(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) **1-0039265**
(51)[8] **A61K 39/00**; C07K 14/47
(13) **B**

(21) 1-2017-04109
(22) 17/03/2016
(86) PCT/EP2016/055817 17/03/2016
(87) WO 2016/146751 22/09/2016
(30) 62/134,253 17/03/2015 US; 1504502.4 17/03/2015 GB
(45) 25/03/2024 432
(43) 25/12/2017 357A
(73) IMMATICS BIOTECHNOLOGIES GMBH (DE)
Paul-Ehrlich-Strasse 15, 72076 Tuebingen, Germany
(72) WEINSCHENK, Toni (DE); FRITSCHE, Jens (DE); SINGH, Harpreet (DE); MAHR, Andrea (DE); OTT, Martina (DE); WAGNER, Claudia (DE); SCHOOR, Oliver (DE).
(74) Công ty Luật TNHH WINCO (WINCO LAW FIRM)

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

(57) Sáng chế đề cập đến peptit được phân lập chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 21. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến kháng thể được phân lập, thụ thể tế bào T được phân lập, axit nucleic được phân lập mã hóa peptit, vectơ biểu hiện, tế bào chủ tái tổ hợp chứa peptit, phương pháp tạo ra peptit, phương pháp tạo ra thụ thể tế bào T, tế bào lymphô T hoạt hóa và phương pháp tạo ra tế bào lymphô T hoạt hóa *in vitro*, dược phẩm và kit bao gồm đồ chứa để đựng dược phẩm này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

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

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

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Ung thư tụy là một trong số các bệnh ung thư xâm lấn và nguy hiểm nhất trên thế giới. Năm 2012, bệnh này là bệnh ung thư phổ biến thứ 12 ở nam giới với 178000 ca bệnh và là bệnh ung thư phổ biến thứ 11 ở nữ giới với 160000 ca bệnh trên toàn thế giới. Cũng trong năm này, có 330000 ca tử vong được thống kê làm cho bệnh ung thư tụy trở thành nguyên nhân phổ biến thứ 7 gây tử vong do bệnh ung thư (World Cancer Report, 2014).

Ung thư tụy không phải là một bệnh ung thư thực thể mà có một số kiểu phụ khác biệt cần được phân biệt. Các khối u ngoại tiết chiếm khoảng 95% trong tổng số các ca bệnh ung thư tụy và bao gồm cả ung thư tuyến ống và phế nang, khối u nhầy trong ống tụy (intraductal papillary mucinous neoplasm: IPMN), khối u đặc giả nhú của tụy, u nang nhầy của tụy và u tuyến nang thanh dịch. Tỷ lệ 5% còn lại trong tổng số các ca ung thư tụy thuộc về nhóm phụ là các khối u thần kinh - nội tiết của tụy

(World Cancer Report, 2014).

Sự thâm nhiễm ung thư tuyến ống là dạng xâm lấn nhất của bệnh ung thư tụy và do tỷ lệ của nó cao (90% trong tổng số các ca ung thư tụy), số liệu dịch tễ học chủ yếu phản ánh kiểu phụ cụ thể này (World Cancer Report, 2014).

Trong năm 2012, có 68% trong tổng số các ca bệnh mới xuất hiện ở các nước phát triển, với tỷ lệ mắc bệnh cao nhất ở Trung và Đông Âu, Bắc Mỹ, Argentina, Uruguay và Úc. Trái lại, phần lớn các nước ở châu Phi và Đông Á đều có tỷ lệ mắc bệnh thấp. Trên phạm vi toàn cầu, tỷ lệ mắc bệnh dường như xuất hiện khá ổn định theo thời gian ở cả nam và nữ (World Cancer Report, 2014).

Do không có triệu chứng cụ thể, bệnh ung thư tụy thường được chẩn đoán ở giai đoạn tiến triển và thường đã di căn. Sự tiên lượng khi chẩn đoán là rất xấu, với tỷ lệ sống 5 năm là 5% và tỷ lệ tử vong so với tỷ lệ mắc mới là 0,98 (World Cancer Report, 2014).

Một số yếu tố đã được thông báo là làm tăng nguy cơ phát triển bệnh ung thư tụy, bao gồm tuổi già, do phần lớn bệnh nhân đều trên 65 tuổi khi chẩn đoán, và chủng tộc, do ở Mỹ, tỷ lệ người da đen có nguy cơ mắc bệnh cao hơn 1,5 lần so với người da trắng. Các yếu tố nguy cơ khác là hút thuốc lá, tình trạng béo phì, bệnh đái tháo đường, không thuộc nhóm máu 0 AB0, bệnh viêm tụy và tiền sử gia đình có người mắc bệnh ung thư tụy (World Cancer Report, 2014).

Có đến 10% trong tổng số các ca bệnh ung thư tụy được cho là có tính gia đình. Sự đột biến tế bào mầm trong các gen sau đây có liên quan đến nguy cơ phát triển bệnh ung thư tụy gia tăng: p16/CDKN2A, BRCA2, PALB2, PRSS1, STK11, ATM và các gen sửa chữa bắt cặp sai ADN. Ngoài ra, một số trường hợp lẻ tẻ mắc bệnh ung thư tụy cũng được đặc trưng bởi sự đột biến ở các gen gây ung thư và các gen ức chế khối u khác nhau. Các đột biến phổ biến nhất ở bệnh ung thư tuyến ống xuất hiện trong các gen gây ung thư KRAS (95%) và AIB1 (lên đến 60%) và các gen ức chế khối u TP53 (75%), p16/CDKN2A (95%) và SMAD4 (55%) (World Cancer Report, 2014).

Các lựa chọn điều trị đối với bệnh nhân ung thư tụy là rất hạn chế. Một vấn đề chính để việc điều trị có hiệu quả là khối u thường ở giai đoạn tiến triển khi chẩn đoán. Ngoài ra, bệnh ung thư tụy khá kháng thuốc với các chất hóa trị liệu, điều này có thể là do mô đỡ khối u tạo mô xơ làm dày và làm giảm lưu lượng mạch máu.

Theo hướng dẫn của Hiệp hội ung thư Đức, Trung tâm hỗ trợ về bệnh ung thư ở Đức và Hiệp hội các nhà khoa học y khoa ở Đức, phương pháp cắt bỏ khối u là lựa chọn điều trị chữa khỏi duy nhất có thể thực hiện. Phương pháp cắt bỏ được khuyến cáo nếu khối u chỉ giới hạn ở tuyến tụy hoặc sự di căn chỉ giới hạn đến các cơ quan lân cận. Không nên cắt bỏ nếu khối u đã lan đến các vị trí ở xa. Sau khi cắt bỏ, tiến hành hóa trị liệu bổ sung bằng gemcitabine hoặc 5-flouraxil +/- leucovorin trong 6 tháng (S3-Leitlinie Exokrines Pankreaskarzinom, 2013).

Các bệnh nhân có khối u ở giai đoạn tiến triển không phẫu thuật được có thể được điều trị bằng cách kết hợp phương pháp hóa trị liệu với phương pháp xạ trị-hóa trị liệu (S3-Leitlinie Exokrines Pankreaskarzinom, 2013).

Chế độ liều chuẩn cho phương pháp hóa trị liệu làm giảm nhẹ là gemcitabine, hoặc dưới dạng liệu pháp đơn hoặc kết hợp với chất ức chế thụ thể tyrosin kinaza của yếu tố phát triển biểu mô (EGF) là erlotinib. Các lựa chọn khác là kết hợp 5-flouraxil, leucovorin, irinotecan và oxaliplatin, còn được gọi là phác đồ FOLFIRINOX hoặc kết hợp gemcitabine với nab-paclitaxel, đã được chứng minh là có hiệu quả cao hơn so với liệu pháp đơn gemcitabine trong nghiên cứu MPACT (Von Hoff et al., 2013; S3-Leitlinie Exokrines Pankreaskarzinom, 2013).

Tỷ lệ tử vong so với tỷ lệ mắc mới phản ánh nhu cầu cấp thiết để thực hiện các chiến lược điều trị hữu hiệu hơn đối với bệnh ung thư tụy.

Các liệu pháp hướng đích, đã được chứng minh là có hiệu có trong một số bệnh ung thư thực thể khác, là một lựa chọn đáng quan tâm. Do đó, một số nghiên cứu đã được thực hiện để đánh giá lợi ích của các liệu pháp hướng đích trong bệnh ung thư tiến triển, đáng tiếc là liệu pháp này có sự thành công rất hạn chế (Walker and Ko, 2014). Tuy nhiên, tính đa dạng di truyền của bệnh ung thư tụy có thể tạo cơ hội cho liệu pháp cá nhân hóa, do sự ung thư tuyến ống xâm lấn với sự bất hoạt hai alen BRCA2 hoặc PALB2 đã được chứng minh là mẫn cảm hơn với các chất ức chế poly (ADP-riboza) polymeraza và việc điều trị bằng mitomycin C (World Cancer Report, 2014).

Sự hướng đích mô đỡ khối u là giải pháp khác để phát triển các phương pháp điều trị mới cho bệnh ung thư tụy. Thông thường, mô đỡ làm dày và làm giảm lưu lượng mạch máu có thể có chức năng làm lớp ngăn cách đối với các chất hóa trị liệu và đã được chứng minh là cung cấp các tín hiệu để kích thích sự tăng sinh của khối u,

sự xâm lấn và duy trì tế bào mầm của bệnh ung thư. Do đó, các nghiên cứu lâm sàng và tiền lâm sàng khác nhau được thiết kế để phân tích hiệu quả của việc làm cạn kiệt và bất hoạt trong mô đỡ (Rucki and Zheng, 2014).

Các chiến lược tiêm chủng được đánh giá là lựa chọn khác có tính sáng tạo và triển vọng để điều trị bệnh ung thư tụy. Các vacxin trên cơ sở peptit hướng đích là sự đột biến KRAS, telomeraza có khả năng phản ứng, gastrin, survivin, CEA và MUC1 đã được đánh giá một phần trong các thử nghiệm lâm sàng với các kết quả hứa hẹn. Ngoài ra, các thử nghiệm lâm sàng đối với vacxin trên cơ sở tế bào đuôi gai, vacxin tiết ra yếu tố kích thích dòng bạch cầu hạt-đại thực bào (GM-CSF) khác alen cùng loài và algenpantucel-L ở các bệnh nhân ung thư tụy cũng cho thấy các hiệu quả có lợi của liệu pháp miễn dịch. Các thử nghiệm lâm sàng bổ sung đánh giá thêm hiệu quả của các phương pháp tiêm chủng vacxin khác nhau đang được tiến hành (Salman et al., 2013).

Khi tính đến các tác dụng phụ nghiêm trọng và chi phí liên quan 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 tụy 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 tụy nói riêng, để chẩn đoán bệnh ung thư, đánh giá tiên lượng, và dự đoán thành công điều trị tốt hơn.

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

Sự phân loại hiện nay của các kháng nguyên liên quan đến khối u (tumor associated antigen: TAA) bao gồm các nhóm chính sau:

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

có thể được cho là đặc hiệu khối u về mặt miễn dịch học. Ví dụ đã biết rõ về kháng nguyên CT là thành viên thuộc họ MAGE hoặc NY-ESO-1.

b) Các kháng nguyên biệt hóa: các kháng nguyên TAA này có mặt trong cả khối u và mô bình thường mà từ đó khối u xuất hiện; phần lớn các kháng nguyên này được phát hiện trong u melanin và tế bào melanin bình thường. Nhiều protein trong số các protein liên quan đến dòng tế bào melanin này tham gia vào quá trình sinh tổng hợp melanin và do đó không đặc hiệu khối u nhưng được sử dụng rộng rãi đối với liệu pháp miễn dịch điều trị bệnh ung thư. Ví dụ về chúng bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, tyrosinaza và Melan-A/MART-1 đối với u melanin hoặc PSA đối với bệnh ung thư tuyến tiền liệt.

c) Các kháng nguyên TAA được biểu hiện quá mức: các gen mã hoá TAA được biểu hiện rộng rãi đã được phát hiện trong các loại khối u khác nhau về mặt mô học cũng như trong nhiều mô bình thường, thường là có mức độ biểu hiện thấp hơn. Nhiều epitop được xử lý và có thể được biểu hiện bởi mô bình thường có thể ở mức thấp hơn mức ngưỡng đối với sự nhận biết của tế bào T, trong khi sự biểu hiện quá mức của chúng trong tế bào khối u có thể gây ra đáp ứng kháng 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 virut gây ung thư: các TAA này là các protein của virut có thể đóng vai trò quyết định trong quá trình gây bệnh ung thư và do chúng là protein ngoại lai (không có nguồn gốc từ người), chúng có thể gây ra đáp ứng tế bào T. Ví dụ về protein này là protein E6 và E7 của virut gây u nhú người typ 16, chúng được biểu hiện trong caxinom cổ tử cung.

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

Có hai nhóm phân tử của MHC là MHC nhóm I và MHC nhóm II. Các phân tử của MHC nhóm I gồm chuỗi nặng alpha và beta-2-microglobulin, các phân tử của MHC nhóm II gồm chuỗi alpha và chuỗi beta. Cấu dạng ba chiều của chúng tạo thành rãnh gắn kết, rãnh này được sử dụng để tương tác không cộng hóa trị với các peptit.

Các phân tử của MHC nhóm I có thể được tìm thấy chủ yếu trên các tế bào có nhân. Chúng là các peptit được tạo ra từ sự phân cắt phân giải protein của phần lớn các protein nội sinh, các sản phẩm ribosom khiếm khuyết (defective ribosomal product: DRIP) và các peptit có phân tử lớn. Tuy nhiên, các peptit có nguồn gốc từ các ngăn thể nhân hoặc nguồn ngoại sinh cũng thường được tìm thấy trên các phân tử của MHC nhóm I. Cách trình diện không cổ điển này của nhóm I còn được gọi là trình diện chéo trong tài liệu chuyên ngành (Brossart and Bevan, 1997; Rock et al., 1990). Các phân tử của MHC nhóm II có thể được tìm thấy chủ yếu trên các tế bào trình diện kháng nguyên (antigen presenting cell: APC) chuyên nghiệp, và chủ yếu là các peptit của các protein ngoại sinh hoặc protein xuyên màng được hấp thụ bởi các tế bào APC, ví dụ, trong quá trình nhập nội bào, và được xử lý sau đó.

Các phức hợp của peptit và MHC nhóm I được nhận biết bởi các tế bào T dương tính với CD8 mang thụ thể thụ thể tế bào T thích hợp (T-cell receptor: TCR),

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 lượng 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 dược để kích thích đáp ứng miễn dịch kháng u (Gnjatic et al., 2003). Ở vị trí khối u, các tế bào T hỗ trợ thúc đẩy 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, các tế bào khối u đã được phát hiện là biểu hiện các phân tử MHC nhóm II (Dengjel et al., 2006).

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

Như được thể hiện trong các mô hình động vật có vú, ví dụ, chuột, ngay cả khi không có mặt các tế bào lymphô T dương tính với CD8, các tế bào T dương tính với CD4 vẫn đủ để ức chế sự biểu hiện của khối u bằng cách ức chế sự tạo mạch nhờ sự tiết ra interferon-gama (interferon-gama: IFNγ) (Beatty and Paterson, 2001; Mumberg

et al., 1999). Có bằng chứng về việc tế bào T CD4 làm tế bào hiệu ứng kháng u trực tiếp (Braumuller et al., 2013; Tran et al., 2014).

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

Do cả hai loại đáp ứng phụ thuộc CD8 và CD4 cùng góp phần và có tác dụng hiệp đồng với hiệu quả kháng u, việc nhận biết và xác định các kháng nguyên liên quan đến khối u được nhận biết bởi các tế bào T CD8+ (phối tử: phân tử MHC nhóm I + epitop peptit) hoặc bởi các tế bào T hỗ trợ T dương tính với CD4 (phối tử: phân tử MHC nhóm II + epitop peptit) là quan trọng trong việc phát triển các vacxin 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 chúng còn phải được nhận biết bởi các tế bào T mang các thụ thể tế bào T (TCR) đặc hiệu.

Đối với các protein cần được nhận biết bởi các tế bào lymphô T dưới dạng các kháng nguyên đặc hiệu khối u hoặc kháng nguyên liên quan đến khối u, và cần được sử dụng trong liệu pháp, các điều kiện tiên quyết cụ thể phải được đáp ứng. Kháng nguyên này cần được biểu hiện chủ yếu bởi tế bào khối u và không được biểu hiện bởi các mô khỏe mạnh bình thường, hoặc được biểu hiện với lượng tương đối nhỏ. Theo một phương án được ưu tiên, peptit cần được biểu hiện quá mức bởi các tế bào khối u so với các mô khỏe mạnh bình thường. Ngoài ra, tốt hơn nếu kháng nguyên tương ứng không chỉ có mặt ở một loại khối u, mà còn có mặt với nồng độ cao (nghĩa là số lượng

bản sao của peptit tương ứng trong mỗi tế bào). Kháng nguyên đặc hiệu khối u và kháng nguyên liên quan đến khối u thường có nguồn gốc từ các protein tham gia trực tiếp vào quá trình biến đổi của tế bào bình thường thành tế bào khối u do chức năng của chúng, ví dụ, trong việc kiểm soát hoặc ức chế chu trình tế bào của quá trình chết tế bào theo chương trình. Ngoài ra, các đích xuôi dòng của protein là nguyên nhân trực tiếp của sự biến đổi có thể được điều hòa tăng và do đó có thể liên quan gián tiếp với khối u. Các kháng nguyên liên quan gián tiếp với khối u này cũng có thể là đích của phương pháp tiêm chủng (Singh-Jasuja et al., 2004). Điều quan trọng là các epitop có mặt trong trình tự axit amin của kháng nguyên để đảm bảo rằng peptit này ("peptit gây miễn dịch"), có nguồn gốc từ kháng nguyên liên quan với khối u, điều này dẫn đến đáp ứng của tế bào T *in vitro* hoặc *in vivo*.

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

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

thể thực hiện chức năng hiệu ứng ("tế bào T hiệu ứng").

Trong trường hợp hướng đích peptit-MHC bằng các thụ thể TCR đặc hiệu (ví dụ, các thụ thể TCR hòa tan) và kháng thể hoặc các phân tử gắn kết khác (khung) theo sáng chế, tính sinh miễn dịch của các peptit cơ sở là thứ yếu. Trong các trường hợp này, sự biểu hiện là yếu tố quyết định.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề xuất peptit chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự từ SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 67 hoặc trình tự biến thể của nó có mức độ tương đồng ít nhất 77%, tốt hơn là ít nhất 88% (tốt hơn là có mức độ giống ít nhất 77% hoặc ít nhất 88%) với các trình tự từ SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 67, trong đó biến thể này gắn kết với MHC và/hoặc gây ra phản ứng chéo của các tế bào T với peptit nêu trên, hoặc muối dược dụng của nó, trong đó peptit này không là polypeptit có chiều dài đầy đủ cơ bản.

Sáng chế còn đề xuất peptit chứa trình tự được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự từ SEQID NO: 1 đến SEQ ID NO: 67 hoặc biến thể của nó, có mức độ tương đồng ít nhất 77%, tốt hơn là ít nhất 88% (tốt hơn là có mức độ giống ít nhất 77% hoặc ít nhất 88%) với các trình tự từ SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 67, trong đó peptit này hoặc biến thể của nó có từ 8 đến 100 axit amin, tốt hơn là có từ 8 đến 30 axit amin, và được ưu tiên nhất là có từ 8 đến 14 axit amin trong toàn bộ chiều dài mạch.

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

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

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

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

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

Sáng chế còn đề xuất kit bao gồm:

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

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

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

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Các hình vẽ từ Fig1A đến Fig.1C thể hiện sự biểu hiện quá mức của các peptit khác nhau ở mô bình thường (màu xám đậm) và bệnh ung thư tụy (màu xám nhạt). Fig.1D thể hiện tất cả các dòng tế bào (màu xám đậm), các mô bình thường (màu xám) và các mô ung thư (máu xám nhạt) trong đó peptit làm ví dụ (FLFDGSANLV) (SEQ ID NO.: 9) được phát hiện. Fig.1A) Gen: CTLA/CTLB, Peptit: FLAQQESEI (A*02) (SEQ ID NO.: 1); Các mô được thể hiện từ trái sang phải: 1 mô mỡ, 3 tuyến thượng thận, 2 động mạch, 3 tủy xương, 7 não, 3 vú, 13 ruột kết, 1 buồng trứng, 4 thực quản, 2 túi mật, 3 tim, 12 thận, 4 mẫu bạch cầu, 19 gan, 43 phổi, 1 hạch bạch huyết, 1 buồng trứng, 2 dây thần kinh ngoại vi, 1 màng bụng, 1 tuyến yên, 3 màng phổi, 1 tuyến tiền liệt, 6 cơ thẳng, 3 cơ xương, 3 da, 2 ruột non, 4 lách, 5 dạ dày, 1 tinh hoàn, 2 tuyến ức, 3 tuyến giáp, 2 tử cung, 2 tĩnh mạch, 6 tụy, 18 bệnh ung thư tụy; Fig.1B) Gen: PLEC, Peptit: SLQEEHVAVA (A*02), (SEQ ID NO.: 2); Các mô được thể hiện từ trái sang phải: 1 mô mỡ, 3 tuyến thượng thận, 2 động mạch, 3 tủy xương, 7 não, 3 vú, 13 ruột kết, 1 buồng trứng, 4 thực quản, 2 túi mật, 3 tim, 12 thận, 4 mẫu bạch cầu, 19 gan, 43 phổi, 1 hạch bạch huyết, 1 buồng trứng, 2 dây thần kinh ngoại vi, 1 màng bụng, 1 tuyến yên, 3 màng phổi, 1 tuyến tiền liệt, 6 cơ thẳng, 3 cơ xương, 3 da, 2 ruột non, 4 lách, 5 dạ dày, 1 tinh hoàn, 2 tuyến ức, 3 tuyến giáp, 2 tử cung, 2 tĩnh mạch, 6 tụy, 18 bệnh ung thư tụy; Fig.1C) Gen: COL6A3, Peptit: FLVDGSSAL (A*02) (SEQ ID NO.: 10); Các mô được thể hiện từ trái sang phải: 1 mô mỡ, 3 tuyến thượng thận, 2 động mạch, 3 tủy xương, 7 não, 3 vú, 13 ruột kết, 1 buồng trứng, 4 thực quản, 2 túi mật, 3 tim, 12 thận, 4 mẫu bạch cầu, 19 gan, 43 phổi, 1 hạch bạch huyết, 1 buồng trứng, 2 dây thần kinh ngoại vi, 1 màng bụng, 1 tuyến yên, 3 màng phổi, 1 tuyến tiền liệt, 6 cơ thẳng, 3 cơ xương, 3 da, 2 ruột non, 4 lách, 5 dạ dày, 1 tinh hoàn, 2 tuyến ức, 3 tuyến giáp, 2 tử cung, 2 tĩnh mạch, 6 tụy, 18 bệnh ung thư tụy;

Fig.1D) COL6A3, Peptit: FLFDGSANLV (A*02) (SEQ ID NO.: 9); Các mô được thể hiện từ trái sang phải: 5 dòng tế bào ung thư tụy, 7 mô bình thường (1 ruột kết, 6 phổi), 85 mô ung thư (2 bệnh ung thư vú, 6 bệnh ung thư ruột kết, 4 bệnh ung thư thực quản, 3 bệnh ung thư gan, 56 bệnh ung thư phổi, 5 bệnh ung thư tụy, 3 bệnh ung thư trực tràng, 1 u melanin, 5 bệnh ung thư dạ dày). Tập hợp các mô bình thường cũng được thể hiện trên các hình vẽ từ Fig.1A đến Fig.1C, nhưng các mô không phát hiện được không được thể hiện. Sự khác biệt liên quan đến danh sách của các loại khối u giữa Fig.1D và bảng 4 có thể là do các tiêu chí lựa chọn nghiêm ngặt hơn được áp dụng trong bảng 4 (chi tiết xem trong bảng 4). Fig.1D thể hiện tất cả các mẫu có sự trình diện phát hiện được của peptit Y, bất kể các thông số biểu hiện quá mức và việc kiểm tra chất lượng mẫu về mặt kỹ thuật.

Các hình vẽ từ Fig.1E đến Fig.1I thể hiện tất cả các dòng tế bào (màu xám đậm), các mô bình thường (màu xám) và các mô ung thư (máu xám nhạt) trong đó các peptit làm ví dụ được phát hiện. Fig.1E) Peptit: SVDVSPPKV (A*02) (SEQ ID NO.: 4); Các mô được thể hiện từ trái sang phải: 1 dòng tế bào, 3 môi trường nuôi cấy sơ cấp, 1 da, 1 bệnh ung thư ống mật chủ, 3 bệnh ung thư não, 1 bệnh ung thư vú, 4 bệnh ung thư thực quản, 5 bệnh ung thư thận, 11 bệnh ung thư phổi, 1 bệnh ung thư hạch bạch huyết, 1 bệnh ung thư buồng trứng, 3 bệnh ung thư tụy, 1 bệnh ung thư tuyến tiền liệt, 3 bệnh ung thư da, 2 bệnh ung thư bàng quang, 3 bệnh ung thư tử cung; Fig.1F) Peptit: LLVDDSFLHTV (A*02) (SEQ ID NO.: 5); Các mô được thể hiện từ trái sang phải: 2 dòng tế bào, 1 môi trường nuôi cấy sơ cấp, 1 bệnh ung thư ống mật chủ, 2 bệnh ung thư não, 1 bệnh ung thư vú, 3 bệnh ung thư thực quản, 2 bệnh ung thư túi mật, 2 bệnh ung thư thận, 2 bệnh ung thư gan, 3 bệnh ung thư phổi, 7 bệnh ung thư buồng trứng, 2 bệnh ung thư tụy, 3 bệnh ung thư da, 1 bệnh ung thư dạ dày, 1 bệnh ung thư tử cung, Fig.1G) Peptit: IVDDLTINL (A*02) (SEQ ID NO.: 8); Các mô được thể hiện từ trái sang phải: 1 dòng tế bào, 1 bệnh ung thư ruột kết, 2 bệnh ung thư thực quản, 2 bệnh ung thư túi mật, 5 bệnh ung thư phổi, 1 bệnh ung thư hạch bạch huyết, 1 bệnh ung thư tụy, 2 bệnh ung thư da, 4 bệnh ung thư dạ dày, 1 bệnh ung thư bàng quang, 4 bệnh ung thư tử cung, Fig.1H) Peptit: LLAGQTYHV (A*02) (SEQ ID NO.: 13); Các mô được thể hiện từ trái sang phải: 6 dòng tế bào, 1 phổi, 1 nhau thai, 2 bệnh ung thư ống mật chủ, 3 bệnh ung thư vú, 2 bệnh ung thư ruột kết, 2 bệnh ung thư thực quản, 2 bệnh ung thư túi mật, 1 bệnh ung thư gan, 36 bệnh ung thư phổi, 3 bệnh ung

thư buồng trứng, 3 bệnh ung thư tụy, 1 bệnh ung thư trực tràng, 3 bệnh ung thư bàng quang; và Fig.1I) Peptit: VLAKPGVISV (A*02) (SEQ ID NO.: 14); Các mô được thể hiện từ trái sang phải: 7 dòng tế bào, 1 phổi, 1 bệnh ung thư ống mật chủ, 4 bệnh ung thư vú, 1 bệnh ung thư ruột kết, 2 bệnh ung thư thực quản, 1 bệnh ung thư túi mật, 36 bệnh ung thư phổi, 1 bệnh ung thư buồng trứng, 3 bệnh ung thư tụy, 2 bệnh ung thư trực tràng, 1 bệnh ung thư dạ dày, 1 bệnh ung thư bàng quang.

Fig.2 thể hiện các profin biểu hiện làm ví dụ (sự biểu hiện tương đối so với thận bình thường) của các gen nguồn theo sáng chế được biểu hiện cao quá mức hoặc chỉ được biểu hiện ở bệnh ung thư tụy trong nhóm các mô bình thường (màu xám đậm) và 11 mẫu bệnh ung thư tụy (màu xám). Fig.2A) LAMC2; Các mô từ trái sang phải: 1 tuyến thượng thận, 1 động mạch, 1 tủy xương, 1 não (toàn phần), 1 vú, 1 ruột kết, 1 thực quản, 1 tim, 3 thận, 1 mẫu bạch cầu, 1 gan, 1 phổi, 1 hạch bạch huyết, 1 buồng trứng, 1 tụy, 1 nhau thai, 1 tuyến tiền liệt, 1 tuyến nước bọt, 1 cơ xương, 1 da, 1 ruột non, 1 lách, 1 dạ dày, 1 tinh hoàn, 1 tuyến ức, 1 tuyến giáp, 1 bàng quang, 1 cổ tử cung, 1 tử cung, 1 tĩnh mạch, 18 bệnh ung thư tụy; Fig.2B) VCAN; Các mô từ trái sang phải: 1 tuyến thượng thận, 1 động mạch, 1 tủy xương, 1 não (toàn phần), 1 vú, 1 ruột kết, 1 thực quản, 1 tim, 3 thận, 1 mẫu bạch cầu, 1 gan, 1 phổi, 1 hạch bạch huyết, 1 buồng trứng, 1 tụy, 1 nhau thai, 1 tuyến tiền liệt, 1 tuyến nước bọt, 1 cơ xương, 1 da, 1 ruột non, 1 lách, 1 dạ dày, 1 tinh hoàn, 1 tuyến ức, 1 tuyến giáp, 1 bàng quang, 1 cổ tử cung, 1 tử cung, 1 tĩnh mạch, 18 bệnh ung thư tụy; Fig.2C) FAP; Các mô từ trái sang phải: 1 tuyến thượng thận, 1 động mạch, 1 tủy xương, 1 não (toàn phần), 1 vú, 1 ruột kết, 1 thực quản, 1 tim, 3 thận, 1 mẫu bạch cầu, 1 gan, 1 phổi, 1 hạch bạch huyết, 1 buồng trứng, 1 tụy, 1 nhau thai, 1 tuyến tiền liệt, 1 tuyến nước bọt, 1 cơ xương, 1 da, 1 ruột non, 1 lách, 1 dạ dày, 1 tinh hoàn, 1 tuyến ức, 1 tuyến giáp, 1 bàng quang, 1 cổ tử cung, 1 tử cung, 1 tĩnh mạch, 18 bệnh ung thư tụy.

Fig.3 thể hiện số liệu về tính sinh miễn dịch làm ví dụ: kết quả đếm tế bào theo dòng sau khi nhuộm multime đặc hiệu peptit. Fig.3 (C và D) thể hiện kết quả làm ví dụ của đáp ứng của tế bào T CD8+ *in vitro* đặc hiệu với peptit của người cho HLA-A*02+ khỏe mạnh. Các tế bào T CD8+ được tạo mồi bằng cách sử dụng các tế bào APC nhân tạo được phủ mAb kháng CD28 và HLA-A*02 trong phức hợp với peptit Seq ID No 3 (C, ô bên trái) hoặc peptit Seq ID No 50 (D, ô bên trái), tương ứng. Sau ba chu trình kích thích, sự phát hiện các tế bào có khả năng phản ứng với peptit được

thực hiện bằng cách nhuộm multime 2D bằng A*02/Seq ID No 3 (C) hoặc A*02/Seq ID No 50 (D). Các ô bên phải (C và D) cho thấy sự nhuộm đối chứng của các tế bào được kích thích bằng phức chất A*02/peptit không liên quan. Các tế bào đơn lẻ còn sống được tạo cổng cho các tế bào lymphô CD8+. Các cổng Boolean giúp loại trừ các sự kiện dương tính giả với multime đặc hiệu đối với các peptit khác nhau. Tần suất của các tế bào multime+ đặc hiệu trong số các tế bào lymphô CD8+ được thể hiện.

Mô tả chi tiết sáng chế

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

Bảng 1: các peptit theo sáng chế

SEQ ID No.	Trình tự	(các) GenID	(các) ký hiệu gen chính thức
1	FLAQQESEI	1211, 1212	CLTA, CLTB
2	SLQEEHVAVA	5339	PLEC
3	ALLTFMEQV	165	AEBP1
4	SVDVSPPKV	113146	AHNAK2
5	LLVDDSFLHTV	253982	ASPHD1
6	VLISLKQAPLV	1211	CLTA
7	AQQESEIAGI	1211, 1212	CLTA, CLTB
8	IVDDLTINL	1303	COL12A1
9	FLFDGSANLV	1293	COL6A3
10	FLVDGSSAL	1293	COL6A3
11	FLYKIIDEL	1293	COL6A3
12	FVSEIVDTV	1293	COL6A3

SEQ ID No.	Trình tự	(các) GenID	(các) ký hiệu gen chính thức
13	LLAGQTYHV	1293	COL6A3
14	VLAKPGVISV	1293	COL6A3
15	SLANNVTSV	131566	DCBLD2
16	APVNVTTEVKSV	158078, 1915	EEF1A1P5, EEF1A1
17	FLKSGDAAIV	158078, 1915	EEF1A1P5, EEF1A1
18	SLLDDELMSL	26088	GGA1
19	HLAPETDEDDL	8100	IFT88
20	RLAGDGVGAV	3855	KRT7
21	HLMDQPLSV	3918	LAMC2
22	TLDGAAVNQV	3918	LAMC2
23	SLSAFTLFL	4060	LUM
24	GLLEELVTV	642475	MROH6
25	SLKEEVGEEAI	4627	MYH9
26	SLKEEVGEEAIV	4627	MYH9
27	YLQGQRLDNV	6447	SCG5
28	YLQGQRLDNVV	6447	SCG5
29	FLQEYLDAI	6317, 6318	SERPINB3, SERPINB4
30	VVDEGPTGV	9123	SLC16A3
31	SLAAAAGKQEL	6750	SST
32	SLAAAAGKQELA	6750	SST
33	SLDSRLELA	81628	TSC22D4
34	MLMPVHFLL	114131	UCN3
35	VMDSGDGVTHTV	100996820, 344227, 345651, 440915, 445582, 60, 641455, 653269, 653781, 71, 728378	ACTBL2, POTEKP, POTEE, ACTB, POTEM, POTEI, POTEJ, ACTG1, POTEF
36	KQEYDESGPSIVH	100996820, 344227, 440915, 445582, 60, 641455, 653269, 653781, 71, 728378	POTEKP, POTEE, ACTB, POTEM, POTEI, POTEJ, ACTG1, POTEF
37	GLLKKINSV	55107	ANO1

SEQ ID No.	Trình tự	(các) GenID	(các) ký hiệu gen chính thức
38	NLVEKTPALV	10632, 267020	ATP5L, ATP5L2
39	TLLSNLEEA	1191	CLU
40	FILDSAETTTL	1293	COL6A3
41	FLLDGSEGV	1293	COL6A3
42	KLVDKSTEL	1293	COL6A3
43	RLDQRVPQI	1293	COL6A3
44	VLLDKIKNLQV	1293	COL6A3
45	VADKIHSV	11072	DUSP14
46	TFAPVNVTTEVKSV	158078, 1915	EEF1A1P5, EEF1A1
47	KMDASLGNLFA	10447, 51384	FAM3C, WNT16
48	ALTQTGGPHV	2316	FLNA
49	NLKGTFATL	100187828, 3043, 3045	HBB, HBD
50	ALAAILTRL	80201	HKDC1
51	ALMLQGVDL	3329	HSPD1
52	RMVEEIGVEL	10525	HYOU1
53	SSFGGLGGGSV	3880	KRT19
54	VLLSEIEVA	4134	MAP4
55	YLDAMMNEA	103910, 10627	MYL12B, MYL12A
56	GLLDYATGAIGSV	117583	PARD3B
57	FLGKVVIDV	100271927, 10156	RASA4B, RASA4
58	GLAAFKAFL	5999	RGS4
59	KLFNLSKEDDV	6194	RPS6
60	YLEEDVYQL	23255	SOGA2
61	ALEKDYEEVGV	10376, 113457, 7278, 7846	TUBA1B, TUBA3D, TUBA3C, TUBA1A
62	ALEKDYEEV	10376, 113457, 51807, 7277, 7278, 7846, 84790	TUBA1B, TUBA3D, TUBA8, TUBA4A, TUBA3C, TUBA1A, TUBA1C
63	FAGDDAPR	100996820, 344227, 445582, 58, 59, 60, 653269, 653781, 70, 71, 72,	POTEE, ACTA1, ACTA2, ACTB, POTEI, POTEJ, ACTC1, ACTG1, ACTG2, POTEF

SEQ ID No.	Trình tự	(các) GenID	(các) ký hiệu gen chính thức
		728378	
64	FLVSNMLLAEA	113791	PIK3IP1

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

SEQ ID No.	Trình tự	(các) GenID	(các) ký hiệu gen chính thức
65	YLYDSETKNA	4316	MMP7
66	ALLSGLREA	23028	KDM1A
67	KMFFLIDKV	4599	MX1

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

SEQ ID No.	Trình tự	(các) GenID	(các) ký hiệu gen chính thức
68	KLLTEVHAA	101	ADAM8
69	VMAPFTMTI	338	APOB
70	FLVDGSWSV	1303	COL12A1
71	FLLDGSANV	1293	COL6A3
72	YVYQNNIYL	2191	FAP
73	TLVAIVVGV	60681	FKBP10
74	KIQEILTQV	10643	IGF2BP3
75	RLDDLKMTV	3918	LAMC2
76	RLLDSVSRL	3918	LAMC2
77	GLTDNIHLV	25878	MXRA5
78	TLSSIKVEV	25878	MXRA5
79	VLAPRVLRA	5954	RCN1
80	TLYPHTSQV	1462	VCAN
81	AMSSKFFLV	7474	WNT5A
82	SISDVIAQV	56172	ANKH
83	FLIDSSEGV	1293	COL6A3
84	NLLDLDYEL	1293	COL6A3

SEQ ID No.	Trình tự	(các) GenID	(các) ký hiệu gen chính thức
85	TVAEVIQSV	55083	KIF26B
86	SLLAQNTSWLL	7070	THY1
87	LLLGSPAAA	23544	SEZ6L

Nói chung, sáng chế còn đề cập đến các peptit theo sáng chế để sử dụng trong việc điều trị các bệnh tăng sinh, ví dụ như bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư thận, bệnh ung thư não, bệnh ung thư ruột kết hoặc trực tràng, bệnh ung thư thực quản, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư gan, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, u melanin và bệnh bạch cầu.

Được đặc biệt ưu tiên là các peptit – một mình hoặc kết hợp - theo sáng chế được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự từ SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 67. 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 1 đến SEQ ID NO: 34 (xem Bảng 1~~Bảng 1~~), và sử dụng chúng trong liệu pháp miễn dịch của bệnh ung thư tụy, bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư thận, bệnh ung thư não, bệnh ung thư ruột kết hoặc trực tràng, bệnh ung thư thực quản, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư gan, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, u melanin và bệnh bạch cầu, và tốt hơn nếu là bệnh ung thư tụy. Như được thể hiện trong Bảng 4 và 4-2 sau đây, nhiều peptit theo sáng chế cũng được tìm thấy trên nhiều loại khối u khác nhau và do đó có thể được sử dụng trong liệu pháp miễn dịch của các triệu chứng khác. Xem thêm trên Fig.1 và trong phần Ví dụ 1.

Bảng 4: các peptit theo sáng chế và ứng dụng đặc hiệu của chúng ở các bệnh tăng sinh khác, đặc biệt là ở các bệnh ung thư khác. Bảng này cho thấy rằng đối với các peptit được chọn mà trên các loại khối u bổ sung chúng được phát hiện và có sự biểu hiện quá mức đối với trên ít nhất 5% các mẫu khối u được xác định, hoặc có sự biểu hiện đối với trên 5% các mẫu khối u được xác định với tỷ lệ của khối u theo số trung bình nhân với các mô bình thường là lớn hơn 3. Sự biểu hiện quá mức được xác định là sự biểu hiện cao hơn ở mẫu khối u so với mẫu bình thường có sự biểu hiện cao nhất.

SEQ ID No.	Trình tự	Các bệnh/cơ quan liên quan khác
3	ALLTFMEQV	Phổi, thận, não, ruột kết, trực tràng, thực quản
4	SVDVSPPKV	Phổi, thận, u melanin
5	LLVDDSFLHTV	Thận, não, gan, u melanin, buồng trứng
8	IVDDLTINL	Thực quản
9	FLFDGSANLV	Phổi, ruột kết, trực tràng, vú, thực quản
10	FLVDGSSAL	Phổi, dạ dày, vú
11	FLYKIIDEL	Phổi, ruột kết, trực tràng, vú
12	FVSEIVDTV	Phổi, vú, thực quản
14	VLAKPGVISV	Phổi
15	SLANNVTSV	Phổi, thận, não, dạ dày, u melanin, buồng trứng, thực quản
16	APVNVTTEVKSV	Bạch cầu
21	HLMDQPLSV	Phổi
23	SLSAFTLFL	Phổi, tuyến tiền liệt
24	GLLEELVTV	Phổi, dạ dày, buồng trứng
30	VVDEGPTGV	Phổi, thận, não, dạ dày, gan, bạch cầu, vú, buồng trứng
34	MLMPVHFLL	Dạ dày
36	KQEYDESGPSIVH	Phổi, não
39	TLLSNLEEA	Não, tuyến tiền liệt
40	FILDSAETTTL	Phổi
41	FLLDGSEGV	Phổi, vú, buồng trứng, thực quản
42	KLVDKSTEL	Phổi, ruột kết, trực tràng, thực quản
43	RLDQRVPQI	Phổi, ruột kết, trực tràng, vú, thực quản
44	VLLDKIKNLQV	Phổi, dạ dày, ruột kết, trực tràng, gan, vú, u melanin
45	VADKIHSV	Thận, dạ dày
47	KMDASLGNLFA	Não
50	ALAAILTRL	Thận, dạ dày, ruột kết, trực tràng
51	ALMLQGVDL	Thực quản
53	SSFGGLGGGSV	Phổi
55	YLDAMMNEA	Não, ruột kết, trực tràng, gan, buồng trứng
58	GLAAFKAFL	Phổi, thận, gan

SEQ ID No.	Trình tự	Các bệnh/cơ quan liên quan khác
60	YLEEDVYQL	Phổi, thận, ruột kết, trực tràng, vú
64	FLVSNMLLAEA	Tuyến tiền liệt
65	YLYDSETKNA	Thận, ruột kết, trực tràng, gan, buồng trứng, thực quản
66	ALLSGLREA	Thận, bạch cầu, u melanin
67	KMFFLIDKV	Não, gan
68	KLLTEVHAA	Phổi, thận, dạ dày, ruột kết, trực tràng, gan, vú, buồng trứng
69	VMAPFTMTI	Phổi, gan, tuyến tiền liệt, buồng trứng, thực quản
70	FLVDGSWSV	Phổi, dạ dày, ruột kết, trực tràng, buồng trứng, thực quản
71	FLLDGSANV	Phổi, dạ dày, ruột kết, trực tràng, gan, vú, buồng trứng, thực quản
72	YVYQNNIYL	Phổi, dạ dày, ruột kết, trực tràng, gan, vú, u melanin, buồng trứng, thực quản
73	TLVAIVVGV	Phổi, thận, não, dạ dày, ruột kết, trực tràng, gan, tuyến tiền liệt, vú, buồng trứng, thực quản
74	KIQEILTQV	Phổi, thận, não, dạ dày, ruột kết, trực tràng, gan, bạch cầu, buồng trứng, thực quản
75	RLDDLKMTV	Phổi, thận, ruột kết, trực tràng, buồng trứng, thực quản
76	RLLDSVSRL	Phổi, thận, ruột kết, trực tràng, gan, buồng trứng
77	GLTDNIHLV	Phổi, thận, ruột kết, trực tràng, buồng trứng, thực quản
78	TLSSIKVEV	Phổi, thận, dạ dày, ruột kết, trực tràng, tuyến tiền liệt, vú, u melanin
79	VLAPRVLRA	Phổi, thận, não, ruột kết, trực tràng, gan
81	AMSSKFFLV	Phổi, não, dạ dày, ruột kết, trực tràng, gan, tuyến tiền liệt, thực quản
82	SISDVIAQV	Phổi, não, ruột kết, trực tràng, gan, tuyến tiền liệt
83	FLIDSSEGV	Phổi, ruột kết, trực tràng, vú, buồng trứng, thực quản

SEQ ID No.	Trình tự	Các bệnh/cơ quan liên quan khác
84	NLLDLDYEL	Phổi, dạ dày, ruột kết, trực tràng, vú, buồng trứng, thực quản
85	TVAEVIQSV	Phổi, thực quản
86	SLLAQNTSWLL	Phổi, thận, não, dạ dày, ruột kết, trực tràng, gan, u melanin
87	LLLGSPAAA	Não

Bảng 4-2: các peptit theo sáng chế và ứng dụng đặc hiệu của chúng trong các bệnh tăng sinh khác, đặc biệt là trong các bệnh ung thư khác (phần sửa đổi của Bảng 4). Bảng này cho thấy rằng, giống như Bảng 4, đối với peptit được chọn mà trên các loại khối u bổ sung chúng được phát hiện là có sự biểu hiện quá mức (bao gồm cả sự biểu hiện đặc hiệu) đối với trên 5% các mẫu khối u được xác định, hoặc sự biểu hiện đối với trên 5% các mẫu khối u được xác định với tỷ lệ của khối u theo số trung bình nhân với các mô bình thường là lớn hơn 3. Sự biểu hiện quá mức được xác định là sự biểu hiện cao hơn của mẫu khối u so với mẫu bình thường có sự biểu hiện cao nhất. Các mô bình thường kháng lại sự biểu hiện quá mức được thử nghiệm là: mô mỡ, tuyến thượng thận, tế bào máu, mạch máu, tủy xương, não, sụn, thực quản, mắt, túi mật, tim, thận, đại tràng, gan, phổi, hạch bạch huyết, dây thần kinh, tụy, tuyến cận giáp, màng bụng, tuyến yên, màng phổi, tuyến nước bọt, cơ vân, da, ruột non, lách, dạ dày, tuyến ức, tuyến giáp, khí quản, niệu quản, bàng quang.

SEQ ID No.	Trình tự	Các thực thể bổ sung
3	ALLTFMEQV	SCLC, BRCA, u melanin, bệnh ung thư bàng quang, bệnh ung thư túi mật, bệnh ung thư ống mật chủ
4	SVDVSPPKV	U melanin, bệnh ung thư thực quản
5	LLVDDSFLHTV	SCLC, BRCA, u melanin, bệnh ung thư thực quản, bệnh ung thư tử cung, bệnh ung thư túi mật, bệnh ung thư ống mật chủ
6	VLISLKQAPLV	BRCA, bệnh ung thư bàng quang, bệnh ung thư túi mật, bệnh ung thư ống mật chủ
8	IVDDLTINL	NSCLC, GC, u melanin, bệnh ung thư tử cung, bệnh ung thư túi mật, bệnh ung thư ống mật chủ, NHL
9	FLFDGSANLV	SCLC, u melanin, OC, bệnh ung thư bàng quang, bệnh ung thư túi mật, bệnh ung thư ống mật chủ

SEQ ID No.	Trình tự	Các thực thể bổ sung
10	FLVDGSSAL	SCLC, CRC, u melanin, bệnh ung thư thực quản, bệnh ung thư bàng quang, bệnh ung thư túi mật, bệnh ung thư ống mật chủ
11	FLYKIIDEL	SCLC, u melanin, bệnh ung thư bàng quang, bệnh ung thư túi mật, bệnh ung thư ống mật chủ
12	FVSEIVDTV	SCLC, GC, CRC, bệnh ung thư bàng quang, bệnh ung thư túi mật, bệnh ung thư ống mật chủ
13	LLAGQTYHV	NSCLC, BRCA, OC, bệnh ung thư thực quản, bệnh ung thư bàng quang, bệnh ung thư túi mật, bệnh ung thư ống mật chủ
14	VLAKPGVISV	BRCA, bệnh ung thư túi mật, bệnh ung thư ống mật chủ
15	SLANNVTSV	Bệnh ung thư bàng quang, bệnh ung thư tử cung, bệnh ung thư túi mật, bệnh ung thư ống mật chủ
16	APVNVTTEVKSV	AML
19	HLAPETDEDDL	Bệnh ung thư túi mật, bệnh ung thư ống mật chủ
20	RLAGDGVGAV	Bệnh ung thư bàng quang
21	HLMDQPLSV	OC, bệnh ung thư thực quản, bệnh ung thư tử cung, bệnh ung thư túi mật, bệnh ung thư ống mật chủ
22	TLDGAAVNQV	Bệnh ung thư thực quản, bệnh ung thư tử cung, bệnh ung thư túi mật, bệnh ung thư ống mật chủ
23	SLSAFTLFL	SCLC, BRCA, u melanin, OC, bệnh ung thư thực quản, bệnh ung thư bàng quang, bệnh ung thư túi mật, bệnh ung thư ống mật chủ, NHL
24	GLLEELVTV	SCLC, CRC, BRCA, bệnh ung thư tử cung, bệnh ung thư túi mật, bệnh ung thư ống mật chủ
29	FLQEYLDAI	bệnh ung thư bàng quang
30	VVDEGPTGV	SCLC, CRC, u melanin, bệnh ung thư bàng quang, bệnh ung thư tử cung, bệnh ung thư túi mật, bệnh ung thư ống mật chủ, NHL
34	MLMPVHFLL	BRCA
37	GLLKKINSV	BRCA, bệnh ung thư thực quản, bệnh ung thư bàng quang, bệnh ung thư túi mật, bệnh ung thư ống mật chủ, OC
38	NLVEKTPALV	AML
39	TLLSNLEEA	Bệnh ung thư bàng quang, bệnh ung thư tử cung, NHL

SEQ ID No.	Trình tự	Các thực thể bổ sung
40	FILDSAETTTL	SCLC, BRCA, OC, bệnh ung thư thực quản
41	FLLDGSEGV	SCLC, u melanin, bệnh ung thư bàng quang, bệnh ung thư túi mật, bệnh ung thư ống mật chủ
42	KLVDKSTEL	SCLC, BRCA, u melanin, bệnh ung thư túi mật, bệnh ung thư ống mật chủ
43	RLDQRVPQI	SCLC, bệnh ung thư túi mật, bệnh ung thư ống mật chủ
44	VLLDKIKNLQV	SCLC, OC, bệnh ung thư thực quản, bệnh ung thư bàng quang, bệnh ung thư túi mật, bệnh ung thư ống mật chủ, NHL
45	VADKIHSV	BRCA, u melanin, bệnh ung thư thực quản, bệnh ung thư bàng quang
46	TFAPVNVTTEVKSV	bệnh ung thư túi mật, bệnh ung thư ống mật chủ
47	KMDASLGNLFA	bệnh ung thư thực quản, bệnh ung thư bàng quang
50	ALAAILTRL	bệnh ung thư tử cung, bệnh ung thư túi mật, bệnh ung thư ống mật chủ
51	ALMLQGVDL	BRCA
53	SSFGGLGGGSV	BRCA
54	VLLSEIEVA	U melanin, bệnh ung thư tử cung
55	YLDAMMNEA	PrC, u melanin, bệnh ung thư bàng quang, bệnh ung thư túi mật, bệnh ung thư ống mật chủ
58	GLAAFKAFL	SCLC, BRCA, u melanin, OC, bệnh ung thư thực quản, bệnh ung thư tử cung, bệnh ung thư túi mật, bệnh ung thư ống mật chủ, NHL, OC
60	YLEEDVYQL	U melanin, bệnh ung thư thực quản, bệnh ung thư bàng quang, bệnh ung thư tử cung, bệnh ung thư túi mật, bệnh ung thư ống mật chủ, NHL
64	FLVSNMLLAEA	Bệnh ung thư bàng quang
65	YLYDSETKNA	SCLC, BRCA, bệnh ung thư tử cung, bệnh ung thư túi mật, bệnh ung thư ống mật chủ
66	ALLSGLREA	GC, BRCA
67	KMFFLIDKV	BRCA, u melanin, OC, bệnh ung thư bàng quang, bệnh ung thư tử cung, bệnh ung thư túi mật, bệnh ung thư ống mật chủ, NHL, OC

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

Do đó, theo khía cạnh khác, sáng chế mô tả việc sử dụng ít nhất một peptit theo sáng chế được chọn từ các trình tự SEQ ID No. 3, 4, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 21, 23, 24, 30, 36, 40, 41, 42, 43, 44, 50, 53, 58, 60, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 81, 82, 83, 84 85, và 86 để – theo một phương án được ưu tiên kết hợp - điều trị bệnh ung thư phổi.

Do đó, theo khía cạnh khác, sáng chế mô tả việc sử dụng ít nhất một peptit theo sáng chế được chọn từ các trình tự SEQ ID No. 3, 4, 5, 15, 30, 45, 50, 58, 60, 65, 66, 68, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, và 86 để – theo một phương án được ưu tiên kết hợp - điều trị bệnh ung thư thận.

Do đó, theo khía cạnh khác, sáng chế mô tả việc sử dụng ít nhất một peptit theo sáng chế được chọn từ các trình tự SEQ ID No. 3, 5, 15, 30, 36, 39, 47, 55, 67, 73, 74, 79, 81, 82, 86, và 87 để – theo một phương án được ưu tiên kết hợp - điều trị bệnh ung thư não.

Do đó, theo khía cạnh khác, sáng chế mô tả việc sử dụng ít nhất một peptit theo sáng chế được chọn từ các trình tự SEQ ID No. 3, 9, 11, 42, 43, 44, 50, 55, 60, 65, 68, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 81, 82, 83, 84, và 86 để – theo một phương án được ưu tiên kết hợp - điều trị bệnh ung thư ruột kết.

Do đó, theo khía cạnh khác, sáng chế mô tả việc sử dụng ít nhất một peptit theo sáng chế được chọn từ các trình tự SEQ ID No. 3, 9, 11, 42, 43, 44, 50, 55, 60, 65, 68, 70, 71, 72, 73 74, 75, 76, 77, 78, 79, 81, 82, 83, 84, và 86 để – theo một phương án được ưu tiên kết hợp - điều trị bệnh ung thư trực tràng.

Do đó, theo khía cạnh khác, sáng chế mô tả việc sử dụng ít nhất một peptit theo

sáng chế được chọn từ các trình tự SEQ ID No. 3, 8, 9, 12, 15, 41, 42, 43, 51, 65, 69, 70, 71, 72 73, 74, 75, 77, 81, 83, 84, và 85 để – theo một phương án được ưu tiên kết hợp - điều trị bệnh ung thư thực quản.

Do đó, theo khía cạnh khác, sáng chế mô tả việc sử dụng ít nhất một peptit theo sáng chế được chọn từ các trình tự SEQ ID No. 4, 5, 15, 44, 66, 72, 78, và 86 để – theo một phương án được ưu tiên kết hợp - điều trị u melanin.

Do đó, theo khía cạnh khác, sáng chế mô tả việc sử dụng ít nhất một peptit theo sáng chế được chọn từ các trình tự SEQ ID No. 5, 15, 24, 30, 41, 55, 65, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 83, và 84 để – theo một phương án được ưu tiên kết hợp - điều trị bệnh ung thư buồng trứng.

Do đó, theo khía cạnh khác, sáng chế mô tả việc sử dụng ít nhất một peptit theo sáng chế được chọn từ các trình tự SEQ ID No. 9, 10, 11, 12, 41, 43, 60, 71, 72, 73, 78, 83, và 84 để – theo một phương án được ưu tiên kết hợp - điều trị bệnh ung thư vú.

Do đó, theo khía cạnh khác, sáng chế mô tả việc sử dụng ít nhất một peptit theo sáng chế được chọn từ các trình tự SEQ ID No. 5, 30, 44, 55, 58, 65, 67, 68, 69, 71, 72, 73, 74, 76, 79, 81, 82, 85, và 86 để – theo một phương án được ưu tiên kết hợp - điều trị bệnh ung thư gan.

Do đó, theo khía cạnh khác, sáng chế mô tả việc sử dụng ít nhất một peptit theo sáng chế được chọn từ các trình tự SEQ ID No. 10, 15, 24, 30, 34, 44, 45, 50, 68, 70, 71, 72, 73, 74, 78, 81, 84, và 86 để – theo một phương án được ưu tiên kết hợp - điều trị bệnh ung thư dạ dày.

Do đó, theo khía cạnh khác, sáng chế mô tả việc sử dụng ít nhất một peptit theo sáng chế được chọn từ các trình tự SEQ ID No. 23, 39, 64, 69, 73, 78, 81, và 82 để – theo một phương án được ưu tiên kết hợp - điều trị bệnh ung thư tuyến tiền liệt.

Do đó, theo khía cạnh khác, sáng chế mô tả việc sử dụng ít nhất một peptit theo sáng chế được chọn từ các trình tự SEQ ID No. 16, 30, 66, và 74 để – theo một phương án được ưu tiên kết hợp - điều trị bệnh ung thư dạng bạch cầu.

Ngoài ra, sáng chế đề cập đến peptit theo sáng chế có khả năng gắn kết với phân tử của phức hợp tương thích mô chính (MHC) nhóm -I ở người hoặc - ở dạng kéo dài, như biến thể theo chiều dài- MHC nhóm -II.

Sáng chế còn đề xuất các peptit theo sáng chế trong đó (mỗi) peptit này gồm hoặc chủ yếu bao gồm trình tự axit amin theo các trình tự từ SEQ ID NO: 1 đến SEQ

ID NO: 67.

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

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

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

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

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

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

Sáng chế còn đề xuất 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.

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

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

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

Sáng chế còn đề xuất phương pháp theo sáng chế nêu trên, trong đó kháng nguyên được tải lên các phân tử của MHC nhóm I hoặc II được biểu hiện trên bề mặt của tế bào trình diện kháng nguyên thích hợp hoặc tế bào trình diện kháng nguyên

nhân tạo bằng cách cho kháng nguyên với lượng đủ tiếp xúc với tế bào trình diện kháng nguyên.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp theo sáng chế trong đó tế bào trình diện kháng nguyên chứa vectơ biểu hiện có khả năng biểu hiện hoặc biểu hiện peptit nêu trên có các trình tự từ SEQ ID No. 1 đến SEQ ID No.: 67, tốt hơn là có các trình tự từ SEQ ID No. 1 đến SEQ ID No. 34, hoặc trình tự axit amin của biến thể.

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

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

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

Tốt hơn, nếu thuốc này dùng cho liệu pháp tế bào, vacxin 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 tụy, ung thư phổi, ung thư thận, ung thư não, ung thư ruột kết hoặc trực tràng, ung thư thực quản, ung thư vú, ung thư buồng trứng, ung thư dạ dày, ung thư gan, ung thư tuyến tiền liệt, u melanin và bệnh bạch cầu, và tốt hơn nếu là tế bào ung thư tụy.

Sáng chế còn đề xuất các dấu ấn sinh học trên cơ sở peptit theo sáng chế, được gọi ở đây là "đích" có thể được sử dụng trong chẩn đoán bệnh ung thư, tốt hơn nếu là bệnh ung thư tụy. Dấu ấn này có thể là sự biểu hiện quá mức của chính (các) peptit, hoặc sự biểu hiện quá mức của (các) gen tương ứng. Các dấu ấn này cũng có thể được sử dụng để dự đoán xác xuất thành công của việc điều trị, tốt hơn nếu là liệu pháp miễn dịch, và được ưu tiên nhất là liệu pháp miễn dịch hướng cùng đích được xác định bằng dấu ấn sinh học này. Ví dụ, kháng thể hoặc thụ thể TCR hòa tan có thể

được sử dụng để nhuộm các mẫu khối u để phát hiện sự có mặt của peptit quan tâm trong phức hợp với MHC.

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

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

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.

Gen của ACAT2 mã hóa axetyl-CoA axetyltransferaza 2, thiolaza tham gia vào quá trình chuyển hóa lipit. Sự biểu hiện ACAT2 được điều hòa tăng trong caxinom tế bào gan (Song et al., 2006). Sự biểu hiện ACAT2 có liên quan đến sự kháng phóng xạ ở các dòng tế bào ung thư tụy (Souchek et al., 2014).

Gen của ACTA1 mã hóa alpha actin trong cơ xương, thành viên của họ actin của protein, là các protein được bảo toàn ở mức cao đóng vai trò trong sự di động, cấu trúc và tính toàn vẹn của tế bào. ACTA1, dấu ấn cơ-biểu mô cổ điển, đã được chứng minh là biểu hiện ở mức cao trong các trong nguyên bào sợi liên quan đến bệnh ung thư ở bệnh ung thư bàng quang, caxinom tế bào vảy ở miệng, bệnh ung thư vú xâm lấn, bệnh ung thư dạ dày, caxinom đường mật và caxinom gan di căn và góp phần vào sự chuyển tiếp biểu mô-trung mô, sự hình thành và xơ hóa mô đỡ khối u (Schulte et al., 2012; Franz et al., 2010; Kuroda et al., 2005; Nakayama et al., 2002; Terada et al., 1996).

Gen của ACTA2 mã hóa alpha actin của cơ trơn, thành viên họ actin của các protein, là các protein được bảo toàn ở mức cao đóng vai trò trong sự di động, cấu trúc và tính toàn vẹn của tế bào (RefSeq, 2002). Hiện tượng đa hình nucleotit đơn hoặc sự thay đổi số lượng bản sao của ACTA2 đã được xác định trong bệnh bạch cầu dạng lymphô mạn tính, sự di căn não của bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ và các dòng tế bào có nguồn gốc từ u melanin di căn (Berndt et al., 2013; Lee et al., 2012; Dutton-Regester et al., 2012). Về mặt chức năng, mức độ biểu hiện cao của ACTA2 dường như có liên quan đến mức độ xâm lấn của tế bào khối u gia tăng và sự hình thành di căn (Kojima et al., 2014; Lee et al., 2013b; Tatenhorst et al., 2004).

Gen của ACTB mã hóa beta actin, thành phần chính của bộ phận co và một

trong hai actin trong bộ khung tế bào không phải cơ (RefSeq, 2002). ACTB đã được chứng minh là được điều hòa giảm trong bệnh ung thư gan, u melanin, bệnh ung thư thận, bệnh ung thư kết-trực tràng, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư tụy, bệnh ung thư thực quản, bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh bạch cầu và u lymphô. Sự biểu hiện bất thường và polyme hóa của ACTB và các thay đổi đối với bộ khung tế bào dường như có liên quan đến tính xâm lấn và sự di căn của các bệnh ung thư (Guo et al., 2013).

Gen của ACTBL2 mã hóa actin kappa, thành viên của họ actin của các protein, là các protein được bảo toàn ở mức cao đóng vai trò trong sự di động, cấu trúc và tính toàn vẹn của tế bào (RefSeq, 2002). Quan sát được sự biểu hiện gia tăng của ACTBL2 ở caxinom tế bào gan và các tế bào gan, trong khi nó làm thay đổi các đặc tính sinh trưởng của tế bào và góp phần vào sự tiên lượng xấu sau khi phẫu thuật (Chang et al., 2006; Chang et al., 2011).

Gen của ACTC1 mã hóa alpha actin 1 trong cơ tim, là thành phần chính của bộ phận co trong các tế bào cơ tim (RefSeq, 2002). Mức biểu hiện của ACTC1 thay đổi đã được thông báo trong bệnh ung thư bàng quang, bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ được điều trị bằng paclitaxel và bệnh ung thư buồng trứng kháng hóa chất (Zaravinos et al., 2011; Che et al., 2013; Pan et al., 2009). Ngoài ra, ACTC1 có thể là dấu ấn chẩn đoán hữu ích đối với bệnh ung thư tuyến tiền liệt và sacom cơ vân (Huang et al., 2010; Clement et al., 2003).

Gen của ACTG1 mã hóa actin gama 1, actin trong bào chất được phát hiện trong các tế bào không phải tế bào cơ, có tác dụng làm chất trung gian của sự di động của tế bào bên trong (RefSeq, 2002). ACTG1 đã được chứng minh là được biểu hiện quá mức trong bệnh ung thư phổi tế bào nhỏ và sacom xương và được điều hòa giảm trong bệnh ung thư buồng trứng biểu mô (Li et al., 2010; Jeong et al., 2011; Chow et al., 2010). Các thay đổi về mức ACTG1 đã được thông báo là kích thích sự xâm lấn và sự hình thành di căn ở các loại tế bào ung thư khác nhau. Ở các tế bào ung thư ruột kết và tế bào caxinom của tế bào gan, sự biểu hiện quá mức của ACTG1 làm gia tăng sự di trú và mức độ xâm lấn, trong khi ở tế bào u melanin và tế bào ung thư tuyến nước bọt, sự điều hòa giảm của ACTG1 có liên quan đến kiểu hình này (Simiczyjew et al., 2014; Luo et al., 2014; Zhang et al., 2006; Gutgemann et al., 2001; Suzuki et al., 1998).

Gen của ACTG2 mã hóa actin gama 2; actin trong cơ trơn được tìm thấy ở các mô ruột, làm trung gian cho sự di động của tế bào bên trong (RefSeq, 2002). ACTG2 đã được bàn luận làm dấu ấn sinh học tiềm tàng trong việc chẩn đoán bệnh ung thư tuyến tiền liệt và đã được chứng minh là được điều hòa tăng trong các tế bào nền của tuyến tiền liệt được chuyển biệt hóa (Fillmore et al., 2014; Untergasser et al., 2005). Liên quan đến việc hóa trị liệu, ACTG2 được điều hòa tăng khi điều trị các tế bào ung thư thanh quản bằng paclitaxel, dường như có liên quan đến sự kháng cisplatin ở các tế bào ung thư vú và đã được chứng minh là có tương quan tích cực với độ nhạy của bệnh ung thư kết-trực tràng và sự di căn đến gan với chế độ liều FOLFOX4 (Xu et al., 2013; Watson et al., 2007; Lu et al., 2013b).

Gen của ADAM8 mã hóa vùng 8 của ADAM metalopeptidaza, thành viên của họ vùng disintegrin và metaloproteaza tham gia vào sự tương tác tế bào-tế bào và tế bào-chất nền (RefSeq, 2002). Sự biểu hiện quá mức ADAM8 ở bệnh ung thư tụy có liên quan đến sự di trú và xâm lấn gia tăng của các tế bào ung thư tuyến ống tụy (Schlomann et al., 2015). ADAM8 tham gia vào sự di trú và xâm lấn của tế bào khối u ở bệnh ung thư phổi, caxinom tế bào thận và bệnh ung thư não (Mochizuki and Okada, 2007).

Gen của AEBP1 mã hóa protein 1 gắn kết gen tăng cường của tế bào mỡ, carboxypeptidaza có thể có tác dụng làm chất đồng ức chế-phiên mã có ý nghĩa quan trọng đối với sự tạo mỡ và sự biệt hóa tế bào cơ trơn (RefSeq, 2002). AEBP1 được điều hòa tăng trong u melanin và góp phần vào sự kháng thuốc mắc phải với sự ức chế thể đồng đẳng B1 của gen gây ung thư của virut gây bệnh sacôm thể đột biến v-raf ở chuột (BRAF) (Hu et al., 2013). AEBP1 được điều hòa tăng trong phần lớn u nguyên bào xốp nguyên phát (Reddy et al., 2008).

Gen của AHNAK2 mã hóa protein khung AHNAK nucleoprotein 2 (Marg et al., 2010). AHNAK2 là yếu tố quan trọng của con đường tiết không cổ điển của yếu tố sinh trưởng nguyên bào sợi 1 (fibroblast growth factor 1: FGF1), yếu tố tham gia vào sự phát triển và xâm lấn của khối u (Kirov et al., 2015).

Gen của ANKH mã hóa chứng cứng khớp, thể đồng đẳng tiến triển (ở chuột)/chất điều hòa sự vận chuyển pyrophosphat vô cơ ANKH, protein xuyên màng đa năng để kiểm soát mức pyrophosphat (RefSeq, 2002).

Gen của ANO1 mã hóa anoctamin 1, kênh clorua được hoạt hóa bằng canxi có

liên quan đến sacôm ruột non và bệnh ung thư miệng (RefSeq, 2002). ANO1 được khuếch đại trong bệnh ung thư tế bào vảy thực quản (esophageal squamous cell cancer: ESCC), khối u mô đệm đường dạ dày-ruột (gastrointestinal stromal tumor: GIST), caxinom tế bào vảy vùng đầu và cổ (head and neck squamous cell caxinoma: HNSCC), và bệnh ung thư tụy và bệnh ung thư vú (Qu et al., 2014).

Gen của APOB mã hóa apolipoprotein B, apolipoprotein chính của các vi thể nhũ trấp và lipoprotein tỷ trọng thấp (low density lipoprotein: LDH) (RefSeq, 2002). Ở HCC liên quan đến virut HBV âm tính với alpha-fetoprotein, APOB được phát hiện là một trong số 14 protein được biểu hiện khác biệt có thể liên quan đến sự tiến triển HCC (He et al., 2014). Ở bệnh ung thư vú tiến tiển, APOB được phát hiện là một trong số 6 protein được biểu hiện khác biệt để có thể dự đoán trạng thái đáp ứng với liệu pháp hóa học bổ trợ mới và thời gian sống thêm không tái phát bệnh của bệnh nhân (Hyung et al., 2011).

Gen của ASPHD1 mã hóa vùng aspartat beta-hydroxylaza chứa 1. ASPHD1 nằm trên nhiễm sắc thể 16p11.2 (RefSeq, 2002).

Gen của ATM mã hóa chứng mất điều hòa giãn mạch thể đột biến, thành viên họ PI3/PI4-kinaza và chất kiểm soát chính của con đường truyền tín hiệu kiểm soát chu trình tế bào cần thiết cho sự đáp ứng của tế bào đối với sự tổn thương ADN và tính ổn định của hệ gen (RefSeq, 2002). ATM là chất ức chế khối u thường bị đột biến trong khoảng rộng các bệnh ung thư ở người bao gồm bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư kết - trực tràng, bệnh ung thư vú và bệnh ung thư tạo máu (Weber and Ryan, 2014).

Gen của ATP5B mã hóa ATP synthaza, sự vận chuyển H+, phức hợp ty thể F1, beta polypeptit, cấu trúc dưới phân tử beta của nhân xúc tác của ATP synthaza của ty thể (RefSeq, 2002). Sự biểu hiện của gen ATP5B là cao hơn đáng kể ở các mô của bệnh ung thư kết-trực tràng so với các mô khỏe mạnh (Geyik et al., 2014). Sự điều hòa giảm ATP5B ở các mô khối u có liên quan chặt chẽ đến sự di căn, sự xâm lấn, và tiên lượng xấu của bệnh ung thư túi mật (Sun et al., 2015b).

Gen của ATP5L mã hóa ATP synthaza, sự vận chuyển H+, phức hợp ty thể Fo, cấu trúc dưới phân tử G của thành phần xuyên màng của ATP synthaza của ty thể, thành phần này chứa kênh proton (RefSeq, 2002).

Gen của ATP5L2 mã hóa ATP synthaza, sự vận chuyển H+, phức hợp ty thể

Fo, cấu trúc dưới phân tử G2 của thành phần xuyên màng của ATP synthaza của ty thể, thành phần này chứa kênh proton (RefSeq, 2002).

Gen của BACE2 mã hóa enzym 2 phân giải APP ở vị trí beta, glycoprotein màng tích hợp và aspartic proteaza. BACE2 phân giải tiền protein dạng tinh bột thành beta peptit dạng tinh bột (RefSeq, 2002). BACE2 tham gia vào chức năng tế bào beta của tụy (Vassar et al., 2014).

Gen của CCNB1 mã hóa xyclin B1, protein điều hòa tham gia vào sự gián phân (RefSeq, 2002). CCNB1 là kháng nguyên của khối u đã được mô tả rõ và sự biểu hiện quá mức CCNB1 đã được mô tả đối với bệnh ung thư vú, bệnh ung thư vùng đầu và cổ, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh ung thư kết - trực tràng, bệnh ung thư phổi và bệnh ung thư gan (Egloff et al., 2006).

Gen của CEACAM6 mã hóa phân tử 6 bám dính tế bào liên quan đến kháng nguyên ung thư phôi (kháng nguyên phản ứng chéo không đặc hiệu), thành viên của họ CEACAM của các dấu ấn khối u (RefSeq, 2002). CEACAM6 được điều hòa tăng trong bệnh ung thư dạ dày (Yasui et al., 2004). CEACAM6 là kháng nguyên khối u vú ứng viên (Sood, 2010).

Gen của CLTA mã hóa clathrin, chuỗi nhẹ A, thành phần cấu trúc của các hốc phủ có chức năng điều hòa (RefSeq, 2002). Gen CLTA có kiểu ghép khác ở bệnh u thần kinh đệm (Cheung et al., 2008).

Gen của CTLB mã hóa clathrin, chuỗi nhẹ B, thành phần cấu trúc của các hốc phủ có chức năng điều hòa (RefSeq, 2002).

Gen của CLU mã hóa chaperon được tiết ra có thể tham gia vào một số sự kiện sinh học cơ bản như gây chết tế bào, sự tiến triển của khối u, và các rối loạn thoái hóa thần kinh (RefSeq, 2002). Vai trò của nó trong sự tạo khối u dường như là không rõ ràng như trong các tế bào bình thường và trong giai đoạn đầu của sự gây ung thư, CLU có thể ức chế sự tiến triển của khối u, trong khi ở giai đoạn tạo u tiến triển, nó có thể tạo ra lợi thế sống thêm đáng kể ở khối u bằng cách ức chế nhiều tác nhân gây stress khi điều trị và làm gia tăng sự di căn. CLU đã được chứng minh là đóng vai trò quan trọng trong sinh bệnh học của bệnh ung thư tuyến tiền liệt, điều hòa đặc tính xâm lấn của caxinom tế bào thận trong suốt ở người bằng cách điều hòa sự truyền tín hiệu ERK1/2 và sự biểu hiện MMP-9 và tạo ra sức đề kháng với việc điều trị các giai đoạn tiến triển của bệnh ung thư phổi (Trougakos, 2013; Panico et al., 2009; Takeuchi et

al., 2014; Wang et al., 2014b).

Gen của COL12A1 mã hóa chuỗi alpha của colagen typ XII, thành viên của họ colagen dạng sợi kết hợp với các vòng xoắn bộ ba gián đoạn (fibril-associated collagens with interrupted triple helices: FACIT) và do đó là một phần của khuôn nền ngoại bào (extracellular matrix: ECM) (RefSeq, 2002). COL12A1 được biểu hiện quá mức ở các biến thể kháng thuốc của dòng tế bào ung thư buồng trứng (Januchowski et al., 2014). Ở bệnh ung thư kết-trực tràng, COL12A1 được biểu hiện quá mức trong chất nền tạo mô xơ bởi các nguyên bào sợi liên quan đến bệnh ung thư và quanh các nguyên bào sợi này, cũng như trong dòng tế bào ung thư trước khi xâm lấn (Karagiannis et al., 2012).

Gen của COL6A3 mã hóa chuỗi alpha-3 của colagen typ VI, colagen dạng sợi hạt được tìm thấy ở phần lớn các mô liên kết, đóng vai trò quan trọng trong sự cấu tạo của các thành phần nền (RefSeq, 2002). Sự biểu hiện COL6A3 được thông báo là tăng lên ở bệnh ung thư tụy, bệnh ung thư ruột kết, bệnh ung thư dạ dày, caxinom u biểu bì dạng nhầy và bệnh ung thư buồng trứng. Bệnh ung thư liên quan đến các biến thể của sản phẩm phiên mã bao gồm các exon 3, 4 và 6 phát hiện được ở bệnh ung thư ruột kết, bệnh ung thư bàng quang, bệnh ung thư tuyến tiền liệt và bệnh ung thư tụy (Arafat et al., 2011; Smith et al., 2009; Yang et al., 2007; Xie et al., 2014; Leivo et al., 2005; Sherman-Baust et al., 2003; Gardina et al., 2006; Thorsen et al., 2008). Ở bệnh ung thư buồng trứng, mức COL6A3 có tương quan với mức độ khối u cao hơn và ở bệnh ung thư tụy, COL6A3 đã được chứng minh là thể hiện dấu ấn sinh học trong huyết thanh để chẩn đoán thích hợp (Sherman-Baust et al., 2003; Kang et al., 2014).

Gen của DCBLD2 mã hóa discoidin, protein 2 chứa vùng CUB và LCCL còn được gọi là protein giống như neuropilin có nguồn gốc từ biểu mô và tế bào cơ trơn, đồng thụ thể protein xuyên màng (RefSeq, 2002). DCBLD2 được điều hòa tăng trong bệnh u nguyên bào xốp và bệnh ung thư vùng đầu và cổ (head and neck cancer: HNC) và là yếu tố cần thiết cho sự tạo khối u được kích thích bằng EGFR (Feng et al., 2014). Ngoài ra, DCBLD2 được điều hòa tăng trong các dòng phụ và mẫu mô của bệnh ung thư phổi di căn ở mức cao (Koshikawa et al., 2002). Trái lại, sự biểu hiện của DCBLD2 được làm bất hoạt bằng cách tăng mức độ metyl hóa của gen khởi đầu của nó ở bệnh ung thư dạ dày (Kim et al., 2008).

Gen của DUSP14, phosphataza 14 có tính đặc hiệu kép, có thể khử phosphoryl

hóa tyrosin cũng như các gốc serin/threonin và đóng vai trò trong việc làm bất hoạt sự truyền tín hiệu MAP kinaza (RefSeq, 2002). Hiện tượng đa hình nucleotit đơn trong gen DUSP14 có liên quan đến nguy cơ u melanin biến đổi (Yang et al., 2014a; Liu et al., 2013a).

Gen của EEF1A1 mã hóa isoform của cấu trúc dưới phân tử alpha của phức hợp yếu tố kéo dài-1, là nguyên nhân gây ra sự cung cấp enzym của aminoaxyl tRNA đến ribosom (RefSeq, 2002). EEF1A1 đã được chứng minh là được điều hòa tăng ở nhiều bệnh ung thư thực thể, bao gồm bệnh ung thư kết-trực tràng, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, u nguyên bào xốp và caxinom tế bào vảy và được mô tả làm dấu ấn sinh học tiềm tàng trong huyết thanh đối với bệnh ung thư tuyến tiền liệt (Matassa et al., 2013; Vui-Kee et al., 2012; Lim et al., 2011; Kuramitsu et al., 2010; Kido et al., 2010; Scrideli et al., 2008; Qi et al., 2005; Rehman et al., 2012). Theo thuyết cơ giới, EEF1A1 ức chế sự chết tế bào theo chương trình nhờ sự tương tác với p53 và p73, kích thích sự tăng sinh nhờ sự ức chế phiên mã của chất ức chế chu trình tế bào p21 và tham gia vào sự điều hòa quá trình chuyển tiếp biểu mô-mô giữa (Blanch et al., 2013; Choi et al., 2009; Hussey et al., 2011).

Gen của EEF1A1P5 mã hóa yếu tố kéo dài 1 alpha 1 gen giả 5 của quá trình dịch mã của sinh vật có nhân điển hình và nằm trên nhiễm sắc thể 9q34.13 (RefSeq, 2002).

Gen của FAMC3 là thành viên của họ có độ tương đồng về trình tự (FAM3) và mã hóa protein được tiết ra bằng vùng GG. Sự thay đổi về mức độ biểu hiện của protein này đã được lưu ý trong các tế bào có nguồn gốc từ bệnh ung thư tụy (RefSeq, 2002). Ở bệnh u melanin, FAMC3 đã được xác định là dấu ấn sinh học ứng viên cho bệnh nội sinh, và cơ chế của thời gian sống thêm của tế bào khối u quan trọng (Zou et al., 2002; Kraya et al., 2015). FAMC3 đóng vai trò chủ yếu trong sự chuyển tiếp biểu mô-mô giữa, quá trình này có tương quan với tính xâm lấn, sự tiến triển di căn của các khối u và thời gian sống thêm ngắn, đặc biệt là ở bệnh ung thư tế bào gan, bệnh ung thư kết-trực tràng, bệnh ung thư phổi và bệnh ung thư vú (Csiszar et al., 2014; Gao et al., 2014c; Song et al., 2014; Chaudhury et al., 2010; Lahsnig et al., 2009).

Gen của FAP mã hóa serin proteaza xuyên màng được biểu hiện chọn lọc ở các nguyên bào sợi nền có khả năng phản ứng của các bệnh ung thư biểu mô (các nguyên

bào sợi liên quan đến bệnh ung thư hoặc CAF (cancer-associated fibroblast), mô tạo hạt của việc làm liền vết thương, và các tế bào ác tính của sacôm xương và mô mềm (RefSeq, 2002). FAP đóng vai trò quan trọng trong sự phát triển bệnh ung thư và sự di căn do sự liên quan của nó với sự bám dính tế bào, quá trình di trú và tái mô hình hóa của khuôn nền ngoại bào (ECM) (Jacob et al., 2012). Sự biểu hiện quá mức của FAP có tương quan với sự tiên lượng xấu, giai đoạn khối u tiến triển, sự hình thành di căn và khả năng xâm lấn của các bệnh ung thư khác nhau, cụ thể là bệnh ung thư ruột kết, caxinom tế bào vảy thực quản, ung thư tuyến tụy, u nguyên bào xốp, sacom xương, bệnh ung thư buồng trứng và bệnh ung thư vú (Wikberg et al., 2013; Kashyap et al., 2009; Cohen et al., 2008; Mentlein et al., 2011; Yuan et al., 2013; Zhang et al., 2011; Ariga et al., 2001).

Gen của FKBP10 mã hóa protein 10 gắn kết FK506, thuộc về họ peptidyl-prolyl cis/trans isomeraza typ FKBP. Sản phẩm gen FKBP10 khu trú đến lưới nội bào tương và có tác dụng làm chaperon phân tử (RefSeq, 2002). FKBP10 được xác định là gen mới tham gia vào việc thu được và duy trì kiểu hình kháng adriamycin ở các tế bào bệnh bạch cầu (Sun et al., 2014). FKBP10 có liên quan đến bệnh ung thư kết-trực tràng do sự điều hòa tăng của nó (Olesen et al., 2005). Trái lại, sự biểu hiện giảm của FKBP10 là đặc trưng của caxinom buồng trứng biểu mô (Quinn et al., 2013).

Gen của FLNA mã hóa filamin A, protein gắn kết actin tạo liên kết ngang của các sợi actin và liên kết các sợi actin với glycoprotein màng. Protein đã mã hóa tham gia vào quá trình tái mô hình hóa của bộ khung tế bào để làm thay đổi hình dạng và sự di trú của tế bào và tương tác với các integrin, phức hợp thụ thể xuyên màng, và các nhân tố truyền tin thứ hai (RefSeq, 2002). Tùy thuộc vào sự khu trú dưới mức tế bào của nó, filamin A đóng vai trò kép trong bệnh ung thư: Trong bào chất, filamin A có tác dụng trong nhiều con đường truyền tín hiệu sinh trưởng khác nhau, ngoài việc tham gia vào con đường di trú tế bào và bám dính tế bào. Do đó, sự biểu hiện quá mức của nó có tác dụng kích thích khối u. Trái lại, với filamin A có chiều dài đầy đủ, đầu tận cùng C, được giải phóng khi phân giải protein, khu trú đến nhân, ở đó nó tương tác với các yếu tố phiên mã và nhờ đó ức chế sự phát triển và di căn của khối u (Savoy and Ghosh, 2013).

Gen của GGA1 mã hóa thành viên của Golgi được khu trú, vùng gama adaptin ear-chứa, họ protein (GGA) gắn kết ARF. Các thành viên của họ này là các protein vỏ

thường gặp có tác dụng điều hòa quá trình vận chuyển các protein giữa mạng lưới trans-Golgi và lysosom (RefSeq, 2002).

Gen của HBB mã hóa chuỗi beta của hemoglobin của người, metaloprotein vận chuyển oxy chứa sắt trong hồng cầu (RefSeq, 2002). Khả năng bệnh ung thư vú tạo ra sự di căn xương và nội tạng thể hiện dấu hiệu rõ ràng của hiệu quả lâm sàng kém so với các trường hợp bệnh ung thư vú có sự di căn được giới hạn đến xương. Sự biểu hiện gia tăng của HBB trong sự di căn xương có tương quan với khả năng của chúng trong việc lan tỏa nhanh chóng đến các cơ quan khác (Capulli et al., 2012). HBB đã được chứng minh là được biểu hiện quá mức ở mô caxinom cổ tử cung. Sự biểu hiện lệch vị trí của HBB ở các tế bào ung thư cổ tử cung làm ức chế tình trạng stress do oxy hoá và cải thiện khả năng sống của tế bào (Li et al., 2013).

Gen của HBD mã hóa chuỗi delta của hemoglobin của người, metaloprotein vận chuyển oxy chứa sắt trong hồng cầu. Hai chuỗi alpha cùng với hai chuỗi delta tạo thành hemoglobin A2, với HbF chứa 3% hemoglobin trưởng thành (RefSeq, 2002).

Gen của HKDC1 mã hóa vùng chứa hexokinaza 1, có hoạt tính hexokinaza *in vitro* (Guo et al., 2015). Bằng cách sử dụng phương pháp mới để xác định các đích điều trị tiềm năng từ các dữ liệu không đồng nhất, HKDC1, ngoài các đích điều trị đã biết rõ khác, được phát hiện là đích điều trị tiềm năng mới đối với bệnh ung thư phổi (Li and Huang, 2014).

Gen của HSPD1 mã hóa protein 1 60kDa sốc nhiệt của ty thể, thành viên của họ chaperonin, là thành phần thiết yếu của việc gấp cuộn và ghép các protein mới được thu nhận vào ty thể và có thể có tác dụng làm phân tử truyền tín hiệu trong hệ miễn dịch bẩm sinh (RefSeq, 2002). Mặc dù HSPD1 được cho là protein trong ty thể, nó được tìm thấy ở phần bào tan, màng tế bào, nang, bề mặt tế bào, không gian ngoài tế bào, và máu. Do mức HSPD1 trong phần bào tan tăng dần hoặc giảm dần trong khi gây ung thư ở các cơ quan khác nhau, HSPD1 có thể được dùng làm dấu ấn sinh học để chẩn đoán và tiên lượng các tổn thương của khối u và tiền khối u. Ngoài ra, một số chức năng mới được xác định của HSPD1 có liên quan đến sự gây ung thư, cụ thể là có liên quan đến sự sống sót và tăng sinh của tế bào khối u và gen này đã được bàn luận sâu rộng làm đích hứa hẹn của liệu pháp kháng u (Pace et al., 2013; Nakamura and Minegishi, 2013; Cappello et al., 2013; Cappello et al., 2011; Cappello et al., 2008).

Gen của HYOU1 mã hóa protein 1 được điều hòa tăng bằng cách giảm oxy-huyết, đã được biết rõ là protein được điều hòa bằng bằng glucoza 170kDa (GRP170), thuộc về họ protein 70 sốc nhiệt. Sự biểu hiện của HYOU1 được tạo ra theo cách phụ thuộc stress trong điều kiện giảm oxy-huyết và dẫn đến sự tích tụ của protein trong lưới nội bào tương (ER). Protein được mã hóa bởi HYOU1 được cho là đóng vai trò quan trọng trong việc gấp cuộn và tiết ra protein trong ER (RefSeq, 2002). Hoạt tính của protein HYOU1 trong tế bào đã được chứng minh là tạo ra lợi ích sống còn ở các tế bào ung thư trong quá trình tiến triển hoặc di căn của khối u. Protein HYOU1 ngoài tế bào đóng vai trò chủ yếu trong sự tạo ra đáp ứng miễn dịch kháng u bằng cách tạo điều kiện thuận lợi cho sự cung cấp các kháng nguyên khối u cho sự trình diện chéo của chúng (Fu and Lee, 2006; Wang et al., 2014a). Các protein HYOU1 đã được đưa vào liệu pháp miễn dịch chống ung thư và có hiệu quả điều biến miễn dịch dương tính (Yu et al., 2013; Chen et al., 2013a; Yuan et al., 2012; Wang and Subjeck, 2013). Ở các tế bào ung thư tuyến tiền liệt, sự ức chế HYOU1 có hiệu quả kháng u (Miyagi et al., 2001).

Gen của IFT88 mã hóa thành viên của họ tetratrico peptit lặp lại (tetratrico peptide repeat: TPR) (RefSeq, 2002). Trong quá trình gián phân, IFT88 là một phần của phức hợp được định hướng bởi dynein 1 để vận chuyển cụm vi quản ngoại vi đến các cực thể thoi để đảm bảo sự định hướng thể thoi thích hợp. Việc làm cạn kiệt IFT88 gây ra các khuyết tật phân bào ở các tế bào được nuôi cấy của người (Delaval et al., 2011). Sự giảm mức độ biểu hiện gen IFT88 (còn được gọi là Tg737) gây ra sự tăng sinh của các tế bào mầm ở gan (tế bào bầu dục) và do đó là gen ức chế khối u tạo u ở gan (Isfort et al., 1997). Vào năm 2012, sự đột biến được phát hiện là gây ra dạng mới của chứng đau bụng và mất khứu giác ở người có thể điều trị ở chuột bằng liệu pháp gen qua trung gian adenovirut (McIntyre et al., 2012).

Gen của IGF2BP3 mã hóa yếu tố sinh trưởng II giống như insulin, protein gắn kết 3 của mRNA, protein phôi thai, ức chế sự dịch mã của yếu tố sinh trưởng II giống như insulin (RefSeq, 2002). Một số nghiên cứu đã cho thấy rằng IGF2BP3 có tác dụng trong nhiều khía cạnh quan trọng khác nhau của chức năng tế bào, như sự phân cực, sự di trú, hình thái học, sự chuyển hóa, sự tăng sinh và sự biệt hóa của tế bào. Các nghiên cứu *in vitro* đã cho thấy rằng IGF2BP3 kích thích sự tăng sinh, sự bám dính, và sự xâm lấn của tế bào khối u. Ngoài ra, IGF2BP3 đã được chứng minh là có liên

quan đến các bệnh ung thư xâm lấn và tiến triển (Bell et al., 2013; Gong et al., 2014). Sự biểu hiện quá mức IGF2BP3 đã được mô tả trong nhiều loại khối u khác nhau và có tương quan với sự tiên lượng xấu, giai đoạn khối u tiến triển và sự di căn, ví dụ như trong u nguyên bào thần kinh, caxinom kết-trực tràng, caxinom đường mật trong gan, caxinom tế bào gan, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, và caxinom tế bào thận (Bell et al., 2013; Findeis-Hosey and Xu, 2012; Hu et al., 2014; Szarvas et al., 2014; Jeng et al., 2009; Chen et al., 2011; Chen et al., 2013b; Hoffmann et al., 2008; Lin et al., 2013b; Yuan et al., 2009).

Gen của ITGB4 mã hóa protein của họ integrin. Các integrin là heterodime gồm các cấu trúc dưới phân tử alpha và beta là các thụ thể glycoprotein xuyên màng được liên kết không cộng hóa trị. Chúng làm trung gian cho sự bám dính tế bào-nền hoặc tế bào-tế bào, và truyền các tín hiệu để điều hòa sự biểu gen và sự sinh trưởng của tế bào (RefSeq, 2002). ITGB4 (còn được gọi là CD104) có xu hướng kết hợp với cấu trúc dưới phân tử alpha 6 và có thể đóng vai trò then chốt trong lĩnh vực sinh học của một số caxinom xâm lấn như caxinom tế bào vảy thực quản, caxinom bàng quang và buồng trứng (Kwon et al., 2013; Pereira et al., 2014; Chen et al., 2014b). Hiện tượng đa hình nucleotit đơn ở ITGB4 dường như có ảnh hưởng đến tính xâm lấn của khối u và sự sống sót và có thể có giá trị tiên lượng đối với các bệnh nhân ung thư vú (Brendle et al., 2008).

Gen của KCNK6 mã hóa một trong số các thành viên của siêu họ protein kênh kali chứa hai vùng P tạo lỗ. Protein kênh này, được cho là chất điều chỉnh mở, được biểu hiện rộng rãi. Protein này được kích thích bằng axit arachidonic, và được ức chế bằng cách axit hóa bên trong và các chất gây mê dễ bay hơi (RefSeq, 2002). KCNK6 (còn được gọi là K2P6.1) cùng với K2P1.1, K2P3.1, K2P5.1, K2P6.1, K2P7.1 và K2P10.1 có mức độ biểu hiện giảm đáng kể với các loại bệnh ung thư được thử nghiệm bằng cách sử dụng cơ sở dữ liệu vi mảng về bệnh ung thư trực tuyến, Oncomine (www.oncomine.org) (Williams et al., 2013).

Gen của KCNN3 thuộc về họ KCNN của kênh kali. Gen này mã hóa protein màng tích hợp để tạo ra kênh được hoạt hóa bằng canxi không phụ thuộc điện áp, kênh này được cho là điều hòa khả năng hưng phấn của tế bào thần kinh bằng cách góp phần vào thành phần làm chậm của synap sau khi làm tăng mức độ phân cực (RefSeq, 2002). Sự biểu hiện KCNN3 (còn được gọi là TASK-1) được điều hòa giảm

bằng 17beta-estradiol ở các tế bào u nguyên bào thần kinh N2A của chuột và sự tăng sinh tế bào được cải thiện (Hao et al., 2014). Sự biểu hiện KCNN3 được điều hòa tăng bằng cách cho môi trường nuôi cấy kiểu cơ quan của bệnh ung thư vú tiếp xúc với 1,25 dihydroxy vitamin D (3) với nồng độ sinh lý và siêu sinh lý (Milani et al., 2013). KCNN3 (còn được gọi là K2P3.1) cùng với K2P1.1 và K2P12.1, được biểu hiện quá mức trong loạt các bệnh ung thư được thử nghiệm bằng cách sử dụng cơ sở dữ liệu vi mảng về bệnh ung thư trực tuyến, Oncomine (www.oncomine.org) (Williams et al., 2013).

Gen của KDM1A (còn được gọi là LSD1) mã hóa protein nhân chứa vùng SWIRM, motif gắn kết FAD, và vùng amin oxidaza. Protein này là thành phần của một số phức hợp histon deaxetylaza, do nó làm bất hoạt các gen bằng cách thực hiện chức năng như một histon demethylaza (RefSeq, 2002). Sự biểu hiện quá mức của KDM1A kích thích sự tăng sinh, sự di trú và sự xâm lấn của tế bào khối u và có liên quan đến sự tiên lượng xấu về NSCLC và HCC (Lv et al., 2012; Zhao et al., 2013). Sự biểu hiện tăng của KDM1A có tương quan với sự tái phát bệnh ung thư tuyến tiền liệt và sự biểu hiện VEGF-A tăng (Kashyap et al., 2013). Sự ức chế KDM1A bằng hỗn hợp của trichostatin A (TSA) và 5-aza-2'-deoxyxytidin (decitabine) làm ức chế tính tạo u của dòng tế bào cổ trướng của bệnh ung thư buồng trứng SKOV3 (Meng et al., 2013).

Gen của KIF26B mã hóa thành viên của siêu họ protein kinesin (KIF) là gen thiết yếu cho sự phát triển thận. Sự biểu hiện KIF26B được giới hạn đến mô giữa của hậu thận, và sự phiên mã của nó được điều hòa bằng yếu tố điều hòa phiên mã ngón tay kẽm Sall1 (Terabayashi et al., 2012). Sự biểu hiện KIF26B ở mức cao đối với bệnh ung thư vú có liên quan đến sự tiên lượng xấu (Wang et al., 2013b). Sự điều hòa tăng KIF26B có tương quan đáng kể với kích thước khối u bằng cách phân tích các mô khối u CRC và niêm mạc bình thường liền kề được ghép cặp. KIF26B đóng vai trò quan trọng trong sự gây ung thư kết - trực tràng và có tác dụng làm dấu hiệu tiên lượng mới và đích điều trị tiềm năng của CRC (Wang et al., 2015).

Gen của KRT19 mã hóa thành viên của họ keratin. Các keratin làm trung gian cho các protein dạng sợi tạo ra tính toàn vẹn cấu trúc của các tế bào biểu mô và được chia nhỏ thành cytokeratin và keratin tóc. KRT19 được biểu hiện cụ thể ở lớp biểu bì, lớp bề mặt chuyển tiếp này bao bọc biểu bì phát triển (RefSeq, 2002). Sự biểu hiện

KRT19 trong các tế bào khối u là dấu ấn tiên lượng của một số khối u thực thể như bệnh ung thư vú, bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư buồng trứng và bệnh ung thư tế bào gan (Skondra et al., 2014; Gao et al., 2014b; Liu et al., 2013b; Lee et al., 2013a). KRT19 đã được chứng minh là yếu tố tiên lượng độc lập của các khối u thần kinh-nội tiết ở tụy, đặc biệt là các khối u âm tính với insulin. Các khối u dương tính với KRT19 có liên quan đến hiệu quả kém bất kể các thông số bệnh học được thiết lập như kích thước, sự nguyên phân, sự xâm lấn của mạch bạch huyết, và sự hoại tử (Jain et al., 2010).

Gen của KRT7 mã hóa thành viên của họ gen keratin. Các cytokeratin typ II gồm các protein bazơ hoặc protein trung tính được sắp xếp theo cặp của các chuỗi keratin khác kiểu được đồng biểu hiện trong khi biệt hóa các mô biểu mô đơn lẻ và được phân tầng. Cytokeratin typ II này được biểu hiện cụ thể trong lớp biểu mô đơn lẻ trong các khoang của các cơ quan bên trong và trong ống dẫn tuyến và mạch máu (RefSeq, 2002). KRT7 được sử dụng trong phương pháp hóa mô miễn dịch để phân biệt giữa một số kiểu hình và làm dấu ấn sinh học để tiên lượng một số bệnh ung thư như caxinom tế bào thận, caxinom buồng trứng, khối u da biểu mô, v.v (Kuroda et al., 2013; McCluggage and Young, 2005; Alhumaidi, 2012).

Gen của LAMC2 thuộc về họ các laminin, họ các glycoprotein của khuôn nền ngoại bào. Các laminin là thành phần chính không phải colagen của màng đáy. Chúng có liên quan đến rất nhiều quy trình sinh học bao gồm sự bám dính của tế bào, sự biệt hóa, sự di trú, truyền tín hiệu, mấu lồi của trục sợi thần kinh và sự di căn. LAMC2 mã hóa protein được biểu hiện trong một vài mô thai và được khu trú cụ thể đến các tế bào biểu mô trong da, phổi và thận (RefSeq, 2002). LAMC2 được biểu hiện ở mức cao ở caxinom tuyến giáp thoái biến và có liên quan đến sự tiến triển của khối u, sự di trú, và sự xâm lấn bằng cách điều biến sự truyền tín hiệu của EGFR (Garg et al., 2014). Sự biểu hiện LAMC2 được dự đoán là có tiên lượng xấu hơn ở các bệnh nhân ung thư kết-trực tràng giai đoạn II (Kevans et al., 2011). Sự biểu hiện LAMC2 cùng với ba dấu ấn sinh học khác được phát hiện là có liên quan đáng kể đến sự có mặt của sự di căn LN ở các bệnh nhân caxinom tế bào vảy miệng (Zanaruddin et al., 2013).

Gen của LUM mã hóa thành viên của họ proteoglycan giàu leuxin nhỏ (small leucine-rich proteoglycan: SLRP) bao gồm decorin, biglycan, fibromodulin, keratocan, epiphycan, và osteoglycin. Lumican là proteoglycan keratan sulfat chính

của giác mạc nhưng cũng được phân bố trong chất nền chứa colagen trong kẽ mô trong khắp cơ thể. Lumican có thể điều hòa sự cấu trúc xơ của colagen và sự sinh trưởng theo chu vi, độ trong suốt của giác mạc, và sự di trú của tế bào biểu mô và sự sửa chữa mô (RefSeq, 2002). Protein LUM được điều hòa tăng trong phần lớn các mô khối u như bệnh ung thư vú, bệnh ung thư kết-trực tràng và bệnh ung thư tụy so với mô bình thường và có liên quan đến mức độ khối u cao hơn và hiệu quả kém. Tuy nhiên, lumican ngoài tế bào ức chế sự phát triển của tế bào ung thư tụy và có liên quan đến sự sống sót kéo dài sau khi phẫu thuật (Leygue et al., 1998; Seya et al., 2006; Ishiwata et al., 2007; Li et al., 2014). LUM và các gen khác liên quan đến tính toàn vẹn của khuôn nền ngoại bào (DCN và DPT) được biểu hiện khác biệt và có thể dùng làm các dấu ấn sinh học cho khối u tế bào khổng lồ tái phát và di căn của xương (Lieveld et al., 2014). LUM được điều hỏa giảm ở các biến thể kháng cisplatin, doxorubicin, topotecan, và paclitaxel của dòng tế bào ung thư buồng trứng A2780 (Januchowski et al., 2014).

Gen của MAP4 mã hóa protein liên quan đến vi cấu trúc hình ống chính không phải tế bào thần kinh, để kích thích cấu trúc vi cấu trúc hình ống và chống lại sự mất ổn định của sự kích thích làm hư hại vi cấu trúc hình ống giữa các pha. Sự phosphoryl hóa của protein này ảnh hưởng đến các đặc tính của vi cấu trúc hình ống và sự tiến triển của chu trình tế bào (RefSeq, 2002). Mức MAP4 cao đã được chứng minh là có tương quan tích cực với mức độ bệnh ung thư bàng quang, trong khi sự phosphoryl hóa của protein bởi protein kinaza A làm giảm sự di trú và sự xâm lấn của tế bào ung thư bàng quang (Ou et al., 2014). Nghiên cứu đối với các bệnh nhân ung thư phổi tế bào không nhỏ cho thấy tỷ lệ của MAP4 với stathmin mRNA ở các mẫu khối u tăng lên so với các mẫu bình thường, cho thấy rằng tỷ lệ này có thể dùng làm dấu ấn sinh học đối với bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ (Cucchiarelli et al., 2008). Mức MAP4, được điều hòa giảm bằng gen ức chế khối u p53, ảnh hưởng đến hiệu quả của chất hướng đích là vi cấu trúc hình ống. Mức này cao làm tăng hiệu quả của dược chất (taxan) làm ổn định vi cấu trúc hình ống và làm giảm hiệu quả của dược chất làm mất ổn định vi cấu trúc hình ống (vinca alcaloid), trong khi mức MAP4 thấp có hiệu quả ngược lại (Hait and Yang, 2006; Galmarini et al., 2003; Zhang et al., 1999).

Gen của MMP7 mã hóa an enzym làm thoái biến proteoglycan, fibronectin, elastin và casein và khác với phần lớn các thành viên của họ MMP ở chỗ gen này

không có vùng protein ở đầu tận cùng C được bảo toàn. Các protein của họ metaloproteinaza nền (matrix metalloproteinase: MMP) tham gia vào sự phá vỡ khuôn nền ngoại bào trong các quá trình sinh lý bình thường như sự phát triển phôi, sự sinh sản, và sự tái mô hình hóa mô, cũng như trong các quy trình bệnh như viêm khớp và sự di căn (RefSeq, 2002). MMP7 thường được biểu hiện quá mức ở các mô bệnh ung thư của người, bao gồm bệnh ung thư kết-trực tràng, caxinom phổi di căn và bệnh ung thư dạ dày và có liên quan đến sự tiến triển bệnh ung thư và sự hình thành di căn (Ii et al., 2006; Sun et al., 2015a; Han et al., 2015; Long et al., 2014). MMP7 đã được chứng minh là đóng vai trò quan trọng trong sự kích thích khối u như làm thoái biến protein của khuôn nền ngoại bào, hoạt hóa sự tăng sinh của tế bào khối u bằng cách làm gia tăng độ sinh khả dụng của yếu tố sinh trưởng giống như insulin và yếu tố sinh trưởng biểu mô gắn kết với heparin và gây chết tế bào theo chương trình ở các tế bào liền kề khối u bằng cách phân cắt phối tử Fas gắn kết màng (Ii et al., 2006).

Gen của MROH6, còn được gọi là C8orf73, nằm trên nhiễm sắc thể 8q24.3 (RefSeq, 2002).

Gen của MX1 mã hóa protein chuyển hóa guanosin triphosphat (guanosine triphosphate: GTP) được tạo ra bởi các interferon typ I và typ II và tham gia vào đáp ứng kháng virut của tế bào (RefSeq, 2002). Vai trò của MX1 trong bệnh ung thư vẫn chưa được giải thích đầy đủ. Một mặt, sự biểu hiện MX1 tỷ lệ nghịch với bệnh ung thư tuyến tiền liệt, làm giảm sự hình thành di căn và làm gia tăng độ nhạy với docletaxel. Ngoài ra, sự làm bất hoạt biểu sinh của MX1 bằng cách tăng mức độ metyl hóa đã được phát hiện ở caxinom tế bào vảy vùng đầu và cổ và sự biểu hiện MX1 làm giảm sự di động của tế bào và sự xâm lấn của các dòng tế bào ung thư tuyến tiền liệt và u melanin, tất cả các đặc điểm này mang lại tác dụng ức chế khối u của MX1 (Brown et al., 2015; Calmon et al., 2009; Mushinski et al., 2009). Mặt khác, hiện tượng đa hình nucleotit đơn trong gen MX1 có liên quan đến bệnh ung thư tuyến tiền liệt và sự biểu hiện MX1 ở mức cao có liên quan đến sự di căn hạch bạch huyết ở bệnh ung thư kết-trực tràng, điều này thể hiện đặc tính của gây ung thư của MX1 (Croner et al., 2014; Glymph et al., 2013).

Gen của MXRA5 mã hóa một trong số các protein liên quan đến sự tái mô hình hóa-nền, chứa 7 đoạn lặp lại giàu leuxin và 12 vùng typ C2 giống như globulin miễn dịch liên quan đến perlecan (RefSeq, 2002). Một nghiên cứu của người Trung Quốc

đã xác định MXRA5 làm gen thường được đột biến thứ hai trong bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ (Xiong et al., 2012). Ở bệnh ung thư ruột kết, MXRA5 đã được chứng minh là được biểu hiện quá mức và có thể dùng làm dấu ấn sinh học để chẩn đoán sớm và sự di căn màng nối (Zou et al., 2002; Wang et al., 2013a).

Gen của MYH9 mã hóa chuỗi nặng myosin IIA thông thường không phải trong cơ, chuỗi này chứa vùng IQ và vùng giống như đầu myosin được tham gia vào một số chức năng quan trọng, bao gồm sự phân bào, sự di động của tế bào và duy trì hình dạng của tế bào (RefSeq, 2002). Sự biểu hiện MYH9 ở mức cao đã được chứng minh là có liên quan đến sự tiên lượng xấu ở caxinom tế bào vảy thực quản và, kết hợp với annexin II và kindling-2, có thể dùng làm dấu ấn sinh học để chẩn đoán bệnh tổng thể và tỷ lệ sống sót mà không bị bệnh này (Xia et al., 2012; Cao et al., 2014). Sự đột biến trong gen MYH9 đã được xác định trong các mẫu bệnh ung thư vú ở người và được biểu hiện khác biệt ở caxinom ruột kết (Ellis et al., 2012; Mu et al., 2013). Các nghiên cứu *in vitro* và mô ghép khác loài cho thấy rằng MYH9 kích thích sự phát triển của tế bào khối u và sự xâm lấn của các dòng tế bào khối u khác nhau, bao gồm các tế bào ung thư vú và ung thư phổi tế bào không nhỏ (Robinson et al., 2013; Lin et al., 2013a; Lund et al., 2012; Derycke et al., 2011; Medjkane et al., 2009).

Gen của MYL12A mã hóa chuỗi nhẹ điều hòa myosin không phải khúc cơ, để điều hòa sự co tế bào cơ trơn và không phải tế bào cơ (Amatschek et al., 2004; RefSeq, 2002). Sự phosphoryl hóa của MYL12A được thông báo là kích thích sự di động của tế bào khối u và sự xâm lấn *in vitro* và ở mô hình động vật (Manning, Jr. et al., 2000; Kaneko et al., 2002; Khuon et al., 2010). Ngoài ra, MYL12A dường như điều hòa sự sửa chữa tổn thương ADN và sự chết tế bào theo chương trình được dẫn hướng bằng p53, bằng cách cô lập yếu tố phiên mã đối kháng-sự chết tế bào theo chương trình của chất điều hòa phiên mã (Hopker et al., 2012a; Hopker et al., 2012b).

Gen của MYL12B mã hóa chuỗi nhẹ điều hòa của myosin II (MYH9) không trong cơ. Sự phosphoryl hóa của MYL12B làm cho hoạt tính của MgATPaza cao hơn và sự ghép các sợi myosin II (RefSeq, 2002). Protein này đã được chứng minh là được điều hòa tăng ở bệnh ung thư buồng trứng giai đoạn 3 và sự phong bế dược lý của quá trình phosphoryl hóa hoặc hoạt hóa MYL12B làm giảm sự di trú tế bào khối u và sự xâm lấn *in vitro* và sự hình thành di căn ở mô hình động vật đối với bệnh ung thư vú. Các dữ liệu này cho thấy vai trò di căn sớm của MYL12B (Lim et al., 2011;

Menhofer et al., 2014; Zhang et al., 2013; Patel et al., 2012).

Gen của PARD3B mã hóa protein khu trú đến các vùng bít chặt của tế bào biểu mô và tham gia vào sự tạo thành tính phân cực của tế bào (Izaki et al., 2005). Hiện tượng đa hình nucleotit đơn trong gen PARD3B đã được chứng minh là có liên quan đáng kể đến tính độc hại gan nghiêm trọng liên quan đến việc điều trị ở trẻ em bị bệnh bạch cầu nguyên bào lymphô cấp tính hoặc u lymphô nguyên bào lymphô (Horinouchi et al., 2010).

Gen của PDIA6 (còn được gọi là ERp5) mã hóa protein disulfiua isomeraza là protein cư trú ở lưới nội bào tương (ER) có tác dụng xúc tác sự tạo ra, làm giảm, và isome hóa các liên kết disulfua trong protein và được cho là đóng vai trò trong sự gấp cuộn của các protein được liên kết bằng disulfua (RefSeq, 2002). Việc nhuộm miễn dịch của các vi mảng mô tuyến tiền liệt đối với PDIA6 cho thấy khả năng phản ứng miễn dịch cao hơn đáng kể ở các tổn thương tiền ác tính so với biểu mô không ác tính ($P < 0,0001$, thử nghiệm Mann-Whitney U), và ở các bệnh ung thư cấp độ Gleason cao (4-5) so với cấp độ thấp (2-3) ($P < 0,05$) (Glen et al., 2010). Sự biểu hiện ERp5/ADAM10 cao dẫn đến sự giải phóng MICA và sự nhận dạng các phối tử NKG2D trong vi môi trường hạch bạch huyết ở các u lymphô Hodgkin bị ảnh hưởng. Điều này dẫn đến sự điều biến giảm đối với sự biểu hiện bề mặt của NKG2D trên các tế bào T CD8 và đáp ứng kháng u không đủ (Zocchi et al., 2012). Các protein disulfua isomerasza PDIA4 vàd PDIA6 làm trung gian kháng lại sự chết tế bào do cisplatin gây ra ở bệnh ung thư tuyến phổi (Horibe et al., 2014).

Gen của PIK3IP1 mã hóa protein 1 tương tác phosphoinositide-3-kinaza, chất ức chế PI3K (RefSeq, 2002). Sự điều hòa giảm PIK3IP1 dẫn đến sự phát triển khối u gia tăng ở các tế bào u lymphô nguyên bào lymphô tế bào T của người (Wong et al., 2014). PIK3IP1 được điều hòa giảm ở caxinom tế bào gan (hepatocellular carcinoma: HCC) và PIK3IP1 ức chế sự phát triển của HCC (He et al., 2008).

Gen của PLEC mã hóa thành viên plectin của họ plakin, protein tham gia vào sự tạo liên kết ngang và tạo cấu trúc của bộ khung tế bào và các phức hợp bám dính (Bouameur et al., 2014). PLEC được biểu hiện quá mức ở bệnh ung thư tuyến kết - trực tràng, caxinom tế bào vảy vùng đầu và cổ và bệnh ung thư tụy (Lee et al., 2004; Katada et al., 2012; Bausch et al., 2011).

Gen của POTEE mã hóa họ vùng POTE ankyrin, thành viên E, một trong số 13

paralog thuộc về họ gen POTE. Các gen POTE được cho là đại diện cho họ mới của các kháng nguyên tinh hoàn liên quan đến bệnh ung thư. Chức năng sinh học của họ gen POTE vẫn chưa được giải thích đầy đủ nhưng một số bằng chứng cho thấy có vai trò tiền gây chết tế bào theo chương trình (Liu et al., 2009; Bera et al., 2006). POTEE được biểu hiện chủ yếu ở bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư ruột kết, bệnh ung thư phổi và bệnh ung thư buồng trứng (Bera et al., 2006). Một nghiên cứu đã mô tả POTEE có liên quan chặt chẽ với bệnh ung thư vú, bằng cách sử dụng phương pháp nghiên cứu phiên mã và protein kết hợp (Cine et al., 2014).

Gen của POTEF mã hóa họ vùng POTE ankyrin, thành viên J, một trong số 13 paralog thuộc về họ gen POTE. Các gen POTE được cho là đại diện cho họ mới của các kháng nguyên tinh hoàn liên quan đến bệnh ung thư. Chức năng sinh học của họ gen POTE này vẫn chưa được giải thích đầy đủ nhưng một số bằng chứng cho thấy có vai trò tiền gây chết tế bào theo chương trình (Liu et al., 2009; Bera et al., 2006). POTEF đã được chứng minh là gây chết tế bào theo chương trình ở các tế bào Hela qua con đường ty thể (Liu et al., 2009). POTEF được biểu hiện chủ yếu ở bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư ruột kết, bệnh ung thư phổi và bệnh ung thư buồng trứng (Bera et al., 2006).

Gen của POTEI nằm trên nhiễm sắc thể 2q21.1 và mã hóa họ vùng POTE ankyrin, thành viên I, một trong số 13 paralog thuộc về họ gen POTE. Các gen POTE được cho là đại diện cho họ mới của kháng nguyên tinh hoàn liên quan đến bệnh ung thư. Chức năng sinh học của họ gen POTE vẫn chưa được giải thích đầy đủ nhưng một số bằng chứng cho thấy có vai trò tiền gây chết tế bào theo chương trình (Liu et al., 2009; Bera et al., 2006). POTEI được biểu hiện chủ yếu ở bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư ruột kết, bệnh ung thư phổi và bệnh ung thư buồng trứng (Bera et al., 2006).

Gen của POTEJ mã hóa họ vùng POTE ankyrin, thành viên J, một trong số 13 paralog thuộc về họ gen POTE. Các gen POTE được cho là đại diện cho họ mới của kháng nguyên tinh hoàn liên quan đến bệnh ung thư. Chức năng sinh học của họ gen POTE vẫn chưa được giải thích đầy đủ nhưng một số bằng chứng cho thấy có vai trò tiền gây chết tế bào theo chương trình (Liu et al., 2009; Bera et al., 2006). POTEJ được biểu hiện chủ yếu ở bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư ruột kết, bệnh ung thư phổi và bệnh ung thư buồng trứng (Bera et al., 2006).

Gen của POTEKP mã hóa họ vùng POTE ankyrin, thành viên K, gen giả và nằm trên nhiễm sắc thể 2q21.1 (RefSeq, 2002).

Gen của POTEM mã hóa họ vùng POTE ankyrin, thành viên M, một trong số 13 paralog thuộc về họ gen POTE. Các gen POTE được cho là đại diện cho họ mới của kháng nguyên tinh hoàn liên quan đến bệnh ung thư. Chức năng sinh học của họ gen POTE vẫn chưa được giải thích đầy đủ nhưng một số bằng chứng cho thấy có vai trò tiền gây chết tế bào theo chương trình (Liu et al., 2009; Bera et al., 2006). POTEM được xác định làm sản phẩm phiên mã đặc hiệu của mô tuyến tiền liệt bình thường và ác tính (Stolk et al., 2004).

Gen của PTRF mã hóa polymeraza I và yếu tố giải phóng sản phẩm phiên mã, chất điều hòa sự phiên mã ARN thông tin để kích thích sự phân ly của các phức hợp phiên mã và sự khơi mào lại của polymeraza I trên các sản phẩm phiên mã ARN thông tin vừa tổng hợp xong (RefSeq, 2002). PTRF được điều hòa giảm ở các dòng tế bào ung thư vú và mô khối u vú (Bai et al., 2012). PTRF là dấu ấn sinh học của bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ (Gamez-Pozo et al., 2012). Sự biểu hiện PTRF được điều hòa giảm ở bệnh ung thư tuyến tiền liệt và sự không có mặt của PTRF ở các tế bào ung thư tuyến tiền liệt góp phần đáng kể vào sự tiến triển của khối u và sự di căn bằng cách kích thích khả năng tạo mạch của các tế bào ung thư (Nassar et al., 2013).

Gen của PUS7L mã hóa chất đồng đẳng uridylat synthaza 7 giả (s. cerevisiae)-giống như protein có thể có hoạt tính uridin synthaza giả. Gen PUS7L nằm trên nhiễm sắc thể 12q12 (RefSeq, 2002).

Gen của RAN mã hóa RAN, thành viên của họ gen gây ung thư RAS, protein gắn kết GTP nhỏ tham gia vào sự chuyển dịch của ARN và các protein qua phức hợp lỗ nhân, để kiểm soát sự tổng hợp ADN và sự tiến triển của chu trình tế bào, trong sự hình thành và tổ chức mạng lưới của vi cấu trúc hình ống, và hoạt hóa thụ thể androgen (RefSeq, 2002). RAN là protein chủ chốt trong sự tiến triển di căn của bệnh ung thư. RAN được biểu hiện quá mức trong nhiều khối u như khối u vú và khối u thận (Matchett et al., 2014).

Gen của RANP1 mã hóa RAN, thành viên của họ gen giả 1 của gen gây ung thư RAS, gen giả nằm trên nhiễm sắc thể 6p21.33 (RefSeq, 2002).

Gen của RASA4 mã hóa chất hoạt hóa 4 của protein RAS p21, protein hoạt hóa Ca (2+)-phụ thuộc Ras GTPaza để chặn con đường Ras-MAPK đáp ứng với Ca (2+)

(RefSeq, 2002). RASA4 được khuếch đại đáng kể ở u lymphô tràn dịch nguyên phát (Roy et al., 2011). RASA4 được biểu hiện khác biệt ở ung thư tuyến màng trong tử cung so với màng trong tử cung bình thường (Jeda et al., 2014).

Gen của RASA4B mã hóa chất hoạt hóa 4B của protein RAS p21, protein hoạt hóa Ca (2+)-phụ thuộc Ras GTPaza có thể liên quan đến sự điều hòa con đường Ras-MAPK (RefSeq, 2002).

Gen của RCN1 mã hóa reticulocalbin 1, vùng gắn kết canxi ở đầu EF, protein gắn kết canxi nằm ở khoang của lưới nội bào tương. RCN1 được khu trú đến màng sinh chất ở các dòng tế bào ung thư biểu mô và ung thư tuyến tiền liệt ở người (RefSeq, 2002). RCN1 được biểu hiện quá mức ở bệnh ung thư vú (Amatschek et al., 2004).

Gen của RGS4 mã hóa chất điều hòa sự truyền tín hiệu G-protein 4, protein hoạt hóa GTPaza (GTPase activating protein: GAP) của cấu trúc dưới phân tử G alpha của các protein G heterotrime (RefSeq, 2002). RGS4 cho thấy sự điều hòa giảm đáng kể có ý nghĩa thống kê ở sự di căn gan và ở trước sự xâm lấn của khối u so với khối u tụy nguyên phát (Niedergethmann et al., 2007). RGS4 rất thường được biểu hiện quá mức ở caxinom tuyến giáp, mặc dù gen này không được biểu hiện ở các mô bình thường của người (Nikolova et al., 2008). Sản phẩm phiên mã RGS4 được phát hiện ở các tế bào biểu mô bề mặt buồng trứng được bất tử không gây ung thư ở mức cao hơn vài nghìn lần so với mức biểu hiện của nó ở dòng tế bào ung thư buồng trứng.

Gen của RPS6 mã hóa protein ribosom S6, protein ribosom trong bào chất là thành phần của cấu trúc dưới phân tử 40S của các ribosom. RPS6 có thể góp phần vào việc kiểm soát sự phát triển của tế bào và sự tăng sinh nhờ sự dịch mã chọn lọc của các nhóm ARN thông tin cụ thể (RefSeq, 2002). RPS6 là đích xuôi dòng của mTOR và đã được phát hiện là có liên quan đến nhiều chức năng sinh lý và chức năng sinh lý bệnh (Chen et al., 2014a). Sự phosphoryl hóa RPS6 làm giảm mức độ tổn thương của ADN và sự ức chế khối u trong khi phát triển bệnh ung thư tụy (Khalaileh et al., 2013).

Gen của RPS8 mã hóa protein ribosom S8, protein ribosom trong bào chất là thành phần của cấu trúc dưới phân tử 40S của các ribosom. Sự biểu hiện RPS8 tăng lên ở các khối u kết - trực tràng và polyp ruột kết so với niêm mạc ruột kết bình thường được so sánh (RefSeq, 2002). Sự điều hòa tăng RPS8 ở các bệnh nhân ung thư

tuyến ống tụy có tương quan với sự sống sót trong thời gian ngắn (Chen et al., 2015).

Gen của RPS8P10 mã hóa gen giả 10 của protein ribosom S8, gen giả nằm trên nhiễm sắc thể 15q11.2 (RefSeq, 2002).

Gen của SCG5 mã hóa secretogranin V (protein 7B2), protein tiết của thần kinh-nội tiết (Portela-Gomes et al., 2008). Sự sao chép mở rộng ở đầu 3' của gen SCG5 và vùng ngược dòng của locut GREM1 có thể làm gia tăng nguy cơ phát triển bệnh ung thư kết-trực tràng (Jaeger et al., 2012; Yang et al., 2014b).

Gen của SERPINB2 mã hóa chất ức chế serpin peptidaza, đơn vị huyết thống đơn tố B (lòng trắng trứng), thành viên 2, chất ức chế của chất hoạt hóa plasminogen proteaza urokinaza ngoại bào và chất ức chế plasminogen mô (Schroder et al., 2014). SERPINB2 được biểu hiện trong nhiều khối u khác nhau. Sự biểu hiện SERPINB2 có liên quan đến sự tiên lượng tốt ở bệnh ung thư vú và bệnh ung thư tụy, nhưng liên quan đến sự tiên lượng xấu ở bệnh ung thư màng trong tử cung, bệnh ung thư buồng trứng, và bệnh ung thư kết-trực tràng (Schroder et al., 2014).

Gen của SERPINB3 mã hóa chất ức chế proteaza, chất ức chế serpin peptidaza, đơn vị huyết thống đơn tố B (lòng trắng trứng), thành viên 3 (RefSeq, 2002). SERPINB3 là yếu tố đáp ứng Ras đóng vai trò quan trọng trong sự sản sinh xytokin liên quan đến Ras và sự tạo khối u (Catanzaro et al., 2014). Sự biểu hiện SERPINB3 được điều hòa tăng trong caxinom tế bào gan (Pontisso, 2014). SERPINB3 có liên quan đến sự phát triển bệnh ung thư buồng trứng (Lim and Song, 2013).

Gen của SERPINB4 mã hóa chất ức chế proteaza, chất ức chế serpin peptidaza, đơn vị huyết thống đơn tố B (lòng trắng trứng), thành viên 4 (RefSeq, 2002). SERPINB4 là yếu tố đáp ứng Ras đóng vai trò quan trọng trong sự sản sinh xytokin liên quan đến Ras và sự tạo khối u (Catanzaro et al., 2014). Sự biểu hiện SERPINB4 được điều hòa tăng trong caxinom tế bào gan (Pontisso, 2014).

Gen của SERPINH1 mã hóa chất ức chế serpin peptidaza, đơn vị huyết thống đơn tố H (protein sốc nhiệt 47), thành viên 1, (protein 1 gắn kết colagen), chất ức chế serin proteinaza. SERPINH1 có tác dụng làm phân tử chaperon đặc hiệu với colagen trong lưới nội bào tương (RefSeq, 2002). SERPINH1 được biểu hiện quá mức ở nhiều bệnh ung thư ở người, bao gồm bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư phổi, ung thư tuyến ống tụy, u thần kinh đệm, và caxinom liên quan đến viêm ruột kết mạn loét (Zhao et al., 2014).

Gen của SEZ6L mã hóa cơn động kinh liên quan đến protein giống như chất đồng đẳng 6 (của chuột), protein xuyên màng có nhiều vùng tham gia vào sự tương tác protein-protein và sự tải nạp tín hiệu (Nishioka et al., 2000). SEZ6L được metyl hóa tăng ở bệnh ung thư dạ dày (Kang et al., 2008). Sự biểu hiện SEZ6L được điều hòa tăng ở các dòng tế bào ung thư phổi tế bào không nhỏ và ung thư phổi tế bào nhỏ cũng như ở các mẫu khối u nguyên phát so với các mô phổi bình thường (Gorlov et al., 2007).

Gen của SLC16A3 mã hóa họ chất tải hòa tan 16, thành viên 3, chất vận chuyển monocarboxylat liên kết với proton (RefSeq, 2002). Phần lớn các khối u dạng rắn đã được biết là dựa vào sự phân hủy đường để tạo ra năng lượng. Tỷ lệ phân hủy đường cao dẫn đến sự tạo ra lactat tăng lên, điều này có liên quan đến hiệu quả lâm sàng kém và góp phần trực tiếp vào sự tiến triển và phát triển của khối u. SLC16A3 là một trong vài chất vận chuyển monocarboxylat tạo điều kiện thuận lợi cho sự vận chuyển lactat ở các tế bào ung thư (Dhup et al., 2012; Draoui and Feron, 2011). Sự biểu hiện SLC16A3 có liên quan đến tiên lượng xấu ở các bệnh nhân ung thư tế bào gan và sự tăng sinh, sự di trú và mức độ xâm lấn của tế bào gia tăng trong các thử nghiệm đối với dòng tế bào (Gao et al., 2014a). Sự liên quan về mặt chức năng của SLC16A3 đối với sự tạo khối u được chứng minh trong nhóm phụ của bệnh ung thư tụy (Baek et al., 2014).

Gen của MTCL1 mã hóa yếu tố 1 tạo liên kết ngang với vi cấu trúc hình ống. MTCL1 đã được chứng minh là tham gia vào sự tái mô hình hóa vi cấu trúc hình ống phụ thuộc tính phân cực và làm trung gian cho sự tái cấu trúc đặc hiệu biểu mô-tế bào của các vi cấu trúc hình ống không phải thể trung tâm nhờ hoạt tính tạo liên kết ngang với vi cấu trúc hình ống của nó (Sato et al., 2013).

Gen của SST mã hóa pre-pro-protein của somatostatin của hormon. Somatostatin được biểu hiện trong khắp cơ thể và ức chế sự giải phóng nhiều hormon thứ cấp. Hormon này là chất điều hòa quan trọng của hệ nội tiết nhờ các tương tác của nó với hormon sinh trưởng tuyến yên, hormon kích thích tuyến giáp, và phần lớn các hormon của đường dạ dày-ruột. Somatostatin cũng ảnh hưởng đến tốc độ dẫn truyền thần kinh ở hệ thần kinh trung ương và sự tăng sinh của cả tế bào bình thường và tế bào tạo khối u (RefSeq, 2002). Các chất tương tự SST đã được sử dụng thành công và được đánh giá thêm làm phương pháp điều trị trong việc điều trị các khối u thần kinh-

nội tiết ở dạ dày-ruột-tụy (caxinoit), bệnh ung thư tế bào gan và bệnh ung thư vú (Pivonello et al., 2014; Culler, 2011; Appetecchia and Baldelli, 2010; Modlin et al., 2010; Watt et al., 2008).

Gen của THY1 là gen ức chế khối u ứng viên đối với caxinom mũi họng có hoạt tính chống xâm lấn (Lung et al., 2010).

Gen của TSC22D4 mã hóa protein là thành viên của họ vùng TSC22 của các chất điều hòa phiên mã leuxin khóa (RefSeq, 2002). Mức TSC22D4 trong gan tăng lên ở chứng suy mòn do ung thư (Jones et al., 2013).

Gen của TUBA1A mã hóa tubulin, alpha 1a. Sự biểu hiện của TUBA1A được tìm thấy chủ yếu ở các tế bào thần kinh được biệt hóa về mặt hình thái học. Sự đột biến ở gen này gây ra tật không hồi não typ 3 (lissencephaly type 3: LIS3) – tình trạng thần kinh khác biệt bởi tật đầu nhỏ, sự chậm phát triển tâm thần, và bệnh động kinh khởi phát sớm và do sự di trú tế bào thần kinh khiếm khuyết gây ra (RefSeq, 2002). Sự biểu hiện được điều hòa giảm của TUBA1A và một số gen khác, do sự tái cấu trúc của nhiễm sắc thể ở các dòng tế bào vú tạo khối u và được biến nạp bằng xạ trị gây ra, có thể phản ánh các sự kiện phân tử giai đoạn sớm ở sự gây ung thư vú (Unger et al., 2010). Bằng cách sử dụng phương pháp phân tích nghiên cứu protein so sánh đối với caxinom biểu mô buồng trứng thể thanh dịch tiến triển, TUBA1A đã được xác định là một dấu hiệu chẩn đoán tiềm năng đối với sự kháng hóa chất (Kim et al., 2011).

Gen của TUBA1B mã hóa tubulin, alpha 1b (RefSeq, 2002). Sự biểu hiện khác biệt của TUBA1B kết hợp với sự biểu hiện của một số gen khác có liên quan đến sự tiên lượng u lymphô tế bào vỏ, sự chẩn đoán tỷ lệ tái phát trong số các bệnh nhân bị bệnh ung thư kết-trực tràng giai đoạn II và sự khác biệt giữa các u melanin màng mạch nho có sự di căn sau đó và các u melanin màng mạch nho không có sự di căn (Blenk et al., 2008; Agesen et al., 2012; Linge et al., 2012). Sự biểu hiện TUBA1B được điều hòa tăng ở các mô ung thư tế bào gan và sự tăng sinh của các tế bào ung thư gan. Sự biểu hiện TUBA1B tăng lên có liên quan đến tỷ lệ sống sót tổng thể thấp và sự kháng thuốc paclitaxel của các bệnh nhân mắc bệnh ung thư tế bào gan (Lu et al., 2013a). Ở các tế bào ung thư buồng trứng, sự biểu hiện giảm của TUBA1B có liên quan đến sự kháng thuốc oxaliplatin (Tummala et al., 2009).

Gen của TUBA1C mã hóa tubulin, alpha 1c (RefSeq, 2002). Sự biểu hiện TUBA1C đã được chứng minh là được điều hòa tăng ở bệnh sacom xương và bệnh

ung thư tế bào gan liên quan đến virut HCV và có thể là dấu ấn sinh học tiềm tàng đối với sự tạo khối u của bệnh sacom xương hoặc bệnh ung thư tế bào gan có liên quan đến virut HCV được biệt hóa (Kuramitsu et al., 2011; Li et al., 2010).

Gen của TUBA3C mã hóa tubulin, alpha 3c (RefSeq, 2002). Gen của TUBA3D mã hóa tubulin, alpha 3d (RefSeq, 2002). Gen của TUBA4A mã hóa tubulin, alpha 4a (RefSeq, 2002). Phân tích nghiên cứu protein so sánh đối với caxinom tế bào vảy thực quản (ESCC) cho thấy sự biểu hiện TUBA4A tăng lên (Qi et al., 2005).

Gen của TUBA8 mã hóa tubulin, alpha 8. Sự đột biến ở TUBA8 có liên quan đến bệnh dị dạng nhiều hồi não và chứng giảm sản dây thần kinh thị giác (RefSeq, 2002). Ở gan chuột, TUBA8 được tạo ra sau khi điều trị bằng phenobarbital, chất gây ung thư không có độc tính di truyền. Ở các dòng tế bào caxinom tế bào gan, sự biểu hiện quá mức của TUBA8 đã được chứng minh là ảnh hưởng đến sự sinh trưởng, sự tăng sinh và sự di trú của tế bào (Kamino et al., 2011).

Gen của UCN3 là thành viên của họ sauvagin/yếu tố giải phóng corticotropin/urotensin I. Gen này có liên quan về mặt cấu trúc với gen của yếu tố giải phóng corticotropin (corticotropin-releasing factor: CRF) và sản phẩm mã hóa là phối tử nội sinh của các thụ thể CRF typ 2. Ở não, gen này có thể gây ra các ảnh hưởng stress đối với sự ngon miệng (RefSeq, 2002). Ucn3 được sản sinh ở khối u tuyến thượng thận bình thường và khối u tuyến thượng thận (cả khối u vỏ tuyến thượng thận và u tế bào ưa crom), và có tác dụng làm chất điều hòa kiểu tự tiết hoặc cận tiết ở các khối u tuyến thượng thận bình thường và khối u tuyến thượng thận (Takahashi et al., 2006). Urocortin 3 hoạt hóa các con đường AMPK và AKT và làm gia tăng tỷ lệ thải bỏ glucoza ở cơ xương chuột (Roustit et al., 2014).

Gen của VCAN là thành viên của họ proteoglycan aggrecan/versican. Protein mã hóa này là proteoglycan chondroitin sulfat lớn và là thành phần chính của khuôn nền ngoại bào. Protein này tham gia vào sự bám dính tế bào, sự tăng sinh, sự di trú và sự tạo mạch và đóng vai trò trung tâm trong sự tạo hình thái của mô và duy trì (RefSeq, 2002). Sự biểu hiện VCAN được điều hòa trong các nguyên bào sợi liên quan đến bệnh ung thư nhờ thụ thể TGF-beta typ II và sự truyền tín hiệu SMAD. VCAN được điều hòa tăng kích thích tính di động và sự xâm lấn của các tế bào ung thư buồng trứng bằng cách hoạt hóa con đường truyền tín hiệu NF-kapaB và bằng

cách điều hòa tăng đối với sự biểu hiện của CD44, nền metaloproteinaza-9, và thụ thể di động qua trung gian hyaluronan (Yeung et al., 2013). Dấu hiệu gen tái mô hình hóa- colagen bao gồm VCAN được điều hòa bằng cách truyền tín hiệu TGF-beta có liên quan đến sự di căn và thời gian sống thêm ngắn ở bệnh ung thư buồng trứng thể thanh dịch (Cheon et al., 2014). VCAN được điều hòa tăng đáng kể ở các cặp mẫu so sánh CRC của niêm mạc ruột kết của người khỏe mạnh và các mô khối u của 53 bệnh nhân (Pitule et al., 2013).

Gen của WNT16, họ vị trí đính gắn MMTV kiểu không cánh, thành viên 16 mã hóa protein truyền tín hiệu được tiết ra là protein có liên quan đến các gen gây ung thư và một số quá trình phát triển, bao gồm điều hòa sự chết của tế bào và tạo mô hình trong khi tạo phôi (RefSeq, 2002). Sự biểu hiện của WNT16 đã được chứng minh là được điều hòa tăng ở bệnh bạch cầu u nguyên bào lymphô cấp tính (acute lymphoblastoid leukemia: ALL) có sự chuyển dịch nhiễm sắc thể t (1;19) và đóng vai trò quan trọng trong sự gây bệnh bạch cầu (Casagrande et al., 2006; Mazieres et al., 2005). Nghiên cứu về dòng tế bào ALL và các mẫu lấy từ bệnh nhân bị bệnh ALL cho thấy rằng sự điều hòa tăng của WNT16 và một vài gen Wnt khác được tạo bởi sự metyl hóa các chất ức chế Wnt còn có liên quan đến sự giảm đáng kể thời gian sống thêm không bệnh 10 năm và thời gian sống thêm toàn bộ (Roman-Gomez et al., 2007).

Gen của WNT5A thuộc về họ gen WNT gồm các gen liên quan về mặt cấu trúc, mã hóa các protein truyền tín hiệu được tiết ra. Các protein này có liên quan đến các gen gây ung thư và một số quá trình phát triển, bao gồm điều hòa sự chết của tế bào và tạo mô hình trong khi tạo khi tạo phôi. Gen WNT5A mã hóa thành viên của họ WNT truyền tín hiệu qua cả con đường WNT kinh điển và không kinh điển. Protein này là phối tử của 7 thụ thể xuyên màng-5 dạng xoăn và thụ thể mồ côi tyrosin kinaza 2. Protein này đóng vai trò thiết yếu trong việc điều hòa các con đường phát triển trong khi tạo phôi. Protein này cũng có thể đóng vai trò trong sự tạo khối u (RefSeq, 2002). WNT5A được biểu hiện quá mức ở CRC và có tỷ lệ thích hợp bằng 76% giữa khối u nguyên phát và vị trí di căn (Lee et al., 2014). WNT5A được điều hòa tăng và chất điều hòa chủ chốt của sự chuyển tiếp biểu mô-với-mô giữa và sự di căn các tế bào caxinom dạ dày, caxinom mũi họng và bệnh ung thư tụy của người (Kanzawa et al., 2013; Zhu et al., 2014; Bo et al., 2013).

Sự kích thích đáp ứng miễn dịch phụ thuộc vào sự có mặt của các kháng nguyên được nhận biết là kháng nguyên ngoại lại 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 đối với 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 liền kề. Tốt hơn, nếu peptit này có 9 axit amin trong chiều dài mạch, nhưng có thể chỉ là peptit mạch ngắn có 8 axit amin trong chiều dài mạch, và có thể có mạch dài đến 10, 11, 12, 13 hoặc 14 axit amin hoặc nhiều hơn trong chiều dài mạch và trong trường hợp các peptit của MHC nhóm II (các biến thể kéo dài của peptit theo sáng chế), chúng có thể có mạch dài tới 15, 16, 17, 18, 19 hoặc 20 axit

amin hoặc nhiều hơn trong chiều dài mạch.

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

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

Thuật ngữ "polypeptit" để chỉ loạt các gốc axit amin, thường được liên kết với nhau bằng các liên kết peptit giữa nhóm alpha-amino và nhóm cacbonyl của các axit amin liền kề. Không có giới hạn về chiều dài của polypeptit theo sáng chế miễn là các epitop đúng được giữ nguyên. Trái với các thuật ngữ peptit hoặc oligopeptit, thuật ngữ polypeptit để chỉ các phân tử chứa nhiều hơn khoảng 30 gốc axit amin.

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

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

mạch, và thông thường nhất là có 9 axit amin trong chiều dài mạch.

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

Bảng 5: Tần suất biểu hiện F của HLA-A*02 và HLA-A*24 và các kiểu huyết thanh HLA-DR phổ biến nhất. Tần suất được xác định từ tần suất kiểu đơn Gf trong quần thể dân số Mỹ được làm thích ứng theo tài liệu của Mori và các đồng tác giả (Mori et al., 1997) sử dụng công thức Hardy-Weinberg $F=1-(1-Gf)^2$. Tổ hợp của A*02 hoặc A*24 với một số alen HLA-DR nhất định có thể được làm giàu hoặc với tần suất ít hơn tần suất dự kiến từ các tần số riêng lẻ của chúng do sự mất cân bằng liên kết. Để hiểu chi tiết hơn, xem tài liệu của Chanock và các đồng tác giả (Chanock et al., 2004).

Alen	Quần thể	Kiểu hình tính được từ tần suất alen
A*02	Người da trắng (Bắc Mỹ)	49,1%
A*02	Người Mỹ gốc Phi (Bắc Mỹ)	34,1%
A*02	Người Mỹ gốc Á (Bắc Mỹ)	43,2%
A*02	Người Mỹ La-tinh (Bắc Mỹ)	48,3%
DR1	Người da trắng (Bắc Mỹ)	19,4%
DR2	Người da trắng (Bắc Mỹ)	28,2%
DR3	Người da trắng (Bắc Mỹ)	20,6%
DR4	Người da trắng (Bắc Mỹ)	30,7%
DR5	Người da trắng (Bắc Mỹ)	23,3%
DR6	Người da trắng (Bắc Mỹ)	26,7%
DR7	Người da trắng (Bắc Mỹ)	24,8%
DR8	Người da trắng (Bắc Mỹ)	5,7%
DR9	Người da trắng (Bắc Mỹ)	2,1%
DR1	Người (Bắc) Mỹ gốc Phi	13,20%
DR2	Người (Bắc) Mỹ gốc Phi	29,80%
DR3	Người (Bắc) Mỹ gốc Phi	24,80%
DR4	Người (Bắc) Mỹ gốc Phi	11,10%
DR5	Người (Bắc) Mỹ gốc Phi	31,10%

Alen	Quần thể	Kiểu hình tính được từ tần suất alen
DR6	Người (Bắc) Mỹ gốc Phi	33,70%
DR7	Người (Bắc) Mỹ gốc Phi	19,20%
DR8	Người (Bắc) Mỹ gốc Phi	12,10%
DR9	Người (Bắc) Mỹ gốc Phi	5,80%
DR1	Người (Bắc) Mỹ gốc Á	6,80%
DR2	Người (Bắc) Mỹ gốc Á	33,80%
DR3	Người (Bắc) Mỹ gốc Á	9,20%
DR4	Người (Bắc) Mỹ gốc Á	28,60%
DR5	Người (Bắc) Mỹ gốc Á	30,00%
DR6	Người (Bắc) Mỹ gốc Á	25,10%
DR7	Người (Bắc) Mỹ gốc Á	13,40%
DR8	Người (Bắc) Mỹ gốc Á	12,70%
DR9	Người (Bắc) Mỹ gốc Á	18,60%
DR1	Người (Bắc) Mỹ La-tinh	15,30%
DR2	Người (Bắc) Mỹ La-tinh	21,20%
DR3	Người (Bắc) Mỹ La-tinh	15,20%
DR4	Người (Bắc) Mỹ La-tinh	36,80%
DR5	Người (Bắc) Mỹ La-tinh	20,00%
DR6	Người (Bắc) Mỹ La-tinh	31,10%
DR7	Người (Bắc) Mỹ La-tinh	20,20%
DR8	Người (Bắc) Mỹ La-tinh	18,60%
DR9	Người (Bắc) Mỹ La-tinh	2,10%
A*24	Người Philippin	65%
A*24	Người Nenets ở Nga	61%
A*24:02	Người Nhật Bản	59%
A*24	Người Malaysia	58%
A*24:02	Người Philippin	54%
A*24	Người Ấn Độ	47%
A*24	Người Hàn Quốc	40%
A*24	Người Sri Lanka	37%
A*24	Người Trung Quốc	32%
A*24:02	Người Ấn Độ	29%

Alen	Quần thể	Kiểu hình tính được từ tần suất alen
A*24	Người Tây Úc	22%
A*24	Người Mỹ	22%
A*24	Người Samara ở Nga	20%
A*24	Người Nam Mỹ	20%
A*24	Người châu Âu	18%

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

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

Theo một phương án được ưu tiên, thuật ngữ "trình tự nucleotit" để chỉ 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 "đoạn kháng thể", khi để chỉ trình tự mã hóa, có nghĩa là phần ADN chứa vùng mã hóa hoàn toàn ít hơn trong đó sản phẩm biểu hiện gần như giữ lại được chức năng hoặc hoạt tính sinh học giống như sản phẩm biểu hiện của vùng mã hóa hoàn toàn.

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

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

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

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

Các polynucleotit, và polypeptit tái tổ hợp hoặc polypeptit gây miễn dịch, được bộc lộ theo sáng chế cũng có thể ở dạng "được tinh chế". Thuật ngữ "được tinh chế" không cần phải là tinh khiết tuyệt đối; thay vào đó, thuật ngữ này được dự định là định nghĩa tương đối, và có thể bao gồm cả các chế phẩm được tinh chế ở mức cao hoặc chế phẩm chỉ được tinh chế một phần, như các thuật ngữ được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Ví dụ, các dòng vô tính riêng biệt được phân lập từ thư viện ADN 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 vectơ biểu hiện chứa các axit nucleic và/hoặc polypeptit này, có thể ở "dạng được làm giàu". Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "được làm giàu" có nghĩa là nồng độ của chất này ít nhất gấp khoảng 2, 5, 10, 100, hoặc 1000 lần nồng độ tự nhiên của nó (ví dụ), có lợi nếu lượng chất này bằng 0,01% trọng lượng, tốt hơn nếu ít nhất bằng khoảng 0,1% trọng lượng. Chế phẩm được làm giàu với lượng khoảng 0,5%, 1%, 5%, 10%, và 20% trọng lượng cũng được dự định. Có lợi nếu các

trình tự, cấu trúc, vectơ, dòng vô tính, và các vật liệu khác theo sáng chế có thể ở dạng được làm giàu hoặc được phân lập. Thuật ngữ "đoạn mạch có hoạt tính" để chỉ đoạn mạch, thường là của trình tự peptit, polypeptit hoặc axit nucleic, để tạo ra đáp ứng miễn dịch (nghĩa là có hoạt tính gây miễn dịch) khi được sử dụng, một mình hoặc tùy ý với tá dược thích hợp hoặc trong vectơ, cho động vật, như động vật có vú, ví dụ, thỏ hoặc chuột, và còn bao gồm cả người, đáp ứng miễn dịch này ở dạng kích thích đáp ứng của tế bào T trong động vật được điều trị, như người. Theo cách khác, "đoạn mạch có hoạt tính" cũng có thể được sử dụng để gây ra đáp ứng của tế bào T *in vitro*.

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

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 basơ 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 xuất peptit chứa trình tự được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự từ SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 67 hoặc biến thể của nó có mức độ tương đồng 88% với các trình tự từ SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 67, hoặc biến thể của nó mà sẽ gây ra phản ứng chéo của tế bào T với peptit này. Các peptit theo sáng chế có khả năng gắn kết với phân tử của phức hợp tương thích mô chính (MHC) nhóm -I ở người hoặc phiên bản kéo dài của các peptit này với nhóm II.

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

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ có thể đánh giá xem các tế bào T được tạo bởi biến thể của peptit đặc hiệu sẽ có thể phản ứng chéo với chính peptit này hay không (Appay et al., 2006; Colombetti et al., 2006; Fong et al., 2001; Zaremba et al., 1997).

Thuật ngữ "biến thể" của trình tự axit amin nhất định theo sáng chế có nghĩa là các mạch bên của, ví dụ, một hoặc hai gốc axit amin được thay đổi (ví dụ, bằng cách thay thế chúng bằng mạch bên của gốc axit amin có trong tự nhiên khác hoặc một số mạch bên khác) sao cho peptit này sẽ có khả năng gắn kết với phân tử HLA theo cách

gần giống như peptit gồm các trình tự axit amin nhất định bao gồm các trình tự từ SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 67. Ví dụ, peptit có thể được cải biến sao cho nó ít nhất là duy trì, nếu không cải thiện, khả năng tương tác với và gắn kết với rãnh gắn kết của phân tử MHC thích hợp, như HLA-A*02 hoặc -DR, và theo cách sao cho nó ít nhất là duy trì, nếu không cải thiện, khả năng gắn kết với thụ thể TCR của các tế bào T hoạt hóa.

Sau đó, các tế bào T này có thể phản ứng chéo với tế bào và tiêu diệt tế bào biểu hiện polypeptit chứa trình tự axit amin tự nhiên của peptit cùng nguồn gốc như được xác định theo các khía cạnh của sáng chế. Như có thể thu được từ tài liệu khoa học và các cơ sở dữ liệu (Rammensee et al., 1999; Godkin et al., 1997), một số vị trí nhất định của các peptit gắn kết HLA thường là gốc dạng neo tạo ra trình tự của nhân khớp với motif gắn kết của thụ thể HLA, được xác định bằng đặc tính phân cực, tính chất điện vật lý, kỵ nước và cấu hình không gian của các chuỗi polypeptit tạo thành rãnh gắn kết. Do đó, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ có thể cải biến trình tự axit amin nêu trong các trình tự từ SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO 67, bằng cách giữ nguyên các gốc dạng neo đã biết, và sẽ có thể xác định xem các biến thể này có duy trì khả năng gắn kết với các phân tử MHC nhóm I hoặc II hay không. Các biến thể theo sáng chế vẫn duy trì khả năng gắn kết với thụ thể TCR của các tế bào T hoạt hóa, mà sau đó chúng có thể phản ứng chéo với tế bào và tiêu diệt tế bào biểu hiện polypeptit chứa trình tự axit amin tự nhiên của peptit cùng nguồn gốc như được xác định theo các khía cạnh của sáng chế.

Các peptit gốc (không được cải biến) như được bộc lộ ở đây có thể được cải biến bằng cách thay thế một hoặc nhiều gốc ở các vị trí khác nhau, có thể chọn lọc, trong chuỗi peptit, nếu không được chỉ rõ theo cách khác. Tốt hơn, nếu sự thay thế các gốc này nằm ở đầu của chuỗi axit amin. Sự thay thế này có thể có tính chất bảo toàn, ví dụ, khi một axit amin được thay thế bằng axit amin có cấu trúc và đặc tính tương tự, như khi axit amin kỵ nước được thay thế bằng axit amin kỵ nước khác. Thậm chí sự thay thế axit amin có kích thước hoặc tính chất hóa học và kích thước giống nhau hoặc tương tự sẽ được bảo toàn hơn, như khi leuxin được thay thế bằng isoleuxin. Trong các nghiên cứu về sự thay đổi trình tự ở họ các protein đồng dạng có trong tự nhiên, sự thay thế axit amin nhất định thường được dung nạp hơn so với các loại khác, và sự thay thế này thường có tương quan với tính tương tự về kích thước, điện tích, tính

phân cực, tính kỵ nước giữa axit amin gốc và sự thay thế của nó và đây là cơ sở cho việc xác định "sự thay thế bảo toàn".

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

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

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

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

Peptit chủ yếu bao gồm trình tự axit amin như được xác định trên đây có thể có một hoặc hai axit amin dạng không neo (xem phần dưới đây liên quan đến motif dạng neo) được trao đổi mà không có khả năng gắn kết với phân tử của phức hợp tương thích mô chính (MHC) nhóm-I hoặc nhóm–II ở người bị thay đổi đáng kể hoặc bị ảnh

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

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

Bảng 6: các biến thể và motif của peptit theo các trình tự SEQ ID NO: 4, 29, và 30.

Vị trí	1	2	3	4	5	6	7	8	9
SEQ ID NO. 4	S	V	D	V	S	P	P	K	V
Các biến thể									I
									L
									A
		L							I
		L							L
		L							
		L							A
		A							I
		A							L
		A							
		A							A
		M							I
		M							L
		M							
		M							A
		T							I

Vị trí	1	2	3	4	5	6	7	8	9
		T							L
		T							
		T							A
		Q							I
		Q							L
		Q							
		Q							A
Vị trí	1	2	3	4	5	6	7	8	9
SEQ ID NO. 29	F	L	Q	E	Y	L	D	A	I
Các biến thể		I							L
		I							V
		I							
		I							A
		M							L
		M							V
		M							
		M							A
		A							L
		A							V
		A							
		A							A
		V							L
		V							V
		V							
		V							A
		T							L
		T							V
		T							
		T							A
		Q							L
		Q							V
		Q							

Vị trí	1	2	3	4	5	6	7	8	9
		Q							A
Vị trí	1	2	3	4	5	6	7	8	9
SEQ ID NO. 30	V	V	D	E	G	P	T	G	V
Các biến thể									L
									I
									A
		M							L
		M							I
		M							
		M							A
		L							L
		L							I
		L							
		L							A
		A							L
		A							I
		A							
		A							A
		T							L
		T							I
		T							
		T							A
		Q							L
		Q							I
		Q							
		Q							A

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

Các peptit theo sáng chế có thể được kéo dài tối đa 4 axit amin, nghĩa là 1, 2, 3 hoặc 4 axit amin có thể được bổ sung vào một trong hai đầu theo tổ hợp bất kỳ nằm trong khoảng từ 4:0 đến 0:4. Tổ hợp bất kỳ của việc kéo dài theo sáng chế có thể được tìm thấy trong Bảng 7.

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

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

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

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

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

Theo đó, sáng chế đề xuất các peptit và biến thể của epitop của MHC nhóm I, trong đó peptit hoặc biến thể này có từ 8 đến 100 axit amin, tốt hơn là có từ 8 đến 30 axit amin, và được ưu tiên nhất là có từ 8 đến 14 axit amin, cụ thể là có 8, 9, 10, 11,

12, 13, 14 axit amin trong toàn bộ chiều dài mạch, trong trường hợp các peptit gắn kết với nhóm II được kéo dài, nó cũng có thể có 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 hoặc 22 axit amin trong chiều dài mạch.

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

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

Theo một phương án được đặc biệt ưu tiên của sáng chế, peptit bao gồm hoặc chủ yếu bao gồm trình tự axit amin theo trình tự từ SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 67.

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 67 hoặc biến thể của nó, peptit theo sáng chế chứa các đoạn axit amin nằm ở đầu tận cùng N- và/hoặc C bổ sung là các đoạn không nhất thiết tạo thành một phần của peptit có chức năng làm epitop đối với epitop của phân tử MHC.

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

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

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

Các liên kết không phải peptit là, ví dụ, $-CH_2-NH$, $-CH_2S-$, $-CH_2CH_2-$, $-CH=CH-$, $-COCH_2-$, $-CH(OH)CH_2-$, và $-CH_2SO-$. Patent Mỹ số US 4.897.445 đề xuất phương pháp tổng hợp pha rắn của các liên kết không phải peptit ($-CH_2-NH$) 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 carbobenzoxyl, dansyl, hoặc t-butyloxycacbonyl có thể được bổ sung vào đầu tận cùng amino của peptit. Tương tự, nhóm axetyl hoặc nhóm 9-florenylmetoxy-cacbonyl có thể được thay thế ở đầu tận cùng amino của peptit. Ngoài ra, nhóm kỵ nước, nhóm t-butyloxycacbonyl, hoặc nhóm amido có thể được bổ sung vào đầu tận cùng carboxy của peptit.

Ngoài ra, các peptit theo sáng chế cũng có thể được tổng hợp để làm thay đổi cấu hình không gian của chúng. Ví dụ, chất đồng phân D của một hoặc nhiều gốc axit

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

Tương tự, peptit hoặc biến thể theo sáng chế có thể được cải biến bằng phương pháp hóa học bằng cách cho các axit amin đặc hiệu phản ứng trước hoặc sau khi tổng hợp peptit. Ví dụ về các cải biến này là đã được biết rõ trong lĩnh vực này và được tóm tắt, ví dụ trong tài liệu: R. Lundblad, Chemical Reagents for Protein Modification, 3rd ed. CRC Press, 2004 (Lundblad, 2004), tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn. Sự cải biến hóa học của axit amin bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, cải biến bằng cách axyl hóa, amit hóa, pyridoxyl hóa lysin, alkyl hóa khử, trinitrobenzyl hóa các nhóm amin bằng axit 2,4,6-trinitrobenzen sulphonic (TNBS), sự cải biến amit của các nhóm cacboxyl và cải biến sulphydryl bằng cách oxy hóa xystein bằng axit thành axit xysteic, sự tạo ra các dẫn xuất có thủy ngân, sự tạo ra disulfua hỗn hợp bằng các hợp chất thiol khác, sự phản ứng với maleimit, carboxymetyl hóa bằng axit iodoaxetic hoặc iodoaxetamit và carbamoyl hóa bằng xyanat với độ pH có tính kiềm, tuy nhiên không chỉ giới hạn ở các cải biến này. Về mặt này, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể tham khảo tài liệu: Chapter 15 of Current Protocols In Protein Science, Eds. Coligan et al. (John Wiley and Sons NY 1995-2000) (Coligan et al., 1995) về phương pháp có phạm vi rộng hơn liên quan đến sự cải biến hóa học của các protein.

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

Việc khử chọn lọc liên kết disulfua trong protein cũng là việc phổ biến. Các liên kết disulfua có thể được tạo ra và oxy hóa trong quá trình xử lý nhiệt đối với dược

phẩm sinh học. Chất phản ứng K của Woodward có thể được sử dụng để cải biến các gốc axit glutamic đặc hiệu. Hợp chất N-(3-(dimetylamino)propyl)-N'-etylcarbodiimit có thể được sử dụng để tạo ra các liên kết ngang nội phân tử giữa gốc lysin và gốc axit glutamic. Ví dụ, dietylpyrocacbonat là chất phản ứng để cải biến các gốc histidyl trong protein. Histidin cũng có thể được cải biến bằng cách sử dụng 4-hydroxy-2-nonenal. Phản ứng của các gốc lysin và các gốc α-amin khác chẳng hạn là hữu ích trong sự gắn kết của peptit với bề mặt hoặc sự liên kết ngang của các protein/peptit. Lysin là vị trí liên kết của poly(etylen)glycol và vị trí cải biến chính trong quá trình glycosyl hóa của các protein. Các gốc methionin trong protein có thể được cải biến bằng, ví dụ, iodoaxetamit, bromoetylamin, và cloamin T.

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

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

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

Peptit hoặc biến thể, trong đó peptit này được cải biến hoặc bao gồm các liên kết không peptit là phương án được ưu tiên của sáng chế. Nói chung, các peptit và biến thể (ít nhất các chất này chứa liên kết peptit giữa các gốc axit amin) có thể được tổng hợp bằng chế độ Fmoc-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-florenylmetyloxycacbonyl (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 butyloxycacbonyl (trong trường hợp lysin

và histidin), dẫn xuất trityl (trong trường hợp xystein) và dẫn xuất 4-metoxy-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'-dimetoxybenzhydryl để bảo vệ các nhóm chức amido ở mạch bên. Nền pha rắn trên cơ sở polyme polydimetyl-acrylamit được tạo thành từ ba monome dimetylacrylamit (monome khung chính), bisacryloyletylen diamin (nhóm liên kết ngang) và este acryloylsarcosin metyl (chất tạo nhóm chức). Chất liên kết có thể phân giải peptit-với nhựa được sử dụng là dẫn xuất axit không bền với axit 4-hydroxymetyl-phenoxyaxetic. Tất cả các dẫn xuất axit amin được bổ sung thêm vào dưới dạng dẫn xuất anhydrit đối xứng được điều chế từ trước của chúng, ngoại trừ asparagin và glutamin được bổ sung bằng cách sử dụng phương pháp liên kết qua trung gian N, N-dixyclohexyl-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 gradienaxetonitril/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 phổi khối lượng bắn phá nguyên tử nhanh (fast atom bombardment: FAB), cũng như phương pháp phân tích phổi 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).

Để xác định và định lượng tương đối các phối tử của HLA bằng phương pháp phổ khối lượng, các phân tử HLA từ mẫu mô được đông lạnh sốc được tinh chế và các peptit liên quan đến HLA được phân lập. Các peptit phân lập được 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 TUMAP tự nhiên ghi được từ các mẫu bệnh ung thư tụy (N = 18 mẫu dương tính A*02) với các mẫu phân mảnh của các peptit tham chiếu tổng hợp tương ứng của các trình tự giống nhau. Do các peptit được xác định trực tiếp dưới dạng phối tử của các phân tử HLA của khối u nguyên phát, các kết quả này cung cấp bằng chứng trực tiếp về việc xử lý và trình diện tự nhiên của các peptit được xác định trên mô ung thư nguyên phát thu được từ 18 bệnh nhân ung thư tụy.

Thiết bị phát hiện XPRESIDENT® v2.1 (ví dụ, xem công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số US 2013-0096016, tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn toàn bộ nội dung của nó) cho phép xác định và chọn lọc các ứng viên vacxin peptit được trình diện quá mức liên quan trên cơ sở định lượng tương đối trực tiếp lượng peptit giới hạn bởi HLA trên các mô ung thư so với một vài mô và cơ quan không ung thư khác nhau. Điều này đạt được bằng cách phát triển phương pháp định lượng khác nhau không đánh dấu bằng cách sử dụng dữ liệu LC-MS thu được được xử lý bằng chương trình phân tích dữ liệu độc quyền, kết hợp các thuật toán để xác định trình tự,

phân cụm phổ, đếm ion, dóng thẳng hàng thời gian duy trì, giải phóng trạng thái tích điện và chuẩn hóa.

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

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

Các peptit TUMAP được xác định trên nhiều bệnh ung thư tụy và các 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 dóng thẳng hàng thời gian duy trì và chuẩn hóa.

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

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

bệnh nhân mắc bệnh ung thư tụy, mà không ở trên các mô bình thường (xem Ví dụ 1).

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

Các peptit theo sáng chế đã được chứng minh là có khả năng kích thích đáp ứng của tế bào T và/hoặc được biểu hiện quá mức và do đó có thể được sử dụng để tạo ra kháng thể và/hoặc các thụ thể TCR, cụ thể là thụ thể TCR hòa tan theo sáng chế (xem Ví dụ 3, Ví dụ 4). Hơn nữa, khi các peptit được tạo phức với MHC tương ứng cũng có thể được sử dụng để tạo ra kháng thể và/hoặc thụ thể TCR, cụ thể là các thụ thể hòa tan sTCR theo sáng chế. Các phương pháp tương ứng là đã được biết rõ với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, và cũng có thể được tìm thấy trong các tài liệu chuyên ngành tương ứng. Do đó, các peptit theo sáng chế hữu ích để tạo ra đáp ứng miễn dịch ở bệnh nhân mà nhờ đó các tế bào khối u có thể bị phá hủy. Đáp ứng miễn dịch ở bệnh nhân có thể được tạo ra bằng cách sử dụng trực tiếp các peptit đã mô tả hoặc tiền chất thích hợp (ví dụ, peptit được kéo dài, protein, hoặc axit nucleic mã hóa các peptit này) cho bệnh nhân, lý tưởng là kết hợp với chất làm gia tăng tính sinh miễn dịch (nghĩa là tá dược). Đáp ứng miễn dịch có nguồn gốc từ việc tiêm chủng vacxin điều trị bệnh này có thể được dự kiến là có độ đặc hiệu cao với các tế bào khối u do các peptit đích của sáng chế không được biểu hiện trên mô bình thường với số lượng bản sao tương đương, điều này ngăn ngừa nguy cơ của các phản ứng tự miễn không mong muốn đối với tế bào bình thường ở bệnh nhân.

"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 Pratice: 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 –NH2 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 sucxinic, axit maleic, axit fumaric, axit tartaric, axit xitric, axit benzoic, axit xinamic, axit mandelic, axit metan sulfonic, axit etan sulfonic, axit p-toluensulfonic, axit salixylic, và axit tương tự, cũng như các axit vô cơ, ví dụ, axit clohydric, axit bromhydric, axit sulfuric, axit nitric, axit phosphoric và axit tương tự. Ngược lại, việc điều chế các muối bazơ của gốc axit có thể có mặt trên peptit được điều chế bằng cách sử dụng bazơ dược dụng như natri hydroxit, kali hydroxit, amoni hydroxit, canxi hydroxit, trimetylamin hoặc bazơ tương tự.

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

Tốt hơn, nếu thuốc theo sáng chế là các liệu pháp miễn dịch như vacxin. Vacxin 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 intơlơkin-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 hemoxyanin 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 các trình tự từ SEQ ID No. 1 đến SEQ ID No. 67, và ít nhất một peptit bổ sung, tốt hơn là chứa từ 2 đến 50, tốt hơn nữa là chứa từ 2 đến 25, thậm chí tốt hơn nữa là chứa từ 2 đến 20 và tốt nhất là chứa 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 hoặc 18 peptit. (Các) peptit này có thể có nguồn gốc từ một hoặc nhiều TAA đặc hiệu và có thể gắn kết với các phân tử của MHC nhóm I.

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

Nhiều phương pháp khác nhau đã được phát triển để liên kết các polynucleotit, đặc biệt là ADN, với các vectơ, 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 vectơ. Sau đó, vectơ 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 vectơ. 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 vectơ 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 vectơ của virut được sử dụng, vectơ poxvirut hoặc vectơ adenovirut được ưu tiên.

Tiếp đó, ADN (hoặc trong trường hợp vectơ retrovirut, ARN) có thể được biểu hiện ở vật chủ thích hợp để tạo ra polypeptit chứa peptit hoặc biến thể theo sáng chế.

Do đó, ADN mã hóa peptit hoặc biến thể theo sáng chế có thể được sử dụng theo các kỹ thuật đã biết, được cải biến thích hợp theo phần bộc lộ được nêu ở đây, để tạo cấu trúc cho vectơ biểu hiện, mà sau đó vectơ này được dùng để biến nạp tế bào chủ thích hợp để biểu hiện và tạo ra polypeptit theo sáng chế. Các kỹ thuật này bao gồm các kỹ thuật được bộc lộ, ví dụ, trong các patent Mỹ số US 4.440.859, 4.530.901, 4.582.800, 4.677.063, 4.678.751, 4.704.362, 4.710.463, 4.757.006, 4.766.075, và 4.810648.

ADN (hoặc trong trường hợp vectơ retrovirut, 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 vectơ biểu hiện, như plasmit, theo sự định hướng thích hợp và khung đọc chính xác để biểu hiện. Nếu cần, ADN có thể được liên kết với các trình tự nucleotit đối chứng điều hòa phiên mã và dịch mã thích hợp được nhận biết bởi vật chủ mong muốn, mặc dù các đối chứng này thường có mặt trong vectơ biểu hiện. Sau đó, vectơ được đưa vào vật chủ bằng các kỹ thuật chuẩn. Nói chung, không phải tất cả các chủ sẽ được biến nạp bởi vectơ. 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 vectơ 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 vectơ 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 neomyxin. 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 virut 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 b-lactamaza để chọn sự kháng ampixilin ở vi khuẩn, polyA của hGH, và nguồn gốc f1. 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 hoặc các biến thể của peptit theo sáng chế được mã hóa và do đó được biểu hiện theo thứ tự lần lượt (tương tự với cấu trúc "chuỗi hạt"). Theo cách này, peptit hoặc các biến thể của peptit có thể được liên kết hoặc được dung hợp với nhau bằng các đoạn axit amin của nhóm liên kết, ví dụ như LLLLLL, hoặc có thể được liên kết mà không có (các) peptit bổ sung bất kỳ giữa

chúng. Các cấu trúc này cũng có thể được sử dụng cho liệu pháp ung thư, và có thể tạo ra đáp ứng miễn dịch liên quan đến cả MHC I và MHC II.

Sáng chế còn đề xuất tế bào chủ được biến nạp với cấu trúc của vectơ 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 vectơ biểu hiện baculovirut. Tổng quan về sự lựa chọn các tế bào chủ thích hợp để biểu hiện có thể được tìm thấy trong các tài liệu, ví dụ, the textbook of Paulina Balbás and Argelia Lorence "Methods in Molecular Biology Recombinant Gene Expression, Reviews and Protocols," Part One, Second Edition, ISBN 978-1-58829-262-9, và tài liệu khác mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này đã biết.

Sự biến nạp của các tế bào chủ thích hợp với cấu trúc ADN của sáng chế được thực hiện bằng các phương pháp đã được biết rõ, các phương pháp này thường phụ thuộc vào loại vectơ được sử dụng. Liên quan đến sự biến nạp của tế bào chủ không nhân, ví dụ, xem tài liệu của Cohen và các đồng tác giả (Cohen et al., 1972) và (Green and Sambrook, 2012). Sự biến nạp của các tế bào nấm men được mô tả trong tài liệu của Sherman và các đồng tác giả (Sherman et al., 1986). Các phương pháp trong tài liệu của Beggs (Beggs, 1978) cũng hữu ích. Liên quan đến các tế bào của động vật có

xương sống, các chất phản ứng hữu ích trong việc chuyển nhiễm các tế bào này, ví dụ, sản phẩm canxi phosphat và DEAE-dextran hoặc liposom, có thể mua được từ công ty Stratagene Cloning Systems, hoặc Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD 20877, Mỹ. Phương pháp xung điện cũng hữu ích để biến nạp và/hoặc chuyển nhiễm các tế bào và đã được biết rõ trong lĩnh vực này để biến nạp tế bào nấm men, tế bào vi khuẩn, tế bào côn trùng và tế bào của động vật có xương sống.

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

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

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

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

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

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

Polynucleotit dùng để tiêm chủng có hiệu quả có thể gần như tinh khiết, hoặc được chứa trong vectơ 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 vacxin polynucleotit được bào chế dễ dàng nhưng cơ chế tác dụng của các vectơ này trong việc gây đáp ứng miễn dịch vẫn chưa được hiểu rõ hoàn toàn. Các vectơ và hệ giải phóng thích hợp bao gồm ADN và/hoặc ARN của virut, như các hệ trên cơ sở adenovirut, virut vacxinia, retrovirut, virut ecpet, virut liên quan đến adenovirut hoặc thể lai chứa các thành phần của nhiều hơn một virut. Các hệ giải phóng không chứa virut 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 intơlơkin 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 vectơ PepTel®, các vi hạt trên cơ sở poly(lactit co-glycolit) [PLG] và dextran, talactoferin SRL172, Virosom và các hạt tương tự virut khác, YF-17D, VEGF trap, R848, beta-glucan, Pam3Cys, Aquila's QS21 stimulon, sản phẩm này có nguồn gốc từ saponin, chất chiết từ vi khuẩn *mycobacterium* và chất tương tự thành tế bào của vi khuẩn tổng hợp, và các chất phụ trợ độc quyền khác như Ribi's Detox, Quil, hoặc Superfos. Các chất phụ trợ như tá dược Freund hoặc GM-CSF là được ưu tiên. Một vài chất phụ trợ miễn dịch (ví dụ, MF59) đặc hiệu với tế bào đuôi gai và phương pháp điều chế chúng đã được mô tả trước đây (Allison and Krummel, 1995). Các xytokin cũng có thể được sử dụng. Một vài xytokin đã được liên kết trực tiếp để tác động đến sự di trú của tế bào đuôi gai đến các mô bạch huyết (ví dụ, TNF-), thúc đẩy sự trưởng thành của tế bào đuôi gai thành tế bào trình diện kháng nguyên hữu hiệu đối với các tế bào lymphô T (ví dụ, GM-CSF, IL-1 và IL-4) (patent Mỹ số US 5.849.589, tài liệu này được viện dẫn cụ thể ở đây toàn bộ nội dung của nó) và có tác dụng làm chất phụ trợ miễn dịch (ví dụ, IL-12, IL-15, IL-23, IL-7, IFN-alpha. IFN-beta) (Gabrilovich et al., 1996).

Các oligonucleotit kích thích miễn dịch CpG cũng đã được thông báo là làm gia tăng hiệu của của chất phụ trợ trong lĩnh vực vacxin. Không bị ràng buộc bởi lý thuyết bất kỳ, các oligonucleotit CpG có tác dụng bằng cách hoạt hóa hệ miễn dịch bẩm sinh (không thích ứng) nhờ các thụ thể giống Toll (Toll-like receptor: TLR), chủ yếu là TLR9. Sự hoạt hóa TLR9 được khơi mào bởi CpG làm gia tăng mức độ đáp ứng thể dịch và trong tế bào đặc hiệu kháng nguyên với khoảng rộng các kháng nguyên, bao gồm các kháng nguyên peptit hoặc protein, virut còn sống hoặc đã chết, vacxin chứa tế bào đuôi gai, vacxin chứa tế bào tự thân và các thể liên hợp polysacarit trong cả vacxin phòng bệnh và vacxin điều trị bệnh. Quan trọng hơn là nó làm gia tăng sự trưởng thành và biệt hóa của tế bào đuôi gai, điều này dẫn đến sự hoạt hóa tế bào TH1 gia tăng và sự tạo ra tế bào lymphô T (CTL) gây độc tế bào mạnh, ngay cả khi không có mặt tế bào T hỗ trợ CD4. Khuynh hướng TH1 được tạo bởi sự kích thích TLR9 được duy trì ngay cả khi có mặt các chất phụ trợ của vacxin 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 lipit 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). Patent Mỹ số US 6.406.705 B1 mô tả việc sử dụng kết hợp các oligonucleotit CpG, chất phụ trợ không phải axit nucleic và kháng nguyên để gây đáp ứng miễn dịch đặc hiệu kháng nguyên. Chất đối kháng TLR9 của CpG là chất điều biến miễn dịch vòng thân kép (double Stem Loop Immunomodulator: dSLIM), sản phẩm của Mologen (Berlin, Đức) là thành phần được ưu tiên của dược phẩm theo sáng chế. Các phân tử gắn kết thụ thể TLR khác như TLR 7, TLR 8 và/hoặc TLR 9 gắn kết với ARN cũng có thể được sử dụng.

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

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

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

alpha.

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

Dược phẩm này để sử dụng ngoài đường tiêu hóa như sử dụng dưới da, sử dụng trong da, sử dụng trong cơ hoặc sử dụng qua đường miệng. Nhằm mục đích này, các peptit và tùy ý các phân tử khác được hòa tan hoặc tạo hỗn dịch trong chất mang dược dụng, tốt hơn nếu là chất mang trong nước. Ngoài ra, dược phẩm có thể chứa các tá dược như chất đệm, chất gắn kết, chất gây nổ, chất pha loãng, chất tạo hương vị, chất làm trơn, v.v.. Các peptit cũng có thể được sử dụng cùng với các chất kích thích miễn dịch như xytokin. Danh sách nhiều loại tá dược có thể được sử dụng trong dược phẩm này có thể được tìm thấy trong tài liệu, ví dụ, A. Kibbe, Handbook of Pharmaceutical Excipients (Kibbe, 2000). Dược phẩm này có thể được sử dụng để ngăn ngừa, phòng và/hoặc điều trị các bệnh u tuyến hoặc bệnh ung thư. Các dạng dược phẩm làm ví dụ có thể được tìm thấy, ví dụ, trong patent châu Âu số EP2112253.

Điều quan trọng cần thực hiện là đáp ứng miễn dịch được kích thích bằng vacxin theo sáng chế tấn công bệnh ung thư ở các giai đoạn tế bào khác nhau và các giai đoạn phát triển khác nhau. Ngoài ra, các con đường truyền tín hiệu liên quan đến bệnh ung thư khác nhau bị tấn công. Đây là lợi thế đối với các vacxin chỉ hướng đến một hoặc vài đích, điều này có thể làm cho khối u dễ dàng thích ứng với sự tấn công (thoát khỏi khối u). Hơn nữa, không phải tất cả các khối u riêng biệt đều biểu hiện cùng kiểu kháng nguyên. Do đó, hỗn hợp của vài peptit liên quan đến khối u đảm bảo rằng mỗi khối u đơn lẻ mang ít nhất một số đích. Dược phẩm được thiết kế 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, vacxin "có sẵn" này có thể được sử dụng dễ dàng cho quần thể lớn bệnh nhân. Điều này có nghĩa là

việc lựa chọn từ trước đối với các bệnh nhân cần được điều trị bằng vacxin này có thể được giới hạn với loại HLA, không cần sự đánh giá dấu ấn sinh học bổ sung bất kỳ đối với sự biểu hiện kháng nguyên mà vẫn đảm bảo được rằng một số đích được tấn công đồng thời bởi đáp ứng miễn dịch được tạo ra, điều này là quan trọng đối với hiệu quả (Banchereau et al., 2001; Walter et al., 2012).

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

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

Mỗi khung có thể có sự đánh dấu để tạo ra khung gắn kết có thể được phát hiện bằng cách xác định sự có mặt hoặc không có mặt của tín hiệu được tạo ra bởi nguyên

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

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

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

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

Aptame nhận biết các phân tử nằm ở bề mặt tế bào đã được xác định trong thập kỷ trước và tạo ra phương tiện để phát triển phương pháp chẩn đoán và điều trị. Do aptame đã được chứng minh là gần như không có tính độc và tính sinh miễn dịch, chúng là các ứng viên triển vọng cho các ứng dụng y sinh. Thực vậy, các aptame, ví dụ, aptame nhận biết kháng nguyên màng đặc hiệu tuyến tiền liệt, đã được sử dụng thành công cho các liệu pháp hướng đích và đã được chứng minh là có chức năng trong các mô hình mô ghép khác loài *in vivo*. Ngoài ra, aptame nhận biết các dòng tế bào khối u đặc hiệu đã được xác định.

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

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

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

Aptam có thể được lựa chọn đối với các đích phức hợp như các tế bào và mô và phức hợp peptit chứa, tốt hơn là bao gồm, trình tự theo trình tự bất kỳ trong số các trình tự từ SEQ ID NO 1 đến SEQ ID NO 67, theo sáng chế với phân tử MHC, bằng cách sử dụng kỹ thuật tiến hóa theo hệ thống của phối tử bằng cách làm giàu lũy tiến (Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment: SELEX)-tế bào.

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

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

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

nguyên giới hạn HLA, trong đó tốt hơn nếu kháng thể này là kháng thể đa dòng, kháng thể đơn dòng, kháng thể đặc hiệu kép và/hoặc kháng thể thể khảm.

Các phương pháp tương ứng để tạo ra kháng thể này và các phức hợp tương thích mô chính nhóm I chuỗi đơn, cũng như các công cụ khác để tạo ra các kháng thể này được bộc lộ trong các công bố đơn quốc tế số WO 03/068201, WO 2004/084798, WO 01/72768, WO 03/070752, và tài liệu công bố (Cohen et al., 2003a; Cohen et al., 2003b; Denkberg et al., 2003), nhằm mục đích của sáng chế, toàn bộ các tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn toàn bộ nội dung của chúng.

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

Sáng chế đề xuất peptit chứa trình tự được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự từ SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 67, hoặc biến thể của nó có độ tương đồng (tốt hơn là mức độ giống) về trình tự ít nhất là 88% với các trình tự từ SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 67 hoặc biến thể của nó gây ra phản ứng chéo của các tế bào T với peptit nêu trên, trong đó peptit này không là polypeptit cơ sở có chiều dài đầy đủ.

Sáng chế còn đề xuất peptit chứa trình tự được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự từ SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 67 hoặc biến thể của nó có độ tương đồng (tốt hơn là mức độ giống) về trình tự ít nhất là 88% với các trình tự từ SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 67, trong đó peptit hoặc biến thể này có từ 8 đến 100 axit amin, tốt hơn là từ 8 đến 30 axit amin, và tốt nhất là từ 8 đến 14 axit amin trong toàn bộ chiều dài mạch.

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

Sáng chế còn đề xuất các peptit theo sáng chế trong đó peptit này bao gồm hoặc chủ yếu bao gồm trình tự axit amin theo các trình tự từ SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 67.

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

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

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

Sáng chế còn đề xuất vectơ biểu hiện có khả năng biểu hiện axit nucleic theo sáng chế.

Sáng chế còn đề xuất peptit theo sáng chế, axit nucleic theo sáng chế hoặc vectơ biểu hiện theo sáng chế để dùng làm thuốc, cụ thể là để điều trị bệnh ung thư tụy.

Sáng chế còn đề xuất tế bào chủ chứa axit nucleic theo sáng chế hoặc vectơ biểu hiện theo sáng chế.

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

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

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

Sáng chế còn đề xuất phương pháp theo sáng chế, trong đó tế bào trình diện kháng nguyên chứa vectơ biểu hiện có khả năng biểu hiện peptit nêu trên, peptit này chứa các trình tự từ SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 67, hoặc trình tự axit amin của biến thể của nó.

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

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

Sáng chế còn mô tả việc sử dụng peptit bất kỳ đã mô tả, axit nucleic theo sáng chế, vectơ 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 vacxin. Sáng chế còn mô tả việc sử dụng theo sáng chế, trong đó thuốc này có hoạt tính chống ung thư.

Sáng chế còn đề xuất việc sử dụng theo sáng chế, trong đó các tế bào ung thư nêu trên là tế bào ung thư tụy hoặc tế bào khối u huyết học hoặc khối u dạng rắn khác như bệnh ung thư tụy, bệnh ung thư não, bệnh ung thư thận, bệnh ung thư ruột kết hoặc trực tràng, bệnh bạch cầu.

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

Thuật ngữ "kháng thể" hoặc "các kháng thể" được sử dụng ở đây theo nghĩa rộng và bao gồm cả kháng thể đa dòng và kháng thể đơn dòng. Ngoài các phân tử globulin miễn dịch nguyên vẹn hoặc "đầy đủ", các đoạn kháng thể (ví dụ, các vùng quyết định tính bổ trợ (CDRs), đoạn Fv, đoạn Fab và đoạn Fc) hoặc các polyme của các phân tử globulin miễn dịch này và các phiên bản được làm cho giống kháng thể của người của phân tử globulin miễn dịch cũng được bao gồm trong thuật ngữ "kháng thể", miễn là chúng có đặc tính bất kỳ trong số các đặc tính mong muốn (ví dụ, sự gắn kết đặc hiệu của (poly)peptit của gen đánh ấn bệnh ung thư tụy, sự cung cấp độc tố đến tế bào ung thư tụy biểu hiện gen đánh dấu ung thư ở mức cao, và/hoặc ức chế hoạt tính của polypeptit của của gen đánh dấu bệnh ung thư tụy) 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 tụy có chiều dài đầy đủ hoặc các đoạn của nó có thể được sử dụng để tạo ra kháng thể theo sáng chế. Polypeptit được sử dụng để tạo ra kháng thể theo sáng chế có thể được tinh chế một phần hoặc hoàn toàn ra khỏi nguồn tự nhiên, hoặc có thể được tạo ra bằng kỹ thuật ADN tái tổ hợp.

Ví dụ, peptit mã hóa ADN bổ trợ theo sáng chế, như peptit theo các trình tự từ SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 67, polypeptit, hoặc biến thể hoặc đoạn của nó, có thể được biểu hiện ở các tế bào không nhân (ví dụ, vi khuẩn) hoặc các tế bào có nhân điển hình (ví dụ, các tế bào nấm men, côn trùng, hoặc động vật có vú), mà sau đó protein tái tổ hợp có thể được tinh chế và sử dụng để tạo ra kháng thể đơn dòng hoặc kháng thể đa dòng để gắn kết đặc hiệu với polypeptit của gen đánh dấu bệnh ung thư tụy 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 phần mô đông lạnh. Sau khi xác định tính chất ban đầu của chúng *in vitro*, kháng thể được dự định cho mục đích điều trị hoặc chẩn đoán *in vivo* được sử dụng theo các phương pháp thử nghiệm trong lâm sàng đã biết.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "kháng thể đơn dòng" để chỉ kháng thể thu được từ quần thể kháng thể gần như đồng nhất, nghĩa là các kháng thể riêng biệt chứa quần thể là giống nhau ngoại trừ sự đột biến có thể có trong tự nhiên nhưng có thể có mặt với lượng rất nhỏ. Các kháng thể đơn dòng ở đây cụ thể bao gồm các kháng thể "thể khảm" trong đó phần chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ là giống với hoặc tương đồng với các trình tự tương ứng trong kháng thể có nguồn gốc từ loài cụ thể hoặc thuộc về nhóm hoặc phân nhóm kháng thể cụ thể, trong khi phần còn lại của (các) chuỗi này là giống với hoặc tương đồng với các trình tự tương ứng trong kháng thể có nguồn gốc từ các loài khác hoặc thuộc về nhóm hoặc phân nhóm kháng thể, cũng như các đoạn của kháng thể này, miễn là chúng có hoạt tính đối kháng mong muốn (patent Mỹ số US 4.816.567, tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn toàn bộ nội dung của nó).

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

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

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

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

gây đột biến đặc hiệu vị trí của axit nucleic mã hóa đoạn kháng thể.

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

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

trong đó vùng biến đổi nguyên vẹn của người được thay thế ít hơn đáng kể bằng trình tự tương ứng từ các loài không phải người. Trên thực tế, kháng thể được làm cho giống kháng thể của người thường là kháng thể của người trong đó một số gốc CDR và có thể là một số gốc FR được thay thế bằng các gốc từ các vị trí tương tự ở kháng thể của động vật gặm nhấm.

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

Tốt hơn, nếu kháng thể theo sáng chế được sử dụng cho đối tượng trong chất mang dược dụng. Thông thường, lượng thích hợp của muối dược dụng được sử dụng trong sản phẩm để tạo ra sản phẩm đẳng trương. Ví dụ về các chất mang dược 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 tụy, hiệu quả của kháng thể điều trị có thể được đánh giá theo nhiều cách khác nhau mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này đã biết rõ. Chẳng hạn, kích thước, số lượng và/hoặc sự phân bố bệnh ung thư ở đối tượng được điều trị có thể được theo dõi bằng cách sử dụng kỹ thuật hình ảnh khối u chuẩn. Kháng thể được sử dụng để điều trị bệnh làm ngừng sự phát triển của khối u, làm cho khối u nhỏ lại, và/hoặc ngăn ngừa sự phát triển của khối u mới, so với sự diễn biến của bệnh sẽ xuất hiện khi không sử dụng kháng thể, là kháng thể có hiệu quả để điều trị bệnh ung thư.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp tạo ra thụ thể tế bào T hòa tan (sTCR) nhận biết phức hợp peptit-MHC đặc hiệu. Các thụ thể tế bào T hòa tan này có thể được tạo ra từ các dòng vô tính của tế bào T đặc hiệu, và ái lực của chúng có thể được tăng lên bằng cách gây đột biến hướng đích là các vùng quyết định tính bổ trợ. Nhằm mục đích chọn lọc thụ thể tế bào T, sự biểu hiện trên thể thực khuẩn có thể được sử dụng (US 2010/0113300, (Liddy et al., 2012)). Nhằm mục đích làm ổn định các thụ thể tế bào T trong khi biểu hiện trên thể thực khuẩn và trong trường hợp sử dụng trên thực tế làm dược chất, chuỗi alpha và beta có thể được liên kết, ví dụ, bằng các liên kết disulfua không tự nhiên, các liên kết cộng hóa trị khác (thụ thể tế bào T chuỗi đơn), hoặc bằng các vùng dime hóa (Boulter et al., 2003; Card et al., 2004; Willcox et al., 1999). Thụ thể tế bào T có thể được liên kết với độc tố, dược chất, xytokin (ví dụ, xem công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số US 2013/0115191), các vùng tập hợp các tế bào hiệu ứng như vùng kháng CD3, v.v., để thực hiện chức năng cụ thể trên các tế bào đích. Ngoài ra, nó có thể được biểu hiện ở các tế bào T dùng để chuyển mượn. 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, ^{3}H, ^{32}P hoặc ^{35}S) sao cho khối u có thể được cố định bằng cách sử dụng phương pháp chụp hình miễn dịch nhấp nháy. Theo một phương án, kháng thể hoặc đoạn kháng thể gắn kết với vùng ngoại bào của hai hoặc nhiều đích của protein được chọn từ nhóm bao gồm các protein nêu trên, và giá trị ái lực (Kd) nhỏ hơn 1 x 10μM.

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 vectơ biểu hiện có khả năng biểu hiện peptit chứa các trình tự từ SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 67, hoặc trình tự axit amin biến thể của nó.

Nhiều phương pháp khác có thể được sử dụng để tạo ra tế bào T *in vitro*. Ví dụ, các tế bào lymphô thâm nhiễm khối u tự thân có thể được sử dụng để tạo ra CTL. Plebanski và các đồng tác giả (Plebanski et al., 1995) sử dụng các tế bào lymphô trong máu ngoại vi (peripheral blood lymphocytes: PLBs) tự thân để tạo ra các tế bào T. Ngoài ra, sự tạo ra các tế bào T tự thân bằng cách gây xung cho các tế bào đuôi gai bằng peptit hoặc polypeptit, hoặc có thể bằng cách tiêm virut 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 virut 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 mồi của các tế bào T *in vitro* bằng cách sử dụng tế bào trình diện kháng nguyên nhân tạo (artificial antigen presenting cells: aAPCs), phương pháp này cũng là cách thích hợp để tạo ra các tế bào T đối với peptit được chọn. Theo sáng chế, aAPCs được tạo ra bằng cách ghép cặp phức hợp MHC:peptit đã được tạo ra từ trước với bề mặt của các hạt polystyren (vi hạt) theo hỗn hợp hóa sinh biotin:streptavidin. Hệ này cho phép kiểm soát chính xác mật độ MHC trên aAPCs, điều này cho phép tạo ra theo cách chọn lọc các đáp ứng của tế bào T đặc hiệu với kháng nguyên ở mức cao hoặc thấp với hiệu quả cao từ các mẫu máu. Ngoài phức hợp MHC:peptit, aAPCs cần mang các protein khác có hoạt tính đồng kích thích như các kháng thể kháng CD28 được liên kết với bề mặt của chúng. Ngoài ra, các hệ trên cơ sở aAPC này thường cần bổ sung thêm các yếu tố hòa tan thích hợp, ví dụ, xytokin, như intơlơkin-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 vacxinia. 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 hướng vào peptit theo sáng chế là hữu ích trong liệu pháp. Do đó, theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất các tế bào T hoạt hóa có thể thu được bằng các phương pháp theo sáng chế nêu trên.

Các tế bào T hoạt hóa, được tạo ra bằng phương pháp nêu trên, sẽ nhận biết chọn lọc tế bào biểu hiện bất thường polypeptit chứa trình tự axit amin trong số các trình tự từ SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 67.

Tốt hơn, nếu tế bào T nhận biết tế bào bằng cách tương tác qua thụ thể TCR của nó với phức hợp HLA/peptit (ví dụ, gắn kết). Các tế bào T hữu ích trong phương

pháp tiêu diệt tế bào đích ở bệnh nhân có các tế bào đích biểu hiện bất thường polypeptit chứa trình tự axit amin theo sáng chế trong đó bệnh nhân này được cho sử dụng lượng hữu hiệu của các tế bào T hoạt hóa. Các tế bào T được sử dụng cho bệnh nhân có thể có nguồn gốc từ bệnh nhân này và được hoạt hóa như đã mô tả trên đây (nghĩa là chúng là các tế bào T tự thân). Theo cách khác, các tế bào T không có nguồn gốc từ bệnh nhân mà có nguồn gốc từ đối tượng khác. Tất nhiên là tốt hơn nếu đối tượng này là đối tượng khỏe mạnh. Thuật ngữ "đối tượng khỏe mạnh" theo sáng chế để chỉ đối tượng thường là có sức khỏe tốt, tốt hơn là có hệ miễn dịch mạnh và tốt hơn nữa nếu đối tượng này không bị bệnh bất kỳ có thể được thử nghiệm và phát hiện dễ dàng.

Các tế bào đích *in vivo* của tế bào T dương tính với CD8 theo sáng chế có thể là các tế bào khối u (các tế bào này đôi khi biểu hiện MHC nhóm II) và/hoặc tế bào nền bao quanh khối u (các tế bào khối u) (các tế bào này đôi khi cũng biểu hiện MHC nhóm II; (Dengjel et al., 2006)).

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

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

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

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

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

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

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

Sáng chế còn đề xuất kit bao gồm:

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

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

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

Kit còn có thể chứa một hoặc nhiều thành phần trong số (iii) chất đệm, (iv) chất pha loãng, (v) dụng cụ lọc, (vi) kim tiêm, hoặc (v) bơm tiêm. Tốt hơn, nếu đồ chứa là chai, lọ, bơm tiêm hoặc ống thử nghiệm; và có thể là đồ chứa đa dụng. Tốt hơn, nếu dược 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 độn, kim tiêm, bơm tiêm khác, và bao gói có kèm theo hướng dẫn sử dụng.

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

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

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

Dạng của dược phẩm theo sáng chế là dạng thích hợp để sử dụng các peptit qua

đường có thể chấp nhận bất kỳ như đường miệng (trong ruột), đường mũi, đường mắt, dưới da, trong da, trong cơ, trong tĩnh mạch hoặc qua da. Tốt hơn, nếu việc sử dụng là qua đường dưới da (s.c.), và tốt nhất nếu việc sử dụng qua đường i.d. có thể bằng cách bơm truyền.

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

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

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

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

quan trọng có nguồn gốc từ "không phải chính" kháng nguyên trong trường hợp các đáp ứng của tế bào T1 là đáp ứng của tế bào do vacxin bất kỳ gây ra với các peptit TUMAP có nguồn gốc từ "chính" các kháng nguyên ở bệnh nhân không được quan sát. Và điều thứ ba là nó có thể cho phép rút ra kết luận liên quan đến tình trạng khả năng miễn dịch của bệnh nhân.

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

1. Các phối tử HLA từ vật liệu ác tính được xác định bằng phương pháp phổ khối lượng

2. Phương pháp phân tích sự biểu hiện của axit ribonucleic thông tin (mRNA) có hệ gen rộng được dùng để xác định các gen được biểu hiện quá mức ở mô ác tính (bệnh ung thư tụy) so với khoảng mô và cơ quan bình thường

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

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

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

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

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

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

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

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

Tốt hơn, nếu các peptit đưa vào vacxin được xác định bằng phương pháp bao gồm các bước: (a) xác định các peptit liên quan đến khối u (TUMAP) được biểu hiện bởi mẫu khối u được lấy từ bệnh nhân riêng biệt; (b) so sánh các peptit xác định được trong bước (a) với kho chứa (cơ sở dữ liệu) của các peptit như được mô tả trên đây; và (c) chọn lọc ít nhất một peptit từ kho chứa (cơ sở dữ liệu) có tương quan với peptit liên quan đến khối u được xác định ở bệnh nhân. Ví dụ, các peptit TUMAP được biểu hiện bởi mẫu khối u được xác định bằng cách: (a1) so sánh dữ liệu biểu hiện từ mẫu khối u với dữ liệu biểu hiện từ mẫu mô bình thường tương ứng với loại mô của mẫu

khối u để xác định các protein được biểu hiện quá mức hoặc biểu hiện bất thường ở mẫu khối u; và (a2) tương quan dữ liệu biểu hiện với trình tự của các phối tử MHC gắn kết với các phân tử MHC nhóm I và/hoặc nhóm II trong mẫu khối u để xác định các phối tử MHC có nguồn gốc từ protein được biểu hiện quá mức hoặc biểu hiện bất thường bởi khối u này. Tốt hơn, nếu các trình tự của phối tử MHC được xác định bằng cách rửa giải các peptit đã gắn kết ra khỏi phân tử MHC được phân lập ra khỏi mẫu khối u, và giải trình tự của các phối tử được rửa giải. Tốt hơn, nếu mẫu khối u và mô bình thường được lấy từ cùng bệnh nhân.

Ngoài ra hoặc theo cách khác, bước chọn lọc peptit bằng cách sử dụng mô hình lập kho chứa (cơ sở dữ liệu), peptit TUMAP có thể được xác định ở bệnh nhân *de novo*, và sau đó được đưa vào vacxin. Theo một ví dụ, các peptit TUMAP ứng viên có thể được xác định ở bệnh nhân theo các bước (a1) so sánh dữ liệu biểu hiện từ mẫu khối u với dữ liệu biểu hiện từ mẫu mô bình thường tương ứng với loại mô của mẫu khối u để xác định các protein được biểu hiện quá mức hoặc biểu hiện bất thường trong mẫu khối u; và (a2) tương quan dữ liệu biểu hiện với trình tự của phối tử MHC gắn kết với các phân tử MHC nhóm I và/hoặc nhóm II trong mẫu khối u để xác định các phối tử MHC có nguồn gốc từ các protein được biểu hiện quá mức hoặc biểu hiện bất thường bởi khối u này. Theo ví dụ khác, các protein có thể được xác định là có các đột biến khác biệt với mẫu khối u so với mô tương ứng bình thường được lấy từ bệnh nhân riêng biệt, và các peptit TUMAP có thể được xác định là đích đặc hiệu của sự đột biến. Ví dụ, hệ gen của khối u và của mô bình thường tương ứng có thể được giải trình tự bằng cách giải trình tự toàn bộ hệ gen: để phát hiện các đột biến không cùng nghĩa ở các vùng mã hóa protein của gen, ADN và ARN hệ gen được chiết từ các mô khối u và ADN dòng mầm của hệ gen bình thường không được đột biến được chiết ra khỏi các tế bào đơn nhân máu ngoại vi (peripheral blood mononuclear cell: PBMC). Phương pháp NGS đã áp dụng bị giới hạn với việc xác định lại trình tự của các vùng mã hóa protein (xác định lại trình tự exom). Nhằm mục đích này, ADN exon từ các mẫu lấy từ người bị bắt giữ bằng cách sử dụng kit giàu đích được cung cấp bởi nhà cung cấp, sau đó giải trình tự, ví dụ, bằng HiSeq2000 (Illumina). Ngoài ra, ARN thông tin của khối u được giải trình tự để định lượng trực tiếp sự biểu hiện gen và xác nhận các gen đột biến được biểu hiện ở khối u của bệnh nhân. Hàng triệu kết quả trình tự thu được được xử lý bằng các thuật toán phần mềm. Danh sách kết quả có sự đột

biến và sự biểu hiện gen. Sự đột biến thực thể đặc hiệu khối u được xác định bằng cách so sánh với các thay đổi về dòng phôi có nguồn gốc từ PBMC và được ưu tiên. Sau đó, các peptit đã xác định *de novo* có thể được thử nghiệm về tính sinh miễn dịch như đã mô tả trên đây đối với kho chứa, và các peptit TUMAP ứng viên có tính sinh miễn dịch thích hợp được chọn để đưa vào vacxin.

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

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

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

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

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

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

Sự có mặt của các peptit theo sáng chế khi sinh thiết mô trong các mẫu máu có thể trợ giúp chuyên gia bệnh học trong việc chẩn đoán bệnh ung thư. Sự phát hiện một số peptit bằng phương pháp kháng thể, phương pháp phổ khối lượng hoặc các phương pháp khác đã biết trong lĩnh vực này có thể cung cấp cho chuyên gia bệnh học biết rằng mẫu mô này là ác tính hoặc bị viêm hoặc thường là bị bệnh, hoặc có thể được sử dụng làm dấu ấn sinh học cho bệnh ung thư tụy. 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 mượn của các tế bào lymphô. Trong lĩnh vực liệu pháp gen, các đáp ứng của tế bào lymphô với peptit có thể được xem xét để đánh giá các tác dụng phụ. Việc theo dõi các đáp ứng của tế bào lymphô cũng có thể là công cụ có giá trị để tiếp tục đánh giá các liệu pháp ghép, ví dụ, để phát hiện bệnh mô ghép chống túc chủ và bệnh túc chủ chống lại mô ghép.

Sáng chế sẽ được mô tả trong các ví dụ sau đây, các ví dụ này mô tả các phương án được ưu tiên của sáng chế cùng với các hình vẽ kèm theo nhưng không làm giới hạn phạm vi của sáng chế. Theo mục đích của sáng chế, tất cả các tài liệu viện

dẫn được nêu ở đây được đưa vào đây bằng cách viện dẫn toàn bộ nội dung của chúng.

Ví dụ thực hiện sáng chế

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

Các mẫu mô

Các mô khối u của bệnh nhân được lấy từ Asterand (Detroit, Mỹ và Royston, Herts, Vương Quốc Anh); Geneticist Inc. (Glendale, CA, Mỹ); Bệnh viện Heidelberg; Bệnh viện đại học Tübingen. Các mô bình thường được lấy từ Bio-Options Inc. (CA, Mỹ); BioServe (Beltsville, MD, Mỹ); Capital BioScience Inc. (Rockville, MD, Mỹ); Geneticist Inc. (Glendale, CA, Mỹ); Bệnh viện đại học Geneva; Bệnh viện đại học Heidelberg; Đại học y Kyoto Prefectural (Kyoto Prefectural University of Medicine: KPUM); Bệnh viện đại học Munich; ProteoGenex Inc. (Culver City, CA, Mỹ); Bệnh viện đại học Tübingen. 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 được đông lạnh sốc thu được bằng cách kết tủa miễn dịch từ các mô rắn theo quy trình được cải biến không đáng kể (Falk, K., 1991; Seeger, F.H.T., 1999) bằng cách sử dụng kháng thể BB7.2 đặc hiệu HLA-A*02, kháng thể W6/32 đặc hiệu HLA-A, -B, -C, sepharoza 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 (75µm i.d. x 250mm) được nạp vật liệu đảo pha C18 1,7µm (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 = 30 000), sau đó, các lần quét bằng bằng phương pháp MS/MS cũng được thực hiện trong thiết bị orbitrap (R = 7500) trên 5 tiền chất ion dư thừa nhất với sự loại trừ động lực của các ion đã chọn trước đó. Phổ khối nối tiếp được giải thích bằng thuật toán SEQUEST và sự điều chỉnh bằng tay bổ sung. Trình tự peptit xác định được được đảm bảo bằng cách so sánh mẫu phân mảnh peptit tự nhiên được tạo ra với mẫu phân mảnh của peptit tham chiếu tổng hợp có trình tự giống hệt.

Phương pháp định lượng bằng cách sắc ký lỏng-phổ khối (LC-MS) tương đối không đánh dấu được thực hiện bằng cách đếm ion nghĩa là bằng cách chiết và phân tích các đặc điểm của phổ LC-MS (Mueller et al. 2007a). Phương pháp này giả định rằng vùng tín hiệu LC-MS của peptit có tương quan với sự có mặt quá nhiều của nó trong mẫu. Các đặc điểm khi chiết được xử lý thêm bằng cách giải phóng trạng thái tích điện và dóng thẳng hàng thời gian duy trì (Mueller et al. 2007b; Sturm et al. 2008). Cuối cùng, tất cả các đặc điểm của phổ LC-MS được tham chiếu chéo với kết quả xác định trình tự để kết hợp các dữ liệu định lượng của các mẫu và mô khác nhau với profin trình diện của peptit. Các dữ liệu định lượng được chuẩn hóa theo kiểu hai bậc theo xu hướng trung tâm để giải thích sự thay đổi trong các bản sao về mặt kỹ thuật và sinh học. Do đó, mỗi peptit xác định được có thể có liên quan đến dữ liệu định lượng để cho phép định lượng tương đối giữa các mẫu và mô. Ngoài ra, tất cả các dữ liệu định lượng thu được của các ứng viên peptit được kiểm tra bằng tay để đảm bảo tính nhất quán của dữ liệu và để kiểm tra độ chính xác của phương pháp phân tích tự động. Đối với mỗi peptit, profin trình diện tính được cho thấy sự biểu hiện trung bình của mẫu cũng như sự biến đổi lặp lại. Để các profin của mẫu bệnh ung thư tụy cạnh đường gốc của các mẫu mô bình thường. Profin trình diện của các peptit biểu hiện quá mức làm ví dụ được thể hiện trên Fig.1. Điểm số biểu hiện của các peptit làm

ví dụ được thể hiện trong Bảng 8.

Bảng 8: Điểm số biểu hiện. Bảng này liệt kê các peptit được biểu hiện ở mức quá 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	FLAQQESEI	+++
2	SLQEEHVAVA	++
3	ALLTFMEQV	+++
4	SVDVSPPKV	+
5	LLVDDSFLHTV	+++
7	AQQESEIAGI	+++
8	IVDDLTINL	+++
9	FLFDGSANLV	+++
10	FLVDGSSAL	+++
11	FLYKIIDEL	+++
12	FVSEIVDTV	+++
13	LLAGQTYHV	++
14	VLAKPGVISV	+
15	SLANNVTSV	+
16	APVNVTTEVKSV	+++
17	FLKSGDAAIV	+++
18	SLLDDELMSL	++
19	HLAPETDEDDL	+++
20	RLAGDGVGAV	++
21	HLMDQPLSV	+++
23	SLSAFTLFL	+
24	GLLEELVTV	+++
25	SLKEEVGEEAI	+
26	SLKEEVGEEAIV	++
29	FLQEYLDAI	+++
31	SLAAAAGKQEL	+++

32	SLAAAAGKQELA	+++
33	SLDSRLELA	+++
34	MLMPVHFLL	+++
35	VMDSGDGVTHTV	+
36	KQEYDESGPSIVH	+++
37	GLLKKINSV	+++
38	NLVEKTPALV	+++
39	TLLSNLEEA	+
40	FILDSAETTTL	+++
41	FLLDGSEGV	+++
42	KLVDKSTEL	+++
43	RLDQRVPQI	++
46	TFAPVNVTTEVKSV	+
47	KMDASLGNLFA	+++
48	ALTQTGGPHV	+++
49	NLKGTFATL	+++
50	ALAAILTRL	+++
51	ALMLQGVDL	+++
52	RMVEEIGVEL	++
56	GLLDYATGAIGSV	+++
57	FLGKVVIDV	+++
58	GLAAFKAFL	+++
59	KLFNLSKEDDV	+++
61	ALEKDYEEVGV	+++
62	ALEKDYEEV	+++
63	FAGDDAPR	+++
64	FLVSNMLLAEA	+++
66	ALLSGLREA	+++
67	KMFFLIDKV	+++
68	KLLTEVHAA	+++
70	FLVDGSWSV	+++
71	FLLDGSANV	+++
74	KIQEILTQV	+++

75	RLDDLKMTV	++
76	RLLDSVSRL	+
77	GLTDNIHLV	+++
79	VLAPRVLRA	+
80	TLYPHTSQV	+
81	AMSSKFFLV	+++
82	SISDVIAQV	+++
83	FLIDSSEGV	+++
84	NLLDLDYEL	+++
85	TVAEVIQSV	++
86	SLLAQNTSWLL	++
87	LLLGSPAAA	+++

Ví dụ 2

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

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

Nguồn ARN và điều chế

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

ARN tổng số từ 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 đôi được tổng hợp từ 5–8µg 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 theo sáng chế được biểu hiện ở mức quá cao hoặc chỉ được biểu hiện ở bệnh ung thư tụy được thể hiện trên Fig.2. Điểm số biểu hiện của các gen làm ví dụ khác được thể hiện trong Bảng 9.

Bảng 9: Điểm số biểu hiện. Bảng này liệt kê các peptit từ gen được biểu hiện ở mức rất cao trong khối u so với nhóm các mô bình thường (+++), được biểu hiện ở mức quá cao trong khối u so với nhóm các mô bình thường (++) hoặc được biểu hiện

quá mức trong khối u so với nhóm các mô bình thường (+).

SEQ ID No	Trình tự	Sự biểu hiện gen
3	ALLTFMEQV	++
4	SVDVSPPKV	+
6	VLISLKQAPLV	+
13	LLAGQTYHV	+
15	SLANNVTSV	+
16	APVNVTTEVKSV	+
20	RLAGDGVGAV	+
23	SLSAFTLFL	+
25	SLKEEVGEEAI	++
27	YLQGQRLDNV	+
30	VVDEGPTGV	++
36	KQEYDESGPSIVH	+
43	RLDQRVPQI	+
44	VLLDKIKNLQV	+
46	TFAPVNVTTEVKSV	++
47	KMDASLGNLFA	+
48	ALTQTGGPHV	+
50	ALAAILTRL	+++
51	ALMLQGVDL	++
52	RMVEEIGVEL	+
57	FLGKVVIDV	+
58	GLAAFKAFL	+
59	KLFNLSKEDDV	+
61	ALEKDYEEVGV	+++
62	ALEKDYEEV	+++
66	ALLSGLREA	++
67	KMFFLIDKV	+
71	FLLDGSANV	+
73	TLVAIVVGV	++
75	RLDDLKMTV	++
76	RLLDSVSRL	+++

78	TLSSIKVEV	+++
81	AMSSKFFLV	++

Ví dụ 3

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

Để thu được thông tin liên quan đến tính sinh miễn dịch của peptit TUMAP theo sáng chế, các tác giả sáng chế đã tiến hành đánh giá bằng cách sử dụng thử nghiệm tạo mồi tế bào T *in vitro* trên cơ sở sự kích thích lặp lại của các tế bào T CD8+ bằng các tế bào trình diện kháng nguyên nhân tạo (artificial antigen presenting cell: aAPC) được tải phức hợp peptit/MHC và kháng thể kháng CD28. Theo cách này, tác giả sáng chế có thể cho thấy tính sinh miễn dịch đối với peptit TUMAP được giới hạn bởi 22 HLA-A*0201 theo sáng chế, để chứng minh rằng các peptit này là epitop của tế bào T kháng tiền tế bào T CD8+ tồn tại ở người (Bảng 10).

Tạo mồi các tế bào T CD8+ *in vitro*

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

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

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

pMHC khác nhau cho mỗi điều kiện đọc kết quả.

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

pMHC được sử dụng để kích thích đối chứng dương tính và âm tính là A*0201/MLA-001 (peptit ELAGIGILTV (SEQ ID NO 88) từ Melan-A/MART-1 được cải biến) và A*0201/DDX5-001 (YLLPAIVHI (SEQ ID No. 89) từ DDX5), tương ứng.

800.000 hạt/200 µl được phủ trong đĩa có 96 lỗ với sự có mặt của 4 x 12,5 ng biotin-pMHC khác nhau, được rửa và 600 ng biotin kháng CD28 được cho thêm sau đó với thể tích 200µl. Sự kích thích được khơi mào trong đĩa có 96 lỗ bằng cách ủ đồng thời $1x10^6$ tế bào T CD8+ với $2x10^5$ 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 mồi *in vitro* của các tế bào lymphô 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 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 tụy

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 theo sáng chế được thể hiện trên Fig.3 cùng với các đối chứng âm tính tương ứng. Kết quả của 2 peptit theo sáng chế được tóm tắt trong Bảng 10.

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

Kết quả làm ví dụ của thử nghiệm tính sinh miễn dịch *in vitro* được tiến hành bởi tác giả sáng chế đối với các peptit theo sáng chế. <20% = +; 20% - 49% = ++; 50% - 69%= +++; >= 70 % = ++++

Seq ID	Các lỗ	Người cho
69	++	++++
87	+	+++

Kết quả của 7 peptit bổ sung theo sáng chế được tóm tắt trong Bảng 10B.

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

Các kết quả làm ví dụ của thử nghiệm tính sinh miễn dịch *in vitro* được tiến hành bởi tác giả sáng chế đối với các peptit theo sáng chế. <20% = +; 20% - 49% = ++; 50% - 69 %= +++; >= 70% = ++++

Seq ID No	Trình tự	Tỷ lệ lỗ dương tính [%]
3	ALLTFMEQV	++
20	RLAGDGVGAV	++++
21	HLMDQPLSV	+
23	SLSAFTLFL	++
34	MLMPVHFLL	+
37	GLLKKINSV	+
50	ALAAILTRL	+++

Ví dụ 4

Tổng hợp peptit

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

Ví dụ 5

Thử nghiệm gắn kết MHC

Các peptit ứng viên dùng cho liệu pháp trên cơ sở tế bào T theo sáng chế được thử nghiệm thêm về khả năng gắn kết với MHC (ái lực) của chúng. Các phức hợp peptit-MHC riêng biệt được tạo ra bằng cách trao đổi UV-phối tử, trong đó peptit nhạy UV được phân giải khi chiếu UV, và được trao đổi với peptit quan tâm khi phân tích. Khi các ứng viên peptit có thể gắn kết hữu hiệu và làm ổn định các phân tử MHC nhận peptit để ngăn ngừa sự phân ly của các phức hợp MHC. Để xác định hiệu suất của phản ứng trao đổi, thử nghiệm ELISA được thực hiện dựa trên sự phát hiện chuỗi nhẹ (β2m) 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*0201/MLA-001 cuộn gập lại được dùng làm chất chuẩn, phủ với lượng nằm trong khoảng từ 15 đến 500 ng/ml. Các monome peptit-MHC của phản ứng trao đổi UV- được pha loãng 100 lần trong dung dịch đệm phong bế. Các mẫu được ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ 37°C, rửa 4 lần, ủ với HRP 2ug/ml liên hợp kháng β2m 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 11: điểm gắn kết với MHC nhóm I. <20% = +; 20% - 49% = ++; 50% - 75%= +++; >= 75% = ++++

SEQ ID No	Trình tự	Sự trao đổi peptit
1	FLAQQESEI	++
2	SLQEEHVAVA	++
3	ALLTFMEQV	+++
4	SVDVSPPKV	++
5	LLVDDSFLHTV	+++
6	VLISLKQAPLV	++
7	AQQESEIAGI	++
8	IVDDLTINL	++
9	FLFDGSANLV	++
10	FLVDGSSAL	++
11	FLYKIIDEL	+++
12	FVSEIVDTV	+++
13	LLAGQTYHV	++
14	VLAKPGVISV	++
15	SLANNVTSV	++
16	APVNVTTEVKSV	++
17	FLKSGDAAIV	++
18	SLLDDELMSL	++
20	RLAGDGVGAV	++
21	HLMDQPLSV	++
22	TLDGAAVNQV	++
23	SLSAFTLFL	++
24	GLLEELVTV	++
25	SLKEEVGEEAI	++
26	SLKEEVGEEAIV	++
27	YLQGQRLDNV	++
28	YLQGQRLDNVV	++

SEQ ID No	Trình tự	Sự trao đổi peptit
29	FLQEYLDAI	+++
30	VVDEGPTGV	++
31	SLAAAAGKQEL	++
32	SLAAAAGKQELA	+
33	SLDSRLELA	++
34	MLMPVHFLL	++++
35	VMDSGDGVTHTV	++
37	GLLKKINSV	++
38	NLVEKTPALV	+++
39	TLLSNLEEA	++
40	FILDSAETTTL	++
41	FLLDGSEGV	+++
42	KLVDKSTEL	++
43	RLDQRVPQI	++
44	VLLDKIKNLQV	++
46	TFAPVNVTTEVKSV	++
47	KMDASLGNLFA	++++
48	ALTQTGGPHV	++
49	NLKGTFATL	+
50	ALAAILTRL	+++
51	ALMLQGVDL	++
52	RMVEEIGVEL	++
53	SSFGGLGGGSV	+
54	VLLSEIEVA	++
55	YLDAMMNEA	++
56	GLLDYATGAIGSV	+++
57	FLGKVVIDV	++++
58	GLAAFKAFL	+++
59	KLFNLSKEDDV	++
60	YLEEDVYQL	++
64	FLVSNMLLAEA	+++
65	YLYDSETKNA	++

SEQ ID No	Trình tự	Sự trao đổi peptit
66	ALLSGLREA	+++
67	KMFFLIDKV	+++

Tài liệu tham khảo

Agesen, T. H. et al., Gut 61 (2012)

Alhumaidi, A., Indian J Dermatol.Venereol.Leprol. 78 (2012)

Allison, J. P. et al., Science 270 (1995)

Amatschek, S. et al., Cancer Res 64 (2004)

Andersen, R. S. et al., Nat.Protoc. 7 (2012)

Appay, V. et al., Eur.J Immunol. 36 (2006)

Appetecchia, M. et al., J Exp.Clin Cancer Res 29 (2010)

Arafat, H. et al., Surgery 150 (2011)

Ariga, N. et al., Int J Cancer 95 (2001)

Baek, G. et al., Cell Rep. 9 (2014)

Bai, L. et al., J Cell Biochem. 113 (2012)

Banchereau, J. et al., Cell 106 (2001)

Bausch, D. et al., Clin Cancer Res 17 (2011)

Beatty, G. et al., J Immunol 166 (2001)

Beggs, J. D., Nature 275 (1978)

Bell, J. L. et al., Cell Mol Life Sci. 70 (2013)

Benjamini, Y. et al., Journal of the Royal Statistical Society.Series B (Methodological), Vol.57 (1995)

Bera, T. K. et al., Cancer Res 66 (2006)

Berndt, S. I. et al., Nat Genet. 45 (2013)

Blanch, A. et al., PLoS.One. 8 (2013)

Blenk, S. et al., BMC.Cancer 8 (2008)

Bo, H. et al., BMC.Cancer 13 (2013)

Bouameur, J. E. et al., J Invest Dermatol. 134 (2014)

Boulter, J. M. et al., Protein Eng 16 (2003)

Braumuller, H. et al., Nature (2013)

Brendle, A. et al., Carcinogenesis 29 (2008)

Brossart, P. et al., Blood 90 (1997)

Brown, S. G. et al., Prostate 75 (2015)

Bruckdorfer, T. et al., Curr.Pharm.Biotechnol. 5 (2004)

Calmon, M. F. et al., Neoplasia. 11 (2009)

Cao, H. H. et al., Oncotarget. (2014)

Cappello, F. et al., Curr.Pharm.Des 19 (2013)

Cappello, F. et al., Cancer Biol.Ther 7 (2008)

Cappello, F. et al., Front Biosci. (Schol.Ed) 3 (2011)

Capulli, M. et al., J Bone Miner.Res 27 (2012)

Card, K. F. et al., Cancer Immunol Immunother. 53 (2004)

Casagrande, G. et al., Haematologica 91 (2006)

Catanzaro, J. M. et al., Nat Commun. 5 (2014)

Chang, K. W. et al., Anticancer Res. 31 (2011)

Chang, K. W. et al., Hepatol.Res 36 (2006)

Chanock, S. J. et al., Hum.Immunol. 65 (2004)

Chaudhury, A. et al., Nat Cell Biol. 12 (2010)

Che, C. L. et al., Int J Clin Exp.Pathol. 6 (2013)

Chen, B. et al., Cancer Lett. 354 (2014a)

Chen, Q. et al., PLoS.One. 9 (2014b)

Chen, R. et al., Lab Invest 95 (2015)

Chen, S. et al., Cancer Epidemiol. 37 (2013a)

Chen, S. T. et al., Cancer Sci. 102 (2011)

Chen, Y. L. et al., Int J Surg. 11 (2013b)

Cheon, D. J. et al., Clin Cancer Res 20 (2014)

Cheung, H. C. et al., BMC.Genomics 9 (2008)

Choi, W. I. et al., Cell Physiol Biochem. 23 (2009)

Chow, S. N. et al., Eur.J Gynaecol.Oncol 31 (2010)

Cine, N. et al., Oncol Rep. 32 (2014)

Clement, S. et al., Virchows Arch. 442 (2003)

Cohen, C. J. et al., J Mol Recognit. 16 (2003a)

Cohen, C. J. et al., J Immunol 170 (2003b)

Cohen, S. J. et al., Pancreas 37 (2008)

Cohen, S. N. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 69 (1972)

Coligan JE et al., (1995)

Colombetti, S. et al., J Immunol. 176 (2006)

Croner, R. S. et al., Int J Cancer 135 (2014)

Csiszar, A. et al., Breast Cancer Res 16 (2014)

Cucchiarelli, V. et al., Cell Motil.Cytoskeleton 65 (2008)

Culler, M. D., Horm.Metab Res 43 (2011)

Delaval, B. et al., Nat Cell Biol. 13 (2011)

Dengjel, J. et al., Clin Cancer Res 12 (2006)

Denkberg, G. et al., J Immunol 171 (2003)

Derycke, L. et al., Int J Dev.Biol. 55 (2011)

Dhup, S. et al., Curr.Pharm.Des 18 (2012)

Draoui, N. et al., Dis.Model.Mech. 4 (2011)

Dutton-Regester, K. et al., Genes Chromosomes.Cancer 51 (2012)

Egloff, A. M. et al., Cancer Res 66 (2006)

Ellis, M. J. et al., Nature 486 (2012)

Falk, K. et al., Nature 351 (1991)

Feng, H. et al., J Clin Invest 124 (2014)

Fillmore, R. A. et al., Exp.Biol.Med. (Maywood.) 239 (2014)

Findeis-Hosey, J. J. et al., Biotech.Histochem. 87 (2012)

Fong, L. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 98 (2001)

Franz, M. et al., J Oral Pathol.Med. 39 (2010)

Fu, Y. et al., Cancer Biol.Ther 5 (2006)

Gabrilovich, D. I. et al., Nat Med. 2 (1996)

Galmarini, C. M. et al., Br.J Cancer 88 (2003)

Gamez-Pozo, A. et al., PLoS.One. 7 (2012)

Gao, H. J. et al., J Cancer Res Clin Oncol (2014a)

Gao, J. et al., PLoS.One. 9 (2014b)

Gao, Z. H. et al., Histopathology 65 (2014c)

Gardina, P. J. et al., BMC.Genomics 7 (2006)

Garg, M. et al., J Clin Endocrinol.Metab 99 (2014)

Gattinoni, L. et al., Nat Rev.Immunol 6 (2006)

Geyik, E. et al., Gene 540 (2014)

Glen, A. et al., Prostate 70 (2010)

Glymph, S. et al., Infect.Genet.Evol. 16 (2013)

Gnjatic, S. et al., Proc Natl.Acad.Sci.U.S.A 100 (2003)

Godkin, A. et al., Int.Immunol 9 (1997)

Gong, Y. et al., Adv.Anat.Pathol. 21 (2014)

Gorlov, I. P. et al., Cancer Res 67 (2007)

Green MR et al., 4th, (2012)

Greenfield EA, 2nd, (2014)

Guo, C. et al., Clin Chim.Acta 417 (2013)

Guo, C. et al., Nat Commun. 6 (2015)

Gutgemann, A. et al., Arch.Dermatol.Res 293 (2001)

Hait, W. N. et al., Trans.Am Clin Climatol.Assoc. 117 (2006)

Han, J. C. et al., World J Surg.Oncol 13 (2015)

Hao, X. et al., J Membr.Biol. 247 (2014)

He, X. et al., Neoplasma 61 (2014)

He, X. et al., Cancer Res 68 (2008)

Hoffmann, N. E. et al., Cancer 112 (2008)

Hopker, K. et al., EMBO J 31 (2012a)

Hopker, K. et al., Cell Cycle 11 (2012b)

Horibe, T. et al., Chembiochem. 15 (2014)

Horinouchi, M. et al., Pediatr.Hematol.Oncol 27 (2010)

Hu, S. et al., J Cancer Res Clin Oncol 140 (2014)

Hu, W. et al., Cell Death.Dis. 4 (2013)

Huang, H. C. et al., Technol.Cancer Res Treat. 9 (2010)

Hurst, J. H. et al., Cell Mol Biol.Lett. 14 (2009)

Hussey, G. S. et al., Mol Cell 41 (2011)

Hwang, M. L. et al., J Immunol. 179 (2007)

Hyung, S. W. et al., Mol Cell Proteomics. 10 (2011)

Ii, M. et al., Exp.Biol.Med. (Maywood.) 231 (2006)

Isfort, R. J. et al., Oncogene 15 (1997)

Ishiwata, T. et al., Oncol Rep. 18 (2007)

Izaki, T. et al., Biochem.Biophys.Res Commun. 329 (2005)

Jacob, M. et al., Curr.Mol Med. 12 (2012)

Jaeger, E. et al., Nat Genet. 44 (2012)

Jain, R. et al., Appl.Immunohistochem.Mol Morphol. 18 (2010)

Januchowski, R. et al., Biomed.Res Int 2014 (2014)

Jeda, A. et al., Ginekol.Pol. 85 (2014)

Jeng, Y. M. et al., Br.J Surg. 96 (2009)

Jeong, H. C. et al., J Proteome.Res 10 (2011)

Jones, A. et al., EMBO Mol Med. 5 (2013)

Jung, G. et al., Proc Natl Acad Sci U S A 84 (1987)

Kamino, H. et al., Cancer Genet. 204 (2011)

Kaneko, K. et al., Pancreas 24 (2002)

Kang, C. Y. et al., J Gastrointest.Surg. 18 (2014)

Kang, G. H. et al., Lab Invest 88 (2008)

Kanzawa, M. et al., Pathobiology 80 (2013)

Karagiannis, G. S. et al., Oncotarget. 3 (2012)

Kashyap, M. K. et al., Cancer Biol.Ther 8 (2009)

Kashyap, V. et al., Mol Oncol 7 (2013)

Katada, K. et al., J Proteomics. 75 (2012)

Kevans, D. et al., Int J Surg.Pathol. 19 (2011)

Khalaileh, A. et al., Cancer Res 73 (2013)

Khuon, S. et al., J Cell Sci. 123 (2010)

Kibbe AH, rd, (2000)

Kido, T. et al., Genes (Basel) 1 (2010)

Kim, M. et al., Mol Cancer Res 6 (2008)

Kim, S. W. et al., OMICS. 15 (2011)

Kirov, A. et al., J Cell Biochem. (2015)

Kojima, M. et al., PLoS.One. 9 (2014)

Koshikawa, K. et al., Oncogene 21 (2002)

Kraya, A. A. et al., Autophagy. 11 (2015)

Krieg, A. M., Nat Rev.Drug Discov. 5 (2006)

Kuramitsu, Y. et al., Anticancer Res 30 (2010)

Kuramitsu, Y. et al., Anticancer Res 31 (2011)

Kuroda, N. et al., Histol.Histopathol. 20 (2005)

Kuroda, N. et al., Pathol.Int 63 (2013)

Kwon, J. et al., Int J Oncol 43 (2013)

Lahsnig, C. et al., Oncogene 28 (2009)

Lee, C. W. et al., World J Surg.Oncol 11 (2013a)

Lee, H. W. et al., Clin Cancer Res 19 (2013b)

Lee, H. W. et al., Int J Oncol 41 (2012)

Lee, K. Y. et al., J Med. 35 (2004)

Lee, M. A. et al., BMC.Cancer 14 (2014)

Leivo, I. et al., Cancer Genet.Cytogenet. 156 (2005)

Leygue, E. et al., Cancer Res 58 (1998)

Li, G. H. et al., Bioinformatics. 30 (2014)

Li, X. et al., Clin Cancer Res 20 (2014)

Li, X. et al., PLoS.One. 8 (2013)

Li, Y. et al., Cancer Genet.Cytogenet. 198 (2010)

Liddy, N. et al., Nat Med. 18 (2012)

Lieveld, M. et al., Virchows Arch. 465 (2014)

Lim, R. et al., Biochem.Biophys.Res Commun. 406 (2011)

Lim, W. et al., J Cancer Prev. 18 (2013)

Lin, H. C. et al., J Proteome.Res 12 (2013a)

Lin, L. et al., Oncol Lett. 6 (2013b)

Linge, A. et al., Invest Ophthalmol.Vis.Sci. 53 (2012)

Liu, H. et al., Carcinogenesis 34 (2013a)

Liu, M. et al., Reprod.Sci. 20 (2013b)

Liu, X. F. et al., Apoptosis. 14 (2009)

Ljunggren, H. G. et al., J Exp.Med. 162 (1985)

Long, Z. W. et al., Tumour.Biol. 35 (2014)

Longenecker, B. M. et al., Ann N.Y.Acad.Sci. 690 (1993)

Lu, C. et al., Dig.Dis.Sci. 58 (2013a)

Lu, X. et al., Cancer Biother.Radiopharm. 28 (2013b)

Lukas, T. J. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 78 (1981)

Lund, R. R. et al., Proteomics. 12 (2012)

Lundblad RL, 3rd, (2004)

Lung, H. L. et al., Int.J Cancer 127 (2010)

Luo, Y. et al., Mol Med.Rep. 9 (2014)

Lv, T. et al., PLoS.One. 7 (2012)

Manning, T. J., Jr. et al., Cell Motil.Cytoskeleton 45 (2000)

Marg, A. et al., Biochem.Biophys.Res Commun. 401 (2010)

Matassa, D. S. et al., Cell Death.Dis. 4 (2013)

Matchett, K. B. et al., Adv.Exp.Med.Biol. 773 (2014)

Mazieres, J. et al., Oncogene 24 (2005)

McCluggage, W. G. et al., Semin.Diagn.Pathol. 22 (2005)

McIntyre, J. C. et al., Nat Med. 18 (2012)

Medjkane, S. et al., Nat Cell Biol. 11 (2009)

Meng, F. et al., Int J Oncol 43 (2013)

Menhofer, M. H. et al., PLoS.One. 9 (2014)

Mentlein, R. et al., Biol.Chem. 392 (2011)

Meziere, C. et al., J Immunol 159 (1997)

Milani, C. et al., BMC.Cancer 13 (2013)

Miyagi, T. et al., Mol Urol. 5 (2001)

Mochizuki, S. et al., Cancer Sci. 98 (2007)

Modlin, I. M. et al., Aliment.Pharmacol.Ther 31 (2010)

Morgan, R. A. et al., Science 314 (2006)

Mori, M. et al., Transplantation 64 (1997)

Mortara, L. et al., Clin Cancer Res. 12 (2006)

Mu, Y. et al., Electrophoresis 34 (2013)

Mueller, L. N. et al., J Proteome.Res 7 (2008)

Mueller, L. N. et al., Proteomics. 7 (2007)

Mumberg, D. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 96 (1999)

Mushinski, J. F. et al., J Biol.Chem. 284 (2009)

Nakamura, H. et al., Curr.Pharm.Des 19 (2013)

Nakayama, H. et al., J Clin Pathol. 55 (2002)

Nassar, Z. D. et al., Oncotarget. 4 (2013)

Niedergethmann, M. et al., Br.J Cancer 97 (2007)

Nikolova, D. N. et al., Oncol Rep. 20 (2008)

Nishioka, M. et al., Oncogene 19 (2000)

Olesen, S. H. et al., Mol Cell Proteomics. 4 (2005)

Ou, Y. et al., Urol.Oncol 32 (2014)

Pace, A. et al., Curr.Pharm.Des 19 (2013)

Pan, S. et al., OMICS. 13 (2009)

Panico, F. et al., Adv.Cancer Res 105 (2009)

Patel, R. A. et al., Cancer Res 72 (2012)

Pereira, P. M. et al., Org.Biomol.Chem. 12 (2014)

Pinheiro J et al., (2015)

Pitule, P. et al., Anticancer Res 33 (2013)

Pivonello, C. et al., Infect.Agent.Cancer 9 (2014)

Plebanski, M. et al., Eur.J Immunol 25 (1995)

Pontisso, P., Ann Hepatol. 13 (2014)

Porta, C. et al., Virology 202 (1994)

Portela-Gomes, G. M. et al., Regul.Pept. 146 (2008)

Qi, Y. et al., Proteomics. 5 (2005)

Qu, Z. et al., Cancer Med. 3 (2014)

Quinn, M. C. et al., Int J Oncol 42 (2013)

Rammensee, H. G. et al., Immunogenetics 50 (1999)

Reddy, S. P. et al., Clin Cancer Res 14 (2008)

RefSeq, The NCBI handbook [Internet], Chapter 18 (2002)

Rehman, I. et al., PLoS.One. 7 (2012)

Rini, B. I. et al., Cancer 107 (2006)

Robinson, T. J. et al., Cell Cycle 12 (2013)

Rock, K. L. et al., Science 249 (1990)

Roman-Gomez, J. et al., Blood 109 (2007)

Roustit, M. M. et al., J Endocrinol. 223 (2014)

Roy, D. et al., Blood 118 (2011)

Rucki, A. A. et al., World J Gastroenterol. 20 (2014)

S3-Leitlinie Exokrines Pankreaskarzinom, 032-010OL, (2013)

Saiki, R. K. et al., Science 239 (1988)

Salman, B. et al., Oncoimmunology. 2 (2013)

Sato, Y. et al., J Cell Sci. 126 (2013)

Savoy, R. M. et al., Endocr.Relat Cancer 20 (2013)

Schlomann, U. et al., Nat Commun. 6 (2015)

Schroder, W. A. et al., Cancer Med. 3 (2014)

Schulte, J. et al., Histochem.Cell Biol. 138 (2012)

Scrideli, C. A. et al., J Neurooncol. 88 (2008)

Seeger, F. H. et al., Immunogenetics 49 (1999)

Seya, T. et al., Oncol Rep. 16 (2006)

Sherman F et al., (1986)

Sherman-Baust, C. A. et al., Cancer Cell 3 (2003)

Simiczyjew, A. et al., Histochem.Cell Biol. 142 (2014)

Singh-Jasuja, H. et al., Cancer Immunol.Immunother. 53 (2004)

Skondra, M. et al., Anticancer Res 34 (2014)

Small, E. J. et al., J Clin Oncol. 24 (2006)

Smith, M. J. et al., Br.J Cancer 100 (2009)

Song, B. L. et al., Biochem.J 394 (2006)

Song, Q. et al., Tumour.Biol. 35 (2014)

Sood, A. K., Immunol Res 46 (2010)

Souchek, J. J. et al., Br.J Cancer 111 (2014)

Stolk, J. A. et al., Prostate 60 (2004)

Sturm, M. et al., BMC.Bioinformatics. 9 (2008)

Sun, D. W. et al., Cancer Epidemiol. (2015a)

Sun, J. et al., J Mol Histol. 46 (2015b)

Sun, Z. et al., J Proteome.Res 13 (2014)

Suzuki, H. et al., Int J Oncol 12 (1998)

Szarvas, T. et al., Int J Cancer 135 (2014)

Takahashi, K. et al., Peptides 27 (2006)

Takeuchi, A. et al., Mol Cell Endocrinol. 384 (2014)

Tatenhorst, L. et al., J Neuropathol.Exp.Neurol. 63 (2004)

Terabayashi, T. et al., PLoS.One. 7 (2012)

Terada, T. et al., J Hepatol. 24 (1996)

Teufel, R. et al., Cell Mol Life Sci. 62 (2005)

Thorsen, K. et al., Mol Cell Proteomics. 7 (2008)

Tran, E. et al., Science 344 (2014)

Trougakos, I. P., Gerontology 59 (2013)

Tummala, R. et al., Cancer Chemother.Pharmacol. 64 (2009)

Unger, K. et al., Endocr.Relat Cancer 17 (2010)

Untergasser, G. et al., Mech.Ageing Dev. 126 (2005)

Vassar, R. et al., J Neurochem. 130 (2014)

Von Hoff, D. D. et al., N.Engl.J Med. 369 (2013)

Vui-Kee, K. et al., Kaohsiung.J Med.Sci. 28 (2012)

Walker, E. J. et al., World J Gastroenterol. 20 (2014)

Walter, S. et al., J Immunol 171 (2003)

Walter, S. et al., Nat Med. 18 (2012)

Wang, G. H. et al., Oncol Lett. 5 (2013a)

Wang, H. et al., Front Oncol 4 (2014a)

Wang, J. et al., J Exp.Clin Cancer Res 34 (2015)

Wang, Q. et al., PLoS.One. 8 (2013b)

Wang, X. et al., Urol.Int. 92 (2014b)

Wang, X. Y. et al., Int J Hyperthermia 29 (2013)

Watson, M. B. et al., Acta Oncol 46 (2007)

Watt, H. L. et al., Mol Cell Endocrinol. 286 (2008)

Weber, A. M. et al., Pharmacol.Ther (2014)

Wikberg, M. L. et al., Tumour.Biol. 34 (2013)

Willcox, B. E. et al., Protein Sci. 8 (1999)

Williams, S. et al., PLoS.One. 8 (2013)

Wong, C. C. et al., Nat Genet. 46 (2014)

World Cancer Report, (2014)

Xia, Z. K. et al., Dis.Esophagus. 25 (2012)

Xie, X. et al., Oncol Lett. 7 (2014)

Xiong, D. et al., Carcinogenesis 33 (2012)

Xu, C. Z. et al., Int J Clin Exp.Pathol. 6 (2013)

Yang, C. Y. et al., J Immunol 192 (2014a)

Yang, H. et al., PLoS.One. 9 (2014b)

Yang, S. et al., Biochim.Biophys.Acta 1772 (2007)

Yasui, W. et al., Cancer Sci. 95 (2004)

Yeung, T. L. et al., Cancer Res 73 (2013)

Yu, X. et al., Cancer Res 73 (2013)

Yuan, B. et al., Immunobiology 217 (2012)

Yuan, D. et al., J Surg.Oncol 108 (2013)

Yuan, R. H. et al., Ann Surg.Oncol 16 (2009)

Zanaruddin, S. N. et al., Hum.Pathol. 44 (2013)

Zaravinos, A. et al., PLoS.One. 6 (2011)

Zaremba, S. et al., Cancer Res. 57 (1997)

Zhang, C. et al., Biochem.Biophys.Res Commun. 434 (2013)

Zhang, C. C. et al., Cancer Res 59 (1999)

Zhang, Y. et al., Zhonghua Gan Zang.Bing.Za Zhi. 14 (2006)

Zhang, Y. et al., Cancer Lett. 303 (2011)

Zhao, D. et al., J Neurooncol. 118 (2014)

Zhao, Z. K. et al., Tumour.Biol. 34 (2013)

Zhu, H. H. et al., Asian Pac.J Trop.Med. 7 (2014)

Zocchi, M. R. et al., Blood 119 (2012)

Zou, T. T. et al., Oncogene 21 (2002)

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Peptit được phân lập chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No. 21, hoặc muối dược dụng của nó, trong đó peptit này có khả năng gắn kết với phân tử của phức hợp tương thích mô chính (major histocompatibility complex: MHC) nhóm I, và trong đó khi được gắn kết với MHC, peptit này có khả năng được nhận biết bởi các tế bào T CD8.

2. Peptit theo điểm 1, trong đó peptit này bao gồm các liên kết không peptit.

3. Peptit theo điểm 1 hoặc 2, trong đó peptit này là một phần của protein dung hợp chứa các axit amin ở đầu tận cùng N của chuỗi bất biến liên quan đến kháng nguyên HLA-DR (Ii).

4. Kháng thể được phân lập, hòa tan hoặc liên kết màng, trong đó kháng thể này nhận biết đặc hiệu peptit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, tốt hơn nếu là peptit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3 khi được gắn kết với phân tử của MHC.

5. Thụ thể tế bào T được phân lập, hòa tan hoặc liên kết màng, có khả năng phản ứng với phối tử HLA, tùy ý trong đó phối tử này là một phần của phức hợp peptit-MHC, và trong đó phối tử này chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No. 21.

6. Thụ thể tế bào T theo điểm 5, trong đó thụ thể tế bào T này được tạo ra dưới dạng phân tử hòa tan và tùy ý mang chức năng hiệu ứng khác như miền kích thích miễn dịch hoặc độc tố.

7. Axit nucleic được phân lập mã hóa peptit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, hoặc thụ thể tế bào T theo điểm 5 hoặc điểm 6, trong đó axit nucleic này được liên kết với trình tự gen khởi đầu khác loại.

8. Vectơ biểu hiện biểu hiện axit nucleic theo điểm 7.

9. Tế bào chủ tái tổ hợp chứa peptit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, axit nucleic theo điểm 7 hoặc vectơ biểu hiện theo điểm 8, trong đó tốt hơn nếu tế bào chủ này là tế bào trình diện kháng nguyên như tế bào đuôi gai, hoặc là tế bào T hoặc tế bào NK.

10. Phương pháp tạo ra peptit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ theo điểm 9 chứa peptit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, hoặc biểu hiện axit nucleic theo điểm 7 hoặc vectơ biểu hiện theo điểm 8, và phân lập peptit ra khỏi tế bào chủ nêu trên và/hoặc môi trường nuôi cấy của nó.

11. Phương pháp tạo ra thụ thể tế bào T theo điểm 5 hoặc điểm 6, trong đó phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ theo điểm 9 chứa peptit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, hoặc biểu hiện axit nucleic theo điểm 7 hoặc vectơ biểu hiện theo điểm 8, và phân lập thụ thể tế bào T ra khỏi tế bào chủ nêu trên và/hoặc môi trường nuôi cấy của nó.

12. 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 bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3.

13. Tế bào lymphô T hoạt hóa được tạo ra bằng phương pháp theo điểm 12, trong đó tế bào này nhận biết chọn lọc tế bào chứa polypeptit có trình tự axit amin được nêu trong điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3.

14. Kit bao gồm:

(a) đồ chứa để đựng dược phẩm chứa ít nhất một hoạt chất được chọn từ nhóm

bao gồm peptit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, kháng thể theo điểm 4, thụ thể tế bào T theo điểm 5 hoặc điểm 6, axit nucleic theo điểm 7, vectơ biểu hiện theo điểm 8, tế bào theo điểm 9, hoặc tế bào lymphô T hoạt hóa theo điểm 13, ở dạng dung dịch hoặc dạng đông khô nhanh;

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

(c) tùy ý, ít nhất một peptit nữa được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự từ SEQ ID No. 1 đến 20 và từ SEQ ID No. 22 đến SEQ ID No. 87, và

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

15. Kit theo điểm 14, trong đó kit này còn chứa một hoặc nhiều thành phần trong số (iii) chất đệm, (iv) chất pha loãng, (v) dụng cụ lọc, (vi) kim tiêm, hoặc (vii) bơm tiêm.

16. Dược phẩm chứa ít nhất một hoạt chất được chọn từ nhóm bao gồm

a) peptit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3;

b) thụ thể tế bào T được phân lập có khả năng phản ứng với peptit và/hoặc phức hợp peptit-MHC theo mục a);

c) protein dung hợp chứa peptit theo mục a), và các axit amin từ 1 đến 80 ở đầu tận cùng N của chuỗi bất biến liên quan đến kháng nguyên HLA-DR (Ii);

d) axit nucleic được phân lập mã hóa thành phần theo mục bất kỳ trong số các mục từ a) đến c) hoặc vectơ biểu hiện chứa axit nucleic nêu trên,

e) tế bào chủ tái tổ hợp chứa vectơ biểu hiện nêu trong mục d),

f) tế bào lymphô T hoạt hóa, thu được bằng phương pháp bao gồm bước cho tế bào T tiếp xúc *in vitro* với peptit theo mục a) 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 này theo cách đặc hiệu kháng nguyên,;

g) kháng thể được phân lập, hoặc thụ thể tế bào T hòa tan được phân lập, có khả năng phản ứng với peptit và/hoặc phức hợp peptit - MHC theo mục a) và/hoặc tế bào chứa peptit theo mục a), và có khả năng được cải biến bằng cách dung hợp với, ví dụ, miền hoạt hóa miễn dịch hoặc độc tố,

h) aptame nhận biết peptit theo mục a) và/hoặc phức hợp của peptit theo mục a) với phân tử MHC, và

i) peptit hoặc khung được liên hợp hoặc đánh dấu theo mục bất kỳ trong số các mục từ a) đến h) và chất mang dược dụng, và tùy ý, tá dược và/hoặc chất ổn định dược dụng.

Fig.1A

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

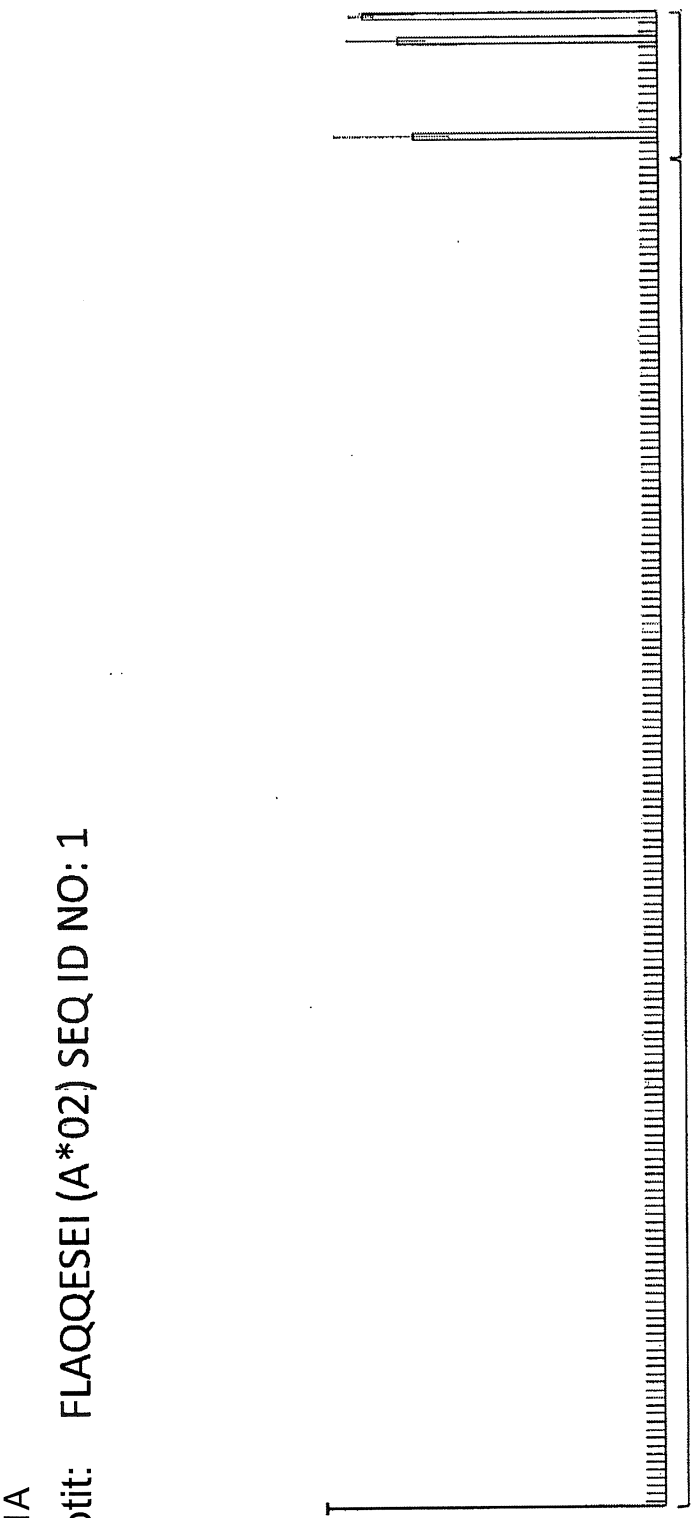


Fig.1B
Peptit: SLQEEHVAVA (A*02) SEQ ID NO: 2

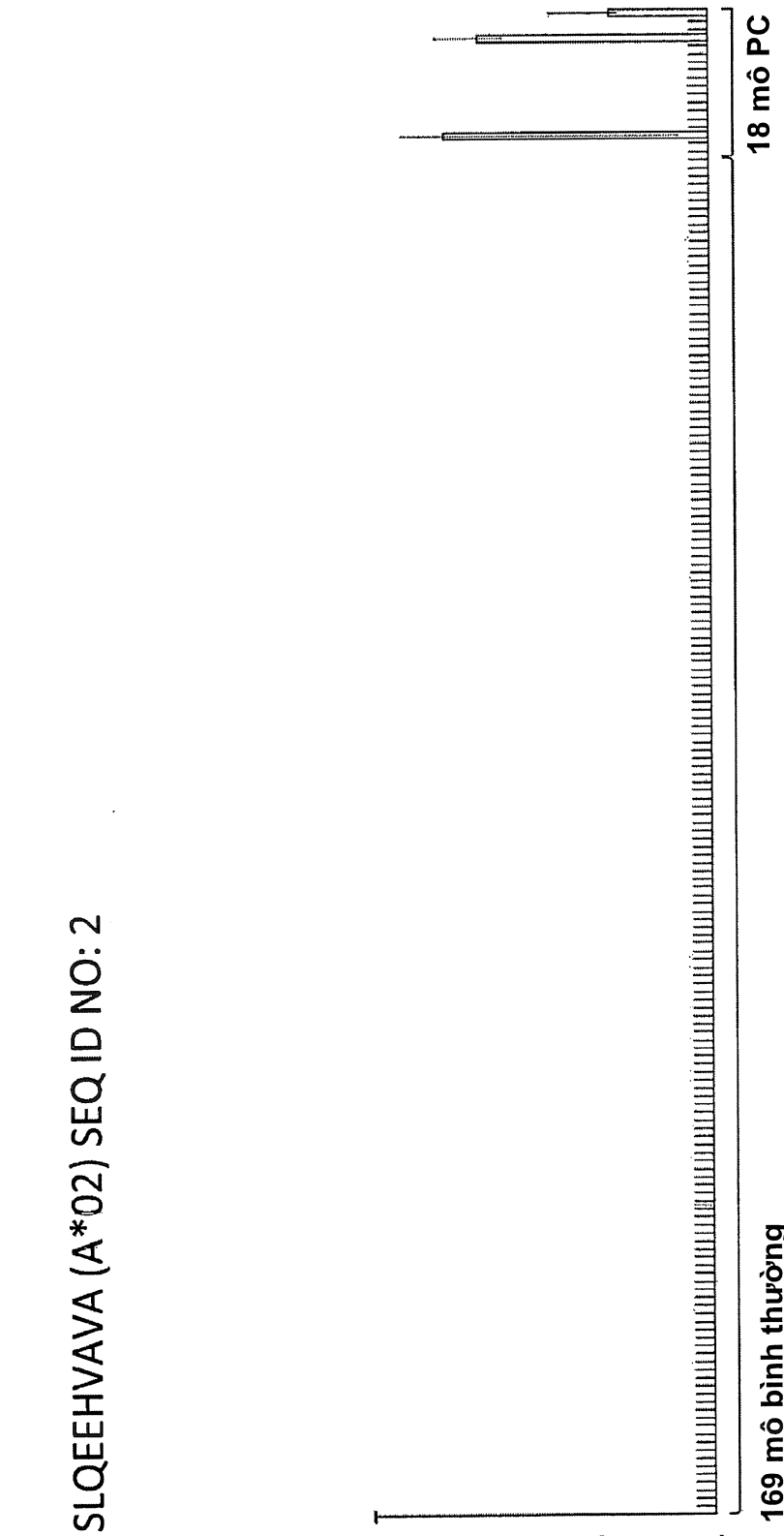


Fig.1C

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

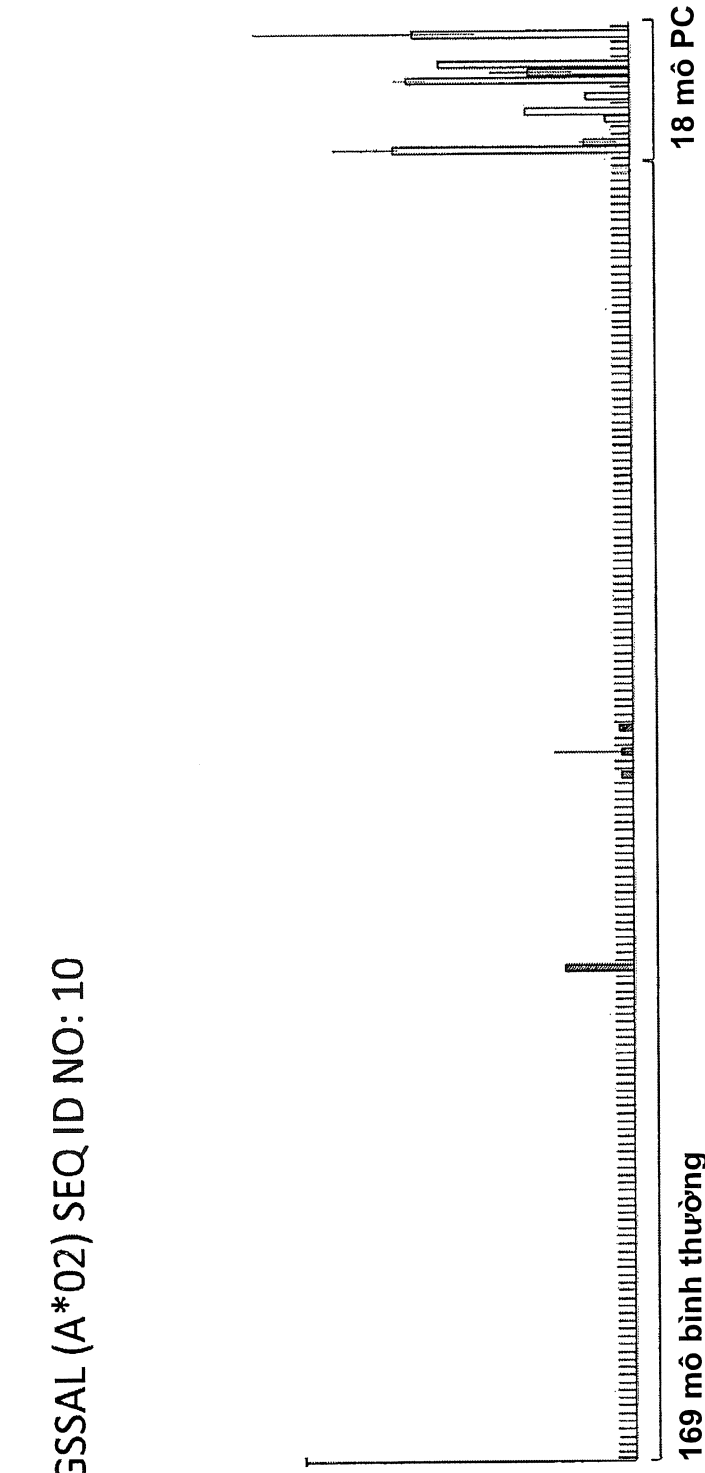
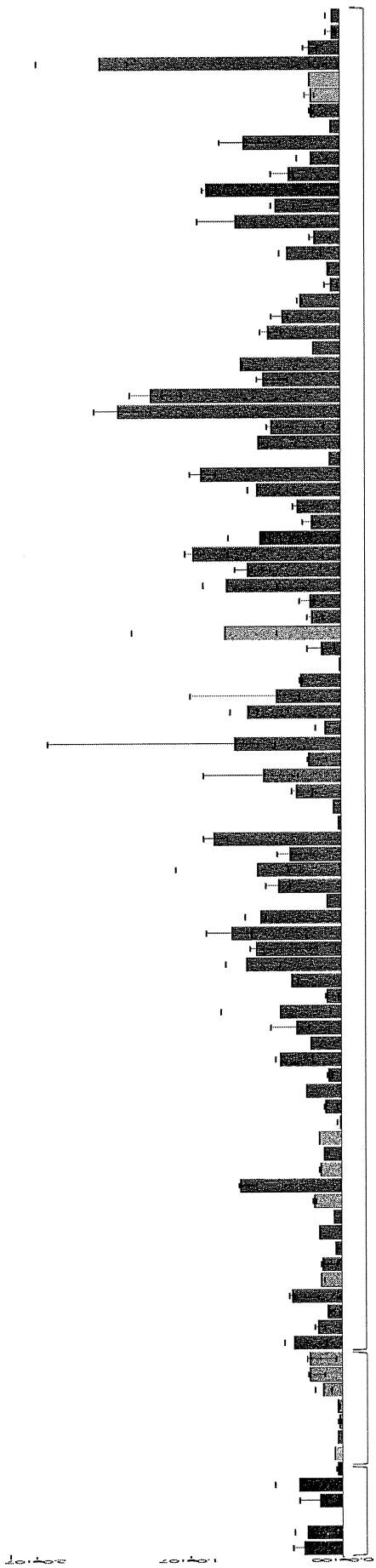


Fig.1D
Peptit: FLFDGSANLV (A*02) SEQ ID NO: 9

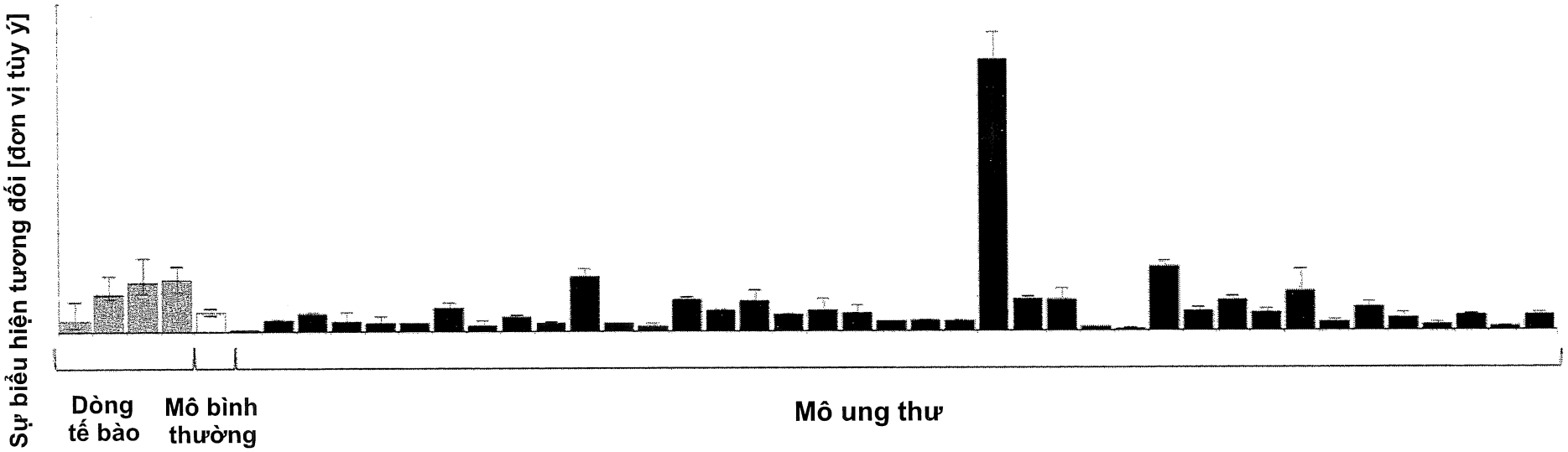


Các pepti được phát hiện trên
5 dòng tế bào ung thư tụy, 7 mô bình thường (1 ruột kết, 6 phổi), 85 mô bệnh ung thư (2 bệnh ung thư vú, 6 bệnh ung thư ruột kết, 4 bệnh ung thư thực quản, 3 bệnh ung thư gan, 56 bệnh ung thư phổi, 5 bệnh ung thư tụy, 3 bệnh ung thư trực tràng, 1 u melanin, 5 bệnh ung thư dạ dày) (từ trái sáng phải)

Fig.1E

Peptit: SVDVSPPKV (A*02)

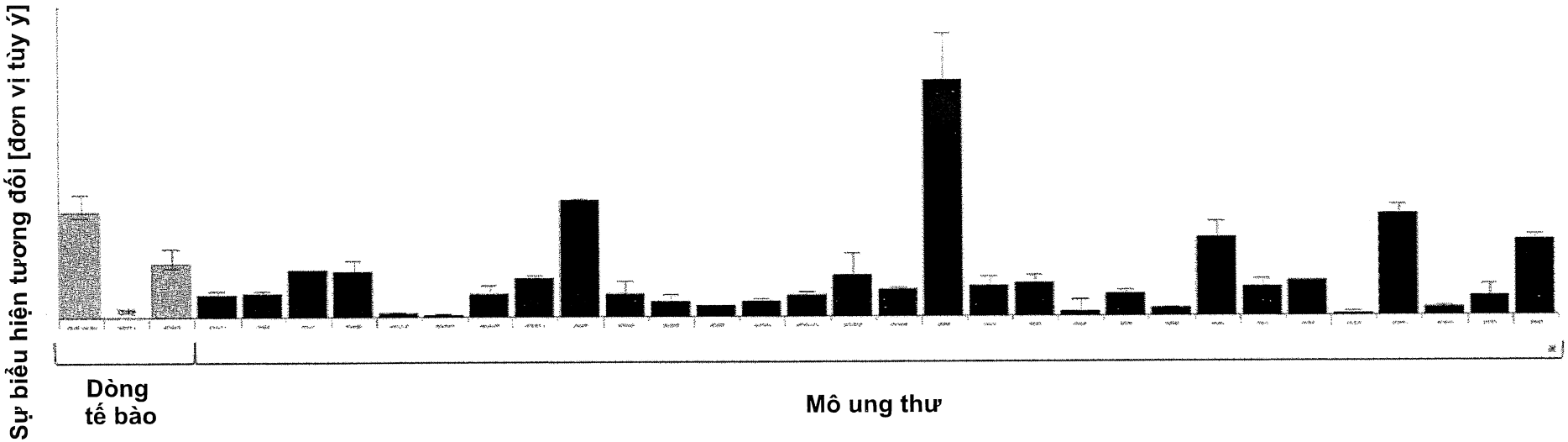
SEQ ID NO: 4



Peptit được phát hiện trên
1 dòng tế bào, 3 môi trường nuôi cấy sơ cấp, 1 da, 1 bệnh ung thư ống mật chủ, 3 bệnh ung thư não, 1 bệnh ung thư vú, 4 bệnh ung thư thực quản, 5 bệnh ung thư thận, 11 bệnh ung thư phổi, 1 bệnh ung thư hạch bạch huyết, 1 bệnh ung thư buồng trứng, 3 bệnh ung thư tụy, 1 bệnh ung thư tuyến tiền liệt, 3 bệnh ung thư da, 2 bệnh ung thư bàng quang, 3 bệnh ung thư tử cung (từ trái sang phải)

Fig.1F

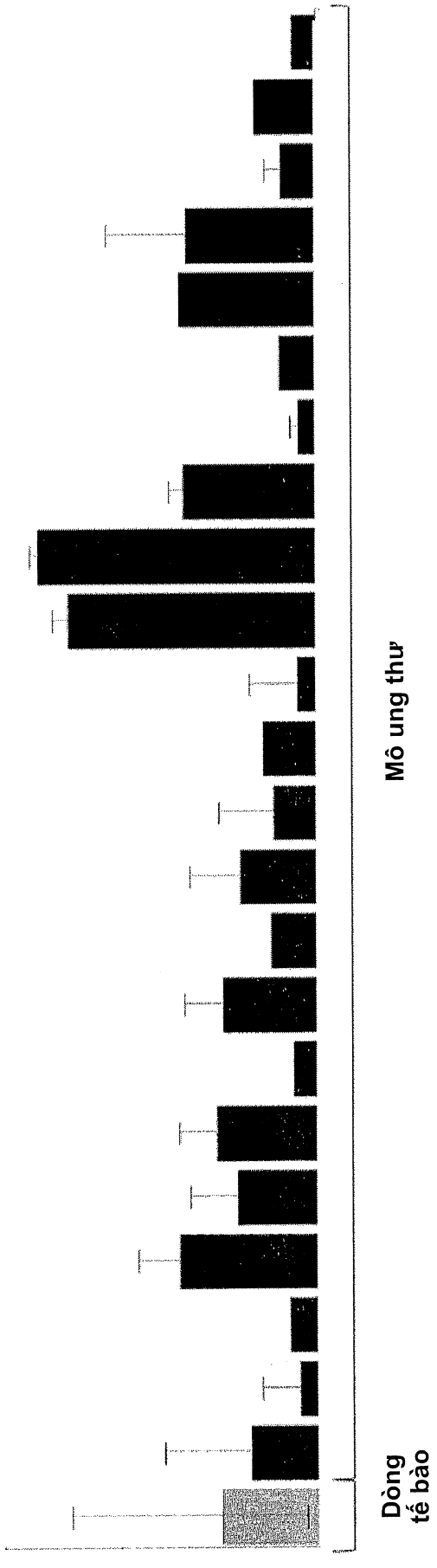
Peptit: LLVDDSFLHTV (A*02)
SEQ ID NO: 5



Peptit được phát hiện trên
2 dòng tế bào, 1 môi trường nuôi cấy sơ cấp, 1 bệnh ung thư ống mật chủ, 2 bệnh ung thư não, 1 bệnh ung thư vú, 3 bệnh ung thư thực quản, 2 bệnh ung thư túi mật, 2 bệnh ung thư thận, 2 bệnh ung thư gan, 3 bệnh ung thư phổi, 7 bệnh ung thư buồng trứng, 2 bệnh ung thư tụy, 3 bệnh ung thư da, 1 bệnh ung thư dạ dày, 1 bệnh ung thư tử cung (từ trái sang phải)

Fig.1G

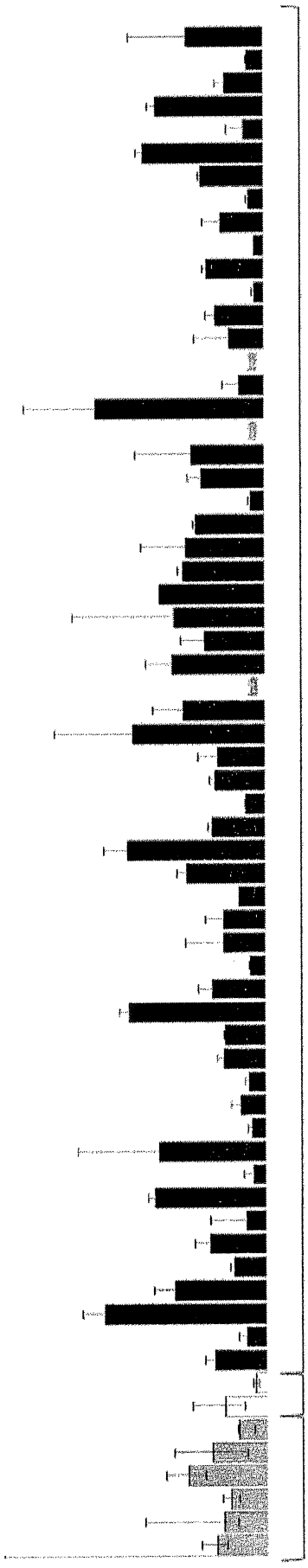
Peptit: VDDLTINL (A*02)
SEQ ID NO: 8



Peptit được phát hiện trên
1 dòng tế bào, 1 bệnh ung thư ruột kết, 2 bệnh ung thư thực quản, 2 bệnh ung thư túi mật, 5 bệnh ung thư phổi, 1 bệnh ung thư hạch bạch huyết, 1 bệnh ung thư tụy, 2 bệnh ung thư da, 4 bệnh ung thư dạ dày, 1 bệnh ung thư bàng quang, 4 bệnh ung thư tử cung (từ trái sang phải)

Fig.1H

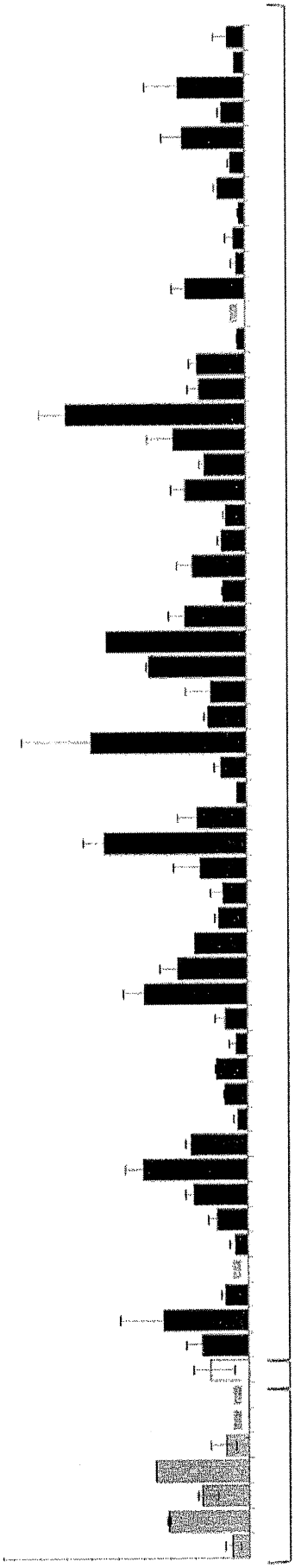
Peptit: LLAGQTYHV (A*02)
SEQ ID NO: 13



Peptit được phát hiện trên
6 dòng tế bào, 1 phổi, 1 nhau thai, 2 bệnh ung thư ống mật chủ, 3 bệnh ung thư vú, 2 bệnh ung thư ruột kết, 2 bệnh ung thư thực quản, 2 bệnh ung thư túi mật, 1 bệnh ung thư gan, 36 bệnh ung thư phổi, 3 bệnh ung thư buồng trứng, 3 bệnh ung thư tụy, 1 bệnh ung thư trực tràng, 3 bệnh ung thư bàng quang (từ trái sang phải)

Fig.1I

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



Peptit được phát hiện trên
7 dòng tế bào, 1 phổi, 1 bệnh ung thư ống mật chủ, 4 bệnh ung thư vú, 1 bệnh ung thư ruột kết, 2 bệnh ung thư thực quản,
1 bệnh ung thư túi mật, 36 bệnh ung thư phổi, 1 bệnh ung thư buồng trứng, 3 bệnh ung thư tụy, 2 bệnh ung thư trực tràng,
1 bệnh ung thư dạ dày, 1 bệnh ung thư bàng quang (từ trái sang phải)

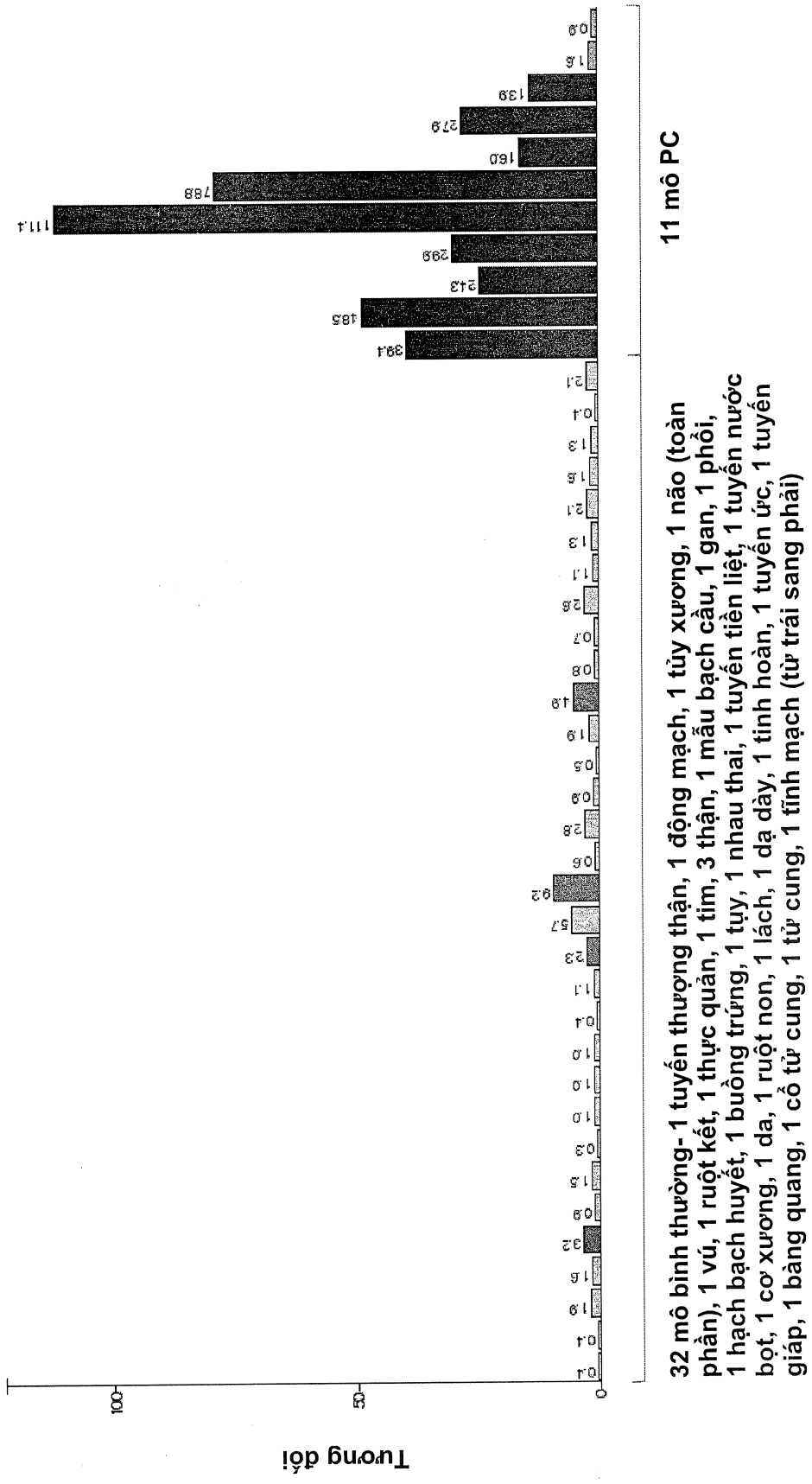


Fig.2A Gen LAM2

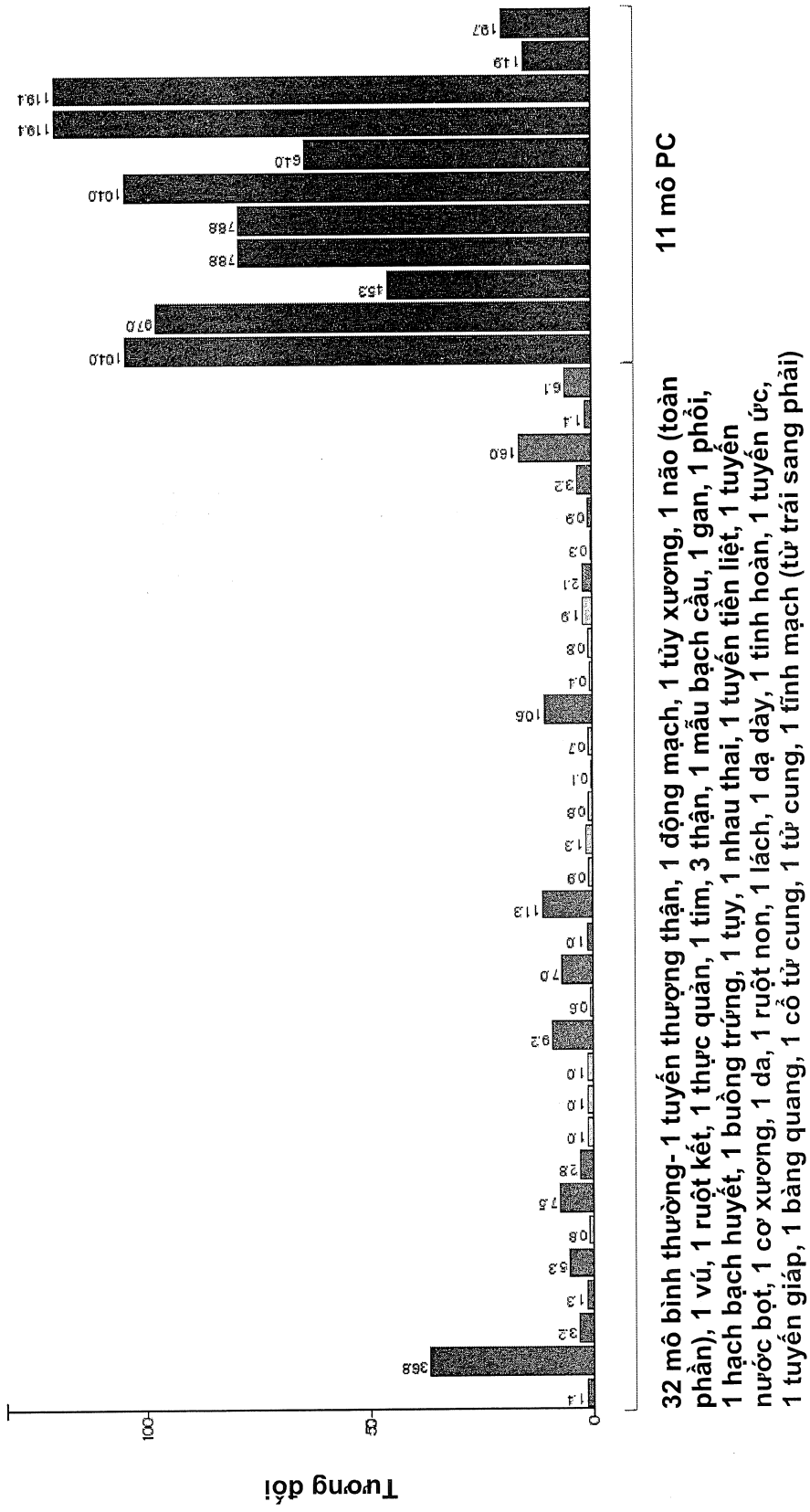


Fig.2B Gen VCAN

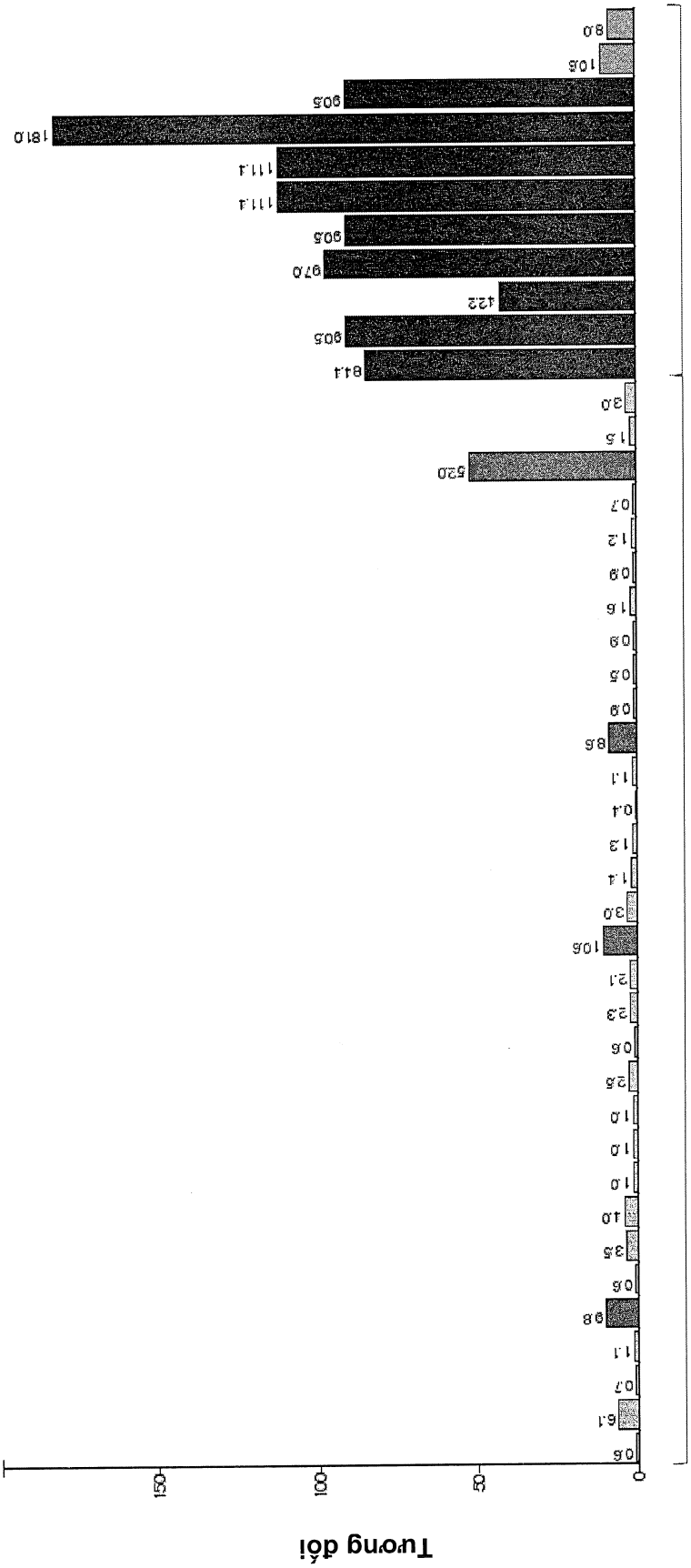
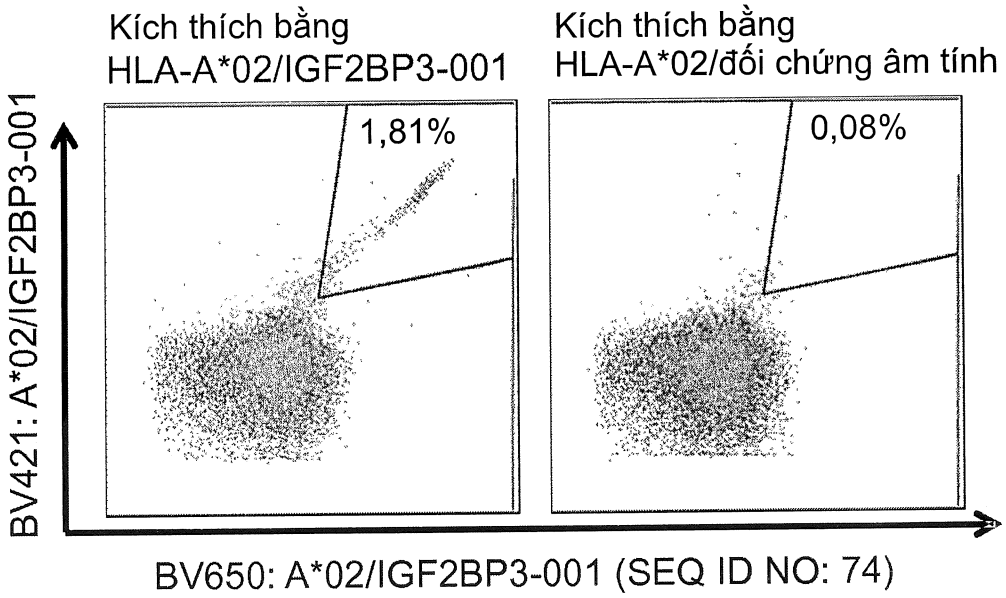


Fig.2C Gen FAP

Fig.3

A


Kích thích bằng
HLA-A*02/IGF2BP3-001
Kích thích bằng
HLA-A*02/đối chứng âm tính
1,81%
0,08%
BV421: A*02/IGF2BP3-001
BV650: A*02/IGF2BP3-001 (SEQ ID NO: 74)

B

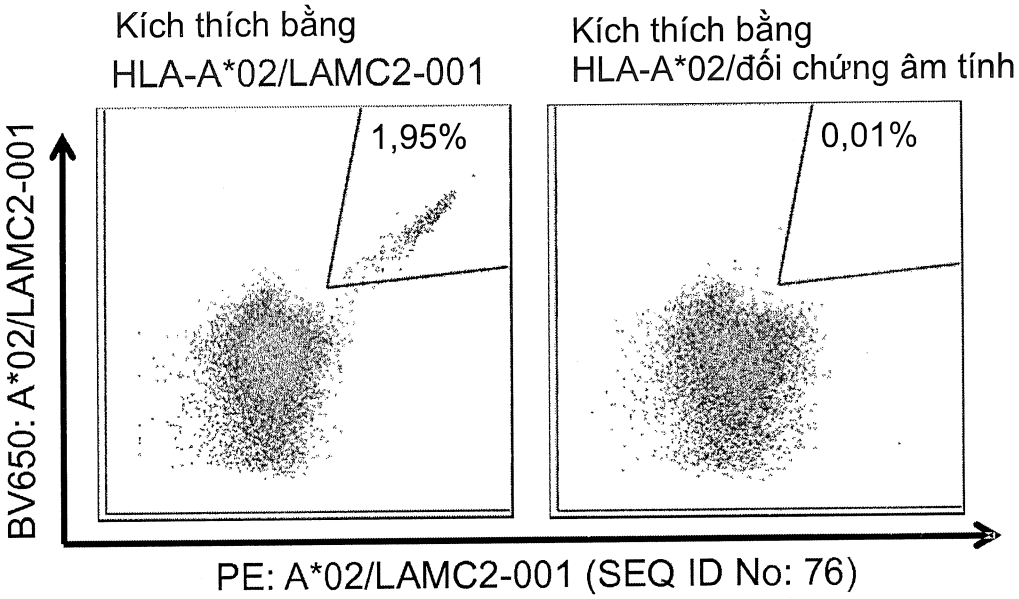
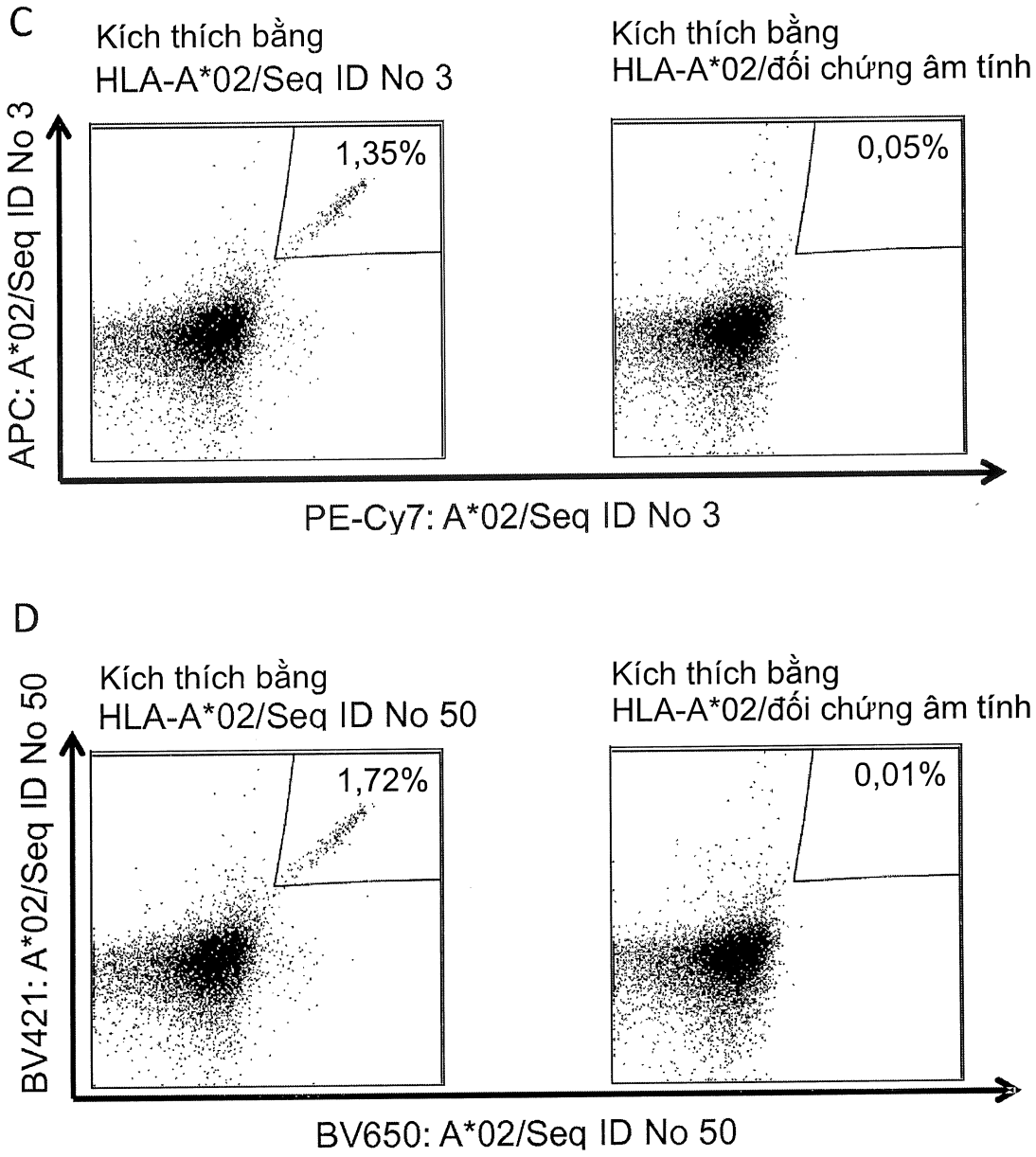

Kích thích bằng
HLA-A*02/LAMC2-001
Kích thích bằng
HLA-A*02/đối chứng âm tính
1,95%
0,01%
BV650: A*02/LAMC2-001
PE: A*02/LAMC2-001 (SEQ ID No: 76)

Fig.3 (tiếp tục)



DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Immatics biotechnologies GmbH

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

<130> I32744WO

<150> GB 1504502.4
<151> 2015-03-17

<150> US 62/134,253
<151> 2015-03-17

<160> 89

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 9
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 1

Phe Leu Ala Gln Gln Glu Ser Glu Ile
1 5

<210> 2
<211> 10
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 2

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

<210> 3
<211> 9
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 3

Ala Leu Leu Thr Phe Met Glu Gln Val
1 5

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

<400> 4

Ser Val Asp Val Ser Pro Pro Lys Val
1 5

<210> 5
<211> 11
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 5

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

<210> 6
<211> 11
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 6

Val Leu Ile Ser Leu Lys Gln Ala Pro Leu Val
1 5 10

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

<400> 7

Ala Gln Gln Glu Ser Glu Ile Ala Gly Ile
1 5 10

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

<400> 8

Ile Val Asp Asp Leu Thr Ile Asn Leu
1 5

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

<400> 9

Phe Leu Phe Asp Gly Ser Ala Asn Leu Val
1 5 10

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

<400> 10

Phe Leu Val Asp Gly Ser Ser Ala Leu
1 5

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

<400> 11

Phe Leu Tyr Lys Ile Ile Asp Glu Leu
1 5

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

<400> 12

Phe Val Ser Glu Ile Val Asp Thr Val
1 5

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

<400> 13

Leu Leu Ala Gly Gln Thr Tyr His Val
1 5

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

<400> 14

Val Leu Ala Lys Pro Gly Val Ile Ser Val
1 5 10

<210> 15
<211> 9
<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 15

Ser Leu Ala Asn Asn Val Thr Ser Val
1 5

<210> 16
<211> 12
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 16

Ala Pro Val Asn Val Thr Thr Glu Val Lys Ser Val
1 5 10

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

<400> 17

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

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

<400> 18

Ser Leu Leu Asp Asp Glu Leu Met Ser Leu
1 5 10

<210> 19
<211> 11
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 19

His Leu Ala Pro Glu Thr Asp Glu Asp Asp Leu
1 5 10

<210> 20
<211> 10
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 20

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

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

<400> 21

His Leu Met Asp Gln Pro Leu Ser Val
1 5

<210> 22
<211> 10
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 22

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

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

<400> 23

Ser Leu Ser Ala Phe Thr Leu Phe Leu
1 5

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

<400> 24

Gly Leu Leu Glu Glu Leu Val Thr Val
1 5

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

<400> 25

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

<210> 26
<211> 12
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 26

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

<210> 27
<211> 10
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 27

Tyr Leu Gln Gly Gln Arg Leu Asp Asn Val
1 5 10

<210> 28
<211> 11
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 28

Tyr Leu Gln Gly Gln Arg Leu Asp Asn Val Val
1 5 10

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

<400> 29

Phe Leu Gln Glu Tyr Leu Asp Ala Ile
1 5

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

<400> 30

Val Val Asp Glu Gly Pro Thr Gly Val
1 5

<210> 31
<211> 11
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 31

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

<210> 32
<211> 12
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 32

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

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

<400> 33

Ser Leu Asp Ser Arg Leu Glu Leu Ala
1 5

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

<400> 34

Met Leu Met Pro Val His Phe Leu Leu
1 5

<210> 35
<211> 12
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 35

Val Met Asp Ser Gly Asp Gly Val Thr His Thr Val
1 5 10

<210> 36
<211> 13
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 36

Lys Gln Glu Tyr Asp Glu Ser Gly Pro Ser Ile Val His

1 5 10

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

<400> 37

Gly Leu Leu Lys Lys Ile Asn Ser Val
1 5

<210> 38
<211> 10
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 38

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

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

<400> 39

Thr Leu Leu Ser Asn Leu Glu Glu Ala
1 5

<210> 40
<211> 11
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 40

Phe Ile Leu Asp Ser Ala Glu Thr Thr Thr Leu
1 5 10

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

<400> 41

Phe Leu Leu Asp Gly Ser Glu Gly Val
1 5

<210> 42

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

<400> 42

Lys Leu Val Asp Lys Ser Thr Glu Leu
1 5

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

<400> 43

Arg Leu Asp Gln Arg Val Pro Gln Ile
1 5

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

<400> 44

Val Leu Leu Asp Lys Ile Lys Asn Leu Gln Val
1 5 10

<210> 45
<211> 8
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 45

Val Ala Asp Lys Ile His Ser Val
1 5

<210> 46
<211> 14
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 46

Thr Phe Ala Pro Val Asn Val Thr Thr Glu Val Lys Ser Val
1 5 10

<210> 47
<211> 11
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 47

Lys Met Asp Ala Ser Leu Gly Asn Leu Phe Ala
1 5 10

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

<400> 48

Ala Leu Thr Gln Thr Gly Gly Pro His Val
1 5 10

<210> 49
<211> 9
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 49

Asn Leu Lys Gly Thr Phe Ala Thr Leu
1 5

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

<400> 50

Ala Leu Ala Ala Ile Leu Thr Arg Leu
1 5

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

<400> 51

Ala Leu Met Leu Gln Gly Val Asp Leu
1 5

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

<400> 52

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

<210> 53
<211> 11
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 53

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

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

<400> 54

Val Leu Leu Ser Glu Ile Glu Val Ala
1 5

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

<400> 55

Tyr Leu Asp Ala Met Met Asn Glu Ala
1 5

<210> 56
<211> 13
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 56

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

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

<400> 57

Phe Leu Gly Lys Val Val Ile Asp Val
1 5

<210> 58
<211> 9

<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 58

Gly Leu Ala Ala Phe Lys Ala Phe Leu
1 5

<210> 59
<211> 11
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 59

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

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

<400> 60

Tyr Leu Glu Glu Asp Val Tyr Gln Leu
1 5

<210> 61
<211> 11
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 61

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

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

<400> 62

Ala Leu Glu Lys Asp Tyr Glu Glu Val
1 5

<210> 63
<211> 8
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 63

Phe Ala Gly Asp Asp Ala Pro Arg
1 5

<210> 64
<211> 11
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 64

Phe Leu Val Ser Asn Met Leu Leu Ala Glu Ala
1 5 10

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

<400> 65

Tyr Leu Tyr Asp Ser Glu Thr Lys Asn Ala
1 5 10

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

<400> 66

Ala Leu Leu Ser Gly Leu Arg Glu Ala
1 5

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

<400> 67

Lys Met Phe Phe Leu Ile Asp Lys Val
1 5

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

<400> 68

Lys Leu Leu Thr Glu Val His Ala Ala
1 5

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

<400> 69

Val Met Ala Pro Phe Thr Met Thr Ile
1 5

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

<400> 70

Phe Leu Val Asp Gly Ser Trp Ser Val
1 5

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

<400> 71

Phe Leu Leu Asp Gly Ser Ala Asn Val
1 5

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

<400> 72

Tyr Val Tyr Gln Asn Asn Ile Tyr Leu
1 5

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

<400> 73

Thr Leu Val Ala Ile Val Val Gly Val
1 5

<210> 74
<211> 9
<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 74

Lys Ile Gln Glu Ile Leu Thr Gln Val
1 5

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

<400> 75

Arg Leu Asp Asp Leu Lys Met Thr Val
1 5

<210> 76
<211> 9
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 76

Arg Leu Leu Asp Ser Val Ser Arg Leu
1 5

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

<400> 77

Gly Leu Thr Asp Asn Ile His Leu Val
1 5

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

<400> 78

Thr Leu Ser Ser Ile Lys Val Glu Val
1 5

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

<400> 79

Val Leu Ala Pro Arg Val Leu Arg Ala
1 5

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

<400> 80

Thr Leu Tyr Pro His Thr Ser Gln Val
1 5

<210> 81
<211> 9
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 81

Ala Met Ser Ser Lys Phe Phe Leu Val
1 5

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

<400> 82

Ser Ile Ser Asp Val Ile Ala Gln Val
1 5

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

<400> 83

Phe Leu Ile Asp Ser Ser Glu Gly Val
1 5

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

<400> 84

Asn Leu Leu Asp Leu Asp Tyr Glu Leu
1 5

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

<400> 85

Thr Val Ala Glu Val Ile Gln Ser Val
1 5

<210> 86
<211> 11
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 86

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

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

<400> 87

Leu Leu Leu Gly Ser Pro Ala Ala Ala
1 5

<210> 88
<211> 10
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 88

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

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

<400> 89

Tyr Leu Leu Pro Ala Ile Val His Ile
1 5