



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

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

(11)



1-0035924

(51)⁸ C07K 14/47; A61K 39/00; A61P 35/00 (13) B

(21) 1-2018-00910

(22) 05/08/2016

(86) PCT/EP2016/068727 05/08/2016

(87) WO 2017/021527 A3 09/02/2017

(30) 62/201,289 05/08/2015 US; 1513921.5 06/08/2015 GB

(45) 26/06/2023 423

(43) 25/05/2018 362A

(73) IMMATICS BIOTECHNOLOGIES GMBH (DE)

Paul-Ehrlich-Straße 15, 72076 Tübingen, Germany

(72) MAHR, Andrea (DE); WEINSCHENK, Toni (DE); SCHOOR, Oliver (DE);

FRITSCHKE, Jens (DE); SINGH, Harpreet (DE); MÜLLER, Phillip (DE); LEIBOLD, Julia (DE); GOLDFINGER, Valentina (DE).

(74) Công ty Luật TNHH WINCO (WINCO LAW FIRM)

(54) PEPTIT ĐỂ SỬ DỤNG TRONG LIỆU PHÁP MIỄN DỊCH, PROTEIN DUNG HỢP VÀ TẾ BÀO CHỨA PEPTIT NÀY, ĐƯỢC PHÂN VÁ PHƯƠNG PHÁP TẠO RA PEPTIT

(57) Sáng chế đề cập đến peptit, protein, axit nucleic và tế bào để sử dụng trong liệu pháp miễn dịch. Cụ thể, sáng chế đề cập đến liệu pháp miễn dịch điều trị bệnh ung thư. Sáng chế còn đề cập đến epitop peptit của tế bào T liên quan đến khối u, một mình hoặc kết hợp với các peptit liên quan đến khối u khác để có thể dùng làm, ví dụ, thành phần 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 để sử dụng trong các phương pháp điều trị miễn dịch. Cụ thể, sáng chế đề cập đến liệu pháp miễn dịch điều trị bệnh ung thư. Sáng chế còn đề cập đến epitop peptit của tế bào T liên quan đến khối u, một mình hoặc kết hợp với các peptit liên quan đến khối u khác để có thể dùng làm, ví dụ, thành phần 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.

Sáng chế đề cập đến peptit có nguồn gốc từ các phân tử kháng nguyên bạch cầu ở người (HLA) nhóm I của các tế bào khối u của người có thể được sử dụng trong các chế phẩm vaccin để tạo ra đáp ứng miễn dịch kháng u hoặc làm đích để phát triển các hợp chất và tế bào có hoạt tính dược học/miễn dịch học.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Ung thư tuyến tiền liệt là bệnh ung thư thường được chẩn đoán nhiều thứ hai trên thế giới và là nguyên nhân phổ biến thứ năm gây tử vong do bệnh ung thư ở nam giới, với khoảng 1,1 triệu ca mắc bệnh mới (15% tổng số ca mắc bệnh ung thư ở nam giới) và 0,3 triệu ca tử vong do bệnh ung thư (7% tổng số ca tử vong do bệnh ung thư ở nam giới) trong năm 2012. Trong cùng thời gian này, đây là loại bệnh ung thư thường gặp nhất ở nam giới của 84 nước trên thế giới, phần lớn ở các nước có trình độ phát triển của con người đạt mức cao hoặc rất cao, nhưng cũng ở một số nước Trung và Nam Phi. Theo Hiệp hội ung thư Mỹ, ước tính có khoảng 220.800 ca mắc mới bệnh ung thư tuyến tiền liệt và 27.540 ca tử vong do bệnh ung thư tuyến tiền liệt trong năm 2015 ở Mỹ. Các yếu tố nguy cơ của bệnh ung thư tuyến tiền liệt là độ tuổi, tiền sử gia đình, và chủng tộc (World Cancer Report, 2014; SEER Stat facts, 2014; American Cancer Society, 2015).

Gần như tất cả bệnh ung thư tuyến tiền liệt là dạng caxinom tuyến phát triển từ các

tế bào tuyến của tuyến tiền liệt. Các dạng hiếm gặp của bệnh ung thư tuyến tiền liệt bao gồm sacôm, caxinom tế bào nhỏ, khối u thần kinh nội tiết (không phải caxinom tế bào nhỏ) hoặc caxinom tế bào chuyển tiếp (American Cancer Society, 2015).

Chiến lược điều trị đối với bệnh ung thư tuyến tiền liệt chủ yếu phụ thuộc vào giai đoạn của bệnh ung thư. Đối với bệnh ung thư tuyến tiền liệt không di căn được giới hạn khu trú, các lựa chọn điều trị bao gồm theo dõi tích cực (chờ đợi và theo dõi), phẫu thuật cắt bỏ hoàn toàn tuyến tiền liệt và sử dụng liệu pháp xạ trị liều cao tại chỗ kết hợp với liệu pháp tia phóng xạ để gần hoặc không kết hợp với liệu pháp này. Ở các bệnh nhân có nguy cơ cao, liệu pháp loại bỏ hormon và liệu pháp xạ trị tại chỗ sau khi phẫu thuật là các lựa chọn khác. Phương pháp điều trị chuẩn đối với bệnh ung thư tuyến tiền liệt di căn còn bao gồm phẫu thuật cắt bỏ hoàn toàn tuyến tiền liệt, liệu pháp xạ trị liều cao tại chỗ và liệu pháp loại bỏ hormon. Các khối u không đáp ứng với liệu pháp ức chế hormon được gọi là bệnh ung thư tuyến tiền liệt kháng phẫu thuật cắt bỏ (castration-resistant prostate cancer: CRPC). Các bệnh nhân CRPC được cho sử dụng docetaxel, abiraterone và vaccin sipuleucel-T trên cơ sở tế bào đuôi gai. Bệnh di căn xương được điều trị bằng radi-223 một mình hoặc hỗn hợp của radi-223, docetaxel hoặc abiraterone với bisphosphonat hoặc denosumab (S3-Leitlinie Prostatakarzinom, 2014).

Vaccin sipuleucel-T trên cơ sở tế bào đuôi gai là vaccin kháng ung thư hàng đầu được Cơ quan quản lý thực phẩm và dược phẩm Mỹ (Food and Drug Administration: FDA) cấp phép cho sử dụng. Do hiệu quả tích cực của nó đối với sự sống của bệnh nhân mắc bệnh CRPC, đã có nhiều nỗ lực tập trung vào việc phát triển các liệu pháp miễn dịch khác. Liên quan đến các chiến lược tiêm chủng vaccin, vaccin chứa peptit là kháng nguyên đặc hiệu với tuyến tiền liệt (prostate-specific antigen: PSA)-TRICOM, vaccin chứa peptit được cá nhân hóa PPV, vaccin chứa ADN pTVG-HP và vaccin chứa tế bào toàn phần biểu hiện yếu tố kích thích dòng bạch cầu hạt-đại thực bào (GM-CSF) GVAX có kết quả hứa hẹn trong các thử nghiệm lâm sàng khác nhau. Ngoài ra, các vaccin trên cơ sở tế bào đuôi gai không phải sipuleucel-T, cụ thể là BPX-101 và DCVAC/Pa đã được chứng minh là tạo ra đáp ứng lâm sàng ở bệnh nhân mắc bệnh ung thư tuyến tiền liệt. Hiện nay, các chất ức chế sự kiểm soát miễn dịch như ipilimumab và nivolumab được đánh giá trong các thử nghiệm lâm sàng dưới dạng liệu pháp đơn cũng như kết hợp với các phương pháp điều trị khác, bao gồm liệu pháp ức chế androgen, liệu pháp xạ trị tại chỗ, PSA-TRICOM và GVAX. Hiện nay, chất điều biến miễn dịch tasquinimod làm

chậm đáng kể sự tiến triển của bệnh và làm tăng tỷ lệ sống không có sự tiến triển của bệnh trong thử nghiệm pha II, được đánh giá thêm trong thử nghiệm pha III. Lenalidomide, chất điều biến miễn dịch khác, tạo ra hiệu quả hứa hẹn trong các nghiên cứu lâm sàng giai đoạn sớm nhưng không cải thiện tỷ lệ sống trong thử nghiệm pha III. Mặc dù có kết quả thất vọng, các thử nghiệm thêm với lenalidomide vẫn đang được tiến hành (Quinn et al., 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 tuyến tiền liệt 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 tuyến tiền liệt 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. Các ví dụ đã biết rõ về kháng nguyên CT là thành viên thuộc họ MAGE và 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 này được phát hiện trong u melanin và tế bào melanin bình thường. Nhiều protein trong số các protein liên quan đến dòng tế bào melanin này tham gia vào quá trình sinh tổng hợp melanin và do đó không đặc hiệu khối u nhưng được sử dụng rộng rãi đối với

liệu pháp miễn dịch điều trị bệnh ung thư. Ví dụ về chúng bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, tyrosinaza và Melan-A/MART-1 đối với u melanin hoặc PSA đối với bệnh ung thư tuyến tiền liệt.

c) Các kháng nguyên TAA được biểu hiện quá mức: các gen mã hoá TAA được biểu hiện rộng rãi đã phát hiện được 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 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 khi 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.

Giống như tất cả các thực thể bệnh ung thư phát triển từ các cơ quan hoặc mô không quan trọng cho sự sống, các kháng nguyên đặc hiệu tuyến tiền liệt có thể là lựa chọn tốt cho liệu pháp miễn dịch điều trị bệnh ung thư do các kháng nguyên đặc hiệu tuyến tiền liệt là đích đặc hiệu mô ở bệnh nhân cắt bỏ tuyến tiền liệt. Ở bệnh nhân ung thư nhưng không cắt bỏ tuyến tiền liệt, các kháng nguyên này cũng có thể là đích quan tâm do tuyến tiền liệt không được cho là cơ quan quan trọng cho sự sống, và phương pháp tương tự đã được thực hiện trong u melanin với các kháng nguyên biệt hóa tế bào melanin. Có một số ví dụ cho thấy rằng kháng nguyên đặc hiệu với tuyến tiền liệt hoặc kháng nguyên liên quan đến tuyến tiền liệt ở mức cao là các đích an toàn, ví dụ, sipuleucel-T (Provenge) từ công ty Dendreon chứa phosphatase axit của tuyến tiền liệt được sử dụng làm kháng nguyên khối u (Westdorp et al., 2014). Kháng nguyên này không chỉ được biểu hiện trong tuyến tiền liệt mà được biểu hiện quá mức với mức độ cao hơn từ 1 đến 2 lần trong tuyến tiền liệt so với các mô khác (Graddis et al., 2011).

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 xytokin thân thiện với tế bào T gây độc tế bào (cytotoxic T cell: CTL) (Mortara et al., 2006) và thu hút các tế bào hiệu ứng, ví dụ, tế bào CTL, tế bào NK, đại thực bào, tế bào hạt (Hwang et al., 2007).

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

Các peptit kéo dài (dài hơn) theo sáng chế có thể có tác dụng làm các epitop có hoạt tính của MHC nhóm II. Các tế bào T hỗ trợ, được hoạt hóa bởi epitop của MHC nhóm II, đóng vai trò quan trọng trong việc phối hợp chức năng hiệu ứng của CTL trong sự miễn dịch kháng 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 một phương

án được ưu tiên, peptit cần được biểu hiện quá mức bởi các tế bào khối u so với các mô khỏe mạnh bình thường. Ngoài ra, tốt hơn nếu kháng nguyên tương ứng không chỉ có mặt ở một loại khối u, mà còn có mặt với nồng độ cao (nghĩa là số lượng bản sao của peptit tương ứng trong mỗi tế bào). Kháng nguyên đặc hiệu khối u và kháng nguyên liên quan đến khối u thường có nguồn gốc từ các protein tham gia trực tiếp vào quá trình biến đổi của tế bào bình thường thành tế bào khối u do chức năng của chúng, ví dụ, trong việc kiểm soát hoặc ức chế chu trình tế bào của quá trình tế bào chết 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

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 nêu trong SEQ ID NO: 4, hoặc muối được dụng của nó.

Công bố đơn quốc tế số WO 2004/016643 bộc lộ các peptit kháng nguyên liên quan đến khối u có khả năng gắn kết hữu hiệu với phân tử MHC nhóm I để tạo ra đáp ứng CTL.

Tsavalier và các đồng tác giả (Trp-p8, gen đặc hiệu tuyến tiền liệt mới, được điều hòa tăng trong bệnh ung thư tuyến tiền liệt và các bệnh ác tính khác và có chung tính tương đồng ở mức cao với các protein kênh canxi tiềm năng của thụ thể chuyển tiếp. Tài liệu: Cancer Res. 2001 May 1;61(9):3760-9) bộc lộ rằng protein TRPM8 được biểu hiện trên nhiều loại bệnh ung thư.

Các bảng sau đây thể hiện các peptit như được bộc lộ, 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, Bảng 3 và Bảng 5 đều gắn kết với HLA-A*02. Tất cả các peptit trong Bảng 2, Bảng 4 và Bảng 6 đều gắn kết với HLA-A*24. Các peptit trong Bảng 3 và Bảng 4 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 5 và Bảng 6 là các peptit bổ sung có thể hữu ích khi kết hợp với các peptit khác như được bộc lộ. Ngoài ra, các peptit trong Bảng 7 và Bảng 8 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 HLA-A*02 như được bộc lộ. Trình tự SEQ ID No. 4 là trình tự theo sáng chế

SEQ ID No.	Trình tự	(các) GenID	(các) ký hiệu gen chính thức
1	VTAQIGIVAV	81285	OR51E2
2	SMLGEEIQL	9687	GREB1
3	HLLEDIAHV	4744	NEFH
4	ALLTFVWKL	79054	TRPM8
5	KIFSRLIYI	79054	TRPM8
6	ALLESRVNL	50940	PDE11A
7	TLLQVVGVS	10257	ABCC4
8	LLDFSLADA	1674	DES
9	GMLNEAEGKAIKL	4629	MYH11
10	TLWRGPVVV	261729	STEAP2
11	YLEEECPAT	563	AZGP1
12	SLNEEIAFL	1674	DES
13	AMAPNHAVV	4057	LTF
14	KMDEASAQLL	54682	MANSC1
15	KMDEASAQLLA	54682	MANSC1
16	KMDEASAQL	54682	MANSC1
17	RLGIKPESV	1466	CSRP2
18	GLSEFTEYL	4131	MAP1B
19	LLPPPPLLA	23245	ASTN2
20	SLLSHQVLL	57221	KIAA1244
21	YLNDSLRHV	283078	MKX
22	SLYDSIAFI	56978	PRDM8
23	AVAGADVITV	1428	CRYM

Bảng 2: các peptit HLA-A*24 như được bộc lộ

SEQ ID No.	Trình tự	(các) GenID	(các) ký hiệu gen chính thức
24	SYNDALLTF	79054	TRPM8
25	IYEPYLAMF	79054	TRPM8
26	RYADDTFTPAF	5865	RAB3B
27	GYLQGLVSF	9622	KLK4
28	YYAKEIHKF	7043	TGFB3
29	RYGSPINTF	647024	C6orf132

SEQ ID No.	Trình tự	(các) GenID	(các) ký hiệu gen chính thức
30	SYSPA HARL	2624	GATA2
31	AYTSPPSFF	171024	SYNPO2
32	PYQLNASLFTF	171024	SYNPO2
33	QYGKDFLTL	79088	ZNF426
34	AFSPDSHYLLF	3679	ITGA7
35	IYTRVTYYL	64499, 7177	TPSB2, TPSAB1
36	RYMWINQEL	374654	KIF7
37	RYLQDLLAW	5339	PLEC
38	VYSDKLWIF	8216	LZTR1
39	SYIDVAVKL	57544	TXNDC16

Bảng 3: các peptit HLA-A*02 bổ sung như được bộc lộ không liên quan đến bệnh ung thư đã biết trước đó. J = phospho-serin

SEQ ID No.	Trình tự	(các) GenID	(các) ký hiệu gen chính thức
40	RTFJPTYGL	23336	SYNM

Bảng 4: các peptit HLA-A*24 bổ sung như được bộc lộ không liên quan đến bệnh ung thư đã biết trước đó

SEQ ID No.	Trình tự	(các) GenID	(các) ký hiệu gen chính thức
41	RYLQKIEEF	3755	KCNG1
42	TYIGQGYII	60681	FKBP10
43	AYIKNGQLF	56978	PRDM8
44	VYNTVSEGTHF	25800	SLC39A6
45	RYFKTPRKF	25792	CIZ1
46	VYEEILHQL	116496	FAM129A
47	SYTPVLNQF	10497	UNC13B
48	AWAPKPYHKF	23043, 50488, 9448	TNIK, MINK1, MAP4K4

Bảng 5: các peptit HLA-A*02 hữu ích, ví dụ, đối với liệu pháp điều trị bệnh ung

thư được cá nhân hóa

SEQ ID No.	Trình tự	(các) GenID	(các) ký hiệu gen chính thức
49	SLFHPEDTGQV	354	KLK3
50	TLGPASFLV	389816	LRRC26
51	AMFDKKVQL	23336	SYNM
52	ALGDLVQSV	7782	SLC30A4
53	YLLKDKGEYTL	2316	FLNA

Bảng 6: các peptit HLA-A*24 hữu ích, ví dụ, đối với liệu pháp điều trị bệnh ung thư được cá nhân hóa

SEQ ID No.	Trình tự	(các) GenID	(các) ký hiệu gen chính thức
54	AYSEKVTEF	3817	KLK2
55	LYFEKGGEYF	55	ACPP
56	LFHPEDTGQVF	354	KLK3
57	KYADKIYSI	2346	FOLH1
58	GYIDKVRQL	4744	NEFH
59	IYPDVTYAF	1135	CHRNA2

Bảng 7: các peptit như được bộc lộ 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 (không phải ung thư) kháng lại sự biểu hiện quá mức được thử nghiệm được chọn từ: 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, và tĩnh mạch.

SEQ ID No.	Trình tự	Các bệnh/cơ quan liên quan khác
1	VTAQIGIVAV	SCLC, u melanin
2	SMLGEEIQL	HCC, BRCA, u melanin, bệnh ung thư tử cung
3	HLLEDIAHV	MCC, bệnh ung thư tử cung
5	KIFSRLIYI	U melanin
6	ALLESRVNL	HCC, PC
7	TLLQVVGVS	Bệnh ung thư tử cung, bệnh ung thư túi mật, bệnh ung thư ống mật chủ
8	LLDFSLADA	CRC, BRCA, u melanin, bệnh ung thư bàng quang, bệnh ung thư tử cung
10	TLWRGPVVV	NSCLC, RCC, CRC, HCC, bệnh bạch cầu, OC, bệnh ung thư thực quản, bệnh ung thư túi mật, bệnh ung thư ống mật chủ, CLL
12	SLNEEIAFL	SCLC, PC, bệnh ung thư bàng quang, bệnh ung thư túi mật, bệnh ung thư ống mật chủ
13	AMAPNHAVV	Bệnh ung thư não
16	KMDEASAQL	Bệnh ung thư bàng quang
17	RLGIKPESV	Bệnh ung thư não, HCC, BRCA, bệnh ung thư tử cung
18	GLSEFTEYL	Bệnh ung thư não
19	LLPPPPLLA	Bệnh ung thư não, u melanin, bệnh ung thư bàng quang
20	SLLSHQVLL	SCLC, CRC, HCC, bệnh ung thư bàng quang, BRCA, bệnh ung thư thực quản, bệnh ung thư tử cung
22	SLYDSIAFI	Bệnh ung thư não, bệnh bạch cầu, AML
26	RYADDTFTPAF	HCC
27	GYLQGLVSF	HCC
28	YYAKEIHKF	NSCLC, HCC
29	RYGSPINTF	NSCLC, GC, HCC
31	AYTSPPSFF	GC, HCC
33	QYGKDFLTL	NSCLC, bệnh ung thư não, HCC
34	AFSPDSHYLLF	NSCLC, RCC, bệnh ung thư não, HCC
35	IYTRVTYYL	NSCLC, GC
36	RYMWINQEL	NSCLC, bệnh ung thư não, HCC
37	RYLQDLLAW	NSCLC, RCC, bệnh ung thư não

SEQ ID No.	Trình tự	Các bệnh/cơ quan liên quan khác
38	VYSDKLWIF	NSCLC, bệnh ung thư não, GC, HCC
40	RTFJPTYGL	Bệnh ung thư bàng quang
41	RYLQKIEEF	NSCLC, RCC, bệnh ung thư não
42	TYIGQGYII	NSCLC, bệnh ung thư não, GC, HCC
43	AYIKNGQLF	Bệnh ung thư não
44	VYNTVSEGTHF	NSCLC, bệnh ung thư não, HCC
45	RYFKTPRKF	HCC
47	SYTPVLNQF	HCC
48	AWAPKPYHKF	NSCLC, RCC, bệnh ung thư não, HCC

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, HCC (liver cancer) = bệnh ung thư gan, PC (pancreatic cancer) = bệnh ung thư tụy, BRCA (breast cancer) = bệnh ung thư vú, MCC (Merkel cell carcinoma) = caxinom tế bào Merkel, OC (ovarian cancer) = bệnh ung thư buồng trứng, AML (acute myeloid leukemia) = bệnh bạch cầu tủy bào cấp tính, CLL (chronic lymphocytic leukemia) = bệnh bạch cầu dạng lymphô mạn tính, GC (stomach cancer) = bệnh ung thư dạ dày; J = phosphoserin

Nói chung, sáng chế còn đề cập đến 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 phổi tế bào nhỏ, u melanin, bệnh ung thư gan, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư tử cung, caxinom tế bào Merkel, bệnh ung thư tụy, bệnh ung thư túi mật, bệnh ung thư ống mật chủ, CRC, bệnh ung thư bàng quang, bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ, bệnh ung thư thận, bệnh bạch cầu (ví dụ, AML hoặc CLL), bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư thực quản, bệnh ung thư não, và bệnh ung thư dạ dày (vùng dạ dày).

Được bộc lộ 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: 48. 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: 6 (xem bảng 1) và các trình tự từ SEQ ID No: 24 đến SEQ ID No: 28 (xem bảng 2) hoặc các trình tự SEQ ID No: 1, 4, 5, 6, 49, và 52 hoặc SEQ ID No: 2, 3, và 54, và sử dụng chúng trong liệu pháp miễn dịch điều trị bệnh ung thư phổi, bệnh

ung thư phổi tế bào nhỏ, u melanin, bệnh ung thư gan, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư tử cung, caxinom tế bào Merkel, bệnh ung thư tụy, bệnh ung thư túi mật, bệnh ung thư ống mật chủ, CRC, bệnh ung thư bàng quang, bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ, bệnh ung thư thận, bệnh bạch cầu (ví dụ, AML hoặc CLL), bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư thực quản, bệnh ung thư não, và bệnh ung thư dạ dày (vùng dạ dày), và tốt nhất nếu là bệnh ung thư tuyến tiền liệt. Như được thể hiện trong Bảng 7 trên đây, nhiều peptit như được bộc lộ 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.

Sáng chế mô tả việc sử dụng peptit như được bộc lộ để - tốt hơn là được kết hợp - điều trị bệnh tăng sinh được chọn từ nhóm bao gồm bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư phổi tế bào nhỏ, u melanin, bệnh ung thư gan, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư tử cung, caxinom tế bào Merkel, bệnh ung thư tụy, bệnh ung thư túi mật, bệnh ung thư ống mật chủ, CRC, bệnh ung thư bàng quang, bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ, bệnh ung thư thận, bệnh bạch cầu (ví dụ, AML hoặc CLL), bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư thực quản, bệnh ung thư não, và bệnh ung thư dạ dày (vùng dạ dày), và tốt nhất nếu là bệnh ung thư tuyến tiền liệt.

Peptit theo sáng chế có khả năng gắn kết với phân tử của phức hợp tương thích mô chính (MHC) nhóm -I ở người.

Sáng chế còn đề cập đến peptit theo sáng chế, trong đó peptit này 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.

Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến peptit không có trong tự nhiên, trong đó peptit này chứa trình tự axit amin theo trình tự SEQ ID No: 4 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,

vacxin peptit như được bộc lộ ở đây. Độ tan đủ và ít nhất là đáng kể của (các) peptit là cần thiết để cung cấp peptit hữu hiệu cho đối tượng cần điều trị. Tốt hơn nếu các muối này là muối được dụng của peptit. Các muối theo sáng chế này bao gồm các muối kim loại kiềm và kim loại kiềm thổ như các muối của dãy Hofmeister bao gồm các anion PO_4^{3-} , SO_4^{2-} , CH_3COO^- , Cl^- , Br^- , NO_3^- , ClO_4^- , I^- , SCN^- và các cation NH_4^+ , Rb^+ , K^+ , Na^+ , Cs^+ , Li^+ , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} và Ba^{2+} . Các muối cụ thể được chọn từ $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$, NH_4Cl , NH_4Br , NH_4NO_3 , NH_4ClO_4 , NH_4I , NH_4SCN , Rb_3PO_4 , Rb_2HPO_4 , RbH_2PO_4 , Rb_2SO_4 , $\text{Rb}_4\text{CH}_3\text{COO}$, Rb_4Cl , Rb_4Br , Rb_4NO_3 , Rb_4ClO_4 , Rb_4I , Rb_4SCN , K_3PO_4 , K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , K_2SO_4 , KCH_3COO , KCl , KBr , KNO_3 , KClO_4 , KI , KSCN , Na_3PO_4 , Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , Na_2SO_4 , NaCH_3COO , NaCl , NaBr , NaNO_3 , NaClO_4 , NaI , NaSCN , ZnCl_2 , Cs_3PO_4 , Cs_2HPO_4 , CsH_2PO_4 , Cs_2SO_4 , CsCH_3COO , CsCl , CsBr , CsNO_3 , CsClO_4 , CsI , CsSCN , Li_3PO_4 , Li_2HPO_4 , LiH_2PO_4 , Li_2SO_4 , LiCH_3COO , LiCl , LiBr , LiNO_3 , LiClO_4 , LiI , LiSCN , Cu_2SO_4 , $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$, Mg_2HPO_4 , $\text{Mg}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$, Mg_2SO_4 , $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, 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 (ít nhất là các chất này chứa liên kết peptit giữa các gốc axit amin) có thể được tổng hợp bằng chế độ Fmoc-polyamit của phương pháp tổng hợp peptit pha rắn như được bộc lộ trong tài liệu của Lukas và các đồng tác giả (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 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-phenoxyaxetic. Tất cả các dẫn xuất axit amin được bổ sung thêm vào dưới dạng dẫn xuất anhydrit đối xứng được điều chế từ trước của chúng, ngoại trừ asparagin và glutamin được bổ sung bằng cách sử dụng phương pháp liên kết qua trung gian N, N-dicyclohexyl-carbodiimit/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 peptit theo sáng chế. 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 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 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 peptit theo sáng chế hoặc các

phức hợp của 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 alen 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.

Các kháng thể và 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 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 biểu hiện peptit nêu trên chứa trình tự SEQ ID No. 4.

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

Sáng chế còn đề cập đến peptit 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 theo sáng chế dùng làm thuốc hoặc để sản xuất thuốc. Tốt hơn nếu thuốc này có hoạt tính kháng ung thư.

Tốt hơn nếu thuốc này là 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 phổi, ung thư phổi tế bào nhỏ, u melanin, ung thư gan, ung thư vú, ung thư tử cung, caxinom tế bào Merkel, ung thư tụy, ung thư túi mật, ung thư ống mật chủ, CRC, ung thư bàng quang, ung thư phổi tế bào không nhỏ, ung thư thận, bệnh bạch cầu (ví dụ, AML hoặc CLL), ung thư buồng trứng, ung thư thực quản, ung thư não, và ung thư dạ dày (vùng dạ dày), và tốt nhất nếu là các tế bào ung thư tuyến tiền liệt.

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

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

Kênh cation tiềm năng của thụ thể chuyển tiếp, họ phụ M, thành viên 8 (TRPM8) - TRPM8 là kênh natri và canxi được hoạt hóa đáp ứng với sự kích thích lạnh. TRPM8 được biểu hiện chủ yếu trong các tế bào biểu mô tuyến tiền liệt, và ngoài ra, còn biểu hiện trong một số noron cảm giác (Prevarskaya et al., 2007). TRPM8 đã được thông báo là được biểu hiện quá mức trong bệnh ung thư tuyến tiền liệt và các loại bệnh ung thư khác, như khối u vú, khối u ruột kết, khối u phổi và khối u da (Tsavaler et al., 2001).

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Các hình vẽ từ Fig.1A đến Fig.1C thể hiện sự biểu hiện quá mức của các peptit khác nhau ở mô bình thường (cột màu trắng) và mô ung thư tuyến tiền liệt và mô tăng sản tuyến tiền liệt lành tính (cột màu đen).

Các hình vẽ từ Fig.1D đến Fig.1E thể hiện tất cả các dòng tế bào, mô bình thường và mô ung thư trong đó các peptit làm ví dụ (SLLSHQVLL (A*02) (SEQ ID NO. 20) và SLLSHQVLL (A*24) (SEQ ID NO. 20)) được phát hiện. Fig.1A) Gen: OR51E2, Peptit: VTAQIGIVAV (A*02; SEQ ID NO.:1) - Các mô từ trái sang phải: 1 mô mỡ, 3 tuyến thượng thận, 6 động mạch, 5 tủy xương, 7 não, 3 vú, 1 dây thần kinh trung ương, 13 ruột kết, 1 tá tràng, 8 thực quản, 2 túi mật, 5 tim, 16 thận, 21 gan, 46 phổi, 4 hạch bạch huyết, 4 mẫu bạch cầu, 4 buồng trứng, 7 tụy, 4 dây thần kinh ngoại vi, 1 màng bụng, 3 tuyến yên, 4 nhau thai, 3 màng phổi, 6 trực tràng, 7 tuyến nước bọt, 4 cơ xương, 6 da, 2 ruột non, 4 lách, 7 dạ dày, 4 tinh hoàn, 3 tuyến ức, 4 tuyến giáp, 10 khí quản, 3 niệu quản, 6 bàng quang, 2 tử cung, 2 tĩnh mạch, 3 tuyến tiền liệt, 44 mô khối u tuyến tiền liệt. Peptit

cũng được phát hiện trên mẫu bệnh ung thư phổi tế bào nhỏ (không được thể hiện). Fig.1B) Gen: MANSC1, Peptit: KMDEASAQLL (A*02; SEQ ID NO.:14) - Các mô từ trái sang phải: 1 mô mỡ, 3 tuyến thượng thận, 6 động mạch, 5 tủy xương, 7 não, 3 vú, 1 dây thần kinh trung ương, 13 ruột kết, 1 tá tràng, 8 thực quản, 2 túi mật, 5 tim, 16 thận, 21 gan, 46 phổi, 4 hạch bạch huyết, 4 mẫu bạch cầu, 4 buồng trứng, 7 tụy, 4 dây thần kinh ngoại vi, 1 màng bụng, 3 tuyến yên, 4 nhau thai, 3 màng phổi, 6 trực tràng, 7 tuyến nước bọt, 4 cơ xương, 6 da, 2 ruột non, 4 lách, 7 dạ dày, 4 tinh hoàn, 3 tuyến ức, 4 tuyến giáp, 10 khí quản, 3 niệu quản, 6 bàng quang, 2 tử cung, 2 tĩnh mạch, 3 tuyến tiền liệt, 44 mô khối u tuyến tiền liệt. Fig.1C) Gen: TRPM8, Peptit: SYNDALLTF (A*24; SEQ ID NO.:24) - Các mô từ trái sang phải: 2 tuyến thượng thận, 1 động mạch, 4 não, 1 vú, 5 ruột kết, 1 tim, 13 thận, 9 gan, 9 phổi, 3 tụy, 1 tuyến yên, 2 trực tràng, 3 da, 1 lách, 12 dạ dày, 1 tuyến ức, 2 tử cung, 40 mô khối u tuyến tiền liệt. Peptit cũng được phát hiện trên mẫu bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ (không được thể hiện). Fig.1D) Gen: KIAA1244, Peptit: SLLSHQVLL (A*02; SEQ ID NO.:20) - Các mô từ trái sang phải: 1 dòng tế bào (tụy), 20 mô ung thư (1 bệnh ung thư não, 1 bệnh ung thư vú, 2 bệnh ung thư ruột kết, 1 bệnh ung thư thực quản, 1 bệnh ung thư thận, 1 bệnh ung thư gan, 3 bệnh ung thư phổi, 8 bệnh ung thư tuyến tiền liệt, 1 bệnh ung thư dạ dày, 1 bệnh ung thư bàng quang). Tập hợp các mô bình thường được thử nghiệm cũng được thể hiện trên các hình vẽ từ Fig.1A đến Fig.1B, nhưng không phát hiện được peptit trên mô bình thường bất kỳ. Fig.1E) Gen: KIAA1244, Peptit: QYGKDFLTL (A*24; SEQ ID NO.:33) - Các mô từ trái sang phải: 3 mô tăng sản tuyến tiền liệt lành tính, 3 mô bình thường (1 gan, 1 phổi, 1 trực tràng), 31 mô ung thư (5 bệnh ung thư não, 4 bệnh ung thư gan, 15 bệnh ung thư phổi, 7 bệnh ung thư tuyến tiền liệt). Tập hợp các mô bình thường được thử nghiệm cũng được thể hiện trên Fig.1C, nhưng các mô không phát hiện được peptit không được thể hiện.

Các hình vẽ từ Fig.1F đến Fig.1K thể hiện sự biểu hiện quá mức của các peptit khác nhau ở mô bình thường (cột màu trắng) và mô ung thư tuyến tiền liệt và mô tăng sản tuyến tiền liệt lành tính (cột màu đen). Các hình vẽ từ Fig.1L đến Fig.1S thể hiện tất cả các dòng tế bào, mô bình thường và mô ung thư trong đó phát hiện được các peptit khác nhau. Fig.1F) Gen: NEFH, Peptit: HLLEDIAHV (A*02; SEQ ID NO.: 3) - Các mô từ trái sang phải: 1 mô mỡ, 3 tuyến thượng thận, 6 động mạch, 5 tủy xương, 7 não, 3 vú, 1 dây thần kinh trung ương, 13 ruột kết, 1 tá tràng, 8 thực quản, 2 túi mật, 5 tim, 16 thận, 4 mẫu bạch cầu, 21 gan, 46 phổi, 4 hạch bạch huyết, 3 buồng trứng, 7 tụy, 4 dây thần

kinh ngoại vi, 1 màng bụng, 3 tuyến yên, 2 nhau thai, 3 màng phổi, 6 trực tràng, 7 tuyến nước bọt, 4 cơ xương, 5 da, 2 ruột non, 4 lách, 7 dạ dày, 4 tinh hoàn, 3 tuyến ức, 4 tuyến giáp, 9 khí quản, 3 niệu quản, 6 bàng quang, 2 tử cung, 2 tĩnh mạch, 3 tuyến tiền liệt, 33 mô ung thư tuyến tiền liệt và 10 mô tăng sản tuyến tiền liệt lành tính. Fig.1G) Gen: PDE11A, Peptit: ALLESRVNL (A*02; SEQ ID NO.: 6) - Các mô từ trái sang phải: 1 mô mỡ, 3 tuyến thượng thận, 6 động mạch, 5 tủy xương, 7 não, 3 vú, 1 dây thần kinh trung ương, 13 ruột kết, 1 tá tràng, 8 thực quản, 2 túi mật, 5 tim, 16 thận, 4 mẫu bạch cầu, 21 gan, 46 phổi, 4 hạch bạch huyết, 3 buồng trứng, 7 tụy, 4 dây thần kinh ngoại vi, 1 màng bụng, 3 tuyến yên, 2 nhau thai, 3 màng phổi, 6 trực tràng, 7 tuyến nước bọt, 4 cơ xương, 5 da, 2 ruột non, 4 lách, 7 dạ dày, 4 tinh hoàn, 3 tuyến ức, 4 tuyến giáp, 9 khí quản, 3 niệu quản, 6 bàng quang, 2 tử cung, 2 tĩnh mạch, 3 tuyến tiền liệt, 33 mô ung thư tuyến tiền liệt và 10 mô tăng sản tuyến tiền liệt lành tính. Fig.1H) Gen: KLK4, Peptit: GYLQGLVSF (A*24; SEQ ID NO.: 27) - Các mô từ trái sang phải: 2 tuyến thượng thận, 1 động mạch, 4 não, 1 vú, 5 ruột kết, 1 tim, 13 thận, 9 gan, 9 phổi, 3 tụy, 1 tuyến yên, 2 trực tràng, 3 da, 1 lách, 12 dạ dày, 1 tuyến ức, 2 tử cung, 37 mô ung thư tuyến tiền liệt và 3 mô tăng sản tuyến tiền liệt lành tính. Fig.1I) Gen: TGFB3, Peptit: YYAKEIHKF (A*24; SEQ ID NO.: 28) - Các mô từ trái sang phải: 2 tuyến thượng thận, 1 động mạch, 4 não, 1 vú, 5 ruột kết, 1 tim, 13 thận, 9 gan, 9 phổi, 3 tụy, 1 tuyến yên, 2 trực tràng, 3 da, 1 lách, 12 dạ dày, 1 tuyến ức, 2 tử cung, 37 mô ung thư tuyến tiền liệt và 3 mô tăng sản tuyến tiền liệt lành tính. Fig.1J) Gen: KLK3, Peptit: SLFHPEDTGQV (A*02; SEQ ID NO.: 49) - Các mô từ trái sang phải: 1 mô mỡ, 3 tuyến thượng thận, 6 động mạch, 5 tủy xương, 7 não, 3 vú, 1 dây thần kinh trung ương, 13 ruột kết, 1 tá tràng, 8 thực quản, 2 túi mật, 5 tim, 16 thận, 4 mẫu bạch cầu, 21 gan, 46 phổi, 4 hạch bạch huyết, 3 buồng trứng, 7 tụy, 4 dây thần kinh ngoại vi, 1 màng bụng, 3 tuyến yên, 2 nhau thai, 3 màng phổi, 6 trực tràng, 7 tuyến nước bọt, 4 cơ xương, 5 da, 2 ruột non, 4 lách, 7 dạ dày, 4 tinh hoàn, 3 tuyến ức, 4 tuyến giáp, 9 khí quản, 3 niệu quản, 6 bàng quang, 2 tử cung, 2 tĩnh mạch, 3 tuyến tiền liệt, 33 mô ung thư tuyến tiền liệt và 10 mô tăng sản tuyến tiền liệt lành tính. Fig.1K) Gen: KLK2, Peptit: AYSEKVTEF (A*24; SEQ ID NO.: 54) - Các mô từ trái sang phải: 2 tuyến thượng thận, 1 động mạch, 4 não, 1 vú, 5 ruột kết, 1 tim, 13 thận, 9 gan, 9 phổi, 3 tụy, 1 tuyến yên, 2 trực tràng, 3 da, 1 lách, 12 dạ dày, 1 tuyến ức, 2 tử cung, 37 mô ung thư tuyến tiền liệt và 3 mô tăng sản tuyến tiền liệt lành tính. Fig.1L) Gen: GREB1, Peptit: SMLGEEIQL (A*02; SEQ ID NO.: 2) - Các mô từ trái sang phải: 1

mô tăng sản tuyến tiền liệt lành tính (BPH), 3 dòng tế bào (3 da), 1 mô bình thường (1 tử cung), 26 mô ung thư (2 bệnh ung thư vú, 2 bệnh ung thư gan, 1 bệnh ung thư phổi, 1 bệnh ung thư buồng trứng, 13 bệnh ung thư tuyến tiền liệt, 6 bệnh ung thư da, 1 bệnh ung thư tử cung. Fig.1M) Gen: TRPM8, Peptit: ALLTFVWKL (A*02; SEQ ID NO.: 4) - Các mô từ trái sang phải: 3 mô tăng sản tuyến tiền liệt lành tính (BPH), 13 mô ung thư (1 bệnh ung thư não, 12 bệnh ung thư tuyến tiền liệt). Fig.1N) Gen: TRPM8, Peptit: KIFSRLIYI (A*02; SEQ ID NO.: 5) - Các mô từ trái sang phải: 4 mô tăng sản tuyến tiền liệt lành tính (BPH), 10 mô ung thư (1 bệnh ung thư não, 8 bệnh ung thư tuyến tiền liệt, 1 bệnh ung thư da). Fig.1O) Gen: MANSC1, Peptit: KMDEASAQL (A*02; SEQ ID NO.: 16) - Các mô từ trái sang phải: 21 mô ung thư (20 bệnh ung thư tuyến tiền liệt, 1 bệnh ung thư bàng quang). Fig.1P) Gen: C6orf132, Peptit: RYGSPINTF (A*24; SEQ ID NO.: 29) - Các mô từ trái sang phải: 4 mô tăng sản tuyến tiền liệt lành tính (BPH), 54 mô ung thư (1 bệnh ung thư gan, 24 bệnh ung thư phổi, 26 bệnh ung thư tuyến tiền liệt, 3 bệnh ung thư dạ dày). Fig.1Q) Gen: ITGA7, Peptit: AFSPDSHYLLF (A*24; SEQ ID NO.: 34) - Các mô từ trái sang phải: 5 mô tăng sản tuyến tiền liệt lành tính (BPH), 44 mô ung thư (10 bệnh ung thư não, 1 bệnh ung thư thận, 4 bệnh ung thư gan, 18 bệnh ung thư phổi, 11 bệnh ung thư tuyến tiền liệt). Fig.1R) Gen: TPSB2, TPSAB1, Peptit: IYTRVTYYL (A*24; SEQ ID NO.: 35) - Các mô từ trái sang phải: 3 mô tăng sản tuyến tiền liệt lành tính (BPH), 59 mô ung thư (36 bệnh ung thư phổi, 14 bệnh ung thư tuyến tiền liệt, 9 bệnh ung thư dạ dày). Fig.1S) Gen: SLC30A4, Peptit: ALGDLVQSV (A*02; SEQ ID NO.: 52) - Các mô từ trái sang phải: 1 mô tăng sản tuyến tiền liệt lành tính (BPH), 11 mô ung thư (1 bệnh ung thư hạch bạch huyết, 9 bệnh ung thư tuyến tiền liệt, 1 bệnh ung thư da).

Các hình vẽ từ Fig.2A đến Fig.2E thể hiện các profin biểu hiện làm ví dụ (sự biểu hiện tương đối so với thận bình thường) của các gen nguồn như được bộc lộ được biểu hiện ở mức quá cao hoặc chỉ được biểu hiện ở bệnh ung thư tuyến tiền liệt trong nhóm mẫu mô bình thường và 20 mẫu ung thư tuyến tiền liệt. Các mô từ trái sang phải: tuyến thượng thận, động mạch, tủy xương, não (toàn phần), vú, ruột kết, thực quản, tim, thận (ba mẫu), bạch cầu, gan, phổi, hạch bạch huyết, buồng trứng, tụy, nhau thai, tuyến tiền liệt, tuyến nước bọt, cơ xương, da, ruột non, lách, dạ dày, tinh hoàn, tuyến ức, tuyến giáp, bàng quang, cổ tử cung, tử cung, tĩnh mạch, 20 mẫu ung thư tuyến tiền liệt. Fig.2A) NEFH; Fig.2B) ABCC4; Fig.2C) RAB3B; Fig.2D) OR51E2; và Fig.2E) KLK2.

Fig.3 thể hiện số liệu về tính sinh miễn dịch làm ví dụ: kết quả đếm tế bào theo

dòng sau khi nhuộm multime đặc hiệu peptit. A) TYIGQGYII (FKBP10; SEQ ID No. 42); B) IYTRVTYYL (TPSB2, TPSAB1; SEQ ID No. 35).

Các hình vẽ từ Fig.4A đến Fig.4C thể hiện kết quả làm ví dụ của các đáp ứng của tế bào T CD8+ *in vitro* đặc hiệu peptit của người cho HLA-A*02+ khỏe mạnh. Các tế bào T CD8+ được tạo môi bằng cách sử dụng các tế bào APC nhân tạo được phủ kháng thể đơn dòng mAb kháng CD28 và HLA-A*02 trong phức hợp với peptit có trình tự Seq No.1 (hình A, ô bên trái), peptit có trình tự SeqID No.3 (hình B, ô bên trái) hoặc peptit có trình tự SeqID No.5 (hình C, ô bên trái), tương ứng. Sau ba chu trình kích thích, phát hiện các tế bào có khả năng phản ứng với peptit bằng cách nhuộm multime 2D bằng A*02/SeqID No.1 (hình A), A*02/SeqID No.3 (hình B) hoặc A*02/SeqID No.5 (hình C). Các ô bên phải (hình A, B và C) thể hiện kết quả nhuộm đối chứng của các tế bào được kích thích bằng phức hợp A*02/peptit không liên quan. Các tế bào đơn lẻ còn sống được tạo cổng cho các tế bào lymphô CD8+. Các cổng Boolean giúp loại trừ các sự kiện dương tính giả 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.

Các hình vẽ từ Fig.5A đến Fig.5B thể hiện kết quả làm ví dụ của các đáp ứng của tế bào T CD8+ đặc hiệu peptit *in vitro* của người cho khỏe mạnh dương tính với HLA-A*24+. 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*24 trong phức hợp với peptit có trình tự Seq No.24 (hình A, ô bên trái) hoặc peptit có trình tự SeqID No.27 (hình B, 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*24/SeqID No.24 (hình A), hoặc A*24/SeqID No.27 (hình B). Các ô bên phải (hình A, và B) thể hiện kết quả nhuộm đối chứng của các tế bào được kích thích bằng phức hợp A*24/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, hoặc 13 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 như được bộc lộ), chúng có thể có mạch dài tới 14, 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 liên 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 liên kề. Không có giới hạn về chiều dài của polypeptit theo sáng chế miễn là các epitop đúng được giữ nguyên. Trái với các thuật ngữ peptit hoặc oligopeptit, thuật ngữ polypeptit để chỉ các phân tử chứa nhiều hơn khoảng 30 gốc axit amin.

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

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

Ở người, có ba locus di truyền khác nhau mã hóa các phân tử MHC nhóm I (các phân tử MHC của người còn được ký hiệu là các kháng nguyên bạch cầu của người

(HLA)): HLA-A, HLA-B, và HLA-C. HLA-A*01, HLA-A*02, và HLA-B*07 là các ví dụ về các alen của MHC nhóm I khác nhau có thể được biểu hiện từ các locus này.

Bảng 8: 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%

Alen	Quần thể	Kiểu hình tính được từ tần suất alen
DR1	Người (Bắc) Mỹ gốc Á	6,80%
DR2	Người (Bắc) Mỹ gốc Á	33,80%
DR3	Người (Bắc) Mỹ gốc Á	9,20%
DR4	Người (Bắc) Mỹ gốc Á	28,60%
DR5	Người (Bắc) Mỹ gốc Á	30,00%
DR6	Người (Bắc) Mỹ gốc Á	25,10%
DR7	Người (Bắc) Mỹ gốc Á	13,40%
DR8	Người (Bắc) Mỹ gốc Á	12,70%
DR9	Người (Bắc) Mỹ gốc Á	18,60%
DR1	Người (Bắc) Mỹ La-tinh	15,30%
DR2	Người (Bắc) Mỹ La-tinh	21,20%
DR3	Người (Bắc) Mỹ La-tinh	15,20%
DR4	Người (Bắc) Mỹ La-tinh	36,80%
DR5	Người (Bắc) Mỹ La-tinh	20,00%
DR6	Người (Bắc) Mỹ La-tinh	31,10%
DR7	Người (Bắc) Mỹ La-tinh	20,20%
DR8	Người (Bắc) Mỹ La-tinh	18,60%
DR9	Người (Bắc) Mỹ La-tinh	2,10%
A*24	Người Philippin	65%
A*24	Người Nenets ở Nga	61%
A*24:02	Người Nhật Bản	59%
A*24	Người Malaysia	58%
A*24:02	Người Philippin	54%
A*24	Người Ấn Độ	47%
A*24	Người Hàn Quốc	40%
A*24	Người Sri Lanka	37%
A*24	Người Trung Quốc	32%
A*24:02	Người Ấn Độ	29%
A*24	Người Tây Úc	22%
A*24	Người Mỹ	22%
A*24	Người Samara ở Nga	20%
A*24	Người Nam Mỹ	20%

Alen	Quần thể	Kiểu hình tính được từ tần suất alen
A*24	Người châu Âu	18%

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

Nếu các peptit A*02 như được bộc lộ 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 dị polyme của deoxyribonucleotit.

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

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

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

tự này cùng với trình tự bổ trợ của nó (ADN sợi kép) và trình tự bổ trợ của trình tự này.

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

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

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

Thuật ngữ “mảnh”, 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 mảnh 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 vector và/hoặc các polynucleotit hoặc polypeptit này có thể là một phần của hỗn hợp, và vẫn được phân lập sao cho vector hoặc hỗn hợp này không là một phần của môi trường tự nhiên của nó.

Các polynucleotit, và polypeptit tái tổ hợp hoặc polypeptit sinh miễn dịch, được bộc lộ theo sáng chế cũng có thể ở dạng “được tinh chế”. Thuật ngữ “được tinh chế” không cần phải là tinh khiết tuyệt đối; thay vào đó, thuật ngữ này được dự định là định nghĩa tương đối, và có thể bao gồm cả các chế phẩm được tinh chế ở mức cao hoặc chế phẩm chỉ được tinh chế một phần, như các thuật ngữ được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Ví dụ, các dòng vô tính riêng biệt được phân lập từ thư viện ADN bổ 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

“mảnh” 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 gồm axit amin theo trình tự

SEQ ID NO: 4 hoặc muối được dụng của nó. Peptit theo sáng chế có khả năng gắn kết với phân tử của phức hợp tương thích mô chính (MHC) nhóm -I ở người.

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).

Sau đó, các tế bào T 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.

Tất nhiên là peptit theo sáng chế sẽ có khả năng gắn kết với phân tử của phức hợp tương thích mô chính (MHC) nhóm I ở người. Sự gắn kết của peptit với phức hợp MHC có thể được thử nghiệm bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này.

Tốt hơn nếu khi các tế bào T đặc hiệu với peptit theo sáng chế được thử nghiệm đối với peptit được thể, nồng độ peptit mà khi đó các peptit đã thể đạt một nửa mức tăng tối đa trong quá trình phân giải so với nồng độ ban đầu 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 thể được nhận biết bởi các tế bào T từ nhiều hơn một đối tượng, ít nhất là hai, và tốt hơn nữa là ba đối tượng.

Peptit chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 4.

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: 48 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.

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 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 các liên kết không peptit vào.

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

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

Peptit, trong đó peptit này bao gồm các liên kết không peptit là phương án được

ưu tiên của sáng chế. Nói chung, các peptit (ít nhất là các chất này chứa liên kết peptit giữa các gốc axit amin) có thể được tổng hợp bằng chế độ Fmoc-polyamit của phương pháp tổng hợp peptit pha rắn như được bộc lộ trong tài liệu của Lukas và các đồng tác giả (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 polydimethylacrylamit được tạo thành từ ba monome dimethylacrylamit (monome khung chính), bisacryloyletylen diamin (nhóm liên kết ngang) và este acryloylsarcosin metyl (chất tạo nhóm chức). Chất liên kết có thể phân giải peptit-với nhựa được sử dụng là dẫn xuất axit không bền với axit 4-hydroxymetyl-phenoxyaxetic. Tất cả các dẫn xuất axit amin được bổ sung thêm vào dưới dạng dẫn xuất anhydrit đối xứng được điều chế từ trước của chúng, ngoại trừ asparagin và glutamin được bổ sung bằng cách sử dụng phương pháp liên kết qua trung gian N, N-dicyclohexyl-carbodiimide/1hydroxybenzotriazol ngược. Tất cả các phản ứng liên kết và khử bảo vệ được theo dõi bằng cách sử dụng ninhydrin, axit trinitrobenzen sulphonic hoặc phương pháp thử nghiệm isotin. Khi quá trình tổng hợp kết thúc, các peptit được phân giải ra khỏi nền nhựa và đồng thời loại bỏ các nhóm bảo vệ mạch bên bằng cách xử lý bằng axit trifloaxetic 95% chứa hỗn hợp chất tẩy 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 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 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. Do các peptit có nguồn gốc từ các kháng nguyên đặc hiệu tuyến tiền liệt có thể được xác định trong mô tuyến tiền liệt bất kỳ, bất kể trạng thái lành tính hoặc ác tính của nó, ngoài các mẫu mô ung thư tuyến tiền liệt, các mẫu tăng sản tuyến tiền liệt lành tính cũng được phân tích với mục đích xác định peptit được mã hóa bởi các kháng nguyên đặc hiệu với tuyến tiền liệt. Các peptit phân lập được 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 TUMAP tự nhiên ghi được từ các mẫu bệnh ung thư tuyến tiền liệt (N = 34 mẫu dương tính với A*02 và N = 37 mẫu dương tính với A*24) cũng như các mẫu tăng sản tuyến tiền liệt lành tính bổ sung (N = 10 mẫu dương tính với A*02 và N = 3 mẫu dương tính với A*24) với các mẫu phân mảnh của

các peptit tham chiếu tổng hợp tương ứng của các trình tự giống nhau. Do các peptit được xác định trực tiếp dưới dạng phối tử của các phân tử HLA của mô khối u, 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 khối u thu được từ 70 bệnh nhân có khối u tuyến tiền liệt.

Thiết bị phát hiện XPRESIDENT® v2.1 (ví dụ, xem công bố đơn sáng chế Mỹ số US 2013-0096016) cho phép xác định và chọn lọc các ứng viên vacxin peptit được trình diện quá mức liên quan trên cơ sở định lượng tương đối trực tiếp lượng peptit giới hạn bởi HLA trên các mô ung thư so với một vài mô và cơ quan không ung thư khác nhau. Điều này đạt được bằng cách phát triển phương pháp định lượng khác nhau không đánh dấu bằng cách sử dụng dữ liệu LC-MS thu được được xử lý bằng chương trình phân tích dữ liệu độc quyền, kết hợp các thuật toán để xác định trình tự, phân cụm phổ, đếm ion, 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 khối u tuyến tiền liệt 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 khối u tuyến tiền liệt đều khẳng định sự trình diện của chúng trên các khối u tuyến tiền liệt.

Các peptit TUMAP được xác định trên nhiều mô bệnh ung thư tuyến tiền liệt, mô tăng sản tuyến tiền liệt lành tính 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 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 suất 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).

Sáng chế đề cập đến peptit hữu ích trong việc điều trị bệnh ung thư/khối u, tốt hơn nếu là bệnh ung thư tuyến tiền liệt được biểu hiện quá mức hoặc chỉ biểu hiện peptit theo sáng chế. Peptit này được chứng minh bằng phương pháp phổ khối lượng là được biểu hiện trong tự nhiên bởi các phân tử HLA trên mẫu khối u tuyến tiền liệt 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 mô bình thường, không phải của tuyến tiền liệt, 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 tuyến tiền liệt 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 khối u tuyến tiền liệt biểu hiện peptit có nguồn gốc từ đó.

Các peptit như được bộc lộ 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 như được bộc lộ 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, không phải mô tuyến tiền liệt 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. Các kháng nguyên đặc hiệu tuyến tiền liệt có thể là lựa chọn tốt cho liệu pháp miễn dịch điều trị bệnh ung thư tuyến tiền liệt do các kháng nguyên đặc hiệu tuyến tiền liệt là các đích đặc hiệu mô ở bệnh nhân cắt bỏ tuyến tiền liệt. Ở bệnh nhân ung thư nhưng không cắt bỏ tuyến tiền liệt, các kháng nguyên này cũng có thể là đích quan tâm do tuyến tiền liệt không được cho là cơ quan quan trọng cho sự sống.

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 cập đến các peptit theo sáng chế có khả năng gắn kết với các thụ thể TCR và kháng thể khi được biểu hiện bởi phân tử MHC. Sáng chế còn đề cập đến axit nucleic, vector và tế bào chủ để biểu hiện thụ thể TCR và peptit theo sáng chế; và phương pháp sử dụng chúng.

Thuật ngữ “thụ thể tế bào T” (viết tắt là TCR) để chỉ phân tử 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 gamma/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 "miền", cụ thể là miền biến đổi và miền ổn định. Miền biến đổi gồm sự kết chuỗi của vùng biến đổi (V), và vùng nối (J). Miền biến đổi cũng có thể bao gồm vùng dẫn đầu (L). Các chuỗi beta và delta cũng có thể bao gồm vùng đa dạng (D). Các miền ổn định alpha và beta cũng có thể bao gồm các miền xuyên màng (TM) ở đầu tận cùng C để neo các chuỗi alpha và beta với màng tế bào.

Liên quan đến thụ thể TCR gama/delta, thuật ngữ "miền 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 miền 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 "miền 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 "miền ổn định của thụ thể TCR delta" để chỉ vùng TRDC ngoại bào, hoặc trình tự TRDC bị cắt đứt ở đầu tận cùng C.

Tốt hơn nếu các thụ thể TCR theo sáng chế gắn kết với phức hợp peptit - phân tử HLA theo sáng chế 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 ngữ pháp của chúng được sử dụng để chỉ thụ thể TCR có ái lực gắn kết (KD) đối với phức hợp peptit - phân tử HLA theo sáng chế nhỏ hơn

hoặc bằng 100 μ M.

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 miền ổn định TRAC và trình tự miền ổn định TRBC1 hoặc TRBC2 ngoại trừ việc các gốc Thr 48 của TRAC và Ser 57 của TRBC1 hoặc TRBC2 được thay thế bằng các gốc xystein, các gốc xystein này tạo thành liên kết disulfua giữa trình tự miền ổn định TRAC và trình tự miền ổn định TRBC1 hoặc TRBC2 của thụ thể TCR.

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

Các thụ thể TCR theo sáng chế có thể chứa 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 - phân tử HLA theo sáng chế, 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 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/peptit theo sáng chế, 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 (florescence 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 vector biểu hiện, như gama retrovirus hoặc lentivirus. Các virus tái tổ hợp được tạo ra và sau đó được thử nghiệm về mặt chức năng, như độ đặc hiệu kháng nguyên và ái lực chức năng. Tiếp đó, phần phân ức 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), virus tế bào gốc của chuột (murine stem cell virus: MSCV) U3, phosphoglycerat kinaza (phosphoglycerate kinase: PGK), β -actin, ubiquitin, và gen khởi đầu phức hợp virus của khỉ 40 (simian virus 40: 40SV40)/CD43, yếu tố kéo dài (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 lentivirus (Follenzi et al., 2000), và yếu tố điều hòa sau phiên mã của virus viêm gan ở chuột chũi (woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element: wPRE), yếu tố này làm tăng mức độ biểu hiện chuyển gen bằng cách làm tăng tính ổn định của ARN (Zufferey et al., 1999).

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

Cần đạt được sự biểu hiện trên bề mặt của thụ thể TCR ở mức cao để cho cả chuỗi alpha-TCR và chuỗi beta-TCR của thụ thể TCR 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 virus ở giữa chuỗi alpha-TCR và chuỗi beta-TCR tạo ra sự biểu hiện kết hợp của cả hai chuỗi này, do chuỗi alpha-TCR và chuỗi beta-TCR được tạo ra từ một sản phẩm phiên mã bị phá vỡ thành hai protein trong khi dịch mã, điều này đảm bảo rằng tạo ra tỷ lệ mol tương đương của các chuỗi alpha-TCR và beta-TCR (Schmitt et al. 2009).

Axit nucleic mã hóa các thụ thể TCR theo sáng chế có thể là codon được tối ưu hóa để làm tăng sự biểu hiện từ tế bào chủ. Sự lặp lại trong mã di truyền cho phép một số

axit amin 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 hiệu ứng thụ thể TCR được đưa vào (Kuball et al., 2007).

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

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

tốt (Good Manufacturing Practice: GMP).

Các dược phẩm chứa peptit ở dạng tự do hoặc ở dạng muối dược dụng (cũng xem phần trên đây). Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "muối dược dụng" để chỉ dẫn xuất của peptit được bộc lộ trong đó peptit này được cải biến bằng cách tạo muối axit hoặc muối bazơ của nó. Ví dụ, các muối axit được điều chế từ bazơ tự do (trong đó thường là dạng trung tính của dược chất có nhóm $-NH_2$ trung tính) liên quan đến phản ứng với axit thích hợp. Các axit thích hợp để điều chế các muối axit bao gồm cả các axit hữu cơ, ví dụ, axit axetic, axit propionic, axit glycolic, axit pyruvic, axit oxalic, axit malic, axit malonic, axit succinic, axit maleic, axit fumaric, axit tartaric, axit citric, axit benzoic, axit xianic, axit mandelic, axit metan sulfonic, axit etan sulfonic, axit p-toluensulfonic, axit salicylic, và axit tương tự, cũng như các axit vô cơ, ví dụ, axit clohydric, axit bromhydric, axit sulfuric, axit nitric, axit phosphoric và axit tương tự. Ngược lại, việc điều chế các muối bazơ của gốc axit có thể có mặt trên peptit được điều chế bằng cách sử dụng bazơ dược dụng như natri hydroxit, kali hydroxit, amoni hydroxit, canxi hydroxit, trimethylamin 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 phần 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 SEQ ID No. 4, 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 của 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 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 Bằng độc quyền sáng chế Mỹ số US 4.440.859, 4.530.901, 4.582.800, 4.677.063, 4.678.751, 4.704.362, 4.710.463, 4.757.006, 4.766.075, và 4.810.648.

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

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

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

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

Nhiều hệ biểu hiện là đã biết, bao gồm vi khuẩn (ví dụ, *E. coli* và *Bacillus*

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

Vectơ 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 vectơ biểu hiện của động vật có vú chịu cảm ứng là pMSG, cũng có thể mua được từ Pharmacia. Các vectơ 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 vectơ 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 vectơ CMV có thể chứa nguồn gốc để sao chép pMB1 (dẫn xuất của pBR322) ở các tế bào vi khuẩn, gen β -lactamaza để chọn sự kháng ampicillin ở vi khuẩn, polyA của hGH, và nguồn gốc fl. Các vectơ 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 vectơ 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 như được bộc lộ 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 (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, 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 của sáng chế được sử dụng làm thuốc. Ví dụ, peptit hoặc biến thể của nó có thể được bào chế để tiêm qua đường trong tĩnh mạch (intravenous: i.v.), tiêm dưới da (sub-cutaneous: s.c.), tiêm trong da (intradermal: i.d.), tiêm qua đường trong màng bụng (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 intolơkin 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, QS21 stimulon của Aquila, 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 Detox, Quil, hoặc Superfos của Ribic. 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 cytokin cũng có thể được sử dụng. Một vài cytokin đã được liên kết trực tiếp để tác động đến sự di trú của tế bào đuôi gai đến các mô bạch huyết (ví dụ, TNF-), thúc đẩy sự trưởng thành của tế bào đuôi gai thành tế bào trình diện kháng nguyên hữu hiệu đối với các tế bào lympho T (ví dụ, GM-CSF, IL-1 và IL-4) (Bằng độc quyền sáng chế Mỹ số US 5.849.589) 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 polysaccharit 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 lympho 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 vacxin đủ liều mà không chứa CpG trong một số thử nghiệm (Krieg, 2006). Bằng độc quyền sáng chế Mỹ số US 6.406.705 B1 mô tả việc sử dụng kết hợp các oligonucleotit CpG, chất phụ trợ không phải axit nucleic và kháng nguyên để gây đáp ứng miễn dịch đặc hiệu kháng nguyên. Chất đối kháng TLR9 của CpG là chất điều biến miễn dịch vòng thân kép (double Stem Loop Immunomodulator: dSLIM), sản phẩm của Mologen (Berlin, Đức) là thành phần được ưu tiên của dược phẩm theo sáng chế. Các phân tử gắn kết thụ thể TLR khác như TLR 7, TLR 8 và/hoặc TLR 9 gắn kết với ARN cũng có thể được sử dụng.

Ví dụ khác về các chất phụ trợ hữu ích bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, CpG được cải biến bằng phương pháp hóa học (ví dụ, CpR, Idera), chất tương tự ARN sợi kép như Poly(I:C) và dẫn xuất của nó (ví dụ AmpliGen®, Hiltonol®, poly-(ICLC), poly(IC-R), poly(I:C12U), ADN hoặc ARN của vi khuẩn không chứa CpG cũng như các phân tử nhỏ và kháng thể có hoạt tính miễn dịch như xyclophosphamit, sunitinib, Bevacizumab®, celebrex, NCX-4016, sildenafil, tadalafil, vardenafil, sorafenib, temozolomide, temsirolimus, XL-999, CP-547632, pazopanib, VEGF Trap, ZD2171, AZD2171, chất kháng CTLA4, các cấu trúc quan trọng hướng đích kháng thể khác của hệ miễn dịch (ví dụ, thụ thể kháng CD40, kháng TGF beta, kháng TNF alpha) và SC58175, chúng có thể có tác dụng khi điều trị và/hoặc làm chất phụ trợ. Lượng và nồng độ của các chất phụ trợ và chất phụ gia hữu ích trong ngữ cảnh của sáng chế có thể được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này xác định dễ dàng mà không cần thử nghiệm quá mức.

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

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

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

trợ là xyclophosphamide, imiquimod hoặc resiquimod. Các chất phụ trợ được đặc biệt ưu tiên là Montanide IMS 1312, Montanide ISA 206, Montanide ISA 50V, Montanide ISA-51, poly-ICLC (Hiltonol®) và mAB kháng CD40, hoặc hỗn hợp của chúng.

Dược phẩm này để sử dụng ngoài đường tiêu hóa như sử dụng dưới da, sử dụng trong da, sử dụng trong cơ hoặc sử dụng qua đường miệng. Nhằm mục đích này, các peptit và tùy ý các phân tử khác được hòa tan hoặc tạo hỗn dịch trong chất mang được dùng, 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 Bằng độc quyền sáng chế châu Âu số EP2112253.

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

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 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 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 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; Denkberg et al., 2003).

Tốt hơn nếu kháng thể 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 gồm SEQ ID NO: 4.

Sáng chế còn đề cập đến peptit theo sáng chế có khả năng gắn kết với phân tử của phức hợp tương thích mô chính (MHC) nhóm-I của người.

Sáng chế còn đề cập đến peptit theo sáng chế, trong đó peptit này bao gồm các liên kết không peptit.

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

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

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 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 tuyến tiền liệt.

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 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 trình tự SEQ ID NO: 4.

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 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 tốt hơn nếu các tế bào ung thư nêu trên là tế bào ung thư tuyến tiền liệt hoặc tế bào khối u huyết học hoặc khối u dạng rắn khác như bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư phổi tế bào nhỏ, u melanin, bệnh ung thư gan, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư tử cung, caxinom tế bào Merkel, bệnh ung thư tụy, bệnh ung thư túi mật, bệnh ung thư ống mật chủ, CRC, bệnh ung thư bàng quang, bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ, bệnh ung thư thận, bệnh bạch cầu (ví dụ, AML hoặc CLL), bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư thực quản, bệnh ung thư não, và bệnh ung thư dạ dày (vùng dạ dày), tốt nhất nếu là các tế bào ung thư tuyến tiền liệt.

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 (CDR), đoạn Fv, đoạn Fab và đoạn Fc) hoặc các polyme của các phân tử globulin miễn dịch này và các phiên bản được làm cho giống kháng thể của người của phân tử globulin miễn dịch 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 tuyến tiền liệt, sự cung cấp độc tố đến tế bào ung thư tuyến tiền liệt biểu hiện gen đánh dấu bệnh ung thư ở mức cao, và/hoặc ức chế hoạt tính của polypeptit của gen đánh dấu bệnh ung thư tuyến tiền liệt) 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 tuyến tiền liệt có chiều dài đầy đủ hoặc các đoạn của nó có thể được sử dụng để tạo ra kháng thể theo sáng chế. Polypeptit được sử dụng để tạo ra kháng thể theo sáng chế có thể được tinh chế một phần hoặc hoàn toàn ra khỏi nguồn tự

nhiên, hoặc có thể được tạo ra bằng kỹ thuật ADN tái tổ hợp.

Ví dụ, peptit mã hóa ADN bổ trợ theo sáng chế, như peptit trình tự SEQ ID NO: 4, polypeptit, hoặc mảnh 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 tuyến tiền liệt 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 thấm 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 (Bằng độc quyền sáng chế Mỹ số US 4.816.567).

Các kháng thể đơn dòng theo sáng chế có thể được tạo ra bằng cách sử dụng

phương pháp lai. Trong phương pháp lai, chuột hoặc động vật chủ thích hợp khác thường được tạo miễn dịch bằng chất 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 Bằng độc quyền sáng chế Mỹ số US 4.816.567. ADN mã hóa các kháng thể đơn dòng theo sáng chế có thể được phân lập dễ dàng và giải trình tự bằng cách sử dụng các quy trình thông thường (ví dụ, bằng cách sử dụng đoạn dò oligonucleotit có khả năng gắn kết đặc hiệu với các gen mã hóa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể của chuột).

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

Các mảnh 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 mảnh kháng thể.

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

Các phương pháp làm cho kháng thể không phải của người giống với kháng thể của người là đã được biết rõ trong lĩnh vực này. Nói chung, kháng thể được làm cho giống kháng thể của người có một hoặc nhiều gốc axit amin được đưa vào nó từ nguồn không phải của người. Các gốc axit amin không phải của người này thường được gọi là gốc "nhập khẩu", các gốc này thường được lấy từ vùng biến đổi "nhập khẩu". Việc làm cho giống với kháng thể của người có thể được thực hiện chủ yếu bằng cách thay thế các vùng CDR hoặc trình tự CDR của động vật gặm nhấm cho các trình tự tương ứng của kháng thể của người. Do đó, các kháng thể "được làm cho giống kháng thể của người" này là kháng thể thể khảm (Bằng độc quyền sáng chế Mỹ số US 4.816.567), trong đó vùng biến đổi nguyên vẹn của người được thay thế ít hơn đáng kể bằng trình tự tương ứng từ các loài không phải người. Trên thực tế, kháng thể được làm cho giống kháng thể

của người thường là kháng thể của người trong đó một số gốc CDR và có thể là một số gốc FR được thay thế bằng các gốc từ các vị trí tương tự ở kháng thể của động vật gặm nhấm.

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

Tốt hơn, nếu kháng thể theo sáng chế được sử dụng cho đối tượng trong chất mang được dụng. Thông thường, lượng thích hợp của muối được dụng được sử dụng trong sản phẩm để tạo ra sản phẩm đẳng trương. Ví dụ về các chất mang được 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 µg/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 tuyến tiền liệt, 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 tuyến tiền liệt.

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 (công bố đơn sáng chế Mỹ số US 2010/0113300, (Liddy et al., 2012)). Nhằm mục đích làm ổn định các thụ thể tế bào T trong khi biểu hiện 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 sáng chế Mỹ số US 2013/0115191), các miền tập hợp các tế bào hiệu ứng như miền kháng CD3, v.v., để thực hiện chức năng cụ thể trên các tế bào đích. Ngoài ra, nó có thể được biểu hiện ở các tế bào T dùng để chuyển mương. 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 miền ngoại bào của hai hoặc nhiều đích của protein được chọn từ nhóm bao gồm các protein nêu trên, và giá trị ái lực (Kd) nhỏ hơn $1 \times 10\mu\text{M}$.

Kháng thể dùng để chẩn đoán có thể được đánh dấu bằng đoạn dò thích hợp để phát hiện bằng các phương pháp chụp hình ảnh khác nhau. Các phương pháp để phát hiện đoạn dò bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, phương pháp huỳnh quang, phương pháp chiếu ánh sáng, phương pháp hiển vi electron và confocal; phương pháp chụp cộng hưởng từ và phổ; phương pháp nội soi huỳnh quang, phương pháp chụp ảnh cắt lớp vi tính và phương pháp chụp ảnh cắt lớp bằng bức xạ positron. Các đoạn dò thích hợp bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, fluorescein, rhodamin, eosin và các nhóm huỳnh quang khác, đồng vị phóng xạ, vàng, gadolini và các hợp chất lanthanit khác, sắt thuận từ, flo-18 và chất đồng vị phóng xạ phát ra positron. Ngoài ra, các đoạn dò có thể là đoạn dò hai chức năng hoặc đa chức năng và có thể phát hiện được bằng nhiều hơn một trong số các phương pháp đã liệt kê. Các kháng thể này có thể được đánh dấu trực tiếp hoặc gián tiếp bằng các đoạn dò nêu trên. Sự liên kết của đoạn dò với kháng thể bao gồm sự liên kết cộng hóa trị với đoạn dò, sự kết hợp đoạn dò vào kháng thể, và sự liên kết cộng hóa trị của hợp chất chelat hóa để gắn kết đoạn dò, ngoài các liên kết khác đã được biết rõ trong lĩnh vực này. Để sử dụng trong hóa mô miễn dịch, mẫu mô bệnh có thể là mẫu mới hoặc được đông lạnh hoặc có thể được gắn trong parafin và cố định với chất bảo quản như formalin. Phần chứa mẫu được cố định hoặc gắn được cho tiếp xúc với kháng thể sơ cấp và kháng thể thứ cấp đã được đánh dấu, trong đó kháng thể này được sử dụng để phát hiện sự biểu hiện của các protein tại chỗ.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề 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 biểu hiện peptit chứa trình tự SEQ ID NO: 4.

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

hiệu quả cao từ các mẫu máu. Ngoài phức hợp MHC:peptit, aAPC cần mang các protein khác có hoạt tính đồng kích thích như các kháng thể kháng CD28 được liên kết với bề mặt của chúng. Ngoài ra, các hệ trên cơ sở aAPC này thường cần bổ sung thêm các yếu tố hòa tan thích hợp, ví dụ, xytokin, như intolokin-12.

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

Các tế bào T hoạt hóa 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 nêu trong SEQ ID NO: 4.

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 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 mượn của tế bào T là đã được biết rõ trong lĩnh vực này. Để biết thêm chi tiết có thể xem các tài liệu của Gattinoni và các đồng tác giả và của Morgan và các đồng tác giả (Gattinoni et al., 2006; Morgan et al., 2006).

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

Phân tử bất kỳ theo sáng chế, nghĩa là peptit, axit nucleic, kháng thể, 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 được phẩm chứa chúng. Các thành phần của kit có thể được tạo phức từ trước hoặc mỗi thành phần có thể ở trong đồ chứa riêng biệt trước khi sử dụng cho bệnh nhân. Các thành phần của kit này có thể được tạo ra ở dạng một hoặc nhiều dung dịch lỏng, tốt hơn nếu là dung dịch nước, tốt hơn nữa nếu là dung dịch nước vô khuẩn. Các thành phần của kit cũng có thể được tạo ra dưới dạng chất rắn, chất này có thể được chuyển hóa thành chất lỏng bằng cách cho thêm các dung môi thích hợp, tốt hơn nếu các dung môi này được đựng trong đồ chứa riêng biệt khác.

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

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

Do các peptit theo sáng chế được phân lập từ khối u tuyến tiền liệt, tốt hơn nếu thuốc theo sáng chế được sử dụng để điều trị khối u tuyến tiền liệt.

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.

Các peptit TUMAP có thể được xác định ở bệnh nhân *de novo*, và sau đó được đưa vào vaccin. 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 phối 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 vaccin.

Theo một phương án làm ví dụ, các peptit được đưa vào vaccin 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 vaccin 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 vaccin trên cơ sở peptit được cá nhân hóa được chọn, vaccin này được tạo ra. Tốt hơn, nếu vaccin 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 khối u tuyến tiền liệt 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 khối u.

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 tuyến tiền liệt. 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.

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 mẫu mô tuyển tiền liệt của bệnh nhân được lấy từ Asterand (Detroit, Mỹ và Royston, Herts, Vương quốc Anh); BioServe (Beltsville, MD, Mỹ); Geneticist Inc. (Glendale, CA, Mỹ); Indivumed GmbH (Hamburg, Đức); bệnh viện Saint Savas, Athens, Hy Lạp, 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); Đại học thành phố Osaka (Osaka City University: OCU); Bệnh viện đại học Munich; ProteoGenex Inc., Culver City, CA, Mỹ; Tissue Solutions Ltd., Glasgow, Vương quốc Anh; Bệnh viện đại học Tübingen. 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., 2007). 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., 2008; 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 tuyến tiền liệt và mẫu tăng sản tuyến tiền liệt lành tính 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 12 và Bảng 13.

Bảng 12: Điểm số biểu hiện. Bảng này liệt kê các peptit HLA-A*02 được biểu hiện ở mức rất cao trên khối u so với nhóm các mô bình thường (+++), được biểu hiện ở mức quá cao trên khối u so với nhóm các mô bình thường (++) hoặc được biểu hiện quá mức trên khối u so với nhóm các mô bình thường (+).

SEQ ID No.	Trình tự	Sự biểu hiện peptit
1	VTAQIGIVAV	+++
2	SMLGEEIQL	+++
3	HLLEDIAHV	+++
4	ALLTFVWKL	+++
5	KIFSRLIYI	+++
6	ALLESRVNL	+++
7	TLLQVVGVS	+++
8	LLDFSLADA	+++
9	GMLNEAEGKAIKL	++
10	TLWRGPVVV	+++
11	YLEEECPAT	+++
12	SLNEEIAFL	+++
14	KMDEASAQLL	+++
15	KMDEASAQLLA	+++
17	RLGIKPESV	++
18	GLSEFTEYL	+++
19	LLPPPPLLA	+++
20	SLLSHQVLL	+++
21	YLNDSLRHV	+++
22	SLYDSIAFI	+++
23	AVAGADVITV	+
40	RTFJPTYGL	++

Bảng 13: Điểm số biểu hiện. Bảng này liệt kê các peptit HLA-A*24 được biểu hiện ở mức rất cao trên khối u so với nhóm các mô bình thường (+++), được biểu hiện ở mức quá cao trên khối u so với nhóm các mô bình thường (++) hoặc được biểu hiện quá mức trên khối u so với nhóm các mô bình thường (+).

SEQ ID No.	Trình tự	Sự biểu hiện peptit
24	SYNDALLTF	+++
25	IYEPYLAMF	+
26	RYADDTFTPAF	+++
27	GYLQGLVSF	+++

SEQ ID No.	Trình tự	Sự biểu hiện peptit
28	YYAKEIHKF	+++
29	RYGSPINTF	+++
30	SYSPA HARL	+++
31	AYTSPPSFF	+++
32	PYQLNASLFTF	+++
34	AFSPDSHYLLF	+++
35	IYTRVTYYL	+++
36	RYMWINQEL	++
37	RYLQDLLAW	+++
38	VYSDKLWIF	++
39	SYIDVAVKL	+
41	RYLQKIEEF	+++
42	TYIGQGYII	+++
43	AYIKNGQLF	+++
44	VYNTVSEGTHF	+
45	RYFKTPRKF	++
46	VYEEILHQL	++
47	SYTPVLNQF	++
48	AWAPKPYHKF	++

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 nitor lỏng. ARN tổng số được điều chế từ các mẫu này bằng cách sử dụng chất phản ứng TRI Reagent (Ambion, Darmstadt, Đức), sau đó làm sạch bằng RNeasy (QIAGEN, Hilden, Đức); cả hai phương pháp đều được thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

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

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

Thử nghiệm vi mảng

Việc phân tích sự biểu hiện gen của tất cả các mẫu ARN ở khối u và mô bình thường được thực hiện bằng các vi mảng oligonucleotit Affymetrix Human Genome (HG) U133A hoặc HG-U133 Plus 2.0 (Affymetrix, Santa Clara, CA, Mỹ). Tất cả các bước được tiến hành theo sách hướng dẫn của Affymetrix. Tóm lại, ADN bổ trợ sợi kép được tổng hợp từ 5–8 µg ARN tổng số, bằng cách sử dụng SuperScript RTII (Invitrogen) và đoạn mồi oligo-dT-T7 (MWG Biotech, Ebersberg, Đức) như được mô tả trong sách hướng dẫn. Quá trình phiên mã *in vitro* được thực hiện với kit đánh dấu BioArray High Yield RNA Transcript Labelling Kit (ENZO Diagnostics, Inc., Farmingdale, NY, Mỹ) đối với mảng U133A hoặc với kit đánh dấu GeneChip IVT Labelling Kit (Affymetrix) đối với mảng U133 Plus 2.0, sau đó, phân mảnh ARN bổ trợ, lai, và nhuộm bằng streptavidin-phycoerythrin và kháng thể biotinyl hóa kháng streptavidin (Molecular Probes, Leiden, Hà Lan). Các hình ảnh được quét bằng máy quét Agilent 2500A GeneArray (U133A) hoặc máy quét Affymetrix Gene-Chip 3000 (U133 Plus 2.0), và các dữ liệu được phân tích bằng chương trình phần mềm GCOS (Affymetrix), bằng cách thiết lập mặc định cho tất cả các thông số. Để chuẩn hóa, 100 gen giữ nhà được cung cấp bởi Affymetrix được sử dụng. Các giá trị biểu hiện tương đối được tính từ tỷ lệ log tín hiệu được cung cấp bằng chương trình phần mềm và mẫu thận bình thường được thiết lập tùy ý đến 1.0. Các profin biểu hiện làm ví dụ của các gen nguồn như được bộc lộ được biểu

hiện ở mức quá cao hoặc chỉ được biểu hiện bệnh ung thư tuyến tiền liệt được thể hiện trên các hình vẽ từ Fig.2A đến Fig.2E. Điểm số biểu hiện của các gen làm ví dụ khác được thể hiện trong Bảng 14.

Bảng 14: Điểm số biểu hiện. Bảng này liệt kê các peptit từ gen được biểu hiện ở mức rất cao trong khối u so với nhóm các mô bình thường (+++), được biểu hiện ở mức quá cao trong khối u so với nhóm các mô bình thường (++) hoặc được biểu hiện quá mức trong khối u so với nhóm các mô bình thường (+).

SEQ ID No	Trình tự	Sự biểu hiện gen
1	VTAGIGIVAV	++
2	SMLGEEIQL	++
3	HLLEDIAHV	+++
4	ALLTFVWKL	+
5	KIFSRLIYI	+
7	TLLQVVGVS	++
11	YLEEECPAT	+
19	LLPPPPLLA	+
24	SYNDALLTF	+
25	IYEPYLAMF	+
26	RYADDTFTPAF	++
28	YYAKEIHKF	+
44	VYNTVSEGTHF	++

Ví dụ 3

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

Để thu được thông tin liên quan đến tính sinh miễn dịch của peptit TUMAP như được bộc lộ, các tác giả sáng chế đã tiến hành đánh giá bằng cách sử dụng thử nghiệm tạo môi trường tế bào T *in vitro* trên cơ sở sự kích thích lặp lại của các tế bào T CD8+ bằng các tế bào trình diện kháng nguyên nhân tạo (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 một số peptit TUMAP được chọn của peptit TUMAP được giới hạn bởi HLA-A*0201 và peptit TUMAP được giới hạn bởi HLA-A*024 như được bộc lộ, để chứng minh rằng các peptit này là epitop của tế bào T kháng tiền tế bào T CD8+ tồn tại ở người

(Bảng 15A + B).

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 gạn tách bạch cầu HLA-A*02 mới bằng cách chọn lọc dương tính bằng cách sử dụng các vi hạt CD8 (Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Đức) của người cho khỏe mạnh thu được từ University clinics Mannheim, Đức, sau khi đồng ý tham gia.

PBMC và các tế bào lymphô CD8+ phân lập được 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. 60) từ Melan-A/MART-1 được cải biến) và A*0201/DDX5-001 (YLLPAIVHI từ DDX5 (SEQ ID No. 61), 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 600ng biotin kháng CD28 được cho thêm sau đó với thể tích 200µl. Sự kích thích được khơi mào trong đĩa có 96 lỗ bằng cách ủ đồng thời 1×10^6 tế bào T CD8+ với 2×10^5 hạt được phủ đã rửa sạch trong 200µl TCM được bổ

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

Tính sinh miễn dịch *in vitro* của peptit bệnh ung thư tuyến tiền liệt

Đối với peptit HLA nhóm I được thử nghiệm, tính sinh miễn dịch *in vitro* có thể được chứng minh bằng cách tạo ra các dòng tế bào T đặc hiệu peptit. Kết quả đếm tế bào theo dòng làm ví dụ sau khi nhuộm multime đặc hiệu peptit TUMAP đối với 2 peptit như được bộc lộ được thể hiện trên Fig.3 cùng với các đối chứng âm tương ứng. Kết quả của 5 peptit như được bộc lộ được tóm tắt trong Bảng 15A. Các kết quả khác của 6 peptit như được bộc lộ được tóm tắt trong Bảng 15B.

Bảng 15A: tính sinh miễn dịch *in vitro* của các peptit HLA nhóm I như được bộc lộ.

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 như được bộc lộ. Giá trị <20% = +; 20% - 49% = ++; 50% - 69% = +++; >= 70 % = ++++

Seq ID	Trình tự	Các lỗ	Người cho
17	RLGIKPESV	++	++++
29	RYGSPINTF	+	+++
34	AFSPDSHYLLF	+	+++
35	IYTRVTYYL	++	++++
42	TYIGQGYII	+	++++

Bảng 15B: tính sinh miễn dịch *in vitro* của các peptit HLA nhóm I như được bộc lộ

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 như được bộc lộ. Giá trị <20% = +; 20% - 49% = ++; 50% - 69% = +++; >= 70 % = ++++

SEQ ID	Trình tự	Các lỗ dương tính [%]
1	VTAQIGIVAV	++++
3	HLLEDIAHV	++
5	KIFSRLIYI	+++
6	ALLESRVNL	+
24	SYNDALLTF	+++
27	GYLQGLVSF	++

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 như được bộc lộ 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 2ug/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 2ug/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_2SO_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 16A: Điểm số gắn kết với MHC nhóm I

Sự gắn kết của các peptit được giới hạn bởi HLA-nhóm I với HLA-A*24 được đánh giá theo hiệu suất trao đổi peptit: $\geq 10\% = +$; $\geq 20\% = ++$; $\geq 50 = +++$; $\geq 75\% = ++++$

SEQ ID	Trình tự	Sự trao đổi peptit
24	SYNDALLTF	+++
25	IYEPYLAMF	+++
26	RYADDTFTPAF	+++
27	GYLQGLVSF	++++
28	YYAKEIHKF	++++
29	RYGSPINTF	+++
30	SYSPA HARL	+++

SEQ ID	Trình tự	Sự trao đổi peptit
31	AYTSPPSFF	+++
32	PYQLNASLFTF	++++
33	QYGKDFLTL	+++
34	AFSPDSHYLLF	+++
35	IYTRVTYYL	++
36	RYMWINQEL	+++
41	RYLQKIEEF	+++
42	TYIGQGYII	+++
43	AYIKNGQLF	+++
44	VYNTVSEGTHF	+++
45	RYFKTPRKF	++
47	SYTPVLNQF	++++
48	AWAPKPYHKF	+++
54	AYSEKVTEF	+++
55	LYFEKGEYF	++++
56	LFHPEDTGQVF	++
58	GYIDKVRQL	++
59	IYPDVTYAF	+++

Bảng 16B: 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 được đánh giá theo hiệu suất trao đổi peptit: $\geq 10\%$ = +; $\geq 20\%$ = ++; ≥ 50 = +++; $\geq 75\%$ = ++++

SEQ ID	Trình tự	Sự trao đổi peptit
1	VTAQIGIVAV	++++
2	SMLGEEIQL	++++
3	HLLEDIAHV	++++
4	ALLTFVWKL	++++
5	KIFSRLIYI	+++
6	ALLESRVNL	++++
7	TLLQVVGVS	++
9	GMLNEAEGKAIKL	+++
10	TLWRGPVVV	+++

SEQ ID	Trình tự	Sự trao đổi peptit
11	YLEEECPAT	++
13	AMAPNHAVV	+++
14	KMDEASAQLL	++
15	KMDEASAQLLA	+++
16	KMDEASAQL	+++
20	SLLSHQVLL	+++
21	YLNDSLRHV	++
22	SLYDSIAFI	++++
49	SLFHPEDTGQV	+++
52	ALGDLVQSV	+++
53	YLLKDKGEYTL	+++

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. Ngoài việc phân lập và định lượng tương đối peptit như được mô tả ở đây, các tác giả sáng chế đã phân tích số bản sao peptit tuyệt đối cho một tế bào như được mô tả. 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 mô 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 phân 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 phân 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 17.

Bảng 17: số bản sao tuyệt đối. Bảng này liệt kê kết quả định lượng peptit tuyệt đối trong các mẫu khối u. 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
1	OR51E2-001	+	13
2	GREB-001	++	14
3	NEFH-001	++	11
4	TRPM8-002	+++	6
5	TRPM8-003	++	6
6	PDE11-001	+	10
24	TRPM8-004	+++	15
26	RAB3B-001	++	15

27	KLK4-001	++++	16
28	TGFB3-001	+++	16
42	FKBP10-002	++	19
49	KLK3-004	+	15
50	LRRC26-001	++	13
54	KLK2-001	+++	16
55	ACPP-002	+++	15
56	KLK3-005	+++	16
57	FOLH1-005	+++	16

Tài liệu tham khảo

- Adachi, H. et al., *Oncogene* **23** (2004): 3495-3500
- Allison, J. P. et al., *Science* **270** (1995): 932-933
- American Cancer Society, (2015), www.cancer.org
- Ammendola, M. et al., *Biomed.Res.Int.* **2014** (2014): 154702
- Andersen, R. S. et al., *Nat.Protoc.* **7** (2012): 891-902
- Andres, S. A. et al., *BMC.Cancer* **13** (2013): 326
- Appay, V. et al., *Eur.J Immunol.* **36** (2006): 1805-1814
- Arentz, G. et al., *Clin Proteomics.* **8** (2011): 16
- Banchereau, J. et al., *Cell* **106** (2001): 271-274
- Bausch, D. et al., *Clin Cancer Res.* **17** (2011): 302-309
- Beatty, G. et al., *J Immunol* **166** (2001): 2276-2282
- Beggs, J. D., *Nature* **275** (1978): 104-109
- Benjamini, Y. et al., *Journal of the Royal Statistical Society.Series B (Methodological)*, **Vol.57** (1995): 289-300
- Bhosle, R. C. et al., *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **346** (2006): 768-777
- Bouameur, J. E. et al., *J Invest Dermatol.* **134** (2014): 885-894
- Boulter, J. M. et al., *Protein Eng* **16** (2003): 707-711
- Braumuller, H. et al., *Nature* (2013)
- Bresnick, E. H. et al., *Nucleic Acids Res.* **40** (2012): 5819-5831
- Brossart, P. et al., *Blood* **90** (1997): 1594-1599
- Bruckdorfer, T. et al., *Curr.Pharm.Biotechnol.* **5** (2004): 29-43
- Card, K. F. et al., *Cancer Immunol.Immunother.* **53** (2004): 345-357
- Chanock, S. J. et al., *Hum.Immunol.* **65** (2004): 1211-1223
- Chen, L. et al., *Med.Oncol* **30** (2013): 498
- Chong, I. W. et al., *Oncol Rep.* **16** (2006): 981-988
- Clemen, C. S. et al., *Acta Neuropathol.* **129** (2015): 297-315

- 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
- Davidson, B. et al., Hum.Pathol. **45** (2014): 691-700
- Deng, M. et al., Oncogene **32** (2013): 4273-4283
- Dengjel, J. et al., Clin Cancer Res **12** (2006): 4163-4170
- Denkberg, G. et al., J Immunol. **171** (2003): 2197-2207
- Dubrowskaja, N. et al., Cancer Med. (2014)
- Falk, K. et al., Nature **351** (1991): 290-296
- Faucz, F. R. et al., J Clin Endocrinol.Metab **96** (2011): E135-E140
- Fawcett, L. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **97** (2000): 3702-3707
- Fong, L. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **98** (2001): 8809-8814
- Forti, S. et al., Breast Cancer Res Treat. **73** (2002): 245-256
- Frattini, V. et al., Nat Genet. **45** (2013): 1141-1149
- Fu, C. A. et al., J Biol.Chem. **274** (1999): 30729-30737
- Gabrilovich, D. I. et al., Nat.Med **2** (1996): 1096-1103
- Gattinoni, L. et al., Nat.Rev.Immunol. **6** (2006): 383-393
- Gnjatic, S. et al., Proc Natl.Acad.Sci.U.S.A **100** (2003): 8862-8867
- Godkin, A. et al., Int.Immunol **9** (1997): 905-911
- Graddis, T. J. et al., Int.J Clin Exp.Pathol. **4** (2011): 295-306
- Green, M. R. et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual **4th** (2012)
- Greene, M. H. et al., Endocr.Relat Cancer **17** (2010): R109-R121
- Greenfield, E. A., Antibodies: A Laboratory Manual **2nd** (2014)
- Grunewald, T. G. et al., Biol.Cell **104** (2012): 641-657
- Gutman, G. A. et al., Pharmacol.Rev. **57** (2005): 473-508

- Haferlach, C. et al., *Haematologica* **96** (2011): 829-836
- Hale, L. P. et al., *Clinical Cancer Research* **7** (2001): 846-853
- Hallen, A. et al., *J Neurochem.* **118** (2011): 379-387
- Halpain, S. et al., *Genome Biol.* **7** (2006): 224
- Hanahan, D. et al., *Cell* **100** (2000): 57-70
- Hassan, M. I. et al., *Mol Cancer Res* **6** (2008): 892-906
- Higgins, G. et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **109** (2012): E3128-E3135
- Ho, L. L. et al., *Prostate* **68** (2008): 1421-1429
- Horvath, A. et al., *Curr.Opin.Endocrinol.Diabetes Obes.* **15** (2008): 227-233
- Hu, J. C. et al., *Gene* **251** (2000): 1-8
- Hwang, M. L. et al., *J Immunol.* **179** (2007): 5829-5838
- Hyodo, T. et al., *J Biol.Chem.* **287** (2012): 25019-25029
- Ito, S. et al., *Head Neck* **32** (2010a): 96-103
- Ito, Y. et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **107** (2010b): 10538-10542
- Jiao, X. et al., *BMC.Genomics* **14** (2013): 165
- Jin, Y. et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **110** (2013): E2572-E2581
- Jung, G. et al., *Proc Natl Acad Sci U S A* **84** (1987): 4611-4615
- Kai, F. et al., *Oncotarget.* **6** (2015): 11162-11174
- Kandimalla, R. et al., *Eur.Urol.* **61** (2012): 1245-1256
- Katada, K. et al., *J Proteomics.* **75** (2012): 1803-1815
- Katoh, Y. et al., *Cancer Biol.Ther.* **4** (2005): 1050-1054
- Kibbe, A. H., *Handbook of Pharmaceutical Excipients* **rd** (2000)
- Kibel, A. S. et al., *Int.J Cancer* **109** (2004): 668-672
- Kinameri, E. et al., *PLoS.ONE.* **3** (2008): e3859
- Klejnnot, M. et al., *Acta Crystallogr.D.Biol.Crystallogr.* **68** (2012): 154-159
- Krieg, A. M., *Nat.Rev.Drug Discov.* **5** (2006): 471-484
- Lapointe, J. et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **101** (2004): 811-816

- Laviolette, L. A. et al., *Int.J Cancer* **135** (2014): 1072-1084
- Lee, K. Y. et al., *J Med.* **35** (2004): 141-149
- Li, Y. W. et al., *PLoS.ONE.* **9** (2014): e87505
- Li, Z. J. et al., *Development* **139** (2012): 4152-4161
- Liddy, N. et al., *Nat.Med.* **18** (2012): 980-987
- Liu, P. et al., *Science* **261** (1993): 1041-1044
- Liu, Y. H. et al., *Biochem.Biophys.Res Commun.* **404** (2011): 488-493
- Ljunggren, H. G. et al., *J Exp.Med* **162** (1985): 1745-1759
- Longenecker, B. M. et al., *Ann N.Y.Acad.Sci.* **690** (1993): 276-291
- Lue, H. W. et al., *PLoS.ONE.* **6** (2011): e27720
- 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)
- Ma, Y. et al., *Mol Cell Proteomics.* **8** (2009): 1878-1890
- Malinowska, K. et al., *Prostate* **69** (2009): 1109-1118
- Matsumoto, F. et al., *Hum.Pathol.* **37** (2006): 1592-1600
- Matsuoka, R. et al., *Am.J Med.Genet.* **46** (1993): 61-67
- Meziere, C. et al., *J Immunol* **159** (1997): 3230-3237
- Midorikawa, Y. et al., *Jpn.J Cancer Res.* **93** (2002): 636-643
- Montani, M. et al., *Virchows Arch.* **462** (2013): 437-443
- Morgan, R. A. et al., *Science* **314** (2006): 126-129
- Mori, M. et al., *Transplantation* **64** (1997): 1017-1027
- Mortara, L. et al., *Clin Cancer Res.* **12** (2006): 3435-3443
- Mueller, L. N. et al., *J Proteome.Res.* **7** (2008): 51-61
- Mueller, L. N. et al., *Proteomics.* **7** (2007): 3470-3480
- Mumberg, D. et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **96** (1999): 8633-8638
- Nicke, B. et al., *Mol.Cell* **20** (2005): 673-685
- Nishibe, R. et al., *FEBS Lett.* **587** (2013): 1529-1535

- Nishidate, T. et al., *Int.J Oncol* **25** (2004): 797-819
- Noetzel, E. et al., *Oncogene* **29** (2010): 4814-4825
- Olesen, S. H. et al., *Mol Cell Proteomics*. **4** (2005): 534-544
- Peters, I. et al., *Target Oncol* (2014)
- Petrella, B. L. et al., *Cancer Lett.* **325** (2012): 220-226
- 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
- Prevarskaya, N. et al., *Biochim.Biophys.Acta* **1772** (2007): 937-946
- Quinn, D. I. et al., *Urol.Oncol* **33** (2015): 245-260
- Quinn, M. C. et al., *Int.J Oncol* **42** (2013): 912-920
- Rae, J. M. et al., *Prostate* **66** (2006): 886-894
- Rammensee, H. G. et al., *Immunogenetics* **50** (1999): 213-219
- RefSeq, The NCBI handbook [Internet], Chapter 18, (2002), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21091/>
- Rini, B. I. et al., *Cancer* **107** (2006): 67-74
- Rizzardi, A. E. et al., *BMC.Cancer* **14** (2014): 244
- Rock, K. L. et al., *Science* **249** (1990): 918-921
- Rotondo, F. et al., *Appl.Immunohistochem.Mol.Morphol.* **17** (2009): 185-188
- Russel, F. G. et al., *Trends Pharmacol.Sci.* **29** (2008): 200-207
- S3-Leitlinie Prostatakarzinom, **043/022OL**, (2014)
- Saiki, R. K. et al., *Science* **239** (1988): 487-491
- Sakai, T. et al., *J Pharmacol.Sci.* **98** (2005): 41-48
- Schmitt, M. et al., *Radiol.Oncol.* **47** (2013): 319-329
- Seeger, F. H. et al., *Immunogenetics* **49** (1999): 571-576
- SEER Stat facts, (2014), <http://seer.cancer.gov/>
- Severi, G. et al., *Cancer Med.* **3** (2014): 1266-1274

- Shaheduzzaman, S. et al., *Cancer Biol.Ther* **6** (2007): 1088-1095
- Sherman, F. et al., *Laboratory Course Manual for Methods in Yeast Genetics* (1986)
- Shkoda, A. et al., *PLoS.Biol.* **10** (2012): e1001376
- Singh-Jasuja, H. et al., *Cancer Immunol.Immunother.* **53** (2004): 187-195
- Small, E. J. et al., *J Clin Oncol.* **24** (2006): 3089-3094
- Sturm, M. et al., *BMC.Bioinformatics.* **9** (2008): 163
- Sudhof, T. C., *Neuron* **75** (2012): 11-25
- Sun, Z. et al., *J Proteome.Res* **13** (2014): 1593-1601
- Tan, L. Z. et al., *Am.J Pathol.* **183** (2013): 831-840
- Tan, P. Y. et al., *Mol.Cell Biol.* **32** (2012): 399-414
- Teufel, R. et al., *Cell Mol.Life Sci.* **62** (2005): 1755-1762
- Tran, E. et al., *Science* **344** (2014): 641-645
- Tsavalier, L. et al., *Cancer Research* **61** (2001): 3760-3769
- UniProt, (2015), <http://www.uniprot.org/>
- Walter, S. et al., *J.Immunol.* **171** (2003): 4974-4978
- Walter, S. et al., *Nat Med.* **18** (2012): 1254-1261
- Wang, J. et al., *Arch.Pharm.Res* **34** (2011): 987-995
- Wang, L. et al., *Cancer Research* **70** (2010): 5818-5828
- Wang, R. J. et al., *Asian Pac.J Cancer Prev.* **15** (2014): 7223-7228
- Wang, Y. et al., *Hum.Mol.Genet.* **21** (2012): 569-576
- Wang, Z. et al., *Med.Oncol* **32** (2015): 87
- Ward, P. P. et al., *Cell Mol Life Sci.* **62** (2005): 2540-2548
- Weng, J. et al., *Int.J Cancer* **113** (2005): 811-818
- Westdorp, H. et al., *Front Immunol.* **5** (2014): 191
- Whiteland, H. et al., *Clin Exp.Metastasis* **31** (2014): 909-920
- Willcox, B. E. et al., *Protein Sci.* **8** (1999): 2418-2423
- Willoughby, V. et al., *Appl.Immunohistochem.Mol.Morphol.* **16** (2008): 344-348

- Wilson, P. M. et al., J Neurosci. **30** (2010): 8529-8540
- World Cancer Report, (2014)
- Wu, J. P. et al., Asian J Androl **16** (2014): 710-714
- Yamamoto, G. L. et al., J Med.Genet. **52** (2015): 413-421
- Yang, Z. et al., J Virol. **81** (2007): 6294-6306
- Ye, Q. et al., PLoS.ONE. **9** (2014): e103298
- Yin, J. et al., Mol.Med.Rep. **8** (2013): 1630-1634
- Yu, Y. P. et al., Urology **68** (2006): 578-582
- Zaremba, S. et al., Cancer Res. **57** (1997): 4570-4577
- Zhang, G. et al., Oncol Rep. (2014)
- Zhao, X. et al., Onco.Targets.Ther **7** (2014): 343-351

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Peptit chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No. 4; hoặc muối được dụng của nó.
2. Peptit theo điểm 1, trong đó peptit này bao gồm các liên kết không peptit.
3. Protein dung hợp chứa peptit theo điểm 1 hoặc 2 và các axit amin ở đầu tận cùng N của chuỗi bất biến liên quan đến kháng nguyên HLA-DR (Ii).
4. Thụ thể tế bào T, tốt hơn nếu là thụ thể tế bào T hòa tan hoặc liên kết màng, tái tổ hợp, có khả năng phản ứng với phối tử HLA, trong đó phối tử này có mức độ giống ít nhất 88% với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No. 4, và tốt hơn là chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No. 4, tùy ý trong đó phối tử nêu trên là một phần của phức hợp MHC-peptit.
5. Kháng thể, cụ thể là kháng thể hòa tan hoặc liên kết màng, trong đó kháng thể này nhận biết đặc hiệu peptit theo điểm 1 hoặc 2, hoặc protein dung hợp theo điểm 3, tốt hơn nếu là peptit theo điểm 1 khi được gắn kết với phân tử MHC.
6. Axit nucleic mã hóa peptit theo điểm 1 hoặc thụ thể TCR theo điểm 4, hoặc kháng thể theo điểm 5, trong đó axit nucleic này được liên kết tùy ý với trình tự gen khởi đầu khác loại.
7. Vector biểu hiện biểu hiện axit nucleic theo điểm 6.
8. Tế bào chủ tái tổ hợp chứa peptit theo điểm 1, hoặc protein dung hợp theo điểm 3, hoặc axit nucleic theo điểm 6 hoặc vector biểu hiện theo điểm 7, trong đó tốt hơn nếu tế bào chủ này là tế bào trình diện kháng nguyên như tế bào đuôi gai để biểu hiện peptit hoặc protein dung hợp, hoặc trong đó tốt hơn nếu tế bào chủ nêu trên là tế bào T hoặc tế bào NK để biểu hiện kháng thể hoặc thụ thể tế bào T.
9. Phương pháp tạo ra peptit theo điểm 1, hoặc protein dung hợp theo điểm 3, hoặc thụ

thể tế bào T theo điểm 4, hoặc kháng thể theo điểm 5, trong đó phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ theo điểm 8 chứa peptit theo điểm 1 hoặc protein dung hợp theo điểm 3, hoặc biểu hiện axit nucleic theo điểm 6 hoặc vector biểu hiện theo điểm 7, và phân lập peptit hoặc protein dung hợp hoặc thụ thể TCR hoặc kháng thể ra khỏi tế bào chủ hoặc môi trường nuôi cấy của nó.

10. Phương pháp tạo ra các tế bào lymphô T hoạt hóa *in vitro*, phương pháp này bao gồm bước cho các tế bào T tiếp xúc *in vitro* với kháng nguyên được tải các phân tử MHC nhóm I của người được biểu hiện trên bề mặt của tế bào trình diện kháng nguyên thích hợp hoặc cấu trúc nhân tạo bắt chước tế bào trình diện kháng nguyên trong khoảng thời gian đủ để hoạt hóa các tế bào T này theo cách đặc hiệu kháng nguyên, trong đó kháng nguyên này là peptit theo điểm 1.
11. Tế bào lymphô T hoạt hóa được tạo ra bằng phương pháp theo điểm 10, trong đó tế bào này nhận biết chọn lọc tế bào chứa polypeptit có trình tự axit amin được nêu trong điểm 1.
12. Dược phẩm chứa ít nhất một hoạt chất được chọn từ nhóm bao gồm peptit theo điểm 1 hoặc 2, hoặc protein dung hợp theo điểm 3, axit nucleic theo điểm 6 hoặc vector biểu hiện theo điểm 7, tế bào theo điểm 8, tế bào lymphô T hoạt hóa theo điểm 11 hoặc kháng thể theo điểm 5 hoặc thụ thể tế bào T theo điểm 4, và chất mang dược dụng, và tùy ý, tá dược và/hoặc chất ổn định dược dụng bổ sung.
13. Kit bao gồm:
 - (a) đồ chứa để đựng dược phẩm chứa peptit theo điểm 1 hoặc 2, hoặc protein dung hợp theo điểm 3, axit nucleic theo điểm 6 hoặc vector biểu hiện theo điểm 7, tế bào theo điểm 8, tế bào lymphô T hoạt hóa theo điểm 11 hoặc kháng thể theo điểm 5 hoặc thụ thể tế bào T theo điểm 4, 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;
 - (c) tùy ý, ít nhất một peptit nữa được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự SEQ ID No.

1-3 và SEQ ID No. 5-48, và

- (d) tùy ý, hướng dẫn để (i) sử dụng dung dịch hoặc (ii) hoàn nguyên và/hoặc sử dụng sản phẩm dạng đông khô nhanh; và
- (e) tùy ý, kit này còn chứa một hoặc nhiều thành phần trong số (iii) chất đệm, (iv) chất pha loãng, (v) dụng cụ lọc, (vi) kim tiêm, hoặc (v) bơm tiêm.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Immatics biotechnologies GmbH

<120> Peptit để sử dụng trong liệu pháp miễn dịch, protein dung hợp
và tế bào chứa peptit này, được phẩm và phương pháp tạo ra peptit

<130> I32881WO

<150> GB1513921.5

<151> 2015-08-06

<150> US62/201,289

<151> 2015-08-05

<160> 61

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 1

Val Thr Ala Gln Ile Gly Ile Val Ala Val
1 5 10

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 2

Ser Met Leu Gly Glu Glu Ile Gln Leu
1 5

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 3

His Leu Leu Glu Asp Ile Ala His Val
1 5

<210> 4

<211> 9

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 4

Ala Leu Leu Thr Phe Val Trp Lys Leu

1 5

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

<400> 5

Lys Ile Phe Ser Arg Leu Ile Tyr Ile
 1 5

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

<400> 6

Ala Leu Leu Glu Ser Arg Val Asn Leu
 1 5

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

<400> 7

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

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

<400> 8

Leu Leu Asp Phe Ser Leu Ala Asp Ala
 1 5

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

<400> 9

Gly Met Leu Asn Glu Ala Glu Gly Lys Ala Ile Lys Leu
 1 5 10

<210> 10
 <211> 9

<212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 10

Thr Leu Trp Arg Gly Pro Val Val Val
 1 5

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

<400> 11

Tyr Leu Glu Glu Glu Cys Pro Ala Thr
 1 5

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

<400> 12

Ser Leu Asn Glu Glu Ile Ala Phe Leu
 1 5

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

<400> 13

Ala Met Ala Pro Asn His Ala Val Val
 1 5

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

<400> 14

Lys Met Asp Glu Ala Ser Ala Gln Leu Leu
 1 5 10

<210> 15
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 15

Lys Met Asp Glu Ala Ser Ala Gln Leu Leu Ala
1 5 10

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

<400> 16

Lys Met Asp Glu Ala Ser Ala Gln Leu
1 5

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

<400> 17

Arg Leu Gly Ile Lys Pro Glu Ser Val
1 5

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

<400> 18

Gly Leu Ser Glu Phe Thr Glu Tyr Leu
1 5

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

<400> 19

Leu Leu Pro Pro Pro Pro Leu Leu Ala
1 5

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

<400> 20

Ser Leu Leu Ser His Gln Val Leu Leu
1 5

<210> 21

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

<400> 21

Tyr Leu Asn Asp Ser Leu Arg His Val
 1 5

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

<400> 22

Ser Leu Tyr Asp Ser Ile Ala Phe Ile
 1 5

<210> 23
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 23

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

<210> 24
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 24

Ser Tyr Asn Asp Ala Leu Leu Thr Phe
 1 5

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

<400> 25

Ile Tyr Glu Pro Tyr Leu Ala Met Phe
 1 5

<210> 26
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 26

Arg Tyr Ala Asp Asp Thr Phe Thr Pro Ala Phe
1 5 10

<210> 27
<211> 9
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 27

Gly Tyr Leu Gln Gly Leu Val Ser Phe
1 5

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

<400> 28

Tyr Tyr Ala Lys Glu Ile His Lys Phe
1 5

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

<400> 29

Arg Tyr Gly Ser Pro Ile Asn Thr Phe
1 5

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

<400> 30

Ser Tyr Ser Pro Ala His Ala Arg Leu
1 5

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

<400> 31

Ala Tyr Thr Ser Pro Pro Ser Phe Phe
1 5

<210> 32
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 32

Pro Tyr Gln Leu Asn Ala Ser Leu Phe Thr Phe
 1 5 10

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

<400> 33

Gln Tyr Gly Lys Asp Phe Leu Thr Leu
 1 5

<210> 34
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 34

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

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

<400> 35

Ile Tyr Thr Arg Val Thr Tyr Tyr Leu
 1 5

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

<400> 36

Arg Tyr Met Trp Ile Asn Gln Glu Leu
 1 5

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

<400> 37

Arg Tyr Leu Gln Asp Leu Leu Ala Trp
1 5

<210> 38

<211> 9

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 38

Val Tyr Ser Asp Lys Leu Trp Ile Phe
1 5

<210> 39

<211> 9

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 39

Ser Tyr Ile Asp Val Ala Val Lys Leu
1 5

<210> 40

<211> 9

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 40

Arg Thr Phe Ser Pro Thr Tyr Gly Leu
1 5

<210> 41

<211> 9

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 41

Arg Tyr Leu Gln Lys Ile Glu Glu Phe
1 5

<210> 42

<211> 9

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 42

Thr Tyr Ile Gly Gln Gly Tyr Ile Ile
1 5

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

<400> 43

Ala Tyr Ile Lys Asn Gly Gln Leu Phe
 1 5

<210> 44
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 44

Val Tyr Asn Thr Val Ser Glu Gly Thr His Phe
 1 5 10

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

<400> 45

Arg Tyr Phe Lys Thr Pro Arg Lys Phe
 1 5

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

<400> 46

Val Tyr Glu Glu Ile Leu His Gln Ile
 1 5

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

<400> 47

Ser Tyr Thr Pro Val Leu Asn Gln Phe
 1 5

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

<400> 48

Ala Trp Ala Pro Lys Pro Tyr His Lys Phe
 1 5 10

<210> 49

<211> 11

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 49

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

<210> 50

<211> 9

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 50

Thr Leu Gly Pro Ala Ser Phe Leu Val
 1 5

<210> 51

<211> 9

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 51

Ala Met Phe Asp Lys Lys Val Gln Leu
 1 5

<210> 52

<211> 9

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 52

Ala Leu Gly Asp Leu Val Gln Ser Val
 1 5

<210> 53

<211> 11

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 53

Tyr Leu Leu Lys Asp Lys Gly Glu Tyr Thr Leu
 1 5 10

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

<400> 54

Ala Tyr Ser Glu Lys Val Thr Glu Phe
 1 5

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

<400> 55

Leu Tyr Phe Glu Lys Gly Glu Tyr Phe
 1 5

<210> 56
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 56

Leu Phe His Pro Glu Asp Thr Gly Gln Val Phe
 1 5 10

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

<400> 57

Lys Tyr Ala Asp Lys Ile Tyr Ser Ile
 1 5

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

<400> 58

Gly Tyr Ile Asp Lys Val Arg Gln Leu
 1 5

<210> 59
 <211> 9
 <212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 59

Ile Tyr Pro Asp Val Thr Tyr Ala Phe
1 5

<210> 60

<211> 10

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 60

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

<210> 61

<211> 9

<212> PRT

<213> Người hiện đại

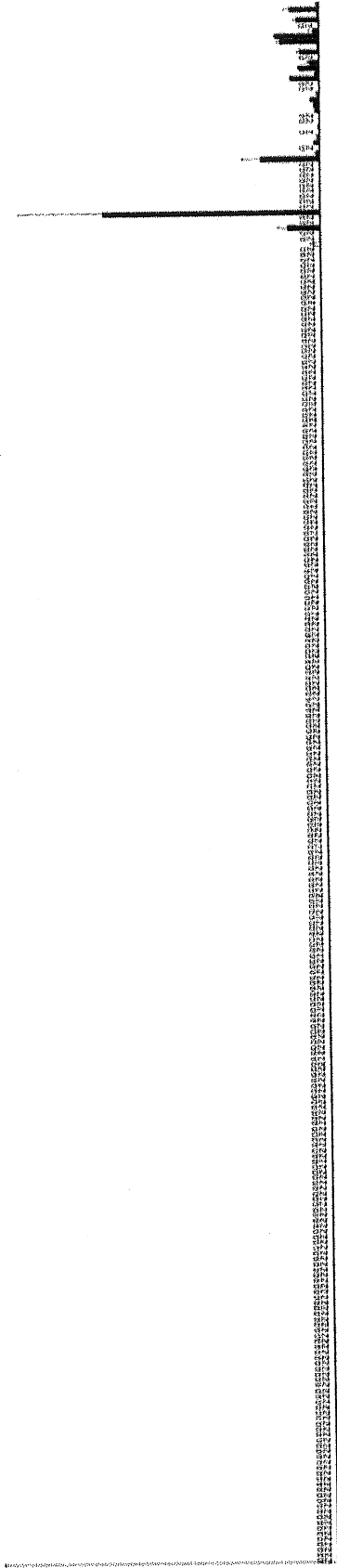
<400> 61

Tyr Leu Leu Pro Ala Ile Val His Ile
1 5

- 2 -

Fig.1A
Peptit: VTAQIGIVAV (A*02)
SEQ ID NO: 1

Sự biểu hiện tương đối [đơn vị tùy ý]



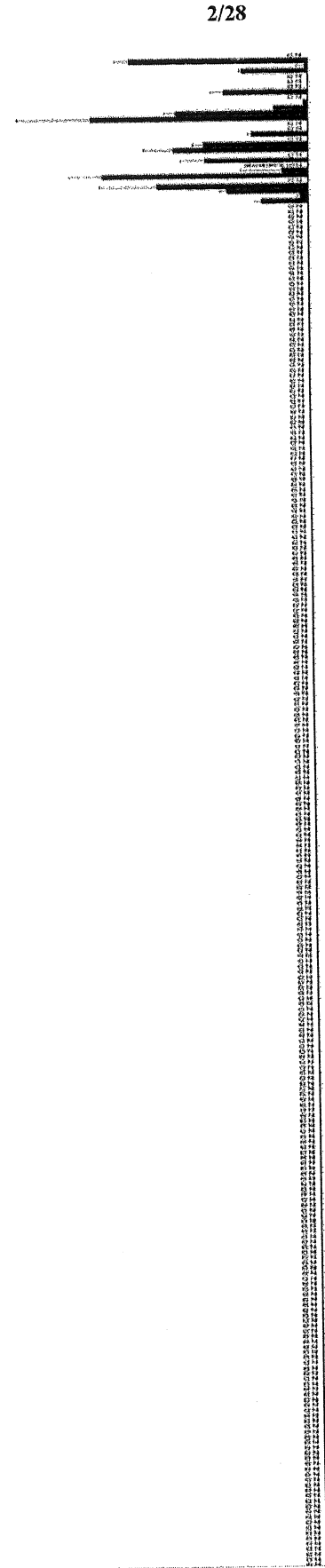
245 mô bình thường
1 mô mỡ, 3 tuyến thượng thận, 6 động mạch, 5 tùy xương, 7 não, 3 vú, 1 dây thần kinh trung ương, 13 ruột kết, 1 tá tràng, 8 thực quản, 2 túi mật, 5 tim, 16 thận, 21 gan, 46 phổi, 4 hạch bạch huyết, 4 mẫu bạch cầu, 4 buồng trứng, 7 tụy, 4 dây thần kinh ngoại vi, 1 màng bụng, 3 tuyến yên, 4 nhau thai, 3 màng phổi, 6 trực tràng, 7 tuyến nước bọt, 4 cơ xương, 6 da, 2 ruột non, 4 lách, 7 dạ dày, 4 tinh hoàn, 3 tuyến ức, 4 tuyến giáp, 10 khí quản, 3 niệu quản, 6 bàng quang, 2 tử cung, 2 tĩnh mạch, 3 tuyến tiền liệt (từ trái sang phải)

34 mô ung thư tuyến tiền liệt và 10 mô tăng sản tuyến tiền liệt lành tính

Fig.1B

Peptit: KMDEASAQLL (A*02)
SEQ ID NO: 14

Sự biểu hiện tương đối [đơn vị tùy ý]



245 mô bình thường
1 mô mỡ, 3 tuyến thượng thận, 6 động mạch, 5 tủy xương, 7 não, 3 vú, 1 dây thần kinh trung ương, 13 ruột kết, 1 tá tràng, 8 thực quản, 2 túi mật, 5 tim, 16 thận, 21 gan, 46 phổi, 4 hạch bạch huyết, 4 mẫu bạch cầu, 4 buồng trứng, 7 tủy, 4 dây thần kinh ngoại vi, 1 màng bụng, 3 tuyến yên, 4 nhau thai, 3 màng phổi, 6 trực tràng, 7 tuyến nước bọt, 4 cơ xương, 6 da, 2 ruột non, 4 lách, 7 dạ dày, 4 tinh hoàn, 3 tuyến ức, 4 tuyến giáp, 10 khí quản, 3 niệu quản, 6 bàng quang, 2 tử cung, 2 tĩnh mạch, 3 tuyến tiền liệt (từ trái sang phải)

34 mô ung thư tuyến
tiền liệt và
10 mô tăng sản tuyến
tiền liệt lành tính

3/28

Fig.1C

Peptit: SYNDALLTF (A*24)

SEQ ID NO: 24

Sự biến hiện tương đối [đơn vị tùy ý]

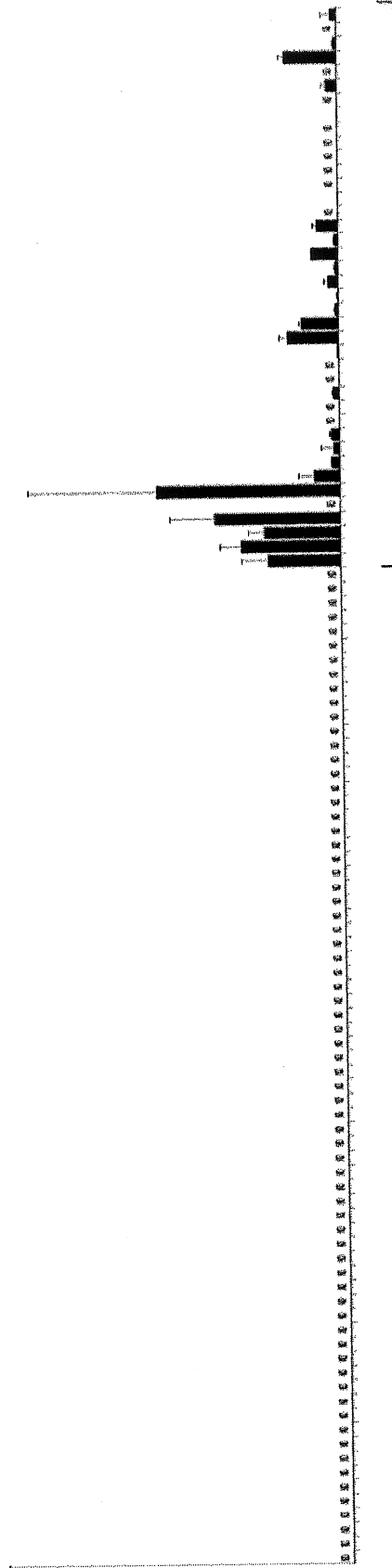
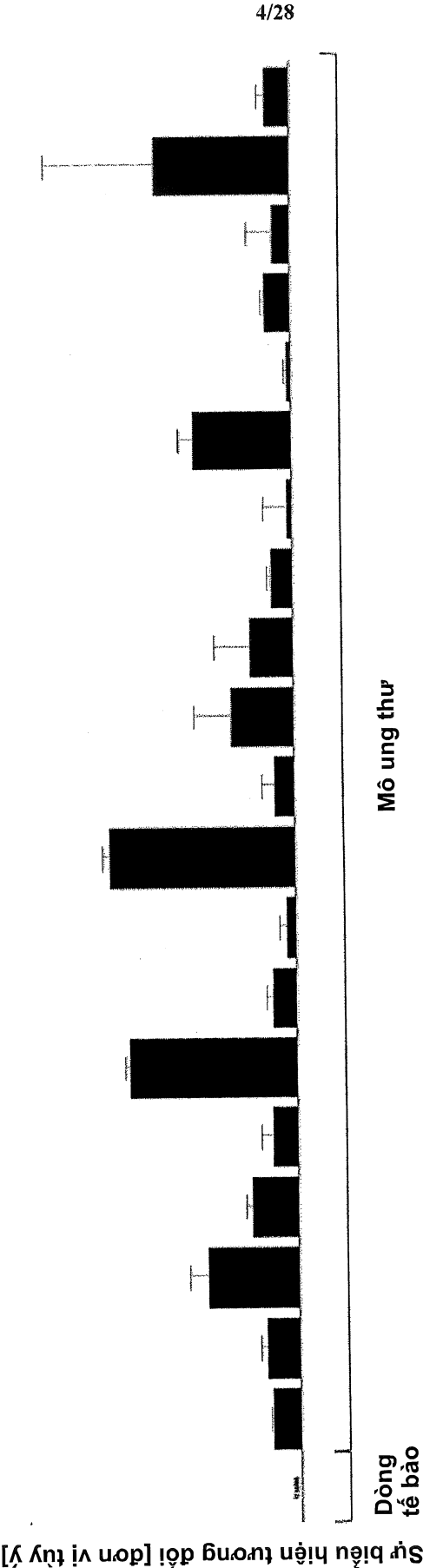
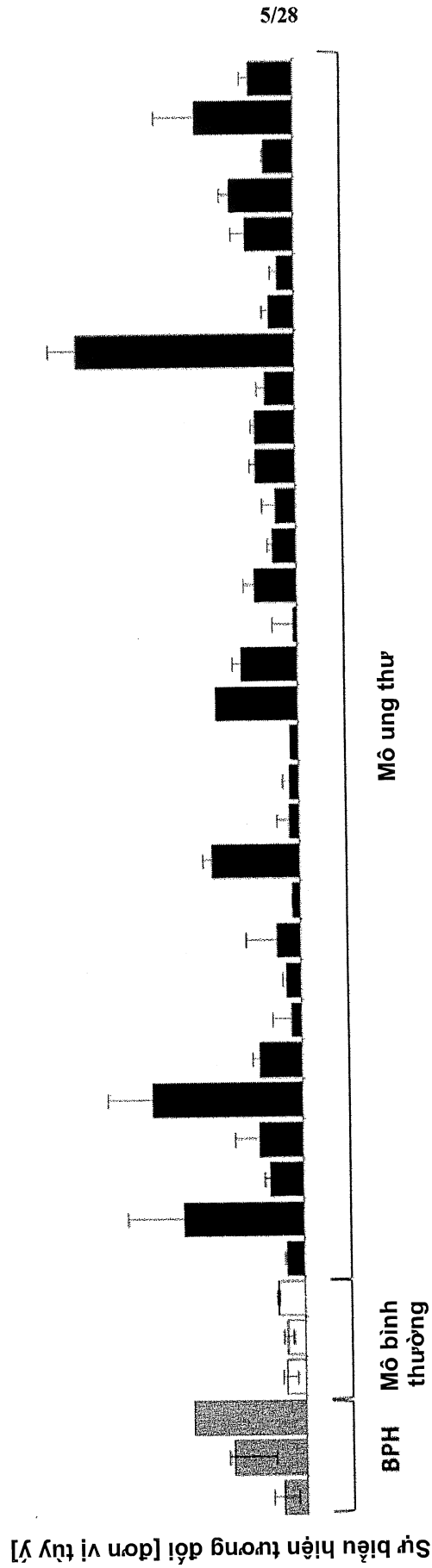


Fig.1D
Peptit: SLLSHQVLL (A*02)
SEQ ID NO: 20



Peptit được phát hiện trên
1 dòng tế bào (tủy), 20 mô ung thư (1 bệnh ung thư não, 1 bệnh ung thư vú, 2 bệnh ung thư ruột kết, 1 bệnh ung thư thực
quần, 1 bệnh ung thư thận, 1 bệnh ung thư gan, 3 bệnh ung thư phổi, 8 bệnh ung thư tuyến tiền liệt, 1 bệnh ung thư dạ dày,
1 bệnh ung thư bàng quang) (từ trái sang phải)

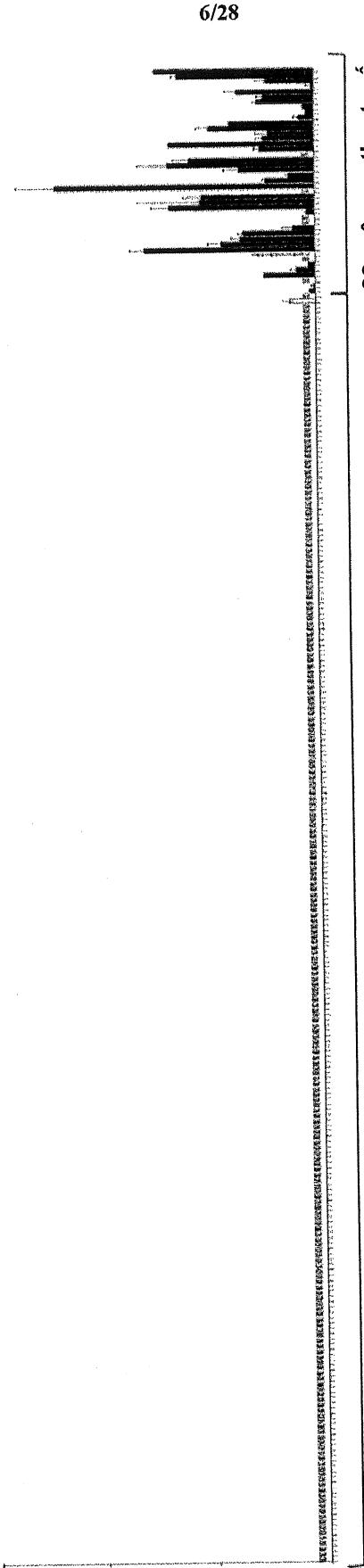
Fig.1E
 Peptit: QYGKDFLTL (A*24)
 SEQ ID NO: 33



Peptit được phát hiện trên
 3 mô tăng sản tuyến tiền liệt lành tính (BPH), 3 mô bình thường (1 gan, 1 phổi, 1 trực tràng), 31 mô ung thư (5 bệnh ung thư não,
 4 bệnh ung thư gan, 15 bệnh ung thư phổi, 7 bệnh ung thư tuyến tiền liệt) (từ trái sang phải)

Fig.1F
Peptit: HLEDIAHV (A*02)
SEQ ID NO: 3

Sự biểu hiện tương đối [đơn vị tùy ý]

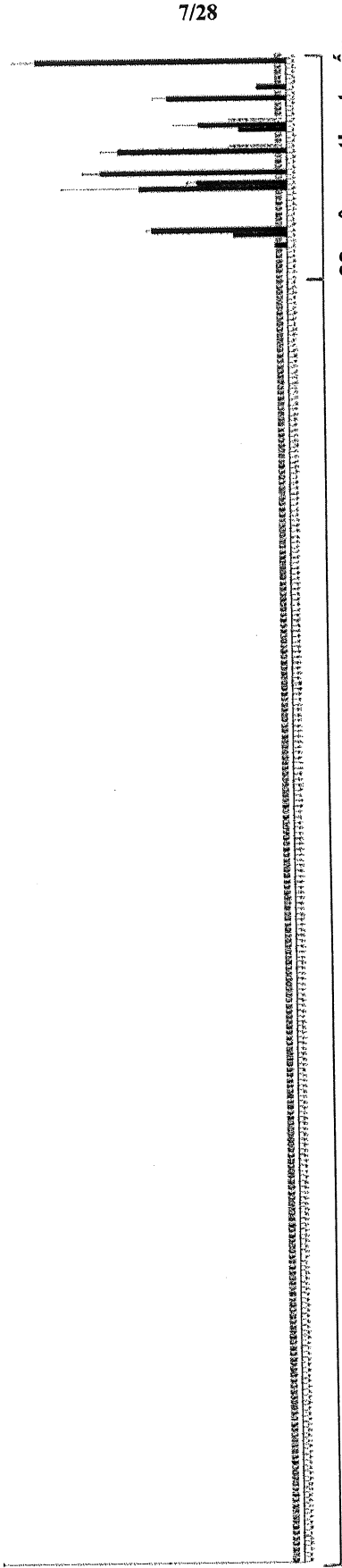


240 mô bình thường
1 mô mỡ, 3 tuyến thượng thận, 6 động mạch, 5 tủy xương, 7 não, 3 vú, 1 dây thần kinh trung ương, 13 ruột kết, 1 tá tràng, 8 thực quản, 2 túi mật, 5 tim, 16 thận, 4 mẫu bạch cầu, 21 gan, 46 phổi, 4 hạch bạch huyết, 3 buồng trứng, 7 tụy, 4 dây thần kinh ngoại vi, 1 màng bụng, 3 tuyến yên, 2 nhau thai, 3 màng phổi, 6 trực tràng, 7 tuyến nước bọt, 4 cơ xương, 5 da, 2 ruột non, 4 lách, 7 dạ dày, 4 tinh hoàn, 3 tuyến ức, 4 tuyến giáp, 9 khí quản, 3 niệu quản, 6 bàng quang, 2 tử cung, 2 tinh mạch, 3 tuyến tiền liệt (từ trái sang phải)

33 mô ung thư tuyến tiền liệt và
10 mô tăng sản tuyến tiền liệt lành tính

Fig.1G
Peptit: ALLESRVNL (A*02)
SEQ ID NO: 6

Sự biến hiện tương đối [đơn vị tùy ý]



240 mô bình thường
1 mô mỡ, 3 tuyến thượng thận, 6 động mạch, 5 tủy xương, 7 não, 3 vú, 1 dây thần kinh trung ương, 13 ruột kết, 1 tá tràng, 8 thực quản, 2 túi mật, 5 tim, 16 thận, 4 mẫu bạch cầu, 21 gan, 46 phổi, 4 hạch bạch huyết, 3 buồng trứng, 7 tụy, 4 dây thần kinh ngoại vi, 1 màng bụng, 3 tuyến yên, 2 nhau thai, 3 màng phổi, 6 trực tràng, 7 tuyến nước bọt, 4 cơ xương, 5 da, 2 ruột non, 4 lách, 7 dạ dày, 4 tinh hoàn, 3 tuyến ức, 4 tuyến giáp, 9 khí quản, 3 niệu quản, 6 bàng quang, 2 tử cung, 2 tĩnh mạch, 3 tuyến tiền liệt (từ trái sang phải)

33 mô ung thư tuyến
tiền liệt và
10 mô tăng sản tuyến
tiền liệt lành tính

Sự biến hiện tương đối [đơn vị tủy ý]

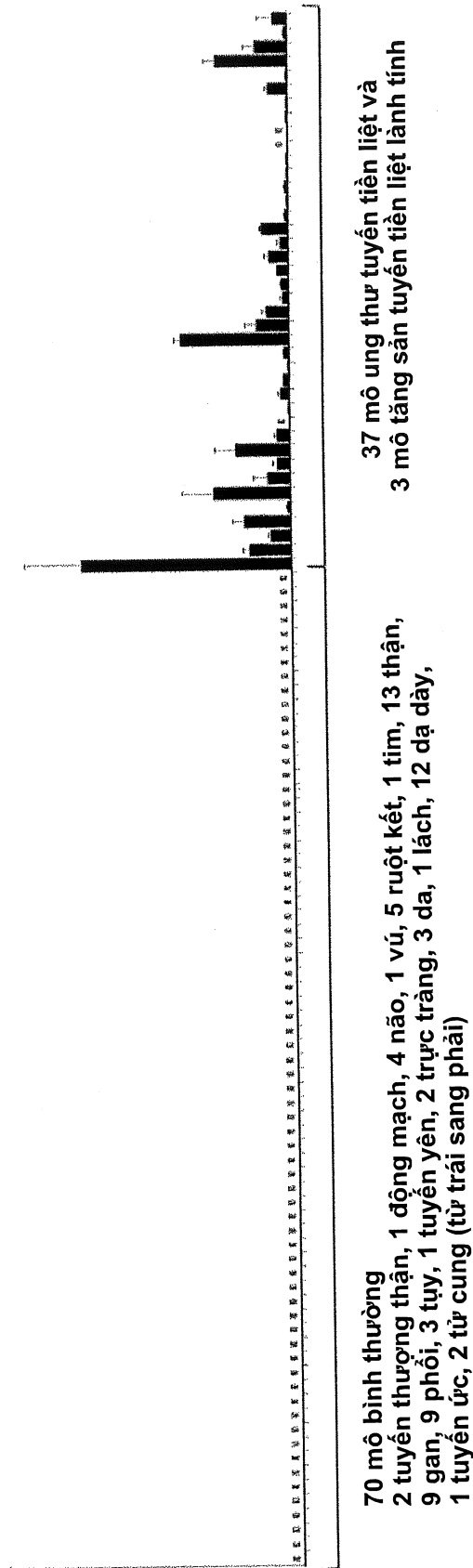


Fig.11
Peptit: YYAKEIHKF (A*24)
SEQ ID NO: 28

Sự biến hiện tương đối [đơn vị tùy ý]

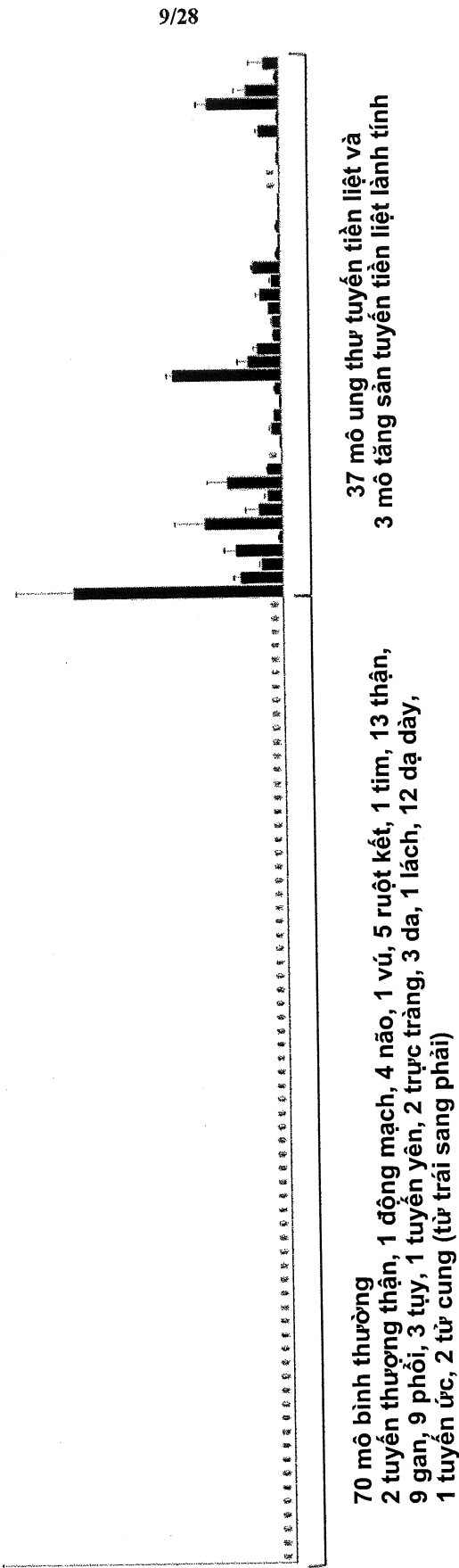


Fig.1J
Peptit: SLFHPEDTGQV (A*02)
SEQ ID NO: 49

Sự biểu hiện tương đối [đơn vị tùy ý]

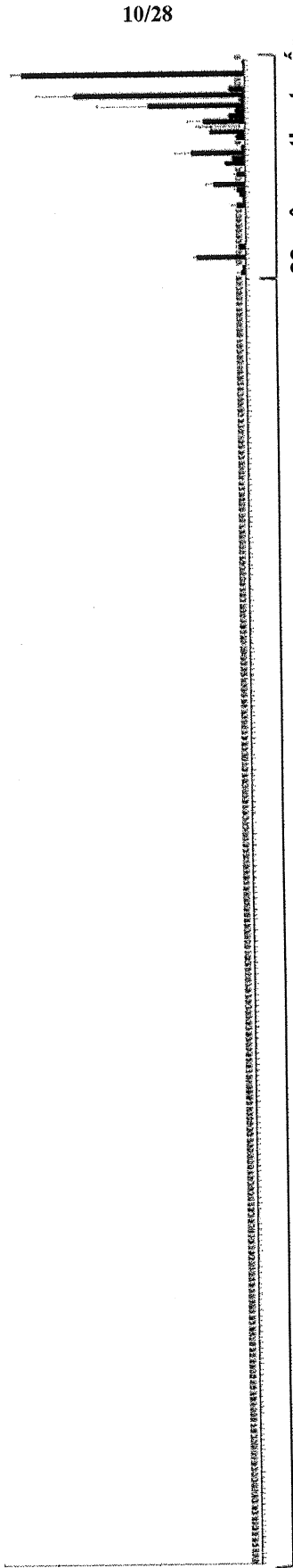


Fig.1K
Peptit: AYSEKVTET (A*24)
SEQ ID NO: 54

Sự biểu hiện tương đối [đơn vị tùy ý]

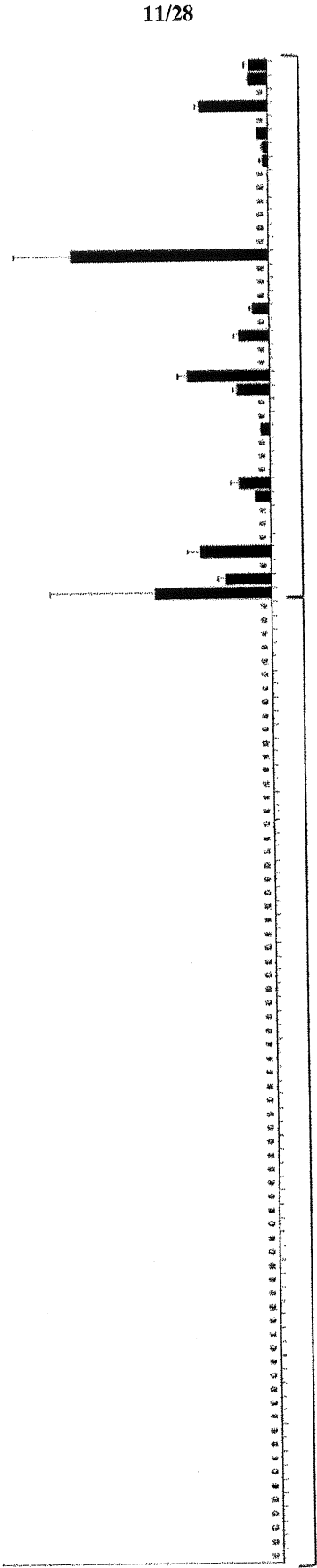
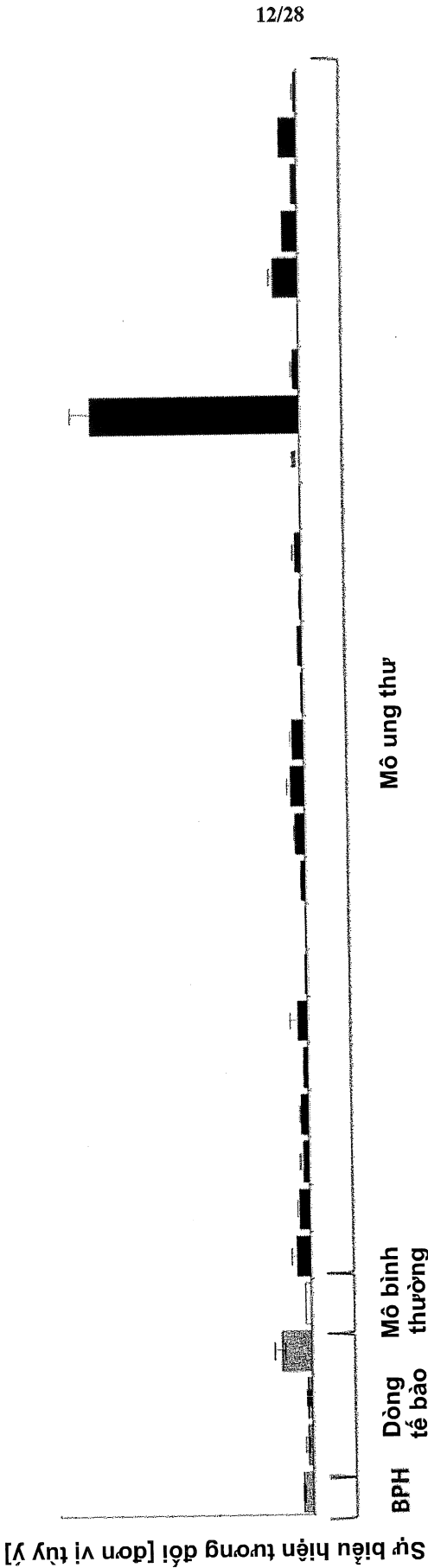
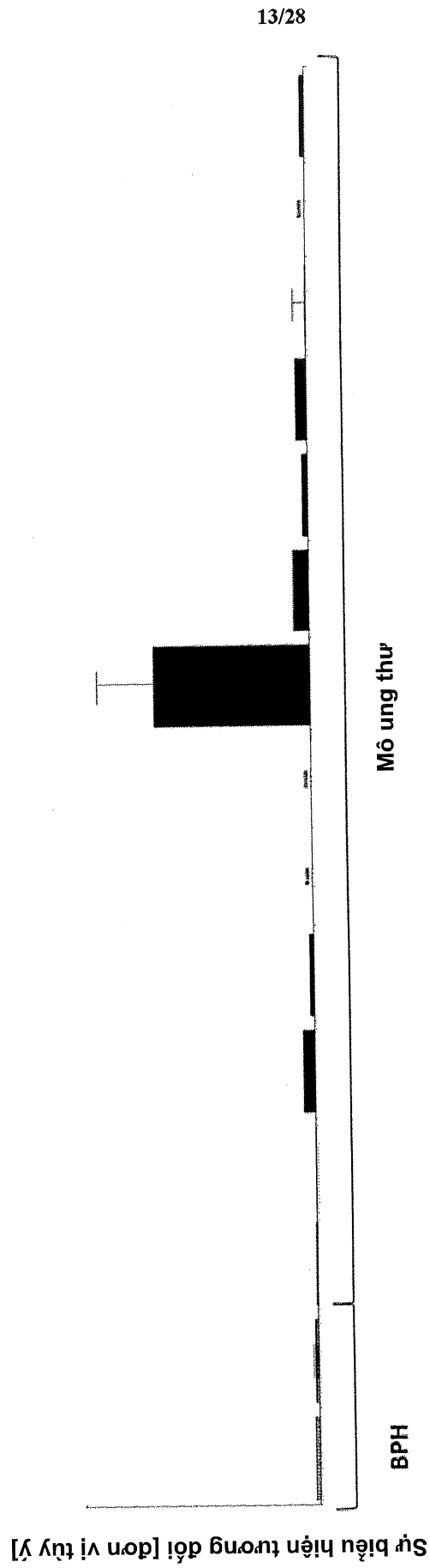


Fig.1L
Peptit: SMLGEEIQL (A*02)
SEQ ID NO: 2



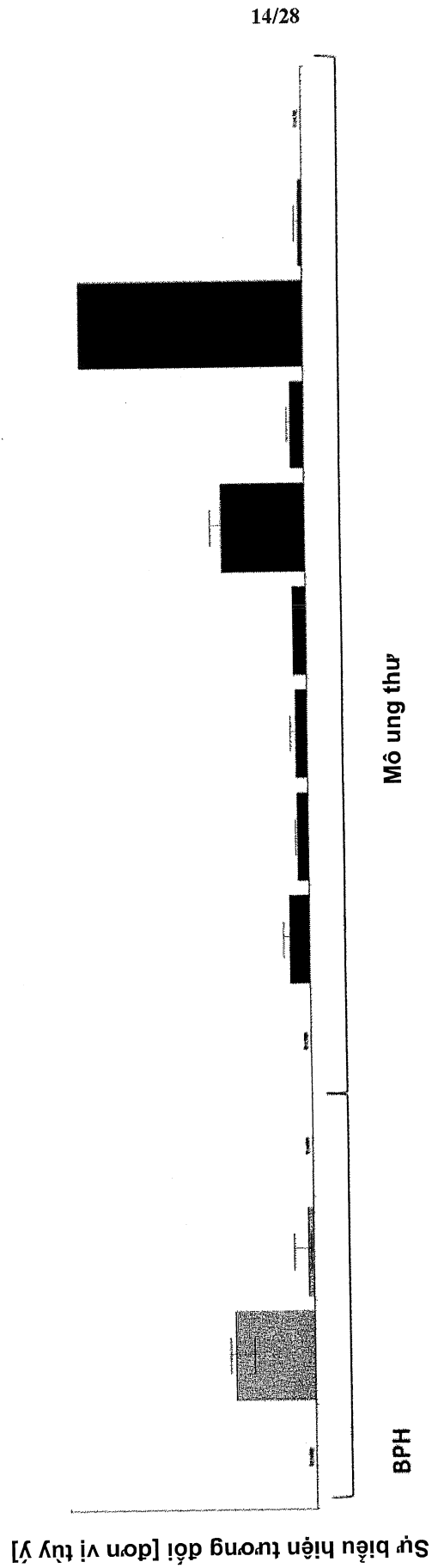
Peptit được phát hiện trên
1 mô tăng sản tuyến tiền liệt lành tính (BPH), 3 dòng tế bào (3 da), 1 mô bình thường (1 tử cung), 26 mô ung thư (2 bệnh ung thư vú, 2 bệnh ung thư gan, 1 bệnh ung thư phổi, 1 bệnh ung thư buồng trứng, 13 bệnh ung thư tuyến tiền liệt, 6 bệnh ung thư da, 1 bệnh ung thư tử cung (từ trái sang phải))

Fig.1M
 Peptit: ALLTFVWKL (A*02)
 SEQ ID NO: 4



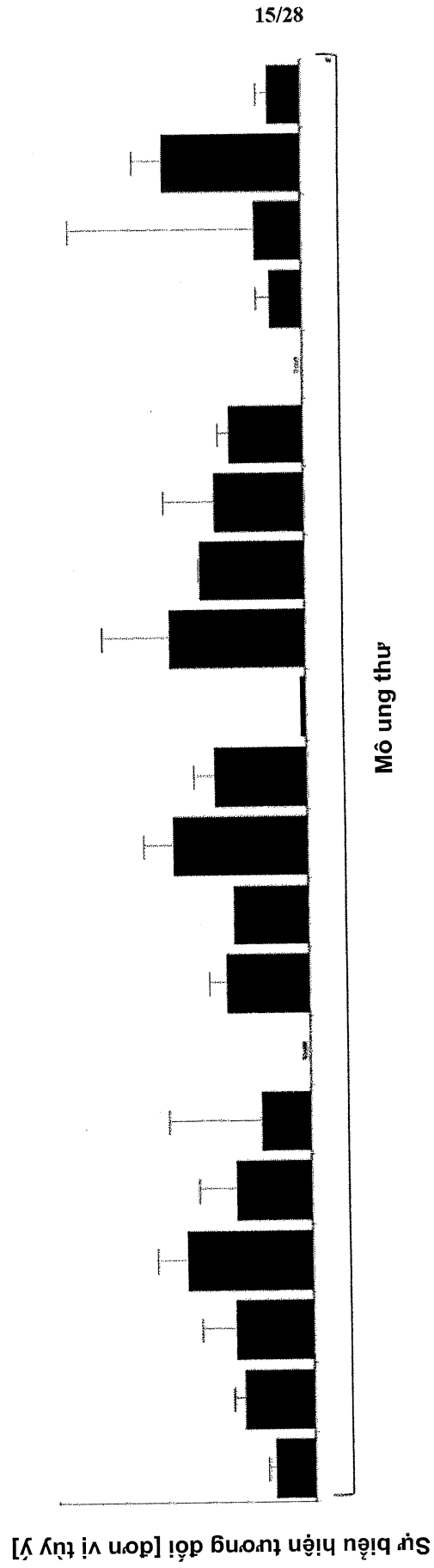
Peptit được phát hiện trên
 3 mô tăng sản tuyến tiền liệt lành tính (BPH), 13 mô ung thư (1 bệnh ung thư tuyến tiền liệt)
 (từ trái sang phải)

Fig.1N
 Peptit: KIFSRLIYI (A*02)
 SEQ ID: 5



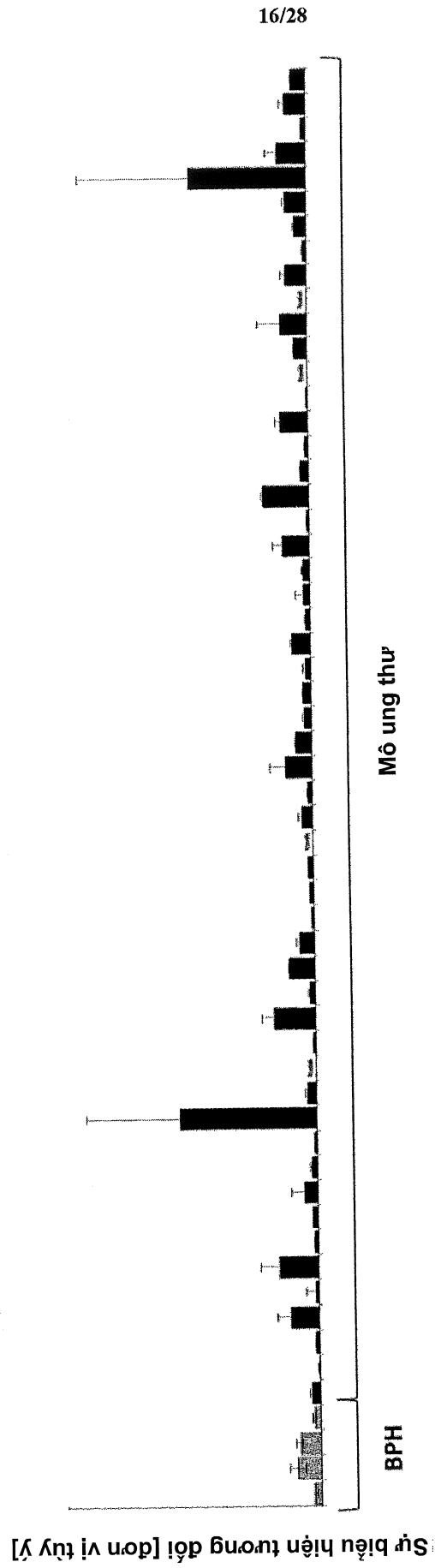
Peptit được phát hiện trên
 4 mô tăng sản tuyến tiền liệt lành tính (BPH), 10 mô ung thư (1 bệnh ung thư não, 8 bệnh ung thư tuyến tiền liệt,
 1 bệnh ung thư da) (từ trái sang phải)

Fig.10
 Peptit: KMDEASAQL (A*02)
 SEQ ID: 16



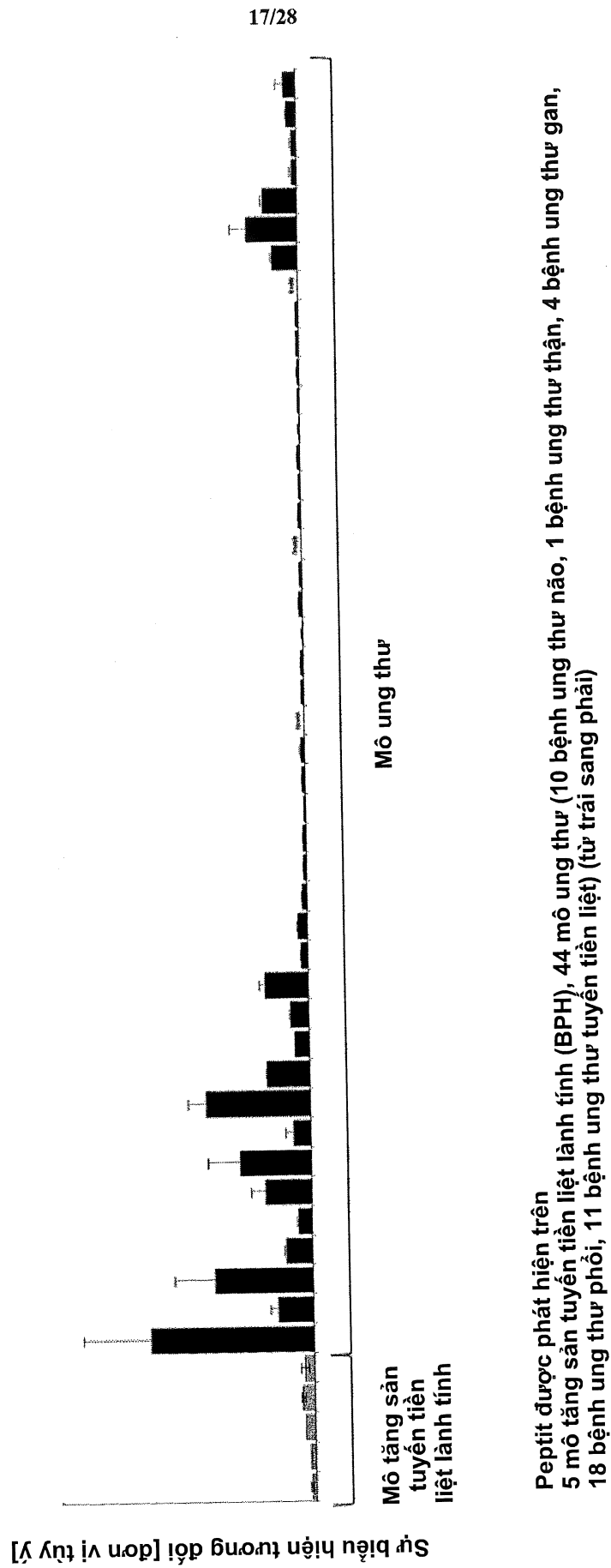
Peptit được phát hiện trên
 21 mô ung thư (20 bệnh ung thư tuyến tiền liệt, 1 bệnh ung thư bàng quang) (từ trái sang phải)

Fig.1P
 Peptit: RYGGSPINTF (A*24)
 SEQ ID NO: 29



Peptit được phát hiện trên
 4 mô tăng sản tuyến tiền liệt lành tính (BPH), 54 mô ung thư (1 bệnh ung thư gan, 24 bệnh ung thư phổi, 26 bệnh ung thư
 tuyến tiền liệt, 3 bệnh ung thư dạ dày) (từ trái sang phải)

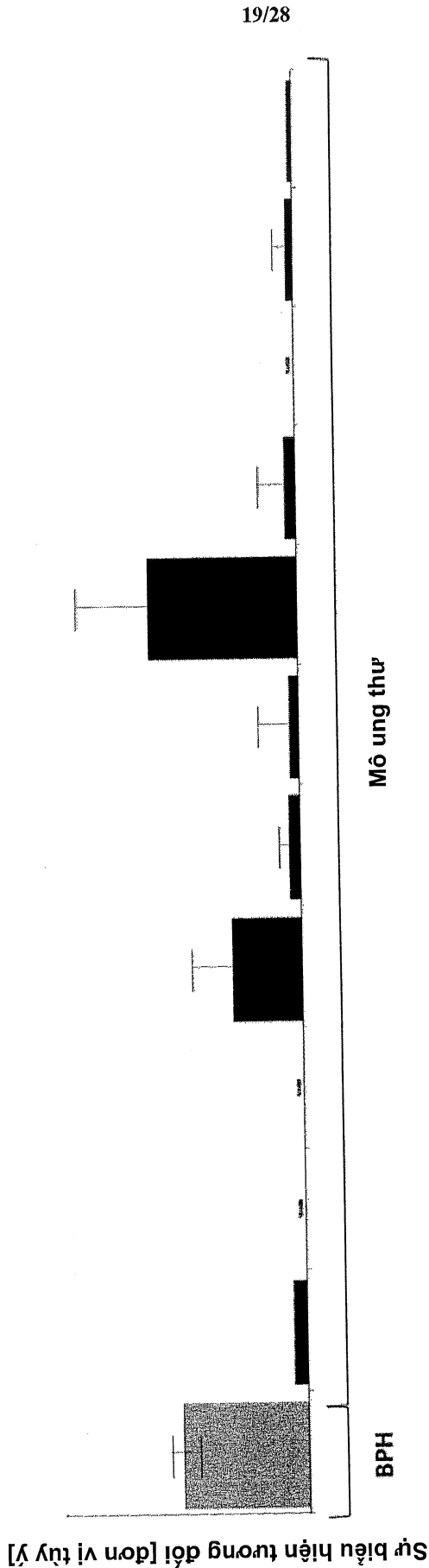
Fig.1Q
 Peptit: AFSPDSHYLLF (A*24)
 SEQ ID NO: 34



Sự biến hiện tương đối [đơn vị tùy ý]



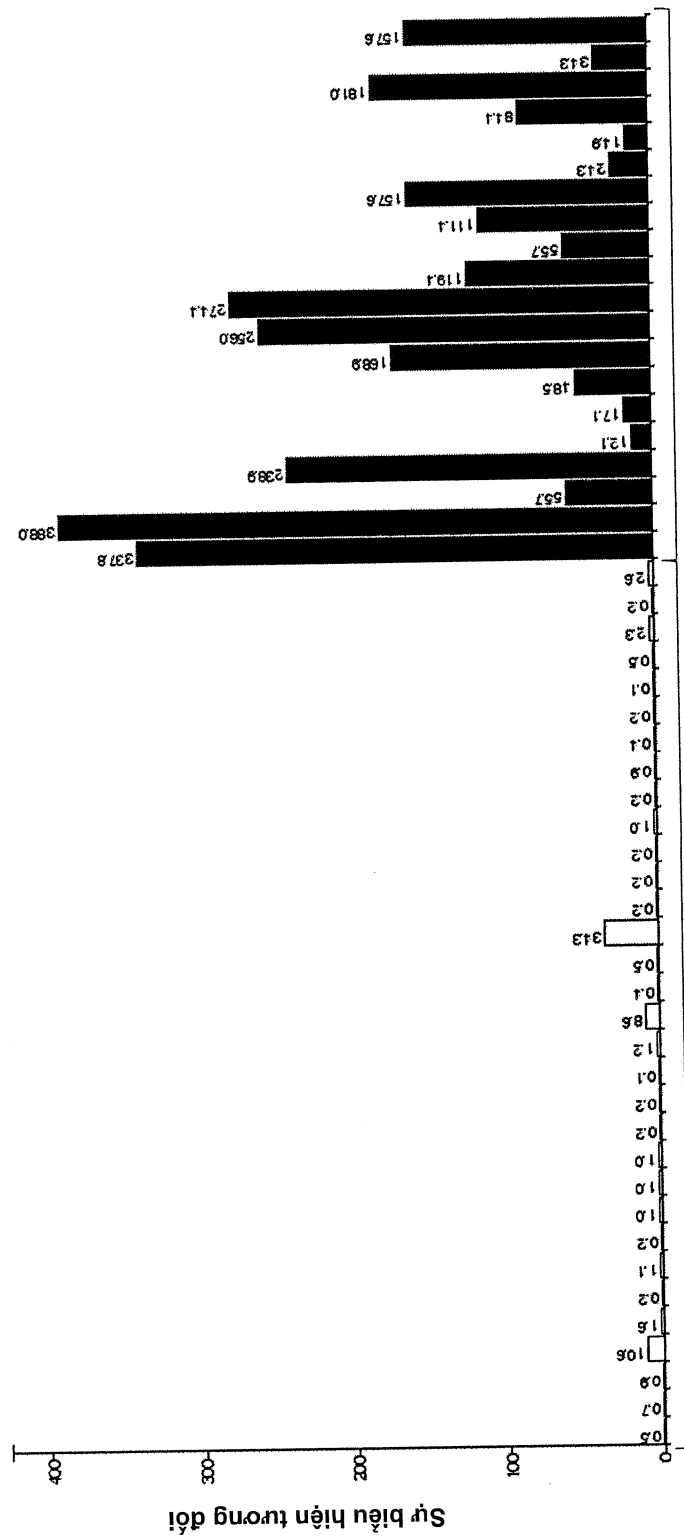
Fig.1S
Peptit: ALGDLVQSV (A*02)
SEQ ID NO: 52



Peptit được phát hiện trên
1 mô tăng sản tuyến tiền liệt lành tính (BPH), 11 mô ung thư (1 bệnh ung thư hạch bạch huyết, 9 bệnh ung thư tuyến tiền liệt,
1 bệnh ung thư da) (từ trái sang phải)

Fig.2A

Gen: NEFH

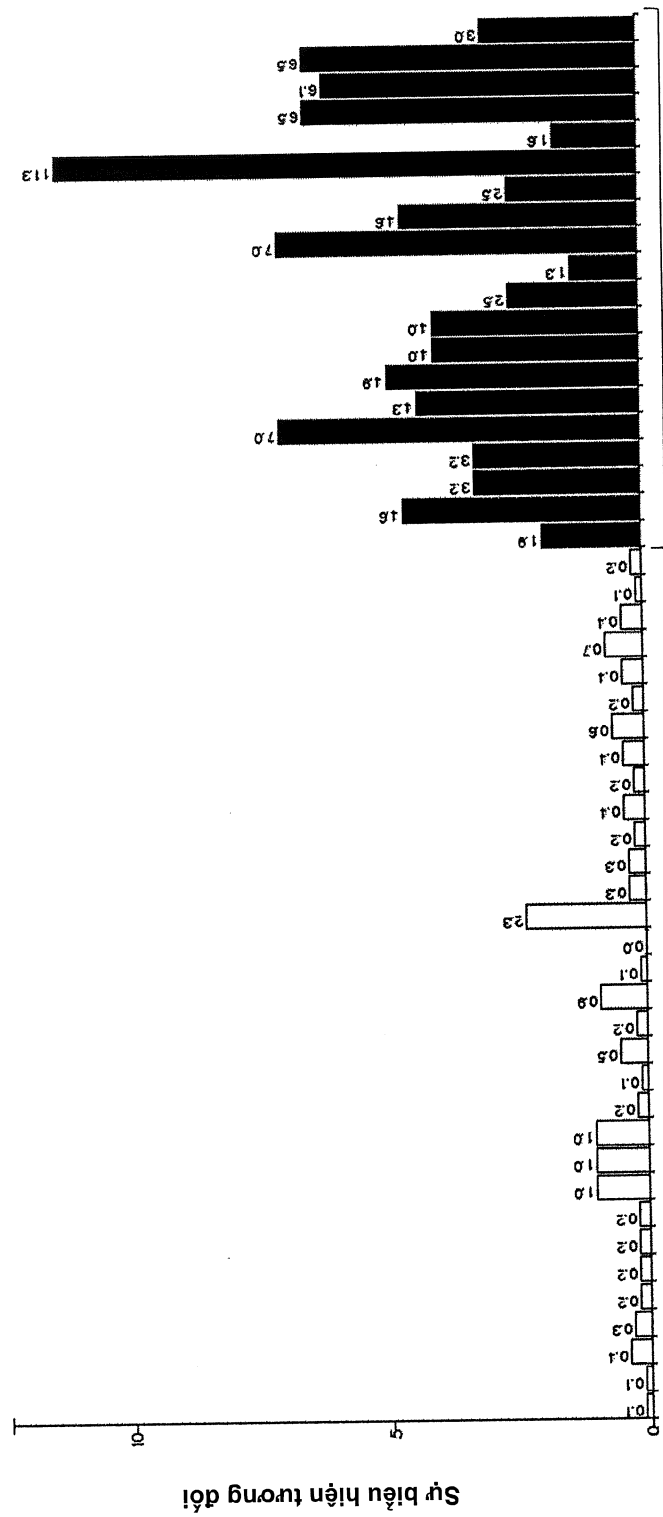


20 mẫu ung thư tuyến tiền liệt

Các mẫu mô bình thường (mỗi mẫu là hỗn hợp mẫu của vài người cho):
 tuyến thượng thận, động mạch, tủy xương, não (toàn phần), vú, ruột kết,
 thực quản, tim, thận (ba mẫu), bạch cầu, gan, phổi, hạch bạch huyết,
 buồng trứng, tụy, nhau thai, tuyến tiền liệt, tuyến nước bọt, cơ xương,
 da, ruột non, lách, dạ dày, tinh hoàn, tuyến ức, tuyến giáp, bàng quang,
 cổ tử cung, tử cung, tĩnh mạch (từ trái sang phải)

Fig.2B

Gen: ABCC4



20 mẫu ung thư tuyến tiền liệt

Các mẫu mô bình thường (mỗi mẫu là hỗn hợp mẫu của vài người cho):
 tuyến thượng thận, động mạch, tủy xương, não (toàn phần), vú, ruột kết,
 thực quản, tim, thận (ba mẫu), bạch cầu, gan, phổi, hạch bạch huyết,
 buồng trứng, tụy, nhau thai, tuyến tiền liệt, tuyến nước bọt, cơ xương, da,
 ruột non, lách, dạ dày, tinh hoàn, tuyến ức, tuyến giáp, bàng quang, cổ tử
 cung, tử cung, tĩnh mạch (từ trái sang phải)

Fig.2C

Gen: RAB3B

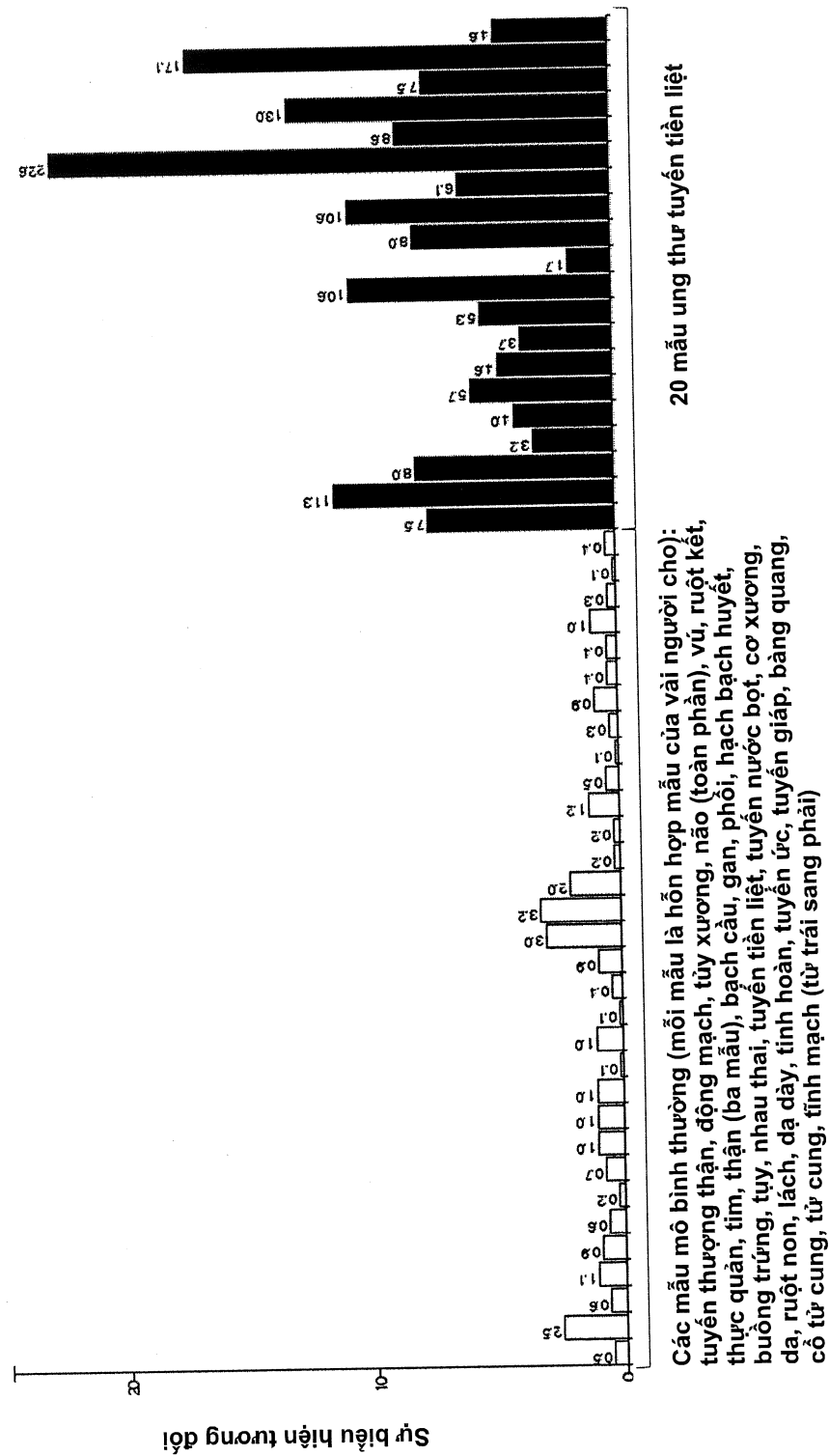


Fig. 2D

Gen: OR51E2

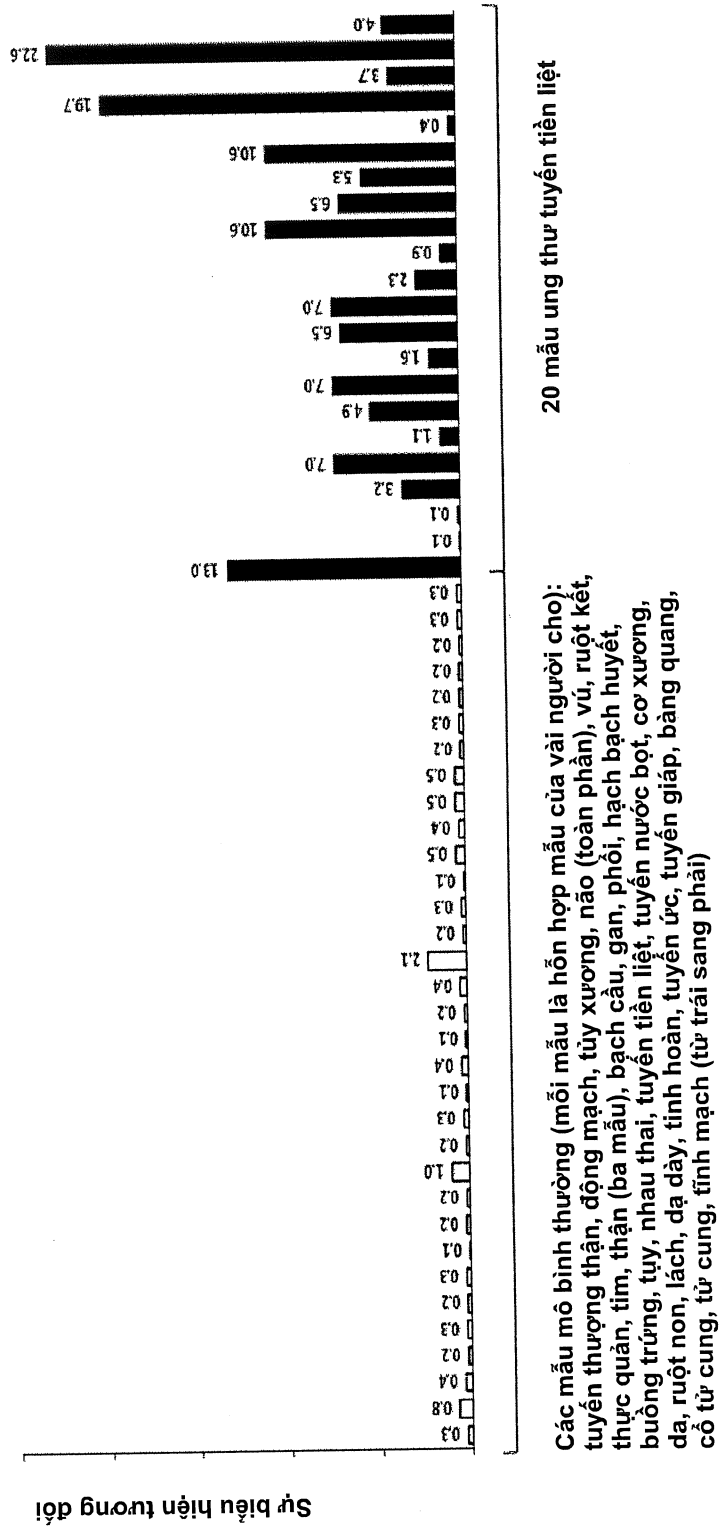


Fig.2E

Gen: KLK2

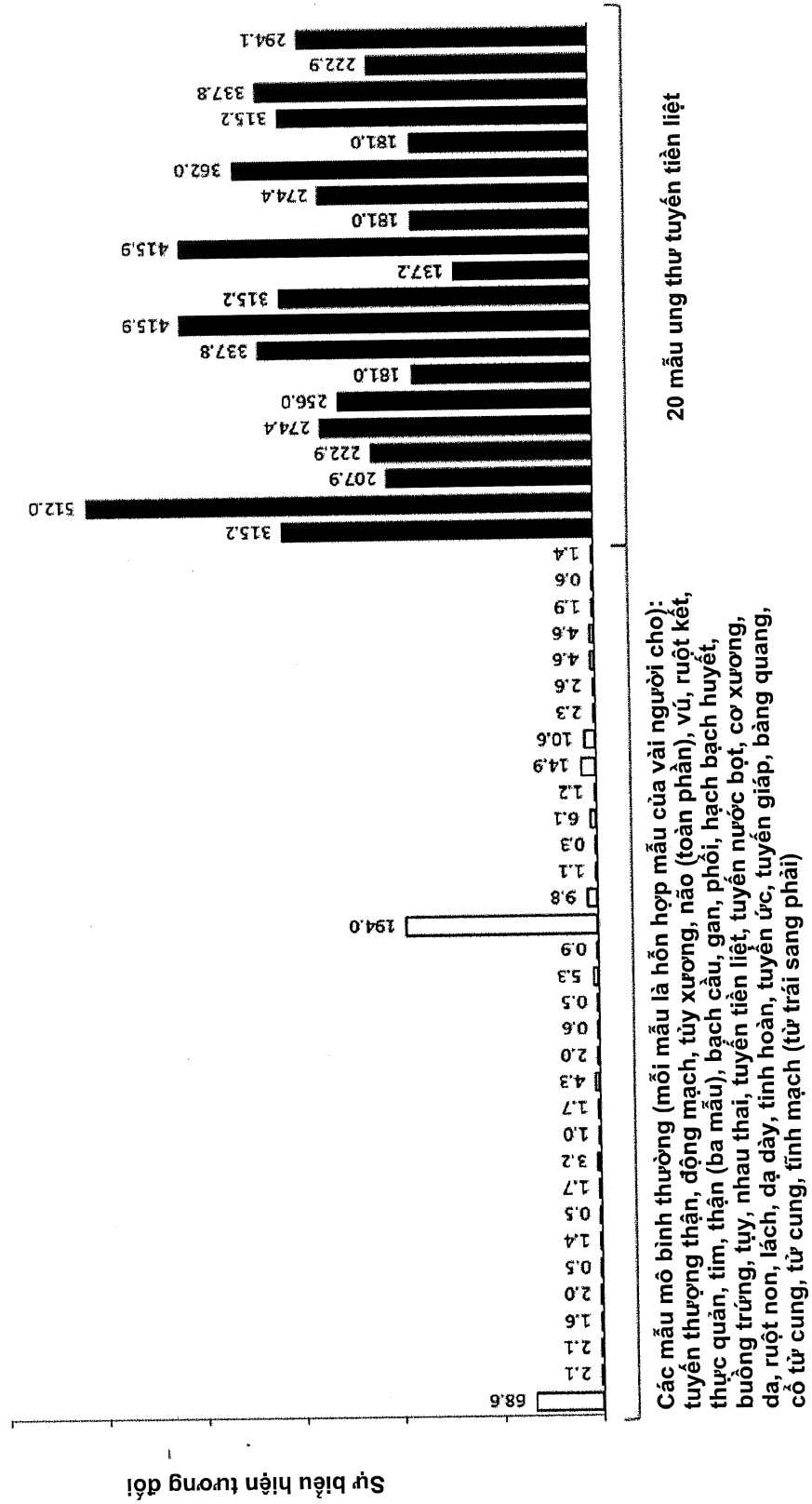


Fig.3

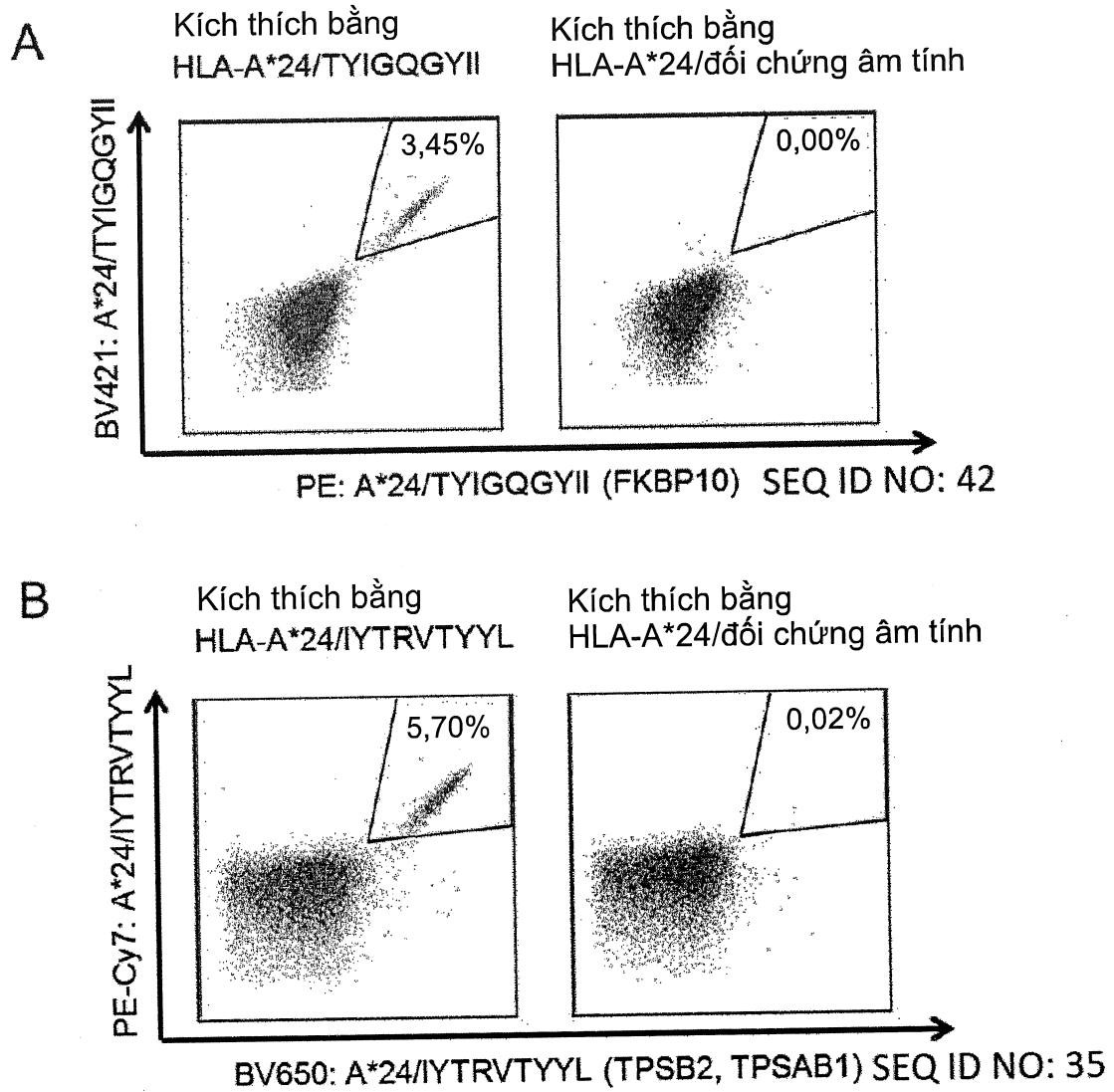


Fig.4

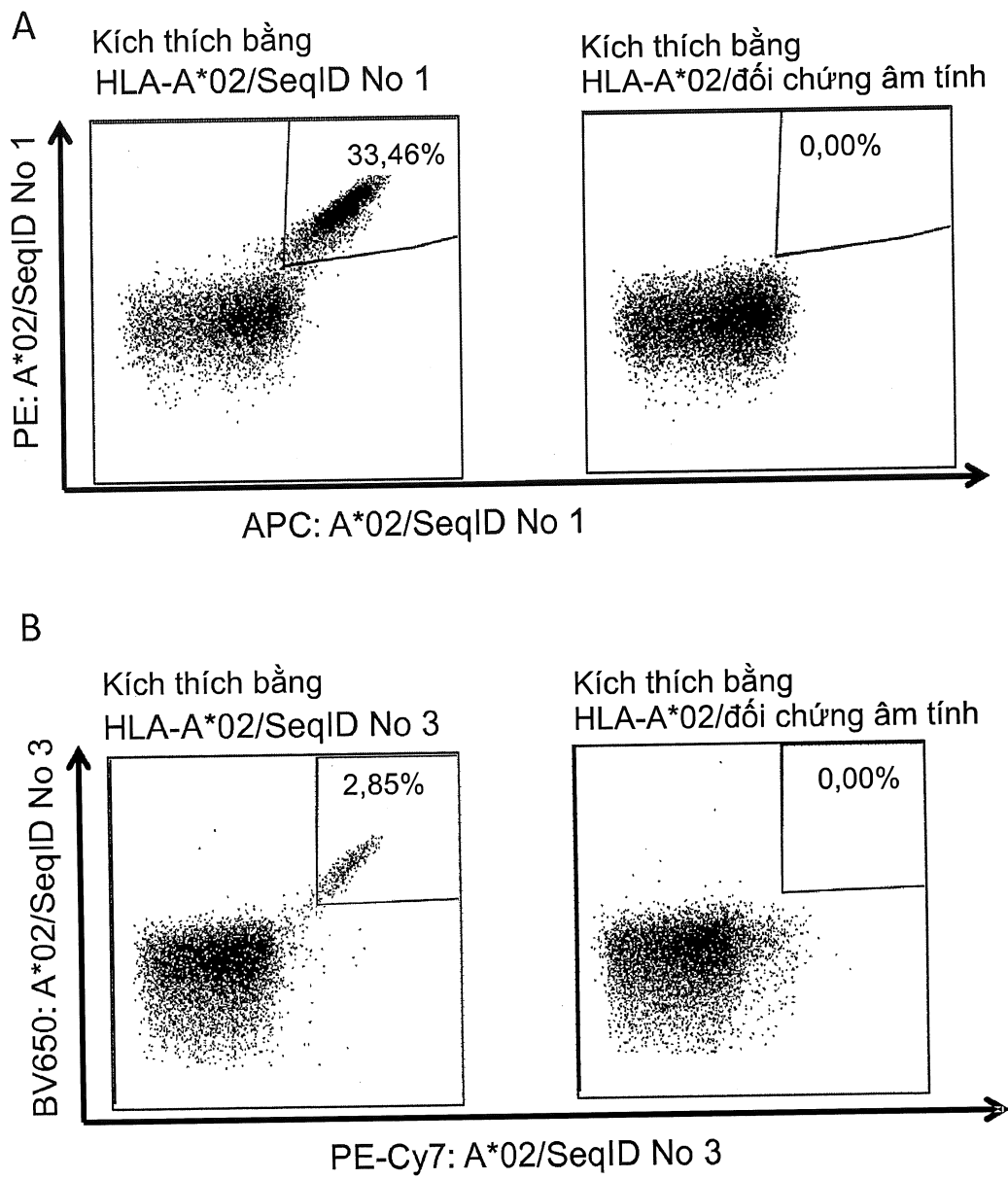


Fig.4 (tiếp theo)

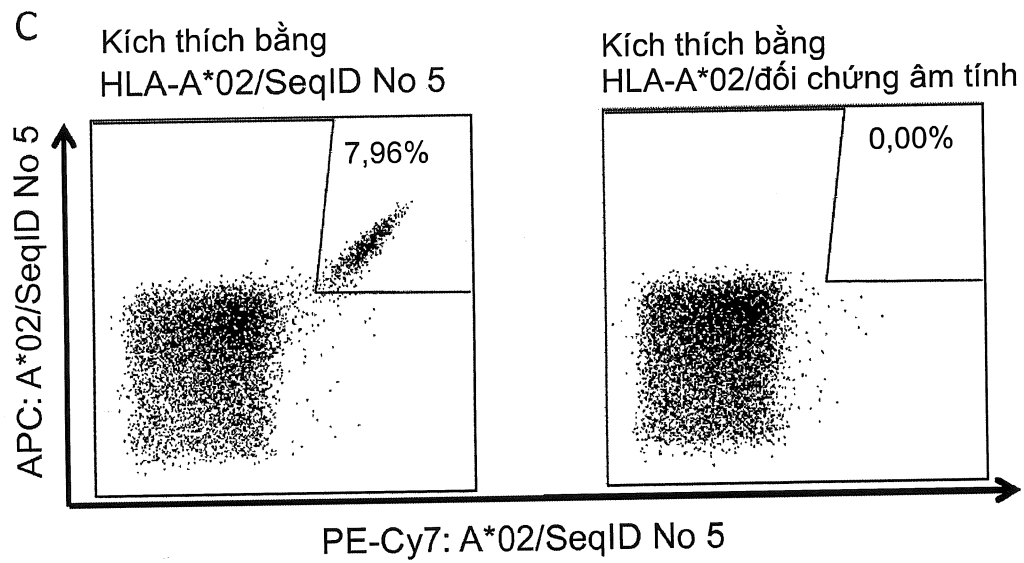


Fig.5

