



(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) 
1-0021834

(51)⁷ **C12N 15/09, 5/10, A61K 35/17, 48/00,**
A61P 35/00

(13) **B**

(21) 1-2017-01469

(22) 06.10.2015

(86) PCT/JP2015/005080 06.10.2015

(87) WO2016/056228 14.04.2016

(30) 2014-208200 09.10.2014 JP

(45) 25.10.2019 379

(43) 26.06.2017 351

(73) Yamaguchi University (JP)

1677-1 Yoshida, Yamaguchi-shi, Yamaguchi 7538511, Japan

(72) TAMADA, Koji (JP), SAKODA, Yukimi (JP), ADACHI, Keishi (JP)

(74) Công ty TNHH Tâm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) **VECTƠ BIỂU HIỆN THỤ THỂ CỦA KHÁNG NGUYÊN KHẢM (CAR) VÀ TẾ BÀO T BIỂU HIỆN THỤ THỂ CỦA KHÁNG NGUYÊN KHẢM NÀY**

(57) Sáng chế đề cập đến các tế bào T biểu hiện CAR mà biểu hiện đồng thời thụ thể của kháng nguyên khảm (CAR) và yếu tố tăng cường chức năng miễn dịch của tế bào T và có tác dụng kích thích miễn dịch và tác dụng chống khối u cao và đề xuất vectơ biểu hiện CAR để tạo ra các tế bào T biểu hiện CAR. Vectơ biểu hiện CAR này chứa axit nucleic mã hóa thụ thể của kháng nguyên khảm (CAR) và axit nucleic mã hóa yếu tố tăng cường chức năng miễn dịch của tế bào T, trong đó axit nucleic mã hóa yếu tố tăng cường chức năng miễn dịch là axit nucleic mã hóa interleukin-7 và axit nucleic mã hóa CCL19, axit nucleic mã hóa thể đột biến âm chiếm ưu thế của SHP-1 hoặc axit nucleic mã hóa thể đột biến âm chiếm ưu thế của SHP-2 hoặc tế bào T biểu hiện CAR được đưa vào vectơ biểu hiện CAR được tạo ra.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến vector biểu hiện thụ thể của kháng nguyên khảm (chimeric antigen receptor - CAR), tế bào T biểu hiện CAR được đưa vào bằng vector biểu hiện CAR và chất trị bệnh ung thư chứa tế bào T biểu hiện CAR.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Thụ thể của kháng nguyên khảm (sau đây, còn gọi là “CAR”) là protein khảm nhân tạo, trong đó kháng thể chuỗi đơn nhận diện kháng nguyên bề mặt tế bào trên tế bào ung thư được dung hợp với vùng truyền dẫn tín hiệu làm hoạt hóa tế bào T. Như được thể hiện trên Fig.1, việc chuyển gen mã hóa CAR vào tế bào T trong máu ngoại vi bình thường dạng không đáp ứng khối u (tế bào limphô T trong máu ngoại vi) cho phép tạo ra tế bào T biểu hiện CAR trên quy mô lớn (sau đây, đơn giản còn được gọi là “tế bào CAR-T”) có khả năng biểu hiện CAR. Tế bào CAR-T này có khả năng đáp ứng khối u và có thể gây tổn thương cho tế bào ung thư mà không phụ thuộc vào sự tương tác với Phức hợp tương thích mô chính (Major Histocompatibility Complex - MHC).

Liệu pháp miễn dịch điều trị bệnh ung thư bằng cách sử dụng tế bào CAR-T, cụ thể hơn, liệu pháp này liên quan đến việc thu thập các tế bào T từ bệnh nhân, chuyển gen mã hóa CAR vào các tế bào T này và chuyển lại các tế bào T vào bệnh nhân (xem tài liệu phi sáng chế 1) đang được thử nghiệm lâm sàng trên thế giới và đã thu được các kết quả cho thấy liệu pháp này hiệu quả đối với, ví dụ, khối u ác tính trú tại cơ quan sinh huyết, như bệnh bạch cầu hoặc u limphô.

Trong những năm gần đây, nhiều nghiên cứu đã được thực hiện trên các tế bào CAR-T khác nhau. Ví dụ, được phẩm chứa các tế bào T tự thân được cải tiến của người đã được đề xuất chứa axit nucleic mã hóa CAR gồm vùng liên kết kháng nguyên CD19, vùng xuyên màng, vùng tín hiệu đồng kích thích 4-1BB và vùng tín

hiệu CD3 ζ (xem tài liệu sáng chế 1), một hoặc nhiều quần thể tế bào T biểu hiện (AT-CAR) thụ thể của kháng nguyên khảm không gắn nhãn có tác dụng trị liệu được sử dụng một cách đồng thời hoặc riêng biệt với chế phẩm chứa một hoặc nhiều protein đã gắn nhãn liên kết với các tế bào ung thư cho đối tượng, trong đó các quần thể tế bào T biểu hiện AT-CAR liên kết với protein đã gắn nhãn và gây chết tế bào ung thư (xem tài liệu sáng chế 2), các tế bào chứa axit nucleic mã hóa thụ thể của kháng nguyên khảm chứa miền liên kết kháng nguyên của kháng thể của người 139, miền bản lề ngoại bào, miền xuyên màng và miền truyền tín hiệu tế bào T nội bào (xem tài liệu sáng chế 3), các tế bào có trình tự axit nucleic mã hóa thụ thể của kháng nguyên khảm, trong đó thụ thể của kháng nguyên khảm chứa miền truyền tín hiệu CD3 ζ chứa miền liên kết kháng nguyên, miền xuyên màng, vùng truyền dẫn tín hiệu đồng kích thích và trình tự axit amin là SEQ ID NO:24 (xem tài liệu sáng chế 4), các tế bào T đặc hiệu CD19 được thiết kế di truyền biểu hiện và giữ lại thụ thể khảm đặc hiệu CD19 trên màng bề mặt tế bào của chúng, trong đó thụ thể khảm chứa miền tín hiệu nội bào để thực hiện các chức năng tác động tế bào miễn dịch, ít nhất một miền xuyên màng và ít nhất một miền ngoại bào và miền ngoại bào chứa thụ thể đặc hiệu CD19 (xem tài liệu sáng chế 5) và các tế bào biểu hiện thụ thể của kháng nguyên khảm chứa axit nucleic mã hóa thụ thể của kháng nguyên khảm chứa, là miền nội bào, miền nội bào của thụ thể yếu tố hoại tử u được kích thích bởi glucocorticoid (GITR) (xem tài liệu sáng chế 6).

Tuy nhiên, chưa có giải pháp nào nêu trên giải quyết được vấn đề về tỷ lệ sống thấp của các tế bào CAR-T *in vivo* hoặc việc hoạt hóa không đủ của các tế bào T nội sinh được kích thích bằng các tế bào CAR-T hoặc việc tích lũy khu trú không đủ lượng các tế bào T nêu trên tại khối u hoặc các vấn đề về các tín hiệu ức chế miễn dịch được điều chỉnh bằng con đường PD-L1/PD-1, một cơ chế thoát khỏi hệ miễn dịch khối u của các tế bào ung thư và việc ức chế hoạt động của các tế bào CAR-T bằng các yếu tố ức chế miễn dịch như TGF- β hoặc IL-10 được tiết ra trong vi môi trường ung thư. Do đó, vẫn tồn tại các loại bệnh hoặc các trường hợp bị bệnh ung thư

mà chưa đạt được điều trị hiệu quả thích hợp. Do đó, cần tạo ra các tế bào CAR-T hiệu quả hơn và vector biểu hiện dùng để tạo ra các tế bào CAR-T.

Các tài liệu đã biết

Các tài liệu sáng chế:

Tài liệu sáng chế 1: Công bố đơn yêu cầu cấp patent Hoa Kỳ số 2014/0106449

Tài liệu sáng chế 2: Công bố đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản chưa xét nghiệm (bản dịch của đơn PCT) số 2014-504294

Tài liệu sáng chế 3: Công bố đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản chưa xét nghiệm (bản dịch của đơn PCT) số 2014-516510

Tài liệu sáng chế 4: Công bố đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản chưa xét nghiệm (bản dịch của đơn PCT) số 2014-507118

Tài liệu sáng chế 5: Công bố đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản chưa xét nghiệm số 2011-004749

Tài liệu sáng chế 6: Công bố quốc tế số WO 2013/051718

Các tài liệu khác:

Tài liệu 1: Yozo Nakazawa, The Shinshu Medical Journal, 61 (4): 197-203 (2013)

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề cần được sáng chế giải quyết

Các tế bào CAR-T thông thường được thiết kế để tăng cường khả năng hoạt hóa các tế bào T bằng cách chứa CD28, 4-1BB, CD3ζ hoặc các miền tương tự trong vùng truyền dẫn tín hiệu của CAR. Tuy nhiên, các tế bào CAR-T thông thường không đủ khả năng tác dụng kích thích miễn dịch của các tế bào CAR-T lên các tế bào T nội sinh hoặc kháng lại cơ chế ức chế miễn dịch của vi môi trường của khối u. Các tế bào CAR-T này không đạt được hiệu quả trị liệu trên các khối u rắn. Theo đó, mục đích

của sáng chế là tạo ra các tế bào CAR-T đồng biểu hiện CAR và yếu tố tăng cường chức năng miễn dịch của tế bào T và có tác dụng kích thích miễn dịch và tác dụng chống khối u cao và tạo ra vector biểu hiện CAR để tạo ra các tế bào CAR-T.

Phương tiện để giải quyết vấn đề

Các tác giả sáng chế đã cố gắng cải thiện các tế bào CAR-T nhằm mục đích đạt được tác dụng kích thích miễn dịch tốt hơn hoặc tác dụng chống khối u trong liệu pháp miễn dịch điều trị bệnh ung thư sử dụng các tế bào CAR-T. Trong quá trình đó, các tác giả sáng chế tập trung vào các xytokin, các chemokin và các protein điều hòa tín hiệu là các yếu tố tăng cường chức năng miễn dịch của các tế bào T và xây dựng vector để đồng biểu hiện CAR và các yếu tố tăng cường chức năng miễn dịch của các tế bào T. Như kết quả của chuyển vector biểu hiện vào các tế bào T, các tác giả sáng chế đã phát hiện ra các tế bào CAR-T vượt trội về tác dụng kích thích miễn dịch và tác dụng chống khối u so với các tế bào CAR-T thông thường có thể được tạo ra và nhờ đó hoàn thiện sáng chế.

Cụ thể, sáng chế được bộc lộ như dưới đây:

(1) Vector biểu hiện CAR chứa axit nucleic mã hóa thụ thể của kháng nguyên khảm (CAR) và axit nucleic mã hóa yếu tố tăng cường chức năng miễn dịch của tế bào T, trong đó axit nucleic mã hóa yếu tố tăng cường chức năng miễn dịch là axit nucleic mã hóa interleukin-7 và axit nucleic mã hóa CCL19, axit nucleic mã hóa thể đột biến âm chiếm ưu thế của SHP-1 hoặc axit nucleic mã hóa thể đột biến âm chiếm ưu thế của SHP-2.

(2) Vector biểu hiện CAR theo mục (1), trong đó axit nucleic mã hóa yếu tố tăng cường chức năng miễn dịch là axit nucleic mã hóa interleukin-7 và axit nucleic mã hóa CCL19.

(3) Vector biểu hiện CAR theo mục (2), trong đó axit nucleic mã hóa CAR và axit nucleic mã hóa yếu tố tăng cường chức năng miễn dịch của tế bào T được liên kết bằng trình tự mã hóa peptit tự phân cắt.

(4) Vector biểu hiện CAR theo mục (2) hoặc (3), trong đó axit nucleic mã hóa interleukin-7 và axit nucleic mã hóa CCL19 được liên kết bằng trình tự mã hóa peptit tự phân cắt.

(5) Vector biểu hiện CAR theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (4), trong đó axit nucleic mã hóa CAR chứa axit nucleic mã hóa polypeptit của kháng thể chuỗi đơn nhận diện FITC hoặc CD20.

(6) Vector biểu hiện CAR theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (5), trong đó axit nucleic mã hóa CAR chứa axit nucleic mã hóa polypeptit của vùng xuyên màng CD8.

(7) Vector biểu hiện CAR theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (6), trong đó axit nucleic mã hóa CAR chứa các axit nucleic mã hóa polypeptit của vùng nội bào CD28, vùng nội bào 4-1BB và vùng nội bào CD3ζ.

(8) Tế bào T biểu hiện CAR được đưa vào vector (a) hoặc (b) sau:

(a) vector biểu hiện CAR theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (7);

(b) vector biểu hiện CAR chứa axit nucleic mã hóa CAR và axit nucleic mã hóa interleukin-7 và vector biểu hiện CAR chứa axit nucleic mã hóa CAR và axit nucleic mã hóa CCL19.

(9) Chất trị bệnh ung thư chứa tế bào T biểu hiện CAR theo mục (8) và phụ gia được dùng.

Hiệu quả của sáng chế

Sử dụng vector biểu hiện CAR theo sáng chế cho phép tạo ra tế bào CAR-T có tất cả các khả năng sống, khả năng tích lũy các tế bào limphô và hoạt tính gây độc tế bào kháng lại tế bào khối u và tế bào CAR-T có khả năng chịu ức chế miễn dịch trong vi môi trường ung thư. Liệu pháp miễn dịch cho bệnh nhân ung thư sử dụng tế bào CAR-T được mong đợi là tạo ra hiệu quả trị liệu cao với ung thư và có thể đóng

vai trò là liệu pháp miễn dịch điều trị bệnh ung thư hiệu quả ngay cả cho bệnh ung thư khó chữa hoặc bệnh ung thư nặng dần lên.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 là sơ đồ thể hiện cấu trúc của CAR và hệ thống cơ bản của liệu pháp miễn dịch điều trị bệnh ung thư sử dụng các tế bào CAR-T.

Fig.2 là sơ đồ thể hiện vector biểu hiện CAR, interleukin-7 (IL-7) và CCL19.

Fig.3 là sơ đồ thể hiện các kết quả-1 của thử nghiệm xác nhận mức độ biểu hiện CAR trong các tế bào T biểu hiện CAR-IL-7/CCL19 kháng FITC bằng phân tích tế bào dòng chảy. Biểu đồ bên trái thể hiện mẫu CAR không được nhuộm và biểu đồ bên phải thể hiện mẫu CAR được nhuộm.

Fig.4 là sơ đồ thể hiện các kết quả-2 của thử nghiệm xác nhận mức độ biểu hiện CAR trong các tế bào T biểu hiện CAR-IL-7/CCL19 kháng FITC bằng phân tích tế bào dòng chảy.

Fig.5 là sơ đồ thể hiện các kết quả thử nghiệm xác nhận mức độ biểu hiện CAR trong các tế bào T biểu hiện CAR-IL-7/CCL19 kháng CD20 của người bằng phân tích tế bào dòng chảy.

Fig.6 là sơ đồ thể hiện các kết quả-1 của thử nghiệm đo hàm lượng của IL-7 và CCL19 trong dịch nội tế bào của các tế bào T biểu hiện CAR-IL-7/CCL19 kháng FITC bằng ELISA.

Fig.7 là sơ đồ thể hiện các kết quả-2 của thử nghiệm đo hàm lượng của IL-7 và CCL19 trong dịch nội tế bào của các tế bào T biểu hiện CAR-IL-7/CCL19 kháng FITC bằng ELISA.

Fig.8 là sơ đồ thể hiện các kết quả của thử nghiệm đo hàm lượng của IL-7 và CCL19 trong dịch nội tế bào của các tế bào T biểu hiện CAR-IL-7/CCL19 kháng CD20 của người bằng ELISA.

Fig.9 là sơ đồ thể hiện số lượng tế bào của các tế bào T biểu hiện CAR-IL-7/CCL19 kháng FITC được kích thích và nuôi cấy trong 3 ngày, 5 ngày hoặc 7 ngày.

Fig.10 là sơ đồ thể hiện tỷ lệ sống của các tế bào T biểu hiện CAR-IL-7/CCL19 kháng FITC được kích thích và nuôi cấy trong 3 ngày, 5 ngày hoặc 7 ngày.

Fig.11 là sơ đồ thể hiện số lượng tế bào của các tế bào T biểu hiện CAR-IL-7/CCL19 kháng CD20 của người được kích thích và nuôi cấy trong 5 ngày.

Fig.12 là sơ đồ thể hiện các kết quả-1 của thử nghiệm sự di chuyển của tế bào T sử dụng các tế bào T biểu hiện CAR-IL-7/CCL19 kháng FITC.

Fig.13 là sơ đồ thể hiện các kết quả-2 của thử nghiệm sự di chuyển của tế bào T sử dụng các tế bào T biểu hiện CAR-IL-7/CCL19 kháng FITC.

Fig.14 là sơ đồ thể hiện các kết quả thử nghiệm sự di chuyển của tế bào đuôi gai sử dụng các tế bào T biểu hiện CAR-IL-7/CCL19 kháng FITC.

Fig.15 là sơ đồ thể hiện các kết quả thử nghiệm sự di chuyển của tế bào T sử dụng các tế bào T biểu hiện CAR-IL-7/CCL19 kháng CD20 của người.

Fig.16 là sơ đồ thể hiện các kết quả thử nghiệm kiểm tra tiềm năng tăng sinh của tế bào T của các tế bào T biểu hiện CAR-IL-7/CCL19 kháng FITC (ngày 5 sau kích thích).

Fig.17 là sơ đồ thể hiện các kết quả thử nghiệm kiểm tra tiềm năng tăng sinh của tế bào T của các tế bào T biểu hiện CAR-IL-7/CCL19 kháng FITC (các ngày 3 và 7 sau kích thích).

Fig.18 là sơ đồ thể hiện các kết quả thử nghiệm kiểm tra biểu hiện CD127 trong các tế bào T biểu hiện CAR-IL-7/CCL19 kháng FITC.

Fig.19 là sơ đồ thể hiện các kết quả thử nghiệm kiểm tra biểu hiện CCR7 trong các tế bào T biểu hiện CAR-IL-7/CCL19 kháng FITC.

Fig.20 là sơ đồ thể hiện các kết quả thử nghiệm kiểm tra sự thay đổi của thể tích khối u khi các tế bào T biểu hiện CAR-IL-7/CCL19 kháng CD20 của người được sử dụng cho chuột mắc bệnh ung thư.

Fig.21 là sơ đồ thể hiện các kết quả thử nghiệm kiểm tra tỷ lệ sống của chuột khi các tế bào T biểu hiện CAR-IL-7/CCL19 kháng CD20 của người được sử dụng cho chuột mắc bệnh ung thư.

Fig.22 là sơ đồ thể hiện các kết quả thử nghiệm kiểm tra tỷ lệ sống của chuột khi các tế bào T biểu hiện CAR-IL-7/CCL19 kháng CD20 của người được sử dụng cho chuột sau khi tiêm dưới da P815-hCD20 và sau đó sử dụng xyclo-phosphamit.

Fig.23 là sơ đồ thể hiện các kết quả thử nghiệm kiểm tra thể tích khối u của chuột khi các tế bào T biểu hiện CAR-IL-7/CCL19 kháng CD20 của người được sử dụng cho chuột sau khi tiêm dưới da P815-hCD20 và sau đó sử dụng xyclo-phosphamit.

Fig.24 là sơ đồ thể hiện 1/10 trị số theo tọa độ của biểu đồ của CPA+7×19 trên Fig.23.

Fig.25 là sơ đồ thể hiện các kết quả quan sát các mô của khối u bằng cách nhuộm H&E khi các tế bào T biểu hiện CAR-IL-7/CCL19 kháng CD20 của người được sử dụng cho chuột sau khi tiêm dưới da P815-hCD20.

Fig.26 là sơ đồ thể hiện các kết quả phân tích hóa mô miễn dịch các mô của khối u khi các tế bào T biểu hiện CAR-IL-7/CCL19 kháng CD20 của người được sử dụng cho chuột sau khi tiêm dưới da P815-hCD20.

Fig.27 là sơ đồ thể hiện các kết quả định lượng vùng dương được gắn nhãn bằng cách nhuộm huỳnh quang trên Fig.26.

Fig.28 là sơ đồ thể hiện các kết quả thử nghiệm kiểm tra thể tích khối u khi các tế bào T biểu hiện CAR-IL-7 kháng CD20 của người, các tế bào T biểu hiện CAR-CCL19 kháng CD20 của người hoặc các tế bào T biểu hiện CAR-IL-7/CCL19 kháng CD20 của người được sử dụng cho chuột sau khi tiêm dưới da P815-hCD20.

Fig.29 (a) là sơ đồ thể hiện vector biểu hiện CAR và thể đột biến âm chiếm ưu thế của SHP1 (vùng tương đồng Src miền 2 chứa phosphatase-1). Fig.29 (b) là sơ đồ thể hiện vector biểu hiện CAR và thể đột biến âm chiếm ưu thế của SHP2 (vùng tương đồng Src miền 2 chứa phosphatase-2).

Fig.30 (a) là sơ đồ thể hiện các kết quả thử nghiệm hoạt tính gây độc tế bào sử dụng các tế bào T biểu hiện CAR-SHP1DN kháng CD20 của người. Fig.30 (b) là sơ đồ thể hiện thử nghiệm hoạt tính gây độc tế bào sử dụng các tế bào T biểu hiện CAR-SHP2DN kháng CD20 của người.

Fig.31 là sơ đồ thể hiện các kết quả thử nghiệm kiểm tra hoạt tính gây độc tế bào kháng lại tế bào khối u bằng cách trộn P815-hCD20 với sự có mặt của các tế bào T biểu hiện CAR-IL-7/CCL19 kháng FITC và rituximab liên kết FITC.

Fig.32 là sơ đồ thể hiện các kết quả thử nghiệm kiểm tra hoạt tính gây độc tế bào kháng lại tế bào khối u bằng cách trộn P815-hCD20 với các tế bào T biểu hiện CAR-IL-7/CCL19 kháng CD20 của người.

Fig.33 là sơ đồ thể hiện các kết quả phân tích CD4, CD8, CD44 và CD62L cho các kiểu hình bề mặt của các bạch cầu bằng phân tích tế bào dòng chảy khi các tế bào T biểu hiện CAR-IL-7/CCL19 kháng CD20 của người được sử dụng cho chuột sau khi tiêm dưới da P815-hCD20.

Fig.34 là sơ đồ thể hiện các kết quả kiểm tra sự tăng sinh của các tế bào T bằng phân tích tế bào dòng chảy khi các bạch cầu lá lách được kích thích bằng cách nuôi cấy trong 4 ngày với P815-hCD20 được xử lý bằng mitomycin C.

Mô tả chi tiết sáng chế

Vector biểu hiện CAR theo sáng chế không bị giới hạn cụ thể miễn là vector biểu hiện CAR chứa axit nucleic mã hóa thụ thể của kháng nguyên khảm (CAR) và axit nucleic mã hóa yếu tố tăng cường chức năng miễn dịch của tế bào T, trong đó axit nucleic mã hóa yếu tố tăng cường chức năng miễn dịch là axit nucleic mã hóa

interleukin-7 và axit nucleic mã hóa CCL19, axit nucleic mã hóa thể đột biến âm chiếm ưu thế của SHP-1 hoặc axit nucleic mã hóa thể đột biến âm chiếm ưu thế của SHP-2. Thụ thể của kháng nguyên khảm nghĩa là protein khảm nhân tạo, trong đó kháng thể chuỗi đơn nhận diện kháng nguyên bề mặt tế bào trên tế bào ung thư được dung hợp với vùng truyền dẫn tín hiệu kích thích sự hoạt hóa tế bào T, thông qua vùng xuyên màng.

Theo sáng chế, axit nucleic mã hóa CAR không bị giới hạn cụ thể, miễn là axit nucleic mã hóa polypeptit cấu thành CAR. Axit nucleic mã hóa CAR chứa axit nucleic mã hóa polypeptit của kháng thể chuỗi đơn nhận diện kháng nguyên bề mặt tế bào trên tế bào ung thư, vùng xuyên màng và vùng truyền dẫn tín hiệu kích thích sự hoạt hóa tế bào T.

Kháng thể chuỗi đơn trong CAR chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ và vùng biến đổi chuỗi nặng (scFv) có nguồn gốc từ vị trí liên kết kháng nguyên của kháng thể đơn dòng. Các ví dụ về chúng có thể bao gồm oligopeptit hoặc polypeptit trong đó peptit liên kết nằm giữa vùng biến đổi chuỗi nhẹ và vùng biến đổi chuỗi nặng.

Kháng nguyên bề mặt tế bào trên tế bào ung thư được nhận diện bởi kháng thể chuỗi đơn có thể là phân tử sinh học được biểu hiện đặc hiệu trên tế bào ung thư và tế bào tiền thân của nó, phân tử sinh học được tìm thấy là được biểu hiện mới do sự biến đổi ác tính của tế bào hoặc phân tử sinh học có mức độ biểu hiện tăng lên trong tế bào ung thư so với tế bào thường. Các ví dụ về chúng có thể bao gồm CD20, EGFR, FITC, CD19, CD22, CD33, PSMA, GD2, các biến thể EGFR, ROR1, c-Met, HER2, CEA, mesothelin, GM2, CD7, CD10, CD30, CD34, CD38, CD41, CD44, CD74, CD123, CD133, CD171, MUC16, MUC1, CS1(CD319), IL-13Ra2, BCMA, Lewis Y, chuỗi kappa IgG, thụ thể folat-alpha, PSCA và EpCAM.

Vùng truyền dẫn tín hiệu làm hoạt hóa tế bào T là vùng có khả năng truyền dẫn tín hiệu trong tế bào khi kháng thể chuỗi đơn nhận diện kháng nguyên bề mặt tế bào trên tế bào ung thư. Vùng truyền dẫn tín hiệu làm hoạt hóa tế bào T tốt hơn là chứa ít

nhất một hoặc nhiều polypeptit được chọn từ polypeptit là CD28, 4-1BB (CD137), GITR, CD27, OX40, HVEM, CD3 ζ và các vùng nội bào chuỗi γ liên kết thụ thể Fc và tốt hơn nữa là chứa polypeptit của ba vùng nội bào là CD28, 4-1BB và CD3 ζ .

Các polypeptit này của vùng nội bào có thể được liên kết bằng liên kết oligopeptit hoặc liên kết polypeptit bao gồm từ 2 đến 10 axit amin. Các ví dụ về trình tự liên kết này có thể bao gồm các trình tự glyxin-serin liên tiếp.

Các ví dụ về vùng xuyên màng theo sáng chế có thể bao gồm polypeptit của các vùng xuyên màng có nguồn gốc từ CD8, các chuỗi α và β của thụ thể tế bào T, CD28, CD3 ϵ , CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154 và GITR và có thể tốt hơn là bao gồm polypeptit của vùng xuyên màng CD8 của người. CAR được neo vào màng tế bào của tế bào T bằng vùng xuyên màng này.

Vùng xuyên màng có thể chứa vùng bản lề tùy ý chứa oligopeptit hoặc polypeptit và có chiều dài nằm trong khoảng từ 1 đến 100 axit amin, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 10 đến 70 axit amin. Các ví dụ về vùng bản lề có thể bao gồm vùng bản lề CD8 của người.

Vùng đệm tùy ý chứa oligopeptit hoặc polypeptit có thể nằm giữa kháng thể chuỗi đơn nhận diện kháng nguyên bề mặt tế bào trên tế bào ung thư và vùng xuyên màng hoặc giữa vùng xuyên màng và vùng truyền dẫn tín hiệu hoạt hóa tế bào T. Các ví dụ về chiều dài của vùng đệm có thể bao gồm từ 1 đến 100 axit amin, tốt hơn là từ 10 đến 50 axit amin. Các ví dụ về vùng đệm này có thể bao gồm các trình tự glyxin-serin liên tiếp.

Theo sáng chế, axit nucleic mã hóa yếu tố tăng cường chức năng tế bào T không bị giới hạn cụ thể miễn là axit nucleic là axit nucleic mã hóa IL-7 và axit nucleic mã hóa CCL19 (sau đây, còn được gọi chung là “axit nucleic 1 theo sáng chế”), axit nucleic mã hóa thể đột biến âm chiếm ưu thế của SHP-1 (sau đây, còn được gọi là “axit nucleic 2 theo sáng chế”) hoặc axit nucleic mã hóa thể đột biến âm chiếm ưu thế

của SHP-2 (sau đây, còn được gọi là “axit nucleic 3 theo sáng chế”). Axit nucleic có thể bao gồm phần lớn axit nucleic được chọn từ axit nucleic từ 1 đến 3 theo sáng chế và có thể cụ thể bao gồm axit nucleic 1 theo sáng chế và axit nucleic 2 theo sáng chế, axit nucleic 1 theo sáng chế và axit nucleic 3 theo sáng chế, axit nucleic 2 theo sáng chế và axit nucleic 3 theo sáng chế, axit nucleic 1 theo sáng chế và axit nucleic 2 theo sáng chế và axit nucleic 3 theo sáng chế.

Axit nucleic mã hóa IL-7 và axit nucleic mã hóa CCL19 trong axit nucleic 1 theo sáng chế có thể bao gồm axit nucleic mã hóa IL-7 và axit nucleic mã hóa CCL19 và axit nucleic mã hóa CCL19 có thể được bố trí ngược dòng hoặc xuôi dòng của axit nucleic mã hóa IL-7.

Axit nucleic mã hóa thể đột biến âm chiếm ưu thế của SHP1 không bị giới hạn cụ thể miễn là axit nucleic mã hóa thể đột biến SHP1 hoạt động chiếm ưu thế so với SHP1 và có thể ức chế tác dụng của SHP1. Các ví dụ về chúng có thể bao gồm axit nucleic mã hóa thể đột biến chứa trình tự axit amin có nguồn gốc từ trình tự axit amin của SHP1 bằng cách thế ít nhất một axit amin bằng axit amin khác và có thể ức chế tác dụng của SHP1. Axit nucleic mã hóa thể đột biến âm chiếm ưu thế của SHP2 không bị giới hạn cụ thể miễn là axit nucleic mã hóa thể đột biến SHP2 hoạt động chiếm ưu thế so với SHP2 và có thể ức chế tác dụng của SHP2. Các ví dụ về các axit nucleic này có thể bao gồm axit nucleic mã hóa thể đột biến chứa trình tự axit amin có nguồn gốc từ trình tự axit amin của SHP2 bằng cách thay thế ít nhất một axit amin bằng axit amin khác và có thể ức chế tác dụng của SHP2.

Vectơ biểu hiện CAR theo sáng chế có thể tùy ý chứa axit nucleic giữa axit nucleic mã hóa thụ thể của kháng nguyên khảm và axit nucleic mã hóa yếu tố tăng cường chức năng miễn dịch của tế bào T, giữa các axit nucleic được chọn từ axit nucleic 1 theo sáng chế, axit nucleic 2 theo sáng chế và axit nucleic 3 theo sáng chế hoặc giữa axit nucleic mã hóa IL-7 và axit nucleic mã hóa CCL19 trong axit nucleic 1 theo sáng chế miễn là mỗi axit nucleic có thể được biểu hiện. Các axit nucleic này tốt hơn là được liên kết bằng trình tự mã hóa peptit tự phân cắt (peptit 2A) hoặc IRES

(vị trí đi vào của ribozym bên trong), tốt hơn là trình tự mã hóa peptit 2A. Liên kết sử dụng trình tự này cho phép biểu hiện hiệu quả mỗi axit nucleic.

Peptit 2A là peptit tự phân cắt có nguồn gốc virus và khác biệt ở chỗ G-P (vị trí là 1 gốc từ đầu tận C) trong trình tự axit amin có SEQ ID NO: 1 bị cắt trong lưới nội chất (Szymczak et al., Expert Opin. Biol. Ther. 5 (5): 627-638 (2005)). Do đó, axit nucleic được đưa vào để nằm bên sườn peptit 2A được biểu hiện nội bào độc lập với nhau.

Peptit 2A, tốt hơn là peptit 2A có nguồn gốc từ picornavirus, rotavirus, virus của côn trùng, *Aphthovirus* hoặc virus *Trypanosoma*, tốt hơn nữa là peptit 2A có nguồn gốc từ picornavirus (F2A) được thể hiện trong SEQ ID NO: 2.

Axit nucleic mã hóa thụ thể của kháng nguyên khả năng có thể được tạo ra bằng kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực, như phương pháp tổng hợp hóa học hoặc phương pháp khuếch đại PCR, trên cơ sở các trình tự nucleotit mã hóa polypeptit của kháng thể chuỗi đơn kháng lại kháng nguyên bề mặt tế bào trên tế bào ung thư, vùng xuyên màng và vùng truyền dẫn tín hiệu làm hoạt hóa tế bào T. Các codon được chọn để mã hóa axit amin có thể được cải biến nhằm tối ưu hóa biểu hiện axit nucleic trong tế bào chủ được quan tâm.

Thông tin về các trình tự nucleotit mã hóa polypeptit của kháng thể chuỗi đơn kháng lại kháng nguyên bề mặt tế bào trên tế bào ung thư, vùng xuyên màng và vùng truyền dẫn tín hiệu làm hoạt hóa tế bào T có thể thu được một cách phù hợp từ các tài liệu đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này hoặc bằng cách tìm kiếm trên cơ sở dữ liệu NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/>) hoặc các cách tương tự.

Ví dụ, thông tin về các trình tự nucleotit mã hóa polypeptit của các vùng xuyên màng CD28, 4-1BB và CD3ζ trong vùng truyền dẫn tín hiệu làm hoạt hóa tế bào T có thể thu được một cách phù hợp bằng cách tìm kiếm trên cơ sở dữ liệu của NCBI hoặc tương tự. Các ví dụ về chúng có thể bao gồm các trình tự được đăng ký với số đăng ký GenBank No: NM_006139.2 (ngày cập nhật: 10/05/2014) đối với CD28 của người,

GenBank No: NM_001561.5 (ngày cập nhật: 16/03/2014) đối với 4-1BB của người và GenBank No: NM_000734.3 (ngày cập nhật: 12/08/2014) đối với CD3 ζ của người.

Thông tin về trình tự nucleotit mã hóa polypeptit của vùng xuyên màng CD8 của người có thể thu được một cách phù hợp bằng cách tìm kiếm trên cơ sở dữ liệu của NCBI hoặc tương tự. Các ví dụ về chúng có thể bao gồm trình tự được đăng ký với số đăng ký GenBank No: NM_001768.6 (ngày cập nhật: 10/05/2014).

Thông tin về trình tự nucleotit mã hóa polypeptit của kháng thể chuỗi đơn có thể còn thu được bằng cách tạo ra kháng thể đơn dòng nhận diện kháng nguyên bề mặt tế bào đích, xác định trình tự axit amin của kháng thể đơn dòng bằng phương pháp đã biết trong lĩnh vực như phương pháp Edman và thu được thông tin về trình tự axit amin cơ bản. Các ví dụ về phương pháp tạo ra kháng thể đơn dòng có thể bao gồm phương pháp tạo kháng thể sử dụng thể lai, phương pháp tạo kháng thể liên quan đến việc chuyển vectơ biểu hiện chứa gen kháng thể vào vật chủ bằng cách tiếp cận kỹ thuật di truyền và phương pháp tạo kháng thể liên quan đến việc chủng ngừa kháng nguyên mong muốn cho động vật chuyển gen.

Axit nucleic mã hóa yếu tố tăng cường chức năng miễn dịch của tế bào T, nghĩa là, axit nucleic mã hóa IL-7 và axit nucleic mã hóa CCL19, axit nucleic mã hóa thể đột biến âm chiếm ưu thế của SHP-1 hoặc axit nucleic mã hóa thể đột biến âm chiếm ưu thế của SHP-2, có thể được tạo ra bằng kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực, như phương pháp tổng hợp hóa học hoặc phương pháp khuếch đại PCR, trên cơ sở các trình tự nucleotit tương ứng của chúng. Các codon được chọn để mã hóa axit amin có thể được cải biến nhằm tối ưu hóa sự biểu hiện axit nucleic trong tế bào chủ được quan tâm.

Thông tin về axit nucleic mã hóa IL-7 và axit nucleic mã hóa CCL19, axit nucleic mã hóa thể đột biến âm chiếm ưu thế của SHP-1 hoặc axit nucleic mã hóa thể đột biến âm chiếm ưu thế của SHP-2 có thể thu được một cách phù hợp từ các tài liệu

đã biết trong lĩnh vực hoặc bằng cách tìm kiếm cơ sở dữ liệu của NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/>) hoặc các cách tương tự.

Axit nucleic mã hóa IL-7 có thể được chọn một cách thích hợp theo kiểu tế bào được chuyển vectơ biểu hiện CAR theo sáng chế. Các ví dụ về chúng có thể bao gồm axit nucleic mã hóa trình tự axit amin (SEQ ID NO: 3) của IL-7 của người. Trình tự nucleotit có mức độ tương đồng là 80% hoặc cao hơn, tốt hơn là 85% hoặc cao hơn, tốt hơn nữa là 90% hoặc cao hơn, tốt hơn nữa là 95% hoặc cao hơn, tốt nhất nếu 98% hoặc cao hơn so với trình tự nucleotit được thể hiện trong SEQ ID NO: 3 có thể được sử dụng miễn là tác dụng tăng cường tỷ lệ tăng sinh tế bào của IL-7 được duy trì.

Axit nucleic mã hóa CCL19 có thể được chọn một cách phù hợp theo kiểu tế bào mà vectơ biểu hiện CAR theo sáng chế được chuyển. Các ví dụ về các axit nucleic này có thể bao gồm axit nucleic mã hóa trình tự axit amin (SEQ ID NO: 4) của CCL19 của người. Trình tự nucleotit có mức độ tương đồng là 80% hoặc cao hơn, tốt hơn là 85% hoặc cao hơn, tốt hơn nữa là 90% hoặc cao hơn, tốt hơn nữa là 95% hoặc cao hơn, tốt nhất nếu 98% hoặc cao hơn so với trình tự nucleotit được thể hiện trong SEQ ID NO: 4 có thể được sử dụng miễn là tác dụng hấp dẫn hóa học của CCL19 trên tế bào T được duy trì.

Axit nucleic mã hóa thể đột biến âm chiếm ưu thế của SHP-1 có thể được chọn một cách phù hợp theo kiểu tế bào mà vectơ biểu hiện CAR theo sáng chế được chuyển. Các ví dụ về các axit nucleic này có thể bao gồm axit nucleic mã hóa trình tự axit amin (SEQ ID NO: 5) của thể đột biến âm chiếm ưu thế của human SHP-1. Trình tự nucleotit có mức độ tương đồng đến 80% hoặc cao hơn, tốt hơn là 85% hoặc cao hơn, tốt hơn nữa là 90% hoặc cao hơn, tốt hơn nữa là 95% hoặc cao hơn, tốt nhất nếu 98% hoặc cao hơn so với trình tự nucleotit được thể hiện trong SEQ ID NO: 5 có thể được sử dụng miễn là thể đột biến âm chiếm ưu thế của SHP-1 có thể ức chế tác dụng của SHP-1. Trong SEQ ID NO: 5, serin ở vị trí 453 là vị trí đột biến.

Axit nucleic mã hóa thể đột biến âm chiếm ưu thế của SHP-2 có thể được chọn một cách phù hợp theo kiểu tế bào được chuyển vector biểu hiện CAR theo sáng chế. Các ví dụ về chúng có thể bao gồm axit nucleic mã hóa trình tự axit amin (SEQ ID NO: 6) của thể đột biến âm chiếm ưu thế của human SHP-2. Trình tự nucleotit có mức độ tương đồng đến 80% hoặc cao hơn, tốt hơn là 85% hoặc cao hơn, tốt hơn nữa là 90% hoặc cao hơn, tốt hơn nữa là 95% hoặc cao hơn, tốt nhất nếu 98% hoặc cao hơn so với trình tự nucleotit được thể hiện trong SEQ ID NO: 6 có thể được sử dụng miễn là thể đột biến âm chiếm ưu thế của SHP-2 có thể ức chế tác dụng của SHP-2. Trong SEQ ID NO: 6, serin ở vị trí 459 là vị trí đột biến.

Vector biểu hiện CAR theo sáng chế có thể là dạng thẳng hoặc dạng tròn và có thể là vector không phải của virus như plasmit, vector của virus hoặc vector trên cơ sở gen nhảy. Vector này có thể chứa các trình tự kiểm soát như trình tự khởi đầu và trình tự kết thúc và trình tự chỉ thị chọn lọc như gen kháng thuốc hoặc gen báo cáo. Axit nucleic mã hóa CAR hoặc axit nucleic mã hóa yếu tố tăng cường chức năng miễn dịch của tế bào T có vị trí hoạt động xuôi dòng với trình tự trình tự khởi đầu, do đó mỗi axit nucleic có thể được phiên mã hiệu quả. Hơn nữa, biểu hiện axit nucleic mã hóa thụ thể của kháng nguyên khảm có thể được xác nhận dễ dàng nhờ gen đánh dấu ở đó.

Vector biểu hiện CAR theo sáng chế có thể chứa axit nucleic mã hóa gen tự sát. Vị trí của gen tự sát không bị giới hạn cụ thể và gen tự sát có thể nằm, bằng trình tự mã hóa peptit 2A hoặc IRES, ở xuôi dòng với trình tự khởi đầu để biểu hiện axit nucleic mã hóa IL-7, axit nucleic mã hóa CCL19, axit nucleic mã hóa thể đột biến âm chiếm ưu thế của SHP-1 hoặc axit nucleic mã hóa thể đột biến âm chiếm ưu thế của SHP-2 và ngược dòng hoặc xuôi dòng với mỗi axit nucleic trong các axit nucleic này hoặc có thể nằm xuôi dòng với trình tự khởi đầu bổ sung. Vector biểu hiện CAR theo sáng chế chứa axit nucleic mã hóa gen tự sát cho phép kiểm soát số lượng tế bào T biểu hiện CAR *in vivo* bằng cách sử dụng thuốc hoạt hóa chức năng của gen tự sát theo tiến trình điều trị ung thư, ví dụ, khi khối u biến mất.

Các ví dụ về gen tự sát có thể bao gồm virus herpes simplex thymidin kinaza (HSV-TK) và gen caspaza 9 có khả năng kích thích được mô tả trong tài liệu được đưa ra dưới đây. Các ví dụ về các thuốc hoạt hóa chức năng của các gen này có thể bao gồm ganciclovir cho virus herpes simplex thymidin kinaza (HSV-TK) và hợp chất kích thích dimer hóa (CID - chemical induction of dimerization) AP1903 cho gen caspaza 9 (Cooper LJ., et al., *Cytotherapy*. 2006; 8 (2): 105-17; Jensen M. C. et al., *Biol Blood Marrow Transplant*. 2010 Sep; 16 (9): 1245-56; Jones BS. *Front Pharmacol*. 2014 Nov 27; 5: 254; Minagawa K., *Pharmaceuticals (Basel)*. 2015 May 8; 8 (2): 230-49; và Bole-Richard E., *Front Pharmacol*. 2015 Aug 25; 6: 174).

Các ví dụ về vector của virus có thể bao gồm vector retrovirus, vector lentivirus, vector adenovirus và vector virus liên quan đến adeno và tốt hơn có thể bao gồm vector retrovirus, tốt hơn nữa là vector pMSGV (Tamada k et al., *Clin Cancer Res* 18: 6436-6445 (2002)) và vector pMSCV (do Takara Bio Inc. sản xuất). Bằng cách sử dụng vector retrovirus, gen chuyển được tích hợp vào hệ gen của tế bào chủ và do đó có thể được biểu hiện ổn định trong khoảng thời gian dài.

Tế bào T biểu hiện CAR theo sáng chế không bị giới hạn cụ thể miễn là tế bào T biểu hiện CAR là tế bào T thu được bằng việc chuyển (a) vector biểu hiện CAR theo sáng chế hoặc tế bào T thu được bằng việc chuyển (b) ít nhất hai vector: vector biểu hiện CAR chứa axit nucleic mã hóa CAR và axit nucleic mã hóa interleukin-7 (vector biểu hiện CAR-IL-7) và vector biểu hiện CAR chứa axit nucleic mã hóa CAR và axit nucleic mã hóa CCL19 (vector biểu hiện CAR-CCL19). Các ví dụ về phương pháp chuyển vector biểu hiện CAR theo sáng chế hoặc vector biểu hiện CAR-IL-7 và vector biểu hiện CAR-CCL19 vào tế bào T có thể bao gồm, nhưng không giới hạn cụ thể ở, phương pháp chuyển gen bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực, như phương pháp lây nhiễm virus, phương pháp canxi phosphat, gây nhiễm bằng liposom, vi tiêm và phương pháp xung điện và tốt hơn có thể bao gồm phương pháp lây nhiễm virus. Vector biểu hiện CAR-IL-7 có thể chứa axit nucleic mã hóa CAR và axit nucleic mã hóa interleukin-7. Vector biểu hiện CAR-CCL19 có thể chứa axit nucleic

mã hóa CAR và axit nucleic mã hóa CCL19. Như với vectơ biểu hiện CAR theo sáng chế, các vectơ biểu hiện này, mỗi vectơ có thể chứa thêm một axit nucleic như axit nucleic mã hóa peptit 2A, IRES hoặc gen tự sát miễn là mỗi axit nucleic có thể được biểu hiện.

Các ví dụ về phương pháp lây nhiễm virus có thể bao gồm phương pháp chuyển tế bào đóng gói như tế bào GP2-293 (do Takara Bio Inc. sản xuất), tế bào Plat-GP (do Cosmo Bio Co., Ltd. sản xuất), tế bào PG13 (ATCC CRL-10686) hoặc tế bào PA317 (ATCC CRL-9078) với vectơ biểu hiện CAR theo sáng chế và plasmit đóng gói để tạo ra virus tái tổ hợp và lây nhiễm tế bào T với virus tái tổ hợp. Phương pháp lây nhiễm virus có thể được thực hiện sử dụng kit có sẵn như Kit Eco đóng gói Retrovirus (do Takara Bio Inc. sản xuất).

Việc chuyển vectơ biểu hiện CAR theo sáng chế vào tế bào T có thể được xác nhận bằng cách kiểm tra biểu hiện CAR bằng phân tích tế bào dòng chảy, thẩm tách Northern, thẩm tách Southern, PCR như RT-PCR, ELISA hoặc thẩm tách Western hoặc kiểm tra biểu hiện gen đánh dấu được chèn vào vectơ.

Các ví dụ về tế bào T có thể bao gồm tế bào T có nguồn gốc từ người và tế bào T có nguồn gốc từ động vật có vú không phải người (ví dụ, chó, mèo, lợn hoặc chuột). Mặt khác, tế bào T có thể thu được bằng cách phân lập và tinh lọc từ chất lỏng của cơ thể như máu hoặc chất lỏng của tủy xương, mô của lá lách, tuyến ức, hạch bạch huyết hoặc tương tự hoặc tế bào miễn dịch xâm nhập vào mô ung thư của khối u sơ cấp, khối u di căn, cổ trướng do ung thư hoặc tương tự. Các ví dụ về tế bào T này có thể bao gồm tế bào $\alpha\beta$ T, tế bào $\gamma\delta$ T, tế bào T CD8⁺, tế bào T CD4⁺, tế bào T xâm nhập khối u, tế bào T nhớ, tế bào T chưa tiếp xúc kháng nguyên và tế bào NKT.

Kháng thể chuỗi đơn được biểu hiện bằng tế bào T biểu hiện CAR theo sáng chế được đặt bên ngoài tế bào. Tế bào T biểu hiện CAR có kháng thể chuỗi đơn này có khả năng nhận diện kháng nguyên liên quan đến khối u (TAA) biểu hiện trên bề mặt của tế bào ung thư.

Tế bào T biểu hiện CAR theo sáng chế có thể chứa vectơ chứa axit nucleic mã hóa gen tự sát ngoài vectơ biểu hiện CAR theo sáng chế.

Chất trị bệnh ung thư theo sáng chế không bị giới hạn cụ thể miễn là chất trị bệnh ung thư chứa tế bào T biểu hiện CAR theo sáng chế và phụ gia được dụng. Các ví dụ về chất phụ gia có thể bao gồm nước muối, nước muối đậm, môi trường nuôi cấy tế bào, dextroza, nước dùng để tiêm, glyxerol, etanol và hỗn hợp của chúng, chất ổn định, chất hòa tan và chất hoạt động bề mặt, dung dịch đệm và chất khử trùng, chất bổ trợ, chất độn và các chất làm trơn.

Chất trị bệnh ung thư theo sáng chế có thể được sử dụng cho đối tượng thử nghiệm có nhu cầu điều trị bệnh ung thư sử dụng phương pháp đã biết với người có hiểu biết trong lĩnh vực. Các ví dụ về phương pháp sử dụng có thể bao gồm tiêm tĩnh mạch, tiêm trong khối u, tiêm trong da, tiêm dưới da, tiêm trong cơ, tiêm trong màng bụng, tiêm trong động mạch, tiêm trong tủy sống, tiêm trong tim, tiêm trong khớp, tiêm trong hoạt dịch, tiêm nội sọ, tiêm nội tủy mạc và tiêm dưới màng nhện (spinal fluid).

Lượng tế bào T biểu hiện CAR theo sáng chế có trong chất trị bệnh ung thư được sử dụng có thể được điều chỉnh một cách thích hợp theo kiểu, vị trí và độ nghiêm trọng của ung thư, độ tuổi, thể trọng và tình trạng của đối tượng thử nghiệm nhận được sự điều trị, v.v.. Các ví dụ về chúng có thể tốt hơn là bao gồm từ 1×10^4 đến 1×10^{10} tế bào, tốt hơn là từ 1×10^5 đến 1×10^9 tế bào, tốt hơn nữa là từ 5×10^6 đến 5×10^8 tế bào, trong một liều.

Chất trị bệnh ung thư được sử dụng có thể được sử dụng riêng rẽ 4 lần, 3 lần, hai lần hoặc một lần mỗi ngày, với khoảng thời gian 1 ngày, 2 ngày, 3 ngày, 4 ngày hoặc 5 ngày, một lần mỗi tuần, với khoảng thời gian 7 ngày, 8 ngày hoặc 9 ngày, hai lần mỗi tuần, một lần mỗi tháng hoặc hai lần mỗi tháng.

Các ví dụ về bệnh ung thư cho chất trị bệnh ung thư theo sáng chế hoặc phương pháp điều trị bệnh ung thư được nêu sau đây có thể bao gồm: các bệnh ung thư như

bệnh ung thư tuyến, bệnh ung thư tế bào hình vảy, bệnh ung thư tuyến vảy, bệnh ung thư chưa biệt hóa, bệnh ung thư tế bào lớn, bệnh ung thư tế bào nhỏ, bệnh ung thư da, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh ung thư bàng quang tiết niệu, bệnh ung thư âm đạo, bệnh ung thư cổ, bệnh ung thư tử cung, bệnh ung thư gan, bệnh ung thư thận, bệnh ung thư tuyến tụy, bệnh ung thư lá lách, bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư khí quản, bệnh ung thư phế quản, bệnh ung thư ruột kết, bệnh ung thư ruột nhỏ, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư thực quản, bệnh ung thư túi mật, bệnh ung thư tinh hoàn và bệnh ung thư buồng trứng; các bệnh ung thư mô xương, mô sụn, mô mỡ, mô cơ, mô mạch và mô máu; sacom như sacom sụn, sacom Ewing, u nội mô mạch máu ác tính, u bao sợi thần kinh ác tính, sacom xương và sacom mô mềm; các u nguyên bào như u nguyên bào gan, u nguyên bào tụy, u nguyên bào thận, u nguyên bào thần kinh, u nguyên bào tụy, u nguyên bào phế quản phổi và u nguyên bào võng mạc; khối u tế bào phổi; u limphô; và bệnh bạch cầu.

Chất trị bệnh ung thư theo sáng chế có thể được sử dụng kết hợp với chất trị bệnh ung thư bổ sung. Các ví dụ về chất trị bệnh ung thư bổ sung có thể bao gồm: chất alkyl hóa như xyclophosphamid, bendamustin, Ifosfamid và dacarbazin; chất chống chuyển hóa như pentostatin, fludarabin, cladribin, methotrexat, 5-flouraxil, 6-mercaptopurin và enoxitabin; các thuốc nhắm đích phân tử như rituximab, cetuximab và trastuzumab; chất ức chế kinaza như imatinib, gefitinib, erlotinib, afatinib, dasatinib, sunitinib và trametinib; chất ức chế proteazom như bortezomib; chất ức chế canxineurin như xyclosporin và tacrolimus; kháng sinh chống ung thư như idarubicin, doxorubicin mitomycin C; alkaloid từ thực vật như irinotecan và etoposid; các thuốc chứa platin như cisplatin, oxaliplatin và carboplatin; chất trị liệu dạng hormon như tamoxifen và bicalutamid; và các thuốc điều hòa miễn dịch như interferon, nivolumab và pembrolizumab và có thể tốt hơn là bao gồm chất alkyl hóa và chất chống chuyển hóa, tốt hơn nữa là xyclophosphamid.

Phương pháp “sử dụng chất trị bệnh ung thư theo sáng chế kết hợp với chất trị bệnh ung thư bổ sung” có thể bao gồm phương pháp sử dụng chất trị bệnh ung thư bổ

sung trong điều trị, sau đó sử dụng chất trị bệnh ung thư theo sáng chế, phương pháp sử dụng đồng thời chất trị bệnh ung thư theo sáng chế và chất trị bệnh ung thư bổ sung và phương pháp sử dụng chất trị bệnh ung thư theo sáng chế trong điều trị, sau đó sử dụng chất trị bệnh ung thư bổ sung và có thể tốt hơn là bao gồm phương pháp sử dụng chất trị bệnh ung thư bổ sung trong điều trị, sau đó sử dụng chất trị bệnh ung thư theo sáng chế. Sử dụng kết hợp chất trị bệnh ung thư theo sáng chế và chất trị bệnh ung thư bổ sung cải thiện hơn tác dụng trị liệu lên ung thư và có thể còn làm giảm tác dụng phụ của mỗi chất trị bệnh ung thư bằng cách làm giảm tần suất sử dụng hoặc liều chất trị bệnh ung thư. Tương tự, chất trị bệnh ung thư bổ sung có thể có trong chất trị bệnh ung thư theo sáng chế.

Các ví dụ về khía cạnh thay thế 1 theo sáng chế có thể bao gồm 1) phương pháp điều trị bệnh ung thư, bao gồm việc cho bệnh nhân có nhu cầu điều trị bệnh ung thư sử dụng tế bào T biểu hiện CAR theo sáng chế, 2) tế bào T biểu hiện CAR theo sáng chế để sử dụng làm chất trị bệnh ung thư và 3) sử dụng tế bào T biểu hiện CAR theo sáng chế để điều chế chất trị bệnh ung thư.

Các ví dụ về khía cạnh thay thế 2 theo sáng chế có thể bao gồm kit để tạo ra tế bào T biểu hiện CAR, chứa vector biểu hiện CAR theo sáng chế. Kit này không bị giới hạn cụ thể miễn là kit này chứa vector biểu hiện CAR theo sáng chế. Kit có thể chứa hướng dẫn sử dụng để tạo ra các tế bào T biểu hiện CAR và chất phản ứng sử dụng trong việc chuyển vector biểu hiện CAR theo sáng chế vào các tế bào T.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1

Tạo ra các tế bào T biểu hiện IL-7 và CCL19

Lựa chọn yếu tố tăng cường chức năng miễn dịch của tế bào T

Ít nhất vài trăm kiểu phân tử khác nhau có thể kiểm soát chức năng của các tế bào T có mặt *in vivo*. Các tác giả sáng chế trước tiên chọn IL-7 và CCL19 trong số lượng lớn các hỗn hợp trên cơ sở các nghiên cứu hoặc thử nghiệm trước đó, như kiểm

soát các phân tử để tăng cường thêm tác dụng chống khối u của các tế bào CAR-T và cũng chọn hỗn hợp hai phân tử này, nghĩa là, hỗn hợp IL-7 và CCL19, không phải mỗi loại riêng biệt. Các tác giả sáng chế tạo ra vectơ biểu hiện đồng thời các yếu tố tăng cường chức năng miễn dịch và CAR của tế bào T.

IL-7 là xytokin quan trọng cho sự sống của các tế bào T và được sản xuất bởi các tế bào không phải tế bào máu như các tế bào cơ chất của tủy xương, tuyến ức và cơ quan hoặc mô limphô. Mặt khác, bản thân các tế bào T khó có khả năng sản xuất IL-7.

CCL19 chủ yếu được sản xuất từ các tế bào đuôi gai hoặc đại thực bào của hạch bạch huyết và có chức năng kích thích sự di chuyển của các tế bào T, các tế bào B hoặc các tế bào đuôi gai trưởng thành qua thụ thể CCR7 của nó.

Sản xuất vectơ biểu hiện CAR kháng FITC để biểu hiện IL-7 và CCL19

Mảnh ADN CAR kháng FITC (SEQ ID NO: 7) mã hóa CAR kháng FITC bao gồm scFv kháng FITC, vùng xuyên màng CD8 của chuột và motif tín hiệu nội bào CD28-4-1BB-CD3ζ của chuột, mảnh ADN F2A-MCS (SEQ ID NO: 8) mã hóa peptit 2A (F2A) được thể hiện trong SEQ ID NO: 1 và vị trí đa nhân dòng (MCS) sau chuỗi peptit và mảnh ADN IL-7-F2A-CCL19 (SEQ ID NO: 9) mã hóa IL-7 của chuột (mà không có codon kết thúc) và F2A và CCL19 của chuột sau IL-7 của chuột được tổng hợp nhân tạo. Trong SEQ ID NO: 7, các vị trí từ 1 đến 819 thể hiện trình tự mã hóa polypeptit của scFv kháng FITC, các vị trí từ 829 đến 1074 thể hiện trình tự mã hóa polypeptit của vùng xuyên màng CD8 của chuột, các vị trí từ 1075 đến 1197 thể hiện trình tự mã hóa polypeptit của vùng nội bào CD28 của chuột, các vị trí từ 1198 đến 1332 thể hiện trình tự mã hóa polypeptit của vùng nội bào 4-1BB và các vị trí từ 1333 đến 1674 thể hiện trình tự mã hóa polypeptit của vùng nội bào CD3ζ. Trong SEQ ID NO: 9, các vị trí từ 1 đến 462 thể hiện trình tự mã hóa IL-7, các vị trí từ 463 đến 537 thể hiện trình tự mã hóa F2A và các vị trí từ 538 đến 864 thể hiện trình tự mã hóa CCL19.

Để tạo ra vector CAR biểu hiện CAR, IL-7 và CCL19, mảnh ADN CAR kháng FITC và mảnh ADN F2A-MCS được liên kết để tạo ra cấu trúc CAR kháng FITC-F2A-MCS. Sau đó, cấu trúc được tạo ra được nhân dòng vào vector biểu hiện retrovirus pMSGV (Tamada k et al., Clin Cancer Res 18: 6436-6445 (2002)) để tạo ra vector pMSGV chứa CAR kháng FITC-F2A-MCS. Mảnh ADN IL-7-F2A-CCL19 được chèn vào MCS của vector pMSGV bằng cách xử lý với enzyme giới hạn (NsiI và SalI) và gắn lại để thu được vector pMSGV chứa CAR kháng FITC-F2A-IL-7-F2A-CCL19 (vector CAR kháng FITC biểu hiện IL-7/CCL19). Sơ đồ của vector thu được được thể hiện trên Fig.2. Tương tự, mảnh ADN CAR kháng FITC được nhân dòng vào vector biểu hiện retrovirus pMSGV để tạo ra vector pMSGV chứa CAR kháng FITC làm đối chứng (vector CAR kháng FITC đối chứng).

Tạo ra retrovirus chứa vector CAR kháng FITC biểu hiện IL-7/CCL19

Để tải nạp các tế bào T của chuột, retrovirus được tạo ra. Dòng tế bào đóng gói GP2-293 (do Takara Bio Inc. sản xuất) được gây nhiễm với vector CAR kháng FITC biểu hiện IL-7/CCL19 nêu trên hoặc vector CAR kháng FITC đối chứng và plasmid pCL-Eco (do Imgenex Corp. sản xuất) sử dụng Lipofectamin 2000 hoặc 3000 (do Life Technologies Corp. sản xuất) để tạo ra retrovirus chứa vector CAR kháng FITC biểu hiện IL-7/CCL19 hoặc vector CAR kháng FITC đối chứng. Sau 48 giờ sau khi gây nhiễm, dịch nổi chứa retrovirus được thu hồi.

DMEM được bổ sung FCS 10%, 100U/ml penixilin và 100mg/ml streptomycin được sử dụng làm môi trường nuôi cấy cho các tế bào GP2-293. RPMI-1640 được bổ sung FCS 10%, 100U/ml penixilin, 100mg/ml streptomycin, 50mM 2-mercaptoetanol và 2mM L-glutamin được sử dụng làm môi trường nuôi cấy cho các tế bào T được sử dụng trong các ví dụ nêu sau đây.

Sự tải nạp các tế bào T của chuột

Để tải nạp các tế bào T của chuột, 3×10^6 tế bào T của chuột được tinh chế có nguồn gốc từ lá lách và hạch bạch huyết được hoạt hóa trong 48 giờ với kháng thể

đơn dòng kháng CD3 cố định (3 μ g/ml), kháng thể đơn dòng kháng CD28 (1 μ g/ml) và IL-2 (100IU/ml). Sau đó, dịch nổi chứa retrovirus được tạo ra từ đó chứa vector CAR kháng FITC biểu hiện IL-7/CCL19 hoặc vector CAR kháng FITC đối chứng được trộn với các tế bào T được hoạt hóa của chuột (1×10^6 tế bào/ml) trong đĩa được phủ 25 μ g/ml RetroNectin(R) (do Takara Bio Inc. sản xuất). Sau khi ly tâm ở 1500 rpm trong 2 giờ, các tế bào được nuôi cấy trong 6 giờ với sự có mặt của IL-2 (100IU/ml). Để loại bỏ retrovirus từ môi trường nuôi cấy, các tế bào T của chuột được thu hồi, chuyển sang môi trường nuôi cấy sinh trưởng mới (RPMI) chứa IL-2 (100IU/ml) và được nuôi cấy thêm 42 giờ để thu các tế bào T của chuột chứa vector CAR kháng FITC biểu hiện IL-7/CCL19 (các tế bào T kháng CAR biểu hiện FITC IL-7/CCL19) hoặc các tế bào T của chuột chứa vector CAR kháng FITC đối chứng (các tế bào T biểu hiện CAR kháng FITC).

Tạo ra vector biểu hiện CAR kháng CD20 để biểu hiện IL-7 và CCL19

Vector pMSGV chứa CAR-F2A-IL-7-F2A-CCL19 kháng CD20 của người (vector CAR kháng CD20 biểu hiện IL-7/CCL19 của người) được tạo ra theo cách giống với cách trong sản xuất vector CAR kháng FITC biểu hiện IL-7/CCL19 được mô tả ở trên ngoại trừ trình tự của vùng scFv kháng FITC trong trình tự là SEQ ID NO: 7 được tạo ra với trình tự của scFv kháng CD20 của người (SEQ ID NO: 10) được tổng hợp bởi Life Technologies Corp. trên cơ sở trình tự của rituximab. Tương tự, vector pMSGV chứa CAR kháng CD20 của người (vector CAR kháng CD20 của người đối chứng) được tạo ra theo cách giống với cách trong sản xuất vector CAR kháng FITC đối chứng được mô tả ở trên ngoại trừ trình tự của vùng scFv kháng FITC trong trình tự có SEQ ID NO: 7 được thay thế với trình tự của scFv kháng CD20 của người (SEQ ID NO: 10). Vector CAR kháng CD20 biểu hiện IL-7/CCL19 của người hoặc vector CAR kháng CD20 của người đối chứng được chuyển vào các tế bào T của chuột theo cách giống với cách như ở trên để tạo ra các tế bào T biểu hiện CAR-IL-7/CCL19 kháng CD20 của người hoặc các tế bào T biểu hiện CAR kháng CD20 của người.

Ví dụ 2

Thử nghiệm CAR biểu hiện bằng phân tích tế bào dòng chảy

Phân tích tế bào dòng chảy

Mức độ biểu hiện CAR nhận diện FITC làm kháng nguyên mẫu được phân tích bằng phân tích tế bào dòng chảy hai màu. Các tế bào T biểu hiện CAR-IL-7/CCL19 kháng FITC được tạo ra được nuôi cấy với sự có mặt của FITC gắn dextran và allophycocyanin (APC) gắn kháng thể đơn dòng kháng CD8 (53-6.7 do Affymetrix, Inc. sản xuất). EC800 (do Sony Corp. sản xuất) được sử dụng trong phân tích tế bào dòng chảy và dữ liệu được phân tích sử dụng phần mềm FlowJo (do Tree Star, Inc. sản xuất).

Mức độ biểu hiện CAR nhận diện CD20 của người cũng được phân tích bằng phân tích tế bào dòng chảy hai màu. Các tế bào T biểu hiện CAR-IL-7/CCL19 kháng CD20 của người được tạo ra được phân tích sử dụng protein biotinyl hóa L và APC gắn streptavidin.

Kết quả

Các kết quả được thể hiện trên các hình vẽ từ Fig.3 đến 5. Trên Fig.3, biểu đồ bên trái thể hiện các kết quả về mẫu CAR không được nhuộm (FITC gắn dextran không được bổ sung) của các tế bào T biểu hiện CAR-IL-7/CCL19 kháng FITC và biểu đồ bên phải thể hiện các kết quả về mẫu CAR được nhuộm (FITC gắn dextran được bổ sung) của các tế bào T biểu hiện CAR-IL-7/CCL19 kháng FITC. Trên Fig.4, “tải nạp (-)” thể hiện các kết quả về các tế bào T không được tải nạp, “đối chứng” thể hiện các kết quả về các tế bào T biểu hiện CAR kháng FITC và “7×19” thể hiện các kết quả về các tế bào T biểu hiện CAR-IL-7/CCL19 kháng FITC. Trên Fig.5, “tải nạp (-)” thể hiện các kết quả về các tế bào T không được tải nạp, “đối chứng” thể hiện các kết quả về các tế bào T biểu hiện CAR kháng CD20 của người và “7×19” thể hiện các kết quả về các tế bào T biểu hiện CAR-IL-7/CCL19 kháng CD20 của người. Các trị số trên các hình vẽ thể hiện tỷ lệ phần trăm của mỗi quần thể. Như được thể hiện

trên các hình vẽ từ Fig.3 đến Fig.5, biểu hiện CAR được xác nhận trong các tế bào T biểu hiện CAR-IL-7/CCL19 kháng FITC và các tế bào T biểu hiện CAR-IL-7/CCL19 kháng CD20 của người.

Ví dụ 3

Việc tiết IL-7 và CCL19

Việc đo các hàm lượng IL-7 và CCL19 trong dịch nổi nuôi cấy của các tế bào T biểu hiện CAR-IL-7/CCL19 kháng FITC - 1

Các tế bào T biểu hiện CAR-IL-7/CCL19 kháng FITC được tạo ra hoặc các tế bào T biểu hiện CAR kháng FITC được kích thích bằng 1 μ g/ml trastuzumab được gắn FITC cố định và được nuôi cấy trong 3 ngày. Dịch nổi được thu hồi và hàm lượng của IL-7 và CCL19 được đo sử dụng kit ELISA có sẵn (do R&D systems, Inc. sản xuất). Các kết quả được thể hiện trên Fig.6.

Kết quả

Như được thể hiện trên Fig.6, trong dịch nổi nuôi cấy, IL-7 được phát hiện ở 300pg/ml hoặc cao hơn và CCL19 được phát hiện ở 75 pg/ml hoặc cao hơn. Do đó, xác nhận rằng: các tế bào T biểu hiện CAR-IL-7/CCL19 kháng FITC biểu hiện IL-7 và CCL19; và IL-7 và CCL19 đã biểu hiện được tiết ra bên ngoài tế bào. IL-7 và CCL19 từ các tế bào T biểu hiện CAR kháng FITC đối chứng đều nằm dưới giới hạn phát hiện (không được phát hiện).

Đo hàm lượng IL-7 và CCL19 trong dịch nổi nuôi cấy của các tế bào T biểu hiện CAR-IL-7/CCL19 kháng FITC - 2

Hàm lượng của IL-7 và CCL-19 sau khi nuôi cấy trong 3, 5 hoặc 7 ngày có hoặc không có sự kích thích bằng trastuzumab được gắn FITC cố định hoặc kháng thể đơn dòng kháng CD3 được đo sử dụng kit ELISA. Các kết quả được thể hiện trên Fig.7. Trên Fig.7, cột trắng thể hiện các kết quả thu được khi không có kích thích, cột xám thể hiện các kết quả thu được khi có kích thích bằng trastuzumab được gắn FITC và cột đầy thể hiện các kết quả thu được khi có kích thích bằng kháng thể đơn dòng

kháng CD3. “Đối chứng” thể hiện các kết quả về các tế bào T biểu hiện CAR kháng FITC và “7×19” thể hiện các kết quả về các tế bào T biểu hiện CAR-IL-7/CCL19 kháng FITC.

Kết quả

Như thấy rõ ràng trên Fig.7, các tế bào T biểu hiện CAR-IL-7/CCL19 kháng FITC thể hiện có sự tiết IL-7 và CCL-19 ra bên ngoài tế bào bằng cách nuôi cấy không chỉ trong 3 ngày mà còn trong 5 ngày hoặc 7 ngày.

Đo hàm lượng IL-7 và CCL19 trong dịch nổi nuôi cấy của các tế bào T biểu hiện CAR-IL-7/CCL19 kháng CD20 của người

Như đối với các tế bào T biểu hiện CAR-IL-7/CCL19 kháng CD20 của người hoặc các tế bào T biểu hiện CAR kháng CD20 của người được tạo ra, nồng độ của IL-7 và CCL-19 sau khi nuôi cấy trong 3 ngày hoặc 5 ngày có hoặc không có kích thích bằng u tế bào bón P815 được xử lý bằng mitomycin C, u tế bào bón P815 được tái tổ hợp di truyền để biểu hiện CD20 của người (P815-hCD20) hoặc cố định kháng thể đơn dòng kháng CD3 được xác định tương tự sử dụng kit ELISA. Các kết quả được thể hiện trên Fig.8. Trên Fig.8, cột trắng thể hiện các kết quả thu được không có kích thích, cột đánh bóng bằng đường gạch chéo thể hiện các kết quả thu được có kích thích bằng P815 được xử lý bằng mitomycin C, cột đen thể hiện các kết quả thu được có kích thích bằng P815-hCD20 và cột xám thể hiện các kết quả thu được có kích thích bằng kháng thể đơn dòng kháng CD3 cố định. “Đối chứng” thể hiện các kết quả về các tế bào T biểu hiện CAR kháng CD20 của người và “7×19” thể hiện các kết quả về các tế bào T biểu hiện CAR-IL-7/CCL19 kháng CD20 của người.

Kết quả

Như thấy rõ ràng từ Fig.8, các tế bào T biểu hiện CAR-IL-7/CCL19 kháng CD20 của người còn thể hiện có tiết IL-7 và CCL-19 ra bên ngoài tế bào.

Ví dụ 4

Số lượng tế bào và tỷ lệ sống của các tế bào T biểu hiện CAR

Số lượng tế bào và tỷ lệ sống của các tế bào T biểu hiện CAR-IL-7/CCL19 kháng FITC

Nghiên cứu được thực hiện để xem xét liệu rằng IL-7 hoặc CCL19 được tạo ra bởi các tế bào T biểu hiện CAR-IL-7/CCL19 kháng FITC sẽ ảnh hưởng đến chức năng sinh học và thể hiện tác dụng kích thích miễn dịch. Các tế bào T biểu hiện CAR-IL-7/CCL19 kháng FITC hoặc các tế bào T biểu hiện CAR kháng FITC được tạo ra được kích thích bằng 1µg/ml trastuzumab được gắn FITC cố định và được nuôi cấy trong 3 ngày, 5 ngày hoặc 7 ngày và các tế bào và dịch nổi được thu hồi. Số lượng tế bào và tỷ lệ sống được phân tích bằng nhuộm xanh trypan. Các kết quả được thể hiện trên Fig.9 và Fig.10. Trên Fig.9 và Fig.10, cột đen thể hiện các kết quả về các tế bào T biểu hiện CAR-IL-7/CCL19 kháng FITC, cột trắng thể hiện các kết quả về các tế bào T biểu hiện CAR kháng FITC và trục hoành thể hiện số ngày nuôi cấy. Khác biệt có ý nghĩa thống kê được đánh giá bằng thử nghiệm t Student (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$, † $p < 0,001$).

Kết quả

Như được thể hiện trên Fig.9 và Fig.10, sự tăng sinh tế bào và tỷ lệ sống của các tế bào T biểu hiện CAR-IL-7/CCL19 kháng FITC đều được tăng cường, thể hiện rằng IL-7 và CCL19 được tạo ra bởi các tế bào T biểu hiện CAR-IL-7/CCL19 kháng FITC ảnh hưởng đến chức năng sinh học.

Số lượng tế bào của các tế bào T biểu hiện CAR-IL-7/CCL19 kháng CD20 của người

Mẫu chứa các tế bào T biểu hiện CAR-IL-7/CCL19 kháng CD20 của người (4×10^5 tế bào) được kích thích đồng thời bằng mitomycin C và P815-hCD20 với sự có mặt của đối chứng isotyp IgG2a của chuột rattus, kháng thể trung hòa đơn dòng kháng CD127 hoặc kháng thể trung hòa đơn dòng kháng CCR7. Các tế bào được nuôi cấy trong 5 ngày và số tuyệt đối các tế bào sống được xác định sử dụng xanh trypan. CD127 là thụ thể của IL-7 và CCR7 là thụ thể của CCL19. Các kết quả được thể hiện trên Fig.11. Trên Fig.11, “đối chứng isotyp.” thể hiện các kết quả thu được bằng cách

kích thích bằng P815-hCD20 với sự có mặt của đối chứng isotyp IgG2a của chuột rattus, “kháng CD127” thể hiện các kết quả thu được bằng cách kích thích bằng P815-hCD20 với sự có mặt của kháng thể trung hòa đơn dòng kháng CD127 và “kháng CCR7” thể hiện các kết quả thu được bằng cách kích thích bằng P815-hCD20 với sự có mặt của kháng thể trung hòa đơn dòng kháng CCR7. Trên Fig.11, cột đen thể hiện các kết quả về các tế bào T biểu hiện CAR-IL-7/CCL19 kháng CD20 của người và cột trắng thể hiện các kết quả về các tế bào T biểu hiện CAR kháng CD20 của người. Mỗi dữ liệu được thể hiện bằng giá trị trung bình $\pm$ sai số tiêu chuẩn từ 3 lỗ. *: $P < 0,05$, †: $P < 0,001$.

Kết quả

Như được thể hiện trên Fig.11, số lượng tế bào của các tế bào T biểu hiện CAR-IL-7/CCL19 kháng CD20 của người cũng tăng lên và tốc độ tăng sinh tế bào của chúng tăng lên trong khi sự tăng sinh tế bào bị ức chế bằng kháng CD127, thể hiện rằng sự tăng lên trong tỷ lệ tăng sinh tế bào thực hiện qua thụ thể của IL-7 CD127.

Ví dụ 5

Thử nghiệm sự di chuyển của tế bào T

Thử nghiệm sự di chuyển của tế bào T sử dụng các tế bào T biểu hiện CAR-IL-7/CCL19 kháng FITC

Tác dụng hấp dẫn hóa học của CCL19 được nghiên cứu bằng thử nghiệm sự di chuyển của tế bào sử dụng Transwell. Đặc tính di chuyển của các tế bào T đáp ứng được xác định bằng sự di chuyển qua phần lọc polycarbonat có kích thước lỗ là $5\mu\text{m}$ sử dụng ngăn 96 giếng Transwell(R) (Costar, do Corning, Inc. sản xuất). Cụ thể, các tế bào T biểu hiện CAR-IL-7/CCL19 kháng FITC hoặc các tế bào T biểu hiện CAR kháng FITC được kích thích trong 3 ngày với $1\mu\text{g/ml}$ trastuzumab được gắn FITC cố định ở ngăn dưới. Các tế bào T đáp ứng được tạo ra từ lá lách hoặc hạch bạch huyết bằng lựa chọn mang tính phủ định sử dụng MACS(R) (do Miltenyi Biotec GmbH sản xuất). Các tế bào T đáp ứng được gắn màu xanh CytoTell (do AAT Bioquest, Inc. sản

xuất) và được nuôi cấy trong 3 giờ trong lớp trên. Sự di chuyển từ ngăn trên đến ngăn dưới được đánh giá bằng phân tích tế bào dòng chảy. Các kết quả được thể hiện trên Fig.12. Trên Fig.12, cột đen thể hiện các kết quả về các tế bào T biểu hiện CAR-IL-7/CCL19 kháng FITC, cột trắng thể hiện các kết quả về các tế bào T biểu hiện CAR kháng FITC và trục tung thể hiện số tuyệt đối của các tế bào T đáp ứng đã di chuyển đến ngăn dưới (tương tự cho Fig.13 và Fig.14 bên dưới). Khác biệt có ý nghĩa thống kê được nghiên cứu bằng thử nghiệm t của các Student (* $p < 0,05$).

Kết quả

Như được thể hiện trên Fig.12, các tế bào T biểu hiện CAR-IL-7/CCL19 kháng FITC cho phép số lượng lớn các tế bào T di chuyển đến ngăn dưới khi so sánh với các tế bào T biểu hiện CAR kháng FITC. Trong liệu pháp chuyển tế bào limphô (ví dụ, tế bào T biểu hiện CAR), hủy hoại tế bào ung thư bằng các tế bào T được sử dụng là quan trọng như vấn đề của quá trình và ngoài ra, quan trọng là hoạt hóa các tế bào T nội sinh (= các tế bào miễn dịch của vật chủ) thể hiện ban đầu ở bệnh nhân ung thư và từ đó thu hút các tế bào này như các tế bào tấn công các tế bào ung thư. Nhằm mục đích này, tốt hơn là không chỉ chuyển các tế bào limphô có thêm tác dụng chống khối u và kích thích sự tương tác hoạt động giữa các tế bào T được chuyển và các tế bào T nội sinh bằng một số phương pháp sao cho các tế bào T nội sinh được tích lũy khu trú đến ung thư, với tác dụng trị liệu miễn dịch tăng cường. Như thấy từ các kết quả trên Fig.12, các tế bào T biểu hiện CAR-IL-7/CCL19 kháng FITC có khả năng tích lũy các tế bào T nội tại, thể hiện rằng sự tương tác hoạt động giữa các tế bào T được chuyển và các tế bào T nội sinh có thể được kích thích.

Thử nghiệm sự di chuyển của các tế bào T hoặc các tế bào đuôi gai sử dụng các tế bào T biểu hiện CAR-IL-7/CCL19 kháng FITC

Mẫu chứa các tế bào T biểu hiện CAR-IL-7/CCL19 kháng FITC hoặc các tế bào T biểu hiện CAR kháng FITC (5×10^5 tế bào) được kích thích bằng trastuzumab được gắn FITC cố định hoặc kháng thể đơn dòng kháng CD3 ở ngăn dưới của

Transwell. Vào ngày 3, 4×10^5 tế bào T được nhuộm màu xanh CytoTell được đặt ở ngăn trên và được nuôi cấy trong 3 giờ hoặc 5 giờ. Tương tự, mỗi mẫu được kích thích bằng trastuzumab được gắn FITC cố định. Vào ngày 3, 4×10^5 tế bào đuôi gai được nhuộm màu xanh CytoTell được đặt ở ngăn trên và được nuôi cấy trong 3 giờ. Các tế bào đáp ứng của mỗi kiểu di chuyển từ ngăn trên đến ngăn dưới được phân tích bằng phân tích tế bào dòng chảy. Các kết quả được thể hiện trên Fig.13 và Fig.14. Trên Fig.13 và Fig.14, cột đen thể hiện các kết quả về các tế bào T biểu hiện CAR-IL-7/CCL19 kháng FITC và cột trắng thể hiện các kết quả về các tế bào T biểu hiện CAR kháng FITC. Trên Fig.13 và Fig.14 và Fig.15 được nêu sau đây, mỗi dữ liệu được thể hiện bằng giá trị trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn từ 3 lỗ. *: $P < 0,05$, **: $P < 0,01$, †: $P < 0,001$, ††: $P < 0,00001$, ‡: $P < 5 \times 10^{-5}$.

Kết quả

Các kết quả trên Fig.13 và Fig.14 thể hiện các tế bào T biểu hiện CAR-IL-7/CCL19 kháng FITC có khả năng tích lũy các tế bào T nội tại và các tế bào đuôi gai cao.

Thử nghiệm sự di chuyển của tế bào T sử dụng các tế bào T biểu hiện CAR-IL-7/CCL19 kháng CD20 của người

Mẫu chứa các tế bào T biểu hiện CAR-IL-7/CCL19 kháng CD20 của người (1×10^5 tế bào) được đồng nuôi cấy với P815-hCD20 được xử lý bằng mitomycin C ở ngăn dưới của Transwell. Vào ngày 3, 4×10^5 tế bào T được nhuộm màu xanh CytoTell được đặt ở ngăn trên và được nuôi cấy trong 3 giờ với sự có mặt của đối chứng isotyp IgG2a của chuột rattus, kháng thể đơn dòng kháng CD127 hoặc kháng thể đơn dòng kháng CCR7. Các tế bào T đáp ứng được di chuyển từ ngăn trên đến ngăn dưới được phân tích bằng phân tích tế bào dòng chảy. Các kết quả được thể hiện trên Fig.15. Trên Fig.15, “đối chứng isotyp.” thể hiện các kết quả thu được bằng cách kích thích bằng P815-hCD20 với sự có mặt của đối chứng isotyp IgG2a của chuột rattus, “kháng CD127” thể hiện các kết quả thu được bằng cách kích thích bằng

P815-hCD20 với sự có mặt của kháng thể trung hòa đơn dòng kháng CD127 và “kháng CCR7” thể hiện các kết quả thu được bằng cách kích thích bằng P815-hCD20 với sự có mặt của kháng thể trung hòa đơn dòng kháng CCR7. Trên Fig.15, cột đen thể hiện các kết quả về các tế bào T biểu hiện CAR-IL-7/CCL19 kháng CD20 của người và cột trắng thể hiện các kết quả về các tế bào T biểu hiện CAR kháng CD20 của người.

Kết quả

Như đã thấy từ các kết quả trên Fig.15, các tế bào T biểu hiện CAR-IL-7/CCL19 kháng CD20 của người cũng có khả năng tích lũy các tế bào T nội tại cao và sự tích lũy các tế bào T nội tại bị ức chế bởi kháng CCR7, thể hiện rằng sự tích lũy các tế bào T nội tại hoạt động thông qua thụ thể CCL19 của CCR7.

Các kết quả trên các hình vẽ từ Fig.9 đến Fig.15 thể hiện các tế bào T biểu hiện CAR-IL-7/CCL19 kháng FITC và các tế bào T biểu hiện CAR-IL-7/CCL19 kháng CD20 của người có các tác dụng quan trọng, không thể thiếu đối với việc tạo ra miễn dịch, của việc tăng sinh hiệu bằng IL-7, có tỷ lệ sống cao và tích lũy khu trú các tế bào T hoặc các tế bào đuôi gai đến ung thư bằng CCL19 và có tác dụng kích thích miễn dịch tốt. Nói chung, biểu hiện hai phân tử đối chứng, nghĩa là, “IL-7” và “CCL19”, trong tế bào T biểu hiện CAR được thể hiện là làm cải thiện khả năng tăng sinh, tỷ lệ sống và tác dụng kích thích miễn dịch của các tế bào T.

Ví dụ 6

Khả năng tăng sinh của các tế bào T

Mẫu chứa các tế bào T biểu hiện CAR-IL-7/CCL19 kháng FITC hoặc các tế bào T biểu hiện CAR kháng FITC đối chứng (5×10^5 tế bào) được nhuộm với CytoTell xanh (do AAT Bioquest, Inc. sản xuất), được kích thích bằng trastuzumab được gắn FITC cố định và sau đó được phân tích bằng phân tích tế bào dòng chảy. Các kết quả vào ngày 5 sau khi bắt đầu kích thích được thể hiện trên Fig.16 và các kết quả vào ngày 3 và 7 sau khi bắt đầu kích thích được thể hiện trên Fig.17. Trên Fig.16, các trị

số trên biểu đồ thể hiện số lượng phân chia tế bào. Trên Fig.16 và Fig.17, các trị số trên biểu đồ hình tròn thể hiện tỷ lệ của mỗi phần qua lỗ (0, 1, 2, 3 hoặc 4 > số lượng phân chia tế bào) với quần thể bạch cầu.

Kết quả

Các kết quả trên Fig.16 và Fig.17 thể hiện khả năng tăng sinh của các tế bào T biểu hiện CAR-IL-7/CCL19 kháng FITC tăng lên khi so sánh với các tế bào T biểu hiện CAR kháng FITC.

Ví dụ 7

Biểu hiện CD127 hoặc CCR7 trong các tế bào T, các tế bào đuôi gai và các tế bào T biểu hiện CAR

Các tế bào T lá lách chưa được kích thích (các tế bào T chưa tiếp xúc kháng nguyên), các tế bào T lá lách được kích thích bằng cách nuôi cấy trong 2 ngày với kháng thể đơn dòng kháng CD3, kháng thể đơn dòng kháng CD28 và IL-2 (các tế bào T đã hoạt hóa), các tế bào đuôi gai lá lách chưa được kích thích (các tế bào đuôi gai) và các tế bào T biểu hiện CAR kháng FITC (đối chứng) và các tế bào T biểu hiện CAR-IL-7/CCL19 kháng FITC (7×19) được tạo ra bằng cách hoạt hóa với cùng cách theo cách trong “tải nạp” các tế bào T của chuột” của ví dụ 1 được phân tích bằng phân tích tế bào dòng chảy và được đánh giá biểu hiện CD127 hoặc CCR7. Các tế bào T là quần thể $CD3^+CD19^-$, các tế bào T biểu hiện CAR kháng FITC và các tế bào T biểu hiện CAR-IL-7/CCL19 kháng FITC là các quần thể dương với các hạt FITC gắn dextran và các tế bào đuôi gai là quần thể $CD11c^+$. Các kết quả kiểm tra biểu hiện CD127 được thể hiện trên Fig.18 và các kết quả kiểm tra biểu hiện CCR7 được thể hiện trên Fig.19. Trên các hình vẽ này, các trị số thể hiện % của các tế bào dương, “đối chứng” thể hiện các kết quả về các tế bào T biểu hiện CAR kháng FITC và “7×19” thể hiện các kết quả về các tế bào T biểu hiện CAR-IL-7/CCL19 kháng FITC.

Kết quả

Như được thể hiện trên Fig.18, biểu hiện CD127 được chứng minh là giảm trong các tế bào T được hoạt hóa khi so sánh với các tế bào T chưa tiếp xúc kháng nguyên, nhưng thể hiện là nhiều hơn trong các tế bào T biểu hiện CAR-IL-7/CCL19 kháng FITC so với trong các tế bào T được hoạt hóa và để được phục hồi các tế bào T chưa tiếp xúc kháng nguyên. Như được thể hiện trên Fig.19, biểu hiện CCR7 giảm bằng cách hoạt hóa trong các tế bào T biểu hiện CAR-IL-7/CCL19 kháng FITC, nhưng thể hiện là cao xấp xỉ khoảng 67% biểu hiện trong các tế bào T chưa tiếp xúc kháng nguyên. Cho đến nay, đã biết rằng biểu hiện CD127 hoặc CCR7 giảm xuống khoảng từ 1/2 đến 1/3 bằng cách hoạt hóa trong các tế bào T. Do đó, ngay cả nếu các tế bào T biểu hiện CAR biểu hiện IL-7 hoặc CCL19 được tạo ra, các tác dụng của IL-7 và CCL19 được cho rằng giảm đi bằng cách hoạt hóa tế bào T biểu hiện CAR. Do đó, thông thường, biểu hiện IL-7 và CCL19 trong các tế bào T biểu hiện CAR có thể không được mong đợi sẽ tăng cường tác dụng kích thích miễn dịch hoặc tác dụng chống khối u của tế bào T biểu hiện CAR. Cũng trong thử nghiệm này, có thể xác nhận rằng biểu hiện CD127 hoặc CCR7 giảm tạm thời vào ngày 2 sau khi hoạt hóa các tế bào T lá lách. Tuy nhiên, biểu hiện CD127 hoặc CCR7 thể hiện là được khôi phục vào ngày 4 trong các tế bào T biểu hiện CAR-IL-7/CCL19 kháng FITC. Điều này thể hiện rằng biểu hiện IL-7 và CCL19 trong tế bào T biểu hiện CAR là hữu ích trong việc làm tăng tác dụng kích thích miễn dịch hoặc tác dụng chống khối u của chúng.

Ví dụ 8

Tác dụng trị liệu trong mô hình khối u của chuột

Sử dụng các tế bào T biểu hiện CAR-IL-7/CCL19 kháng CD20 của người cho chuột

5×10^5 tế bào u tế bào bón P815 được tái tổ hợp di truyền để biểu hiện CD20 của người (P815-hCD20) được tiêm dưới da cho mỗi con chuột mắc bệnh ung thư (DBA/2 của chuột). Sau 3 ngày, 3×10^6 tế bào T biểu hiện CAR-IL-7/CCL19 kháng CD20 của người hoặc các tế bào T biểu hiện CAR kháng CD20 của người được tiêm

trong tĩnh mạch cho chuột. Nhóm không được xử lý được thành lập làm đối chứng bằng cách tiêm u tế bào bón P815 cho mỗi con chuột và không thực hiện các xử lý sau đó (không sử dụng tế bào T biểu hiện CAR). Thể tích khối u của chuột và tỷ lệ sống được xác định hai lần mỗi tuần. Trong phân tích thể tích khối u, độ lệch chuẩn được tính cho mỗi nhóm thử nghiệm. Khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa 3 nhóm được nghiên cứu bằng thử nghiệm t Student cho phân tích thể tích khối u và thử nghiệm xếp hạng log để đánh giá tỷ lệ sống (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$).

Các kết quả kiểm tra thay đổi trong thể tích khối u của chuột được thể hiện trên Fig.20 và các kết quả kiểm tra tỷ lệ sống của chuột được thể hiện trên Fig.21. Trên Fig.20 và Fig.21, hình tròn màu trắng thể hiện các kết quả thu được bằng cách sử dụng các tế bào T biểu hiện CAR kháng CD20 của người, hình tròn màu đen thể hiện các kết quả thu được bằng cách sử dụng các tế bào T biểu hiện CAR-IL-7/CCL19 kháng CD20 của người và hình bình hành màu trắng thể hiện các kết quả thu được mà không sử dụng tế bào T biểu hiện CAR trong nhóm không được xử lý. Trên Fig.20, trục hoành thể hiện ngày sau khi tiêm tĩnh mạch các tế bào cho chuột và trục tung thể hiện thể tích khối u (mm^3). Trên Fig.21, trục hoành thể hiện tuần sau khi tiêm tĩnh mạch các tế bào cho chuột và trục tung thể hiện tỷ lệ sống (%).

Kết quả

Như được thể hiện trên Fig.20 và Fig.21, việc sử dụng các tế bào T biểu hiện CAR-IL-7/CCL19 kháng CD20 của người được xác nhận là thể hiện tác dụng làm giảm thể tích khối u và tăng tỷ lệ sống (tác dụng kéo dài khoảng thời gian sống) khi so sánh với việc sử dụng các tế bào T biểu hiện CAR kháng CD20 của người hoặc không sử dụng tế bào T biểu hiện CAR. Do đó, các tế bào T biểu hiện CAR-IL-7/CCL19 kháng CD20 của người thể hiện có tác dụng chống khối u tốt.

Cấy chuyển chất trị bệnh ung thư và các tế bào T biểu hiện CAR-IL-7/CCL19 kháng CD20 của người cho chuột)

5×10^5 tế bào P815-hCD20 được tiêm dưới da cho mỗi con chuột. Vào ngày 10 sau khi tiêm, chất trị bệnh ung thư xyclophosphamit (CPA, 100mg/kg) được sử dụng trong màng bụng và vào ngày 14, 1×10^6 tế bào T biểu hiện CAR-IL-7/CCL19 kháng CD20 của người hoặc các tế bào T biểu hiện CAR kháng CD20 của người được tiêm trong tĩnh mạch. Các kết quả kiểm tra tỷ lệ sống của chuột được thể hiện trên Fig.22 và các kết quả kiểm tra thể tích khối u của chúng được thể hiện trên Fig.23 và Fig.24. Trên các hình vẽ từ Fig.22 đến Fig.24, trục hoành thể hiện ngày sau khi tiêm dưới da P815-hCD20 (ngày tiêm dưới da P815-hCD20 cho chuột được tính là ngày 0) và trục tung thể hiện tỷ lệ sống (Fig.22) hoặc thể tích khối u (trục chính của khối u $\times$ (trục phụ của khối u)² /2 (mm³)) (Fig.23 và Fig.24). “Không điều trị” thể hiện các kết quả thu được ở nhóm không được điều trị, “CPA” thể hiện các kết quả thu được trong nhóm chỉ sử dụng CPA, “CPA+đối chứng” thể hiện các kết quả thu được trong nhóm sử dụng các tế bào T biểu hiện CAR kháng CD20 của người sau khi sử dụng CPA, “CPA+7 $\times$ 19” thể hiện các kết quả thu được trong nhóm sử dụng các tế bào T biểu hiện CAR-IL-7/CCL19 kháng CD20 của người sau khi sử dụng CPA và † thể hiện sự chết của chuột. Fig.24 là sơ đồ thể hiện 1/10 các trị số trên trục tung của biểu đồ CPA+7 $\times$ 19 trên Fig.23.

Kết quả

Như được thể hiện trên Fig.22, sử dụng kết hợp các tế bào T biểu hiện CAR-IL-7/CCL19 kháng CD20 của người theo sáng chế và chất trị bệnh ung thư đạt được tỷ lệ sống rất cao. Như được thể hiện trên Fig.23 và Fig.24, sử dụng kết hợp các tế bào T biểu hiện CAR-IL-7/CCL19 kháng CD20 của người theo sáng chế và chất trị bệnh ung thư đạt được sự biến mất hoàn toàn khối u. Như được thể hiện trên Fig.24, thể tích khối u là lớn nhất vào ngày 10 sau khi tiêm dưới da P815-hCD20. Theo khía cạnh này, trục phụ nằm trong khoảng từ 4,86mm đến 7,25mm, trục chính nằm trong khoảng từ 5,92mm đến 8,39mm và thể tích khối u nằm trong khoảng từ 69,91mm³ đến 220,50mm³ với trung bình là 140,02 mm³. Các kết quả được mô tả ở trên cũng thể hiện rằng khối u tăng sinh tạm thời sẽ biến mất bởi điều trị bằng các tế bào T biểu

hiện CAR-IL-7/CCL19 kháng CD20 của người. Trong trường hợp sử dụng tế bào T biểu hiện CAR theo sáng chế kết hợp với chất trị bệnh ung thư bổ sung, được ưu tiên, để tăng cường hơn tác dụng chống khối u của tế bào T biểu hiện CAR theo sáng chế, trước mắt là làm giảm số lượng tế bào limphô bằng cách sử dụng chất trị bệnh ung thư bổ sung và sau đó sử dụng các tế bào T biểu hiện CAR-IL-7/CCL19 kháng CD20 của người, như trong phương pháp được mô tả ở trên. Phương pháp này có thể tăng cường sự ổn định nội mô *in vivo* của tế bào T biểu hiện CAR.

Ví dụ 9

Tác dụng xâm nhập vào các mô của khối u

5×10^5 tế bào P815-hCD20 được tiêm dưới da cho mỗi con chuột. Vào ngày 3 sau khi tiêm, 1×10^6 tế bào T biểu hiện CAR-IL-7/CCL19 kháng CD20 của người được sử dụng. Vào ngày 21 sau khi tiêm, các mô của khối u được cắt. Mô của mỗi con chuột được chia thành hai phần. Một trong hai phần được nhuộm với hematoxylin-eosin (H&E) và phần còn lại được sử dụng trong phân tích hóa mô miễn dịch. Phân tích hóa mô miễn dịch được thực hiện sử dụng hỗn hợp các kháng thể đơn dòng kháng CD4 và kháng CD8 hoặc hỗn hợp các kháng thể đơn dòng kháng CD3 và kháng DEC205 làm các kháng thể sơ cấp. Alexa Fluor(R) 488 gắn kháng IgG2a của chuột *rattus* (màu xanh lục) và Alexa Fluor(R) 647 gắn kháng IgG2b của chuột *rattus* (màu đỏ) được sử dụng làm các kháng thể thứ cấp. Nhân của các tế bào được nhuộm với DAPI (màu xanh dương). Các mẫu được nhuộm H&E và các mảnh được gắn nhãn miễn dịch được quan sát dưới kính hiển vi ở độ phóng đại là $\times 100$ hoặc $\times 200$. CD4 và CD8 là các chỉ thị cho các tế bào T và DEC205 là chỉ thị cho các tế bào đuôi gai. Các kết quả nhuộm H&E được thể hiện trên Fig.25 và các kết quả phân tích hóa mô miễn dịch được thể hiện trên Fig.26(a) và Fig.26(b). Các kết quả định lượng vùng dương được gắn nhãn bằng mỗi kiểu nhuộm huỳnh quang (nhuộm CD4 (màu đỏ), nhuộm CD8 (màu xanh lục), nhuộm CD3 (màu đỏ), nhuộm DEC205 (màu xanh lục) và sự tồn tại đồng thời của CD3 và DEC205 (màu vàng)) trong dữ liệu trên Fig.26(a) và Fig.26(b) sử dụng chương trình đếm tế bào lai (do Keyence Corp. sản xuất) được

thể hiện lần lượt trên Fig.27(a) và Fig.27(b). Trên các hình vẽ từ Fig.25 đến Fig.27, “không được điều trị” hoặc “không điều trị” thể hiện các kết quả thu được ở nhóm không được điều trị, “đối chứng” thể hiện các kết quả thu được trong nhóm được điều trị bằng các tế bào T biểu hiện CAR kháng CD20 của người và 7×19 thể hiện nhóm được điều trị bằng các tế bào T biểu hiện CAR-IL-7/CCL19 kháng CD20 của người.

Kết quả

Từ các kết quả trên Fig.25, sự điều trị bằng các tế bào T biểu hiện CAR-IL-7/CCL19 kháng CD20 của người tăng cường hoại tử (các vùng được thể hiện bởi mũi tên) và các vùng mà nhân xuất hiện được quan sát. Các kết quả trên Fig.26(a) và Fig.27(a) thể hiện các tế bào T xâm nhập vào mô ung thư bằng cách điều trị bằng các tế bào T biểu hiện CAR-IL-7/CCL19 kháng CD20 của người. Các kết quả trên Fig.26(b) và Fig.27(b) thể hiện các tế bào đuôi gai cùng với các tế bào T xâm nhập vào mô ung thư bằng cách điều trị bằng các tế bào T biểu hiện CAR-IL-7/CCL19 kháng CD20 của người.

Ví dụ 10

Tác dụng trị liệu mang lại của hỗn hợp IL-7 và CCL19 lên khối u

5×10^5 tế bào P815-hCD20 được tiêm dưới da cho mỗi DBA/2 của chuột. Vào ngày 3 sau khi tiêm, 1×10^6 tế bào T biểu hiện CAR kháng CD20 của người, các tế bào T biểu hiện CAR-IL-7 kháng CD20 của người chỉ biểu hiện IL-7 làm yếu tố tăng cường chức năng miễn dịch (không biểu hiện CCL19), các tế bào T biểu hiện CAR-CCL19 kháng CD20 của người chỉ biểu hiện CCL19 làm yếu tố tăng cường chức năng miễn dịch (không biểu hiện IL-7) hoặc các tế bào T biểu hiện CAR-IL-7/CCL19 kháng CD20 của người biểu hiện IL-7 và CCL19 được tiêm trong tĩnh mạch ở đó. Nhóm chuột đối chứng được thiết lập mà không sử dụng các tế bào T biểu hiện CAR mà không biểu hiện IL-7 hoặc CCL19. Vào ngày 10 sau khi sử dụng, trực chính và trực phụ của khối u được xác định và thể tích khối u (mm^3) được tính theo cách giống cách ở trên. Các kết quả được thể hiện trên Fig.28. Trên Fig.28, “không điều trị” thể

hiện các kết quả thu được mà không sử dụng tế bào T biểu hiện CAR, “CAR đối chứng” thể hiện các kết quả thu được bằng cách sử dụng các tế bào T biểu hiện CAR kháng CD20 của người, “IL-7 CAR” thể hiện các kết quả thu được bằng cách sử dụng của các tế bào T biểu hiện CAR-IL-7 kháng CD20 của người, “CCL19 CAR” thể hiện các kết quả thu được bằng cách sử dụng các tế bào T biểu hiện CAR-CCL19 kháng CD20 của người và “IL-7/CCL19 CAR” thể hiện các kết quả thu được bằng cách sử dụng các tế bào T biểu hiện CAR-IL-7/CCL19 kháng CD20 của người.

Các tế bào T biểu hiện CAR-IL-7 kháng CD20 của người thu được bằng cách tạo ra vector pMSGV chứa kháng CD20 của người CAR-F2A-IL-7 (vector CAR biểu hiện IL-7 kháng CD20 của người) và chuyển vector này vào các tế bào T của chuột theo cách giống như trong “tải nạp các tế bào T của chuột” của ví dụ 1. Tương tự, các tế bào T biểu hiện CAR-CCL19 kháng CD20 của người thu được bằng cách tạo ra vector pMSGV chứa kháng CD20 của người CAR-F2A-CCL19 (vector CAR biểu hiện CCL19 kháng CD20 của người) và chuyển vector này vào các tế bào T của chuột theo cách giống như trong “tải nạp” các tế bào T của chuột” của ví dụ 1. Việc tạo ra mỗi vector được thực hiện theo phương pháp “tạo ra vector biểu hiện CAR kháng FITC biểu hiện IL-7 và CCL19” hoặc “tạo ra vector biểu hiện CAR kháng CD20 biểu hiện IL-7 và CCL19” của ví dụ 1. Trình tự của các vị trí từ 1 đến 462 và codon kết thúc sau các vị trí này trong SEQ ID NO: 9 được sử dụng là trình tự mã hóa IL-7. Trình tự của các vị trí từ 538 đến 864 trong SEQ ID NO: 9 được sử dụng là trình tự mã hóa CCL19. Các kết quả được thể hiện trên Fig.28.

Kết quả

Như được thể hiện trên Fig.28, việc dùng các tế bào T biểu hiện CAR-IL-7 kháng CD20 của người hoặc các tế bào T biểu hiện CAR-CCL19 kháng CD20 của người chỉ thể hiện tác dụng ức chế sinh trưởng của khối u bằng hoặc hơi thấp hơn so với việc sử dụng các tế bào T biểu hiện CAR kháng CD20 của người đối chứng, trong khi khối u hầu như biến mất bằng cách sử dụng các tế bào T biểu hiện CAR-IL-7/CCL19 kháng CD20 của người. Do đó, mặc dù chỉ IL-7 hoặc CCL19 khó có tác

dụng ức chế sinh trưởng của khối u, thì sự kết hợp của IL-7 và CCL19 tạo ra tác dụng ức chế sinh trưởng của khối u rất cao.

Ví dụ 11

Hoạt tính gây độc tế bào kháng lại tế bào khối u trong thử nghiệm giải phóng ^{51}Cr - 1

Lựa chọn yếu tố tăng cường chức năng miễn dịch của tế bào T

Trong vi môi trường của mô ung thư, tín hiệu ức chế được truyền dẫn đến tế bào miễn dịch sao cho đáp ứng miễn dịch chống khối u bị ức chế để từ đó làm giảm hiệu quả của liệu pháp miễn dịch. Các tín hiệu ức chế đến tế bào miễn dịch được chuyển bởi SHP-1 hoặc SHP-2. Do đó, trong liệu pháp tế bào T của ung thư, hiệu quả chống khối u có thể có khả năng cho phép bản thân các tế bào T tạo ra thể đột biến âm chiếm ưu thế ức chế tác dụng của SHP-1 hoặc SHP-2. Theo đó, vector biểu hiện đồng thời thể đột biến âm chiếm ưu thế ức chế tác dụng của SHP-1 hoặc SHP-2 và CAR được tạo ra và hoạt tính gây độc tế bào kháng lại tế bào khối u được kiểm tra.

Sản xuất vector biểu hiện CAR để biểu hiện thể đột biến âm chiếm ưu thế của SHP1 hoặc SHP2

Mảnh ADN mã hóa thể đột biến âm chiếm ưu thế của của chuột SHP1 (SHP1DN) chứa đột biến của gốc xystein xúc tác ở vị trí từ 453 đến serin (C453S) được tạo ra bằng đột biến điểm định vị bằng PCR. Mảnh ADN mã hóa thể đột biến âm chiếm ưu thế của chuột SHP2 (SHP2DN) chứa đột biến của gốc xystein xúc tác ở vị trí từ 459 đến serin (C459S) được tổng hợp bởi Life Technologies Corp. và được sử dụng. Trình tự nucleotit mã hóa SHP1DN của chuột được thể hiện trong SEQ ID NO: 11 và trình tự nucleotit mã hóa SHP2DN của chuột được thể hiện trong SEQ ID NO: 12. 3 bazơ ở các vị trí từ 1357 đến 1359 trong SEQ ID NO: 11 và ở các vị trí từ 1375 đến 1377 trong SEQ ID NO: 12 là các vị trí đột biến. Mảnh ADN mã hóa SHP1DN hoặc SHP2DN được chèn vào MCS của vector pMSGV chứa CAR-F2A-MCS kháng CD20 của người scFv trong quá trình tạo ra vector CAR kháng CD20 biểu hiện IL-7/CCL19 của người trong ví dụ 2 thu được lần lượt là vector CAR biểu

hiện SHP1DN kháng CD20 của người và vector CAR biểu hiện SHP2DN kháng CD20 của người. Bản đồ của vector thu được được thể hiện trên Fig.29.

Sự truyền dẫn của các tế bào T của chuột

Vector CAR biểu hiện SHP1DN kháng CD20 của người hoặc vector CAR biểu hiện SHP2DN kháng CD20 của người được truyền dẫn đến các tế bào T của chuột theo cách giống như trong ví dụ 1 để tạo ra lần lượt là các tế bào T biểu hiện CAR-SHP1DN kháng CD20 của người và các tế bào T biểu hiện CAR-SHP2DN kháng CD20 của người. Các tế bào T biểu hiện CAR kháng CD20 của người được tạo ra trong ví dụ 1 được sử dụng làm đối chứng.

Hoạt tính gây độc tế bào kháng lại tế bào khối u trong thử nghiệm giải phóng ^{51}Cr

Hoạt tính gây độc tế bào của tế bào T biểu hiện CAR kháng lại khối u được xác định bằng thử nghiệm giải phóng ^{51}Cr 4 giờ tiêu chuẩn. P815 biểu hiện CD20 của người (P815-hCD20) được sử dụng làm các tế bào khối u đích. Các tế bào khối u được thu hồi, được nuôi cấy ở 37°C trong 1 giờ với sự có mặt của $100\ \mu\text{Ci}\ \text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ và sau đó được rửa ba lần. Sau đó, các tế bào khối u được nuôi cấy đồng thời với các tế bào T biểu hiện CAR kháng CD20 của người, các tế bào T biểu hiện CAR-SHP1DN kháng CD20 của người hoặc các tế bào T biểu hiện CAR-SHP2DN kháng CD20 của người làm các tế bào T tác động. Tỷ lệ tác động/đích được thiết lập là 0,6, 1,25, 2,5, 5 hoặc 10. Mức giải phóng tối đa và giải phóng tự nhiên của các tế bào đích được xác định bằng cách nuôi cấy các tế bào trong môi trường nuôi cấy chứa Triton-X 10% (do Sigma-Aldrich Co. LLC. sản xuất) hoặc chỉ môi trường nuôi cấy. Sự giải phóng ^{51}Cr của dịch nổi được xác định sử dụng bộ đếm số TopCount (do PerkinElmer, Inc. sản xuất). Phần trăm của tính gây độc tế bào đặc hiệu được tính theo công thức: tính gây độc tế bào đặc hiệu (%) = [(giải phóng thử nghiệm - giải phóng tự nhiên) / (giải phóng tối đa - giải phóng tự nhiên)] $\times$ 100. Các kết quả được thể hiện trên Fig.30. Trên Fig.30(a), hình tròn màu trắng thể hiện các kết quả về các tế bào T biểu hiện CAR kháng CD20 của người và hình tròn màu đen thể hiện các kết

quả về các tế bào T biểu hiện CAR-SHP1DN kháng CD20 của người. Trên Fig.30(b), hình tròn màu trắng thể hiện các kết quả về các tế bào T biểu hiện CAR kháng CD20 của người và hình tròn màu đen thể hiện các kết quả về các tế bào T biểu hiện CAR-SHP2DN kháng CD20 của người. Trục hoành thể hiện tỷ lệ giữa thể tác động (các tế bào T) và thể đích (các tế bào khối u) bằng tỷ lệ E/T và trục tung thể hiện tính gây độc tế bào đặc hiệu (%). Khác biệt có ý nghĩa thống kê được nghiên cứu bởi thử nghiệm t Student (* $p < 0,05$).

Như được thể hiện trên Fig.30, các tế bào T biểu hiện CAR-SHP1DN kháng CD20 của người và các tế bào T biểu hiện CAR-SHP2DN kháng CD20 của người được thể hiện là có hoạt tính gây độc tế bào cao hơn đáng kể kháng lại tế bào khối u so với các tế bào T biểu hiện CAR kháng CD20 của người.

Ví dụ 12

Hoạt tính gây độc tế bào kháng lại tế bào khối u trong thử nghiệm giải phóng ^{51}Cr -2

P815-hCD20 (1×10^4 tế bào/giếng) được trộn với các tế bào T biểu hiện CAR kháng FITC (đối chứng, tròn) hoặc các tế bào T biểu hiện CAR-IL-7/CCL19 kháng FITC (7×19 , vuông) với tỷ lệ thể tác động/thể đích (E/T) là 0,15625, 0,3125, 0,625, 2,5, 5 hoặc 10 với sự có mặt của rituximab không được gắn nhãn (Ab, trắng) hoặc FITC gắn (FITC-Ab, đen). Theo cách giống cách ở trên, sự giải phóng ^{51}Cr của dịch nổi được xác định và phần trăm của hoạt tính gây độc tế bào được tính toán. Các kết quả được thể hiện trên Fig.31. Trên Fig.31, “hình tròn màu đen” thể hiện các kết quả thu được bằng cách trộn các tế bào T biểu hiện CAR kháng FITC với sự có mặt của rituximab liên kết FITC, “hình tròn màu trắng” thể hiện các kết quả thu được bằng cách trộn các tế bào T biểu hiện CAR kháng FITC với sự có mặt của rituximab không được gắn nhãn, “hình vuông đen” thể hiện các kết quả thu được bằng cách trộn các tế bào T biểu hiện CAR-IL-7/CCL19 kháng FITC với sự có mặt của rituximab liên kết FITC và “hình vuông trắng” thể hiện các kết quả thu được bằng cách trộn các tế bào T biểu hiện CAR-IL-7/CCL19 kháng FITC với sự có mặt của rituximab không được gắn nhãn.

815-hCD20 (1×10^4 tế bào/giếng) được trộn với các tế bào T biểu hiện CAR kháng CD20 của người hoặc các tế bào T biểu hiện CAR-IL-7/CCL19 kháng CD20 của người với tỷ lệ thể tích tác động/thể tích đích (E/T) là 0,3125, 0,625, 2,5, 5, 10 hoặc 20. Theo cách giống cách ở trên, sự giải phóng ^{51}Cr của dịch nổi được xác định và phần trăm của hoạt tính gây độc tế bào được tính toán. Các kết quả được thể hiện trên Fig.32. Trên Fig.32, “hình tròn màu đen” thể hiện các kết quả thu được bằng cách trộn các tế bào T biểu hiện CAR-IL-7/CCL19 kháng CD20 của người và “hình tròn màu trắng” thể hiện các kết quả thu được bằng cách trộn các tế bào T biểu hiện CAR kháng CD20 của người.

Kết quả

Như được thể hiện trên Fig.31 và Fig.32, các tế bào T biểu hiện CAR-IL-7/CCL19 kháng FITC thể hiện sự duy trì hoạt tính gây độc tế bào mỗi tế bào kháng lại tế bào khối u ở cùng mức độ với các tế bào T biểu hiện CAR kháng FITC. Tương tự, các tế bào T biểu hiện CAR-IL-7/CCL19 kháng CD20 của người thể hiện sự duy trì hoạt tính gây độc tế bào mỗi tế bào kháng lại tế bào khối u ở cùng mức độ với các tế bào T biểu hiện CAR kháng CD20 của người.

Ví dụ 13

Sự sống *in vivo* của các tế bào T biểu hiện CAR và biệt hóa thành các tế bào T nhớ

Phân tích tế bào dòng chảy

5×10^5 tế bào P815-hCD20 được tiêm dưới da cho mỗi con chuột DBA/2. Vào ngày 10 sau khi tiêm, chất trị bệnh ung thư cyclophosphamit (CPA, 100mg/kg) được sử dụng trong màng bụng và vào ngày 14, 1×10^6 tế bào T biểu hiện CAR-IL-7/CCL19 kháng CD20 của người hoặc các tế bào T biểu hiện CAR kháng CD20 của người được tiêm trong tĩnh mạch. Vào ngày 21 sau khi sử dụng tế bào T biểu hiện CAR, bạch cầu được phân lập từ lá lách hoặc vùng hạch bạch huyết của khối u (khu vực cận dưới, cánh tay trên và vùng háng). Các kết quả phân tích CD4, CD8, CD44 và CD62L cho các kiểu hình bề mặt của bạch cầu bằng phân tích tế bào dòng chảy được thể hiện trên Fig.33. Bạch cầu lá lách được kích thích bằng cách nuôi cấy trong

4 ngày với P815-hCD20 được xử lý bằng mitomycin C. Các kết quả kiểm tra sự tăng sinh của các tế bào T bằng phân tích tế bào dòng chảy được thể hiện trên Fig.34. Biểu hiện CAR được xác nhận sử dụng protein L biotinyl hóa và APC gắn streptavidin. Trên Fig.33, các số thể hiện tỷ lệ của các vùng giếng tương ứng trên các tế bào T $CD4^+$ và các tế bào T $CD8^+$ ($CD62L^+CD44^-$: các tế bào T chưa tiếp xúc kháng nguyên, $CD62L^+CD44^+$: các tế bào T nhớ trung tâm, $CD62L^-CD44^+$: các tế bào T nhớ tác động). Trên Fig.34, các số thể hiện tỷ lệ của protein L-các tế bào T dương. Trên Fig.33 và Fig.34, “đối chứng” thể hiện các kết quả về các tế bào T biểu hiện CAR kháng CD20 của người và “7×19” thể hiện các kết quả về các tế bào T biểu hiện CAR-IL-7/CCL19 kháng CD20 của người.

Kết quả

Các kết quả được thể hiện trên Fig.33 và Fig.34 thể hiện rằng các tế bào T nhớ tăng lên trong lá lách và hạch bạch huyết của chuột được dùng các tế bào T biểu hiện CAR-IL-7/CCL19 kháng CD20 của người và các tế bào T biểu hiện CAR-IL-7/CCL19 kháng CD20 của người sống trong chuột tăng sinh mạnh bằng cách nuôi cấy đồng thời với các tế bào khối u biểu hiện CD20 của người. Cùng với các kết quả tỷ lệ sống trên Fig.21 và Fig.22, các kết quả này gợi ý rằng tế bào T biểu hiện CAR theo sáng chế sống hiệu quả *in vivo* ở thể nhận và còn có khả năng diệt tế bào ung thư và tăng cường tỷ lệ sống bằng cách trở thành các tế bào T nhớ và thể hiện rằng tế bào T biểu hiện CAR theo sáng chế còn có tác dụng phòng chống tái phát bệnh ung thư.

Khả năng áp dụng công nghiệp

Sử dụng vector biểu hiện CAR theo sáng chế cho phép tạo ra các tế bào CAR-T có cả khả năng sống và khả năng tích lũy các tế bào limphô và các tế bào CAR-T có khả năng kháng ức chế miễn dịch trong vi môi trường ung thư. Do đó, vector biểu hiện CAR theo sáng chế có thể áp dụng vào lĩnh vực liệu pháp miễn dịch điều trị bệnh ung thư.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Vectơ biểu hiện thụ thể của kháng nguyên khảm (chimeric antigen receptor: CAR) chứa axit nucleic mã hóa thụ thể của kháng nguyên khảm và axit nucleic mã hóa yếu tố tăng cường chức năng miễn dịch của tế bào T, trong đó axit nucleic mã hóa yếu tố tăng cường chức năng miễn dịch tế bào T là axit nucleic mã hóa interleukin-7 và axit nucleic mã hóa CCL19.
2. Vectơ biểu hiện CAR theo điểm 1, trong đó axit nucleic mã hóa CAR và axit nucleic mã hóa yếu tố tăng cường chức năng miễn dịch của tế bào T được liên kết bằng trình tự mã hóa peptit tự phân cắt.
3. Vectơ biểu hiện CAR theo điểm 1 hoặc 2, trong đó axit nucleic mã hóa interleukin-7 và axit nucleic mã hóa CCL19 được liên kết bằng trình tự mã hóa peptit tự phân cắt.
4. Vectơ biểu hiện CAR theo điểm 1, 2 hoặc 3, trong đó axit nucleic mã hóa CAR chứa axit nucleic mã hóa polypeptit của kháng thể chuỗi đơn nhận diện FITC hoặc CD20.
5. Vectơ biểu hiện CAR theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó axit nucleic mã hóa CAR chứa axit nucleic mã hóa polypeptit của vùng xuyên màng CD8.
6. Vectơ biểu hiện CAR theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong đó axit nucleic mã hóa CAR chứa axit nucleic mã hóa polypeptit của vùng nội bào CD28, vùng nội bào 4-1BB và vùng nội bào CD3ζ.
7. Tế bào T biểu hiện CAR được đưa vào vectơ (a) hoặc (b) sau đây:
 - (a) vectơ biểu hiện CAR theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6;
 - (b) vectơ biểu hiện CAR chứa axit nucleic mã hóa CAR và axit nucleic mã hóa interleukin-7 và vectơ biểu hiện CAR chứa axit nucleic mã hóa CAR và axit nucleic mã hóa CCL19.
8. Chất trị bệnh ung thư chứa tế bào T biểu hiện CAR theo điểm 7 và chất phụ gia được dùng.

9. Tế bào T, trong đó tế bào này biểu hiện CAR, interleukin-7 và CCL19.
10. Chất trị bệnh ung thư chứa tế bào T theo điểm 9 và chất phụ gia được dụng.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> YAMAGUCHI UNIVERSITY

<120> VECTO BIỂU HIỆN THỤ THỂ CỦA KHÁNG NGUYÊN KHÂM (CAR) VÀ TẾ BÀO T
BIỂU HIỆN THỤ THỂ CỦA KHÁNG NGUYÊN KHÂM NÀY

<130> FH26-030WO

<150> JP 2014-208200

<151> 2014-10-09

<160> 12

<170> Patent ở phiên bản 3.1

<210> 1

<211> 8

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> vùng cắt peptit 2A

<220>

<223> Tác giả sáng chế: Tamada, Koji

Tác giả sáng chế: Sakoda, Yukimi

Tác giả sáng chế: Adachi, Keishi

<220>

<221> Đặc tính khác

<222> (2) .. (2)

<223> Val hoặc Ile

<220>

<221> Đặc tính khác

<222> (4) .. (4)

<223> axit amin bất kỳ

<400> 1

Asp Xaa Glu Xaa Asn Pro Gly Pro

1

5

<210> 2

<211> 25

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> 2Apeptit (F2A)

<400> 2

Gly Ser Gly Val Lys Gln Thr Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala
 1 5 10 15

Gly Asp Val Glu Ser Asn Pro Gly Pro
 20 25

<210> 3

<211> 177

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> IL-7 ở người

<400> 3

Met Phe His Val Ser Phe Arg Tyr Ile Phe Gly Leu Pro Pro Leu Ile
 1 5 10 15
 Leu Val Leu Leu Pro Val Ala Ser Ser Asp Cys Asp Ile Glu Gly Lys
 20 25 30
 Asp Gly Lys Gln Tyr Glu Ser Val Leu Met Val Ser Ile Asp Gln Leu
 35 40 45
 Leu Asp Ser Met Lys Glu Ile Gly Ser Asn Cys Leu Asn Asn Glu Phe
 50 55 60
 Asn Phe Phe Lys Arg His Ile Cys Asp Ala Asn Lys Glu Gly Met Phe
 65 70 75 80
 Leu Phe Arg Ala Ala Arg Lys Leu Arg Gln Phe Leu Lys Met Asn Ser
 85 90 95
 Thr Gly Asp Phe Asp Leu His Leu Leu Lys Val Ser Glu Gly Thr Thr
 100 105 110
 Ile Leu Leu Asn Cys Thr Gly Gln Val Lys Gly Arg Lys Pro Ala Ala
 115 120 125
 Leu Gly Glu Ala Gln Pro Thr Lys Ser Leu Glu Glu Asn Lys Ser Leu
 130 135 140
 Lys Glu Gln Lys Lys Leu Asn Asp Leu Cys Phe Leu Lys Arg Leu Leu
 145 150 155 160
 Gln Glu Ile Lys Thr Cys Trp Asn Lys Ile Leu Met Gly Thr Lys Glu
 165 170 175
 His

<210> 4

<211> 98

<212> PRT
 <213> nhân tạo

<220>
 <223> CCL19 ở người

<400> 4

```

Met Ala Leu Leu Leu Ala Leu Ser Leu Leu Val Leu Trp Thr Ser Pro
1           5           10           15
Ala Pro Thr Leu Ser Gly Thr Asn Asp Ala Glu Asp Cys Cys Leu Ser
           20           25           30
Val Thr Gln Lys Pro Ile Pro Gly Tyr Ile Val Arg Asn Phe His Tyr
           35           40           45
Leu Leu Ile Lys Asp Gly Cys Arg Val Pro Ala Val Val Phe Thr Thr
           50           55           60
Leu Arg Gly Arg Gln Leu Cys Ala Pro Pro Asp Gln Pro Trp Val Glu
65           70           75           80
Arg Ile Ile Gln Arg Leu Gln Arg Thr Ser Ala Lys Met Lys Arg Arg
           85           90           95
Ser Ser

```

<210> 5
 <211> 595
 <212> PRT
 <213> nhân tạo

<220>
 <223> SHP1DN ở người

<400> 5

```

Met Val Arg Trp Phe His Arg Asp Leu Ser Gly Leu Asp Ala Glu Thr
1           5           10           15
Leu Leu Lys Gly Arg Gly Val His Gly Ser Phe Leu Ala Arg Pro Ser
           20           25           30
Arg Lys Asn Gln Gly Asp Phe Ser Leu Ser Val Arg Val Gly Asp Gln
           35           40           45
Val Thr His Ile Arg Ile Gln Asn Ser Gly Asp Phe Tyr Asp Leu Tyr
           50           55           60
Gly Gly Glu Lys Phe Ala Thr Leu Thr Glu Leu Val Glu Tyr Tyr Thr
65           70           75           80
Gln Gln Gln Gly Val Leu Gln Asp Arg Asp Gly Thr Ile Ile His Leu
           85           90           95
Lys Tyr Pro Leu Asn Cys Ser Asp Pro Thr Ser Glu Arg Trp Tyr His
           100          105          110
Gly His Met Ser Gly Gly Gln Ala Glu Thr Leu Leu Gln Ala Lys Gly
           115          120          125

```

Glu	Pro	Trp	Thr	Phe	Leu	Val	Arg	Glu	Ser	Leu	Ser	Gln	Pro	Gly	Asp	130	135	140	
Phe	Val	Leu	Ser	Val	Leu	Ser	Asp	Gln	Pro	Lys	Ala	Gly	Pro	Gly	Ser	145	150	155	160
Pro	Leu	Arg	Val	Thr	His	Ile	Lys	Val	Met	Cys	Glu	Gly	Gly	Arg	Tyr	165	170	175	
Thr	Val	Gly	Gly	Leu	Glu	Thr	Phe	Asp	Ser	Leu	Thr	Asp	Leu	Val	Glu	180	185	190	
His	Phe	Lys	Lys	Thr	Gly	Ile	Glu	Glu	Ala	Ser	Gly	Ala	Phe	Val	Tyr	195	200	205	
Leu	Arg	Gln	Pro	Tyr	Tyr	Ala	Thr	Arg	Val	Asn	Ala	Ala	Asp	Ile	Glu	210	215	220	
Asn	Arg	Val	Leu	Glu	Leu	Asn	Lys	Lys	Gln	Glu	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	225	230	235	240
Lys	Ala	Gly	Phe	Trp	Glu	Glu	Phe	Glu	Ser	Leu	Gln	Lys	Gln	Glu	Val	245	250	255	
Lys	Asn	Leu	His	Gln	Arg	Leu	Glu	Gly	Gln	Arg	Pro	Glu	Asn	Lys	Gly	260	265	270	
Lys	Asn	Arg	Tyr	Lys	Asn	Ile	Leu	Pro	Phe	Asp	His	Ser	Arg	Val	Ile	275	280	285	
Leu	Gln	Gly	Arg	Asp	Ser	Asn	Ile	Pro	Gly	Ser	Asp	Tyr	Ile	Asn	Ala	290	295	300	
Asn	Tyr	Ile	Lys	Asn	Gln	Leu	Leu	Gly	Pro	Asp	Glu	Asn	Ala	Lys	Thr	305	310	315	320
Tyr	Ile	Ala	Ser	Gln	Gly	Cys	Leu	Glu	Ala	Thr	Val	Asn	Asp	Phe	Trp	325	330	335	
Gln	Met	Ala	Trp	Gln	Glu	Asn	Ser	Arg	Val	Ile	Val	Met	Thr	Thr	Arg	340	345	350	
Glu	Val	Glu	Lys	Gly	Arg	Asn	Lys	Cys	Val	Pro	Tyr	Trp	Pro	Glu	Val	355	360	365	
Gly	Met	Gln	Arg	Ala	Tyr	Gly	Pro	Tyr	Ser	Val	Thr	Asn	Cys	Gly	Glu	370	375	380	
His	Asp	Thr	Thr	Glu	Tyr	Lys	Leu	Arg	Thr	Leu	Gln	Val	Ser	Pro	Leu	385	390	395	400
Asp	Asn	Gly	Asp	Leu	Ile	Arg	Glu	Ile	Trp	His	Tyr	Gln	Tyr	Leu	Ser	405	410	415	
Trp	Pro	Asp	His	Gly	Val	Pro	Ser	Glu	Pro	Gly	Gly	Val	Leu	Ser	Phe	420	425	430	
Leu	Asp	Gln	Ile	Asn	Gln	Arg	Gln	Glu	Ser	Leu	Pro	His	Ala	Gly	Pro	435	440	445	
Ile	Ile	Val	His	Ser	Ser	Ala	Gly	Ile	Gly	Arg	Thr	Gly	Thr	Ile	Ile	450	455	460	
Val	Ile	Asp	Met	Leu	Met	Glu	Asn	Ile	Ser	Thr	Lys	Gly	Leu	Asp	Cys	465	470	475	480
Asp	Ile	Asp	Ile	Gln	Lys	Thr	Ile	Gln	Met	Val	Arg	Ala	Gln	Arg	Ser	485	490	495	
Gly	Met	Val	Gln	Thr	Glu	Ala	Gln	Tyr	Lys	Phe	Ile	Tyr	Val	Ala	Ile	500	505	510	

21834

Ala Gln Phe Ile Glu Thr Thr Lys Lys Lys Leu Glu Val Leu Gln Ser
515 520 525
Gln Lys Gly Gln Glu Ser Glu Tyr Gly Asn Ile Thr Tyr Pro Pro Ala
530 535 540
Met Lys Asn Ala His Ala Lys Ala Ser Arg Thr Ser Ser Lys His Lys
545 550 555 560
Glu Asp Val Tyr Glu Asn Leu His Thr Lys Asn Lys Arg Glu Glu Lys
565 570 575
Val Lys Lys Gln Arg Ser Ala Asp Lys Glu Lys Ser Lys Gly Ser Leu
580 585 590
Lys Arg Lys
595

<210> 6
<211> 593
<212> PRT
<213> nhân tạo

<220>
<223> SHP2DN ở người

<400> 6

Met Thr Ser Arg Arg Trp Phe His Pro Asn Ile Thr Gly Val Glu Ala
1 5 10 15
Glu Asn Leu Leu Leu Thr Arg Gly Val Asp Gly Ser Phe Leu Ala Arg
20 25 30
Pro Ser Lys Ser Asn Pro Gly Asp Phe Thr Leu Ser Val Arg Arg Asn
35 40 45
Gly Ala Val Thr His Ile Lys Ile Gln Asn Thr Gly Asp Tyr Tyr Asp
50 55 60
Leu Tyr Gly Gly Glu Lys Phe Ala Thr Leu Ala Glu Leu Val Gln Tyr
65 70 75 80
Tyr Met Glu His His Gly Gln Leu Lys Glu Lys Asn Gly Asp Val Ile
85 90 95
Glu Leu Lys Tyr Pro Leu Asn Cys Ala Asp Pro Thr Ser Glu Arg Trp
100 105 110
Phe His Gly His Leu Ser Gly Lys Glu Ala Glu Lys Leu Leu Thr Glu
115 120 125
Lys Gly Lys His Gly Ser Phe Leu Val Arg Glu Ser Gln Ser His Pro
130 135 140
Gly Asp Phe Val Leu Ser Val Arg Thr Gly Asp Asp Lys Gly Glu Ser
145 150 155 160
Asn Asp Gly Lys Ser Lys Val Thr His Val Met Ile Arg Cys Gln Glu
165 170 175
Leu Lys Tyr Asp Val Gly Gly Gly Glu Arg Phe Asp Ser Leu Thr Asp
180 185 190
Leu Val Glu His Tyr Lys Lys Asn Pro Met Val Glu Thr Leu Gly Thr

195	200	205
Val Leu Gln Leu Lys Gln Pro	Leu Asn Thr Thr Arg	Ile Asn Ala Ala
210	215	220
Glu Ile Glu Ser Arg Val Arg	Glu Leu Ser Lys Leu Ala	Glu Thr Thr
225	230	235
Asp Lys Val Lys Gln Gly Phe	Trp Glu Glu Phe Glu Thr	Leu Gln Gln
245	250	255
Gln Glu Cys Lys Leu Leu Tyr	Ser Arg Lys Glu Gly Gln	Arg Gln Glu
260	265	270
Asn Lys Asn Lys Asn Arg Tyr	Lys Asn Ile Leu Pro Phe	Asp His Thr
275	280	285
Arg Val Val Leu His Asp Gly	Asp Pro Asn Glu Pro Val	Ser Asp Tyr
290	295	300
Ile Asn Ala Asn Ile Ile Met	Pro Glu Phe Glu Thr Lys	Cys Asn Asn
305	310	315
Ser Lys Pro Lys Lys Ser Tyr	Ile Ala Thr Gln Gly Cys	Leu Gln Asn
325	330	335
Thr Val Asn Asp Phe Trp Arg	Met Val Phe Gln Glu Asn	Ser Arg Val
340	345	350
Ile Val Met Thr Thr Lys Glu	Val Glu Arg Gly Lys Ser	Lys Cys Val
355	360	365
Lys Tyr Trp Pro Asp Glu Tyr	Ala Leu Lys Glu Tyr Gly	Val Met Arg
370	375	380
Val Arg Asn Val Lys Glu Ser	Ala Ala His Asp Tyr Thr	Leu Arg Glu
385	390	395
Leu Lys Leu Ser Lys Val Gly	Gln Gly Asn Thr Glu Arg	Thr Val Trp
405	410	415
Gln Tyr His Phe Arg Thr Trp	Pro Asp His Gly Val Pro	Ser Asp Pro
420	425	430
Gly Gly Val Leu Asp Phe Leu	Glu Glu Val His His Lys	Gln Glu Ser
435	440	445
Ile Met Asp Ala Gly Pro Val	Val Val His Ser Ser Ala	Gly Ile Gly
450	455	460
Arg Thr Gly Thr Phe Ile Val	Ile Asp Ile Leu Ile Asp	Ile Ile Arg
465	470	475
Glu Lys Gly Val Asp Cys Asp	Ile Asp Val Pro Lys Thr	Ile Gln Met
485	490	495
Val Arg Ser Gln Arg Ser Gly	Met Val Gln Thr Glu Ala	Gln Tyr Arg
500	505	510
Phe Ile Tyr Met Ala Val Gln	His Tyr Ile Glu Thr Leu	Gln Arg Arg
515	520	525
Ile Glu Glu Glu Gln Lys Ser	Lys Arg Lys Gly His Glu	Tyr Thr Asn
530	535	540
Ile Lys Tyr Ser Leu Ala Asp	Gln Thr Ser Gly Asp Gln	Ser Pro Leu
545	550	555
Pro Pro Cys Thr Pro Thr Pro	Pro Cys Ala Glu Met Arg	Glu Asp Ser
565	570	575
Ala Arg Val Tyr Glu Asn Val	Gly Leu Met Gln Gln Gln	Lys Ser Phe

	580	585	590
Arg			
<210>	7		
<211>	1674		
<212>	ADN		
<213>	nhân tạo		
<220>			
<223>	CAR kháng-FITC		
<400>	7		
	atggagttgc ctgtaggtt gttggtgctg atgttctgga ttcttgcctc cagcagtgat		60
	gtcgtgatga cccaaactcc actctccctg cctgtcagtc ttggagatca agcctccatc		120
	tcttgcagat ctagtcagag ccttgtacac agtaatggaa acacctatctt acgttggtac		180
	ctgcagaagc caggccagtc tccaaaggctc ctgatctaca aagtttccaa ccgattttct		240
	gggggtcccag acagggttcag tggcagtgga tcagggacag atttcacact caagatcagc		300
	agagtggagg ctgaggatct gggagtttat ttctgctctc aaagtacaca tgttccgtgg		360
	acgttcggtg gaggcaccaa gctggaaatc aaaagtagtg ctgatgatgc taagaaggat		420
	gctgctaaga aggatgatgc taagaaggat gatgctaaga aggatgggga ggtgaagctg		480
	gatgagactg gaggaggctt ggtgcaacct gggaggccca tgaaactctc ctgtgttgcc		540
	tctggattca ctttttagtga ctactggatg aactgggtcc gccagtctcc agagaaagga		600
	ctggagtggg tagcacaat tagaaacaaa ccttataatt atgaaacata ttattcagat		660
	tctgtgaaag gcagattcac catctcaaga gatgattcca aaagtagtgt ctacctgcaa		720
	atgaacaact taagagttga agacatgggt atctattact gtacgggttc ttactatggt		780
	atggactact ggggtcaagg aacctcagtc accgtctccg cggccgcagt cgtgccagtc		840
	cttcagaaag tgaactctac tactaccaag ccagtgtctgc gaactccctc acctgtgcac		900
	cctaccggga catctcagcc ccagagacca gaagattgtc ggccccgtgg ctcagtgaag		960
	gggaccggat tggacttcgc ctgtgatatt tacatctggg cacccttggc cggaatctgc		1020
	gtggccccctc tgctgtcctt gatcatcact ctcatctgct accacaggag ccgaaatagt		1080

agaaggaaca gactccttca aagtgactac atgaacatga ctccccggag gcctgggctc 1140
 actcgaaagc cttaccagcc ctacgcccct gccagagact ttgcagcgta ccgccccaaa 1200
 tggatcagga aaaaattccc ccacatattc aagcaaccat ttaagaagac cactggagca 1260
 gctcaagagg aagatgcttg tagctgccga tgtccacagg aagaagaagg aggaggagga 1320
 ggctatgagc tgagagcaaa attcagcagg agtgcagaga ctgctgccaa cctgcaggac 1380
 cccaaccagc tctacaatga gctcaatcta gggcgaagag aggaatatga cgtcttgagg 1440
 aagaagcggg ctcgggatcc agagatggga ggcaaacagc agaggaggag gaacccccag 1500
 gaaggcgtat acaatgcact gcagaaagac aagatggcag aagcctacag tgagatcggc 1560
 acaaaaggcg agaggcggag aggcaagggg cacgatggcc tttaccaggg tctcagcact 1620
 gccaccaagg acacctatga tgccctgcat atgcagaccc tggcccctcg ctaa 1674

<210> 8
 <211> 146
 <212> ADN
 <213> nhân tạo

<220>
 <223> F2A-MCS

<400> 8

ggaagcggag tgaaacagac tttgaatttt gaccttctca agttggcggg agacgtggag 60
 tccaaccctg gaccatgcat aaaaagctta aaccagttaa ctggaaaacg cgtaaagtcg 120
 acaaaggcca aaaaggccaa cgtacg 146

<210> 9
 <211> 864
 <212> ADN
 <213> nhân tạo

<220>
 <223> IL-7-F2A của chuột-CCL19 của chuột

<400> 9

atgttccatg tttcttttag atatatcttt ggaattcctc cactgacctt tgttctgctg 60

cctgtcacat catctgagtg ccacattaaa gacaaagaag gttaaagcata tgagagtgtg 120
 ctgatgatca gcatcgatga attggacaaa atgacaggaa ctgatagtaa ttgcccgaat 180
 aatgaaccaa acttttttag aaaacatgta tgtgatgata caaaggaagc tgcttttcta 240
 aatcgtgctg ctcgcaagtt gaagcaattt cttaaaatga atatcagtga agaattcaat 300
 gtccacttac taacagtatc acaaggcaca caaactctgg tgaactgcac aagtaaggaa 360
 gaaaaaaacg taaaggaaca gaaaaagaat gacgcatgtt tcctaaagag actactgaga 420
 gaaataaaaa cttgttggaa taaaattttg aagggcagta taggaagcgg agtgaaacag 480
 actttgaatt ttgaccttct caagttggcg ggagacgtgg agtccaaccc tggacctatg 540
 gccccccgtg tgacccact cctggccttc agcctgctgg ttctctggac cttcccagcc 600
 ccaactctgg ggggtgctaa tgatgcggaa gactgctgcc tgtctgtgac ccagcgcccc 660
 atccctggga acatcgtgaa agccttccgc taccttctta atgaagatgg ctgcaggggtg 720
 cctgctgttg tgttcaccac actaaggggc tatcagctct gtgcacctcc agaccagccc 780
 tgggtggatc gcatcatccg aagactgaag aagtcttctg ccaagaacaa aggcaacagc 840
 accagaagga gccctgtgtc ttga 864

<210> 10

<211> 783

<212> ADN

<213> nhân tạo

<220>

<223> scFv kháng CD20 ở người

<400> 10

atggactgga cctggcggat cctgttctctg gtggctgctg ctacaggcgc ccacagccag 60
 atcgtgctgt ctcagtctcc cgccatcctg tctgctagcc ctggcgagaa agtgaccatg 120
 acctgcagag ccagcagcag cgtgtcctac atccactggg tccagcagaa gcccggcagc 180
 agccccaagc cttggatcta cgccacaagc aacctggcct ctggcgtgcc agtgcggttt 240
 agcggctctg gctctggcac cagctacagc ctgaccatca gcagagtgga agccgaggac 300

gccgccacct actactgtca gcagtggacc agcaaccccc ccacattcgg cggaggcacc 360
 aagctggaaa tcaagggcgg aggcggatct ggcggcggag gatctggggg aggcggctct 420
 caggtgcagc tgcagcagcc tggcgctgag ctctgtaaac ctggcgccctc cgtgaagatg 480
 agctgcaagg ccagcggcta caccttcaca agctacaaca tgcactgggt caagcagacc 540
 cctggcagag gcctggaatg gatcggcgct atctaccccg gcaacggcga cacctcctac 600
 aaccagaagt tcaagggcaa ggccaccctg accgccgaca agagcagcag cacagcctac 660
 atgcagctgt cctccctgac cagcgaggac agcgccgtgt actactgcgc cagatctacc 720
 tactacggcg gcgactggta cttcaacgtg tggggcgctg gcaccaccgt gaccgtgtct 780
 gct 783

<210> 11
 <211> 1788
 <212> ADN
 <213> nhân tạo

<220>
 <223> SHP1DN của chuột

<400> 11

atggtgaggt ggtttcaccg ggacctcagc gggcctgatg cagagaccct gctgaagggc 60
 cggggagtc cttgggagctt cctggctcgg cccagccgca agaaccaggg tgacttctcc 120
 ctctcagtca ggggtgatga tcaggtgact catattcgga tccagaactc aggggacttc 180
 tatgacctgt acggagggga gaagtttgcg acgctgacag agctggtcga gtattacacg 240
 cagcagcagg gcattcctgca ggaccgagat ggcaccatca tccaccttaa gtaccactg 300
 aactgctcgg accccaccag tgagaggtgg taccacggcc acatatctgg agggcaggcg 360
 gagtcaactg tgcaggccaa gggcgagccc tggacatttc ttgtgcgtga gagtctcagc 420
 caacctgggtg attttgtgct ctctgtgctc aatgaccagc ccaaggctgg cccaggttcc 480
 ccgctcaggg tcactcatat caaggttatg tgtgaggggtg gacgctatac tgtgggtggc 540
 tcagagacgt ttgacagcct cacagacctg gtggagcact tcaagaagac agggattgag 600

gaggcctcgg gtgcctttgt ctacctgcgg cagccttact acgctactcg ggtaaacgca 660
 gctgacattg agaatcgggt cttggaactg aacaagaagc aggagtcgga ggacacagcc 720
 aaggctggct tctgggagga gtttgagagt ctacaaaagc aggaggtaaa gaatctacac 780
 caacgtctgg aagggcagcg gccagagaac aagagcaaga accgctacaa gaacattctt 840
 ccctttgacc acagccgagt gatcctgcag ggacgtgaca gtaacatccc aggctctgac 900
 tacatcaatg ccaactacgt gaagaaccag ctgctaggtc cagatgagaa ctctaagacc 960
 tacatcgcca gccagggctg tctggatgcc acagtcaatg acttctggca gatggcttgg 1020
 caggagaaca ctcgtgtcat cgtcatgact accagagagg tggagaaagg ccggaacaaa 1080
 tgtgtcccat actggcccgga ggtgggcact cagcgtgtct atgggtctcta ctctgtgacc 1140
 aacagtaggg agcatgacac agcagaatac aaactgcgaa cattacagat ctccccacta 1200
 gacaatgggg acctggttcg ggagatatgg cactaccagt acctgagctg gcctgaccat 1260
 ggggttccca gtgagcctgg ggggtgtcctc agctttctgg atcagatcaa ccagcgacag 1320
 gaaagtttgc ctcatgcagg gcccatcatt gtgcattcca gcgctggcat cggccgcacg 1380
 ggcaccatca tcgtcattga tatgcttatg gaaagcatct ccaccaaggg gctagactgt 1440
 gacattgata tccagaagac catccagatg gtacgagcac agcgctccgg catgggtgcag 1500
 accgaggccc agtacaagtt tatttacgtg gccattgccc agttcatcga aacgaccaag 1560
 aagaaactgg agatcataca atcccagaag ggccaggagt cggagtatgg gaatatcacg 1620
 taccctcccg ctgtgaggag tgcccacgcc aaagcctcgc gtacttcctc caagcacaag 1680
 gaggaggtgt acgaaaacgt gcatagcaag agcaagaagg aagagaaagt aaagaagcag 1740
 cggtcggcag acaaggagaa gaacaaaggt tctctcaaga ggaagtga 1788

<210> 12

<211> 1782

<212> ADN

<213> nhân tạo

<220>

<223> SHP2DN của chuột

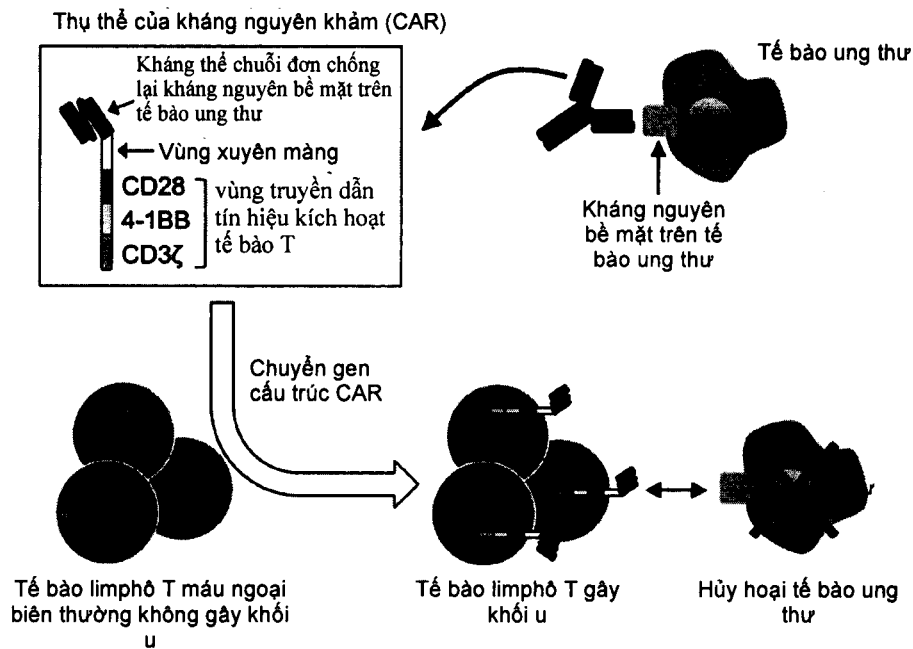
<400> 12

atgacatcgc ggagatgggt tcacccaac atcactgggtg tggaggcaga gaatctcctg	60
ctgaccagag gagtcatgg cagtttttta gcaaggccca gtaagagtaa ccttggagac	120
ttcactctgt ctgttagaag aaatggagct gttaccaca tcaagattca gaacactggg	180
gactactatg acctctatgg tggggagaag tttgccactt tggctgaact ggttcagtat	240
tacatggaac accatgggca gctgaaagag aagaatggag atgttatcga gctcaagtac	300
ccgctgaact gtgcagaccc tacctctgaa aggtggttcc atggtcactt gtctggaaaa	360
gaagcagaga agctgctgac ggagaagggc aagcatggca gcttcctcgt tcgagagagc	420
cagagccacc ccggagactt cgttctctcc gtgcgcactg gtgacgacaa aggggagagc	480
aacgacggca agtccaaagt gaccacgctc atgatccgct gtcaggagct gaaatacgac	540
gttggtgggg gagagcgctt tgactctctg acagacctgg tggagcatta caagaagaac	600
cccatgggtg agacgctggg cacagtcctg cagctcaagc agccctcaa cacaactcgt	660
atcaatgctg ctgaaattga aagccgggtt cgagagttaa gcaagctggc tgagaccaca	720
gataaagtca agcagggctt ttgggaagag tttgagacgc tccagcaaca ggaatgcaaa	780
cttctctata gccgaaaaga aggacagaga caagaaaata aaaacaaaaa cagatacaaa	840
aacatcctgc cctttgatca taccaggtc gttctgcatg atggggatcc caatgagcct	900
gtttctgatt acattaatgc aaacatcatc atgcctgagt ttgagaccaa gtgcaacaat	960
tccaaacca aaaagagtta cattgccact caaggctgcc tgcagaacac ggtgaatgac	1020
ttctggcgga tgggtgtcca ggagaactct cgagtcattg tcatgaccac aaaggaagtg	1080
gagagaggga agagcaaagtg tgtcaagtac tggcctgatg agtatgcgct caaagaatac	1140
ggggtcatgc gtgttaggaa cgtcaaagaa agtgccgcc atgactacac ttacgagag	1200
ctcaaactct ctaaggctcg acaaggaaac acagagagaa ccgtctggca gtaccacttt	1260
cggacctggc cagaccatgg cgtgcctagt gaccctggag gtgtgctgga cttcctggag	1320

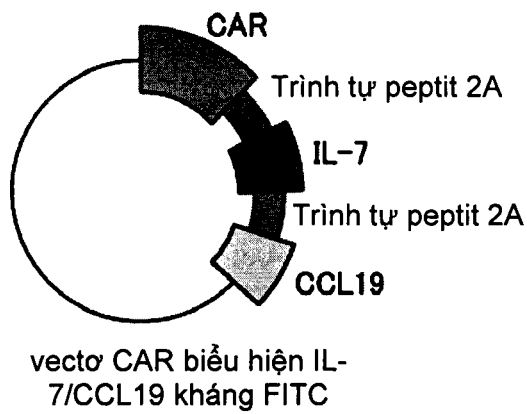
21834

gagggtccacc acaagcagga gagcatcgtg gatgcaggcc ctgtcgtggt tcactccagc	1380
gctgggattg gccggacagg aaccttcatt gtgattgaca tccttattga catcattcga	1440
gagaaaggtg tggactgtga catcgacgtt cctaaaacca ttcagatggt gcggtcccag	1500
aggtcgggga tgggtccagac agaagcacag taccggttta tctacatggc tgtccagcac	1560
tacatagaga cgctgcagcg ccggatcgag gaggagcaga aaagcaaaag aaaaggacat	1620
gaatatacca atattaagta ttccttggtg gaccagacaa gtggtgatca gagtcccctg	1680
ccaccctgca cccaacgcc accctgtgca gaaatgaggg aggacagcgc ccgagtctat	1740
gagaacgtgg gcctcatgca gcagcagagg agtttcagat ga	1782

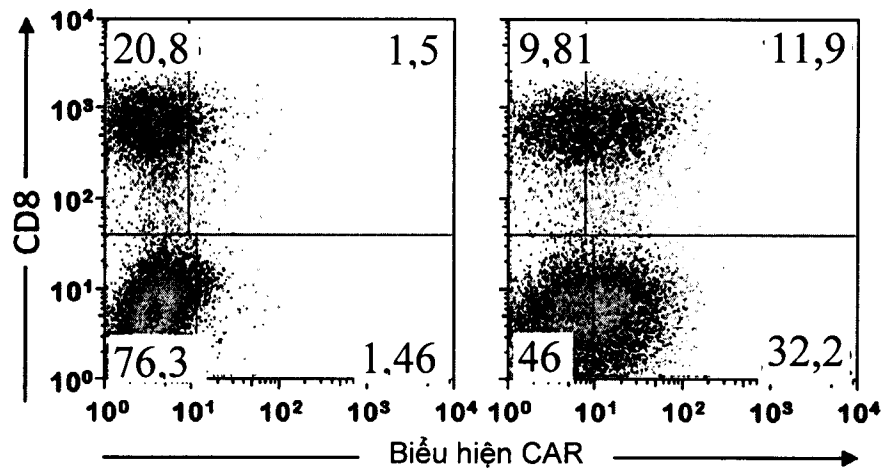
[Fig. 1]



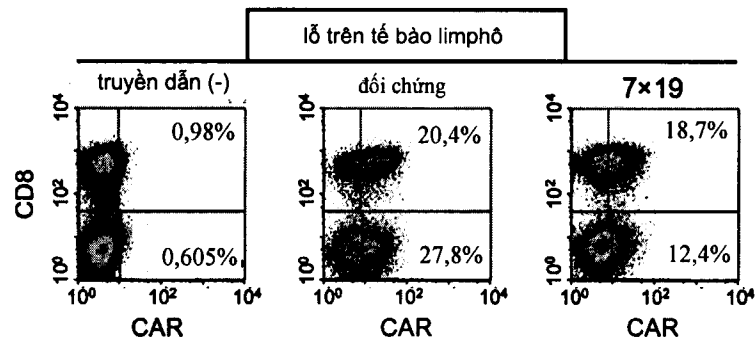
[Fig. 2]



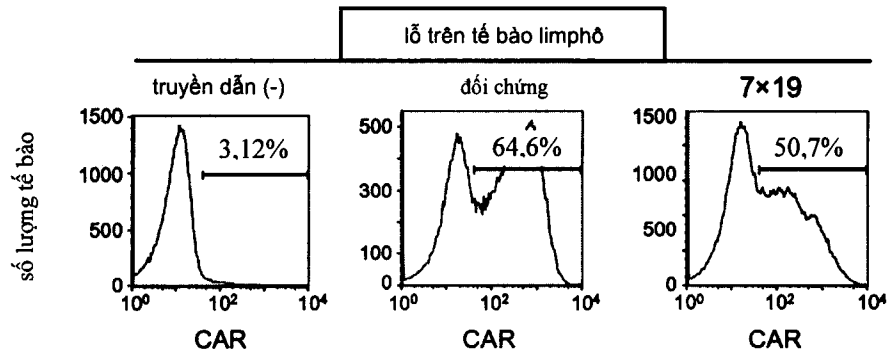
[Fig. 3]



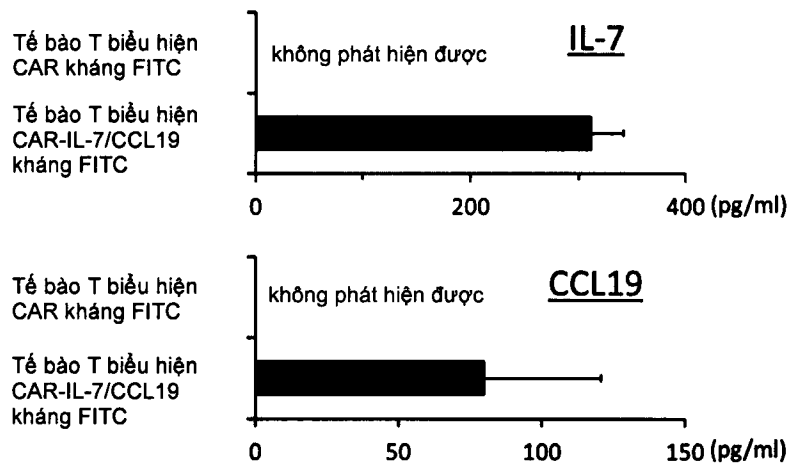
[Fig. 4]



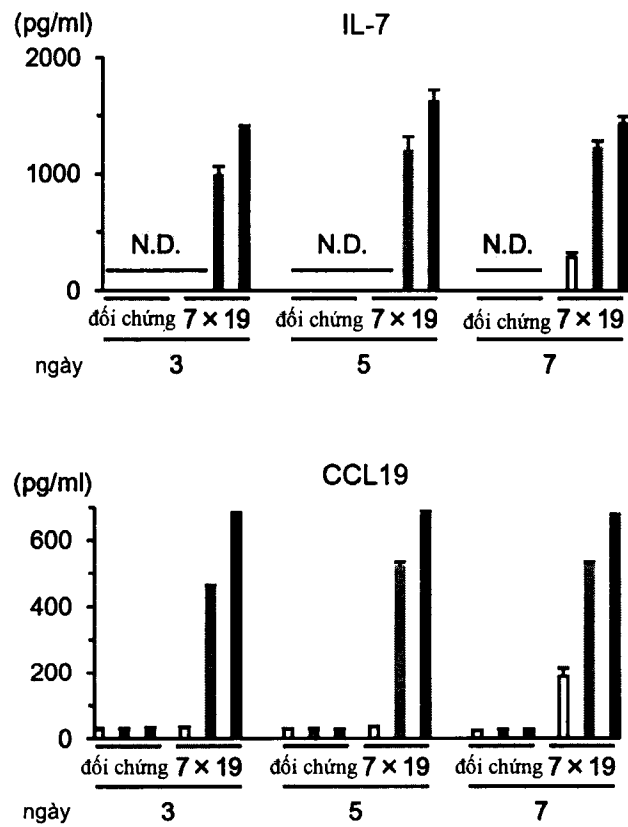
[Fig. 5]



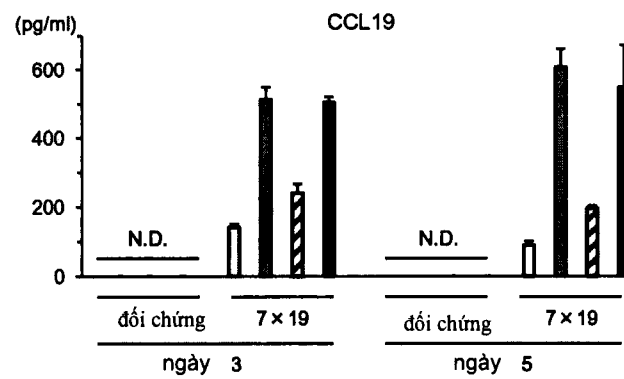
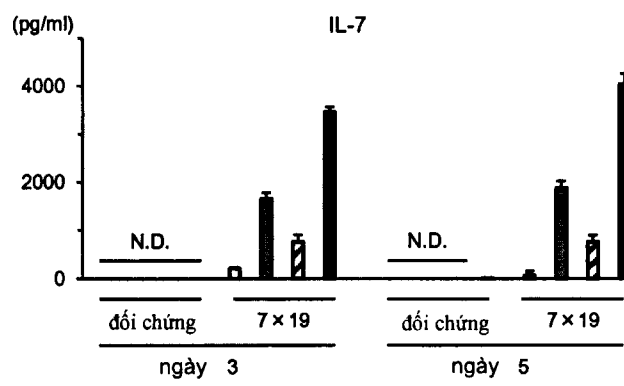
[Fig. 6]



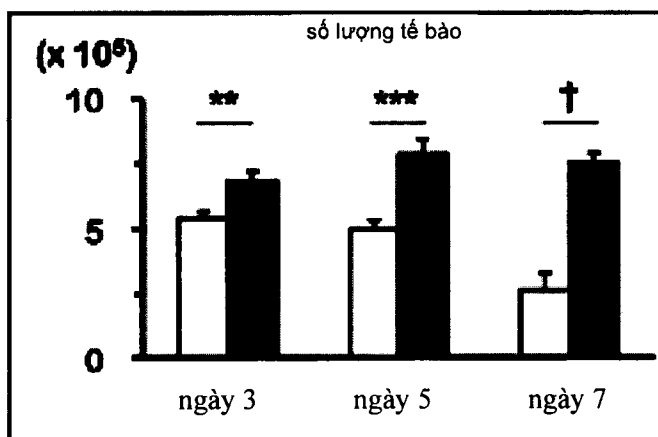
[Fig. 7]



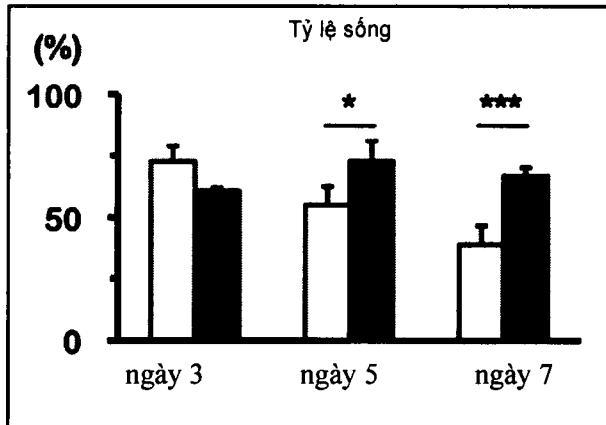
[Fig. 8]



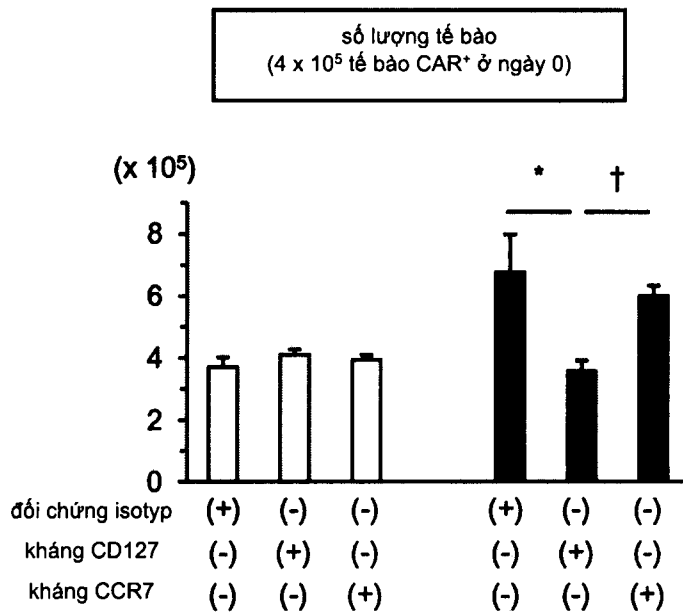
[Fig. 9]



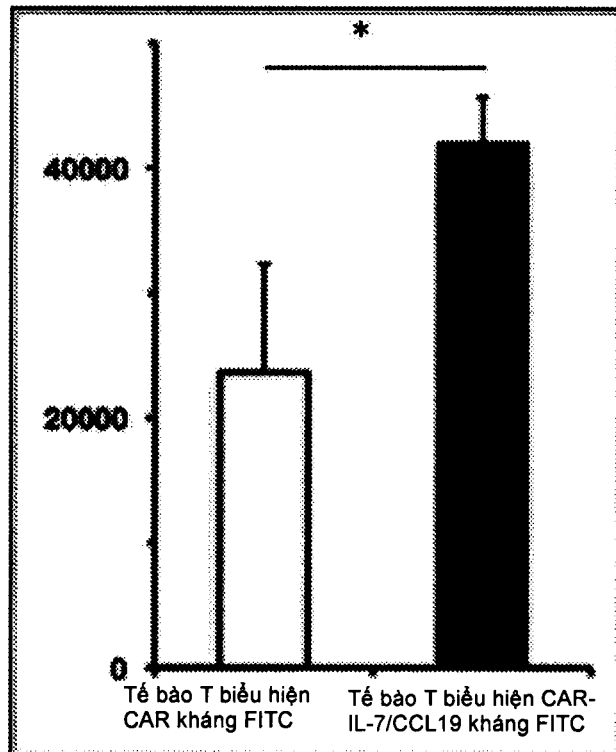
[Fig. 10]



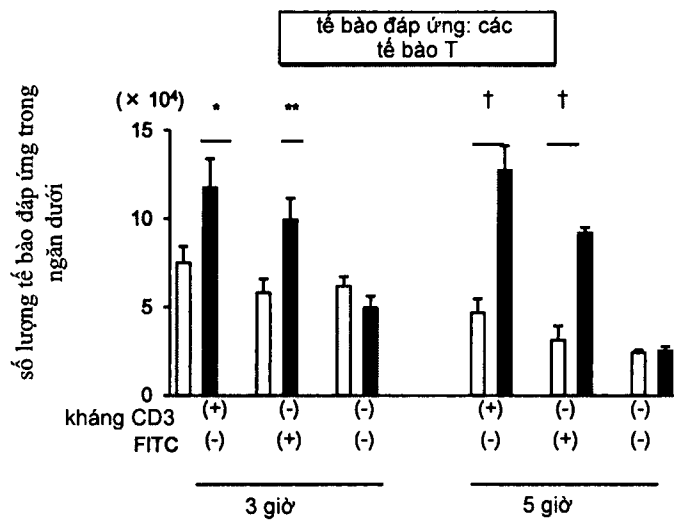
[Fig. 11]



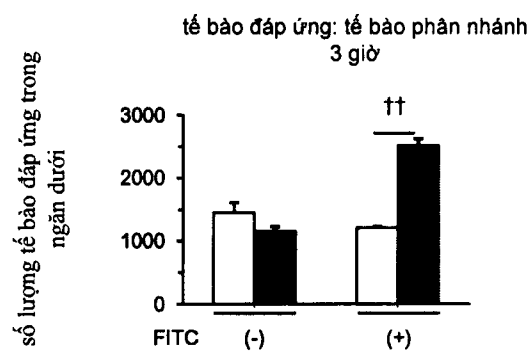
[Fig. 12]



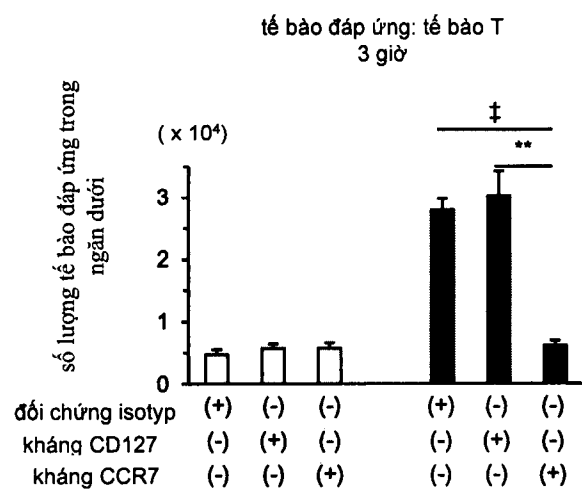
[Fig. 13]



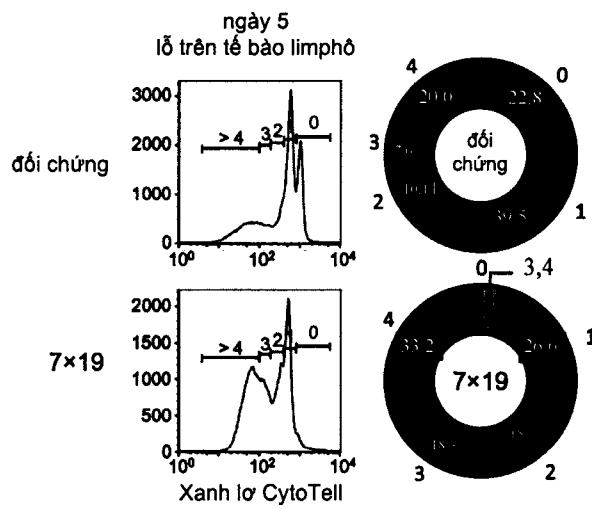
[Fig. 14]



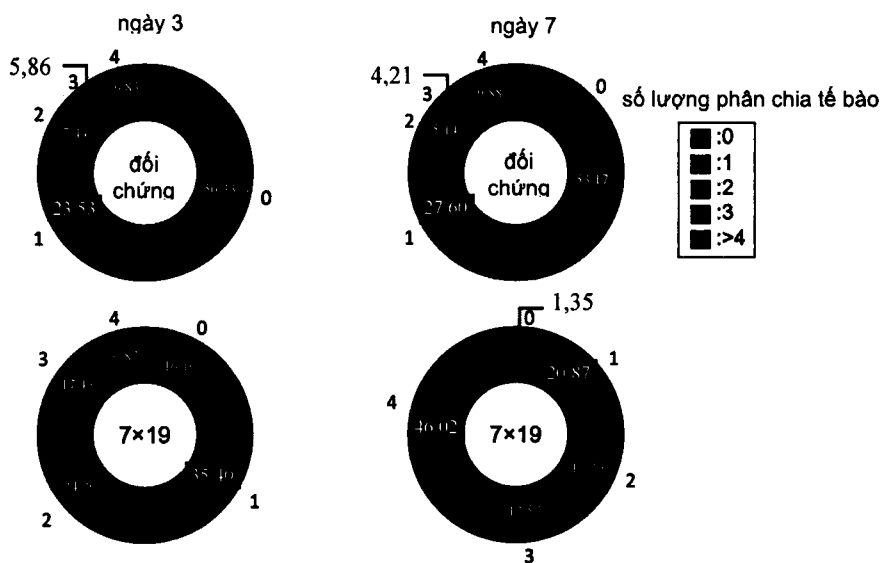
[Fig. 15]



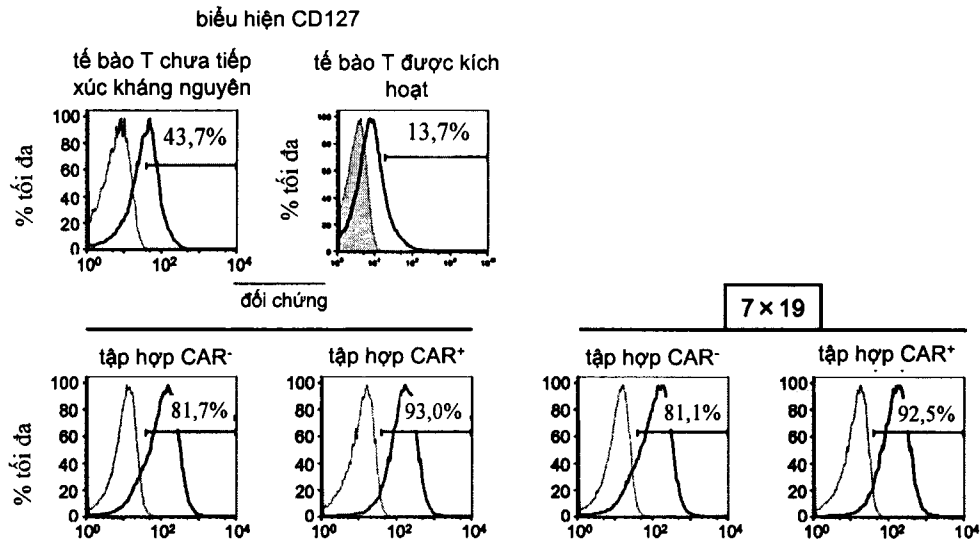
[Fig. 16]



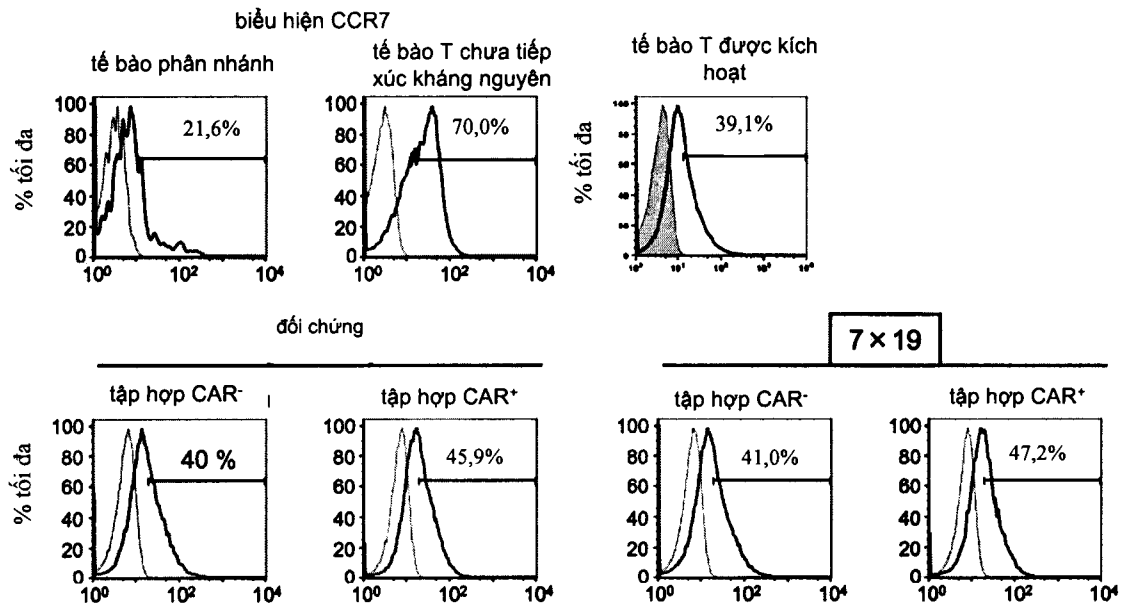
[Fig. 17]



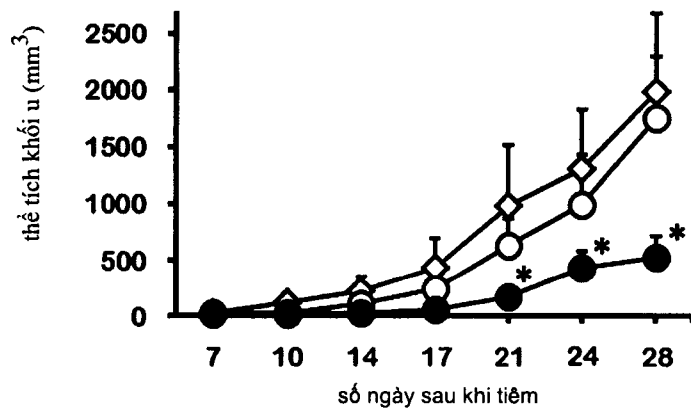
[Fig. 18]



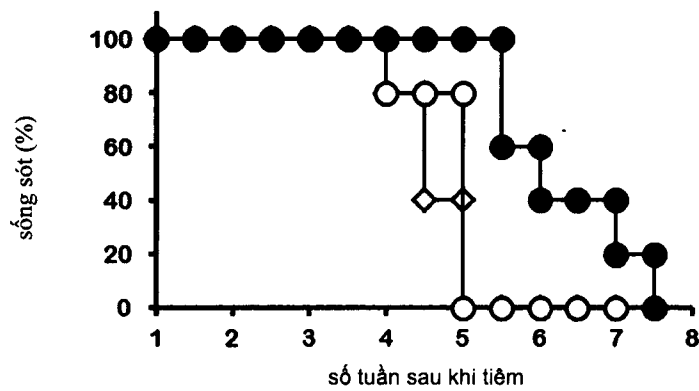
[Fig. 19]



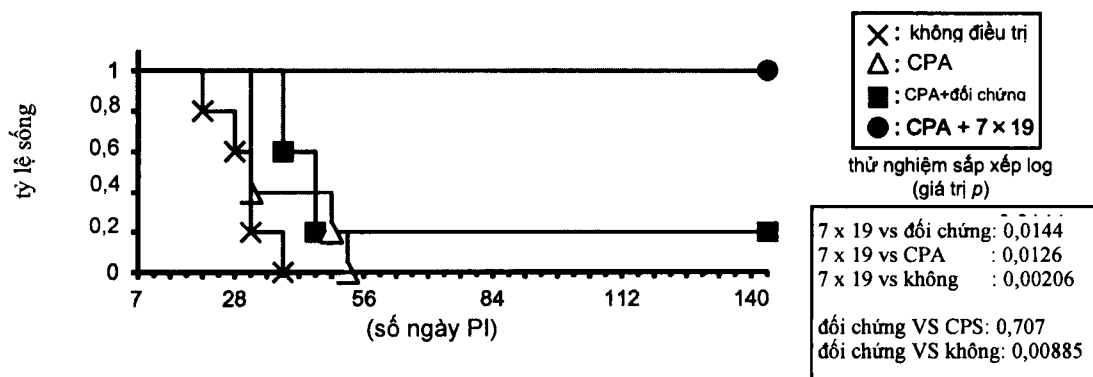
[Fig. 20]



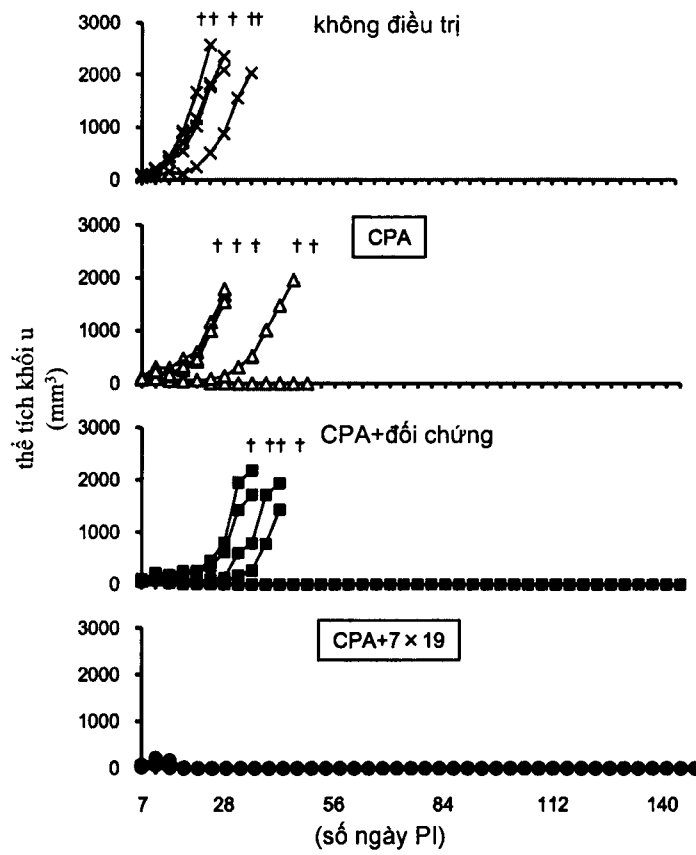
[Fig. 21]



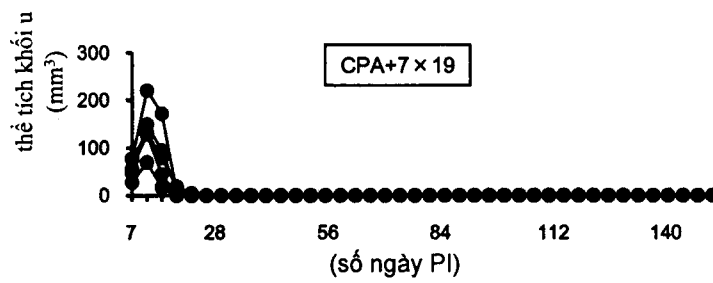
[Fig. 22]



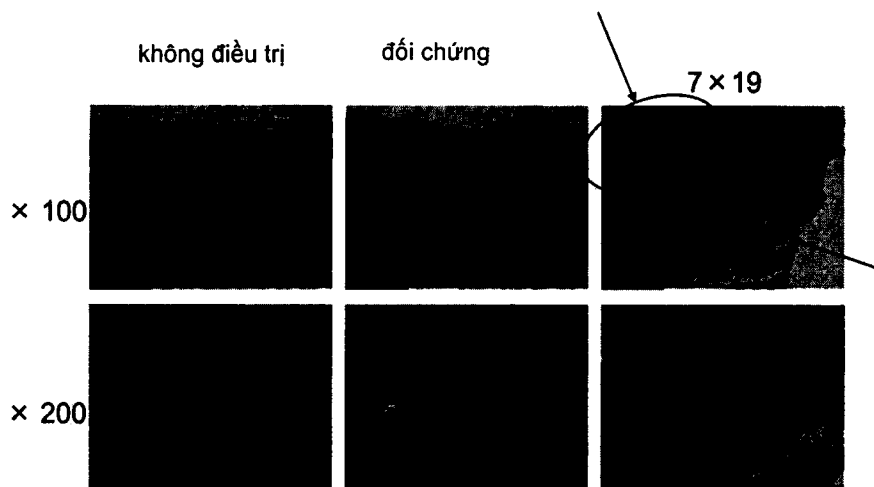
[Fig. 23]



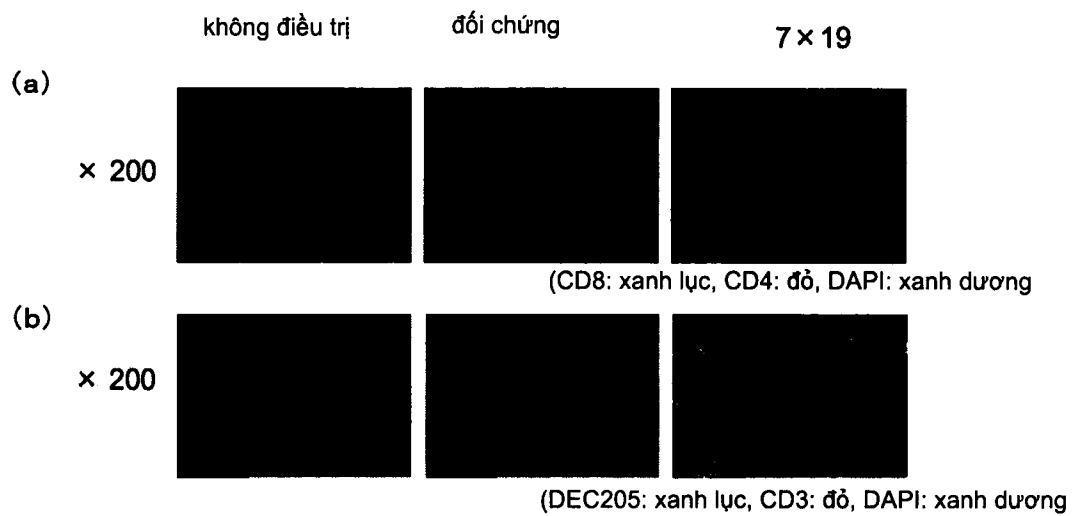
[Fig. 24]



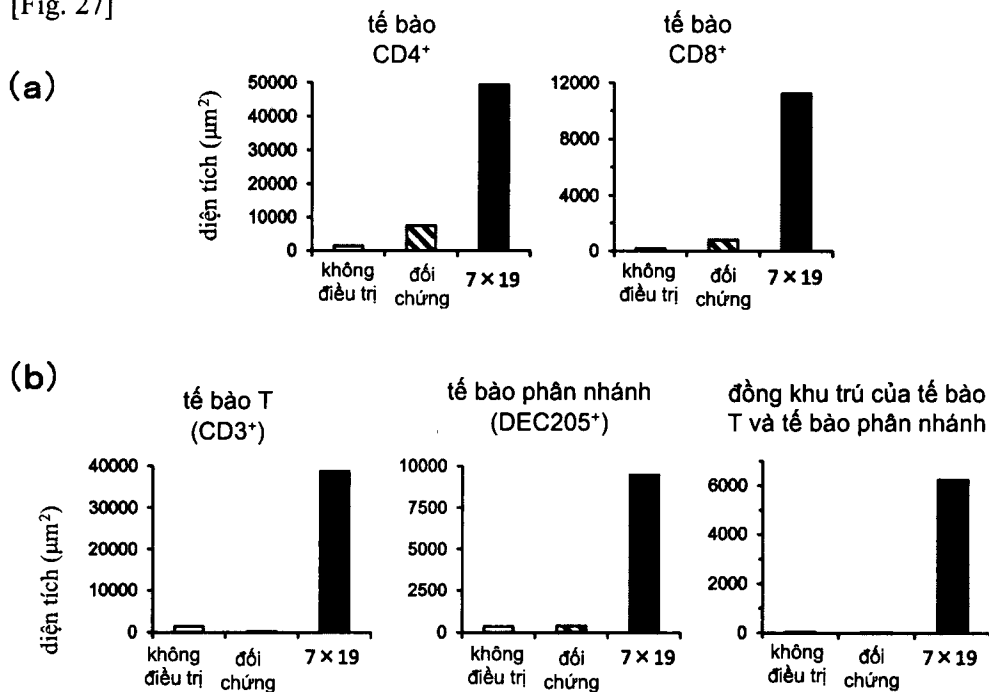
[Fig. 25]



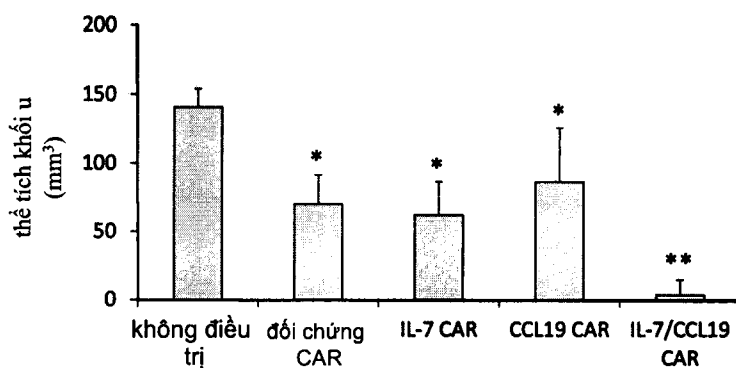
[Fig. 26]



[Fig. 27]



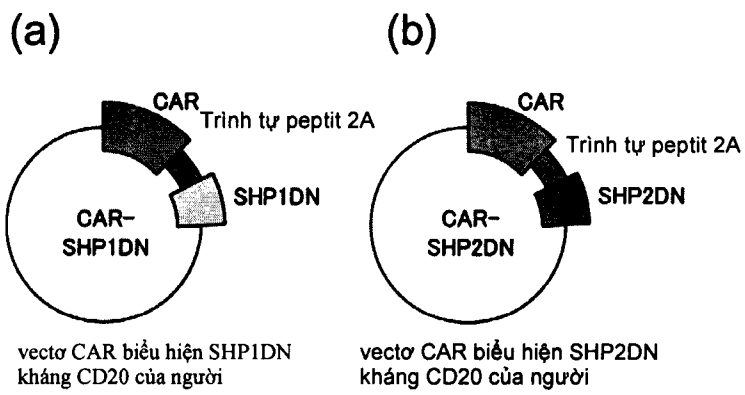
[Fig. 28]



* có ý nghĩa về mặt thống kê ($p < 0,05$) so với nhóm không điều trị bằng thử nghiệm t Student

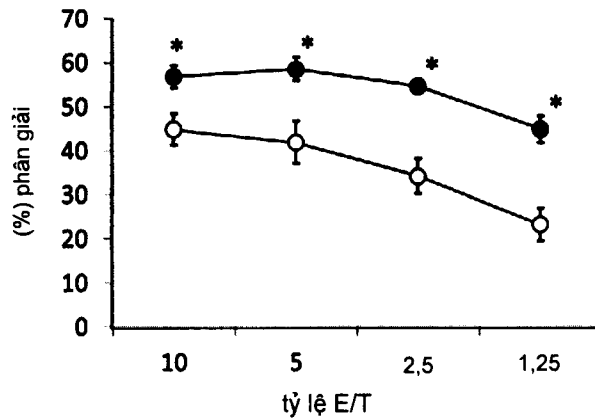
** có ý nghĩa về mặt thống kê ($p < 0,05$) so với các nhóm khác bằng thử nghiệm t Student

[Fig. 29]

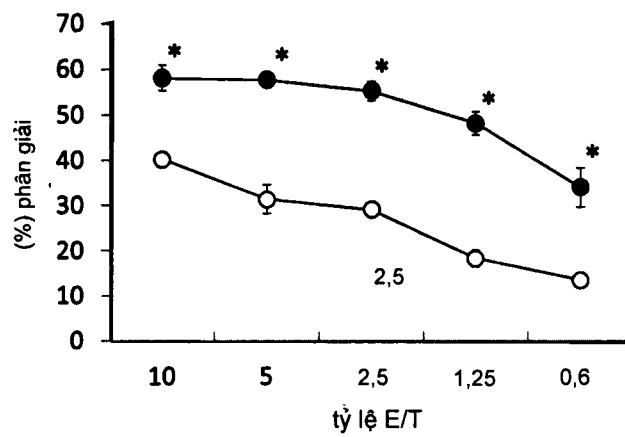


[Fig. 30]

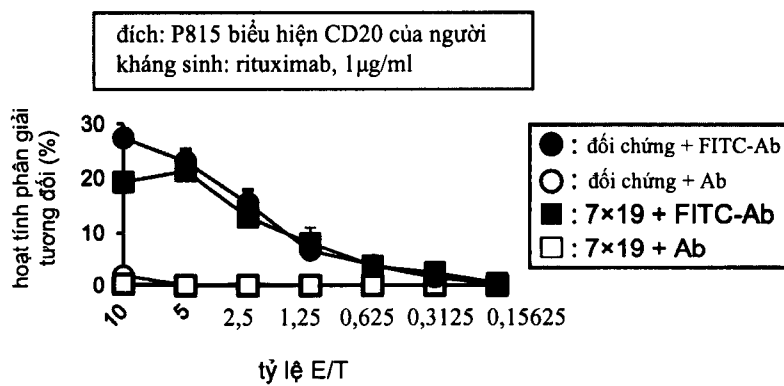
(a)



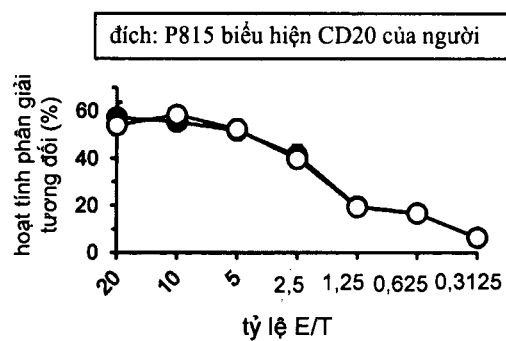
(b)



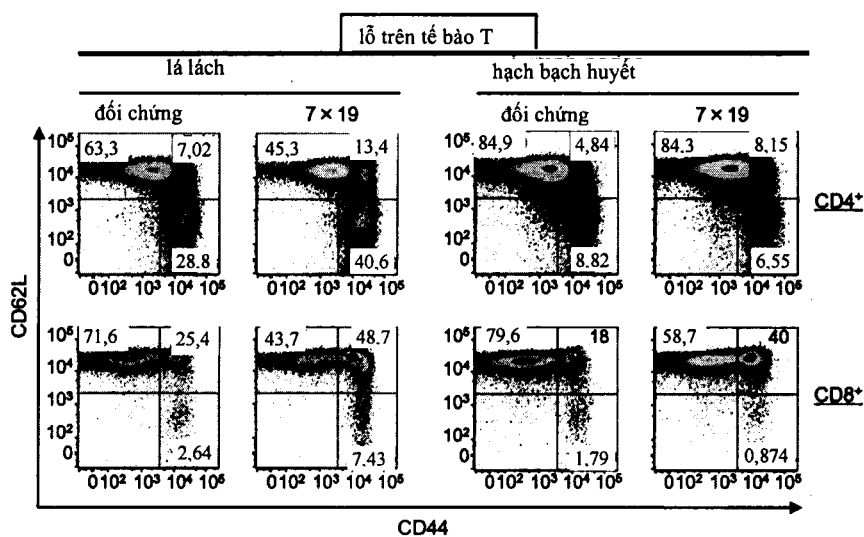
[Fig. 31]



[Fig. 32]



[Fig. 33]



[Fig. 34]

