



(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



1-0035241

(51)⁸ C07K 14/47; C07K 14/635; A61K 39/00 (13) B

-
- (21) 1-2018-00545 (22) 05/07/2016
(86) PCT/EP2016/065812 05/07/2016 (87) WO 2017/005733 12/01/2017
(30) 62/188,870 06/07/2015 US; 1511792.2 06/07/2015 GB
(45) 25/04/2023 421 (43) 26/04/2018 361A
(73) IMMATICS BIOTECHNOLOGIES GMBH (DE)
Paul-Ehrlich-Strasse 15, 72076 Tuebingen, 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) MUỐI DƯỢC DỤNG CỦA PEPTIT TRONG LIỆU PHÁP MIỄN DỊCH, KHÁNG THỂ, THỤ THỂ TẾ BÀO T, VÀ PHƯƠNG PHÁP TẠO RA PEPTIT, KHÁNG THỂ VÀ THỤ THỂ TẾ BÀO T NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến muối dược dụng của peptit, protein, axit nucleic và tế bào hữu ích trong liệu pháp miễn dịch, cụ thể là liệu pháp miễn dịch điều trị bệnh ung thư. Sáng chế còn đề cập đến epitop peptit của tế bào T liên quan đến khối u, một mình hoặc kết hợp với các peptit liên quan đến khối u khác để có thể dùng làm, ví dụ, thành phần dược chất có hoạt tính của chế phẩm vaccin để kích thích các đáp ứng miễn dịch kháng u, hoặc kích thích các tế bào T *ex vivo* và cấy vào bệnh nhân. Các peptit gắn kết với phân tử của phức hợp tương thích mô chính (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.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến các peptit, protein, axit nucleic và tế bào hữu ích trong liệu pháp miễn dịch, cụ thể là liệu pháp miễn dịch đối với bệnh ung thư. Sáng chế còn đề cập đến epitop peptit của tế bào T liên quan đến khối u, một mình hoặc kết hợp với các peptit liên quan đến khối u khác để có thể dùng làm, ví dụ, thành phần dược chất có hoạt tính của chế phẩm vacxin để kích thích các đáp ứng miễn dịch kháng u, hoặc kích thích các tế bào T *ex vivo* và cấy vào bệnh nhân. Các peptit gắn kết với phân tử của phức hợp tương thích mô chính (major histocompatibility complex: MHC), hoặc các peptit này cũng có thể là đích của kháng thể, thụ thể tế bào T hòa tan, và các phân tử gắn kết khác.

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 vacxin để tạo ra đáp ứng miễn dịch kháng u hoặc làm đích để phát triển các hợp chất và tế bào có hoạt tính dược học/miễn dịch học.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Ung thư thực quản là bệnh ung thư phổ biến thứ tám trên thế giới, năm 2012, số lượng bệnh nhân mắc bệnh này trong năm năm là 464.063 người. Tỷ lệ tử vong gần bằng tỷ lệ mắc bệnh (400.169 ca tử vong so với 455.784 ca mắc bệnh trong năm 2012), điều này chỉ ra rằng tỷ lệ tử vong do bệnh ung thư thực quản cao (World Cancer Report, 2014; Ferlay et al., 2013; Bray et al., 2013).

Bệnh caxinom tế bào vảy và caxinom tuyến là hai kiểu phụ phổ biến nhất của bệnh ung thư thực quản. Cả hai kiểu phụ này đều phổ biến ở nam giới hơn so với ở nữ giới nhưng chúng có sự phân bố theo địa lý khác biệt. Tỷ lệ mắc bệnh caxinom tế bào vảy ở các vùng tài nguyên thấp phổ biến hơn với tỷ lệ mắc bệnh rất cao ở Cộng hòa Hồi giáo Iran, các vùng của Trung Quốc và Zimbabwe. Caxinom tuyến là loại bệnh ung thư thực quản phổ biến nhất trong số những người da trắng và các quần thể có điều kiện kinh tế-xã hội cao, đứng đầu là Vương Quốc Anh, Úc, Hà Lan và Mỹ. Các yếu tố có nguy cơ cao nhất đối với sự phát triển của caxinom tế bào vảy ở thực quản bao gồm

uống rượu và hút thuốc lá, trong khi caxinom tuyến thực quản có liên quan chủ yếu với bệnh béo phì và bệnh trào ngược dạ dày-thực quản. Tỷ lệ mắc bệnh caxinom tuyến thực quản gia tăng đều đặn ở các nước có thu nhập cao, điều này có thể là do tỷ lệ mắc bệnh béo phì và bệnh trào ngược dạ dày-thực quản gia tăng cũng như sự thay đổi về cách phân loại khối u ở đường nối tiếp dạ dày-thực quản. Caxinom thần kinh-nội tiết, caxinom dạng tuyến kén, caxinom tuyến vảy, caxinom u niêm mạc- biểu bì, caxinom tuyến thần kinh-nội tiết hỗn hợp, các bệnh sacom khác và u melanin là kiểu phụ hiếm gặp hơn của bệnh ung thư thực quản (World Cancer Report, 2014).

Chiến lược điều trị chủ yếu đối với bệnh ung thư thực quản phụ thuộc vào giai đoạn khối u và vị trí, loại mô học và tình trạng bệnh của bệnh nhân. Chỉ sử dụng phương pháp phẫu thuật là không đủ, ngoại trừ nhóm phụ nhỏ của các bệnh nhân mắc caxinom tế bào vảy. Nói chung, cần kết hợp phẫu thuật với liệu pháp hóa học trước khi phẫu thuật và thậm chí sau khi phẫu thuật hoặc liệu pháp hóa-xạ trị trước khi phẫu thuật, trong khi phương pháp xạ trị riêng trước sau khi phẫu thuật đã được chứng minh là không tạo ra lợi ích sống còn. Phác đồ hóa trị liệu bao gồm oxaliplatin kết hợp với flouraxil, carboplatin kết hợp với paclitaxel, cisplatin kết hợp với flouraxil, FOLFOX và cisplatin kết hợp irinotecan. Các bệnh nhân có khối u dương tính với HER2 cần được điều trị theo hướng dẫn đối với bệnh ung thư dạ dày bằng cách sử dụng kết hợp cisplatin, flouraxil và trastuzumab, do dữ liệu ngẫu nhiên đối với liệu pháp hướng đích ở bệnh ung thư thực quản rất hạn chế (Stahl et al., 2013; Leitlinie Magenkarzinom, 2012).

Nói chung, phần lớn các loại bệnh ung thư thực quản đều có thể kiểm soát tốt, nếu bệnh nhân có khối u giai đoạn sớm, trong khi sự thành công điều trị trong các giai đoạn sau là rất hạn chế. Do đó, sự phát triển của phương pháp sàng lọc mới có thể rất có hiệu quả trong việc làm giảm tỷ lệ tử vong liên quan đến bệnh ung thư thực quản (World Cancer Report, 2014).

Liệu pháp miễn dịch có thể là phương pháp mới hứa hẹn để điều trị bệnh ung thư thực quản tiến triển. Một số gen liên quan đến bệnh ung thư và các kháng nguyên tinh hoàn liên quan đến bệnh ung thư đã được chứng minh là được biểu hiện quá mức trong bệnh ung thư thực quản, bao gồm các gen MAGE khác nhau là NY-ESO-1 và EpCAM (Kimura et al., 2007; Liang et al., 2005b; Inoue et al., 1995; Bujas et al., 2011; Tanaka et al., 1997; Quillien et al., 1997). Các gen này là đích rất quan tâm của liệu pháp miễn

dịch và phần lớn trong số chúng được đánh giá để điều trị các bệnh ác tính khác (ClinicalTrials.gov, 2015). Hơn nữa, sự điều hòa tăng của PD-L1 và PD-L2 được mô tả trong bệnh ung thư thực quản, có tương quan với tiên lượng xấu đi. Do đó, bệnh nhân ung thư thực quản có khối u dương tính với PD-L1 có thể có lợi từ liệu pháp miễn dịch kháng PD-L1 (Ohigashi et al., 2005).

Hiện nay, dữ liệu lâm sàng đối với phương pháp điều trị miễn dịch trong bệnh ung thư thực quản vẫn tương đối hiếm, do chỉ có số lượng rất hạn chế các thử nghiệm lâm sàng giai đoạn sớm đã được hoàn thành (Toomey et al., 2013). Vacxin gồm ba peptit có nguồn gốc từ ba kháng nguyên tinh hoàn liên quan đến bệnh ung thư khác nhau (protein kinaza TTK, locus K của phức hợp kháng nguyên tế bào lympho 6 và protein 3 gắn kết ARN thông tin của yếu tố sinh trưởng giống như insulin (insulin-like growth factor: IGF)-II) được sử dụng cho bệnh nhân mắc bệnh ung thư thực quản tiến triển trong thử nghiệm pha I có kết quả nhất định (Kono et al., 2009). Phương pháp tiêm tế bào T hoạt hóa qua đường trong khối u sau khi thử nghiệm *in vitro* với các tế bào ác tính tự thân và intolokin 2 tạo ra sự đáp ứng một phần hoặc hoàn toàn với khối u ở 4 trong số 11 bệnh nhân trong thử nghiệm pha I/II (Toh et al., 2000; Toh et al., 2002). Các thử nghiệm lâm sàng khác hiện đang được thực hiện để đánh giá sự ảnh hưởng của các liệu pháp miễn dịch khác nhau đối với bệnh ung thư thực quản, bao gồm cả liệu pháp tế bào thích ứng (NCT01691625, NCT01691664, NCT01795976, NCT02096614, NCT02457650), chiến lược tiêm chủng vacxin (NCT01143545, NCT01522820) và liệu pháp kháng PD-L1 (NCT02340975) (ClinicalTrials.gov, 2015).

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 thực quản 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 thực quản nói riêng, để chẩn đoán bệnh ung thư, đánh giá tiên lượng, và dự đoán sự thành công của việc 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 (tumor

associated antigen: TAA) 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 (cancer-testis: CT) do sự biểu hiện của các thành viên của nó trong các khối u của người khác nhau về mô học và trong số các mô bình thường, chúng chỉ biểu hiện trong tế bào tinh/nguyên bào tinh của tinh hoàn và đôi khi trong nhau thai. Do các tế bào tinh hoàn không biểu hiện phân tử 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 biệt hóa đã biết được phát hiện trong u melanin và tế bào melanin bình thường. Nhiều protein trong số các protein liên quan đến dòng tế bào melanin này tham gia vào quá trình sinh tổng hợp melanin và do đó không đặc hiệu khối u nhưng được sử dụng rộng rãi đối với liệu pháp miễn dịch điều trị bệnh ung thư. Ví dụ về chúng bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, tyrosinaza và Melan-A/MART-1 đối với u melanin hoặc PSA đối với bệnh ung thư tuyến tiền liệt.

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

d) Các kháng nguyên đặc hiệu khối u: các kháng nguyên TAA đặc biệt này là do sự đột biến của 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 để kích thích đáp ứng miễn dịch kháng u (Gnjatic et al., 2003). Ở vị trí khối u, các tế bào T hỗ trợ kích thích cytokin thân thiện với tế bào T gây độc tế bào (cytotoxic T cell: CTL) (Mortara et al., 2006) và thu hút các tế bào hiệu ứng, ví dụ, tế bào CTL, tế bào giết tự nhiên (NK), đại thực bào, tế bào hạt (Hwang et al., 2007).

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

Các peptit kéo dài (dài hơn) theo sáng chế có thể có tác dụng làm các epitop có hoạt tính 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 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 vacxin để kích thích các đáp ứng miễn dịch kháng u.

Như được thể hiện trong các mô hình động vật có vú, ví dụ, chuột, ngay cả khi không có mặt các tế bào lymphô T dương tính với CD8, các tế bào T dương tính với CD4 vẫn đủ để ức chế sự biểu hiện của khối u bằng cách ức chế sự tạo mạch nhờ sự tiết ra interferon-gama (interferon-gamma: IFN γ) (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 (Công bố đơn quốc tế số WO 2007/028574, Bằng độc quyền sáng chế châu Âu số 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 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 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, 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 vacxin 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 này do các tế bào T cùng với thụ thể TCR tương ứng cần có

mặt và không được có sự dung nạp miễn dịch đối với epitop cụ thể này hoặc sự dung nạp này ở mức rất nhỏ. Do đó, theo phương án rất được ưu tiên của sáng chế, điều quan trọng là chỉ chọn lọc các peptit được biểu hiện quá mức hoặc được biểu hiện chọn lọc đối với tế bào T chức năng và/hoặc tăng sinh cần được phát hiện. Tế bào T chức năng này được định nghĩa là tế bào T mà khi kích thích bằng kháng nguyên đặc hiệu, nó có thể được mở rộng về dòng vô tính và có thể thực hiện chức năng hiệu ứng (“tế bào T hiệu ứng”).

Trong trường hợp 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 xuất peptit chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự từ SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 93 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: 93, 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 dung của nó, trong đó peptit này không là polypeptit có chiều dài đầy đủ cơ bản.

Sáng chế còn đề xuất peptit chứa trình tự được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự từ SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 93 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: 93, 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.

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 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	STYGGGLSV	3861, 3868	KRT14, KRT16
2	SLYNLGGSKRISI	3852	KRT5
3	TASAITPSV	3852	KRT5
4	ALFGTILEL	2769	GNA15
5	NLMASQPQL	5317	PKP1
6	LLSGDLIFL	2709	GJB5
7	SIFEGLLSGV	2709	GJB5
8	ALLDGGSEAYWRV	84985	FAM83A
9	HLIAEIHTA	5744	PTHLH
10	SLDENSQQV	6273	S100A2
11	ALWLPTDSATV	3914	LAMB3
12	GLASRILDA	3914	LAMB3
13	SLSPVILGV	26525	IL36RN
14	RLPNAGTQV	3655	ITGA6
15	LLANGVYAA	55107	ANO1
16	VLAEGGEGV	10630	PDPN
17	MISRTPEV	2155, 28396, 3500, 3501, 3502, 3503, 3507	F7, IGHV4-31, IGHG1, IGHG2, IGHG3, IGHG4, IGHM
18	FLLDQVQLGL	83882	TSPAN10
19	GLAPFLNNAV	101060689, 154761, 285966	FAM115C
20	IIEVDPDTKEML	100505503, 402057, 442216, 6218	RPS17L, RPS17P16, RPS17P5, RPS17
21	IVREFLTAL	27297	CRCP
22	KLNDTYVNV	23306	TMEM194A
23	KLSDSATYL		No associated gene
24	LLFAGTMTV	29785	CYP2S1
25	LLPPPPPPA	9509	ADAMTS2

SEQ ID No	Trình tự	(các) GenID	(các) ký hiệu gen chính thức
26	MLAEKLLQA	2195	FAT1
27	NLREGDQLL	113146	AHNAK2
28	SLDGFTIQV	4939	OAS2
29	SLDGTELQL	284114	TMEM102
30	SLNGNQVTV	79832	QSER1
31	VLPKLYVKL	100996747, 441502, 6231, 643003, 644928, 728937, 729188	RPS26P11, RPS26, RPS26P28, RPS26P15, RPS26P25, RPS26P58
32	YMLDIFHEV	3038	HAS3
33	GLDVTSLRPFDL	2316	FLNA
34	SLVSEQLEPA	11187	PKP3
35	LLRFSQDNA	51056	LAP3
36	FLLRFSQDNA	51056	LAP3
37	YTQPFSHYGQAL	6051	RNPEP
38	IAAIRGFLV	83451	ABHD11
39	LVRDTQSGSL	871	SERPINH1
40	GLAFSLYQA	871	SERPINH1
41	GLESEELEPEEL	8106	PABPN1
42	TQTAVITRI	81610	FAM83D
43	KVVGKDYLL	832	CAPZB
44	ATGNDRKEAAENSL	7531	YWHAE
45	MLTELEKAL	6279	S100A8
46	YTAQIGADIAL	64499, 7177	TPSB2, TPSAB1
47	VLASGFLTV	79183	TTPAL
48	SMHQMLDQTL	7168	TPM1
49	GLMKDIVGA	8942	KYNU
50	GMNPHQTPAQL	471	ATIC
51	KLFGHLTSA	57157	PHTF2
52	VAIGGVDGNVRL	9948	WDR1
53	VVVTGLTLV	396	ARHGDIA
54	YQDLLNVKM	1674, 4741, 4744, 4747, 7431, 9118	DES, NEFM, NEFH, NEFL, VIM, INA

SEQ ID No	Trình tự	(các) GenID	(các) ký hiệu gen chính thức
55	GAIDLLHNV	115362	GBP5
56	ALVEVTEHV	54972	TMEM132A
57	GLAPNTPGKA	9055	PRC1
58	LILESIPVV	5597	MAPK6
59	SLLDTLREV	9989	PPP4R1
60	VVMEELLKV	23191	CYFIP1
61	TQTTHELTI	5093	PCBP1
62	ALYEQPLQI	4331	MNAT1
63	LAYTLGVKQL	158078, 1915, 1917	EEF1A1P5, EEF1A1, EEF1A2
64	GLTDVIRDV	80028	FBXL18
65	YVVGGLYQRL	4074	M6PR
66	LLDEKVQSV	57616	TSHZ3
67	SMNGGVFAV	23657	SLC7A11
68	PAVLQSSGLYSL	28396, 3500, 3501, 3502, 3503, 3507	IGHV4-31, IGHG1, IGHG2, IGHG3, IGHG4, IGHM
69	GLLVGSEKVTM	3861, 3868, 644945	KRT14, KRT16, KRT16P3
70	FVLDTSESV	1291, 1292	COL6A1, COL6A2
71	ASDPILYRPVAV	5315	PKM
72	FLPPAQVTV	65083	NOL6
73	KITEAIQYV	6095	RORA
74	ILASLATSV	10844	TUBGCP2
75	GLMDDVDFKA	10525	HYOU1
76	KVADYIPQL	2744	GLS

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
77	VLVPYEPPQV	8626	TP63
78	KVANIIAEV	5910	RAP1GDS1

SEQ ID No.	Trình tự	(các) GenID	(các) ký hiệu gen chính thức
79	GQDVGRYQV	6748	SSR4
80	ALQEALENA	9631	NUP155
81	AVLPHVDQV	23379	KIAA0947
82	HLLGHLEQA	63977	PRDM15
83	ALADGVVSQA	27238	GPKOW
84	SLAESLDQA	22894	DIS3
85	NIIELVHQV	6850	SYK
86	GLLTEIRAV	9263	STK17A
87	FLDNGPKTI	1982	EIF4G2
88	GLWEQENHL	79768	KATNBL1
89	SLADSLYNL	23271	CAMSAP2
90	SIYEEYHAL	3091	HIF1A
91	KLIDDVHRL	6734	SRPR
92	SILRHVAEV	1965	EIF2S1
93	VLINTSVTL	23036	ZNF292

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

SEQ ID No	Trình tự	(các) GenID	(các) ký hiệu gen chính thức
94	TLLQEQGTKTV	286887, 3852, 3853, 3854	KRT6C, KRT5, KRT6A, KRT6B
95	LIQDRVAEV	3914	LAMB3
96	GAAVRIGSVL	9150	CTDP1
97	ELDRTPPEV	23450	SF3B3
98	VLFPNLKTV	646	BNC1
99	RVAPEEHPVL	440915, 60, 641455, 71, 728378	POTEKP, ACTB, POTEM, ACTG1, POTEF
100	GLYPDAFAPV	1991	ELANE
101	AMTQLLAGV	3371	TNC

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 ung thư phổi, bệnh ung thư bàng quang,

bệnh ung thư buồng trứng, u melanin, bệnh ung thư tử cung, bệnh ung thư tế bào gan, bệnh ung thư tế bào thận, bệnh ung thư não, bệnh ung thư kết-trực tràng, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư tụy, bệnh ung thư túi mật, bệnh ung thư ống mật chủ, bệnh ung thư tuyến tiền liệt và bệnh bạch cầu.

Được đặc biệt ưu tiên là các peptit – một mình hoặc kết hợp - theo sáng chế được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự từ SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 93. Được ưu tiên hơn là các peptit – một mình hoặc kết hợp - được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự từ SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 76 (xem bảng 1), và sử dụng chúng trong liệu pháp miễn dịch điều trị bệnh ung thư thực quản, bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư bàng quang, bệnh ung thư buồng trứng, u melanin, bệnh ung thư tử cung, bệnh ung thư tế bào gan, bệnh ung thư tế bào thận, bệnh ung thư não, bệnh ung thư kết-trực tràng, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư tụy, bệnh ung thư túi mật, bệnh ung thư ống mật chủ, bệnh ung thư tuyến tiền liệt và bệnh bạch cầu, và tốt hơn nếu là bệnh ung thư thực quản.

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 SEQ ID No. 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 25, 26, 30, 32, 34, 37, 40, 51, 55, 57, 58, 59, 62, 81, và 82, và sử dụng chúng trong liệu pháp miễn dịch điều trị bệnh ung thư thực quản, bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư bàng quang, bệnh ung thư buồng trứng, u melanin, bệnh ung thư tử cung, bệnh ung thư tế bào gan, bệnh ung thư tế bào thận, bệnh ung thư não, bệnh ung thư kết-trực tràng, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư tụy, bệnh ung thư túi mật, bệnh ung thư ống mật chủ, bệnh ung thư tuyến tiền liệt và bệnh bạch cầu, và tốt hơn nếu là bệnh ung thư thực quản. Được đặc biệt ưu tiên hơn là peptit có trình tự SEQ ID NO: 9.

Như được thể hiện trong Bảng 4A sau đây, nhiều peptit theo sáng chế cũng được tìm thấy trên các loại khối u khác và do đó, cũng có thể được sử dụng trong liệu pháp miễn dịch điều trị các triệu chứng khác. Xem thêm trên Fig.1 và 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, tá tràng, thực quản, túi mật, tim, thận, gan, phổi, hạch bạch huyết, tế bào bạch cầu đơn nhân, tụy, dây thần kinh ngoại vi, màng bụng, tuyến yên, màng phổi, trực tràng, tuyến nước bọt, cơ xương, 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
2	SLYNLGGSKRISI	NSCLC
3	TASAITPSV	NSCLC, bệnh ung thư bàng quang
4	ALFGTILEL	NSCLC
7	SIFEGLLSGV	Bệnh ung thư bàng quang
8	ALLDGGSEAYWRV	NSCLC, OC
9	HLIAEIHTA	NSCLC
11	ALWLPTDSATV	NSCLC, u melanin
12	GLASRILDA	Bệnh ung thư bàng quang
13	SLSPVILGV	Bệnh ung thư tử cung
15	LLANGVYAA	HCC
17	MISRTPEV	NSCLC, RCC, HCC
22	KLNDTYVNV	SCLC, bệnh ung thư não, HCC
26	MLAEKLLQA	CRC
29	SLDGTELQL	BRCA
31	VLPKLYVKL	GC
32	YMLDIFHEV	Bệnh ung thư bàng quang
33	GLDVTSLRPFDL	GC
34	SLVSEQLEPA	CRC, bệnh ung thư bàng quang
35	LLRFSQDNA	GC, HCC
36	FLLRFSQDNA	GC
37	YTQPF SHYGQAL	GC, PC
38	IAAIRGFLV	GC
39	LVRDTQSGSL	GC
40	GLAFSLYQA	NSCLC, PC, BRCA, bệnh ung thư bàng quang

SEQ ID No.	Trình tự	Các bệnh/cơ quan liên quan khác
41	GLESEEELEPEEL	GC
42	TQTAVITRI	GC
45	MLTELEKAL	GC
46	YTAQIGADIAL	GC
47	VLASGFLTV	Bệnh ung thư bàng quang
49	GLMKDIVGA	HCC
50	GMNPHQTPAQL	GC
51	KLFGHLTSA	Bệnh ung thư túi mật, bệnh ung thư ống mật chủ
52	VAIGGVDGNVRL	GC
54	YQDLLNVKM	RCC, GC
55	GAIDLLHNV	GC
56	ALVEVTEHV	BRCA
57	GLAPNTPGKA	NSCLC, SCLC, BRCA, u melanin
58	LILESIPVV	NSCLC, u melanin
61	TQTTHELTI	SCLC, bệnh bạch cầu
62	ALYEYQPLQI	NSCLC, HCC, bệnh ung thư bàng quang
63	LAYTLGVKQL	GC
66	LLDEKVQSV	Bệnh ung thư não, u melanin
67	SMNGGVFAV	Bệnh ung thư não, HCC
68	PAVLQSSGLYSL	GC, PC
69	GLLVGSEKVTM	PC
70	FVLDTSESV	GC, HCC, u melanin, OC
71	ASDPILYRPVAV	GC, PC
72	FLPPAQVTV	NSCLC, GC, HCC, bệnh bạch cầu, u melanin
73	KITEAIQYV	BRCA
74	ILASLATSV	CRC, HCC, bệnh ung thư bàng quang
75	GLMDDVDFKA	BRCA, u melanin, bệnh ung thư bàng quang

SEQ ID No.	Trình tự	Các bệnh/cơ quan liên quan khác
76	KVADYIPQL	NSCLC, SCLC
77	VLVPYEPPQV	NSCLC, bệnh ung thư bàng quang
78	KVANIIEV	PC, bệnh bạch cầu, OC
80	ALQEALENA	NSCLC, SCLC, bệnh ung thư não, CRC, HCC, bệnh bạch cầu, BRCA, OC
81	AVLPHVDQV	Bệnh ung thư não
82	HLLGHLEQA	NSCLC, HCC, bệnh bạch cầu, BRCA
83	ALADGVVSQA	Bệnh ung thư não, GC, u melanin, bệnh ung thư bàng quang
85	NIIELVHQV	Bệnh bạch cầu
86	GLLTEIRAV	Bệnh ung thư não, bệnh ung thư bàng quang
87	FLDNGPKTI	Bệnh ung thư não, PC, OC
88	GLWEQENHL	NSCLC, BRCA
89	SLADSLYNL	Bệnh ung thư não, BRCA, bệnh ung thư bàng quang, bệnh ung thư túi mật, bệnh ung thư ống mật chủ
91	KLIDDVHRL	PC, PrC
92	SILRHVAEV	NSCLC, CRC, HCC, bệnh ung thư túi mật, bệnh ung thư ống mật chủ
94	TLLQEQGTKTV	NSCLC
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 rectal 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		

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 (phần sửa đổi của Bảng 4). Bảng này cho thấy rằng, giống như Bảng 4A, đối với peptit được chọn mà trên các loại khối u bỏ

sung chúng được phát hiện là có sự biểu hiện quá mức (bao gồm cả sự biểu hiện đặc hiệu) đối với trên 5% các mẫu khối u được xác định, hoặc 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, tá tràng, thực quản, mắt, túi mật, tim, thận, gan, phổi, hạch bạch huyết, tế bào bạch cầu đơn nhân, tụy, tuyến cận giáp, dây thần kinh ngoại vi, màng bụng, tuyến yên, màng phổi, trực tràng, tuyến nước bọt, cơ xương, da, ruột non, lách, dạ dày, tuyến giáp, khí quản, niệu quản, bàng quang, tĩnh mạch.

SEQ ID No	Trình tự	Các thực thể bổ sung
1	STYGGGLSV	NSCLC, u melanin, HNSCC
2	SLYNLGGSKRISI	Bệnh ung thư bàng quang, HNSCC
3	TASAITPSV	HNSCC
4	ALFGTILEL	Bệnh ung thư bàng quang, bệnh ung thư túi mật, bệnh ung thư ống mật chủ, AML, HNSCC
5	NLMASQPQL	HNSCC
6	LLSGDLIFL	HNSCC
7	SIFEGLLSGV	NSCLC, bệnh ung thư túi mật, bệnh ung thư ống mật chủ, HNSCC
8	ALLDGGSEAYWRV	Bệnh ung thư bàng quang, HNSCC
10	SLDENSQQV	Bệnh ung thư bàng quang, HNSCC
11	ALWLPTDSATV	Bệnh ung thư túi mật, bệnh ung thư ống mật chủ
13	SLSPVILGV	NSCLC, u melanin, bệnh ung thư bàng quang, HNSCC
14	RLPNAGTQV	U melanin
15	LLANGVYAA	Bệnh ung thư bàng quang, bệnh ung thư tử cung, bệnh ung thư túi mật, bệnh ung thư ống mật chủ
16	VLAEGGEGV	Bệnh ung thư não, u melanin, bệnh ung thư túi

SEQ ID No	Trình tự	Các thực thể bổ sung
		mật, bệnh ung thư ống mật chủ, HNSCC
17	MISRTPEV	Bệnh ung thư bàng quang
18	FLLDQVQLGL	U melanin, NHL, HNSCC
19	GLAPFLLNAV	U melanin, NHL, HNSCC
20	IIEVDPDTKEML	HNSCC
22	KLNDTYVNV	BRCA
23	KLSDSATYL	U melanin
25	LLPPPPPPA	Bệnh ung thư túi mật, bệnh ung thư ống mật chủ, NHL, HNSCC
28	SLDGFTIQV	BRCA, u melanin, AML
29	SLDGTELQL	Bệnh ung thư tử cung, NHL
30	SLNGNQVTV	BRCA, u melanin, bệnh ung thư bàng quang, bệnh ung thư tử cung, bệnh ung thư túi mật, bệnh ung thư ống mật chủ, HNSCC
32	YMLDIFHEV	Bệnh ung thư túi mật, bệnh ung thư ống mật chủ, HNSCC
34	SLVSEQLEPA	HNSCC
40	GLAFSLYQA	CRC, u melanin, bệnh ung thư tử cung, bệnh ung thư túi mật, bệnh ung thư ống mật chủ, HNSCC
42	TQTAVITRI	HNSCC
48	SMHQMLDQTL	GC
51	KLFGHLTSA	Bệnh ung thư túi mật, bệnh ung thư ống mật chủ
53	VVVTGLTLV	GC, bệnh ung thư bàng quang
55	GAIDLLHNV	SCLC, u melanin, NHL
56	ALVEVTEHV	RCC, bệnh ung thư tử cung, bệnh ung thư túi mật, bệnh ung thư ống mật chủ
57	GLAPNTPGKA	Bệnh ung thư bàng quang, bệnh ung thư tử cung, HNSCC

SEQ ID No	Trình tự	Các thực thể bổ sung
58	LILESIPVV	SCLC, CLL, bệnh ung thư bàng quang, bệnh ung thư tử cung, NHL, HNSCC
59	SLLDTLREV	HNSCC
62	ALYEYQPLQI	SCLC, BRCA, u melanin, OC, bệnh ung thư túi mật, bệnh ung thư ống mật chủ, NHL
66	LLDEKVQSV	Bệnh ung thư bàng quang, HNSCC
67	SMNGGVFAV	NSCLC, bệnh ung thư túi mật, bệnh ung thư ống mật chủ, HNSCC
68	PAVLQSSGLYSL	NHL
69	GLLVGSEKVTM	HNSCC
72	FLPPAQVTV	CLL, bệnh ung thư bàng quang, bệnh ung thư túi mật, bệnh ung thư ống mật chủ, HNSCC
74	ILASLATSV	BRCA, HNSCC
75	GLMDDVDFKA	GC, HCC, bệnh ung thư túi mật, bệnh ung thư ống mật chủ, NHL, HNSCC
76	KVADYIPQL	RCC, BRCA, u melanin, bệnh ung thư túi mật, bệnh ung thư ống mật chủ, NHL
77	VLVPYEPPQV	NHL, HNSCC
78	KVANIIAEV	Bệnh ung thư bàng quang, HNSCC
79	GQDVGRYQV	SCLC, PC, PrC, CLL, BRCA, OC, bệnh ung thư bàng quang, AML, NHL
80	ALQEALENA	U melanin, bệnh ung thư tử cung, bệnh ung thư túi mật, bệnh ung thư ống mật chủ, HNSCC
81	AVLPHVDQV	Bệnh ung thư tử cung, NHL
82	HLLGHLEQA	RCC
83	ALADGVVSQA	Bệnh ung thư tử cung
84	SLAESLDQA	U melanin, bệnh ung thư tử cung, AML, NHL, HNSCC
85	NIIELVHQV	CLL
86	GLLTEIRAV	U melanin, bệnh ung thư túi mật, bệnh ung thư

SEQ ID No	Trình tự	Các thực thể bổ sung
		ống mật chủ, AML, NHL, HNSCC
87	FLDNGPKTI	Bệnh ung thư bàng quang, HNSCC
88	GLWEQENHL	CRC, bệnh ung thư tử cung, AML, HNSCC
89	SLADSLYNL	U melanin
90	SIYEYYHAL	NHL, HNSCC
92	SILRHVAEV	BRCA, u melanin, AML, NHL

NSCLC= bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ, SCLC= bệnh ung thư phổi tế bào nhỏ, RCC= bệnh ung thư thận, CRC= bệnh ung thư ruột kết hoặc trực tràng, GC= bệnh ung thư dạ dày, HCC= bệnh ung thư gan, PC= bệnh ung thư tụy, PrC= bệnh ung thư tuyến tiền liệt, BRCA=bệnh ung thư vú, OC (ovarian cancer) = bệnh ung thư buồng trứng, NHL (non-Hodgkin lymphoma) = u lymphô không Hodgkin, AML (acute myeloid leukemia) = bệnh bạch cầu tủy bào cấp tính, CLL (chronic lymphocytic leukemia) = bệnh bạch cầu dạng lymphô mạn tính, HNSCC (head and neck squamous cell carcinoma) = caxinom tế bào vảy 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, 4, 7, 8, 9, 11, 13, 17, 40, 57, 58, 62, 67, 72, 76, 77, 80, 82, 88, 92 và 94 để – theo một phương án được ưu tiên kết hợp - điều trị bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ.

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. 18, 19, 25, 29, 55, 58, 62, 68, 75, 76, 77, 79, 81, 84, 86, 90, và 92 để – theo một phương án được ưu tiên kết hợp - điều trị u lymphô.

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. 22, 55, 58, 62, 57, 61, 76, 79 và 80 để – theo một phương án được ưu tiên kết hợp - điều trị bệnh ung thư phổi tế bào nhỏ.

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. 17, 56, 76, 82, và 54 để – theo một phương án được ưu tiên kết hợp - điều trị bệnh ung thư tế bào thận.

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. 16, 22, 66, 67, 80, 81, 83,

86, 87 và 89 để – theo một phương án được ưu tiên kết hợp - 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. 31, 33, 35, 36, 37, 38, 39, 41, 42, 45, 46, 48, 50, 52, 53, 54, 55, 63, 68, 70, 75 và 71 để – theo một phương án được ưu tiên kết hợp - điều trị bệnh ung thư dạ dày.

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. 26, 34, 40, 74, 80, 88, và 92 để – theo một phương án được ưu tiên kết hợp - điều trị bệnh ung thư kết-trực tràng.

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. 15, 17, 22, 35, 49, 62, 67, 70, 72, 74, 75, 80, 82 và 92 để – theo một phương án được ưu tiên kết hợp - điều trị bệnh ung thư tế bào gan.

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. 37, 40, 68, 69, 71, 78, 79, 87 và 91 để – theo một phương án được ưu tiên kết hợp - điều trị bệnh ung thư tụy.

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. 79, và 91 để – theo một phương án được ưu tiên kết hợp - điều trị bệnh ung thư tuyến tiền liệt.

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. 4, 28, 58, 61, 72, 78, 79, 80, 82, 84, 86, 88, 92, và 85 để – theo một phương án được ưu tiên kết hợp - điều trị bệnh bạch cầu.

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. 22, 28, 29, 30, 40, 56, 57, 62, 73, 74, 75, 76, 79, 80, 82, 88, 92 và 89 để – theo một phương án được ưu tiên kết hợp - điều trị bệnh ung thư vú.

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, 13, 14, 11, 16, 18, 19, 23, 28, 30, 40, 55, 57, 58, 62, 66, 70, 72, 75, 76, 80, 84, 86, 89, 92, và 83 để – theo một phương án được ưu tiên kết hợp - 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. 8, 62, 70, 78, 79, 80 và 87

để – theo một phương án được ưu tiên kết hợp - điều trị bệnh ung thư buồng trứng.

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, 4, 7, 8, 10, 12, 13, 15, 17, 30, 32, 34, 40, 47, 53, 57, 58, 62, 66, 72, 74, 75, 77, 78, 79, 83, 86, 87, và 89 để – theo một phương án được ưu tiên kết hợp - 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. 13, 15, 29, 30, 40, 56, 57, 58, 80, 81, 83, 84, và 88 để – theo một phương án được ưu tiên kết hợp - điều trị bệnh ung thư tử cung.

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. 4, 7, 11, 15, 16, 25, 30, 32, 40, 51, 56, 62, 67, 72, 75, 76, 80, 86, 89 và 92 để – theo một phương án được ưu tiên kết hợp - điều trị bệnh ung thư túi mật và 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. SEQ ID No 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 13, 16, 18, 19, 20, 25, 30, 32, 34, 40, 42, 57, 58, 59, 66, 67, 69, 72, 74, 75, 77, 78, 80, 84, 86, 87, 88, và 90 để – theo một phương án được ưu tiên kết hợp - điều trị caxinom tế bào vảy vùng đầu và cổ (HNSCC).

Do đó, theo khía cạnh khác, sáng chế mô tả việc sử dụng các peptit theo sáng chế để - tốt hơn là được kết hợp - điều trị bệnh tăng sinh được chọn từ nhóm bao gồm bệnh ung thư thực quản, bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư bàng quang, bệnh ung thư buồng trứng, u melanin, bệnh ung thư tử cung, bệnh ung thư tế bào gan, bệnh ung thư tế bào thận, bệnh ung thư não, bệnh ung thư kết-trực tràng, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư tụy, bệnh ung thư túi mật, bệnh ung thư ống mật chủ, bệnh ung thư tuyến tiền liệt và bệnh bạch cầu.

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 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: 93.

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 xuất 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 các 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 xuất tế bào chủ theo sáng chế là tế bào trình diện kháng nguyên, và tốt hơn nếu là tế bào đuôi gai.

Sáng chế còn đề 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.: 93, tốt hơn là có các trình tự từ SEQ ID No. 1 đến SEQ ID No. 76, 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 lượng hữu hiệu của các tế bào T như được tạo ra theo sáng chế.

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 thực quản, ung thư phổi, ung thư bàng quang, ung thư buồng trứng, u melanin, ung thư tử cung, ung thư tế bào gan, ung thư tế bào thận, ung thư não, ung thư kết-trực tràng, ung thư vú, ung thư dạ dày, ung thư tụy, ung thư túi mật, ung thư ống mật chủ, ung thư tuyến tiền liệt và bệnh bạch cầu, và tốt hơn nếu là các tế bào ung thư thực quản.

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 thực quản. Dấu ấn này có thể là sự biểu hiện quá mức của chính (các) peptit, hoặc sự biểu hiện quá mức của (các) gen tương ứng. Các dấu ấn này cũng có thể được sử dụng để dự đoán xác suất thành công của việc điều trị, tốt hơn nếu là liệu pháp miễn dịch, và được ưu tiên nhất là liệu pháp miễn dịch hướng cùng đích được xác định bằng dấu ấn sinh học này. Ví dụ, kháng thể hoặc thụ thể TCR hòa tan có thể được sử dụng để nhuộm các mẫu khối u để phát hiện sự có mặt của peptit quan tâm trong phức hợp với MHC.

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

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

ARN 1 đối nghĩa của ABHD11 (ABHD11-AS1) được mô tả là ARN không mã hóa mạch dài đã được chứng minh là được điều hòa tăng trong bệnh ung thư dạ dày và có liên quan với sự biệt hóa và sự phân loại mô học Lauren. Do đó, ABHD11-AS1 có thể là dấu ấn sinh học tiềm năng để chẩn đoán bệnh ung thư dạ dày (Lin et al., 2014). Hoạt tính của ABHD11 đã được chứng minh là có liên quan với sự phát triển tình trạng di căn xa trong caxinom tuyến phổi và do đó có thể là dấu ấn sinh học tiềm năng mới (Wiedl et al., 2011).

ADAMTS2 đã được chứng minh là bị rối loạn điều hòa ở bệnh nhân mắc bệnh bạch cầu cấp tính kiểu hình hỗn hợp tế bào T/tủy bào (Tota et al., 2014). ADAMTS2 được mô tả là có liên quan với con đường JNK khi điều hòa tăng thông qua IL-6 trong các tế bào sácôm xương (Alper and Kockar, 2014). ADAMTS2 có thể là dấu ấn chẩn đoán tiềm năng của bệnh ung thư tuyến giáp dạng nang (Fontaine et al., 2009). ADAMTS2 được mô tả là dấu ấn tiềm năng của sự di căn trong caxinom tế bào vảy ở lưỡi (Carinci et al., 2005). ADAMTS2 đã được chứng minh là được điều hòa tăng trong caxinom tế bào thận và có liên quan với sự sống của bệnh nhân ngắn hơn (Roemer et al., 2004). ADAMTS2 đã được chứng minh là được điều hòa bởi sự tăng sinh của tế bào liên quan đến yếu tố phát triển biến đổi - beta 1 (Wang et al., 2003).

AHNAK2 mã hóa nucleoprotein 2 của protein khung AHNAK (Marg et al., 2010). AHNAK2 là thành phần quan trọng của con đường tiết ra yếu tố phát triển nguyên bào sợi 1 (fibroblast growth factor 1: FGF1) không kinh điển, yếu tố liên quan đến sự phát triển và xâm lấn của khối u (Kirov et al., 2015).

ANO1 mã hóa anoctamin 1, kênh clorua hoạt hóa canxi có liên quan với sácôm ruột non và bệnh ung thư miệng (RefSeq, 2002). ANO1 được khuếch đại trong bệnh ung thư tế bào vảy thực quản (esophageal squamous cell cancer: ESCC), khối u mô đỡ dạ dày-ruột (gastrointestinal stromal tumor: GIST), caxinom tế bào vảy vùng đầu và cổ (HNSCC), bệnh ung thư tụy và bệnh ung thư vú (Qu et al., 2014).

ARHGDI1 đã được chứng minh là được điều hòa giảm trong caxinom tế bào gan và khi phát triển bệnh ung thư vú (Liang et al., 2014; Bozza et al., 2015). ARHGDI1 đã

được chứng minh là có liên quan với sự xâm lấn của khối u, sự di căn, thời gian sống thêm toàn bộ và thời gian đến khi tái phát bệnh trong caxinom tế bào gan. Do đó, ARHGDIA có thể tạo ra đích điều trị tiềm năng cho caxinom tế bào gan (Liang et al., 2014). ARHGDIA đã được chứng minh là được điều hòa giảm trong dòng tế bào ung thư phổi A549 khi điều trị bằng periplocin. Do đó, sự phát triển của các tế bào ung thư phổi bị ức chế bởi periplocin có thể có liên quan với ARHGDIA (Lu et al., 2014). Sự ức chế ARHGDIA đã được chứng minh là có liên quan với mức độ chết tế bào theo chương trình tăng lên trong các tế bào bình thường có nguồn gốc từ phổi và các tế bào khối u được nuôi cấy. Do đó, ARHGDIA được mô tả là chất điều hòa âm tính của sự chết tế bào theo chương trình, quá trình này có thể là đích điều trị tiềm năng (Gordon et al., 2011). ARHGDIA được mô tả là có liên quan với tế bào sáng ở buồng trứng và sự phát triển giai đoạn của caxinom thể thanh dịch mức độ cao (Canet et al., 2011). ARHGDIA được mô tả là gen liên quan đến con đường gây chết tế bào theo chương trình đã được chứng minh là được điều hòa giảm trong các tế bào sacom sợi HT1080 khi có sự chết tế bào theo chương trình qua trung gian TRAIL (Daigeler et al., 2008). ARHGDIA đã được chứng minh là được điều hòa tăng trong dòng tế bào ung thư ruột kết THC8307/L-OHP kháng oxaliplatin và được mô tả là gen liên quan đến sự kháng lại quá trình gây chết tế bào theo chương trình. Do đó, ARHGDIA có thể là dấu ấn tiềm năng có liên quan với tính miễn cảm oxaliplatin (Tang et al., 2007). Sự biểu hiện quá mức ARHGDIA đã được chứng minh là được điều hòa bởi gen ức chế khối u giả định ACVR2, thành viên của họ TGFBR2 liên quan đến bệnh ung thư, trong kiểu đại ACVR2 được chuyển nhiễm bằng dòng tế bào ung thư ruột kết MSI-H mang sự đột biến xô dịch khung ACVR2 (Deacu et al., 2004). ARHGDIA được mô tả là chất điều hòa quan trọng của enzym Rho GTPaza. Việc làm cạn kiệt ARHGDIA đã được chứng minh là gây ra sự hoạt hóa cơ định của Rho GTPaza và con đường COX-2 liên quan với sự tiến triển bệnh ung thư vú trong mô hình động vật có mô ghép khác loài của bệnh ung thư vú (Bozza et al., 2015). Sự truyền tín hiệu ARHGDIA đã được chứng minh là được điều hòa giảm trong bệnh ung thư kết-trực tràng (Sethi et al., 2015). ARHGDIA đã được chứng minh là hướng đích MEK1/2-Erk khi SUMOyl hóa, quá trình này có liên quan đến sự ức chế C-Jun/AP-1, sự phiên mã cyclin d1, và sự tiến triển của chu trình tế bào. Do đó, ARHGDIA có liên quan đến sự ức chế quá trình phát triển của tế bào ung thư (Cao et al., 2014). ARHGDIA được mô tả là gen ức chế mới trong bệnh ung thư tuyến tiền liệt, chất này có thể đóng vai trò quan trọng

trong việc điều hòa sự truyền tín hiệu của thụ thể androgen và sự phát triển và tiến triển bệnh ung thư tuyến tiền liệt (Zhu et al., 2013b).

ATIC được mô tả là đối tác dung hợp gen tiềm năng của kinaza trong u lymphô thể thoái biến liên quan đến bệnh ung thư trong u lymphô tế bào lớn thể thoái biến (Cheuk and Chan, 2001). ATIC đã được chứng minh là được biểu hiện khi dung hợp thể khảm với ALK trong khối u nguyên bào sợi cơ viêm của bàng quang (Debiec-Rychter et al., 2003). Sự ức chế hoạt tính aminoimidazol carboxyamit ribonucleotit transformylaza (aminoimidazole carboxamide ribonucleotide transformylase: AICAR) của ATIC trong dòng tế bào ung thư vú theo mô hình đã được chứng minh là dẫn đến sự giảm phụ thuộc liều của số lượng tế bào và tốc độ phân chia tế bào. Do đó, ATIC có thể là đích tiềm năng trong liệu pháp điều trị bệnh ung thư (Spurr et al., 2012).

CAPZB đã được thông báo là biểu hiện quá mức trong caxinom tế bào vảy ở miệng dương tính với virus u nhú ở người typ 18 và được xác định làm locus tính miễn cảm của bệnh ung thư tuyến tiền liệt (Lo et al., 2007; Nwosu et al., 2001).

COL6A1 được điều hòa tăng trong mô đỡ có hoạt tính của bệnh ung thư tuyến tiền liệt kháng phẫu thuật cắt bỏ và kích thích sự phát triển của khối u (Zhu et al., 2015). COL6A1 được biểu hiện quá mức ở các tế bào ung thư tụy CD166 cho thấy hoạt tính xâm lấn và di trú mạnh hơn các hoạt tính này của các tế bào ung thư CD166+ (Fujiwara et al., 2014). COL6A1 được biểu hiện ở mức cao trong bệnh di căn xương (Blanco et al., 2012). COL6A1 được phát hiện là được điều hòa tăng ở bệnh ung thư cổ tử cung và bệnh ung thư buồng trứng (Zhao et al., 2011; Parker et al., 2009). COL6A1 được biểu hiện khác biệt ở u tế bào hình sao và u nguyên bào xóp (Fujita et al., 2008).

COL6A2 có liên quan đến bệnh ung thư cổ tử cung, thời gian sống thêm toàn bộ ngắn trong bệnh ung thư buồng trứng thể thanh dịch mức độ cao, bệnh bạch cầu dạng lymphô cấp tính tiền tế bào B, caxinom tế bào gan, các khối u não nguyên phát và di căn, caxinom tế bào vảy của phổi, caxinom tế bào vảy vùng đầu và cổ và được mô tả là quá trình metyl hóa ADN tiềm năng đối với bệnh ung thư cổ tử cung (Cheon et al., 2014; Chen et al., 2014d; Vachani et al., 2007; Liu et al., 2010; Seong et al., 2012; Hogan et al., 2011).

CYFIP1 đã được chứng minh là được điều hòa giảm trong quá trình xâm lấn của khối u biểu mô (Silva et al., 2009). Sự điều hòa giảm CYFIP1 có liên quan đến tiên lượng xấu trong khối u biểu mô (Silva et al., 2009).

CYP2S1 đã được chứng minh là điều hòa sự phát triển của bệnh ung thư kết-trực tràng trong dòng tế bào HCT116 thông qua sự liên quan với quá trình hoạt hóa qua trung gian PGE2 của sự truyền tín hiệu β -catenin (Yang et al., 2015b). CYP2S1 được mô tả là được điều hòa tăng trong các bệnh ung thư có nguồn gốc từ đa biểu mô và trong các tế bào khối u có sự giảm oxy không khí hít vào (Nishida et al., 2010; Madanayake et al., 2013). Việc làm cạn kiệt CYP2S1 trong các dòng tế bào biểu mô phế quản đã được chứng minh là dẫn đến sự điều hòa được thay đổi trong các con đường quan trọng liên quan đến sự tăng sinh và sự di trú của tế bào như con đường truyền tín hiệu mTOR (Madanayake et al., 2013). Việc làm cạn kiệt CYP2S1 đã được chứng minh là có liên quan với tính miễn cảm được chất trong bệnh ung thư kết-trực tràng và bệnh ung thư vú (Tan et al., 2011). CYP2S1 đã được chứng minh là có tương quan với sự sống trong bệnh ung thư vú và có liên quan đến tiên lượng xấu trong bệnh ung thư kết-trực tràng (Murray et al., 2010; Kumarakulasingham et al., 2005). CYP2S1 đã được chứng minh là chuyển hóa BaP-7,8-diol thành hợp chất benzo[a]pyren-r-7,t-8-dihydrodiol-t-9,10-epoxit gây đột biến và gây ung thư ở mức cao và do đó có thể đóng vai trò quan trọng trong sự gây ung thư do benzo[a]pyren gây ra (Bui et al., 2009). CYP2S1 đã được chứng minh là được điều hòa tăng đáng kể trong sự di căn bệnh ung thư buồng trứng so với bệnh ung thư buồng trứng nguyên phát (Downie et al., 2005).

Sự biểu hiện DES trong mô đờ bệnh ung thư kết-trực tràng đã được chứng minh là có tương quan với bệnh có giai đoạn tiến triển (Arentz et al., 2011). DES đã được chứng minh là được điều hòa tăng trong bệnh ung thư kết-trực tràng (Ma et al., 2009). DES đã được chứng minh là có liên quan với mức độ nặng của bệnh và sự biệt hóa của bệnh ung thư kết-trực tràng và tỷ lệ sống giảm (Ma et al., 2009). DES được mô tả là dấu ấn khối u tiềm năng trong huyết thanh của bào thai ung thư của bệnh ung thư kết-trực tràng (Ma et al., 2009). DES đã được chứng minh là dấu ấn đặc hiệu của sacom cơ vân (Altmannsberger et al., 1985). DES được mô tả là một trong ba thành phần của nhóm protein có thể có khả năng hữu ích đối với việc xác định giai đoạn của caxinom bàng quang bằng cách sử dụng phương pháp miễn dịch mô hóa học (Council and Hameed, 2009).

DIS3 đã được chứng minh là thường được đột biến trong bệnh đa u tủy và được đột biến theo chu kỳ trong bệnh bạch cầu tủy bào cấp tính (Ding et al., 2012; Lohr et al., 2014). Các đột biến DIS3 trong bệnh đa u tủy đã được chứng minh là có liên quan với

thời gian sống thêm toàn bộ trung bình ngắn hơn. Các đột biến trong dòng phụ nhỏ đã được chứng minh là có liên quan đến sự đáp ứng với liệu pháp kém hơn so với bệnh nhân có các đột biến DIS3 trong dòng chính (Weissbach et al., 2015). DIS3 đã được chứng minh là được điều hòa tăng trong caxinom kết-trục tràng thông qua đoạn 13q. Sự làm bất hoạt DIS3 đã được chứng minh là ảnh hưởng đến các đặc tính tạo khối u quan trọng như khả năng sống, sự di trú và sự xâm lấn. Do đó, DIS3 có thể là gen gây ung thư ứng viên mới góp phần vào sự tiến triển của bệnh ung thư kết-trục tràng (de Groen et al., 2014). DIS3 được mô tả là một phần của nhóm gen có thể được sử dụng kết hợp với dấu ấn sinh học trên cơ sở nồng độ protein trong huyết tương để cho phép chẩn đoán sớm hơn bệnh ung thư buồng trứng biểu mô (Pils et al., 2013). DIS3 có thể là gen ứng viên tiềm năng của tính miễn cảm với bệnh ung thư vú do phát hiện được nhiều hiện tượng đa hình khi sàng lọc đột biến ở họ bệnh ung thư vú (Rozenblum et al., 2002).

EEF1A1 đã được chứng minh là được điều hòa tăng trong các thực thể bệnh ung thư khác nhau, bao gồm bệnh ung thư kết-trục tràng, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, u nguyên bào xốp và caxinom tế bào vảy và được mô tả là dấu ấn sinh học tiềm năng trong huyết thanh đối với bệnh ung thư tuyến tiền liệt (Lim et al., 2011; Qi et al., 2005; Matassa et al., 2013; Vui-Kee et al., 2012; Kuramitsu et al., 2010; Kido et al., 2010; Scrideli et al., 2008; Rehman et al., 2012). Về mặt cơ chế, EEF1A1 ức chế sự chết tế bào theo chương trình thông qua sự tương tác với p53 và p73, kích thích sự tăng sinh nhờ sự ức chế phiên mã của chất ức chế chu trình tế bào p21 và tham gia vào việc điều hòa sự chuyển tiếp biểu mô-mô giữa (Blanch et al., 2013; Choi et al., 2009; Hussey et al., 2011).

EEF1A2 được mô tả là được điều hòa tăng trong bệnh ung thư vú, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư tụy, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư tuyến tiền liệt và caxinom tế bào thận chuyển dịch TFE3 (Pflueger et al., 2013; Sun et al., 2014; Yang et al., 2015c; Zang et al., 2015; Abbas et al., 2015). EEF1A2 đã được chứng minh là có liên quan với tiên lượng xấu ở bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư dạ dày, caxinom tuyến ống tụy và caxinom tuyến phổi (Duanmin et al., 2013; Yang et al., 2015c; Li et al., 2006; Lee and Surh, 2009). EEF1A2 được mô tả là có liên quan với gen gây ung thư do nó kích thích sự truyền tín hiệu phospholipit và hoạt hóa sự di trú của tế bào phụ thuộc Akt và sự tái mô hình hóa actin mà sau đó các quá trình này sẽ kích thích sự tạo khối u (Abbas et al., 2015). EEF1A2 được mô tả là ức chế chức năng của p53

trong caxinom tế bào gan bằng cách làm ổn định MDM4 phụ thuộc PI3K/AKT/mTOR. Sự hoạt hóa mạnh con đường truyền tín hiệu EEf1A2/PI3K/AKT/mTOR/MDM4 đã được chứng minh là có liên quan với thời gian sống ngắn trong caxinom tế bào gan và do đó có thể là đích của liệu pháp dùng cho tập hợp nhỏ bệnh nhân (Longerich, 2014). EEf1A2 đã được chứng minh là có liên quan với giai đoạn TNM, tính xâm lấn và sự sống ở bệnh nhân ung thư tụy. Do đó, EEf1A2 có thể là đích tiềm năng để điều trị bệnh ung thư tụy (Zang et al., 2015). EEf1A2 đã được chứng minh là có liên quan với sự phát triển bệnh ung thư tuyến tiền liệt thông qua sự kích thích mức độ tăng sinh và ức chế sự chết tế bào theo chương trình và do đó có thể dùng làm đích điều trị tiềm năng trong bệnh ung thư tuyến tiền liệt (Sun et al., 2014). EEf1A2 đã được chứng minh là tương tác với protein p16 của gen ức chế khối u, điều này dẫn đến sự điều hòa giảm EEf1A2 và có liên quan đến sự ức chế quá trình phát triển của tế bào ung thư (Lee et al., 2013). EEf1A2 đã được chứng minh là có liên quan với sự di căn hạch và sự xâm lấn quanh thần kinh trong caxinom tuyến ống tụy (Duanmin et al., 2013). EEf1A2 đã được chứng minh là có liên quan với sự sống trong bệnh ung thư vú (Kulkarni et al., 2007). EEf1A2 được mô tả là gen gây ung thư giả định và gen ức chế khối u trong dòng tế bào caxinom tuyến phổi và trong bệnh ung thư buồng trứng (Lee, 2003; Zhu et al., 2007a).

EIF2S1 được mô tả là gen khởi đầu của sự tiến triển của khối u và sự kháng liệu pháp khi phosphoryl hóa. Tuy nhiên, EIF2S1 cũng được mô tả là có liên quan đến hiệu quả ức chế sự tạo khối u (Zheng et al., 2014). EIF2S1 được mô tả là chất tác động xuôi dòng của mTOR để làm giảm sự sống của các tế bào ung thư khi phosphoryl hóa mức và do đó có thể dùng làm đích cho sự phát triển được chất (Tuval-Kochen et al., 2013).

EIF4G2 được mô tả là một trong số các gen lỗi đã được chứng minh là có liên quan với việc loại bỏ sự hình thành khối u của các tế bào u thần kinh đệm CD133+ ở trẻ em (Baxter et al., 2014). EIF4G2 đã được chứng minh là có liên quan với sự ức chế mức độ phát triển của u lymphô tế bào B lớn lan tỏa khi có sự điều hòa giảm thông qua miR-520c-3p (Mazan-Mameczarz et al., 2014). EIF4G2 đã được chứng minh là tạo điều kiện thuận lợi cho sự tổng hợp protein và sự tăng sinh của tế bào bằng cách điều biến sự tổng hợp protein của chu trình tế bào (Lee and McCormick, 2006). EIF4G2 đã được chứng minh là được điều hòa giảm trong khối u bàng quang và sự điều hòa giảm có liên quan với các khối u xâm lấn (Buim et al., 2005). EIF4G2 được mô tả là liên quan đến sự chết tế bào theo chương trình do MycN/IFN γ gây ra và cả khả năng sống và chết của các

tế bào u nguyên bào thần kinh (Wittke et al., 2001).

F7 trong phức hợp với yếu tố mô được mô tả là được biểu hiện bất thường trên bề mặt của các tế bào ung thư, bao gồm cả bệnh ung thư buồng trứng. Phức hợp này còn được mô tả là có liên quan với sự tạo ra các kiểu hình ác tính trong bệnh ung thư buồng trứng (Koizume and Miyagi, 2015). Con đường của phức hợp yếu tố mô F7 được mô tả là yếu tố trung gian của sự tiến triển bệnh ung thư vú để có thể kích thích sự biểu hiện của nhiều kiểu hình ác tính trong các tế bào ung thư vú. Do đó, con đường của yếu tố mô F7 là đích hấp dẫn tiềm năng cho việc điều trị bệnh ung thư vú (Koizume and Miyagi, 2014). F7 đã được chứng minh là được điều hòa bởi thụ thể androgen trong bệnh ung thư vú (Naderi, 2015). F7 đã được chứng minh là có liên quan với việc điều hòa sự tự tiêu qua sự truyền tín hiệu mTOR trong dòng tế bào caxinom tế bào gan (Chen et al., 2014a). F7 đã được chứng minh là có liên quan với sự xâm lấn của khối u và sự di căn trong bệnh ung thư kết-trực tràng và bệnh ung thư buồng trứng (Tang et al., 2010; Koizume et al., 2006). F7 đã được chứng minh là được điều hòa tăng lệch vị trí trong bệnh ung thư kết-trực tràng (Tang et al., 2009). F7 trong phức hợp với yếu tố mô đã được chứng minh là có liên quan với sự kháng liệu pháp hóa học trong u nguyên bào thần kinh (Fang et al., 2008a).

FAM115C được điều hòa tăng khi có sự giảm oxy-huyết trong bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ (Leithner et al., 2014).

FAM83A được mô tả là dấu ấn sinh học tiềm năng của bệnh ung thư phổi (Li et al., 2005). FAM83A được mô tả là gen đánh dấu có thể được sử dụng trong nhóm với NPY1R và KRT19 để phát hiện sự lưu thông của các tế bào ung thư ở các bệnh nhân ung thư vú (Liu et al., 2014d). Sự tách FAM83A ra khỏi các tế bào ung thư vú đã được chứng minh là gây ra sự giảm mức độ truyền tín hiệu MAPK với sự ức chế đáng kể mức độ phát triển *in vitro* và khả năng tạo u *in vivo* (Cipriano et al., 2014). Hơn nữa, họ protein FAM83 được mô tả là họ gen gây ung thư mới điều hòa sự truyền tín hiệu MAPK trong bệnh ung thư và do đó thích hợp cho sự phát triển liệu pháp điều trị bệnh ung thư nhằm ức chế sự truyền tín hiệu MAPK (Cipriano et al., 2014). FAM83A đã được chứng minh là có liên quan với sự kháng trastuzumab trong dòng tế bào ung thư vú dương tính với HER2 (Boyer et al., 2013). Nói chung, FAM83A đã được chứng minh là gen ứng viên có liên quan với sự kháng chất ức chế EGFR-tyrosin kinaza trong bệnh ung thư vú (Lee et al., 2012). FAM83A được mô tả là có liên quan với tiên lượng xấu trong bệnh ung thư vú

(Lee et al., 2012). FAM83A đã được chứng minh là được điều hòa tăng trong bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ (Qu et al., 2010). FAM83A đã được chứng minh là dấu ấn miễn cảm và đặc hiệu tiềm năng để phát hiện sự lưu thông của tế bào khối u trong máu ngoại vi của bệnh nhân ung thư phổi tế bào không nhỏ (Qu et al., 2010).

Sự điều hòa tăng của FAM83D ảnh hưởng đến sự tăng sinh và sự xâm lấn của các tế bào caxinom tế bào gan (Wang et al., 2015a; Liao et al., 2015b). FAM83D được tăng lên đáng kể trong dòng tế bào ung thư vú và trong bệnh ung thư vú ở người nguyên phát (Wang et al., 2013b).

FAT1 được mô tả là được đột biến đáng kể trong bệnh ung thư tế bào vảy của vùng đầu và cổ, thường được đột biến trong caxinom tuyến cổ tử cung, bệnh ung thư bàng quang, bệnh bạch cầu dạng lymphô cấp tính tiền tế bào T giai đoạn sớm, bệnh bạch cầu dạng nguyên bào lymphô mạn tính kháng fludarabine, u nguyên bào xộp và bệnh ung thư kết-trực tràng và được đột biến trong caxinom tế bào vảy ở thực quản (Gao et al., 2014; Neumann et al., 2013; Morris et al., 2013; Messina et al., 2014; Mountzios et al., 2014; Cazier et al., 2014; Chung et al., 2015). FAT1 được mô tả là được ức chế trong bệnh ung thư miệng và tốt hơn là được điều hòa giảm trong bệnh ung thư vú xâm lấn (Katoh, 2012). FAT1 được mô tả là được điều hòa tăng trong bệnh bạch cầu có liên quan đến sự tiên lượng xấu trong bệnh bạch cầu dạng nguyên bào lymphô cấp tính tiền tế bào B (Katoh, 2012). FAT1 đã được chứng minh là được điều hòa tăng trong caxinom tuyến tụy và caxinom tế bào gan (Valletta et al., 2014; Wojtalewicz et al., 2014). FAT1 được mô tả là ức chế sự phát triển của khối u bằng cách hoạt hóa sự truyền tín hiệu Hippo và kích thích sự di trú của khối u bằng cách gây ra sự polyme hóa actin (Katoh, 2012). FAT1 đã được chứng minh là gen dẫn hướng bệnh ung thư ứng viên trong caxinom tế bào vảy ở da (Pickering et al., 2014). FAT1 được mô tả là gen ức chế khối u có liên quan đến sự truyền tín hiệu Wnt và sự tạo khối u (Morris et al., 2013).

Tùy thuộc vào sự khu trú dưới tế bào của nó, filamin A đóng vai trò kép trong bệnh ung thư: Trong bào chất, filamin A có tác dụng trong nhiều con đường truyền tín hiệu sinh trưởng khác nhau, ngoài việc tham gia vào con đường di trú tế bào và bám dính tế bào. Do đó, sự biểu hiện quá mức của nó có tác dụng kích thích khối u. Trái lại, với filamin A có chiều dài đầy đủ, đoạn ở đầu tận cùng C, được giải phóng khi phân giải protein, khu trú đến nhân, ở đó nó tương tác với các yếu tố phiên mã và nhờ đó ức chế sự phát triển và di căn của khối u (Savoy and Ghosh, 2013).

Sự cắt đứt đầu tận cùng C đặc hiệu mô của GBP5 được mô tả là có thể gây ra sự rối loạn điều hòa của GBP5 trong các tế bào u lymphô (Wehner and Herrmann, 2010). GBP5 được mô tả là có thể có chức năng liên quan đến bệnh ung thư do kiểu biểu hiện có giới hạn của ba biến thể ghép GBP5 trong các mô khối u và dòng tế bào của u lymphô tế bào T ở da cũng như trong dòng tế bào u melanin (Fellenberg et al., 2004).

GJB5 đã được chứng minh là được điều hòa giảm trong dòng tế bào ung thư phổi tế bào không nhỏ, bệnh ung thư thanh quản và caxinom tế bào vảy vùng đầu và cổ (Zhang et al., 2012; Broghammer et al., 2004; Al Moustafa et al., 2002). GJB5 được mô tả là có tác dụng làm gen ức chế khối u trong dòng tế bào của bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ thông qua sự ức chế mức độ tăng sinh và di căn của tế bào (Zhang et al., 2012). GJB5 đã được chứng minh là được điều hòa tăng trong u tuyến/polip có răng cửa không cuốn, các tổn thương tiền ác tính có thể chiếm từ 20 đến 30% trong bệnh ung thư ruột kết (Delker et al., 2014). Sự biểu hiện GJB5 được mô tả là được thay đổi đáng kể trong quá trình kích thích khối u ở da và sự tiến triển trong mô hình ở chuột (Slaga et al., 1996).

GLS được mô tả là được điều hòa gián tiếp bởi gen gây ung thư MYC để làm gia tăng sự chuyển hóa glutamin trong các tế bào ung thư (Dang et al., 2009). GLS đã được chứng minh là được ức chế bởi gen ức chế khối u NDRG2 trong bệnh ung thư kết-trực tràng (Xu et al., 2015). GLS được mô tả là được điều hòa tăng trong caxinom tuyến ống tụy, bệnh ung thư vú bộ ba âm tính, caxinom tế bào gan, caxinom tế bào vảy ở miệng, bệnh ung thư kết-trực tràng và các khối u có nguồn gốc từ u thần kinh đệm ác tính (van Geldermalsen et al., 2015; Szeliga et al., 2014; Huang et al., 2014a; Cetindis et al., 2015; Yu et al., 2015a; Chakrabarti et al., 2015). GLS đã được chứng minh là có liên quan với sự sống trong caxinom tế bào gan và cũng được mô tả là dấu ấn sinh học miễn cảm và đặc hiệu đối với sự chẩn đoán bệnh lý và sự tiên lượng caxinom tế bào gan (Yu et al., 2015a). Sự mất một bản sao của GLS đã được chứng minh là làm chậm sự tiến triển của khối u trong mô hình chuột mắc bệnh caxinom tế bào gan qua trung gian MYC có khả năng hình thành miễn dịch (Xiang et al., 2015). GLS đã được chứng minh là thành phần cần thiết cho sự tạo khối u và sự ức chế GLS đặc hiệu mô đã được mô tả là phương pháp tiềm năng của liệu pháp điều trị bệnh ung thư (Xiang et al., 2015). GLS đã được chứng minh là có liên quan với sự kháng Taxol trong bệnh ung thư vú (Fu et al., 2015a). Sự biểu hiện quá mức GLS đã được chứng minh là có tương quan ở mức cao với giai đoạn khối u và

sự tiến triển ở các bệnh nhân mắc bệnh ung thư tuyến tiền liệt (Pan et al., 2015). Sự biểu hiện GLS đã được chứng minh là có liên quan với sự thâm nhiễm khối u sâu hơn và các kiểu bệnh lý của caxinom tuyến tiểu quản trong sự tạo khối u của bệnh ung thư ruột kết. GLS có thể dùng làm đích của liệu pháp điều trị bệnh ung thư kết-trực tràng (Huang et al., 2014a). Sự làm bất hoạt isoenzym KGA của GLS đã được chứng minh là làm cho tỷ lệ sống trong các dòng tế bào u thần kinh đệm SFxL và LN229 thấp hơn (Martin-Rufian et al., 2014). Sự làm bất hoạt GLS trong các dòng tế bào u thần kinh đệm SFxL và LN229 cũng được chứng minh là gây ra sự chết tế bào theo chương trình bằng cách kích thích sự biểu hiện c-myc và bcl-2 thấp hơn, cũng như sự biểu hiện của quá trình tiền chết tế bào theo chương trình hai lần một ngày cao hơn (Martin-Rufian et al., 2014). Sự hoạt hóa ErbB2 đã được chứng minh là làm điều hòa tăng mức độ biểu hiện của GLS qua con đường NF-kB, điều này kích thích sự tăng sinh tế bào của bệnh ung thư vú (Qie et al., 2014). Việc làm giảm hoặc ức chế GLS trong các tế bào ung thư vú có nồng độ GLS cao đã được chứng minh là làm giảm đáng kể sự tăng sinh (Qie et al., 2014).

GNA15 đã được chứng minh là được điều hòa tăng trong sự tạo khối u thần kinh nội tiết ở ruột non nguyên phát và sự tạo khối u thần kinh nội tiết ở ruột non di căn (Zanini et al., 2015). Sự biểu hiện của GNA15 tăng lên đã được chứng minh là có liên quan với khả năng sống thấp hơn, điều này gợi ý rằng GNA15 có thể có vai trò bệnh lý trong sự tạo khối u thần kinh nội tiết ở ruột non và do đó có thể là đích điều trị tiềm năng (Zanini et al., 2015). GNA15 được mô tả là được điều hòa giảm trong nhiều dòng tế bào bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ (Avasarala et al., 2013). Sự biểu hiện ở mức cao của GNA15 trong bệnh bạch cầu tủy bào cấp tính có kiểu nhân bình thường đã được chứng minh là có liên quan với thời gian sống thêm toàn bộ ngắn hơn đáng kể (de Jonge et al., 2011). GNA15 đã được chứng minh là chất tác động xuôi dòng quan trọng của sự truyền tín hiệu Wnt không kinh điển và chất điều hòa sự tăng sinh tế bào của bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ và sự phát triển của tế bào không phụ thuộc vào yếu tố cố định. Do đó, GNA15 là đích điều trị tiềm năng để điều trị bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ (Avasarala et al., 2013). GNA15 đã được chứng minh là có liên quan với sự truyền tín hiệu tạo khối u trong caxinom tụy (Giovinazzo et al., 2013). GNA15 đã được chứng minh là kích thích STAT3 qua cơ chế phụ thuộc c-Src/JAK- và ERK khi hoạt hóa cơ định trong các tế bào thận 293 của phôi người (Lo et al., 2003).

Sự biểu hiện giảm của HAS3 đã được chứng minh là có liên quan với giai đoạn

khối u tiên tiến, sự di căn hạch, sự xâm lấn mạch và thời gian sống đặc hiệu với bệnh và thời gian sống không có sự di căn bệnh ngăn trong caxinom tế bào chuyển tiếp của đường tiết niệu trên và bàng quang (Chang et al., 2015). Do đó, HAS3 có thể dùng làm dấu ấn sinh học chẩn đoán trong tương lai và đích điều trị mới trong caxinom tế bào chuyển tiếp bàng quang (Chang et al., 2015). HAS3 đã được chứng minh là kích thích sự phát triển bệnh ung thư tụy bằng cách tích lũy hyaluronan (Kultti et al., 2014). Sự ức chế HAS3 đã được chứng minh là làm giảm khả năng sống trong dòng tế bào SW620 của caxinom tuyến kết-trực tràng (Heffler et al., 2013). Sự ức chế HAS3 đã được chứng minh là có liên quan với sự biểu hiện khác thường của một số gen liên quan đến sự điều hòa sự sống của tế bào khối u kết-trực tràng SW620 (Heffler et al., 2013). HAS3 đã được chứng minh là có liên quan với sự trung gian của sự phát triển bệnh ung thư ruột kết bằng cách ức chế sự chết tế bào theo chương trình (Teng et al., 2011). HAS3 đã được chứng minh là được điều hòa tăng trong caxinom tế bào vảy ở thực quản, caxinom tuyến và caxinom tế bào vảy ở phổi và caxinom tế bào đáy có hạch (Tzellos et al., 2011; Twarock et al., 2011; de Sa et al., 2013). HAS3 được mô tả là yếu tố chẩn đoán độc lập trong bệnh ung thư vú do sự biểu hiện HAS3 trong các tế bào đáy của bệnh nhân ung thư vú đã được chứng minh là có tương quan với tỷ lệ tái phát cao và thời gian sống thêm toàn bộ ngắn (Auvinen et al., 2014). HAS3 đã được chứng minh là có liên quan với caxinom buồng trứng thể thanh dịch, caxinom tế bào thận tế bào sáng, caxinom màng trong tử cung và sacom xương (Nykopp et al., 2010; Weiss et al., 2012; Cai et al., 2011; Tofuku et al., 2006).

HIF1A đã được chứng minh là có liên quan với sự hoại tử khối u trong bệnh ung thư màng trong tử cung xâm lấn. HIF1A còn được mô tả là đích tiềm năng để điều trị bệnh này (Bredholt et al., 2015). HIF1A đã được chứng minh là có liên quan với sự gây ung thư gan, sự di căn sacom và caxinom mũi-họng (Chen et al., 2014c; El-Naggar et al., 2015; Li et al., 2015b). Hiện tượng đa hình nucleotit đơn trong HIF1A đã được chứng minh là có liên quan đáng kể với hiệu quả lâm sàng của các bệnh nhân mắc bệnh caxinom tế bào gan xâm lấn sau khi phẫu thuật (Guo et al., 2015). Hoạt tính bất thường của HIF1A cùng với hoạt tính bất thường của STAT3 đã được chứng minh là làm thay đổi sự tiến triển của khối u trong các dòng tế bào khối u vô thần kinh ngoại vi ác tính. Do đó, sự ức chế trực truyền tín hiệu STAT3/HIF1A/VEGF-A được mô tả là chiến lược điều trị khả thi (Rad et al., 2015). HIF1A được mô tả là đích quan trọng của sự kháng thuốc được điều khiển bằng sự giảm oxy-huyết ở bệnh đa u tủy (Maiso et al., 2015). HIF1A đã

được chứng minh là được biểu hiện không đối xứng trong ba dòng tế bào khác nhau tương ứng với giai đoạn sinh bệnh học của bệnh đa u tủy, điều này gợi ý rằng HIF1A liên quan đến sự tạo khối u và sự di căn của bệnh đa u tủy (Zhao et al., 2014b). ARN-2 đối mã của HIF1A không mã hóa mạch dài được mô tả là được điều hòa tăng trong caxinom tế bào thận-tế bào sáng không phải thể nhú và bệnh ung thư dạ dày và có liên quan đến sự tăng sinh của tế bào khối u và tiên lượng xấu trong bệnh ung thư dạ dày (Chen et al., 2015b). Sự điều hòa giảm con đường PI3K/AKT/mTOR thông qua HIF1A được mô tả là yếu tố quan trọng đối với sự bất động, sự duy trì và sự sống của các tế bào gốc của bệnh ung thư tuyến tiền liệt (Marhold et al., 2015). HIF1A được mô tả là một gen trong nhóm gồm 4 gen là gen chẩn đoán của caxinom tuyến phổi giai đoạn I (Okayama et al., 2014). Hiện tượng đa hình của HIF1A đã được chứng minh là có liên quan với tính miễn cảm gia tăng với bệnh ung thư đường tiêu hóa ở quần thể người châu Á (Xu et al., 2014). HIF1A được mô tả là dấu hiệu chẩn đoán trong bệnh ung thư vú đơn phát ở nam giới (Deb et al., 2014).

Hoạt tính của protein HYOU1 trong tế bào đã được chứng minh là tạo ra lợi ích sống còn trong các tế bào ung thư trong quá trình tiến triển hoặc di căn của khối u. Protein HYOU1 ngoài tế bào đóng vai trò quan trọng trong sự tạo ra đáp ứng miễn dịch kháng khối u bằng cách tạo điều kiện thuận lợi cho sự cung cấp các kháng nguyên khối u cho sự trình diện chéo của chúng (Fu and Lee, 2006; Wang et al., 2014a). Protein HYOU1 được đưa vào liệu pháp miễn dịch chống ung thư và có hiệu quả điều biến miễn dịch dương tính (Yu et al., 2013; Chen et al., 2013a; Yuan et al., 2012; Wang and Subjeck, 2013).

Một nghiên cứu đã chứng minh rằng IGHG1 được biểu hiện quá mức trong các mô ung thư tụy ở người so với các mô không ung thư liền kề. Trái lại, protein IGHG1 được điều hòa giảm trong sự thâm nhiễm các mô caxinom ống (Kabbage et al., 2008; Li et al., 2011). Việc làm bất hoạt IGHG1 hướng đích siARN có thể ức chế khả năng sống của tế bào và kích thích sự chết tế bào theo chương trình (Pan et al., 2013).

Các nhà nghiên cứu đã quan sát được sự biểu hiện của IGHG3 ở phụ nữ Ả Rập Xê Út mắc bệnh ung thư vú. Tương tự, phát hiện được số lượng bản sao cũng như nồng độ IGHG3 tăng lên ở nam giới là người Mỹ gốc Phi mắc bệnh ung thư tuyến tiền liệt. Báo cáo khác đã cho thấy rằng phát hiện được sự biểu hiện IGHG3 trong bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ có vảy, u trung biểu mô ác tính cũng như trên các tế bào khối u là các tế

bào không thường xuyên quan sát được trong các u lymphô MALT và có xu hướng biệt hóa thành tương bào (Remmelink et al., 2005; Bin Amer et al., 2008; Ledet et al., 2013; Zhang et al., 2013; Sugimoto et al., 2014).

IGHG4 mã hóa vùng hằng định chuỗi nặng gama 4 của globulin miễn dịch (gen đánh dấu G4m) và nằm trên nhiễm sắc thể 14q32.33 (RefSeq, 2002). Nghiên cứu gần đây đã phát hiện được sự sắp xếp lại liên quan đến IGHG4 trong u lymphô tế bào B lớn lan tỏa ở tình hoàn nguyên phát (Twa et al., 2015). IGHM mã hóa vùng hằng định chuỗi nặng mu của globulin miễn dịch (RefSeq, 2002). Các nghiên cứu đã quan sát được sự điều hòa giảm IGHM ở các bệnh nhân Trung Quốc mắc sacom cơ vân. Các nghiên cứu khác đã phát hiện được sự biểu hiện của IGHM trong bệnh u lymphô tế bào B lớn lan tỏa. Nhóm khác đã phát hiện được rằng trong bệnh u lymphô tế bào B lớn lan tỏa, gen IGHM chỉ được bảo toàn trên trên alen IGH có khả năng phát triển trong phần lớn khối u IgM+. Ngoài ra, các mẫu u mỡ-cơ trên mạch máu dạng biểu mô không có khả năng phản ứng bất kỳ đối với yếu tố phiên mã gắn kết với gen tăng cường 3 của IGHM hoặc yếu tố phiên mã EB (Kato et al., 2009; Blenk et al., 2007; Ruminy et al., 2011; Liu et al., 2014b).

IL36RN được mô tả là gen đánh dấu có thể phân biệt rõ ràng giai đoạn III với giai đoạn I và giai đoạn II trong cacinom tuyến phổi (Liang et al., 2015).

Sự biểu hiện của INA giảm đã được chứng minh là có liên quan với sự di căn, sự tái phát và thời gian sống thêm toàn bộ ngắn trong các khối u thần kinh nội tiết ở tụy. Do đó, INA có thể là dấu ấn sinh học chẩn đoán hữu ích đối với sự xâm lấn của khối u thần kinh nội tiết ở tụy (Liu et al., 2014a). INA được mô tả là được điều hòa tăng trong u thần kinh đệm có kiểu hình của tế bào thần kinh đệm ít gai và sự biểu hiện INA đã được chứng minh là có tương quan với thời gian sống không có sự tiến triển của bệnh của u tế bào thần kinh đệm ít gai và u nguyên bào xốp (Suh et al., 2013). INA được mô tả là dấu ấn của u nguyên bào thần kinh hữu ích cho việc chẩn đoán phân biệt khối u tế bào hình tròn nhỏ ở trẻ em (Willoughby et al., 2008).

Sự biểu hiện ITGA6 được điều hòa tăng trong các thực thể bệnh ung thư khác nhau bao gồm bệnh ung thư vú, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh ung thư ruột kết và bệnh ung thư dạ dày và có liên quan đến sự tiến triển của khối u và sự xâm lấn của tế bào (Mimori et al., 1997; Lo et al., 2012; Haraguchi et al., 2013; Rabinovitz et al., 1995; Rabinovitz and Mercurio, 1996). Hiệu quả tăng sinh của biến thể Abeta4 của ITGA6

đường như được trung gian bởi con đường Wnt/beta-catenin (Groulx et al., 2014). Biến thể Abeta4 của ITGA6 dẫn đến sự hoạt hóa phụ thuộc VEGF của con đường PI3K/Akt/mTOR. Con đường này đóng vai trò quan trọng trong sự sống của các tế bào caxinom di căn (Chung et al., 2002).

KRT14 được biểu hiện ở mức cao trong nhiều bệnh caxinom tế bào vảy khác nhau như caxinom tế bào vảy ở thực quản, phổi, thanh quản, cổ tử cung cũng như trong khối u tạo men dạng u tuyến. Tuy nhiên, thành phần này không có mặt trong caxinom tế bào nhỏ của bàng quang và có mặt ở mức thấp trong caxinom tuyến phổi, caxinom tuyến dạ dày, caxinom tuyến kết-trực tràng, caxinom tế bào gan, caxinom tuyến ống tụy, caxinom tuyến ống thâm nhiễm vú, caxinom tuyến giáp dạng nhú và caxinom tuyến màng trong tử cung (Xue et al., 2010; Terada, 2012; Vasca et al., 2014; Hammam et al., 2014; Shruthi et al., 2014). Trong bệnh ung thư bàng quang, sự biểu hiện KRT14 có liên quan mạnh với thời gian sống thêm ngắn (Volkmer et al., 2012).

Đã phát hiện được sự biểu hiện quá mức của KRT16 trong dòng tế bào ung thư vú giống như tế bào đáy cũng như trong caxinom tại chỗ. Các nghiên cứu khác không phát hiện thấy sự khác biệt đáng kể về sự biểu hiện hóa mô miễn dịch của KRT16 giữa u nguyên bào tạo men không tái phát và u nguyên bào tạo men tái phát (Joosse et al., 2012; Ida-Yonemochi et al., 2012; Safadi et al., 2016). Ngoài ra, các phân tích được thực hiện trên máy tính cho thấy mối tương quan giữa sự biểu hiện KRT16 và thời gian sống thêm không có sự tái phát bệnh là ngắn hơn trong bệnh ung thư vú di căn (Joosse et al., 2012).

KRT5 đã được chứng minh là được điều hòa tăng trong bệnh ung thư vú ở phụ nữ trẻ (Johnson et al., 2015). KRT5 đã được chứng minh là có liên quan với thời gian sống thêm không bệnh ngắn hơn trong bệnh ung thư vú ở phụ nữ trẻ và với kết quả lâm sàng không tốt ở các bệnh nhân tiền mãn kinh mắc bệnh ung thư vú dương tính với thụ thể hormon (Johnson et al., 2015; Sato et al., 2014). KRT5 đã được chứng minh là được điều hòa bởi gen ức chế khối u BRCA1 trong các dòng tế bào ung thư vú HCC1937 và T47D (Gorski et al., 2010). KRT5 đã được chứng minh là được điều hòa giảm trong u trung biểu mô màng phổi ác tính (Melaiu et al., 2015). KRT5 được mô tả là gen đánh dấu trung biểu mô chẩn đoán của u trung biểu mô ác tính (Arif and Husain, 2015). KRT5 đã được chứng minh là có tương quan với sự tiến triển của bệnh ung thư màng trong tử cung (Zhao et al., 2013). KRT5 đã được chứng minh là được đột biến và được điều hòa giảm trong các khu vực khối u xâm lấn ở bệnh nhân mắc bệnh caxinom có mụn cóc

(Schumann et al., 2012). KRT5 đã được chứng minh là một phần của nhóm bốn protein được biểu hiện khác thường trong các mẫu sinh thiết của bệnh ung thư kết-trực tràng so với các mẫu mô bình thường (Yang et al., 2012). KRT5 và ba protein còn lại trong nhóm bốn protein này được mô tả là dấu ấn mới và đích tiềm năng để điều trị bệnh ung thư kết-trực tràng (Yang et al., 2012). KRT5 được mô tả là có liên quan với caxinom tế bào đáy (Depianto et al., 2010). KRT5 được mô tả là ứng viên để nhận biết các tế bào gốc của caxinom tế bào chuyển tiếp (Hatina and Schulz, 2012).

Sự hoạt hóa con đường kynurenin, trong đó KYNƯ có liên quan, đã được chứng minh là cao hơn đáng kể trong u nguyên bào xóp và điều này gợi ý sự liên quan của con đường kynurenin trong sinh lý bệnh học của u thần kinh đệm (Adams et al., 2014). KYNƯ được mô tả là gen liên quan đến bệnh ung thư có sự biểu hiện thay đổi khi ức chế thụ thể aryl hydrocacbon trong dòng tế bào ung thư vú MDA-MB-231 (Goode et al., 2014). KYNƯ đã được chứng minh là được biểu hiện khác thường trong dòng tế bào sacom xương mức độ cao và không xâm lấn, điều này gợi ý rằng nó có thể có vai trò quan trọng trong quá trình tạo khối u của sacom xương. Do đó, KYNƯ cũng có thể là ứng viên cho các đích điều trị trong tương lai (Lauvrak et al., 2013). KYNƯ đã được chứng minh là có liên quan với sự biểu hiện lại của khả năng tạo u trong tế bào lai của nguyên bào sợi HeLa không tạo khối u và tế bào lai của nguyên bào sợi ở da người. Do đó, KYNƯ có thể là ứng viên quan tâm để điều hòa mức độ biểu hiện của tạo khối u (Tsujimoto et al., 1999).

Phép phân tích phiên mã của LAMB3 kết hợp với hai gen khác đã được chứng minh là hữu ích trong việc chẩn đoán caxinom tuyến giáp dạng nhú và dự đoán nguy cơ di căn hạch bạch huyết (Barros-Filho et al., 2015). LAMB3 đã được chứng minh là có liên quan với các thực thể bệnh ung thư của caxinom tế bào vảy ở miệng, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư kết-trực tràng, khối u họ ewing, caxinom phổi, caxinom vú và caxinom buồng trứng (Volpi et al., 2011; Li et al., 2011; Reis et al., 2013; Stull et al., 2005; Irifune et al., 2005; Tanis et al., 2014). LAMB3 đã được chứng minh là được điều hòa tăng trong caxinom tế bào vảy ở cổ tử cung, bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư dạ dày, caxinom mũi-họng và caxinom tế bào vảy ở thực quản (Kwon et al., 2011; Wang et al., 2013a; Yamamoto et al., 2013; Kita et al., 2009; Fang et al., 2008b). LAMB3 được mô tả là protein đã biết là ảnh hưởng đến sự biệt hóa, sự di trú, sự dính bám, sự tăng sinh và sự sống của tế bào và có chức năng làm gen gây ung thư

trong caxinom tế bào vảy ở cổ tử cung (Yamamoto et al., 2013). Sự ức chế LAMB3 đã được chứng minh là ức chế sự xâm lấn của tế bào ung thư phổi và sự di căn *in vitro* và *in vivo*. Do đó, LAMB3 là gen quyết định đóng vai trò quan trọng trong sự xuất hiện và sự di căn của bệnh ung thư phổi (Wang et al., 2013a). LAMB3 đã được chứng minh là được điều hòa bởi gen ức chế khối u miR-218 trong caxinom tế bào vảy vùng đầu và cổ (Kinoshita et al., 2012). Sự làm bất hoạt LAMB3 trong caxinom tế bào vảy vùng đầu và cổ đã được chứng minh là làm ức chế mức độ di trú và xâm lấn của tế bào (Kinoshita et al., 2012). Sự biểu hiện LAMB3 đã được chứng minh là có tương quan với mức độ xâm lấn sâu và sự xâm lấn tĩnh mạch trong caxinom tế bào vảy ở thực quản (Kita et al., 2009). Sự methyl hóa LAMB3 đã được chứng minh là có tương quan với một số thông số của sự tiên lượng xấu trong bệnh ung thư bàng quang (Sathyanarayana et al., 2004).

Sự ức chế LAP3 đã được chứng minh là dẫn đến ức chế sự xâm lấn trong dòng tế bào ung thư buồng trứng ES-2 thông qua sự điều hòa giảm fascin và MMP-2/9. Do đó, LAP3 có thể có tác dụng làm đích điều trị tiềm năng chống lại sự di căn (Wang et al., 2015d). Sự biểu hiện LAP3 ở mức cao đã được chứng minh là có tương quan với mức độ ác tính và tiên lượng xấu của bệnh nhân u thần kinh đệm (He et al., 2015). LAP3 đã được chứng minh là kích thích sự tiến triển của u thần kinh đệm bằng cách điều hòa sự phát triển, sự di trú và sự xâm lấn của tế bào và do đó có thể là yếu tố chẩn đoán mới (He et al., 2015). Các đột biến xô dịch khung trong các gen liên quan đến sự chuyển hóa axit amin bao gồm cả LAP3 được phát hiện trong bệnh ung thư kết-trực tràng và bệnh ung thư dạ dày có tính bất ổn định vi vệ tinh ở mức cao (Oh et al., 2014). LAP3 đã được chứng minh là được điều hòa tăng trong caxinom tế bào gan, caxinom tế bào vảy ở thực quản và bệnh ung thư tuyến tiền liệt (Zhang et al., 2014; Tian et al., 2014; Lexander et al., 2005). LAP3 đã được chứng minh là kích thích sự tăng sinh của các tế bào caxinom tế bào gan bằng cách điều hòa sự kiểm soát pha G1/S trong chu trình tế bào và sự di trú của các tế bào tiến triển (Tian et al., 2014). Sự biểu hiện của LAP3 còn được chứng minh là có tương quan với tiên lượng và sự phát triển ác tính của caxinom tế bào gan (Tian et al., 2014). Sự làm bất hoạt LAP3 trong dòng tế bào caxinom tế bào vảy ở thực quản ECA109 đã được chứng minh là làm giảm sự tăng sinh của tế bào và sự tạo khuẩn lạc trong khi sự giảm nồng độ LAP3 dẫn đến làm ngừng chu trình tế bào (Zhang et al., 2014). Sự biểu hiện quá mức của LAP3 trong dòng tế bào caxinom tế bào vảy ở thực quản TE1 đã được chứng minh là kích thích sự tăng sinh và xâm lấn của tế bào (Zhang et

al., 2014). Do đó, LAP3 đã được chứng minh là đóng vai trò trong sự phát triển ác tính của caxinom tế bào vảy ở thực quản (Zhang et al., 2014).

Các nhà nghiên cứu đã thông báo sự biểu hiện của M6PR trong dòng tế bào caxinom ruột kết cũng như trong các tế bào caxinom biểu mô rau (Bräulke et al., 1992; O'Gorman et al., 2002). Trong bệnh ung thư vú, mức độ biểu hiện của M6PR thấp có liên quan với sự tiên lượng xấu ở bệnh nhân (Esseghir et al., 2006). Hơn nữa, sự biểu hiện quá mức của M6PR dẫn đến tốc độ phát triển của tế bào *in vitro* giảm đi và sự phát triển của khối u giảm đi ở chuột không lông (O'Gorman et al., 2002).

MAPK6 đã được chứng minh là đóng vai trò trong việc điều hòa hình thái học và sự di trú của tế bào trong dòng tế bào ung thư vú MDA-MB-231 (Al-Mahdi et al., 2015). MAPK6 được mô tả là một phần của con đường truyền tín hiệu MAPK liên quan đến bệnh ung thư, có liên quan với sự truyền tín hiệu BRAF và MEK1/2 trong u melanin (Lei et al., 2014; Hoeflich et al., 2006). MAPK6 đã được chứng minh là được điều hòa tăng trong caxinom phổi, bệnh ung thư dạ dày và bệnh ung thư miệng (Long et al., 2012; Rai et al., 2004; Liang et al., 2005a). MAPK6 đã được chứng minh là kích thích sự xâm lấn của tế bào ung thư phổi bằng cách phosphoryl hóa gen gây ung thư SRC-3. Do đó, MAPK6 có thể là đích hấp dẫn cho việc điều trị bệnh ung thư phổi xâm lấn (Long et al., 2012). MAPK6 được mô tả là đích tiềm năng cho sự phát triển được chất trị bệnh ung thư chống lại các tế bào ung thư vú kháng thuốc (Yang et al., 2010). Sự biểu hiện quá mức của MAPK6 trong caxinom dạ dày đã được chứng minh là có tương quan với sự phân giai đoạn TNM, sự xâm lấn màng thanh dịch và sự liên quan của hạch bạch huyết (Liang et al., 2005a). MAPK6 đã được chứng minh là đối tác gắn kết của thành phần máy trong chu trình tế bào nhân cyclin D3, điều này gợi ý rằng MAPK6 có hoạt tính tiềm năng trong sự tăng sinh của tế bào (Sun et al., 2006).

MNAT1 đã được chứng minh là có liên quan với tiên lượng xấu trong bệnh ung thư vú dương tính với thụ thể estrogen/âm tính với HER2 (Santarpia et al., 2013). Sự mất phân mảnh nội tại của MNAT1 trong quá trình tạo bạch cầu hạt đã được chứng minh là kích thích sự phát triển và di căn của nguyên thủy bào bệnh bạch cầu (Lou et al., 2013). MNAT1 đã được chứng minh là bị rối loạn điều hòa trong dòng tế bào ung thư buồng trứng OAW42 khi ức chế gen gây ung thư giả định ADRM1 (Fejzo et al., 2013). Việc làm bất hoạt gen MNAT1 qua trung gian siARN đã được chứng minh là ức chế sự phát triển tế bào của dòng tế bào ung thư tụy BxPC3 *in vitro*, và đạt được hiệu quả kháng u

đáng kể đối với khối u tụy được ghép dưới da *in vivo* (Liu et al., 2007a). Các biến thể di truyền trong MNAT1 được mô tả là có liên quan với tính miễn cảm của bệnh ung thư phổi (Li et al., 2007). Sự nhiễm khuẩn của dòng tế bào ung thư tụy BxPC3 bằng MNAT1 đối mã mã hóa adenovirut tái tổ hợp đã được chứng minh là làm giảm mức độ biểu hiện của MNAT1 và làm tăng tỷ lệ của các tế bào pha G0/G1. Do đó, MNAT1 được gợi ý là đóng vai trò quan trọng trong sự điều hòa quá trình chuyển tiếp chu trình tế bào từ G1 thành S trong dòng tế bào ung thư tụy BxPC3 (Zhang et al., 2005). MNAT1 điều biến kinaza phụ thuộc cyclin – làm hoạt hóa hoạt tính kinaza đã được chứng minh là điều hòa chéo sự làm ngừng chu trình G1 của tế bào của u nguyên bào thần kinh và là thành phần quan trọng để chuyển từ sự tăng sinh thành sự biệt hóa trong các tế bào của u nguyên bào thần kinh (Zhang et al., 2004).

Sự methyl hóa ADN liên quan đến sự làm bất hoạt NEFH trong bệnh ung thư vú đã được chứng minh là thường xuyên, đặc hiệu với bệnh ung thư, và có tương quan với các dấu hiệu lâm sàng của sự tiến triển bệnh (Calmon et al., 2015). NEFH còn được mô tả là được bất hoạt thông qua sự methyl hóa ADN ở bệnh ung thư tụy, bệnh ung thư dạ dày và bệnh ung thư ruột kết và do đó cũng có thể góp phần vào sự tiến triển của các bệnh ác tính này (Calmon et al., 2015). Sự methyl hóa đảo CpG của NEFH đã được chứng minh là có liên quan với bệnh tiến triển, sự di căn xa và tiên lượng trong caxinom tế bào thận (Dubrowinskaja et al., 2014). Do đó, sự methyl hóa NEFH có thể là dấu hiệu di truyền học biểu sinh ứng viên để tiên lượng caxinom tế bào thận (Dubrowinskaja et al., 2014). NEFH đã được chứng minh là được điều hòa tăng trong sacom sụn dạng niêm dịch ngoài bộ xương của âm hộ (Dotlic et al., 2014). Sự biểu hiện quá mức của NEFH trong dòng tế bào caxinom tế bào gan đã được chứng minh là làm giảm sự tăng sinh của tế bào trong khi làm giảm sự xâm lấn và di trú của tế bào được kích thích bởi NEFH *in vitro*, và làm gia tăng khả năng tạo ra khối u ở chuột. Do đó, NEFH có tác dụng làm gen ức chế khối u trong caxinom tế bào gan (Revill et al., 2013). NEFH đã được chứng minh là thường được methyl hóa trong sacom Ewing và do đó có thể có liên quan với sự tạo khối u (Alholle et al., 2013).

Sự methyl hóa ADN làm trung gian cho sự làm bất hoạt NEFL đã được chứng minh là sự kiện thường xảy ra trong bệnh ung thư vú và có thể góp phần vào sự tiến triển của bệnh ung thư vú và các bệnh ác tính khác có thể có như bệnh ung thư tụy, bệnh ung thư dạ dày và bệnh ung thư ruột kết (Calmon et al., 2015). NEFL được mô tả là gen ức chế

khối u tiềm năng có liên quan đến bệnh ung thư của một số cơ quan (Huang et al., 2014c). NEFL được mô tả là có thể đóng vai trò trong sự chết tế bào theo chương trình của tế bào ung thư và sự xâm lấn trong dòng tế bào caxinom tế bào vảy vùng đầu và cổ (Huang et al., 2014c). Sự metyl hóa NEFL được mô tả là cơ chế mới tạo ra sự kháng hóa chất cisplatin trong dòng tế bào bệnh ung thư vùng đầu và cổ thông qua sự tương tác với con đường truyền tín hiệu mTOR (Chen et al., 2012). NEFL được mô tả là dấu ấn sinh học ứng viên dự đoán sự đáp ứng với chất hóa trị liệu và sự sống ở bệnh nhân mắc bệnh ung thư vùng đầu và cổ (Chen et al., 2012). Sự biểu hiện NEFL ở mức cao được mô tả là có tương quan với hiệu quả lâm sàng tốt hơn trong u tế bào màng trên lều (Hagel et al., 2013). NEFL đã được chứng minh là được biểu hiện lạc chỗ trong bệnh ung thư vú và được biểu hiện trong bệnh ung thư vú nguyên phát có sự di căn hạch bạch huyết giảm đi so với bệnh ung thư hạch bạch huyết âm tính (Li et al., 2012). Sự biểu hiện NEFL ở mức thấp đã được chứng minh là dấu hiệu thể hiện thời gian sống thêm không bệnh ngắn trong năm năm đối với bệnh nhân ung thư vú giai đoạn sớm và do đó có thể là yếu tố chẩn đoán tiềm năng của các bệnh nhân ung thư vú giai đoạn sớm (Li et al., 2012). NEFL đã được chứng minh là được điều hòa giảm trong u nguyên bào xộp đa dạng (Khalil, 2007). Sự mất đoạn alen ở nhiễm sắc thể 8p21-23 mà NEFL nằm ở đó, được mô tả là sự kiện sớm và thường xuyên trong sự gây ung thư và sự phát triển của bệnh ung thư phổi và cũng được mô tả là có liên quan với bệnh ung thư vú, bệnh ung thư tuyến tiền liệt và caxinom tế bào gan dương tính với virus viêm gan B (Seitz et al., 2000; Becker et al., 1996; Haggman et al., 1997; Kurimoto et al., 2001).

NEFM được mô tả là gen liên quan đến sự tiến triển của khối u và kết hợp với quy trình liên quan đến sự di căn (Singh et al., 2015). NEFM đã được chứng minh là được metyl hóa giảm và được điều hòa tăng trong bệnh ung thư thực quản (Singh et al., 2015). NEFM được mô tả là gen ức chế khối u ứng viên thường được điều hòa giảm trong u nguyên bào xộp (Lee et al., 2015a). Sự metyl hóa ADN liên quan đến sự làm bất hoạt NEFM ở bệnh ung thư vú đã được chứng minh là thường xuyên, đặc hiệu với bệnh ung thư, và có tương quan với các dấu hiệu lâm sàng của sự tiến triển bệnh (Calmon et al., 2015). NEFM còn được mô tả là được bất hoạt thông qua sự metyl hóa ADN trong bệnh ung thư tụy, bệnh ung thư dạ dày và bệnh ung thư ruột kết và do đó cũng có thể góp phần vào sự tiến triển của các bệnh ác tính này (Calmon et al., 2015). NEFM đã được chứng minh là có liên quan với bệnh ung thư tuyến tiền liệt và u tế bào hình sao (Wu et al.,

2010; Penney et al., 2015). NEFM được mô tả là gen ức chế khối u ứng viên mới đã được chứng minh là được methyl hóa trong caxinom tế bào thận (Ricketts et al., 2013). Sự methyl hóa NEFM đã được chứng minh là có liên quan với tiên lượng trong caxinom tế bào thận (Ricketts et al., 2013). NEFM được mô tả là dấu ấn chẩn đoán tiềm năng đã được chứng minh là được biểu hiện khác thường trong dòng tế bào khối u thần kinh nội tiết so với dòng tế bào không phải khối u thần kinh (Hofsli et al., 2008).

NUP155 được mô tả là dấu ấn sinh học di truyền học biểu sinh tiềm năng của ADN của bạch cầu có liên quan đến sự tiên định vị bệnh ung thư vú (Khakpour et al., 2015). NUP155 được mô tả là thành phần rất cần thiết cho sự tăng sinh và sự sống của các tế bào bệnh bạch cầu dạng lymphô cấp tính tế bào T dương tính với NUP214-ABL1 và do đó là đích được chất tiềm năng trong bệnh này (De et al., 2014).

OAS2 đã được chứng minh là có liên quan với sự giảm mức độ biểu hiện của chuỗi CD3-zeta thông qua sự hoạt hóa caspaza-3. Sự thiếu hụt chuỗi CD3-zeta được mô tả là thường quan sát được trong bệnh ung thư miệng (Dar et al., 2015). OAS2 được mô tả là có liên quan với con đường nhánh của con đường viêm và miễn dịch bẩm sinh liên quan đến nguy cơ bệnh ung thư tuyến tiền liệt tiến triển (Kazma et al., 2012). Việc phân tích con đường nhánh cho thấy rằng OAS2 có liên quan về mặt lý thuyết với nguy cơ bệnh ung thư tuyến tiền liệt tiến triển (Kazma et al., 2012).

Sự biểu hiện PABPN1 ở mức thấp trong bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ đã được chứng minh là có tương quan với tiên lượng xấu (Ichinose et al., 2014). Sự mất PABPN1 được mô tả là có khả năng kích thích sự xâm lấn của khối u bằng cách giải phóng các tế bào ung thư ra khỏi quá trình điều hòa gen qua trung gian microARN trong bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ (Ichinose et al., 2014). Thử đột biến mở rộng polyalanin ở đầu tận cùng N của PABPN1 đã được chứng minh là có liên quan với sự gây chết tế bào theo chương trình qua con đường p53 trong các dòng tế bào HeLa và HEK-293 (Bhattacharjee et al., 2012).

PCBP1 được mô tả là thành phần chính với sự làm giàu tế bào gốc của bệnh ung thư và chức năng trong các tế bào ung thư tuyến tiền liệt (Chen et al., 2015a). PCBP1 được mô tả là chất ức chế của quá trình sinh bệnh học trong bệnh ung thư dạ dày có sự điều hòa giảm liên quan đến kiểu hình ác tính trong cả các tế bào ung thư dạ dày được nuôi cấy và mô ghép khác loài (Zhang et al., 2015e). Dựa trên sự biểu hiện khác biệt giữa mẫu mô lành tính và mẫu mô trong huyết thanh ác tính tương ứng, ở các bệnh nhân

mắc caxinom tuyến ở buồng trứng thể thanh dịch, PCBP1 được gợi ý là đóng vai trò trong quá trình sinh bệnh học của bệnh ung thư buồng trứng (Wegdam et al., 2014). PCBP1 đã được chứng minh là chất trung gian quan trọng của sự chuyển tiếp biểu mô-mô giữa do TGF- β gây ra, điều kiện tiên quyết cho sự di căn của khối u, trong dòng tế bào caxinom túi mật GBC-SD (Zhang and Dou, 2014). Mức độ biểu hiện của PCBP1 đã được chứng minh là điều hòa khả năng di trú và xâm lấn của dòng tế bào caxinom túi mật GBC-SD *in vitro* (Zhang and Dou, 2014). Do đó, PCBP1 có thể là dấu hiệu chẩn đoán tiềm năng của sự di căn caxinom túi mật (Zhang and Dou, 2014). Sự điều hòa giảm PCBP1 được mô tả là có thể liên quan với sinh bệnh học của bệnh ung thư cổ tử cung (Pathak et al., 2014). PCBP1 được mô tả là chất điều hòa của yếu tố phiên mã p63 liên quan đến sự ức chế khối u (Cho et al., 2013). Sự biểu hiện của PCBP1 ở mức cao trong bệnh chửa trứng hoàn toàn đã được chứng minh là có liên quan với nguy cơ tiến triển thấp thành khối u lá nuôi phôi trong thời kỳ thai nghén, trong khi sự biểu hiện PCBP1 trong bệnh chửa trứng biến đổi ác tính là thấp hơn đáng kể (Shi et al., 2012). Do đó, PCBP1 được gợi ý là đóng vai trò quan trọng trong sinh bệnh học của khối u lá nuôi phôi trong thời kỳ thai nghén (Shi et al., 2012). Sự biểu hiện quá mức của PCBP1 đã được chứng minh là ức chế sự dịch mã của protein PRL-3 liên quan đến sự di căn và sự bất hoạt AKT trong khi ức chế PCBP1 đã được chứng minh là gây ra sự hoạt hóa AKT và kích thích sự tạo khối u (Wang et al., 2010). PCBP1 đã được mô tả là đóng vai trò tiêu cực trong sự xâm lấn của khối u trong dòng tế bào u gan HepG2 (Zhang et al., 2010). Sự mất PCBP1 trong các khối u gan ở người được mô tả là góp phần vào sự hình thành kiểu hình di căn (Zhang et al., 2010).

PDPN được mô tả là được điều hòa tăng trong caxinom tế bào vảy, u trung biểu mô, u nguyên bào xốp và sacom xương (Fujita and Takagi, 2012). PDPN được mô tả là chất điều hòa sự xâm lấn và di căn của khối u do PDPN có liên quan đến một vài con đường, các con đường này tham gia vào sự chuyển tiếp biểu mô-mô giữa, sự di trú của tế bào chung, sự hoạt hóa tiểu cầu, sự kết tụ, và sự tạo mạch bạch huyết (Dang et al., 2014). PDPN được mô tả là dấu ấn trong sự gây ung thư miệng và u trung biểu mô dạng biểu mô (Swain et al., 2014; Ordonez, 2005). Sự điều hòa tăng PDPN được mô tả là có liên quan với sự di căn hạch bạch huyết và tiên lượng xấu trong caxinom tế bào vảy của đường tiêu hóa trên (Chuang et al., 2013). PDPN được mô tả là được biểu hiện trong khối u mạch, u trung biểu mô ác tính, khối u của hệ thần kinh trung ương, khối u tế bào mầm, caxinom tế

bào vảy và các khối u xâm lấn có khả năng xâm lấn và di căn ở mức cao (Raica et al., 2008). Do đó, PDPN có thể được cho là đích điều trị hấp dẫn của các tế bào khối u (Raica et al., 2008).

PHTF2 đã được chứng minh là được điều hòa giảm trong caxinom tế bào vảy ở lưỡi (Huang et al., 2007).

PKM2 đã được chứng minh là thành phần quyết định đối với sự tăng sinh của tế bào ung thư và sự phát triển của khối u (Chen et al., 2014b; Li et al., 2014; DeLaBarre et al., 2014). N-myc có tác dụng làm chất điều hòa phiên mã của PKM2 trong u nguyên thủy bào (Tech et al., 2015). PKM2 dường như đóng vai trò trong sự sinh caxinom gan, sự chuyển tiếp biểu mô-mô giữa, và sự tạo mạch (Nakao et al., 2014). PKM2 là một trong hai yếu tố quyết định của hiệu ứng Warburg trong ung thư học (Tamada et al., 2012; Warner et al., 2014; Ng et al., 2015). Sự biểu hiện của PKM2 được điều hòa tăng trong các tế bào ung thư (Chaneton and Gottlieb, 2012; Luo and Semenza, 2012; Wu and Le, 2013). Trong các tế bào ác tính, PKM2 có tác dụng trong sự phân hủy đường, làm chất đồng hoạt hóa phiên mã và làm protein kinaza. Trong tác dụng thứ hai, nó dịch chuyển đến nhân và phosphoryl hóa histon 3 mà cuối cùng làm tiến triển chu trình tế bào trong u nguyên bào xóp (Semenza, 2011; Luo and Semenza, 2012; Tamada et al., 2012; Venneti and Thompson, 2013; Yang and Lu, 2013; Gupta et al., 2014; Iqbal et al., 2014; Chen et al., 2014b; Warner et al., 2014). PKM2 dime có hoạt tính thấp có thể đóng vai trò trong bệnh ung thư thay vì dạng tetrame có hoạt tính (Mazurek, 2011; Wong et al., 2015; Iqbal et al., 2014; Mazurek, 2007).

PKP1 đã được chứng minh là được điều hòa giảm trong bệnh ung thư tuyến tiền liệt và caxinom tuyến thực quản (Kaz et al., 2012; Yang et al., 2015a). Sự ức chế PKP1 trong dòng tế bào tuyến tiền liệt BPH-1, không thuộc khối u dẫn đến sự chết tế bào theo chương trình giảm và sự biểu hiện khác biệt của các gen như gen SPOCK1 liên quan đến bệnh ung thư tuyến tiền liệt (Yang et al., 2015a). Nói chung, sự biểu hiện của PKP1 và SPOCK1 thay đổi dường như là sự kiện quan trọng và thường xuyên trong bệnh ung thư tuyến tiền liệt và PKP1 được gợi ý là có chức năng ức chế khối u (Yang et al., 2015a). Sự biểu hiện của PKP1 giảm đã được chứng minh là có liên quan với thời gian ngắn hơn đáng kể với sự khởi phát hiện tượng di căn xa trong caxinom tế bào vảy ở khoang miệng (Harris et al., 2015). Sự mất PKP1 thông qua sự metyl hóa gen khởi đầu được mô tả là có liên quan với sự tiến triển của bệnh thực quản Barrett thành caxinom tuyến thực quản

(Kaz et al., 2012). PKP1 đã được chứng minh là được điều hòa tăng trong bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ và có thể là dấu ấn tốt để phân biệt các mẫu caxinom tế bào vảy (Sanchez-Palencia et al., 2011). PKP1 đã được chứng minh là được điều hòa tăng trong dòng tế bào sacom mỡ GOT3 được biệt hóa tốt (Persson et al., 2008). Sự biểu hiện PKP1 giảm được mô tả là kích thích tính di động tăng lên trong các tế bào caxinom tế bào vảy vùng đầu và cổ (Sobolik-Delmaire et al., 2007). Sự mất PKP1 đã được chứng minh là có liên quan với sự gây ung thư cổ tử cung (Schmitt-Graeff et al., 2007). PKP1 đã được chứng minh là có liên quan với sự tái phát khu trú hoặc sự di căn cũng như khả năng sống thấp ở các bệnh nhân mắc bệnh caxinom tế bào vảy ở miệng-hầu (Papagerakis et al., 2003).

Nồng độ mRNA của PKP3 tăng lên trong máu của bệnh nhân mắc bệnh ung thư dạ dày-ruột có thể được dùng làm dấu ấn sinh học và dấu hiệu dự đoán kết quả điều trị bệnh (Valladares-Ayerbes et al., 2010). Sự biểu hiện quá mức của PKP3 có tương quan với kết quả điều trị kém ở bệnh ung thư vú, bệnh ung thư phổi và bệnh ung thư tuyến tiền liệt, trong khi sự điều hòa giảm ở bệnh ung thư bàng quang có liên quan đến đặc tính xâm lấn (Furukawa et al., 2005; Breuninger et al., 2010; Demirag et al., 2012; Takahashi et al., 2012). Sự giảm nồng độ PKP3 dẫn đến nồng độ protein của MMP7 và PRL3 tăng lên, là điều kiện cần thiết cho sự di trú của tế bào và sự tạo khối u (Khapare et al., 2012; Basu et al., 2015).

Sự ức chế PPP4R1 đã được chứng minh là ức chế sự tăng sinh của tế bào trong dòng tế bào ung thư vú ZR-75-30 (Qi et al., 2015). Do đó, PPP4R1 có thể kích thích sự tăng sinh của tế bào bệnh ung thư vú và có thể đóng quan trọng trong sự xuất hiện bệnh ung thư vú (Qi et al., 2015). Sự ức chế PPP4R1 trong dòng tế bào caxinom tế bào gan HepG2 đã được chứng minh là làm giảm sự tăng sinh của tế bào, sự tạo khuẩn lạc và làm ngừng chu trình tế bào ở pha G2/M (Wu et al., 2015). Sự ức chế PPP4R1 còn được chứng minh là dẫn đến sự bất hoạt các thác truyền tín hiệu p38 và c-Jun kinaza ở đầu tận cùng N của các tế bào HepG2, điều này cho thấy rằng PPP4R1 có thể kích thích sự tăng sinh của tế bào (Wu et al., 2015). Do đó, PPP4R1 đóng vai trò quan trọng trong việc kích thích sự phát triển tế bào của caxinom tế bào gan (Wu et al., 2015). PPP4R1 được mô tả là chất điều hòa âm tính của chất ức chế hoạt tính NF- κ B kinaza trong các tế bào lymphô có sự điều hòa giảm của chất kích thích sự truyền tín hiệu NF- κ B gây ung thư trong nhóm phụ của các u lymphô tế bào T (Brechmann et al., 2012).

PRC1 được mô tả là có liên quan với sự kháng phóng xạ ở bệnh ung thư cổ tử cung do các mô ung thư cổ tử cung có sự biểu hiện của PRC1 khác biệt ở mức cao sau khi chiếu phóng xạ (Fu et al., 2015b). Locus di truyền ở intron 14 của PRC1 được mô tả là có liên quan với tính miễn cảm của bệnh ung thư vú (Cai et al., 2014). PRC1 được mô tả là một gen trong dấu hiệu năm gen có thể được đề xuất làm dấu hiệu chẩn đoán của thời gian sống không bệnh của bệnh nhân ung thư vú (Mustacchi et al., 2013). PRC1 đã được chứng minh là được điều hòa tăng trong caxinom buồng trứng, bệnh ung thư cổ tử cung và bệnh ung thư bàng quang (Espinosa et al., 2013; Ehrlichova et al., 2013; Kanehira et al., 2007). PRC1 đã được chứng minh là được điều hòa tăng trong quá trình biến nạp ác tính qua trung gian 4-hydroxy-estradiol của dòng tế bào biểu mô của động vật có vú MCF-10A (Okoh et al., 2013). PRC1 được mô tả là gen có ý nghĩa sinh học đáng kể trong sinh bệnh học khối u để có thể được sử dụng trong bộ gen để dự đoán tiên lượng đối với bệnh nhân mắc bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ có thể phẫu thuật khi sử dụng liệu pháp hóa học hỗ trợ (Tang et al., 2013). PRC1 được gợi ý là được điều hòa âm tính bởi kinaza Plk1 liên quan đến chu trình tế bào (Hu et al., 2012). Sự ức chế PRC1 trong dòng tế bào ung thư bàng quang NIH3T3 đã được chứng minh là làm tăng đáng kể các tế bào đa nhân và sự chết tế bào sau đó (Kanehira et al., 2007). Hơn nữa, PRC1 đã được chứng minh là tương tác với kháng nguyên tinh hoàn mới liên quan đến bệnh ung thư MPHOSPH1 trong các tế bào ung thư bàng quang và phức hợp MPHOSPH1/PRC1 được gợi ý là đóng vai trò quyết định trong sự gây ung thư bàng quang và có thể là đích điều trị mới (Kanehira et al., 2007). PRC1 đã được chứng minh là được điều hòa bởi p53 (Li et al., 2004).

Việc lập profin của đuôi trình tự biểu hiện đã xác định PRDM15 làm gen được điều hòa tăng trong các u lymphô (Giallourakis et al., 2013). PRDM15 được mô tả là gen ức chế khối u ứng viên có thể góp phần vào sự phát triển hoặc sự tiến triển của bệnh ung thư tụy (Bashyam et al., 2005).

Hiện tượng đa hình khác biệt trong PTHLH đã được chứng minh là có liên quan với nguy cơ và tiên lượng bệnh ung thư phổi (Manenti et al., 2000). Sự điều hòa tăng của PTHLH trong mô hình bệnh ung thư ở động vật có vú di căn tự phát có nguồn gốc từ chuột C57BL/6 được mô tả là có khả năng liên quan đến sự phát tán di căn của bệnh ung thư vú (Johnstone et al., 2015). PTHLH đã được chứng minh là được điều hòa tăng trong caxinom tế bào vảy ở miệng, mô ung thư dạng sụn, bệnh bạch cầu/u lymphô tế bào T

trưởng thành và caxinom tế bào thận tế bào sáng (Bellon et al., 2013; Yang et al., 2013a; Yao et al., 2014; Lv et al., 2014). Sự điều hòa tăng của PTHLH đã được chứng minh là có liên quan với sự biệt hóa gây bệnh kém và tiên lượng xấu ở bệnh nhân mắc caxinom tế bào vảy vùng đầu và cổ (Lv et al., 2014). PTHLH đã được chứng minh là được điều hòa tăng thông qua sự truyền tín hiệu p38 MAPK, góp phần vào sự thoát mạch tế bào ung thư ruột kết của phổi do sự chết không phụ thuộc caspaza trong các tế bào nội mô của hệ vi mạch của phổi (Urosevic et al., 2014). PTHLH đã được chứng minh là được biểu hiện khác thường đáng kể trong caxinom tế bào vảy so với da bình thường (Prasad et al., 2014). PTHLH được mô tả là một phần của dấu hiệu bốn gen có liên quan với sự sống trong số các bệnh nhân mắc bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ giai đoạn sớm (Chang et al., 2012). Sự phá vỡ chức năng kháng tăng sinh bằng sự đột biến xô dịch khung của PTHLH được mô tả là góp phần vào sự phát triển của bệnh ung thư kết-trực tràng giai đoạn sớm ở bệnh nhân mắc bệnh ung thư kết-trực tràng không phải polip có tính di truyền (Yamaguchi et al., 2006). Sự điều hòa tăng PTHLH đã được chứng minh là có liên quan với kết quả điều trị kém cả về thời gian sống thêm toàn bộ và thời gian sống thêm không bệnh đối với bệnh nhân mắc bệnh caxinom tế bào thận tế bào sáng bị cắt bỏ thận (Yao et al., 2014). PTHLH đã được chứng minh là điều biến dương tính sự tiến triển của chu trình tế bào và làm thay đổi sự biểu hiện của các protein liên quan đến sự điều hòa chu trình tế bào qua các con đường truyền tín hiệu ERK1/2, p38, MAPK, và PI3K trong dòng tế bào caxinom tuyến kết-trực tràng Caco-2 (Calvo et al., 2014).

RAP1GDS1 đã được chứng minh là kích thích sự tăng sinh của các tế bào ung thư tụy (Schuld et al., 2014). Sự mất đồng thời hai biến thể ghép của RAP1GDS1 trong các mô ghép khác loài của dòng tế bào caxinom phổi tế bào không nhỏ NCI-H1703 ở chuột đã được chứng minh là làm giảm sự tạo khối u (Schuld et al., 2014). RAP1GDS1 đã được chứng minh là kích thích sự tiến triển của chu trình tế bào trong nhiều loại bệnh ung thư, làm cho nó là đích quan trọng để điều trị bệnh ung thư (Schuld et al., 2014). RAP1GDS1 đã được chứng minh là được điều hòa tăng trong bệnh ung thư vú, bệnh ung thư tuyến tiền liệt và caxinom phổi tế bào không nhỏ (Hauser et al., 2014; Tew et al., 2008; Zhi et al., 2009). Biến thể ghép SmgGDS-558 của RAP1GDS1 đã được chứng minh là gen khởi đầu duy nhất của RhoA và hoạt tính của NF- κ B đóng vai trò chức năng trong sự ác tính của bệnh ung thư vú (Hauser et al., 2014). Sự biểu hiện RAP1GDS1 ở mức cao đã được chứng minh là có liên quan với hiệu quả lâm sàng kém trong bệnh ung thư vú (Hauser et

al., 2014). RAP1GDS1 đã được chứng minh là điều hòa sự tăng sinh, sự di trú của tế bào, và hoạt tính phiên mã của NF-kappa B trong bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ, do đó kích thích kiểu hình ác tính của bệnh này. Do đó, RAP1GDS1 là đích điều trị hấp dẫn trong bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ (Tew et al., 2008). RAP1GDS1 đã được chứng minh là được dung hợp với NUP98 trong bệnh bạch cầu dạng nguyên bào lymphô cấp tính tế bào T (Romana et al., 2006).

Hoạt tính của RNPEP đã được chứng minh là được điều hòa tăng trong u tuyến kết-trực tràng, caxinom tuyến giáp dạng nhú, bệnh ung thư vú và caxinom tế bào thận tế bào sáng (Ramirez-Exposito et al., 2012; Larrinaga et al., 2013; Perez et al., 2015; Varona et al., 2007). RNPEP đã được chứng minh là có liên quan với sự phát triển của khối u thần kinh đệm C6 ở chuột được cấy vào vùng dưới da (Mayas et al., 2012).

RORA được mô tả là gen gây ung thư tiềm năng của bệnh ung thư phổi (Wang et al., 2015e). RORA đã được chứng minh là có liên quan với sự biểu hiện của gen ức chế khối u tiềm năng OPCML trong bệnh ung thư ruột kết (Li et al., 2015a). Hai hiện tượng đa hình nucleotit đơn trong RORA đã được chứng minh là có liên quan với bệnh ung thư vú (Truong et al., 2014). RORA được mô tả là gen ức chế khối u và đích điều trị tiềm năng của bệnh ung thư vú (Du and Xu, 2012). RORA đã được chứng minh là được điều hòa giảm trong caxinom tuyến kết-trực tràng và bệnh ung thư vú (Kottorou et al., 2012; Du and Xu, 2012). Sự biểu hiện quá mức ổn định của RORA trong dòng tế bào u gan HepG2 đã được chứng minh là ảnh hưởng đến sự biểu hiện của các gen liên quan đến sự chuyển hóa glucoza và sự gây ung thư gan, điều này cho thấy mối liên quan của RORA với sự gây ung thư trong các tế bào có nguồn gốc từ gan (Chauvet et al., 2011). RORA đã được chứng minh là được metyl hóa khác biệt trong bệnh ung thư dạ dày so với niêm mạc dạ dày bình thường (Watanabe et al., 2009). RORA được mô tả là có liên quan với sự kiểm soát sự phát triển và sự biệt hóa của tế bào, và với sự kiểm soát tập tính di căn trong dòng tế bào ung thư tuyến tiền liệt DU 145 không phụ thuộc androgen (Moretti et al., 2002).

RPS17 đã được chứng minh là được biểu hiện khác biệt trong u melanin màng mạch nhỏ di căn trong máu toàn phần và mô bình thường dễ bị di căn bởi u melanin màng mạch nhỏ, điều này gợi ý rằng RPS17 có thể đóng vai trò trong sự hướng tính của sự di căn u melanin màng mạch nhỏ (Demirci et al., 2013). RPS17 đã được chứng minh là được điều hòa tăng trong caxinom tế bào gan (Liu et al., 2007b).

Sự làm giảm nồng độ RPS26 đã được chứng minh là tạo ra sự ổn định và hoạt hóa p53, điều này dẫn đến sự ức chế mức độ phát triển của tế bào phụ thuộc p53 (Cui et al., 2014). RPS26 còn được chứng minh là đóng vai trò trong đáp ứng làm tổn thương ADN bằng cách tác động trực tiếp đến hoạt tính phiên mã của p53 (Cui et al., 2014).

S100A2 đã được chứng minh là có liên quan với bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ và được mô tả là dấu hiệu dự đoán của thời gian sống thêm toàn bộ ngắn ở các bệnh nhân mắc bệnh caxinom phổi có vảy (Hountis et al., 2014; Zhang et al., 2015d). S100A2 được mô tả là đích xuôi dòng của gen gây ung thư KRAS và gen khởi đầu của sự tiến triển khối u trong bệnh ung thư phổi (Woo et al., 2015). S100A2 được mô tả là dấu ấn hứa hẹn để dự đoán thời gian sống thêm toàn bộ trong caxinom tuyến ống tụy (Jamieson et al., 2011). Sự biểu hiện của S100A2 thay đổi thông qua nitrosamin N-nitrosopyrrolidon được mô tả là nguyên nhân tiềm tàng của sự tiến triển khối u của caxinom tế bào vảy ở thực quản trong số những người Nam Phi da đen (Pillay et al., 2015). S100A2 đã được chứng minh là được điều hòa tăng trong giai đoạn sớm của bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ, trong huyết tương của bệnh nhân mắc bệnh caxinom mũi-họng, bệnh ung thư thanh quản, bệnh ung thư dạ dày và khối u biểu bì (Zhu et al., 2013a; Lin et al., 2013; Zhang et al., 2015a; Zha et al., 2015; Wang et al., 2015c). Sự bất hoạt S100A2 liên quan đến sự metyl hóa đã được chứng minh là thường xuyên trong bệnh ung thư vùng đầu và cổ và bệnh ung thư bàng quang, và do đó có thể là sự kiện quan trọng trong sự tạo khối u của các bệnh này (Lee et al., 2015c). Sự biểu hiện trong chất tế bào của S100A2 đã được chứng minh là được điều hòa tăng trong caxinom tế bào vảy ở miệng, trong khi sự biểu hiện trong nhân được điều hòa giảm (Kumar et al., 2015). Sự điều hòa tăng S100A2 trong chất tế bào đã được chứng minh là yếu tố dự đoán tiềm năng của nguy cơ tái phát ở bệnh nhân mắc bệnh caxinom tế bào vảy ở miệng (Kumar et al., 2015). S100A2 được mô tả là đóng vai trò trong sự di căn của caxinom ở động vật có vú (Naba et al., 2014). S100A2 đã được chứng minh là gen ức chế khối u được điều hòa đồng thời của BRCA1/p63, gen này đóng vai trò trong sự điều hòa tính ổn định của thể đột biến p53 bằng cách điều biến sự gắn kết của thể đột biến p53 với HSP90 (Buckley et al., 2014). S100A2 được mô tả là gen ức chế khối u ứng viên được điều hòa giảm trong bệnh ung thư mũi-họng tái phát, và do đó có thể đóng vai trò quan trọng trong sự xuất hiện bệnh ung thư mũi-họng tái phát (Huang et al., 2014b). S100A2 đã được chứng minh là được điều hòa giảm trong bệnh ung thư dạ dày và sự điều hòa giảm đã được chứng minh là có liên quan với sự xâm lấn

sâu tiến triển, sự di căn hạch bạch huyết, sự giảm khả năng không tái phát, và sự giảm thời gian sống thêm toàn bộ (Liu et al., 2014e). Do đó, sự điều hòa giảm S100A2 có thể là dấu ấn sinh học chẩn đoán không phụ thuộc kết quả âm tính của bệnh ung thư dạ dày (Liu et al., 2014e). S100A2 còn được chứng minh là điều hòa âm tính con đường truyền tín hiệu MEK/ERK trong các tế bào ung thư MGC-803 (Liu et al., 2014e). Sự biểu hiện quá mức của S100A2 đã được chứng minh là gây ra sự chuyển tiếp biểu mô-mô giữa trong các tế bào ung thư phổi A549, sau đó là sự xâm lấn gia tăng và sự phosphoryl hóa Akt tăng lên và sự phát triển của khối u tăng lên ở chuột bị suy giảm miễn dịch (Naz et al., 2014). Tác dụng tạo tiền khối u của S100A2 còn được mô tả là liên quan đến sự điều hòa quá trình truyền tín hiệu PI3/Akt và tương tác chức năng với cách truyền tín hiệu TGF beta của protein Smad3 (Naz et al., 2014). Sự biểu hiện của S100A2 đã được chứng minh là có tương quan với sự phân độ mô học, sự di căn hạch bạch huyết, giai đoạn lâm sàng, và tỷ lệ sống thấp của bệnh nhân mắc bệnh caxinom đường mật quanh rốn và ngoài gan (Sato et al., 2013). Do đó, S100A2 có thể có tác dụng làm dấu hiệu chẩn đoán ở bệnh nhân mắc bệnh caxinom đường mật (Sato et al., 2013).

S100A8 được mô tả là chất trung gian quan trọng trong bệnh viêm cấp tính và mạn tính có tương tác với các tế bào của gen ức chế có nguồn gốc từ tủy bào trong vòng liên hệ ngược dương tính để kích thích sự phát triển của khối u và sự di căn (Zheng et al., 2015). S100A8 được mô tả là dấu ấn sinh học chẩn đoán tiềm năng, dấu hiệu chỉ báo dự đoán và đích điều trị trong bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ (Lim and Thomas, 2013). Sự biểu hiện quá mức của S100A8 đã được chứng minh là có liên quan với sự tiến triển giai đoạn, sự xâm lấn, sự di căn và tỷ lệ sống thấp trong bệnh ung thư bàng quang (Yao et al., 2007). S100A8 đã được chứng minh là dấu ấn chẩn đoán của caxinom bàng quang xâm lấn (Ismail et al., 2015). S100A8 đã được chứng minh là được điều hòa tăng trong caxinom tuyến giáp thể thoái biến, khối u tế bào khổng lồ của bệnh ung thư xương và bệnh ung thư kết-trực tràng (Reeb et al., 2015; Zhang et al., 2015b; Liao et al., 2015a). Phân tích *in vivo* trên chuột bằng cách sử dụng các tế bào caxinom tuyến giáp thoái biến có sự ức chế S100A8 cho thấy sự phát triển của khối u và sự di căn phổi giảm, cũng như sự sống của động vật được kéo dài đáng kể (Reeb et al., 2015). S100A8 đã được chứng minh là kích thích sự tăng sinh tế bào của caxinom tuyến giáp thoái biến thông qua sự tương tác với RAGE, quá trình này làm hoạt hóa con đường truyền tín hiệu p38, ERK1/2 và JNK trong các tế bào khối u (Reeb et al., 2015). Do đó, S100A8 có thể là đích điều trị

thích hợp trong caxinom tuyến giáp thoái biến (Reeb et al., 2015). S100A8 đã được chứng minh là có liên quan với bệnh bạch cầu dạng nguyên bào lymphô mạn tính nguy cơ cao (Alsagaby et al., 2014). S100A8 đã được chứng minh là có liên quan với sự tiến triển bệnh ung thư thận và được mô tả là dấu ấn sinh học triển vọng và đích điều trị của bệnh ung thư thận (Mirza et al., 2014). S100A8 được mô tả là một phần của calprotectin, thành phần này là heterodime cần thiết cho sự tiến triển của khối u gan được định hướng không viêm và có thể là đích điều trị của bệnh caxinom tế bào gan (De et al., 2015). S100A8 đã được chứng minh là điều hòa chu trình tế bào của bệnh ung thư ruột kết và sự tăng sinh do sự biểu hiện Id3 gây ra trong khi ức chế p21 (Zhang et al., 2015b).

SERPINH1 mã hóa chất ức chế serpin peptidaza, đơn vị huyết thống đơn tố H (protein sốc nhiệt 47), thành viên 1, (protein 1 gắn kết collagen 1), chất ức chế serin proteinaza. SERPINH1 có tác dụng làm phân tử chaperon đặc hiệu với collagen trong lưới nội bào tương (RefSeq, 2002). SERPINH1 được biểu hiện quá mức ở nhiều bệnh ung thư ở người, bao gồm bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư phổi, caxinom tuyến ống tụy, u thần kinh đệm, và caxinom liên quan đến bệnh viêm loét đại tràng (Zhao et al., 2014a). SERPINH1 đã được chứng minh là được điều hòa tăng trong caxinom tế bào gan, caxinom tế bào vảy ở thực quản, caxinom tế bào ống dẫn mật, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư phổi, caxinom tuyến ống tụy, caxinom liên quan đến bệnh viêm loét đại tràng và u thần kinh đệm (Zhao et al., 2014a; Padden et al., 2014; Lee et al., 2015b; Naboulsi et al., 2015). Sự biểu hiện quá mức của SERPINH1 đã được chứng minh là có liên quan với tiên lượng xấu ở bệnh nhân mắc bệnh caxinom tế bào vảy ở thực quản và mức độ nhuộm miễn dịch của SERPINH1 và giai đoạn gây bệnh đã được chứng minh là có tương quan đáng kể với tổng thời gian sống thêm và thời gian sống thêm không có sự tái phát bệnh (Lee et al., 2015b). Do đó, SERPINH1 có thể là dấu ấn sinh học chẩn đoán tiềm năng của caxinom tế bào vảy ở thực quản (Lee et al., 2015b). Sự làm giảm nồng độ SERPINH1 trong các tế bào u thần kinh đệm đã được chứng minh là ức chế sự phát triển của tế bào u thần kinh đệm, sự di trú và sự xâm lấn *in vitro* trong khi sự làm giảm nồng độ SERPINH1 *in vivo* đã được chứng minh là ức chế sự phát triển của khối u và gây ra sự chết tế bào theo chương trình (Zhao et al., 2014a). Do đó, SERPINH1 có thể là đích điều trị để điều trị u thần kinh đệm (Zhao et al., 2014a). SERPINH1 đã được chứng minh là được điều hòa giảm trong bệnh di căn so với khối u nguyên phát của caxinom tế bào vảy ở miệng có nhiều hạch bạch huyết, điều này cho thấy rằng SERPINH1 có thể có liên

quan với khả năng di căn của các khối u này (Nikitakis et al., 2003).

SLC7A11 đã được chứng minh là được điều hòa giảm trong các biến thể kháng thuốc của các dòng tế bào ung thư buồng trứng W1 và do đó có thể đóng vai trò trong sự kháng thuốc của tế bào ung thư (Januchowski et al., 2013). SLC7A11 được mô tả là điều biến vi môi trường khối u, dẫn đến có lợi cho sự phát triển của bệnh ung thư (Savaskan and Eyupoglu, 2010). SLC7A11 được mô tả là có liên quan đến quá trình thoái hóa thần kinh trong u thần kinh đệm, thiết lập SLC7A11 làm đích môi tiềm năng của liệu pháp điều trị bệnh ung thư (Savaskan et al., 2015). SLC7A11 đã được chứng minh là bị ức chế bởi p53 trong trường hợp gây chết tế bào phụ thuộc sắt, và trục p53-SLC7A11 được mô tả là được bảo toàn trong thể đột biến p53(3KR), và góp phần vào khả năng ức chế của nó đối với sự tạo khối u khi không có mặt cơ chế ức chế khối u cổ điển (Jiang et al., 2015). SLC7A11 được mô tả là cấu trúc dưới phân tử chức năng của hệ Xc- có chức năng tăng lên trong các tế bào ung thư vú xâm lấn (Linher-Melville et al., 2015). Mức độ nhuộm màng cao đối với SLC7A11 trong bệnh ung thư bàng quang kháng cisplatin đã được chứng minh là có liên quan với hiệu quả lâm sàng kém hơn và sự ức chế SLC7A11 được mô tả là phương pháp điều trị hứa hẹn để điều trị bệnh này (Drayton et al., 2014). SLC7A11 đã được chứng minh là được biểu hiện khác thường trong dòng tế bào bệnh bạch cầu tiền tủy bào ở người HL-60 đã được cho tiếp xúc với benzen và các chất chuyển hóa của nó và do đó làm nổi bật mối liên quan tiềm năng của SLC7A11 với sự gây bệnh bạch cầu (Sarma et al., 2011). Sự phá vỡ SLC7A11 được mô tả là gây ức chế sự phát triển của nhiều bệnh caxinom, bao gồm u lymphô, u thần kinh đệm, bệnh ung thư tuyến tiền liệt và bệnh ung thư vú (Chen et al., 2009). Sự ức chế SLC7A11 đã được chứng minh là ức chế sự xâm lấn của tế bào trong dòng tế bào ung thư thực quản KYSE150 *in vitro* và sự di căn trong thử nghiệm của nó trong chuột không lông và do đó thiết lập vai trò của SLC7A11 trong sự di căn của khối u (Chen et al., 2009).

SRPR đã được chứng minh là được khuếch đại trong trường hợp bệnh bạch cầu tủy bào cấp tính có các nhiễm sắc thể nhỏ kép (Crossen et al., 1999).

Gen cùng nguồn SSR4 của người đã được chứng minh là được biểu hiện khác thường trong dòng tế bào u melanin của giống Thú có túi *Opossum* TD6b và TD15L2 và được điều hòa tăng trong khối u ở giai đoạn tiến triển, điều này cho thấy SSR4 là gen ứng viên có chức năng tiềm năng có thể có liên quan với sự tạo u melanin do tia tử ngoại gây ra và sự di căn (Wang and VandeBerg, 2004). Nồng độ mRNA của SSR4 đã được chứng

minh là được làm giàu trong dòng tế bào sacom xương OHS, SaOS-2 và KPDXM so với các tế bào nguyên bào xương bình thường (Olstad et al., 2003).

Mức độ biểu hiện của STK17A được điều hòa giảm có liên quan đến các loại bệnh ung thư khác nhau. Mức độ biểu hiện giảm trong bệnh ung thư cổ tử cung và bệnh ung thư kết-trực tràng có liên quan đến đặc tính tiên chết tế bào theo chương trình của STK17A liên quan đến sự tiến triển của khối u. STK17A trong u nguyên bào xộp và bệnh ung thư vùng đầu và cổ được biểu hiện quá mức theo cách phụ thuộc cấp độ, có thể được tạo ra thông qua sự tác động đối với các con đường liên quan đến khối u khác như TGF-beta (Mao et al., 2013a; Thomas et al., 2013; Park et al., 2015; Bandres et al., 2004). STK17A là đích trực tiếp của gen ức chế khối u p53 và chất điều biến gốc oxy có khả năng phản ứng (reactive oxygen species: ROS) (Kerley-Hamilton et al., 2005; Mao et al., 2011).

SYK được mô tả là chất điều biến của sự tạo khối u, chất này có tác dụng làm gen khởi đầu của khối u, bằng cách tạo ra chức năng sống, trong một số tế bào và làm gen ức chế khối u, bằng cách giới hạn sự chuyển tiếp biểu mô-mô giữa và ức chế sự di trú, theo cách khác (Krisenko and Geahlen, 2015). SYK được mô tả là có liên quan với sự hoạt hóa thụ thể tế bào (B-cell receptor: BCR) trong các u lymphô tế bào B (Seda and Mraz, 2015). Sự ức chế các kinaza quan trọng của con đường BCR như SYK đã được phát hiện trong các mô hình tiền lâm sàng để làm giảm khả năng sống của tế bào trong bệnh bạch cầu dạng lymphô mạn tính (Davids and Brown, 2012). SYK đã được chứng minh là được điều hòa tăng trong bệnh bạch cầu dạng lymphô mạn tính (Feng and Wang, 2014). SYK được mô tả là có liên quan với sinh bệnh học của bệnh bạch cầu dạng lymphô mạn tính và có thể có giá trị trong việc đánh giá hiệu quả của liệu pháp và sự tiên lượng của bệnh này (Feng and Wang, 2014). SYK được mô tả là gen ức chế khối u tiềm năng trong bệnh ung thư vú mà không có các khối u vú nguyên phát có tương quan với hiệu quả điều trị kém (Navara, 2004). SYK đã được chứng minh là đóng vai trò quan trọng trong sự kháng paclitaxel trong bệnh ung thư buồng trứng (Yu et al., 2015b). Sự điều hòa giảm SYK được mô tả là có liên quan với sự phát triển của nhiều loại bệnh ung thư khác nhau, bao gồm cả bệnh ung thư kết-trực tràng (Peng et al., 2015). Hiện tượng đa hình khác biệt trong gen khởi đầu SYK đã được chứng minh là yếu tố nguy cơ độc lập đối với sự phát triển của bệnh ung thư kết-trực tràng trong quần thể người Hán ở nam Trung Quốc (Peng et al., 2015). SYK đã được chứng minh là thường được methyl hóa trong caxinom tế bào

gan và sự methyl hóa SYK đã được chứng minh là xác định nhóm phụ của các trường hợp caxinom tế bào gan có tiên lượng xấu (Shin et al., 2014).

Sự chuyển dịch TP63 được mô tả là sự kiện trong nhóm phụ của các u lymphô tế bào lớn thể thoái biến dương tính với u lymphô kinaza thể thoái biến có liên quan đến quá trình xâm lấn của bệnh này (Hapgood and Savage, 2015). TP63 được mô tả là đóng vai trò phức hợp trong bệnh ung thư do sự liên quan của nó trong sự biệt hóa biểu mô, sự ngừng chu trình tế bào và sự chết tế bào theo chương trình (Lin et al., 2015). Thể đồng dạng TAp63 của TP63 được mô tả là được biểu hiện quá mức trong các bệnh ác tính tạo máu trong khi sự đột biến sai nghĩa của TP63 đã được thông báo trong bệnh ung thư có vảy và sự chuyển dịch TP63 trong các u lymphô và một số caxinom tuyến phổi (Orzol et al., 2015). Sự ghép bất thường dẫn đến sự biểu hiện quá mức của thể đồng dạng DeltaNp63 của TP63 được mô tả là thường được tìm thấy trong các bệnh ung thư ở người như caxinom tế bào vảy ở da, mà ở đó nó có khả năng tạo ra sự khơi mào và sự tiến triển của khối u (Missero and Antonini, 2014; Inoue and Fry, 2014).

TPM1 đã được chứng minh là được điều hòa giảm trong caxinom tế bào thận, caxinom tế bào vảy của dòng tế bào thực quản, caxinom ở động vật có vú thuộc về chó di căn và dòng tế bào u nguyên bào thần kinh (Klopfleisch et al., 2010; Yager et al., 2003; Zare et al., 2012; Wang et al., 2015b). Sự biểu hiện TPM1 đã được chứng minh là có liên quan với kích thước khối u, giai đoạn Fuhrman và sự tiên lượng của các bệnh nhân mắc bệnh caxinom tế bào thận. Sự chuyển nhiễm TPM1 của dòng tế bào caxinom tế bào thận OSRC-2 và 786-O đã được chứng minh là làm giảm khả năng di trú và xâm lấn, trong khi làm tăng sự chết tế bào theo chương trình (Wang et al., 2015b). Do đó, TPM1 được mô tả là có đặc tính của gen ức chế khối u trong khi được biểu hiện quá mức trong các tế bào caxinom tế bào thận (Wang et al., 2015b). Các con đường truyền tín hiệu RAS/PI3K/AKT và RAS/MEK/ERK được mô tả là có liên quan với sự điều hòa và ức chế TPM1 trong dòng tế bào caxinom đường mật trong gan HuCCT1, cũng như trong dòng tế bào caxinom có vảy ở thực quản (Zare et al., 2012; Yang et al., 2013b). TPM1 được mô tả là gen ức chế khối u có sự biểu hiện quá mức trong dòng tế bào ung thư vú MCF-7 ức chế sự phát triển của tế bào không phụ thuộc yếu tố cố định (Zhu et al., 2007b). Sự ức chế TPM1 về di truyền học biểu sinh được mô tả là có liên quan với chức năng của gen ức chế khối u TGF-beta được thay đổi và có thể góp phần vào đặc tính di căn của các tế bào khối u (Varga et al., 2005).

Tryptaza đã được chứng minh là được điều hòa tăng trong một số bệnh nhân mắc bệnh bạch cầu tủy bào cấp tính (Jin et al., 2014). Sự biểu hiện của tryptaza được mô tả là được điều hòa bởi sự truyền tín hiệu SCF/C-KIT qua các con đường ERK1/2 và p38MAPK (Jin et al., 2014). Tryptaza của tế bào bón được mô tả là có liên quan đến sự tạo mạch của bệnh ung thư kết-trực tràng và đã được chứng minh là được biểu hiện trong huyết thanh của bệnh nhân ung thư kết-trực tràng trước khi phẫu thuật cắt bỏ hoàn toàn là cao hơn so với sau khi phẫu thuật cắt bỏ hoàn toàn (Ammendola et al., 2014).

TSHZ3 đã được chứng minh là được điều hòa giảm trong dòng tế bào caxinom tế bào vảy ở miệng SCC-9 so với dòng tế bào không tạo khối u OKF6-TERT1R (Marcinkiewicz and Gudas, 2014). TSHZ3 được mô tả là gen điều hòa phiên mã đã phát hiện được tái sắp xếp lại trong một số trường hợp bệnh ung thư buồng trứng thể thanh dịch mức độ cao (McBride et al., 2012). TSHZ3 được mô tả là gen ức chế khối u ứng viên có sự biểu hiện được điều hòa giảm trong bệnh ung thư vú và bệnh ung thư tuyến tiền liệt (Yamamoto et al., 2011).

TSPAN10 đã được chứng minh là gen được biểu hiện khác thường giữa các mẫu u melanin di căn và mẫu da bình thường có thể là dấu ấn sinh học tiềm năng của liệu pháp điều trị u melanin di căn (Liu et al., 2014c). Ngoài các gen khác, TSPAN10 đã được chứng minh là được điều hòa tăng trong sự di căn của sacom cơ trơn tử cung so với sacom cơ trơn nguyên phát và do đó, gen này góp phần vào sự biệt hóa của các tình trạng bệnh này và có thể trợ giúp cho việc tìm hiểu sự tiến triển của khối u trong bệnh ung thư này (Davidson et al., 2014).

TTPAL được mô tả là gen gây ung thư ứng viên có các đột biến trong bệnh ung thư kết-trực tràng có tính bất ổn định vi vệ tinh (Tuupanen et al., 2014).

TUBGCP2 đã được chứng minh là được điều hòa tăng trong dòng tế bào ung thư buồng trứng kháng taxol và được mô tả là có liên quan với sự gây miễn cảm của dòng tế bào caxinom phổi tế bào không nhỏ NCI-H1155 với taxol (Huang and Chao, 2015). TUBGCP2 đã được chứng minh là được điều hòa tăng trong u nguyên bào xóp, ở đó sự biểu hiện quá mức của nó làm trung hòa hiệu quả ức chế của protein 3 của gen ức chế khối u liên quan đến cấu trúc dưới phân tử điều hòa của CDK5 đối với hoạt tính kiểm soát pha G2/M của sự tổn thương ADN (Draberova et al., 2015).

VIM được mô tả là đích xuôi dòng của STAT3 có liên quan đến sự tiến triển của khối u vú khi có sự điều hòa giảm thông qua STAT3 (Banerjee and Resat, 2015). VIM

được mô tả là protein liên quan đến caxinom mũi-họng tiềm năng (Chen et al., 2015c). Trạng thái metyl hóa âm tính của vimentin đã được chứng minh là dự đoán sự tiên lượng được cải thiện ở bệnh nhân ung thư tụy (Zhou et al., 2014). VIM đã được chứng minh là được điều hòa tăng thông qua C6orf106 trong bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ và được mô tả là có liên quan sau đó với sự xâm lấn của tế bào ung thư gia tăng (Zhang et al., 2015c). VIM được mô tả là yếu tố dự đoán độc lập về thời gian sống thêm toàn bộ của các bệnh nhân mắc bệnh caxinom phổi dạng tế bào vảy (Che et al., 2015). VIM được mô tả là dấu ấn sinh học có thể có khả năng phân biệt các kiểu phụ của u melanin và có thể dự đoán sự xâm lấn của u melanin trong các nhóm phụ khác nhau của u melanin (Qendro et al., 2014). VIM đã được chứng minh là được điều hòa tăng trong caxinom tế bào thận tế bào sáng (Shi et al., 2015). Sự biểu hiện VIM ở mức cao được mô tả là dấu hiệu chẩn đoán độc lập của caxinom tế bào thận tế bào sáng (Shi et al., 2015). VIM đã được chứng minh là có tác dụng làm khung để huy động Slug đến ERK và để kích thích sự phosphoryl hóa Slug, quá trình đã được mô tả là điều kiện cần thiết cho sự khởi mào quá trình chuyển tiếp biểu mô-mô giữa, quá trình phát triển được chọn trong khi tạo khối u để kích thích khả năng di căn (Virtakoivu et al., 2015).

WDR1 đã được chứng minh là được điều hòa tăng trong dịch kẽ mô từ caxinom buồng trứng và các khối u tế bào bón ở da chó mức độ cao có tiên lượng xấu so với khối u tế bào bón mức độ thấp có tiên lượng tốt (Schlieben et al., 2012; Haslene-Hox et al., 2013). WDR1 đã được chứng minh là được điều hòa giảm trong caxinom buồng trứng biểu mô thể thanh dịch tiến triển kháng hóa chất (Kim et al., 2011). Sự điều hòa giảm WDR1 trong caxinom buồng trứng biểu mô thể thanh dịch tiến triển kháng hóa chất đã được chứng minh là có tương quan với thời gian sống thêm toàn bộ ngắn (Kim et al., 2011). WDR1 đã được chứng minh là được điều hòa tăng trong vùng giữa trước khi khối u xâm lấn và mô bình thường (vùng bề mặt phân cách) trong bệnh ung thư vú và do đó có thể liên quan đến sự tiến triển và sự di căn của caxinom vú (Kang et al., 2010).

Sự dung hợp YWHAE với NUTM2B/NUTM2E được mô tả là sự kiện quan sát được trong số ít sacom tế bào sáng của thận (Karlsson et al., 2015). Sự dung hợp YWHAE-NUTM2 được mô tả là sự kiện thường xuyên trong sacom mô đỡ màng trong tử cung mức độ cao (Ali et al., 2014). Sacom mô đỡ màng trong tử cung mức độ cao có sự dung hợp YWHAE-NUTM2 được mô tả là nhóm phụ của sacom mô đỡ màng trong tử cung có tập tính xâm lấn trong lâm sàng và tiên lượng xấu (Kruse et al., 2014). Sự phá vỡ

ở ba locus bao gồm cả YWHAE được mô tả là yếu tố góp phần đáng kể vào sự phát triển của sacom mạch tử cung (Suzuki et al., 2014). YWHAE đã được chứng minh là được điều hòa giảm trong bệnh ung thư dạ dày và nồng độ YWHAE giảm có liên quan với bệnh ung thư dạ dày kiểu lan tỏa và sự khởi phát sớm của bệnh lý này, điều này cho thấy rằng YWHAE có thể có vai trò trong quá trình gây ung thư dạ dày (Leal et al., 2012). YWHAE đã được chứng minh là được biểu hiện khác thường trong các mô của bệnh nhân ung thư vú có và không có sự tái phát và đã được chứng minh là có liên quan với cả thời gian sống thêm toàn bộ và thời gian sống thêm không bệnh (Cimino et al., 2008). Do đó, YWHAE có thể được sử dụng làm dấu hiệu chẩn đoán độc lập và đích được chất tiềm năng của bệnh ung thư vú (Cimino et al., 2008).

Sự thay đổi về ZNF292 được mô tả là sự thay đổi yếu tố định hướng của bệnh bạch cầu dạng nguyên bào lymphô mạn tính (Puente et al., 2015). ZNF292 được mô tả là gen ức chế khối u trong bệnh ung thư kết-trực tràng (Takeda et al., 2015). ZNF292 được mô tả là kháng nguyên sinh miễn dịch có liên quan về mặt lâm sàng trong caxinom tế bào vảy vùng đầu và cổ (Heubeck et al., 2013).

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Các hình vẽ từ Fig.1A đến Fig.1V thể hiện sự biểu hiện quá mức của các peptit khác nhau trong mô bình thường (cột màu trắng) và bệnh ung thư thực quản (cột màu đen). Fig.1A) Ký hiệu gen: KRT14/KRT16, Peptit: STYGGGLSV (SEQ ID NO: 1) Các mô từ trái sang phải: 1 mô mỡ, 3 tuyến thượng thận, 8 động mạch, 5 tủy xương, 7 não, 5 vú, 2 sụn, 1 dây thần kinh trung ương, 13 ruột kết, 1 tá tràng, 2 túi mật, 5 tim, 14 thận, 21 gan, 44 phổi, 4 hạch bạch huyết, 4 mẫu bạch cầu, 3 buồng trứng, 8 tụy, 5 dây thần kinh ngoại vi, 1 màng bụng, 3 tuyến yên, 4 nhau thai, 3 màng phổi, 3 tuyến tiền liệt, 6 trực tràng, 7 tuyến nước bọt, 4 cơ xương, 6 da, 2 ruột non, 4 lách, 5 dạ dày, 6 tinh hoàn, 3 tuyến ức, 3 tuyến giáp, 7 khí quản, 2 niệu quản, 6 bàng quang, 2 tử cung, 2 tĩnh mạch, 6 thực quản, 16 mẫu bệnh ung thư thực quản. Peptit được phát hiện bổ sung trên 4/91 mẫu bệnh ung thư phổi. Fig.1B) Ký hiệu gen: GJB5, Peptit: SIFEGLLSGV (SEQ ID NO: 7). Các mô từ trái sang phải: 1 mô mỡ, 3 tuyến thượng thận, 8 động mạch, 5 tủy xương, 7 não, 5 vú, 2 sụn, 1 dây thần kinh trung ương, 13 ruột kết, 1 tá tràng, 2 túi mật, 5 tim, 14 thận, 21 gan, 44 phổi, 4 hạch bạch huyết, 4 mẫu bạch cầu, 3 buồng trứng, 8 tụy, 5 dây thần kinh ngoại vi, 1 màng bụng, 3 tuyến yên, 4 nhau thai, 3 màng phổi, 3 tuyến tiền liệt,

6 trực tràng, 7 tuyến nước bọt, 4 cơ xương, 6 da, 2 ruột non, 4 lách, 5 dạ dày, 6 tinh hoàn, 3 tuyến ức, 3 tuyến giáp, 7 khí quản, 2 niệu quản, 6 bàng quang, 2 tử cung, 2 tĩnh mạch, 6 thực quản, 16 mẫu bệnh ung thư thực quản. Peptit được phát hiện bổ sung trên 1/43 mẫu bệnh ung thư tuyến tiền liệt, 1/3 mẫu bệnh ung thư túi mật, 1/20 mẫu bệnh ung thư buồng trứng, 5/91 mẫu bệnh ung thư phổi và 1/4 mẫu bệnh ung thư bàng quang. Fig.1C) Ký hiệu gen: PKP3, Peptit: SLVSEQLEPA (SEQ ID NO: 34). Các mô từ trái sang phải: 1 mô mỡ, 3 tuyến thượng thận, 8 động mạch, 5 tủy xương, 7 não, 5 vú, 2 sụn, 1 dây thần kinh trung ương, 13 ruột kết, 1 tá tràng, 2 túi mật, 5 tim, 14 thận, 21 gan, 44 phổi, 4 hạch bạch huyết, 4 mẫu bạch cầu, 3 buồng trứng, 8 tụy, 5 dây thần kinh ngoại vi, 1 màng bụng, 3 tuyến yên, 4 nhau thai, 3 màng phổi, 3 tuyến tiền liệt, 6 trực tràng, 7 tuyến nước bọt, 4 cơ xương, 6 da, 2 ruột non, 4 lách, 5 dạ dày, 6 tinh hoàn, 3 tuyến ức, 3 tuyến giáp, 7 khí quản, 2 niệu quản, 6 bàng quang, 2 tử cung, 2 tĩnh mạch, 6 thực quản, 16 mẫu bệnh ung thư thực quản. Peptit được phát hiện bổ sung trên 8/24 mẫu bệnh ung thư kết-trực tràng, 1/20 mẫu bệnh ung thư buồng trứng, 1/46 mẫu bệnh ung thư dạ dày, 5/91 mẫu bệnh ung thư phổi và 2/4 mẫu bệnh ung thư bàng quang. Fig.1D) Ký hiệu gen: RNPEP, Peptit: YTQPF SHYGQAL (SEQ ID NO: 37). Các mô từ trái sang phải: 1 mô mỡ, 3 tuyến thượng thận, 8 động mạch, 5 tủy xương, 7 não, 5 vú, 2 sụn, 1 dây thần kinh trung ương, 13 ruột kết, 1 tá tràng, 2 túi mật, 5 tim, 14 thận, 21 gan, 44 phổi, 4 hạch bạch huyết, 4 mẫu bạch cầu, 3 buồng trứng, 8 tụy, 5 dây thần kinh ngoại vi, 1 màng bụng, 3 tuyến yên, 4 nhau thai, 3 màng phổi, 3 tuyến tiền liệt, 6 trực tràng, 7 tuyến nước bọt, 4 cơ xương, 6 da, 2 ruột non, 4 lách, 5 dạ dày, 6 tinh hoàn, 3 tuyến ức, 3 tuyến giáp, 7 khí quản, 2 niệu quản, 6 bàng quang, 2 tử cung, 2 tĩnh mạch, 6 thực quản, 16 mẫu bệnh ung thư thực quản. Peptit được phát hiện bổ sung trên 1/19 mẫu bệnh ung thư tụy, 7/46 mẫu bệnh ung thư dạ dày và 1/91 mẫu bệnh ung thư phổi. Fig.1E) Ký hiệu gen: NUP155, Peptit: ALQEALENA (SEQ ID NO: 80). Các mẫu từ trái sang phải: 4 dòng tế bào (1 thận, 1 tụy, 1 tuyến tiền liệt, 1 bệnh bạch cầu tủy bào), 3 mô bình thường (1 phổi, 1 tuyến tiền liệt, 1 ruột non), 47 mô ung thư (5 bệnh ung thư não, 2 bệnh ung thư vú, 1 bệnh ung thư ruột kết, 2 bệnh ung thư thực quản, 1 bệnh bạch cầu mạn tính, 2 bệnh ung thư gan, 22 bệnh ung thư phổi, 7 bệnh ung thư buồng trứng, 4 bệnh ung thư tuyến tiền liệt, 1 bệnh ung thư trực tràng). Fig.1F) Ký hiệu gen: KRT5, Peptit: SLYNLGGSKRISI (SEQ ID NO: 2). Các mô từ trái sang phải: 20 mô ung thư (9 bệnh ung thư vùng đầu và cổ, 2 bệnh ung thư thực quản, 1 bệnh ung thư thực quản và dạ dày, 7 bệnh ung thư phổi, 1 bệnh ung thư bàng

quang). Fig.1G) Ký hiệu gen: KRT5, Peptit: TASAITPSV (SEQ ID NO: 3). Các mô từ trái sang phải: 17 mô ung thư (2 bệnh ung thư thực quản, 6 bệnh ung thư vùng đầu và cổ, 7 bệnh ung thư phổi, 2 bệnh ung thư bàng quang). Fig.1H) Ký hiệu gen: S100A2, Peptit: SLDENSDDQQV (SEQ ID NO: 10). Các mô từ trái sang phải: 7 mô ung thư (3 bệnh ung thư vùng đầu và cổ, 2 bệnh ung thư thực quản, 1 bệnh ung thư phổi, 1 bệnh ung thư bàng quang). Fig.1I) Ký hiệu gen: LAMB3, Peptit: ALWLPTDSATV (SEQ ID NO: 11). Các mô từ trái sang phải: 12 mô ung thư (2 bệnh ung thư thực quản, 1 bệnh ung thư túi mật, 8 bệnh ung thư phổi, 1 bệnh ung thư da). Fig.1J) Ký hiệu gen: IL36RN, Peptit: SLSPVILGV (SEQ ID NO: 13). Các mô từ trái sang phải: 26 mô ung thư (8 bệnh ung thư vùng đầu và cổ, 3 bệnh ung thư thực quản, 10 bệnh ung thư phổi, 3 bệnh ung thư da, 1 bệnh ung thư bàng quang, 1 bệnh ung thư tử cung). Fig.1K) Ký hiệu gen: ANO1, Peptit: LLANGVYAA (SEQ ID NO: 15). Các mô từ trái sang phải: 8 mô ung thư (2 bệnh ung thư thực quản, 1 bệnh ung thư túi mật, 1 bệnh ung thư gan, 1 bệnh ung thư phổi, 1 bệnh ung thư dạ dày, 1 bệnh ung thư bàng quang, 1 bệnh ung thư tử cung). Fig.1L) Ký hiệu gen: F7, IGHV4-31, IGHG1, IGHG2, IGHG3, IGHG4, IGHM, Peptit: MISRTPEV (SEQ ID NO: 17). Các mô từ trái sang phải: 19 mô ung thư (2 bệnh ung thư thực quản, 2 bệnh ung thư thận, 2 bệnh ung thư gan, 9 bệnh ung thư phổi, 1 bệnh ung thư hạch bạch huyết, 1 bệnh ung thư tinh hoàn, 2 bệnh ung thư bàng quang). Fig.1M) Ký hiệu gen: QSER1, Peptit: SLNGNQVTV (SEQ ID NO: 30). Các mô từ trái sang phải: 1 dòng tế bào (1 tủy), 14 mô ung thư (1 bệnh ung thư vùng đầu và cổ, 1 bệnh ung thư ống mật chủ, 1 bệnh ung thư não, 1 bệnh ung thư vú, 1 bệnh ung thư thực quản, 1 bệnh ung thư thận, 1 bệnh ung thư phổi, 2 bệnh ung thư da, 3 bệnh ung thư bàng quang, 2 bệnh ung thư tử cung). Fig.1N) Ký hiệu gen: HAS3, Peptit: YMLDIFHEV (SEQ ID NO: 32). Các mô từ trái sang phải: 1 mô bình thường (1 tử cung), 15 mô ung thư (1 bệnh ung thư não, 2 bệnh ung thư thực quản, 1 bệnh ung thư túi mật, 3 bệnh ung thư vùng đầu và cổ, 4 bệnh ung thư phổi, 4 bệnh ung thư bàng quang). Fig.1O) Ký hiệu gen: PKP3, Peptit: SLVSEQLEPA (SEQ ID NO: 34). Các mô từ trái sang phải: 1 dòng tế bào (1 tủy), 1 mô bình thường (1 ruột kết), 28 mô ung thư (6 bệnh ung thư vùng đầu và cổ, 1 bệnh ung thư vú, 1 bệnh ung thư manh tràng, 3 bệnh ung thư ruột kết, 1 bệnh ung thư kết-trực tràng, 3 bệnh ung thư thực quản, 6 bệnh ung thư phổi, 1 bệnh ung thư buồng trứng, 3 bệnh ung thư trực tràng, 3 bệnh ung thư bàng quang). Fig.1P) Ký hiệu gen: SERPINH1, Peptit: GLAFSLYQA (SEQ ID NO: 40). Các mô từ trái sang phải: 3 dòng tế bào (1 thận, 2 tủy), 4 mô bình

thường (1 tuyến thượng thận, 1 phổi, 2 nhau thai), 41 mô ung thư (3 bệnh ung thư vùng đầu và cổ, 3 bệnh ung thư vú, 2 bệnh ung thư ruột kết, 2 bệnh ung thư thực quản, 1 bệnh ung thư túi mật, 1 bệnh ung thư gan, 15 bệnh ung thư phổi, 1 bệnh ung thư buồng trứng, 1 bệnh ung thư tụy, 3 bệnh ung thư trực tràng, 2 bệnh ung thư da, 1 bệnh ung thư dạ dày, 4 bệnh ung thư bàng quang, 2 bệnh ung thư tử cung). Fig.1Q) Ký hiệu gen: TMEM132A, Peptit: ALVEVTEHV (SEQ ID NO: 56). Các mô từ trái sang phải: 7 mô bình thường (5 phổi, 1 tuyến giáp, 1 khí quản), 64 mô ung thư (6 bệnh ung thư vùng đầu và cổ, 12 bệnh ung thư não, 4 bệnh ung thư vú, 3 bệnh ung thư thực quản, 1 bệnh ung thư túi mật, 5 bệnh ung thư thận, 21 bệnh ung thư phổi, 1 bệnh ung thư hạch bạch huyết, 7 bệnh ung thư buồng trứng, 1 bệnh ung thư tụy, 1 bệnh ung thư da, 2 bệnh ung thư tử cung). Fig.2R) Ký hiệu gen: PRC1, Peptit: GLAPNTPGKA (SEQ ID NO: 57). Các mô từ trái sang phải: 14 mô ung thư (1 bệnh ung thư vùng đầu và cổ, 1 bệnh ung thư vú, 2 bệnh ung thư thực quản, 6 bệnh ung thư phổi, 1 bệnh ung thư buồng trứng, 1 bệnh ung thư da, 1 bệnh ung thư bàng quang, 1 bệnh ung thư tử cung). Fig.3S) Ký hiệu gen: MAPK6, Peptit: LILESIPVV (SEQ ID NO: 58). Các mô từ trái sang phải: 2 dòng tế bào (1 tế bào máu, 1 da), 25 mô ung thư (5 bệnh ung thư vùng đầu và cổ, 1 bệnh ung thư ruột kết, 2 bệnh ung thư thực quản, 1 bệnh ung thư dạng bạch cầu, 8 bệnh ung thư phổi, 2 bệnh ung thư hạch bạch huyết, 3 bệnh ung thư da, 2 bệnh ung thư bàng quang, 1 bệnh ung thư tử cung). Fig.1T) Ký hiệu gen: PPP4R1, Peptit: SLLDTLREV (SEQ ID NO: 59). Các mô từ trái sang phải: 1 mô bình thường (1 ruột non), 8 mô ung thư (1 bệnh ung thư vùng đầu và cổ, 2 bệnh ung thư thực quản, 4 bệnh ung thư phổi, 1 bệnh ung thư buồng trứng). Fig.4U) Ký hiệu gen: TP63, Peptit: VLVPYEPPQV (SEQ ID NO: 77). Các mô từ trái sang phải: 2 mô bình thường (1 thực quản, 1 khí quản), 47 mô ung thư (8 bệnh ung thư vùng đầu và cổ, 4 bệnh ung thư thực quản, 1 bệnh ung thư túi mật, 14 bệnh ung thư phổi, 7 bệnh ung thư hạch bạch huyết, 2 bệnh ung thư tuyến tiền liệt, 1 bệnh ung thư da, 8 bệnh ung thư bàng quang). Fig.1V) Ký hiệu gen: KIAA0947, Peptit: AVLPHVDQV (SEQ ID NO: 81). Các mô từ trái sang phải: 3 dòng tế bào (1 tế bào máu, 1 tụy), 12 mô ung thư (5 bệnh ung thư não, 2 bệnh ung thư thực quản, 1 bệnh ung thư phổi, 3 bệnh ung thư hạch bạch huyết, 1 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 ở mức quá cao hoặc chỉ được biểu hiện ở bệnh ung thư thực quản trong nhóm mẫu mô bình thường (cột màu trắng) và 11 mẫu bệnh ung

thực quản (cột màu đen). Các mô từ trái sang phải: 7 động mạch, 1 não, 1 tim, 2 gan, 2 phổi, 2 tĩnh mạch, 1 mô mỡ, 1 tuyến thượng thận, 4 tủy xương, 1 ruột kết, 2 thực quản, 2 túi mật, 1 thận, 6 hạch bạch huyết, 1 tụy, 1 tuyến yên, 1 trực tràng, 1 cơ xương, 1 da, 1 ruột non, 1 lách, 1 dạ dày, 1 tuyến ức, 1 tuyến giáp, 5 khí quản, 1 bàng quang, 1 vú, 3 buồng trứng, 3 nhau thai, 1 tuyến tiền liệt, 1 tinh hoàn, 1 tử cung, 11 mẫu bệnh ung thư thực quản. Fig.2A) Ký hiệu gen: PTHLH; Fig.2B) Ký hiệu gen: KRT14; Fig.2C) Ký hiệu gen: FAM83A; Fig.2D) Ký hiệu gen: PDPN.

Các hình vẽ từ Fig.3A đến Fig.3E thể hiện kết quả làm ví dụ của sự đáp ứng của tế bào T CD8+ đặc hiệu peptit *in vitro* của người cho khỏe mạnh dương tính với HLA-A*02+ nghĩa là 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.3A) Ký hiệu gen: SF3B3, Peptit: ELDRTPEEV (SEQ ID NO: 97); Fig.3B) Ký hiệu gen: TNC, Peptit: AMTQLLAGV (SEQ ID NO: 101). Ngoài ra, 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 SEQ ID NO: 5 (hình C, ô bên trái), peptit có trình tự SEQ ID NO: 2 (hình D, ô bên trái) và peptit có trình tự SEQ ID NO: 77 (hình E, 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. 5 (hình C), A*02/SeqID No. 2 (hình D) hoặc A*02/SeqID No. 77 (hình E). Các ô bên phải (hình C, D và E) 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 được phát hiện 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

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).

Khi được sử dụng ở đây và ngoại trừ khi được lưu ý theo cách khác, tất cả các thuật ngữ được định nghĩa như được đưa ra dưới đây.

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 loại 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 liên kề. Tốt hơn, nếu peptit này có 9 axit amin trong chiều dài mạch, nhưng có thể chỉ là peptit mạch ngắn có 8 axit amin trong chiều dài mạch, và có thể có mạch dài đến 10, 11, 12, 13 hoặc 14 axit amin hoặc nhiều hơn trong chiều dài mạch và trong trường hợp các peptit của MHC nhóm II (các biến thể kéo dài của peptit theo sáng chế), chúng có thể có mạch dài tới 15, 16, 17, 18, 19 hoặc 20 axit amin hoặc nhiều hơn trong chiều dài mạch.

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

Thuật ngữ “peptit” còn bao gồm “oligopeptit”. Thuật ngữ “oligopeptit” được sử dụng ở đây để chỉ loạt các gốc axit amin, thường được liên kết với nhau bằng các liên kết peptit giữa nhóm alpha-amino và nhóm cacbonyl của axit amin 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 loạt 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. 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%

Alen	Quần thể	Kiểu hình tính được từ tần suất alen
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 vaccin theo sáng chế, các peptit theo sáng chế như được mô tả ở đây gắn kết với A*02. Vaccin cũng có thể chứa các peptit của MHC nhóm II gắn kết-pan. Do đó, vaccin 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 virus.

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

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, 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 kháng thể”, khi để chỉ trình tự mã hóa, có nghĩa là phần ADN chứa vùng mã hóa hoàn toàn ít hơn trong đó sản phẩm biểu hiện gần như giữ lại được chức năng hoặc hoạt tính sinh học giống như sản phẩm biểu hiện của vùng mã hóa hoàn toàn.

Thuật ngữ “đoạn ADN” để chỉ polyme ADN, ở dạng đoạn riêng biệt hoặc làm thành phần của cấu trúc ADN lớn hơn, có nguồn gốc từ ADN phân lập được ít nhất một lần ở dạng gần như tinh khiết, nghĩa là không chứa các chất nội sinh và với lượng hoặc nồng độ cho phép xác định, thao tác, và thu hồi đoạn mạch và các trình tự nucleotit thành phần của nó bằng phương pháp hóa sinh chuẩn, ví dụ, bằng cách sử dụng vectơ tách dòng. Các đoạn mạch này được tạo ra ở dạng khung đọc mở không bị đứt quãng bởi các trình tự không dịch mã bên trong, hoặc intron thường có mặt trong các gen có nhân điển hình. Trình tự của ADN không dịch mã có thể có mặt ở phía sau khung đọc mở này, trong đó nó không can thiệp vào việc thao tác hoặc sự biểu hiện của các vùng mã hóa.

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

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

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

Các polynucleotit, và polypeptit tái tổ hợp hoặc polypeptit sinh miễn dịch, được

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

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

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

quan đến polynucleotit, các thuật ngữ này để chỉ các sản phẩm được tạo ra khi điều trị bằng các polynucleotit này cùng với endonucleaza bất kỳ.

Theo sáng chế, thuật ngữ “tỷ lệ % độ 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: 93 hoặc biến thể của nó có mức độ tương đồng 88% với các trình tự từ SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 93, 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 cụ thể 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: 93. 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: 93, 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 sinh 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 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: 4, 9, và 18

Vị trí	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
SEQ ID No.: 4	A	L	F	G	T	I	L	E	L	
Các 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	10
SEQ ID No.: 9	H	L	I	A	E	I	H	T	A	
Các biến thể									V	
									I	
									L	
	M								V	
	M								I	
	M								L	
	M									
	A								V	
	A								I	

	A								L	
	A									
	V								V	
	V								I	
	V								L	
	V									
	T								V	
	T								I	
	T								L	
	T									
	Q								V	
	Q								I	
	Q								L	
	Q									
Vị trí	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
SEQ ID No.: 18	F	L	L	D	Q	V	Q	L	G	L
Các 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

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
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 xuất các peptit và biến thể của epitop của MHC nhóm I, trong đó peptit hoặc biến thể này có từ 8 đến 100 axit amin, tốt hơn là có từ 8 đến 30 axit amin, và được ưu tiên nhất là có từ 8 đến 14 axit amin, cụ thể là có 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 axit amin trong toàn bộ chiều dài mạch, trong trường hợp các peptit 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 thế, nồng độ peptit mà khi đó các peptit đã thế đạt một nửa mức tăng tối đa trong quá trình phân giải so với nồng độ tức thời là không nhiều hơn khoảng 1mM, tốt hơn là không nhiều hơn khoảng 1μM, tốt hơn nữa là không nhiều hơn khoảng 1nM, và vẫn tốt hơn nữa là không nhiều hơn khoảng 100pM, và tốt nhất là không nhiều hơn khoảng 10pM. Cũng được ưu tiên nếu peptit đã thế 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: 93.

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: 93 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 “Ti” 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 bất chức 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 các chất giả peptit này là hữu ích đối với sự gắn kết với MHC và các đáp ứng của tế bào T hỗ trợ. 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, -CH₂-NH, -CH₂S-, -CH₂CH₂-, -CH=CH-, -COCH₂-, -CH(OH)CH₂-, và -CH₂SO-. Patent Mỹ số US 4.897.445 đề xuất phương pháp tổng hợp pha rắn của các liên kết không phải peptit (-CH₂-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 NaCNBH₃.

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, sự cải biến bằng cách axyl hóa, amit hóa, pyridoxyl hóa lysin, alkyl hóa khử, trinitrobenzyl hóa các nhóm amin bằng axit 2,4,6-trinitrobenzen sulphonic (TNBS), sự cải biến amit của các nhóm cacboxyl và cải biến sulphydryl bằng cách oxy hóa xystein bằng axit thành axit xysteic, sự tạo ra các dẫn xuất có thủy ngân, sự tạo ra disulfua hỗn hợp bằng các hợp chất thiol khác, sự phản ứng với maleimide, carboxymethyl hóa bằng axit iodoacetic hoặc iodoacetamide và carbamoyl hóa bằng xyanat ở 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-butanedione, và 1,2-cyclohexanedione để tạo ra sản phẩm cộng. Ví dụ khác là phản ứng của methylglyoxal với

các gốc arginin. Xystein có thể được cải biến mà không cải biến đồng thời các vị trí ái nhân khác như lysin và histidin. Kết quả là lượng lớn các chất phản ứng có thể sử dụng để cải biến xystein. Website của các công ty như Sigma-Aldrich (<http://www.sigma-aldrich.com>) cung cấp thông tin về các chất phản ứng đặc hiệu.

Việc khử chọn lọc liên kết disulfua trong protein cũng là việc phổ biến. Các liên kết disulfua có thể được tạo ra và oxy hóa trong quá trình xử lý nhiệt đối với dược phẩm sinh học. Chất phản ứng K của Woodward có thể được sử dụng để cải biến các gốc axit glutamic đặc hiệu. Hợp chất N-(3-(dimethylamino)propyl)-N'-ethylcarbodiimide có thể được sử dụng để tạo ra các liên kết ngang nội phân tử giữa gốc lysin và gốc axit glutamic. Ví dụ, 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, iodoacetamid, bromoetylamin, và cloamin T.

Tetranitrometan và N-acetylimidazol 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-metyl-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. 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-polyamid 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-florenylmethoxycarbonyl (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-dimethylformamid. 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-trimethylbenzenesulphonyl (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 polydimethyl-acrylamit được tạo thành từ ba monome dimethylacrylamit (monome khung chính), bisacryloyletylen diamin (nhóm liên kết ngang) và este acryloylsarcosin methyl (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-hydroxymethyl-phenoxyacetic. 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 trifloacetic 95% chứa hỗn hợp chất tẩy tã 50%. Các chất tẩy tã 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 trifloacetic 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 tã 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 tã. 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).

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 thực quản (N = 16 mẫu dương tính 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 đối với mô ung thư nguyên phát thu được từ 16 bệnh nhân ung thư thực quản.

Thiết bị phát hiện XPRESIDENT® v2.1 (ví dụ, xem công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số US 2013-0096016, tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn 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, đóng 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 ung thư thực quản 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 thực quản nguyên phát đều khẳng định sự trình diện của chúng trên bệnh ung thư thực quản nguyên phát.

Các peptit TUMAP được xác định trên nhiều mô bệnh ung thư thực quản 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.

Ngoài sự biểu hiện quá mức của peptit, sự biểu hiện mRNA của gen cơ sở cũng được thử nghiệm. Các số liệu mRNA thu được A bằng cách phân tích RNASeq của các mô bình thường và mô ung thư (xem ví dụ 2). Nguồn bổ sung của số liệu về mô bình thường là cơ sở dữ liệu của số liệu về sự biểu hiện của ARN công khai từ khoảng 3000 mẫu mô bình thường (Lonsdale, 2013). Tốt hơn, nếu peptit có nguồn gốc từ protein có sự mã hóa mRNA được biểu hiện ở mức cao trong mô ung thư nhưng được biểu hiện ở mức rất thấp hoặc không có mặt trong các mô bình thường còn sống, được đưa vào sáng chế.

Ngoài ra, thiết bị phát hiện XPRESIDENT® v2.x cho phép định lượng tuyệt đối trực tiếp MHC-, tốt hơn là được giới hạn bởi HLA, mức peptit trên các mô ung thư hoặc mô bị bệnh khác. Tóm lại, tổng số lượng tế bào được tính từ hàm lượng ADN tổng số của

mẫu mô được phân tích. Tổng lượng peptit của peptit TUMAP trong mẫu mô được xác định bằng phương pháp nanoLC-MS/MS theo tỷ lệ của peptit TUMAP tự nhiên và lượng đã biết của dạng được đánh dấu bằng đồng vị phóng xạ của peptit TUMAP, còn được gọi là chất chuẩn nội. Hiệu quả của sự phân lập peptit TUMAP được xác định bằng cách bổ sung phức hợp peptit:MHC của tất cả các peptit TUMAP được chọn vào dịch tan mô ở thời điểm sớm nhất có thể của quá trình phân lập TUMAP và sự phát hiện chúng bằng phương pháp nanoLC-MS/MS sau khi kết thúc quá trình phân lập peptit. Tổng số lượng tế bào và lượng peptit được tính từ ba lần xác định đối với mỗi mẫu mô. Hiệu suất phân lập peptit đặc hiệu được tính từ giá trị trung bình thu được từ 10 thử nghiệm bổ sung, mỗi thử nghiệm được thực hiện ba lần (xem ví dụ 6 và bảng 12).

Sáng chế đề cập đến các peptit hữu ích trong việc điều trị bệnh ung thư/khối u, tốt hơn nếu là bệnh ung thư thực quản được biểu hiện quá mức hoặc chỉ biểu hiện các peptit theo sáng chế. Các peptit này được chứng minh bằng phương pháp phổ khối lượng được biểu hiện trong tự nhiên bởi các phân tử HLA trên mẫu bệnh ung thư thực quản 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 được chứng minh là biểu hiện ở mức quá cao ở bệnh ung thư so với các mô bình thường – thuật ngữ “các mô bình thường” liên quan đến sáng chế này sẽ có nghĩa là tế bào thực quản khỏe mạnh hoặc các tế bào mô bình thường khác, chứng minh sự liên quan đến khối u ở mức cao của các gen nguồn (xem ví dụ 2). Ngoài ra, chính các peptit được biểu hiện ở mức quá cao trên mô khối u – thuật ngữ “mô khối u” liên quan đến sáng chế này có nghĩa là mẫu lấy từ bệnh nhân mắc bệnh ung thư thực quản mà không phải 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 lympho 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 thực quản biểu hiện peptit có nguồn gốc từ đó.

Các peptit theo sáng chế đã được chứng minh là có khả năng kích thích đáp ứng của tế bào T và/hoặc được biểu hiện quá mức và do đó có thể được sử dụng để tạo ra kháng thể và/hoặc các thụ thể TCR, cụ thể là thụ thể TCR hòa tan theo sáng chế (xem ví dụ 3, ví dụ 4). Ngoài ra, 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 vacxin 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 thụ thể các thụ thể tế bào T (TCR) chứa chuỗi alpha và chuỗi beta (“thụ thể TCR alpha/beta”). Sáng chế còn đề xuất các peptit HAVCR1-001 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 xuất 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 dị dime chứa chuỗi polypeptit alpha (chuỗi alpha) và chuỗi polypeptit beta (chuỗi beta), trong đó thụ thể dị dime này có khả năng gắn kết với kháng nguyên của peptit được trình diện bởi phân tử HLA. Thuật ngữ này còn bao gồm thuật ngữ còn được gọi là thụ thể TCR gama/delta.

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

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến 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 tetrame 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 HAVCR1-001- 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 các 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 về ngữ pháp của chúng được sử dụng để chỉ thụ thể TCR có ái lực gắn kết (KD) đối với phức hợp peptit HAVCR1-001-phân tử HLA bằng 100 μ M hoặc nhỏ hơn.

Các thụ thể dị dime TCR alpha/beta theo sáng chế có thể có liên kết disulfua được đưa vào giữa các vùng ổn định của chúng. Các thụ thể TCR thuộc loại này được ưu tiên 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 dị dime 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 có sự glycosyl hóa được cải biến 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, và/hoặc chu kỳ bán hủy của sự gắn kết, với phức hợp peptit HAVCR1-001- 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 của 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 được 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 sinh miễn dịch, do các khối u sinh ra từ 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 peptit HAVCR1-001 theo sáng chế có thể được tăng lên bằng các phương pháp đã biết rõ trong lĩnh vực này.

Sáng chế còn đề xuất 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/HAOCR1-001, 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, sinh miễn dịch cho chuột này bằng HAVCR1-001, ủ các tế bào PBMC thu được từ chuột chuyển gen với tetrame-phycoerythrin (PE), và phân lập các tế bào T có ái lực cao bằng phương pháp phân tích Calibur-phân loại tế bào được hoạt hóa huỳnh quang (FACS).

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 vectơ biểu hiện, như gama retrovirus hoặc lentivirus. Các virus tái tổ hợp được tạo ra và sau đó được thử nghiệm về mặt chức năng, như độ đặc hiệu kháng nguyên và ái lực chức năng. Tiếp đó, phần phân ước của sản phẩm cuối được sử dụng để tải nạp quần thể tế bào T đích (thường được tinh chế từ các tế bào PBMC của bệnh nhân), quần thể này được mở rộng trước khi tiêm truyền vào bệnh nhân.

Theo khía cạnh khác, để thu được các tế bào T biểu hiện thụ thể TCR theo sáng chế, ARN của thụ thể TCR được tổng hợp bằng các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực này, ví dụ, các hệ phiên mã *in vitro*. Sau đó, 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, 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), virut tế bào gốc của chuột (murine stem cell virus: MSCV) U3, phosphoglycerat kinaza (phosphoglycerate kinaza: PGK), β -actin, ubiquitin, và gen khởi đầu phức hợp virut của khỉ 40 (simian virus 40: 40SV40)/CD43, yếu tố kéo dài (yếu tố kéo dài: 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 lentivirut (Follenzi et al., 2000), và yếu tố điều hòa sau phiên mã của virut 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 đưa vào 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 thể khắc phục được yêu cầu nêu trên. Việc sử dụng điểm vào trong ribosom (intraribosomal entry site: IRES) của virut 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 cần 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 của sự ghép cặp 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 ẩn, 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 biểu hiện 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 CD3 ζ (thể dung hợp CD3 ζ) (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 cinamic, 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 hướng đích, có thể là protein dung hợp, hoặc có thể là phân tử lai. Các peptit có trình tự được nêu trong sáng chế được dự kiến là kích thích các tế bào T CD4 hoặc CD8. Tuy nhiên, sự kích thích các tế bào T CD8 có hiệu quả hơn khi có sự trợ giúp của tế bào T hỗ trợ CD4. Do đó, đối với các epitop của MHC nhóm I kích thích tế bào T CD8, đối tác dung hợp hoặc các phân tử lai là thích hợp để tạo ra các epitop kích thích tế bào T dương tính với CD4. Các epitop kích thích CD4- và CD8- là đã được biết rõ trong lĩnh vực này và bao gồm các epitop đã được xác định theo sáng chế.

Theo một khía cạnh, 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. 93, 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 xuất axit nucleic (ví dụ, polynucleotit) mã hóa peptit hoặc biến thể của peptit theo sáng chế. Polynucleotit này có thể là, ví dụ, ADN, ADN bổ trợ, APN, ARN hoặc hỗn hợp của chúng, ở dạng sợi đơn và/hoặc sợi kép, hoặc dạng nguyên thể hoặc dạng ổn định của các polynucleotit, ví dụ như các polynucleotit có khung chính phosphorothioat và nó có thể chứa hoặc không chứa intron miễn là nó mã hóa peptit. Tất nhiên là chỉ các peptit chứa các gốc axit amin có trong tự nhiên được liên kết bằng các liên kết peptit có trong tự nhiên là có thể mã hóa bằng polynucleotit. Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất vector biểu hiện có khả năng biểu hiện polypeptit theo sáng chế.

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

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

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

Tiếp đó, ADN (hoặc trong trường hợp vector retrovirus, ARN) có thể được biểu

hiện ở vật chủ thích hợp để tạo ra polypeptit chứa peptit hoặc biến thể theo sáng chế. Do đó, ADN mã hóa peptit hoặc biến thể theo sáng chế có thể được sử dụng theo các kỹ thuật đã biết, được cải biến thích hợp theo phân bố 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 patent 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 plasmit, theo sự định hướng thích hợp và khung đọc chính xác để biểu hiện. Nếu cần, ADN có thể được liên kết với các trình tự nucleotit đối chứng điều hòa phiên mã và dịch mã thích hợp được nhận biết bởi vật chủ mong muốn, mặc dù các đối chứng này thường có mặt trong vector biểu hiện. Sau đó, vector được đưa vào vật chủ bằng các kỹ thuật chuẩn. Nói chung, không phải tất cả các 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 cao ở các tế bào COS cho phép sao chép SV40. Ví dụ, các vector CMV có thể chứa nguồn gốc để sao chép pMB1 (dẫn xuất của pBR322) ở các tế bào vi khuẩn, gen *b-lactamaza* để chọn sự kháng ampicillin ở vi khuẩn, polyA của hGH, và nguồn gốc fl. Các vector chứa trình tự dẫn đầu pre-pro-trypsin (PPT) có thể định hướng sự tiết ra của protein dung hợp FLAG vào môi trường nuôi cấy để tinh chế bằng cách sử dụng kháng thể ANTI-FLAG, nhựa và bản kính. Các vector và hệ biểu hiện khác là đã được biết rõ trong lĩnh vực này để sử dụng với nhiều loại tế bào chủ khác nhau.

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

Sáng chế còn đề xuất tế bào chủ được biến nạp với cấu trúc của vector polynucleotit theo sáng chế. Tế bào chủ này có thể là tế bào không nhân hoặc có nhân điển hình. Các tế bào vi khuẩn có thể là tế bào chủ không nhân trong một số trường hợp và thường là chủng *E. coli*, ví dụ như chủng *E. coli* DH5 có thể mua được từ Bethesda Research Laboratories Inc., Bethesda, MD, Mỹ, và chủng RR1 có thể mua được từ Bảo tàng giống chuẩn vi sinh vật Mỹ (American Type Culture Collection: ATCC) của Rockville, MD, Mỹ (số ATCC 31343). Các tế bào chủ có nhân điển hình 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 Gene Expression, Reviews and Protocols,” Part One, Second Edition, ISBN 978-1-58829-262-9, và tài liệu khác mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này đã biết.

Sự biến nạp của các tế bào chủ thích hợp với cấu trúc ADN của sáng chế được thực hiện bằng các phương pháp đã được biết rõ, các phương pháp này thường phụ thuộc vào loại vector 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 vector biểu hiện theo sáng chế.

Theo một phương án được ưu tiên, tế bào chủ là tế bào trình diện kháng nguyên, cụ thể là tế bào đuôi gai hoặc tế bào trình diện kháng nguyên. APC được tải protein dung hợp tái tổ hợp chứa phosphatase axit tuyến tiền liệt (prostatic acid phosphatase: PAP) đã được Cục quản lý thực phẩm và dược phẩm Mỹ (Food and Drug Administration: FDA) phê chuẩn ngày 29 tháng 4 năm 2010, để điều trị HRPC di căn không có triệu chứng hoặc có triệu chứng 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 (intramàng bụng: 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 lipit 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 intolokine 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 lipit 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 lymphô T (ví dụ, GM-CSF, IL-1 và IL-4) (patent 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 vaccin. 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). Patent 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 virut.

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 được 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 patent 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 loài 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, 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 viện dẫn 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.

Aptam 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: 93, theo sáng chế 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 HLA nêu trên.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể gắn kết đặc hiệu với phức hợp tương thích mô chính (MHC) nhóm I hoặc II 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; Denkborg et al., 2003), nhằm mục đích của sáng chế, toàn bộ các tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn 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: 93, 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: 93 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: 93 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: 93, 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: 93.

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.

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 trong số các trình tự từ SEQ ID No: 1 đến SEQ ID No: 48 và được sản xuất bằng phương pháp tổng hợp (ví dụ, được tổng hợp) dưới dạng muối được dụng. 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 này theo sáng chế 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 , $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, MgCl_2 , MgBr_2 , $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$, MgI_2 , $\text{Mg}(\text{SCN})_2$, MnCl_2 , $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, Ca_2HPO_4 , $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$, CaSO_4 , $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, CaCl_2 , CaBr_2 , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Ca}(\text{ClO}_4)_2$, CaI_2 , $\text{Ca}(\text{SCN})_2$, $\text{Ba}_3(\text{PO}_4)_2$, Ba_2HPO_4 , $\text{Ba}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$, BaSO_4 , $\text{Ba}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, BaCl_2 , BaBr_2 , $\text{Ba}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Ba}(\text{ClO}_4)_2$, BaI_2 , và $\text{Ba}(\text{SCN})_2$. Được đặc biệt ưu tiên là các muối NH axetat, MgCl_2 , KH_2PO_4 , Na_2SO_4 , KCl , NaCl , và CaCl_2 , 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-metoxi-2,3,6-trimetylbenzensulphonyl (trong trường hợp arginin). Khi glutamin hoặc asparagin là các gốc ở đầu tận cùng C, cần sử dụng nhóm 4,4'-dimetoxibenzhydryl để bảo vệ các nhóm chức amido ở mạch bên. Nền pha rắn trên cơ sở polyme polydimetyl-acrylamit được tạo thành từ ba monome dimetylacrylamit (monome khung chính), bisacryloyletylen diamin (nhóm liên kết ngang) và este 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-dixyclohexyl-carbodiimide/ 1hydroxybenzotriazol ngược. Tất cả các phản ứng liên kết và

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

Axit trifloaxetic được loại bỏ bằng cách làm bay hơi trong chân không, sau đó nghiền thành bột với ete dietyl để tạo ra peptit thô. Các chất tẩy tạp bất kỳ có mặt được loại bỏ bằng phương pháp chiết một lần trong đó sự đông khô 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.

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 thực quản.

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: 93, 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 tế bào ung thư thực quản hoặc tế bào khối u huyết học hoặc khối u dạng rắn khác như bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư bàng quang, bệnh ung thư buồng trứng, u melanin, bệnh ung thư tử cung, bệnh ung thư tế bào gan, bệnh ung thư tế bào thận, bệnh ung thư não, bệnh ung thư kết-trực tràng, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư tụy, bệnh ung thư túi mật, bệnh ung thư ống mật chủ, bệnh ung thư tuyến tiền liệt và bệnh bạch cầu.

Sáng chế còn đề cập đến các protein 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 thực quản. 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 hỗ trợ (CDRs), đoạn Fv, đoạn Fab và đoạn Fc) hoặc các polyme của các phân tử globulin miễn dịch này và các phiên bản được làm cho giống kháng thể của người của phân tử globulin miễn dịch 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 thực quản, sự cung cấp độc tố đến tế bào ung thư thực quản biểu hiện gen đánh dấu ung thư ở mức cao, và/hoặc ức chế hoạt tính của polypeptit của gen đánh dấu bệnh ung thư thực quản) 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 thực quản 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 hỗ trợ theo sáng chế, như peptit theo các trình tự từ SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 93, 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 thực quản 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, phép tách Western, nhuộm hóa mô miễn dịch bệnh ung thư được cố định trong formalin hoặc phân 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 (patent Mỹ số US 4.816.567, tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn toàn bộ nội dung của nó).

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 sinh 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 sinh 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 patent 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 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 patent 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 (patent 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 dụng bao gồm nước muối, dung dịch Ringer và dung dịch dextroza. Tốt hơn, nếu độ pH của dung

dịch nằm trong khoảng từ 5 đến 8, và tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 7 đến 7,5. Các chất mang khác bao gồm các thành phần giải phóng duy trì như nền bán thấm của polyme kỵ nước dạng rắn chứa kháng thể, các nền đã được tạo hình từ trước, ví dụ, màng, liposom hoặc vi hạt. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rằng một số chất mang nhất định có thể được ưu tiên hơn, tùy theo, ví dụ, đường sử dụng và nồng độ kháng thể được sử dụng.

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

Liều dùng hữu hiệu và chế độ sử dụng kháng thể có thể được xác định theo kinh nghiệm, và người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ biết cách xác định này. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rằng liều dùng của kháng thể cần được sử dụng sẽ thay đổi tùy theo, ví dụ, đối tượng sẽ nhận kháng thể, đường sử dụng, loại kháng thể cụ thể được sử dụng và các dược chất khác được sử dụng. Liều dùng hàng ngày thông thường của kháng thể được sử dụng một mình có thể nằm trong khoảng từ 1 $\mu\text{g/kg}$ đến tối đa 100 mg/kg thể trọng hoặc cao hơn mỗi ngày, tùy theo các yếu tố nêu trên. Khi sử dụng kháng thể, tốt hơn là để điều trị bệnh ung thư thực quản, 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 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 bổ 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 dược 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, dược chất, xytokin (ví dụ, xem công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số US 2013/0115191), 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 mựa. 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 (K_d) 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 xuất phương pháp tạo ra các tế bào T hoạt hóa *in vitro*, phương pháp này bao gồm bước cho các tế bào T tiếp xúc *in vitro* với kháng nguyên được tải các phân tử MHC 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: 93, 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 (máu ngoại vi lymphocytes: 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 của các tế bào T *in vitro* bằng cách sử dụng tế bào trình diện kháng nguyên nhân tạo (artificial antigen presenting cells: aAPCs), 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, aAPCs 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, 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 định hướng peptit theo sáng chế là hữu ích trong liệu pháp.

Do đó, theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất các tế bào T hoạt hóa có thể thu được bằng các phương pháp theo sáng chế nêu trên.

Các tế bào T hoạt hóa, được tạo ra bằng phương pháp nêu trên, sẽ nhận biết chọn lọc tế bào biểu hiện bất thường polypeptit chứa trình tự axit amin trong số các trình tự từ SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 93.

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 độ biểu hiện trong các mô (khỏe mạnh) bình thường hoặc gen này không biểu hiện trong mô được lấy từ khối u mà biểu hiện trong chính khối u này. 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 mựa 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 Gattioni 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, vector biểu hiện, tế bào, tế bào T hoạt hóa, thụ thể tế bào T hoặc axit nucleic mã hóa nó là hữu ích để điều trị các rối loạn, khác biệt ở chỗ, các tế bào tránh được sự đáp ứng miễn dịch. Do đó, phân tử bất kỳ theo sáng chế có thể được dùng làm thuốc hoặc để sản xuất thuốc. Phân tử này có thể được sử dụng một mình hoặc kết hợp với (các) phân tử khác theo sáng chế hoặc (các) phân tử đã biết.

Sáng chế còn đề xuất kit bao gồm:

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

(b) tùy ý, đồ chứa thứ hai để đựng chất pha loãng hoặc dung dịch hoàn nguyên dùng cho sản 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 sản 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 dược phẩm theo sáng chế cùng với hoặc không cùng với các thành phần khác (ví dụ, các hợp chất khác hoặc dược phẩm chứa các hợp chất khác này) hoặc có đồ chứa riêng biệt cho mỗi thành phần.

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

Đồ chứa của kit điều trị có thể là lọ, ống thử nghiệm, bình, chai, bơm tiêm, hoặc phương tiện khác bất kỳ để đựng chất rắn hoặc chất lỏng. Thông thường, khi có nhiều hơn một thành phần, kit này sẽ chứa lọ thứ hai hoặc đồ chứa khác để cho phép tách liều dùng. Kit cũng có thể chứa đồ chứa khác để đựng chất lỏng được dùng. Tốt hơn, nếu kit

điều trị sẽ chứa dụng cụ (ví dụ, một hoặc nhiều kim tiêm, bơm tiêm, bình nhỏ giọt thuốc mắt, pipet, v.v.), để cho phép sử dụng các chất theo sáng chế là các thành phần của kit theo sáng chế.

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

Do các peptit theo sáng chế được phân lập từ bệnh ung thư thực quản, tốt hơn nếu thuốc theo sáng chế được sử dụng để điều trị bệnh ung thư thực quản.

Sáng chế còn đề xuất 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 vaccin 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 vaccin 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 mắc bệnh ung thư thực quản 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 một vài mô ung thư thực quản, 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 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 của 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 thực quản được lấy từ 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 thực quản) so với khoảng 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 mắc bệnh ung thư thực quản.

Theo một khía cạnh, các peptit được sàng lọc sơ bộ về tính sinh miễn dịch trước khi được đưa vào kho chứa. Theo một 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 bệnh nhân và, nếu có thể, có tính sinh miễn dịch mạnh *in vitro* khi được thử nghiệm với các 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 (máu ngoại vi 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 hoà 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 thực quản và do đã xác định được rằng các peptit này không có mặt hoặc có mặt ở mức thấp ở 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 thực quản. Sự có mặt của các nhóm peptit có thể cho phép phân loại hoặc phân nhóm các mô 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 mựa của các tế bào lympho. 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 bằng cách viện dẫn toàn bộ nội dung của chúng.

Ví dụ thực hiện sáng chế

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

Các mẫu mô

Các mô khối u của bệnh nhân được lấy từ Asterand (Detroit, Mỹ và Royston, Herts, Vương quốc Anh); ProteoGenex Inc., (Culver City, CA, Mỹ); Tissue Solutions Ltd. (Glasgow, Vương quốc Anh); Bệnh viện đại học Tübingen. Các mô bình thường được lấy từ Asterand (Detroit, Mỹ và Royston, Herts, Vương quốc Anh); Bio-Options Inc. (CA, Mỹ); BioServe (Beltsville, MD, Mỹ); Capital BioScience Inc. (Rockville, MD, Mỹ); Geneticist Inc. (Glendale, CA, Mỹ); Bệnh viện đại học Geneva; Bệnh viện đại học Heidelberg; Đại học y Kyoto Prefectural (Kyoto Prefectural University of Medicine: KPUM); Bệnh viện đại học Munich; ProteoGenex Inc. (Culver City, CA, Mỹ); Bệnh viện đại học Tübingen; Tissue Solutions Ltd. (Glasgow, Vương quốc Anh). 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, K., 1991; Seeger, F.H.T., 1999) bằng cách sử dụng kháng thể BB7.2 đặc hiệu HLA-A*02, kháng thể W6/32 đặc hiệu HLA-A, -B, -C, sepharosa được hoạt hóa bằng CNBr, xử lý bằng axit, và siêu lọc.

Phân tích phổ khối lượng

Hỗn hợp peptit của HLA khi thu được được tách theo độ kỵ nước của chúng bằng phương pháp sắc ký đảo pha (hệ sắc ký nanoAcquity UPLC, Waters) và các peptit rửa giải được phân tích trong phổ khối kế 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 thực quản cạnh đường gốc của các mẫu mô bình thường.

Profin trình diện 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 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 (+). Nhóm các mô bình thường bao gồm: mô mỡ, tuyến thượng thận, động mạch, tĩnh mạch, tủy xương, não, dây thần kinh trung ương và dây thần kinh ngoại vi, ruột kết, trực tràng, ruột non bao gồm cả tá tràng, thực quản, túi mật, tim, thận, gan, phổi, hạch bạch huyết, tế bào bạch cầu đơn nhân, tụy, màng bụng, tuyến yên, màng phổi, tuyến nước bọt, cơ xương, da, lách, dạ dày, tuyến ức, tuyến giáp, khí quản, niệu quản, bàng quang.

SEQ ID No.	Trình tự	Sự biểu hiện peptit
1	STYGGGLSV	+++
2	SLYNLGGSKRISI	+++
3	TASAITPSV	+++
4	ALFGTILEL	++
5	NLMASQPQL	+++
6	LLSGDLIFL	+++
7	SIFEGLLSGV	+++
8	ALLDGGSEAYWRV	+++
9	HLIAEIHTA	+++
10	SLDENSDDQV	+++
11	ALWLPTDSATV	+++
12	GLASRILDA	+++
13	SLSPVILGV	+++
14	RLPNAGTQV	+++
15	LLANGVYAA	+++
16	VLAEGGEGV	+++
17	MISRTPEV	+++
18	FLLDQVQLGL	+++
19	GLAPFLLNAV	+++
20	IIEVDPDTKEML	+++
21	IVREFLTAL	+++
22	KLNDTYVNV	+++
23	KLSDSATYL	+++
24	LLFAGTMTV	+++

SEQ ID No.	Trình tự	Sự biểu hiện peptit
25	LLPPPPPPA	+++
26	MLAEKLLQA	+++
27	NLREGDQLL	+++
28	SLDGFTIQV	+++
29	SLDGTELQL	+++
30	SLNGNQVTV	+++
32	YMLDIFHEV	+++
33	GLDVTSLRPFDL	+++
34	SLVSEQLEPA	+
35	LLRFSQDNA	+++
36	FLLRFSQDNA	+++
37	YTQPFSHYGQAL	+++
38	IAAIRGFLV	+++
39	LVRDTQSGSL	+++
40	GLAFSLYQA	+++
41	GLESEELEPEEL	+
44	ATGNDRKEAAENSL	+++
45	MLTELEKAL	+++
47	VLASGFLTV	+++
48	SMHQMLDQTL	+++
50	GMNPHQTPAQL	+++
51	KLFGHLTSA	+++
52	VAIGGVDGNVRL	+++
55	GAIDLLHNV	+++
57	GLAPNTPGKA	+++
58	LILESIPVV	+++
59	SLLDTLREV	+++
61	TQTTHELTI	+++
62	ALYEQPLQI	+++
63	LAYTLGVKQL	+++
64	GLTDVIRDV	++
65	YVVGGLYQRL	+++

SEQ ID No.	Trình tự	Sự biểu hiện peptit
66	LLDEKVQSV	+
68	PAVLQSSGLYSL	+++
70	FVLDTSESV	+
71	ASDPILYRPVAV	+
72	FLPPAQVTV	+
73	KITEAIQYV	+
75	GLMDDVDFKA	+
77	VLVPYEPPQV	++
78	KVANIIEV	+
80	ALQEALENA	++
81	AVLPHVDQV	+++
82	HLLGHLEQA	+++
84	SLAESLDQA	+
86	GLLTEIRAV	+
87	FLDNGPKTI	+
88	GLWEQENHL	+
89	SLADSLYNL	+
91	KLIDDVHRL	+
92	SILRHVAEV	+
94	TLLQEQQGTKTV	+

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. 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 chuẩn bị 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 mô khối u dùng cho các thử nghiệm RNASeq thu được từ: ProteoGenex Inc. (Culver City, CA, Mỹ); Tissue Solutions Ltd. (Glasgow, Vương quốc Anh).

ARN tổng số từ các mô của người khỏe mạnh dùng cho các thử nghiệm RNASeq thu được từ Asterand (Detroit, Mỹ và Royston, Herts, Vương quốc Anh); ProteoGenex Inc. (Culver City, CA, Mỹ), Geneticist Inc. (Glendale, CA, Mỹ); Istituto Nazionale Tumori "Pascale", Molecular Biology and Viral Oncology Unit (IRCCS) (Naples, Ý); Bệnh viện đại học Heidelberg (Đức); BioCat GmbH (Heidelberg, Đức).

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 RNAseq

Việc phân tích sự biểu hiện gen của mẫu ARN của khối u và mô bình thường được thực hiện bằng phương pháp giải trình tự thế hệ tiếp theo (RNAseq) của công ty 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 giao thức của nhà cung cấp (Illumina Inc., San Diego, CA, Mỹ), bao gồm sự phân mảnh ARN, sự biến đổi cADN và cho thêm chất thích ứng để giải trình tự. Thư viện thu được từ nhiều mẫu được trộn lẫn theo tỷ lệ đẳng mol và được giải trình tự trên thiết bị giải trình tự Illumina HiSeq 2500 theo hướng dẫn của nhà sản xuất, để tạo ra số đọc từ một đầu theo 50 cặp bazơ (base pair: bp). Các trình tự đọc đã xử lý được vẽ bản đồ với hệ gen của người (GRCh38) bằng cách sử dụng chương trình phần mềm STAR. Các số liệu biểu hiện được thể hiện ở cấp độ phiên mã dưới dạng số đọc cho một kilobazơ cho một triệu lần đọc được vẽ bản đồ ((Reads Per Kilobase per Million mapped reads: RPKM), 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), trên cơ sở các

chú giải của tập hợp cơ sở dữ liệu trình tự (Ensembl77). Các số đọc exon được chuẩn hóa theo chiều dài và kích thước thẳng hàng để thu được giá trị RPKM.

Các profin biểu hiện làm ví dụ của các gen nguồn theo sáng chế được biểu hiện ở mức quá cao hoặc chỉ được biểu hiện ở bệnh ung thư thực quản được thể hiện trên Fig.2. Điểm số biểu hiện của 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 các điểm số này được tính từ kết quả xác định của các mô bình thường sau: mô mỡ, tuyến thượng thận, động mạch, tủy xương, não, ruột kết, thực quản, túi mật, tim, thận, gan, phổi, hạch bạch huyết, tụy, tuyến yên, trực tràng, cơ xương, da, ruột non, lách, dạ dày, tuyến ức, tuyến giáp, khí quản, bàng quang, tĩnh mạch.

SEQ ID No.	Trình tự	Sự biểu hiện gen
1	STYGGGLSV	+++
2	SLYNLGGSKRISI	+++
3	TASAITPSV	+++
4	ALFGTILEL	++
5	NLMASQPQL	+++
6	LLSGDLIFL	+++
7	SIFEGLLSGV	+++
8	ALLDGGSEAYWRV	+++
9	HLIAEIHTA	+++
10	SLDENSDDQV	+++
11	ALWLPTDSATV	+++
12	GLASRILDA	+++
13	SLSPVILGV	+++
14	RLPNAGTQV	+++
15	LLANGVYAA	+++
16	VLAEGGEGV	+++
17	MISRTPEV	+++
18	FLLDQVQLGL	+++

SEQ ID No.	Trình tự	Sự biểu hiện gen
24	LLFAGTMTV	+++
25	LLPPPPPA	+
26	MLAEKLLQA	++
27	NLREGDQLL	+++
32	YMLDIFHEV	+++
49	GLMKDIVGA	+
55	GAIDLLHNV	++
57	GLAPNTPGKA	+
67	SMNGGVFAV	++
69	GLLVGSEKVTM	+++
71	ASDPILYRPVAV	+
77	VLVPYEPPQV	+++
80	ALQEALENA	+
94	TLLQEQGTKTV	+++

Ví dụ 3

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

Để thu được thông tin liên quan đến tính sinh miễn dịch của 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*0201 theo sáng chế, để chứng minh rằng các peptit này là epitop của tế bào T kháng tiền tế bào T CD8+ tồn tại ở người (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.

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

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

IgG2a của chuột tinh khiết được đồng kích thích kháng CD28 Ab 9.3 của người (Jung et al., 1987) được biotinyl 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 và đối chứng âm là A*0201/MLA-001 (peptit ELAGIGILTV (SEQ ID NO. 102) từ Melan-A/MART-1 được cải biến) và A*0201/DDX5-001 (YLLPAIVHI từ DDX5 (SEQ ID No. 103)), tương ứng.

800.000 hạt/200 µl được phủ trong đĩa có 96 lỗ với sự có mặt của 4 x 12,5 ng biotin-pMHC khác nhau, được rửa và 600 ng biotin kháng CD28 được cho thêm sau đó với thể tích 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 multimer 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 multimer 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 multimer 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 multimer được thực hiện bằng cách sử dụng chương trình phần mềm FlowJo (Tree Star, Oregon, Mỹ). Sự tạo môi trường *in vitro* của các tế bào lympho multimer+ 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 multimer+ đặc hiệu trong số các tế bào T CD8+ và tỷ lệ % tế bào multimer+ 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 peptit bệnh ung thư thực quản

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 multimer đặc hiệu peptit TUMAP đối với hai peptit (SEQ ID No. 97 và SEQ ID No. 101) theo sáng chế được thể hiện trên Fig.3 cùng với các đối chứng âm tương ứng. Kết quả của năm peptit theo sáng chế được tóm tắt trong Bảng 10A.

Bảng 10A: 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 theo sáng chế. Giá trị <20% = +; 20% - 49% = ++; 50% - 69% = +++; >= 70 % = ++++

SEQ ID No	Trình tự	Các lỗ	Người cho
94	TLLQEQQGTKTV	+	++
95	LIQDRVAEV	+	++
97	ELDRTPEEV	++	++++
98	VLFPNLKTV	+	++++
101	AMTQLLAGV	++	+++

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 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, giá trị <20% = +; 20% - 49% = ++; 50% - 69% = +++; >= 70 % = ++++

SEQ ID No	Trình tự	Các lỗ dương tính [%]
1	STYGGGLSV	+
2	SLYNLGGSKRISI	+
5	NLMASQPQL	+++
6	LLSGDLIFL	++
12	GLASRILDA	+
19	GLAPFLNAV	+
29	SLDGTELQL	+
47	VLASGFLTV	+++
69	GLLVGSEKVTM	+
77	VLVPYEPPQV	+

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	Trình tự	Sự trao đổi peptit
1	STYGGGLSV	+++
2	SLYNLGGSKRISI	++++
3	TASAITPSV	+++
5	NLMASQPQL	+++
6	LLSGDLIFL	+++
7	SIFEGLLSGV	++
8	ALLDGGSEAYWRV	+++
9	HLIAEIHTA	+++
10	SLDENSDDQV	+++
11	ALWLPTDSATV	+++
12	GLASRILDA	+++

SEQ ID	Trình tự	Sự trao đổi peptit
13	SLSPVILGV	++++
14	RLPNAGTQV	++++
15	LLANGVYAA	+
16	VLAEGGEGV	+++
17	MISRTPEV	++
18	FLLDQVQLGL	+++
19	GLAPFLLNAV	+++
21	IVREFLTAL	+++
22	KLNDTYVNV	+++
23	KLSDSATYL	+++
24	LLFAGTMTV	++
25	LLPPPPPPA	+++
26	MLAEKLLQA	+
27	NLREGDQLL	+++
28	SLDGFTIQV	++
29	SLDGTELQL	+++
30	SLNGNQVTV	+
31	VLPKLYVKL	++
32	YMLDIFHEV	++
33	GLDVTSLRPFDL	+++
34	SLVSEQLEPA	+++
35	LLRFSQDNA	+++
36	FLLRFSQDNA	++
37	YTQPFSHYGQAL	+++
38	IAAIRGFLV	+++
39	LVRDTQSGSL	++
40	GLAFSLYQA	++
41	GLESEELEPEEL	++
42	TQTAVITRI	+
43	KVVGKDYLL	+
44	ATGNDRKEAAENSL	+++
45	MLTELEKAL	++

SEQ ID	Trình tự	Sự trao đổi peptit
46	YTAQIGADIAL	+++
47	VLASGFLTV	++++
48	SMHQMLDQTL	++
49	GLMKDIVGA	+++
51	KLFGHLTSA	++
52	VAIGGVDGNVRL	++
53	VVVTGLTLV	++
54	YQDLLNVKM	+++
55	GAIDLLHNV	++
56	ALVEVTEHV	++
57	GLAPNTPGKA	+++
58	LILESIPVV	++
59	SLLDTLREV	+++
60	VVMEELLKV	++
61	TQTTHELTI	+++
62	ALYEQPLQI	++
63	LAYTLGVKQL	+++
64	GLTDVIRDV	++++
65	YVVGGLYQRL	+++
66	LLDEKVQSV	+++
67	SMNGGVFAV	++
68	PAVLQSSGLYSL	++
69	GLLVGSEKVTM	+++
70	FVLDTSESV	+++
71	ASDPILYRPVAV	+++
72	FLPPAQVTV	++
73	KITEAIQYV	+++
74	ILASLATSV	+++
76	KVADYIPQL	+++
77	VLVPYEPPQV	++
78	KVANIIAEV	++
79	GQDVGRYQV	++

SEQ ID	Trình tự	Sự trao đổi peptit
80	ALQEALENA	++
81	AVLPHVDQV	+++
82	HLLGHLEQA	+++
83	ALADGVVSQA	+++
84	SLAESLDQA	+++
85	NIIELVHQV	++++
87	FLDNGPKTI	+++
89	SLADSLYNL	++
90	SIYEYYHAL	+++
91	KLIDDVHRL	++++
92	SILRHVAEV	++
93	VLINTSVTL	+++

Ví dụ 6

Định lượng tuyệt đối các peptit liên quan đến khối u được biểu hiện trên bề mặt tế bào

Việc điều chế các chất gắn kết, như kháng thể và/hoặc thụ thể TCR, là quy trình tốn kém nên quy trình này có thể chỉ được tiến hành đối với một số đích được chọn. Trong trường hợp các peptit liên quan đến khối u và đặc hiệu khối u, tiêu chí lựa chọn bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, tính đặc hữu về mức độ trình diện và mật độ peptit được biểu hiện trên bề mặt tế bào. Việc định lượng số bản sao peptit TUMAP cho một tế bào trong các mẫu khối u rắn cần phải định lượng tuyệt đối peptit TUMAP phân lập được, hiệu quả phân lập peptit TUMAP, số lượng tế bào trong mẫu được phân tích.

Định lượng peptit bằng phương pháp nanoLC-MS/MS

Để định lượng chính xác peptit bằng phương pháp phổ khối lượng, lập đường cong hiệu chỉnh của mỗi peptit bằng cách sử dụng phương pháp chất chuẩn nội. Chất chuẩn nội là biến thể được đánh dấu bằng đồng vị phóng xạ kép của mỗi peptit, nghĩa là các axit amin được đánh dấu bằng hai đồng vị phóng xạ được đưa vào quá trình tổng hợp peptit TUMAP. Chất này chỉ khác với peptit liên quan đến khối u về khối lượng của nó mà không có sự khác biệt về các tính chất hóa lý khác (Anderson et al., 2012). Chất chuẩn nội này được bổ sung vào mỗi mẫu MS và tất cả các tín hiệu MS được chuẩn hóa với tín hiệu MS của chất chuẩn nội để bù lại sự biến thiên do kỹ thuật có thể có giữa các

lần thử nghiệm MS.

Các đường cong hiệu chỉnh được lập theo ít nhất ba ma trận khác nhau, nghĩa là dịch rửa giải peptit HLA của các mẫu tự nhiên giống với các mẫu MS thông thường, và mỗi chế phẩm được xác định theo hai lần phân tích MS lặp lại. Để đánh giá, các tín hiệu MS được chuẩn hóa với tín hiệu của chất chuẩn nội và đường cong hiệu chỉnh được tính bằng phương pháp hồi quy logic.

Để định lượng các peptit liên quan đến khối u từ mẫu mô, các mẫu tương ứng được bổ sung chất chuẩn nội, các tín hiệu MS được chuẩn hóa với chất chuẩn nội và được định lượng bằng cách sử dụng đường cong hiệu chỉnh peptit.

Hiệu quả phân lập peptit/MHC

Giống như đối với phương pháp tinh chế protein bất kỳ, việc phân lập protein từ các mẫu mô đi kèm với lượng tổn hao nhất định của protein cần quan tâm. Để xác định hiệu quả phân lập TUMAP, phức hợp peptit/MHC được tạo ra đối với tất cả các peptit TUMAP được chọn để định lượng tuyệt đối. Để có thể phân biệt phức hợp bổ sung với các phức hợp peptit/MHC tự nhiên, các dạng được đánh dấu bằng đồng vị phóng xạ đơn của peptit TUMAP được sử dụng, tức là axit amin được đánh dấu bằng một đồng vị phóng xạ được đưa vào sử dụng trong quá trình tổng hợp peptit TUMAP. Các phức hợp này được bổ sung vào các dịch phân giải mô mới điều chế, tức là ở thời điểm sớm nhất có thể của quá trình phân lập TUMAP, và sau đó được bắt giữ giống như phức hợp peptit/MHC tự nhiên trong quá trình tinh chế ái lực sau đó. Do đó, việc xác định lượng thu hồi của TUMAP được đánh dấu đơn cho phép kết luận hiệu quả phân lập của từng TUMAP tự nhiên.

Hiệu quả phân lập được phân tích với số lượng ít mẫu và là tương đương trong các mẫu mô này. Trái lại, hiệu quả phân lập là khác nhau giữa các peptit riêng biệt. Điều này gợi ý rằng hiệu quả phân lập, mặc dù chỉ được xác định ở một số lượng giới hạn các mẫu mô, có thể được ngoại suy cho chế phẩm mô khác bất kỳ. Tuy nhiên, cần phân tích mỗi peptit TUMAP riêng biệt do hiệu quả phân lập có thể không được ngoại suy từ peptit này sang các peptit khác.

Xác định số lượng tế bào trong mô rắn được đông lạnh

Để xác định số lượng tế bào trong mẫu mô được định lượng peptit tuyệt đối, tác giả sáng chế đã áp dụng phương pháp phân tích hàm lượng ADN. Phương pháp này có thể áp dụng cho một phạm vi rộng các mẫu có nguồn gốc khác nhau và điều quan trọng

nhất là các mẫu đông lạnh (Alcoser et al., 2011; Forsey and Chaudhuri, 2009; Silva et al., 2013). Trong quá trình phân lập peptit, mẫu mô được xử lý thành dịch phân giải đồng nhất mà phần phân ước dịch tan được lấy ra từ đó. Phần phân ước này được chia thành ba phần mà ADN được phân lập từ đó (QiaAmp DNA Mini Kit, Qiagen, Hilden, Đức). Nồng độ ADN tổng số từ mỗi lần phân lập ADN được định lượng bằng cách sử dụng thử nghiệm định lượng ADN trên cơ sở huỳnh quang (Kit thử nghiệm ADN sợi kép Qubit HS, Life Technologies, Darmstadt, Đức) với ít nhất hai lần.

Để tính số lượng tế bào, lập đường cong ADN chuẩn từ các phần phân ước của tế bào máu khỏe mạnh đơn lẻ, với khoảng số lượng tế bào xác định, được tạo ra. Đường cong chuẩn được sử dụng để tính tổng số lượng tế bào từ nồng độ ADN tổng số từ mỗi lần phân lập ADN. Tổng số lượng tế bào trung bình của mẫu mô dùng để phân lập peptit được ngoại suy khi tính đến thể tích đã biết của các phần phân ước của dịch tan và tổng thể tích dịch tan.

Số bản sao peptit cho một tế bào

Với số liệu của các thử nghiệm nêu trên, các tác giả sáng chế tính được số lượng bản sao TUMAP cho một tế bào bằng cách chia tổng lượng peptit cho tổng số lượng tế bào của mỗi mẫu, sau đó chia cho hiệu suất phân lập. Số bản sao cho một tế bào của các peptit được chọn được thể hiện trong Bảng 12.

Bảng 12: số bản sao tuyệt đối. Bảng này liệt kê kết quả định lượng peptit tuyệt đối trong các mẫu khối u NSCLC. Số bản sao trung bình cho một tế bào được thể hiện đối với mỗi peptit: <100 = +; >=100 = ++; >=1000 = +++; >=10000 = ++++. Số lượng mẫu trong đó các số liệu MS có thể đánh giá với chất lượng cao được thể hiện.

SEQ ID No.	Ký hiệu peptit	Số bản sao của mỗi tế bào (giá trị trung bình)	Số lượng mẫu
9	PTHL-001	+	31

Tài liệu tham khảo

- Abbas, W. et al., *Front Oncol* **5** (2015): 75
- Adams, S. et al., *PLoS.One.* **9** (2014): e112945
- Al Moustafa, A. E. et al., *Oncogene* **21** (2002): 2634-2640
- Al-Mahdi, R. et al., *Cell Adh.Migr.* (2015): 0
- Alcoser, S. Y. et al., *BMC.Biotechnol.* **11** (2011): 124
- Alholle, A. et al., *Epigenetics.* **8** (2013): 1198-1204
- Ali, R. H. et al., *Hum.Pathol.* **45** (2014): 2453-2462
- Allison, J. P. et al., *Science* **270** (1995): 932-933
- Alper, M. et al., *Mol.Cell Biochem.* **393** (2014): 165-175
- Alsagaby, S. A. et al., *J Proteome.Res* **13** (2014): 5051-5062
- Altmannsberger, M. et al., *Am.J Pathol.* **118** (1985): 85-95
- Ammendola, M. et al., *PLoS.One.* **9** (2014): e99512
- Andersen, R. S. et al., *Nat.Protoc.* **7** (2012): 891-902
- Anderson, N. L. et al., *J Proteome.Res* **11** (2012): 1868-1878
- Appay, V. et al., *Eur.J Immunol.* **36** (2006): 1805-1814
- Arentz, G. et al., *Clin Proteomics.* **8** (2011): 16
- Arif, Q. et al., *Arch.Pathol.Lab Med.* **139** (2015): 978-980
- Auvinen, P. et al., *Breast Cancer Res Treat.* **143** (2014): 277-286
- Avasarala, S. et al., *PLoS.One.* **8** (2013): e76895
- Banchereau, J. et al., *Cell* **106** (2001): 271-274
- Bandres, E. et al., *Oncol Rep.* **12** (2004): 287-292
- Banerjee, K. et al., *Int.J Cancer* (2015)
- Barros-Filho, M. C. et al., *J Clin Endocrinol.Metab* **100** (2015): E890-E899
- Bashyam, M. D. et al., *Neoplasia.* **7** (2005): 556-562
- Basu, S. et al., *PLoS.One.* **10** (2015): e0123979
- Baxter, P. A. et al., *Acta Neuropathol.Commun.* **2** (2014): 160

- Beatty, G. et al., *J Immunol* **166** (2001): 2276-2282
- Becker, S. A. et al., *Cancer Res* **56** (1996): 5092-5097
- Beggs, J. D., *Nature* **275** (1978): 104-109
- Bellon, M. et al., *Blood* **121** (2013): 5045-5054
- Benjamini, Y. et al., *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)*, **Vol.57** (1995): 289-300
- Bhattacharjee, R. B. et al., *Cell Biol Int.* **36** (2012): 697-704
- Bin Amer, S. M. et al., *Saudi.Med.J* **29** (2008): 507-513
- Blanch, A. et al., *PLoS.One.* **8** (2013): e66436
- Blanco, M. A. et al., *Cell Res* **22** (2012): 1339-1355
- Blenk, S. et al., *Cancer Inform.* **3** (2007): 399-420
- Boulter, J. M. et al., *Protein Eng* **16** (2003): 707-711
- Boyer, A. P. et al., *Mol.Cell Proteomics.* **12** (2013): 180-193
- Bozza, W. P. et al., *Oncotarget.* **6** (2015): 32723-32736
- Braulke, T. et al., *Arch.Biochem.Biophys.* **298** (1992): 176-181
- Braumuller, H. et al., *Nature* (2013)
- Bray, F. et al., *Int J Cancer* **132** (2013): 1133-1145
- Brechmann, M. et al., *Immunity.* **37** (2012): 697-708
- Bredholt, G. et al., *Oncotarget.* **6** (2015): 39676-39691
- Breuninger, S. et al., *Am.J Pathol.* **176** (2010): 2509-2519
- Brezinova, J. et al., *Cancer Genet.Cytogenet.* **173** (2007): 10-16
- Broghammer, M. et al., *Cancer Lett.* **214** (2004): 225-229
- Brossart, P. et al., *Blood* **90** (1997): 1594-1599
- Bruckdorfer, T. et al., *Curr.Pharm.Biotechnol.* **5** (2004): 29-43
- Buckley, N. E. et al., *Cell Death.Dis.* **5** (2014): e1070
- Bui, P. H. et al., *Mol.Pharmacol.* **76** (2009): 1044-1052
- Buim, M. E. et al., *Oncology* **69** (2005): 445-454

- Bujas, T. et al., *Eur.J Histochem.* **55** (2011): e7
- Cai, J. L. et al., *Chin J Cancer Res* **23** (2011): 59-63
- Cai, Q. et al., *Nat Genet.* **46** (2014): 886-890
- Calmon, M. F. et al., *Epigenetics.* **10** (2015): 622-632
- Calvo, N. et al., *Biochem.Cell Biol* **92** (2014): 305-315
- Canet, B. et al., *Hum.Pathol.* **42** (2011): 833-839
- Cao, Z. et al., *Mol.Oncol* **8** (2014): 285-296
- Card, K. F. et al., *Cancer Immunol Immunother.* **53** (2004): 345-357
- Carinci, F. et al., *Int.J Immunopathol.Pharmacol.* **18** (2005): 513-524
- Cazier, J. B. et al., *Nat Commun.* **5** (2014): 3756
- Cetindis, M. et al., *Eur.Arch.Otorhinolaryngol.* (2015)
- Chakrabarti, G. et al., *Cancer Metab* **3** (2015): 12
- Chaneton, B. et al., *Trends Biochem.Sci.* **37** (2012): 309-316
- Chang, I. W. et al., *Tumour.Biol* **36** (2015): 5441-5450
- Chang, J. W. et al., *Anticancer Res* **32** (2012): 1259-1265
- Chanock, S. J. et al., *Hum.Immunol.* **65** (2004): 1211-1223
- Chauvet, C. et al., *PLoS.One.* **6** (2011): e22545
- Che, J. et al., *Tumour.Biol* **36** (2015): 6559-6568
- Chen, B. et al., *Mol.Cancer Res* **10** (2012): 305-315
- Chen, K. D. et al., *Cell Death.Dis.* **5** (2014a): e1244
- Chen, L. et al., *Int.J Mol.Sci.* **15** (2014b): 11435-11445
- Chen, Q. et al., *Cell Physiol Biochem.* **35** (2015a): 1052-1061
- Chen, R. S. et al., *Oncogene* **28** (2009): 599-609
- Chen, S. et al., *Cancer Epidemiol.* **37** (2013): 172-178
- Chen, W. M. et al., *Dig.Dis.Sci.* **60** (2015b): 1655-1662
- Chen, Y. et al., *Med.Oncol* **31** (2014c): 304
- Chen, Y. C. et al., *Int.J Cancer* **135** (2014d): 117-127

- Chen, Z. T. et al., *Int.J Mol.Sci.* **16** (2015c): 15497-15530
- Cheon, D. J. et al., *Clin Cancer Res* **20** (2014): 711-723
- Cheuk, W. et al., *Pathology* **33** (2001): 7-12
- Cho, S. J. et al., *PLoS.One.* **8** (2013): e71724
- Choi, W. I. et al., *Cell Physiol Biochem.* **23** (2009): 359-370
- Chuang, W. Y. et al., *Histol.Histopathol.* **28** (2013): 293-299
- Chung, J. et al., *J Cell Biol* **158** (2002): 165-174
- Chung, T. K. et al., *Int.J Cancer* **137** (2015): 776-783
- Cimino, D. et al., *Int.J Cancer* **123** (2008): 1327-1338
- Cipriano, R. et al., *Mol.Cancer Res* **12** (2014): 1156-1165
- ClinicalTrials.gov, (2015), <http://www.clinicaltrials.gov>
- 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
- Coligan, J. E. et al., *Current Protocols in Protein Science* (1995)
- Colombetti, S. et al., *J Immunol.* **176** (2006): 2730-2738
- Council, L. et al., *Mod.Pathol.* **22** (2009): 639-650
- Crossen, P. E. et al., *Cancer Genet.Cytogenet.* **113** (1999): 126-133
- Cui, D. et al., *Oncogene* **33** (2014): 2225-2235
- Daigeler, A. et al., *J Exp.Clin Cancer Res* **27** (2008): 82
- Dang, C. V. et al., *Clin Cancer Res* **15** (2009): 6479-6483
- Dang, Q. et al., *Med.Oncol* **31** (2014): 24
- Dar, A. A. et al., *Immunology* (2015)
- Davids, M. S. et al., *Leuk.Lymphoma* **53** (2012): 2362-2370
- Davidson, B. et al., *Hum.Pathol.* **45** (2014): 691-700
- de Groen, F. L. et al., *Genes Chromosomes.Cancer* **53** (2014): 339-348
- de Jonge, H. J. et al., *Leukemia* **25** (2011): 1825-1833

- de Sa, V. K. et al., *Braz.J Med.Biol Res* **46** (2013): 21-31
- De, Keersmaecker K. et al., *Haematologica* **99** (2014): 85-93
- De, Ponti A. et al., *Cancer Lett.* **369** (2015): 396-404
- Deacu, E. et al., *Cancer Res* **64** (2004): 7690-7696
- Deb, S. et al., *Mod.Pathol.* **27** (2014): 1223-1230
- Debiec-Rychter, M. et al., *Genes Chromosomes.Cancer* **38** (2003): 187-190
- DeLaBarre, B. et al., *Chem Biol* **21** (2014): 1143-1161
- Delker, D. A. et al., *PLoS.One.* **9** (2014): e88367
- Demirag, G. G. et al., *Med.Oncol* **29** (2012): 1518-1522
- Demirci, H. et al., *J Ophthalmic Vis.Res* **8** (2013): 303-307
- Dengjel, J. et al., *Clin Cancer Res* **12** (2006): 4163-4170
- Denkberg, G. et al., *J Immunol* **171** (2003): 2197-2207
- Depianto, D. et al., *Nat Genet.* **42** (2010): 910-914
- Ding, L. et al., *Nature* **481** (2012): 506-510
- Dotlic, S. et al., *Appl.Immunohistochem.Mol.Morphol.* **22** (2014): 537-542
- Downie, D. et al., *Clin Cancer Res.* **11** (2005): 7369-7375
- Draberova, E. et al., *J Neuropathol.Exp.Neurol.* **74** (2015): 723-742
- Drayton, R. M. et al., *Clin Cancer Res* **20** (2014): 1990-2000
- Du, J. et al., *Int.J Mol.Sci.* **13** (2012): 15755-15766
- Duanmin, H. et al., *Hepatogastroenterology* **60** (2013): 870-875
- Dubrowinskaja, N. et al., *Cancer Med.* **3** (2014): 300-309
- Ehrlichova, M. et al., *Genomics* **102** (2013): 96-101
- El-Naggar, A. M. et al., *Cancer Cell* **27** (2015): 682-697
- Espinosa, A. M. et al., *PLoS.One.* **8** (2013): e55975
- Esseghir, S. et al., *J Pathol.* **210** (2006): 420-430
- Falk, K. et al., *Nature* **351** (1991): 290-296
- Fang, J. et al., *BMC.Cancer* **8** (2008a): 69

- Fang, W. et al., *J Transl.Med.* **6** (2008b): 32
- Fejzo, M. S. et al., *Int.J Mol.Sci.* **14** (2013): 3094-3109
- Fellenberg, F. et al., *J Invest Dermatol.* **122** (2004): 1510-1517
- Feng, G. et al., *Leuk.Lymphoma* **55** (2014): 2699-2705
- Ferlay et al., GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No.11 [Internet], (2013), <http://globocan.iarc.fr>
- Fong, L. et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **98** (2001): 8809-8814
- Fontaine, J. F. et al., *PLoS.One.* **4** (2009): e7632
- Forsey, R. W. et al., *Biotechnol.Lett.* **31** (2009): 819-823
- Fu, A. et al., *Mol.Med.Rep.* **11** (2015a): 4727-4733
- Fu, Y. et al., *Cancer Biol.Ther* **5** (2006): 741-744
- Fu, Z. C. et al., *Med.Sci.Monit.* **21** (2015b): 1276-1287
- Fujita, A. et al., *Genet.Mol.Res* **7** (2008): 371-378
- Fujita, N. et al., *J Biochem.* **152** (2012): 407-413
- Fujiwara, K. et al., *PLoS.One.* **9** (2014): e107247
- Furukawa, C. et al., *Cancer Res* **65** (2005): 7102-7110
- Gabrilovich, D. I. et al., *Nat Med.* **2** (1996): 1096-1103
- Gao, Y. B. et al., *Nat Genet.* **46** (2014): 1097-1102
- Gattinoni, L. et al., *Nat Rev.Immunol* **6** (2006): 383-393
- Giallourakis, C. C. et al., *J Immunol.* **190** (2013): 5578-5587
- Giovinazzo, F. et al., *Cell Signal.* **25** (2013): 651-659
- Gkika, D. et al., *J Cell Biol* **208** (2015): 89-107
- 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
- Goode, G. et al., *PLoS.One.* **9** (2014): e100103
- Gordon, G. J. et al., *BMC.Cancer* **11** (2011): 169
- Gorski, J. J. et al., *Breast Cancer Res Treat.* **122** (2010): 721-731

- Green, M. R. et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* **4th** (2012)
- Greenfield, E. A., *Antibodies: A Laboratory Manual* **2nd** (2014)
- Groulx, J. F. et al., *Carcinogenesis* **35** (2014): 1217-1227
- Guo, X. et al., *Sci.Rep.* **5** (2015): 11846
- Gupta, V. et al., *Curr.Pharm.Des* **20** (2014): 2595-2606
- Hagel, C. et al., *J Neurooncol.* **112** (2013): 191-197
- Haggman, M. J. et al., *Urology* **50** (1997): 643-647
- Hammam, O. et al., *J Egypt.Soc.Parasitol.* **44** (2014): 733-740
- Hapgood, G. et al., *Blood* **126** (2015): 17-25
- Haraguchi, N. et al., *Int.J Oncol* **43** (2013): 425-430
- Harris, T. M. et al., *Arch.Pathol.Lab Med.* **139** (2015): 494-507
- Haslene-Hox, H. et al., *Biochim.Biophys.Acta* **1834** (2013): 2347-2359
- Hatina, J. et al., *Neoplasma* **59** (2012): 728-736
- Hauser, A. D. et al., *Mol.Cancer Res* **12** (2014): 130-142
- He, X. et al., *Int.J Biol Macromol.* **72** (2015): 1081-1089
- Heffler, M. et al., *Anticancer Agents Med.Chem* **13** (2013): 584-594
- Heubeck, B. et al., *Eur.J Cancer* **49** (2013): e1-e7
- Hoeflich, K. P. et al., *Int.J Oncol* **29** (2006): 839-849
- Hofsli, E. et al., *Br.J Cancer* **99** (2008): 1330-1339
- Hogan, L. E. et al., *Blood* **118** (2011): 5218-5226
- Hountis, P. et al., *Tumour.Biol* **35** (2014): 7327-7333
- Hu, C. K. et al., *Mol.Biol Cell* **23** (2012): 2702-2711
- Huang, F. et al., *Int.J Clin Exp.Pathol.* **7** (2014a): 1093-1100
- Huang, S. L. et al., *Cancers (Basel)* **7** (2015): 1052-1071
- Huang, Y. D. et al., *Hua Xi.Kou Qiang.Yi.Xue.Za Zhi.* **25** (2007): 500-503
- Huang, Z. et al., *Indian J Otolaryngol.Head Neck Surg.* **66** (2014b): 120-125
- Huang, Z. et al., *J Oral Pathol.Med.* **43** (2014c): 191-198

- Hussey, G. S. et al., *Mol Cell* **41** (2011): 419-431
- Hwang, M. L. et al., *J Immunol.* **179** (2007): 5829-5838
- Ichinose, J. et al., *Cancer Sci.* **105** (2014): 1135-1141
- Ida-Yonemochi, H. et al., *Mod.Pathol.* **25** (2012): 784-794
- Ii, M. et al., *Int.J Oncol* **39** (2011): 593-599
- Inoue, H. et al., *Int.J Cancer* **63** (1995): 523-526
- Inoue, K. et al., *Subcell.Biochem.* **85** (2014): 17-40
- Iqbal, M. A. et al., *FEBS Lett.* **588** (2014): 2685-2692
- Irifune, H. et al., *Cancer Biol Ther.* **4** (2005): 449-455
- Ismail, M. F. et al., *Tumour.Biol* (2015)
- Israelsen, W. J. et al., *Semin.Cell Dev.Biol* **43** (2015): 43-51
- Jamieson, N. B. et al., *Clin Cancer Res* **17** (2011): 3316-3331
- Januchowski, R. et al., *Biomed.Pharmacother.* **67** (2013): 240-245
- Jiang, L. et al., *Cell Cycle* **14** (2015): 2881-2885
- Jin, J. et al., *Int.J Hematol.* **99** (2014): 750-757
- Johnson, R. H. et al., *Oncotarget.* (2015)
- Johnstone, C. N. et al., *Dis.Model.Mech.* **8** (2015): 237-251
- Joosse, S. A. et al., *Clin Cancer Res* **18** (2012): 993-1003
- Jung, G. et al., *Proc Natl Acad Sci U S A* **84** (1987): 4611-4615
- Kabbage, M. et al., *J Biomed.Biotechnol.* **2008** (2008): 564127
- Kanehira, M. et al., *Cancer Res* **67** (2007): 3276-3285
- Kang, S. et al., *J Proteome.Res* **9** (2010): 5638-5645
- Kao, C. J. et al., *Oncogene* **27** (2008): 1397-1403
- Karlsson, J. et al., *Cancer Lett.* **357** (2015): 498-501
- Kato, I. et al., *Pathol.Int.* **59** (2009): 38-43
- Katoh, M., *Int.J Oncol* **41** (2012): 1913-1918
- Kaz, A. M. et al., *Genes Chromosomes.Cancer* **51** (2012): 384-393

- Kazma, R. et al., PLoS.One. **7** (2012): e51680
- Kerley-Hamilton, J. S. et al., Oncogene **24** (2005): 6090-6100
- Khakpour, G. et al., Tumour.Biol **36** (2015): 4905-4912
- Khalil, A. A., Cancer Sci. **98** (2007): 201-213
- Khapare, N. et al., PLoS.One. **7** (2012): e38561
- Kibbe, A. H., Handbook of Pharmaceutical Excipients **rd** (2000)
- Kido, T. et al., Genes (Basel) **1** (2010): 283-293
- Kim, S. W. et al., OMICS. **15** (2011): 281-292
- Kimura, H. et al., Int.J Oncol **30** (2007): 171-179
- Kinoshita, T. et al., Oncotarget. **3** (2012): 1386-1400
- Kirov, A. et al., J Cell Biochem. (2015)
- Kita, Y. et al., Eur.J Surg.Oncol **35** (2009): 52-58
- Klopfleisch, R. et al., J Proteome.Res **9** (2010): 6380-6391
- Koizume, S. et al., Cancer Res **66** (2006): 9453-9460
- Koizume, S. et al., World J Clin Oncol **5** (2014): 908-920
- Koizume, S. et al., Biomark.Cancer **7** (2015): 1-13
- Kono, K. et al., Cancer Sci. **100** (2009): 1502-1509
- Kottorou, A. E. et al., Acta Histochem. **114** (2012): 553-561
- Krieg, A. M., Nat Rev.Drug Discov. **5** (2006): 471-484
- Krisenko, M. O. et al., Biochim.Biophys.Acta **1853** (2015): 254-263
- Kruse, A. J. et al., Int.J Gynecol.Cancer **24** (2014): 1616-1622
- Kulkarni, G. et al., Breast Cancer Res Treat. **102** (2007): 31-41
- Kultti, A. et al., Biomed.Res Int. **2014** (2014): 817613
- Kumar, M. et al., J Transl.Med. **13** (2015): 8
- Kumarakulasingham, M. et al., Clin Cancer Res **11** (2005): 3758-3765
- Kuramitsu, Y. et al., Anticancer Res **30** (2010): 4459-4465
- Kurimoto, F. et al., Int.J Mol.Med. **8** (2001): 89-93

- Kwon, O. H. et al., *Biochem.Biophys.Res Commun.* **406** (2011): 539-545
- Larrinaga, G. et al., *Dis.Markers* **35** (2013): 825-832
- Lauvrak, S. U. et al., *Br.J Cancer* **109** (2013): 2228-2236
- Leal, M. F. et al., *World J Gastroenterol.* **18** (2012): 1531-1537
- Ledet, E. M. et al., *Prostate* **73** (2013): 614-623
- Lee, E. J. et al., *J Genet.Genomics* **42** (2015a): 355-371
- Lee, H. W. et al., *Dis.Esophagus.* (2015b)
- Lee, J. et al., *Oncoscience.* **2** (2015c): 410-418
- Lee, J. M., *Reprod.Biol Endocrinol.* **1** (2003): 69
- Lee, M. H. et al., *J Cell Sci.* **126** (2013): 1744-1752
- Lee, M. H. et al., *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **1171** (2009): 87-93
- Lee, S. H. et al., *EMBO J* **25** (2006): 4008-4019
- Lee, S. Y. et al., *J Clin Invest* **122** (2012): 3211-3220
- Lei, Y. Y. et al., *Asian Pac.J Cancer Prev.* **15** (2014): 8539-8548
- Leithner, K. et al., *BMC.Cancer* **14** (2014): 40
- Leitlinie Magenkarzinom, **032-009OL**, (2012)
- Lexander, H. et al., *Anal.Quant.Cytol.Histol.* **27** (2005): 263-272
- Li, C. et al., *Oncogene* **23** (2004): 9336-9347
- Li, C. et al., *Am.J Cancer Res* **5** (2015a): 1635-1648
- Li, R. et al., *Oncogene* **25** (2006): 2628-2635
- Li, X. et al., *Pancreas* **40** (2011): 753-761
- Li, X. Q. et al., *PLoS.One.* **7** (2012): e31146
- Li, Y. et al., *Neoplasia.* **7** (2005): 1073-1080
- Li, Y. et al., *Cell Rep.* **12** (2015b): 388-395
- Li, Y. et al., *Lung Cancer* **58** (2007): 171-183
- Li, Z. et al., *Biochim.Biophys.Acta* **1846** (2014): 285-296
- Liang, B. et al., *World J Gastroenterol.* **11** (2005a): 623-628

- Liang, J. et al., *Tumour.Biol* **36** (2015): 6391-6399
- Liang, L. et al., *Int.J Oncol* **45** (2014): 659-666
- Liang, Z. et al., *Zhonghua Zhong.Liu Za Zhi.* **27** (2005b): 534-537
- Liao, J. S. et al., *Zhejiang.Da.Xue.Xue.Bao.Yi.Xue.Ban.* **44** (2015a): 329-334
- Liao, W. et al., *Oncotarget.* **6** (2015b): 24132-24147
- Liddy, N. et al., *Nat Med.* **18** (2012): 980-987
- Lim, M. Y. et al., *Int.J Chronic.Dis.* **2013** (2013): 578613
- Lim, R. et al., *Biochem.Biophys.Res Commun.* **406** (2011): 408-413
- Lin, C. et al., *Oncotarget.* **6** (2015): 8434-8453
- Lin, S. J. et al., *J Proteomics.* **94** (2013): 186-201
- Lin, X. et al., *Med.Oncol* **31** (2014): 42
- Linher-Melville, K. et al., *Mol.Cell Biochem.* **405** (2015): 205-221
- Liu, B. et al., *J Clin Endocrinol.Metab* **99** (2014a): E786-E795
- Liu, C. et al., *Int.J Clin Exp.Pathol.* **7** (2014b): 690-698
- Liu, D. et al., *Genet.Mol.Res* **13** (2014c): 8153-8162
- Liu, J. P. et al., *Zhonghua Yi.Xue.Za Zhi.* **87** (2007a): 2719-2723
- Liu, L. et al., *Oncol Lett.* **7** (2014d): 2192-2198
- Liu, Y. et al., *J Neurooncol.* **99** (2010): 13-24
- Liu, Y. et al., *Cell Death.Dis.* **6** (2015): e1630
- Liu, Y. et al., *Oncol Rep.* **18** (2007b): 943-951
- Liu, Y. F. et al., *Tumour.Biol* **35** (2014e): 3731-3741
- Ljunggren, H. G. et al., *J Exp.Med.* **162** (1985): 1745-1759
- Lo, P. K. et al., *Oncogene* **31** (2012): 2614-2626
- Lo, R. K. et al., *J Biol Chem* **278** (2003): 52154-52165
- Lo, W. Y. et al., *J Proteome.Res* **6** (2007): 2143-2151
- Lohr, J. G. et al., *Cancer Cell* **25** (2014): 91-101
- Long, W. et al., *J Clin Invest* **122** (2012): 1869-1880

- Longenecker, B. M. et al., Ann N.Y.Acad.Sci. **690** (1993): 276-291
- Longerich, T., Pathologe **35 Suppl 2** (2014): 177-184
- Lonsdale, J., Nat.Genet. **45** (2013): 580-585
- Lou, S. et al., Stem Cells **31** (2013): 1942-1953
- Lu, Z. et al., Cell Physiol Biochem. **33** (2014): 859-868
- Lukas, T. J. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **78** (1981): 2791-2795
- Lundblad, R. L., Chemical Reagents for Protein Modification **3rd** (2004)
- Luo, W. et al., Trends Endocrinol.Metab **23** (2012): 560-566
- Lv, Z. et al., J Exp.Clin Cancer Res **33** (2014): 100
- Ma, Y. et al., Mol.Cell Proteomics. **8** (2009): 1878-1890
- Madanayake, T. W. et al., BMC.Genomics **14** (2013): 833
- Maiso, P. et al., Cancer Res **75** (2015): 2071-2082
- Manenti, G. et al., Toxicol.Lett. **112-113** (2000): 257-263
- Mao, P. et al., J Biol Chem **286** (2011): 19381-19391
- Mao, P. et al., PLoS.One. **8** (2013): e81803
- Marcinkiewicz, K. M. et al., Exp.Cell Res **320** (2014): 128-143
- Marg, A. et al., Biochem.Biophys.Res Commun. **401** (2010): 143-148
- Marhold, M. et al., Mol.Cancer Res **13** (2015): 556-564
- Martin-Rufian, M. et al., J Mol.Med.(Berl) **92** (2014): 277-290
- Matassa, D. S. et al., Cell Death.Dis. **4** (2013): e851
- Mayas, M. D. et al., Anticancer Res **32** (2012): 3675-3682
- Mazan-Mamczarz, K. et al., PLoS.Genet. **10** (2014): e1004105
- Mazurek, S., Ernst.Schering.Found.Symp.Proc. (2007): 99-124
- Mazurek, S., Int.J Biochem.Cell Biol **43** (2011): 969-980
- McBride, D. J. et al., J Pathol. **227** (2012): 446-455
- Melaiu, O. et al., Mutat.Res **771** (2015): 6-12
- Messina, M. et al., Blood **123** (2014): 2378-2388

- Meziere, C. et al., *J Immunol* **159** (1997): 3230-3237
- Mimori, K. et al., *Int.J Oncol* **11** (1997): 959-964
- Mirza, Z. et al., *Anticancer Res* **34** (2014): 1873-1884
- Missero, C. et al., *Exp.Dermatol.* **23** (2014): 143-146
- Moretti, R. M. et al., *Oncol Rep.* **9** (2002): 1139-1143
- Morgan, R. A. et al., *Science* **314** (2006): 126-129
- Mori, M. et al., *Transplantation* **64** (1997): 1017-1027
- Morris, L. G. et al., *Nat Genet.* **45** (2013): 253-261
- Mortara, L. et al., *Clin Cancer Res.* **12** (2006): 3435-3443
- Mountzios, G. et al., *Ann.Oncol* **25** (2014): 1889-1900
- 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
- Murray, G. I. et al., *Histopathology* **57** (2010): 202-211
- Mustacchi, G. et al., *Int.J Mol.Sci.* **14** (2013): 9686-9702
- Naba, A. et al., *Elife.* **3** (2014): e01308
- Naboulsi, W. et al., *J Proteome.Res* (2015)
- Naderi, A., *Exp.Cell Res* **331** (2015): 239-250
- Nakao, K. et al., *J Gastroenterol.* **49** (2014): 589-593
- Navara, C. S., *Curr.Pharm.Des* **10** (2004): 1739-1744
- Naz, S. et al., *Carcinogenesis* **35** (2014): 14-23
- Neumann, M. et al., *Blood* **121** (2013): 4749-4752
- Ng, S. K. et al., *Clin Experiment.Ophthalmol.* **43** (2015): 367-376
- Nikitakis, N. G. et al., *Am.J Clin Pathol.* **119** (2003): 574-586
- Nishida, C. R. et al., *Mol.Pharmacol.* **78** (2010): 497-502
- Nwosu, V. et al., *Hum.Mol Genet.* **10** (2001): 2313-2318
- Nykopp, T. K. et al., *BMC.Cancer* **10** (2010): 512

- O'Gorman, D. B. et al., *Endocrinology* **143** (2002): 4287-4294
- Oh, H. R. et al., *Cell Oncol (Dordr.)* **37** (2014): 455-461
- Ohigashi, Y. et al., *Clin Cancer Res.* **11** (2005): 2947-2953
- Okayama, H. et al., *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* **23** (2014): 2884-2894
- Okoh, V. O. et al., *PLoS.One.* **8** (2013): e54206
- Olstad, O. K. et al., *Anticancer Res* **23** (2003): 2201-2216
- Ordonez, N. G., *Arch.Pathol.Lab Med.* **129** (2005): 1407-1414
- Orzol, P. et al., *Histol.Histopathol.* **30** (2015): 503-521
- Padden, J. et al., *Mol.Cell Proteomics.* **13** (2014): 2661-2672
- Pan, B. et al., *Mol.Biol Rep.* **40** (2013): 27-33
- Pan, T. et al., *Biochem.Biophys.Res Commun.* **456** (2015): 452-458
- Papagerakis, S. et al., *Hum.Pathol.* **34** (2003): 565-572
- Park, Y. et al., *Oncogene* **34** (2015): 5037-5045
- Parker, L. P. et al., *Cancer Genomics Proteomics.* **6** (2009): 189-194
- Pathak, S. et al., *Nutr.Cancer* **66** (2014): 818-824
- Peng, H. et al., *Cell Oncol (Dordr.)* **38** (2015): 165-172
- Penney, K. L. et al., *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* **24** (2015): 255-260
- Perez, I. et al., *Int.J Med.Sci.* **12** (2015): 458-467
- Persson, F. et al., *Cancer Lett.* **260** (2008): 37-47
- Pflueger, D. et al., *Neoplasia.* **15** (2013): 1231-1240
- Pickering, C. R. et al., *Clin Cancer Res* **20** (2014): 6582-6592
- Pillay, V. et al., *S.Afr.Med.J* **105** (2015): 656-658
- Pils, D. et al., *BMC.Cancer* **13** (2013): 178
- 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

- Prasad, N. B. et al., *Mod.Pathol.* **27** (2014): 945-957
- Puente, X. S. et al., *Nature* **526** (2015): 519-524
- Qendro, V. et al., *J Proteome.Res* **13** (2014): 5031-5040
- Qi, Y. et al., *Proteomics.* **5** (2005): 2960-2971
- Qi, Y. et al., *J Breast Cancer* **18** (2015): 218-224
- Qie, S. et al., *J Cell Biochem.* **115** (2014): 498-509
- Qu, Y. M. et al., *Zhonghua Yi.Xue.Za Zhi.* **90** (2010): 1958-1962
- Qu, Z. et al., *Cancer Med.* **3** (2014): 453-461
- Quillien, V. et al., *Anticancer Res.* **17** (1997): 387-391
- Rabinovitz, I. et al., *Biochem.Cell Biol* **74** (1996): 811-821
- Rabinovitz, I. et al., *Clin Exp.Metastasis* **13** (1995): 481-491
- Rad, E. et al., *Mol.Cancer Res* **13** (2015): 1149-1160
- Rai, R. et al., *Oral Oncol* **40** (2004): 705-712
- Raica, M. et al., *Anticancer Res* **28** (2008): 2997-3006
- Ramirez-Exposito, M. J. et al., *Maturitas* **72** (2012): 79-83
- Rammensee, H. G. et al., *Immunogenetics* **50** (1999): 213-219
- Reeb, A. N. et al., *J Clin Endocrinol.Metab* **100** (2015): E232-E242
- RefSeq, The NCBI handbook [Internet], Chapter 18, (2002), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21091/>
- Rehman, I. et al., *PLoS.One.* **7** (2012): e30885
- Reis, S. T. et al., *Clinics.(Sao Paulo)* **68** (2013): 652-657
- Rommelink, M. et al., *Int.J Oncol* **26** (2005): 247-258
- Revill, K. et al., *Gastroenterology* **145** (2013): 1424-1435
- Ricketts, C. J. et al., *Clin Epigenetics.* **5** (2013): 16
- 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

- Roemer, A. et al., J Urol. **172** (2004): 2162-2166
- Romana, S. P. et al., Leukemia **20** (2006): 696-706
- Rozenblum, E. et al., Hum.Genet. **110** (2002): 111-121
- Ruminy, P. et al., Leukemia **25** (2011): 681-688
- Safadi, R. A. et al., Oral Surg.Oral Med.Oral Pathol.Oral Radiol. **121** (2016): 402-411
- Saiki, R. K. et al., Science **239** (1988): 487-491
- Sanchez-Palencia, A. et al., Int.J Cancer **129** (2011): 355-364
- Santarpia, L. et al., Oncologist. **18** (2013): 1063-1073
- Sarma, S. N. et al., Environ.Toxicol.Pharmacol. **32** (2011): 285-295
- Sathyanarayana, U. G. et al., Cancer Res **64** (2004): 1425-1430
- Sato, T. et al., Oncogene **33** (2014): 2215-2224
- Sato, Y. et al., J Gastroenterol.Hepatol. **28** (2013): 1422-1429
- Savaskan, N. E. et al., Ann.Anat. **192** (2010): 309-313
- Savaskan, N. E. et al., Curr.Neuropharmacol. **13** (2015): 258-265
- Savoy, R. M. et al., Endocr.Relat Cancer **20** (2013): R341-R356
- Schlieben, P. et al., Vet.J **194** (2012): 210-214
- Schmitt-Graeff, A. et al., Histopathology **51** (2007): 87-97
- Schuld, N. J. et al., Cell Cycle **13** (2014): 941-952
- Schumann, H. et al., Br.J Dermatol. **167** (2012): 929-936
- Scrideli, C. A. et al., J Neurooncol. **88** (2008): 281-291
- Seda, V. et al., Eur.J Haematol. **94** (2015): 193-205
- Seeger, F. H. et al., Immunogenetics **49** (1999): 571-576
- Seitz, S. et al., Eur.J Cancer **36** (2000): 1507-1513
- Semenza, G. L., Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol **76** (2011): 347-353
- Seong, J. et al., Mol.Biol.Rep. **39** (2012): 3597-3601
- Sethi, M. K. et al., J Proteomics. **126** (2015): 54-67
- Sherman, F. et al., Laboratory Course Manual for Methods in Yeast Genetics (1986)

- Shi, Z. et al., *Int.J Gynecol.Cancer* **22** (2012): 1125-1129
- Shi, Z. G. et al., *Clin Transl.Oncol* **17** (2015): 65-73
- Shibano, T. et al., *PLoS.One.* **10** (2015): e0127271
- Shin, S. H. et al., *Lab Invest* **94** (2014): 1396-1405
- Shruthi, D. K. et al., *J Oral Maxillofac.Pathol.* **18** (2014): 365-371
- Silva, J. M. et al., *Cell* **137** (2009): 1047-1061
- Silva, L. P. et al., *Anal.Chem.* **85** (2013): 9536-9542
- Singh, V. et al., *OMICS.* **19** (2015): 688-699
- Singh-Jasuja, H. et al., *Cancer Immunol.Immunother.* **53** (2004): 187-195
- Slaga, T. J. et al., *J Investig.Dermatol.Symp.Proc.* **1** (1996): 151-156
- Small, E. J. et al., *J Clin Oncol.* **24** (2006): 3089-3094
- Sobolik-Delmaire, T. et al., *Cell Commun.Adhes.* **14** (2007): 99-109
- Spurr, I. B. et al., *Chembiochem.* **13** (2012): 1628-1634
- Stahl, M. et al., *Ann.Oncol.* **24 Suppl 6** (2013): vi51-vi56
- Stull, R. A. et al., *BMC.Genomics* **6** (2005): 55
- Sturm, M. et al., *BMC.Bioinformatics.* **9** (2008): 163
- Sugimoto, K. J. et al., *Int.J Clin Exp.Pathol.* **7** (2014): 8980-8987
- Suh, J. H. et al., *J Korean Med.Sci.* **28** (2013): 593-601
- Sun, M. et al., *Biochem.Biophys.Res Commun.* **340** (2006): 209-214
- Sun, Y. et al., *Biochem.Biophys.Res Commun.* **450** (2014): 1-6
- Suzuki, S. et al., *Pathol.Res Pract.* **210** (2014): 130-134
- Swain, N. et al., *Tumour.Biol* **35** (2014): 8407-8413
- Szeliga, M. et al., *Tumour.Biol* **35** (2014): 1855-1862
- Takabe, P. et al., *Exp.Cell Res* **337** (2015): 1-15
- Takahashi, H. et al., *Urology* **79** (2012): 240-248
- Takeda, H. et al., *Nat Genet.* **47** (2015): 142-150
- Tamada, M. et al., *Clin Cancer Res* **18** (2012): 5554-5561

- Tan, B. S. et al., *Mol.Cancer Ther.* **10** (2011): 1982-1992
- Tanaka, F. et al., *Int.J Oncol* **10** (1997): 1113-1117
- Tang, H. et al., *Anticancer Drugs* **18** (2007): 633-639
- Tang, H. et al., *Clin Cancer Res* **19** (2013): 1577-1586
- Tang, J. Q. et al., *Beijing Da.Xue.Xue.Bao.* **41** (2009): 531-536
- Tang, J. Q. et al., *Chin Med.J (Engl.)* **123** (2010): 3559-3565
- Tanis, T. et al., *Arch.Oral Biol* **59** (2014): 1155-1163
- Tech, K. et al., *Cancer Lett.* **356** (2015): 268-272
- Teng, B. P. et al., *Anticancer Agents Med.Chem* **11** (2011): 620-628
- Terada, T., *Int.J Clin Exp.Pathol.* **5** (2012): 596-600
- Teufel, R. et al., *Cell Mol Life Sci.* **62** (2005): 1755-1762
- Tew, G. W. et al., *J Biol Chem* **283** (2008): 963-976
- Thomas, A. et al., *Cancer Med.* **2** (2013): 836-848
- Tian, S. Y. et al., *Int.J Clin Exp.Pathol.* **7** (2014): 3752-3762
- Tofuku, K. et al., *Int.J Oncol* **29** (2006): 175-183
- Toh, U. et al., *Int.J Clin Oncol* **7** (2002): 372-375
- Toh, U. et al., *Clin Cancer Res.* **6** (2000): 4663-4673
- Toomey, P. G. et al., *Cancer Control* **20** (2013): 32-42
- Tota, G. et al., *BMC.Cancer* **14** (2014): 963
- Tran, E. et al., *Science* **344** (2014): 641-645
- Truong, T. et al., *Endocr.Relat Cancer* **21** (2014): 629-638
- Tsujimoto, H. et al., *Mol.Carcinog* **26** (1999): 298-304
- Tuupanen, S. et al., *Br.J Cancer* **111** (2014): 1657-1662
- Tuval-Kochen, L. et al., *PLoS.One.* **8** (2013): e77260
- Twa, D. D. et al., *J Pathol.* **236** (2015): 136-141
- Twarock, S. et al., *Mol.Cancer* **10** (2011): 30
- Tzellos, T. G. et al., *J Eur.Acad.Dermatol.Venereol.* **25** (2011): 679-687

- Urosevic, J. et al., *Nat Cell Biol* **16** (2014): 685-694
- Vachani, A. et al., *Clin Cancer Res.* **13** (2007): 2905-2915
- Valladares-Ayerbes, M. et al., *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* **19** (2010): 1432-1440
- Valletta, D. et al., *Carcinogenesis* **35** (2014): 1407-1415
- van, Geldermalsen M. et al., *Oncogene* (2015)
- Varga, A. E. et al., *Oncogene* **24** (2005): 5043-5052
- Varona, A. et al., *Am.J Physiol Renal Physiol* **292** (2007): F780-F788
- Vasca, V. et al., *Oncol Lett.* **8** (2014): 2501-2504
- Venneti, S. et al., *Brain Pathol.* **23** (2013): 217-221
- Virtakoivu, R. et al., *Cancer Res* **75** (2015): 2349-2362
- Volkmer, J. P. et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **109** (2012): 2078-2083
- Volpi, A. et al., *G.Chir* **32** (2011): 59-63
- Vui-Kee, K. et al., *Kaohsiung.J Med.Sci.* **28** (2012): 243-250
- Walter, S. et al., *J Immunol* **171** (2003): 4974-4978
- Walter, S. et al., *Nat Med.* **18** (2012): 1254-1261
- Wang, D. et al., *Biochem.Biophys.Res Commun.* **458** (2015a): 313-320
- Wang, H. et al., *Front Oncol* **4** (2014): 377
- Wang, H. et al., *Cancer Cell* **18** (2010): 52-62
- Wang, J. et al., *Oncol Rep.* **33** (2015b): 1326-1334
- Wang, T. et al., *Tumour.Biol* (2015c)
- Wang, W. M. et al., *J Biol Chem* **278** (2003): 19549-19557
- Wang, X. et al., *Eur.J Pharmacol.* **768** (2015d): 116-122
- Wang, X. M. et al., *PLoS.One.* **8** (2013a): e55714
- Wang, X. Y. et al., *Int J Hyperthermia* **29** (2013): 364-375
- Wang, Y. et al., *Neoplasma* **62** (2015e): 966-973
- Wang, Z. et al., *Oncotarget.* **4** (2013b): 2476-2486
- Wang, Z. et al., *Melanoma Res* **14** (2004): 107-114

- Warner, S. L. et al., *Future.Med.Chem* **6** (2014): 1167-1178
- Watanabe, Y. et al., *Gastroenterology* **136** (2009): 2149-2158
- Wegdam, W. et al., *PLoS.One.* **9** (2014): e108046
- Wehner, M. et al., *FEBS J* **277** (2010): 1597-1605
- Weiss, I. et al., *Int.J Mol.Sci.* **13** (2012): 12925-12938
- Weissbach, S. et al., *Br.J Haematol.* **169** (2015): 57-70
- Wiedl, T. et al., *J Proteomics.* **74** (2011): 1884-1894
- Willcox, B. E. et al., *Protein Sci.* **8** (1999): 2418-2423
- Willoughby, V. et al., *Appl.Immunohistochem.Mol.Morphol.* **16** (2008): 344-348
- Wittke, I. et al., *Cancer Lett.* **162** (2001): 237-243
- Wojtalewicz, N. et al., *PLoS.One.* **9** (2014): e90461
- Wong, N. et al., *Cancer Lett.* **356** (2015): 184-191
- Woo, T. et al., *PLoS.One.* **10** (2015): e0142642
- World Cancer Report, (2014)
- Wu, G. et al., *Onco.Targets.Ther.* **8** (2015): 2067-2074
- Wu, S. et al., *Acta Biochim.Biophys.Sin.(Shanghai)* **45** (2013): 27-35
- Wu, X. et al., *Cancer Res* **70** (2010): 2718-2727
- Xiang, Y. et al., *J Clin Invest* **125** (2015): 2293-2306
- Xu, J. et al., *Genet.Mol.Res* **13** (2014): 5732-5744
- Xu, X. et al., *Oncotarget.* **6** (2015): 26161-26176
- Xue, L. Y. et al., *Zhonghua Zhong.Liu Za Zhi.* **32** (2010): 838-844
- Yager, M. L. et al., *Br.J Cancer* **89** (2003): 860-863
- Yamaguchi, T. et al., *Dis.Colon Rectum* **49** (2006): 399-406
- Yamamoto, M. et al., *PLoS.One.* **6** (2011): e17149
- Yamamoto, N. et al., *Int.J Oncol* **42** (2013): 1523-1532
- Yang, C. et al., *Tumour.Biol* (2015a)
- Yang, C. et al., *Exp.Cell Res* **331** (2015b): 377-386

- Yang, H. Y. et al., J Proteomics. **75** (2012): 3639-3653
- Yang, J. Y. et al., BMC.Cancer **10** (2010): 388
- Yang, S. et al., J Cancer Res Clin Oncol **141** (2015c): 1265-1275
- Yang, W. et al., Cancer Lett. **339** (2013): 153-158
- Yang, W. et al., Nature **499** (2013a): 491-495
- Yang, W. et al., Int.J Oncol **42** (2013b): 690-698
- Yao, M. et al., Cancer Med. **3** (2014): 845-854
- Yao, R. et al., Histol.Histopathol. **22** (2007): 1025-1032
- Yu, D. et al., Oncotarget. **6** (2015a): 7619-7631
- Yu, X. et al., Cancer Res **73** (2013): 2093-2103
- Yu, Y. et al., Cancer Cell **28** (2015b): 82-96
- Yuan, B. et al., Immunobiology **217** (2012): 738-742
- Zang, W. et al., Mol.Cancer **14** (2015): 37
- Zanini, S. et al., Cell Signal. **27** (2015): 899-907
- Zare, M. et al., Mol.Carcinog **51** (2012): 796-806
- Zaremba, S. et al., Cancer Res. **57** (1997): 4570-4577
- Zha, C. et al., PLoS.One. **10** (2015): e0122322
- Zhang, D. et al., J Cell Mol.Med. **16** (2012): 1047-1059
- Zhang, H. Y. et al., Mol.Biol Rep. **41** (2014): 5519-5524
- Zhang, Q. et al., J Cancer Res Clin Oncol **141** (2015a): 691-703
- Zhang, S. et al., Cancer Res **64** (2004): 2977-2983
- Zhang, S. et al., J Mol.Histol. **45** (2014): 283-292
- Zhang, S. N. et al., Zhonghua Yi.Xue.Za Zhi. **85** (2005): 1348-1351
- Zhang, T. et al., Mol.Cancer **9** (2010): 72
- Zhang, X. et al., Int.J Cancer **137** (2015b): 2803-2814
- Zhang, X. et al., Tumour.Biol **36** (2015c): 5979-5985
- Zhang, X. et al., PLoS.One. **8** (2013): e72458

- Zhang, Y. et al., *Cancer Metastasis Rev* **34** (2015d): 249-264
- Zhang, Z. Z. et al., *Mol.Cancer Ther.* **14** (2015e): 1162-1170
- Zhao, D. et al., *J Neurooncol.* **118** (2014a): 39-47
- Zhao, G. et al., *Biochem.Biophys.Res Commun.* **408** (2011): 154-159
- Zhao, H. et al., *Gene* **548** (2014b): 234-243
- Zhao, L. J. et al., *Chin Med.J (Engl.)* **126** (2013): 4260-4264
- Zheng, Q. et al., *Tumour.Biol* **35** (2014): 6255-6264
- Zheng, R. et al., *Int.Immunopharmacol.* **29** (2015): 919-925
- Zhi, H. et al., *J Pathol.* **217** (2009): 389-397
- Zhou, Y. F. et al., *World J Gastroenterol.* **20** (2014): 13172-13177
- Zhu, H. et al., *Cancer Lett.* **245** (2007a): 303-314
- Zhu, L. et al., *J Dermatol.Sci.* **72** (2013a): 311-319
- Zhu, S. et al., *J Biol Chem* **282** (2007b): 14328-14336
- Zhu, Y. et al., *Prostate* **73** (2013b): 1614-1622
- Zhu, Y. P. et al., *Oncotarget.* **6** (2015): 14488-14496

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Muối được dụng của peptit có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 9.
2. Muối được dụng theo điểm 1, trong đó muối này là muối clorua hoặc trifloaxetat.
3. Kháng thể được phân lập, cụ thể là kháng thể hòa tan hoặc liên kết màng, hoặc mảnh của nó, trong đó kháng thể này nhận biết đặc hiệu peptit có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 9, hoặc muối được dụng của nó, hoặc peptit có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 9 hoặc muối được dụng của nó, khi được gắn kết với phân tử của phức hợp tương thích mô chính (MHC).
4. Kháng thể hoặc mảnh của nó theo điểm 3, trong đó kháng thể này là kháng thể đơn dòng, kháng thể đặc hiệu kép và/hoặc kháng thể thể khảm, hoặc mảnh của nó.
5. Thụ thể tế bào T (T-cell receptor: TCR) được phân lập, hoặc mảnh của nó, có khả năng phản ứng với phối tử HLA, trong đó phối tử này là peptit có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 9.
6. Thụ thể tế bào T hoặc mảnh của nó theo điểm 5, trong đó thụ thể này là thụ thể tái tổ hợp, hòa tan hoặc liên kết màng.
7. Thụ thể tế bào T hoặc mảnh của nó theo điểm 5 hoặc 6, trong đó thụ thể tế bào T này hoặc mảnh của nó được tạo ra dưới dạng phân tử hòa tan, và mang chức năng hiệu ứng khác.
8. Thụ thể tế bào T hoặc mảnh của nó theo điểm 7, trong đó chức năng hiệu ứng khác là miễn kích thích miễn dịch hoặc độc tố.
9. Axit nucleic mã hóa peptit có tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 9, kháng thể hoặc mảnh của nó được xác định theo điểm 3 hoặc 4, hoặc thụ thể TCR hoặc mảnh của nó được xác định theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 6 đến 8, được liên kết với trình tự gen khởi đầu khác loại.
10. Vector biểu hiện chứa axit nucleic theo điểm 9.
11. Tế bào chủ tái tổ hợp chứa peptit có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 9, kháng thể hoặc mảnh của nó được xác định theo điểm 3 hoặc 4, hoặc thụ thể TCR hoặc mảnh của nó được xác định theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 6 đến 8, axit nucleic theo điểm 9 hoặc vector biểu hiện theo điểm 10.

12. Tế bào chủ tái tổ hợp theo điểm 11, trong đó tế bào chủ này được chọn từ tế bào trình diện kháng nguyên, tế bào T hoặc tế bào NK.

13. Tế bào chủ tái tổ hợp theo điểm 12, trong đó tế bào trình diện kháng nguyên là tế bào đuôi gai.

14. Phương pháp tạo ra peptit có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 9, trong đó phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ tái tổ hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 11 đến 13 chứa peptit có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 9, hoặc biểu hiện axit nucleic theo điểm 9 hoặc chứa vector biểu hiện theo điểm 10, và phân lập peptit ra khỏi tế bào chủ hoặc môi trường nuôi cấy của nó.

15. Phương pháp tạo ra kháng thể hoặc mảnh của nó theo điểm 3 hoặc 4, trong đó phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ tái tổ hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 11 đến 13 chứa peptit có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 9, hoặc biểu hiện axit nucleic theo điểm 9 hoặc chứa vector biểu hiện theo điểm 10, và phân lập kháng thể hoặc mảnh của nó ra khỏi tế bào chủ hoặc môi trường nuôi cấy của nó.

16. Phương pháp tạo ra hoặc thụ thể TCR hoặc mảnh của nó theo điểm 6 hoặc 7, trong đó phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ tái tổ hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 11 đến 13 chứa peptit có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 9, hoặc biểu hiện axit nucleic theo điểm 9 hoặc chứa vector biểu hiện theo điểm 10, và phân lập thụ thể TCR hoặc mảnh của nó ra khỏi tế bào chủ hoặc môi trường nuôi cấy của nó.

17. Phương pháp tạo ra các tế bào lympho 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 bất chước tế bào trình diện kháng nguyên trong khoảng thời gian đủ để hoạt hóa các tế bào T này theo cách đặc hiệu kháng nguyên, trong đó kháng nguyên này là peptit có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 9.

18. Tế bào lympho T hoạt hóa được tạo ra bằng phương pháp theo điểm 17, trong đó tế bào này nhận biết chọn lọc tế bào chứa polypeptit có trình tự axit amin được nêu trong điểm 1 hoặc 2.

Fig.1A

Peptit: STYGGGLSV (A*02)
SEQ ID NO: 1

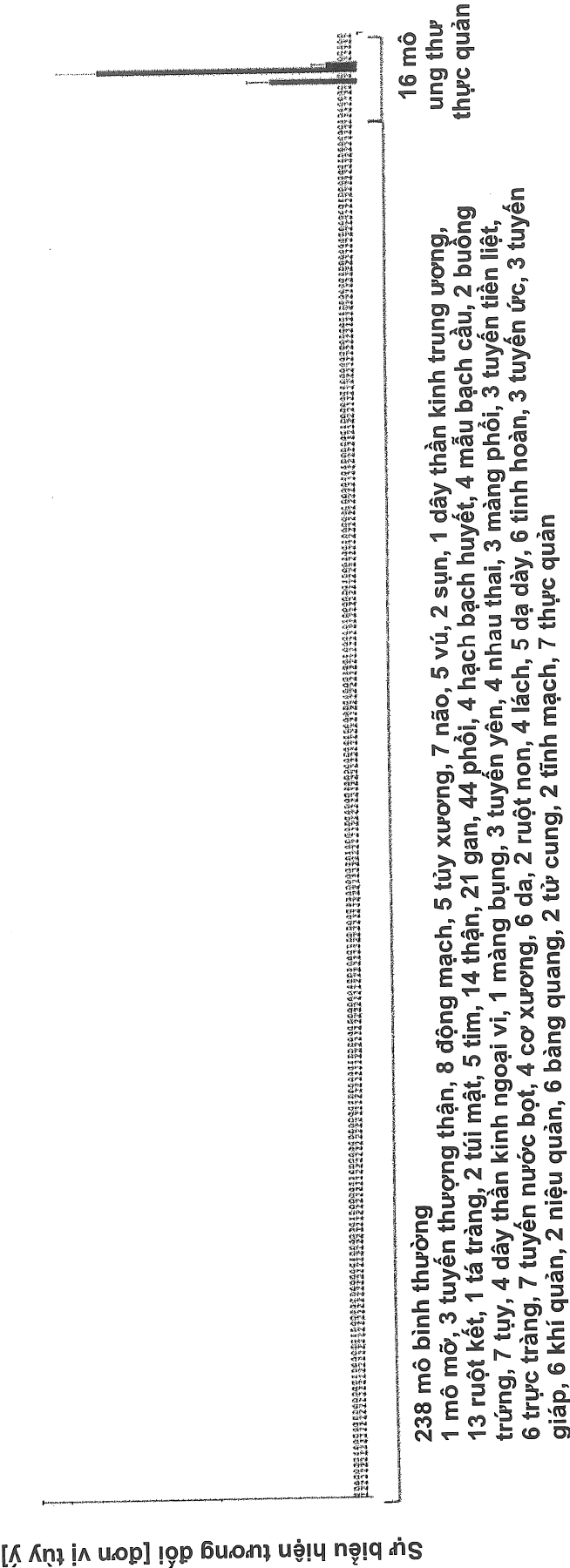


Fig.1B

Peptit: SIFEGLLSGV (A*02)

SEQ ID NO: 7

Sự biểu hiện tương đối [đơn vị tùy ý]

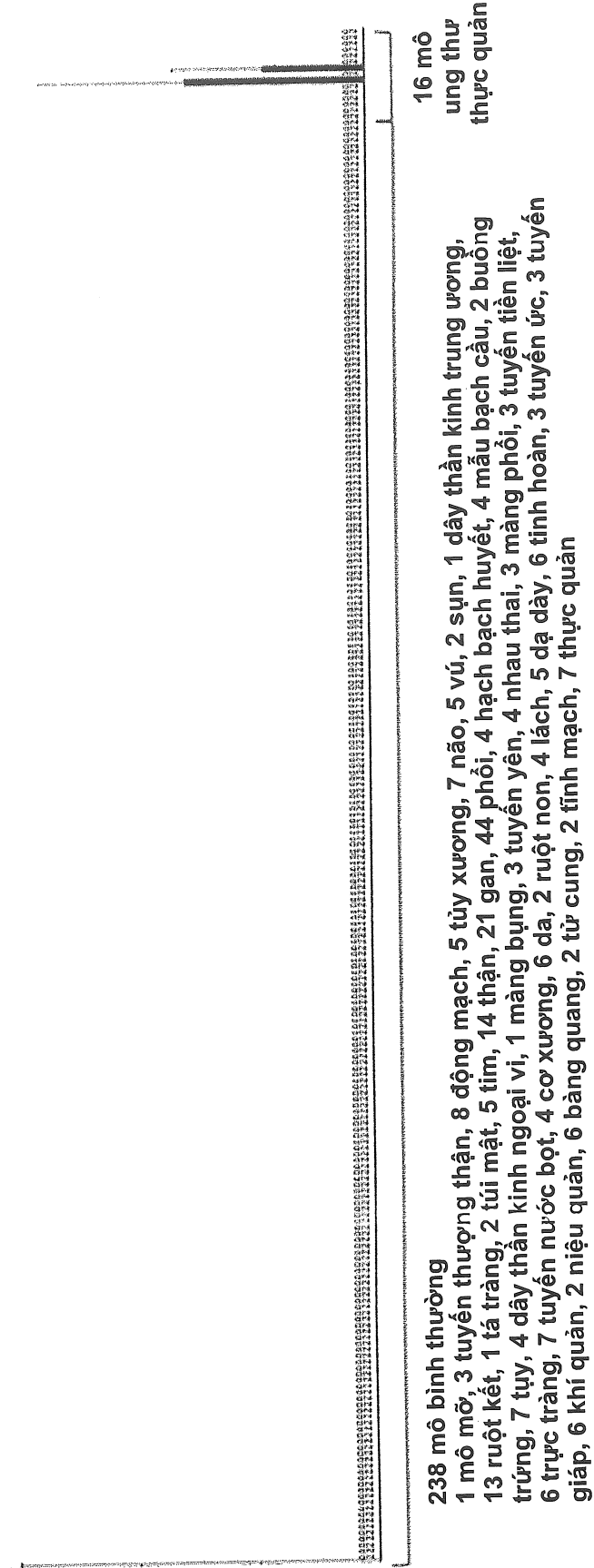


Fig.1C

Peptit: SLVSEQLLEPA (A*02)
SEQ ID NO: 34

Sự biểu hiện tương đối [đơn vị tùy ý]

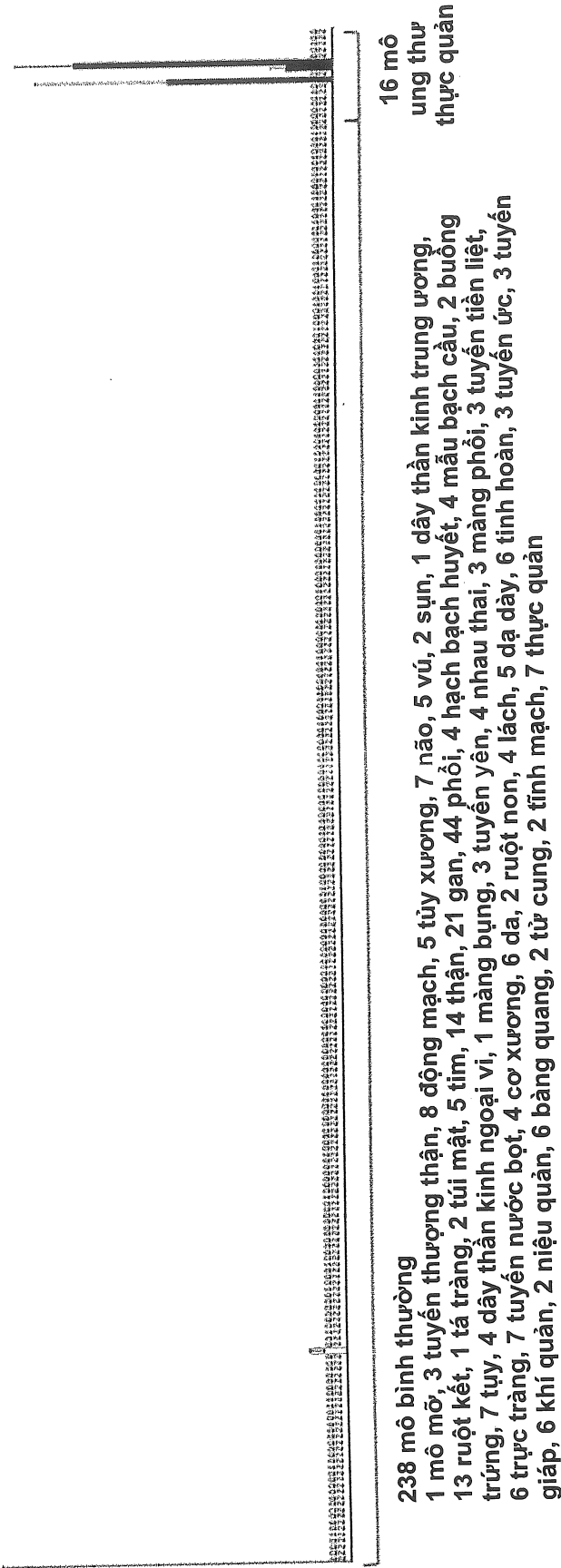
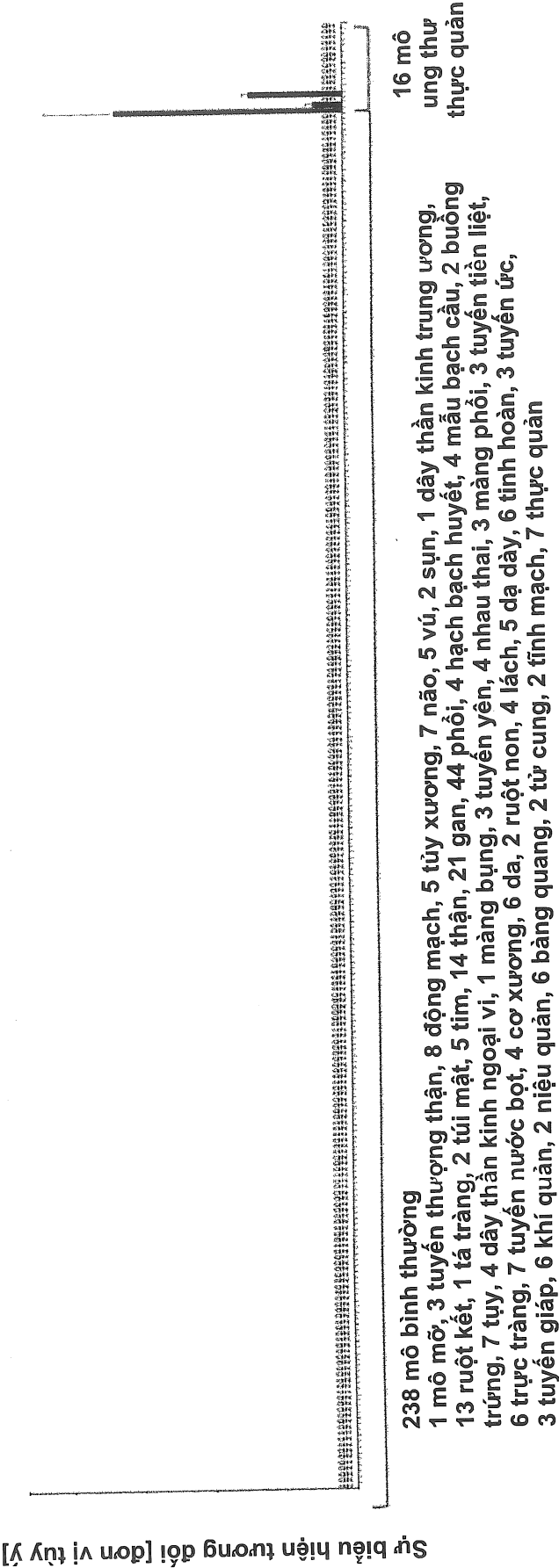


Fig.1D

Peptit: YQPFSHYQAL (A*02)
SEQ ID NO: 37



Peptit: ALQEALENA (A*02)
SEQ ID NO: 80

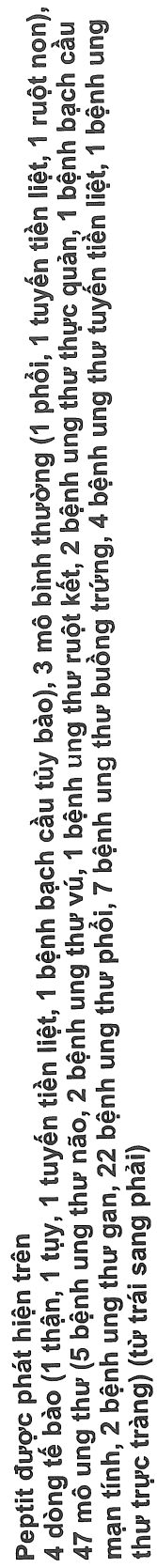
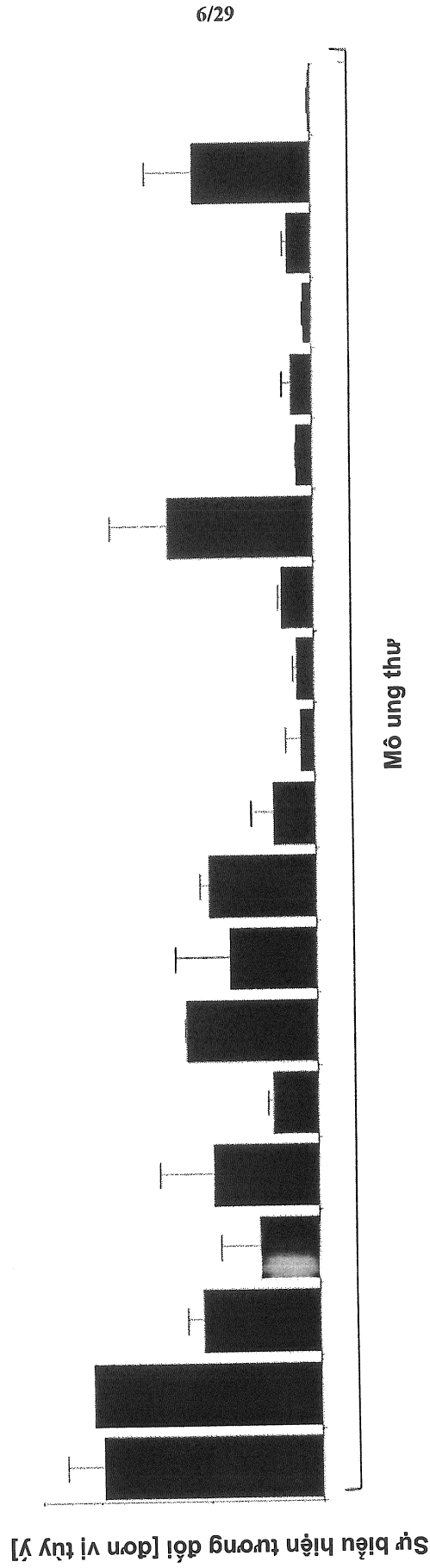


Fig.1F

Peptit: SLYNLGGSKRISI (A*02)
SEQ ID NO: 2



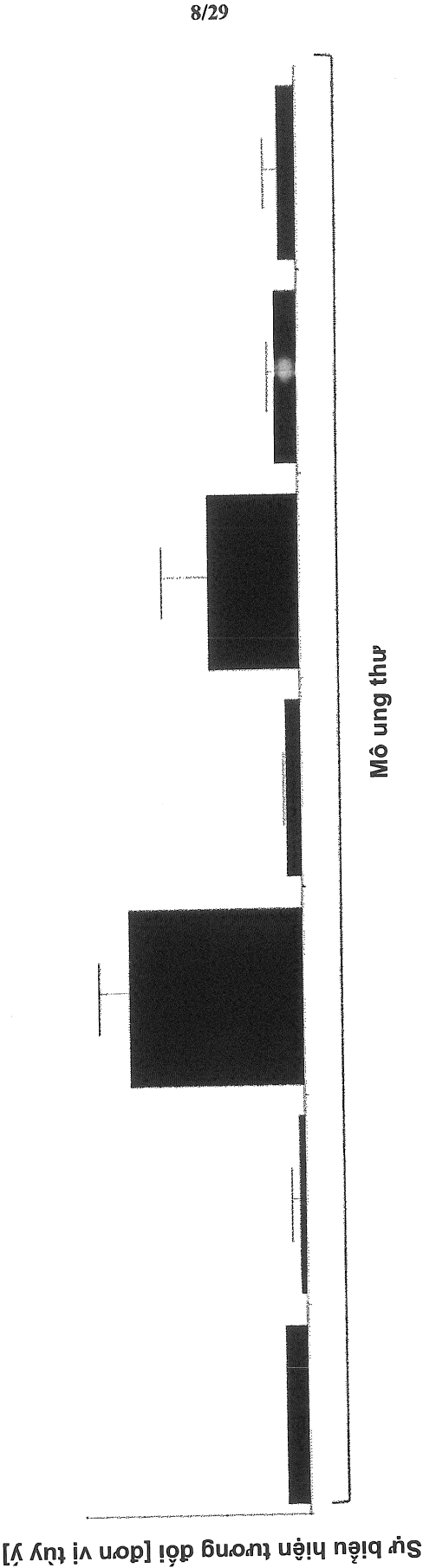
Peptit được phát hiện trên
20 mô ung thư (9 bệnh ung thư vùng đầu và cổ, 2 bệnh ung thư thực quản, 1 bệnh ung thư thực quản và dạ dày, 7 bệnh ung thư phổi, 1 bệnh ung thư bàng quang) (từ trái sang phải)

Peptit: TASAITPSV (A*02)
SEQ ID NO: 3



Fig.1H

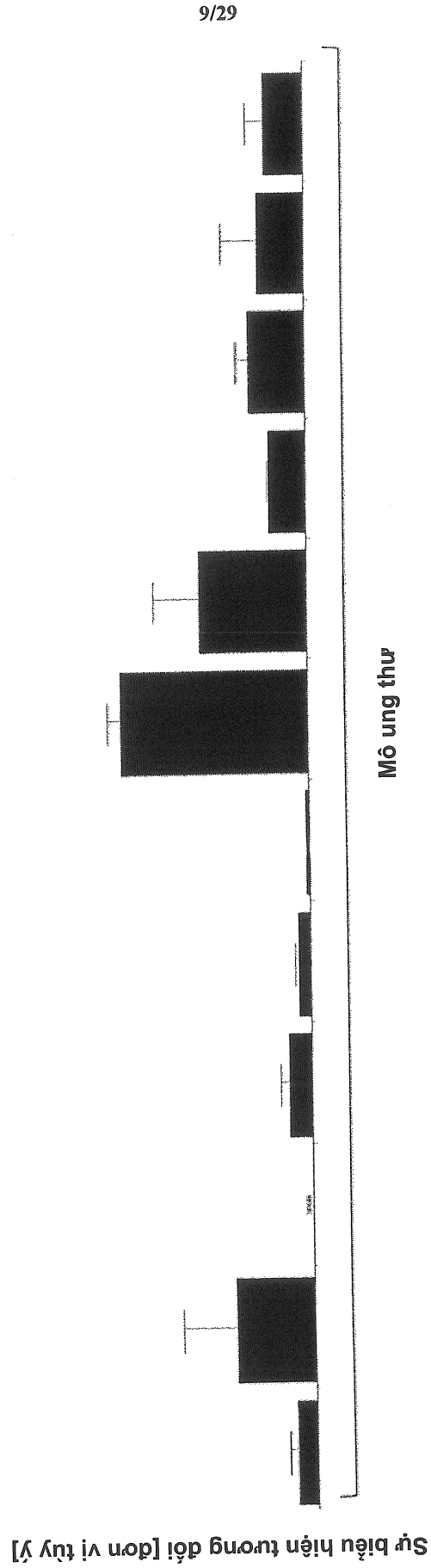
Peptit: SLDENSDQQV (A*02)
SEQ ID NO: 10



Peptit được phát hiện trên
7 mô ung thư (3 bệnh ung thư vùng đầu và cổ, 2 bệnh ung thư thực quản, 1 bệnh ung thư phổi, 1 bệnh ung thư bàng quang)
(từ trái sang phải)

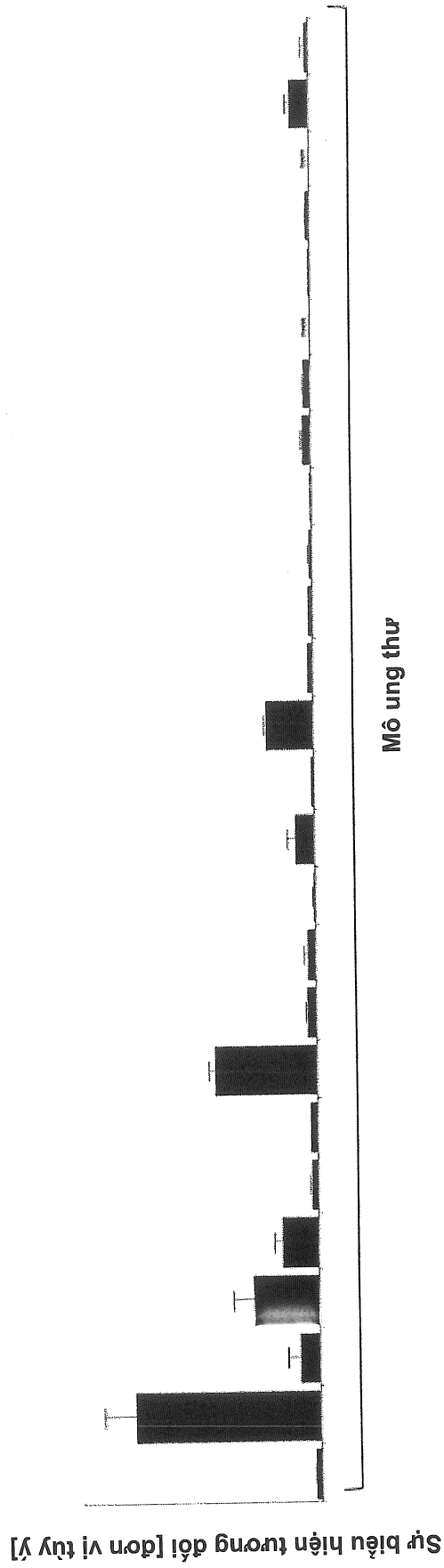
Fig.1I

Peptit: ALWLPTDSATV (A*02)
SEQ ID NO: 11



Peptit được phát hiện trên
12 mô ung thư (2 bệnh ung thư thực quản, 1 bệnh ung thư túi mật, 8 bệnh ung thư phổi, 1 bệnh ung thư da) (từ trái sang phải)

Peptit: SLSPVILGV (A*02)
SEQ ID NO: 13

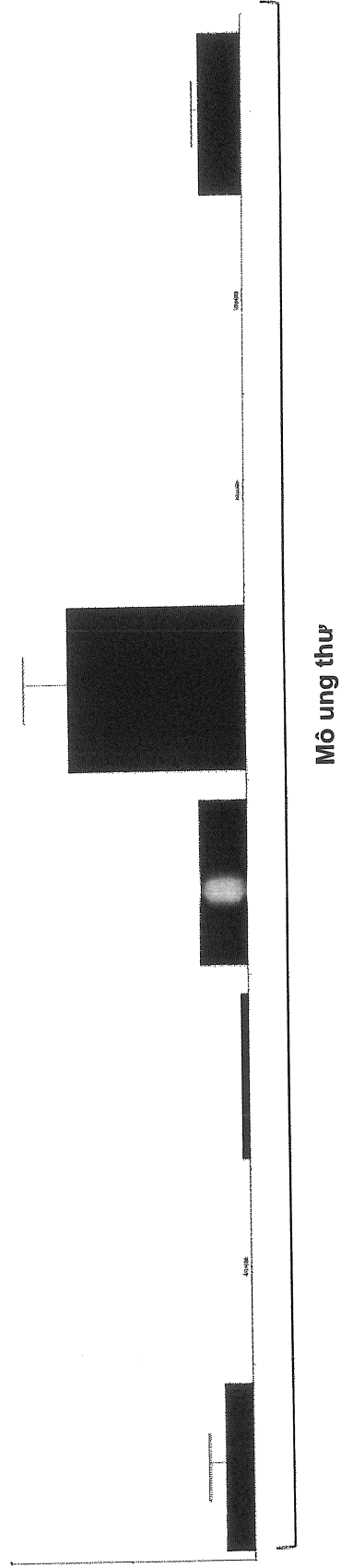


Peptit được phát hiện trên 26 mô ung thư (8 bệnh ung thư vùng đầu và cổ, 3 bệnh ung thư thực quản, 10 bệnh ung thư phổi, 3 bệnh ung thư da, 1 bệnh ung thư bàng quang, 1 bệnh ung thư tử cung) (từ trái sang phải)

Fig.1K

Peptit: LLANGVYAA (A*02)
SEQ ID NO: 15

Sự biểu hiện tương đối [đơn vị tùy ý]

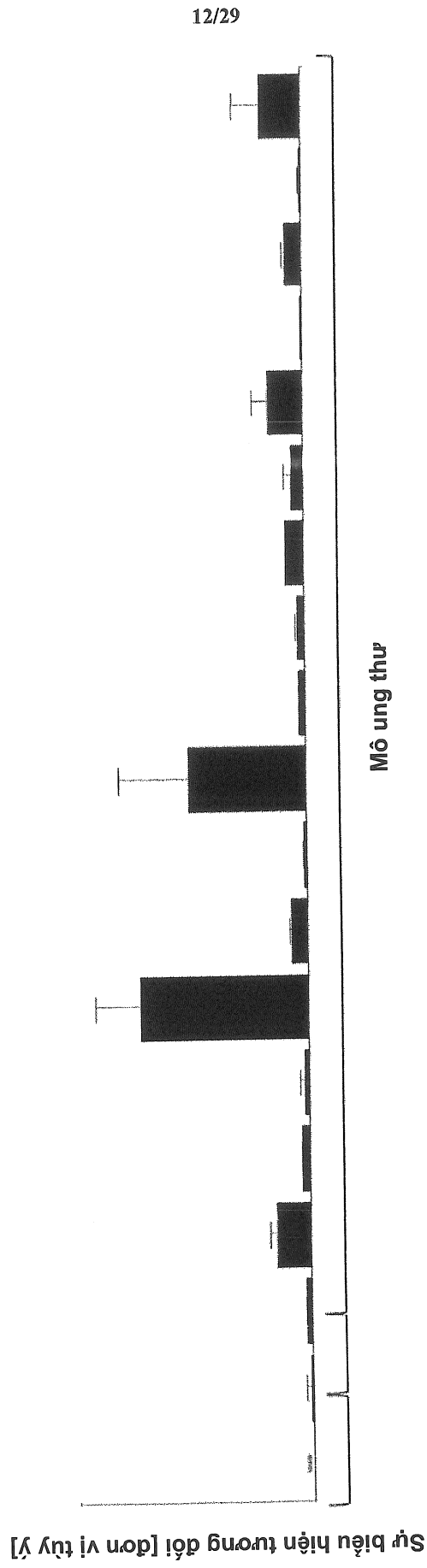


11/29

Peptit được phát hiện trên
8 mô ung thư (2 bệnh ung thư thực quản, 1 bệnh ung thư túi mật, 1 bệnh ung thư gan, 1 bệnh ung thư phổi, 1 bệnh ung thư
dạ dày, 1 bệnh ung thư bàng quang, 1 bệnh ung thư tử cung) (từ trái sang phải)

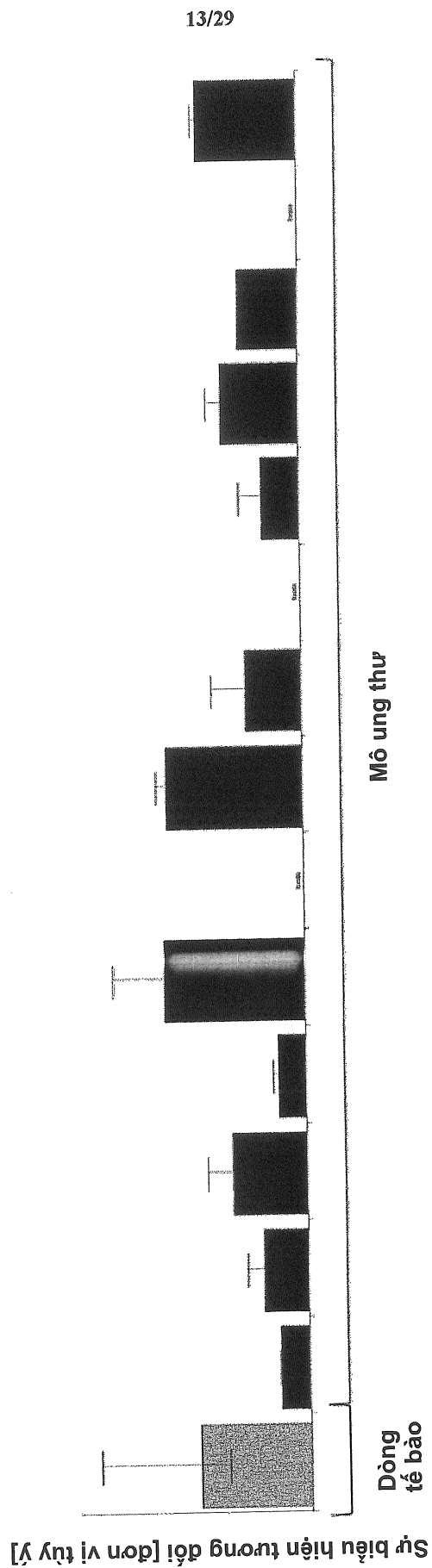
Fig.1L

Peptit: MISRTPEV (A*02)
SEQ ID NO: 17



Peptit được phát hiện trên
19 mô ung thư (2 bệnh ung thư thực quản, 2 bệnh ung thư thận, 2 bệnh ung thư gan, 9 bệnh ung thư phổi, 1 bệnh ung thư hạch bạch huyết, 1 bệnh ung thư tinh hoàn, 2 bệnh ung thư bàng quang) (từ trái sang phải)

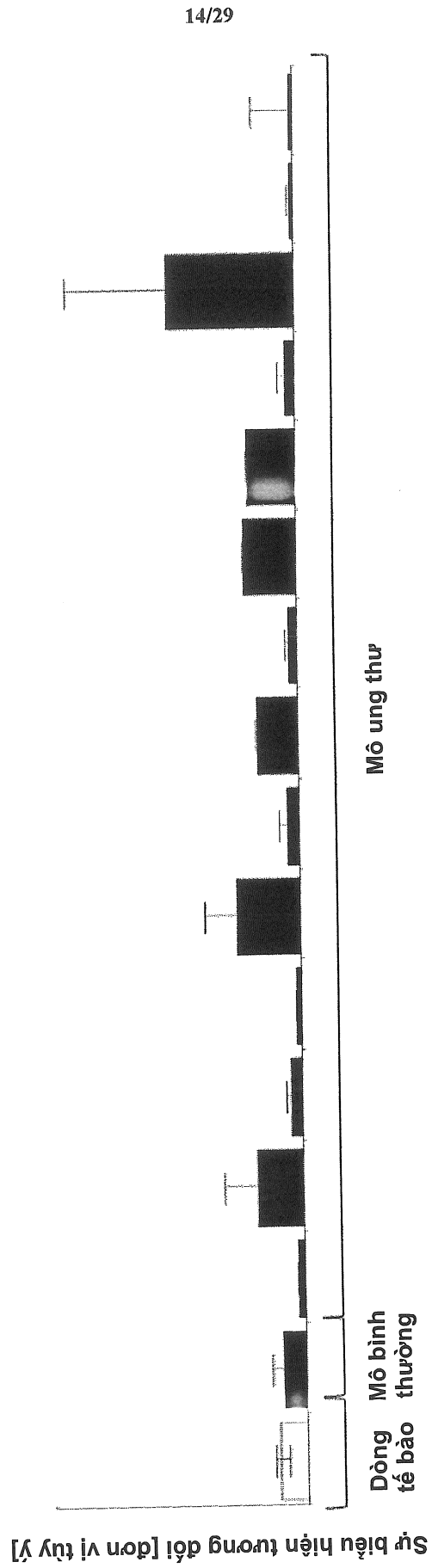
Peptit: SLNGNQVTV (A*02)
SEQ ID NO: 30



Peptit được phát hiện trên 1 dòng tế bào (1 tùy), 14 mô ung thư vùng đầu và cổ, 1 bệnh ung thư ống mật chủ, 1 bệnh ung thư não, 1 bệnh ung thư vú, 1 bệnh ung thư thực quản, 1 bệnh ung thư thận, 1 bệnh ung thư phổi, 2 bệnh ung thư da, 3 bệnh ung thư bàng quang, 2 bệnh ung thư tử cung) (từ trái sang phải)

Fig.1N

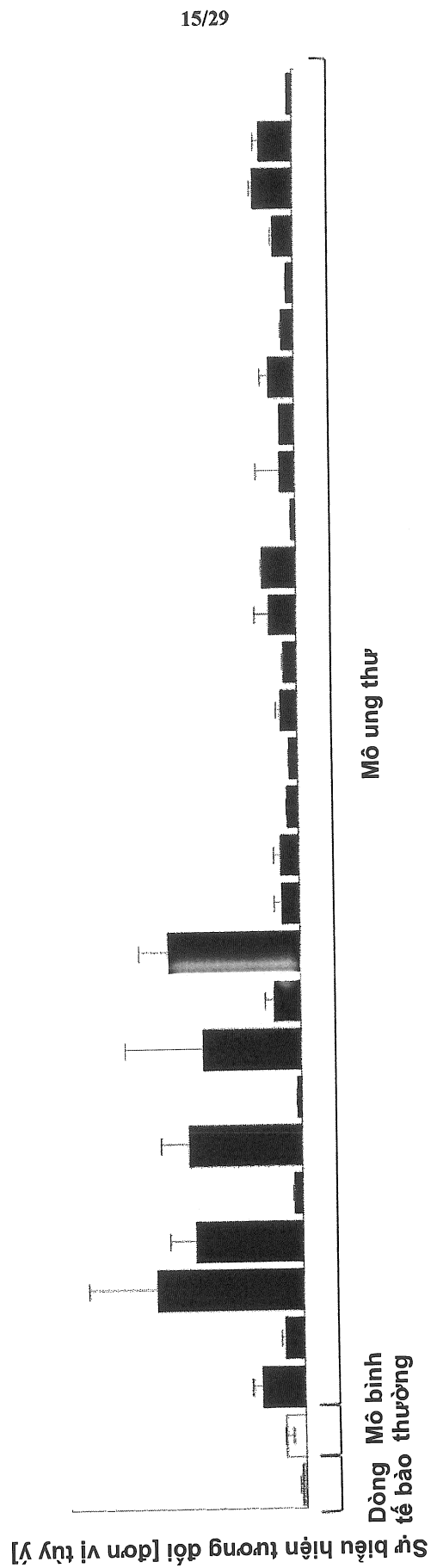
Peptit: YMLDIFHEV (A*02)
SEQ ID NO: 32



Peptit được phát hiện trên
1 mô bình thường (1 tử cung); 15 mô ung thư (1 bệnh ung thư não, 2 bệnh ung thư thực quản, 1 bệnh ung thư túi mật, 3 bệnh ung
thư vùng đầu và cổ, 4 bệnh ung thư phổi, 4 bệnh ung thư bàng quang) (từ trái sang phải)

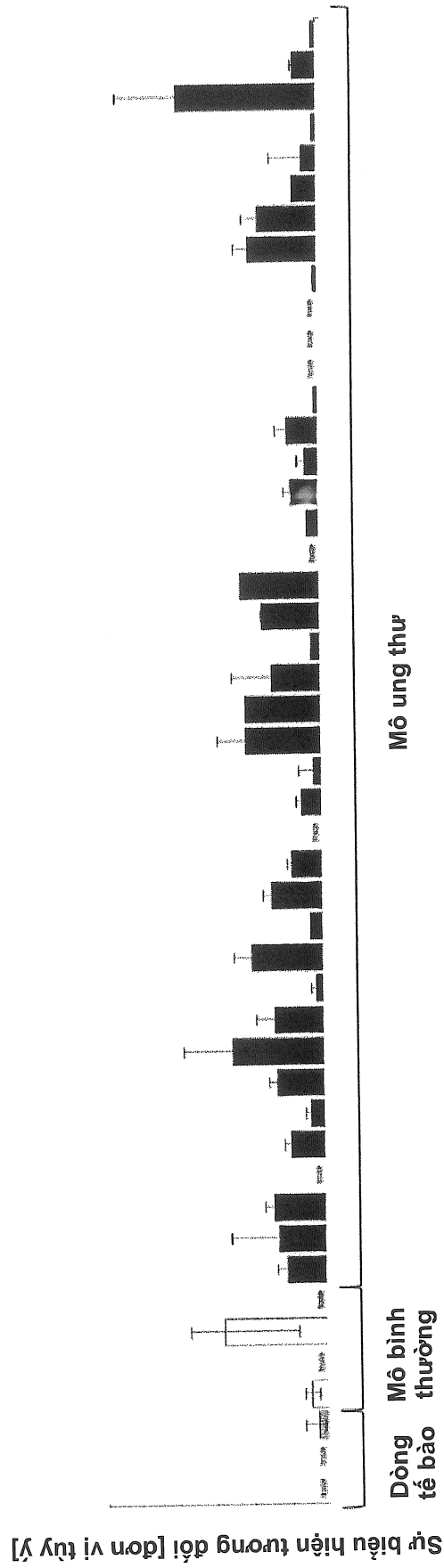
Fig.10

Peptit: SLVSEQLLEPA (A*02)
SEQ ID NO: 34



Peptit được phát hiện trên
1 dòng tế bào (1 tùy), 1 mô bình thường (1 ruột kết), 28 mô ung thư (6 bệnh ung thư vùng đầu và cổ, 1 bệnh ung thư vú, 1 bệnh ung thư manh tràng, 3 bệnh ung thư ruột kết, 1 bệnh ung thư kết-trực tràng, 3 bệnh ung thư thực quản, 6 bệnh ung thư phổi, 1 bệnh ung thư buồng trứng, 3 bệnh ung thư trực tràng, 3 bệnh ung thư bàng quang) (từ trái sang phải)

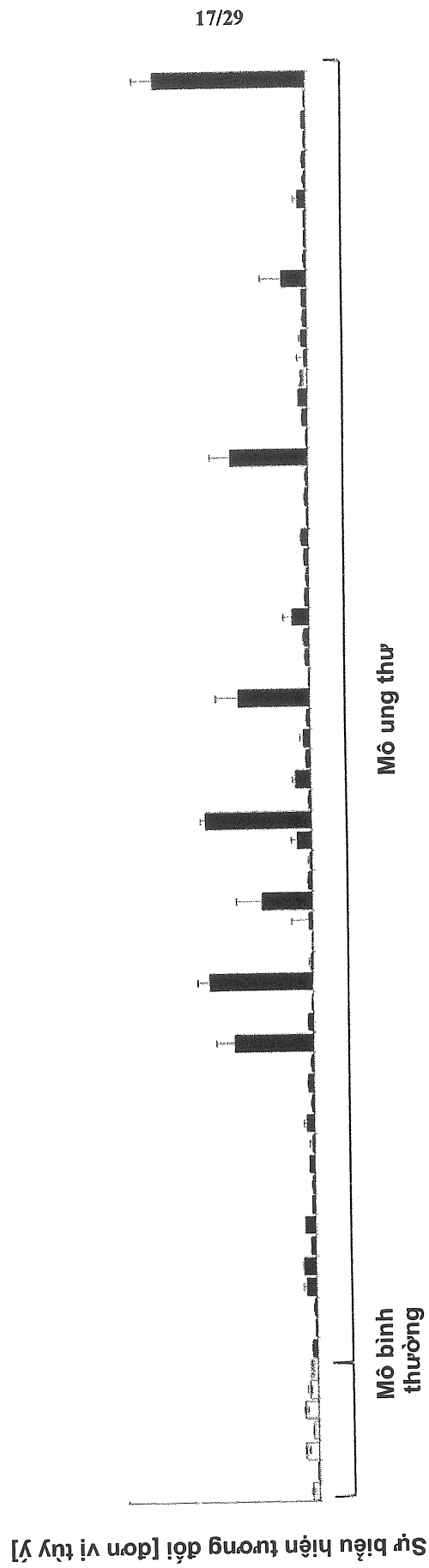
Peptit: GLAFSLYQA (A*02)
SEQ ID NO: 40



Peptit được phát hiện trên
3 dòng tế bào (1 thận, 2 tụy), 4 mô bình thường (1 tuyến thượng thận, 1 phổi, 2 nhau thai), 41 mô ung thư (3 bệnh ung thư vùng đầu và cổ, 3 bệnh ung thư vú, 2 bệnh ung thư ruột kết, 2 bệnh ung thư thực quản, 1 bệnh ung thư túi mật, 1 bệnh ung thư gan, 15 bệnh ung thư phổi, 1 bệnh ung thư buồng trứng, 1 bệnh ung thư tụy, 3 bệnh ung thư trực tràng, 2 bệnh ung thư da, 1 bệnh ung thư dạ dày, 4 bệnh ung thư bàng quang, 2 bệnh ung thư tử cung) (từ trái sang phải)

Fig.1Q

Peptit: ALVEVTEHV (A*02)
SEQ ID NO: 56



Peptit được phát hiện trên
7 mô bình thường (5 phổi, 1 tuyến giáp, 1 khí quản), 64 mô ung thư (6 bệnh ung thư vùng đầu và cổ, 12 bệnh ung thư não, 4 bệnh ung thư vú, 3 bệnh ung thư thực quản, 1 bệnh ung thư túi mật, 5 bệnh ung thư thận, 21 bệnh ung thư phổi, 1 bệnh ung thư hạch bạch huyết, 7 bệnh ung thư buồng trứng, 1 bệnh ung thư tụy, 1 bệnh ung thư da, 2 bệnh ung thư từ cùng) (từ trái sang phải)

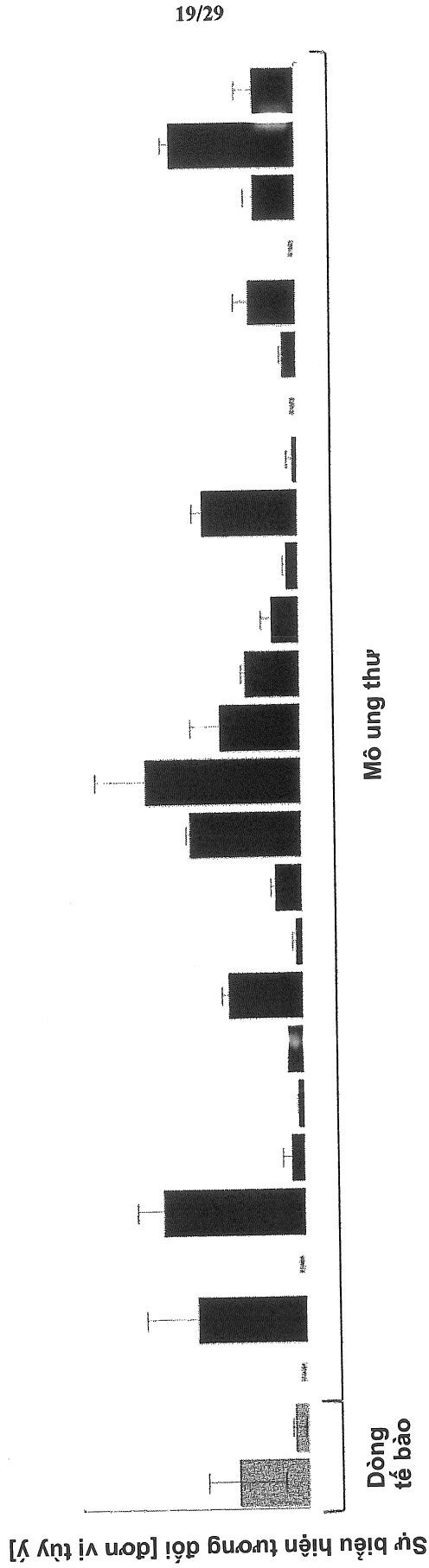
Peptit: GLAPNTPGKA (A*02)
SEQ ID NO: 57



Fig.1S

Peptit: LILESIPVV (A*02)

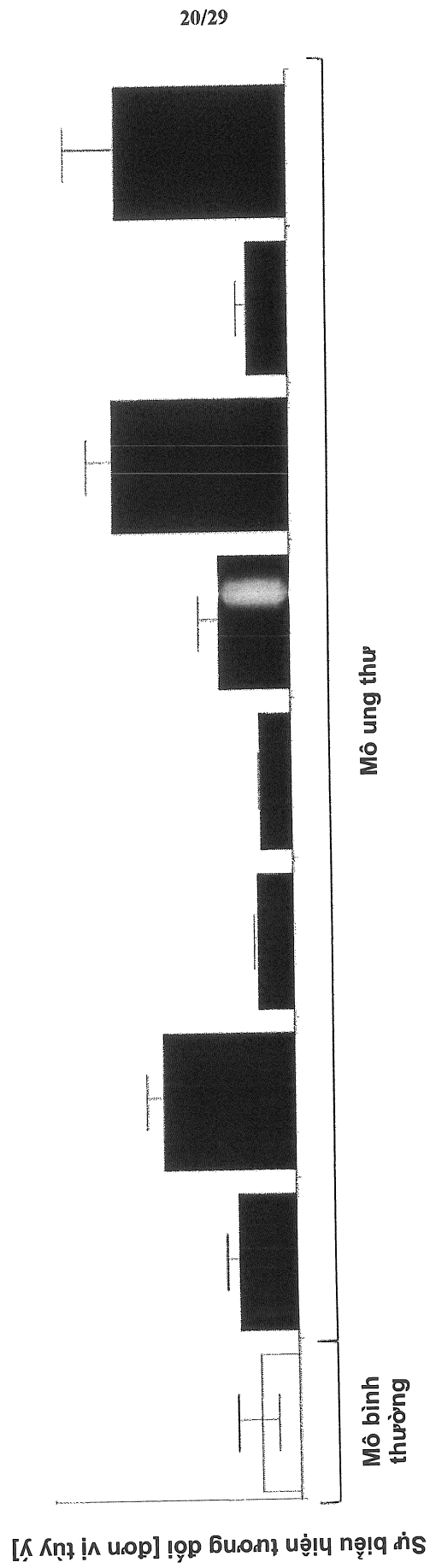
SEQ ID NO: 58



Peptit được phát hiện trên
 2 dòng tế bào (1 tế bào máu, 1 da), 25 mô ung thư (5 bệnh ung thư vùng đầu và cổ, 1 bệnh ung thư ruột kết, 2 bệnh ung thư thực quản, 1 bệnh ung thư dạng bạch cầu, 8 bệnh ung thư phổi, 2 bệnh ung thư hạch bạch huyết, 3 bệnh ung thư da, 2 bệnh ung thư bàng quang, 1 bệnh ung thư tử cung) (từ trái sang phải)

Fig.1T

Peptit: SLLDTLREV (A*02)
SEQ ID NO: 59



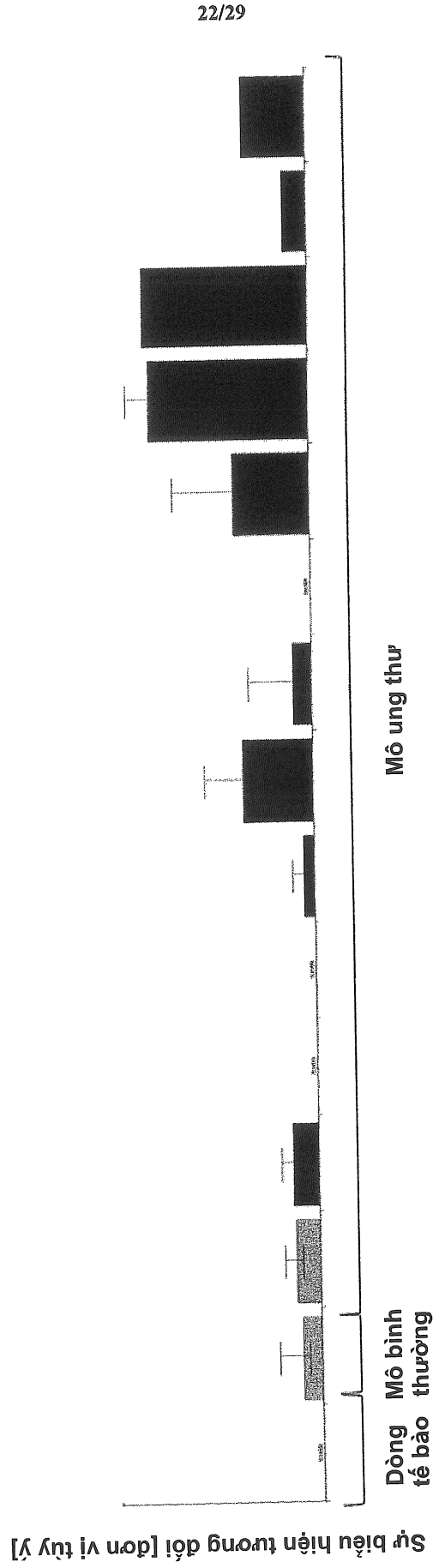
Peptit được phát hiện trên
1 mô bình thường (1 ruột non), 8 mô ung thư (1 bệnh ung thư vùng đầu và cổ, 2 bệnh ung thư thực quản, 4 bệnh ung thư phổi, 1 bệnh ung thư buồng trứng) (từ trái sang phải)

Peptit: VLVPYEPQV (A*02)
SEQ ID NO: 77



Fig.1V

Peptit: AVLPHVDQV (A*02)
SEQ ID NO: 81



Peptit được phát hiện trên
3 dòng tế bào (1 tế bào máu, 1 tủy), 12 mô ung thư (5 bệnh ung thư thực quản, 2 bệnh ung thư thực quản, 1 bệnh ung thư phổi,
3 bệnh ung thư hạch bạch huyết, 1 bệnh ung thư tử cung) (từ trái sang phải)

Fig.2A

Gen: PTHLH
Peptit: HLI AEIHTA
SEQ ID NO: 9

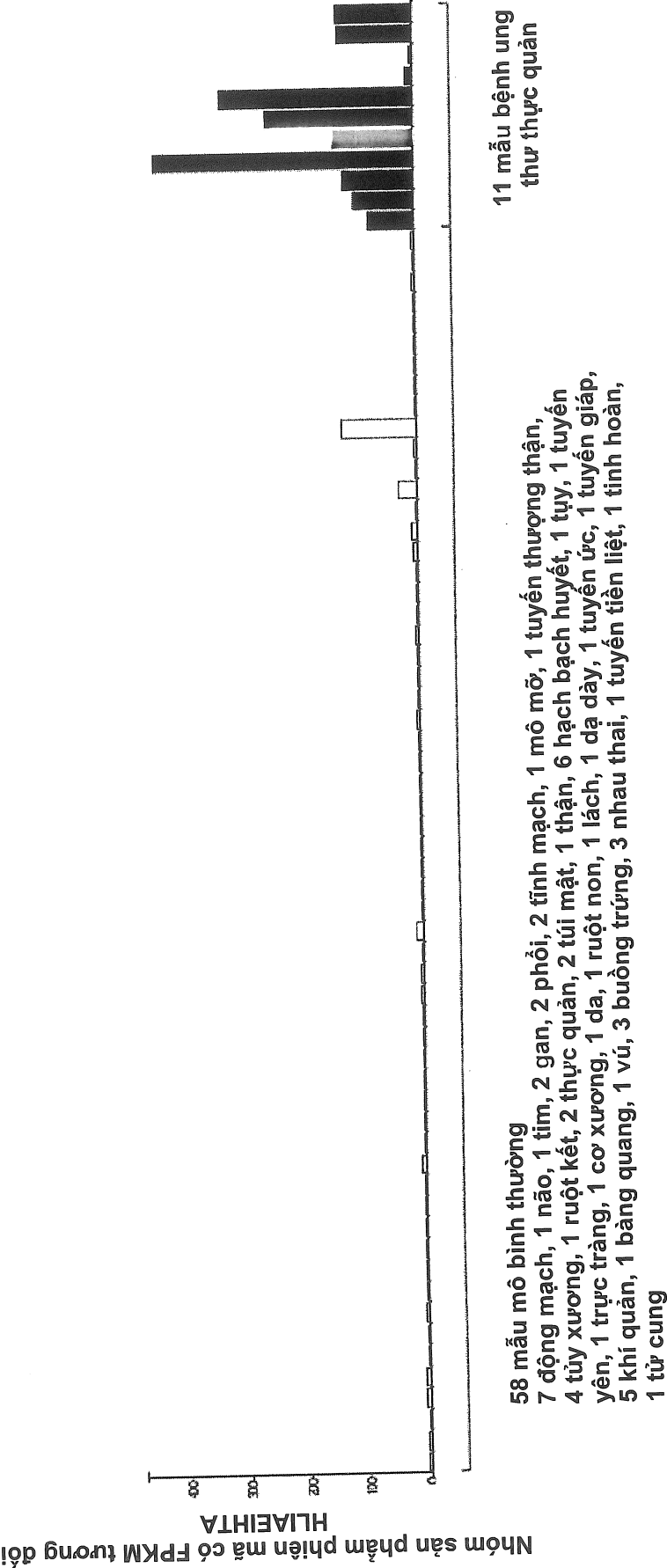


Fig.2B

Gen: KRT14
Peptit: GLLVGSEKVTM
SEQ ID NO: 69

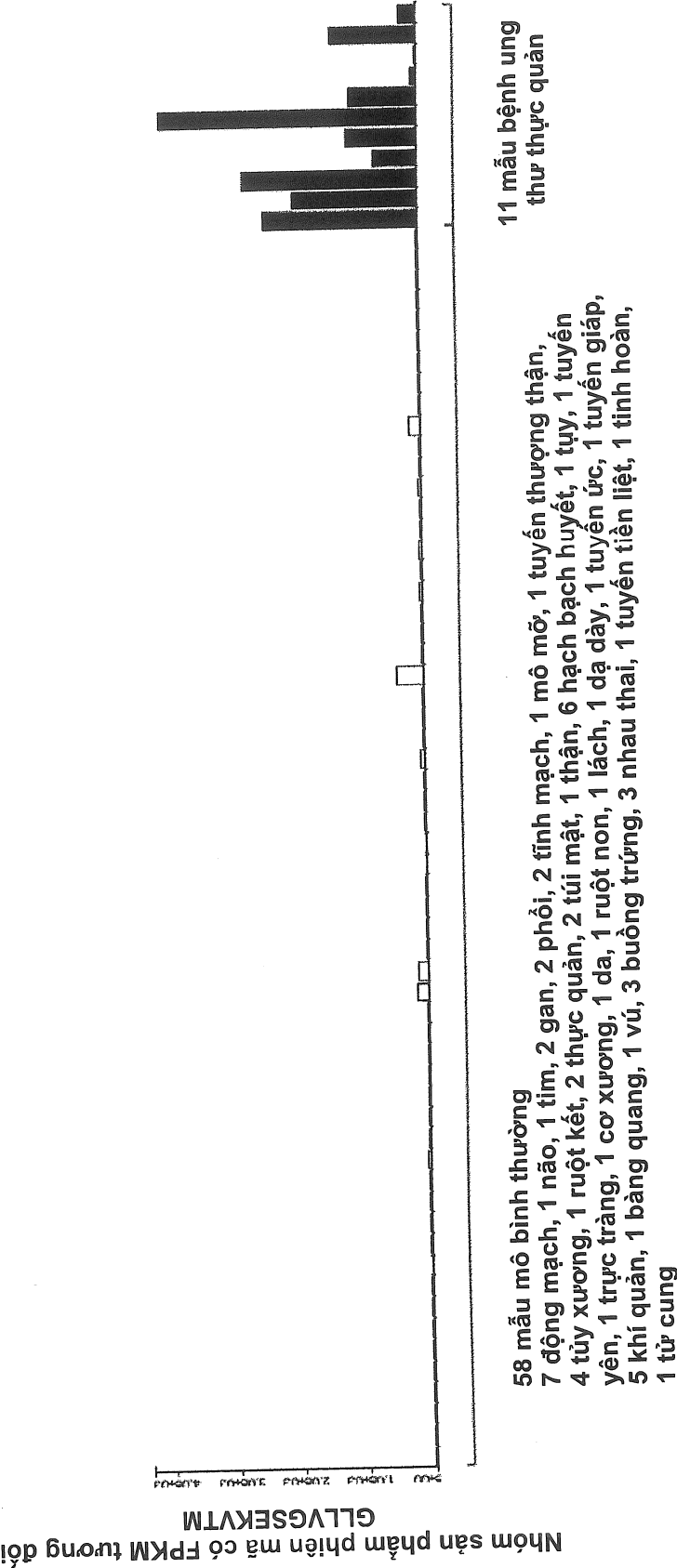


Fig.2C

Gen: FAM83A
Peptit: ALDGGSEAYWRV
SEQ ID NO: 8

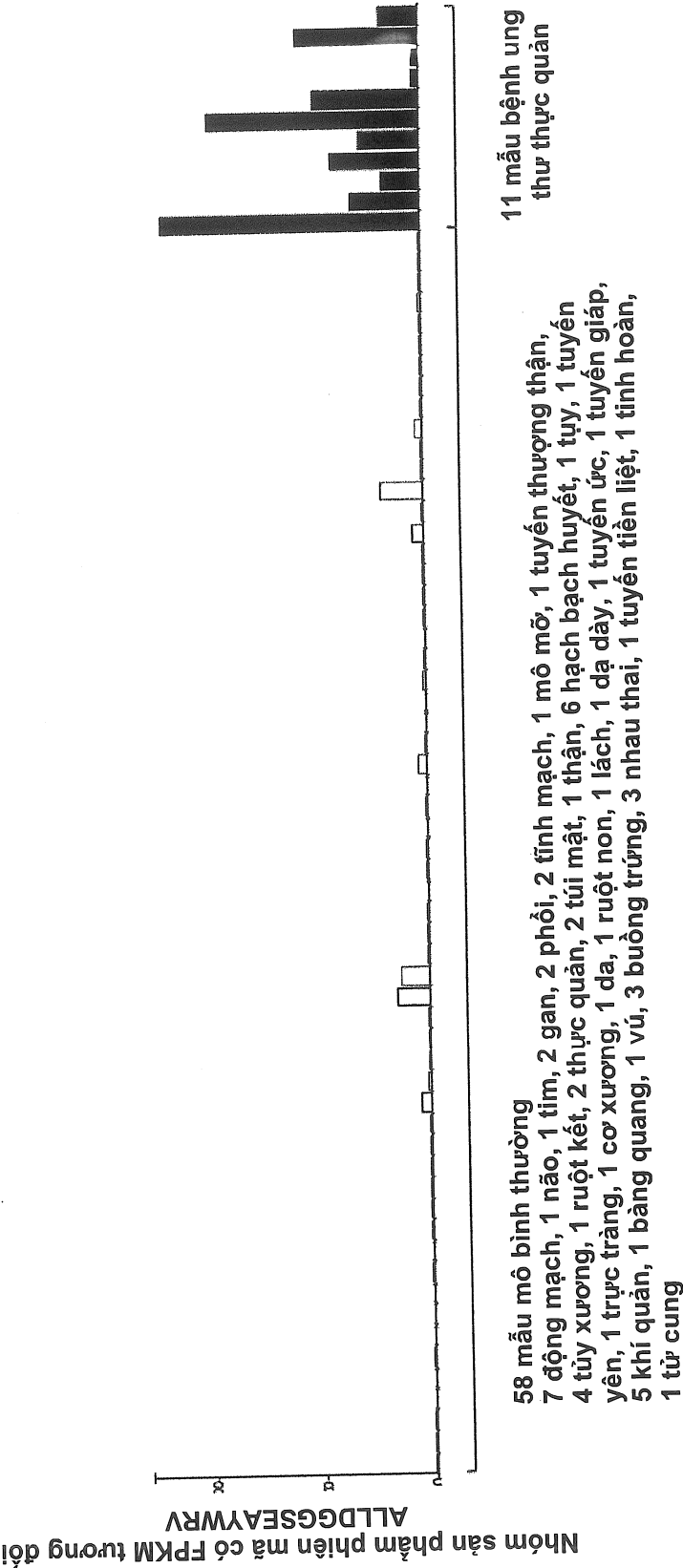
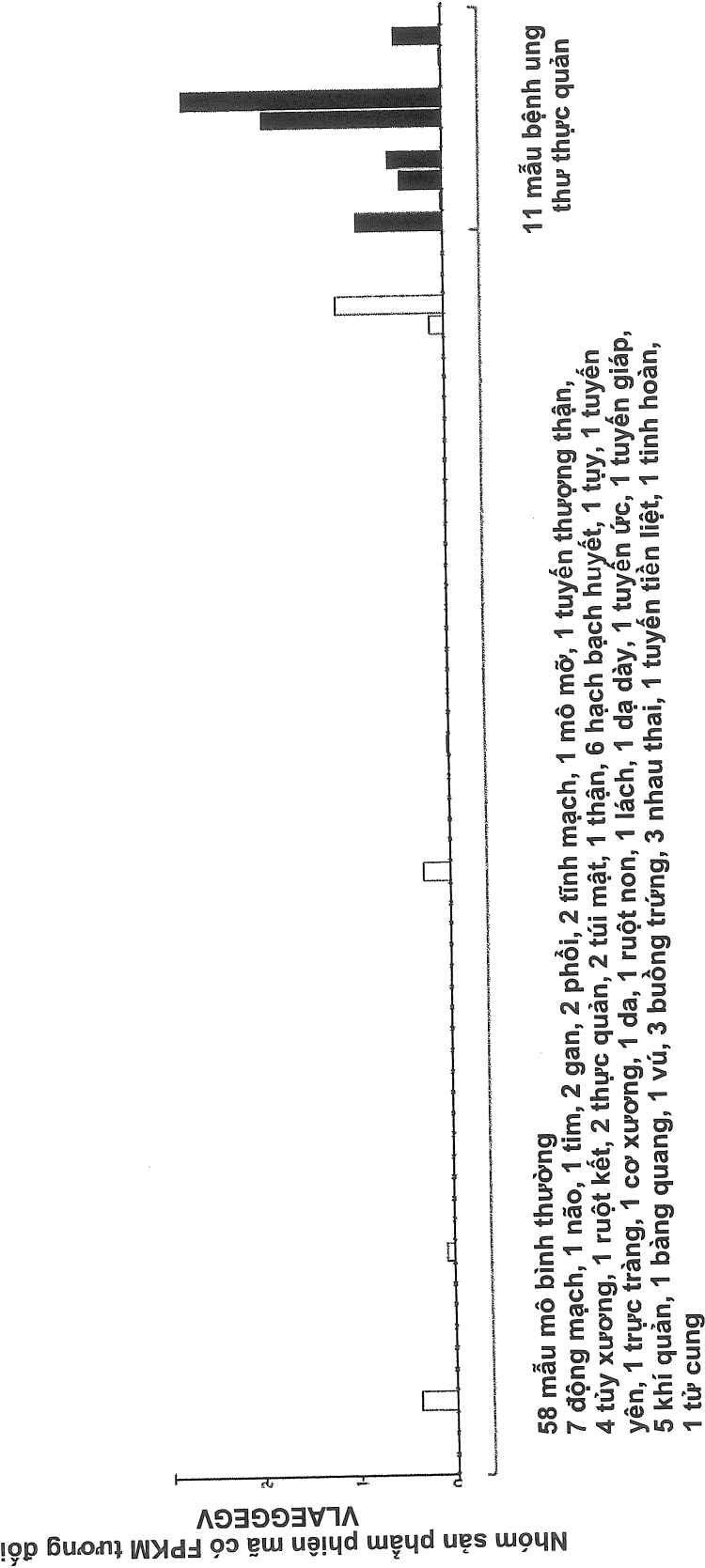


Fig.2D

Gen: PDPN
Peptit: VLAEGGEGV
SEQ ID NO: 16



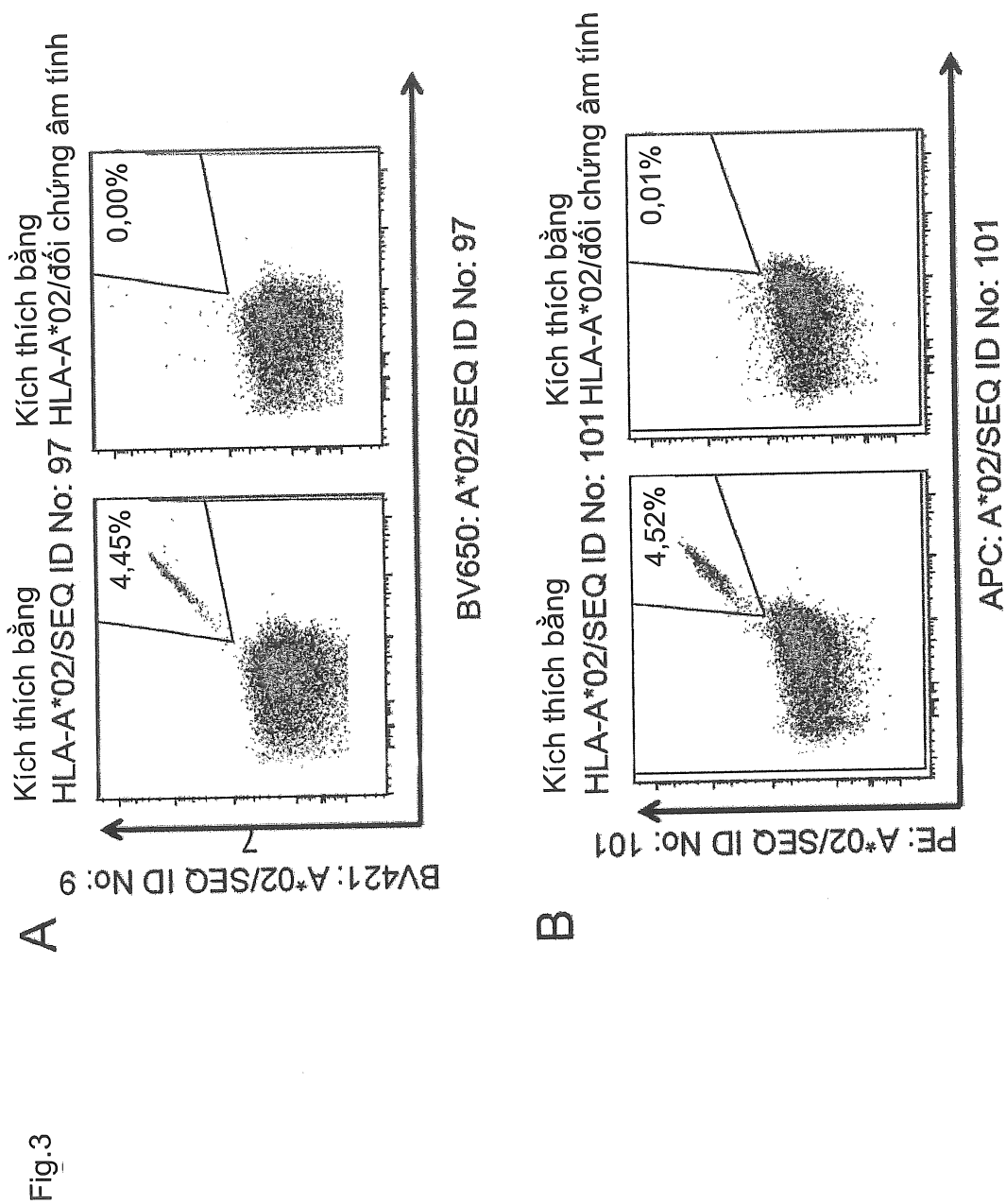
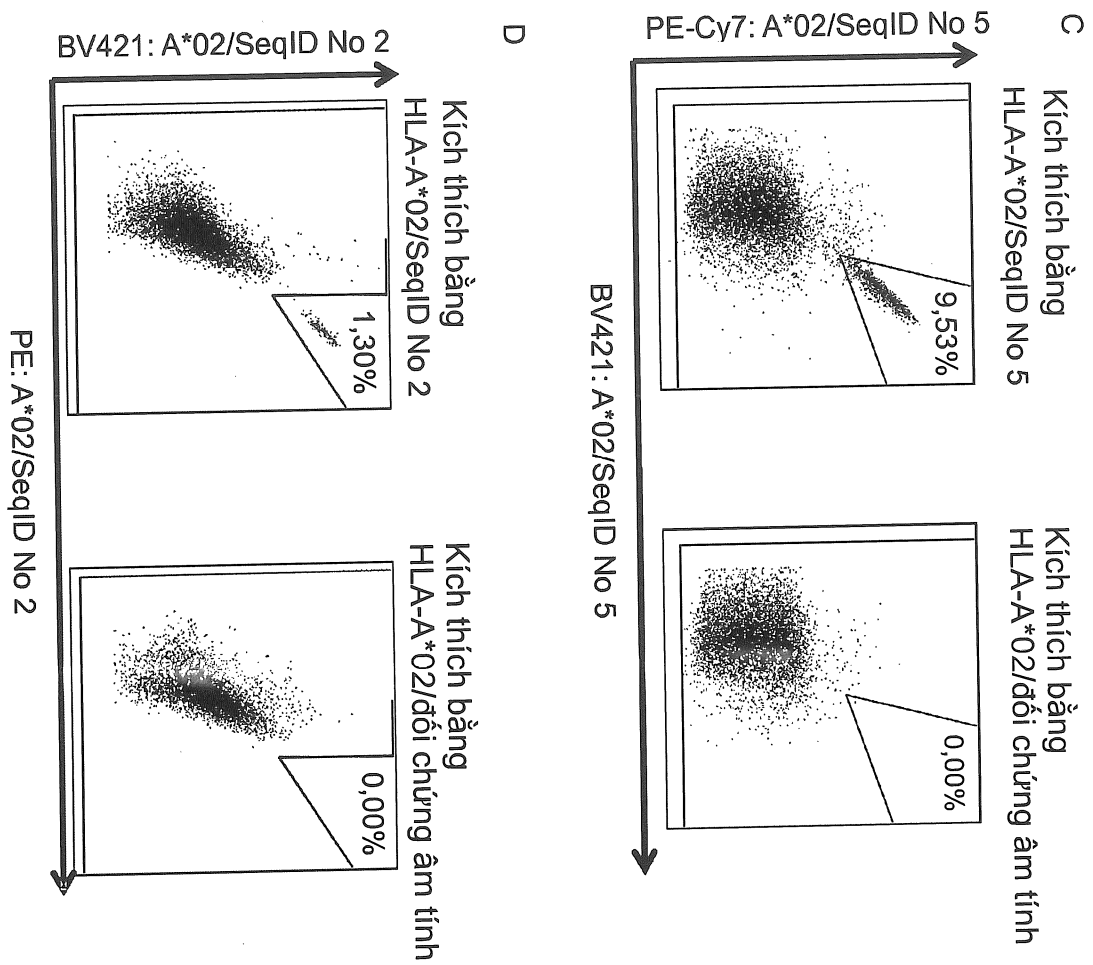


Fig.3 (tiếp theo)



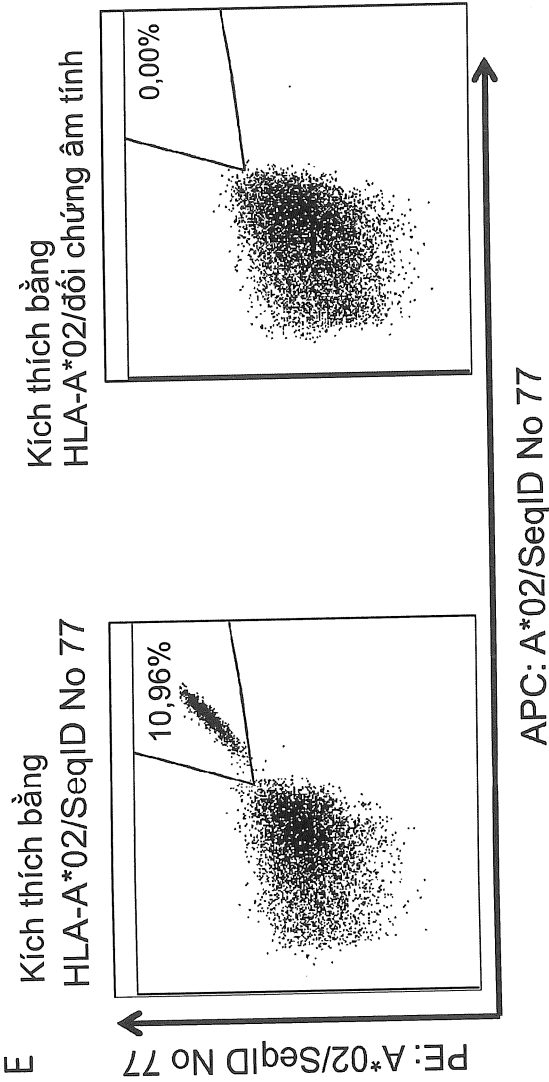


Fig.3 (tiếp theo)

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Immatics biotechnologies GmbH

<120> Muối được dùng của peptit trong liệu pháp miễn dịch, kháng thể, thụ thể tế bào T, phương pháp tạo ra peptit, kháng thể và thụ thể tế bào T này

<130> I32873W0

<150> US62/188,870

<151> 2015-07-06

<150> GB1511792.2

<151> 2015-07-06

<160> 103

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 1

Ser Thr Tyr Gly Gly Gly Leu Ser Val

1 5

<210> 2

<211> 13

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 2

Ser Leu Tyr Asn Leu Gly Gly Ser Lys Arg Ile Ser Ile

1 5 10

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 3

Thr Ala Ser Ala Ile Thr Pro Ser Val

1 5

<210> 4
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 4

Ala Leu Phe Gly Thr Ile Leu Glu Leu
 1 5

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

<400> 5

Asn Leu Met Ala Ser Gln Pro Gln Leu
 1 5

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

<400> 6

Leu Leu Ser Gly Asp Leu Ile Phe Leu
 1 5

<210> 7
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 7

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

<210> 8
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 8

Ala Leu Leu Asp Gly Gly Ser Glu Ala Tyr Trp Arg Val
 1 5 10

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

<400> 9

His Leu Ile Ala Glu Ile His Thr Ala
 1 5

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

<400> 10

Ser Leu Asp Glu Asn Ser Asp Gln Gln Val
 1 5 10

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

<400> 11

Ala Leu Trp Leu Pro Thr Asp Ser Ala Thr Val
 1 5 10

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

<400> 12

Gly Leu Ala Ser Arg Ile Leu Asp Ala
 1 5

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

<400> 13

Ser Leu Ser Pro Val Ile Leu Gly Val
1 5

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

<400> 14

Arg Leu Pro Asn Ala Gly Thr Gln Val
1 5

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

<400> 15

Leu Leu Ala Asn Gly Val Tyr Ala Ala
1 5

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

<400> 16

Val Leu Ala Glu Gly Gly Glu Gly Val
1 5

<210> 17
<211> 8
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 17

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
1 5

<210> 18
<211> 10
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 18

Phe Leu Leu Asp Gln Val Gln Leu Gly Leu
1 5 10

<210> 19

<211> 10

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 19

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

<210> 20

<211> 12

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 20

Ile Ile Glu Val Asp Pro Asp Thr Lys Glu Met Leu
1 5 10

<210> 21

<211> 9

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 21

Ile Val Arg Glu Phe Leu Thr Ala Leu
1 5

<210> 22

<211> 9

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 22

Lys Leu Asn Asp Thr Tyr Val Asn Val
1 5

<210> 23

<211> 9

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 23

Lys Leu Ser Asp Ser Ala Thr Tyr Leu
1 5

<210> 24

<211> 9

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 24

Leu Leu Phe Ala Gly Thr Met Thr Val
1 5

<210> 25

<211> 9

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 25

Leu Leu Pro Pro Pro Pro Pro Pro Ala
1 5

<210> 26

<211> 9

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 26

Met Leu Ala Glu Lys Leu Leu Gln Ala
1 5

<210> 27

<211> 9

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 27

Asn Leu Arg Glu Gly Asp Gln Leu Leu
1 5

<210> 28

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

<400> 28

Ser Leu Asp Gly Phe Thr Ile Gln Val
 1 5

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

<400> 29

Ser Leu Asp Gly Thr Glu Leu Gln Leu
 1 5

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

<400> 30

Ser Leu Asn Gly Asn Gln Val Thr Val
 1 5

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

<400> 31

Val Leu Pro Lys Leu Tyr Val Lys Leu
 1 5

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

<400> 32

Tyr Met Leu Asp Ile Phe His Glu Val
 1 5

<210> 33
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 33

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

<210> 34
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 34

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

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

<400> 35

Leu Leu Arg Phe Ser Gln Asp Asn Ala
 1 5

<210> 36
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 36

Phe Leu Leu Arg Phe Ser Gln Asp Asn Ala
 1 5 10

<210> 37
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 37

Tyr Thr Gln Pro Phe Ser His Tyr Gly Gln Ala Leu

1 5 10

```
<210> 38
<211> 9
<212> PRT
<213> Người hiện đại
```

<400> 38

Ile Ala Ala Ile Arg Gly Phe Leu Val
1 5

```
<210> 39
<211> 10
<212> PRT
<213> Người hiện đại
```

<400> 39

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

```
<210> 40
<211> 9
<212> PRT
<213> Người hiện đại
```

<400> 40

Gly Leu Ala Phe Ser Leu Tyr Gln Ala
1 5

```
<210> 41
<211> 12
<212> PRT
<213> Người hiện đại
```

<400> 41

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

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

<400> 42

Thr Gln Thr Ala Val Ile Thr Arg Ile
1 5

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

<400> 43

Lys Val Val Gly Lys Asp Tyr Leu Leu
1 5

<210> 44
<211> 14
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 44

Ala Thr Gly Asn Asp Arg Lys Glu Ala Ala Glu Asn Ser Leu
1 5 10

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

<400> 45

Met Leu Thr Glu Leu Glu Lys Ala Leu
1 5

<210> 46
<211> 11
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 46

Tyr Thr Ala Gln Ile Gly Ala Asp Ile Ala Leu
1 5 10

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

<400> 47

Val Leu Ala Ser Gly Phe Leu Thr Val
1 5

<210> 48

<211> 10

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 48

Ser Met His Gln Met Leu Asp Gln Thr Leu
1 5 10

<210> 49

<211> 9

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 49

Gly Leu Met Lys Asp Ile Val Gly Ala
1 5

<210> 50

<211> 11

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 50

Gly Met Asn Pro His Gln Thr Pro Ala Gln Leu
1 5 10

<210> 51

<211> 9

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 51

Lys Leu Phe Gly His Leu Thr Ser Ala
1 5

<210> 52

<211> 12

<212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 52

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

<210> 53
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 53

Val Val Val Thr Gly Leu Thr Leu Val
 1 5

<210> 54
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 54

Tyr Gln Asp Leu Leu Asn Val Lys Met
 1 5

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

<400> 55

Gly Ala Ile Asp Leu Leu His Asn Val
 1 5

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

<400> 56

Ala Leu Val Glu Val Thr Glu His Val
 1 5

<210> 57
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 57

Gly Leu Ala Pro Asn Thr Pro Gly Lys Ala
 1 5 10

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

<400> 58

Leu Ile Leu Glu Ser Ile Pro Val Val
 1 5

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

<400> 59

Ser Leu Leu Asp Thr Leu Arg Glu Val
 1 5

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

<400> 60

Val Val Met Glu Glu Leu Leu Lys Val
 1 5

<210> 61
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 61

Thr Gln Thr Thr His Glu Leu Thr Ile
 1 5

<210> 62
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 62

Ala	Leu	Tyr	Glu	Tyr	Gln	Pro	Leu	Gln	Ile
1			5						10

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

<400> 63

Leu	Ala	Tyr	Thr	Leu	Gly	Val	Lys	Gln	Leu
1			5						10

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

<400> 64

Gly	Leu	Thr	Asp	Val	Ile	Arg	Asp	Val
1			5					

<210> 65
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 65

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

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

<400> 66

Leu Leu Asp Glu Lys Val Gln Ser Val
1 5

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

<400> 67

Ser Met Asn Gly Gly Val Phe Ala Val
1 5

<210> 68
<211> 12
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 68

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

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

<400> 69

Gly Leu Leu Val Gly Ser Glu Lys Val Thr Met
1 5 10

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

<400> 70

Phe Val Leu Asp Thr Ser Glu Ser Val
1 5

<210> 71
<211> 12
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 71

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

<210> 72

<211> 9

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 72

Phe Leu Pro Pro Ala Gln Val Thr Val
1 5

<210> 73

<211> 9

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 73

Lys Ile Thr Glu Ala Ile Gln Tyr Val
1 5

<210> 74

<211> 9

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 74

Ile Leu Ala Ser Leu Ala Thr Ser Val
1 5

<210> 75

<211> 10

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 75

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

<210> 76

<211> 9

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 76

Lys Val Ala Asp Tyr Ile Pro Gln Leu
1 5

<210> 77

<211> 10

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 77

Val Leu Val Pro Tyr Glu Pro Pro Gln Val
1 5 10

<210> 78

<211> 9

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 78

Lys Val Ala Asn Ile Ile Ala Glu Val
1 5

<210> 79

<211> 9

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 79

Gly Gln Asp Val Gly Arg Tyr Gln Val
1 5

<210> 80

<211> 9

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 80

Ala Leu Gln Glu Ala Leu Glu Asn Ala
1 5

<210> 81

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

<400> 81

Ala Val Leu Pro His Val Asp Gln Val
 1 5

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

<400> 82

His Leu Leu Gly His Leu Glu Gln Ala
 1 5

<210> 83
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 83

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

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

<400> 84

Ser Leu Ala Glu Ser Leu Asp Gln Ala
 1 5

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

<400> 85

Asn Ile Ile Glu Leu Val His Gln Val
 1 5

<210> 86
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 86

Gly Leu Leu Thr Glu Ile Arg Ala Val
 1 5

<210> 87
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 87

Phe Leu Asp Asn Gly Pro Lys Thr Ile
 1 5

<210> 88
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 88

Gly Leu Trp Glu Gln Glu Asn His Leu
 1 5

<210> 89
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 89

Ser Leu Ala Asp Ser Leu Tyr Asn Leu
 1 5

<210> 90
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 90

Ser Ile Tyr Glu Tyr Tyr His Ala Leu

1 5

<210> 91
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 91

Lys Leu Ile Asp Asp Val His Arg Leu
 1 5

<210> 92
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 92

Ser Ile Leu Arg His Val Ala Glu Val
 1 5

<210> 93
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 93

Val Leu Ile Asn Thr Ser Val Thr Leu
 1 5

<210> 94
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 94

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

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

<400> 95

Leu Ile Gln Asp Arg Val Ala Glu Val
1 5

<210> 96
<211> 10
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 96

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

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

<400> 97

Glu Leu Asp Arg Thr Pro Pro Glu Val
1 5

<210> 98
<211> 9
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 98

Val Leu Phe Pro Asn Leu Lys Thr Val
1 5

<210> 99
<211> 10
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 99

Arg Val Ala Pro Glu Glu His Pro Val Leu
1 5 10

<210> 100
<211> 10
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 100

Gly Leu Tyr Pro Asp Ala Phe Ala Pro Val
1 5 10

<210> 101

<211> 9

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 101

Ala Met Thr Gln Leu Leu Ala Gly Val
1 5

<210> 102

<211> 10

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 102

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

<210> 103

<211> 9

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 103

Tyr Leu Leu Pro Ala Ile Val His Ile
1 5