



(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)



1-0027258

(51)⁷ C12N 15/09; C12N 15/70; C12N 15/63 (13) B

(21) 1-2009-01862

(22) 03/09/2009

(45) 25/02/2021 395

(43) 27/09/2010 270A

(73) TAIWAN ADVANCE BIO-PHARM INC (TW)

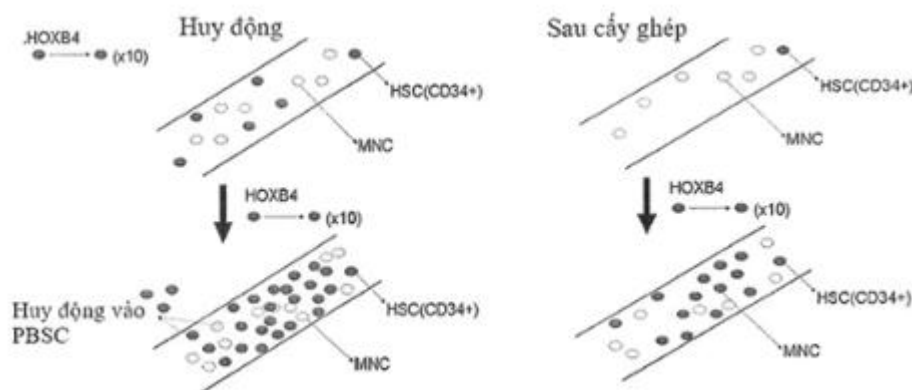
12F, No. 25 Lane 169, Kang-Ning St. Hsi-Chi City, Taipei County, Taiwan

(72) Kou-Juey Wu (TW).

(74) Công ty TNHH Sáng chế ACTIP (ACTIP PATENT LIMITED)

(54) PHƯƠNG PHÁP TẠO PROTEIN TAT-HOXB4H VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA PROTEIN NÀY

(57) Sáng chế đề xuất phương pháp mới và sáng tạo để tạo thể protein dung hợp đính thêm gốc histidin tại đầu tận cùng C (TAT-HOXB4H), tạo ra tác dụng có lợi không ngờ với hiệu suất và tính ổn định gia tăng để cho phép sử dụng *in vivo* protein này và dược phẩm chứa hoạt chất TAT-HOXB4H có hoạt tính kích thích gia tăng quá trình tạo máu. Cụ thể hơn, protein tái tổ hợp TAT-HOXB4H gia tăng sự cấy ghép tủy xương, hồi phục quá trình tạo máu, phục hồi tế bào tủy xương và số tế bào gốc lưu thông, đặc biệt sau hóa trị liệu hoặc xạ trị.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp mới và sáng tạo để tạo ra protein dung hợp TAT-HOXB4 có gắn histidin tại đầu tận cùng C (TAT-HOXB4H) với ít nhất 6 gốc histidin ở đầu tận cùng C. Phương pháp này tạo ra lợi ích bất ngờ là tính ổn định và hiệu suất gia tăng, cho phép sử dụng thành công protein này *in vivo*, và được phẩm chứa hoạt chất TAT-HOXB4H.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các mối quan tâm ngày càng lớn đối với y học tái tạo đã thúc đẩy sự nghiên cứu các tế bào gốc đặc thù theo cơ quan hay các tế bào có khả năng tự đổi mới. Quần thể tế bào tự đổi mới được nghiên cứu tốt nhất là các tế bào gốc tạo máu (HSC) vì đây là những lựa chọn sáng tạo trong điều trị các bệnh từ ung thư đến bệnh chuyển hóa và cho đến thiếu hụt miễn dịch.

Quá trình tạo tế bào máu mà nhờ đó tế bào hồng cầu và bạch cầu được thay thế bằng sự phân chia của các tế bào HSC (tế bào gốc tạo máu) nằm trong tủy xương được gọi là quá trình tạo máu. Các tế bào HSC có các đặc tính chủ chốt để có thể tự đổi mới và biệt hóa thành những tế bào trưởng thành của cả dòng tế bào dạng lympho và dòng tế bào dạng tủy. Tuy nhiên, những cơ chế di truyền chịu trách nhiệm điều khiển quá trình tự đổi mới và kết quả biệt hóa của quá trình phân chia các tế bào HSC vẫn chưa được hiểu rõ.

Hiện nay, việc cấy ghép những tế bào HSC từ tủy xương người trưởng thành, máu ngoại biên đã huy động, và máu dây rốn (UCB) đã được sử dụng lâm sàng để điều trị ung thư máu (bệnh bạch cầu và u lympho) và để giúp hệ miễn dịch hồi phục sau đợt hóa trị liệu liều cao những bệnh ung thư không phải ung thư máu. Tuy nhiên, để cấy ghép hiệu quả thì cần lượng đáng kể các tế bào HSC từ nhiều nguồn khác nhau và có thể cần điều trị kéo dài.

Các tế bào HSC có thể có nguồn gốc từ tủy xương, máu ngoại biên và UCB (dây rốn). Việc tách tế bào tủy xương phải được thực hiện bằng phẫu thuật và là công đoạn gây đau đớn, vì vậy ít được ưa chuộng. Phương pháp sử dụng máu ngoại biên cũng có

vấn đề vì khó khăn trong quá trình thu nhận những tế bào HSC có chất lượng từ những bệnh nhân bị tổn thương quá trình tạo máu do ốm hay phải trải qua hóa trị liệu. Máu dây rốn là dễ lấy hơn và chất lượng của các tế bào HSC là cao hơn nhiều nhưng lại có nhược điểm là số lượng tế bào HSC có thể thu được bằng phương pháp này lại có giới hạn. Số tế bào từ mỗi lần tách là đủ dùng cho trẻ em, nhưng có thể không đủ cho người lớn. Để giải quyết vấn đề tiềm tàng này, quả thật cần phải có phương pháp mới tạo điều kiện cho sự tăng sinh *in vitro* các tế bào HSC bằng cách can thiệp quá trình tự đổi mới tế bào gốc để phục vụ việc cấy ghép tế bào HSC.

Đã biết là các yếu tố phiên mã đóng vai trò quan trọng trong điều tiết biểu hiện gen và sự biệt hóa tế bào gốc (Orkin, S. H. Nature Reviews Genetics 1, 57-64, 2000). Yếu tố phiên mã chuyển đổi nhiều quá trình tế bào khác nhau thông qua việc gắn kết vào gen đích đặc thù, và sự điều khiển này cũng phụ thuộc vào nồng độ của nó trong tế bào. Nhóm các yếu tố phiên mã có tên gọi là ADN liên kết homeobox (HOX) trước đây được biết là đóng vai trò chính trong quá trình tạo phôi. Hiện nay, họ HOX còn được biết là có liên quan đến quá trình phát triển của các tế bào HSC (Buske, C. và cộng sự, J. Hematol. 71, 301-308, 2000). Dr. Guy Sauvageau thuộc University of Montreal đã nghiên cứu việc điều khiển quá trình tự đổi mới HSC bằng yếu tố phiên mã HOX. Nhóm Dr. Sauvageau đã chỉ ra gen homeobox HOXB4 là cực kỳ quan trọng trong điều khiển quá trình tự đổi mới các tế bào HSC nhờ khả năng của gen này duy trì được quần thể HSC trong tủy xương. Những gen HOX được biểu hiện trong tế bào máu được phát hiện đầu tiên ở dòng tế bào người và chuột nhắt. Một số dạng của gen HOX được biểu hiện rộng khắp trong nhiều dạng tế bào khác nhau, trong khi một số dạng khác của gen này lại chỉ biểu hiện riêng ở một số dạng tế bào nhất định hay chỉ biểu hiện ở một số thời điểm nhất định trong quá trình phát triển. Ví dụ, tám thành viên thuộc cụm gen HOXB của người được biểu hiện ở giai đoạn sớm trong quá trình phát triển hồng cầu. Tuy nhiên, những gen HOXB như HOXB4 và HOXB7 cũng được biểu hiện trong tế bào T và tế bào B. Nhóm của Sauvageau đã xác nhận rằng chín gen HOXA, tám gen HOXB và bốn gen HOXC được biểu hiện trong tế bào tủy xương CD34⁺. Trong số những tế bào tủy xương CD34⁺ này, HOXB2, HOXB9 và HOXA10 có nhiều nhất trong tế bào gốc của hồng cầu. Tuy nhiên, không có gen HOX nào biểu hiện trong tế bào CD34⁺. Gen homeobox B4 (HOXB4) của người gần đây được chứng minh là có thể làm gia tăng hữu hiệu số lượng tế bào HSC ở dạng protein retrovirus hay protein tái tổ hợp. Các protein

tái tổ hợp TAT-HOXB4 đã được sử dụng trong phòng thí nghiệm để gia tăng tế bào gốc tránh nguy cơ phải cài thêm retrovirus hay cùng nuôi cấy với tế bào đệm tủy xương (tham chiếu Krosi, J. và cộng sự, Nature Medicine 9, 1428-1432, 2003). Vì vậy, protein HOXB4 thường được sử dụng làm chất kích thích để thúc đẩy sự gia tăng số lượng tế bào HSC *in vitro* (Fig.1).

Bằng chứng gần đây chỉ ra rằng bằng cách thêm đoạn trình tự protein TAT vào đầu tận cùng N của HOXB4, có thể đưa gen HOXB4 ngoại sinh vào tế bào. Đoạn trình tự TAT này hướng việc vận chuyển HOXB4 từ ngoài tế bào vào trong tế bào. Khi đã vào trong tế bào chất, HOXB4 có thể giãn ra trở lại dạng cấu hình nguyên thủy của nó bởi chaperon HSP90. TAT-HOXB4 có khả năng thúc đẩy tăng sinh HSC từ 2 đến 6 lần (Amsellem, S. và cộng sự, Nature Medicine 9, 1423-1427, 2003; Krosi, J. và cộng sự, Nature Medicine 9, 1428-1432, 2003). Tuy nhiên, hiệu suất thu nhận protein tái tổ hợp TAT-HOXB4 từ *E. coli* bằng cách sử dụng cách tinh chế thông thường là quá thấp.

Để tăng lượng protein tái tổ hợp TAT-HOXB4 tạo ra, đã phát triển phương pháp tạo protein TAT-HOXB4H có thêm sáu gốc histidin được đính vào đầu tận cùng C và hiệu suất tạo tăng gấp 3-4 lần so với hiệu suất tạo protein gốc sau tinh chế. Protein tái tổ hợp thu được (TAT-HOXB4H) chứa sáu gốc 6 histidin ở đầu tận cùng C. Phương pháp này đã được đề cập trong đơn PCT số PCT/CN2006/000646.

Đã biết rằng có thể sử dụng protein tái tổ hợp TAT-HOXB4H để tăng nhanh số lượng máu ngoại biên hay tế bào gốc UCB của người và những tế bào gốc gia tăng này vẫn giữ tính đa năng của mình. Ngoài ra, những tế bào gốc đã xử lý bằng protein tái tổ hợp TAT-HOXB4H được đưa vào tủy xương của chuột nhất mắc chứng thiếu hụt miễn dịch kết hợp đại tháo đường nặng thể không béo phì (NOD-SCID) và tế bào bạch cầu của người đã được phát hiện trong các tế bào bạch cầu ngoại biên, điều này cho thấy sự đổi mới miễn dịch và quá trình tạo máu ở chuột nhất.

Tuy nhiên, protein tái tổ hợp TAT-HOXB4H chưa bao giờ được sử dụng trước đây làm chất kích thích quá trình tạo máu *in vivo*, đặc biệt là để tái tạo lại sự tạo máu, sự bành trướng về số lượng, lập lại quần thể tế bào tủy xương và để gia tăng số lượng tế bào gốc tuần hoàn ở ngoại biên, đặc biệt là sau quá trình chiếu xạ hay hóa trị liệu. Krosi và cộng sự (2003) và Amsellem và cộng sự (2003) không thể thu nhận được số lượng lớn protein HOXB4 có tính ổn định cao để sử dụng được trong các nghiên cứu lâm sàng

nhằm bành trướng số lượng tế bào HSC. Theo sáng chế này, tổng lượng protein TAT-HOXB4H thu được sau tinh chế thường là từ 6 đến 10mg cho một lít nuôi cấy, trong khi tổng lượng protein TAT-HOXB4 thu được sau tinh chế cho một lít nuôi cấy bằng các phương pháp kỹ thuật trước đây thường là từ 1mg đến 2mg. Plasmit pTAT-HA-HOXB4 được sử dụng để biểu hiện protein TAT-HOXB4 bằng các phương pháp kỹ thuật trước đây là quà tặng của Dr. Guy Sauvageau thuộc University of Montreal, Canada. Phương pháp tinh chế protein TAT-HOXB4H theo sáng chế cho thấy hiệu suất thu được protein là cao hơn hẳn khi sử dụng *in vivo*. Krosi và cộng sự (2003) cũng cho biết là phần lớn protein TAT-HOXB4 của họ bị mất sau 4 giờ ủ trong môi trường có huyết thanh. Sáng chế này cho thấy protein TAT-HOXB4H ổn định cao có ý nghĩa thậm chí sau 4 tuần, và đây là yếu tố chủ chốt cho việc sử dụng protein TAT-HOXB4 trong các nghiên cứu lâm sàng.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế dựa trên phương pháp mới và sáng tạo để tạo ra protein TAT-HOXB4H với hiệu suất và tính ổn định cao, và còn dựa trên phát hiện rằng protein tái tổ hợp TAT-HOXB4H khi được đưa vào cá thể có nhu cầu sẽ làm gia tăng số lượng tế bào tạo máu (HSC) ở cả tủy xương và máu ngoại biên *in vivo*.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp tạo protein TAT-HOXB4H. Phương pháp bao gồm các bước: (a) cung cấp tế bào chủ chứa vật truyền mã hóa protein này; (b) biểu hiện protein này trong tế bào chủ; (c) thu gom dung dịch chứa tinh chế của protein biểu hiện; (d) tinh chế protein này từ dung dịch bằng cách: (i) cho dung dịch vào cột HisTrap; (ii) rửa cột HisTrap; (iii) rửa giải protein đã được tinh chế một phần từ cột HisTrap để tạo dung dịch protein đã được tinh chế một phần; (iv) cho dung dịch protein đã được tinh chế một phần này vào cột MonoSP; (v) rửa cột MonoSP này; (vi) rửa giải protein đã được tinh chế từ cột MonoSP ở dạng biến tính; (e) cuộn xoắn lại protein được biến tính đã được rửa giải bằng cách sử dụng các hợp chất kỵ nước qua các bước: (i) kết hợp protein được biến tính đã được rửa giải và dung dịch của các hợp chất kỵ nước để tạo thành dung dịch của protein và các hợp chất kỵ nước; (ii) khử muối dung dịch của protein và các hợp chất kỵ nước để thu được dung dịch protein và dung dịch hợp chất kỵ nước đã được khử muối; (iii) loại bỏ các hợp chất kỵ nước này khỏi dung dịch protein đã khử muối bằng phương pháp siêu lọc.

Một khía cạnh của sáng chế là đề xuất phương pháp tăng cường huy động các tế bào gốc tạo máu (HSC) từ tủy xương ra máu ngoại biên. Phương pháp này bao gồm các bước: a) cho cá thể có nhu cầu dùng lượng hữu hiệu protein TAT-HOXB4H đã tạo ra bằng các phương pháp được mô tả ở đây, và b) cho protein TAT-HOXB4H làm gia tăng số lượng tuyệt đối tế bào gốc tạo máu trong tủy xương cá thể nhờ đó mà tăng cường huy động tế bào gốc tạo máu vào máu ngoại biên của cá thể.

Khía cạnh nữa của sáng chế là đề xuất phương pháp cải thiện thời gian hồi phục của bệnh nhân đã trải qua cấy ghép tế bào gốc tạo máu (HSC), chiếu xạ hay hóa trị liệu. Phương pháp này bao gồm các bước: a) cho cá thể có nhu cầu dùng lượng hữu hiệu protein TAT-HOXB4H được tạo ra bằng các phương pháp mô tả ở đây, và b) cho protein TAT-HOXB4H làm gia tăng số lượng tuyệt đối tế bào HSC cho tủy xương cá thể.

Một khía cạnh của sáng chế là đề xuất được phẩm có tác dụng huy động tế bào HSC từ tủy xương vào máu ngoại biên của cá thể. Được phẩm theo sáng chế chứa lượng hữu hiệu protein TAT-HOXB4H được tạo ra bằng các phương pháp đã mô tả ở đây đủ để gia tăng số lượng tuyệt đối tế bào HSC trong tủy xương cá thể mà nhờ đó tăng cường sự huy động HSC vào máu ngoại biên của cá thể.

Có thể dùng được phẩm của sáng chế cho bệnh nhân đã trải qua cấy ghép tế bào gốc tạo máu (HSC) cùng nguồn để cải thiện thời gian hồi phục sau cấy ghép HSC.

Có thể dùng được phẩm của sáng chế cho bệnh nhân không miễn cảm với yếu tố kích thích khuẩn lạc bạch cầu hạt (G-CSF) làm chất thay thế G-CSF để huy động HSC vào máu ngoại biên.

Có thể dùng được phẩm của sáng chế ở người cho HSC, nhờ đó mà thu được lượng HSC từ máu ngoại biên đủ để cấy ghép theo quy cách ít mang tính xâm nhập hơn nhiều so với lấy từ tủy xương của người cho này.

Khía cạnh khác của sáng chế đề cập đến việc điều trị các bệnh do sự thiếu hụt HSC di truyền bằng cách dùng có hệ thống lượng hữu hiệu protein tái tổ hợp TAT-HOXB4H được tạo ra bằng phương pháp mô tả ở đây hoặc cho các thể bị bệnh nói trên dùng được phẩm chứa protein này. Nhờ vậy, protein tái tổ hợp TAT-HOXB4H này làm gia tăng số lượng tuyệt đối HSC trong tủy xương cá thể.

Khía cạnh nữa của sáng chế là đề xuất phương pháp cải thiện thời gian hồi phục

sau cấy ghép HSC bằng cách dùng có hệ thống lượng hữu hiệu protein tái tổ hợp TAT-HOXB4H được tạo ra bằng phương pháp đã mô tả ở đây hoặc cho cá thể dùng được phẩm chứa protein này.

Khía cạnh nữa của sáng chế là đề cập đến phương pháp tăng cường sự hồi phục của HSC ở bệnh nhân xạ trị hay hóa trị liệu bằng cách dùng có hệ thống lượng hữu hiệu protein tái tổ hợp TAT-HOXB4H được tạo ra bằng các phương pháp đã mô tả ở đây hoặc dùng cho cá thể dùng được phẩm chứa protein này.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Những khía cạnh và ưu điểm nêu trên của sáng chế sẽ trở nên rõ ràng hơn trong phần mô tả dưới đây cùng với các hình vẽ:

Fig.1 là sơ đồ biểu diễn sự huy động HSC từ tế bào CD34 vào máu ngoại biên (PB) bằng cách bành trướng về số lượng *in vivo*;

Fig.2 là sơ đồ biểu hiện cấu trúc và nhân dòng vô tính pTAT-HOXB4H ở vật truyền pET21b đã cải biến;

Fig.3 là trình tự ADN của pTAT-HOXB4H. Sáu gốc histidin bổ sung thêm vào các đầu tận cùng N và C ở pTAT-HOXB4H được gạch chân và đoạn TAT được tô màu sáng;

Fig.4 là trình tự protein của TAT-HOXB4H.

Fig.5 là ảnh chụp phân tích 10% SDS-polyacrylamit gel (1,5mm) khi tinh chế protein TAT-HOXB4H. SDS-polyacrylamit gel được nhuộm màu bằng xanh coomassie. Đường 1, các thang chuẩn trọng lượng phân tử (M), 0,3µg protein; đường 2, dịch tan tế bào từ các tế bào BL21(DE3)pLysS chưa cảm ứng biểu hiện protein TAT-HOXB4H, 1µg protein; đường 3, dịch tan tế bào từ các tế bào BL21(DE3)pLysS đã cảm ứng biểu hiện protein TAT-HOXB4H với 1mM IPTG, 1µg protein; đường 4, TAT-HOXB4H đã được tinh chế, 0,7mg protein; đường 5, TAT-HOXB4 đã được tinh chế (0,2mg protein). Plasmid pTAT-HA-HOXB4 được sử dụng để biểu hiện protein TAT-HOXB4 (đường 5) được đề xuất bởi Dr. Guy Sauvageau thuộc University of Montreal, Canada. Các thể tích như nhau của các phân đoạn thu từ cột MonoSP được nạp trong các đường 4 và 5;

Fig.6 là ảnh chụp phân tích SDS-polyacrylamit gel về tính ổn định của protein TAT-HOXB4H tinh chế được bảo quản trong PBS ở 0 giờ (A) và 16 giờ (B) ở 4°C. M

là các thang chuẩn trọng lượng phân tử, 0 là 0 giờ ủ ở 4°C, 16 là 16 giờ ủ ở 4°C;

Fig.7 là đồ thị thể hiện tính ổn định của protein TAT-HOXB4H được bảo quản ở 4°C và -20°C trong PBS và trong đệm bảo quản, IMDM, phân tích bằng 10% SDS-polyacrylamit sau khi nhuộm xanh coomassie. Các mũi tên là các dải protein TAT-HOXB4H;

Fig.8A là đồ thị thể hiện tác dụng kích thích của G-CSF lên số tế bào gốc CD34⁺ trong tủy xương chuột nhắt được phân tích bằng tế bào kế;

Fig.8B là đồ thị thể hiện tác dụng kích thích của PBS lên số tế bào gốc CD34⁺ trong tủy xương chuột nhắt được phân tích bằng tế bào kế;

Fig.8C là đồ thị thể hiện tác dụng kích thích của TAT-HOXB4H lên số tế bào gốc CD34⁺ trong tủy xương chuột nhắt được phân tích bằng tế bào kế;

Fig.9A là đồ thị thể hiện tác dụng kích thích của G-CSF lên số tế bào gốc CD34⁺ trong tủy xương khỉ redut được phân tích bằng tế bào kế;

Fig.9B là đồ thị thể hiện tác dụng kích thích của TAT-HOXB4H cùng với G-CSF lên số tế bào gốc CD34⁺ trong tủy xương khỉ redut được phân tích bằng tế bào kế;

Fig.9C là đồ thị thể hiện tác dụng kích thích của TAT-HOXB4H lên số tế bào gốc CD34⁺ trong tủy xương khỉ redut được phân tích bằng tế bào kế;

Fig.9D là đồ thị thể hiện tác dụng của PBS lên số tế bào gốc CD34⁺ trong tủy xương khỉ redut được phân tích bằng tế bào kế;

Fig.10 là đồ thị thể hiện tác dụng của protein TAT-HOXB4H lên sự phục hồi tạo máu ở chuột nhắt NOD-SCID; và

Fig.11 là đồ thị thể hiện tác dụng của protein TAT-HOXB4H lên sự hồi phục tạo máu ở chuột nhắt Balb/c sau khi hóa trị liệu bằng cisplatin.

Mô tả chi tiết sáng chế

I. Protein TAT-HOXB4H

Sáng chế đề cập đến phương pháp mới và sáng tạo để tạo protein TAT-HOXB4H, cho lợi ích bất ngờ là tính ổn định và hiệu suất gia tăng, điều kiện để dùng protein này *in vivo*. Protein TAT-HOXB4H là một cấu trúc chứa ba thành phần: TAT, HOXB4, và đuôi histidin đính kèm. HOXB4 là thành viên họ HOX của các yếu tố phiên mã và thúc

đẩy sự bành trướng về số lượng HSC. TAT cho phép gốc HOXB4 được vận chuyển vào tế bào. Đuôi histidin đính kèm cho phép gia tăng hiệu suất ban đầu từ các nguồn biểu hiện tái tổ hợp, cho dù phương pháp này còn tăng tiếp hiệu suất của protein. pTAT-HOXB4H được thiết kế như trên Fig.2, và trình tự ADN được thể hiện trên Fig.3. Protein tái tổ hợp TAT-HOXB4H được dùng để chỉ protein dung hợp TAT-HOXB4 có thêm sáu gốc histidin đính vào đầu tận cùng C (Fig.4).

Trừ khi có quy định khác, trình tự axit amin của protein (nghĩa là “cấu trúc sơ cấp” hay “trình tự sơ cấp” của nó) có thể được viết từ đầu amino đến đầu carboxy. Ở những hệ phi sinh học (ví dụ, hệ dùng phương pháp tổng hợp trạng thái rắn), cấu trúc sơ cấp của protein (cấu trúc này cũng bao gồm các vị trí liên kết disulfit (cystein)) có thể do người sử dụng xác định.

Thuật ngữ “khuyết đoạn” được dùng để chỉ thay đổi axit amin hay trình tự nucleotit do không có một hoặc nhiều gốc axit amin hoặc nucleotit. Thuật ngữ “chèn” hay “thêm” được dùng để chỉ những thay đổi axit amin hay trình tự nucleotit dẫn đến việc có thêm một hay nhiều gốc axit amin hay nucleotit, lần lượt, ở phân tử hay dạng đại diện của nó, so với trình tự tham chiếu, ví dụ, trình tự được thấy ở phân tử có nguồn gốc tự nhiên. Thuật ngữ “thay thế” được dùng để chỉ sự thay thế một hay nhiều axit amin hoặc nucleotit lần lượt bằng các axit amin hay nucleotit khác nhau.

Các trình tự tương tự hay tương đồng (ví dụ có ít nhất khoảng 85% đồng nhất trình tự) với các trình tự được mô tả ở đây cũng là một phần của sáng chế này. Theo một số phương án, sự đồng nhất trình tự có thể khoảng 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc cao hơn. Theo cách khác, sự đồng nhất đáng kể tồn tại khi các đoạn axit nucleic có thể lai trong điều kiện lai chọn lọc (ví dụ điều kiện lai khắt khe), với đoạn bổ trợ của chúng. Các axit nucleic có thể có trong toàn bộ tế bào, trong dịch tan tế bào, hoặc ở dạng tinh khiết một phần hoặc tinh khiết đáng kể.

Cách tính độ “tương đồng” hay “độ đồng nhất” trình tự giữa hai trình tự (các thuật ngữ này có thể được sử dụng thay thế lẫn nhau) như sau. Sắp xếp thẳng hàng để so các trình tự nhằm mục đích so sánh tối ưu (ví dụ các khoảng trống có thể được đưa vào một trong hai trình tự hay vào cả hai trình tự axit amin hay axit nucleic thứ nhất và thứ hai nhằm so hàng tối ưu và có thể loại các trình tự không tương đồng khỏi mục đích so sánh). Theo phương án được ưu tiên, chiều dài trình tự tham chiếu được sắp xếp thẳng

hàng để so sánh ít nhất là bằng 30%, tốt hơn nếu ít nhất bằng 40%, tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 50%, thậm chí tốt hơn nữa là ít nhất 60%, và tốt nhất là ít nhất 70%, 80%, 90%, 100% chiều dài trình tự tham chiếu. Sau đó, so sánh các gốc axit amin hoặc nucleotit ở các vị trí axit amin hoặc nucleotit tương ứng. Khi vị trí ở trình tự thứ nhất bị chiếm bởi axit amin hoặc nucleotit giống thế tại vị trí tương ứng ở trình tự thứ hai, thì các phân tử này đồng nhất tại vị trí này (thuật ngữ “độ đồng nhất” axit amin hay axit nucleic là tương đương với thuật ngữ “độ tương đồng” axit amin hay axit nucleic). Phần trăm đồng nhất giữa hai trình tự là hàm của số vị trí đồng nhất giữa các trình tự, tính đến số khoảng trống, và chiều dài mỗi khoảng trống, cần đưa vào để sắp xếp thẳng hàng so sánh tối ưu hai trình tự.

Việc so sánh các trình tự và xác định phần trăm đồng nhất giữa hai trình tự có thể được thực hiện bằng thuật toán. Theo phương án ưu tiên, phần trăm đồng nhất giữa hai trình tự axit amin được xác định bằng thuật toán Needleman và Wunsch ((1970) J. Mol. Biol. 48:444-453), các thuật toán này đã được đưa vào chương trình GAP trong phần mềm GCG (sẵn có tại địa chỉ <http://www.gcg.com>), sử dụng ma trận Blossum 62 hoặc PAM250, và trọng lượng trống là 16, 14, 12, 10, 8, 6, hoặc 4 và trọng lượng dài bằng 1, 2, 3, 4, 5, hoặc 6. Theo phương án ưu tiên nữa, phần trăm đồng nhất giữa hai trình tự nucleotit được xác định bằng chương trình GAP trong phần mềm GCG (có tại địa chỉ <http://www.gcg.com>), bằng cách sử dụng ma trận NWSgapdna.CMP và trọng lượng trống bằng 40, 50, 60, 70, hoặc 80 và trọng lượng dài bằng 1, 2, 3, 4, 5, hoặc 6. Nhóm thông số được ưu tiên đặc biệt (và là nhóm có thể được sử dụng nếu người sử dụng chưa chắc chắn việc dùng thông số nào để xác định nếu phân tử nằm trong giới hạn đồng nhất hay tương đồng của sáng chế) là ma trận điểm Blossum 62 với hàm phạt trống bằng 12, hàm phạt kéo dài bằng 4, và hàm phạt dịch chuyển bằng 5. Phần trăm đồng nhất giữa hai trình tự axit amin hay nucleotit cũng có thể được xác định bằng cách sử dụng thuật toán của E. Meyers và W. Miller ((1989) CABIOS, 4:11-17), thuật toán này đã được đưa vào chương trình ALIGN (version 2.0), bằng cách sử dụng bảng trọng lượng gốc PAM120, hàm phạt dài trống bằng 12 và hàm phạt trống bằng 4.

II. Phương pháp tạo Protein tái tổ hợp TAT-HOXB4H

A. Nhân dòng vô tính và biểu hiện

Đã biết những hệ thống để nhân dòng vô tính và biểu hiện protein ở nhiều loại tế

bào chủ. Những tế bào thích hợp để tạo protein đã được mô tả, chẳng hạn trong tài liệu: Fernandez và cộng sự (1999) *Gene Expression Systems*, Academic Press, eds. Ngắn gọn thì những tế bào chủ thích hợp là tế bào động vật có vú, tế bào côn trùng, tế bào thực vật, tế bào nấm men, hay tế bào nhân sơ, ví dụ *E. coli*. Tế bào động vật có vú đã được dùng trước đây để biểu hiện protein khác nguồn gốc là các dòng tế bào lympho (ví dụ, NSO), tế bào HEK293, tế bào buồng trứng chuột đồng Trung Quốc (CHO), tế bào COS, tế bào HeLa, tế bào thận chuột đồng con, noãn bào, và tế bào từ động vật chuyển gen, ví dụ tế bào biểu mô của động vật có vú. Có thể chọn hoặc tạo những vật truyền phù hợp để chứa các trình tự điều khiển phù hợp, bao gồm các đoạn trình tự dẫn đầu, các đoạn trình tự kết thúc, các trình tự đã bổ sung chuỗi poly(A), gen tăng cường, gen đánh dấu, và các trình tự khác. Những vật truyền này cũng có thể chứa plasmit hoặc bộ khung virut. Xem chi tiết trong tài liệu: Sambrook và cộng sự, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989). Nhiều kỹ thuật sử dụng vật truyền, kể cả các thao tác, điều chế, gây đột biến, thiết lập trình tự, và chuyển nhiễm ADN, đã được mô tả trong: *Current Protocols in Molecular Biology*, Second Edition, Ausubel và cộng sự eds., John Wiley & Sons (1992).

Khía cạnh nữa là đề xuất phương pháp đưa axit nucleic vào tế bào chủ. Đối với các tế bào nhân thực, những kỹ thuật chuyển nhiễm phù hợp có thể là canxi phosphat, DEAE-Dextran, tạo lỗ bằng xung điện, chuyển nhiễm qua liposom, và tải nạp bằng cách sử dụng retrovirut hoặc các virut khác, ví dụ, vaxinia hoặc baculovirut. Đối với tế bào vi khuẩn, những kỹ thuật chuyển nhiễm phù hợp có thể là kỹ thuật biến nạp dùng canxi clorua, tạo lỗ bằng xung điện, và chuyển nhiễm bằng thể thực khuẩn. Sau khi đưa ADN vào thì có thể thực hiện chọn lọc (ví dụ, tính kháng thuốc) để chọn các tế bào chứa axit nucleic.

B. Tinh chế và cuộn xoắn lại

Có thể phân lập protein TAT-HOXB4H trước tiên từ tế bào chủ tái tổ hợp bằng phương pháp bất kỳ đã biết. Ví dụ, có thể tách protein này từ dịch nổi tế bào, nếu protein có khả năng được tiết ra, hoặc có thể tách protein từ dịch tan tế bào.

Có thể tinh chế protein TAT-HOXB4H bằng cách sử dụng phương pháp sắc ký gồm các bước: (a) cho dịch tan tế bào hoặc dịch nổi tế bào vào cột HisTrap, nếu protein được tiết vào dung dịch; b) rửa cột HisTrap bằng chất đệm; (c) rửa giải protein đã được

tinh chế một phần từ cột HisTrap này (d) cho protein đã được tinh chế một phần này từ cột HisTrap vào cột MonoSP; (e) rửa cột MonoSP bằng chất đệm; (f) rửa giải protein TAT-HOXB4H đã được tinh chế từ cột MonoSP.

Dịch tan tế bào hoặc dịch nổi tế bào, nếu protein có thể được tiết vào dung dịch, có thể được làm trong bằng ly tâm ở 20.000xg trong 30 phút ở 4°C, dịch nổi được điều chỉnh đến 10mM imidazol và nạp vào các cột chelat HisTrap (Amersham Pharmacia). Có thể rửa cột này bằng 8M ure, 20mM HEPES, 0,5mM DTT, 10mM NaCl, độ pH 8,0 và 10mM imidazol để tách các protein chưa gắn kết. Có thể rửa giải protein TAT-HOXB4H được tinh khiết một phần từ cột HisTrap bằng imidazol và muối nồng độ cao.

Để tinh chế tiếp, protein được tinh khiết một phần thu được từ cột HisTrap được cho vào cột MonoSP (Amersham Pharmacia). Rửa cột này bằng 4M ure, 20mM HEPES, 50mM NaCl, độ pH 6,5 để loại những protein không gắn kết. TAT-HOXB4H đã gắn kết có thể rửa giải bằng muối nồng độ cao. Protein TAT-HOXB4H tinh khiết thu được từ công đoạn tinh chế này là ở dạng đã biến tính.

Ngoài ra, protein TAT-HOXB4H đã được biến tính này được rửa giải từ cột MonoSP có thể được cuộn xoắn lại bằng cách sử dụng các hợp chất kỵ nước bằng cách (i) kết hợp protein biến tính đã được rửa giải và dung dịch của các hợp chất kỵ nước để tạo ra dung dịch của protein và các hợp chất kỵ nước; (ii) khử muối dung dịch của protein và các hợp chất kỵ nước để thu được protein và dung dịch hợp chất kỵ nước đã được khử muối; và (iii) tách các hợp chất kỵ nước từ dung dịch protein đã được khử muối bằng phương pháp siêu lọc.

Thuật ngữ “các hợp chất kỵ nước” được dùng để chỉ hợp chất kỵ nước bất kỳ có khả năng bảo vệ protein mong muốn trước sự hình thành các thể kết tụ không tan trong quá trình tách muối biến tính. Các hợp chất kỵ nước thích hợp để sử dụng cho sáng chế này được mô tả trong tài liệu: Oganessian và cộng sự, *Pharmagenomics* (2004) 71, 22-26. Các hợp chất kỵ nước thích hợp là, nhưng không bị giới hạn ở, Triton X-100, tween-20 hoặc các hợp chất polybenzen. Có thể thực hiện siêu lọc hoặc thay đổi chất đệm bằng bộ lọc Centricon hoặc Stir-Cell. Điều kiện siêu lọc hoặc thay đổi chất đệm có thể thay đổi tùy theo người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực, và phụ thuộc vào dạng protein mong muốn.

Theo một phương án, hợp chất kỵ nước trong dung dịch đã được khử muối chứa

protein HOXB4H đã biến tính được tách bằng 5 đến 10 lần thay đổi chất đệm (mỗi lần thực hiện bằng cách ly tâm ở 1.000-2.500xg trong 10 phút) với dung dịch chứa nồng độ từ thấp đến cao của các hợp chất kỵ nước lớn như beta-cyclodextrin nhờ đó protein HOXB4H đã được biến tính được cuộn xoắn lại thành dạng nguyên thủy của nó.

Theo một phương án, protein TAT-HOXB4H tinh khiết có thể được bảo quản trong môi trường IMDM (HyClone) có bán trên thị trường (chất đệm bảo quản 1) ở 4°C hoặc -20°C.

Theo phương án khác, protein TAT-HOXB4H tinh khiết có thể được bảo quản trong môi trường DMEM (HyClone) có bán trên thị trường (chất đệm bảo quản 2) ở 4°C hoặc -20°C.

Theo một phương án, có thể tách gốc His đính ở đầu tận cùng C của TAT-HOXB4H trước khi dùng *in vivo*.

Theo phương án khác, có thể tách gốc His ở đầu tận cùng N của TAT-HOXB4H trước khi dùng *in vivo*.

Theo phương án khác, có thể tách cả hai gốc His ở đầu N và C trước khi dùng *in vivo*.

C. Bào chế dược phẩm

Có thể sử dụng TAT-HOXB4H làm dược phẩm khi kết hợp với chất mang dược dụng. Dược phẩm này có thể chứa, ngoài protein TAT-HOXB4H và chất mang, các chất pha loãng, chất đệm, muối, chất đệm, chất ổn định, chất hòa tan, và các chất đã biết khác trong lĩnh vực này. Thuật ngữ “dược dụng” có nghĩa là chất không độc và không ảnh hưởng đến hiệu quả hoạt tính sinh học của các hoạt chất. Đặc tính của chất mang có thể phụ thuộc vào đường dùng.

Đặc biệt có lợi khi bào chế dược phẩm ở dạng đơn vị liều lượng để dễ dùng và thống nhất dạng liều lượng. Dạng đơn vị liều lượng được dùng ở đây để chỉ các đơn vị vật lý riêng biệt phù hợp làm liều lượng đơn dùng cho cá thể được điều trị; mỗi đơn vị liều chứa lượng hoạt chất đã xác định được tính toán để tạo ra tác dụng điều trị mong muốn cùng với chất mang dược dụng theo yêu cầu. Đặc tính của các dạng đơn vị liều lượng theo sáng chế được quy định bởi và phụ thuộc trực tiếp vào các đặc tính đặc biệt của hoạt chất và tác dụng trị liệu cụ thể cần có, và những giới hạn vốn có trước đây cho

việc pha chế đối với hoạt chất dùng điều trị cho các cá thể.

Các đường dùng cụ thể là, nhưng không bị giới hạn ở, đường miệng, khu trú, ngoài đường tiêu hóa (ví dụ, đặt dưới lưỡi hay ngậm trong miệng), dưới lưỡi, trực tràng, âm đạo, và trong mũi. Thuật ngữ “ngoài đường tiêu hóa” được dùng ở đây bao gồm cả tiêm dưới da, tiêm tĩnh mạch, tiêm bắp, tiêm ức, xoang thể hang, nội tủy mạc, miệng lỗ, niệu đạo hoặc kỹ thuật tiêm truyền. Dược phẩm này được bào chế sao cho hoạt chất của nó có sinh khả dụng khi bệnh nhân dùng thuốc. Dược phẩm có thể ở dạng một hay nhiều đơn vị liều lượng, ví dụ, viên nén có thể là dạng một đơn vị liều lượng, và dạng hộp chứa một hay nhiều hộp chất của sáng chế dạng sol khí có thể chứa nhiều đơn vị liều lượng.

Khi dùng lượng hữu hiệu trị liệu của protein TAT-HOXB4H qua đường miệng, chất gắn kết có thể ở dạng viên nén, viên nang, bột, dung dịch hoặc chế phẩm chứa cón. Khi dùng ở dạng viên nén, dược phẩm của sáng chế có thể chứa thêm chất mang rắn như gelatin hay chất bổ trợ. Viên nén, viên nang, và bột chứa từ khoảng 5 đến 95% chất gắn kết, và tốt hơn nếu từ khoảng 25 đến 90% chất gắn kết. Ví dụ như sucroza, kaolin, glyxerin, tinh bột dextrin, natri alginat, carboxymetylxenluloza và etyl xenluloza. Có thể có chất tạo màu và/hoặc chất điều vị. Có thể dùng vỏ bọc. Khi dùng ở dạng lỏng, có thể thêm chất mang lỏng như nước, dầu mỡ, dầu nguồn gốc động vật hay thực vật như dầu lạc, dầu khoáng, dầu đậu tương, hay dầu vừng, hay dầu tổng hợp. Dạng lỏng của dược phẩm có thể còn chứa thêm dung dịch nước muối sinh lý, dextroza hoặc dung dịch sacarit khác, hoặc các glycol như etylen glycol, propylen glycol hoặc polyetylen glycol. Khi dùng ở dạng lỏng, dược phẩm chứa từ khoảng 0,5 đến 90% trọng lượng là chất gắn kết, và tốt hơn nếu là từ khoảng 1 đến 50% là chất gắn kết.

Khi dùng lượng hữu hiệu trị liệu protein TAT-HOXB4H bằng cách tiêm tĩnh mạch, tiêm da hay dưới da, chất gắn kết có thể ở dạng không có chất gây sốt, dung dịch nước dùng ngoài đường tiêu hóa được. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực sẽ biết được những chế phẩm dung dịch protein dùng qua ngoài đường tiêu hóa được, có độ pH, tính đẳng trương, tính ổn định phù hợp và các tính chất tương tự. Theo một số phương án, dược phẩm để tiêm tĩnh mạch, tiêm da, hay dưới da có thể chứa, ngoài chất gắn kết, môi trường đẳng trương như dung dịch tiêm Natri Clorua, dung dịch tiêm Ringer, dung dịch tiêm Dextroza, dung dịch tiêm Dextroza và Natri Clorua, dung dịch tiêm Ringer đã lactat hóa, hay môi trường đã biết khác trong lĩnh vực này. Dược phẩm

của sáng chế cũng có thể chứa các chất ổn định, chất bảo quản, chất đệm, chất chống oxy hóa, hoặc chất phụ gia đã biết khác đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực.

Để thực hiện phương pháp điều trị hay thực hiện sáng chế, cần cho cá thể dùng protein TAT-HOXB4H với lượng hữu hiệu có tác dụng trị liệu, ví dụ cho động vật có vú dùng (người chẳng hạn). Thuật ngữ “lượng hữu hiệu có tác dụng trị liệu” được dùng để chỉ tổng lượng mỗi hoạt chất trong dược phẩm hay trong một phương pháp là đủ để có tác dụng có lợi có ý nghĩa cho bệnh nhân, ví dụ làm thuyên giảm triệu chứng, chữa bệnh, hay gia tăng tốc độ chữa bệnh. Khi cho cá thể dùng riêng một hoạt chất, thì thuật ngữ này tham chiếu đến hoạt chất đó mà thôi. Khi cho dùng phối hợp, thì thuật ngữ này tham chiếu đến lượng phối hợp các hoạt chất tạo ra tác dụng trị liệu, dù việc dùng này là theo cách phối hợp hay theo trình tự hay dùng đồng thời.

Lượng protein TAT-HOXB4H trong dược phẩm theo sáng chế có thể phụ thuộc vào bản chất và mức độ trầm trọng của bệnh điều trị, và phụ thuộc vào các lần điều trị trước đây của bệnh nhân, tuổi và giới tính. Cơ bản là bác sĩ có thể quyết định lượng hoạt chất điều trị cho mỗi bệnh nhân. Ban đầu bác sĩ có thể dùng hoạt chất liều thấp và theo dõi đáp ứng của bệnh nhân. Liều lớn hơn có thể được dùng cho đến khi có được tác dụng trị liệu tối ưu cho bệnh nhân, và tại thời điểm này sẽ không tăng liều nữa. Có thể dùng nhiều loại dược phẩm để thực hiện phương pháp của sáng chế mà các dược phẩm này chứa từ khoảng 1 μ g đến 1mg protein TAT-HOXB4H cho một kg thể trọng. Ví dụ về các khoảng liều lượng có thể cho bệnh nhân dùng là từ: 1 μ g/kg đến 1mg/kg, 1 μ g/kg đến 0,5mg/kg, 1 μ g/kg đến 0,1mg/kg, 10 μ g/kg đến 0,5mg/kg, 10 μ g/kg đến 0,1mg/kg, 100 μ g/kg đến 0,5mg/kg, 250 μ g/kg đến 0,5mg/kg. Ngoài ra, có thể chọn các khoảng liều lượng từ: 50 μ g đến 100mg, 100 μ g đến 50mg, 500 μ g đến 50mg, 1mg đến 50mg. Thời gian trị liệu qua đường tĩnh mạch bằng dược phẩm của sáng chế có thể thay đổi, tùy theo mức độ trầm trọng của bệnh điều trị và tình trạng cũng như phản ứng dị ứng ở mỗi bệnh nhân. Theo một phương án, dự tính là thời gian mỗi lần dùng protein TAT-HOXB4H có thể trong khoảng từ 12 đến 24 giờ dùng tĩnh mạch liên tục. Theo phương án khác, thời gian dùng protein TAT-HOXB4H có thể kéo dài cùng với quá trình xạ trị hay hóa trị liệu đang diễn ra. Có thể dùng protein TAT-HOXB4H với khoảng liều lượng 10 đến 100 μ g/kg theo đường tĩnh mạch, hai lần một ngày từ 4,5 đến 5 ngày. Một chu kỳ điều

trị có thể đủ để các tế bào gốc tạo máu (HSC) bành trướng số lượng *in vivo*. Cơ bản là bác sĩ điều trị có thể quyết định thời lượng điều trị qua tĩnh mạch bằng được phẩm của sáng chế.

Có thể xác định độc tính và hiệu quả trị liệu của các hợp chất này bằng các công đoạn chuẩn trong ngành dược trên giống cây tế bào hay trên động vật thử nghiệm, ví dụ, xác định LD₅₀ (liều gây tử vong 50% số cá thể) và ED₅₀ (liều có tác dụng trị liệu cho 50% số cá thể). Tỷ lệ liều lượng giữa độc tính và tác dụng trị liệu là chỉ số trị liệu và có thể biểu diễn theo tỷ số LD₅₀/ED₅₀. Số liệu thu được từ thử nghiệm trên giống cây tế bào và nghiên cứu trên động vật có thể được dùng để đánh giá khoảng liều lượng sử dụng cho người. Liều lượng của các hợp chất này có thể nằm trong khoảng nồng độ lưu thông trong máu bao gồm cả giá trị ED₅₀ với độc tính rất thấp hoặc không có độc tính. Liều lượng có thể thay đổi trong khoảng này tùy thuộc vào dạng liều lượng được dùng và đường dùng. Ban đầu, có thể ước tính liều trị liệu hữu hiệu của TAT-HOXB4H bằng các thử nghiệm trên giống cây tế bào. Liều lượng có thể được bào chế cho động vật thử nghiệm để đạt được khoảng nồng độ tuần hoàn trong huyết tương bao gồm cả giá trị IC₅₀ (tức là nồng độ của protein thử nghiệm tạo ra tác dụng ức chế triệu chứng bằng một nửa giá trị cực đại) khi xác định trong giống cây tế bào. Có thể xác định nồng độ trong huyết tương, chẳng hạn bằng sắc ký lỏng hiệu suất cao. Tác dụng của liều lượng cụ thể bất kỳ có thể được theo dõi bằng thử nghiệm sinh học bất kỳ. Ví dụ về những thử nghiệm sinh học phù hợp là, nhưng không bị giới hạn bởi, đo số tế bào gốc CD34⁺ trong tế bào đơn nhân bằng cách sử dụng mẫu đó phát huỳnh quang (ví dụ, FITC) đã đánh các kháng thể đối với tế bào gốc CD34⁺ và xác định phần trăm tế bào LY5 ở máu ngoại biên hay các tế bào HSC tủy xương bằng dụng cụ dòng tế bào kế. Polynucleotit và protein của sáng chế được trình bày là có một hay nhiều ứng dụng hay có hoạt tính sinh học (bao gồm cả các chất đã nêu trong thử nghiệm ở đây) được xác định dưới đây. Các ứng dụng hay hoạt tính của protein theo sáng chế có thể có được bằng cách sử dụng các protein hay sử dụng polynucleotit ghi mã các protein này (chẳng hạn như, trong trị liệu bằng gen hay vật truyền phù hợp để cảm ứng ADN).

III. Phương pháp kích thích quá trình tạo máu *in vivo*

A. Bệnh nhân cần điều trị

Có thể sử dụng được phẩm của sáng chế để điều trị các bệnh bao gồm, nhưng

không bị giới hạn, rối loạn tự miễn, rối loạn thiếu hụt miễn dịch, và các bệnh về máu. Ngoài ra, dược phẩm của sáng chế có thể được sử dụng để cải thiện thời gian hồi phục sau cấy ghép HSC.

Dược phẩm của sáng chế là để, nhưng không bị giới hạn bởi, điều trị bệnh nhân bị hay mắc cảm với bệnh u lympho, bệnh bạch cầu, bệnh Hodgkin và rối loạn tăng sinh tủy. Ngoài ra, những bệnh di truyền do thiếu hụt HSC và thiếu máu bất sản có thể điều trị được bằng dược phẩm của sáng chế.

Ngoài ra, có thể dùng dược phẩm của sáng chế cho người cho HSC và những bệnh nhân không nhạy cảm với G-CSF.

Theo một phương án của sáng chế, TAT-HOXB4H là hoạt chất duy nhất được dùng để huy động HSC, và fluorouraxil (5-FU) không được dùng đối với người cho trước khi điều trị hay trong sơ đồ trị liệu phối hợp.

Những bệnh lý hay tình trạng bệnh lý khác liên quan tới khả năng sống sót tế bào gia tăng mà có thể điều trị được bằng dược phẩm của sáng chế là, nhưng không bị giới hạn ở, sự tiến triển, và/hoặc di căn các khối ác tính và các bệnh lý liên quan đến các khối u này như bệnh ung thư bạch cầu (bao gồm bệnh ung thư bạch cầu ác tính (ví dụ, bệnh ung thư bạch cầu lympho bào ác tính, ung thư bạch cầu tủy ác tính (bao gồm nguyên tủy bào, tiền tủy bào, bạch cầu đơn nhân tủy bào, chứng bạch cầu đơn nhân, và ung thư bạch cầu hồng cầu)) và bệnh ung thư bạch cầu mãn tính (ví dụ, chronic myelocytic (granulocytic) ung thư bạch cầu và ung thư bạch cầu lympho bào mãn tính)), hội chứng loạn sinh tủy, chứng tăng hồng cầu vô căn, u lympho (ví dụ, bệnh Hodgkin và bệnh phi Hodgkin), đau tủy, chứng macroglobulin huyết Waldenström's, và các khối u rắn bao gồm, nhưng không bị hạn chế bởi, bệnh sa côm và các caxinom như sa côm sợi, sa côm niêm, sa côm mỡ, sa côm sụn, sa côm sinh cốt, u nguyên sống, sa côm mạch, sa côm nội mạch, lymphsa côm mạch, sa côm bạch mạch, u màng hoạt dịch, u trung biểu mô, u Ewing, sa côm cơ trơn, sa côm cơ vân, caxinom ruột kết, ung thư tụy, ung thư vú, ung thư buồng trứng, ung thư tuyến tiền liệt, caxinom tế bào vảy, caxinom tế bào đáy (dạng ung thư ở da), adenocaxinom, caxinom tuyến mồ hôi, caxinom tuyến bã nhờn, caxinom gai, adenocaxinom gai, u nang tuyến caxinom, caxinom tủy, caxinom phế quản, caxinom tế bào thận, ung thư gan, caxinom ống mật, caxinoma nhau, u tinh, caxinom phổi, u Wilm, ung thư tử cung, ung thư tinh hoàn, caxinom phổi, caxinom phổi tế bào nhỏ,

caxinôm bằng quang, caxinôm biểu mô, u thần kinh đệm, u tế bào hình sao, u nguyên thủy bào, u sọ-hầu, u màng não thất, u tuyến tủy quả, u nguyên bào mạch máu, u xơ thần kinh thính giác, u thần kinh đệm ít nhánh, u màng não, u hắc tố, u nguyên bào thần kinh, và u nguyên bào võng mạc.

Sáng chế không bị hạn chế bởi phương pháp hay quy cách cụ thể, các dòng tế bào, các giống hay loài động vật được dùng cũng như các chất thử dưới đây. Việc sử dụng thuật ngữ để mô tả những phương án cụ thể không nhằm giới hạn phạm vi của sáng chế vốn chỉ bị hạn chế bởi các yêu cầu bảo hộ kèm theo. Những danh từ số ít, số nhiều được dùng đều có nghĩa tham chiếu là số nhiều trừ khi có quy định khác rõ ràng. Vì vậy, chẳng hạn như khi đề cập đến “một tế bào” thì có nghĩa là chỉ một hay nhiều tế bào và cả các thuật ngữ tương đương đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực.

Trừ khi có quy định khác, mọi thuật ngữ được sử dụng ở đây có nghĩa thông thường đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực của sáng chế. Mặc dù có thể sử dụng bất kỳ phương pháp, thiết bị, và nguyên liệu tương đương với những thứ được mô tả ở đây để thực hiện hay kiểm định sáng chế, bản mô tả này thể hiện các phương án ưu tiên của phương pháp, thiết bị và nguyên liệu. Các tài liệu công bố và patent được viện dẫn ở đây nhằm mục đích mô tả, ví dụ những cấu trúc và phương pháp được mô tả trong các tài liệu công bố này có thể sử dụng liên quan đến sáng chế này. Các tài liệu công bố nêu trên và trong suốt bản mô tả này được đưa ra nhằm mục đích duy nhất là cung cấp thông tin về các tài liệu đã công bố trước ngày ưu tiên của sáng chế này. Không có thông tin nào trong bản mô tả này được hiểu là các tác giả không có quyền ghi lùi thời gian các tài liệu công bố này thông qua các giải pháp tiền thân.

Định nghĩa thuật ngữ

“Tế bào gốc” là tế bào đa năng hay vạn năng có khả năng tự làm mới, duy trì trạng thái chưa biệt hóa, và được biệt hóa. Tế bào gốc có thể phân chia không hạn chế, ít nhất là trong vòng đời của động vật nơi tế bào này cư trú tự nhiên. Tế bào gốc không kết thúc sự phát triển của mình bằng quá trình biệt hóa, có nghĩa chúng không ở giai đoạn cuối của quá trình biệt hóa. Khi tế bào gốc phân chia, mỗi tế bào con có thể vẫn giữ ở trạng thái tế bào gốc hoặc nó có thể tham gia vào tiến trình dẫn đến sự biệt hóa cuối cùng. Tế bào gốc “thể ghép” là tế bào gốc có một phần ADN của mình có nguồn

gốc của sinh vật ngoại sinh.

“Tế bào tạo máu” là tế bào liên quan đến quá trình tạo máu, nghĩa là quá trình hình thành tế bào máu trưởng thành từ các tế bào gốc. Ở người trưởng thành, quá trình tạo máu xảy ra trong tủy xương. Trong giai đoạn đầu của quá trình, quá trình tạo máu xảy ra ở các vị trí khác nhau trong các giai đoạn khác nhau của sự phát triển; những tế bào máu nguyên thủy xuất hiện trong túi noãn hoàng, và sau đó tế bào máu được hình thành ở gan, lách, và tủy xương. Quá trình tạo máu trải qua sự điều tiết phức hợp, bao gồm cả điều tiết bằng hormon, ví dụ, erythropoietin; bằng các yếu tố sinh trưởng, ví dụ, yếu tố kích thích khuẩn lạc; và bằng các cytokin, ví dụ, interleukin.

“Vật truyền” được dùng để chỉ phân tử axit nucleic có khả năng vận chuyển axit nucleic khác mà nó đã gắn kết vào. Một dạng của vật truyền là “plasmid”, được dùng để chỉ vòng ADN sợi kép xoắn tròn mà các phân đoạn ADN bổ sung có thể nối vào. Dạng vật truyền khác là vật truyền virus, trong đó các đoạn ADN bổ sung có thể được nối vào hệ gen virus. Một số vật truyền nhất định có khả năng tự sao chép trong tế bào chủ mà chúng đã được đưa vào (ví dụ, vật truyền vi khuẩn có nguồn gốc sao chép vi khuẩn và vật truyền episom của động vật có vú). Các vật truyền khác (ví dụ, các vật truyền phi episom của động vật có vú) có thể được hợp nhất vào hệ gen tế bào chủ khi đưa vào tế bào chủ, và nhờ vậy được sao chép cùng với hệ gen vật chủ. Ngoài ra, một số vật truyền có khả năng điều khiển biểu hiện các gen mà chúng được liên kết có điều khiển với vật truyền. Các vật truyền này được gọi là “vật truyền biểu hiện tái tổ hợp” (hoặc đơn giản là “các vật truyền biểu hiện”). Nói chung, các vật truyền biểu hiện hữu ích trong các kỹ thuật ADN tái tổ hợp thường ở dạng plasmid. Theo sáng chế này, “plasmid” và “vật truyền” có thể được sử dụng thay thế nhau vì plasmid là dạng vật truyền được sử dụng nhiều nhất. Tuy nhiên, sáng chế nhằm bao hàm các dạng vật truyền biểu hiện khác, như vật truyền virus (ví dụ, các retrovirus mất khả năng sao chép, adenovirus và virus gắn với adeno), có chức năng tương đương nhau.

“Biến nạp,” được dùng để chỉ việc chèn đoạn polynucleotit có nguồn gốc ngoại sinh vào tế bào chủ, không liên quan đến bản chất phương pháp được sử dụng để chèn vào: ví dụ, biến nạp bằng hấp thụ trực tiếp, chuyển nhiễm, lây nhiễm, và phương pháp tương tự. Xem phần mô tả dưới đây cho các phương pháp chuyển nhiễm cụ thể. Có thể duy trì polynucleotit nguồn gốc ngoại sinh dưới dạng vật truyền không hòa nhập, ví dụ, dạng episom, hoặc theo cách khác có thể được hòa nhập vào hệ gen vật chủ.

Thông thường, thuật ngữ “protein” được dùng để chỉ polyme bất kỳ của hai hay nhiều axit amin (bất kể các axit amin này có nguồn gốc tự nhiên hay không) được liên kết qua các liên kết peptit. Liên kết này hình thành khi nguyên tử cacbon của gốc carboxyl thuộc nhóm axit carboxylic đã liên kết với cacbon ở vị trí α của một axit amin (hoặc gốc axit amin) được liên kết đồng hóa trị với nguyên tử nitơ của amin thuộc nhóm amin đã liên kết với nguyên tử cacbon ở vị trí α của axit amin liền kề. Các mối liên kết peptit này, và các nguyên tử chứa chúng (tức là các nguyên tử cacbon ở vị trí α , các nguyên tử cacbon carboxyl (và các nguyên tử oxy thay thế của chúng), và các nguyên tử nitơ amino (và các nguyên tử hydro thay thế của chúng)) tạo thành “bộ khung polypeptit” cho protein. Ngoài ra, thuật ngữ “protein” được hiểu là bao gồm cả các thuật ngữ “polypeptit” và “peptit” (và các thuật ngữ này có thể được sử dụng thay thế lẫn nhau). Tương tự, các phân đoạn protein, các chất tương tự, các dẫn xuất, và các biến thể có thể được đề cập ở đây là “proteins,” và nên được coi là “protein” trừ khi có quy định khác. Thuật ngữ “phân đoạn” của protein được dùng để chỉ polypeptit chứa axit amin ít hơn tổng số gốc axit amin của một protein. Có thể đánh giá là “một phân đoạn” của protein có thể ở dạng protein bị cắt cụt tại đầu amino, đầu carboxy, và/hoặc ở trong (như bởi sự cắt tách tự nhiên), và cũng có thể là một dạng biến thể và/hoặc dẫn xuất. “Lĩnh vực” của protein cũng là một phân đoạn, và chứa các gốc axit amin của protein cần cho việc có hoạt tính sinh hóa tương ứng với protein có nguồn gốc tự nhiên.

Thuật ngữ “tái tổ hợp” chỉ phân tử axit nucleic có nghĩa polynucleotit có nguồn gốc hệ gen, cADN, virus, bán tổng hợp, hay có nguồn gốc tổng hợp, mà theo nguồn gốc của mình hay do thao tác là không có liên quan với tất cả hay một phần của polynucleotit mà nó gắn với trong tự nhiên. Thuật ngữ “tái tổ hợp” khi sử dụng cho protein hoặc polypeptit có nghĩa là polypeptit được tạo ra nhờ biểu hiện của polynucleotit tái tổ hợp.

Phân tử “đã được phân lập,” “tinh khiết,” “cơ bản đã được phân lập,” hay “hầu như tinh khiết” (như polypeptit hoặc polynucleotit) là phân tử đã được thực hiện thao tác di truyền để tồn tại ở nồng độ cao hơn so với trong tự nhiên. Ví dụ, protein này được phân lập, tinh chế, cơ bản đã phân lập, hay hầu như tinh khiết khi có ít nhất 50%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% các chất liệu phi protein gắn với protein này trong tự nhiên hoặc hơn đã được loại bỏ. Phân tử “đã được phân lập,” “tinh khiết,” “cơ bản đã được phân lập,” hoặc “hầu như tinh khiết” được nêu ở đây bao gồm cả các phân tử tái tổ hợp.

“Chuột nhất SCID” là chuột được thử nghiệm hội chứng thiếu hụt miễn dịch trầm trọng kết hợp (SCID), hội chứng này gây khuyết tật nghiêm trọng trong quá trình phát triển hệ miễn dịch. Những con chuột này thiếu hụt, hay thiếu hoàn toàn, cả lympho bào T và B. Thao tác SCID để làm hỏng sự tái tổ hợp của các gen thụ thể kháng nguyên, gây ra thiếu hụt các lympho bào T và B chức năng. Các dạng tế bào tạo máu khác dường như phát triển và thực hiện các chức năng bình thường. Chuột SCID sẵn sàng hỗ trợ sự biệt hóa lympho bào bình thường và có thể được khôi phục lại bằng các lympho bào bình thường lấy từ chuột cùng gen hay khác loại, hoặc bằng lympho bào của người. Những con chuột này cũng hỗ trợ sự sinh trưởng của các khối u khác loại và khác loài. Vì vậy, chuột SCID, loại cho phép sinh trưởng lan tỏa một số loại u của người, đặc biệt là các rối loạn huyết học và u hắc tố ác tính, có thể được sử dụng để nghiên cứu các bệnh ác tính.

Các thuật ngữ “đối tượng”, “cá thể”, “vật chủ”, và “bệnh nhân” được sử dụng trong bản mô tả này thay thế cho nhau để chỉ động vật sống, bao gồm cả người và động vật khác. Đối tượng, ví dụ, có thể là sinh vật mang tế bào miễn dịch có khả năng phản ứng lại kích thích kháng nguyên, và tải nạp tín hiệu kích thích và ức chế thông qua sự gắn kết thụ thể bề mặt tế bào. Đối tượng có thể là động vật có vú, như người hoặc động vật có vú khác, ví dụ, chó, mèo, lợn, cừu, bò, dê, ngựa, chuột cống, và chuột nhất. Thuật ngữ “đối tượng” không loại trừ các cá thể hoàn toàn bình thường về mặt bệnh lý, hoặc bình thường trên mọi khía cạnh.

Thuật ngữ “điều trị” được dùng để chỉ biện pháp trị liệu hay phòng ngừa. Việc điều trị có thể được áp dụng cho cá thể có rối loạn y học hay người thực sự đã mắc bệnh, để ngăn ngừa, chữa trị, làm chậm, giảm mức độ trầm trọng, hay thuyên giảm một hay nhiều triệu chứng của bệnh hoặc tránh tái phát bệnh, hoặc để kéo dài thời gian sống vượt quá kỳ vọng trong trường hợp không điều trị.

Thuật ngữ “lượng hữu hiệu có tác dụng trị liệu” có nghĩa là lượng hợp chất đối tượng có thể gây đáp ứng mong muốn, ví dụ, đáp ứng sinh học hay y học của mô, hệ thống, động vật, hay người mà các chuyên gia y học, thú y, nhà nghiên cứu và bác sỹ lâm sàng tìm kiếm.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ dưới đây chỉ nhằm mục đích minh họa, và không nhằm mục đích giới

hạn sáng chế. Không cần phải mô tả quá kỹ lưỡng, người có trình độ trung bình trong cùng lĩnh vực có thể dựa trên phần mô tả ở đây, sử dụng sáng chế này ở phạm vi đầy đủ nhất.

Ví dụ 1: Tạo plasmit pET21b-His-pTAT-HOXB4-His

(a) Cải biến plasmit pET21b chứa gốc HIS được đính vào đầu tận cùng N và đầu tận cùng C và peptit tín hiệu TAT.

Vật truyền biểu hiện pET21b chứa gốc His đính vào đầu tận cùng N và peptit tín hiệu TAT được tạo ra bằng cách cài các oligonucleotit 5'-TATGCACCACCACCACCACCTACGGCCGCAAGAAACGCCGCCAGCGCCGC CGGCG-3' (thuận nghĩa) và 5'-CTAGCGGCGCTGGCGGCGTTTCTTGCGGCCGTAGTGGTGGTGGTGGTGGTGCA-3' (đổi nghĩa) vào plasmit pET21b. Gốc His đính vào đầu tận cùng C đã có sẵn trong vật truyền pET21b.

(b) Nhân dòng vô tính HOXB4 vào vật truyền biểu hiện pET21b đã cải biến

Phân đoạn ADN chứa khung đọc mở (ORF) của HOXB4 và đoạn trình tự ghi mã bổ sung có 6 gốc histidin đã thu nhận bằng khuếch đại PCR có sử dụng plasmit MGC54130 (GeneDiscovery, Taipei, Taiwan. Cat. No. 5533346) được dùng làm khuôn mẫu, và phân đoạn cADN HOXB4 đã tạo ra bằng PCR được nhân dòng phụ vào vật truyền biểu hiện pET21b đã cải biến. Cấu trúc plasmit và các trình tự axit nucleic được thể hiện trên Fig.2 và 3.

Ví dụ 2: Biểu hiện protein tái tổ hợp TAT-HOXB4H trong *E. coli*

Biến nạp vật truyền biểu hiện pET21b-His-TAT-HOXB4-His vào chủng *E. coli* BL21(DE3)pLysS (Novagen). Cho các tế bào biến nạp này sinh trưởng qua đêm ở 37°C. Pha loãng dịch nuôi cấy đã sinh trưởng qua đêm này đến mật độ quang ban đầu OD600 bằng 0,05. Sau đó, cho dịch nuôi cấy này sinh trưởng đến giá trị OD600 bằng 0,5 ở 37°C, cảm ứng bằng 1mM isopropyl-beta-D-thiogalactopyranosit (IPTG) ở 37°C trong 3 giờ, có khuấy mạnh.

Ví dụ 3: Tinh chế protein tái tổ hợp TAT-HOXB4H

Sau khi cảm ứng, thu hoạch tế bào bằng ly tâm và tạo lại huyền phù trong chất đệm A (8M Ure, 20mM HEPES, 0,5mM DTT và 100mM NaCl, độ pH 8,0). Cho huyền phù tế bào đi ba lần qua máy ép French, và làm trong dịch tan tế bào bằng cách ly tâm

ở 20.000xg trong 30 phút ở 4°C, điều chỉnh dịch nổi đến nồng độ 10mM imidazol và nạp vào cột chelat HisTrap (Amersham Pharmacia). Rửa giải các protein đã gắn kết bằng 50, 100 và 250mM imidazol trong chất đệm A. Các phân đoạn chứa TAT-HOXB4H được nạp vào cột MonoSP trong chất đệm B (4M ure, 20mM HEPES và 50mM NaCl, độ pH 6,5), rửa giải bằng 1,5M NaCl và 20mM HEPES (độ pH 8,0).

Ví dụ 4: Hồi tính protein tái tổ hợp TAT-HOXB4H

Protein TAT-HOXB4H trong các phân đoạn đã rửa giải được hòa tan và biến tính trong dung dịch chứa muối gây biến tính (ví dụ, guanidin hydroclorua) và sau đó trộn nó với chất đệm D-PBS-T (0,1% Triton X-100 trong 2 x PBS). Tỷ lệ giữa dung dịch protein TAT-HOXB4H và chất đệm D-PBS-T là 1:4. Cho hỗn hợp tạo thành này vào ống nghiệm ly tâm loại 10K (50ml hoặc 15ml) đã xử lý trước bằng nước (10ml hoặc 3ml), và sau đó ly tâm ở 3.000 vòng/phút trong 10 phút. Trong bước này, muối biến tính được thay bằng chất đệm D-PBS-T trong đó Triton X-100 có khả năng gắn kết với vùng kỵ nước của protein HOXB4H.

Bước siêu lọc hay thay đổi chất đệm này sử dụng ống nghiệm loại 10K được thực hiện mười lần bằng dung dịch chứa các nồng độ beta-cyclodextrin khác nhau (hai lần trong đó mỗi lần là 1mM, 2mM, 3mM, 4mM và 5mM beta-cyclodextrin trong chất đệm bảo quản IMDM bằng cách ly tâm ở 1.000-2.500xg trong 10 phút. Mẫu còn lại trong ống ly tâm 10K được thu gom và bảo quản ở -80°C.

Phân tích tính đồng nhất của protein TAT-HOXB4H tinh khiết trên SDS-polyacrylamide gel, sau đó là nhuộm coomassie (Fig.5). Như thể hiện trên Fig.5, TAT-HOXB4H đã tinh chế từ HisTrap và MonoSP với hiệu suất cao gấp 3 đến 4 lần so với protein TAT-HOXB4. Plasmid pTAT-HA-HOXB4 được đề xuất bởi Dr. Guy Sauvageau, University of Montreal, Canada. Biến nạp plasmid này vào BL21(DE3)pLysS (Novagen) và tinh chế protein TAT-HOXB4 theo như mô tả trong tài liệu: Krosi và cộng sự, 2003.

Ví dụ 5: Tính ổn định của protein tái tổ hợp TAT-HOXB4H

Đo tính ổn định của TAT-HOXB4H bằng phân tích SDS-polyacrylamit gel. Trong quá trình bảo quản, TAT-HOXB4H với chiều dài trọn vẹn có thể bị xuống cấp và phân thành các đoạn 30kD và 10kD. Như thể hiện trên Fig.6, protein TAT-HOXB4H được tạo ra bằng phương pháp của sáng chế là ổn định ngay cả sau 16 giờ bảo quản

trong PBS ở 4°C.

Ngoài ra, tính ổn định của protein TAT-HOXB4H bảo quản ở 4°C và -20°C trong PBS và đệm bảo quản IMDM đã được phân tích bằng điện di 10% SDS-polyacrylamide gel, sau đó là nhuộm coomassie. Như thể hiện trên Fig.7, khi IMDM được dùng làm chất đệm bảo quản, tính ổn định của protein TAT-HOXB4H được duy trì ngay cả sau 4 tuần.

Ví dụ 6: Tác dụng của protein tái tổ hợp TAT-HOXB4H lên quá trình tạo máu trong chuột Balb/c kiểu đại

Sử dụng chuột nhắt Balb/c để nghiên cứu khả năng tác dụng của protein tái tổ hợp TAT-HOXB4H lên sự huy động HSC từ tủy xương vào máu ngoại biên. Sử dụng protein tái tổ hợp TAT-HOXB4H trong nước muối đệm phosphat (PBS) bằng cách tiêm dưới da bốn lần một ngày trong 4 ngày. Để kiểm tra đáp ứng liều lượng, các nhóm thử nghiệm (n = 21) đã được nhận liều nằm trong khoảng từ 1µg, 5µg, 10µg, 15µg, v.v. đến 100µg trên một kg thể trọng cho một con chuột. Nhóm chuột đối chứng chỉ nhận nước muối đệm phosphat, và nhóm chuột đối chứng còn lại được tiêm G-CSF dưới da hai lần/ngày trong 4 ngày với liều 5µg/kg thể trọng cho mỗi con chuột.

Lấy máu ngoại biên từ tất cả chuột và đem phân tích bằng tế bào kế để thu nhận phần trăm số tế bào gốc CD34⁺ trong tế bào đơn nhân (MNC). Kết quả được ghi trong bảng 1 là các giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn.

Bảng 1

Nhóm (Thử nghiệm/Đối chứng)	TAT-HOXB4H (µg/kg)	CD34 ⁺ /MNC (%)
1	1	0 ± 0,03
2	5	0,3 ± 0,05
3	10	0,45 ± 0,03
4	15	0,42 ± 0,01
5	20	0,38 ± 0,05
6	25	0,41 ± 0,02
7	30	0,35 ± 0,21
8	35	0,33 ± 0,11
9	40	0,29 ± 0,16
10	45	0,46 ± 0,01

11	50	$0,45 \pm 0,02$
12	55	$0,42 \pm 0,06$
13	60	$0,44 \pm 0,02$
14	65	$0,41 \pm 0,04$
15	70	$0,41 \pm 0,03$
16	75	$0,49 \pm 0,01$
17	80	$0,45 \pm 0,04$
18	85	$0,46 \pm 0,07$
19	90	$0,44 \pm 0,02$
20	95	$0,41 \pm 0,01$
21	100	$0,42 \pm 0,05$
Đối chứng (PBS)	0	0,002
Đối chứng (G-CSF)	0	$0,5 \pm 0,03$

Bảng 1 là phần trăm tế bào CD34⁺/MNC trong máu ngoại biên lấy từ chuột đã điều trị. Các nhóm thử nghiệm điều trị bằng TAT-HOXB4H từ số 3 đến 21 (nhận liều 10µg/kg thể trọng hoặc hơn) đã có tác dụng huy động gần như giống ở nhóm đối chứng dùng G-CSF.

Tủy xương của chuột điều trị bằng TAT-HOXB4H (Nhóm thử nghiệm số 3 nhận liều 10µg/kg thể trọng), chuột điều trị bằng G-CSF, và chuột được tiêm PBS được tạo phenotyp tiếp bằng cách sử dụng kháng thể đối với CD34⁺, kháng thể này đã tiếp hợp FITC (Becton Dickinson) và đem phân tích bằng tế bào kế. Tủy xương của chuột điều trị bằng TAT-HOXB4H (Fig.5C) dường như giàu số tế bào gốc CD34⁺ hơn tủy xương của chuột dùng G-CSF (Fig.5A) và chuột tiêm PBS (Fig.5B). Vì vậy, các kết quả này cho thấy việc tiêm protein tái tổ hợp TAT-HOXB4H sẽ làm gia tăng số HSC trong cả tủy xương và máu ngoại biên ở chuột nhất.

Ví dụ 7: Tác dụng của protein tái tổ hợp TAT-HOXB4H lên quá trình tạo máu ở khi redut

Khi redut đực trưởng thành được sử dụng để nghiên cứu hiệu quả của protein tái tổ hợp TAT-HOXB4H ở loài khi. Nhóm thử nghiệm I (n=5) được tiêm tĩnh mạch protein tái tổ hợp TAT-HOXB4H 10µg/kg thể trọng bốn lần/ngày trong 4 ngày. Nhóm thử nghiệm II (n=5) được tiêm tĩnh mạch TAT-HOXB4H 10µg/kg thể trọng bốn lần/ngày và tiêm G-CSF dưới da 5µg/kg thể trọng trong 4 ngày. Nhóm đối chứng I chỉ nhận PBS, và nhóm đối chứng II được tiêm G-CSF dưới da hai lần/ngày trong 4 ngày với liều lượng

5µg/kg thể trọng. Lấy máu ngoại biên từ tất cả các con khi và đem phân tích bằng tế bào kế để thu nhận kết quả phần trăm tế bào gốc CD34⁺ ở tế bào đơn nhân (MNC). Kết quả trong bảng 2 dưới đây.

Bảng 2

Nhóm (Thử nghiệm/Đối chứng)	(%) CD34 ⁺ /MNC
I. TAT-HOXB4H (10 µg/kg)	0,62
II. TAT-HOXB4H (10 µg/kg) + G-CSF (5 µg/kg)	0,38
Đối chứng 1 (PBS)	0,07
Đối chứng 2 (G-CSF, 5 µg/kg)	0,28

Theo bảng 2, khi (nhóm thử nghiệm I) đã điều trị bằng TAT-HOXB4H chỉ có tác dụng huy động tốt hơn có ý nghĩa so với khi được điều trị bằng G-CSF (nhóm đối chứng II). Khi được điều trị bằng TAT-HOXB4H và G-CSF (nhóm thử nghiệm II) có tác dụng huy động tốt hơn một chút so với khi được điều trị bằng G-CSF (nhóm đối chứng II).

Các mẫu tủy xương lấy từ khi đã điều trị bằng TAT-HOXB4H, G-CSF hoặc PBS được tạo phenotyp tiếp bằng cách sử dụng kháng thể của CD34⁺, kháng thể này đã tiếp hợp với FITC (Becton Dickinson) và được phân tích bằng tế bào kế. Các mẫu tủy xương lấy từ khi điều trị bằng TAT-HOXB4H (Fig.6C) dường như giàu tế bào gốc CD34⁺ hơn nhiều so với các mẫu tủy xương lấy từ khi điều trị bằng G-CSF (Fig.6A), TAT-HOXB4H + G-CSF (Fig.6B) và khi tiêm PBS (Fig.6D).

Ví dụ 8: Tác dụng của protein tái tổ hợp TAT-HOXB4H lên sự hồi phục tạo máu ở chuột NOD-SCID

10⁴ tế bào Lin⁻/CD34⁺ của người được tiêm vào chuột NOD-LtSz-scid/scid (NOD-SCID) đã chiếu xạ (2,5 Gy), cùng với 10⁵ tế bào phụ CD34⁻ đã chiếu xạ. Chuột được chia thành hai nhóm ngẫu nhiên: một nhóm (n=28) được tiêm tĩnh mạch protein tái tổ hợp TAT-HOXB4H 10µg/kg thể trọng hai lần một ngày, và nhóm còn lại (n=28) nhận PBS hai lần/ngày. Đo định kỳ sự có mặt của tế bào CD45⁺ của người trong các tế bào máu ngoại biên ở tất cả các con chuột bằng dụng cụ tế bào kế dòng sau khi cấy ghép. Sự phục hồi tạo máu được đánh giá theo số chuột có lượng tế bào CD45⁺ của người đạt đến mức > 0,1% ở máu ngoại biên (PB) sau khi cấy ghép. Như thể hiện trên Fig.7, thời gian hồi phục tạo máu đã cải thiện được quan sát thấy ở chuột tiêm protein tái tổ hợp

TAT-HOXB4H.

Ví dụ 9: Tác dụng của protein tái tổ hợp TAT-HOXB4H lên sự hồi phục tạo máu ở chuột Balb/c sau hóa trị liệu bằng Cisplatin

Chuột Balb/c 5 tuần tuổi được tiêm lặp lại tĩnh mạch bằng cisplatin cho đến khi số lượng tế bào Ly5 (CD45 của chuột) ở máu ngoại biên chuột đã giảm đến xấp xỉ bằng khoảng 10% số lượng ban đầu. Chuột đã điều trị bằng cisplatin được chia thành hai nhóm ngẫu nhiên: một nhóm (n=28) được tiêm tĩnh mạch protein tái tổ hợp TAT-HOXB4H với liều 10 µg/kg thể trọng hai lần một ngày, và nhóm còn lại (n=28) nhận PBS hai lần một ngày. Sự có mặt của tế bào Ly5 ở tế bào máu ngoại biên ở tất cả chuột được đo định kỳ bằng dụng cụ tế bào kế dòng sau khi cấy ghép. Tốc độ hồi phục tạo máu được đánh giá theo phần trăm số lượng tế bào Ly5 ở máu ngoại biên so với số lượng ban đầu. Như thể hiện trên Fig.8, quan sát thấy sự hồi phục tạo máu đã được cải thiện ở chuột được tiêm protein tái tổ hợp TAT-HOXB4H.

Những động vật trong các thử nghiệm này đã được biết đến trước đây dùng làm cơ sở dự báo kết quả sẽ thu được ở người. Ví dụ xem tài liệu: Broxmeyer và cộng sự (2005) *The Journal of Experimental Medicine*, 201, 1307-1318; Laroche và cộng sự (2006) *Blood* 107, 3772-3778.

Mặc dù sáng chế đã được mô tả và giải thích trong các phương án khác nhau, cần hiểu rằng có thể có nhiều cải biến khác vẫn thuộc phạm vi của sáng chế được xác định trong các yêu cầu bảo hộ dưới đây.

Danh mục trình tự

<110> WU, KOU-JUEY
HUANG, CHI-HUNG

<120> PHƯƠNG PHÁP TẠO PROTEIN TAT-HOXB4H VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA PROTEIN NÀY

<130> 10712.0001-00000

<140> 12/042,097

<141> 2008-03-04

<160> 5

<170> PatentIn Ver. 3.3

<210> 1

<211> 57

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp

<400> 1

tatgcaccac caccaccacc actacggccg caagaaacgc cgccagcgcc gccggcg 57

<210> 2

<211> 53

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp

<400> 2

ctagcggcgc tggcggcggt tcttgcgggc gtagtggtgg tggtggtggt gca 53

<210> 3

<211> 840

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: polynucleotit tổng hợp

<400> 3

atgcaccacc accaccacca ctacggccgc aagaaacgcc gccagcgccg ccgcgctagc 60
atggctatga gttctttttt gatcaactca aactatgtcg accccaagtt ccctccatgc 120
gaggaatatt cacagagcga ttacctacc agcgaccact cgccggggta ctacgccggc 180
ggccagaggg gagagagcag cttccagccg gaggcgggct tcggggcgccg cgccggcgctgc 240
accgtgcagc gctacgcggc ctgccggggac cctggggcccc cgccgcctcc gccaccaccc 300
ccgccgcccc cgccaccgcc cgggtctgtcc cctcgggctc ctgcgcgcgc acccgccggg 360
gccctcctcc cggagcccgg ccagcgctgc gaggcgggtca gcagcagccc cccgccgcct 420
ccctgcgcc agaacccct gcacccagc ccgtcccact ccgcgtgcaa agagcccgtc 480
gtctaccct ggatgcgcaa agttcacgtg agcacggtaa accccaatta cgccggcggg 540

gagcccaagc gctctcggac cgcctacacg cgccagcagg tcttggagct ggagaaggaa 600
 tttcactaca accgctacct gacacggcgc cggagggtgg agatcgccca cgcgctctgc 660
 ctctccgagc gccagatcaa gatctggttc cagaaccggc gcatgaagtg gaaaaaagac 720
 cacaagttgc ccaacaccaa gatccgctcg ggtggtgcgg caggctcagc cggagggccc 780
 cctggcgggc ccaatggagg cccccgcgcg ctctctcagc accaccacca ccaccactga 840

<210> 4

<211> 279

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp

<400> 4

Met His His His His His His Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg
 1 5 10 15

Arg Arg Ala Ser Met Ala Met Ser Ser Phe Leu Ile Asn Ser Asn Tyr
 20 25 30

Val Asp Pro Lys Phe Pro Pro Cys Glu Glu Tyr Ser Gln Ser Asp Tyr
 35 40 45

Leu Pro Ser Asp His Ser Pro Gly Tyr Tyr Ala Gly Gly Gln Arg Arg
 50 55 60

Glu Ser Ser Phe Gln Pro Glu Ala Gly Phe Gly Arg Arg Ala Ala Cys
 65 70 75 80

Thr Val Gln Arg Tyr Ala Ala Cys Arg Asp Pro Gly Pro Pro Pro Pro
 85 90 95

Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Gly Leu Ser Pro Arg
 100 105 110

Ala Pro Ala Pro Pro Pro Ala Gly Ala Leu Leu Pro Glu Pro Gly Gln
 115 120 125

Arg Cys Glu Ala Val Ser Ser Ser Pro Pro Pro Pro Pro Cys Ala Gln
 130 135 140

Asn Pro Leu His Pro Ser Pro Ser His Ser Ala Cys Lys Glu Pro Val
 145 150 155 160

Val Tyr Pro Trp Met Arg Lys Val His Val Ser Thr Val Asn Pro Asn
 165 170 175

Tyr Ala Gly Gly Glu Pro Lys Arg Ser Arg Thr Ala Tyr Thr Arg Gln
 180 185 190

Gln Val Leu Glu Leu Glu Lys Glu Phe His Tyr Asn Arg Tyr Leu Thr
 195 200 205

Arg Arg Arg Arg Val Glu Ile Ala His Ala Leu Cys Leu Ser Glu Arg
 210 215 220

27258

Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys Asp
225 230 235 240

His Lys Leu Pro Asn Thr Lys Ile Arg Ser Gly Gly Ala Ala Gly Ser
245 250 255

Ala Gly Gly Pro Pro Gly Arg Pro Asn Gly Gly Pro Arg Ala Leu Leu
260 265 270

Glu His His His His His His
275

<210> 5

<211> 6

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: 6x his tag tổng hợp

<400> 5

His His His His His His
1 5

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp tạo protein TAT-HOXB4H có trình tự axit amin SEQ ID NO: 4 bao gồm các bước:

- (a) cung cấp tế bào chủ chứa vật truyền mã hóa protein này;
- (b) biểu hiện protein này trong tế bào chủ;
- (c) thu gom dung dịch chưa tinh chế của protein biểu hiện này;
- (d) tinh chế protein từ dung dịch này bằng cách:
 - (i) cho dung dịch vào cột HisTrap;
 - (ii) rửa cột HisTrap;
 - (iii) rửa giải protein đã được tinh chế một phần từ cột HisTrap để tạo dung dịch protein đã được tinh chế một phần;
 - (iv) cho dung dịch protein đã được tinh chế một phần này vào cột MonoSP;
 - (v) rửa cột MonoSP;
 - (vi) rửa giải protein đã được tinh chế từ cột MonoSP ở dạng biến tính;
- (e) cuộn xoắn lại protein được biến tính đã được rửa giải nhờ sử dụng các hợp chất kỵ nước bằng cách:
 - (i) kết hợp protein được biến tính đã được rửa giải và dung dịch của các hợp chất kỵ nước để tạo thành dung dịch của protein và các hợp chất kỵ nước;
 - (ii) khử muối dung dịch của protein và các hợp chất kỵ nước để thu nhận dung dịch của protein và hợp chất kỵ nước đã được khử muối;
 - (iii) loại bỏ các hợp chất kỵ nước khỏi dung dịch protein đã được khử muối bằng phương pháp siêu lọc trong ống ly tâm thể tích nhỏ hoặc máy khuấy lọc tế bào dùng áp suất cao; và
- (f) bảo quản protein đã được tinh chế này trong môi trường Dulbecco cải biến Iscove (IMDM) hoặc trong môi trường Eagle cải biến Dulbecco (DMEM).

2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó dung dịch đệm rửa cột HisTrap chứa 8M Ure, 20mM HEPES, 0,5mM DTT, 100mM NaCl, độ pH là 8,0 và 10mM imidazol.

3. Phương pháp theo điểm 1, trong đó đệm rửa giải để rửa giải protein đã được tinh

chế một phần từ cột HisTrap chứa ít nhất 50mM imidazol trong 8M Ure, 20mM HEPES, 0,5mM DTT, 100mM NaCl, độ pH là 8,0.

4. Phương pháp theo điểm 1, trong đó đệm rửa giải để rửa giải protein đã được tinh chế một phần từ cột HisTrap chứa 50 đến 100mM imidazol.

5. Phương pháp theo điểm 1, trong đó đệm rửa giải để rửa giải protein đã được tinh chế một phần từ cột HisTrap chứa 100 đến 250mM imidazol.

6. Phương pháp theo điểm 1, trong đó đệm rửa cột MonoSP chứa 4M ure, 20mM HEPES và 50mM NaCl, độ pH là 6,5.

7. Phương pháp theo điểm 1, trong đó đệm rửa giải để rửa giải protein đã được tinh chế từ cột MonoSP chứa 1,5M NaCl và 20mM HEPES, độ pH là 8,0.

8. Phương pháp theo điểm 1, trong đó các hợp chất kỵ nước chứa Triton X-100, tween-20 hoặc polybenzen.

9. Dược phẩm để sử dụng *in vivo* nhằm tăng cường huy động HSC từ tủy xương đến máu ngoại biên ở cá thể có nhu cầu chứa:

a) lượng hữu hiệu protein TAT-HOXB4H có trình tự axit amin SEQ ID NO: 4 được tạo ra bằng phương pháp theo điểm 1, và

b) chất mang dược dụng, chất pha loãng hoặc tá dược.

10. Dược phẩm theo điểm 9, trong đó cá thể này là người cho HSC.

11. Dược phẩm theo điểm 9, trong đó cá thể này là bệnh nhân đã cấy ghép HSC cùng nguồn.

12. Dược phẩm theo điểm 9, trong đó cá thể này là bệnh nhân không nhạy cảm với G-CSF.

13. Dược phẩm theo điểm 12, trong đó cá thể bị bệnh do thiếu hụt HSC di truyền.

14. Dược phẩm theo điểm 13, trong đó cá thể bị thiếu máu bất sản di truyền.

15. Dược phẩm theo điểm 9, trong đó cá thể này bị một trong các rối loạn huyết học, u rần và rối loạn miễn dịch.

16. Dược phẩm theo điểm 15, trong đó rối loạn huyết học được chọn từ nhóm gồm u lympho, bệnh bạch cầu, bệnh Hodgkin's và rối loạn tăng sinh tủy.

17. Dược phẩm để sử dụng *in vivo* nhằm cải thiện thời gian hồi phục của bệnh nhân đã trải qua cấy ghép HSC, chiếu xạ hoặc hóa trị liệu chứa:

a) lượng hữu hiệu của protein TAT-HOXB4H có trình tự axit amin SEQ ID NO: 4 được tạo ra bằng phương pháp theo điểm 1, và

b) chất mang dược dụng, chất pha loãng hoặc tá dược.

18. Dược phẩm theo điểm 17, trong đó cá thể này là người cho HSC.

19. Dược phẩm theo điểm 17, trong đó cá thể này là bệnh nhân đã cấy ghép HSC cùng nguồn.

20. Dược phẩm theo điểm 17, trong đó cá thể này là bệnh nhân không nhạy cảm với G-CSF.

21. Dược phẩm theo điểm 20, trong đó cá thể này bị bệnh thiếu hụt HSC di truyền.

22. Dược phẩm theo điểm 21, trong đó cá thể này bị thiếu máu bất sản di truyền.

23. Dược phẩm theo điểm 17, trong đó cá thể này bị một trong các rối loạn huyết học, u rần, và các rối loạn miễn dịch.

24. Dược phẩm theo điểm 23, trong đó rối loạn huyết học được chọn từ nhóm gồm u lympho, bệnh bạch cầu, bệnh Hodgkin và rối loạn tăng sinh tủy.

25. Phương pháp theo điểm 1, trong đó phương pháp này còn có thêm bước tách gốc His đính tại đầu tận cùng N của TAT-HOXB4H.

26. Phương pháp theo điểm 1, trong đó phương pháp này còn có thêm bước tách gốc His đính vào đầu tận cùng C của TAT-HOXB4H.

27. Phương pháp theo điểm 1, trong đó phương pháp này còn có thêm bước tách các gốc His đính tại cả đầu tận cùng N và đầu tận cùng C của TAT-HOXB4H.

28. Dược phẩm theo điểm 9, trong đó TAT-HOXB4H không chứa gốc His đính tại đầu tận cùng N.

29. Dược phẩm theo điểm 9, trong đó TAT-HOXB4H không chứa gốc His đính tại đầu tận cùng C.

30. Dược phẩm theo điểm 9, trong đó TAT-HOXB4H không chứa gốc His đính tại cả đầu tận cùng N hay đầu C.

31. Được phẩm theo điểm 17, trong đó TAT-HOXB4H không chứa gốc His đính tại đầu tận cùng N.
32. Được phẩm theo điểm 17, trong đó TAT-HOXB4H không chứa gốc His đính tại đầu tận cùng C.
33. Được phẩm theo điểm 17, trong đó TAT-HOXB4H không chứa gốc His đính tại đầu tận cùng N hoặc đầu tận cùng C.

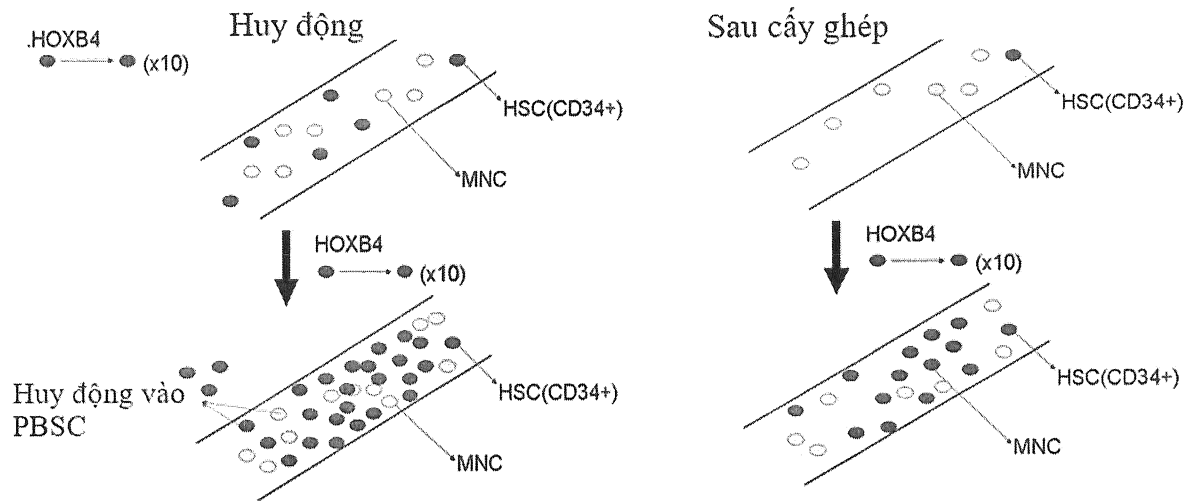


Fig.1

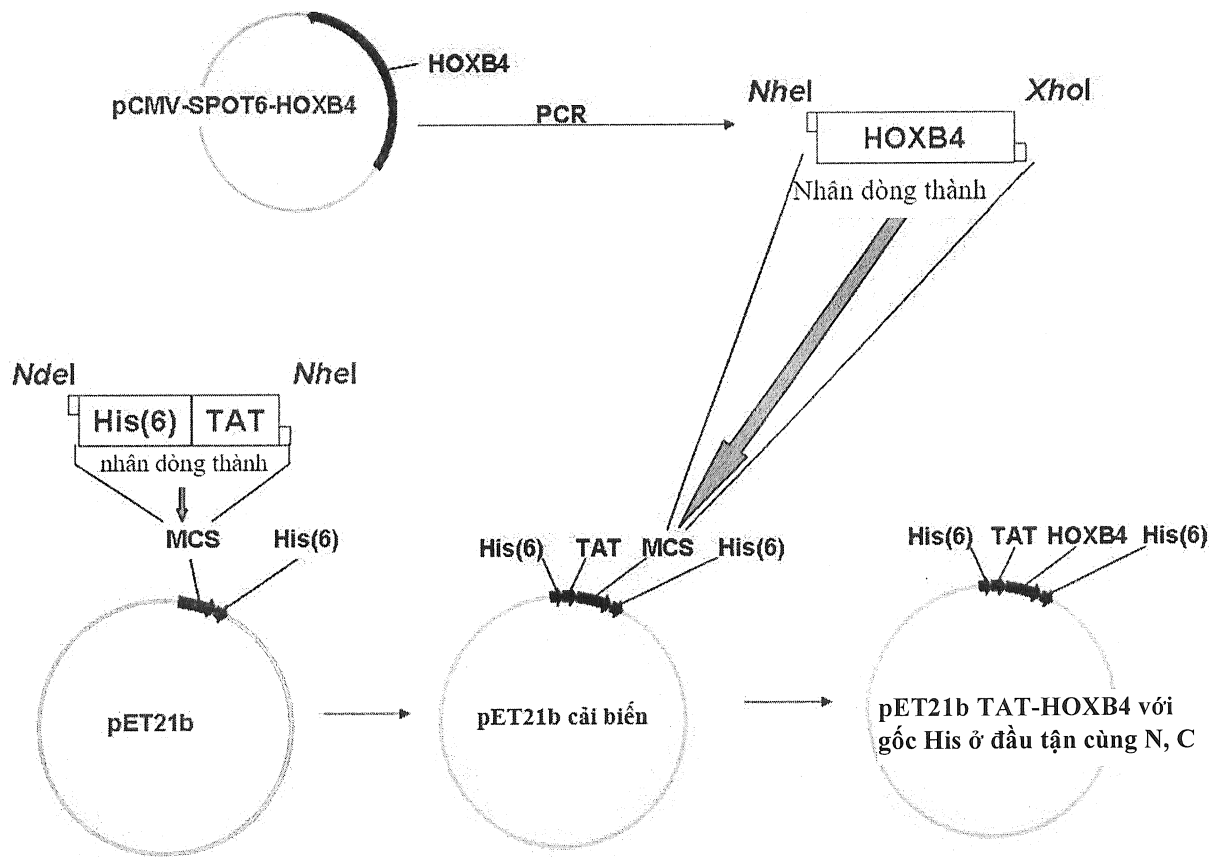


Fig.2

Trình tự pTAT-HOXB4H

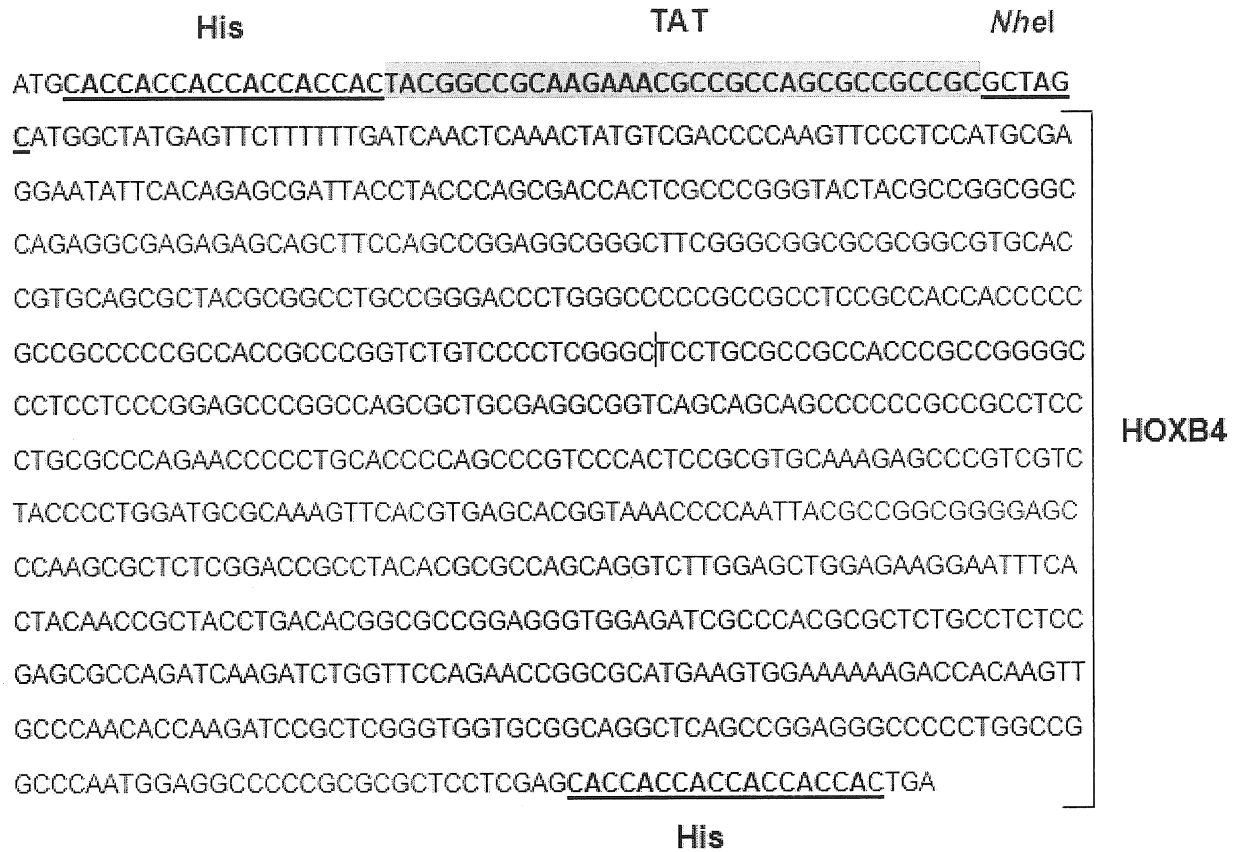


Fig.3

Trình tự Protein TAT-HOXB4H

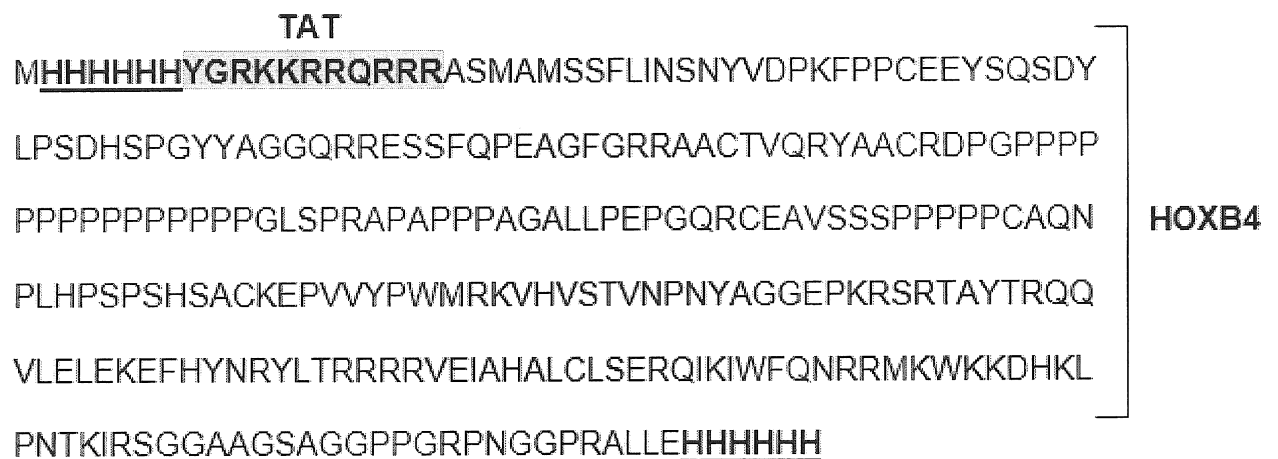


Fig.4

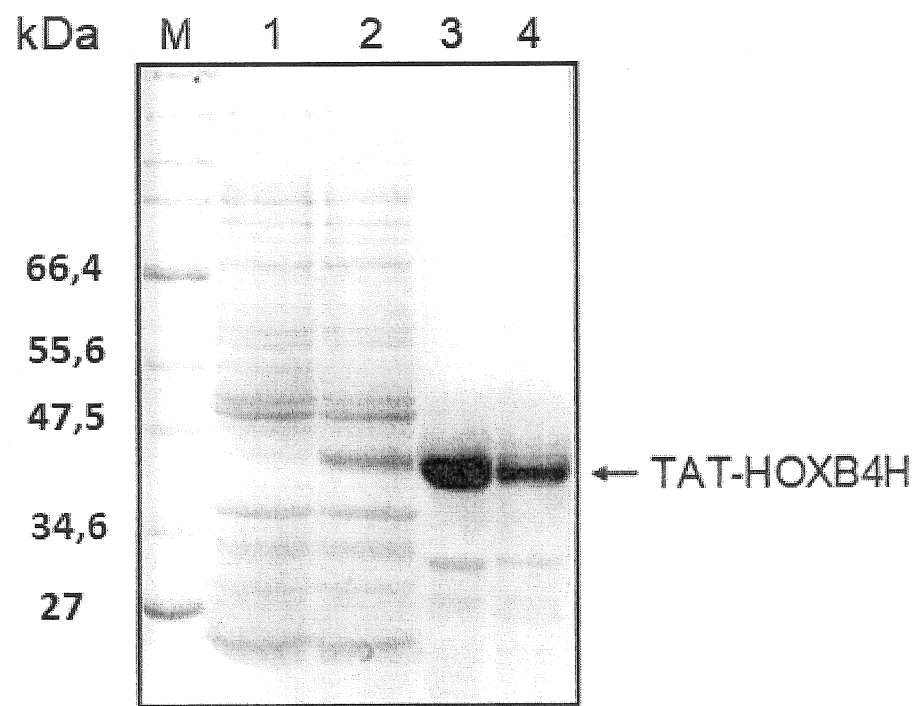


Fig.5

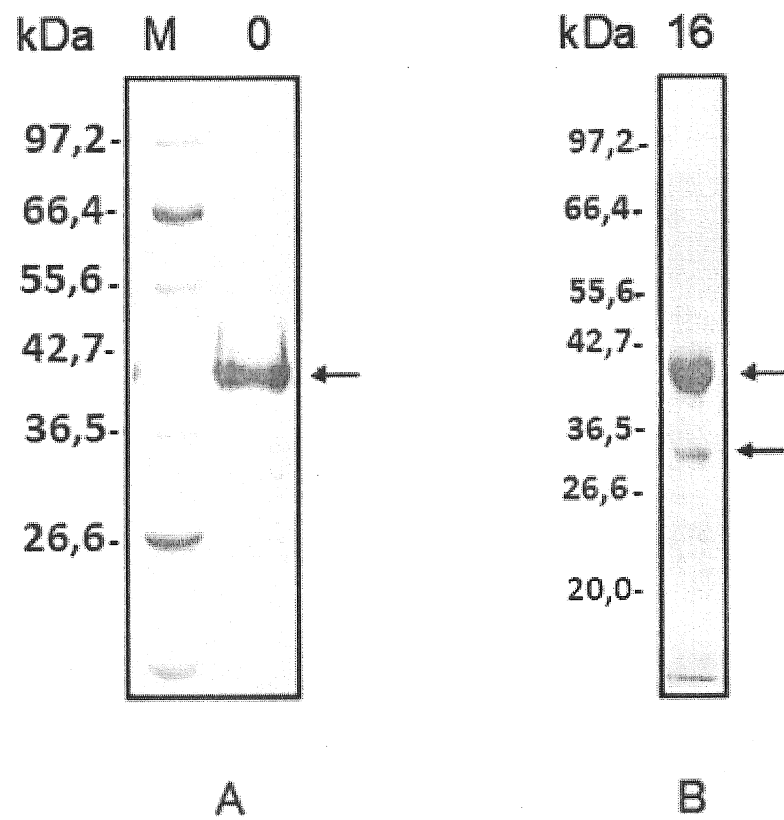


Fig.6

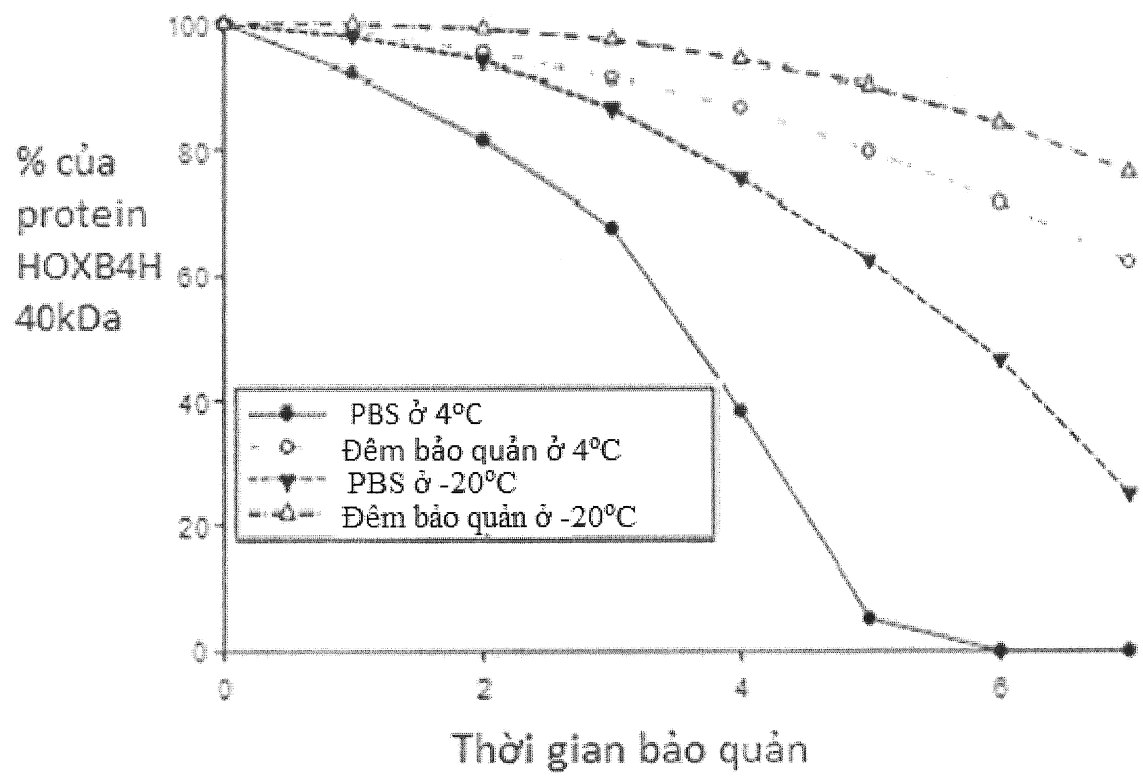
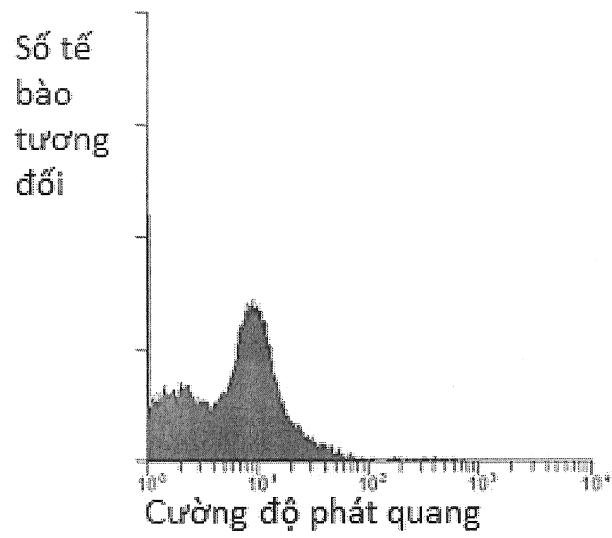
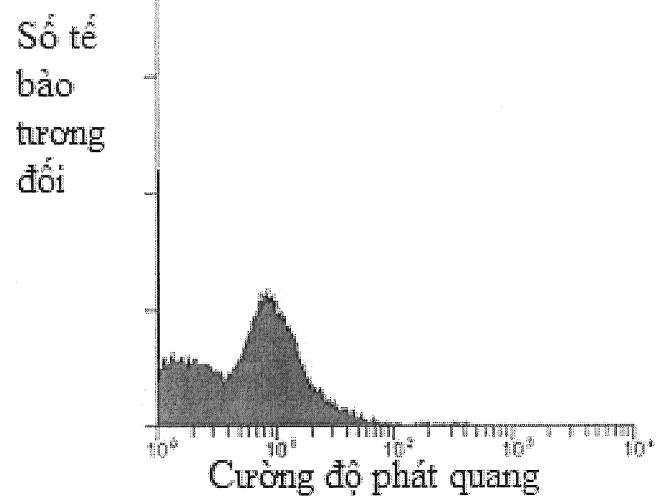


Fig.7

A



B



C

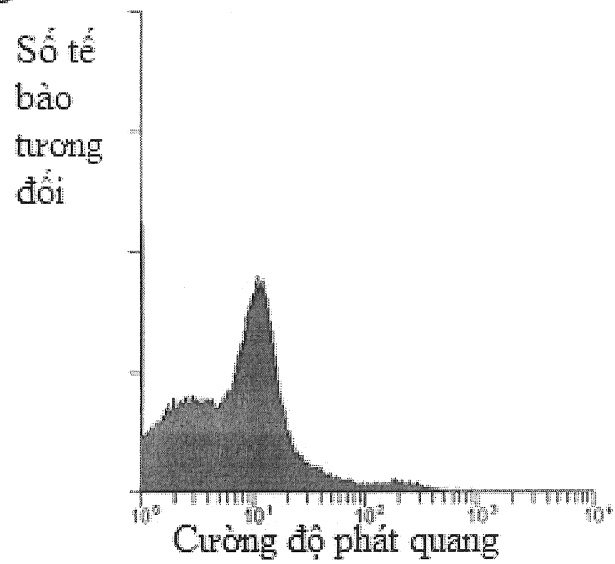


Fig.8

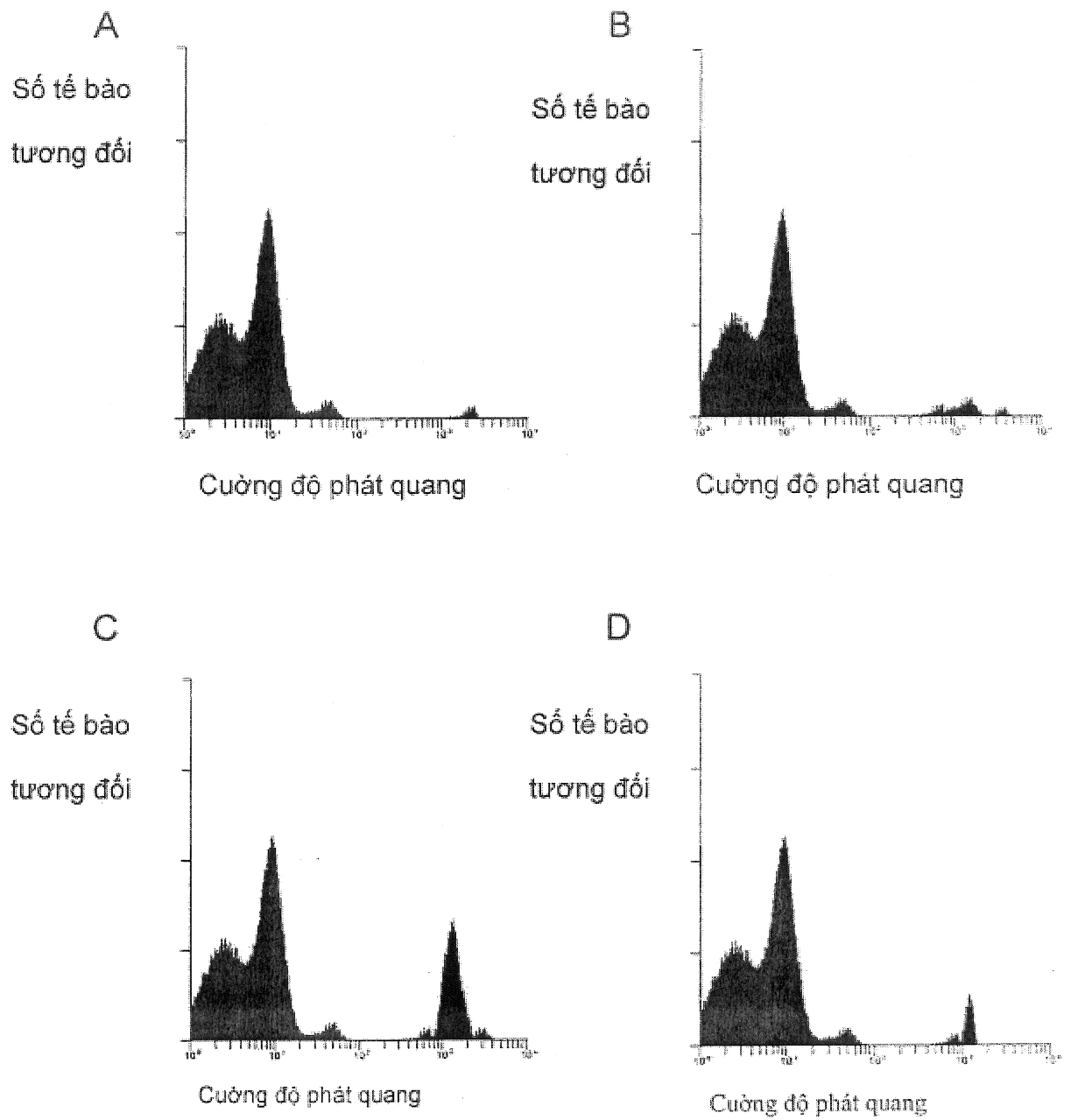


Fig.9

PB CD45 > 0,1% số chuột

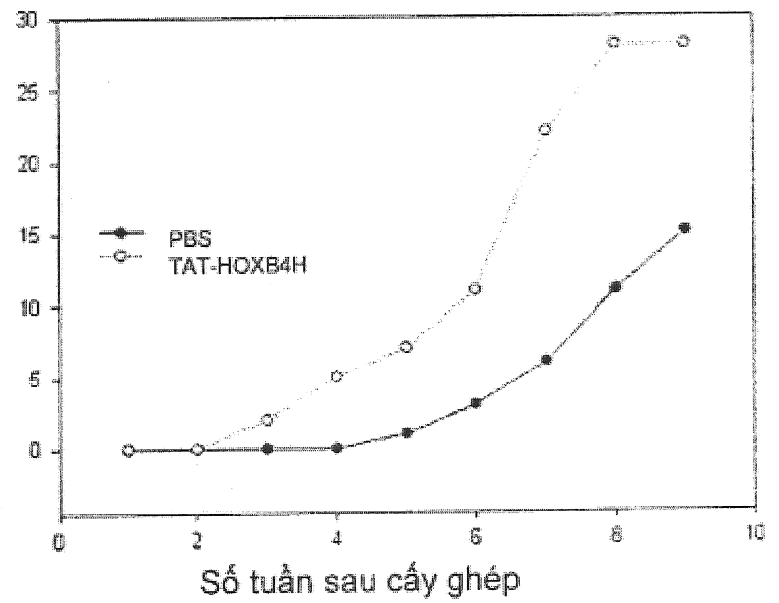


Fig.10

Tốc độ hồi phục bằng
PBLy5

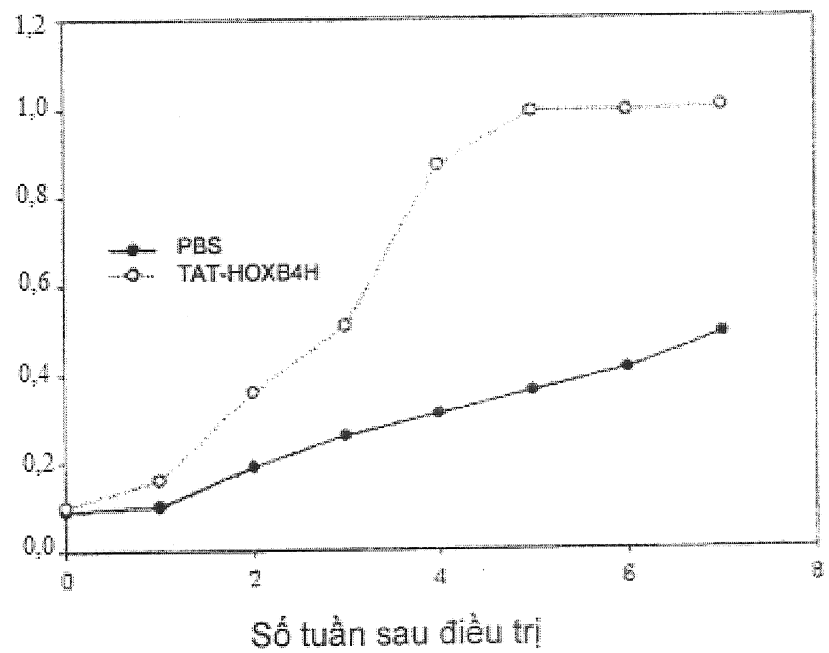


Fig.11