



(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)



1-0043156

(51)^{2020.01} C07K 7/06; A61K 38/08; C07K 14/47

(13) B

(21) 1-2020-04906

(22) 08/02/2019

(86) PCT/EP2019/053168 08/02/2019

(87) WO2019/162110 29/08/2019

(30) 10 2018 103 944.1 21/02/2018 DE; 62/633,325 21/02/2018 US; 10 2018 107 224.4
27/03/2018 DE

(45) 25/02/2025 443

(43) 25/12/2020 393

(73) IMMATICS BIOTECHNOLOGIES GMBH (DE)

Paul-Ehrlich-Strasse 15, 72076 Tuebingen, Germany

(72) SCHUSTER, Heiko (DE); HOFFGAARD, Franziska (DE); FRITSCH, Jens (DE);
SCHOOR, Oliver (DE); WEINSCHENK, Toni (DE); KOWALEWSKI, Daniel (DE);
TSOU, Chih-Chiang (US).

(74) Công ty TNHH dịch vụ sở hữu trí tuệ DREWMARKS (DREWMARKS CO.,LTD.)

(54) PEPTIT ĐƯỢC NHẬN DẠNG BỞI TẾ BÀO T, PHƯƠNG PHÁP TẠO RA PEPTIT
VÀ KIT CHỨA PEPTIT NÀY

(21) 1-2020-04906

(57) Sáng chế đề cập đến peptit và kết hợp của peptit có nguồn gốc không chính tắc, phương pháp tạo ra peptit và kết hợp của peptit có nguồn gốc không chính tắc và chế phẩm dược phẩm để sử dụng trong liệu pháp miễn dịch chống lại các loại ung thư khác nhau. Cụ thể, sáng chế đề cập đến liệu pháp miễn dịch ung thư. Sáng chế còn đề cập đến các quyết định kháng nguyên (epitope) peptit tế bào T liên quan đến khối u, một mình hoặc kết hợp với các peptit liên quan đến khối u khác, ví dụ như có thể đóng vai trò là thành phần dược phẩm có hoạt tính của các chế phẩm vắc xin kích thích đáp ứng miễn dịch chống khối u hoặc kích thích tế bào T bên ngoài cơ thể sống (*ex-vivo*) và chuyển vào bệnh nhân. Các peptit liên kết với các phân tử của phức hợp tương hợp mô chính (major histocompatibility complex-MHC), hoặc peptit này, cũng có thể là đích của kháng thể, thụ thể tế bào T hòa tan được và các phân tử liên kết khác.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến peptit, protein, axit nucleic và tế bào để sử dụng trong các phương pháp trị liệu miễn dịch. Cụ thể, sáng chế đề cập đến liệu pháp miễn dịch ung thư. Sáng chế còn đề cập đến các quyết định kháng nguyên (epitope) peptit tế bào T liên quan đến khối u, một mình hoặc kết hợp với các peptit liên quan đến khối u khác, ví dụ như có thể đóng vai trò là thành phần được phẩm hoạt động của các chế phẩm vắc xin kích thích đáp ứng miễn dịch chống khối u hoặc kích thích tế bào T bên ngoài cơ thể sống (*ex-vivo*) và chuyển vào bệnh nhân. Các peptit liên kết với các phân tử của phức hợp tương hợp mô chính (major histocompatibility complex-MHC), hoặc peptit này, cũng có thể là đích của kháng thể, thụ thể tế bào T hòa tan được và các phân tử liên 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 người (human leukocyte-antigens – HLA) lớp I của tế bào khối u của người có thể được sử dụng trong các chế phẩm vắc xin để khơi gợi đáp ứng miễn dịch chống khối u, hoặc là mục tiêu để phát triển các hợp chất hoạt động miễn dịch/được phẩm và tế bào.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Theo Tổ chức Y tế Thế giới (WHO), ung thư nằm trong số bốn căn bệnh chết người không lây nhiễm chính trên toàn thế giới vào năm 2012. Trong cùng năm đó, ung thư đại trực tràng, ung thư vú và ung thư đường hô hấp đã được liệt kê trong số 10 nguyên nhân gây tử vong hàng đầu ở các nước thu nhập cao.

GBM là bệnh ác tính hệ thần kinh trung ương phổ biến nhất với tỷ lệ mắc bệnh được điều chỉnh theo tuổi là 3,19 trên 100.000 dân ở Hoa Kỳ. GBM có tiên lượng rất xấu với tỷ lệ sống sau 1 năm là 35% và tỷ lệ sống 5 năm thấp hơn 5%. Giới tính nam, tuổi già và sắc tộc dường như là những yếu tố rủi ro đối với GBM (Thakkar và cộng sự, 2014).

CLL là bệnh bạch cầu phổ biến nhất trong thế giới phương Tây, nơi chiếm khoảng một phần ba tổng số bệnh bạch cầu. Tỷ lệ mắc bệnh tương tự ở Mỹ và châu Âu, và ước tính các trường hợp mới là khoảng 16000 mỗi năm. CLL phổ biến hơn ở người da trắng so với người châu Phi, hiếm hơn ở người gốc Tây Ban Nha và người Mỹ bản địa và hiếm khi ở người châu Á. Ở những người gốc châu Á, tỷ lệ mắc CLL thấp hơn 3 lần so với người da trắng (Gunawardana và cộng sự, 2008). Tỷ lệ sống sót sau năm năm đối với bệnh nhân mắc CLL là khoảng 79%.

Bệnh bạch cầu dòng tủy cấp tính (acute myeloid leukemia-AML) là loại bệnh bạch cầu phổ biến thứ hai được chẩn đoán ở cả người lớn và trẻ em. Ước tính các trường hợp mới ở Hoa Kỳ là khoảng 21000 mỗi năm. Tỷ lệ sống sót sau năm năm của những người mắc AML là khoảng 25%.

Ung thư phổi là loại ung thư phổ biến nhất trên toàn thế giới và là nguyên nhân hàng đầu gây tử vong do ung thư ở nhiều quốc gia. Ung thư phổi được phân chia thành ung thư phổi tế bào nhỏ và ung thư phổi không phải tế bào nhỏ. NSCLC bao gồm các loại ung thư biểu mô tuyến, ung thư biểu mô tế bào vảy và ung thư biểu mô tế bào lớn và chiếm 85% trong tất cả các loại ung thư phổi ở Hoa Kỳ. Tỷ lệ mắc NSCLC có liên quan chặt chẽ với tỷ lệ hút thuốc, bao gồm cả những người hút thuốc hiện tại và từng hút thuốc và tỷ lệ sống sót sau năm năm được báo cáo là 15% (World Cancer Report, 2014; Molina et al., 2008).

Xem xét các tác dụng phụ nghiêm trọng và chi phí liên quan đến điều trị ung thư, cần xác định các yếu tố có thể được sử dụng trong điều trị ung thư nói chung và cụ thể là bệnh bạch cầu dòng tủy cấp tính (acute myeloid leukemia-AML), ung thư vú (breast cancer-BRCA), ung thư biểu mô tế bào đường mật (cholangiocellular carcinoma-CCC), bệnh bạch cầu lympho bào mạn tính (chronic lymphocytic leukemia-CLL), ung thư đại trực tràng (colorectal cancer-CRC), ung thư túi mật (gallbladder cancer-GBC), ung thư dạ dày (gastric cancer-GC), ung thư dạ dày thực quản (gastro-esothực khuẩn thêal junction cancer-GEJC), ung thư biểu mô tế bào gan (hepatocellular carcinoma-HCC), ung thư biểu mô tế bào vảy vùng đầu cổ (head and neck squamous cell carcinoma-HNSCC), MEL (khối u ác tính), ung thư hạch không Hodgkin (non-Hodgkin lymphoma-

NHL), ung thư phổi không phải tế bào nhỏ (non-small cell lung cancer-NSCLC), ung thư buồng trứng (ovarian cancer-OC), ung thư thực quản (esophageal cancer-OSCAR), ung thư tuyến tụy), ung thư tuyến tiền liệt tuyến (prostate cancer-PRCA), ung thư biểu mô tế bào thận (renal cell carcinoma-RCC), ung thư phổi tế bào nhỏ (small cell lung cancer-SCLC), ung thư biểu mô bàng quang (urinary bladder carcinoma-UBC) và ung thư nội mạc tử cung (uterine endometrial cancer-UEC). Ngoài ra còn cần xác định các yếu tố nhận diện đại diện cho dấu ấn sinh học cho bệnh ung thư nói chung và bệnh bạch cầu dòng tủy cấp tính, ung thư vú, ung thư biểu mô tế bào đường mật, bệnh bạch cầu lympho bào mạn tính, ung thư đại trực tràng, ung thư túi mật, u nguyên bào đệm, ung thư dạ dày, ung thư dạ dày thực quản, ung thư biểu mô tế bào gan, ung thư biểu mô tế bào vảy vùng đầu cổ, khối u ác tính, ung thư hạch không Hodgkin, ung thư phổi không phải tế bào nhỏ, ung thư buồng trứng, ung thư thực quản, ung thư tuyến tụy, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư biểu mô tế bào thận, ung thư phổi tế bào nhỏ, ung thư biểu mô bàng quang và ung thư nội mạc tử cung, dẫn đến chẩn đoán ung thư tốt hơn, đánh giá tiên lượng và dự đoán thành công điều trị.

Liệu pháp miễn dịch ung thư đại diện cho lựa chọn trúng đích cụ thể của các tế bào ung thư trong khi giảm thiểu tác dụng phụ. Liệu pháp miễn dịch ung thư sử dụng sự tồn tại của các kháng nguyên liên quan đến khối u.

Phân loại hiện tại của các kháng nguyên liên quan đến khối u (tumor associated antigens-TAA) bao gồm các nhóm chính sau:

a) kháng nguyên ung thư-tinh hoàn: các TAA đầu tiên từng được xác định có thể được nhận ra bởi các tế bào T thuộc nhóm này, ban đầu được gọi là kháng nguyên ung thư tinh hoàn (cancer-testis-CT) do sự biểu hiện của các thành phần của nó trong các khối u ở người khác nhau về mô học và, trong các mô bình thường, chỉ trong các tinh nguyên bào/tinh bào của tinh hoàn và, đôi khi, trong nhau thai. Do các tế bào của tinh hoàn không biểu hiện các phân tử HLA lớp I và II, các kháng nguyên này không thể được các tế bào T nhận ra trong các mô bình thường và do đó có thể được coi là đặc hiệu khối u miễn dịch.

Các ví dụ đã biết về các kháng nguyên CT là các thành viên gia đình MAGE và NY-ESO-1.

b) các kháng nguyên phân biệt: các TAA này được chia sẻ giữa các khối u và mô bình thường từ đó khối u phát sinh. Hầu hết các kháng nguyên biệt hóa đã biết đến được tìm thấy trong các khối u ác tính và các tế bào hắc tố bình thường. Nhiều trong số các protein liên quan đến dòng tế bào hắc tố tham gia vào sinh tổng hợp sắc tố đen (melanin) và do đó không đặc hiệu khối u nhưng tuy nhiên được sử dụng rộng rãi cho liệu pháp miễn dịch ung thư. Các ví dụ bao gồm, nhưng không giới hạn, tyrosinase và Melan-A/MART-1 cho khối u ác tính hoặc PSA cho ung thư tuyến tiền liệt.

c) các TAA biểu hiện quá mức: các gen mã hóa các TAA đã 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, nói chung với mức độ biểu hiện thấp hơn. Có thể nhiều epitope được xử lý và có khả năng được trình hiện bởi các mô bình thường nằm dưới ngưỡng nhận ra của tế bào T, trong khi sự biểu hiện quá mức của chúng trong các tế bào khối u có thể kích hoạt đáp ứng chống ung thư bằng cách phá vỡ sự dung nạp đã được thiết lập trước đó. Các ví dụ nổi bật cho các lớp TAA này là Her-2/neu, survivin, telomerase hoặc WT1.

d) kháng nguyên đặc hiệu của khối u: những TAA độc nhất này phát sinh từ đột biến gen bình thường (như β -catenin, CDK4, v.v.). Một số thay đổi phân tử này có liên quan đến chuyển đổi và/hoặc tiến triển của khối u. Các kháng nguyên đặc hiệu khối u nói chung có thể tạo ra các đáp ứng miễn dịch mạnh mẽ mà không có nguy cơ phản ứng tự miễn chống lại các mô bình thường. Mặt khác, các TAA này trong hầu hết các trường hợp chỉ liên quan đến khối u chính xác mà chúng được xác định và thường không được chia sẻ giữa nhiều khối u riêng lẻ. Tính đặc hiệu khối u (hoặc -liên quan) của peptit cũng có thể phát sinh nếu peptit có nguồn gốc từ exon (có liên quan) khối u trong trường hợp protein có các isoform (có liên quan) đặc hiệu khối u.

e) các TAA phát sinh từ các biến đổi sau dịch mã bất thường: các TAA như vậy có thể phát sinh từ các protein không đặc hiệu hoặc không biểu hiện quá mức trong các khối

u nhưng tuy nhiên trở thành khối u liên quan đến các quá trình sau dịch mã chủ yếu hoạt động trong các khối u. Các ví dụ cho lớp này phát sinh từ các kiểu glycosyl hóa bị thay đổi dẫn đến các epitope mới trong các khối u như đối với MUC1 hoặc các sự kiện như tách protein trong quá trình thoái hóa có thể hoặc không thể là khối u cụ thể.

f) các protein virus khối u: các TAA này là các protein virus có thể đóng vai trò quan trọng trong quá trình gây ung thư và, vì chúng có nguồn gốc bên ngoài (không phải nguồn gốc của con người), chúng có thể gây lên đáp ứng của tế bào T. Ví dụ về các protein như vậy là protein virus gây u nhú ở người loại 16, E6 và E7, được biểu hiện trong ung thư biểu mô cổ tử cung.

Phần lớn trong hệ protein người có nguồn gốc từ các nguồn không chính tắc, chẳng hạn như các khung đọc mở thay thế (altORF (Vanderperre et al., 2013)), các yếu tố retrovirus nội sinh hoặc liên quan đến việc sao phiên mã bổ sung (nổi các ARN thay thế (Nilsen and Graveley, 2010)) hoặc các bước xử lý sau dịch mã (biến đổi sau dịch mã (Khoury et al., 2011), ghép nối proteasomal (Liepe et al., 2016)). Phần proteome này thể hiện một nguồn phong phú cho các TAA vì nhiều quá trình tế bào liên quan đến việc tạo ra các protein và peptit không chính tắc này thường xuyên bị thay đổi trong các tế bào ung thư (Laumont and Perreault, 2018).

Nhiều ARN thông tin (mARN) chứa, ngoài khung đọc mở tham chiếu (open reading frame-ORF), các khung đọc mở thay thế không theo thông thường (altORF, (de Klerk and 't Hoen, 2015)). Các trình tự mã hóa bổ sung này có thể thay đổi kích thước từ vài, thường dưới 100 (các khung đọc mở nhỏ; sORF (Olexiouk et al., 2016)), đến hàng trăm bộ ba mã hóa (codon) và có thể nằm phía trước, phía sau hoặc thậm chí chồng lên ORF tham chiếu. Việc dịch mã của các altORF này xảy ra từ các vị trí bắt đầu dịch mã khác nhau và có thể xảy ra trong khung đọc khác nhau dưới dạng ORF tham chiếu. Sự hiện diện của các khung đọc mở nhỏ không bị hạn chế đối với mARN nhưng cũng được mô tả cho các ARN điều tiết khác mà trước đây được cho là không mã hóa (ncARN, (Nam et al., 2016)). Một số ARN có mã không dài (lncARN) và microARN (miARN) đã được thể hiện để mã hóa và dịch mã rộng rãi các peptit nhỏ. (Anderson et al., 2015; Aspden et al., 2014).

Các retrovirus nội sinh ở người (HERV) chiếm một phần đáng kể (~ 8%) trong bộ gen của con người. Những yếu tố virus này được tích hợp trong bộ gen hàng triệu năm trước và kể từ đó được truyền dọc qua các thế hệ. Phần lớn các HERV đã mất hoạt động chức năng thông qua đột biến hoặc cắt ngắn, nhưng một số retrovirus nội sinh, chẳng hạn như các thành viên của dòng HERV-K, vẫn mã hóa các gen chức năng và đã được chứng minh tạo thành các hạt kiểu retrovirus (Subramanian et al., 2011). Việc phiên mã của các provirus HERV được kiểm soát về mặt di truyền và giữ im lặng trong điều kiện sinh lý bình thường. Tuy nhiên, việc kích hoạt lại và biểu hiện quá mức dẫn đến dịch mã protein tích cực đã được mô tả trong một số bệnh và đặc biệt đối với các loại ung thư khác nhau (Gonzalez-Cao et al., 2016; Kassiotis and Stoye, 2017). Biểu hiện đặc hiệu khối u của protein có nguồn gốc HERV này có thể được khai thác cho các loại liệu pháp miễn dịch ung thư khác nhau (Krishnamurthy et al., 2015; Schiavetti et al., 2002).

Liệu pháp miễn dịch trên cơ sở tế bào T nhắm vào các epitope peptit có nguồn gốc từ các protein liên quan đến khối u hoặc đặc hiệu của khối u, được trình diện bởi các phân tử của phức hợp tương hợp mô chính (major histocompatibility complex - MHC). Các kháng nguyên được nhận ra bởi các tế bào lympho T đặc hiệu của khối u, nghĩa là các epitope của chúng, có thể là các phân tử có nguồn gốc từ tất cả các lớp protein, chẳng hạn như enzyme, thụ thể, các yếu tố phiên mã, v.v. được biểu hiện và, so với các tế bào chưa được sửa đổi cùng một nguồn gốc, thường được điều chỉnh tăng trong các tế bào của khối u tương ứng.

Có hai lớp phân tử MHC, MHC lớp I và MHC lớp II. Các phân tử MHC lớp I bao gồm chuỗi nặng alpha và các phân tử beta-2-microglobulin, MHC lớp II của chuỗi alpha và chuỗi beta. Cấu trúc ba chiều của chúng thu được một rãnh liên kết, được sử dụng cho tương tác không cộng hóa trị với các peptit.

Các phân tử MHC lớp I có thể được tìm thấy trên hầu hết các tế bào có nhân. Các phân tử này trình diện các peptit do sự phân cắt protein của protein chủ yếu là nội sinh, các sản phẩm ribosome bị lỗi (defective ribosomal products-DRIPs) và các peptit lớn hơn. Tuy nhiên, các peptit có nguồn gốc từ khoang nội sinh hoặc nguồn ngoại sinh cũng

thường được tìm thấy trên các phân tử MHC lớp I. Bằng cách không phân lớp cách trình diện lớp I được đề cập như các trình diện chéo trong tài liệu (Brossart and Bevan, 1997; Rock et al., 1990). Các phân tử MHC lớp II có thể được tìm thấy chủ yếu trên các tế bào trình diện kháng nguyên chuyên nghiệp (antigen presenting cells-APCs) và chủ yếu trình diện các peptit của protein ngoại sinh hoặc protein màng tế bào được APCs lấy ra, ví dụ trong quá trình nhập bào và sau đó được xử lý.

Các phức hợp peptit và MHC lớp I được nhận ra bởi các tế bào T dương tính CD8 mang thụ thể tế bào T thích hợp (T-cell receptor-TCR), trong khi các phức hợp của các phân tử peptit và MHC lớp II được nhận ra bởi các tế bào T-trợ giúp-dương tính CD4 mang TCR thích hợp. Người ta biết rằng TCR, peptit và MHC do đó có mặt với lượng cân bằng theo hệ tỉ lệ là 1: 1: 1.

Các tế bào T trợ giúp dương tính CD4 đóng vai trò quan trọng trong việc gây ra và duy trì các đáp ứng hiệu quả bởi các tế bào T gây độc tế bào dương tính CD8. Việc xác định các epitope tế bào T dương tính CD4 có nguồn gốc từ các kháng nguyên liên quan đến khối u (tumor associated antigens-TAA) có tầm quan trọng lớn đối với việc phát triển các sản phẩm được phẩm để kích hoạt đáp ứng miễn dịch chống khối u (Gnjatic et al., 2003). Tại vị trí khối u, các tế bào trợ giúp T, hỗ trợ môi trường cytokine thân thiện tế bào T gây độc tế bào (cytotoxic T cell-CTL) (Mortara et al., 2006) và thu hút các tế bào chấp hành, ví dụ: CTL, tế bào diệt tự nhiên (natural killer-NK), đại thực bào và bạch cầu hạt (Hwang et al., 2007).

Trong trường hợp không bị viêm, biểu hiện của các phân tử MHC lớp II chủ yếu bị hạn chế ở các tế bào của hệ thống miễn dịch, đặc biệt là các tế bào trình diện kháng nguyên chuyên nghiệp (antigen-presenting cells-APC), ví dụ, các tế bào đơn nhân, tế bào có nguồn gốc đơn nhân, đại thực bào, tế bào đuôi gai. Ở bệnh nhân ung thư, các tế bào của khối u đã được tìm thấy để biểu hiện các phân tử MHC lớp II (Dengjel et al., 2006). (Dengjel et al., 2006).

Các peptit kéo dài (dài hơn) theo sáng chế có thể hoạt động như các epitope hoạt động MHC lớp II.

Các tế bào T-trợ giúp, được kích hoạt bởi các epitope MHC lớp II, đóng vai trò quan trọng trong việc điều phối chức năng chấp hành của các CTL trong khả năng miễn dịch chống khối u. Các epitope tế bào T-trợ giúp kích hoạt đáp ứng tế bào T-trợ giúp của các chức năng chấp hành hỗ trợ loại TH1 của các tế bào T diệt dương tính CD8, bao gồm các chức năng gây độc tế bào có hướng chống lại các tế bào khối u hiển thị phức hợp peptit/MHC liên quan đến khối u trên bề mặt tế bào của chúng. Theo cách này, các epitope peptit tế bào T-helper liên quan đến khối u, một mình hoặc kết hợp với các peptit liên quan đến khối u khác, có thể đóng vai trò là thành phần được phẩm tích cực của các chế phẩm vắc xin kích thích đáp ứng miễn dịch chống khối u.

Đã được chứng minh trên các mô hình động vật có vú, ví dụ, chuột, ngay cả khi không có tế bào lympho T dương tính CD8, tế bào T dương tính CD4 là đủ để ức chế sự xuất hiện của khối u thông qua việc ức chế sự hình thành mạch bằng cách tiết ra protein ức chế sự tăng trưởng của virus (interferon-gamma (IFN γ)) (Beatty and Paterson, 2001; Mumberg et al., 1999). Có bằng chứng cho các tế bào T CD4 là tác nhân chống khối u trực tiếp (Braumuller et al., 2013; Tran et al., 2014).

Do sự biểu hiện cấu thành của các phân tử HLA lớp II thường chỉ giới hạn ở các tế bào miễn dịch, nên khả năng phân lập peptit lớp II trực tiếp từ các khối u nguyên phát trước đây không được coi là có thể. Tuy nhiên, Dengjel và cộng sự đã thành công trong việc xác định một số epitope MHC lớp II trực tiếp từ các khối u (WO 2007/028574, EP 1 760 088 B1).

Do cả hai loại đáp ứng, phụ thuộc CD8 và CD4, đóng góp chung và hiệp đồng vào tác dụng chống khối u, việc xác định và mô tả các kháng nguyên liên quan đến khối u được nhận ra bởi các tế bào T CD8 + (phối tử: phân tử MHC lớp I + epitope peptit) hoặc bởi các tế bào T-trợ giúp dương tính CD4 (phối tử: phân tử MHC lớp II + epitope peptit) rất quan trọng trong việc phát triển vắc xin khối u.

Đối với peptit MHC lớp I kích hoạt (khơi gợi) đáp ứng miễn dịch tế bào, nó cũng phải liên kết với phân tử MHC. Quá trình này phụ thuộc vào alen của phân tử MHC và tính đa hình cụ thể của trình tự axit amin của peptit. Các peptit liên kết MHC-lớp-I thường có độ dài 8-12 phần dư axit amin và thường chứa hai axit amin được bảo toàn ("neo") trong chuỗi của chúng mà tương tác với rãnh liên kết tương ứng của phân tử MHC. Theo cách này, mỗi alen MHC có một "kiểu liên kết", xác định các peptit nào có thể liên kết cụ thể với rãnh liên kết

Trong phản ứng miễn dịch phụ thuộc MHC lớp I, peptit không chỉ phải có khả năng liên kết với một số phân tử MHC lớp I nhất định được biểu hiện bởi các tế bào khối u, sau đó chúng còn phải được nhận ra bởi các tế bào T mang thụ thể tế bào T cụ thể (T cell receptors - TCR).

Để các protein được tế bào lympho T nhận ra là kháng nguyên đặc hiệu hoặc liên quan đến khối u và được sử dụng trong trị liệu, các điều kiện tiên quyết cụ thể phải được đáp ứng. Kháng nguyên cần được biểu hiện chủ yếu bởi các tế bào khối u và không, hoặc với lượng tương đối nhỏ, bởi các mô khỏe mạnh bình thường. Trong một phương án ưu tiên, peptit nên được biểu hiện quá mức bởi các tế bào khối u so với các mô khỏe mạnh bình thường. Ngoài ra, mong muốn rằng kháng nguyên tương ứng không chỉ có mặt trong một loại khối u, mà còn ở nồng độ cao (nghĩa là số lượng bản sao của peptit tương ứng trên mỗi tế bào). Kháng nguyên đặc hiệu khối u và liên quan đến khối u thường có nguồn gốc từ các protein tham gia trực tiếp vào việc biến đổi tế bào bình thường thành tế bào khối u do chức năng của chúng, ví dụ: trong kiểm soát chu kỳ tế bào hoặc chặn cơ chế gây chết tế bào theo chương trình (apoptosis). Ngoài ra, các đích phía sau của protein trực tiếp gây ra sự biến đổi có thể được điều chỉnh tăng do đó có thể liên quan đến khối u một cách gián tiếp. Các kháng nguyên liên quan đến khối u gián tiếp như vậy cũng có thể là mục tiêu của phương pháp vắc xin (Singh-Jasuja et al., 2004). Điều cần thiết là các epitope có mặt trong trình tự axit amin của kháng nguyên, để đảm bảo rằng peptit đó ("peptit miễn dịch"), có nguồn gốc từ kháng nguyên liên quan đến khối u, dẫn đến đáp ứng tế bào T trong ống nghiệm (in-vitro) hoặc trong cơ thể (in-vivo).

Về cơ bản, bất kỳ peptit nào có thể liên kết phân tử MHC đều có thể hoạt động như một epitope của tế bào T. Điều kiện tiên quyết để tạo ra đáp ứng tế bào T in-vitro hoặc in-vivo là sự hiện diện của tế bào T có TCR tương ứng và không có sự dung nạp miễn dịch đối với epitope cụ thể này.

Do đó, các TAA là điểm khởi đầu cho sự phát triển của liệu pháp trên cơ sở tế bào T bao gồm nhưng không giới hạn ở vắc xin khối u. Các phương pháp xác định và mô tả TAA thường dựa trên việc sử dụng các tế bào T mà có thể phân lập được từ bệnh nhân hoặc đối tượng khỏe mạnh, hoặc dựa trên việc tạo ra các cấu trúc phiên mã khác biệt hoặc mô hình biểu hiện peptit khác biệt giữa các khối u và các mô bình thường. Tuy nhiên, việc xác định các gen biểu hiện quá mức trong các mô khối u hoặc các dòng tế bào khối u ở người, hoặc được biểu hiện có chọn lọc trong các mô hoặc các dòng tế bào đó, không cung cấp thông tin chính xác về việc sử dụng các kháng nguyên được sao chép từ các gen này trong liệu pháp miễn dịch. Điều này là do chỉ có một quần thể đơn lẻ các epitope của các kháng nguyên này phù hợp cho ứng dụng đó vì tế bào T có TCR tương ứng phải có mặt và dung nạp miễn dịch đối với epitope cụ thể này cần phải vắng mặt hoặc ở mức tối thiểu. Do đó, trong phương án rất được ưu tiên của sáng chế, điều quan trọng là chỉ chọn những peptit được trình diện quá mức hoặc có chọn lọc dựa vào đó có thể tìm thấy tế bào T chức năng và/hoặc tăng sinh. Tế bào T chức năng này được định nghĩa là tế bào T, ngay khi được kích thích bằng kháng nguyên cụ thể có thể được mở rộng theo cách tách dòng và có thể thực hiện các chức năng chấp hành (tế bào T chấp hành).

Trong trường hợp nhắm đích peptit-MHC bằng các TCR cụ thể (ví dụ: TCR hòa tan) và các kháng thể hoặc các phân tử liên kết khác (khung) theo sáng chế, khả năng miễn dịch của các peptit cơ bản là thứ yếu. Trong những trường hợp này, việc trình diện là yếu tố quyết định.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Theo khía cạnh thứ nhất của sáng chế, sáng chế đề cập đến peptit chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm nhận dạng trình tự (ID SEQ) số 1 đến ID SEQ số 101

hoặc trình tự biến thể của nó mà tương đồng ít nhất 77%, tốt hơn là ít nhất 88% (tốt hơn là giống hệt ít nhất 77% hoặc ít nhất 88%) với ID SEQ số 1 đến ID SEQ số 101, trong đó biến thể đã nêu liên kết với MHC và/hoặc khiến cho các tế bào T phản ứng chéo với peptit đã nêu, hoặc muối được dụng của nó, trong đó peptit đã nêu không phải là polypeptit có chiều dài cơ bản đầy đủ.

Sáng chế còn đề cập đến peptit theo sáng chế chứa trình tự được chọn từ nhóm bao gồm ID SEQ số 1 đến ID SEQ số 101 hoặc biến thể của nó mà tương đồng ít nhất 77%, tốt hơn là ít nhất 88% (tốt hơn là giống hệt ít nhất 77% hoặc ít nhất 88%) với ID SEQ số 1 đến ID SEQ số 101, trong đó peptit đã nêu hoặc biến thể của nó có tổng chiều dài từ 8 đến 100, tốt hơn là từ 8 đến 30, và tốt nhất là từ 8 đến 14 axit amin.

Các bảng sau đây cho thấy các peptit theo sáng chế, các số ID SEQ tương ứng của chúng và các gen (do các peptit quy định) nguồn sắp tới cho các peptit này. Các peptit trong bảng 3 là các peptit có nguồn gốc từ cái gọi là khung đọc mở "thay thế" hoặc "ngắn". Đối với mỗi chuỗi peptit, ID phiên mã nguồn ví dụ (Ensemble (Aken et al., 2016) or RefSeq (O'Leary et al., 2016) annotation) được thể hiện. Các peptit có thể bắt nguồn từ các bản phiên mã bổ sung hoặc thay thế khác không được liệt kê ở đây.

Trong bảng 3, các peptit với ID SEQ số 1 đến ID SEQ số 71 liên kết với kháng nguyên bạch cầu người (human leukocyte-antigens – HLA) HLA-A*02. Các peptit trong bảng 4 là các peptit có nguồn gốc từ retrovirus nội sinh ở người. Đối với mỗi peptit, một vị trí nhiễm sắc thể làm ví dụ được trình bày. Các peptit có thể còn ánh xạ tới các vị trí nhiễm sắc thể bổ sung hoặc thay thế không được liệt kê ở đây. Trong bảng 4, các peptit với ID SEQ số 72 đến ID SEQ số 74 liên kết với HLA-A*02, các peptit với ID SEQ số 75 đến ID SEQ số 95 liên kết với HLC lớp I khác (xem alen HLA). Các peptit trong bảng 5 là các peptit không có tham chiếu trực tiếp trong bộ gen của con người. Trong bảng 5, các peptit với ID SEQ số 96 đến ID SEQ số 101 liên kết với HLA-A*02.

Bảng 3: Các peptit theo sáng chế từ các khung đọc mở thay thế hoặc ngắn.

ID SEQ số	Trình tự	Mã peptit	ID bản phiên mã nguồn làm ví dụ
1	KLLDFSTRI	NUDCD2-001	ENST00000521797
2	ALLDVLVKL	COLPDG-001	ENST00000225964
3	FLLVPSPIWQL	altORF-001	ENST00000430553
4	YLGDSHVLL	altORF-002	ENST00000356971
5	LVWEVVESV	altORF-003	ENST00000425076
6	ALHDSPVYL	altORF-004	ENST00000584912
7	ALWEEVKATSL	altORF-005	ENST00000361298
8	ILQSLVPAA	altORF-006	ENST00000595125
9	FLQEGDLISV	altORF-007	ENST00000463488
10	SLLDKLSGI	altORF-008	ENST00000374472
11	ALLPHAPEAV	altORF-009	ENST00000621654
12	HLDSMNVSI	altORF-010	ENST00000558088
13	FLDEGSLLRL	altORF-011	ENST00000484411
14	LLIEVSEEL	altORF-012	ENST00000561317
15	NLVMPLLHI	altORF-013	ENST00000326799
16	ALLDAEQSPVAL	altORF-014	ENST00000559705

ID SEQ số	Trình tự	Mã peptit	ID bản phiên mã nguồn làm ví dụ
17	VLWDLRPSSLI	altORF-015	ENST00000503454
18	KMMTFFQGL	altORF-016	ENST00000559195
19	MLLPWLPKL	altORF-017	ENST00000568176
20	VLISLPGKV	altORF-018	ENST00000342308
21	FVFISPSFL	altORF-019	ENST00000579991
22	SLYDVPVGA	altORF-020	ENST00000540839
23	GLEVLDALL	altORF-021	ENST00000344922
24	TLTSLNILL	altORF-022	ENST00000451303
25	ISVLNLSAI	altORF-023	ENST00000490069
26	KLWTSLVNL	altORF-024	ENST00000513284
27	IAAGVPNTDA	altORF-025	ENST00000447802
28	SQLEKPETA	altORF-026	ENST00000412585
29	LLWEFPSMA	altORF-027	ENST00000465527
30	LLRLTLLPL	altORF-028	XM_005265671
31	VVLPIVITL	altORF-029	ENST00000335507
32	VLSVSAVLGA	altORF-030	ENST00000414310
33	FASERPPSV	altORF-031	ENST00000617924

ID SEQ số	Trình tự	Mã peptit	ID bản phiên mã nguồn làm ví dụ
34	LLNVEPAGA	altORF-032	ENST00000525179
35	VLLNSNYPV	altORF-033	ENST00000433310
36	FQVTRTTGV	altORF-034	ENST00000406361
37	KILDEFYNV	altORF-035	ENST00000464456
38	SLSAWLPSL	altORF-036	ENST00000430083
39	YIYEDEVRL	altORF-037	ENST00000603198
40	FTLPFLVNL	altORF-038	ENST00000522371
41	LMASEGIWESSL	altORF-039	ENST00000233242
42	WITPVIPAL	altORF-040	ENST00000421212
43	AIWSTILIA	altORF-041	ENST00000420453
44	WLIPRQLAAA	altORF-042	ENST00000367145
45	ALYHQSPLL	altORF-043	ENST00000555447
46	AMVEIIPKV	altORF-044	ENST00000425544
47	ALLPGVPGL	altORF-045	ENST00000434646
48	MLAEIHPKA	altORF-046	ENST00000558952
49	FLWDPRDVVL	altORF-047	ENST00000491641
50	GLASYLDRV	altORF-048	ENST00000411618

ID SEQ số	Trình tự	Mã peptit	ID bản phiên mã nguồn làm ví dụ
51	GLLTQVHIL	altORF-049	ENST00000521282
52	LAFVSHVLI	altORF-050	ENST00000361835
53	TISISLSSV	altORF-051	ENST00000254627
54	GLSPDQVFL	altORF-052	ENST00000394904
55	MVQQEKLFV	altORF-053	ENST00000611855
56	IITNLIVNI	altORF-054	ENST00000263321
57	YVLMTSLLL	altORF-055	ENST00000414195
58	MIISHRALEL	altORF-056	ENST00000452840
59	LAASTTFLGV	altORF-057	ENST00000605962
60	LLLATLENL	altORF-058	ENST00000484275
61	VLPWQPLLL	altORF-059	ENST00000492470
62	SLLGKPGLTI	altORF-060	ENST00000359318
63	LSFKRSLSI	altORF-061	ENST00000469017
64	LLLALRLSL	altORF-062	ENST00000375105
65	IAISQLTFV	altORF-063	ENST00000473984
66	ILNELLNSI	altORF-064	ENST00000505646
67	ALKELMGPA	altORF-065	ENST00000308370

ID SEQ số	Trình tự	Mã peptit	ID bản phiên mã nguồn làm ví dụ
68	KLLADAFKV	altORF-066	ENST00000569593
69	LLCPVVLQL	altORF-067	ENST00000497492
70	LLLQIEPAA	altORF-068	ENST00000624543
71	WLMPVMPAL	altORF-069	ENST00000473202

Bảng 4: Các peptit bổ sung theo sáng chế từ retrovirut nội sinh ở người.

ID SE Q số	Trình tự	Mã peptit	Các alen HLA	Vị trí nhiễm sắc thể làm ví dụ
2	YLSFIKILL	HERVK -001	A*02	Vị trí GRCh38:3:1:198295559:1 : 75551556-75551582
3	STTIINLIL	HERVK -002	A*02	Vị trí GRCh38:22:1:50818468:1 : 18946733-18946759
4	TLLSYSIPL	HERVK -003	A*02	Vị trí GRCh38:19:1:58617616:1 : 58312367-58312399
5	TTQEAEKLLE R	HERVK -004	A*68 /A*03	Vị trí GRCh38:19:1:58617616:1 : 58312301-58312330
	TEQGPTGVTM	HERVK	B*40/B*44/B*	Vị trí GRCh38:3:1:198295559:1 :

ID SE Q số	Trình tự	Mã peptit	Các alen HLA	Vị trí nhiễm sắc thể làm ví dụ
6		-005	49	101694496-101694528
7	VPAGVDVITE Y	HERVK -006	A*29/B*35/B* 07	Vị trí GRCh38:19:1:58617616:1 : 58312250-58312276
8	GLLPPVRAM	HERVK -007	B*15	Vị trí GRCh38:22:1:50818468:1: 23540302-23540328
9	KIQDPGTAF	HERVK -008	A*03	Vị trí GRCh38:8:1:145138636:1: 42918854-42918828
0	RDQIVTVSV	HERVK -009	B*41/B*44	Vị trí GRCh38:7:1:159345973:1: 4587989-4587954
1	SLLGAATVEPP K	HERVK -010	A*03	Vị trí GRCh38:6:1:170805979:1: 28690343-28690369
2	LAPQMIAL	HERVK -011	B*15/B*51	Vị trí GRCh38:7:1:159345973:1: 141755441-141755418
3	KPRGPTPL	HERVK -012	B*08	Vị trí GRCh38:20:1:64444167:1: 32723848-32723877
4	RLCPAAPSEK	HERVK -013	A*03	Vị trí GRCh38:20:1:64444167:1: 32717605-32717631

ID SE Q số	Trình tự	Mã peptit	Các alen HLA	Vị trí nhiễm sắc thể làm ví dụ
5	VYLLTFPPL	UNKN-007	A*24	Vị trí GRCh38:10:1:133797422:1:6825699-6825676
6	LMIGKRIL	HERVK-014	B*08	Vị trí GRCh38:4:1:190214555:1:9130103-9130138
7	LNLVSETEAM VK	HERVK-015	A*11 (A*03)	Vị trí GRCh38:1:1:248956422:1:150635421-150635392
8	DEQETDAFL	HERVK-016	B*18/B*44	Vị trí GRCh38:6:1:170805979:1:77721912-77721889
9	MIFYVLQK	HERVK-017	A*03	Vị trí GRCh38:4:1:190214555:1:190112774-190112748
0	YLRDFKIKR	HERVK-018	A*31 (A*03)	Vị trí GRCh38:4:1:190214555:1:190107560-190107534
1	SSHFILVTF	HERVK-019	A*24	Vị trí GRCh38:3:1:198295559:1:75556001-75556027
2	ELVAVTSVL	HERVK-020	B*13	Vị trí GRCh38:8:1:145138636:1:145025405-145025379
3	WQKNSMRL	HERVK-021	B*15	Vị trí GRCh38:20:1:64444167:1:34135051-34135074

ID SEQ số	Trình tự	Mã peptit	Các alen HLA	Vị trí nhiễm sắc thể làm ví dụ
4	MGRRRNLY	HERVK -022	B*15	Vị trí GRCh38:4:1:190214555:1: 165000827-165000850
5	QVKIVTLL	HERVK -023	B*52	Vị trí GRCh38:12:1:133275309:1 34627138-34627115

Bảng 5: Các peptit bổ sung theo sáng chế không tham chiếu trực tiếp trong bộ gen người theo sáng chế.

ID SEQ số	Trình tự	Mã peptid
96	KIIEDLANTV	KRT18-001
97	GLIDDKGTIKL	CDC2-006
98	SLMEVTHDL	LARS-001
99	ALMDGSESRRFFV	BSG-001
100	SLGPPVGV	CIZ1-001
101	KLPEGHLPEV	AHNAK2-003

Bảng 6: Các peptit theo sáng chế hữu ích cho ví dụ, các liệu pháp điều trị ung thư cá nhân.

ID SEQ số	Trình tự	Mã peptit
102	GLDPTQFRV	POLA1-003
103	SLVSYLDKV	KRT16P-001

Điều ngạc nhiên được tìm thấy trong bối cảnh của sáng chế rằng các khung đọc mở thay thế là nguồn kháng nguyên liên quan đến khối u hiệu quả. Cho đến nay, chỉ có rất ít báo cáo mô tả các kháng nguyên này, ví dụ có nguồn gốc từ gp75 (Wang et al., Utilization of an alteARNtive open reading frame of a normal gene in generating a novel human cancer antigen. J Exp Med. 1996 Mar 1;183(3):1131-40), and NY-ESO-1/LAGE-1 ORF2 (Mandic, et al., The alteARNtive open reading frame of LAGE-1 gives rise to multiple promiscuous HLA-DR-restricted epitopes recognized by T-helper 1-type tumor-reactive CD4+ T cells, Cancer Res. 2003 Oct 1;63(19):6506-15). Tương tự, chỉ có một vài báo cáo đã thảo luận về trình tự retrovirus nội sinh (HERV) là nguồn thực sự cho các kháng nguyên liên quan đến khối u (Mullins CS and Linnebacher M. Endogenous retrovirus sequences as a novel class of tumor-specific antigens: an example of HERV-H env encoding strong CTL epitopes. Cancer Immunol Immunother. 2012 Jul;61(7):1093-100; and Attermann AS, et al., Human endogenous retroviruses and their implication for immunotherapeutics of cancer. Ann Oncol. 2018 Nov 1;29(11):2183-2191). Các HERV được đề xuất như 'chất bổ trợ nội tại', có thể làm nhạy cảm các tế bào ung thư để nhận biết miễn dịch, hoặc như các chất tự kháng có thể gây ra tự miễn dịch trong các bệnh lý thần kinh, như bệnh đa xơ cứng và bệnh tâm thần phân liệt (Tu X, et al., Human leukemia antigen-A*0201-restricted epitopes of human endogenous retrovirus W family envelope (HERV-W env) induce strong cytotoxic T lymphocyte responses. Virol Sin. 2017 Aug;32(4):280-289).

Sáng chế nói chung liên quan đến các peptit theo sáng chế để sử dụng trong điều trị các bệnh tăng sinh, ví dụ như bệnh bạch cầu dòng tủy cấp tính, ung thư vú, ung thư biểu

mô tế bào đường mật, bệnh bạch cầu tế bào lympho mạn tính, ung thư đại trực tràng, ung thư túi mật, u nguyên bào đệm, ung thư dạ dày, ung thư dạ dày thực quản, ung thư biểu mô tế bào gan, ung thư biểu mô tế bào vảy vùng đầu và cổ, khối u ác tính, ung thư hạch không Hodgkin, ung thư phổi không phải tế bào nhỏ, ung thư buồng trứng, ung thư tuyến tụy, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư biểu mô tế bào thận, ung thư phổi tế bào nhỏ, ung thư biểu mô bàng quang tiết niệu và ung thư nội mạc tử cung.

Đặc biệt tốt hơn là các peptit - một mình hoặc kết hợp - theo sáng chế được chọn từ nhóm bao gồm ID SEQ số 1 đến ID SEQ số 101. Tốt hơn là các peptit - một mình hoặc kết hợp - được chọn từ nhóm bao gồm ID SEQ số 1 đến ID SEQ số 14, ID SEQ số 72 đến ID SEQ số 81, ID SEQ số 96 đến ID SEQ số 101 (xem bảng 3, bảng 4 và bảng 5), và công dụng của chúng trong liệu pháp miễn dịch bệnh bạch cầu dòng tủy cấp tính, ung thư vú, ung thư biểu mô tế bào đường mật, bệnh bạch cầu tế bào lympho mạn tính, ung thư đại trực tràng, ung thư túi mật, u nguyên bào đệm, ung thư dạ dày, ung thư dạ dày thực quản, ung thư biểu mô tế bào gan, ung thư biểu mô tế bào vảy vùng đầu và cổ, khối u ác tính, ung thư hạch không Hodgkin, ung thư phổi không phải tế bào nhỏ, ung thư buồng trứng, ung thư thực quản, ung thư tuyến tụy, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư biểu mô tế bào thận, ung thư phổi tế bào nhỏ, ung thư bàng quang tiết niệu và ung thư nội mạc tử cung.

Do đó, khía cạnh khác của sáng chế đề cập đến các việc sử dụng các peptit theo sáng chế để tốt hơn là được kết hợp trong điều trị các bệnh tăng sinh được chọn từ nhóm bao gồm bệnh bạch cầu dòng tủy cấp tính, ung thư vú, ung thư biểu mô tế bào đường mật, bệnh bạch cầu tế bào lympho mạn tính, ung thư đại trực tràng, ung thư túi mật, u nguyên bào đệm, ung thư dạ dày, ung thư đường dạ dày thực quản, ung thư biểu mô tế bào gan, ung thư biểu mô tế bào vảy vùng đầu và cổ, khối u ác tính, ung thư hạch không Hodgkin, ung thư phổi không phải tế bào nhỏ, ung thư buồng trứng, ung thư thực quản, ung thư tuyến tụy, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư biểu mô tế bào thận, ung thư phổi tế bào nhỏ, ung thư biểu mô bàng quang tiết niệu và ung thư nội mạc tử cung.

Sáng chế còn đề cập đến các peptit theo sáng chế có khả năng liên kết với phân tử của phức hợp tương thích mô chính (major histocompatibility complex-MHC) ở người lớp I hoặc - ở dạng kéo dài, như MHC biến thể dài lớp II.

Sáng chế còn đề cập đến các peptit theo sáng chế trong đó (mỗi) các peptit đã nêu bao gồm hoặc chủ yếu bao gồm trình tự axit amin theo ID SEQ số 1 đến ID SEQ số 101.

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

Sáng chế còn đề cập đến các peptit theo sáng chế, trong đó peptit đã nêu là một phần của protein dung hợp, cụ thể được dung hợp với các axit amin đầu N của chuỗi bất biến liên quan đến kháng nguyên HLA-DR (Ii) hoặc dung hợp với (hoặc vào trình tự) kháng thể, như vậy, ví dụ kháng thể dành riêng cho các tế bào đuôi gai.

Sáng chế còn đề cập đến axit nucleic, mã hóa các peptit theo sáng chế. Sáng chế còn đề cập đến axit nucleic theo sáng chế là ADN, cADN, ANP, ARN hoặc các kết hợp của chúng.

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

Sáng chế còn đề cập đến peptit theo sáng chế, axit nucleic theo sáng chế hoặc một vectơ biểu hiện theo sáng chế để sử dụng trong điều trị bệnh và trong y học, cụ thể là trong điều trị ung thư.

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

Sáng chế đề cập đến các thụ thể tế bào T (T-cell receptors-TCR), đặc biệt là TCR hòa tan (soluble TCR-sTCR) và các TCR tách dòng được thiết kế thành các tế bào T tự thân hoặc dị sinh, và các phương pháp tạo ra chúng, cũng như các tế bào NK hoặc các tế bào khác mang TCR đã nêu hoặc phản ứng chéo với các TCR đã nêu.

Các kháng thể và TCR là phương án bổ sung của việc sử dụng các peptit miễn dịch trị liệu theo sáng chế.

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

Sáng chế còn đề cập đến phương pháp sản xuất peptit theo sáng chế, phương pháp này bao gồm nuôi cấy tế bào chủ theo sáng chế và phân lập peptit từ tế bào chủ đã nêu hoặc môi trường nuôi cấy của nó.

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

Sáng chế còn đề cập đến phương pháp theo sáng chế, trong đó tế bào trình diện kháng nguyên bao gồm vector biểu hiện có khả năng biểu hiện hoặc biểu hiện peptit đã nêu có chứa ID SEQ số 1 đến ID SEQ số: 101, tốt nhất là chứa ID SEQ số 1 đến ID SEQ số 14, ID SEQ số 72 đến ID SEQ số 81, ID SEQ số 96 đến ID SEQ số 101 hoặc trình tự axit amin biến thể.

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

Sáng chế còn đề cập đến phương pháp diệt tế bào đích ở bệnh nhân mà các tế bào đích biểu hiện bất thường polypeptit chứa bất kỳ trình tự axit amin nào theo sáng chế, phương pháp bao gồm sử dụng cho bệnh nhân một số lượng tế bào T hiệu quả được tạo ra theo sáng chế.

Sáng chế đề cập đến việc sử dụng bất kỳ peptit nào như được mô tả, axit nucleic theo sáng chế, vector biểu hiện theo sáng chế, tế bào theo sáng chế, tế bào lympho T hoạt hóa, thụ thể tế bào T hoặc các kháng thể hoặc các peptit- và/hoặc phân tử liên kết peptit-

MHC khác theo sáng chế như được phẩm hoặc trong sản xuất được phẩm. Tốt hơn là, được phẩm đã nêu có hoạt tính chống ung thư.

Tốt hơn là, được phẩm đã nêu là liệu pháp tế bào, vắcxin hoặc protein dựa trên TCR hòa tan hoặc kháng thể.

Sáng chế còn đề cập đến việc sử dụng theo sáng chế, trong đó các tế bào ung thư đã nêu là bệnh bạch cầu dòng tủy cấp tính, ung thư vú, ung thư biểu mô tế bào đường mật, bệnh bạch cầu tế bào lympho mãn tính, ung thư đại trực tràng, ung thư túi mật, u nguyên bào đệm, ung thư dạ dày, ung thư dạ dày thực quản, ung thư biểu mô tế bào gan, ung thư biểu mô tế bào vảy vùng đầu và cổ, khối u ác tính, ung thư hạch không Hodgkin, ung thư phổi không phải tế bào nhỏ, ung thư buồng trứng, ung thư thực quản, ung thư tuyến tụy, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư biểu mô tế bào thận, ung thư phổi tế bào nhỏ, ung thư bàng quang tiết niệu, ung thư nội mạc tử cung, và tốt hơn là các tế bào ung thư bạch cầu dòng tủy cấp tính, ung thư vú, ung thư biểu mô tế bào đường mật, ung thư bạch cầu tế bào lympho mãn tính, ung thư đại trực tràng, ung thư túi mật, u nguyên bào đệm, ung thư dạ dày, ung thư dạ dày thực quản, ung thư biểu mô tế bào gan, ung thư biểu mô tế bào vảy vùng đầu và cổ, khối u ác tính, ung thư hạch không Hodgkin, ung thư phổi không phải tế bào nhỏ, ung thư buồng trứng, ung thư thực quản, ung thư tuyến tụy, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư biểu mô tế bào thận, ung thư phổi tế bào nhỏ, ung thư bàng quang tiết niệu, ung thư nội mạc tử cung.

Sáng chế còn đề cập đến các dấu ấn sinh học dựa trên peptit theo sáng chế, sau đây được gọi là "đích" mà có thể sử dụng trong chẩn đoán ung thư, tốt hơn là bệnh bạch cầu dòng tủy cấp tính, ung thư vú, ung thư biểu mô tế bào đường mật, bệnh bạch cầu tế bào lympho mãn tính, ung thư đại trực tràng, ung thư túi mật, u nguyên bào đệm, ung thư dạ dày, ung thư dạ dày thực quản, ung thư biểu mô tế bào gan, ung thư biểu mô tế bào vảy vùng đầu và cổ, khối u ác tính, ung thư hạch không Hodgkin, ung thư phổi không phải tế bào nhỏ, ung thư buồng trứng, ung thư thực quản, ung thư tuyến tụy, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư biểu mô tế bào thận, ung thư phổi tế bào nhỏ, ung thư biểu mô bàng quang tiết niệu và ung thư nội mạc tử cung. Các dấu ấn sinh học có thể trình diện quá mức chính

(các) peptit hoặc biểu hiện quá mức (các) gen tương ứng. Các dấu ấn sinh học cũng có thể được sử dụng để dự đoán khả năng thành công trong điều trị, tốt nhất là liệu pháp miễn dịch và tốt nhất là liệu pháp miễn dịch nhắm vào cùng đích được xác định bởi dấu ấn sinh học. Ví dụ, kháng thể hoặc TCR hòa tan có thể được sử dụng để nhuộm các phần của khối u để phát hiện sự hiện diện của peptit quan tâm trong phức hợp với MHC.

Tùy chọn, kháng thể mang chức năng chấp hành khác như miễn kích thích miễn dịch hoặc độc tố.

Sáng chế cũng đề cập đến việc sử dụng các đích mới này trong bối cảnh điều trị ung thư.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1A đến Fig. 1F thể hiện sự trình diện quá mức của các peptit khác nhau trong các mô ung thư khác nhau.

Fig. 2A đến 2F thể hiện sơ đồ biểu hiện mẫu của các gen nguồn theo sáng chế được biểu hiện quá mức trong các mẫu ung thư khác nhau.

Fig. 3 thể hiện kết quả ví dụ về đáp ứng tế bào T CD8 + (trong ống nghiệm) *in vitro* đặc hiệu với peptit của người cho HLA-A * 02 + khỏe mạnh.

Fig. 4 thể hiện kết quả ví dụ về đáp ứng tế bào T CD8 + *in vitro* đặc hiệu với peptit của người cho HLA-A * 02 + khỏe mạnh.

Mô tả chi tiết sáng chế

Kích thích đáp ứng miễn dịch phụ thuộc vào sự hiện diện của các kháng nguyên được nhận ra là ngoại lai bởi hệ thống miễn dịch của vật chủ. Việc phát hiện ra sự tồn tại của các kháng nguyên liên quan đến khối u đã làm tăng khả năng sử dụng hệ thống miễn dịch của vật chủ để can thiệp vào sự phát triển của khối u. Các cơ chế khác nhau để khai thác cả cánh tay tế bào và dịch của hệ thống miễn dịch hiện đang được khám phá cho liệu pháp miễn dịch ung thư.

Các yếu tố đặc hiệu của đáp ứng miễn dịch tế bào có khả năng nhận ra và tiêu diệt đặc hiệu các tế bào khối u. Việc phân lập tế bào T từ quần thể tế bào xâm nhập khối u hoặc từ máu ngoại vi cho thấy các tế bào này đóng vai trò quan trọng trong việc bảo vệ miễn dịch tự nhiên chống lại ung thư. Các tế bào T dương tính CD8, đặc biệt, nhận ra các phân tử lớp I của phức hợp tương hợp mô chính (MHC) mang các peptit thường tồn tại 8 đến 10 axit amin có nguồn gốc từ protein hoặc khiếm khuyết các sản phẩm ribosome (DRIPS) có trong cytosol, đóng vai trò quan trọng trong đáp ứng này. Các phân tử MHC của con người cũng được chỉ định là kháng nguyên bạch cầu người (human leukocyte-antigens - HLA).

Như được sử dụng ở đây và ngoại trừ như đã lưu ý, tất cả các thuật ngữ được định nghĩa như được đưa ra dưới đây.

Thuật ngữ "đáp ứng tế bào T" có nghĩa là sự tăng sinh đặc biệt và kích hoạt các chức năng chấp hành gây ra bởi peptit *in vitro* hoặc *in vivo*. Đối với MHC lớp I đã hạn chế các tế bào T gây độc tế bào, các chức năng chấp hành có thể là sự phân giải các peptit được tạo xung, tiền chất peptit được tạo xung hoặc các tế bào đích trình diện peptit tự nhiên, tiết ra các cytokine, tốt hơn là interferon-gamma, TNF-alpha hoặc IL-2 bởi peptit, tiết ra các phân tử chấp hành, tốt hơn là granzyme hoặc perforin gây ra bởi peptit, hoặc thoái hóa.

Thuật ngữ "peptit" được sử dụng ở đây để chỉ chuỗi phần dư axit amin, được nối với nhau bằng các liên kết peptit giữa các nhóm alpha-amino và carbonyl của các axit amin liền kề. Các peptit tốt hơn là dài 9 axit amin nhưng có thể ngắn bằng 8 axit amin và dài bằng 10, 11 hoặc 12 hoặc dài hơn và trong trường hợp peptit MHC lớp II (biến thể kéo dài của các peptit của sáng chế) chúng có thể dài bằng 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 hoặc 20 hoặc nhiều axit amin hơn.

Hơn nữa, thuật ngữ "peptit" sẽ bao gồm muối của chuỗi phần dư axit amin, được nối với nhau bằng các liên kết peptit giữa các nhóm alpha-amino và carbonyl của các axit amin liền kề. Tốt hơn là, muối là muối được dụng của các peptit, ví dụ như muối clorua

hoặc axetat (trifluoroacetate). Cần lưu ý rằng các muối của các peptit theo sáng chế về cơ bản khác với các peptit ở trạng thái *in vivo* của chúng, vì các peptit không ở dạng muối hoặc liên kết với ion *in vivo*.

Thuật ngữ "peptit" cũng sẽ gồm "oligopeptit" Thuật ngữ "oligopeptit" được sử dụng ở đây để chỉ chuỗi phần dư axit amin, được nối với nhau bằng các liên kết peptit giữa các nhóm alpha-amino và carbonyl của các axit amin liên kề. Độ dài của oligopeptit không quan trọng đối với sáng chế, miễn là epitope hoặc các epitope chính xác được duy trì trong đó. Các oligopeptit thường có chiều dài ít hơn khoảng 30 phần dư axit amin và chiều dài lớn hơn khoảng 15 axit amin.

Thuật ngữ "polypeptit" để chỉ chuỗi phần dư axit amin, được nối với nhau bằng các liên kết peptit giữa các nhóm alpha-amino và carbonyl của các axit amin liên kề. Độ dài của polypeptit không quan trọng đối với sáng chế, miễn là các epitope chính xác được duy trì trong đó. Trái ngược với các thuật ngữ peptit hoặc oligopeptit, thuật ngữ polypeptit có nghĩa là để chỉ các phân tử có chứa hơn 30 phần dư axit amin.

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

"Epitope" của tế bào T lớp I yêu cầu peptit gắn với thụ thể MHC lớp I, tạo thành phức hợp ba cấu tử (chuỗi alpha MHC lớp I, beta-2-microglobulin và peptit) có thể được nhận ra bởi tế bào T mang thụ thể tế bào T phù hợp liên kết với phức hợp MHC/peptit với ái lực thích hợp. Các peptit liên kết với các phân tử MHC lớp I thường có chiều dài 8-14 axit amin và điển hình nhất là có chiều dài 9 axit amin.

Ở người có ba vị trí di truyền khác nhau mã hóa các phân tử MHC lớp I (các phân tử MHC của người cũng được chỉ định là kháng nguyên bạch cầu ở người (HLA)): HLA-A, HLA-B, và HLA-C. HLA-A*01, HLA-A*02, và HLA-B*07 là những ví dụ về các alen MHC lớp I khác nhau có thể được biểu hiện từ các vị trí này.

Bảng 7: Tần số biểu hiện F của các kiểu huyết thanh HLA-A * 02, HLA-A * 01, HLA-A * 03, HLA-A * 24, HLA-B * 07, HLA-B * 08 và HLA-B * 44. Tần số kiểu gen đơn bội (Haplotype) Gf có nguồn gốc từ nghiên cứu sử dụng dữ liệu đánh máy HLA từ sổ đăng ký của hơn 6,5 triệu tình nguyện viên ở Hoa Kỳ (Gragert et al., 2013). Tần số haplotype là tần số của alen riêng biệt trên một nhiễm sắc thể riêng lẻ. Do bộ nhiễm sắc thể lưỡng bội trong các tế bào động vật có vú, tần số xuất hiện kiểu gen của alen này cao hơn và có thể được tính theo nguyên tắc Hardy-Weinberg ($F = 1 - (1 - Gf)^2$).

Alen	Dân cư	Kiểu hình được tính từ tần số alen (F)
A*02	Châu Phi (N=28557)	32,3%
	Da trắng châu Âu (N = 1242890)	49,3%
	Người Nhật (N=24582)	42,7%
	Tây Ban Nha, phía nam + trung Mỹ (N=146714)	46,1%
	Đông Nam Á (N = 27978)	30,4%
A*01	Châu Phi (N=28557)	10,2%
	Da trắng châu Âu (N = 1242890)	30,2%

	Người Nhật (N=24582)	1,8%
	Tây Ban Nha, phía nam + trung Mỹ (N=146714)	14,0%
	Đông Nam Á (N = 27978)	21,0%
A*03	Châu Phi (N=28557)	14,8%
	Da trắng châu Âu (N = 1242890)	26,4%
	Người Nhật (N=24582)	1,8%
	Tây Ban Nha, phía nam + trung Mỹ (N=146714)	14,4%
	Đông Nam Á (N = 27978)	10,6%
A*24	Châu Phi (N=28557)	2,0%
	Da trắng châu Âu (N = 1242890)	8,6%
	Người Nhật (N=24582)	35,5%
	Tây Ban Nha, phía nam + trung Mỹ (N=146714)	13,6%
	Đông Nam Á (N = 27978)	16,9%
B*07	Châu Phi (N=28557)	14,7%

	Da trắng châu Âu (N = 1242890)	25,0%
	Người Nhật (N=24582)	11,4%
	Tây Ban Nha, phía nam + trung Mỹ (N=146714)	12,2%
	Đông Nam Á (N = 27978)	10,4%
B*08	Châu Phi (N=28557)	6,0%
	Da trắng châu Âu (N = 1242890)	21,6%
	Người Nhật (N=24582)	1,0%
	Tây Ban Nha, phía nam + trung Mỹ (N=146714)	7,6%
	Đông Nam Á (N = 27978)	6,2%
B*44	Châu Phi (N=28557)	10,6%
	Da trắng châu Âu (N = 1242890)	26,9%
	Người Nhật (N=24582)	13,0%
	Tây Ban Nha, phía nam + trung Mỹ (N=146714)	18,2%
	Đông Nam Á (N = 27978)	13,1%

Các peptit theo sáng chế, tốt hơn là khi được đưa vào vắc xin theo sáng chế như được mô tả ở đây liên kết với A*02. Vắc xin cũng có thể bao gồm các peptit MHC lớp II liên kết pan. Do đó, vắc xin theo sáng chế có thể được sử dụng để điều trị ung thư ở những bệnh nhân dương tính với A*02, trong khi không có sự lựa chọn nào cho các kiểu gen MHC lớp II là cần thiết do liên kết pan tự nhiên của các peptit này.

Nếu các peptit A*02 theo sáng chế được kết hợp với các peptit liên kết với alen khác, ví dụ A*24, thì tỷ lệ cao hơn của bất kỳ nhóm dân cư bệnh nhân nào có thể được điều trị so với chỉ giải quyết alen MHC lớp I một mình. Mặc dù trong hầu hết các quần thể, ít hơn 50% bệnh nhân có thể được giải quyết chỉ bằng alen, vắc xin bao gồm các epitope HLA-A*24 và HLA-A*02 có thể điều trị cho ít nhất 60% bệnh nhân trong bất kỳ dân cư nào có liên quan. Cụ thể, tỷ lệ phần trăm bệnh nhân sau đây sẽ dương tính với ít nhất một trong số các alen này ở các khu vực khác nhau: Hoa Kỳ 61%, Tây Âu 62%, Trung Quốc 75%, Hàn Quốc 77%, Nhật Bản 86% (tính từ www.allelefrequencies.net).

Bảng 8: Độ bao phủ của các alen HLA trong dân cư người da trắng châu Âu (được tính bởi (Gragert et al., 2013)).

	độ bao phủ (ít nhất một alen A)	kết hợp với B * 07	kết hợp với B * 44	kết hợp với B * 07 và B * 44
A*02/A*01	70%	78%	78%	84%
A*02/A*03	68%	76%	76%	83%
A*02/A*24	61%	71%	71%	80%
A*01/A*03	52%	64%	65%	75%

	độ bao phủ (ít nhất một alen A)	kết hợp với B * 07	kết hợp với B * 44	kết hợp với B * 07 và B * 44
A*01/A*24	44%	58%	59%	71%
A*03/A*24	40%	55%	56%	69%
A*02/A*01/A*03	84%	88%	88%	91%
A*02/A*01/A*24	79%	84%	84%	89%
A*02/A*03/A*24	77%	82%	83%	88%
A*01/A*03/A*24	63%	72%	73%	81%
A*02/A*01/A*03/A*24	90%	92%	93%	95%

Theo phương án ưu tiên, thuật ngữ "trình tự nucleotit" có nghĩa là đề cập đến một loại dị nguyên của deoxyribonucleotit.

Trình tự nucleotit mã hóa cho peptit, oligopeptit hoặc polypeptit cụ thể có thể xảy ra tự nhiên hoặc chúng có thể được tạo dựng theo cách tổng hợp. Nói chung, các phân đoạn ADN mã hóa các peptit, polypeptit và protein của sáng chế này được tập hợp từ các đoạn cADN và các liên kết oligonucleotit ngắn, hoặc từ một loạt các oligonucleotit, để cung cấp gen tổng hợp có khả năng biểu hiện trong đơn vị phiên mã tái tổ hợp bao gồm các yếu tố điều tiết có nguồn gốc từ operon của vi khuẩn hoặc virus.

Như được sử dụng ở đây thuật ngữ "nucleotit mã hóa cho (hoặc mã hóa) peptit", đề cập đến chuỗi nucleotit mã hóa peptit bao gồm các bộ ba mã hóa bắt đầu và kết thúc nhân

tạo (con người tạo) tương thích với hệ thống sinh học, trình tự này sẽ được biểu hiện bằng, ví dụ, tế bào đuôi gai hoặc hệ thống tế bào khác hữu ích cho việc sản xuất các TCR.

Như được sử dụng ở đây, tham chiếu đến trình tự axit nucleic bao gồm cả axit nucleic chuỗi đơn và chuỗi kép. Do đó, ví dụ đối với ADN, trình tự cụ thể, trừ khi bối cảnh chỉ ra khác, đề cập đến chuỗi ADN đơn của trình tự đó, chuỗi đôi của trình tự đó với phần bổ sung của nó (ADN chuỗi kép) và phần bổ sung của trình tự đó.

Thuật ngữ "vùng mã hóa", đề cập đến phần gen mà mã hóa theo cách tự nhiên hoặc thông thường cho sản phẩm biểu hiện của gen đó trong môi trường gen tự nhiên của nó, tức là vùng mã hóa *in vivo* cho sản phẩm biểu hiện tự nhiên của gen.

Vùng mã hóa có thể có nguồn gốc từ gen không bị đột biến (gen bình thường), gen bị đột biến hoặc bị thay đổi hoặc thậm chí có thể được lấy từ trình tự ADN hoặc gen, được tổng hợp hoàn toàn trong phòng thí nghiệm bằng các phương pháp đã biết đến với người có hiểu biết trong lĩnh vực tổng hợp ADN.

Thuật ngữ "sản phẩm biểu hiện" có nghĩa là polypeptit hoặc protein là sản phẩm dịch mã tự nhiên của gen và bất kỳ tương đương mã hóa trình tự axit nucleic nào do sự thoái hóa mã di truyền và do đó mã hóa cho cùng (các) axit amin.

Thuật ngữ "phân đoạn", khi đề cập đến trình tự mã hóa, có nghĩa là một phần ADN bao gồm ít hơn vùng mã hóa hoàn chỉnh, sản phẩm biểu hiện của nó vẫn giữ nguyên chức năng sinh học thiết yếu hoặc hoạt động như sản phẩm biểu hiện của vùng mã hóa hoàn chỉnh.

Thuật ngữ "đoạn ADN", đề cập đến polymer ADN, dưới dạng phân đoạn riêng biệt hoặc là thành phần của cấu trúc ADN lớn hơn, có nguồn gốc từ ADN được phân lập ít nhất một lần ở dạng về cơ bản là tinh khiết, tức là không gây tạp nhiễm vật liệu nội sinh và với số lượng hoặc nồng độ cho phép xác định, thao tác và phục hồi đoạn và các chuỗi nucleotit thành phần của nó bằng các phương pháp sinh hóa tiêu chuẩn, ví dụ, bằng cách sử dụng vectơ tách dòng. Các đoạn như vậy được cung cấp dưới dạng khung đọc mở không bị gián đoạn bởi các trình tự không dịch mã nội bộ hoặc các intron, thường xuất

hiện trong các gen của sinh vật nhân chuẩn. Các trình tự ADN không được dịch mã có thể xuất hiện phía sau khung đọc mở, trong đó các chuỗi ADN không được dịch mã không can thiệp vào thao tác hoặc biểu hiện của các vùng mã hóa.

Thuật ngữ "mồi" có nghĩa là trình tự axit nucleic ngắn có thể được bắt cặp với một sợi ADN và cung cấp đầu 3'-OH tự do, tại đó ADN polymerase bắt đầu tổng hợp chuỗi deoxyribonucleotit.

Thuật ngữ "trình tự khởi đầu" có nghĩa là vùng ADN tham gia vào liên kết ARN polymerase để bắt đầu phiên mã.

Thuật ngữ "được phân lập", có nghĩa là vật liệu bị loại bỏ khỏi môi trường ban đầu của nó (ví dụ: môi trường tự nhiên, nếu nó xảy ra tự nhiên). Ví dụ, polynucleotit hoặc polypeptit tự nhiên có trong động vật sống không bị phân lập, nhưng polynucleotit hoặc polypeptit này, được tách ra từ một số hoặc tất cả các vật liệu cùng tồn tại trong hệ thống tự nhiên, được phân lập. Các polynucleotit như vậy có thể là một phần của vectơ và/hoặc các polynucleotit hoặc polypeptit đó có thể là một phần của chế phẩm, và vẫn bị phân lập trong đó vectơ hoặc thành phần đó không phải là một phần của môi trường tự nhiên.

Các polynucleotit, và polypeptit tái tổ hợp hoặc gây miễn dịch, được bộc lộ theo sáng chế cũng có thể ở dạng "đã tinh sạch". Thuật ngữ "đã tinh sạch" không yêu cầu độ tinh khiết tuyệt đối; đúng hơn, thuật ngữ này được dùng như một định nghĩa tương đối, và có thể bao gồm các chế phẩm được tinh sạch cao hoặc các chế phẩm chỉ được tinh sạch một phần, vì những thuật ngữ đó được hiểu bởi những người có hiểu biết trong lĩnh vực kỹ thuật liên quan. Ví dụ, các dòng vô tính riêng lẻ được phân lập từ thư viện cADN đã được tinh sạch theo quy ước đồng nhất điện di. Việc tinh sạch vật liệu ban đầu hoặc vật liệu tự nhiên thành ít nhất một bậc độ lớn, tốt nhất là hai hoặc ba bậc, và tốt nhất là bốn hoặc năm bậc độ lớn được dự tính rõ ràng. Hơn nữa, polypeptit được yêu cầu bảo hộ có độ tinh sạch tốt hơn là 99,999%, hoặc ít nhất 99,99% hoặc 99,9%; và thậm chí đáng mong đợi 99% theo trọng lượng hoặc lớn hơn được bao gồm rõ ràng.

Các axit nucleic và các sản phẩm biểu hiện polypeptit được bộc lộ theo sáng chế, cũng như các vector biểu hiện có chứa axit nucleic và/hoặc các polypeptit này, có thể ở "dạng được làm giàu". Như được sử dụng trong tài liệu này, thuật ngữ "được làm giàu" có nghĩa là có nồng độ vật liệu ít nhất gấp khoảng 2, 5, 10, 100 hoặc 1000 lần nồng độ tự nhiên của nó (ví dụ), thuận lợi là 0,01%, tính theo trọng lượng, tốt hơn là khoảng 0,1% theo trọng lượng. Các chế phẩm được làm giàu khoảng 0,5%, 1%, 5%, 10% và 20% theo trọng lượng cũng được dự tính. Các trình tự, cấu trúc, vector, dòng, và các vật liệu khác theo sáng chế có thể theo cách có lợi ở dạng được làm giàu hoặc được phân lập. Thuật ngữ "phân đoạn hoạt tính" có nghĩa là phân đoạn, thường peptit, polypeptit hoặc trình tự axit nucleic, 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 chất phù hợp hoặc trong vector, trên động vật, chẳng hạn như động vật có vú, ví dụ như thỏ hoặc chuột, và bao gồm cả con người, đáp ứng miễn dịch này có dạng kích thích đáp ứng tế bào T trong động vật nhận, chẳng hạn như con người. Ngoài ra, "phân đoạn hoạt tính" cũng có thể được sử dụng để tạo ra đáp ứng tế bào T *in vitro*.

Như được sử dụng trong tài liệu này, các thuật ngữ "phần", "đoạn" và "phân đoạn", khi được sử dụng liên quan đến các polypeptit, đề cập đến trình tự phần dư liên tục, chẳng hạn như phần dư axit amin, mà trình tự tạo thành tập hợp con của trình tự lớn hơn. Ví dụ, nếu polypeptit đã trải qua xử lý bằng bất kỳ endopeptidase thông thường nào, chẳng hạn như trypsin hoặc chymotrypsin, thì oligopeptit thu được từ quá trình xử lý này sẽ đại diện cho các phần, đoạn hoặc phân đoạn của polypeptit bắt đầu. Khi được sử dụng liên quan đến polynucleotit, các thuật ngữ này đề cập đến các sản phẩm được sản xuất bằng cách xử lý các polynucleotit đã nêu với bất kỳ endonuclease nào.

Theo sáng chế, thuật ngữ "đồng nhất phần trăm" hoặc "phần trăm đồng nhất", khi đề cập đến trình tự, có nghĩa là trình tự được so sánh với trình tự được yêu cầu hoặc mô tả sau khi sắp thẳng hàng trình tự sẽ được so sánh ("trình tự so sánh") với trình tự được mô tả hoặc được yêu cầu (trình tự tham chiếu). Phần trăm đồng nhất sau đó được xác định theo công thức sau:

Phần trăm đồng nhất = $100 [1 - (C/R)]$

trong đó C là số lượng khác biệt giữa trình tự tham chiếu và trình tự so sánh theo độ dài sắp 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 gốc bazơ hoặc axit amin được sắp thẳng hàng tương ứng trong trình tự so sánh và

(ii) mỗi khoảng trống trong trình tự tham chiếu và

(i) mỗi bazơ hoặc axit amin được sắp thẳng hàng trong trình tự tham chiếu mà khác với bazơ hoặc axit amin được sắp thẳng hàng trong trình tự so sánh, tạo thành một sự khác biệt và

(iii) sự sắp thẳng hàng phải bắt đầu tại vị trí 1 của các trình tự được sắp thẳng hàng;

và R là số lượng bazơ hoặc axit amin trong trình tự tham chiếu theo chiều dài sắp thẳng hàng với trình tự so sánh với bất kỳ khoảng cách nào được tạo trong trình tự tham chiếu cũng được tính là một bazơ hoặc axit amin.

Nếu sự sắp thẳng hàng tồn tại giữa trình tự so sánh và trình tự tham chiếu mà phần trăm đồng nhất như được tính ở trên bằng hoặc lớn hơn phần trăm đồng nhất tối thiểu được chỉ định thì trình tự so sánh có phần trăm đồng nhất tối thiểu được chỉ định với trình tự tham chiếu mặc dù việc sắp thẳng hàng có thể tồn tại trong đó phần trăm đồng nhất được tính ở trên nhỏ hơn phần trăm đồng nhất được chỉ định.

Như đã đề cập ở trên, sáng chế đề xuất peptit bao gồm trình tự được chọn từ nhóm bao gồm ID SEQ số 1 đến ID SEQ số 101 hoặc biến thể của nó mà tương đồng 88% với ID SEQ số 1 đến ID SEQ số 101, hoặc biến thể của chúng sẽ tạo ra các tế bào T phản ứng chéo với peptit nói trên. Các peptit theo sáng chế có khả năng liên kết với phân tử của phức hợp tương hợp mô chính người (MHC) lớp I hoặc các bản kéo dài của các peptit đã nêu đến lớp II.

Theo sáng chế, thuật ngữ "tương đồng" đề cập đến mức độ đồng nhất (xem phần trăm đồng nhất ở trên) giữa các trình tự của hai trình tự axit amin, tức là các trình tự peptit

hoặc polypeptit. "Sự tương đồng" như nêu trên đã được xác định bằng cách so sánh hai trình tự được sắp thẳng hàng dưới các điều kiện tối ưu so với các trình tự sẽ được so sánh. Sự tương đồng trình tự này có thể được tính bằng cách tạo sự sắp thẳng hàng sử dụng, ví dụ, thuật toán ClustalW. Phần mềm phân tích trình tự phổ biến có sẵn, cụ thể hơn, Vector NTI, GENETYX hoặc các công cụ khác được cung cấp bởi cơ sở dữ liệu công cộng.

Người có hiểu biết trong lĩnh vực kỹ thuật sẽ có thể đánh giá, liệu các tế bào T gây ra bởi biến thể của peptit cụ thể sẽ có thể phản ứng chéo với chính peptit (Appay et al., 2006; Colombetti et al., 2006; Fong et al., 2001; Zaremba et al., 1997).

Bằng "biến thể" của trình tự axit amin đã cho có nghĩa là các chuỗi bên của, ví dụ, một hoặc hai phần dư axit amin bị thay đổi (ví dụ bằng cách thay thế chúng bằng chuỗi bên của phần dư axit amin xảy ra tự nhiên khác hoặc một số chuỗi bên khác) sao cho peptit vẫn có thể liên kết với phân tử HLA về cơ bản giống như peptit chứa trình tự axit amin đã cho bao gồm ID SEQ số 1 đến ID SEQ số 101. Ví dụ, peptit có thể được sửa đổi để ít nhất nó duy trì, nếu không cải thiện, khả năng tương tác và liên kết với rãnh liên kết của phân tử MHC phù hợp, chẳng hạn như HLA-A * 02 hoặc -DR, và trong đó cách này, ít nhất là duy trì, nếu không cải thiện, khả năng liên kết với TCR của các tế bào T được kích hoạt.

Các tế bào T này sau đó có thể phản ứng chéo với các tế bào và tiêu diệt các tế bào biểu hiện polypeptit có chứa trình tự axit amin tự nhiên của peptit tương tự như được định nghĩa trong các khía cạnh của sáng chế. Như có thể được suy ra từ các tài liệu khoa học và cơ sở dữ liệu (Rammensee et al., 1999; Godkin et al., 1997), một số vị trí nhất định của peptit liên kết HLA thường là phần dư neo tạo thành trình tự lõi phù hợp với kiểu liên kết của thụ thể HLA, mà được xác định bởi các tính chất về cực, điện vật lý, tính kỵ nước và không gian của chuỗi polypeptit cấu thành rãnh liên kết. Do đó, người có hiểu biết trong lĩnh vực kỹ thuật sẽ có thể sửa đổi các trình tự axit amin được nêu trong ID SEQ số 1 đến ID SEQ số 101, bằng cách duy trì phần dư neo đã biết và có thể xác định liệu các biến thể đó có duy trì khả năng liên kết các phân tử MHC lớp I hoặc II hay không. Các biến thể của sáng chế giữ khả năng liên kết với TCR của các tế bào T được kích hoạt, sau đó có

thể phản ứng chéo với và tiêu diệt các tế bào biểu hiện polypeptit chứa trình tự axit amin tự nhiên của peptit tương tự như được định nghĩa trong các khía cạnh của sáng chế.

Các peptit ban đầu (không thay đổi) như được bộc lộ ở đây có thể được sửa đổi bằng cách thay thế một hoặc nhiều phần dư tại các vị trí khác nhau, có thể chọn lọc, trong chuỗi peptit, nếu không có quy định khác. Tốt nhất là những thay thế này được đặt ở cuối chuỗi axit amin. Sự thay thế như vậy có thể có tính chất bảo toàn, ví dụ, trong đó một axit amin được thay thế bằng một axit amin có cấu trúc và đặc điểm tương tự, chẳng hạn như khi axit amin kỵ nước được thay thế bằng một axit amin kỵ nước khác. Thậm chí bảo toàn hơn sẽ là thay thế các axit amin có kích thước hoặc tính chất hóa học giống hoặc tương tự, chẳng hạn như leucine được thay thế bằng isoleucine. Trong các nghiên cứu về các biến thể trình tự trong các họ protein tương đồng xuất hiện trong tự nhiên, một số thay thế axit amin nhất định thường được dung nạp hơn các loại khác và chúng thường cho thấy mối tương quan với sự tương đồng về kích thước, điện tích, độ phân cực và tính kỵ nước giữa axit amin ban đầu và axit amin thay thế của nó, và đó là cơ sở để xác định những thay thế bảo toàn".

Thay thế bảo toàn ở đây được định nghĩa là trao đổi trong một trong năm nhóm sau đây: nhóm 1 - phần dư axit amin không cực hoặc có cực nhẹ, béo nhỏ (Ala, Ser, Thr, Pro, Gly); nhóm 2 - phần dư axit amin tích điện âm, có cực và amit của chúng (Asp, Asn, Glut, Gln); nhóm 3 - phần dư axit amin tích điện dương, có cực (His, Arg, Lys); nhóm 4 - phần dư axit amin không cực, béo lớn (Met, Leu, Ile, Val, Cys); và nhóm 5 - phần dư axit amin lớn, thơm (Phe, Tyr, Trp).

Trong một khía cạnh, những thay thế bảo toàn có thể bao gồm những thay thế được mô tả bởi Dayhoff trong tài liệu "The Atlas of Protein Sequence and Structure. Vol. 5", *Natl. Biomedical Research*, các nội dung được kết hợp bằng cách tham chiếu toàn bộ. Ví dụ, trong một khía cạnh, các axit amin, thuộc một trong các nhóm sau, có thể được trao đổi với nhau, do đó, tạo thành trao đổi bảo toàn: nhóm 1: alanine (A), proline (P), glycine (G), asparagine (N), serine (S), threonine (T); nhóm 2: cysteine (C), serine (S), tyrosine (Y), threonine (T); nhóm 3: valine (V), isoleucine (I), leucine (L), methionine (M),

alanine (A), phenylalanine (F); nhóm 4: lysine (K), arginine (R), histidine (H); nhóm 5: phenylalanine (F), tyrosine (Y), tryptophan (W), histidine (H); và nhóm 6: aspartic acid (D), glutamic acid (E). Trong một khía cạnh, sự thay thế axit amin bảo toàn có thể được chọn như sau $T \rightarrow A$, $G \rightarrow A$, $A \rightarrow I$, $T \rightarrow V$, $A \rightarrow M$, $T \rightarrow I$, $A \rightarrow V$, $T \rightarrow G$, và/hoặc $T \rightarrow S$.

Trong khía cạnh, sự thay thế axit amin bảo toàn có thể bao gồm sự thay thế một axit amin bằng một axit amin khác cùng lớp, ví dụ, (1) không phân cực: Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Met, Phe, Trp; (2) phân cực không tích điện: Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Gln; (3) có tính axit: Asp, Glu; và (4) có tính bazơ: Lys, Arg, His. Các thay thế axit amin bảo toàn khác cũng có thể được thực hiện như sau: (1) thơm: Phe, Tyr, His; (2) phần tử cho proton: Asn, Gln, Lys, Arg, His, Trp; và (3) phần tử nhận proton: Glu, Asp, Thr, Ser, Tyr, Asn, Gln (see, ví dụ: bằng sáng chế Hoa Kỳ số 10.106.805, nội dung được kết hợp bằng cách tham chiếu toàn bộ).

Theo khía cạnh khác, sự thay thế bảo toàn có thể được thực hiện theo bảng A. Các phương pháp dự đoán khả năng dung nạp cho thay đổi protein có thể được tìm thấy, ví dụ, trong tài liệu Guo et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 101(25):9205-9210 (2004), các nội dung được kết hợp bằng cách tham chiếu toàn bộ.

Bảng A

Những thay thế axit amin bảo toàn	
Axit amin	Những thay thế (các thay thế khác đã biết trong lĩnh vực)
Ala	Ser, Gly, Cys
Arg	Lys, Gln, His
Asn	Gln, His, Glu, Asp
Asp	Glu, Asn, Gln
Cys	Ser, Met, Thr
Gln	Asn, Lys, Glu, Asp, Arg
Glu	Asp, Asn, Gln
Gly	Pro, Ala, Ser
His	Asn, Gln, Lys
Ile	Leu, Val, Met, Ala
Leu	Ile, Val, Met, Ala
Lys	Arg, Gln, His
Met	Leu, Ile, Val, Ala, Phe
Phe	Met, Leu, Tyr, Trp, His
Ser	Thr, Cys, Ala
Thr	Ser, Val, Ala
Trp	Tyr, Phe
Tyr	Trp, Phe, His
Val	Ile, Leu, Met, Ala, Thr

Ở một khía cạnh khác, những thay thế bảo toàn có thể là những thay thế được thể hiện trong bảng B dưới tiêu đề "những thay thế bảo toàn". Nếu những thay thế như vậy dẫn đến thay đổi hoạt tính sinh học, thì những thay đổi đáng kể hơn, "những thay thế" được đặt tên trong bảng B, có thể được đưa ra và sàng lọc các sản phẩm nếu cần.

Bảng B:

Những thay thế axit amin bảo toàn		
Phần dư ban đầu (axit amin xảy ra trong tự nhiên)	Những thay thế bảo toàn	Những thay thế ví dụ
Ala (A)	Val	Val; Leu; Ile
Arg (R)	Lys	Lys; Gln; Asn
Asn (N)	Gln	Gln; His; Asp, Lys; Arg
Asp (D)	Glu	Glu; Asn
Cys (C)	Ser	Ser; Ala
Gln (Q)	Asn	Asn; Glu
Glu (E)	Asp	Asp; Gln
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Arg	Asn; Gln; Lys; Arg
Ile (I)	Leu	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucine
Leu (L)	Ile	Norleucine; Ile; Val; Met; Ala; Phe
Lys (K)	Arg	Arg; Gln; Asn
Met (M)	Leu	Leu; Phe; Ile
Phe (F)	Tyr	Leu; Val; Ile; Ala; Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr	Tyr; Phe
Tyr (Y)	Phe	Trp; Phe; Thr; Ser
Val (V)	Leu	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucine

Những thay thế ít bảo toàn hơn có thể liên quan đến việc thay thế một axit amin này bằng một axit amin khác có đặc điểm tương tự nhưng có kích thước hơi khác nhau, chẳng hạn như thay thế alanine phần dư isoleucine. Việc thay thế không bảo toàn cao có thể liên quan đến việc thay thế axit amin có tính axit cho axit amin có cực, hoặc thậm chí cho axit có tính chất cơ bản. Tuy nhiên, sự thay thế "gốc" như vậy không thể bị loại bỏ vì có thể

không hiệu quả vì các tác động hóa học không hoàn toàn có thể dự đoán được và sự thay thế gốc cũng có thể làm phát sinh các tác dụng ngẫu nhiên không thể dự đoán được từ các nguyên tắc hóa học đơn giản.

Tất nhiên, những thay thế như vậy có thể liên quan đến các cấu trúc khác ngoài các axit L-amino thông thường. Do đó, các axit D-amino có thể được thay thế cho các axit L-amino thường thấy trong các peptit kháng nguyên theo sáng chế và vẫn được bao gồm trong nội dung bộc lộ trong tài liệu này. Ngoài ra, các axit amin không chuẩn (nghĩa là, ngoài các axit amin tạo protein xảy ra trong tự nhiên phổ biến) cũng có thể được sử dụng cho mục đích thay thế để sản xuất các chất gây miễn dịch và polypeptit miễn dịch theo sáng chế.

Nếu những thay thế ở nhiều hơn một vị trí được tìm thấy dẫn đến peptit có hoạt tính kháng nguyên tương đương hoặc lớn hơn đáng kể như được định nghĩa dưới đây, thì sự kết hợp của những thay thế đó sẽ được kiểm tra để xác định xem sự thay thế kết hợp có dẫn đến tác dụng phụ hay hiệp đồng đối với tính kháng nguyên của peptit không. Nhiều nhất, không quá 4 vị trí trong peptit sẽ được thay thế đồng thời.

Peptit bao gồm chủ yếu trình tự axit amin như được chỉ ra ở đây có thể có một hoặc hai axit amin không neo (xem bên dưới về kiểu neo) được trao đổi mà không có khả năng liên kết với phân tử của phức hợp tương hợp mô chính người (MHC) lớp I hoặc lớp II bị thay đổi đáng kể hoặc bị ảnh hưởng tiêu cực, khi so sánh với peptit không bị biến đổi. Theo phương án khác, trong peptit bao gồm chủ yếu trình tự axit amin như được chỉ ra ở đây, một hoặc hai axit amin có thể được trao đổi với các đối tác trao đổi bảo toàn của chúng (xem ở dưới đây) mà không có khả năng liên kết với phân tử phức hợp tương hợp mô chính người (MHC) lớp I hoặc lớp II bị thay đổi đáng kể hoặc bị ảnh hưởng tiêu cực, khi so sánh với peptit không biến đổi.

Phần dư axit amin không đóng góp đáng kể vào tương tác với thụ thể tế bào T có thể được sửa đổi bằng cách thay thế bằng các axit amin khác mà sự kết hợp của nó không ảnh hưởng đáng kể đến phản ứng tế bào T và không loại bỏ liên kết với MHC có liên quan.

Do đó, ngoài điều kiện đã cho, peptit theo sáng chế có thể là bất kỳ peptit nào (với giới hạn các tác giả sáng chế bao gồm oligopeptit hoặc polypeptit), bao gồm các trình tự axit amin hoặc một phần hoặc biến thể của chúng.

Bảng 9: Các biến thể và kiểu của các peptit theo ID SEQ số: 4, 8, 72, 74, 96 và 97

Vị trí	1	2	3	4	5	6	7	8	9		
ID SEQ số 4	Y	L	G	D	S	H	V	L	L		
Biến thể									V		
									I		
									A		
		M							V		
		M							I		
		M									
		M							A		
		A							V		
		A							I		
		A									
		A							A		
		V							V		
		V							I		
		V									
		V							A		

		T							V		
		T							I		
		T									
		T							A		
		Q							V		
		Q							I		
		Q									
		Q							A		
Vị trí	1	2	3	4	5	6	7	8	9		
ID SEQ 8	I	L	Q	S	L	V	P	A	A		
Biên thể									V		
									I		
									L		
		M							V		
		M							I		
		M							L		
		M									
		A							V		
		A							I		

		A							L		
		A									
		V							V		
		V							I		
		V							L		
		V									
		T							V		
		T							I		
		T							L		
		T									
		Q							V		
		Q							I		
		Q							L		
		Q									
Vị trí	1	2	3	4	5	6	7	8	9		
ID SEQ số 72	Y	L	S	F	I	K	I	L	L		
Biến thể									V		
									I		

								A		
	M							V		
	M							I		
	M									
	M							A		
	A							V		
	A							I		
	A									
	A							A		
	V							V		
	V							I		
	V									
	V							A		
	T							V		
	T							I		
	T									
	T							A		
	Q							V		
	Q							I		
	Q									

		Q							A		
Vị trí	1	2	3	4	5	6	7	8	9		
ID SEQ số 74	T	L	L	S	Y	S	I	P	L		
Biến thể									V		
									I		
									A		
		M							V		
		M							I		
		M									
		M							A		
		A							V		
		A							I		
		A									
		A							A		
		V							V		
		V							I		
		V									
		V							A		

		T							V		
		T							I		
		T									
		T							A		
		Q							V		
		Q							I		
		Q									
Vị trí	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
ID SEQ số 96	K	I	I	E	D	L	A	N	T	V	
Biến thể		L									
		L								I	
		L								L	
		L								A	
		M									
		M								I	
		M								L	
		M								A	

		A									
		A								I	
		A								L	
		A								A	
		V									
		V								I	
		V								L	
		V								A	
		T									
		T								I	
		T								L	
		T								A	
		Q									
		Q								I	
		Q								L	
		Q								A	
Vị trí	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
ID SEQ số 97	G	L	I	D	D	K	G	T	I	K	L

Biến thể										V
										I
										A
	M									V
	M									I
	M									
	M									A
	A									V
	A									I
	A									
	A									A
	V									V
	V									I
	V									
	V									A
	T									V
	T									I
	T									
	T									A
	Q									V

		Q								I
		Q								
		Q								A

Peptit dài hơn (kéo dài) cũng có thể phù hợp. Có thể các epitope MHC lớp I, mặc dù thường dài từ 8 đến 11 axit amin, được tạo ra bởi quá trình xử lý peptit từ các peptit hoặc protein dài hơn bao gồm các epitope thực. Tốt hơn là các phần dư bên cạnh các epitope thực là các phần dư không ảnh hưởng đáng kể đến sự phân tách protein cần thiết để tiếp xúc các epitope thực tế trong quá trình xử lý.

Các peptit theo sáng chế có thể được kéo dài bởi tối đa bốn axit amin, đó là 1, 2, 3 hoặc 4 axit amin có thể được thêm vào một trong hai kết hợp bất kỳ sự kết hợp nào giữa 4: 0 và 0: 4. Sự kết hợp của sự kéo dài theo sáng chế có thể được tìm thấy trong Bảng 10.

Bảng 10: Sự kết hợp của sự kéo dài của các peptit của sáng chế

Đầu cuối C	Đầu cuối 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 cuối N	Đầu cuối C
4	0

Đầu cuối C	Đầu cuối N
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 cho sự kéo dài/mở rộng có thể là các peptit của trình tự ban đầu của protein hoặc bất kỳ axit amin nào khác. Sự kéo dài có thể được sử dụng để tăng cường tính ổn định hoặc độ hòa tan của các peptit.

Do đó, các epitope theo sáng chế có thể giống hệt với các epitope liên quan đến khối u hoặc đặc hiệu của khối u xảy ra trong tự nhiên hoặc có thể bao gồm các epitope khác nhau không quá bốn phần dư từ peptit tham chiếu, miễn là chúng có hoạt tính kháng nguyên giống hệt nhau.

Trong phương án thay thế, peptit được kéo dài ở một hoặc cả hai bên nhờ lớn hơn 4 axit amin, tốt hơn là với tổng chiều dài lên tới 30 axit amin. Điều này có thể dẫn đến các peptit liên kết MHC lớp II. Liên kết với MHC lớp II có thể được kiểm tra bằng các phương pháp được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật.

Theo đó, sáng chế cung cấp các peptit và các biến thể của epitopes MHC lớp I, trong đó peptit hoặc biến thể có chiều dài tổng thể từ 8 đến 100, tốt hơn là từ 8 đến 30, và tốt nhất từ 8 đến 14, cụ thể là 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 axit amin, trong trường hợp các peptit liên kết lớp II được kéo dài, chiều dài cũng có thể là 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 hoặc 22 axit amin.

Tất nhiên, peptit hoặc biến thể theo sáng chế sẽ có khả năng liên kết với phân tử của phức hợp tương hợp mô chính ở người (MHC) lớp I hoặc II. Liên kết của peptit hoặc biến

thể của phức hợp MHC có thể được kiểm tra bằng các phương pháp được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật.

Tốt hơn là, khi các tế bào T đặc hiệu cho peptit theo sáng chế được thử nghiệm dựa vào các peptit được thay thế, nồng độ peptit mà tại đó các peptit được thay thế đạt được một nửa mức tăng phân giải tối đa so với nền là không quá 1 mM, tốt hơn là không nhiều hơn khoảng 1 μ M, tốt hơn nữa là không quá 1 nM, và tốt hơn nữa vẫn là không quá 100 pM, và tốt nhất là không quá 10 pM. Tốt hơn là peptit được thay thế được các tế bào T nhận ra từ nhiều hơn một cá thể, ít nhất là hai và tốt nhất là ba cá thể.

Trong phương án được ưu tiên cụ thể theo sáng chế, peptit bao gồm hoặc về cơ bản bao gồm chuỗi axit amin theo ID SEQ số 1 đến ID SEQ số 101.

"Về cơ bản bao gồm", có nghĩa là peptit theo sáng chế, ngoài trình tự theo ID bất kỳ trong số ID SEQ số 1 đến ID SEQ số 101 hoặc biến thể của chúng có chứa phần kéo dài axit amin nằm ở các đầu cuối N- và/hoặc C không nhất thiết phải là phần của peptit có chức năng như epitope cho epitope phân tử MHC.

Tuy nhiên, những phần kéo dài này có thể rất quan trọng để cung cấp việc đưa hiệu quả peptit theo sáng chế vào các tế bào. Theo một phương án của sáng chế, peptit là một phần của protein dung hợp, ví dụ, bao gồm các axit amin đầu cuối N 80 của chuỗi bất biến liên quan đến kháng nguyên HLA-DR (trang 33, trong phần sau của "Ii") có nguồn gốc từ NCBI, GenBank Accession số X00497. Trong các kết hợp khác, các peptit theo sáng chế có thể được dung hợp với kháng thể như được mô tả trong tài liệu này, hoặc một phần chức năng của chúng, đặc biệt thành trình tự của kháng thể, để mà được nhắm đích cụ thể bởi kháng thể nói trên, hoặc, ví dụ, đến hoặc vào kháng thể dành riêng cho các tế bào đuôi gai như được mô tả trong tài liệu này.

Ngoài ra, peptit hoặc biến thể có thể được biến đổi thêm để cải thiện tính ổn định và/hoặc liên kết với các phân tử MHC để tạo ra đáp ứng miễn dịch mạnh hơn. Các phương pháp tối ưu hóa trình tự peptit như vậy đã được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật và bao gồm, ví dụ, đưa ra các liên kết peptit ngược hoặc liên kết không peptit.

Trong liên kết peptit ngược, phần dư axit amin không được nối với nhau bằng liên kết peptit ($-\text{CO}-\text{NH}-$) mà liên kết peptit bị đảo ngược. Các peptidomimetic đảo lộn lại phía sau như vậy có thể được thực hiện bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật, ví dụ như các phương pháp được mô tả trong Meziere và cộng sự (1997) (Meziere et al., 1997), được kết hợp trong tài liệu này để tham khảo. Cách tiếp cận này liên quan đến việc tạo ra các pseudopeptit có chứa các thay đổi liên quan đến xương sống và không phải là hướng đến chuỗi bên. Meziere et al. (Meziere et al., 1997) cho thấy đối với các đáp ứng của tế bào trợ giúp T và liên kết MHC, các pseudopeptit này rất hữu ích. Các peptit nghịch đảo về sau, có chứa các liên kết $\text{NH}-\text{CO}$ thay vì các liên kết peptit $\text{CO}-\text{NH}$, có khả năng chống phân giải protein cao hơn nhiều.

Liên kết không peptit là, ví dụ, $-\text{CH}_2-\text{NH}$, $-\text{CH}_2\text{S}-$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{CH}=\text{CH}-$, $-\text{COCH}_2-$, $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$, and $-\text{CH}_2\text{SO}-$. Patent Mỹ số 4.897.445 đề xuất phương pháp tổng hợp pha rắn các liên kết không peptit ($-\text{CH}_2-\text{NH}$) trong chuỗi polypeptit liên quan đến polypeptit được tổng hợp theo quy trình chuẩn và liên kết không peptit được tổng hợp bằng phản ứng amin aldehyd và axit amin với sự có mặt của NaCNBH_3 .

Các peptit bao gồm các trình tự được mô tả ở trên có thể được tổng hợp với các nhóm hóa học bổ sung có trong amino và/hoặc carboxy termini của chúng, để tăng cường tính ổn định, sinh khả dụng và/hoặc ái lực của các peptit. Ví dụ, các nhóm kỵ nước như carbobenzoxy, dansyl hoặc t-butyloxycarbonyl có thể được thêm vào các đầu cuối amino của peptit. Tương tự như vậy, nhóm acetyl hoặc nhóm 9-fluorenylmethoxy-carbonyl có thể được đặt tại các đầu cuối amino của peptit. Ngoài ra, nhóm kỵ nước, t-butyloxycarbonyl hoặc nhóm amido có thể được thêm vào các đầu cuối carboxy của peptit.

Hơn nữa, các peptit theo sáng chế có thể được tổng hợp để thay đổi cấu trúc không gian của chúng. Ví dụ, đồng phân D của một hoặc nhiều phần dư axit amin của peptit có thể được sử dụng, chứ không phải là đồng phân L thông thường. Hơn nữa, ít nhất một trong các phần dư axit amin của các peptit theo sáng chế có thể được thay thế bằng một trong những phần dư axit amin không xảy ra trong tự nhiên đã biết. Những thay đổi như

thể này có thể đóng vai trò để tăng tính ổn định, độ sinh khả dụng và/hoặc hoạt động liên kết của các peptit theo sáng chế.

Tương tự, peptit hoặc biến thể theo sáng chế có thể được thay đổi về mặt hóa học bằng cách phản ứng với các axit amin cụ thể trước hoặc sau khi tổng hợp peptit. Các ví dụ về các sửa đổi như vậy đã biết trong tình trạng kỹ thuật và được tóm tắt, ví dụ trong tài liệu R. Lundblad, *Chemical Reagents for Protein Modification*, 3rd ed. CRC Press, 2004 (Lundblad, 2004), được kết hợp ở đây để tham khảo. Sự thay đổi hóa học các axit amin bao gồm nhưng không giới hạn ở, thay đổi bằng cách acyl hóa, amid hóa, pyridoxyl hóa lysine, kiềm hóa khử, trinitrobenzyl hóa các nhóm amino với axit sulphonic 2,4,6-trinitrobenzene (TNBS), thay đổi amide của nhóm carboxyl và thay đổi sulphhydryl bằng cách thực hiện oxy hóa axit cysteine thành axit cysteic, hình thành các dẫn xuất thủy ngân, hình thành các disulphide hỗn hợp với các hợp chất thiol khác, phản ứng với maleimide, carboxymethyl hóa với axit iodoacetic hoặc iodoacetamide và carbamoylation với cyanate tại pH kiềm, mặc dù không có giới hạn nào ở đây. Về vấn đề này, người có hiểu biết trong lĩnh vực kỹ thuật có thể tham khảo tại chương 15 của tài liệu *Current Protocols In Protein Science*, Eds. Makarov và cộng sự. (John Wiley and Sons NY 1995-2000) (Coligan et al., 1995) cho phương pháp sâu rộng hơn liên quan đến thay đổi hóa học của protein.

Tóm lại, thay đổi ví dụ phần dư arginyl trong các protein thường dựa trên phản ứng của các hợp chất dicarbonyl lân cận như phenylglyoxal, 2,3-butanedione và 1,2-cyclohexanedione để tạo thành sản phẩm cộng. Ví dụ khác là phản ứng của methylglyoxal với phần dư arginine. Cysteine có thể được sửa đổi mà không cần sửa đổi đồng thời các vị trí nucleophilic khác như lysine và histidine. Kết quả là, một số lượng lớn chất phản ứng có sẵn để điều chỉnh cysteine. Các trang web của các công ty như Sigma-Aldrich (<http://www.sigma-aldrich.com>) cung cấp thông tin về các chất phản ứng cụ thể.

Khử chọn lọc liên kết disulfide trong protein cũng phổ biến. Các liên kết disulfide có thể được hình thành và oxy hóa trong quá trình xử lý nhiệt của dược phẩm sinh học. Chất phản ứng Woodward K có thể được sử dụng để thay đổi phần dư axit glutamic cụ thể. N-(3-(dimethylamino)propyl)-N'-ethylcarbodiimide có thể được sử dụng để hình thành các

liên kết chéo trong phân tử phần dư lysine và phần dư axit glutamic. Ví dụ, diethylpyrocarbonate là chất phản ứng để điều chỉnh phần dư histidyl trong protein. Histidine cũng có thể được biến đổi bằng cách sử dụng 4-hydroxy-2-nonenal. Phản ứng của phần dư lysine và các nhóm α -amino khác, ví dụ, rất hữu ích trong việc liên kết các peptit với các bề mặt hoặc liên kết chéo của protein/peptit. Lysine là vị trí gắn glycol poly (etylen) và là vị trí biến đổi chính trong quá trình glycosyl hóa protein. Các phần dư methionine trong protein có thể được biến đổi với ví dụ, iodoacetamide, bromoethylamine và chloramine T.

Tetranitromethane và N-acetylimidazole có thể được sử dụng để biến đổi phần dư tyrosyl. Liên kết chéo thông qua sự hình thành của dityrosine có thể được thực hiện bằng các ion hydro peroxide/đồng.

Các nghiên cứu gần đây về việc biến đổi tryptophan đã sử dụng N-bromosuccinimide, 2-hydroxy-5-nitrobenzyl bromide hoặc 3-bromo-3-methyl-2- (2-nitrophenylmercapto) -3H-indole (BPNS-skatole).

Biến đổi thành công liệu pháp protein và peptit bằng PEG thường liên quan đến việc kéo dài chu kỳ bán hủy trong khi liên kết chéo của protein với glutaraldehyd, polyethylen glycol diacryit và formaldehyd được sử dụng để điều chế hydrogel. Biến đổi hóa học của chất gây dị ứng cho liệu pháp miễn dịch thường đạt được bằng cách carbamyl hóa với kali cyanate.

Peptit hoặc biến thể, trong đó peptit được biến đổi hoặc bao gồm các liên kết không peptit là phương án được ưu tiên của sáng chế.

Phương án khác theo sáng chế liên quan đến peptit không xảy ra trong tự nhiên trong đó peptit đã nêu bao gồm hoặc chủ yếu bao gồm trình tự axit amin theo ID SEQ số 1 đến ID SEQ số 101 và đã được sản xuất theo cách tổng hợp (ví dụ: được tổng hợp) dưới dạng muối được dụng. Các phương pháp để sản xuất theo cách tổng hợp các peptit đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật. Các muối của các peptit theo sáng chế về cơ bản khác với các peptit ở trạng thái *in vivo* của chúng, vì các peptit khi được tạo ra *in vivo* không phải là

muối. Dạng muối không tự nhiên của peptit làm điều hòa khả năng hòa tan của peptit, cụ thể là trong phạm vi của các chế phẩm được phẩm bao gồm các peptit, ví dụ: các vắc xin peptit như được bộc lộ ở đây. Độ hòa tan đủ và ít nhất là đáng kể của (các) peptit là cần thiết để cung cấp hiệu quả các peptit cho đối tượng cần xử lý. Tốt hơn là, các muối là muối được dụng của các peptit. Các muối này theo sáng chế bao gồm các muối kiềm và kiềm thổ như muối của loạt Hofmeister bao gồm các anion PO_4^{3-} , SO_4^{2-} , CH_3COO^- , Cl^- , Br^- , NO_3^- , ClO_4^- , I^- , SCN^- và cation như NH_4^+ , Rb^+ , K^+ , Na^+ , Cs^+ , Li^+ , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} và Ba^{2+} . Các muối cụ thể được chọn từ nhóm gồm $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$, NH_4Cl , NH_4Br , NH_4NO_3 , NH_4ClO_4 , NH_4I , NH_4SCN , Rb_3PO_4 , Rb_2HPO_4 , RbH_2PO_4 , Rb_2SO_4 , $\text{Rb}_4\text{CH}_3\text{COO}$, Rb_4Cl , Rb_4Br , Rb_4NO_3 , Rb_4ClO_4 , Rb_4I , Rb_4SCN , K_3PO_4 , K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , K_2SO_4 , KCH_3COO , KCl , KBr , KNO_3 , KClO_4 , KI , KSCN , Na_3PO_4 , Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , Na_2SO_4 , NaCH_3COO , NaCl , NaBr , NaNO_3 , NaClO_4 , NaI , NaSCN , ZnCl_2 , Cs_3PO_4 , Cs_2HPO_4 , CsH_2PO_4 , Cs_2SO_4 , CsCH_3COO , CsCl , CsBr , CsNO_3 , CsClO_4 , CsI , CsSCN , Li_3PO_4 , Li_2HPO_4 , LiH_2PO_4 , Li_2SO_4 , LiCH_3COO , LiCl , LiBr , LiNO_3 , LiClO_4 , LiI , LiSCN , Cu_2SO_4 , $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$, Mg_2HPO_4 , $\text{Mg}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$, Mg_2SO_4 , $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, MgCl_2 , MgBr_2 , $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$, MgI_2 , $\text{Mg}(\text{SCN})_2$, MnCl_2 , $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, Ca_2HPO_4 , $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$, CaSO_4 , $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, CaCl_2 , CaBr_2 , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Ca}(\text{ClO}_4)_2$, CaI_2 , $\text{Ca}(\text{SCN})_2$, $\text{Ba}_3(\text{PO}_4)_2$, Ba_2HPO_4 , $\text{Ba}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$, BaSO_4 , $\text{Ba}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, BaCl_2 , BaBr_2 , $\text{Ba}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Ba}(\text{ClO}_4)_2$, BaI_2 , and $\text{Ba}(\text{SCN})_2$. Cụ thể tốt hơn là NH acetate, MgCl_2 , KH_2PO_4 , Na_2SO_4 , KCl , NaCl , và CaCl_2 , chẳng hạn, ví dụ, các muối (trifluoroacetate) clorua hoặc acetate.

Thông thường, peptit và các biến thể (ít nhất là chúng chứa các liên kết peptit giữa các phần dư axit amin) có thể được tổng hợp theo chế độ Fmoc-polyamide của tổng hợp peptit pha rắn như được bộc lộ bởi Lukas và cộng sự (Lukas et al., 1981) và bởi các tài liệu tham khảo như được trích dẫn ở đây. Bảo vệ nhóm N-amino tạm thời được cấp bởi nhóm 9-fluorenylmethyloxycarbonyl (Fmoc). Sự phân hủy lặp đi lặp lại của nhóm bảo vệ có tính bazơ rất không bền này được thực hiện bằng cách sử dụng 20% piperidine trong N, N-dimethylformamide. Các chức năng chuỗi bên có thể được bảo vệ như ete butyl của

chúng (trong trường hợp serine threonine và tyrosine), các butyl este (trong trường hợp axit glutamic và axit aspartic), dẫn xuất butyloxycarbonyl (trong trường hợp lysine và histidine), trityl derivative (trong trường hợp của cysteine) và dẫn xuất 4-methoxy-2,3,6-trimethylbenzenesulphonyl (trong trường hợp arginine). Trong đó glutamine hoặc asparagine là phần dư đầu cuối C, việc sử dụng được tạo ra từ nhóm 4,4'-dimethoxybenzhydryl để bảo vệ các chức năng amido chuỗi bên. Sự hỗ trợ pha rắn dựa trên polyme polydimethyl-acrylamide được cấu thành từ ba monome dimethylacrylamide (xương sống-monome), bisacryloylethylene diamine (liên kết chéo) và acryloylsarcosine methyl ester (tác nhân chức năng hóa). Các tác nhân liên kết có thể phân tách peptit và chất dẻo được sử dụng là dẫn xuất axit 4-hydroxymethyl-phenoxyacetic có tính axit không bền. Tất cả các dẫn xuất axit amin được thêm vào như các dẫn xuất anhydrid đối xứng được tạo hình trước của chúng ngoại trừ asparagine và glutamine, được thêm vào bằng cách sử dụng quy trình ghép nối trung gian N-dicyclohexylcarbodiimide/1hydroxybenzotriazole, N nghịch đảo. Tất cả các phản ứng ghép và khử bảo vệ được theo dõi bằng cách sử dụng ninhydrin, axit trinitrobenzene sulphonic hoặc quy trình thử nghiệm isotin. Sau khi hoàn thành tổng hợp, các peptit được tách ra khỏi sự hỗ trợ của chất dẻo với việc loại bỏ đồng thời các nhóm bảo vệ chuỗi bên bằng cách xử lý với axit trifluoroacetic nồng độ 95% có chứa hỗn hợp chất làm sạch nồng độ 50%. Chất làm sạch thường được sử dụng bao gồm ethanedithiol, phenol, anisole và nước, sự lựa chọn chính xác tùy thuộc vào các axit amin cấu thành của peptit được tổng hợp. Ngoài ra, có thể kết hợp các phương pháp pha rắn và pha lỏng để tổng hợp peptit (xem, ví dụ, (Bruckdorfer et al., 2004), và các tài liệu tham khảo như được trích dẫn trong đó).

Axit trifluoroacetic được loại bỏ bằng cách bay hơi trong chân không, với quá trình nghiền sau đó với diethyl ete cung cấp peptit thô. Bất kỳ chất làm sạch nào có mặt đều được loại bỏ bằng quy trình chiết xuất đơn giản, trong quá trình đông khô pha nước cung cấp peptit thô không có chất làm sạch. Chất phản ứng để tổng hợp peptit thường có sẵn từ ví dụ Calbiochem-Novabiochem (Nottingham, Vương quốc Anh).

Việc tinh sạch có thể được thực hiện bởi bất kỳ một hoặc kết 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) sắc ký lỏng hiệu năng cao pha ngược sử dụng, ví dụ tách theo gradien axetonitril/nước.

Phân tích các peptit có thể được thực hiện bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng, điện di, đặc biệt là điện di mao quản, chiết pha rắn (CSPE), sắc ký lỏng hiệu năng cao pha ngược, phân tích axit amin sau khi thủy phân axit và phân tích khối phổ bắn phá khối nguyên tử nhanh (fast atom bombardment-FAB) , cũng như phân tích khối phổ MALDI và ESI-Q-TOF.

Để chọn các peptit được trình diện quá mức, cấu hình trình diện được tính toán hiển thị trình diện mẫu trung bình cũng như sao chép biến thể. Các đường bao liên kết các mẫu của thực thể khối u quan tâm đến đường cơ sở của các mẫu mô bình thường. Mỗi đường bao này sau đó có thể được hợp nhất thành vết cắt trình diện quá mức bằng cách tính giá trị p của mô hình hiệu ứng hỗn hợp tuyến tính (Pinheiro et al., 2015) điều chỉnh cho nhiều thử nghiệm theo tỷ lệ khám phá sai (Benjamini and Hochberg, 1995) (cf. ví dụ 1, Fig. 1).

Để xác định và định lượng tương đối các phối tử HLA bằng khối phổ, các phân tử HLA từ các mẫu mô đông lạnh đã được tinh sạch và các peptit liên quan đến HLA được phân lập. Các peptit được phân lập đã được tách ra và các trình tự được xác định bằng các thí nghiệm sắc ký lỏng khối phổ ion hóa điện tử nano (nanoESI) trực tuyến (LC-MS). Các trình tự peptit thu được đã được xác minh bằng cách so sánh mẫu phân mảnh của các peptit liên quan đến khối u (tumor-associated peptit-TUMAP) trong tự nhiên được ghi nhận từ các mẫu bệnh bạch cầu dòng tủy cấp tính, ung thư vú, ung thư biểu mô tế bào đường mật, bệnh bạch cầu lympho bào mạn tính, ung thư đại trực tràng, ung thư túi mật, u nguyên bào đệm, ung thư dạ dày, ung thư dạ dày thực quản, ung thư biểu mô tế bào gan, ung thư biểu mô tế bào vảy vùng đầu cổ, khối u ác tính, ung thư hạch không Hodgkin, ung thư phổi không phải tế bào nhỏ, ung thư buồng trứng, ung thư thực quản, ung thư tuyến tụy, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư biểu mô tế bào thận, ung thư phổi tế bào nhỏ,

ung thư biểu mô bàng quang và ung thư nội mạc tử cung (N=490 mẫu) với các mẫu phân mảnh của các peptit tham chiếu tổng hợp tương ứng của các trình tự giống hệt nhau. Do các peptit được xác định trực tiếp là phối tử của các phân tử HLA của khối u nguyên phát, những kết quả này cung cấp bằng chứng trực tiếp cho quá trình xử lý tự nhiên và trình diện các peptit được xác định trên mô ung thư nguyên phát thu được từ các bệnh nhân bệnh bạch cầu dòng tủy cấp tính, ung thư vú, ung thư biểu mô tế bào đường mật, bệnh bạch cầu tế bào lympho mạn tính, ung thư đại trực tràng, ung thư túi mật, u nguyên bào đệm, ung thư dạ dày, ung thư đường dạ dày thực quản, ung thư biểu mô tế bào gan, ung thư biểu mô tế bào vảy vùng đầu và cổ, khối u ác tính, ung thư hạch không Hodgkin, ung thư phổi không phải tế bào nhỏ, ung thư buồng trứng, ung thư tuyến tụy, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư biểu mô tế bào thận, ung thư phổi tế bào nhỏ, ung thư biểu mô bàng quang tiết niệu và ung thư nội mạc tử cung.

Đường ống khám phá XPRESIDENT® v2.1 (xem, ví dụ, tài liệu US 2013-0096016, được kết hợp trong bản mô tả này bằng cách tham chiếu toàn bộ) cho phép xác định và lựa chọn các ứng cử viên vắc xin peptit được trình diện quá mức có liên quan dựa trên định lượng tương đối trực tiếp của các mức peptit bị giới hạn HLC trên các mô ung thư so với một số mô và cơ quan không ung thư khác nhau. Điều này đạt được bằng cách phát triển định lượng vi sai không đánh dấu bằng cách sử dụng dữ liệu LC-MS thu được được xử lý bằng đường ống phân tích dữ liệu độc quyền, kết hợp các thuật toán để nhận dạng trình tự, phân cụm phổ, đếm ion, căn chỉnh thời gian lưu, giải chấp trạng thái tích điện và chuẩn hóa

Thông tin trình tự bổ sung từ các tài nguyên công cộng (Olexiouk et al., 2016; Subramanian et al., 2011) đã được tích hợp vào đường ống khám phá XPRESIDENT® để cho phép xác định TUMAP từ nguồn gốc không chính xác. Giải trình tự De-novo được sử dụng trong chiến lược tìm kiếm độc lập với cơ sở dữ liệu trực giao để xác định trình tự peptit của các cụm phổ đặc trưng cho khối u, như được xác định bởi XPRESIDENT®. Do đó, các TUMAP mới mà không cần tham chiếu trực tiếp trong cơ sở dữ liệu hệ hoặc hệ protein của người có thể được xác định. Các mức trình diện bao gồm ước tính lỗi cho

từng peptit và mẫu đã được thiết lập. Peptit được trình diện dành riêng trên mô khối u và các peptit được trình diện quá mức trong khối u so với các mô và cơ quan không ung thư đã được xác định.

Các phức hợp peptit HLA từ các mẫu mô bệnh bạch cầu dòng tủy cấp tính, ung thư vú, ung thư biểu mô tế bào đường mật, bệnh bạch cầu lympho bào mạn tính, ung thư đại trực tràng, ung thư túi mật, u nguyên bào đệm, ung thư dạ dày, ung thư dạ dày thực quản, ung thư biểu mô tế bào gan, ung thư biểu mô tế bào vảy vùng đầu cổ, khối u ác tính, ung thư hạch không Hodgkin, ung thư phổi không phải tế bào nhỏ, ung thư buồng trứng, ung thư thực quản, ung thư tuyến tụy, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư biểu mô tế bào thận, ung thư phổi tế bào nhỏ, ung thư biểu mô bàng quang và ung thư nội mạc tử cung đã được tinh sạch và các peptit liên quan đến HLA được phân lập và phân tích bằng LC-MS (xem ví dụ 1). Tất cả các TUMAP có trong sáng chế đã được xác định bằng phương pháp này trên các mẫu bệnh bạch cầu dòng tủy cấp tính, ung thư vú, ung thư biểu mô tế bào đường mật, bệnh bạch cầu tế bào lympho mạn tính, ung thư đại trực tràng, ung thư túi mật, u nguyên bào đệm, ung thư dạ dày, ung thư dạ dày thực quản, ung thư biểu mô tế bào gan, ung thư biểu mô tế bào vảy vùng đầu và cổ, khối u ác tính, ung thư hạch không Hodgkin, ung thư phổi không phải tế bào nhỏ, ung thư buồng trứng, ung thư thực quản, ung thư tuyến tụy, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư biểu mô tế bào thận, ung thư phổi tế bào nhỏ, ung thư bàng quang tiết niệu, ung thư nội mạc tử cung xác nhận sự trình diện của chúng trên bệnh bạch cầu dòng tủy cấp tính, ung thư vú, ung thư biểu mô tế bào đường mật, ung thư bạch cầu tế bào lympho mạn tính, ung thư đại trực tràng, ung thư túi mật, u nguyên bào đệm, ung thư dạ dày, ung thư dạ dày thực quản, ung thư biểu mô tế bào gan, ung thư biểu mô tế bào vảy vùng đầu và cổ, khối u ác tính, ung thư hạch không Hodgkin, ung thư phổi không phải tế bào nhỏ, ung thư buồng trứng, ung thư thực quản, ung thư tuyến tụy, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư biểu mô tế bào thận, ung thư phổi tế bào nhỏ, ung thư bàng quang tiết niệu, ung thư nội mạc tử cung.

TUMAP được xác định trên nhiều bệnh bạch cầu dòng tủy cấp tính, ung thư vú, ung thư biểu mô tế bào đường mật, bệnh bạch cầu lympho bào mạn tính, ung thư đại trực

tràng, ung thư túi mật, u nguyên bào đệm, ung thư dạ dày, ung thư dạ dày thực quản, ung thư biểu mô tế bào gan, ung thư biểu mô tế bào vảy vùng đầu cổ, khối u ác tính, ung thư hạch không Hodgkin, ung thư phổi không phải tế bào nhỏ, ung thư buồng trứng, ung thư thực quản, ung thư tuyến tụy, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư biểu mô tế bào thận, ung thư phổi tế bào nhỏ, ung thư biểu mô bàng quang và ung thư nội mạc tử cung và các mô bình thường được định lượng bằng cách sử dụng đếm ion dữ liệu LC-MS không đánh dấu. Phương pháp giả định rằng các vùng tín hiệu LC-MS của peptit tương quan với sự dồi dào của nó trong mẫu. Tất cả các tín hiệu định lượng của peptit trong các thử nghiệm LC-MS khác nhau đã được chuẩn hóa dựa trên xu hướng trung tâm, tính trung bình trên mỗi mẫu và được hợp nhất vào một biểu đồ thanh, được gọi là kết cấu trình diện. Kết cấu trình diện hợp nhất các phương pháp phân tích khác nhau như tìm kiếm cơ sở dữ liệu protein, phân cụm phổ, giải chấp trạng thái tích điện (giải tích điện) và căn chỉnh thời gian lưu và chuẩn hóa.

Hơn nữa, đường ống khám phá XPRESIDENT® cho phép định lượng tuyệt đối trực tiếp MHC-, tốt nhất là mức peptit bị giới hạn HLA đối với bệnh ung thư hoặc các mô bị nhiễm bệnh khác. Tóm lại, việc đếm tế bào tổng số được tính từ tổng hàm lượng ADN của mẫu mô được phân tích. Tổng lượng peptit cho TUMAP trong mẫu mô được đo bằng LC-MS/MS nano theo tỷ lệ của TUMAP tự nhiên và lượng bản TUMAP được đánh dấu đồng vị đã biết, được gọi là tiêu chuẩn nội bộ. Hiệu quả của phân lập TUMAP được xác định bằng cách tăng đột biến peptit: các phức hợp MHC của tất cả các TUMAP được chọn vào phân giải mô tại điểm sớm nhất có thể của quy trình phân lập TUMAP và phát hiện chúng bằng nano LC-MS/MS sau khi hoàn thành quy trình phân lập peptit. Đếm tổng số tế bào và lượng tổng số peptit đã được tính toán từ các phép đo ba lần trên mỗi mẫu mô. Hiệu suất phân lập đặc hiệu peptit được tính trung bình từ 9 thử nghiệm tăng đột biến, mỗi thí nghiệm được đo là ba lần (xem ví dụ 6 và Bảng 15).

Bên cạnh việc trình diện quá mức của peptit, biểu hiện mRNA của gen cơ bản đã được thử nghiệm. Dữ liệu mRNA thu được thông qua các phân tích ARNSeq của các mô bình thường và các mô ung thư (xem ví dụ 2, hình 2). Một nguồn bổ sung của dữ liệu mô

bình thường là cơ sở dữ liệu về dữ liệu biểu hiện ARN có sẵn công khai từ khoảng 3000 mẫu mô bình thường (Lonsdale, 2013). Các peptit có nguồn gốc từ protein có mARN mã hóa được biểu hiện cao trong mô ung thư, nhưng rất thấp hoặc không có trong các mô bình thường quan trọng, tốt nhất là được đưa vào sáng chế.

Sáng chế đề xuất các peptit mà hữu ích trong điều trị ung thư/khối u, tốt hơn là bệnh bạch cầu dòng tủy cấp tính, ung thư vú, ung thư biểu mô tế bào đường mật, bệnh bạch cầu lympho bào mạn tính, ung thư đại trực tràng, ung thư túi mật, u nguyên bào đệm, ung thư dạ dày, ung thư dạ dày thực quản, ung thư biểu mô tế bào gan, ung thư biểu mô tế bào vảy vùng đầu cổ, khối u ác tính, ung thư hạch không Hodgkin, ung thư phổi không phải tế bào nhỏ, ung thư buồng trứng, ung thư thực quản, ung thư tuyến tụy, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư biểu mô tế bào thận, ung thư phổi tế bào nhỏ, ung thư biểu mô bàng quang và ung thư nội mạc tử cung mà trình diện quá mức hoặc dành riêng các peptit của sáng chế. Các peptit này đã được thể hiện bằng khối phổ sẽ được trình diện theo cách tự nhiên bởi các phân tử HLA trên các mẫu bệnh bạch cầu dòng tủy cấp tính, ung thư vú, ung thư biểu mô tế bào đường mật, bệnh bạch cầu tế bào lympho mạn tính, ung thư đại trực tràng, ung thư túi mật, u nguyên bào đệm, ung thư dạ dày, ung thư dạ dày thực quản, ung thư biểu mô tế bào gan, ung thư biểu mô tế bào vảy vùng đầu và cổ, khối u ác tính, ung thư hạch không Hodgkin, ung thư phổi không phải tế bào nhỏ, ung thư buồng trứng, ung thư tuyến tụy, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư biểu mô tế bào thận, ung thư phổi tế bào nhỏ, ung thư biểu mô bàng quang tiết niệu và ung thư nội mạc tử cung nguyên phát ở người.

Nhiều gen/protein nguồn (cũng được chỉ là protein có chiều dài đầy đủ, hoặc protein cơ bản), từ đó các peptit có nguồn gốc đã thể hiện là biểu hiện quá mức ở mức cao trong bệnh ung thư so với các mô bình thường - "các mô bình thường" có liên quan đến sáng chế có nghĩa là các tế bào máu, não, tim, gan, phổi, mô mỡ, tuyến thượng thận, ống mật, bàng quang, tủy xương, thực quản, mắt, túi mật, đầu & cổ, ruột già, ruột non, thận, hạch bạch huyết, dây thần kinh trung ương, dây thần kinh ngoại vi, tuyến tụy, tuyến cận giáp, phúc mạc, tuyến yên, màng phổi, cơ xương, da, tủy sống, lá lách, dạ dày, tuyến giáp, khí quản và niệu quản khỏe mạnh hoặc các tế bào mô bình thường khác, cho thấy mức độ liên

kết khối u cao của các gen nguồn (xem ví dụ 2). Hơn nữa, bản thân các peptit được trình diện quá mức một cách mạnh mẽ trên mô khối u - "mô khối u" có liên quan đến sáng chế này có nghĩa là mẫu từ bệnh nhân bị các mẫu bệnh bạch cầu dòng tủy cấp tính, ung thư vú, ung thư biểu mô tế bào đường mật, bệnh bạch cầu tế bào lympho mạn tính, ung thư đại trực tràng, ung thư túi mật, u nguyên bào đệm, ung thư dạ dày, ung thư dạ dày thực quản, ung thư biểu mô tế bào gan, ung thư biểu mô tế bào vảy vùng đầu và cổ, khối u ác tính, ung thư hạch không Hodgkin, ung thư phổi không phải tế bào nhỏ, ung thư buồng trứng, ung thư thực quản, ung thư tuyến tụy, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư biểu mô tế bào thận, ung thư phổi tế bào nhỏ, ung thư biểu mô bàng quang tiết niệu và ung thư nội mạc tử cung nhưng không phải trên các mô bình thường (xem ví dụ 1).

Các peptit liên kết HLA có thể được hệ thống miễn dịch, đặc biệt là các tế bào lympho T nhận ra. Các tế bào T có thể phá hủy các tế bào trình diện phức hợp HLA/peptit được nhận ra, ví dụ các tế bào bệnh bạch cầu dòng tủy cấp tính, ung thư vú, ung thư biểu mô tế bào đường mật, bệnh bạch cầu tế bào lympho mạn tính, ung thư đại trực tràng, ung thư túi mật, u nguyên bào đệm, ung thư dạ dày, ung thư dạ dày thực quản, ung thư biểu mô tế bào gan, ung thư biểu mô tế bào vảy vùng đầu và cổ, khối u ác tính, ung thư hạch không Hodgkin, ung thư phổi không phải tế bào nhỏ, ung thư buồng trứng, ung thư thực quản, ung thư tuyến tụy, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư biểu mô tế bào thận, ung thư phổi tế bào nhỏ, ung thư biểu mô bàng quang tiết niệu và ung thư nội mạc tử cung trình diện các peptit được dẫn ra.

Các peptit theo sáng chế đã được chứng minh là có khả năng kích thích đáp ứng của tế bào T và/hoặc được trình diện quá mức và do đó có thể được sử dụng để tạo ra kháng thể và/hoặc TCR, như TCR hòa tan, theo sáng chế (xem ví dụ 3). Hơn nữa, các peptit khi được tạo phức với MHC tương ứng cũng có thể được sử dụng để sản xuất kháng thể và/hoặc TCR, đặc biệt là sTCR, theo sáng chế. Các phương pháp tương ứng được biết đến với người có hiểu biết và cũng có thể được tìm thấy trong các tài liệu tương ứng (xem thêm bên dưới). Do đó, các peptit theo sáng chế rất hữu ích để tạo ra đáp ứng miễn dịch ở bệnh nhân nhờ đó các tế bào khối u có thể bị phá hủy. Đáp ứng miễn dịch ở bệnh nhân có

thể được gây ra bằng cách sử dụng trực tiếp các peptit được mô tả hoặc các chất tiền chất phù hợp (ví dụ như peptit được kéo dài, protein hoặc axit nucleic mã hóa các peptit này) cho bệnh nhân, lý tưởng là kết hợp với tác nhân tăng cường khả năng gây miễn dịch (nghĩa là tá chất). Đáp ứng miễn dịch có nguồn gốc từ việc tiêm vắc xin trị liệu như vậy có thể được dự kiến là đặc hiệu cao đối với các tế bào khối u vì các peptit đích theo sáng chế không được trình diện trên các mô bình thường với số lượng bản sao tương đương, ngăn ngừa nguy cơ phản ứng tự miễn không mong muốn chống lại các tế bào bình thường trong bệnh nhân.

Mô tả hiện tại liên quan đến các thụ thể tế bào T (T-cell receptor-TCR) bao gồm chuỗi alpha và chuỗi beta (TCRs alpha/beta). Cũng được cung cấp là các peptit theo sáng chế có khả năng liên kết với TCR và kháng thể khi được trình diện bởi phân tử MHC.

Sáng chế cũng liên quan đến các phân đoạn TCR theo sáng chế có khả năng liên kết với kháng nguyên peptit theo sáng chế khi được trình diện bởi phân tử HLA. Giới hạn này đặc biệt liên quan đến các phân đoạn TCR hòa tan, ví dụ như các TCR thiếu các phần xuyên màng và/hoặc các vùng không đổi, các TCR chuỗi đơn và các dung hợp của nó, ví dụ như với Ig.

Sáng chế cũng liên quan đến axit nucleic, vector và tế bào chủ để biểu hiện các TCR và peptit theo sáng chế; và các phương pháp sử dụng chúng.

Thuật ngữ "thụ thể tế bào T" (được viết tắt là TCR) đề cập đến phân tử dị thể bao gồm chuỗi alpha polypeptit (chuỗi alpha) và chuỗi polypeptit beta (chuỗi beta), trong đó thụ thể dị thể có khả năng liên kết với kháng nguyên peptit được trình diện bởi phân tử HLA. Thuật ngữ này cũng bao gồm cái gọi là các TCR gamma/delta.

Trong một phương án, nội dung mô tả cung cấp phương pháp tạo ra TCR như được mô tả trong tài liệu này, phương pháp bao gồm nuôi cấy tế bào chủ có khả năng biểu hiện TCR trong các điều kiện phù hợp để thúc đẩy biểu hiện TCR.

Nội dung mô tả ở khía cạnh khác liên quan đến các phương pháp theo nội dung mô tả, trong đó kháng nguyên được tải lên các phân tử MHC lớp I hoặc II được biểu hiện trên

bề mặt của tế bào trình diện kháng nguyên phù hợp hoặc tế bào trình diện kháng nguyên nhân tạo bằng cách tiếp xúc với một lượng kháng nguyên vừa đủ với tế bào trình diện kháng nguyên hoặc kháng nguyên được tải lên các bốn phần MHC lớp I hoặc II bằng cách chia làm bốn các monome phức hợp MHC lớp I hoặc II/kháng nguyên.

Chuỗi alpha và beta của các TCR alpha/beta, và chuỗi gamma và delta của các gamma/delta TCR, thường được coi là mỗi chuỗi có hai "miền", cụ thể là miền biến thiên và miền bất biến. Miền biến thiên bao gồm kết hợp của vùng biến thiên (V) và vùng nối (J). Miền biến thiên cũng có thể bao gồm vùng chỉ huy (L). Chuỗi beta và delta cũng có thể bao gồm khu vực đa dạng (D). Các miền bất biến alpha và beta cũng có thể bao gồm các miền xuyên màng đầu cuối C (TM) neo chuỗi alpha và beta vào màng tế bào.

Đối với các TCR gamma/delta, thuật ngữ "miền biến thiên TCR gamma" như được sử dụng ở đây dùng để chỉ sự kết hợp của vùng TCR gamma V (TRGV) không có vùng chỉ huy (L) và vùng TCR gamma J (TRGJ) và thuật ngữ miền bất biến gamma TCR đề cập đến vùng TRGC ngoại bào hoặc trình tự TRGC bị cắt ngắn đầu cuối C. Tương tự như vậy, thuật ngữ "miền biến thiên TCR delta" đề cập đến sự kết hợp của vùng TCR delta V (TRDV) không có vùng chỉ huy (L) và vùng TCR delta D/J (TRDD/TRDJ) và thuật ngữ "miền bất biến TCR delta" đề cập đến vùng TRDC ngoại bào, hoặc trình tự TRDC bị cắt đầu cuối C.

Các TCR theo sáng chế tốt hơn là liên kết với phức hợp phân tử peptit-HLA có ái lực liên kết (KD) khoảng nhỏ hơn hoặc bằng 100 μM , nhỏ hơn hoặc bằng khoảng 50 μM , nhỏ hơn hoặc bằng khoảng 25 μM , nhỏ hơn hoặc bằng khoảng 10 μM . Tốt hơn là các TCR có ái lực cao có ái lực liên kết nhỏ hơn hoặc bằng 1 μM , nhỏ hơn hoặc bằng 100 nM, nhỏ hơn hoặc bằng 50 nM, nhỏ hơn hoặc bằng 25 nM. Các ví dụ không giới hạn về khoảng ái lực liên kết được ưu tiên cho các TCR theo sáng chế bao gồm khoảng 1 nM đến khoảng 10 nM; khoảng 10 nM đến khoảng 20 nM; khoảng 20 nM đến khoảng 30 nM; khoảng 30 nM đến khoảng 40 nM; khoảng 40 nM đến khoảng 50 nM; khoảng 50 nM đến khoảng 60 nM; khoảng 60 nM đến khoảng 70 nM; khoảng 70 nM đến khoảng 80 nM; khoảng 80 nM đến khoảng 90 nM; và khoảng 90 nM đến khoảng 100 nM.

Như được sử dụng trong tài liệu này để nối với các TCR theo sáng chế, "liên kết đặc hiệu" và các biến thể ngữ pháp của nó được sử dụng để có nghĩa là TCR có ái lực liên kết (KD) đối với phức hợp phân tử peptit-HLA nhỏ hơn hoặc bằng 100 μM .

Các TCR dị vòng alpha/beta theo sáng chế có thể có liên kết disulfide được đưa vào giữa các miền bất biến của chúng. Các TCR được ưu tiên thuộc loại này bao gồm các TCR có trình tự miền bất biến TRAC và trình tự miền bất biến TRBC1 hoặc TRBC2 ngoại trừ Thr 48 của TRAC và Ser 57 của TRBC1 hoặc TRBC2 được thay thế bằng các phần dư cystein, các cystein nói trên tạo thành liên kết disulfide giữa trình tự miền bất biến TRAC và trình tự miền bất biến TRBC1 hoặc TRBC2 của TCR.

Có hoặc không có liên kết liên chuỗi được đưa ra ở trên, các TCR dị hợp alpha/beta theo sáng chế có thể có trình tự miền bất biến TRAC và trình tự miền bất biến TRBC1 hoặc TRBC2 và trình tự miền bất biến TRAC và trình tự miền bất biến TRBC1 hoặc TRBC2 của TCR có thể được liên kết bằng liên kết disulfide tự nhiên giữa Cys4 của exon 2 của TRAC và Cys2 của exon 2 của TRBC1 hoặc TRBC2.

Các TCR theo sáng chế có thể bao gồm phân tử đánh dấu có thể phát hiện được chọn từ nhóm bao gồm nuclit phóng xạ, fluorophore và biotin. TCR theo sáng chế có thể được cộng hợp với hoạt chất trị liệu, chẳng hạn như nuclit phóng xạ, tác nhân hóa trị liệu hoặc độc tố.

Trong phương án, TCR theo sáng chế có ít nhất một đột biến trong chuỗi alpha và/hoặc có ít nhất một đột biến trong chuỗi beta đã biến đổi glycosyl hóa so với TCR không được đột biến.

Theo phương án, TCR bao gồm ít nhất một đột biến trong chuỗi alpha TCR và/hoặc chuỗi beta TCR có ái lực liên kết đối với và/hoặc thời gian bán hủy liên kết đối với phức hợp phân tử peptit-HLA, ít nhất gấp đôi của TCR bao gồm chuỗi alpha TCR không đột biến và/hoặc chuỗi beta TCR không đột biến. Tăng cường ái lực của các TCR đặc hiệu khối u và khai thác của nó, phụ thuộc vào sự tồn tại của cửa sổ cho các ái lực TCR tối ưu. Sự tồn tại của cửa sổ như vậy dựa trên các quan sát mà các TCR cụ thể cho ví dụ: các tác

nhân gây bệnh bị hạn chế HLA-A2 có các giá trị KD thường thấp hơn khoảng 10 lần khi so sánh với các TCR cụ thể, ví dụ: tự kháng nguyên liên quan đến khối u bị hạn chế HLA-A2. Hiện tại đã biết rằng, mặc dù các kháng nguyên khối u có khả năng gây miễn dịch, bởi vì các khối u phát sinh từ các tế bào riêng của cá thể chỉ các protein hoặc protein bị đột biến với quá trình dịch mã thay đổi sẽ bị hệ thống miễn dịch xem như là ngoại lai. Các kháng nguyên được điều hòa quá mức hoặc biểu hiện quá mức (được gọi là tự kháng nguyên) sẽ không nhất thiết gây ra đáp ứng miễn dịch chức năng chống lại khối u: Các tế bào T biểu hiện các TCR có khả năng phản ứng cao với các kháng nguyên này sẽ được lựa chọn tiêu cực trong tuyển ức trong quy trình được gọi là dung nạp trung tâm, nghĩa là chỉ các tế bào T có các TCR có ái lực thấp để tự kháng nguyên. Do đó, ái lực của các TCR hoặc các biến thể của các peptit theo sáng chế có thể được tăng cường bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật.

Sáng chế còn đề cập đến phương pháp xác định và phân lập TCR theo sáng chế, phương pháp này bao gồm bước ủ PBMCs từ những người cho khỏe mạnh âm tính HLA-A * 02 với các monome A2/peptit, ủ PBMC bằng tetramer-phycoery (PE) và phân lập các tế bào T ái lực cao bằng cách phân tích Calibur phân loại tế bào được kích hoạt bằng huỳnh quang (fluorescence activated cell sorting-FACS).

Sáng chế còn đề cập đến phương pháp xác định và phân lập TCR theo sáng chế, phương pháp này bao gồm bước lấy một con chuột biến đổi gen với toàn bộ vị trí gen TCR α R của con người (1,1 và 0,7 Mb), tế bào T của nó biểu hiện danh mục TCR của con người đa dạng bù cho sự thiếu hụt TCR của chuột, gây miễn dịch cho chuột bằng peptit, ủ PBMC thu được từ chuột biến đổi gen bằng tetramer-phycoerythrin (PE) và phân lập tế bào T có ái lực cao bằng cách phân tích Calibur phân loại tế bào được kích hoạt bằng huỳnh quang (FACS).

Theo một khía cạnh, để thu được các tế bào T biểu hiện các TCR theo sáng chế, các axit nucleic mã hóa các chuỗi TCR-alpha và/hoặc TCR-beta theo sáng chế được tách dòng vào các vectơ biểu hiện, như gamma retrovirus hoặc lentivirus. Các virus tái tổ hợp được tạo ra và sau đó được kiểm tra chức năng, chẳng hạn như tính đặc hiệu kháng

nguyên và ái lực chức năng. Ước số của sản phẩm cuối cùng sau đó được sử dụng để tải nạp quần thể tế bào T đích (thường được tinh sạch từ các PBMC của bệnh nhân), được nhân rộng trước khi truyền vào bệnh nhân.

Ở một khía cạnh khác, để thu được các tế bào T biểu hiện các TCR theo sáng chế, các ARN TCR được tổng hợp bằng các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật, ví dụ, các hệ thống phiên mã *in vitro*. Các ARN TCR được tổng hợp *in vitro* sau đó được đưa vào các tế bào T CD8⁺ cơ sở thu được từ những người cho khỏe mạnh bằng cách điện hóa để biểu hiện lại chuỗi TCR-alpha và/hoặc TCR-beta đặc hiệu khối u.

Để tăng biểu hiện, các axit nucleic mã hóa các TCR theo sáng chế có thể được liên kết hoạt động với trình tự khởi đầu mạnh, chẳng hạn như đoạn lặp lại đầu cuối dài retrovirus (LTR), cytomegalovirus (CMV), virus tế bào gốc murine (MSCV) U3, phosphoglycerate kinase (PGK), β -actin, ubiquitin, và trình tự khởi đầu tổng hợp virus 40 (SV40)/CD43, yếu tố kéo dài (EF) -1a và trình tự khởi đầu virus hình thành tập trung lá lách (spleen focus-forming virus - SFFV). Theo phương án được ưu tiên, trình tự khởi đầu không đồng nhất với axit nucleic được biểu hiện.

Ngoài các trình tự khởi đầu mạnh, các băng biểu hiện TCR theo sáng chế có thể chứa các yếu tố bổ sung mà có thể tăng cường biểu hiện chuyển gen, bao gồm cả đường polypurine trung tâm (cPPT), thúc đẩy chuyển vị hạt nhân của các cấu trúc lentivirus (Follenzi et al., 2000), và yếu tố điều hòa sau phiên mã virus gây bệnh viêm gan Woodchuck (wPRE), làm tăng mức độ biểu hiện chuyển gen bằng cách tăng sự ổn định ARN (Zufferey et al., 1999).

Các chuỗi alpha và beta của TCR theo sáng chế có thể được mã hóa bởi các axit nucleic nằm trong các vectơ riêng biệt hoặc có thể được mã hóa bởi các polynucleotit nằm trong cùng một vectơ.

Để đạt được biểu hiện bề mặt TCR ở mức cao đòi hỏi cả chuỗi TCR-alpha và TCR-beta của TCR được đưa vào phải được phiên mã ở mức cao. Để làm như vậy, chuỗi TCR-alpha và TCR-beta theo sáng chế có thể được tách dòng vào các cấu trúc bi-cistronic

trong một vector duy nhất, được chứng minh là có khả năng vượt qua trở ngại này. Việc sử dụng vị trí xâm nhập nội bào của virus (IRES) giữa chuỗi TCR-alpha và TCR-beta dẫn đến biểu hiện phối hợp của cả hai chuỗi, bởi vì chuỗi TCR-alpha và TCR-beta được tạo ra từ một bản phiên mã bị phá vỡ thành hai protein trong quá trình dịch mã, đảm bảo rằng tỷ lệ mol bằng nhau của chuỗi TCR-alpha và TCR-beta được tạo ra (Schmitt et al., 2009).

Các axit nucleic mã hóa các TCR theo sáng chế có thể là bộ ba mã hóa tối ưu hóa để tăng biểu hiện từ tế bào chủ. Sự dư thừa trong mã di truyền cho phép một số axit amin được mã hóa bởi nhiều hơn một bộ ba mã hóa, nhưng một số bộ ba mã hóa nhất định ít 'tối ưu' hơn các bộ ba khác vì tính sẵn có tương đối của các tARN phù hợp cũng như các yếu tố khác (Gustafsson et al., 2004). Biến đổi trình tự gen TCR-alpha và TCR-beta sao cho mỗi axit amin được mã hóa bởi bộ ba mã hóa tối ưu để biểu hiện gen động vật có vú, cũng như loại bỏ các kiểu không ổn định mRNA hoặc các vị trí nối mã, đã được chứng minh là giúp tăng cường đáng kể biểu hiện gen TCR-alpha và TCR -beta (Scholten et al., 2006).

Hơn nữa, việc bắt cặp sai giữa các chuỗi TCR được đưa vào và nội sinh có thể dẫn đến việc có được các đặc tính gây nguy cơ tự miễn dịch đáng kể. Ví dụ, sự hình thành các dimer TCR hỗn hợp có thể làm giảm số lượng phân tử CD3 có sẵn để hình thành các phức TCR được bắt cặp đúng, và do đó có thể làm giảm đáng kể ái lực chức năng của các tế bào biểu hiện TCR được đưa vào (Kuball et al., 2007).

Để giảm bớt sự bắt cặp sai, miền đầu cuối C của chuỗi TCR được đưa vào theo sáng chế có thể được biến đổi để thúc đẩy ái lực giữa các chuỗi, đồng thời làm giảm khả năng các chuỗi được đưa vào bắt cặp với TCR nội sinh. Những chiến lược này có thể bao gồm việc thay thế các miền đầu cuối C TCR-alpha và TCR-beta bằng bản sao từ chuột của chúng (miền đầu cuối C từ chuột); tạo ra một liên kết disulfide liên chuỗi thứ hai trong miền đầu cuối C bằng cách đưa ra phần dư cystein thứ hai vào cả chuỗi TCR-alpha và TCR-beta của TCR được đưa ra (biến đổi cystein); hoán đổi phần dư tương tác trong các miền đầu cuối C chuỗi TCR-alpha và TCR-beta ("nút trong lỗ"); và hợp nhất các miền

biến thiên của chuỗi TCR-alpha và TCR-beta trực tiếp vào CD3 ζ (hợp nhất CD3 ζ) (Schmitt et al., 2009).

Trong phương án, tế bào chủ được thiết kế để biểu hiện TCR theo sáng chế. Trong các phương án được ưu tiên, tế bào chủ là tế bào T của con người hoặc tế bào tổ tiên của tế bào T. Trong một số phương án, tế bào tổ tiên của tế bào T hoặc tế bào T được lấy từ bệnh nhân ung thư. Trong một số phương án khác, tế bào tổ tiên của tế bào T hoặc tế bào T được lấy từ người cho khỏe mạnh. Các tế bào chủ theo sáng chế có thể là dị sinh hoặc tự thân đối với bệnh nhân được điều trị. Theo phương án, vật chủ là tế bào T gamma/delta được biến đổi để biểu hiện TCR alpha/beta.

"Chế phẩm được phẩm là chế phẩm phù hợp để dùng cho con người trong môi trường y tế. Tốt hơn là, chế phẩm được phẩm được vô trùng và được sản xuất theo hướng dẫn của GMP.

Các chế phẩm được phẩm bao gồm các peptit ở dạng tự do hoặc ở dạng muối được dụng (xem thêm ở trên). Như được sử dụng ở đây, "muối được dụng" đề cập đến các dẫn xuất của các peptit được bộc lộ, trong đó các peptit được biến đổi bằng cách tạo ra các muối axit hoặc bazơ của chất. Ví dụ, các muối axit được điều chế từ bazơ tự do (điển hình trong đó dạng trung tính của thuốc có nhóm trung tính NH₂) liên quan đến phản ứng với axit thích hợp. Các axit thích hợp để điều chế muối axit bao gồm cả axit hữu cơ, ví dụ axit axetic, axit propionic, axit glycolic, axit pyruvic, axit oxalic, axit malic, axit malonic, axit succinic, axit maleic, axit fumaric, axit tartaric, axit citric, axit benzoic, axit cinnamic, axit mandelic, axit metan sulfonic, axit ethane sulfonic, axit p-toluenesulfonic, axit salicylic, và các loại tương tự, cũng như axit vô cơ, ví dụ, axit hydroclorua, axit hydrobromic, axit sunfuric, axit nitric, axit phosphoric và các loại tương tự. Ngược lại, việc điều chế các muối bazơ của các một nửa axit có thể có trên peptit được điều chế bằng cách sử dụng bazơ được dụng như natri hydroxit, kali hydroxit, amoni hydroxit, canxi hydroxit, trimethylamine hoặc các chất tương tự.

Trong phương án được đặc biệt ưu tiên, các chế phẩm được phẩm bao gồm các peptit là muối của axit axetic (acetate), trifluoro acetate hoặc axit hydrochloric (clorua).

Tốt hơn là, dược phẩm theo sáng chế là liệu pháp miễn dịch như vắc xin. Có thể đưa trực tiếp vào bệnh nhân, vào cơ quan bị ảnh hưởng hoặc hệ thống i.d., i.m., s.c., i.p. và i.v., hoặc áp dụng *ex vivo* cho các tế bào có nguồn gốc từ bệnh nhân hoặc dòng tế bào người sau đó được đưa vào bệnh nhân hoặc sử dụng trong *in vitro* để chọn quần thể tế bào miễn dịch có nguồn gốc từ bệnh nhân, sau đó được đưa lại cho bệnh nhân. Nếu axit nucleic được sử dụng cho các tế bào *in vitro*, có thể hữu ích cho các tế bào được tải nạp để tạo ra các cytokine kích thích miễn dịch đồng thời biểu hiện, như interleukin-2. Peptit có thể về cơ bản là tinh khiết hoặc kết hợp với tá chất kích thích miễn dịch (xem bên dưới) hoặc được sử dụng kết hợp với các cytokine kích thích miễn dịch, hoặc được sử dụng với hệ thống phân phối phù hợp, ví dụ như liposome. Peptit cũng có thể được cộng hợp với chất mang phù hợp như keyhole limem haemocyanin (KLH) hoặc mannan (xem tài liệu WO 95/18145 và (Longenecker et al., 1993)). Peptit cũng có thể được gắn nhãn, có thể là protein tổng hợp hoặc có thể là phân tử lai. Các peptit mà trình tự của chúng được đưa ra trong sáng chế dự kiến sẽ kích thích các tế bào T CD4 hoặc CD8. Tuy nhiên, việc kích thích tế bào T CD8 hiệu quả hơn khi có sự trợ giúp của các tế bào T trợ giúp CD4. Do đó, đối với các epitope MHC lớp I kích thích tế bào T CD8, phần hoặc đối tác dung hợp của phân tử lai cung cấp phù hợp các epitope mà kích thích tế bào T dương tính CD4. Các epitope kích thích CD4 và CD8 đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật và bao gồm những epitope được xác định trong sáng chế.

Ở một khía cạnh, vắc xin bao gồm ít nhất một peptit có trình tự axit amin được đặt từ ID SEQ số 1 đến ID SEQ số 101, và ít nhất một peptit bổ sung, tốt hơn là từ hai đến 50, tốt hơn là hai đến 25, thậm chí tốt hơn nữa là hai đến 20 và tốt nhất là hai, ba, bốn, năm, sáu, bảy, tám, chín, mười, mười một, mười hai, mười ba, mười bốn, mười lăm, mười sáu, mười bảy hoặc mười tám peptit. Các peptit có thể được lấy từ một hoặc nhiều TAA cụ thể và có thể liên kết với các phân tử MHC lớp I.

Khía cạnh khác của sáng chế đề xuất axit nucleic (ví dụ như polynucleotit) mã hóa biến thể peptit hoặc peptit theo sáng chế. Ví dụ, polynucleotit có thể là ADN, cADN, ANP, ARN hoặc các tổ hợp của chúng, hoặc là các dạng polynucleotit đơn và chuỗi đôi, hoặc tự nhiên hoặc ổn định, chẳng hạn như polynucleotit với xương sống phosphorothioate và nó có thể có hoặc không chứa các intron miễn là nó mã hóa cho peptit. Tất nhiên, chỉ những peptit có chứa phần dư axit amin tự nhiên được nối với nhau bằng liên kết peptit xảy ra trong tự nhiên mới được mã hóa bởi polynucleotit. Vẫn trong khía cạnh khác của sáng chế, sáng chế đề xuất vector biểu hiện có khả năng biểu hiện polypeptit theo sáng chế.

Một loạt các phương pháp đã được phát triển để liên kết các polynucleotit, đặc biệt là ADN, với các vector chẳng hạn thông qua các đầu cuối gắn kết bổ sung. Ví dụ, các vùng đồng nhất bổ sung có thể được thêm vào đoạn ADN để được chèn vào ADN vector. Đoạn vector và ADN sau đó được nối bằng liên kết hydro giữa các đuôi homopolymeric bổ sung để tạo thành các phân tử ADN tái tổ hợp.

Các trình liên kết tổng hợp có chứa một hoặc nhiều vị trí giới hạn cung cấp phương pháp khác để nối đoạn ADN vào các vector. Các trình liên kết tổng hợp có chứa một loạt các vị trí endonuclease giới hạn có sẵn trên thị trường từ một số nguồn bao gồm InteARNtional Biotechnologists Inc. New Haven, CN, USA.

Phương pháp mong muốn biến đổi ADN mã hóa polypeptit theo sáng chế sử dụng phản ứng chuỗi polymerase được bộc lộ bởi Saiki RK, và cộng sự. (Saiki et al., 1988). Phương pháp này có thể được sử dụng để đưa ADN vào vector phù hợp, ví dụ như bằng kỹ thuật tại các vị trí giới hạn phù hợp hoặc có thể được sử dụng để biến đổi ADN theo những cách hữu ích khác như đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật. Nếu vector virus được sử dụng, vector pox hoặc adenovirus được ưu tiên.

ADN (hoặc trong trường hợp vector retrovirus, ARN) sau đó có thể được biểu thị trong vật chủ thích hợp để tạo ra polypeptit bao gồm 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 biến đổi một cách thích hợp theo quan điểm được hướng dẫn theo sáng chế, để dựng vector biểu hiện, sau đó được sử dụng để biến đổi tế bào chủ thích hợp cho biểu hiện và sản xuất polypeptit theo sáng chế. Các kỹ thuật này bao gồm những kỹ thuật được bộc lộ, ví dụ, ở US 4.440.859, 4.530.901, 4.582.800, 4.677.063, 4.678.751, 4.704.362, 4.710.463, 4.357.006, 4.766.075 và 4.810.648.

ADN (hoặc trong trường hợp vector retrovirus, ARN) mã hóa polypeptit cấu thành hợp chất theo sáng chế có thể được nối với nhiều trình tự ADN khác để đưa vào vật chủ thích hợp. ADN đồng hành sẽ phụ thuộc vào bản chất của vật chủ, cách thức đưa ADN vào vật chủ và liệu có cần duy trì hoặc tích hợp episomal hay không.

Nói chung, ADN được chèn vào vector biểu hiện, chẳng hạn như plasmit, theo đúng hướng và khung đọc chính xác để biểu hiện. Nếu cần thiết, ADN có thể được liên kết với trình tự nucleotit kiểm soát điều khiển phiên mã và dịch mã thích hợp được nhận biết bởi vật chủ mong muốn, mặc dù các kiểm soát như vậy thường có sẵn trong vector biểu hiện. Các vector sau đó được đưa vào vật chủ thông qua các kỹ thuật tiêu chuẩn. Nói chung, không phải tất cả các vật chủ sẽ được biến đổi bởi vector. Do đó, sẽ cần phải chọn cho các tế bào chủ được biến đổi. Một kỹ thuật lựa chọn liên quan đến việc kết hợp vào vector biểu hiện trình tự ADN, với bất kỳ yếu tố kiểm soát cần thiết nào, mã hóa cho đặc điểm có thể lựa chọn trong tế bào biến đổi, chẳng hạn như kháng kháng sinh.

Ngoài ra, gen cho đặc điểm có thể lựa chọn như vậy có thể nằm trên một vector khác, được sử dụng để đồng biến đổi tế bào chủ mong muốn.

Các tế bào chủ đã được biến đổi bởi ADN tái tổ hợp theo sáng chế sau đó được nuôi cấy trong thời gian đủ và trong những điều kiện thích hợp được biết đến bởi những người có hiểu biết trong lĩnh vực kỹ thuật theo quan điểm hướng dẫn được bộc lộ trong sáng chế để cho phép biểu hiện polypeptit, sau đó có thể sẽ được thu hồi.

Nhiều hệ thống biểu hiện đã biết, bao gồm vi khuẩn (ví dụ *E. coli* và *Bacillus subtilis*), nấm men (ví dụ: *Saccharomyces cerevisiae*), nấm sợi (ví dụ *Aspergillus* dưới

loài.), tế bào thực vật, tế bào động vật và tế bào côn trùng. Tốt hơn là, hệ thống có thể là các tế bào động vật có vú như tế bào CHO có sẵn trong bộ sưu tập sinh học tế bào ATCC.

Plasmid vector tế bào động vật có vú điển hình cho biểu hiện cơ bản bao gồm trình tự khởi đầu CMV hoặc SV40 với đuôi poly A phù hợp và chỉ thị sinh học kháng thuốc, như neomycin. Một ví dụ là pSVL có sẵn từ Pharmacia, Piscataway, NJ, USA. Ví dụ về vector biểu hiện của động vật có vú có thể cảm ứng là pMSG, cũng có sẵn từ Pharmacia. Các vector plasmid nấm men hữu ích là pRS403-406 và pRS413-416 và thường có sẵn từ hệ thống tách dòng Stratagene, La Jolla, CA 92037, Hoa Kỳ. Các plasmid pRS403, pRS404, pRS405 và pRS406 là các plasmid tích hợp nấm men (YIps) và kết hợp các chỉ thị sinh học có thể lựa chọn nấm men là HER3, TRP1, LEU2 và URA3. Các plasmid pRS413-416 là plasmid nấm men (Ycps). Các vector dựa trên trình tự khởi đầu CMV (ví dụ từ Sigma-Aldrich) cung cấp biểu hiện nhất thời hoặc ổn định, biểu hiện hoặc bài tiết tế bào chất, và đánh dấu đầu cuối N hoặc đầu cuối C trong các kết hợp khác nhau của FLAG, 3xFLAG, c-myc hoặc MAT. Những protein dung hợp này cho phép phát hiện, tinh sạch và phân tích protein tái tổ hợp. Các dung hợp được đánh dấu kép cung cấp sự linh hoạt trong phát hiện.

Vùng điều hòa trình tự khởi đầu của cytomegalovirus (CMV) ở người khỏe mạnh thúc đẩy mức độ biểu hiện protein cấu thành cao tới 1 mg/L trong các tế bào COS. Đối với các dòng tế bào ít mạnh hơn, mức protein thường là ~ 0,1 mg/L. Sự hiện diện của nguồn gốc sao chép SV40 sẽ dẫn đến mức độ sao chép ADN cao trong các tế bào COS cho phép sao chép SV40. Các vector CMV, ví dụ, có thể chứa nguồn gốc pMB1 (dẫn xuất của pBR322) để sao chép trong tế bào vi khuẩn, gen b-lactamase để lựa chọn kháng ampicillin ở vi khuẩn, hGH polyA và nguồn gốc F1. Các vector chứa trình tự pre-pro-trypsin (PPT) có thể hướng sự tiết protein hợp nhất FLAG vào môi trường nuôi cấy để tinh sạch bằng kháng thể, chất dẻo và tấm ANTI-FLAG. Các vector và hệ thống biểu hiện khác được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật để sử dụng với nhiều loại tế bào chủ.

Trong phương án khác, hai hoặc nhiều biến thể peptit hoặc peptit theo sáng chế được mã hóa và do đó được biểu hiện theo thứ tự liên tiếp (tương tự như cấu trúc "chuỗi

hạt"). Khi làm như vậy, các biến thể peptit hoặc peptit có thể được liên kết hoặc dung hợp với nhau bằng các chuỗi axit amin liên kết, ví dụ như LLLLLL, hoặc có thể được liên kết mà không có bất kỳ (các) peptit bổ sung nào giữa chúng. Những cấu trúc này cũng có thể được sử dụng cho liệu pháp ung thư và có thể gây ra cả hai đáp ứng miễn dịch liên quan đến MHC I và MHC II.

Sáng chế cũng đề cập đến tế bào chủ được biến đổi với cấu trúc vector polynucleotit theo sáng chế. Tế bào chủ có thể là nhân sơ hoặc nhân điển hình. Các tế bào vi khuẩn có thể là các tế bào chủ prokaryotic được ưu tiên trong một số trường hợp và thường là chủng *E. coli*, ví dụ như các chủng *E. coli* DH5 có sẵn từ Bethesda Research Lab Laboratory Inc., Bethesda, MD, USA và RR1 có sẵn từ American Type Culture Collection (ATCC) của Rockville, MD, USA (số ATCC 31343). Các tế bào vật chủ nhân điển hình được ưu tiên bao gồm các tế bào nấm men, côn trùng và động vật có vú, tốt hơn là các tế bào động vật có xương sống như các tế bào từ chuột nhắt, chuột, khỉ hoặc dòng tế bào sợi và tế bào ruột kết của người. Các tế bào chủ của nấm men bao gồm YPH499, YPH500 và YPH501, thường có sẵn từ Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA 92037, USA. Các tế bào chủ của động vật có vú được ưu tiên bao gồm các tế bào buồng trứng của chuột ham Trung Quốc (Chinese hamster ovary-CHO) có sẵn từ ATCC như CCL61, tế bào phôi chuột NIH Thụy Sĩ NIH/3T3 có sẵn từ ATCC như CRL 1658, tế bào COS-1 có nguồn gốc từ thận khỉ có sẵn từ ATCC như CRL 1650 và các tế bào 293 là các tế bào thận phôi người. Các tế bào côn trùng được ưu tiên là các tế bào Sf9 có thể được thay thế bằng các vector biểu hiện baculovirus. Tổng quan về việc lựa chọn các tế bào chủ thích hợp để biểu hiện có thể được tìm thấy trong, ví dụ, sách giáo khoa của Paulina Balbás và Argelia Lorence trong "Methods in Molecular Biology Recombinant Gene Expression, Reviews and Protocols," Part One, Second Edition, ISBN 978-1-58829-262-9, và các tài liệu khác được biết đến bởi người có hiểu biết trong lĩnh vực.

Sự biến đổi của các tế bào chủ thích hợp với cấu trúc ADN của sáng chế được thực hiện bằng các phương pháp đã biết mà thường phụ thuộc vào loại vector được sử dụng. Liên quan đến sự biến đổi của các tế bào chủ nhân sơ, xem, ví dụ, Cohen và cộng sự.

(Cohen et al., 1972) và (Green and Sambrook, 2012). Sự biến đổi của các tế bào nấm men được mô tả trong Sherman và cộng sự. (Sherman et al., 1986). Phương pháp của Beggs (Beggs, 1978) cũng hữu ích. Liên quan đến các tế bào động vật có xương sống, các chất phản ứng hữu ích trong việc chuyển các tế bào đó, ví dụ như canxi phosphate và DEAE-dextran hoặc các công thức liposome, có sẵn từ Stratagene Claming Systems, hoặc Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD 20877, Hoa Kỳ. Điện di cũng hữu ích cho việc biến đổi và/hoặc chuyển tế bào và đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật biến đổi tế bào nấm men, tế bào vi khuẩn, tế bào côn trùng và tế bào động vật có xương sống.

Các tế bào biến đổi thành công, tức là các tế bào có cấu trúc ADN theo sáng chế, có thể được xác định bằng các kỹ thuật đã biết như PCR. Ngoài ra, sự có mặt của protein trong phần nổi có thể được phát hiện bằng cách sử dụng các kháng thể.

Được đánh giá cao rằng các tế bào chủ nhất định theo sáng chế là hữu ích trong việc điều chế các peptit theo sáng chế, ví dụ như 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 trị liệu nhất định. 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 của sáng chế sao cho chúng có thể được tải vào các phân tử MHC thích hợp. Do đó, sáng chế đề xuất tế bào chủ chứa axit nucleic hoặc vectơ biểu hiện theo sáng chế.

Theo phương án 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. Các APC được tải protein dung hợp tái tổ hợp có chứa phosphatase axit tuyến tiền liệt (prostatic acid phosphatase- PAP) đã được Cơ quan Quản lý Thực phẩm và Dược phẩm Hoa Kỳ (FDA) phê duyệt vào ngày 29 tháng 4 năm 2010, để điều trị HRPC di căn không triệu chứng hoặc ít có triệu chứng (Sipuleucel-T) (Rini et al., 2006; Small et al., 2006).

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

Trong một phương án khác, peptit, axit nucleic hoặc vector biểu hiện theo sáng chế được sử dụng trong y học. Ví dụ, peptit hoặc biến thể của nó có thể được chuẩn bị để tiêm tĩnh mạch (i.v.), tiêm dưới da (s.c.), tiêm trong da (i.d.), tiêm trong màng bụng (i.p.), tiêm bắp (i.m.). Các phương pháp tiêm peptit được ưa thích bao gồm s.c., i.d., i.p., i.m., và i.v. Các phương pháp tiêm ADN được ưa thích bao gồm i.d., i.m., s.c., i.p. và i.v. Liều dùng ví dụ có thể được đưa ra từ 50 µg đến 1,5 mg, tốt hơn là 125 µg đến 500 µg peptit hoặc ADN và sẽ phụ thuộc vào peptit hoặc ADN tương ứng. Liều dùng của khoảng này đã được sử dụng thành công trong thử nghiệm trước đó (Walter et al., 2012).

Các polynucleotit được sử dụng để tiêm chủng tích cực có thể là về cơ bản tinh khiết hoặc được chứa trong vector hoặc hệ thống phân phối phù hợp. Axit nucleic có thể là ADN, cADN, ANP, ARN hoặc kết hợp chúng. Các phương pháp để thiết kế và đưa ra axit nucleic như vậy đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật. Tổng quan được cung cấp bởi ví dụ: Teufel và cộng sự. (Teufel et al., 2005). Các vắc xin polynucleotit rất dễ điều chế, nhưng phương thức hoạt động của các vector này trong việc tạo ra đáp ứng miễn dịch vẫn chưa được hiểu đầy đủ. Các vector phù hợp và hệ thống phân phối bao gồm ADN và/hoặc ARN của virus, chẳng hạn như các hệ thống dựa trên adenovirus, virus vaccinia, retrovirus, virus herpes, virus liên quan đến adeno hoặc các giống lai có chứa nhiều yếu tố của nhiều hơn một loại virus. Các hệ thống phân phối không phải virus bao gồm lipit cation và polyme cation và là hệ thống đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật phân phối ADN. Việc phân phối vật lý, chẳng hạn như thông qua "súng bắn gen" cũng có thể được sử dụng. Peptit hoặc các peptit được mã hóa bởi axit nucleic có thể là protein hợp nhất, ví dụ với epitope kích thích các tế bào T cho CDR đối diện tương ứng như đã nêu ở trên.

Dược phẩm theo sáng chế cũng có thể bao gồm một hoặc nhiều tá chất. Các tá chất là những chất tăng cường hoặc tăng khả năng không cụ thể đáp ứng miễn dịch (ví dụ: các đáp ứng miễn dịch trung gian bởi tế bào T dương tính CD8 và tế bào T trợ giúp (TH) đối với kháng nguyên và do đó sẽ được coi là hữu ích trong dược phẩm theo sáng chế. Các tá chất phù hợp bao gồm, nhưng không giới hạn ở, 1018 ISS, muối nhôm, AMPLIVAX®, AS15, BCG, CP-870,893, CpG7909, CyaA, dSLIM, phối tử Flagellin hoặc TLR5 có

nguồn gốc từ Flagellin, phối tử FL3, GM-CSF, IC30, IC31, Imiquimod (ALDARA®), resiquimod, ImuFact IMP321, Interleukin như IL-2, IL-13, IL-21, Interferon-alpha hoặc -beta, hoặc các dẫn xuất pegylated của chúng, IS Patch, ISS, ISCOMATRIX, IS, LipoVac, MALP2, MF59, monophosphoryl lipid A, Montanide IMS 1312, Montanide ISA 206, Montanide ISA 50V, Montanide ISA-51, nhũ tương nước và dầu trong nước, OK-432, OM-174 -197-MP-EC, ONTAK, OspA, hệ thống vector PepTel®, poly (lactid co-glycolid) [PLG] dựa trên các vi hạt và dextran, talactoferrin SRL172, Virosomes và các hạt virus khác, YF-17D, VEG R848, beta-glucan, Pam3Cys, thuốc kích thích QS21 của Aquila, có nguồn gốc từ saponin, chiết xuất mycobacterial và giả thành tế bào vi khuẩn tổng hợp và các tá chất độc quyền khác như Ribi's Detox, Quil, hoặc Superfos. Các tá chất như Freund's hoặc GM-CSF được ưu tiên. Một số tá chất miễn dịch (ví dụ, MF59) dành riêng cho tế bào đuôi gai và việc điều chế chúng đã được mô tả trước đây (Allison and Krummel, 1995). Các cytokine có thể được sử dụng. Một số cytokine có liên quan trực tiếp đến việc ảnh hưởng đến sự di chuyển của tế bào đuôi gai đến các mô bạch huyết (ví dụ TNF-), thúc đẩy sự trưởng thành của các tế bào đuôi gai thành các tế bào trình diện kháng nguyên hiệu quả cho tế bào lympho T (ví dụ, GM-CSF, IL-1 và IL-4) (US patent số 5,849,589, được kết hợp cụ thể trong bản mô tả này bằng cách tham chiếu toàn bộ) và đóng vai trò là tá chất 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 báo cáo để tăng cường hiệu quả của tá chất trong môi trường vắc xin. Không bị ràng buộc bởi lý thuyết, các oligonucleotit CpG hoạt động bằng cách kích hoạt hệ thống miễn dịch bẩm sinh (không thích ứng) thông qua các thụ thể dạng Toll (Toll-like receptors-TLR), chủ yếu là TLR9. Sự hoạt hóa TLR9 được kích hoạt CpG giúp tăng cường đáp ứng tế bào và thể dịch đặc hiệu kháng nguyên đối với nhiều loại kháng nguyên, bao gồm kháng nguyên peptit hoặc protein, virus sống hoặc virus chết, vắc xin tế bào đuôi gai, vắc xin tế bào tự thân và cộng hợp polysaccharit trong cả các vắc xin dự phòng và điều trị. Quan trọng hơn, giúp tăng cường sự trưởng thành và biệt hóa của tế bào đuôi gai, dẫn đến hoạt tính của các tế bào

TH1 được tăng cường và tạo ra tế bào lympho T gây độc tế bào (cytotoxic T-lymphocyte-CTL) mạnh, ngay cả khi không có sự trợ giúp của tế bào T CD4. Xu hướng TH1 gây ra bởi kích thích TLR9 được duy trì ngay cả khi có mặt các tá chất vắc xin như phèn hoặc tá chất Freund không hoàn chỉnh (incomplete Freund's adjuvant -IFA) thường thúc đẩy xu hướng TH2. Các oligonucleotit CpG thậm chí còn cho thấy hoạt tính tá chất lớn hơn khi được bào chế hoặc phối hợp sử dụng với các tá chất khác hoặc trong các công thức như vi hạt, hạt nano, nhũ tương lipid hoặc các công thức tương tự, đặc biệt cần tạo ra đáp ứng mạnh khi kháng nguyên tương đối yếu. Chúng cũng đẩy nhanh đáp ứng miễn dịch và cho phép giảm liều kháng nguyên khoảng hai bậc về độ lớn, với đáp ứng kháng thể tương đương với vắc xin liều đủ mà không có CpG trong một số thử nghiệm (Krieg, 2006). US 6,406,705 B1 mô tả việc sử dụng kết hợp các oligonucleotit CpG, tá chất axit không nucleic và kháng nguyên để tạo ra đáp ứng miễn dịch đặc hiệu với kháng nguyên. Tác nhân đối kháng CpG TLR9 là dSLIM (bộ điều hòa miễn dịch vòng lặp gốc kép) của Mologen (Berlin, Đức), là thành phần được ưu tiên trong chế phẩm được phẩm theo sáng chế. Các phân tử liên kết TLR khác như ARN liên kết TLR 7, TLR 8 và/hoặc TLR 9 cũng có thể được sử dụng.

Các ví dụ khác cho các tá chất hữu ích bao gồm, nhưng không giới hạn ở các CpG biến đổi hóa học (ví dụ CpR, Idera), các chất tương tự dsARN như Poly(I: C) và dẫn xuất của chúng (ví dụ AmpliGen®, Hiltonol®, poly- (ICLC) (IC-R), poly (I: C12U), ADN hoặc ARN của vi khuẩn không CpG cũng như các phân tử và kháng thể nhỏ có hoạt tính miễn dịch như cyclophosphamide, sunitinib, Bevacizumab®, Celebrex, NCX-4016, sildenafil, tafafil, temozolomide, temsirolimus, XL-999, CP-547632, pazopanib, VEGF Trap, ZD2171, AZD2171, anti-CTLA4, các kháng thể khác nhắm vào các cấu trúc mấu chốt của hệ thống miễn dịch (ví dụ như anti-CD40, anti- TGF, thụ thể anti-TNFalpha) và SC58175, có thể hoạt động trị liệu và/hoặc như tá chất. Số lượng và nồng độ của tá chất và chất phụ gia hữu ích trong bối cảnh sáng chế có thể dễ dàng được xác định bởi người có hiểu biết trong lĩnh vực kỹ thuật không cần thử nghiệm quá mức.

Các tá chất ưu tiên là anti-CD40, imiquimod, resiquimod, GM-CSF, cyclophosphamide, sunitinib, bevacizumab, interferon-alpha, CpG oligonucleotit và các dẫn xuất, poly- (I: C) và các dẫn xuất, ARN, sildenafil và các công thức dạng hạt với PLG hoặc virosome.

Trong phương án được ưu tiên, chế phẩm được phẩm theo sáng chế, tá chất được chọn từ nhóm bao gồm các yếu tố kích thích khuẩn lạc, như yếu tố kích thích khuẩn lạc đại thực bào Granulocyte (GM-CSF, sargramostim), cyclophosphamide, imiquimod, resiquimod và interferon-alpha.

Trong phương án được ưu tiên, chế phẩm được phẩm theo sáng chế, tá chất được chọn từ nhóm bao gồm các yếu tố kích thích khuẩn lạc, như yếu tố kích thích khuẩn lạc đại thực bào Granulocyte (GM-CSF, sargramostim), cyclophosphamide, imiquimod, resiquimod. Trong phương án được ưu tiên của chế phẩm được phẩm theo sáng chế, tá chất là cyclophosphamide, imiquimod hoặc resiquimod. Các tá chất được ưu tiên hơn nữa là Montanide IMS 1312, Montanide ISA 206, Montanide ISA 50V, Montanide ISA-51, poly-ICLC (Hiltonol®) và anti-CD40 mAb hoặc các kết hợp chúng.

Thành phần này được sử dụng cho đường dùng ngoài đường tiêu hóa, chẳng hạn như tiêm dưới da, trong da, tiêm bắp hoặc dùng đường uống. Đối với điều này, các peptit và các phân tử tùy ý khác được hòa tan hoặc lơ lửng trong chất mang tốt hơn là dạng nước, được dùng. Ngoài ra, chế phẩm có thể chứa tá được, như chất đệm, chất liên kết, chất nở, chất pha loãng, hương liệu, chất bôi trơn, v.v.. Các peptit cũng có thể được dùng cùng với các chất kích thích miễn dịch, như cytokine. Một danh sách đầy đủ các tá được có thể được sử dụng trong chế phẩm như vậy, ví dụ, có thể được lấy từ A. Kibbe, Handbook of Pharmaceutical Excipients (Kibbe, 2000). Các thành phần có thể được sử dụng để phòng ngừa, điều trị dự phòng và/hoặc điều trị các bệnh ung thư tuyến hoặc ung thư. Các công thức ví dụ có thể được tìm thấy trong, ví dụ, EP2112253.

Điều quan trọng là phải nhận ra rằng đáp ứng miễn dịch được kích hoạt bởi vắc xin theo sáng chế tấn công ung thư ở các giai đoạn tế bào khác nhau và các giai đoạn phát

triển khác nhau. Hơn nữa các con đường tín hiệu hóa liên quan đến ung thư khác nhau bị tấn công. Đây là một lợi thế so với vắc xin chỉ giải quyết một hoặc một vài mục tiêu, có thể khiến khối u dễ dàng thích nghi với cuộc tấn công (thoát khỏi khối u). Hơn nữa, không phải tất cả các khối u riêng lẻ đều biểu hiện cùng một kiểu kháng nguyên. Do đó, sự kết hợp của một số peptit liên quan đến khối u đảm bảo rằng mọi khối u riêng lẻ đều mang ít nhất một số mục tiêu. Thành phần này được thiết kế theo cách mà mỗi khối u dự kiến sẽ thể hiện một số kháng nguyên và bao gồm một số con đường độc lập cần thiết cho sự phát triển và duy trì khối u. Do đó, vắc xin có thể dễ dàng được sử dụng trên thị trường cho cộng đồng bệnh nhân lớn hơn. Điều này có nghĩa là việc lựa chọn trước bệnh nhân được điều trị bằng vắc xin có thể bị hạn chế loại HLA, không yêu cầu bất kỳ đánh giá dấu ấn sinh học bổ sung nào cho biểu hiện kháng nguyên, nhưng vẫn đảm bảo rằng một số mục tiêu bị tấn công đồng thời bởi đáp ứng miễn dịch gây ra, đó là quan trọng cho hiệu quả (Banchereau et al., 2001; Walter et al., 2012).

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "khung" dùng để chỉ phân tử liên kết cụ thể với yếu tố quyết định (ví dụ như kháng nguyên). Trong một phương án, khung có thể hướng thực thể mà nó được gắn vào (ví dụ như một nửa liên kết kháng nguyên (thứ hai)) đến vị trí đích, ví dụ như loại tế bào khối u hoặc mô đệm khối u cụ thể mang yếu tố quyết định kháng nguyên (ví dụ phức hợp của peptit với MHC, theo ứng dụng trong tay). Trong phương án khác, khung có thể kích hoạt tín hiệu hóa thông qua kháng nguyên đích của nó, ví dụ như kháng nguyên phức hợp thụ thể tế bào T. Khung bao gồm nhưng không giới hạn ở các kháng thể và các phân đoạn của chúng, các miền liên kết kháng nguyên của kháng thể, bao gồm vùng biến thiên chuỗi nặng kháng thể và vùng biến thiên chuỗi nhẹ kháng thể, các protein liên kết bao gồm ít nhất một kiểu lặp lại ankyrin và liên kết kháng nguyên miền đơn (single domain antigen binding-SDAB) các phân tử, các aptamer, các TCR (hòa tan) và các tế bào (đã biến đổi) như tế bào T dị sinh hoặc tự thân. Để đánh giá xem phân tử có phải là khung liên kết với đích hay không, có thể thực hiện các thử nghiệm liên kết.

Liên kết "đặc hiệu" có nghĩa là khung liên kết phức hợp peptit-MHC quan tâm hơn các phức hợp peptit-MHC tự nhiên khác, đến một mức độ mà khung được trang bị phân tử hoạt tính có thể giết chết tế bào mang đích cụ thể mà không thể giết chết tế bào khác mà không có đích đặc hiệu nhưng trình diện các phức hợp peptit-MHC khác. Liên kết với các phức hợp peptit-MHC khác là không liên quan nếu peptit của peptit-MHC phản ứng chéo không xảy ra một cách tự nhiên, tức là không có nguồn gốc từ peptidome ở người. Các thử nghiệm để đánh giá sự diệt tế bào đích đã được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật. Các thử nghiệm này nên được thực hiện bằng cách sử dụng các tế bào đích (tế bào chính hoặc dòng tế bào) với sự trình diện peptit-MHC không thay đổi hoặc các tế bào được tải peptit sao cho đạt được mức peptit-MHC xảy ra trong tự nhiên.

Mỗi khung có thể gồm phân tử đánh dấu mà cung cấp rằng khung được liên kết có thể được phát hiện bằng cách xác định sự hiện diện hay vắng mặt của tín hiệu được cung cấp bởi phân tử đánh dấu. Ví dụ, khung có thể được đánh dấu bằng thuốc nhuộm huỳnh quang hoặc bất kỳ phân tử đánh dấu tế bào có thể áp dụng nào khác. Các phân tử đánh dấu như vậy đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật. Ví dụ, đánh dấu huỳnh quang, ví dụ được cung cấp bởi thuốc nhuộm huỳnh quang, có thể cung cấp hình ảnh của aptamer được liên kết bằng kính hiển vi quét huỳnh quang hoặc laser hoặc đếm tế bào dòng.

Mỗi khung có thể được cộng hợp với phân tử hoạt động thứ hai, chẳng hạn như IL-21, anti-CD3 và anti-CD28.

Để biết thêm thông tin về khung polypeptit, ví dụ, xem phần tình trạng kỹ thuật của tài liệu sáng chế WO 2014/071978A1 và các tài liệu tham khảo được trích dẫn trong đó.

Sáng chế còn liên quan đến các aptamer. Các aptamer (xem ví dụ WO 2014/191359 và tài liệu được trích dẫn trong đó) là các phân tử axit nucleic chuỗi đơn ngắn, có thể gấp lại thành các cấu trúc ba chiều xác định và nhận ra các cấu trúc đích cụ thể. Chúng dường như là lựa chọn thay thế phù hợp để phát triển các liệu pháp mục tiêu. Các aptamer đã được chứng minh là liên kết có chọn lọc với một loạt các đích phức hợp với ái lực và tính đặc hiệu cao.

Các aptamer nhận ra các phân tử nằm trên bề mặt tế bào đã được xác nhận trong thập kỷ qua và cung cấp phương tiện để phát triển các phương pháp chẩn đoán và điều trị. Vì các aptamer đã được chứng minh là hầu như không có độc tính và tính gây miễn dịch, nên chúng là ứng cử viên đầy triển vọng cho các ứng dụng y sinh. Thật vậy, các aptamer, ví dụ như các aptamer nhận dạng kháng nguyên màng tuyến tiền liệt cụ thể, đã được sử dụng thành công cho các liệu pháp đích và được chứng minh là có chức năng trong các mô hình ghép ngoại lai *in vivo*. Hơn nữa, các aptamer nhận ra các dòng tế bào khối u cụ thể đã được xác định.

Các aptamer ADN có thể được chọn để tiết lộ các đặc điểm nhận dạng phổ rộng cho các tế bào ung thư khác nhau, và đặc biệt là các tế bào có nguồn gốc từ các khối u rắn, trong khi các tế bào khỏe mạnh không phải khối u và nguyên phát không được nhận ra. Nếu các aptamer được xác định không chỉ nhận ra loại con khối u cụ thể mà còn tương tác với một loạt các khối u, thì điều này làm cho các aptamer được áp dụng như cái gọi là chẩn đoán và điều trị phổ rộng.

Hơn nữa, nghiên cứu hành vi liên kết tế bào với đếm tế bào học dòng cho thấy các aptamer thể hiện ái lực rõ ràng rất tốt nằm trong phạm vi nano.

Các aptamer rất hữu ích cho mục đích chẩn đoán và điều trị. Hơn nữa, có thể chỉ ra rằng một số aptamer được đưa lên bởi các tế bào khối u và do đó có thể hoạt động như phương tiện phân tử để phân phối theo đích đến của các tác nhân chống ung thư như siARN vào tế bào khối u.

Các aptamer có thể được chọn chống lại các đích phức hợp như tế bào và mô và các phức hợp của các peptit bao gồm, tốt hơn là, bao gồm trình tự theo bất kỳ ID SEQ số 1 đến ID SEQ số 101 nào, theo sáng chế có trong phân tử MHC, sử dụng kỹ thuật cell-SELEX (sự phát triển có hệ thống của phối tử theo cấp số nhân-systematic evolution of ligands by exponential).

Các peptit theo sáng chế có thể được sử dụng để tạo và phát triển các kháng thể đặc hiệu chống lại các phức hợp MHC/peptit. Chúng có thể được sử dụng để điều trị, nhắm

đích các độc tố hoặc các chất phóng xạ đến mô bệnh. Một cách sử dụng khác của các kháng thể này có thể nhắm đích các nuclit phóng xạ đến mô bệnh cho mục đích chẩn đoán hình ảnh như PET. Việc sử dụng này có thể giúp phát hiện các di căn nhỏ hoặc để xác định kích thước và vị trí chính xác của các mô bệnh.

Do đó, khía cạnh tiếp theo của sáng chế là đề xuất phương pháp sản xuất kháng thể tái tổ hợp liên kết đặc biệt với phức hợp tương hợp mô chính ở người (MHC) lớp I hoặc II được tạo phức với kháng nguyên giới hạn HLA (tốt nhất là peptit theo sáng chế), phương pháp bao gồm: gây miễn dịch cho động vật có vú không phải là con người được thiết kế về mặt di truyền bao gồm các tế bào biểu hiện phức hợp tương hợp mô chính ở người (MHC) lớp I hoặc II với dạng hòa tan của phân tử MHC lớp I hoặc II được tạo phức với kháng nguyên giới hạn HLA nói trên; phân lập các phân tử mARN từ các tế bào sản xuất kháng thể của động vật có vú không phải người nói trên; tạo ra thư viện hiển thị thực khuẩn thể hiển thị các phân tử protein được mã hóa bởi các phân tử mARN đã nói; và phân lập ít nhất một thực khuẩn thể khỏi thư viện hiển thị thực khuẩn thể đã nói, cho biết ít nhất một thực khuẩn thể hiển thị kháng thể liên kết đặc hiệu với phức hợp tương hợp mô chính ở người (MHC) lớp I hoặc II được tạo phức với kháng nguyên giới hạn HLA đã nêu.

Do đó, khía cạnh khác của sáng chế là đề xuất kháng thể mà liên kết đặc hiệu với phức hợp tương hợp mô chính (MHC) lớp I hoặc II được tạo phức với kháng nguyên giới hạn HLA, trong đó kháng thể tốt hơn là kháng thể đa dòng, kháng thể đơn dòng, kháng thể nhị đặc hiệu và/hoặc kháng thể chimeric.

Các phương pháp tương ứng để tạo ra các kháng thể đó và các phức hợp tương hợp mô chính lớp I, cũng như các công cụ khác để sản xuất các kháng thể này được bộc lộ trong WO 03/068201, WO 2004/084798, WO 01/72768, WO 03/070752, và trong các công bố (Cohen et al., 2003a; Cohen et al., 2003b; Denkborg et al., 2003), mà cho các mục đích của sáng chế đều được kết hợp rõ ràng bằng cách tham chiếu toàn bộ.

Tốt hơn là, kháng thể đang liên kết với ái lực liên kết dưới 20 nanomole, tốt hơn là dưới 10 nanomol, với phức hợp, cũng được coi là "đặc hiệu" theo nội dung của sáng chế.

Sáng chế còn đề cập đến peptit bao gồm trình tự được chọn từ nhóm bao gồm ID SEQ số: 1 đến ID SEQ số 101 hoặc biến thể của nó mà tương đồng (tốt hơn là giống hệt) ít nhất 88% với ID SEQ số 1 đến ID SEQ số 101 hoặc biến thể của nó gây ra các tế bào T phản ứng chéo với peptit đã nêu, trong đó peptit đã nêu không phải là polypeptit có chiều dài đủ bên dưới.

Sáng chế còn đề cập đến peptit bao gồm trình tự được chọn từ nhóm bao gồm ID SEQ số 1 đến ID SEQ số 101 hoặc biến thể của nó mà tương đồng (tốt hơn là giống hệt) ít nhất 88% với ID SEQ số 1 đến ID SEQ số 101, trong đó peptit đã nêu hoặc biến thể của nó có chiều dài tổng thể từ 8 đến 100, tốt nhất là từ 8 đến 30, và tốt nhất là từ 8 đến 14 axit amin.

Sáng chế còn đề cập đến các peptit theo sáng chế có khả năng liên kết với phân tử của phức hợp tương hợp mô chính (MHC) ở người lớp I hoặc II.

Sáng chế còn đề cập đến các peptit theo sáng chế trong đó peptit đã nêu bao gồm hoặc chủ yếu bao gồm trình tự axit amin theo ID SEQ số 1 đến ID SEQ số 101.

Sáng chế còn đề cập đến các peptit theo sáng chế, trong đó peptit được sửa đổi (về mặt hóa học) và/hoặc bao gồm các liên kết không phải peptit.

Sáng chế còn đề cập đến các peptit theo sáng chế, trong đó peptit là một phần của protein dung hợp, cụ thể bao gồm các axit amin đầu N của chuỗi bất biến liên quan đến kháng nguyên HLA-DR (Ii) hoặc trong đó peptit dung hợp với (hoặc thành) kháng thể, như vậy, ví dụ kháng thể dành riêng cho các tế bào đuôi gai.

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

Sáng chế còn đề cập đến axit nucleic theo sáng chế là ADN, cADN, ANP, ARN hoặc các kết hợp của chúng.

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

Sáng chế còn đề cập đến peptit theo sáng chế, axit nucleic theo sáng chế hoặc vector biểu hiện theo sáng chế để sử dụng trong y học, cụ thể là trong điều trị bệnh bạch cầu dòng tủy cấp tính, ung thư vú, ung thư biểu mô tế bào đường mật, bệnh bạch cầu tế bào lympho mạn tính, ung thư đại trực tràng, ung thư túi mật, u nguyên bào đệm, ung thư dạ dày, ung thư dạ dày thực quản, ung thư biểu mô tế bào gan, ung thư biểu mô tế bào vảy vùng đầu và cổ, khối u ác tính, ung thư hạch không Hodgkin, ung thư phổi không phải tế bào nhỏ, ung thư buồng trứng, ung thư thực quản, ung thư tuyến tụy, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư biểu mô tế bào thận, ung thư phổi tế bào nhỏ, ung thư biểu mô bàng quang tiết niệu và ung thư nội mạc tử cung.

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

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

Sáng chế còn đề cập đến phương pháp sản xuất peptit theo sáng chế, phương pháp này bao gồm nuôi cấy tế bào chủ theo sáng chế và phân lập peptit từ tế bào chủ đã nêu hoặc môi trường nuôi cấy của nó.

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

Sáng chế còn đề cập đến phương pháp theo sáng chế, trong đó tế bào trình diện kháng nguyên bao gồm vector biểu hiện có khả năng biểu hiện peptit đã nêu có chứa ID SEQ số 1 đến ID SEQ số 101 hoặc trình tự axit amin biến thể đã nêu.

Sáng chế còn đề cập đến các tế bào T được kích hoạt, được sản xuất theo phương pháp theo sáng chế, trong đó, tế bào T nhận biết có chọn lọc tế bào mà biểu hiện khác thường polypeptit bao gồm trình tự axit amin theo sáng chế.

Sáng chế còn đề cập đến phương pháp diệt tế bào đích ở bệnh nhân nhắm vào các tế bào đích biểu hiện bất thường polypeptit chứa bất kỳ trình tự axit amin nào theo sáng chế, phương pháp bao gồm đưa vào bệnh nhân lượng tế bào T hiệu quả theo sáng chế.

Sáng chế đề cập đến việc sử dụng bất kỳ peptit, axit nucleic nào như được mô tả theo sáng chế, vector biểu hiện theo sáng chế, tế bào theo sáng chế, tế bào lympho T có độc tính tế bào được hoạt hóa theo sáng chế như được phẩm hoặc trong sản xuất được phẩm. Sáng chế còn đề cập đến việc sử dụng theo sáng chế, trong đó được phẩm có hoạt tính chống ung thư.

Sáng chế còn đề cập đến việc sử dụng theo sáng chế, trong đó được phẩm là vắc xin. Sáng chế còn đề cập đến việc sử dụng theo sáng chế, trong đó được phẩm có hoạt tính chống ung thư.

Sáng chế còn đề cập đến việc sử dụng theo sáng chế, trong đó các tế bào ung thư đã nêu là bệnh bạch cầu dòng tủy cấp tính, ung thư vú, ung thư biểu mô tế bào đường mật, bệnh bạch cầu tế bào lympho mãn tính, ung thư đại trực tràng, ung thư túi mật, u nguyên bào đệm, ung thư dạ dày, ung thư dạ dày thực quản, ung thư biểu mô tế bào gan, ung thư biểu mô tế bào vảy vùng đầu và cổ, khối u ác tính, ung thư hạch không Hodgkin, ung thư phổi không phải tế bào nhỏ, ung thư buồng trứng, ung thư thực quản, ung thư tuyến tụy, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư biểu mô tế bào thận, ung thư phổi tế bào nhỏ, ung thư bàng quang tiết niệu, ung thư nội mạc tử cung hoặc các tế bào khối u rắn hoặc huyết học như tế bào ung thư bạch cầu dòng tủy cấp tính, ung thư vú, ung thư biểu mô tế bào đường mật, ung thư bạch cầu tế bào lympho mãn tính, ung thư đại trực tràng, ung thư túi mật, u nguyên bào đệm, ung thư dạ dày, ung thư dạ dày thực quản, ung thư biểu mô tế bào gan, ung thư biểu mô tế bào vảy vùng đầu và cổ, khối u ác tính, ung thư hạch không Hodgkin, ung thư phổi không phải tế bào nhỏ, ung thư buồng trứng, ung thư thực quản, ung thư

tuyến tụy, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư biểu mô tế bào thận, ung thư phổi tế bào nhỏ, ung thư bàng quang tiết niệu, ung thư nội mạc tử cung.

Sáng chế còn đề cập đến các protein đánh dấu và dấu ấn sinh học cụ thể dựa trên peptit theo sáng chế, sau đây được gọi là "đích" mà có thể sử dụng trong chẩn đoán và/hoặc tiên lượng ung thư, tốt hơn là bệnh bạch cầu dòng tủy cấp tính, ung thư vú, ung thư biểu mô tế bào đường mật, bệnh bạch cầu tế bào lympho mạn tính, ung thư đại trực tràng, ung thư túi mật, u nguyên bào đệm, ung thư dạ dày, ung thư dạ dày thực quản, ung thư biểu mô tế bào gan, ung thư biểu mô tế bào vảy vùng đầu và cổ, khối u ác tính, ung thư hạch không Hodgkin, ung thư phổi không phải tế bào nhỏ, ung thư buồng trứng, ung thư tuyến tụy, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư biểu mô tế bào thận, ung thư phổi tế bào nhỏ, ung thư biểu mô bàng quang tiết niệu và ung thư nội mạc tử cung. Sáng chế cũng đề cập đến việc sử dụng các đích mới này trong điều trị 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 đơn dòng. Ngoài các phân tử immunoglobulin nguyên vẹn hoặc "đầy đủ", cũng được bao gồm trong thuật ngữ "các kháng thể" là các phân đoạn (ví dụ như các phân đoạn CDR, Fv, Fab và Fc) hoặc các polyme của các phân tử immunoglobulin và các phiên bản nhân hóa của các phân tử immunoglobulin, miễn là chúng thể hiện bất kỳ tính chất mong muốn nào (ví dụ, liên kết đặc hiệu của (poly)peptit dấu hiệu bệnh bạch cầu dòng tủy cấp tính, ung thư vú, ung thư biểu mô tế bào đường mật, bệnh bạch cầu tế bào lympho mạn tính, ung thư đại trực tràng, ung thư túi mật, u nguyên bào đệm, ung thư dạ dày, ung thư dạ dày thực quản, ung thư biểu mô tế bào gan, ung thư biểu mô tế bào vảy vùng đầu và cổ, khối u ác tính, ung thư hạch không Hodgkin, ung thư phổi không phải tế bào nhỏ, ung thư buồng trứng, ung thư thực quản, ung thư tuyến tụy, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư biểu mô tế bào thận, ung thư phổi tế bào nhỏ, ung thư biểu mô bàng quang tiết niệu và ung thư nội mạc tử cung, phân phối độc tố đến tế bào bệnh bạch cầu dòng tủy cấp tính, ung thư vú, ung thư biểu mô tế bào đường mật, bệnh bạch cầu tế bào lympho mạn tính, ung thư đại trực tràng, ung thư túi mật, u nguyên bào đệm, ung thư dạ dày, ung thư dạ dày thực quản, ung thư biểu mô tế bào gan, ung thư biểu mô tế bào

vảy vùng đầu và cổ, khối u ác tính, ung thư hạch không Hodgkin, ung thư phổi không phải tế bào nhỏ, ung thư buồng trứng, ung thư thực quản, ung thư tuyến tụy, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư biểu mô tế bào thận, ung thư phổi tế bào nhỏ, ung thư biểu mô bàng quang tiết niệu và ung thư nội mạc tử cung biểu hiện các gen dấu hiệu ung thư tại mức tăng lên, và/hoặc ức chế hoạt tính polypeptit dấu hiệu bệnh bạch cầu dòng tủy cấp tính, ung thư vú, ung thư biểu mô tế bào đường mật, bệnh bạch cầu tế bào lympho mạn tính, ung thư đại trực tràng, ung thư túi mật, u nguyên bào đệm, ung thư dạ dày, ung thư dạ dày thực quản, ung thư biểu mô tế bào gan, ung thư biểu mô tế bào vảy vùng đầu và cổ, khối u ác tính, ung thư hạch không Hodgkin, ung thư phổi không phải tế bào nhỏ, ung thư buồng trứng, ung thư thực quản, ung thư tuyến tụy, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư biểu mô tế bào thận, ung thư phổi tế bào nhỏ, ung thư biểu mô bàng quang tiết niệu và ung thư nội mạc tử cung) theo sáng chế.

Bất cứ khi nào có thể, các kháng thể theo sáng chế có thể được mua từ các nguồn thương mại. Các kháng thể theo sáng chế cũng có thể được tạo ra bằng các phương pháp đã biết. Những người có hiểu biết trong lĩnh vực sẽ hiểu rằng toàn bộ chiều dài của các polypeptide hoặc các phân đoạn của nó là dấu hiệu ung thư bệnh bạch cầu dòng tủy cấp tính, ung thư vú, ung thư biểu mô tế bào đường mật, bệnh bạch cầu lympho bào mạn tính, ung thư đại trực tràng, ung thư túi mật, u nguyên bào đệm, ung thư dạ dày, ung thư dạ dày thực quản, ung thư biểu mô tế bào gan, ung thư biểu mô tế bào vảy vùng đầu cổ, khối u ác tính, ung thư hạch không Hodgkin, ung thư phổi không phải tế bào nhỏ, ung thư buồng trứng, ung thư thực quản, ung thư tuyến tụy, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư biểu mô tế bào thận, ung thư phổi tế bào nhỏ, ung thư biểu mô bàng quang và ung thư nội mạc tử cung có thể được sử dụng để tạo các kháng thể theo sáng chế. Polypeptit được sử dụng để tạo kháng thể theo sáng chế có thể được tinh sạch một phần hoặc toàn bộ từ nguồn tự nhiên hoặc có thể được tạo ra bằng các kỹ thuật ADN tái tổ hợp.

Ví dụ, cADN mã hóa peptit theo sáng chế, chẳng hạn như peptit theo polypeptit ID SEQ số 1 đến ID SEQ số 101, hoặc biến thể hoặc phân đoạn của chúng, có thể được biểu hiện trong các tế bào nhân sơ (ví dụ: vi khuẩn) hoặc tế bào nhân chuẩn (ví dụ, tế bào nấm

men, côn trùng hoặc động vật có vú), sau đó protein tái tổ hợp có thể được tinh sạch và sử dụng để tạo ra chế phẩm kháng thể đơn dòng hoặc đa dòng mà liên kết đặc hiệu polypeptit dấu hiệu ung thư bệnh bạch cầu dòng tủy cấp tính, ung thư vú, ung thư biểu mô tế bào đường mật, bệnh bạch cầu lympho bào mạn tính, ung thư đại trực tràng, ung thư túi mật, u nguyên bào đệm, ung thư dạ dày, ung thư dạ dày thực quản, ung thư biểu mô tế bào gan, ung thư biểu mô tế bào vảy vùng đầu cổ, khối u ác tính, ung thư hạch không Hodgkin, ung thư phổi không phải tế bào nhỏ, ung thư buồng trứng, ung thư thực quản, ung thư tuyến tụy, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư biểu mô tế bào thận, ung thư phổi tế bào nhỏ, ung thư biểu mô bàng quang và ung thư nội mạc tử cung được sử dụng để tạo ra kháng thể theo sáng chế.

Người có hiểu biết trong lĩnh vực kỹ thuật sẽ nhận ra rằng việc tạo ra hai hoặc nhiều tập hợp kháng thể đơn dòng hoặc đa dòng khác nhau sẽ tối đa hóa khả năng có được kháng thể với tính đặc hiệu và ái lực cần thiết cho mục đích sử dụng của nó (ví dụ ELISA, hóa mô miễn dịch, hình ảnh *in vivo*, liệu pháp miễn dịch độc tố). Các kháng thể được kiểm tra hoạt tính mong muốn của chúng bằng các phương pháp đã biết, phù hợp với mục đích sử dụng kháng thể (ví dụ ELISA, hóa mô miễn dịch, liệu pháp miễn dịch, v.v. để được hướng dẫn thêm về việc tạo và thử nghiệm kháng thể, xem, ví dụ: Greenfield, 2014 (Greenfield, 2014)). Ví dụ, các kháng thể có thể được kiểm tra trong xét nghiệm ELISA hoặc, Western blots, nhuộm hóa mô miễn dịch của ung thư cố định formalin hoặc các phần mô đông lạnh. Sau đặc tính *in vitro* ban đầu, các kháng thể được dự định để sử dụng trong chẩn đoán hoặc điều trị *in vivo* được thử nghiệm theo các phương pháp thử nghiệm lâm sàng đã biết.

Thuật ngữ "kháng thể đơn dòng" như được sử dụng ở đây đề cập đến kháng thể thu được từ quần thể kháng thể về cơ bản là đồng nhất, tức là; các kháng thể riêng biệt bao gồm quần thể giống hệt nhau ngoại trừ các đột biến có thể xảy ra trong tự nhiên có thể xuất hiện với số lượng nhỏ. Các kháng thể đơn dòng ở đây cụ thể bao gồm các kháng thể "chimeric" trong đó phần chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ giống hệt hoặc tương đồng với các trình tự tương ứng trong các kháng thể có nguồn gốc từ một loài cụ thể hoặc thuộc lớp

hoặc phân lớp kháng thể cụ thể, trong khi phần còn lại trong số (các) chuỗi giống hệt hoặc tương đồng với các trình tự tương ứng trong các kháng thể có nguồn gốc từ loài khác hoặc thuộc về lớp hoặc phân lớp kháng thể khác, cũng như các phân đoạn của các kháng thể đó, miễn là chúng thể hiện hoạt tính trái ngược mong muốn (US 4,816,567, được kết hợp toàn bộ).

Các kháng thể đơn dòng theo sáng chế có thể được điều chế bằng các phương pháp lai. Trong phương pháp lai, chuột hoặc động vật chủ thích hợp khác thường được gây miễn dịch điển hình bằng tác nhân gây miễn dịch để kích thích các tế bào lympho sản xuất hoặc có khả năng tạo ra các kháng thể mà sẽ liên kết đặc biệt với tác nhân gây miễn dịch. Ngoài ra, các tế bào lympho có thể được gây miễn dịch *in vitro*.

Các kháng thể đơn dòng cũng có thể được tạo ra bằng các phương pháp ADN tái tổ hợp, chẳng hạn như các kháng thể được mô tả trong US 4,816,567. Mã hóa ADN các kháng thể đơn dòng theo sáng chế có thể dễ dàng phân lập và giải trình tự bằng cách sử dụng các quy trình thông thường (ví dụ: bằng cách sử dụng các đầu dò oligonucleotit có khả năng liên kết đặc biệt với các gen mã hóa các chuỗi kháng thể chuột nặng và nhẹ).

Các phương pháp *in vitro* cũng thích hợp để điều chế kháng thể đơn trị. Quá trình phân cắt các kháng thể để tạo ra các phân đoạn của chúng, cụ thể là các phân đoạn Fab, có thể được thực hiện bằng các kỹ thuật thông thường đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật. Ví dụ, việc phân cắt có thể được thực hiện bằng papain. Ví dụ về phân cắt bằng papain được mô tả trong WO 94/29348 và US 4,342,566. Quá trình phân cắt kháng thể bằng papain thường tạo ra hai phân đoạn liên kết kháng nguyên giống hệt nhau, được gọi là các phân đoạn Fab, mỗi phân đoạn có một vị trí liên kết kháng nguyên duy nhất và phân đoạn Fc còn lại. Xử lý pepsin mang lại phân đoạn F(ab')₂ và phân đoạn pFc'.

Các phân đoạn kháng thể, dù có được gắn với các trình tự khác hay không, cũng có thể bao gồm các phần chèn, xóa, thay thế hoặc các biến đổi được lựa chọn khác của các vùng cụ thể hoặc phần dư axit amin cụ thể, miễn là hoạt tính của phân đoạn không bị thay đổi hoặc suy yếu đáng kể so với phân đoạn kháng thể hoặc kháng thể không biến đổi.

Những biến đổi này có thể cung cấp cho một số tính chất bổ sung, như loại bỏ/thêm các axit amin có khả năng liên kết disulfide, để tăng tuổi thọ sinh học của nó, để thay đổi các đặc tính bài tiết của nó, v.v.. Trong mọi trường hợp, phân đoạn kháng thể phải có đặc tính hoạt tính sinh học, chẳng hạn như hoạt tính liên kết, quy định liên kết tại miền liên kết, v.v.. Các vùng chức năng hoặc hoạt tính của kháng thể có thể được xác định bằng cách gây đột biến một vùng cụ thể của protein, sau đó là biểu hiện và thử nghiệm polypeptit được biểu hiện. Các phương pháp như vậy rất rõ ràng đối với người có kinh nghiệm trong lĩnh vực kỹ thuật và có thể bao gồm đột biến vị trí cụ thể của axit nucleic mã hóa phân đoạn kháng thể.

Các kháng thể theo sáng chế có thể bao gồm thêm các kháng thể nhân hóa hoặc các kháng thể của con người. Các dạng kháng thể không phải của con người được nhân hóa (ví dụ, chuột) là các globulin miễn dịch chimeric, các chuỗi immunoglobulin hoặc các phân đoạn của chúng (như Fv, Fab, Fab' hoặc các trình tự con liên kết kháng nguyên khác của kháng thể) có chứa trình tự tối thiểu có nguồn gốc từ globulin miễn dịch. Các kháng thể được nhân hóa bao gồm các globulin miễn dịch ở người (kháng thể nhận) trong đó phần còn lại từ vùng xác định tính bổ khuyết (complementary determining region - CDR) của bên nhận được thay thế bằng phần còn lại từ CDR của loài không phải người (kháng thể cho) như chuột nhắt, chuột hoặc thỏ có tính đặc hiệu, ái lực và năng lực mong muốn. Trong một số trường hợp, phần còn lại khung Fv (FR) của globulin miễn dịch ở người được thay thế bằng phần dư không phải của người tương ứng. Các kháng thể được nhân hóa cũng có thể chứa các phần dư không tìm thấy trong kháng thể của bên nhận cũng như trong các trình tự CDR hoặc khung đưa vào. Nhìn chung, kháng thể được nhân hóa sẽ bao gồm về cơ bản tất cả trong số ít nhất một, và thường là hai, các miền biến thiên, trong đó tất cả hoặc về cơ bản là tất cả các vùng CDR tương ứng với miền biến thiên của globulin miễn dịch không phải của người và tất cả hoặc về cơ bản là tất cả các vùng FR là những miền biến thiên của trình tự liên ứng globulin miễn dịch ở người. Các kháng thể được nhân hóa một cách tối ưu cũng sẽ bao gồm ít nhất một phần của vùng bất biến globulin miễn dịch (Fc), điển hình là phần globulin miễn dịch ở người.

Các phương pháp nhân hóa các kháng thể không phải ở người đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật. Thông thường, kháng thể được nhân hóa có một hoặc nhiều phần dư axit amin được đưa vào nó từ nguồn không phải của người. Các phần dư axit amin không phải của người này thường được gọi là phần dư "du nhập", thường được lấy từ miền biến thiên "du nhập". Quá trình nhân hóa có thể về cơ bản được thực hiện bằng cách thay thế các trình tự các CDR hoặc CDR của loài gặm nhấm cho các trình tự tương ứng của kháng thể người. Theo đó, các kháng thể "nhân hóa" như vậy là các kháng thể chimeric (US 4,816,567), trong đó về cơ bản ít hơn một miền biến thiên ở người còn nguyên vẹn đã được thay thế bằng trình tự tương ứng từ loài không phải con người. Trong thực tế, các kháng thể được nhân hóa thường là các kháng thể ở người, trong đó một số phần dư CDR và có thể một số phần dư FR được thay thế bằng các phần dư từ các vị trí tương tự trong các kháng thể loài gặm nhấm

Động vật biến đổi gen (ví dụ, chuột) có khả năng, ngay khi được gây miễn dịch, tạo ra thư mục đầy đủ các kháng thể của người trong sự trường hợp không sản xuất được globulin miễn dịch nội sinh. Ví dụ, người ta đã mô tả rằng việc xóa đồng hợp tử của gen vùng nối chuỗi kháng thể nặng trong chimeric và chuột đột biến dòng phôi dẫn đến ức chế hoàn toàn việc sản xuất kháng thể nội sinh. Chuyển dãy gen globulin miễn dịch dòng phôi ở người ở những con chuột đột biến dòng phôi như vậy sẽ dẫn đến việc tạo ra kháng thể người ngay khi yêu cầu kháng nguyên. Các kháng thể người cũng có thể được sản xuất trong các thư viện hiển thị thực khuẩn thể.

Các kháng thể theo sáng chế tốt hơn là được sử dụng cho đối tượng trong chất mang được dụng. Thông thường, lượng muối được dụng thích hợp được sử dụng trong công thức để đưa ra công thức đẳng trương. Ví dụ về chất mang được dụng bao gồm nước muối, dung dịch Ringer và dung dịch dextrose. Độ pH của dung dịch tốt nhất là từ khoảng 5 đến khoảng 8, và tốt nhất là từ khoảng 7 đến khoảng 7,5. Các chất mang khác bao gồm các chế phẩm giải phóng được duy trì liên tục như ma trận bán thân của polyme kỵ nước rắn có chứa kháng thể, ma trận ở dạng vật có hình dạng, ví dụ, màng, liposome hoặc vi hạt. Rõ ràng với những người có hiểu biết trong lĩnh vực kỹ thuật rằng chất mang nhất

định có thể thích hợp hơn, ví dụ, tùy theo đường dùng 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 tĩnh mạch, tiêm màng bụng, tiêm dưới da, tiêm bắp) hoặc bằng các phương pháp khác như truyền dịch để đảm bảo đưa nó vào dòng máu dưới dạng hiệu quả. Các kháng thể cũng có thể được dùng bằng các đường trong khối u hoặc quanh khối u, để phát huy tác dụng điều trị tại chỗ cũng như toàn thân. Tiêm tại chỗ hoặc tiêm tĩnh mạch được ưu tiên.

Liều lượng và lịch trình hiệu quả để dùng các kháng thể có thể được xác định theo kinh nghiệm và việc đưa ra những quyết định như vậy là thuộc kỹ năng trong lĩnh vực kỹ thuật. Những người có hiểu biết trong lĩnh vực kỹ thuật sẽ hiểu rằng liều lượng kháng thể phải được sử dụng sẽ khác nhau tùy thuộc vào, ví dụ, đối tượng sẽ nhận kháng thể, đường dùng, loại kháng thể cụ thể được sử dụng và các loại thuốc khác được sử dụng. Liều kháng thể thông thường hàng ngày được sử dụng một mình có thể nằm trong khoảng từ khoảng 1 $\mu\text{g/kg}$ đến 100 mg/kg trọng lượng cơ thể trở lên mỗi ngày, tùy thuộc vào các yếu tố được đề cập ở trên. Sử dụng kháng thể tốt hơn là để điều trị bệnh bạch cầu dòng tủy cấp tính, ung thư vú, ung thư biểu mô tế bào đường mật, bệnh bạch cầu lympho bào mạn tính, ung thư đại trực tràng, ung thư túi mật, u nguyên bào đệm, ung thư dạ dày, ung thư dạ dày thực quản, ung thư biểu mô tế bào gan, ung thư biểu mô tế bào vảy vùng đầu cổ, khối u ác tính, ung thư hạch không Hodgkin, ung thư phổi không phải tế bào nhỏ, ung thư buồng trứng, ung thư thực quản, ung thư tuyến tụy, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư biểu mô tế bào thận, ung thư phổi tế bào nhỏ, ung thư biểu mô bàng quang và ung thư nội mạc tử cung, hiệu quả của kháng thể trị liệu có thể được đánh giá theo nhiều cách khác nhau đã biết với người có hiểu biết lĩnh vực. Ví dụ, kích thước, số lượng và/hoặc phân phối ung thư trong đối tượng được điều trị có thể được theo dõi bằng các kỹ thuật hình ảnh khối u tiêu chuẩn. Kháng thể được dùng làm liệu pháp ngăn chặn sự phát triển của khối u, dẫn đến sự co rút của khối u và/hoặc ngăn ngừa sự phát triển của các khối u mới,

so với tiến trình bệnh sẽ xảy ra khi không có kháng thể, là kháng thể hiệu quả trong điều trị ung thư.

Khía cạnh khác của sáng chế là đề xuất phương pháp sản xuất thụ thể tế bào T hòa tan (sTCR) nhận ra phức hợp peptit-MHC đặc hiệu. Các thụ thể tế bào T hòa tan như vậy có thể được tạo ra từ các dòng tế bào T đặc hiệu, và ái lực của chúng có thể được tăng lên bằng cách gây đột biến nhắm vào các vùng xác định tính bổ khuyết. Với mục đích lựa chọn thụ thể tế bào T, có thể sử dụng hiển thị thực khuẩn thể (US 2010/0113300, (Liddy et al., 2012)). Với mục đích ổn định các thụ thể tế bào T trong quá trình hiển thị thực khuẩn thể và trong trường hợp sử dụng thực tế làm thuốc, chuỗi alpha và beta có thể được liên kết, ví dụ: bởi các liên kết disulfide không tự nhiên, các liên kết cộng hóa trị khác (thụ thể tế bào T chuỗi đơn) hoặc bởi các miền nhị trùng hóa (Boulter et al., 2003; Card et al., 2004; Willcox et al., 1999). Thụ thể tế bào T có thể được liên kết với các độc tố, thuốc, cytokine (xem, ví dụ, US 2013/0115191) và các miền tuyển chọn các tế bào chấp hành như miền anti-CD3, v.v., để thực hiện các chức năng cụ thể trên các tế bào mục tiêu. Hơn nữa, nó có thể được biểu hiện trong các tế bào T được sử dụng để chuyển vào đối tượng nhận. Thông tin khác có thể thấy trong WO 2004/033685A1 và WO 2004/074322A1. Kết hợp của các sTCR được mô tả trong WO 2012/056407A1. Các phương pháp sản xuất khác được bộc lộ trong WO 2013/057586A1.

Ngoài ra, các peptit và/hoặc các TCR hoặc kháng thể hoặc các phân tử liên kết khác theo sáng chế có thể được sử dụng để xác minh chẩn đoán của nhà nghiên cứu bệnh ung thư dựa trên mẫu sinh thiết.

Các kháng thể hoặc TCR cũng có thể được sử dụng để xét nghiệm chẩn đoán *in vivo*. Nói chung, kháng thể được đánh dấu bằng radionucleotit (chẳng hạn như ^{11}In , ^{99}Tc , ^{14}C , ^{131}I , ^3H , ^{32}P hoặc ^{35}S) để khối u có thể được định vị bằng cách sử dụng phương pháp miễn dịch. Trong một phương án, các kháng thể hoặc các phân đoạn của chúng liên kết với các miền ngoại bào của hai hoặc nhiều đích của protein được chọn từ nhóm bao gồm các protein nói trên và giá trị ái lực (Kd) nhỏ hơn $1 \times 10\mu\text{M}$.

Các kháng thể để sử dụng chẩn đoán có thể được đánh dấu bằng các đầu dò phù hợp để phát hiện bằng các phương pháp chẩn đoán hình ảnh khác nhau. Các phương pháp phát hiện đầu dò bao gồm, nhưng không giới hạn ở, huỳnh quang, ánh sáng, đồng tiêu và kính hiển vi điện tử; hình ảnh cộng hưởng từ và quang phổ; phép nghiệm huỳnh quang, chụp cắt lớp vi tính và chụp cắt lớp phát xạ positron. Các đầu dò thích hợp bao gồm, nhưng không giới hạn ở, florescein, rodamin, eozin và các chất huỳnh quang khác, đồng vị phóng xạ, vàng, gadolini và các lantanit khác, sắt thuận từ, flo-18 và các hạt nhân phóng xạ phát positron khác. Ngoài ra, các đầu dò có thể là hai hoặc đa chức năng và có thể phát hiện được bằng nhiều hơn một phương pháp được liệt kê. Các kháng thể này có thể được đánh dấu trực tiếp hoặc gián tiếp bằng các mẫu dò đã nêu. Việc gắn các đầu dò vào kháng thể bao gồm gắn cộng hóa trị đầu dò, kết hợp đầu dò vào kháng thể và gắn cộng hóa trị hợp chất tạo chelat để gắn với đầu dò, trong số những chất khác đã được công nhận trong lĩnh vực này. Đối với hóa mô miễn dịch, mẫu mô bệnh có thể tươi hoặc đông lạnh hoặc có thể được nhúng vào parafin và cố định bằng chất bảo quản như formalin. Phần cố định hoặc phần nhúng chứa mẫu được tiếp xúc với kháng thể sơ cấp được đánh dấu và kháng thể thứ cấp, trong đó kháng thể này được sử dụng để phát hiện sự biểu hiện của các protein tại chỗ.

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

Tốt hơn là tế bào của động vật có vú thiếu hoặc có mức hoặc chức năng của chất vận chuyển peptit TAP giảm. Các tế bào thích hợp thiếu chất vận chuyển peptit TAP bao gồm tế bào T2, RMA-S và Drosophila. TAP là chất vận chuyển kết hợp với quá trình xử lý kháng nguyên.

Dòng tế bào thiếu hụt tải peptit ở người T2 có sẵn từ American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, USA theo Catalog No CRL 1992; dòng tế bào *Drosophila* Schneider 2 có sẵn từ ATCC theo Catalog No CRL 19863; dòng tế bào RMA-S của chuột được mô tả trong tài liệu Ljunggren và cộng sự. (Ljunggren and Karre, 1985).

Tốt hơn là trước khi chuyển nạp, tế bào chủ về cơ bản không biểu hiện phân tử MHC lớp I nào. Tốt hơn là tế bào kích thích cũng biểu hiện phân tử quan trọng để cung cấp tín hiệu đồng kích thích cho tế bào T, chẳng hạn như bất kỳ B7.1, B7.2, ICAM-1 và LFA 3. Trình tự axit nucleic của nhiều phân tử MHC lớp I và của các phân tử đồng kích thích được công bố công khai từ cơ sở dữ liệu GenBank và EMBL.

Trong trường hợp epitope MHC lớp I được sử dụng như một kháng nguyên; tế bào T là tế bào T dương tính CD8.

Nếu tế bào trình diện kháng nguyên được chuyển nạp để biểu hiện epitope như vậy, thì tốt hơn là tế bào bao gồm vectơ biểu hiện có khả năng biểu hiện peptit chứa ID ID SEQ số: 1 đến ID SEQ số: 101 hoặc trình tự axit amin biến thể của chúng.

Một số phương pháp khác có thể được sử dụng để tạo ra các tế bào T *in vitro*. Ví dụ, tế bào lympho thâm nhiễm khối u tự thân có thể được sử dụng trong việc tạo ra CTL. Plebanski và cộng sự (Plebanski et al., 1995) đã sử dụng các tế bào lympho máu ngoại vi tự thân (PLB) để điều chế các tế bào T. Hơn nữa, có thể sản xuất các tế bào T tự thân bằng cách tạo xung các tế bào đuôi gai với peptit hoặc polypeptit, hoặc thông qua lây nhiễm virus tái tổ hợp. Ngoài ra, tế bào B có thể được sử dụng để sản xuất tế bào T tự thân. Ngoài ra, các đại thực bào được xung với peptit hoặc polypeptit, hoặc bị nhiễm virus tái tổ hợp, có thể được sử dụng để điều chế các tế bào T tự thân. S. Walter và cộng sự (Walter et al., 2003) mô tả quá trình môi *in vitro* của tế bào T bằng cách sử dụng các tế bào trình diện kháng nguyên nhân tạo (aAPC), đây cũng là một cách thích hợp để tạo ra tế bào T đối lại peptit được lựa chọn. Trong sáng chế này, các aAPC được tạo ra bằng cách ghép các phức hợp MHC:peptit đã được tạo với bề mặt của các hạt polystyren (vòng vi

hạt) bằng hóa sinh biotin: streptavidin. Hệ thống này cho phép kiểm soát chính xác mật độ MHC trên aAPC, cho phép chọn lọc các đáp ứng tế bào T đặc hiệu kháng nguyên ái lực cao hoặc thấp kích thích với hiệu quả cao từ các mẫu máu. Ngoài phức hợp MHC:peptit, các aAPC nên mang các protein khác có hoạt tính đồng kích thích như kháng thể kháng CD28 được ghép trên bề mặt của chúng. Hơn nữa, các hệ thống dựa trên các aAPC như vậy thường yêu cầu bổ sung các yếu tố hòa tan thích hợp, e. g. cytokine, như interleukin-12.

Tế bào dị sinh cũng có thể được sử dụng trong việc điều chế tế bào T và phương pháp được mô tả chi tiết trong WO 97/26328, được đưa vào đây để tham khảo. 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 nhiễm baculovirus, vi khuẩn, nấm men và tế bào đích bị nhiễm bệnh đậu mùa. Ngoài ra, virus thực vật có thể được sử dụng (ví dụ, Porta và cộng sự (Porta et al., 1994) mô tả sự phát triển của virus khảm cây đậu đũa như hệ thống năng suất cao để trình diện các peptit ngoại lai.

Các tế bào T đã được hoạt hóa chống lại trực tiếp các peptit theo sáng chế rất hữu ích trong liệu pháp. Do đó, khía cạnh khác của sáng chế đề xuất các tế bào T đã hoạt hóa có thể thu được bằng các phương pháp nêu trên theo sáng chế.

Các tế bào T được hoạt hóa, được tạo ra bởi phương pháp trên, sẽ nhận ra một cách có chọn lọc tế bào biểu hiện bất thường polypeptit chứa trình tự axit amin là ID SEQ số 1 đến ID SEQ số 101.

Tốt hơn là tế bào T nhận ra tế bào bằng cách tương tác thông qua TCR của nó với phức hợp HLA/peptit (ví dụ: liên kết). Tế bào T rất hữu ích trong phương pháp tiêu diệt các tế bào đích ở bệnh nhân mà tế bào đích biểu hiện bất thường polypeptit bao gồm trình tự axit amin theo sáng chế, trong đó bệnh nhân được dùng một số lượng tế bào T đã hoạt hóa hiệu quả. Các tế bào T được sử dụng cho bệnh nhân có thể có nguồn gốc từ bệnh nhân và được hoạt hóa như mô tả ở trên (tức là chúng là các tế bào T tự thân). Ngoài ra, các tế bào T không phải từ bệnh nhân mà là từ một cá nhân khác. Tất nhiên, ưu tiên nếu

cá nhân là một cá thể khỏe mạnh. "Cá nhân khỏe mạnh" theo sáng chế có nghĩa là cá nhân đó nói chung có sức khỏe tốt, tốt nhất là có hệ thống miễn dịch tốt và tốt hơn nữa là không mắc bất kỳ bệnh nào có thể dễ dàng kiểm tra và phát hiện.

in vivo, các tế bào đích cho các tế bào T dương tính CD8 theo sáng chế có thể là tế bào của khối u (đôi khi biểu hiện MHC lớp II) và/hoặc tế bào cơ chất xung quanh khối u (tế bào khối u) (đôi khi cũng biểu hiện MHC lớp II; (Dengjel et al., 2006)).

Tế bào T theo sáng chế có thể được sử dụng làm các thành phần hoạt tính của chế phẩm điều trị. Do đó, sáng chế cũng đề xuất phương pháp tiêu diệt tế bào đích ở bệnh nhân mà tế bào đích biểu hiện bất thường polypeptit bao gồm trình tự axit amin theo sáng chế, phương pháp này bao gồm việc đưa vào bệnh nhân một số lượng tế bào T hiệu quả như đã định nghĩa ở trên.

“Biểu hiện bất thường”, theo sáng chế cũng có nghĩa là polypeptit được biểu hiện quá mức so với mức biểu hiện trong các mô bình thường hoặc gen im lặng trong mô mà từ đó khối u được phân phối nhưng trong khối u, nó được biểu hiện. “Biểu hiện quá mức” theo sáng chế có nghĩa là polypeptit có mặt ở mức gấp ít nhất 1,2 lần so với mức có mặt trong mô bình thường; tốt nhất là ít nhất gấp 2 lần, và tốt hơn nữa là ít nhất gấp 5 lần hoặc 10 lần mức có mặt trong mô bình thường.

Các tế bào T có thể thu được bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này, ví dụ: những mô tả ở trên.

Phương thức cho cái gọi là chuyển tiếp nhận tế bào T này đã được biết đến trong lĩnh vực này. Các đánh giá có thể được tìm thấy trong: Gattioni và cộng sự và Morgan và cộng sự (Gattinoni et al., 2006; Morgan et al., 2006).

Khía cạnh khác của sáng chế bao gồm việc sử dụng các 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 là tế bào T. Tế bào T đã được thiết kế này sau đó có thể được chuyển cho bệnh nhân để điều trị ung thư.

Bất kỳ phân tử nào theo sáng chế, tức là peptit, axit nucleic, kháng thể, vector biểu hiện, tế bào, tế bào T được hoạt hóa, thụ thể tế bào T hoặc axit nucleic mã hóa nó, đều hữu ích cho việc điều trị các rối loạn, đặc trưng bởi các tế bào thoát khỏi đáp ứng miễn dịch. Do đó, bất kỳ phân tử nào theo sáng chế đều có thể được sử dụng làm thuốc chữa bệnh hoặc sản xuất thuốc chữa bệnh. Phân tử có thể được sử dụng bởi chính nó hoặc kết hợp với (các) phân tử khác theo sáng chế hoặc (các) phân tử đã biết.

Sáng chế còn hướng đến bộ kit bao gồm:

(a) vật chứa chứa chế phẩm dược phẩm như mô tả ở trên, ở dạng dung dịch hoặc ở dạng đông khô;

(b) tùy ý vật chứa thứ hai chứa chất pha loãng hoặc dung dịch hoàn nguyên cho công thức đông khô; và

(c) tùy ý, hướng dẫn (i) sử dụng dung dịch hoặc (ii) hoàn nguyên và/hoặc sử dụng công thức đông khô.

Bộ kit có thể còn bao gồm một hoặc nhiều (iii) chất đệm, (iv) chất pha loãng, (v) bộ lọc, (vi) kim tiêm hoặc (v) ống tiêm. Vật chứa tốt hơn là chai, lọ, ống tiêm hoặc ống nghiệm; và có thể là vật chứa nhiều công dụng. Chế phẩm dược phẩm tốt hơn là được đông khô.

Bộ kit theo sáng chế tốt hơn là bao gồm công thức đông khô theo sáng chế trong vật chứa phù hợp và các hướng dẫn hoàn nguyên nó và/hoặc sử dụng nó. Các vật chứa thích hợp bao gồm, ví dụ, chai, lọ (ví dụ: lọ hai ngăn), ống tiêm (chẳng hạn như ống tiêm hai buồng) và ống nghiệm. Vật chứa có thể được tạo ra từ nhiều loại vật liệu khác nhau như thủy tinh hoặc chất dẻo. Tốt hơn là bộ kit và/hoặc vật chứa chứa hướng dẫn về hoặc được liên kết với vật chứa mà chỉ ra hướng hoàn nguyên và/hoặc sử dụng. Ví dụ, nhãn có thể chỉ ra rằng công thức đông khô phải được hoàn nguyên đến nồng độ peptit như mô tả ở trên. Nhãn có thể cho biết thêm rằng công thức này hữu ích hoặc được dùng để tiêm dưới da.

Vật chứa giữ công thức có thể là lọ dùng được nhiều lần, cho phép tái sử dụng (ví dụ, từ 2-6 lần dùng) công thức đã hoàn nguyên. Bộ kit còn có thể bao gồm vật chứa thứ hai chứa chất pha loãng thích hợp (ví dụ, dung dịch natri bicacbonat).

Khi trộn chất pha loãng và công thức đông khô, nồng độ peptit cuối cùng trong công thức đã hoàn nguyên tốt hơn là ít nhất 0,15 mg/mL/peptit (= 75 µg) và tốt hơn là không quá 3 mg/mL/peptit (= 1500 µg). Bộ kit có thể còn bao gồm các vật liệu khác mong muốn từ quan điểm thương mại và người dùng, còn bao gồm các chất đệm, chất pha loãng, bộ lọc, kim tiêm, ống tiêm và bao bì kèm theo tờ hướng dẫn sử dụng.

Bộ kit theo sáng chế có thể có vật chứa duy nhất chứa công thức chế phẩm được phẩm theo sáng chế có hoặc không có các thành phần khác (ví dụ, các hợp chất khác hoặc chế phẩm được phẩm của các hợp chất khác này) hoặc có thể có vật chứa riêng biệt cho từng thành phần.

Tốt hơn là, bộ kit theo sáng chế bao gồm công thức theo sáng chế được đóng gói để sử dụng kết hợp với việc sử dụng đồng thời hợp chất thứ hai (chẳng hạn như tá chất (ví dụ GM-CSF), tác nhân hóa trị liệu, sản phẩm tự nhiên, hoocmon hoặc chất đối kháng, chất ức chế hoặc chất chống hình thành mạch, chất gây chết theo chương trình hoặc chất thải kim loại nặng) hoặc chế phẩm được phẩm của chúng. Các thành phần của bộ kit có thể được tạo phức trước hoặc mỗi thành phần có thể được chứa trong vật chứa riêng biệt trước khi dùng cho bệnh nhân. Các thành phần của bộ kit có thể được cung cấp trong một hoặc nhiều dung dịch lỏng, tốt nhất là dung dịch nước, tốt hơn là dung dịch nước vô trùng. Các thành phần của bộ kit cũng có thể được cung cấp dưới dạng chất rắn, có thể được chuyển thành chất lỏng bằng cách bổ sung các dung môi thích hợp, tốt hơn là được cung cấp trong vật chứa riêng biệt khác.

Vật chứa của bộ dụng cụ điều trị có thể là lọ, ống nghiệm, bình, chai, ống tiêm hoặc bất kỳ phương tiện nào khác để chứa chất rắn hoặc chất lỏng. Thông thường, khi có nhiều hơn một thành phần, bộ kit sẽ chứa lọ thứ hai hoặc vật chứa khác, cho phép định lượng riêng biệt. Bộ kit cũng có thể chứa vật chứa khác cho chất lỏng được dùng. Tốt hơn là, bộ

kit điều trị sẽ chứa thiết bị (ví dụ, một hoặc nhiều kim tiêm, ống tiêm, ống nhỏ giọt, pipet, v.v.), cho phép sử dụng các tác nhân theo sáng chế là thành phần của bộ kit này.

Công thức hiện tại là công thức phù hợp để dùng các peptit bằng bất kỳ đường dùng nào được chấp nhận như uống (đường ruột), nhỏ mũi, tra mắt, tiêm dưới da, trong da, tiêm bắp, tiêm tĩnh mạch hoặc qua da. Tốt hơn là đường dùng là s.c. và tốt nhất là đường dùng i.d. có thể bằng bơm truyền.

Vì các peptit theo sáng chế được phân lập từ bệnh bạch cầu dòng tủy cấp tính, ung thư vú, ung thư biểu mô tế bào đường mật, bệnh bạch cầu tế bào lympho mãn tính, ung thư đại trực tràng, ung thư túi mật, u nguyên bào đệm, ung thư dạ dày, ung thư dạ dày thực quản, ung thư biểu mô tế bào gan, ung thư biểu mô tế bào vảy vùng đầu và cổ, khối u ác tính, ung thư hạch không Hodgkin, ung thư phổi không phải tế bào nhỏ, ung thư buồng trứng, ung thư thực quản, ung thư tuyến tụy, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư biểu mô tế bào thận, ung thư phổi tế bào nhỏ, ung thư bàng quang tiết niệu, ung thư nội mạc tử cung, được phẩm theo sáng chế tốt hơn là được sử dụng để điều trị bệnh bạch cầu dòng tủy cấp tính, ung thư vú, ung thư biểu mô tế bào đường mật, ung thư bạch cầu tế bào lympho mãn tính, ung thư đại trực tràng, ung thư túi mật, u nguyên bào đệm, ung thư dạ dày, ung thư dạ dày thực quản, ung thư biểu mô tế bào gan, ung thư biểu mô tế bào vảy vùng đầu và cổ, khối u ác tính, ung thư hạch không Hodgkin, ung thư phổi không phải tế bào nhỏ, ung thư buồng trứng, ung thư thực quản, ung thư tuyến tụy, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư biểu mô tế bào thận, ung thư phổi tế bào nhỏ, ung thư bàng quang tiết niệu, ung thư nội mạc tử cung.

Sáng chế còn đề cập đến phương pháp sản xuất được phẩm được cá nhân hóa cho từng bệnh nhân bao gồm sản xuất chế phẩm được phẩm chứa ít nhất một peptit được chọn từ kho TUMAP được sàng lọc trước, trong đó ít nhất một peptit được sử dụng trong chế phẩm được phẩm được chọn để phù hợp với từng bệnh nhân. Trong một phương án, chế phẩm được phẩm là vắc xin. Phương pháp này cũng có thể được thích ứng để tạo ra các dòng tế bào T cho các ứng dụng sau, chẳng hạn như phân lập TCR hoặc kháng thể hòa tan và các lựa chọn điều trị khác.

“Được phẩm được cá nhân hóa” có nghĩa là các liệu pháp được điều chỉnh cụ thể cho một bệnh nhân riêng lẻ sẽ chỉ được sử dụng để điều trị cho riêng bệnh nhân đó, bao gồm vắc xin ung thư được cá nhân hóa tích cực và các liệu pháp tế bào tiếp nhận sử dụng mô bệnh nhân tự thân.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "kho" sẽ chỉ một nhóm hoặc tập hợp các peptit đã được sàng lọc trước về khả năng gây miễn dịch và/hoặc biểu hiện quá mức trong một loại khối u cụ thể. Thuật ngữ “kho” không nhằm ngụ ý rằng các peptit cụ thể có trong vắc xin đã được sản xuất trước và bảo quản trong cơ sở vật chất, mặc dù khả năng đó đã được dự tính. Dự kiến rõ ràng rằng các peptit có thể được sản xuất *de novo* cho từng loại vắc xin được sản xuất riêng lẻ hoặc có thể được sản xuất trước và bảo quản. Kho (ví dụ, ở dạng cơ sở dữ liệu) bao gồm các peptit liên quan đến khối u được biểu hiện quá mức ở mức cao trong mô khối u của bệnh nhân bệnh bạch cầu dòng tủy cấp tính, ung thư vú, ung thư biểu mô tế bào đường mật, bệnh bạch cầu tế bào lympho mạn tính, ung thư đại trực tràng, ung thư túi mật, u nguyên bào đệm, ung thư dạ dày, ung thư dạ dày thực quản, ung thư biểu mô tế bào gan, ung thư biểu mô tế bào vảy vùng đầu và cổ, khối u ác tính, ung thư hạch không Hodgkin, ung thư phổi không phải tế bào nhỏ, ung thư buồng trứng, ung thư thực quản, ung thư tuyến tụy, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư biểu mô tế bào thận, ung thư phổi tế bào nhỏ, ung thư biểu mô bàng quang tiết niệu và ung thư nội mạc tử cung với các alen HLA-A HLA-B và HLA-C khác nhau. Nó có thể chứa các peptit MHC lớp I và MHC lớp II hoặc các peptit MHC lớp I được kéo dài. Ngoài các peptit liên quan đến khối u được thu thập từ các mô bệnh bạch cầu dòng tủy cấp tính, ung thư vú, ung thư biểu mô tế bào đường mật, bệnh bạch cầu lympho bào mạn tính, ung thư đại trực tràng, ung thư túi mật, u nguyên bào đệm, ung thư dạ dày, ung thư dạ dày thực quản, ung thư biểu mô tế bào gan, ung thư biểu mô tế bào vảy vùng đầu cổ, khối u ác tính, ung thư hạch không Hodgkin, ung thư phổi không phải tế bào nhỏ, ung thư buồng trứng, ung thư thực quản, ung thư tuyến tụy, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư biểu mô tế bào thận, ung thư phổi tế bào nhỏ, ung thư biểu mô bàng quang và ung thư nội mạc tử cung, kho có thể chứa các peptit đánh dấu HLA-A * 02, HLA-A * 01, HLA-A * 03, HLA-A * 24, HLA-B * 07,

HLA-B * 08 và HLA-B * 44. Các peptit này cho phép so sánh mức độ miễn dịch tế bào T do các TUMAP gây ra theo cách định lượng và do đó cho phép rút ra kết luận quan trọng về khả năng của vắc xin trong việc tạo ra các đáp ứng chống khối u. Thứ hai, chúng hoạt động như các peptit kiểm soát dương tính quan trọng có nguồn gốc từ kháng nguyên “không phải tự thân” trong trường hợp không quan sát thấy bất kỳ đáp ứng nào của tế bào T do vắc xin gây ra với các TUMAP có nguồn gốc từ kháng nguyên “tự thân” ở bệnh nhân. Và thứ ba, nó có thể cho phép rút ra kết luận, liên quan đến tình trạng khả năng miễn dịch của bệnh nhân.

Các TUMAP cho kho được xác định bằng cách sử dụng phương pháp tiếp cận bộ gen chức năng tích hợp kết hợp phân tích biểu hiện gen, khối phổ và miễn dịch tế bào T (XPresident®). Phương pháp này đảm bảo rằng chỉ các TUMAP thực sự hiện diện trên một tỷ lệ phần trăm khối u cao nhưng không hoặc chỉ biểu hiện rất ít trên mô bình thường, mới được chọn để phân tích thêm. Để lựa chọn peptit ban đầu, các mẫu bệnh bạch cầu dòng tủy cấp tính, ung thư vú, ung thư biểu mô tế bào đường mật, bệnh bạch cầu lympho bào mạn tính, ung thư đại trực tràng, ung thư túi mật, u nguyên bào đệm, ung thư dạ dày, ung thư dạ dày thực quản, ung thư biểu mô tế bào gan, ung thư biểu mô tế bào vảy vùng đầu cổ, khối u ác tính, ung thư hạch không Hodgkin, ung thư phổi không phải tế bào nhỏ, ung thư buồng trứng, ung thư thực quản, ung thư tuyến tụy, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư biểu mô tế bào thận, ung thư phổi tế bào nhỏ, ung thư biểu mô bàng quang và ung thư nội mạc tử cung từ bệnh nhân và máu từ những người cho khỏe mạnh được phân tích theo phương thức từng bước:

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

2. Phân tích biểu hiện axit ribonucleic thông tin (mARN) trên toàn bộ gen được sử dụng để xác định các gen biểu hiện quá mức trong mô ác tính (bệnh bạch cầu dòng tủy cấp tính, ung thư vú, ung thư biểu mô tế bào đường mật, bệnh bạch cầu tế bào lympho mạn tính, ung thư đại trực tràng, ung thư túi mật, u nguyên bào đệm, ung thư dạ dày, ung thư dạ dày thực quản, ung thư biểu mô tế bào gan, ung thư biểu mô tế bào vảy vùng đầu và cổ, khối u ác tính, ung thư hạch không Hodgkin, ung thư phổi không phải tế bào nhỏ,

ung thư buồng trứng, ung thư thực quản, ung thư tuyến tụy, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư biểu mô tế bào thận, ung thư phổi tế bào nhỏ, ung thư biểu mô bàng quang tiết niệu và ung thư nội mạc tử cung được so sánh với một loạt các cơ quan và mô bình thường.

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

4. Nghiên cứu tài liệu đã được thực hiện để xác định bằng chứng bổ sung hỗ trợ sự thích hợp của các peptit được xác định là các TUMAP

5. Sự thích hợp của biểu hiện quá mức ở mức mRNA đã được xác nhận bằng cách phát hiện lại các TUMAP được chọn từ bước 3 trên mô khối u và không phát hiện (hoặc không thường xuyên) trên các mô khỏe mạnh.

6. Để đánh giá, liệu sự gây ra các đáp ứng của tế bào T *in vivo* bởi các peptit đã chọn có thể khả thi hay không, các thử nghiệm tính gây miễn dịch *in vitro* đã được thực hiện bằng cách sử dụng tế bào T của người từ những người cho khỏe mạnh cũng như từ bệnh nhân bệnh bạch cầu dòng tủy cấp tính, ung thư vú, ung thư biểu mô tế bào đường mật, bệnh bạch cầu tế bào lympho mạn tính, ung thư đại trực tràng, ung thư túi mật, u nguyên bào đệm, ung thư dạ dày, ung thư đường dạ dày thực quản, ung thư biểu mô tế bào gan, ung thư biểu mô tế bào vảy vùng đầu và cổ, khối u ác tính, ung thư hạch không Hodgkin, ung thư phổi không phải tế bào nhỏ, ung thư buồng trứng, ung thư thực quản, ung thư tuyến tụy, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư biểu mô tế bào thận, ung thư phổi tế bào nhỏ, ung thư biểu mô bàng quang tiết niệu và ung thư nội mạc tử cung.

Theo một khía cạnh, các peptit được sàng lọc trước về khả năng gây miễn dịch trước khi đưa vào kho. Theo cách ví dụ, và không giới hạn, khả năng gây miễn dịch của các peptit có trong kho được xác định bằng phương pháp bao gồm môi tế bào T trong ống nghiệm thông qua các lần kích thích lặp lại các tế bào T CD8 + từ những người cho khỏe

mạnh với các tế bào trình diện kháng nguyên nhân tạo được tải phức hợp peptit/MHC và kháng thể chống CD28.

Phương pháp này được ưu tiên cho các bệnh ung thư hiếm gặp và bệnh nhân có biểu hiện hiếm gặp. Trái ngược với các loại hỗn hợp nhiều peptit có thành phần cố định như được phát triển hiện nay, cho phép ghép phù hợp cao hơn đáng kể giữa biểu hiện thực tế của kháng nguyên trong khối u với vắc xin. Một số peptit “có sẵn” được chọn lọc duy nhất hoặc kết hợp sẽ được sử dụng cho từng bệnh nhân theo phương pháp đa mục tiêu. Về lý thuyết, cách tiếp cận dựa trên việc lựa chọn ví dụ 5 peptit kháng nguyên khác nhau từ thư viện gồm 50 sẽ dẫn đến khoảng 17 triệu chế phẩm sản phẩm thuốc (drug product - DP) có thể có.

Theo khía cạnh, các peptit được chọn để đưa vào vắc xin dựa trên tính phù hợp của chúng đối với từng bệnh nhân riêng lẻ dựa trên phương pháp theo sáng chế như được mô tả ở đây hoặc như bên dưới.

Dữ liệu về kiểu hình, phiên mã và peptit của HLA được thu thập từ vật liệu khối u của bệnh nhân và các mẫu máu để xác định các peptit phù hợp nhất cho từng bệnh nhân có chứa TUMAP "kho" và bệnh nhân-duy nhất (tức là bị đột biến). Các peptit đó sẽ được chọn, được biểu hiện chọn lọc hoặc quá mức trong khối u của bệnh nhân và nếu có thể, thể hiện khả năng gây miễn dịch *in vitro* mạnh nếu được thử nghiệm với các PBMC riêng lẻ của bệnh nhân.

Tốt hơn là, các peptit có trong vắc xin được xác định bằng phương pháp bao gồm: (a) xác định các peptit liên quan đến khối u (các TUMAP) được trình diện bởi mẫu khối u từ bệnh nhân riêng lẻ; (b) so sánh các peptit được xác định trong (a) với các peptit của kho (cơ sở dữ liệu) như được mô tả ở trên; và (c) chọn ít nhất một peptit từ kho (cơ sở dữ liệu) tương quan với peptit liên quan đến khối u được xác định ở bệnh nhân. Ví dụ: các TUMAP được trình diện bởi mẫu khối u được xác định bởi: (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 được biểu hiện bất

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

Ngoài, hoặc như sự thay thế cho, việc lựa chọn peptit bằng mô hình tạo kho (cơ sở dữ liệu), các TUMAP có thể được xác định trong bệnh nhân *de novo* và sau đó được đưa vào vắc xin. Như một ví dụ, các TUMAP ứng viên có thể được xác định ở bệnh nhân bằng (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 được biểu hiện bất thường trong mẫu khối u; và (a2) tương quan dữ liệu biểu hiện với các trình tự của các phối tử MHC liên kết với các phân tử MHC lớp I và/hoặc lớp II trong mẫu khối u để xác định các phối tử MHC có nguồn gốc từ các protein được khối u biểu hiện quá mức hoặc bất thường. Một ví dụ khác, các protein có thể được xác định có chứa các đột biến mà là duy nhất đối với mẫu khối u so với mô tương ứng bình thường của từng bệnh nhân và các TUMAP có thể được xác định nhằm mục tiêu cụ thể vào đột biến. Ví dụ, bộ gen của khối u và của mô bình thường tương ứng có thể được giải trình tự bằng giải trình tự toàn bộ bộ gen: để phát hiện ra các đột biến không đồng nghĩa trong các vùng mã hóa protein của gen, ADN và ARN bộ gen được chiết xuất từ các mô khối u và ADN dòng phôi bộ gen bình thường không đột biến được chiết xuất từ tế bào đơn nhân máu ngoại vi (peripheral blood mononuclear cell-PBMC). Phương pháp NGS được áp dụng chỉ giới hạn trong việc giải trình tự lại các vùng mã hóa protein (giải trình tự lại exome). Với mục đích này, ADN exonic từ mẫu người được thu bằng cách sử dụng bộ kit làm giàu đích do nhà cung cấp cung cấp, sau đó giải trình tự với ví dụ: HiSeq2000 (Illumina). Ngoài ra, mARN của khối u được giải trình tự để định lượng trực tiếp biểu hiện gen và xác nhận rằng các gen đột biến được biểu hiện trong khối u của bệnh nhân. Kết quả là hàng triệu lần đọc trình tự được xử lý thông qua các thuật toán phần mềm.

Danh sách đầu ra chứa các đột biến và biểu hiện gen. Các đột biến soma đặc hiệu khối u được xác định bằng cách so sánh với các biến thể dòng phôi có nguồn gốc PBMC và được ưu tiên. Sau đó, các peptit được xác định *de novo* có thể được kiểm tra khả năng sinh miễn dịch như đã mô tả ở trên cho kho và các TUMAP ứng viên có khả năng gây miễn dịch phù hợp được chọn để đưa vào vắc xin.

Theo một phương án ví dụ, các peptit có trong vắc xin được xác định bằng cách: (a) xác định các peptit liên quan đến khối u (các TUMAP) được trình diện bởi mẫu khối u từ từng bệnh nhân bằng phương pháp như mô tả ở trên; (b) so sánh các peptit được xác định trong a) với kho peptit đã được sàng lọc trước về khả năng gây miễn dịch và sự trình diện quá mức trong các khối u so với mô bình thường tương ứng; (c) chọn ít nhất một peptit từ kho mà tương quan với peptit liên quan đến khối u được xác định ở bệnh nhân; và (d) tùy ý, chọn ít nhất một peptit được xác định *de novo* ở (a) xác nhận tính khả năng gây miễn dịch của nó.

Theo một phương án ví dụ, các peptit có trong vắc xin được xác định bằng cách: (a) xác định các peptit liên quan đến khối u (các TUMAP) được trình diện bởi mẫu khối u từ bệnh nhân riêng lẻ; và (b) chọn ít nhất một peptit được xác định *de novo* ở (a) và xác nhận khả năng gây miễn dịch của nó.

Một khi các peptit cho vắc xin dựa trên peptit được cá nhân hóa được chọn, vắc xin sẽ được sản xuất. Tốt hơn là vắc xin là công thức dạng lỏng bao gồm các peptit riêng lẻ được hòa tan trong khoảng 20-40% DMSO, tốt hơn là khoảng 30-35% DMSO, chẳng hạn như khoảng 33% DMSO.

Mỗi peptit được đưa vào sản phẩm được hòa tan trong DMSO. Nồng độ của các dung dịch peptit đơn lẻ phải được chọn tùy thuộc vào số lượng peptit được đưa vào sản phẩm. Các dung dịch peptit-DMSO đơn lẻ được trộn thành các phần bằng nhau để đạt được dung dịch chứa tất cả các peptit cần có trong sản phẩm với nồng độ ~ 2,5 mg/ml mỗi peptit. Dung dịch đã trộn sau đó được pha loãng với tỉ lệ 1: 3 bằng nước để tiêm đề

đạt nồng độ 0,826 mg/ml mỗi peptit trong 33% DMSO. Dung dịch đã pha loãng được lọc qua màng lọc vô trùng 0,22 μm . Dung dịch khối lượng cuối cùng thu được.

Dung dịch khối lượng cuối cùng được đổ đầy vào lọ và bảo quản ở -20°C cho đến khi sử dụng. Một lọ chứa 700 μL dung dịch, chứa 0,578 mg mỗi peptit. Trong số này, 500 μL (khoảng 400 μg mỗi peptit) sẽ được áp dụng để tiêm trong da.

Ngoài việc hữu ích cho việc điều trị ung thư, các peptit theo sáng chế cũng hữu ích trong việc chẩn đoán. Vì những peptit này đã được tạo ra từ các tế bào bệnh bạch cầu dòng tủy cấp tính, ung thư vú, ung thư biểu mô tế bào đường mật, bệnh bạch cầu lympho bào mạn tính, ung thư đại trực tràng, ung thư túi mật, u nguyên bào đệm, ung thư dạ dày, ung thư dạ dày thực quản, ung thư biểu mô tế bào gan, ung thư biểu mô tế bào vảy vùng đầu cổ, khối u ác tính, ung thư hạch không Hodgkin, ung thư phổi không phải tế bào nhỏ, ung thư buồng trứng, ung thư thực quản, ung thư tuyến tụy, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư biểu mô tế bào thận, ung thư phổi tế bào nhỏ, ung thư biểu mô bàng quang và ung thư nội mạc tử cung và vì đã xác định được rằng các peptit này không có hoặc ở mức thấp hơn trong các mô bình thường, nên các peptit này có thể được sử dụng để chẩn đoán sự hiện diện của ung thư.

Sự hiện diện của các peptit đã được tuyên bố trên sinh thiết mô trong mẫu máu có thể hỗ trợ bác sĩ bệnh học chẩn đoán ung thư. Việc phát hiện một số peptit nhất định bằng các kháng thể, khối phổ hoặc các phương pháp khác đã biết đến trong lĩnh vực này có thể cho bác sĩ bệnh học biết rằng mẫu mô là ác tính hoặc bị viêm hoặc nói chung là bị bệnh, hoặc có thể được sử dụng như dấu ấn sinh học cho bệnh bạch cầu dòng tủy cấp tính, ung thư vú, ung thư biểu mô tế bào đường mật, bệnh bạch cầu tế bào lympho mạn tính, ung thư đại trực tràng, ung thư túi mật, u nguyên bào đệm, ung thư dạ dày, ung thư đường dạ dày thực quản, ung thư biểu mô tế bào gan, ung thư biểu mô tế bào vảy vùng đầu và cổ, khối u ác tính, ung thư hạch không Hodgkin, ung thư phổi không phải tế bào nhỏ, ung thư buồng trứng, ung thư thực quản, ung thư tuyến tụy, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư biểu mô tế bào thận, ung thư phổi tế bào nhỏ, ung thư biểu mô bàng quang tiết niệu và ung thư

nội mạc tử cung. Sự hiện diện của các nhóm peptit có thể cho phép phân loại hoặc phân loại nhỏ các mô bệnh.

Việc phát hiện các peptit trên mẫu mô bệnh có thể giúp đưa ra quyết định về lợi ích của các liệu pháp liên quan đến hệ thống miễn dịch, đặc biệt nếu tế bào lympho T đã biết hoặc được kỳ vọng có liên quan đến cơ chế hoạt động. Mất biểu hiện MHC là một cơ chế được mô tả rõ ràng mà theo đó các tế bào ác tính bị nhiễm sẽ thoát khỏi sự giám sát miễn dịch. Do đó, sự hiện diện của các peptit cho thấy rằng cơ chế này không được các tế bào được phân tích khai thác.

Các peptit theo sáng chế có thể được sử dụng để phân tích đáp ứng của tế bào lympho chống lại các peptit đó, chẳng hạn như đáp ứng của tế bào T hoặc đáp ứng của kháng thể chống lại peptit hoặc peptit được tạo phức với các phân tử MHC. Các đáp ứng của tế bào lympho này có thể được sử dụng làm dấu hiệu tiên lượng để quyết định các bước điều trị tiếp theo. Các đáp ứng này cũng có thể được sử dụng như các dấu hiệu đáp ứng thay thế trong các phương pháp tiếp cận liệu pháp miễn dịch nhằm mục đích tạo ra các đáp ứng của tế bào lympho bằng các phương tiện khác nhau, ví dụ: tiêm chủng protein, axit nucleic, vật liệu tự thân, chuyển nhận tế bào lympho. Trong thiết lập liệu pháp gen, các đáp ứng của tế bào lympho chống lại các peptit có thể được xem xét khi đánh giá các tác dụng phụ. Theo dõi đáp ứng của tế bào lympho cũng có thể là công cụ có giá trị để kiểm tra theo dõi các liệu pháp cấy ghép, ví dụ: để phát hiện các bệnh mô ghép so với vật chủ và vật chủ so với mô ghép.

Sáng chế sẽ được mô tả trong các ví dụ sau đây mô tả các phương án được ưu tiên của nó, và tham chiếu đến các số liệu kèm theo, tuy nhiên, không bị giới hạn ở đó. Theo mục đích của sáng chế, tất cả các tài liệu viện dẫn như được trích dẫn ở đây được kết hợp toàn bộ để tham khảo.

Fig. 1A đến Fig. 1F thể hiện sự trình diện quá mức của các peptit khác nhau trong các mô ung thư khác nhau (chấm đen). Phần trên: cường độ tín hiệu MS trung bình từ các phép đo lặp lại kỹ thuật được vẽ biểu đồ dưới dạng các dấu chấm cho mẫu bình thường

đương tính HLA-A * 02 (chấm màu xám, phần bên trái của hình) và các mẫu khối u (chấm đen, phần bên phải của hình) mà peptit được phát hiện trên đó. Các ô hiển thị phần trăm trung bình, thứ 25 và thứ 75 của cường độ tín hiệu chuẩn hóa, trong khi râu kéo dài đến điểm dữ liệu thấp nhất vẫn nằm trong khoảng tứ phân vị 1,5 (interquartile range - IQR) của phần tư phía dưới và điểm dữ liệu cao nhất vẫn nằm trong 1,5 IQR của phần tư phía trên. Các cơ quan bình thường được sắp xếp theo loại nguy cơ (tế bào máu, mạch máu, não, gan, phổi: nguy cơ cao, chấm xám; cơ quan sinh sản, vú, tuyến tiền liệt: nguy cơ thấp, chấm xám; tất cả các cơ quan khác: nguy cơ trung bình; chấm xám). Phần dưới: tần số phát hiện peptit tương đối trong mọi cơ quan được thể hiện dưới dạng biểu đồ cột sống. Các con số bên dưới bảng cho biết số lượng mẫu mà peptit được phát hiện trên tổng số mẫu được phân tích cho từng cơ quan (N = 440 đối với mẫu bình thường, N = 490 đối với mẫu khối u). Nếu peptit đã được phát hiện trên mẫu nhưng không thể định lượng được vì lý do kỹ thuật, thì mẫu được đưa vào biểu diễn tần số phát hiện này, nhưng không có dấu chấm nào được hiển thị ở phần trên của hình. Các mô (từ trái sang phải): các mẫu bình thường: tế bào máu; mạch máu; não; tim; gan; phổi; bạch cầu đơn nhân; tế bào T; mô mỡ; tuyến thượng thận; ống mật; bàng quang; tủy xương; thực quản; mắt; túi mật; đầu cổ; ruột già; ruột non; thận; hạch bạch huyết; dây thần kinh trung ương; dây thần kinh ngoại vi; tuyến tụy; tuyến cận giáp; phúc mạc; tuyến yên; màng phổi; cơ xương; da; tủy sống; lách; dạ dày; tuyến giáp; khí quản; niệu quản; vú; buồng trứng; nhau thai; tuyến tiền liệt; tinh hoàn; tuyến ức; tử cung. Các mẫu khối u: AML (bệnh bạch cầu dòng tủy cấp tính); BRCA (ung thư vú); CCC (ung thư biểu mô tế bào mật); CLL (bệnh bạch cầu lymphocytic mãn tính); CRC (ung thư đại trực tràng); GBC (ung thư túi mật); GBM (u nguyên bào đệm); GC (ung thư dạ dày); GEJC (ung thư dạ dày-thực quản); HCC (ung thư biểu mô tế bào gan); HNSCC (ung thư biểu mô tế bào vảy vùng đầu và cổ); MEL (khối u ác tính); NHL (ung thư lympho bào không Hodgkin); NSCLCadenơ (ung thư biểu mô tuyến tế bào phổi không phải tế bào nhỏ); NSCLC khác (mẫu NSCLC không thể được định rõ ràng cho NSCLCadenơ hoặc NSCLCsquamous); NSCLCsquamous (ung thư phổi không phải tế bào nhỏ tế bào vảy); OC (ung thư buồng trứng); OSCAR (ung thư thực quản); PACA (ung thư tuyến tụy); PRCA (ung thư tuyến tiền liệt); RCC (ung thư biểu mô tế bào

thận); SCLC (ung thư phổi tế bào nhỏ); UBC (ung thư biểu mô bàng quang); UEC (ung thư nội mạc tử cung). Fig. 1A) Peptit: KLLDFSTRI (ID SEQ số: 1) Fig. 1B) Peptit: ALLDVLVKL (ID SEQ số: 2) Fig. 1C) Peptit: FLLVPSPIWQL (ID SEQ số: 3) Fig. 1D) Peptit: LVWEVVESV (ID SEQ số: 5) Fig. 1E) Peptit: SLLDKLSGI (ID SEQ số: 10). Fig. 1F thể hiện sự trình diện quá mức của các peptit khác nhau trong các mô ung thư khác nhau (chấm đen). Phần trên: cường độ tín hiệu MS trung bình từ các phép đo lặp lại kỹ thuật được vẽ biểu đồ dưới dạng các dấu chấm cho mẫu bình thường dương tính HLA-A * 03 (dấu chấm màu xám, phần bên trái của hình) và các mẫu khối u (chấm đen, phần bên phải của hình) mà peptit được phát hiện trên đó. Các ô hiển thị phần trăm trung bình, thứ 25 và thứ 75 của cường độ tín hiệu chuẩn hóa, trong khi râu kéo dài đến điểm dữ liệu thấp nhất vẫn nằm trong khoảng tứ phân vị 1,5 (interquartile range - IQR) của phần tư phía dưới và điểm dữ liệu cao nhất vẫn nằm trong 1,5 IQR của phần tư phía trên. Các cơ quan bình thường được sắp xếp theo loại nguy cơ (tế bào máu, mạch máu, não, gan, phổi: nguy cơ cao, chấm xám; cơ quan sinh sản, vú, tuyến tiền liệt: nguy cơ thấp, chấm xám; tất cả các cơ quan khác: nguy cơ trung bình; chấm xám). Phần phía dưới: tần số phát hiện peptit tương đối trong mọi cơ quan được thể hiện dưới dạng biểu đồ cột sống. Các con số bên dưới bảng cho biết số lượng mẫu mà peptit được phát hiện trên tổng số mẫu được phân tích cho từng cơ quan (N = 36 đối với mẫu bình thường, N = 107 đối với mẫu khối u). Nếu peptit đã được phát hiện trên mẫu nhưng không thể định lượng được vì lý do kỹ thuật, thì mẫu được đưa vào biểu diễn tần số phát hiện này, nhưng không có dấu chấm nào được hiển thị ở phần trên của hình. Các mô (từ trái sang phải) Các mẫu bình thường: tế bào máu; mạch máu; não; tim; gan; phổi; tuyến thượng thận; bàng quang; túi mật; ruột non; hạch bạch huyết; tuyến tụy; da; lách; khí quản. Các mẫu khối u: AML (bệnh bạch cầu dòng tủy cấp tính); BRCA (ung thư vú); CCC (ung thư biểu mô tế bào mật); CLL (bệnh bạch cầu lymphocytic mãn tính); CRC (ung thư đại trực tràng); GBC (ung thư túi mật); GBM (u nguyên bào đệm); GC (ung thư dạ dày); HCC (ung thư biểu mô tế bào gan); HNSCC (ung thư biểu mô tế bào vảy vùng đầu và cổ); MEL (khối u ác tính); NHL (ung thư lympho bào không Hodgkin); NSCLCadenơ (ung thư biểu mô tuyến tế bào phổi không phải tế bào nhỏ); NSCLC khác (mẫu NSCLC không thể được định rõ ràng cho

NSCLCadenos hoặc NSCLCsquams); NSCLCsquams (ung thư phổi không phải tế bào nhỏ tế bào vảy); OC (ung thư buồng trứng); OSCAR (ung thư thực quản); PACA (ung thư tuyến tụy); PRCA (ung thư tuyến tiền liệt); RCC (ung thư biểu mô tế bào thận); SCLC (ung thư phổi tế bào nhỏ); UBC (ung thư biểu mô bàng quang); UEC (ung thư nội mạc tử cung) Fig. 1F) Peptit: SLLGAATVEPPK (ID SEQ số: 81; A*03).

Hình 2A đến 2F thể hiện sơ đồ biểu hiện ví dụ của các gen nguồn theo sáng chế được biểu hiện quá mức trong các mẫu ung thư khác nhau. Các mẫu khối u (chấm đen) và bình thường (chấm xám) được phân nhóm theo cơ quan xuất xứ. Các đồ thị dạng ô và râu thể hiện giá trị FPKM trung bình, phần trăm thứ 25 và thứ 75 (ô) cùng với râu kéo dài đến điểm dữ liệu thấp nhất vẫn nằm trong khoảng tứ phân vị 1,5 (interquartile range - IQR) của phần tư phía dưới và điểm dữ liệu cao nhất vẫn nằm trong 1,5 IQR của phần tư phía trên. Các cơ quan bình thường được sắp xếp theo danh mục rủi ro. FPKM: các phân đoạn trên một kilobase trên một triệu lần đọc được ánh xạ. Các mô (từ trái sang phải): các mẫu bình thường: tế bào máu; mạch máu; não; tim; gan; phổi; mô mỡ; tuyến thượng thận; ống mật; bàng quang; tủy xương; thực quản; mắt; túi mật; đầu cổ; ruột già; ruột non; thận; hạch bạch huyết; dây thần kinh ngoại vi; tuyến tụy; tuyến cận giáp; phúc mạc; tuyến yên; màng phổi; cơ xương; da; lách; dạ dày; tuyến giáp; khí quản; niệu quản; vú; buồng trứng; nhau thai; tuyến tiền liệt; tinh hoàn; tuyến ức; tử cung. Các mẫu khối u: AML (bệnh bạch cầu dòng tủy cấp tính); BRCA (ung thư vú); CCC (ung thư biểu mô tế bào mật); CLL (bệnh bạch cầu lymphocytic mãn tính); CRC (ung thư đại trực tràng); GBC (ung thư túi mật); GBM (u nguyên bào đệm); GC (ung thư dạ dày); HCC (ung thư biểu mô tế bào gan); HNSCC (ung thư biểu mô tế bào vảy vùng đầu và cổ); MEL (khối u ác tính); NHL (ung thư lympho bào không Hodgkin); NSCLCadenos (ung thư biểu mô tuyến tế bào phổi không phải tế bào nhỏ); NSCLC khác (mẫu NSCLC không thể được định rõ ràng cho NSCLCadenos hoặc NSCLCsquams); NSCLCsquams (ung thư phổi không phải tế bào nhỏ tế bào vảy); OC (ung thư buồng trứng); OSCAR (ung thư thực quản); PACA (ung thư tuyến tụy); PRCA (ung thư tuyến tiền liệt); RCC (ung thư biểu mô tế bào thận); SCLC (ung thư phổi tế bào nhỏ); UBC (ung thư biểu mô bàng quang); UEC (ung thư nội mạc tử

cung). Fig. 2A) ID Ensembl: ENST00000225964, Peptit: ALLDVLVKL (ID SEQ số: 2) Fig. 2B) ID Ensembl: ENST00000374472, Peptit: SLLDKLSGI (ID SEQ số 10), Figure 2C) ID Ensembl: ENST00000617924, Peptit: FASERPPSV (ID SEQ số: 33) Fig. 2D) ID Ensembl: ENST00000603198, Peptit: YIYEDEVRL (ID SEQ số: 39), Fig. 2E) ID Ensembl: ENST00000420453, Peptit: AIWSTILIA (ID SEQ Số: 43), Fig. 2F) ID Ensembl: ENST00000473984, Peptit: IAISQLTFV (ID SEQ Số: 65), Fig. 2G) ID Ensembl ENST00000375105.7, Peptit: LLLALRLSL (ID SEQ số: 64).

Fig. 3 thể hiện kết quả ví dụ về đáp ứng tế bào T CD8 + *in vitro* đặc hiệu với peptit của người cho HLA-A * 02 + khỏe mạnh. Tế bào T CD8 + được nuôi bằng cách sử dụng các APC nhân tạo được phủ mAb kháng CD28 và HLA-A * 02 trong phức hợp với peptit ID Seq số 102 (GLDPTQFRV, mã peptit: POLA1-003) (A, bảng trái) và ID Seq số 103 peptit (SLVSYLDKV, mã peptit: KRT16P-001) (B, bảng bên trái). Sau ba chu kỳ kích thích, việc phát hiện các tế bào phản ứng với peptit được thực hiện bằng cách nhuộm đa phân tử 2D với A * 02/ID Seq số 102 (A) và A * 02/ID Seq số 103 (B). Bảng bên phải (A và B) hiển thị nhuộm kiểm soát các tế bào được kích thích bằng các phức hợp peptit/A * 02/không thích hợp. Tế bào đơn còn sống được kiểm tra tế bào lympho CD8 + Cổng boolean giúp loại trừ các sự kiện dương tính giả được phát hiện với các chất đa phân tử đặc hiệu cho các peptit khác nhau. Tần suất của đa phân tử đặc hiệu + tế bào trong số các tế bào lympho CD8 + được chỉ định.

Fig. 4 thể hiện kết quả ví dụ về đáp ứng tế bào T CD8 + *in vitro* đặc hiệu với peptit của người cho HLA-A * 02 + khỏe mạnh. Các tế bào T CD8 + được nuôi bằng cách sử dụng tương ứng các APC nhân tạo phủ mAb kháng CD28 và HLA-A * 02 trong phức hợp với SeqID số 18 peptit (KMMTFFQGL) (A, bảng bên trái), ID Seq số 68 peptit (KLLADAFKV) (B, bảng bên trái), ID Seq số 40 Peptit (FTLPFLVNL) (C, bảng bên trái), ID Seq số 19 peptit (MLLPWLPKL) (D, bảng bên trái) hoặc ID Seq số 48 peptit (MLAEIHPKA) (E, bảng bên trái). Sau ba chu kỳ kích thích, việc phát hiện các tế bào phản ứng với peptit được thực hiện bằng cách nhuộm đa phân tử 2D với A * 02/SeqID số 18 (A), A * 02/ID Seq số 68 (B), A * 02/ID Seq số 40 (C), A * 02/ID Seq số 19 (D) hoặc

A * 02/ID Seq số 48 (E). Bảng bên phải (A, B, C, D và E) hiển thị nhuộm kiểm soát các tế bào được kích thích bằng các phức hợp peptit/A * 02/không thích hợp. Tế bào đơn còn sống được kiểm tra tế bào lympho CD8 + Cổng boolean giúp loại trừ các sự kiện dương tính giả được phát hiện với các chất đa phân tử đặc hiệu cho các peptit khác nhau. Tần suất của đa phân tử đặc hiệu + tế bào trong số các tế bào lympho CD8 + được chỉ định.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1:

Xác định và định lượng các peptit liên quan đến khối u được trình diện trên bề mặt tế bào

Các mẫu mô

Các mô ung thư của bệnh nhân thu được từ: Asterand (Detroit, MI, Mỹ & Royston, Herts, Anh); Bio-Options Inc. (Brea, CA, Hoa Kỳ); Geneticist Inc. (Glendale, CA, Hoa Kỳ); Bệnh viện Đại học Heidelberg (Heidelberg, Đức); ProteoGenex Inc. (Culver City, CA, Hoa Kỳ); Tissue Solutions Ltd (Glasgow, Vương quốc Anh); Bệnh viện Đại học Munich (Munich, Đức). Các mô bình thường được lấy từ Asterand (Detroit, MI, USA & Royston, Herts, UK); Bio-Options Inc. (Brea, CA, Hoa Kỳ); BioServe (Beltsville, MD, Hoa Kỳ); Capital BioScience Inc. (Rockville, MD, Hoa Kỳ); Centre for Clinical Transfusion Medicine Tuebingen (Tübingen, Đức); Geneticist Inc. (Glendale, CA, Hoa Kỳ); Đại học Y khoa tỉnh Kyoto (KPUM) (Kyoto, Nhật Bản); Đại học Thành phố Osaka (OCU) (Osaka, Nhật Bản); ProteoGenex Inc. (Culver City, CA, Hoa Kỳ); Tissue Solutions Ltd (Glasgow, Vương quốc Anh); Bệnh viện Đại học Geneva (Geneva, Thụy Sĩ); Bệnh viện Đại học Heidelberg (Heidelberg, Đức); Bệnh viện Đại học Tübingen (Tübingen, Đức); Bệnh viện Đại học Munich (Munich, Đức).

Văn bản đồng ý của tất cả bệnh nhân đã được đưa ra trước khi phẫu thuật hoặc khám nghiệm tử thi. Mô được làm đông lạnh gấp ngay sau khi cắt và được bảo quản cho đến khi phân lập các TUMAP ở -70°C hoặc thấp hơn.

Phân lập peptit HLA từ các mẫu mô

Nhóm peptit HLA từ các mẫu mô được đông lạnh gấp thu được bằng cách kết tủa miễn dịch từ các mô rắn theo quy trình được sửa đổi một chút (Falk et al., 1991; Seeger et al., 1999) sử dụng kháng thể đặc hiệu HLA-A * 02 BB7.2, kháng thể đặc hiệu HLA-A, -B, C W6/32, kháng thể đặc hiệu HLA-DR L243 và kháng thể đặc hiệu HLA DP B7/21, sepharose được kích hoạt bằng CNBr, xử lý axit và siêu lọc.

Phân tích khối phổ:

Các nhóm peptit HLA thu được được tách theo tính kỵ nước của chúng bằng sắc ký pha ngược (hệ thống nanoAcquity UPLC, Waters) và các peptit rửa giải được phân tích trong LTQ-velos và khối phổ lai hợp nhất (ThermoElectron) được trang bị nguồn ESI. Các nhóm peptit được nạp trực tiếp lên cột vi mao quản silica được nung chảy phân tích (75 μm i.d. x 250 mm) được đóng gói bằng vật liệu pha ngược C18 1,7 μm (nước) áp dụng tốc độ dòng 400 nL mỗi phút. Sau đó, các peptit được tách ra bằng cách sử dụng gradient nhị phân hai bước 180 phút từ 10% đến 33% B với tốc độ dòng 300 nL mỗi phút. Gradient bao gồm dung môi A (0,1% axit fomic trong nước) và dung môi B (0,1% axit fomic trong axetonitril). Ống mao dẫn bằng thủy tinh mạ vàng (PicoTip, New Objective) được sử dụng để đưa vào nguồn nanoESI. Máy khối phổ LTQ-Orbitrap được vận hành ở chế độ phụ thuộc vào dữ liệu bằng cách sử dụng chiến lược TOP5. Nói tóm lại, chu kỳ quét được bắt đầu bằng việc quét toàn bộ với độ chính xác khối lượng cao trong orbitrap ($R = 30000$), sau đó là quét MS/MS cũng trong orbitrap ($R = 7500$) trên 5 ion tiền chất dồi dào nhất với sự loại trừ động của các ion đã chọn trước đó. Khối phổ song song được SEQUEST giải thích ở tỷ lệ phát hiện sai cố định ($q \leq 0,05$) và điều khiển thủ công bổ sung. Trong trường hợp trình tự peptit đã xác định là không chắc chắn, trình tự này được xác nhận bổ sung bằng cách so sánh mẫu phân đoạn peptit tự nhiên được tạo ra với mẫu phân đoạn của peptit đối chứng giống hệt trình tự tổng hợp.

Định lượng LC-MS tương đối không đánh dấu được thực hiện bằng cách đếm ion, tức là bằng cách chiết xuất và phân tích các đặc điểm của LC-MS (Mueller et al., 2007). Phương pháp giả định rằng các vùng tín hiệu LC-MS của peptit tương quan với sự dồi dào của nó trong mẫu. Các tính năng trích xuất được tiếp tục xử lý bằng cách giải mã

trạng thái tích điện và căn chỉnh thời gian lưu (Mueller et al., 2008; Sturm et al., 2008). Cuối cùng, tất cả các đặc điểm của LC-MS đã được tham chiếu chéo với kết quả nhận dạng trình tự để kết hợp dữ liệu định lượng của các mẫu và mô khác nhau thành đặc điểm trình diện peptit. Dữ liệu định lượng đã được chuẩn hóa theo kiểu hai bậc theo xu hướng trung tâm để tính đến sự thay đổi trong các bản sao kỹ thuật và sinh học. Do đó mỗi peptit được xác định có thể được liên kết với dữ liệu định lượng cho phép định lượng tương đối giữa các mẫu và mô. Ngoài ra, tất cả dữ liệu định lượng thu được cho các ứng viên peptit được kiểm tra thủ công để đảm bảo tính nhất quán của dữ liệu và xác minh tính chính xác của phân tích tự động. Đối với mỗi peptit, kết cấu trình diện được tính toán cho thấy trình diện mẫu trung bình cũng như các biến thể lặp lại. Các kết cấu này để các mẫu bệnh bạch cầu dòng tủy cấp tính, ung thư vú, ung thư biểu mô tế bào đường mật, bệnh bạch cầu lympho bào mạn tính, ung thư đại trực tràng, ung thư túi mật, u nguyên bào đệm, ung thư dạ dày, ung thư dạ dày thực quản, ung thư biểu mô tế bào gan, ung thư biểu mô tế bào vảy vùng đầu cổ, khối u ác tính, ung thư hạch không Hodgkin, ung thư phổi không phải tế bào nhỏ, ung thư buồng trứng, ung thư thực quản, ung thư tuyến tụy, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư biểu mô tế bào thận, ung thư phổi tế bào nhỏ, ung thư biểu mô bàng quang và ung thư nội mạc tử cung liên hệ với các mẫu mô bình thường. Các kết cấu trình diện này của các peptit được trình diện quá mức được thể hiện trên Fig. 1. Sự trình diện peptit trên các khối u đối với các peptit ví dụ được thể hiện trên bảng 11.

Bảng 11 thể hiện sự trình diện về các thực thể ung thư khác nhau đối với các peptit được chọn, và do đó mức độ liên quan cụ thể của các peptit như đã đề cập trong việc chẩn đoán và/hoặc điều trị các bệnh ung thư như đã chỉ ra (ví dụ: peptit ID SEQ số 1 cho bệnh bạch cầu dòng tủy cấp tính, ung thư đại trực tràng, u nguyên bào đệm, ung thư dạ dày, ung thư biểu mô tế bào gan, ung thư biểu mô tế bào vảy vùng đầu cổ, khối u ác tính, ung thư hạch không Hodgkin, ung thư phổi không phải tế bào nhỏ, ung thư buồng trứng, ung thư thực quản, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư biểu mô tế bào thận, ung thư phổi tế bào nhỏ, ung thư biểu mô bàng quang và ung thư nội mạc tử cung, peptid ID SEQ số 2 cho ung thư vú, ung thư đại trực tràng, ung thư túi mật, ung thư dạ dày-thực quản, ung thư

biểu mô tế bào vảy vùng đầu cổ, khối u ác tính, ung thư hạch không Hodgkin, ung thư phổi không phải tế bào nhỏ, ung thư buồng trứng, ung thư thực quản, ung thư tuyến tụy, ung thư phổi tế bào nhỏ, ung thư nội mạc tử cung).

Bảng 11: Tổng quan về việc trình diện các peptit liên quan đến khối u được chọn theo sáng chế trên các thực thể.

Dạng ung thư: AML (bệnh bạch cầu dòng tủy cấp tính); BRCA (ung thư vú); CCC (ung thư biểu mô tế bào mật); CLL (bệnh bạch cầu dòng tế bào lympho mãn tính); CRC (ung thư đại trực tràng); GBC (ung thư túi mật); GBM (u nguyên bào đệm); GC (ung thư dạ dày); GEJC (ung thư dạ dày-thực quản); HCC (ung thư biểu mô tế bào gan); HNSCC (ung thư biểu mô tế bào vảy vùng đầu và cổ); MEL (khối u ác tính); NHL (ung thư lympho bào không Hodgkin); NSCLCadenơ (ung thư biểu mô tuyến tế bào phổi không phải tế bào nhỏ); NSCLC khác (mẫu NSCLC không thể được định rõ ràng cho NSCLCadenơ hoặc NSCLCsquamous); NSCLCsquamous (ung thư phổi không phải tế bào nhỏ tế bào vảy); OC (ung thư buồng trứng); OSCAR (ung thư thực quản); PACA (ung thư tuyến tụy); PRCA (ung thư tuyến tiền liệt); RCC (ung thư biểu mô tế bào thận); SCLC (ung thư phổi tế bào nhỏ); UBC (ung thư biểu mô bàng quang); UEC (ung thư nội mạc tử cung).

ID SEQ số	Trình tự	Trình diện peptit về các loại ung thư
1	KLLDFSTRI	AML, CRC, GBM, HCC, HNSCC, MEL, NHL, NSCLC, OC, OSCAR, PRCA, RCC, SCLC, UBC, UEC
2	ALLDVLVKL	BRCA, CRC, GBC, GEJC, HNSCC, MEL, NHL, NSCLC, OC, OSCAR, PACA, SCLC, UEC
3	FLLVPSPIWQL	AML, CLL, CRC, GBM, HCC, HNSCC, MEL, NHL,

ID SEQ số	Trình tự	Trình diện peptit về các loại ung thư
		NSCLC, OC, RCC, SCLC, UEC
4	YLGDSHVLL	AML, BRCA, CLL, CEC, GBM, HCC, MEL, NHL, NSCLC, OSCAR, RCC, SCLC, UBC
5	LVWEVVESV	HCC, HNSCC, MEL, NHL, NSCLC, OC, OSCAR
6	ALHDSPVYL	AML, BRCA, CCC, CRC, GBM, GC, HCC, HNSCC, MEL, NHL, NSCLC, OC, OSCAR, RCC, SCLC, UBC, UEC
7	ALWEEVKATSL	GBM, HCC, MEL, NSCLC, OC, SCLC, UEC
8	ILQSLVPAA	CRC, NHL, NSCLC, OC, RCC
9	FLQEGDLISV	CLL, CRC, NHL, NSCLC, OSCAR, SCLC
10	SLLDKLSGI	CLL, CRC, NHL
11	ALLPHAPEAV	BRCA, HCC, HNSCC, NHL, NSCLC, OC, OSCAR, SCLC, UBC
12	HLDSMNVSI	AML, CLL, GC, MEL, NHL, PACA, PRCA
13	FLDEGSLLRL	GC, HCC, HNSCC, MEL, OC, PACA, SCLC, UBC
14	LLIEVSEEL	BRCA, CRC, GBM, HCC, OSCAR, MEL, NHL, NSCLC, PACA, SCLC
15	NLVMPLLHI	AML, CLL, CRC, MEL, NSCLC, OC, PACA, UEC

ID SEQ số	Trình tự	Trình diện peptit về các loại ung thư
16	ALLDAEQSPVAL	AML, CLL, HCC, MEL, NHL, NSCLC, RCC
17	VLWDLRPSSLI	CLL, HNSCC, NHL, NSCLC, PACA, SCLC
18	KMMTFFQGL	HCC, NSCLC, NHL, OSCAR, PRCA, UBC
19	MLLPWLPKL	CLL, GBM, HCC, HNSCC, NHL, NSCLC
20	VLISLPGKV	HCC, MEL, NSCLC
21	FVFISPSFL	AML, BRCA, CCC, CRC, GC, HCC, HNSCC, NHL, NSCLC, OC, PACA, PRCA
22	SLYDVPVGA	CLL, CRC, GBM, HCC, MEL, NHL, NSCLC, OC, OSCAR, PACA, RCC, UBC
23	GLEVLDALL	BRCA, CRC, GC, HCC, MEL, NHL, NSCLC, RCC, UEC
24	TLTSLNILL	AML, CRC, GBM, HNSCC, MEL, NHL, NSCLC, OC, OSCAR, SCLC, UEC
25	ISVLNLSAI	CCC, HCC, MEL, NHL, NSCLC, OC, PRCA, SCLC
26	KLWTSLVNL	AML, CLL, CRC, GC, HNSCC, MEL, NSCLC, PACA, SCLC
27	IAAGVPNTDA	BRCA, CLL, HCC, MEL, NSCLC, OC, RCC
28	SQLEKPETA	HCC, HNSCC, NHL, NSCLC, SCLC, UEC

ID SEQ số	Trình tự	Trình diện peptit về các loại ung thư
29	LLWEFPSMA	AML, CLL, GBM, HNSCC, MEL, NHL, NSCLC, UEC
30	LLRLTLLPL	CLL, HCC, NHL, NSCLC, OC, UEC
31	VVLPIVITL	GC, HCC, NHL, NSCLC, RCC, PACA
32	VLSVSAVLGA	CLL, GBM, GC, NSCLC, OC, OSCAR, PRCA, RCC
33	FASERPPSV	BRCA, CRC, GC, GBC, GBM, HCC, HNSCC, MEL, NSCLC, OC, OSCAR, PACA, SCLC, UBC
34	LLNVEPAGA	AML, BRCA, CLL, GBM, HCC, MEL, NHL, UEC
35	VLLNSNYPV	NSCLC, PRCA, UBC
36	FQVTRTTGV	GBC, HCC, NHL, NSCLC, RCC
37	KILDEFYNV	CRC, GC, HCC, NSCLC
38	SLSAWLPSL	GC, HCC, HNSCC, NSCLC, OC, OSCAR, RCC, UBC, UEC
39	YIYEDEVRL	BRCA, CRC, HCC, HNSCC, NSCLC, OC, OSCAR, SCLC, UEC
40	FTLPFLVNL	AML, CLL, CRC, GC, NHL, HCC, HNSCC, NSCLC, OC, UBC
41	LMASEGIWESSL	CRC, GC, NSCLC, PRCA

ID SEQ số	Trình tự	Trình diện peptit về các loại ung thư
42	WITPVIPAL	AML, CLL, CRC, HCC, HNSCC, MEL, NHL, OC, PACA, RCC, SCLC, UBC, UEC
43	AIWSTILIA	BRCA, CRC, NSCLC, OC, OSCAR, PRCA, SCLC
44	WLIPRQLAAA	PRCA
45	ALYHQSPLL	HNSCC, NSCLC, OSCAR, OC
46	AMVEIIPKV	NSCLC, SCLC, UBC
47	ALLPGVPGL	CRC, GBC, HNSCC, NSCLC, OC, RCC
48	MLAEIHPKA	AML, BRCA, GBM, MEL, NSCLC
49	FLWDPRDVVL	GBM, OC
50	GLASYLDRV	BRCA, CRC, HCC, RCC, OC, OSCAR, SCLC, UBC
51	GLLTQVHIL	AML, BRCA, CRC, GBM, HCC, NSCLC, PACA, UBC
52	LAFVSHVLI	CRC, GC
53	TISISLSSV	AML, CLL, CRC, GBM, GC, HCC, HNSCC, MEL, NHL, NSCLC, OC, OSCAR, PACA, PRCA, RCC, SCLC, UBC, UEC
54	GLSPDQVFL	GBM, HNSCC, MEL, NHL
55	MVQQEKLFFV	AML, BRCA, CRC, GBM, GC, HCC, HNSCC, MEL,

ID SEQ số	Trình tự	Trình diện peptit về các loại ung thư
		NSCLC, OSCAR, PACA, PRCA, RCC, SCLC, UBC, UEC
56	IITNLIVNI	AML, CRC, GBC, GBM, HCC, HNSCC, MEL, NHL, NSCLC, OC, RCC, SCLC, UEC
57	YVLMTSLLL	BRCA, CRC, GBM, GC, HCC, HNSCC, MEL, NSCLC, OSCAR, PRCA, SCLC
58	MIISHRALEL	CLL, CRC, GBC, GBM, HCC, HNSCC, MEL, NSCLC, OC, PRCA, UBC
59	LAASTTFLGV	HNSCC, NHL, NSCLC, OSCAR, PACA, UBC
60	LLLATLENL	AML, CRC, GBM, MEL, NSCLC, SCLC, UBC, UEC
61	VLPWQPLLL	AML, GC, HCC, HNSCC, NSCLC, OC, PACA
62	SLLGKPGLTI	BRCA, CLL, CRC, GBC, HCC, NHL, NSCLC, OSCAR, RCC, PRCA, UBC, UEC
63	LSFKRSLSI	AML, BRCA, CRC, GBM, HCC, NSCLC, PRCA, RCC, UBC
64	LLLALRLSL	GBC, HCC, NHL, MEL, NSCLC, OSCAR, PACA
65	IAISQLTFV	CLL, HCC, NHL, NSCLC, OSCAR, PRCA, SCLC, UEC
66	ILNELLNSI	GBC, GC, HCC, MEL, NHL, PRCA, SCLC
67	ALKELMGPA	NHL, NSCLC, RCC

ID SEQ số	Trình tự	Trình diện peptit về các loại ung thư
68	KLLADAFKV	AML, HCC, HNSCC, NSCLC, RCC, UBC, UEC
69	LLCPVVLQL	AML, CLL, CRC, NSCLC, RCC, UBC, UEC
70	LLLQIEPAA	GBM, HNSCC, NHL, NSCLC, UBC
71	WLMPVMPAL	CLL, GBM, GC, MEL
72	YLSFIKILL	MEL, PRCA
73	STTINLIL	AML, BRCA, CRC, HNSCC, HCC, NSCLC, OC, PACA
74	TLLSYSIPL	CRC, GC, MEL, PACA, PRCA, UEC
75	TTQEA EKLLER	BRCA, GBC, GC, HCC, HNSCC, NSCLC, OC, PACA, PRCA, SCLC, UBC, UEC
76	TEQGPTGVTM	AML, CLL, CRC, HCC, HNSCC, MEL, NSCLC, OSCAR, OC, RCC, UEC
77	VPAGVDVITEY	PRCA
78	GLLPPVRAM	GBC, NHL, OSCAR
79	KIQDPGTAF	PRCA
80	RDQIVTVSV	AML, BRCA, NHL, SCLC, UBC, UEC
81	SLLGAATVEPPK	AML, BRCA, CC, GBC, GBM, HCC, HNSCC, MEL, NHL, NSCLC, OC, OSCAR, PACA, PRCA, RCC, SCLC,

ID SEQ số	Trình tự	Trình diện peptit về các loại ung thư
		UBC, UEC
82	LAPQMIAL	CLL, GBC, GC, HCC, MEL, NHL, NSCLC, OC, OSCAR, PRCA, UBC, SCLC
83	KPRGPTPL	BRCA, GC, HCC, HNSCC, MEL, NSCLC, PACA, RCC, SCLC, UBC
84	RLCPAAPSEK	BRCA, CCC, CRC, GBM, HCC, HNSCC, MEL, NHL, NSCLC, OC, OSCAR, PACA, RCC, UBC, UEC
85	VYLLTFPPL	BRCA, GC, HCC, HNSCC, NHL, NSCLC, OC, OSCAR, UBC, UEC
86	LMIGKRIL	HCC, HNSCC, NSCLC, OC, OSCAR, PACA, SCLC, UEC
87	LNLVSETEAMVK	CRC, UEC
88	DEQETDAFL	NSCLC
89	MIFYVLQK	AML, BRCA, CCC, CRC, GBM, HCC, HNSCC, MEL, NHL, NSCLC, OC, OSCAR, PACA, PRCA, RCC, SCLC, UBC, UEC
90	YLRDFKIKR	AML, BRCA, GBM, GC, HCC, HNSCC, NSCLC, PRCA, RCC, SCLC, UBC, UEC
91	SSHFILVTF	CCC, GC, HCC, RCC

ID SEQ số	Trình tự	Trình diện peptit về các loại ung thư
92	ELVAVTSVL	CLL, NHL, PACA, SCLC, UEC
93	WQKNSMRL	NSCLC
94	MGRRRNLY	CCC, GBM, HNSCC, MEL, NHL, NSCLC, OC, OSCAR, PACA, PRCA, SCLC, UBC, UEC
95	QVKIVTLL	GC, NSCLC, OC, PACA, PRCA, RCC
96	KIIEDLANTV	CCC, CRC, HCC, NSCLC, OC, OSCAR, PRCA, SCLC, UBC, UEC
97	GLIDDKGTIKL	AML, BRCA, CRC, GBC, GBM, HCC, HNSCC, MEL, NHL, NSCLC, OC, OSCAR, SCLC, UBC, UEC
98	SLMEVTHDL	BRCA, GBM, HCC, HNSCC, NHL, NSCLC, OC, OSCAR, PRCA, UBC, UEC
99	ALMDGSESFFV	AML, CLL, GBM, HNSCC, MEL, NHL, NSCLC, UEC
100	SLGPPVGV	AML, GBM, OC, UBC
101	KLPEGHLPEV	HNSCC, NHL, NSCLC, OSCAR, PACA, UBC

Ví dụ 2:

Cấu trúc biểu hiện của các gen mã hóa các peptit theo sáng chế

Sự trình diện quá mức hoặc trình diện đặc hiệu của peptit trên tế bào khối u so với tế bào bình thường là đủ cho tính hữu ích của nó trong liệu pháp miễn dịch và một số peptit đặc hiệu với khối u mặc dù protein nguồn của chúng cũng xuất hiện trong các mô bình thường. Tuy nhiên, cấu hình biểu hiện mRNA bổ sung thêm mức độ an toàn trong việc lựa chọn các đích peptit cho liệu pháp miễn dịch. Đặc biệt đối với các lựa chọn điều trị có rủi ro an toàn cao, chẳng hạn như các TCR trưởng thành ái lực, peptit đích lý tưởng sẽ có nguồn gốc từ protein duy nhất cho khối u và không tìm thấy trên các mô bình thường.

Nguồn ARN và điều chế

Các mẫu mô đã được loại bỏ bằng phẫu thuật được cung cấp như đã nêu ở trên (xem ví dụ 1) sau khi nhận được sự đồng ý bằng văn bản từ mỗi bệnh nhân. Các mẫu mô khối u được đông lạnh gấp ngay sau khi phẫu thuật và sau đó được đồng nhất bằng cối và chày trong điều kiện nitơ lỏng. ARN tổng số được điều chế từ các mẫu này bằng thuốc phản ứng TRI (Ambion, Darmstadt, Đức) sau đó làm sạch bằng RNeasy (QIAGEN, Hilden, Đức); cả hai phương pháp đều được thực hiện theo quy trình của nhà sản xuất.

ARN tổng số từ các mô người khỏe mạnh cho các thử nghiệm ARNSeq được thu được từ: Asterand (Detroit, MI, USA & Royston, Herts, UK); Bio-Options Inc. (Brea, CA, USA); Geneticist Inc. (Glendale, CA, USA); ProteoGenex Inc. (Culver City, CA, USA); Tissue Solutions Ltd (Glasgow, UK).

ARN tổng số từ các mô khối u cho các thử nghiệm ARNSeq được thu được từ: Asterand (Detroit, MI, USA & Royston, Herts, UK); BioCat GmbH (Heidelberg, Germany); BioServe (Beltsville, MD, USA); Geneticist Inc. (Glendale, CA, USA); Istituto Nazionale Tumori "Pascale" (Naples, Italy); ProteoGenex Inc. (Culver City, CA, USA); University Hospital Heidelberg (Heidelberg, Germany).

Chất lượng và số lượng của tất cả các mẫu ARN được đánh giá bằng máy Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent, Waldbronn, Đức) sử dụng ARN 6000 Pico LabChip Kit (Agilent).

Các thử nghiệm ARNseq

Phân tích biểu hiện gen của - các mẫu ARN mô bình thường và khối u được thực hiện bằng cách giải trình tự thế hệ tiếp theo (ARNseq) bởi CeGaT (Tübingen, Đức). Tóm lại, các thư viện giải trình tự được chuẩn bị bằng cách sử dụng bộ chất phản ứng Illumina HiSeq v4 theo quy trình của nhà cung cấp (Illumina Inc., San Diego, CA, Hoa Kỳ), bao gồm phân đoạn ARN, chuyển đổi cADN và bổ sung trình tự biết trước (adaptor) giải trình tự gen. Các thư viện có nguồn gốc từ nhiều mẫu được trộn đều và giải trình tự trên máy giải trình tự Illumina HiSeq 2500 theo hướng dẫn của nhà sản xuất, tạo ra 50 bp lần đọc đầu đơn. Các lần đọc đã xử lý được ánh xạ tới bộ gen người (GRCh38) bằng phần mềm STAR. Dữ liệu biểu hiện được cung cấp trên mức phiên mã như lần đọc mỗi kilobase mỗi triệu lần đọc được ánh xạ (Reads Per Kilobase per Million mapped reads- RPKM, được tạo bởi phần mềm Cufflinks) và ở cấp độ exon (tổng số lần đọc, được tạo bởi phần mềm Bedtools), dựa trên chú thích của cơ sở dữ liệu trình tự ensembl (Ensembl77). Các lần đọc exon được chuẩn hóa cho chiều dài exon và kích thước căn chỉnh để có được giá trị RPKM.

Các cấu trúc biểu hiện ví dụ của các gen nguồn theo sáng chế được biểu hiện quá mức hoặc biểu hiện dành riêng ở mức cao trong bệnh bạch cầu dòng tủy cấp tính, ung thư vú, ung thư biểu mô tế bào đường mật, bệnh bạch cầu tế bào lympho mạn tính, ung thư đại trực tràng, ung thư túi mật, u nguyên bào đệm, ung thư dạ dày, ung thư dạ dày thực quản, ung thư biểu mô tế bào gan, ung thư biểu mô tế bào vảy vùng đầu và cổ, khối u ác tính, ung thư hạch không Hodgkin, ung thư phổi không phải tế bào nhỏ, ung thư buồng trứng, ung thư thực quản, ung thư tuyến tụy, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư biểu mô tế bào thận, ung thư phổi tế bào nhỏ, ung thư biểu mô bàng quang tiết niệu và ung thư nội mạc tử cung được thể hiện trên Fig. 1. Điểm biểu hiện cho các gen ví dụ tiếp theo được trình bày trong bảng 12.

Bảng 12: Các điểm biểu hiện. Bảng liệt kê các peptit từ các gen được biểu hiện quá mức ở mức rất cao trong các khối u so với bảng các mô bình thường (+++), biểu hiện quá mức ở mức cao trong các khối u so với bảng các mô bình thường (++) hoặc biểu hiện quá mức trong khối u so với bảng các mô bình thường (+). Đường cơ sở cho điểm này được

tính toán từ các phép đo các mô bình thường có liên quan sau đây: tế bào máu; mạch máu; não; tim; gan; phổi; mô mỡ; tuyến thượng thận; ống mật; bàng quang; tủy xương; sụn; thực quản; mắt; túi mật; đầu và cổ; ruột già; ruột non; thận; hạch bạch huyết; thần kinh trung ương; dây thần kinh ngoại vi; tuyến tụy; tuyến cận giáp; phúc mạc; tuyến yên; màng phổi; cơ xương; da; tủy sống; lách; dạ dày; tuyến giáp; khí quản; niệu quản.

Trong trường hợp có sẵn dữ liệu biểu hiện cho một số mẫu cùng loại mô, thì giá trị trung bình cộng của tất cả các mẫu tương ứng được sử dụng để tính toán.

ID SEQ số	Trình tự	Biểu hiện gen
3	FLLVPSPIWQL	+
5	LVWEVVESV	+
9	FLQEGDLISV	+
10	SLLDKLSGI	++
14	LLIEVSEEL	++
17	VLWDLRPSSLI	++
18	KMMTFFQGL	+
19	MLLPWLPKL	+
24	TLTSLNILL	+
31	VVLPIVITL	+
32	VLSVSAVLGA	++
33	FASERPPSV	++

ID SEQ số	Trình tự	Biểu hiện gen
34	LLNVEPAGA	++
35	VLLNSNYPV	++
36	FQVTRTTGV	++
37	KILDEFYNV	++
38	SLSAWLPSL	++
39	YIYEDEVRL	++
40	FTLPFLVNL	++
41	LMASEGIWESSL	++
42	WITPVIPAL	+
43	AIWSTILIA	++
44	WLIPRQLAAA	++
46	AMVEIIPKV	+
47	ALLPGVPGL	++
48	MLAEIHPKA	++
49	FLWDPRDVVL	++
51	GLLTQVHIL	++
52	LAFVSHVLI	++

ID SEQ số	Trình tự	Biểu hiện gen
53	TISISLSSV	++
54	GLSPDQVFL	++
56	IITNLIVNI	++
57	YVLMTSLLL	++
59	LAASTTFLGV	++
60	LLLATLENL	+
62	SLLGKPGLTI	++
63	LSFKRSLSI	++
64	LLLALRLSL	++
65	IAISQLTFV	++
66	ILNELLNSI	+
67	ALKELMGPA	++
68	KLLADAFKV	++
69	LLCPVVLQL	++
70	LLLQIEPAA	++
71	WLMPVMPAL	++

Ví dụ 3:

Khả năng gây miễn dịch *in vitro* cho các peptit được trình diện MHC lớp I

Để có được thông tin liên quan đến khả năng gây miễn dịch của các TUMAP theo sáng chế, các tác giả sáng chế đã thực hiện khảo sát bằng cách sử dụng thử nghiệm mỗi tế bào T *in vitro* dựa trên các kích thích lặp lại tế bào T CD8 + với các tế bào trình diện kháng nguyên nhân tạo (aAPC) được tải phức hợp peptit/MHC và kháng thể kháng CD28. Bằng cách này, các tác giả sáng chế có thể cho thấy khả năng gây miễn dịch đối với các TUMAP bị hạn chế HLA-A * 02: 01 theo sáng chế, chứng minh rằng các peptit này là các epitope tế bào T mà các tế bào T tiền thân CD8 + tồn tại ở người (bảng 13a và 13b).

Môi *in vitro* tế bào T CD8+

Để thực hiện các kích thích *in vitro* bằng các tế bào trình diện kháng nguyên nhân tạo được tải phức hợp peptit-MHC (pMHC) và kháng thể kháng CD28, các tác giả sáng chế đầu tiên đã phân lập tế bào T CD8 + từ các sản phẩm gan bạch cầu HLA-A * 02 tươi thông qua lựa chọn dương tính bằng cách sử dụng vi hạt CD8 (Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Đức) của những người cho khỏe mạnh lấy được từ các phòng mạch Đại học Mannheim, Đức, sau khi có sự đồng ý.

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

Việc tạo ra hạt phủ pMHC/chống CD28, kích thích và đọc tế bào T được thực hiện trong hệ thống *in vitro* được xác định cao bằng cách sử dụng bốn phân tử pMHC khác nhau cho mỗi điều kiện kích thích và 8 phân tử pMHC khác nhau cho mỗi điều kiện đọc.

CD28 Ab 9.3 ở người kháng IgG2a ở chuột đồng kích thích tinh khiết (Jung et al., 1987) đã được biotin hóa theo cách hóa học bằng cách sử dụng Sulfo-N-hydroxysuccinimidobiotin theo khuyến cáo của nhà sản xuất (Perbio, Bonn, Đức). Hạt được sử dụng là các hạt polystyrene phủ streptavidin có đường kính 5,6 μm (Phòng thí nghiệm Bangs, Illinois, Hoa Kỳ).

pMHC được sử dụng cho các kích thích kiểm soát tích cực và tiêu cực lần lượt là A * 0201/MLA-001 (peptit ELAGIGILTV (ID SEQ số 104) từ Melan-A/MART-1 được sửa đổi) và A * 0201/DDX5-001 (YLLPAIVHI từ DDX5, ID SEQ số 105).

800000 hạt/200 μl được phủ trong đĩa 96 giếng với sự có mặt của 4 x 12,5 ng biotin-pMHC khác nhau, được rửa sạch và 600 ng biotin kháng-CD28 được thêm vào sau đó với thể tích 200 μl . Kích thích được bắt đầu trong đĩa 96 giếng bằng cách đồng ủ 1×10^6 tế bào T CD8 + với 2×10^5 hạt đã phủ đã rửa trong 200 μl TCM được bổ sung 5 ng/ml IL-12 (PromoCell) trong 3 ngày ở nhiệt độ 37°C. Một nửa môi trường sau đó được trao đổi bằng TCM tươi bổ sung 80 U/ml IL-2 và ủ tiếp tục trong 4 ngày ở 37°C. Chu kỳ kích thích này được thực hiện tổng cộng ba lần. Đối với phép đọc đa phân tử pMHC sử dụng 8 phân tử pMHC khác nhau cho mỗi điều kiện, phương pháp mã hóa tổ hợp hai chiều đã được sử dụng như đã mô tả trước đây (Andersen et al., 2012) với những sửa đổi nhỏ bao gồm việc ghép nối thành 5 fluorochrome khác nhau. Cuối cùng, các phân tích đa phân tử được thực hiện bằng cách nhuộm tế bào bằng thuốc nhuộm Live/dead near IR (Invitrogen, Karlsruhe, Đức), dòng kháng thể CD8-FITC SK1 (BD, Heidelberg, Đức) và đa phân tử pMHC huỳnh quang. Để phân tích, máy đo tế bào BD LSRII SORP được trang bị laser và bộ lọc thích hợp đã được sử dụng. Các tế bào đặc hiệu peptit được tính theo tỷ lệ phần trăm của tổng số tế bào CD8 +. Đánh giá phân tích đa số được thực hiện bằng phần mềm FlowJo (Tree Star, Oregon, Hoa Kỳ). Việc môi *in vitro* của các tế bào lympho đa chức năng + CD8 + đặc hiệu được phát hiện bằng cách so sánh với các kích thích kiểm soát âm tính. Khả năng gây miễn dịch đối với kháng nguyên nhất định được phát hiện nếu ít nhất một giếng được kích thích *in vitro* có giá trị của một người cho khỏe mạnh được tìm thấy có chứa dòng tế bào T CD8 + đặc hiệu sau khi kích thích *in vitro* (nghĩa là giếng này chứa

ít nhất 1% đa phân tử+ đặc hiệu trong số các tế bào T CD8 + và tỷ lệ phần trăm tế bào đa phân tử+ đặc hiệu ít nhất gấp 10 lần giá trị trung bình của các kích thích kiểm soát âm tính).

Khả năng gây miễn dịch *in vitro* cho các peptit bệnh bạch cầu dòng tủy cấp tính, ung thư vú, ung thư biểu mô tế bào đường mật, bệnh bạch cầu lympho bào mạn tính, ung thư đại trực tràng, ung thư túi mật, u nguyên bào đệm, ung thư dạ dày, ung thư dạ dày thực quản, ung thư biểu mô tế bào gan, ung thư biểu mô tế bào vảy vùng đầu cổ, khối u ác tính, ung thư hạch không Hodgkin, ung thư phổi không phải tế bào nhỏ, ung thư buồng trứng, ung thư thực quản, ung thư tuyến tụy, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư biểu mô tế bào thận, ung thư phổi tế bào nhỏ, ung thư biểu mô bàng quang và ung thư nội mạc tử cung.

Đối với peptit HLA lớp I đã được thử nghiệm, khả năng gây miễn dịch *in vitro* có thể được chứng minh bằng cách tạo ra các dòng tế bào T đặc hiệu với peptit. Kết quả đếm lưu lượng tế bào ví dụ sau khi nhuộm đa phân tử đặc hiệu TUMAP cho 7 peptit theo sáng chế được thể hiện trên Fig. 3A và 3B và Fig. 4A-E cùng với các đối chứng âm tính tương ứng. Kết quả cho 30 peptit từ sáng chế được tóm tắt trong bảng 13a và 13b.

Bảng 13a: Khả năng gây miễn dịch *in vitro* của peptit HLA lớp I theo sáng chế

Các kết quả ví dụ *in vitro* về các thử nghiệm khả năng gây miễn dịch được thực hiện bởi chủ đơn cho các peptit của sáng chế tiến hành. <20 % = +; 20 % - 49 % = ++; 50 % - 69 % = +++; >= 70 % = ++++

ID SEQ số	Trình tự	Các giếng dương tính [%]
102	GLDPTQFRV	++
103	SLVSYLDKV	+

Bảng 13b: khả năng gây miễn dịch *in vitro* của peptit HLA lớp I theo sáng chế

Các kết quả ví dụ *in vitro* về các thử nghiệm khả năng gây miễn dịch được thực hiện bởi chủ đơn cho các peptit của sáng chế tiến hành. <20% = +; 20-49% = ++; 50-69% = +++; ≥ 70% = ++++

ID SEQ số	Trình tự	Các giếng dương tính [%]
1	KLLDFSTRI	+
2	ALLDVLVKL	+
3	FLLVPSPIWQL	+
4	YLGDSHVLL	+
6	ALHDSPVYL	++
7	ALWEEVKATSL	+
13	FLDEGSLLRL	+
18	KMMTFFQGL	++
19	MLLPWLPKL	++
26	KLWTSLVNL	++
29	LLWEFPSMA	++
31	VVLPIVITL	++
33	FASERPPSV	++

36	FQVTRTTGV	+
37	KILDEFYNV	++
38	SLSAWLPSL	+
40	FTLPFLVNL	++
46	AMVEIIPKV	+
47	ALLPGVPGL	++
48	MLAEIHPKA	++
49	FLWDPRDVVL	+
50	GLASYLDRV	+
51	GLLTQVHIL	+
65	IAISQLTFV	+
68	KLLADAFKV	++
74	TLLSYSIPL	+
96	KHIEDLANTV	++
101	KLPEGHLPEV	+

Ví dụ 4:

Tổng hợp các peptit

Tất cả các peptit được tổng hợp bằng cách sử dụng tổng hợp peptit pha rắn chuẩn và được thiết lập tốt bằng cách sử dụng chiến lược Fmoc. Nhận dạng và độ tinh khiết của từng peptit riêng lẻ đã được xác định bằng phương pháp khối phổ và RP-HPLC phân tích. Các peptit thu được ở dạng đông khô từ trắng đến trắng nhạt (muối trifluoro axetat) với độ tinh khiết > 50%. Tất cả TUMAP tốt hơn nên được sử dụng dưới dạng muối trifluoro-axetat hoặc muối axetat, các dạng muối khác cũng có thể được sử dụng.

Ví dụ 5:

Thử nghiệm liên kết MHC

Các peptit ứng viên cho liệu pháp dựa trên tế bào T theo sáng chế đã được kiểm tra thêm về khả năng liên kết MHC (ái lực) của chúng. Kết quả cho 79 peptit từ sáng chế được tóm tắt trong bảng 14.

Các phức hợp peptit-MHC riêng lẻ được tạo ra bằng cách trao đổi phối tử UV, trong đó peptit nhạy cảm với tia UV bị phân cắt khi chiếu tia UV và trao đổi với peptit quan tâm như đã phân tích. Chỉ những ứng cử viên peptit có thể liên kết và ổn định hiệu quả các phân tử MHC tiếp nhận peptit mới ngăn chặn sự phân ly của phức MHC. Để xác định năng suất của phản ứng trao đổi, ELISA được thực hiện dựa trên việc phát hiện chuỗi nhẹ ($\beta 2m$) của các phức hợp MHC ổn định. Thử nghiệm được thực hiện như được mô tả chung trong Rodenko và cộng sự (Rodenko et al., 2006).

Đĩa MAXISorp 96 giếng (NUNC) được phủ qua đêm với 2 μ g/ml streptavidin trong PBS ở nhiệt độ phòng, rửa 4 lần và chặn trong 1 giờ ở 37°C trong 2% BSA có chứa đệm chặn. Các monome HLA-A * 02: 01/MLA-001 được gấp được dùng làm tiêu chuẩn, có phạm vi từ 15-500 ng/ml. Các monome peptit-MHC của phản ứng trao đổi UV được pha loãng 100 lần trong đệm chặn. Các mẫu được ủ trong 1h ở 37°C, rửa bốn lần, ủ với 2 μ g/ml HRP cộng hợp anti- $\beta 2m$ trong 1h ở 37°C, rửa lại và phát hiện bằng dung dịch TMB được dừng bằng NH_4SO_4 . Đo hấp thụ ở bước sóng 450nm. Các peptit ứng cử viên cho thấy năng suất trao đổi cao (tốt hơn là cao hơn 50%, tốt nhất là cao hơn 75%) thường được ưu tiên để tạo và sản xuất các kháng thể hoặc các phân đoạn của chúng, và/hoặc các

thụ thể tế bào T hoặc các phân đoạn của chúng, khi chúng cho thấy đủ ái lực với các phân tử MHC và ngăn cản sự phân ly của các phức hợp MHC.

Bảng 14: Điểm liên kết MHC lớp I. Sự liên kết của các peptit bị hạn chế HLA-lớp I với HLA-A * 02: 01 được thay đổi theo hiệu suất trao đổi peptit: $\geq 10\%$ = +; $\geq 20\%$ = ++; $\geq 50\%$ = +++; $\geq 75\%$ = ++++

ID SEQ số	Trình tự	Trao đổi peptit
1	KLLDFSTRI	++++
2	ALLDVLVKL	++++
3	FLLVPSPIWQL	++++
4	YLGDSHVLL	++++
5	LVWEVVESV	++++
6	ALHDSPVYL	++++
7	ALWEEVKATSL	++++
8	ILQSLVPAA	++++
9	FLQEGDLISV	++++
10	SLLDKLSGI	++++
11	ALLPHAPEAV	+++
12	HLDSMNVSI	++++
13	FLDEGSLLRL	++++

14	LLIEVSEEL	++++
15	NLVMPLLHI	++
16	ALLDAEQSPVAL	++++
17	VLWDLRPSSLI	++++
18	KMMTFFQGL	++++
19	MLLPWLPKL	++++
20	VLISLPGKV	++
21	FVFISPSFL	+++
22	SLYDVPVGA	++++
23	GLEVLDALL	++
24	TLTSLNILL	++++
25	ISVLNLSAI	++
26	KLWTSLVNL	++++
27	IAAGVPNTDA	++
28	SQLEKPETA	+++
29	LLWEFPSMA	++++
30	LLRLTLLPL	++
31	VVLPIVITL	++++

32	VLSVSAVLGA	+++
33	FASERPPSV	++++
34	LLNVEPAGA	++++
35	VLLNSNYPV	++++
36	FQVTRTTGV	++++
37	KILDEFYNV	++++
38	SLSAWLPSL	++++
39	YIYEDEVRL	++++
40	FTLPFLVNL	++++
41	LMASEGIWESSL	+++
42	WITPVIPAL	++++
43	AIWSTILIA	++
44	WLIPRQLAAA	++++
45	ALYHQSPLL	++++
46	AMVEIIPKV	++++
47	ALLPGVPGL	++++
48	MLAEIHPKA	++++
49	FLWDPRDVVL	++++

50	GLASYLDRV	++++
51	GLLTQVHIL	++++
52	LAFVSHVLI	++
53	TISISLSSV	++++
54	GLSPDQVFL	++++
55	MVQQEKLFV	+++
56	IITNLIVNI	+++
57	YVLMTSLLL	++++
58	MIISHRALEL	++
59	LAASTTFLGV	++++
60	LLLATLENL	++++
61	VLPWQPLLL	++
62	SLLGKPGLTI	++++
63	LSFKRSLSI	++
64	LLLALRLSL	+
65	IAISQLTFV	++++
66	ILNELLNSI	++++
67	ALKELMGPA	++

68	KLLADAFKV	++++
69	LLCPVVLQL	++++
70	LLLQIEPAA	++++
71	WLMPVMPAL	++++
73	STTIINLIL	++
74	TLLSYSIPL	++++
96	KIIEDLANTV	++++
97	GLIDDKGTIKL	++++
98	SLMEVTHDL	++++
99	ALMDGSESRRFFV	++++
100	SLGPPPVGV	++++
101	KLPEGHLPEV	++++

Ví dụ 6:

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

Việc tạo ra chất liên kết, chẳng hạn như kháng thể và/hoặc TCR, là một quá trình tốn nhiều công sức, có thể chỉ được tiến hành đối với một số mục tiêu đã chọn. Trong trường hợp các peptit đặc hiệu và liên quan đến khối u, tiêu chí lựa chọn bao gồm nhưng không bị giới hạn ở tính độc quyền của sự trình diện và mật độ của peptit được trình diện trên bề mặt tế bào. Ngoài việc phân lập và định lượng tương đối các peptit như được mô

tả trong **Error! Reference source not found.**, các tác giả sáng chế đã phân tích các bản sao peptit tuyệt đối trên mỗi tế bào như được mô tả trong WO 2016/107740. Việc định lượng các bản sao TUMAP trên mỗi tế bào trong các mẫu khối u rắn yêu cầu định lượng tuyệt đối TUMAP được phân lập, hiệu quả của quá trình phân lập TUMAP và số lượng tế bào của mẫu mô được phân tích.

Định lượng peptit bằng nano LC-MS/MS

Để định lượng chính xác các peptit bằng phương pháp khối phổ, đường chuẩn được tạo cho từng peptit riêng lẻ sử dụng hai biến thể peptit được đánh dấu đồng vị khác nhau (một hoặc hai axit amin được đánh dấu đồng vị được bao gồm trong quá trình tổng hợp TUMAP). Các biến thể được đánh dấu đồng vị này chỉ khác với peptit liên kết với khối u về khối lượng nhưng không có sự khác biệt về các đặc tính hóa lý khác (Anderson et al., 2012). Đối với đường chuẩn peptit, một loạt các phép đo LC-MS/MS nano đã được thực hiện để xác định tỷ lệ tín hiệu MS/MS của peptit được đánh dấu đồng vị chuẩn độ (peptit được đánh dấu đồng vị đơn) trên peptit được đánh dấu đồng vị không đổi (peptit được đánh dấu đồng vị kép).

Peptit được đánh dấu đồng vị kép, còn được gọi là chất chuẩn nội, được tăng thêm vào mỗi mẫu MS và tất cả các tín hiệu MS được chuẩn hóa thành tín hiệu MS của chất chuẩn nội để loại bỏ các phương sai kỹ thuật tiềm ẩn giữa các thí nghiệm MS.

Các đường chuẩn được chuẩn bị trong ít nhất ba ma trận khác nhau, tức là chất rửa giải peptit HLA từ các mẫu tự nhiên tương tự như các mẫu MS thông thường, và mỗi chế phẩm được đo trong các lần chạy MS lặp lại. Để đánh giá, các tín hiệu MS được chuẩn hóa thành tín hiệu của chất chuẩn nội và đường chuẩn được tính toán bằng hồi quy logistic.

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

Hiệu quả của việc phân lập peptit/MHC

Đối với bất kỳ quá trình tinh sạch protein nào, việc phân lập protein từ các mẫu mô có liên quan đến việc mất đi một số protein quan tâm nhất định. Để xác định hiệu quả phân lập TUMAP, phức hợp peptit/MHC được tạo ra cho tất cả các TUMAP được chọn để định lượng tuyệt đối. Để có thể phân biệt được tăng đột biến từ phức hợp peptit/MHC tự nhiên, các phiên bản được đánh dấu đồng vị đơn của TUMAP đã được sử dụng, tức là một axit amin được đánh dấu đồng vị đã được đưa vào tổng hợp TUMAP. Các phức hợp này được tăng đột biến vào các chất ly giải mô mới chuẩn bị, tức là tại điểm sớm nhất có thể của quy trình phân lập TUMAP, và sau đó được giữ lại giống như các phức hợp peptit/MHC tự nhiên trong quá trình tinh sạch bằng ái lực sau đây. Do đó, việc đo lường sự thu hồi của các TUMAP được đánh dấu đơn cho phép kết luận về hiệu quả của việc phân lập các TUMAP tự nhiên riêng lẻ.

Hiệu quả của việc phân lập được phân tích trong một nhóm mẫu nhỏ và có thể so sánh giữa các mẫu mô này. Ngược lại, hiệu quả phân lập khác nhau giữa các peptit riêng lẻ. Điều này cho thấy rằng hiệu quả phân lập, mặc dù chỉ được xác định trong một số mẫu mô hạn chế, có thể được ngoại suy cho bất kỳ sự chuẩn bị mô nào khác. Tuy nhiên, cần phải phân tích từng TUMAP riêng lẻ vì hiệu quả phân lập có thể không ngoại suy từ một peptit này sang peptit khác.

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

Để xác định số lượng tế bào của các mẫu mô được định lượng peptit tuyệt đối, các tác giả sáng chế đã áp dụng phân tích hàm lượng ADN. Phương pháp này có thể áp dụng cho nhiều loại mẫu có nguồn gốc khác nhau và quan trọng nhất là các mẫu đông lạnh. (Alcoser et al., 2011; Forsey and Chaudhuri, 2009; Silva et al., 2013). Trong quy trình phân lập peptit, mẫu mô được xử lý thành sản phẩm phân giải đồng nhất, từ đó lấy một lượng mẫu nhỏ sản phẩm phân giải. Phần mẫu được chia thành ba phần, từ đó ADN được phân lập (QiaAmp ADN Mini Kit, Qiagen, Hilden, Đức). Tổng hàm lượng ADN từ mỗi lần phân lập ADN được định lượng bằng cách sử dụng xét nghiệm định lượng ADN dựa trên huỳnh quang (Qubit dsADN HS Assay Kit, Life Technologies, Darmstadt, Đức) trong ít nhất hai lần lặp lại.

Để tính số lượng tế bào, đường chuẩn ADN từ phần mẫu các tế bào máu khỏe mạnh được phân lập từ một số người cho, với phạm vi số tế bào xác định, đã được tạo ra. Đường chuẩn được sử dụng để tính tổng hàm lượng tế bào từ tổng hàm lượng ADN từ mỗi lần phân lập ADN. Sau đó, tổng số tế bào trung bình của mẫu mô được sử dụng để phân lập peptit sau đó được ngoại suy dựa trên thể tích đã biết của sản phẩm phân giải và tổng thể tích sản phẩm phân giải.

Các bản sao peptit trên mỗi tế bào

Với dữ liệu của các thử nghiệm nói trên, các tác giả sáng chế đã tính toán số lượng bản sao TUMAP trên mỗi tế bào bằng cách chia tổng lượng peptit cho tổng số tế bào của mẫu, tiếp theo là chia thông qua hiệu suất phân lập. Số tế bào sao chép cho các peptit đã chọn được hiển thị trong bảng 15.

Bảng 15: Số bản sao tuyệt đối. Bảng liệt kê kết quả định lượng peptit tuyệt đối trong các mẫu khối u. Số lượng bản sao trung bình trên mỗi tế bào được biểu thị cho mỗi peptit: $<25 = +$; $\geq 25 = ++$; $\geq 50 = +++$; $\geq 75 = ++++$. Số lượng mẫu, trong đó có sẵn dữ liệu MS chất lượng cao, có thể đánh giá được.

ID SEQ số	Mã peptid	Bản sao trên mỗi tế bào (trung bình)	Số lượng mẫu
1	NUDCD2-001	+++	8
2	COLPDG-001	++++	12
4	altORF-002	+	7
5	altORF-003	++++	13
6	altORF-004	+	23

ID SEQ số	Mã peptid	Bản sao trên mỗi tế bào (trung bình)	Số lượng mẫu
7	altORF-005	+	1
8	altORF-006	++++	12
9	altORF-007	++	11
10	altORF-008	+	11
11	altORF-009	+	13
39	altORF-037	++	4
96	KRT18-001	++	1
97	CDC2-006	++	10
100	CIZ1-001	+	1

Tài liệu tham khảo

Accardi, L. et al., Int.J Cancer **134** (2014): 2742-2747

Aken, B. L. et al., Database.(Oxford) **2016** (2016)

Alcoser, S. Y. et al., BMC.Biotechnol. **11** (2011): 124

Allison, J. P. et al., Science **270** (1995): 932-933

American Cancer Society, (2015a), www.cancer.org

American Cancer Society, (2015b), www.cancer.org

- Ampie, L. et al., *Front Oncol.* **5** (2015): 12
- Andersen, R. S. et al., *Nat.Protoc.* **7** (2012): 891-902
- Anderson, D. M. et al., *Cell* **160** (2015): 595-606
- Anderson, N. L. et al., *J Proteome.Res* **11** (2012): 1868-1878
- Appay, V. et al., *Eur.J Immunol.* **36** (2006): 1805-1814
- Armitage, J. O., *Blood* **110** (2007): 29-36
- Aspden, J. L. et al., *Elife.* **3** (2014): e03528
- Avigan, D. et al., *Clin Cancer Res.* **10** (2004): 4699-4708
- Azevedo, R. et al., *J Control Release* **214** (2015): 40-61
- Banchereau, J. et al., *Cell* **106** (2001): 271-274
- Beatty, G. et al., *J Immunol* **166** (2001): 2276-2282
- Beggs, J. D., *Nature* **275** (1978): 104-109
- Benjamini, Y. et al., *JouARNI of the Royal Statistical Society.Series B (Methodological)*, **Vol.57** (1995): 289-300
- Berman, R. S. et al., *National Cancer Institute: PDQ(R) Colon Cancer Treatment* (2015a)
- Berman, R. S. et al., *National Cancer Institute: PDQ(R) Rectal Cancer Treatment* (2015b)
- Boulter, J. M. et al., *Protein Eng* **16** (2003): 707-711
- Braumuller, H. et al., *Nature* (2013)
- Bray, F. et al., *Int J Cancer* **132** (2013): 1133-1145
- Bridgewater, J. et al., *J Hepatol.* **60** (2014): 1268-1289
- Brossart, P. et al., *Blood* **90** (1997): 1594-1599
- Bruckdorfer, T. et al., *Curr.Pharm.Biotechnol.* **5** (2004): 29-43
- Bujas, T. et al., *Eur.J Histochem.* **55** (2011): e7

- Butterfield, L. H. et al., Clin.Cancer Res. **12** (2006): 2817-2825
- Butterfield, L. H. et al., Clin.Cancer Res. **9** (2003): 5902-5908
- Byrd, J. C. et al., N.Engl.J Med. **369** (2013): 32-42
- Carballido, E. et al., Cancer Control **19** (2012): 54-67
- Card, K. F. et al., Cancer Immunol.Immunother. **53** (2004): 345-357
- Chang, Y. S. et al., Cancer Chemother.Pharmacol. **59** (2007): 561-574
- Chapiro, J. et al., Radiol.Med. **119** (2014): 476-482
- ClinicalTrials.gov, (2015), <http://www.clinicaltrials.gov>
- Cohen, C. J. et al., J Mol.Recognit. **16** (2003a): 324-332
- Cohen, C. J. et al., J Immunol. **170** (2003b): 4349-4361
- Cohen, S. N. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **69** (1972): 2110-2114
- Coligan, J. E. et al., Current Protocols in Protein Science (1995)
- Colombetti, S. et al., J Immunol. **176** (2006): 2730-2738
- Coosemans, A. et al., Anticancer Res **33** (2013): 5495-5500
- Counter, C. M. et al., Blood **85** (1995): 2315-2320
- de, Klerk E. et al., Trends Genet. **31** (2015): 128-139
- Dedes, K. J. et al., Sci.Transl.Med. **2** (2010): 53ra75
- Dengjel, J. et al., Clin Cancer Res **12** (2006): 4163-4170
- Denkberg, G. et al., J Immunol. **171** (2003): 2197-2207
- Economopoulou, P. et al., Ann.Transl.Med. **4** (2016): 173
- Eichhorst, B. F. et al., Blood **107** (2006): 885-891
- Emens, L. A., Expert.Rev.Anticancer Ther. **12** (2012): 1597-1611
- Enguita-German, M. et al., World J Hepatol. **6** (2014): 716-737

- Estey, E. H., *Am.J Hematol.* **89** (2014): 1063-1081
- Falk, K. et al., *Nature* **351** (1991): 290-296
- Ferlay et al., GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No.11 [Internet], (2013), <http://globocan.iarc.fr>
- Follenzi, A. et al., *Nat Genet.* **25** (2000): 217-222
- Fong, L. et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **98** (2001): 8809-8814
- Forsey, R. W. et al., *Biotechnol.Lett.* **31** (2009): 819-823
- Fuge, O. et al., *Res Rep.Urol.* **7** (2015): 65-79
- Furman, R. R. et al., *N.Engl.J Med.* **370** (2014): 997-1007
- Gabrilovich, D. I. et al., *Nat.Med* **2** (1996): 1096-1103
- Gandhi, A. V. et al., *Ann Surg.Oncol* **20 Suppl 3** (2013): S636-S643
- Gattinoni, L. et al., *Nat.Rev.Immunol.* **6** (2006): 383-393
- Giannopoulos, K. et al., *Leukemia* **24** (2010): 798-805
- Giannopoulos, K. et al., *Int.J Oncol* **29** (2006): 95-103
- Gnjatic, S. et al., *Proc Natl.Acad.Sci.U.S.A* **100** (2003): 8862-8867
- Godkin, A. et al., *Int.Immunol* **9** (1997): 905-911
- Goede, V. et al., *N.Engl.J Med.* **370** (2014): 1101-1110
- Gonzalez-Cao, M. et al., *Cancer Biol Med* **13** (2016): 483-488
- Gragert, L. et al., *Hum.Immunol.* **74** (2013): 1313-1320
- Granziero, L. et al., *Blood* **97** (2001): 2777-2783
- Green, J. et al., *Cochrane.Database.Syst.Rev* (2005): CD002225
- Green, M. R. et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* **4th** (2012)
- Greenfield, E. A., *Antibodies: A Laboratory Manual* **2nd** (2014)

- Grivas, P. D. et al., *Semin.Cancer Biol* **35** (2015): 125-132
- Gunawardana, C. et al., *Br.J Haematol.* **142** (2008): 606-609
- Gustafsson, C. et al., *Trends Biotechnol.* **22** (2004): 346-353
- Hallek, Michael et al., *ASH Annual Meeting Abstracts* **112** (2008): 325
- Harig, S. et al., *Blood* **98** (2001): 2999-3005
- Hinrichs, C. S. et al., *Nat Biotechnol.* **31** (2013): 999-1008
- Holtl, L. et al., *Clin.Cancer Res.* **8** (2002): 3369-3376
- Horig, H. et al., *Cancer Immunol.Immunother.* **49** (2000): 504-514
- Hung, C. F. et al., *Immunol.Rev* **222** (2008): 43-69
- Hus, I. et al., *Oncol Rep.* **20** (2008): 443-451
- Hwang, M. L. et al., *J Immunol.* **179** (2007): 5829-5838
- Inoue, H. et al., *Int.J Cancer* **63** (1995): 523-526
- Jones, R. T. et al., *Urol.Clin North Am.* **43** (2016): 77-86
- Jung, G. et al., *Proc Natl Acad Sci U S A* **84** (1987): 4611-4615
- Kalos, M. et al., *Sci.Transl.Med* **3** (2011): 95ra73
- Kanthan, R. et al., *J Oncol* **2015** (2015): 967472
- Kassiotis, G. et al., *Philos.Trans.R Soc.Lond B Biol Sci.* **372** (2017)
- Kaufman, H. L. et al., *Clin Cancer Res.* **14** (2008): 4843-4849
- Khoury, G. A. et al., *Sci.Rep.* **1** (2011)
- Kibbe, A. H., *Handbook of Pharmaceutical Excipients* **rd** (2000)
- Kimura, H. et al., *Int.J Oncol* **30** (2007): 171-179
- Knollman, H. et al., *Ther.Adv.Urol.* **7** (2015a): 312-330
- Knollman, H. et al., *Ther.Adv.Urol.* **7** (2015b): 312-330

- Koido, S. et al., World J Gastroenterol. **19** (2013): 8531-8542
- Kono, K. et al., Cancer Sci. **100** (2009): 1502-1509
- Krackhardt, A. M. et al., Blood **100** (2002): 2123-2131
- Krieg, A. M., Nat.Rev.Drug Discov. **5** (2006): 471-484
- Krishnamurthy, J. et al., Clin Cancer Res **21** (2015): 3241-3251
- Kronenberger, K. et al., J Immunother. **31** (2008): 723-730
- Kuball, J. et al., Blood **109** (2007): 2331-2338
- Laumont, C. M. et al., Cell Mol.Life Sci. **75** (2018): 607-621
- Lee, W. C. et al., J Immunother. **28** (2005): 496-504
- Leitlinie Endometriumkarzinom, **032/034**, (2008)
- Leitlinie Magenkarzinom, **032-009OL**, (2012)
- Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie, **030/099**, (2014)
- Li, Y. et al., Cancer Epidemiol. **39** (2015): 8-13
- Liang, Z. et al., Zhonghua Zhong.Liu Za Zhi. **27** (2005): 534-537
- Liddy, N. et al., Nat.Med. **18** (2012): 980-987
- Liepe, J. et al., Science **354** (2016): 354-358
- Ljunggren, H. G. et al., J Exp.Med **162** (1985): 1745-1759
- Llovet, J. M. et al., N.Engl.J Med. **359** (2008): 378-390
- Longenecker, B. M. et al., Ann N.Y.Acad.Sci. **690** (1993): 276-291
- Lonsdale, J., Nat.Genet. **45** (2013): 580-585
- Lukas, T. J. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **78** (1981): 2791-2795
- Lukka, H. et al., Clin Oncol (R Coll.Radiol.) **14** (2002): 203-212
- Lundblad, R. L., Chemical Reagents for Protein Modification **3rd** (2004)

- Mantia-Smaldone, G. M. et al., Hum.Vaccin.Immunother. **8** (2012): 1179-1191
- Marten, A. et al., Cancer Immunol.Immunother. **51** (2002): 637-644
- Massari, F. et al., Cancer Treat.Rev. **41** (2015): 114-121
- Matsueda, S. et al., World J Gastroenterol. **20** (2014): 1657-1666
- Maus, M. V. et al., Blood **123** (2014): 2625-2635
- Mayr, C. et al., Exp.Hematol. **34** (2006): 44-53
- Mayr, C. et al., Blood **105** (2005): 1566-1573
- Meziere, C. et al., J Immunol **159** (1997): 3230-3237
- Miyagi, Y. et al., Clin.Cancer Res. **7** (2001): 3950-3962
- Molina, J. R. et al., Mayo Clin Proc. **83** (2008): 584-594
- Morgan, R. A. et al., Science **314** (2006): 126-129
- Mortara, L. et al., Clin Cancer Res. **12** (2006): 3435-3443
- Moulton, H. M. et al., Clin Cancer Res. **8** (2002): 2044-2051
- Mueller, L. N. et al., J Proteome.Res. **7** (2008): 51-61
- Mueller, L. N. et al., Proteomics. **7** (2007): 3470-3480
- Muller, M. R. et al., Blood **103** (2004): 1763-1769
- Mumberg, D. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **96** (1999): 8633-8638
- Nam, J. W. et al., Mol.Cells **39** (2016): 367-374
- National Cancer Institute, (6-5-2015), www.cancer.gov
- National Cancer Institute (NCI), (1-19-2011), <http://www.cancer.gov/cancertopics/wyntk/kidney/page3>
- Nilsen, T. W. et al., Nature **463** (2010): 457-463
- O'Brien, S. et al., Lancet Oncol **15** (2014): 48-58

- O'Leary, N. A. et al., *Nucleic Acids Res* **44** (2016): D733-D745
- Ohigashi, Y. et al., *Clin Cancer Res.* **11** (2005): 2947-2953
- Okuno, K. et al., *Exp.Ther.Med.* **2** (2011): 73-79
- Olexiouk, V. et al., *Nucleic Acids Res* **44** (2016): D324-D329
- Palma, M. et al., *Cancer Immunol.Immunother.* **57** (2008): 1705-1710
- Palmer, D. H. et al., *Hepatology* **49** (2009): 124-132
- Palomba, M. L., *Curr.Oncol Rep.* **14** (2012): 433-440
- Parikh, S. A. et al., *Blood* **118** (2011): 2062-2068
- Phan, G. Q. et al., *Cancer Control* **20** (2013): 289-297
- Pinheiro, J. et al., *nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models* (<http://CRAN.R-project.org/package=nlme>) (2015)
- Plebanski, M. et al., *Eur.J Immunol* **25** (1995): 1783-1787
- Porta, C. et al., *Virology* **202** (1994): 949-955
- Porter, D. L. et al., *N.Engl.J Med.* **365** (2011): 725-733
- Quillien, V. et al., *Anticancer Res.* **17** (1997): 387-391
- Quinn, D. I. et al., *Urol.Oncol* **33** (2015): 245-260
- Rakic, M. et al., *Hepatobiliary.Surg.Nutr.* **3** (2014): 221-226
- Rammensee, H. G. et al., *Immunogenetics* **50** (1999): 213-219
- Reinisch, W. et al., *J Immunother.* **25** (2002): 489-499
- Reinmuth, N. et al., *Dtsch.Med.Wochenschr.* **140** (2015): 329-333
- Richards, S. et al., *J Natl.Cancer Inst.* **91** (1999): 861-868
- Rini, B. I. et al., *Curr.Opin.Oncol.* **20** (2008): 300-306
- Rini, B. I. et al., *Cancer* **107** (2006): 67-74

- Robak, T. et al., *Expert.Opin.Biol.Ther* **14** (2014): 651-661
- Rock, K. L. et al., *Science* **249** (1990): 918-921
- Rodenko, B. et al., *Nat.Protoc.* **1** (2006): 1120-1132
- Rouanne, M. et al., *Crit Rev Oncol Hematol.* **98** (2016): 106-115
- Rucki, A. A. et al., *World J Gastroenterol.* **20** (2014): 2237-2246
- S3-Leitlinie Exokrines Pankreaskarzinom, **032-010OL**, (2013)
- S3-Leitlinie Lungenkarzinom, **020/007**, (2011a)
- S3-Leitlinie Lungenkarzinom, **020/007**, (2011b)
- S3-Leitlinie maligne Ovarialtumore, **032-035OL**, (2013)
- S3-Leitlinie Mammakarzinom, **032-045OL**, (2012)
- S3-Leitlinie Melanom, **032-024OL**, (2013)
- S3-Leitlinie Prostatakarzinom, **043/022OL**, (2014)
- S3-Leitlinie Zervixkarzinom, **032/033OL**, (2014)
- Saiki, R. K. et al., *Science* **239** (1988): 487-491
- Salman, B. et al., *Oncoimmunology.* **2** (2013): e26662
- Sangro, B. et al., *J Clin.Oncol.* **22** (2004): 1389-1397
- Schotelig, J. et al., *J Clin Oncol* **26** (2008): 5094-5100
- Schiavetti, F. et al., *Cancer Res* **62** (2002): 5510-5516
- Schmidt, S. M. et al., *Cancer Res.* **64** (2004): 1164-1170
- Schmitt, T. M. et al., *Hum.Gene Ther.* **20** (2009): 1240-1248
- Scholten, K. B. et al., *Clin Immunol.* **119** (2006): 135-145
- Seeger, F. H. et al., *Immunogenetics* **49** (1999): 571-576
- Sherman, F. et al., *Laboratory Course Manual for Methods in Yeast Genetics* (1986)

- Shi, M. et al., World J Gastroenterol. **10** (2004): 1146-1151
- Showel, M. M. et al., F1000Prime.Rep. **6** (2014): 96
- Siegel, S. et al., Blood **102** (2003): 4416-4423
- Silva, L. P. et al., Anal.Chem. **85** (2013): 9536-9542
- Singh-Jasuja, H. et al., Cancer Immunol.Immunother. **53** (2004): 187-195
- Small, E. J. et al., J Clin Oncol. **24** (2006): 3089-3094
- Spaner, D. E. et al., Cancer Immunol.Immunother. **54** (2005): 635-646
- Srivastava, N. et al., Cancer Manag.Res. **6** (2014): 279-289
- Stahl, M. et al., Ann.Oncol. **24 Suppl 6** (2013): vi51-vi56
- Steinberg, R. L. et al., Urol.Oncol (2016a)
- Steinberg, R. L. et al., Urol.Oncol (2016b)
- Stevanovic, S. et al., J Clin Oncol **33** (2015): 1543-1550
- Stintzing, S., F1000Prime.Rep. **6** (2014): 108
- Sturm, M. et al., BMC.Bioinformatics. **9** (2008): 163
- Su, Z. et al., Cancer Res. **63** (2003): 2127-2133
- Subramanian, R. P. et al., Retrovirology. **8** (2011): 90
- Takayama, T. et al., Cancer **68** (1991): 2391-2396
- Takayama, T. et al., Lancet **356** (2000): 802-807
- Tanaka, F. et al., Int.J Oncol **10** (1997): 1113-1117
- Teufel, R. et al., Cell Mol.Life Sci. **62** (2005): 1755-1762
- Thakkar, J. P. et al., Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev. **23** (2014): 1985-1996
- Toh, U. et al., Int.J Clin Oncol **7** (2002): 372-375
- Toh, U. et al., Clin Cancer Res. **6** (2000): 4663-4673

- Toomey, P. G. et al., *Cancer Control* **20** (2013): 32-42
- Tran, E. et al., *Science* **344** (2014): 641-645
- Vanderperre, B. et al., *PLoS.One.* **8** (2013): e70698
- Vici, P. et al., *J Exp.Clin Cancer Res* **33** (2014): 29
- Von Hoff, D. D. et al., *N.Engl.J Med.* **369** (2013): 1691-1703
- von Rundstedt, F. C. et al., *Transl.Androl Urol.* **4** (2015): 244-253
- Walter, S. et al., *J.Immunol.* **171** (2003): 4974-4978
- Walter, S. et al., *Nat Med.* **18** (2012): 1254-1261
- Wang, N. et al., *Arch.Gynecol.Obstet.* **283** (2011): 103-108
- Wierda, W. G. et al., *Blood* **118** (2011): 5126-5129
- Wilhelm, S. M. et al., *Cancer Res.* **64** (2004): 7099-7109
- Willcox, B. E. et al., *Protein Sci.* **8** (1999): 2418-2423
- Wilson, P. M. et al., *Nat Rev.Clin Oncol* **11** (2014): 282-298
- Wittig, B. et al., *Hum.Gene Ther.* **12** (2001): 267-278
- World Cancer Report, (2014)
- World Health Organization, (2014), <http://www.who.int/en/>
- Zaremba, S. et al., *Cancer Res.* **57** (1997): 4570-4577
- Zufferey, R. et al., *J Virol.* **73** (1999): 2886-2892

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Peptit được phân lập có trình tự axit amin theo SEQ ID No. 2, hoặc muối được dụng của nó, trong đó peptit này có tổng chiều dài lên tới 30 axit amin.
2. Peptit hoặc muối của nó theo điểm 1, trong đó peptit này có tổng chiều dài lên tới 16 axit amin, hoặc trong đó peptit bao gồm trình tự axit amin theo SEQ ID No. 2.
3. Peptit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 2, trong đó peptit này là một phần của protein dung hợp, hoặc trong đó peptit này là một phần của protein dung hợp bao gồm các axit amin đầu cuối N của chuỗi bất biến liên quan đến kháng nguyên HLA-DR (li).
4. Axit nucleic, mã hóa peptit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, được liên kết với trình tự khởi đầu khác nguồn gốc.
5. Vector biểu hiện có khả năng biểu hiện axit nucleic mã hóa peptit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3.
6. Tế bào chủ tái tổ hợp, tế bào trình diện kháng nguyên tái tổ hợp hoặc tế bào đuôi gai tái tổ hợp chứa peptit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, axit nucleic theo điểm 4 hoặc vector biểu hiện theo điểm 5.
7. Phương pháp sản xuất peptit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ theo điểm 6 để trình diện peptit theo điểm từ 1 đến 3, hoặc biểu hiện axit nucleic theo điểm 4 hoặc bao gồm vector biểu hiện theo điểm 5, và phân lập peptit từ tế bào chủ hoặc môi trường nuôi cấy tế bào chủ.
8. Phương pháp tạo ra tế bào lympho T được hoạt hóa, phương pháp bao gồm bước cho tế bào T tiếp xúc với các phân tử MHC lớp I hoặc II ở người được tải kháng nguyên được biểu hiện trên bề mặt của tế bào trình diện kháng nguyên thích hợp hoặc cấu trúc nhân tạo bất chước tế bào trình diện kháng nguyên trong khoảng thời gian đủ để hoạt hóa các tế bào T này theo cách thức đặc hiệu kháng nguyên, trong đó kháng nguyên này là peptit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3.

9. Tế bào lympho T được hoạt hóa, được tạo ra bằng phương pháp theo điểm 8, mà nhận diện có chọn lọc tế bào mà trình diện polypeptit chứa trình tự axit amin đã đưa ra theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1 hoặc 2.

10. Kháng thể được phân lập, kháng thể hòa tan được phân lập hoặc kháng thể liên kết với màng được phân lập, có khả năng nhận diện đặc hiệu peptit theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1 hoặc 2, hoặc nhận diện đặc hiệu peptit theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1 hoặc 2 khi liên kết với phân tử MHC.

11. Bộ kit bao gồm: (a) vật chứa chứa chế phẩm được chứa peptit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, axit nucleic theo điểm 4, vectơ biểu hiện theo điểm 5, tế bào theo điểm 6, tế bào lympho T được hoạt hóa theo điểm 9 hoặc kháng thể theo điểm 10, ở dạng dung dịch hoặc ở dạng đông khô.

12. Bộ kit theo điểm 11, còn bao gồm một hoặc nhiều trong số:

b) vật chứa thứ hai chứa dung dịch pha loãng hoặc dung dịch hoàn nguyên cho dạng bào chế đông khô,

(c) ít nhất một peptit nữa được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID No. 1 đến SEQ ID No. 101,

(d) hướng dẫn để (i) sử dụng dung dịch này hoặc (ii) hoàn nguyên và/hoặc sử dụng dạng bào chế đông khô;

(e) dung dịch đệm,

(f) dung dịch pha loãng,

(f) bộ lọc,

(h) kim tiêm,

(i) ống tiêm, hoặc

(j) tá chất.

13. Thụ thể tế bào T được phân lập, thụ thể tế bào T hòa tan được phân lập hoặc thụ thể tế bào T liên kết màng được phân lập phản ứng với phối tử HLA, trong đó phối tử này có trình tự axit amin bao gồm SEQ ID No. 2.

14. Thụ thể tế bào T hòa tan theo điểm 13, bao gồm chức năng chấp hành khác, miễn kích thích miễn dịch hoặc độc tố.

15. Axit nucleic, mã hóa cho thụ thể tế bào T theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 13 đến 14, được liên kết với trình tự khởi đầu khác nguồn gốc.

16. Vector biểu hiện có khả năng biểu hiện axit nucleic mã hóa cho thụ thể tế bào T theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 13 đến 14.

17. Tế bào chủ bao gồm axit nucleic theo điểm 15 hoặc axit nucleic mã hóa kháng thể theo điểm 10 hoặc vector biểu hiện theo điểm 16, trong đó tốt hơn là tế bào chủ này là tế bào T hoặc tế bào NK.

18. Phương pháp tạo ra thụ thể tế bào T theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 13 đến 14, phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ theo điểm 17, và phân lập thụ thể tế bào T này từ tế bào chủ đã nêu và/hoặc môi trường nuôi cấy của tế bào chủ đã nêu.

19. Chế phẩm được chứa ít nhất một thành phần có hoạt tính được chọn từ nhóm bao gồm

a) peptit được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID No. 2;

b) thụ thể tế bào T phản ứng với peptit theo a) và/hoặc MHC được tạo phức với peptit theo a);

c) protein dung hợp chứa peptit theo a), và axit amin đầu cuối N từ 1 đến 80 của chuỗi bất biến liên quan đến kháng nguyên HLA-DR (li);

d) axit nucleic mã hóa cho bất kỳ một trong số a) đến c) được liên kết với trình tự khởi đầu khác nguồn gốc hoặc vector biểu hiện bao gồm axit nucleic mã hóa cho bất kỳ một trong số a) đến c),

e) tế bào chủ chứa vector biểu hiện axit nucleic của d),

f) tế bào lympho T được hoạt hóa, thu được bằng phương pháp bao gồm bước cho tế bào T tiếp xúc *in vitro* với peptit theo a) được biểu hiện trên bề mặt của tế bào trình diện kháng nguyên thích hợp trong khoảng thời gian đủ để kích hoạt tế bào T này theo cách thức đặc hiệu kháng nguyên, cũng như phương pháp chuyển các tế bào T được hoạt hóa này vào bệnh nhân tự thân hoặc bệnh nhân khác;

g) kháng thể được phân lập, hoặc thụ thể tế bào T hòa tan được phân lập, phản ứng với peptit theo a) và/hoặc phản ứng với MHC được tạo phức với peptit theo a) và/hoặc tế bào trình diện peptit theo a), và/hoặc các kháng thể được biến đổi bằng cách dung hợp hoặc bao gồm miền kích hoạt miễn dịch hoặc độc tố,

i) peptit hoặc khung được liên hợp hoặc đánh dấu theo một trong số từ a) đến g), chế phẩm còn bao gồm một hoặc nhiều trong số đó; chất mang được dung, tá được được dung, hoặc chất ổn định.

20. Chế phẩm được theo điểm 19, trong đó (i) chế phẩm được này còn bao gồm một hoặc nhiều tá chất, và/hoặc chế phẩm được này là vắc xin hoặc tác nhân trị liệu tế bào.

21. Chế phẩm được theo điểm 20, trong đó một hoặc nhiều tá chất được chọn từ:

- a) interleukin,
- b) tá chất miễn dịch
- c) IL-2; và/hoặc
- d) IL-15.

22. Phương pháp sản xuất vắc xin chống ung thư được cá nhân hóa hoặc liệu pháp dựa trên hợp chất và/hoặc liệu pháp tế bào cho cá thể, phương pháp này bao gồm các bước:

a) xác định peptit liên quan đến khối u (tumor-associated peptide - TUMAP) được thể hiện trong mẫu khối u từ cá nhân nói trên;

b) so sánh các peptit như được xác định trong a) với kho peptit đã được sàng lọc trước về khả năng sinh miễn dịch và/hoặc biểu hiện quá mức ở các khối u như đã so sánh với các mô bình thường,

c) chọn peptit từ kho peptit phù hợp với TUMAP được xác định trong mẫu khối u của cá nhân nói trên; và

d) sản xuất và/hoặc bào chế vắc xin được cá nhân hóa hoặc liệu pháp dựa trên hợp chất hoặc liệu pháp tế bào dựa trên bước c),

trong đó kho peptit này bao gồm peptit theo SEQ ID No. 2 và trong đó vắc xin, liệu pháp dựa trên hợp chất và/hoặc liệu pháp tế bào bao gồm một hoặc nhiều peptit được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID No. 1 đến No.101.

23. Phương pháp theo điểm 22, trong đó TUMAP đã nêu 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 biểu hiện quá mức hoặc biểu hiện bất thường trong mẫu khối u; và

a2) đối chiếu dữ liệu biểu hiện với các chuỗi phối tử MHC liên kết với các phân tử MHC lớp I và/hoặc lớp II trong mẫu khối u để xác định các phối tử MHC có nguồn gốc từ các protein được khối u biểu hiện quá mức hoặc biểu hiện bất thường.

24. Phương pháp theo điểm 22 hoặc 23, trong đó trình tự của các phối tử MHC được xác định bằng cách rửa giải các peptit liên kết khỏi các phân tử MHC được phân lập từ mẫu khối u, và giải trình tự các phối tử đã được rửa giải.

25. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 22 đến 24, trong đó mô bình thường tương ứng với loại mô của mẫu khối u được lấy từ cùng một cá thể.

26. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 22 đến 25, trong đó các peptit có trong kho được xác định dựa trên các bước sau:

aa. thực hiện phân tích biểu hiện axit ribonucleic thông tin (mRNA) trên toàn bộ gen bằng các phương pháp song song cao, chẳng hạn như microarray hoặc hồ sơ biểu hiện dựa trên trình tự, bao gồm việc xác định các gen được biểu hiện có chọn lọc hoặc biểu hiện quá mức trong mô ác tính, so với mô hoặc các mô bình thường;

ab. chọn các peptit được mã hóa bởi các gen được biểu hiện chọn lọc hoặc biểu hiện quá mức như được phát hiện ở bước aa, và

ac. xác định khả năng gây ra đáp ứng tế bào T *in vivo* bằng các peptit được chọn bao gồm các thử nghiệm về khả năng sinh miễn dịch *in vitro* sử dụng tế bào T của người từ người hiến khỏe mạnh hoặc cá thể này; hoặc

ba. xác định các phối tử HLA từ mẫu khối u nói trên bằng phép đo phổ khối;

bb. thực hiện phân tích biểu hiện axit ribonucleic thông tin (mRNA) trên toàn bộ gen bằng các phương pháp song song cao, chẳng hạn như microarray hoặc hồ sơ biểu hiện dựa trên trình tự, bao gồm việc xác định các gen được biểu hiện có chọn lọc hoặc biểu hiện quá mức trong mô ác tính, so với mô hoặc các mô bình thường;

bc. so sánh các phối tử HLA đã xác định với dữ liệu biểu hiện gen nói trên;

bd. lựa chọn các peptide được mã hóa bởi các gen được biểu hiện chọn lọc hoặc biểu hiện quá mức như được phát hiện ở bước bc;

be. phát hiện lại TUMAP đã chọn từ bước bd trên mô khối u và phát hiện thiếu hoặc không thường xuyên trên các mô khỏe mạnh và xác nhận sự liên quan của biểu hiện quá mức ở cấp độ mRNA; và

bf. xác định khả năng gây ra đáp ứng tế bào T *in vivo* bằng các peptit được chọn bao gồm các thử nghiệm khả năng sinh miễn dịch *in vitro* sử dụng tế bào T của người từ người hiến khỏe mạnh hoặc cá thể này.

27. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 22 đến 26, trong đó khả năng sinh miễn dịch của các peptit có trong kho được xác định bằng phương pháp bao gồm các thử nghiệm về khả năng sinh miễn dịch *in vitro*, theo dõi miễn dịch của bệnh nhân để gắn kết HLA riêng lẻ, nhuộm đa phân tử MHC, thử nghiệm ELISPOT và/hoặc nhuộm cytokine nội bào.

28. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 22 đến 27, còn bao gồm việc xác định ít nhất một đột biến duy nhất ở mẫu khối u so với mô tương ứng bình thường từ cá

thể, và chọn peptit tương ứng với đột biến để đưa vào vắc xin hoặc để tạo ra các liệu pháp tế bào.

29. Phương pháp theo điểm 28, trong đó ít nhất một đột biến được xác định bằng giải trình tự toàn bộ bộ gen.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Immatics Biotechnologies GmbH

<120> Peptit được nhận dạng bởi tế bào T, phương pháp tạo ra peptit và kit chứa peptit này

<130> I33148WO

<150> US 62/633,325

<151> 2018-02-21

<150> DE 10 2018 103 944.1

<151> 2018-02-21

<150> DE 10 2018 107 224.4

<151> 2018-03-27

<160> 105

<170> PatentIn phiên bản 3.5

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Lys Leu Leu Asp Phe Ser Thr Arg Ile
1 5

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Ala Leu Leu Asp Val Leu Val Lys Leu
1 5

<210> 3

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Phe Leu Leu Val Pro Ser Pro Ile Trp Gln Leu
1 5 10

<210> 4
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4

Tyr Leu Gly Asp Ser His Val Leu Leu
1 5

<210> 5
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 5

Leu Val Trp Glu Val Val Glu Ser Val
1 5

<210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6

Ala Leu His Asp Ser Pro Val Tyr Leu
1 5

<210> 7
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 7

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

<210> 8
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 8

Ile Leu Gln Ser Leu Val Pro Ala Ala
1 5

<210> 9

<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 9

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

<210> 10
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 10

Ser Leu Leu Asp Lys Leu Ser Gly Ile
1 5

<210> 11
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 11

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

<210> 12
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 12

His Leu Asp Ser Met Asn Val Ser Ile
1 5

<210> 13
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 13

Phe Leu Asp Glu Gly Ser Leu Leu Arg Leu
1 5 10

<210> 14
<211> 9

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 14

Leu Leu Ile Glu Val Ser Glu Glu Leu
1 5

<210> 15
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 15

Asn Leu Val Met Pro Leu Leu His Ile
1 5

<210> 16
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 16

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

<210> 17
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 17

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

<210> 18
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 18

Lys Met Met Thr Phe Phe Gln Gly Leu
1 5

<210> 19
<211> 9
<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

Met Leu Leu Pro Trp Leu Pro Lys Leu
1 5

<210> 20

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

Val Leu Ile Ser Leu Pro Gly Lys Val
1 5

<210> 21

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 21

Phe Val Phe Ile Ser Pro Ser Phe Leu
1 5

<210> 22

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

Ser Leu Tyr Asp Val Pro Val Gly Ala
1 5

<210> 23

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 23

Gly Leu Glu Val Leu Asp Ala Leu Leu
1 5

<210> 24

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 24

Thr Leu Thr Ser Leu Asn Ile Leu Leu
1 5

<210> 25

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 25

Ile Ser Val Leu Asn Leu Ser Ala Ile
1 5

<210> 26

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 26

Lys Leu Trp Thr Ser Leu Val Asn Leu
1 5

<210> 27

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 27

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

<210> 28

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 28

Ser Gln Leu Glu Lys Pro Glu Thr Ala
1 5

<210> 29

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 29

Leu Leu Trp Glu Phe Pro Ser Met Ala
1 5

<210> 30

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 30

Leu Leu Arg Leu Thr Leu Leu Pro Leu
1 5

<210> 31

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 31

Val Val Leu Pro Ile Val Ile Thr Leu
1 5

<210> 32

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 32

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

<210> 33

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 33

Phe Ala Ser Glu Arg Pro Pro Ser Val
1 5

<210> 34

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 34

Leu Leu Asn Val Glu Pro Ala Gly Ala
1 5

<210> 35
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 35

Val Leu Leu Asn Ser Asn Tyr Pro Val
1 5

<210> 36
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 36

Phe Gln Val Thr Arg Thr Thr Gly Val
1 5

<210> 37
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 37

Lys Ile Leu Asp Glu Phe Tyr Asn Val
1 5

<210> 38
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 38

Ser Leu Ser Ala Trp Leu Pro Ser Leu
1 5

<210> 39
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 39

Tyr Ile Tyr Glu Asp Glu Val Arg Leu
1 5

<210> 40
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 40

Phe Thr Leu Pro Phe Leu Val Asn Leu
1 5

<210> 41
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 41

Leu Met Ala Ser Glu Gly Ile Trp Glu Ser Ser Leu
1 5 10

<210> 42
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 42

Trp Ile Thr Pro Val Ile Pro Ala Leu
1 5

<210> 43
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 43

Ala Ile Trp Ser Thr Ile Leu Ile Ala
1 5

<210> 44
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 44

Trp Leu Ile Pro Arg Gln Leu Ala Ala Ala

1 5 10

<210> 45
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 45

Ala Leu Tyr His Gln Ser Pro Leu Leu
1 5

<210> 46
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 46

Ala Met Val Glu Ile Ile Pro Lys Val
1 5

<210> 47
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 47

Ala Leu Leu Pro Gly Val Pro Gly Leu
1 5

<210> 48
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 48

Met Leu Ala Glu Ile His Pro Lys Ala
1 5

<210> 49
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 49

Phe Leu Trp Asp Pro Arg Asp Val Val Leu
1 5 10

<210> 50
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 50

Gly Leu Ala Ser Tyr Leu Asp Arg Val
1 5

<210> 51
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 51

Gly Leu Leu Thr Gln Val His Ile Leu
1 5

<210> 52
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 52

Leu Ala Phe Val Ser His Val Leu Ile
1 5

<210> 53
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 53

Thr Ile Ser Ile Ser Leu Ser Ser Val
1 5

<210> 54
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 54

Gly Leu Ser Pro Asp Gln Val Phe Leu
1 5

<210> 55
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 55

Met Val Gln Gln Glu Lys Leu Phe Val
1 5

<210> 56
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 56

Ile Ile Thr Asn Leu Ile Val Asn Ile
1 5

<210> 57
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 57

Tyr Val Leu Met Thr Ser Leu Leu Leu
1 5

<210> 58
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 58

Met Ile Ile Ser His Arg Ala Leu Glu Leu
1 5 10

<210> 59
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 59

Leu Ala Ala Ser Thr Thr Phe Leu Gly Val
1 5 10

<210> 60
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 60

Leu Leu Leu Ala Thr Leu Glu Asn Leu
1 5

<210> 61
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 61

Val Leu Pro Trp Gln Pro Leu Leu Leu
1 5

<210> 62
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 62

Ser Leu Leu Gly Lys Pro Gly Leu Thr Ile
1 5 10

<210> 63
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 63

Leu Ser Phe Lys Arg Ser Leu Ser Ile
1 5

<210> 64
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 64

Leu Leu Leu Ala Leu Arg Leu Ser Leu
1 5

<210> 65

<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 65

Ile Ala Ile Ser Gln Leu Thr Phe Val
1 5

<210> 66
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 66

Ile Leu Asn Glu Leu Leu Asn Ser Ile
1 5

<210> 67
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 67

Ala Leu Lys Glu Leu Met Gly Pro Ala
1 5

<210> 68
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 68

Lys Leu Leu Ala Asp Ala Phe Lys Val
1 5

<210> 69
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 69

Leu Leu Cys Pro Val Val Leu Gln Leu
1 5

<210> 70
<211> 9

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 70

Leu Leu Leu Gln Ile Glu Pro Ala Ala
1 5

<210> 71
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 71

Trp Leu Met Pro Val Met Pro Ala Leu
1 5

<210> 72
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 72

Tyr Leu Ser Phe Ile Lys Ile Leu Leu
1 5

<210> 73
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 73

Ser Thr Thr Ile Ile Asn Leu Ile Leu
1 5

<210> 74
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 74

Thr Leu Leu Ser Tyr Ser Ile Pro Leu
1 5

<210> 75
<211> 11
<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 75

Thr Thr Gln Glu Ala Glu Lys Leu Leu Glu Arg
1 5 10

<210> 76

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 76

Thr Glu Gln Gly Pro Thr Gly Val Thr Met
1 5 10

<210> 77

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 77

Val Pro Ala Gly Val Asp Val Ile Thr Glu Tyr
1 5 10

<210> 78

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 78

Gly Leu Leu Pro Pro Val Arg Ala Met
1 5

<210> 79

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 79

Lys Ile Gln Asp Pro Gly Thr Ala Phe
1 5

<210> 80

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 80

Arg Asp Gln Ile Val Thr Val Ser Val
1 5

<210> 81

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 81

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

<210> 82

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 82

Leu Ala Pro Gln Met Ile Ile Ala Leu
1 5

<210> 83

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 83

Lys Pro Arg Gly Pro Thr Pro Leu
1 5

<210> 84

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 84

Arg Leu Cys Pro Ala Ala Pro Ser Glu Lys
1 5 10

<210> 85

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 85

Val Tyr Leu Leu Thr Phe Pro Pro Leu
1 5

<210> 86

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 86

Leu Met Ile Gly Lys Arg Ile Leu
1 5

<210> 87

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 87

Leu Asn Leu Val Ser Glu Thr Glu Ala Met Val Lys
1 5 10

<210> 88

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 88

Asp Glu Gln Glu Thr Asp Ala Phe Leu Leu
1 5 10

<210> 89

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 89

Met Ile Phe Tyr Val Leu Gln Lys
1 5

<210> 90

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 90

Tyr Leu Arg Asp Phe Lys Ile Lys Arg
1 5

<210> 91
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 91

Ser Ser His Phe Ile Leu Val Thr Phe
1 5

<210> 92
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 92

Glu Leu Val Ala Val Thr Ser Val Leu
1 5

<210> 93
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 93

Trp Gln Lys Asn Ser Met Arg Leu
1 5

<210> 94
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 94

Met Gly Arg Arg Arg Asn Leu Tyr
1 5

<210> 95
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 95

Gln Val Lys Ile Val Thr Leu Leu
1 5

<210> 96
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 96

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

<210> 97
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 97

Gly Leu Ile Asp Asp Lys Gly Thr Ile Lys Leu
1 5 10

<210> 98
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 98

Ser Leu Met Glu Val Thr His Asp Leu
1 5

<210> 99
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 99

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

<210> 100
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 100

Ser Leu Gly Pro Pro Pro Val Gly Val

1 5

<210> 101
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 101

Lys Leu Pro Glu Gly His Leu Pro Glu Val
1 5 10

<210> 102
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 102

Gly Leu Asp Pro Thr Gln Phe Arg Val
1 5

<210> 103
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 103

Ser Leu Val Ser Tyr Leu Asp Lys Val
1 5

<210> 104
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 104

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

<210> 105
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 105

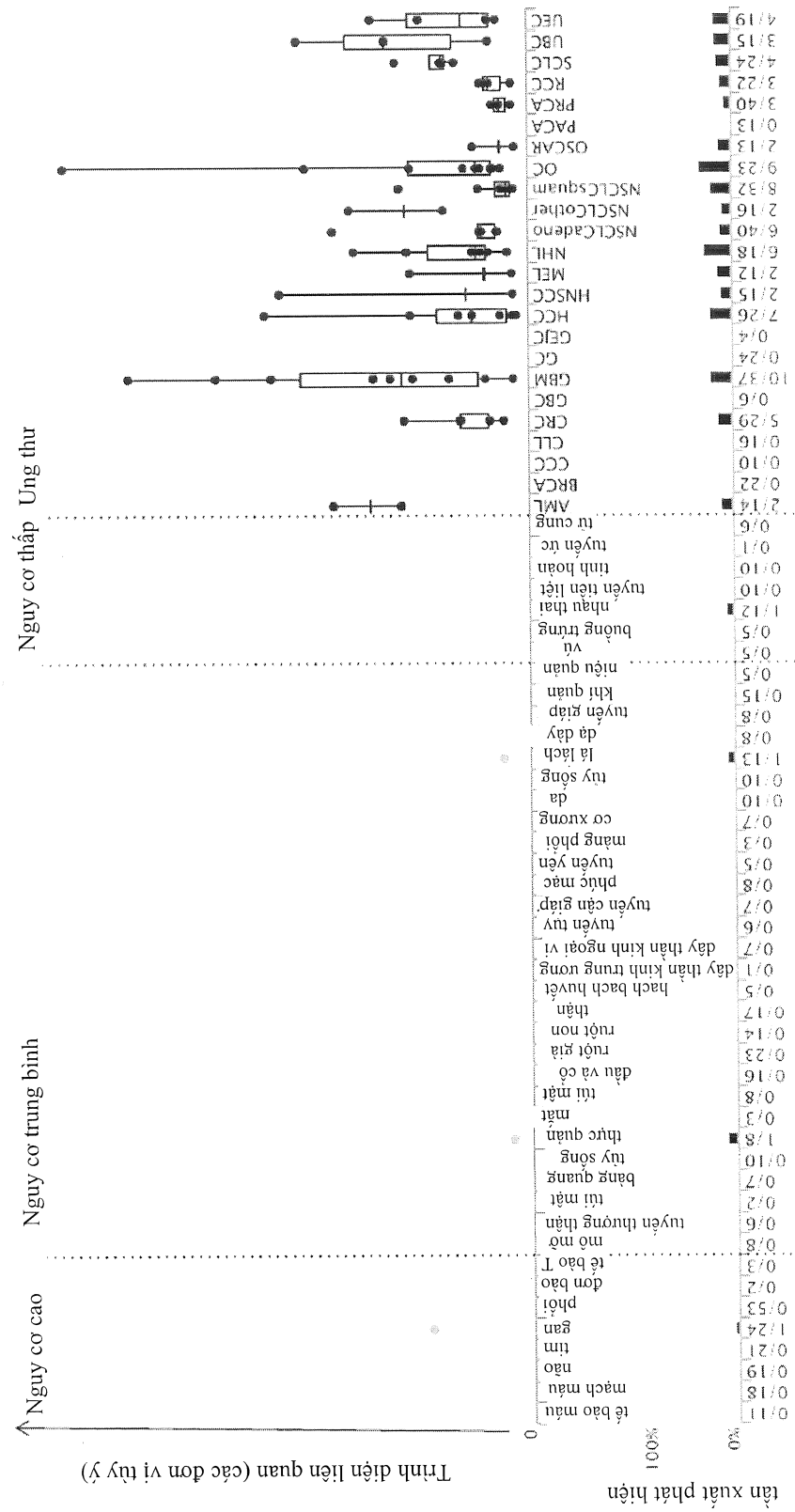
Tyr Leu Leu Pro Ala Ile Val His Ile
1 5

1/17

Fig. 1A

Peptit: KLLDFSTRI (A*02)

ID SEQ số: 1



2/17

Figure 1B

Peptit: ALLDVLVKL (A*02)

ID SEQ số: 2

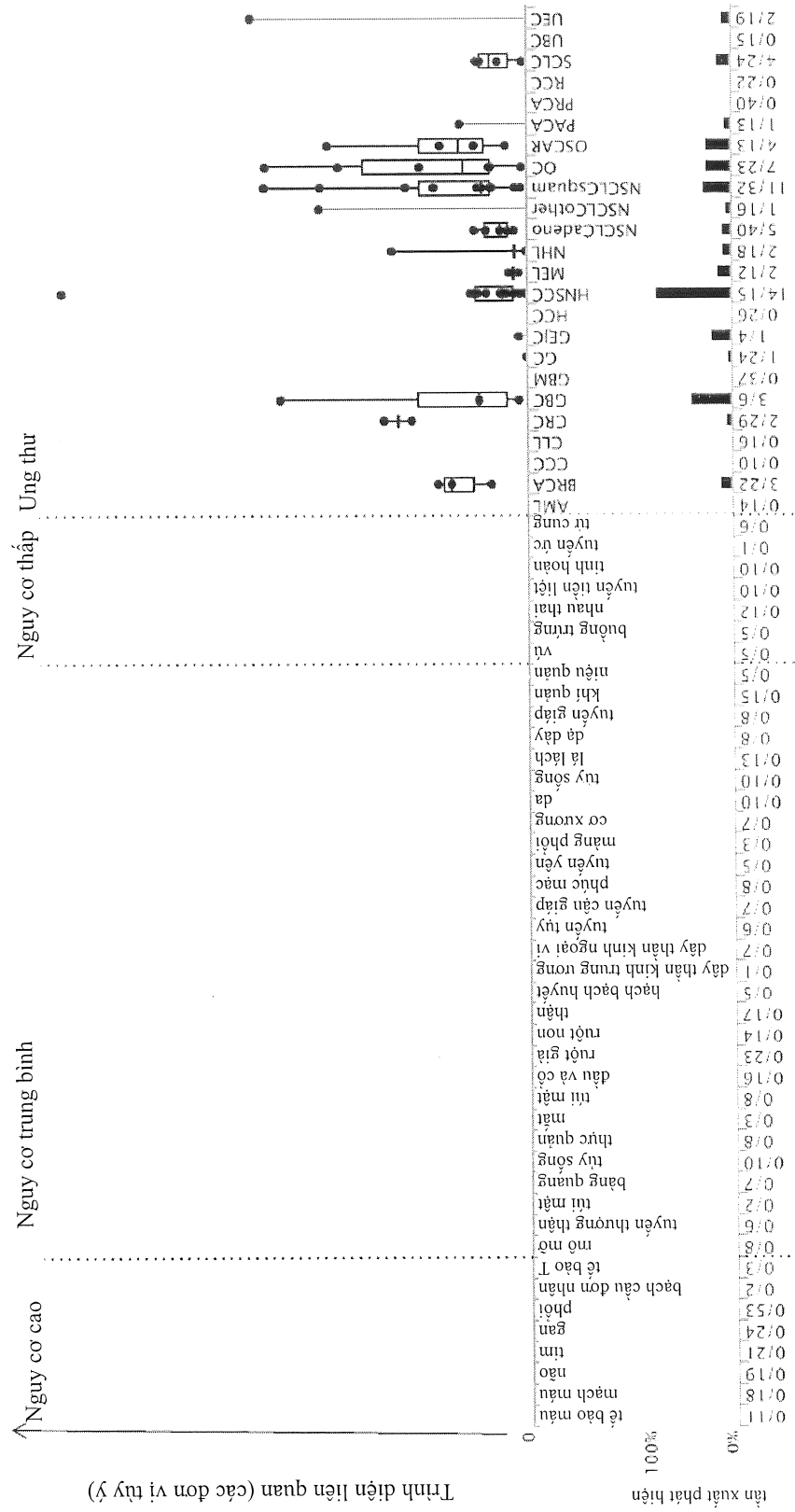
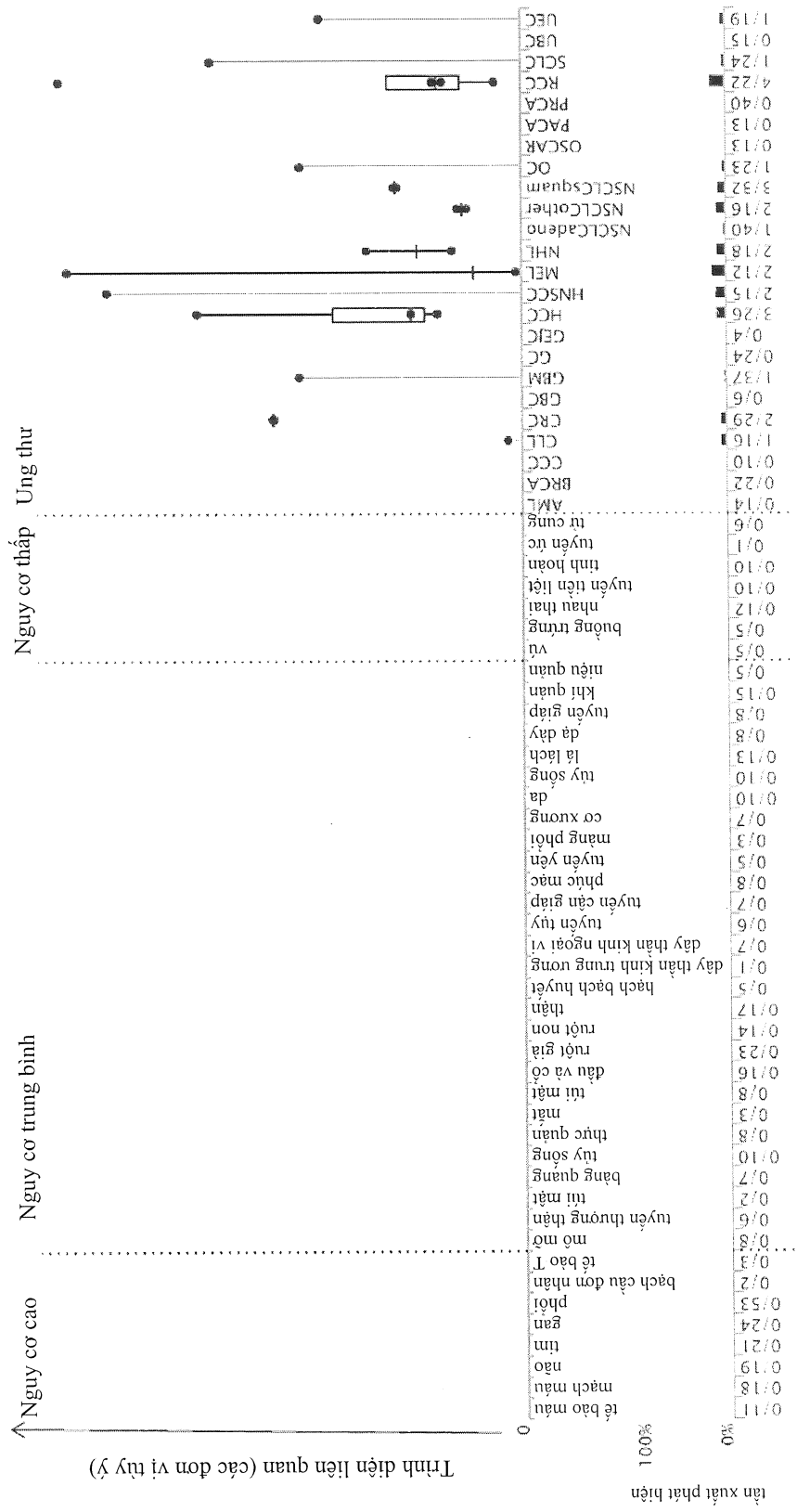


Figure 1C

Peptit: FLLVPSPIWQL (A*02)

ID SEQ số: 3

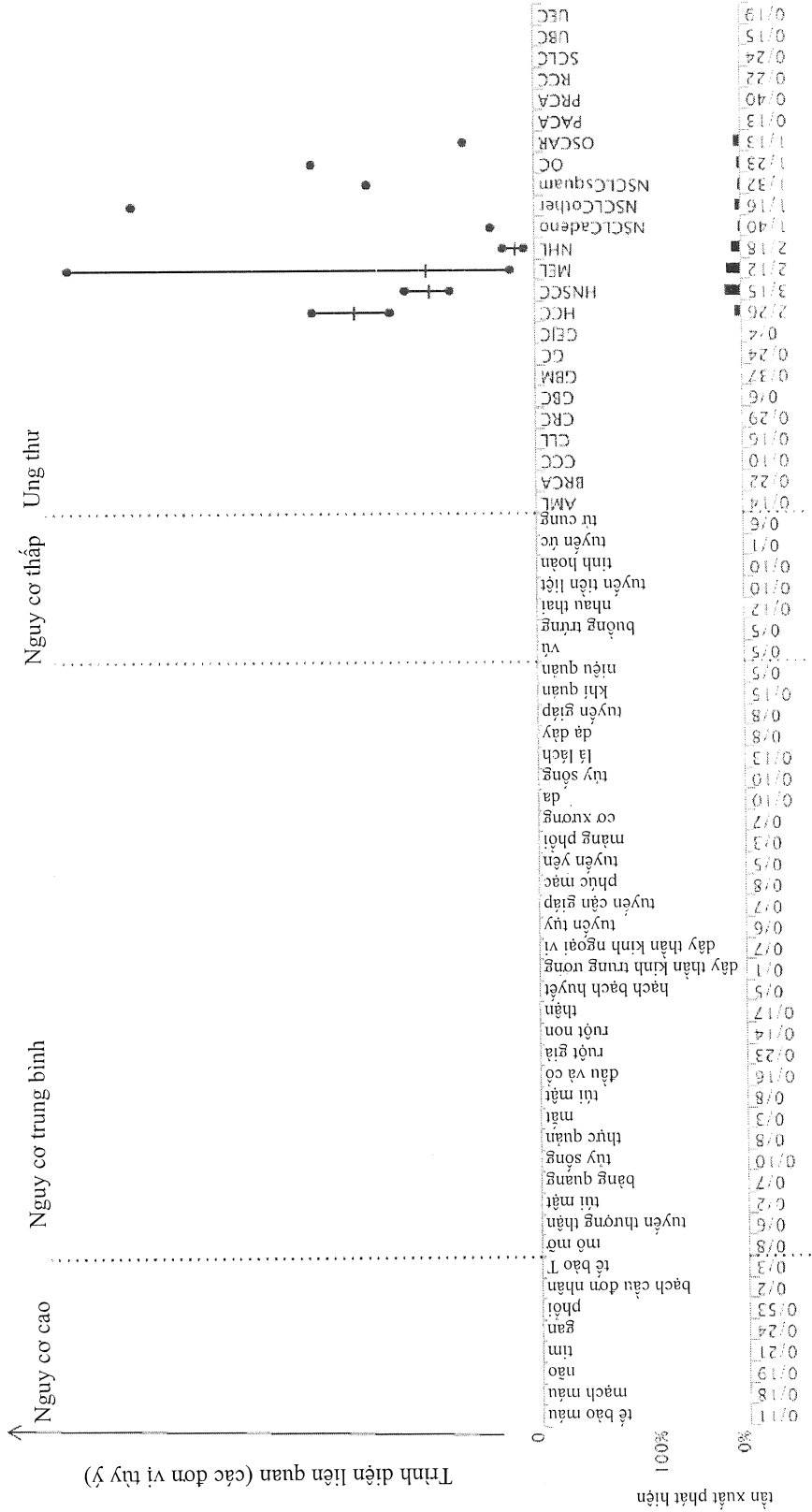


4/17

Figure 1D

Peptit: LVWEVVESV (A*02)

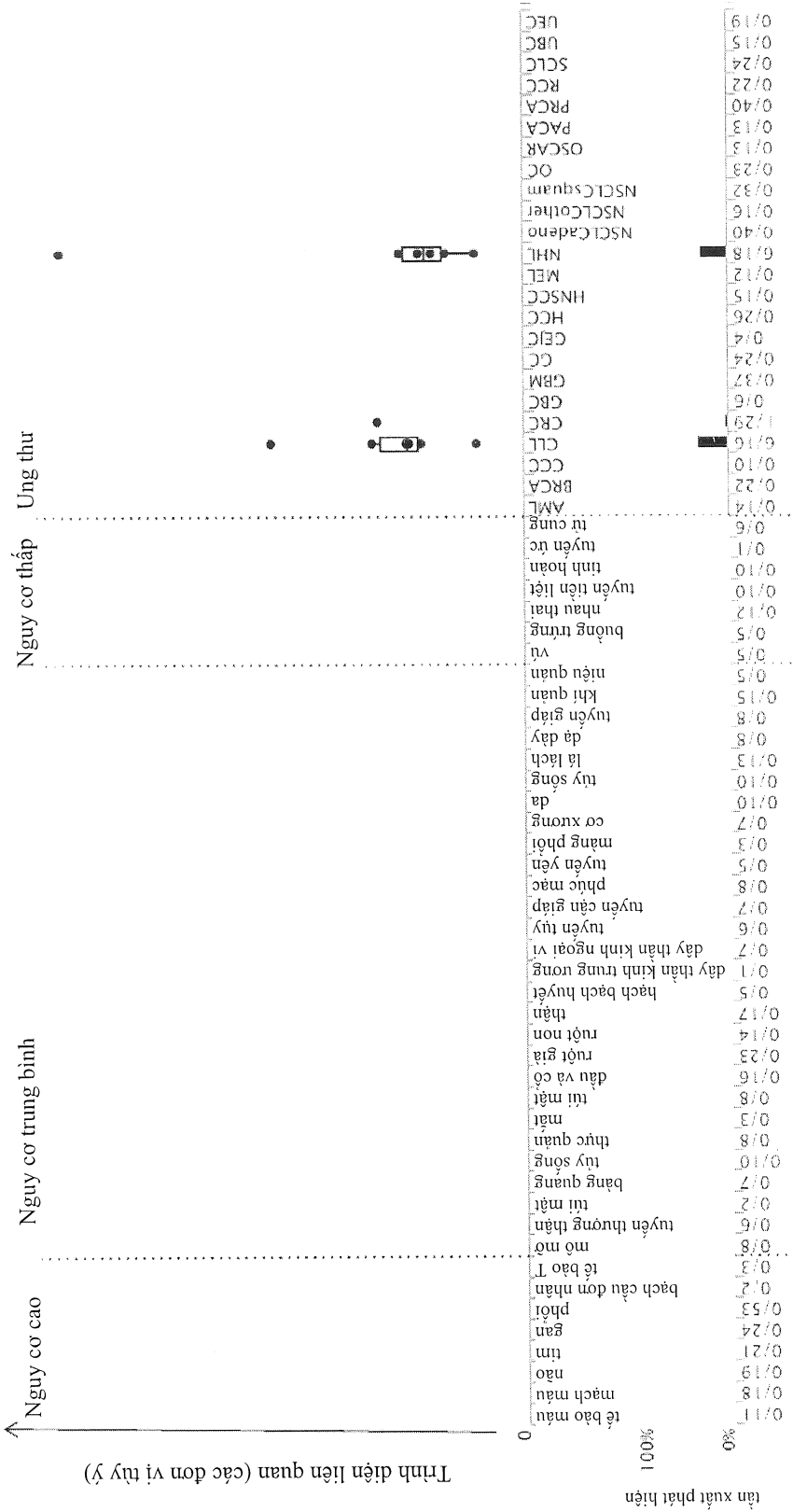
ID SEQ số: 5



5/17

Figure 1E

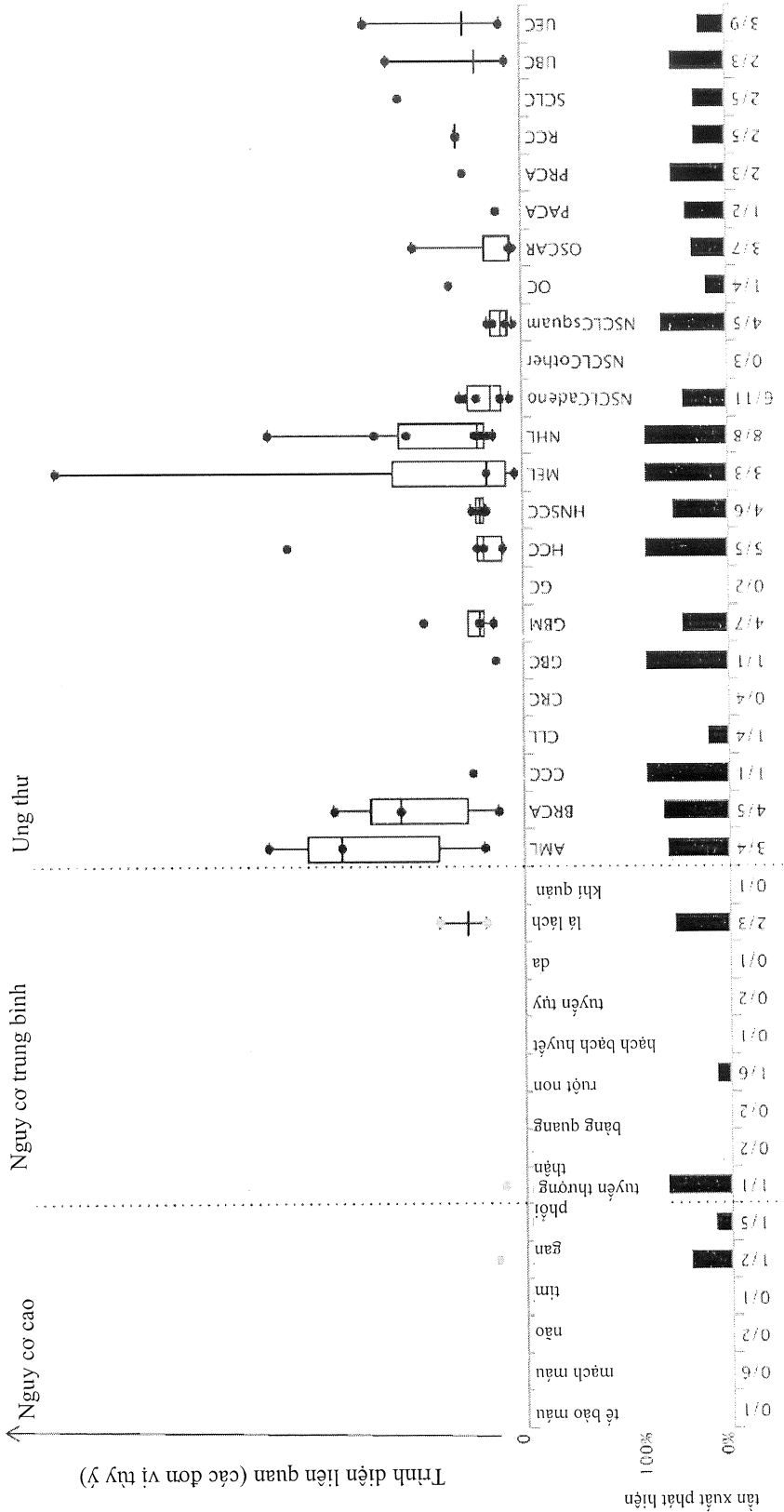
Peptit: SLLDKLSGI (A*02)
ID SEQ số: 10



6/17

Figure 1F

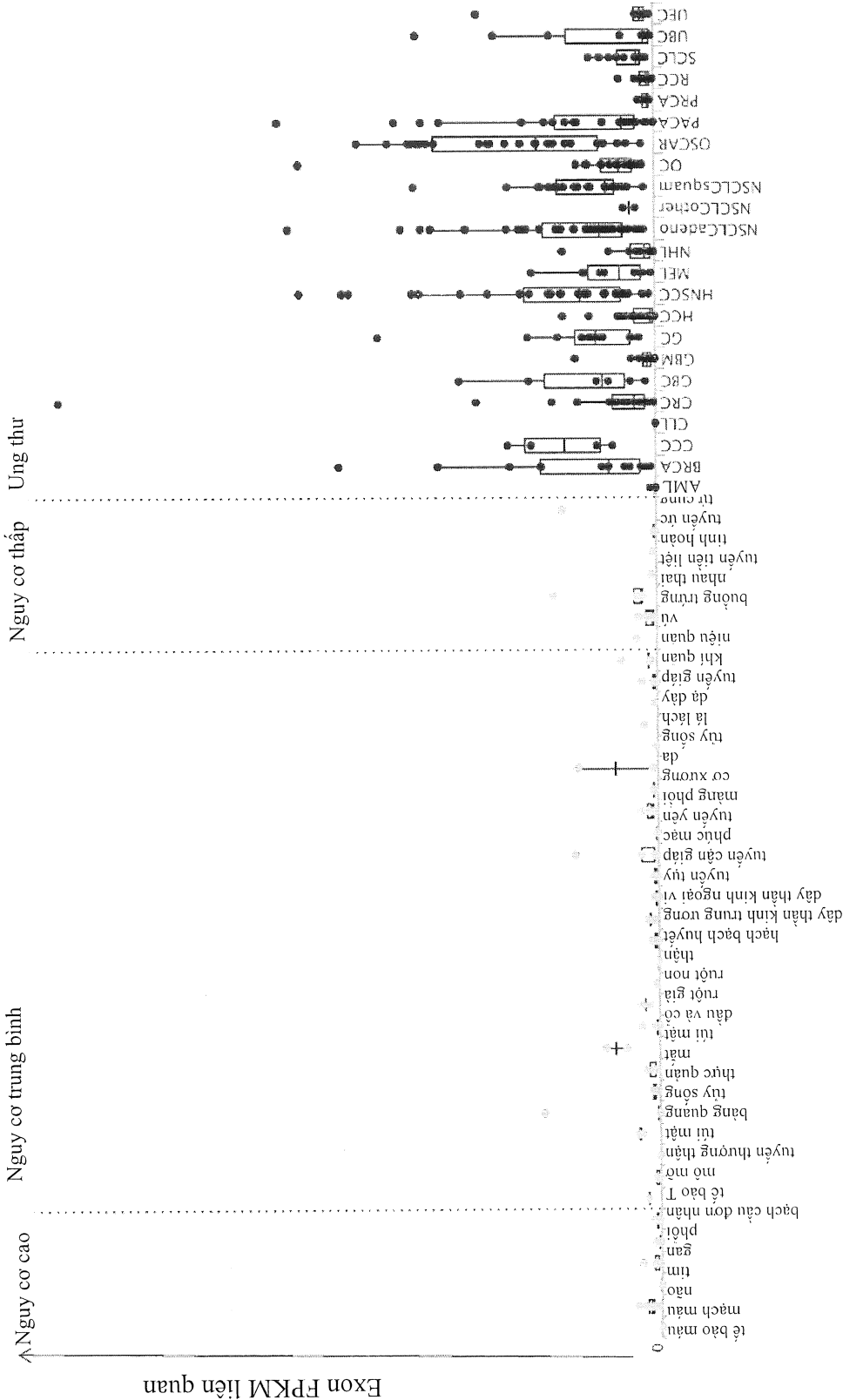
Peptit: SLLGAATVEPPK (A*03)
ID SEQ số: 81



7/17

Figure 2A

Ensembl ID: ENST00000225964
Peptit: ALLDVLVKL
ID SEQ số: 2



ID SEQ số: 10

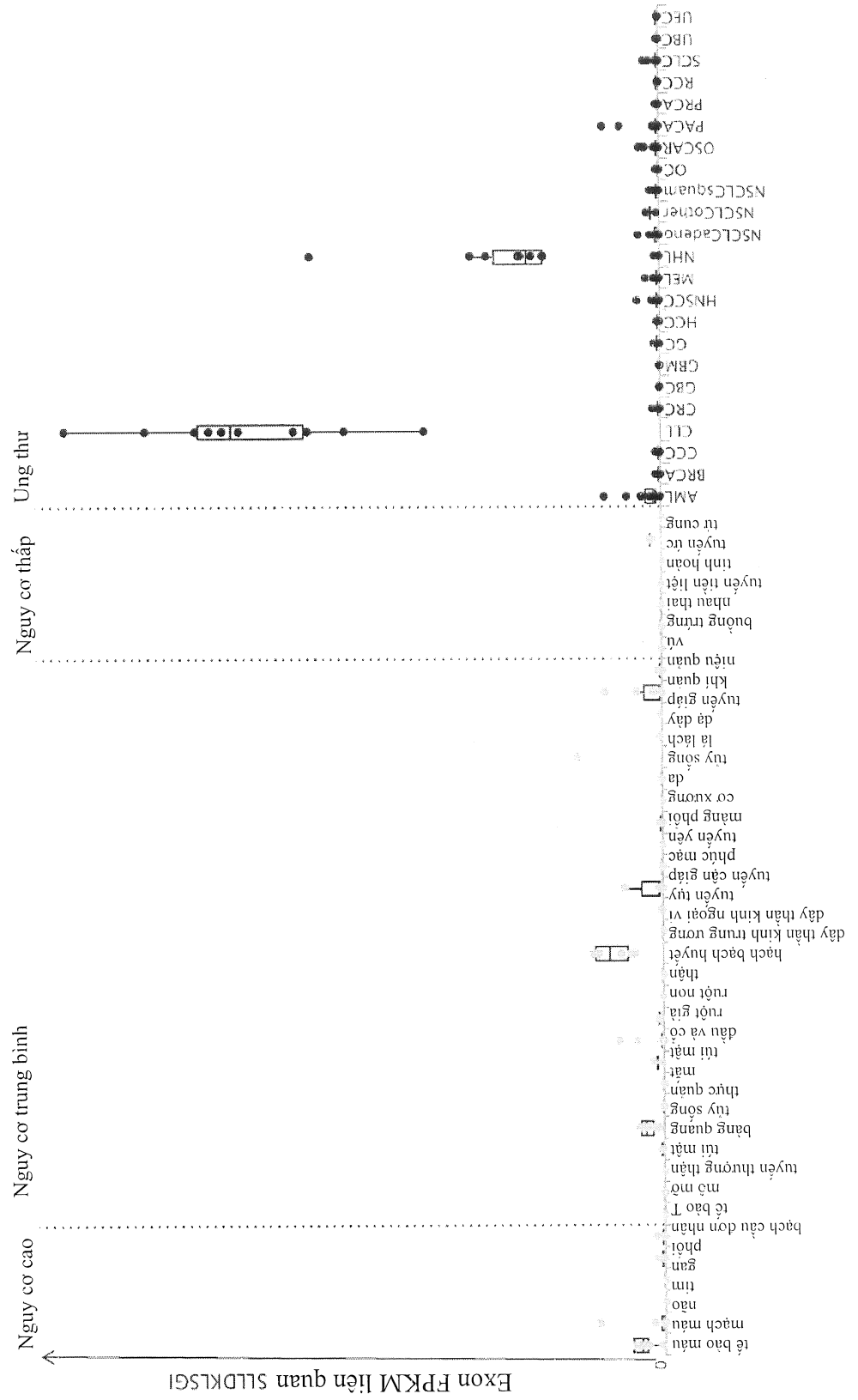


Figure 2C

Peptit: FASERPPSV

ID SEQ số: 33

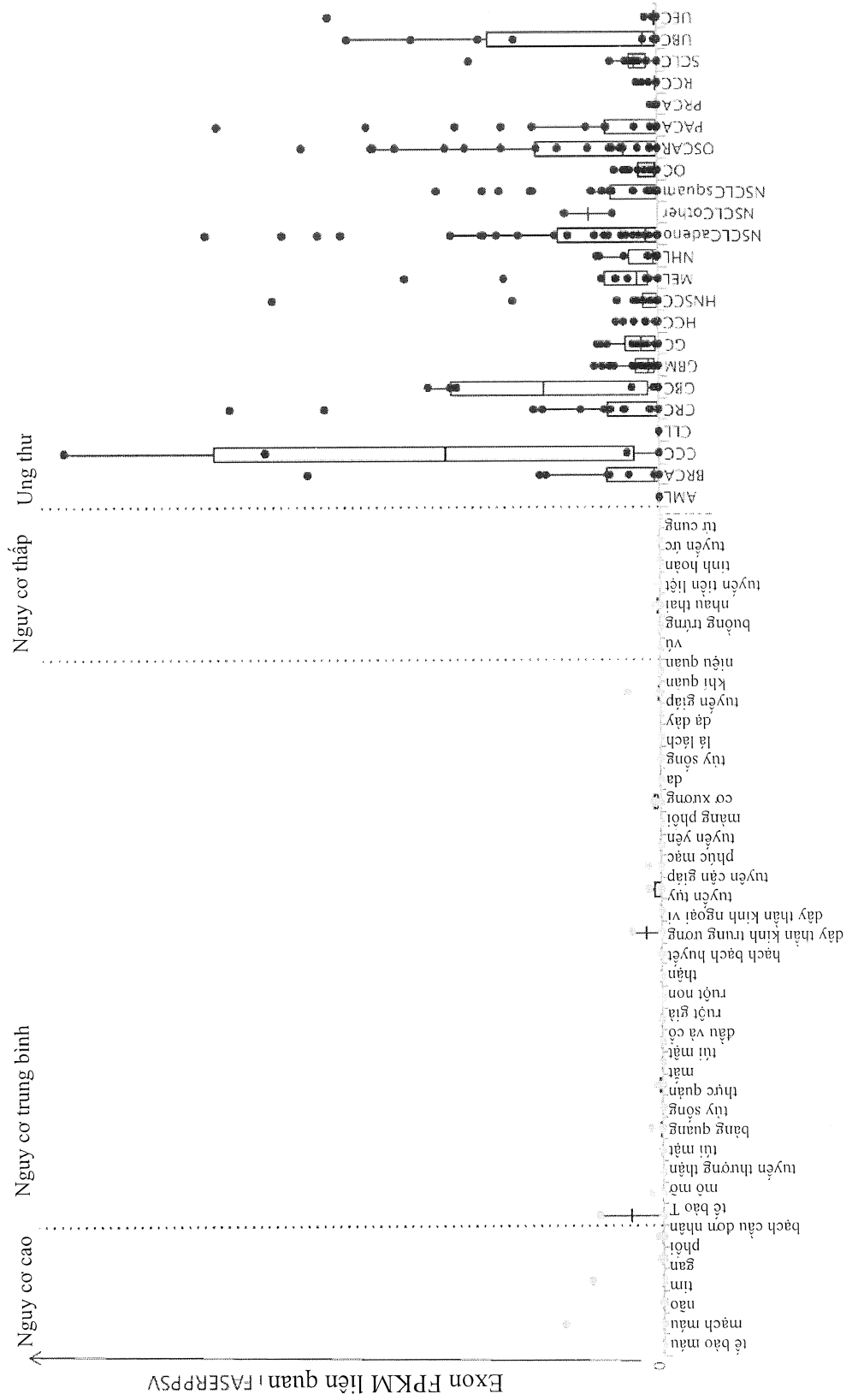
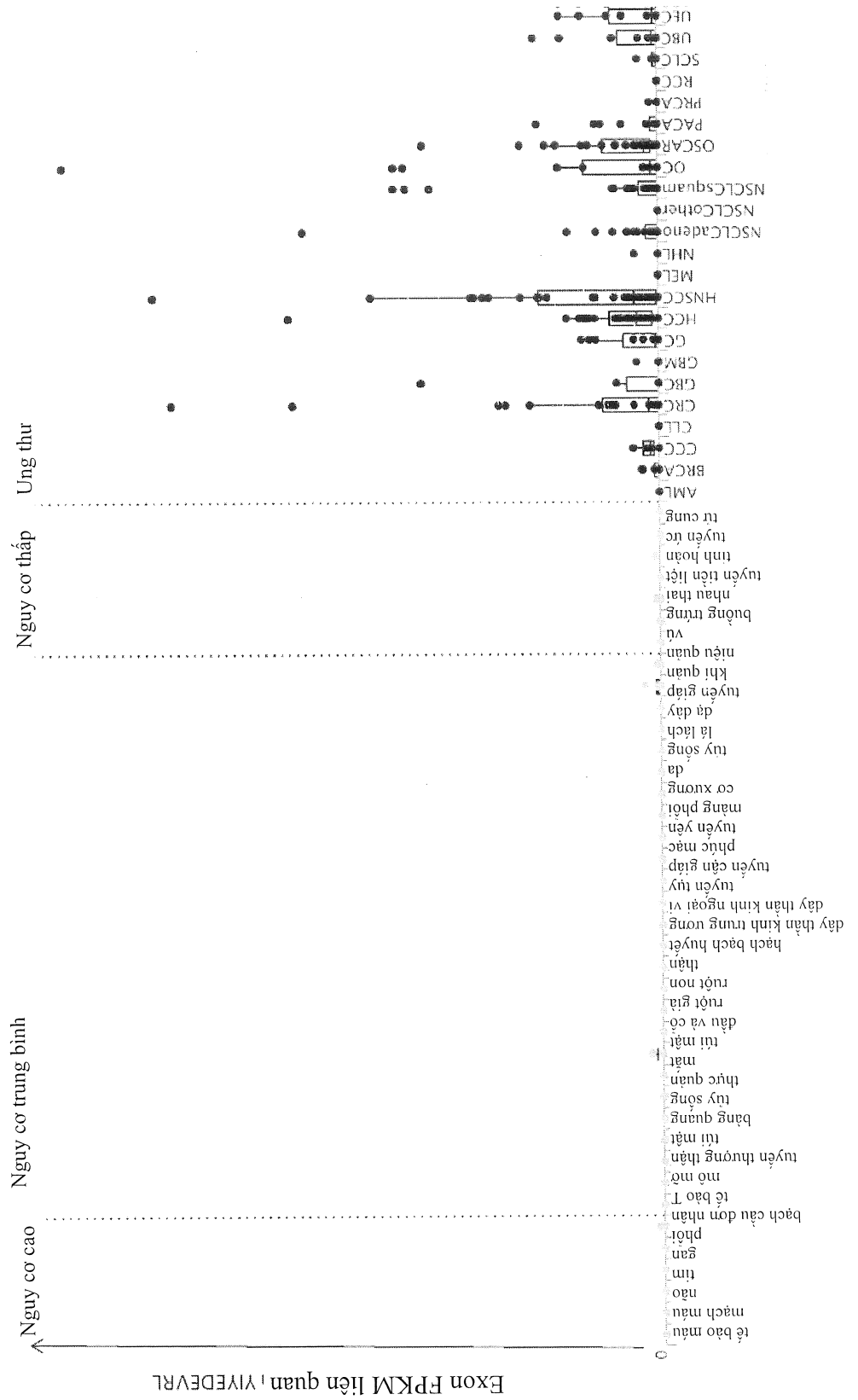


Figure 2D

Peptit: YIYEDVRL

ID SEQ số: 39



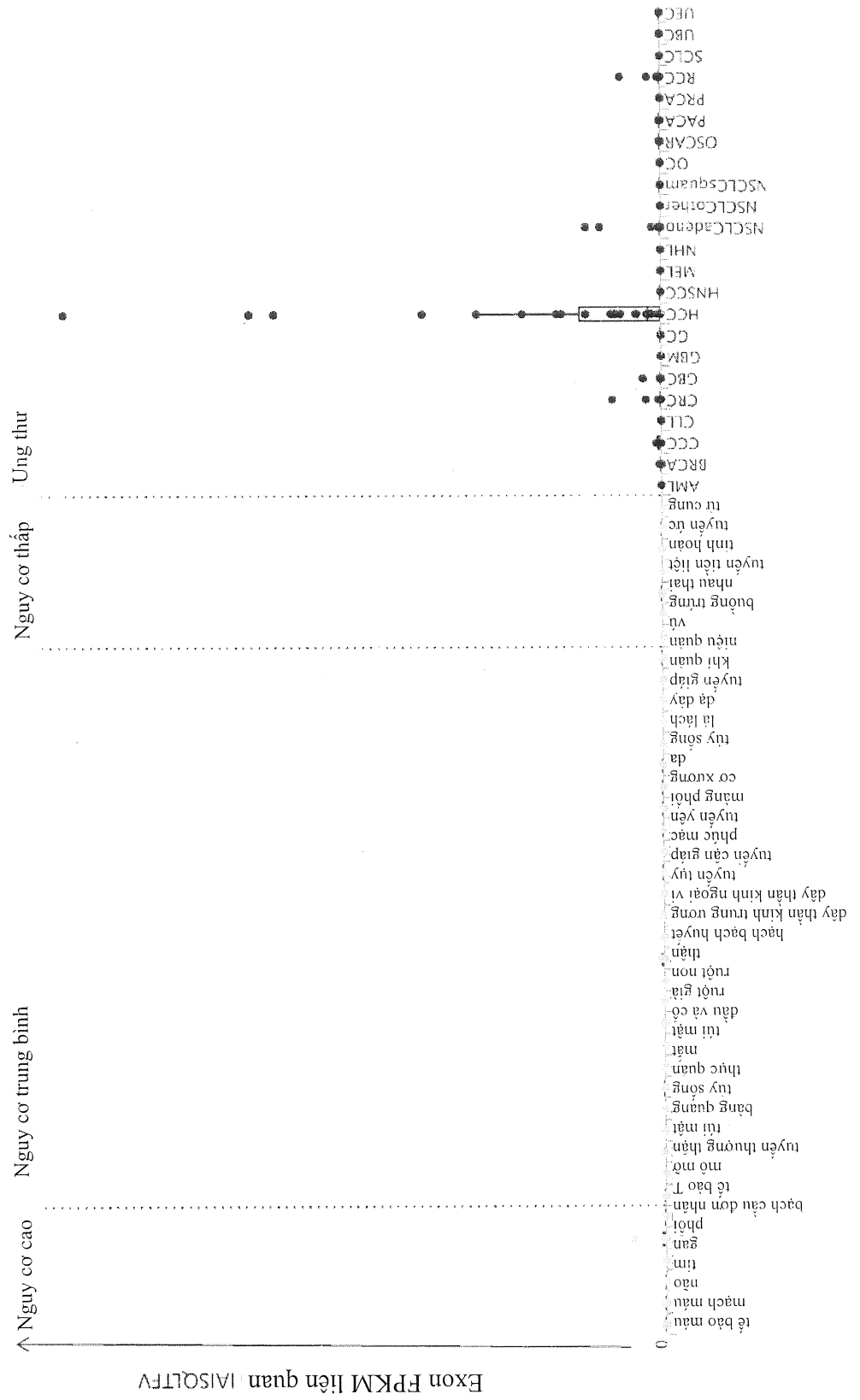
12/17

Figure 2F

Ensembl ID: ENST000000473984

Peptit: IAISQLTFV

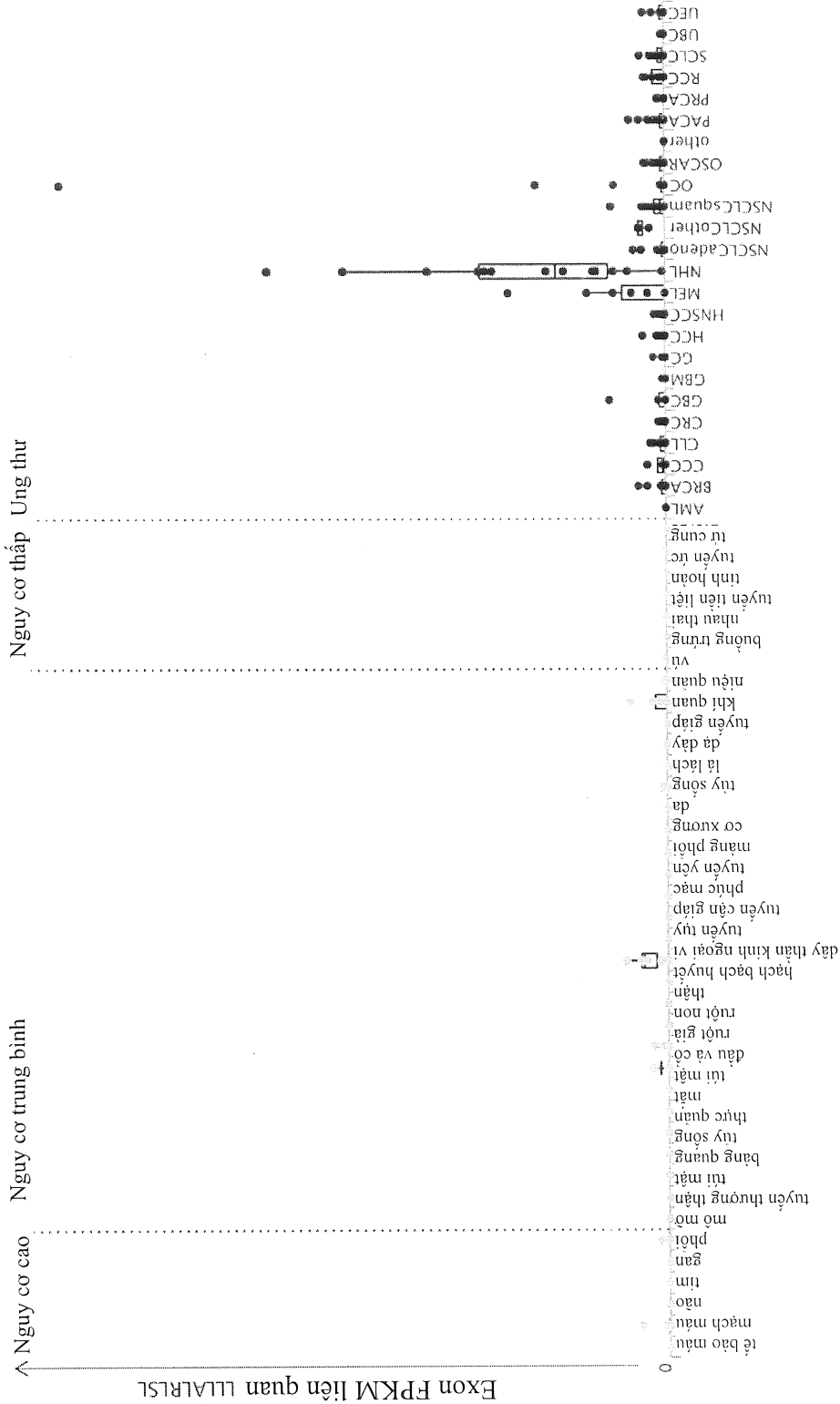
ID SEQ số: 65



13/17

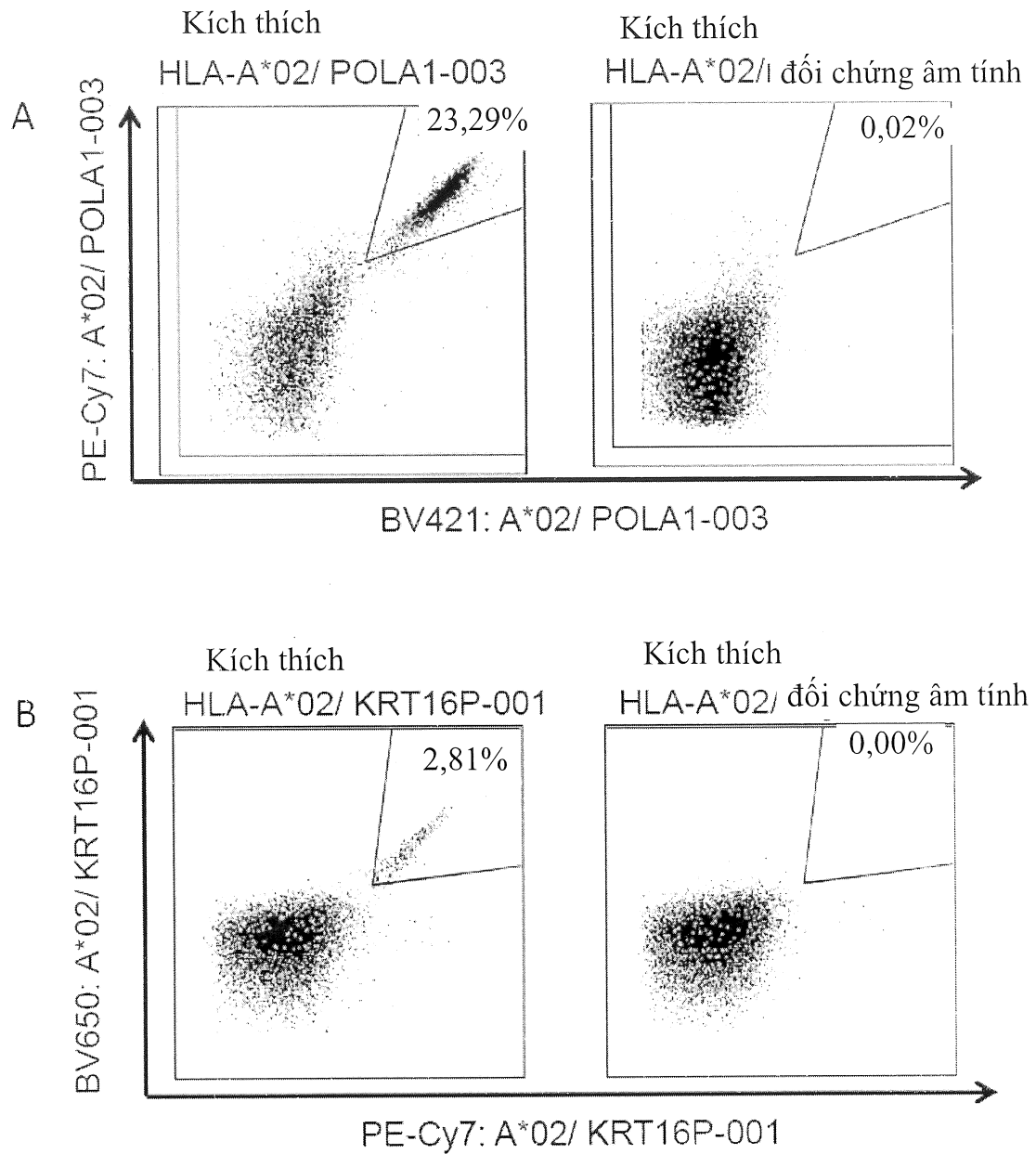
Figure 2G

Ensembl ID: ENST00000375105
Peptit: LLLALRLSL
ID SEQ số: 64



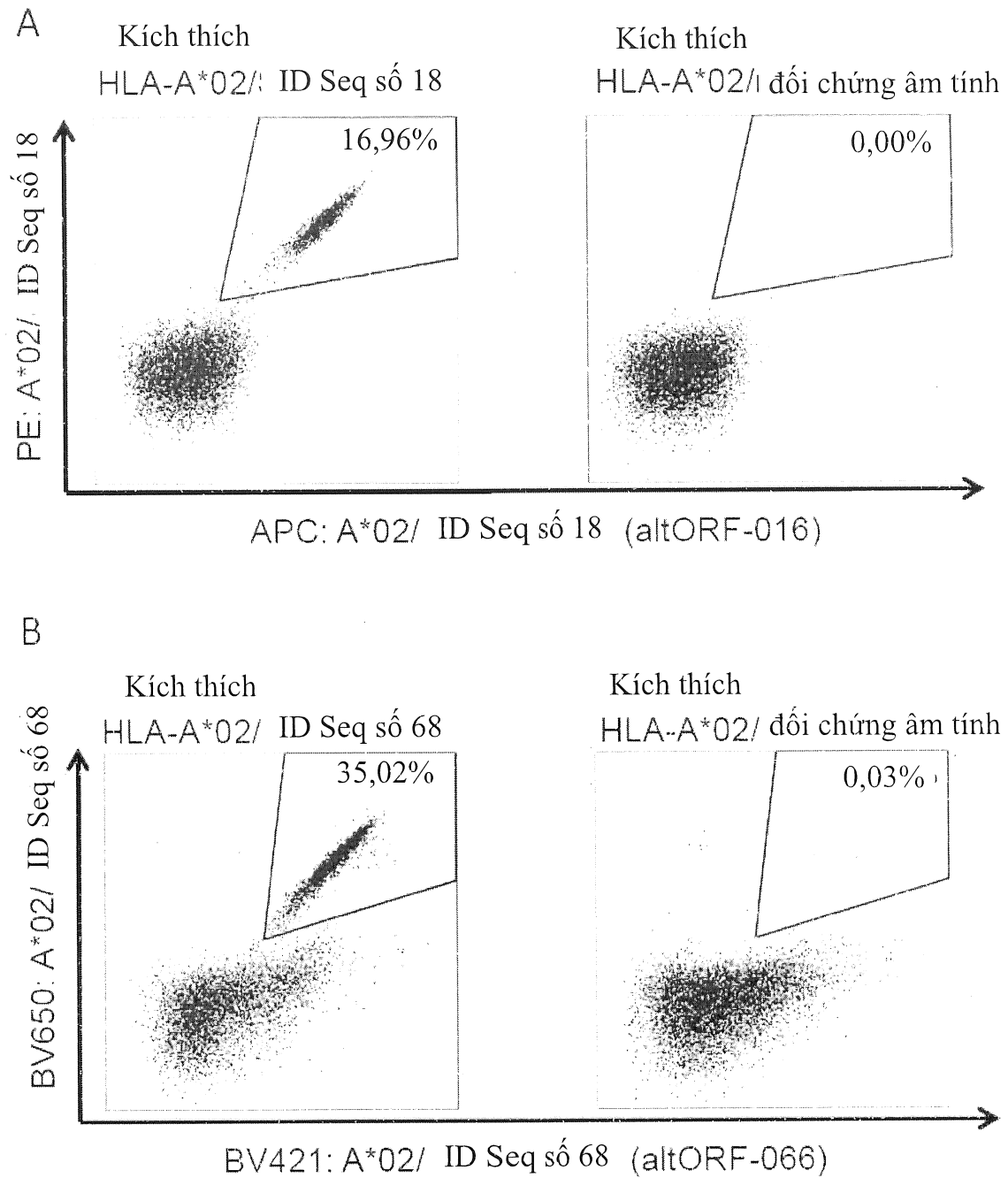
14/17

Figure 3



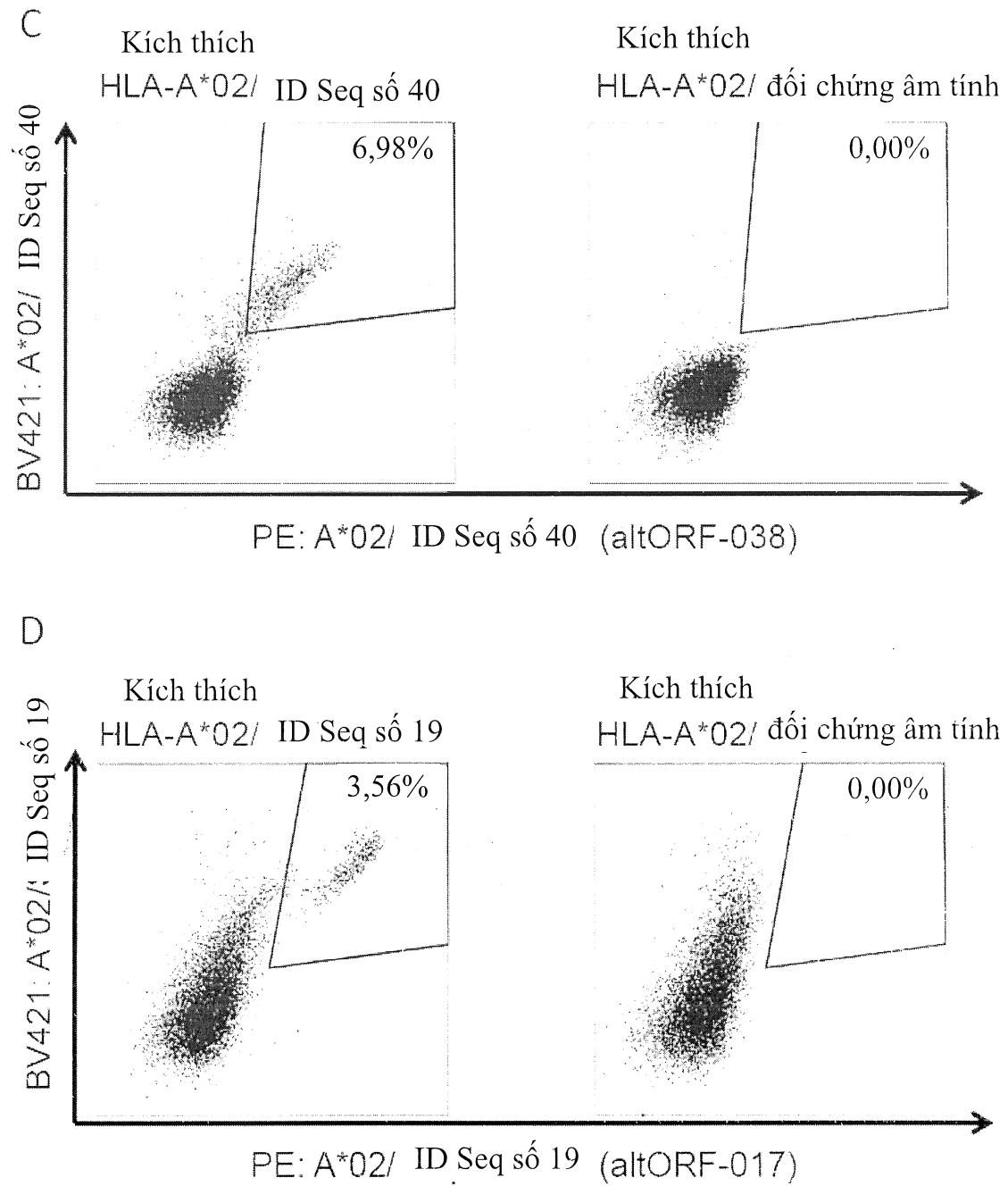
15/17

Figure 4



16/17

Figure 4 (tiếp theo)



17/17

Figure 4 (tiếp theo)

