



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

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ



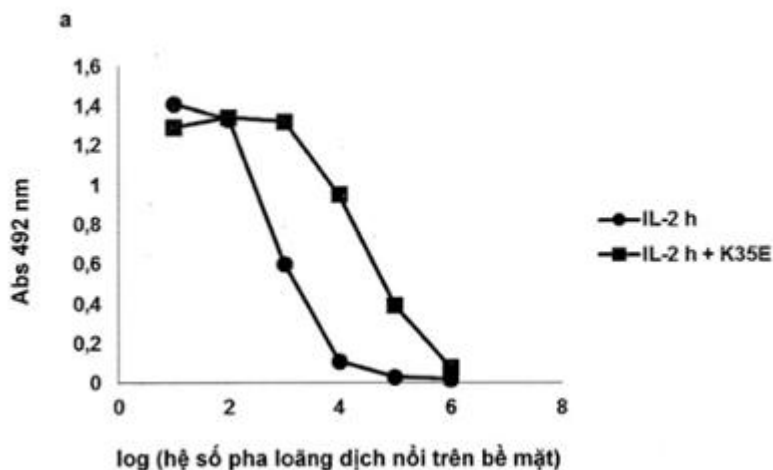
1-0039476

(51)⁸ C07K 14/55; A61P 37/00; A61K 38/20; (13) B
A61P 35/00

- (21) 1-2019-03003 (22) 10/11/2017
(86) PCT/CU2017/050007 10/11/2017 (87) WO2018/091003 24/05/2018
(30) 2016-0171 15/11/2016 CU
(45) 25/04/2024 433 (43) 25/10/2019 379A
(73) Centro de Inmunología Molecular (CU)
Calle 216 y 15, Atabey, Playa, Habana 11600, P.O. BOX 16040., La Habana, Cuba
(72) ROJAS DORANTES Gertrudis (CU); León Monzón Kalet (CU); CARMENATE
PORTILLA Tania (CU).
(74) Công ty Luật TNHH Phạm và Liên danh (PHAM & ASSOCIATES)

(54) PHƯƠNG PHÁP IN VITRO LÀM TĂNG MỨC TIẾT IL-2 TÁI TỔ HỢP CỦA NGƯỜI

(57) Sáng chế đề cập đến lĩnh vực công nghệ sinh học, cụ thể là phương pháp dựa trên cơ sở việc đưa một đột biến duy nhất vào trong các gen mã hóa IL-2 của người và các mutein dẫn xuất của nó để dẫn đến làm tăng mức tiết ở vật chủ khác nhau mà không làm ảnh hưởng đến các chức năng sinh học của chúng. Cụ thể, các đột biến này dựa trên cơ sở sự thay đổi không bảo toàn trong axit amin nằm ở vị trí 35 trong trình tự gốc của IL-2 của người, tốt hơn là các thay thế là K35E, K35D và K35Q. Mục đích khác của sáng chế là đề cập đến hệ thống biểu hiện được sử dụng để thu được cả IL-2 tái tổ hợp của người và các mutein dẫn xuất của nó bằng cách sử dụng phương pháp theo sáng chế. Phương pháp này hữu ích để cải thiện hiệu quả sản xuất IL-2 tái tổ hợp của người và các mutein dẫn xuất của nó cả ở quy mô phòng thí nghiệm lẫn quy mô công nghiệp. Protein thu được bằng cách sử dụng phương pháp này có thể được sử dụng để trị liệu cũng như mở rộng tế bào T in vitro cho liệu pháp truyền tế bào mựn.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến lĩnh vực công nghệ sinh học, cụ thể là đề cập đến phương pháp đưa đột biến vào gen chứa interleukin-2 (IL-2) để làm tăng mức tiết của phân tử này và họ của các mutein điều biến miễn dịch có nguồn gốc từ chúng mà không làm ảnh hưởng đến các chức năng sinh học của chúng

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

IL-2, ban đầu được mô tả là yếu tố sinh trưởng cho tế bào T (Smith, K.A. Immunol. Rev. 51: 337-357, 1980), đã nổi lên sau đó như một chất điều hòa với chức năng kép trong đáp ứng miễn dịch (Malek, T.R. Annu. Rev. Immunol. 26: 453-479, 2008; Hoyer K.K. et al, Immunol. Rev. 226: 19-28, 2008), có khả năng thúc đẩy hoặc điều biến âm chức năng hiệu ứng của hệ miễn dịch. Vai trò chính của nó hiện đang được xem xét liên quan đến việc duy trì khả năng dung nạp miễn dịch (Malek, T.R. & Bayer, A.L. Nat. Rev. Immunol. 4: 665-674, 2004) nhờ sự kích thích của tế bào điều hòa T, mà biểu hiện cơ định ở mức cao chuỗi alpha của thụ thể IL-2. Mặc dù cấu trúc siêu phân tử beta và gama tạo ra thụ thể dime ái lực trung gian có mặt cơ định trong tế bào hiệu ứng của hệ miễn dịch, sự có mặt cơ định ở mức cao của chuỗi alpha tạo ra tế bào điều hòa T thụ thể trime ái lực cao cho phép sử dụng ưu tiên xytokin bởi quần thể tế bào này. (Malek, T.R. & Castro, I. Immunity. 33: 153-165, 2010).

Sự phân đôi chức năng của IL-2 đã được khai thác để tạo ra hiệu quả điều trị ngược lại đối với hệ miễn dịch và điều biến đáp ứng miễn dịch theo nghĩa mong muốn trong các trường hợp khác nhau. Khả năng kích thích miễn dịch của nó đã được sử dụng để kích thích đáp ứng kháng khối u (Klapper, J.A. et al, Cancer. 113: 293-301, 2008). Mặt khác, khả năng kích thích tế bào điều hòa T của IL-2 ưu tiên đã được khai thác thông qua việc dùng các liều lượng thấp, không đủ để kích thích tế bào hiệu ứng T hoặc tạo ra tác dụng độc, nhằm kiểm soát rối loạn tự miễn (Hartemann, A. et al, Lancet Diabetes Endocrinol.1: 295-305, 2013) và viêm (Saadoun, D. et al, N. Engl. J. Med. 365: 2067-2077, 2011),

và của bệnh mảnh ghép chống túc chủ (Koreth, A. et al, N. Engl. J. Med. 365: 2055-2066, 2011).

Việc chia tách các tương tác của IL-2 thông qua việc đưa đột biến vào trong bề mặt chung gắn kết khác nhau với cấu trúc siêu phân tử của thụ thể đã được đề xuất dùng làm phương pháp để thu được mutein với các đặc tính điều biến miễn dịch khác nhau. Sự nhiễu chọn lọc của bề mặt chung với chuỗi alpha bằng cách gây đột biến theo hướng đã được cho phép để thu được phân tử được gọi là không alpha có khả năng kích thích tế bào điều hòa T giảm, trong khi vẫn giữ được tác động chủ vận của nó đối với tế bào hiệu ứng mang thụ thể dime beta/gama (Carmenate, T. et al, J. Immunol. 190: 6230-6238, 2013; US 9,206,243 B2). Phân tử này có hiệu ứng kháng khối u mạnh ở chuột nhắt. Mặt khác, sự phá vỡ bởi việc gây đột biến bề mặt chung IL-2 bằng cấu trúc siêu phân tử beta và/hoặc gama có thể sinh ra chất đối kháng thụ thể IL-2 làm điều biến chọn lọc sự kích thích của các quần thể tế bào khác nhau (Shanafelt, A.B. et al, Nat. Biotechnol. 18: 1197-1202, 2000; WO 2011/063770). Ví dụ về dạng phân tử này là các mutein M1 và M2 được mô tả trong US 8,759,486 B2.

Ngoài các mutein có khả năng tương tác bị mất, các biến thể đột biến của IL-2 có các đặc tính siêu chủ vận do sự tăng khả năng gắn kết của chúng với một cấu trúc siêu phân tử hoặc với cấu trúc siêu phân tử khác của thụ thể đã được mô tả. Mức tăng ái lực đối với cấu trúc siêu phân tử beta dẫn đến việc tạo ra phân tử kích thích tiềm năng tế bào hiệu ứng và có hiệu ứng kháng khối u mạnh (Levin, A.M. et al, Nature. 484: 529-533, 2012). Mặt khác, ái lực của IL-2 đối với cấu trúc siêu phân tử alpha của thụ thể tăng đã dẫn đến việc tăng các biến thể siêu chủ vận khác với khả năng vượt trội để kích thích đáp ứng tăng sinh của tế bào T *in vitro* (WO 2005/007121).

Các mutein có nguồn gốc từ IL-2 được mô tả trên đây đã thu nhận được thông qua thiết kế hợp lý, sàng lọc *in silico* và tiến hóa theo hướng của IL-2 được hiển thị trên bề mặt của tế bào nấm. Mặc dù mức hiển thị của IL-2 có hoạt tính sinh học trên thực khuẩn thể dạng sợi đã đạt được (Buchli, P.J. et al, Arch. Biochem. Biophys. 339: 79-84, 1997; Vispo, N.S. et al, Immunotechnology 3:

185-193, 1997), nền tảng công nghệ này chưa được khai thác cho việc chọn lọc các biến thể xytokin mới với các đặc tính được cải biến.

Ngoài đặc tính điều hòa miễn dịch của IL-2 và các mutein dẫn xuất của nó, yếu tố cần thiết để khai thác trong điều trị của chúng là sự phát triển các hệ thống để cho phép thu được nó với số lượng đủ. Cụ thể, ở quy mô phòng thí nghiệm, ở quy mô công nghiệp hoặc bằng cách chuyển nhiễm hoặc tải nạp tế bào hoặc mô bình thường và/hoặc khối u.

Con đường chủ yếu để sản xuất IL-2 tái tổ hợp và các phân tử liên quan khác là sự biểu hiện trong tế bào chất của thể vùi tạo thành E. coli, tiếp theo là quy trình tái nhập tự nhiên trong ống nghiệm (Devos, R. et al, Nucl. Acids Res. 11: 4307-4323, 1983; Weir, M.P. & Sparks, J., Biochem. J. 245: 85-91, 1987). Mặc dù việc sử dụng đã được chứng minh cho chiến lược này, việc khám phá các hệ thống biểu hiện khác bắt nguồn từ việc thu nhận các phân tử được cuộn gập chính xác rất giống với IL-2 tự nhiên, vẫn được tiếp tục. Mức tiết IL-2 trong một số hệ thống biểu hiện này đã bị hạn chế bởi xu hướng kết tụ IL-2 (Halfmann, G. et al, J. Gen. Microbiol. 139: 2465-2473, 1993; Cha, H.J. et al, Biochem. Eng. J. 24: 225-233, 2005).

Bất ngờ là, các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng một số đột biến không được mô tả hoặc dự đoán trước đó từ phân tích cấu trúc tinh thể của IL-2 ở người, việc đưa chúng vào đã làm tăng khả năng của các dạng tế bào khác nhau để tiết IL-2 tái tổ hợp của người và nhiều mutein dẫn xuất của nó có đặc tính điều biến miễn dịch đặc hiệu. Phát hiện này tạo ra cơ sở cho việc sử dụng các đột biến này ở quy mô sản xuất.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp làm tăng mức tiết của IL-2 tái tổ hợp của người ở vật chủ khác nhau mà không làm ảnh hưởng đến các chức năng sinh học của chúng. Phương pháp này dựa trên cơ sở việc đưa một đột biến duy nhất vào trong các gen mã hoá IL-2 của người và các polypeptit khác có nguồn gốc từ chúng, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các mutein có nguồn gốc từ IL-2 của người được thiết kế để hoạt động như chất đối kháng, chất siêu

chủ vận hoặc chất chủ vận chọn lọc. Sự tăng mức tiết của các protein nêu trên khi phương pháp theo sáng chế được sử dụng cao hơn ít nhất ba lần so với dạng tương ứng không được gây đột biến. Theo sáng chế, các mutein dẫn xuất dùng để chỉ các mutein có hơn 90% mức đồng nhất với IL-2 của người.

Phương pháp theo sáng chế đề cập đến các đột biến dẫn đến sự thay đổi không bảo toàn của axit amin nằm ở vị trí 35 của trình tự protein ban đầu (Lys trong trình tự gốc), tốt hơn là các thay thế K35E, K35D và K35Q.

Đặc biệt, sáng chế đề xuất protein thu được bằng phương pháp được mô tả ở đây được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO. 1 đến 18.

Ngoài ra, mục đích của sáng chế là đề xuất cấu trúc di truyền bao gồm các gen đột biến được mô tả trên đây dung hợp với các trình tự nucleotit khác mã hóa quá trình tổng hợp protein dung hợp được tạo ra bằng IL-2 hoặc các polypeptit điều biến miễn dịch khác có nguồn gốc từ đó và các trình tự protein bổ sung. Các trình tự protein bổ sung bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, protein vỏ capsit của thực khuẩn thể dạng sợi, albumin, vùng Fc của kháng thể, toàn bộ kháng thể hoặc mảnh kháng thể bao gồm miền thay đổi của chúng.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1. đánh giá ELISA mức hiển thị thực khuẩn thể của IL-2 đột biến. Tất cả các chế phẩm thực khuẩn thể được điều chỉnh đến nồng độ tương đương là 10^{13} hạt virut/ml.

Fig. 2. đánh giá ELISA mức tiết của protein dung hợp được tạo ra bằng IL-2 hoặc các mutein dẫn xuất của nó và miền Fc IgG1 của người. Tế bào được chuyển nhiễm bằng polyetylenimin và các cấu trúc di truyền ghi mã cho protein dung hợp chứa:

- a. IL-2 có và không có đột biến K35E
- b. IL-2 không alpha (NA) có và không có đột biến bổ sung K35E
- c. IL-2 siêu beta (SB) có và không có K35E
- d. IL-2 M1 không gama (NG M1) có và không có K35E
- e. IL-2 M2 không gama (NG M2) có và không có K35E

Fig. 3. Sự bảo toàn của các tương tác phân tử của IL-2 nguyên thể trong biến thể K35E (ELISA).

Fig. 4. Sự bảo toàn của hoạt tính sinh học IL-2 với K35E thay thế bằng cách sử dụng thử nghiệm tăng sinh CTLL-2.

Fig. 5. Khả năng của IL-2 K35E để mở rộng quần thể tế bào phụ thuộc IL-2 *in vivo*.

5a. Hình ảnh lá lách của chuột nhất được tiêm biến thể IL-2 K35E và PBS.

5b. Biểu đồ đếm tế bào dòng của quần thể tế bào phenotyp trí nhớ CD3+CD8+ (CD44hi) ở lá lách.

Fig. 6. So sánh giữa K35E thay thế với mức mất khả năng gắn kết với thụ thể IL-2 cấu trúc siêu phân tử alpha đã được mô tả đối với mutein có nguồn gốc IL-2 (ELISA). Đĩa vi chuẩn độ được phủ cấu trúc siêu phân tử alpha của người (a) và chuột (b).

Fig. 7. So sánh giữa K35E thay thế với mức tăng khả năng gắn kết với thụ thể IL-2 cấu trúc siêu phân tử beta đã được mô tả đối với mutein có nguồn gốc IL-2 (ELISA).

Mô tả chi tiết sáng chế

Theo phương án cụ thể, vật chủ được sử dụng để thu được phân tử được mô tả trên đây bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, tế bào *E. coli*, nấm và động vật có vú như HEK-293, CHO, NSO, trong số những vật chủ khác. Phương pháp theo sáng chế rất hữu ích để cải thiện hiệu quả của việc sản xuất IL-2 và các polypeptit khác có nguồn gốc từ đó, cả ở quy mô phòng thí nghiệm và quy mô công nghiệp. Protein thu được bằng phương pháp theo sáng chế có thể được sử dụng nhằm mục đích trị liệu. Theo phương án khác, mục đích của sáng chế là nhằm cải biến sinh lý học của tế bào và/hoặc mô bình thường và khối u thông qua sự biểu hiện của IL-2 của người và/hoặc họ của các mutein điều biến miễn dịch có nguồn gốc từ đó (một mình hoặc dung hợp với protein khác), cả *in vitro* lẫn *in vivo*. Ví dụ, việc tải nạp lymphô bào T, lymphô bào B hoặc tế bào NK cho liệu pháp truyền tế bào mụn; hoặc tải nạp/chuyển nhiễm trực tiếp của mô khối u.

Phương pháp theo sáng chế rất hữu ích để làm tăng mức tiết của phân tử đang quan tâm ở phạm vi này.

Sáng chế đề xuất phương pháp làm tăng mức tiết của IL-2 tái tổ hợp của người ở vật chủ khác nhau mà không làm ảnh hưởng đến các chức năng sinh học của chúng. Phương pháp này dựa trên cơ sở việc đưa một đột biến duy nhất vào trong các gen mã hoá IL-2 của người và các polypeptit khác có nguồn gốc từ đó, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các mutein có nguồn gốc từ IL-2 của người được thiết kế để hoạt động như chất đối kháng, chất siêu chủ vận hoặc chất chủ vận chọn lọc.

Nhận diện đột biến làm tăng khả năng của protein có nguồn gốc từ IL-2 của người được hiển thị trên thực khuẩn thể dạng sợi

Việc chọn lọc các polypeptit có nguồn gốc từ IL-2 của người, với các đột biến duy nhất dẫn đến sự tăng mức hiển thị của chúng trên thực khuẩn thể dạng sợi có thể được thực hiện từ các thư viện có hơn 10^8 phân tử có mặt trên thực khuẩn thể dạng sợi. Các gen tương ứng với các polypeptit nêu trên có thể được cài xen vào các véc-tơ biểu hiện dạng phagemit (dung hợp với một trong số các gen mã hoá protein vỏ capsit thực khuẩn thể dạng sợi) và được sử dụng để sản xuất hạt virut hiển thị các biến thể protein trên bề mặt của chúng. Các thư viện khởi đầu có thể có các mức đa dạng hóa khác nhau trong toàn bộ trình tự hoặc trong nhóm các vị trí đã xác định trước. Mỗi gốc ban đầu trong các vị trí này có thể được thay thế bằng tổ hợp của 20 axit amin hoặc bằng các nhóm phụ của các gốc đã chọn. Sự đa dạng có thể đạt được thông qua việc gây đột biến ngẫu nhiên hoặc gây đột biến trực tiếp tại vị trí.

Việc chọn lọc thực khuẩn thể với mức hiển thị IL-2 của người tăng có thể dựa trên việc cấy hỗn hợp thực khuẩn thể từ thư viện tiếp xúc với phân tử chọn lọc cố định trên bề mặt rắn, việc khử bỏ thực khuẩn thể chưa gắn kết bằng cách rửa, và rửa giải thực khuẩn thể gắn kết trong các điều kiện can thiệp vào các tương tác protein. Đối với phân tử chọn lọc, một trong số các cấu trúc siêu phân tử của thụ thể IL-2 tái tổ hợp hoặc kháng thể đơn dòng chống lại trực tiếp IL-2 hoặc chống lại peptit được dung hợp di truyền vào đó có thể được sử dụng. Một vài chu

trình chọn lọc liên tiếp có thể được thực hiện trong các điều kiện tương tự. Việc phân tích trình tự ADN được cài xen trong phagemit đã chọn có thể cho thấy tính thường xuyên dẫn đến việc nhận diện các thay thế phong phú hơn này và có khả năng liên quan đến việc tăng khả năng hiển thị trên thực khuẩn thể.

Mức hiển thị của các biến thể đột biến của IL-2 có thể được đánh giá thông qua thử nghiệm gắn kết như ELISA, trên phân tử bắt giữ cố định mà nhận diện không rõ ràng các biến thể IL-2 đột biến khác nhau và dạng tham chiếu nguyên thể. Đối với phân tử bắt giữ cho dạng thử nghiệm này, kháng thể chống lại trình tự peptit gen đánh dấu dung hợp di truyền với các biến thể IL-2, như peptit c-myc, mà được dung hợp với tất cả các protein lạ trong hệ thống biểu hiện trên cơ sở véc-tơ phagemit pCSM, được ưu tiên. Tính tổng quát của các hiệu ứng của đột biến được nhận diện trong việc sàng lọc được mô tả trên đây đối với họ dẫn xuất mutein IL-2 có thể được chứng minh thông qua việc đưa các thay đổi nêu trên vào trình tự của các biến thể đột biến khác nhau được mô tả cho IL-2 của người, bao gồm một số thay đổi về sự thay thế có bản chất đa dạng trong toàn bộ trình tự của nó nhằm mục đích tác động có chọn lọc các tương tác với cấu trúc siêu phân tử khác nhau của thụ thể IL-2, với cải biến tiếp theo về chức năng điều biến miễn dịch của chúng. Tất cả các mutein đã cải biến này được hiển thị trên thực khuẩn thể dạng sợi, bằng cách cài xen các gen mã hoá của chúng trong véc-tơ phagemit. Việc đánh giá mỗi mutein hiển thị các mức trên thực khuẩn thể dạng sợi có thể được thực hiện bằng ELISA như được mô tả đối với IL-2. Đối với dạng tham chiếu để tính toán độ lớn của mức tăng hiển thị thực khuẩn thể liên quan đến việc đưa vào các thay đổi được nhận diện là một phần của sáng chế, các mutein gốc được sử dụng mà không có sự thay đổi bổ sung bất kỳ và hiển thị trên thực khuẩn thể. Theo cách khác, phương pháp theo sáng chế có thể được thực hiện bằng cách khai thác các nền tảng khác của sinh học kết hợp, như hiển thị trên tế bào nấm hoặc động vật có vú, để chọn lọc các biến thể của IL-2 và/hoặc các mutein dẫn xuất của nó với mức có mặt tăng trên màng tế bào.

Từ quy trình chọn lọc được mô tả trên đây, các đột biến không bảo toàn lặp lại có thể xuất hiện ở vị trí 35 (đặc biệt là K35E, K35D và K35Q).

Sử dụng các đột biến đã nhận diện để làm tăng mức tiết của IL-2 của người và các mutein dẫn xuất của nó, dưới dạng protein hòa tan và tái tự nhiên hóa chúng từ thể vùi

Khi một nhóm các đột biến dẫn đến việc làm tăng hiển thị trên thực khuẩn thể dạng sợi của IL-2 của người và các mutein dẫn xuất của nó được nhận diện, hiệu quả của các thay đổi giống nhau này đến mức tiết của protein hòa tan có thể được chứng minh, bằng cách đưa chúng vào các gen ghi mã tương ứng đã được tách dòng trong các véc-tơ biểu hiện hòa tan đối với tế bào nấm hoặc động vật có vú. Việc đánh giá nồng độ của protein được tiết vào dịch nổi trên bề mặt bằng tế bào vật chủ chứa các véc-tơ biểu hiện nêu trên cho phép chứng minh sự tăng mức tiết của IL-2 và các mutein dẫn xuất của nó liên quan đến việc đưa vào đột biến mà phương pháp theo sáng chế sử dụng, so với dạng tương đương gốc của nó không có các thay đổi nêu trên.

Theo cách khác, việc tạo ra IL-2 của người và các mutein dẫn xuất của nó tăng cần được kiểm tra từ quá trình chuyển nhiễm và/hoặc tải nạp tế bào bình thường và/hoặc khối u và/hoặc mô *in vivo* hoặc *in vitro*.

Các nghiên cứu được mô tả trên đây sử dụng phương pháp theo sáng chế có thể được thực hiện với IL-2 và các mutein dẫn xuất của nó một mình hoặc dung hợp với các trình tự polypeptit bổ sung, như albumin, vùng Fc của globulin miễn dịch của người, toàn bộ các kháng thể hoặc mảnh kháng thể trên cơ sở các vùng thay đổi của nó.

Các đột biến được mô tả trong sáng chế cũng có thể được sử dụng để cải thiện các quy trình tái tự nhiên hóa *in vitro* của IL-2 của người và các mutein dẫn xuất của nó, thu được dưới dạng thể vùi trong bào lập của *E. coli*. Mức tăng hiệu quả của quá trình tái tự nhiên hóa có thể được đánh giá bằng cách đo hoạt tính sinh học đặc hiệu cho mỗi lượng protein bằng cách so sánh với biến thể không được gây đột biến.

Chứng minh tính tương thích của đột biến đã sử dụng với chức năng sinh học của IL-2 và điều biến chọn lọc các tương tác của nó với cấu trúc siêu phân tử của thụ thể

Việc đánh giá hoạt tính sinh học của các biến thể IL-2 được cải biến bằng phương pháp sàng chế có thể bao gồm các kỹ thuật *in vitro* và *in vivo* hướng đến bằng chứng về sự bảo toàn khả năng gây ra sự tăng sinh, sự biệt hóa và sự hoạt hóa các dạng tế bào khác nhau của chúng như quần thể phụ T lymphô bào, tế bào NK và dòng tế bào của gốc bạch huyết phụ thuộc vào IL-2 đối với sự phát triển của chúng. Hiệu quả của IL-2 nguyên thể đối với sự tăng sinh lymphô bào T biểu hiện thụ thể trime có thể được xác định bằng thử nghiệm *in vitro* về sự tăng sinh dòng tế bào CTLL-2 bằng cách sử dụng kỹ thuật đo màu của phương pháp khử Alamar Blue hoặc bằng phương pháp đếm tế bào dòng. Hiệu quả *in vitro* của IL-2 nguyên thể đối với sự biệt hóa của lymphô bào T CD4+ thành lymphô bào điều hòa T và khả năng mở rộng và hoạt hóa tế bào NK *in vitro* của phân tử này, được xác định bằng phương pháp đếm tế bào dòng.

Khả năng tương thích của các đột biến được sử dụng trong phương pháp theo sàng chế với sự điều biến chọn lọc của tương tác IL-2 với thụ thể của nó có thể được chứng minh bằng cách đưa các thay đổi nêu trên lên khung của các mutein được thiết kế trước đây và/hoặc được chọn lọc để làm tăng hoặc làm giảm khả năng gắn kết của chúng với cấu trúc siêu phân tử bất kỳ trong số các cấu trúc siêu phân tử của thụ thể IL-2. Sự xuất hiện của các thay đổi mong muốn trong các đặc tính gắn kết có thể được chứng minh thông qua việc xác định trực tiếp chúng trong các thử nghiệm ELISA trên đĩa vi chuẩn độ được phủ mỗi cấu trúc siêu phân tử của thụ thể. Các thử nghiệm được mô tả trước đây được sử dụng để xác định đặc điểm của sự điều biến miễn dịch và/hoặc hoạt tính kháng khối u của các mutein *in vitro* và *in vivo* khác nhau có thể được sử dụng làm công cụ kiểm tra bổ sung. Trong trường hợp của mutein không alpha (Carmenate, T. y otros, J. Immunol. 190: 6230-6238, 2013), có thể xác nhận được rằng nó duy trì khả năng giống như IL-2 nguyên thể trong việc kích thích sự tăng sinh *in vitro* của lymphô bào T CD8+. Trong trường hợp của mutein có khả năng gắn kết tăng với cấu trúc siêu phân tử beta của thụ thể và có hoạt tính siêu chủ vận (mutein siêu beta), có thể xác nhận được rằng nó duy trì khả năng kích thích tăng sinh tế bào NK *in vitro* cao hơn so với IL-2 nguyên thể. Trong cả hai trường hợp, sự tăng sinh có thể được xác định bằng phương pháp đếm tế bào dòng. Hiệu quả khác nhau đối với sự

tăng sinh của quần thể *in vivo* có thể được xác định bằng các thử nghiệm kết hợp bromodeoxyuridin. Có thể chứng minh được rằng cả hai mutein này đều gây ra hiệu ứng kháng khối u *in vivo* lớn hơn so với IL-2 nguyên thể, trong mô hình di căn thử nghiệm sử dụng dòng khối u ác tính MB16F0.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1. Chọn lọc và xác định đặc điểm của thực khuẩn thể dạng sợi hiển thị IL-2 đột biến chức năng của người.

Thư viện ngẫu nhiên mềm hướng đích một vài vị trí của IL-2 của người được cấu trúc. Các vị trí đã chọn bao gồm các vị trí có các gốc với mạch bên góp phần vào bề mặt chung của thụ thể cấu trúc siêu phân tử alpha (K35, R38, T41, F42, K43, F44, Y45, E61, E62, K64, P65, E68, V69, N71, L72, Q74 và Y107). IL-2 của người được làm đa dạng bằng phương pháp gây đột biến Kunkel với oligonucleotit đột biến đã bị mất tác dụng giữ 85% nucleotit ban đầu ở mỗi vị trí đích, cộng với 15% của hỗn hợp đẳng phân tử của 3 nucleotit còn lại để đưa vào mức đa dạng vừa phải trong tất cả các vùng đã chọn. 10^9 thư viện dòng vô tính thu được như vậy dưới dạng toàn bộ 20 axit amin ở mỗi vị trí của bề mặt chung, trong khi đó mỗi phân tử trong thư viện chỉ có rất ít các thay thế, giới hạn nghiên cứu đối với các polypeptit mới ở không gian trình tự ở chức năng gần hơn với phân tử khởi đầu. Thực khuẩn thể của thư viện được tinh chế bằng cách kết tủa bằng polyetylen glycol sử dụng các quy trình đã thiết lập (Marks, J. *et al*, J. Mol. Biol. 222: 581-597, 1991). Hạt virus đã tinh chế được ủ trên ống miễn dịch (Nunc, Đan Mạch) được phủ cấu trúc siêu phân tử của thụ thể alpha IL-2 tái tổ hợp (R&D), để phân lập các biến thể IL-2 đột biến chức năng do khả năng của chúng được hiển thị trên thực khuẩn thể. Hai quy trình phân tích trọng lượng độc lập được thực hiện trên cấu trúc siêu phân tử của thụ thể IL-2 của người và chuột. Sau khi rửa thực khuẩn thể không gắn kết, thực khuẩn thể gắn kết được rửa giải bằng cách bổ sung dung dịch trietylamin cơ bản. TG1 vi khuẩn được gây nhiễm bằng thực khuẩn thể đã chọn, mà được khuếch đại bằng cách sử dụng thực khuẩn thể trợ giúp M13KO7 và được sử dụng làm nguyên liệu ban đầu cho vòng chọn lọc mới. 4 vòng chọn lọc thực khuẩn thể được thực hiện. Việc tạo trình tự các đoạn cài xen

trong các phagemit đã chọn (từ vòng chọn lọc thứ ba và thứ tư) đã cho thấy tính tương tự trong các biến thể đột biến thu được. Mặc dù gen IL-2 không đột biến ban đầu chiếm ưu thế (có mặt ở mức cao trong thư viện ban đầu), vẫn có tỷ lệ nhỏ các biến thể có các đoạn thay thế K35E, K35D và K35Q, cho thấy ảnh hưởng của sự thay đổi không bảo toàn ở vị trí 35 trong mức hiển thị của IL-2 chức năng đối với thực khuẩn thể dạng sợi. K35E là thay thế thường xuyên nhất. Phát hiện này là điều bất ngờ vì việc phân tích cấu trúc tinh thể của phức hợp IL-2/thụ thể (PDB ghi mã 3B5I và 2ERJ) chỉ ra mối liên quan của gốc K35 ban đầu trong các tương tác ion ở vùng ngoại biên phân cực của bề mặt chung với cấu trúc siêu phân tử alpha. Khả năng của các thay thế không bảo toàn (nghịch chuyển trong hai trường hợp) để giữ tương tác với phân tử chọn lọc là kết quả hoàn toàn bất ngờ.

Ví dụ 2. Tăng mức tiết và hiển thị thực khuẩn thể của IL-2 của người với sự thay đổi không bảo toàn ở vị trí 35.

Khả năng của các biến thể IL-2 khác nhau được chọn từ thư viện để được tiết vào chất bào *E.coli* và hiển thị trên thực khuẩn thể được so sánh. IL-2 nguyên thể được sử dụng làm phân tử tham chiếu. Biến thể chứa K35R (thay đổi bảo toàn ở vị trí 35) cũng được cấu trúc bằng cách gây đột biến Kunkel để được sử dụng làm mẫu đối chứng bổ sung. Tất cả các protein thu được thông qua việc cài xen các gen ghi mã của chúng trong véc-tơ phagemit pCSM (dung hợp với gen M13 3) và việc sản xuất thực khuẩn thể sau đó từ vi khuẩn TG1 được biến nạp với các cấu trúc di truyền thu được (Rojas, G. *et al*, Immunobiology. 218: 105-113, 2013). Mức hiển thị thực khuẩn thể của mỗi biến thể được đánh giá thông qua ELISA trên đĩa vi chuẩn độ được phủ kháng thể đơn dòng 9E10. Thực khuẩn thể gắn kết được dò bằng kháng thể kháng M13 kết hợp với peroxidaza chùm ngậy. Đã thấy rằng các thay thế K35E, K35D và K35Q dẫn đến việc làm tăng mức hiển thị của IL-2 của người so với phân tử gốc (Fig. 1). Mức tăng này là 10 lần đối với các thay đổi nghịch chuyển K35E và K35D, và 7 lần đối với K35Q. Mặt khác, đoạn thay đổi bảo toàn K35R không cải biến khả năng hiển thị của IL-2 (Fig. 1). K35E được chọn cho các nghiên cứu tiếp theo.

Ví dụ 3. Hiệu quả của thay thế K35E đối với mức tiết và hiển thị thực khuẩn thể mở rộng đến panen của các biến thể IL-2 đột biến.

K35E được đưa vào bằng cách gây đột biến Kunkel trong các gen chứa một vài biến thể đột biến của IL-2 của người (ở dạng hiển thị thực khuẩn thể). Panen bao gồm 4 mutein đã được mô tả để thực hiện chức năng điều biến miễn dịch khác nhau: 1 mutein không alpha với chức năng chủ vận chọn lọc đối với tế bào hiệu ứng T (Carmenate, T. *et al*, J. Immunol. 190: 6230-6238, 2013; US 9,206,243 B2), 1 mutein đối kháng mất khả năng gắn kết của nó với cấu trúc siêu phân tử của thụ thể IL-2 gama (không gama) (US 8,759,486 B2), và 2 mutein siêu chủ vận với khả năng gắn kết tăng cường với cấu trúc siêu phân tử của thụ thể IL-2 beta (siêu beta) hoặc alpha (siêu alpha) (Levin, A.M. *et al*, Nature. 484: 529-533, 2012; WO 2005/007121). Thực khuẩn thể hiển thị mỗi protein này được tạo ra và tinh chế (cùng với phân tử gốc không có K35E), và mức hiển thị các protein lạ được đánh giá bằng ELISA trên đĩa vi chuẩn độ được phủ kháng thể đơn dòng 9E10. Chế phẩm thực khuẩn thể hiển thị IL-2 nguyên thể được sử dụng làm mẫu tham chiếu (giả sử sự có mặt của 100 đơn vị tùy ý/ml trong nó) để cấu trúc đường cong tiêu chuẩn để tính toán mức hiển thị tương đối cho mỗi biến thể. Bảng 1 thể hiện sự tăng mức hiển thị của mỗi mutein liên quan đến việc đưa vào K35E.

Bảng 1. Sự tăng mức hiển thị các mutein thử nghiệm liên quan đến việc đưa vào K35E thay thế.

Mutein	Sự tăng mức hiển thị thực khuẩn thể tương đối liên quan đến việc đưa vào K35E
Không alpha	6x
Không gama M1	29x
Siêu beta H9	18x
Siêu alpha	14x

Ví dụ 4. K35 thay thế tăng cường mức tiết của protein dung hợp trên cơ sở IL-2 và các mutein dẫn xuất của nó bởi tế bào vật chủ người.

Cấu trúc di truyền được thiết kế để dung hợp các gen của IL-2 của người và các mutein dẫn xuất của nó với gen vùng Fc IgG1 của người, trong phạm vi của véc-tơ biểu hiện pCMX. Panen bổ sung của cấu trúc tương đương có đột biến K35E cũng được tạo ra. Tế bào T HEK 293 (thích nghi để sinh trưởng trong hỗn dịch) được chuyển nhiễm bằng mỗi cấu trúc di truyền được mô tả trên đây được trộn thích hợp với polyetylenimin. Thể tích chuyển nhiễm là 50 ml. Phần dịch nổi từ tế bào chuyển nhiễm được thu gom sau 6 ngày nuôi cấy. Sự có mặt của protein có nguồn gốc từ IL-2 tái tổ hợp được đánh giá bằng ELISA trên đĩa vi chuẩn độ được phủ kháng thể đơn dòng IL-2.2 (chống lại trực tiếp epitop tuyến tính có mặt trên tất cả các mutein). Protein dung hợp đã bắt giữ được phát hiện bằng kháng thể Fc kháng người kết hợp với peroxidaza chùm ngậy. Mức protein dung hợp trong phần dịch nổi là cao hơn đối với các phân tử chứa K35E thay thế này so với dạng tương ứng gốc của chúng (Fig. 2a-e). Protein tái tổ hợp như vậy được tinh chế bằng sắc ký ái lực Protein A. Bảng 2 thể hiện hiệu suất sau khi tinh chế.

Bảng 2. Hiệu suất tinh chế IL-2 và các mutein dẫn xuất của nó dung hợp với miền Fc của globulin miễn dịch của người từ tế bào T HEK 293 chuyển nhiễm trong hỗn dịch.

Phân tử	Biến thể gốc	Biến thể K35E	Mức tăng liên quan đến K35E
IL-2/Fc	0,28 mg	4,24 mg	15x
Không alpha/Fc	0,16 mg	1,44 mg	9x
Siêu alpha/Fc	1,72 mg	5,08 mg	3x
Siêu beta/Fc	0,04 mg	1,08 mg	27x
Không gama M1/Fc	0,04 mg	0,24 mg	6x
Không gama M2/Fc	0,04 mg	0,2 mg	5x

Ví dụ 5. K35E thay thế tương thích với các tương tác phân tử của IL-2 nguyên thể.

Đã biết khả năng gắn kết của IL-2 đột biến tái tổ hợp (K35E) ở dạng homodime dung hợp Fc của người được đánh giá bằng ELISA trên đĩa vi chuẩn độ được phủ phân tử khác nhau tương tác với IL-2 nguyên thể. Panen của phân tử phủ bao gồm 4 kháng thể đơn dòng nhận diện các epitop khác nhau trên IL-2, cũng như thụ thể IL-2 cấu trúc siêu phân tử alpha (có nguồn gốc từ người hoặc chuột). Protein dung hợp đã bắt giữ được dò bằng kháng thể Fc kháng người kết hợp với peroxidaza chùm ngậy. Homodime dung hợp tương tự bao gồm đột biến không IL-2, được tạo ra trong cùng hệ thống biểu hiện, được sử dụng làm mẫu đối chứng. Sự gắn kết của homodime đột biến với cả kháng thể và thụ thể không bị ảnh hưởng bởi sự có mặt của K35E, ngược lại nó tạo ra hiệu ứng ngược lại. Tính phản ứng của biến thể đột biến theo tất cả các phân tử phủ là cao hơn so với tính phản ứng của dạng tương đương không đột biến tái tổ hợp của nó (Fig. 3), chỉ ra rằng tính kháng nguyên và chức năng của biến thể K35E tái tạo tính kháng nguyên và chức năng của IL-2 nguyên thể đến mức lớn hơn so với tính kháng nguyên và chức năng của protein không đột biến tái tổ hợp thu được trong các điều kiện tương tự.

Ví dụ 6. IL-2 K35E dung hợp Fc duy trì khả năng kích thích sự tăng sinh của tế bào CTLL-2.

Khả năng của IL-2 đột biến (K35E) ở dạng homodime dung hợp Fc (được tinh chế từ tế bào T HEK 293 chuyển nhiễm trong hỗn dịch) để gây ra sự tăng sinh CTLL-2 được đánh giá. IL-2 tái tổ hợp của người được sử dụng làm mẫu đối chứng. Tế bào được sinh trưởng với sự có mặt của nồng độ khác nhau của cả hai protein, và sự tăng sinh được đo thông qua thử nghiệm khử đo màu Alamar Blue (Fig. 4). Hoạt tính đặc hiệu được tính toán trong mọi trường hợp từ liều lượng phân tử đã tạo ra sự tăng sinh tối đa một nửa bằng cách sử dụng phần mềm GraphPad. Hoạt tính đặc hiệu của IL-2 đột biến dung hợp Fc (bao gồm K35E) là 4×10^6 IU/mg, trong cùng khoảng so với hoạt tính đặc hiệu của IL-2 tái tổ hợp

tham chiếu ($2,3 \times 10^6$ IU/mg). Kết quả này đã cho thấy sự bảo toàn của hoạt tính sinh học IL-2 với sự có mặt của K35E.

Ví dụ 7. IL-2 K35E dung hợp Fc có khả năng kích thích sự mở rộng của tế bào T CD8 phenotyp trí nhớ *in vivo*.

Chuột nhắt C57BL/6 tiếp nhận 5 liều dùng hằng ngày là 4×10^4 IU IL-2 đột biến dung hợp Fc (K35E) trong 5 ngày liên tiếp để nghiên cứu khả năng của protein để kích thích sự tăng sinh *in vivo* của quần thể tế bào phụ thuộc IL-2. Các con chuột này được giết sau khi xử lý và lá lách của chúng được quan sát. Ngoài ra, kích thước của quần thể tế bào CD3+CD8+ có phenotyp trí nhớ (CD44hi) được xác định bằng phương pháp đếm tế bào dòng. Nhóm đối chứng của thử nghiệm là nhóm chuột nhắt được tiêm dung dịch nước muối đệm phosphat (PBS). IL-2 dung hợp Fc tái tổ hợp (K35E) có hiệu quả mong đợi đối với quần thể tế bào nhớ T CD8, được đánh giá bằng sự mở rộng của lá lách (Fig. 5a) và sự nhân đôi về tỷ lệ của tế bào T CD8 phenotyp trí nhớ trong chúng (Fig. 5b).

Ví dụ 8. K35E thay thế tương thích với việc mất khả năng gắn kết với thụ thể IL-2 cấu trúc siêu phân tử alpha xác định các đặc tính của chất chủ vận chọn lọc.

Đặc tính gắn kết của cả IL-2 của người và của mutein không alpha được mô tả trước đây (Carmenate, T. *et al*, J. Immunol. 190: 6230-6238, 2013; US 9,206,243), bao gồm các thay thế R38A, F42A, Y45A và E62A dẫn đến việc mất khả năng gắn kết thụ thể IL-2 cấu trúc siêu phân tử alpha nhằm làm giảm khả năng kích thích của nó đối với tế bào điều hòa T mà không làm ảnh hưởng đến tác động đến tế bào hiệu ứng có thụ thể beta/gama dị dimer, được so sánh. Cả hai protein tái tổ hợp đều có đột biến K35E bổ sung và được tạo ra dưới dạng protein dung hợp chứa miền Fc của globulin miễn dịch của người. Đĩa vi chuẩn độ được phủ cấu trúc siêu phân tử của thụ thể alpha IL-2 tái tổ hợp có nguồn gốc từ người (a) và chuột (b). Protein dung hợp đã bắt giữ được dò bằng kháng thể Fc kháng người kết hợp với peroxidaza chùm ngày. Việc đưa vào K35E tạo ra mức tăng phân tử không alpha mới với mức biểu hiện cao hơn so với mức biểu hiện của dạng tương đương gốc của nó (Fig. 2b) và mức gắn kết chuỗi alpha của người và

chuột giảm mạnh so với đột biến không IL-2 cũng có thay thế K35E (Fig. 6). Các kết quả này đưa ra những bằng chứng đầu tiên về khả năng tương thích của K35E với sự điều biến chọn lọc của các tương tác và chức năng điều biến miễn dịch của IL-2.

Ví dụ 9. K35E thay thế tương thích với sự tăng khả năng gắn kết cấu trúc siêu phân tử beta của thụ thể IL-2 đã được mô tả đối với biến thể siêu chủ vận.

Khả năng gắn kết của IL-2 và mutein siêu beta chứa các đột biến L80F, R81D, L85V, I86V và I92F (cả hai đều có đột biến bổ sung K35E và dung hợp với miền Fc của IgG1 của người) được đánh giá bằng ELISA trên đĩa được phủ thụ cấu trúc siêu phân tử beta thể IL-2. Protein dung hợp đã bắt giữ được dò bằng kháng thể Fc kháng người kết hợp với peroxidaza chùm ngậy. Việc đưa vào K35E tạo ra mức tăng phân tử mới với mức biểu hiện cao hơn so với mutein siêu beta gốc (Fig. 2c) và có khả năng gắn kết cấu trúc siêu phân tử beta tăng cường, là cơ sở cho chức năng siêu chủ vận của nó (Fig. 7). Kết quả này đã mở rộng bằng chứng về sự tương thích của K35E thay thế bằng thiết kế của phân tử có nguồn gốc từ IL-2 mới với các cải biến khác về sự tương tác của chúng với cấu trúc siêu phân tử của thụ thể và chức năng điều biến miễn dịch.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp in vitro làm tăng mức tiết IL-2 tái tổ hợp của người và các mutein dẫn xuất của nó ở vật chủ, mà không làm ảnh hưởng đến chức năng sinh học của nó và điều biến chọn lọc các tương tác của nó với cấu trúc siêu phân tử của thụ thể, khác biệt ở chỗ một đột biến không bảo toàn duy nhất được đưa vào ở vị trí 35 của trình tự đầu tiên của nó được chọn từ nhóm bao gồm:

- K35E,
- K35D, và
- K35Q

và trong đó các mutein có trình tự được chọn từ nhóm bao gồm:

- SEQ ID NO. 1,
- SEQ ID NO. 4,
- SEQ ID NO. 5,
- SEQ ID NO. 6,
- SEQ ID NO. 8,
- SEQ ID NO. 9,
- SEQ ID NO. 10,
- SEQ ID NO. 11,
- SEQ ID NO. 12,
- SEQ ID NO. 13,
- SEQ ID NO. 14,
- SEQ ID NO. 15,
- SEQ ID NO. 16,
- SEQ ID NO. 17, và
- SEQ ID NO. 18

và trong đó vật chủ được chọn từ nhóm bao gồm:

- *E. coli*,
- tế bào động vật có vú, và
- nấm men.

2. Phương pháp in vitro theo điểm 1, trong đó IL-2 tái tổ hợp của người và các mutein dẫn xuất của nó được dung hợp với protein bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm:

- protein vỏ capsit của thực khuẩn thể dạng sợi,
 - albumin,
 - vùng Fc kháng thể,
- kháng thể hoàn chỉnh, và
- mảnh kháng thể bao gồm miền thay đổi.

3. Phương pháp in vitro theo điểm 1 hoặc 2 để cải biến sinh lý học của tế bào và/hoặc mô bình thường hoặc khối u.

4. Phương pháp in vitro theo điểm 3, trong đó tế bào đã cải biến là tế bào NK, lymphô bào T hoặc B.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

- <110> CENTRO DE INMUNOLOGÍA MOLECULAR
- <120> PHƯƠNG PHÁP LÀM TĂNG MỨC TIẾT CỦA INTERLEUKIN 2 VÀ PROTEIN THU ĐƯỢC BẰNG PHƯƠNG PHÁP NÀY
- <130> 542016CU00
- <160> 18
- <170> PatentIn phiên bản 3.5
- <210> 1
 <211> 133
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
- <220>
 <223> Bảng kỹ thuật tái tổ hợp ADN
- <400> 1
- Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
 1 5 10 15
- Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
 20 25 30
- Asn Pro Glu Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
 35 40 45
- Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
 50 55 60
- Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
 65 70 75 80
- Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
 85 90 95
- Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
 100 105 110
- Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile
 115 120 125
- Ile Ser Thr Leu Thr
 130
- <210> 2
 <211> 133
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
- <220>
 <223> Bảng kỹ thuật tái tổ hợp ADN

<400> 2

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
1 5 10 15

Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
20 25 30

Asn Pro Asp Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
35 40 45

Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
50 55 60

Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
65 70 75 80

Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
85 90 95

Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
100 105 110

Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile
115 120 125

Ile Ser Thr Leu Thr
130

<210> 3

<211> 133

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Bằng kỹ thuật tái tổ hợp ADN

<400> 3

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
1 5 10 15

Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
20 25 30

Asn Pro Gln Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
35 40 45

Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
50 55 60

Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
65 70 75 80

Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
85 90 95

Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
100 105 110

Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile
115 120 125

Ile Ser Thr Leu Thr
130

<210> 4
<211> 133
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Bảng kỹ thuật tái tổ hợp ADN

<400> 4

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
1 5 10 15

Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
20 25 30

Asn Pro Glu Leu Thr Ala Met Leu Thr Ala Lys Phe Ala Met Pro Lys
35 40 45

Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Ala Leu Lys
50 55 60

Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
65 70 75 80

Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
85 90 95

Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
100 105 110

Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile
115 120 125

Ile Ser Thr Leu Thr
130

<210> 5
<211> 133
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Bảng kỹ thuật tái tổ hợp ADN

<400> 5

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
1 5 10 15

Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
20 25 30

Asn Pro Asp Leu Thr Ala Met Leu Thr Ala Lys Phe Ala Met Pro Lys
35 40 45

Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Ala Leu Lys
50 55 60

Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
65 70 75 80

Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
85 90 95

Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
100 105 110

Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile
115 120 125

Ile Ser Thr Leu Thr
130

<210> 6

<211> 133

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Bảng kỹ thuật tái tổ hợp ADN

<400> 6

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
1 5 10 15

Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
20 25 30

Asn Pro Gln Leu Thr Ala Met Leu Thr Ala Lys Phe Ala Met Pro Lys
35 40 45

Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Ala Leu Lys
50 55 60

Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
65 70 75 80

Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
85 90 95

Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
100 105 110

Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile
115 120 125

Ile Ser Thr Leu Thr
130

<210> 7

<400> 7
000

<210> 8

<211> 133

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Bảng kỹ thuật tái tổ hợp ADN

<400> 8

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
1 5 10 15

Leu Leu Leu Asp Leu Val Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
20 25 30

Asn Pro Asp Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
35 40 45

Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
50 55 60

Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
65 70 75 80

Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
85 90 95

Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
100 105 110

Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Ala Ser Ile
115 120 125

Asp Gly Thr Leu Thr
130

<210> 9
 <211> 133
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Bảng kỹ thuật tái tổ hợp ADN

<400> 9

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
 1 5 10 15

Leu Leu Leu Asp Leu Val Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
 20 25 30

Asn Pro Gln Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
 35 40 45

Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
 50 55 60

Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
 65 70 75 80

Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
 85 90 95

Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
 100 105 110

Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Ala Ser Ile
 115 120 125

Asp Gly Thr Leu Thr
 130

<210> 10
 <211> 133
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Bảng kỹ thuật tái tổ hợp ADN

<400> 10

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
 1 5 10 15

Leu Asn Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
 20 25 30

Asn Pro Glu Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
 35 40 45

Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
50 55 60

Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
65 70 75 80

Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
85 90 95

Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
100 105 110

Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Tyr Ser Ile
115 120 125

Ile Arg Thr Leu Thr
130

<210> 11
<211> 133
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Bằng kỹ thuật tái tổ hợp ADN

<400> 11

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
1 5 10 15

Leu Asn Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
20 25 30

Asn Pro Asp Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
35 40 45

Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
50 55 60

Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
65 70 75 80

Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
85 90 95

Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
100 105 110

Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Tyr Ser Ile
115 120 125

Ile Arg Thr Leu Thr

130

<210> 12
 <211> 133
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Bảng kỹ thuật tái tổ hợp ADN

<400> 12

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
 1 5 10 15

Leu Asn Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
 20 25 30

Asn Pro Gln Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
 35 40 45

Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
 50 55 60

Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
 65 70 75 80

Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
 85 90 95

Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
 100 105 110

Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Tyr Ser Ile
 115 120 125

Ile Arg Thr Leu Thr
 130

<210> 13
 <211> 133
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Bảng kỹ thuật tái tổ hợp ADN

<400> 13

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
 1 5 10 15

Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
 20 25 30

Asn Pro Glu Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys

35 40 45
 Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
 50 55 60
 Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Phe
 65 70 75 80
 Asp Pro Arg Asp Val Val Ser Asn Ile Asn Val Phe Val Leu Glu Leu
 85 90 95
 Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
 100 105 110
 Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile
 115 120 125
 Ile Ser Thr Leu Thr
 130
 <210> 14
 <211> 133
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Bằng kỹ thuật tái tổ hợp ADN
 <400> 14
 Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
 1 5 10 15
 Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
 20 25 30
 Asn Pro Asp Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
 35 40 45
 Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
 50 55 60
 Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Phe
 65 70 75 80
 Asp Pro Arg Asp Val Val Ser Asn Ile Asn Val Phe Val Leu Glu Leu
 85 90 95
 Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
 100 105 110
 Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile
 115 120 125

Ile Ser Thr Leu Thr
130

<210> 15
<211> 133
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Bằng kỹ thuật tái tổ hợp ADN

<400> 15

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
1 5 10 15

Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
20 25 30

Asn Pro Gln Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
35 40 45

Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
50 55 60

Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Phe
65 70 75 80

Asp Pro Arg Asp Val Val Ser Asn Ile Asn Val Phe Val Leu Glu Leu
85 90 95

Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
100 105 110

Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile
115 120 125

Ile Ser Thr Leu Thr
130

<210> 16
<211> 133
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Bằng kỹ thuật tái tổ hợp ADN

<400> 16

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
1 5 10 15

Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
20 25 30

Asn Pro Glu Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
 35 40 45

Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
 50 55 60

Pro Leu Glu Glu Ala Leu Asn Leu Ala Pro Ser Lys Asn Phe His Leu
 65 70 75 80

Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
 85 90 95

Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
 100 105 110

Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile
 115 120 125

Ile Ser Thr Leu Thr
 130

<210> 17
 <211> 133
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Bảng kỹ thuật tái tổ hợp ADN

<400> 17

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
 1 5 10 15

Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
 20 25 30

Asn Pro Asp Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
 35 40 45

Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
 50 55 60

Pro Leu Glu Glu Ala Leu Asn Leu Ala Pro Ser Lys Asn Phe His Leu
 65 70 75 80

Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
 85 90 95

Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
 100 105 110

Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile

115

120

125

Ile Ser Thr Leu Thr
130

<210> 18

<211> 133

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Bảng kỹ thuật, tái tổ hợp ADN

<400> 18

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
1 5 10 15

Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
20 25 30

Asn Pro Gln Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
35 40 45

Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
50 55 60

Pro Leu Glu Glu Ala Leu Asn Leu Ala Pro Ser Lys Asn Phe His Leu
65 70 75 80

Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
85 90 95

Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
100 105 110

Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile
115 120 125

Ile Ser Thr Leu Thr
130

1/7

Fig. 1

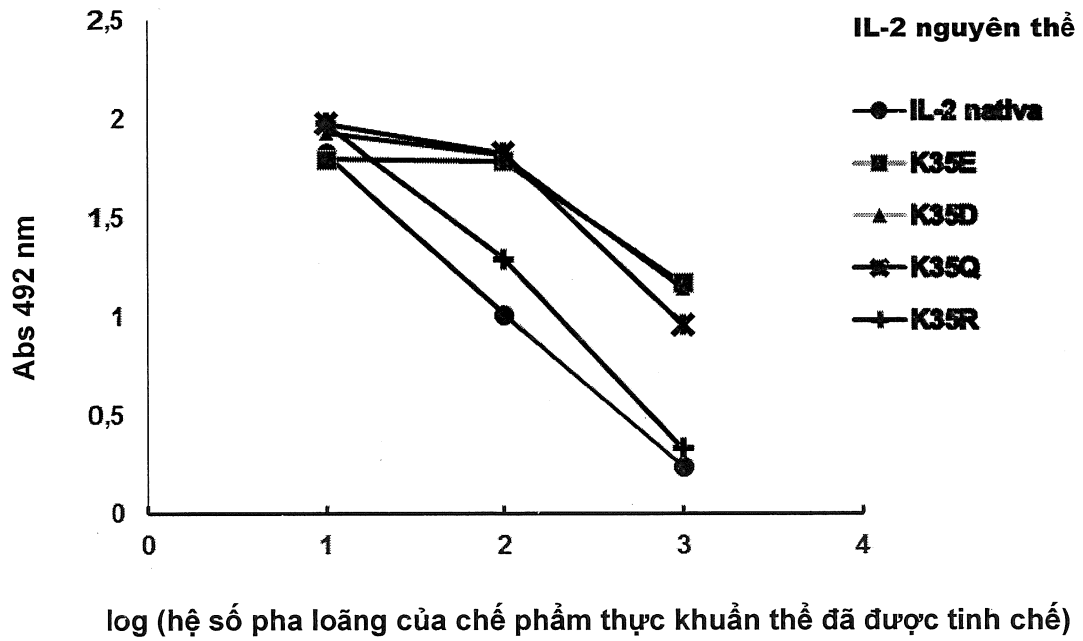
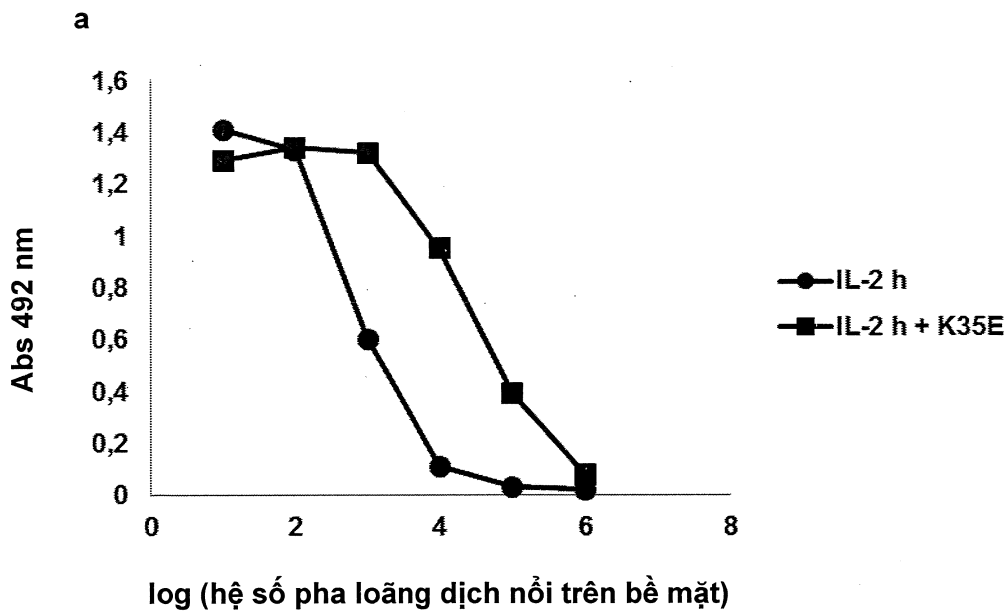
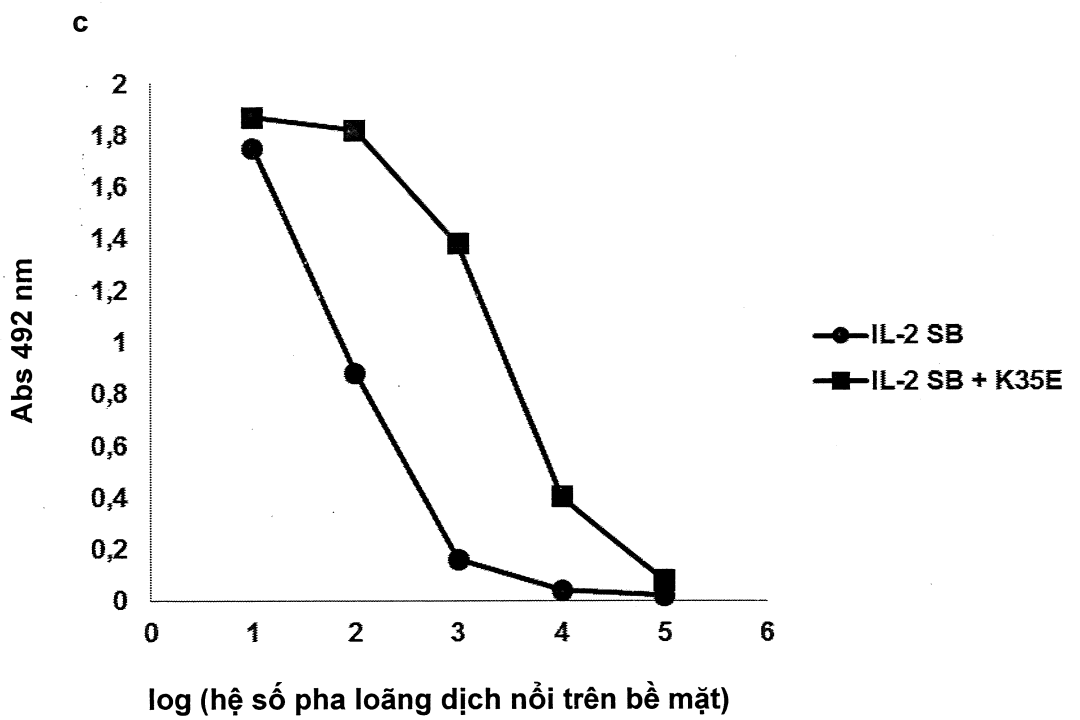
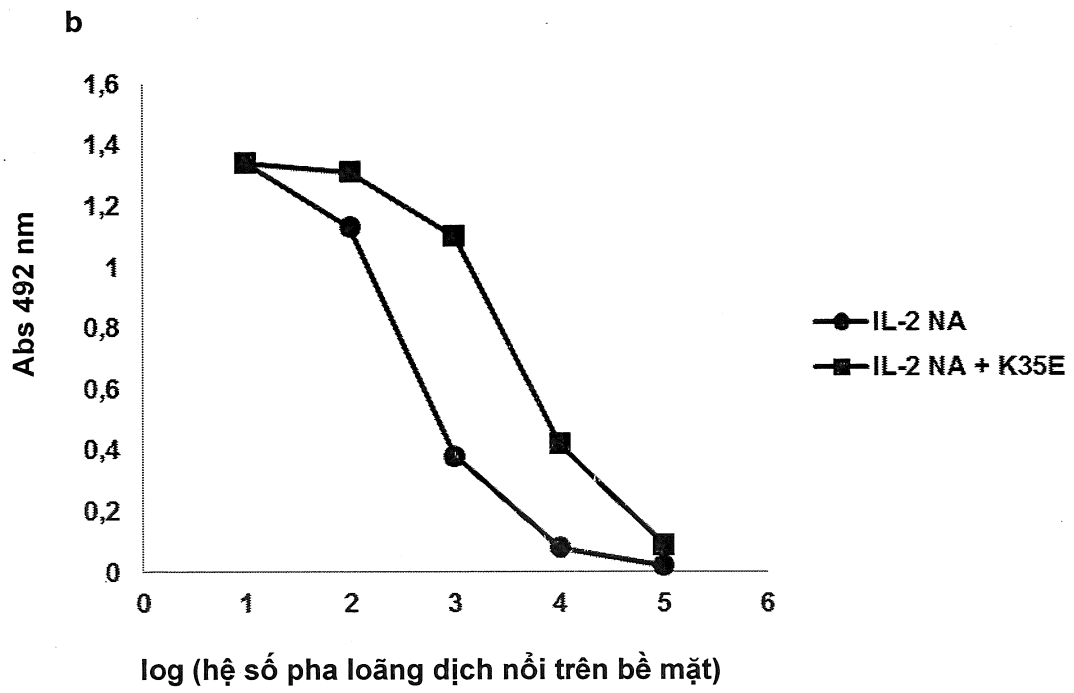


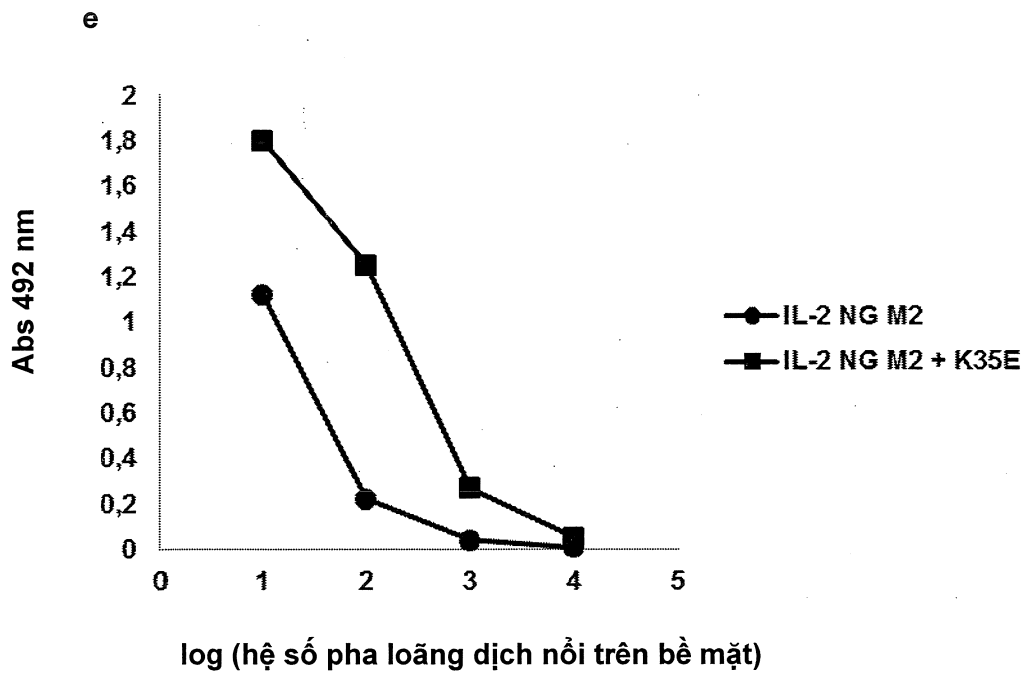
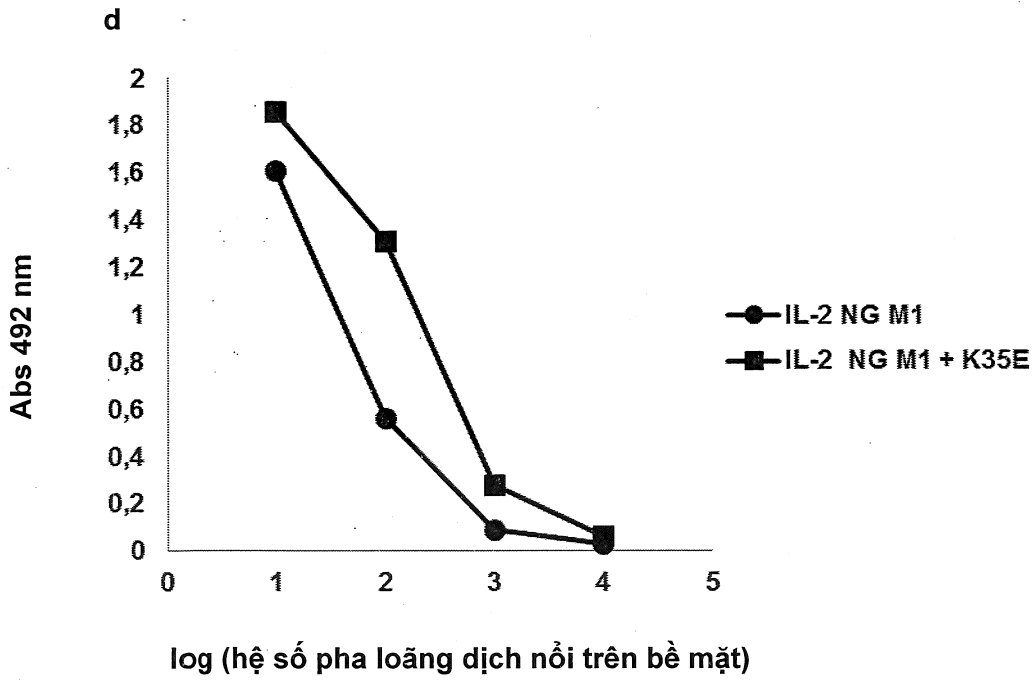
Fig. 2



2/7
Fig. 2

3/7

Fig. 2



4/7

Fig. 3

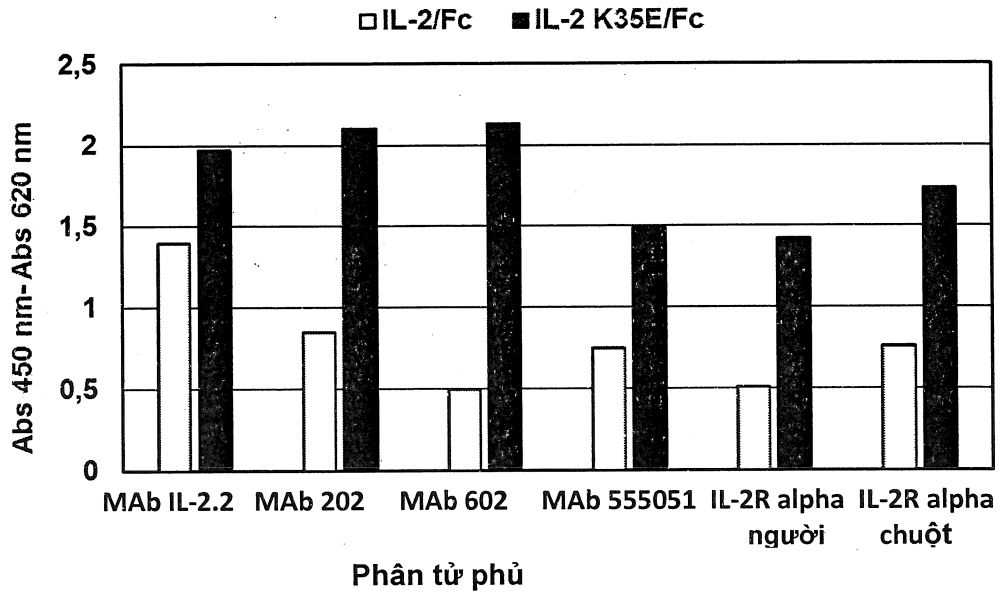
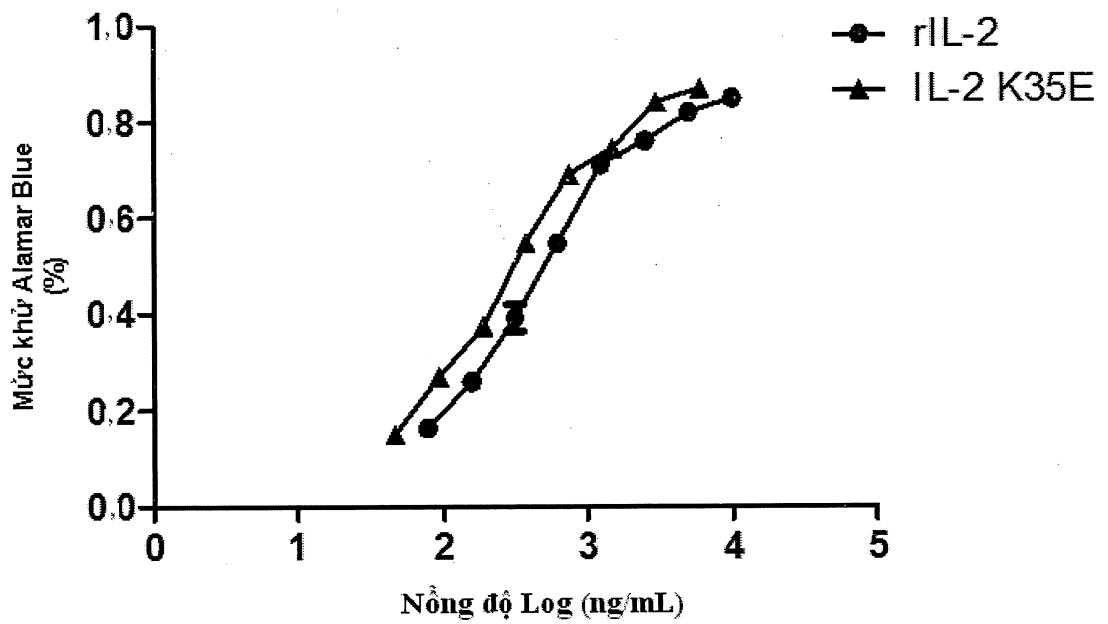


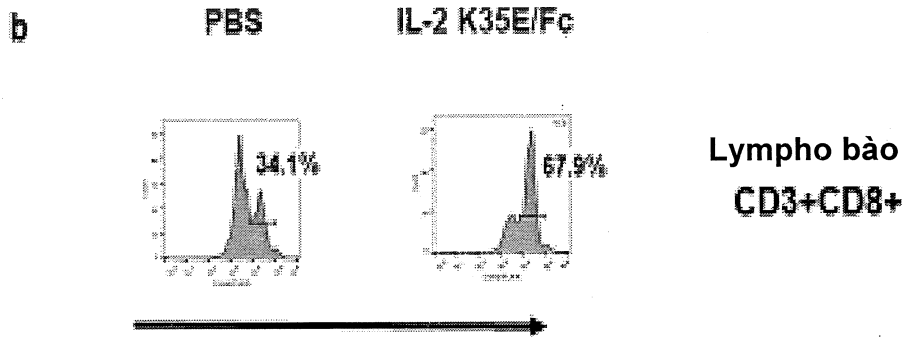
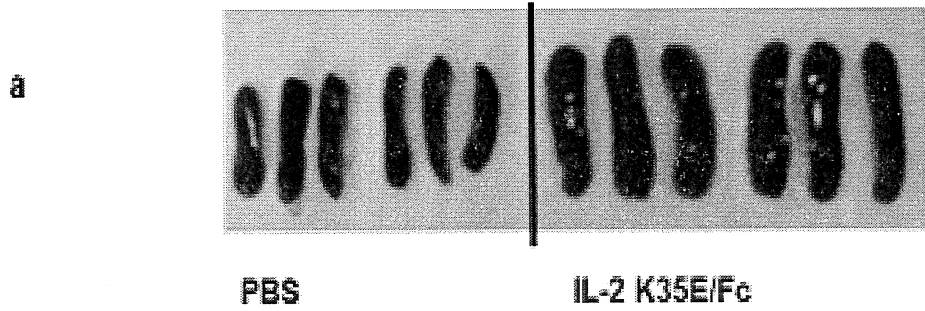
Fig. 4



5/7

Fig. 5

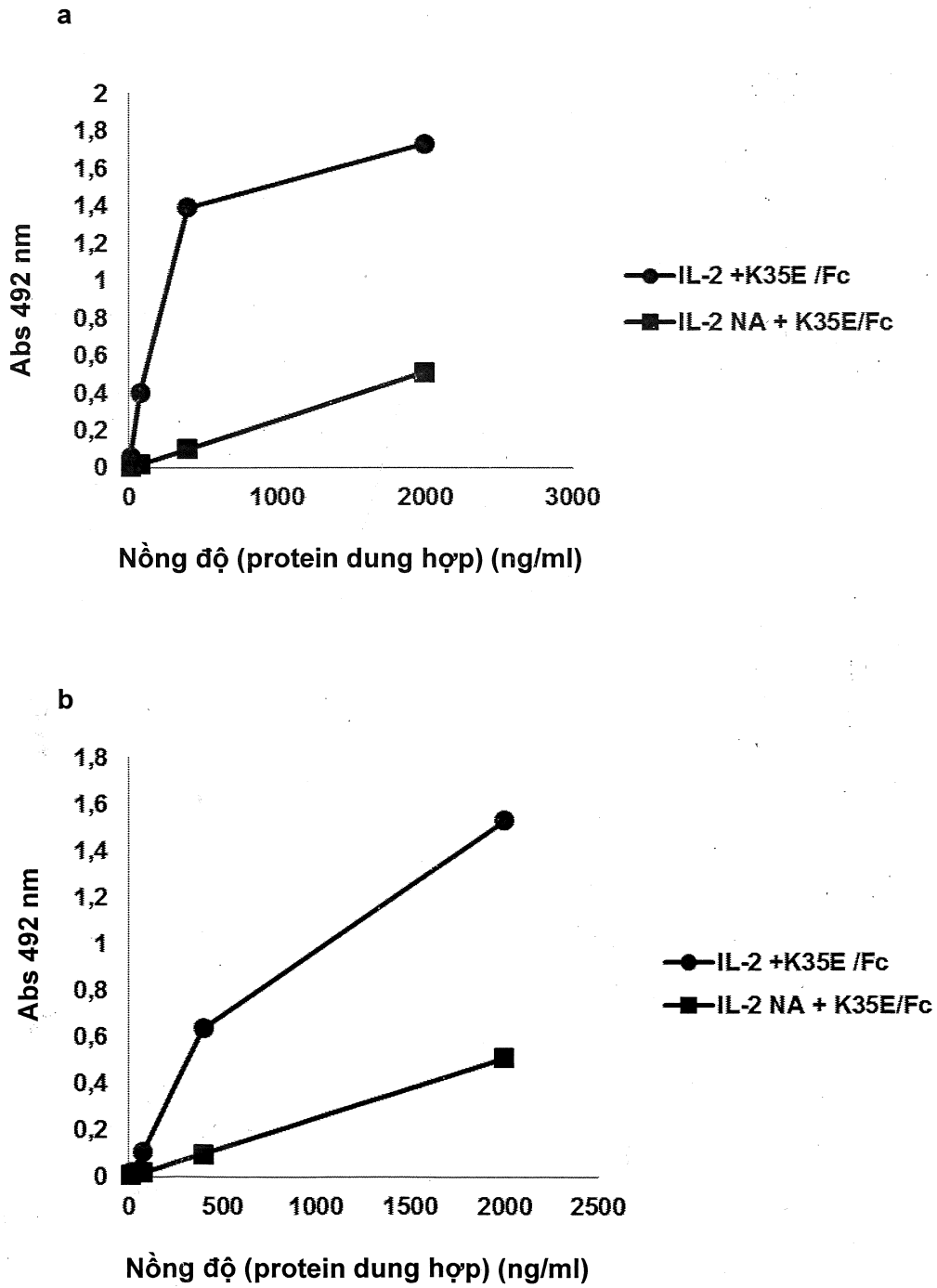
Lá lách



Gen đánh dấu phenotyp của tế bào trí
nhớ T

6/7

Fig. 6



7/7

Fig. 7

