



(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)



1-0027827

(51)⁷ C07K 14/735; A61K 38/17

(13) B

(21) 1-2015-01534

(22) 30/10/2013

(86) PCT/EP2013/072741 30/10/2013

(87) WO 2014/068012 A1 08/05/2014

(30) 13/663,527 30/10/2012 US

(45) 25/04/2021 397

(43) 25/09/2015 330A

(73) SUPPREMOL GMBH (DE)

Am Klopferspitz 19, 82152 Munich, Germany

(72) SONDERMANN, Peter (DE); TER MEER, Dominik (DE); POHL, Thomas (DE);
WINTER, Reno (DE); JACOB, Uwe (DE).

(74) Công ty TNHH Quốc tế D&N (D&N INTERNATIONAL CO.,LTD.)

(54) TRÌNH TỰ AXIT NUCLEIC MÃ HÓA PROTEIN IIB CỦA THỤ THỂ FC GAMA, PROTEIN, VECTƠ, TẾ BÀO CHỦ CHỨA CHÚNG, DƯỢC PHẨM CHỨA PROTEIN VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT DƯỢC PHẨM NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến trình tự axit nucleic mã hóa protein có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1; vectơ chứa trình tự axit nucleic này và tế bào chủ chứa trình tự axit nucleic này hoặc vectơ này. Sáng chế cũng đề cập đến protein thu được hoặc có thể thu được bằng cách biểu hiện trình tự axit nucleic nêu trên hoặc vectơ nêu trên trong tế bào chủ. Ngoài ra, sáng chế đề cập đến protein được mã hóa bởi trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO: 6. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến dược phẩm và phương pháp sản xuất dược phẩm này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến trình tự axit nucleic mã hóa protein có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1; vectơ chứa trình tự axit nucleic này và tế bào chủ chứa trình tự axit nucleic này hoặc vectơ này. Sáng chế còn đề cập đến protein thu được hoặc có thể thu được bằng cách biểu hiện trình tự axit nucleic này hoặc vectơ này trong tế bào chủ. Ngoài ra, sáng chế đề cập đến protein được mã hóa bởi trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO: 6. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến dược phẩm và phương pháp sản xuất dược phẩm này. Sáng chế còn đề cập đến chế phẩm chứa protein có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 2 và/hoặc 3, chế phẩm này còn có thể chứa protein có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 4 và/hoặc 5.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các FcγR thuộc họ các thụ thể Fc (Fc receptors- các FcR) rất quan trọng để bảo vệ cơ thể người chống lại bệnh lây nhiễm. Thông thường, việc hoạt hóa các FcγR và ức chế các FcγR là khác nhau. Trong số ba loại FcγR chính trong cơ thể người, FcγRI có thể gắn kết với IgG đơn phân, trong khi FcγRII và FcγRIII gắn kết với các phức hợp miễn dịch đa trị (immune complexes- ICs) bao gồm các kháng thể và kháng nguyên (Takai, T. Nature Reviews Immunology 2002: 580-592.). Chức năng phản ứng được kích hoạt bởi các FcγR bao gồm, tùy thuộc vào loại FcR được biểu hiện và các protein được gắn kết, quá trình nhập nội bào với sự trung hòa tiếp theo các mầm bệnh và sự trình diện kháng nguyên, hiện tượng gây độc tế bào do tế bào phụ thuộc kháng thể (antibody-dependent cellular cytotoxicity - ADCC), sự tiết các chất trung gian hoặc điều hòa quá trình sản sinh kháng thể (Fridman et al. Immunol Rev. 1992;125:49-76, van de Winkel và Capel Immunol Today. 1993; 14(5):215-21).

Công bố đơn quốc tế WO 00/32767 mô tả các thụ thể Fc (các FcR) tan được trong đó chỉ bao gồm phần ngoại bào của thụ thể và không được glycosyl hóa. Do sự vắng mặt của vùng xuyên màng và của peptit tín hiệu, các protein này có mặt dưới dạng tan được và không được liên kết với các tế bào. Hơn nữa, các FcR được mô tả trong công bố đơn quốc tế WO 00/32767 có thể được sản xuất bằng cách tái tổ hợp và đã

được đề xuất để điều trị các bệnh tự miễn do chúng có khả năng gắn kết với phần Fc của kháng thể mà không gây trở ngại cho các thành phần khác của hệ miễn dịch. Công bố đơn quốc tế WO 00/32767 còn mô tả cấu trúc tinh thể của các FcR nhất định và khả năng tìm kiếm các chất ức chế sự tương tác của IgG với các FcR với sự hỗ trợ của các cấu trúc tinh thể này. Sự giải thích về việc các cấu trúc tinh thể cho phép tìm thấy các chất ức chế này bằng cách sàng lọc cơ sở dữ liệu nhờ sử dụng các chương trình máy tính có sẵn. Sáng chế được bộc lộ trong công bố đơn quốc tế WO 03/043648 tiếp tục phát triển các kết quả của công bố đơn quốc tế WO 00/32767 và đề xuất các phương pháp điều trị đặc biệt là đối với các bệnh như đa xơ cứng (multiple sclerosis- MS), luput ban đỏ hệ thống (systemic lupus erythematosus - SLE), và viêm khớp dạng thấp (rheumatoidarthritis - RA) và cũng dùng để điều trị các bệnh có nồng độ các tế bào tiêu diệt tự nhiên cao.

Khi các thụ thể nêu trên được sản xuất bằng cách tái tổ hợp trong các sinh vật nhân sơ và bởi vậy không được glycosyl hóa, các tác giả của công bố đơn quốc tế WO 03/043648 bất ngờ tìm ra rằng mặc dù các protein không được glycosyl hóa được dự đoán là có khả năng hòa tan kém, các thụ thể có thể được tinh chế có nồng độ Fc γ R cao ở dạng tan được. Công bố đơn quốc tế WO 03/043648 và tài liệu công bố khác trong đó các FcR đóng vai trò quan trọng trong các phản ứng bảo vệ của hệ miễn dịch.

Các thụ thể Fc đóng vai trò trung tâm trong hệ miễn dịch, trong đó chúng kiểm soát phạm vi và cường độ của đáp ứng miễn dịch. Hóa ra đặc biệt là thụ thể IIB của Fc gamma (sFc γ RIIB) (tức là phần ngoại bào của thụ thể IIB của Fc gamma) tan được, mà cạnh tranh với các Fc γ R được biểu hiện trên các tế bào miễn dịch cho các phức hợp miễn dịch gây bệnh là có lợi trong việc điều trị các bệnh tự miễn. Việc gây trở ngại ở giai đoạn đầu các phản ứng miễn dịch mà xảy ra ở các bệnh tự miễn ngăn chặn sự kích hoạt theo dây chuyền mà dẫn đến viêm và phá hủy mô. Đặc biệt là, trong khi sFc γ RIIB đang trong thử nghiệm lâm sàng giai đoạn II để chỉ định cho bệnh giảm tiểu cầu miễn dịch nguyên phát (ITP) và luput ban đỏ hệ thống (SLE). Như thường được biết đến, để đạt được vật liệu sinh học cho các thử nghiệm lâm sàng, ở đây sFc γ RIIB được yêu cầu tốt hơn là phải có các đặc tính hóa học, sản xuất và kiểm soát (Chemistry, Manufacturing and Control-CMC) tốt, như độ tinh khiết và ổn định cao trong quá trình tinh chế.

Do đó mục đích của sáng chế là đề xuất các protein FcγRIIB của người có các đặc tính CMC tốt. Mục đích này đạt được nhờ các phương án được phản ánh trong bộ yêu cầu bảo hộ, được mô tả ở đây, được minh họa bởi các ví dụ và hình vẽ.

Đáng ngạc nhiên là các protein như các protein được mô tả ở đây, thể hiện rằng độ tinh khiết cao hơn có thể đạt được do độ hòa tan tốt hơn ở nồng độ amoni sunfat vượt quá 1,5M. Kết tủa amoni sunfat có tác dụng loại bỏ lượng lớn các protein tạp, như một bước đầu tiên trong nhiều quy trình tinh chế. Nồng độ amoni sunfat càng cao thì thu được protein càng tinh khiết, nhưng ứng suất đặt lên protein càng lớn, do cường độ ion cao của amoni sunfat. Do đó, khả năng chịu được ứng suất của protein càng lớn thì nồng độ amoni sunfat có thể càng cao và do đó độ tinh khiết của protein càng cao. Đặc biệt là, bằng cách bổ sung các sản phẩm phụ của amoni sunfat kosmotropic như các loại không cuộn gấp và cuộn gấp sai và cả các tạp chất có nguồn gốc từ tế bào chủ như các thành phần của thành tế bào và các protein được kết tủa. Với việc làm tăng nồng độ chất kết tủa, hiệu quả kết tủa sẽ tăng và do đó thu được chế phẩm protein có độ tinh khiết cao miễn là protein cần tạo ra chịu được kết tủa ở nồng độ amoni sunfat cao như vậy. Như đã nêu trên, đáng ngạc nhiên là protein FcR như được mô tả ở đây có thể hòa tan tốt ở các nồng độ amoni sunfat bằng hoặc vượt quá 1,5M. Điều này không được dự tính trước đây, bởi vì các protein FcR đã biết hoạt động khác với các protein FcR được thể hiện trong các Ví dụ và không có bất kỳ hướng dẫn nào về cách biến đổi protein FcR sao cho nó có hoạt động và các đặc tính như protein FcR mà sáng chế đề xuất. Như đã nêu trên, các tác giả của sáng chế đã rất ngạc nhiên, hóa ra các protein được mô tả ở đây thực chất chịu được các nồng độ amoni sunfat cao, do đó cho phép độ tinh khiết cao so với các protein FcγRIIB đã biết, như các protein FcγRIIB được mô tả trong công bố đơn quốc tế WO 00/32767 hoặc WO 03/043648.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề cập đến trình tự axit nucleic mã hóa protein có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1. Sáng chế cũng đề xuất các trình tự axit nucleic mã hóa các protein được nêu trong SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, hoặc 9. Trình tự axit nucleic được nêu trong SEQ ID NO: 6 mã hóa protein có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1.

Sáng chế cũng đề cập đến vector chứa trình tự axit nucleic mã hóa protein có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1. Sáng chế cũng đề cập đến vector chứa trình tự axit nucleic mã hóa protein có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, hoặc 9.

Hơn nữa, sáng chế còn đề cập đến protein thu được hoặc có thể thu được bằng cách biểu hiện trình tự axit nucleic mã hóa protein có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1 hoặc vector theo sáng chế trong tế bào chủ, tốt hơn là tế bào chủ nhân sơ, tốt hơn nữa là trong *E. coli*.

Ngoài ra, sáng chế cũng đề cập đến protein được mã hóa bởi trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO: 6.

Sáng chế cũng đề cập đến dược phẩm chứa protein thu được hoặc có thể thu được bằng cách biểu hiện trình tự axit nucleic mã hóa protein có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1 hoặc vector theo sáng chế trong tế bào chủ hoặc protein được mã hóa bởi trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO: 6.

Hơn nữa, sáng chế đề cập đến chế phẩm chất bao gồm protein có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 2 và/hoặc 3. Tốt hơn là, chế phẩm chất là dược phẩm.

Theo một phương án, chế phẩm chất theo sáng chế còn bao gồm protein có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 4 và/hoặc 5. Tốt hơn, chế phẩm chất là dược phẩm.

Theo phương án khác, chế phẩm chất theo sáng chế có lượng protein có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 2 lớn hơn lượng protein có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 3.

Theo phương án khác, chế phẩm chất theo sáng chế có lượng protein có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 2 lớn hơn lượng protein có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 3 và lượng protein có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 2 và 3 lớn hơn lượng protein có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 4 và/hoặc 5.

Sáng chế còn đề cập đến chế phẩm chất bao gồm protein có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 9. Tốt hơn, chế phẩm chất là dược phẩm.

Sáng chế còn đề cập đến tế bào chủ chứa trình tự axit nucleic mã hóa protein có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1 hoặc tế bào chủ chứa vector theo sáng chế chứa trình tự axit nucleic theo điểm 1. Sáng chế cũng đề cập đến tế bào chủ chứa trình tự axit nucleic mã hóa protein có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, hoặc 9 hoặc tế bào chủ chứa vector theo sáng chế chứa trình tự axit nucleic mã hóa protein có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, hoặc 9.

Theo một phương án, tế bào chủ theo sáng chế tế bào chủ nhân sơ hoặc nhân thực.

Theo phương án khác của sáng chế, tế bào chủ nhân sơ là *E. coli*, tốt hơn là *E. coli* BL21, như BL21 (DE3).

Sáng chế còn đề cập đến phương pháp sản xuất dược phẩm bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ theo sáng chế trong các điều kiện cho phép sự biểu hiện của protein được mã hóa, và thu hồi dược phẩm thu được.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 thể hiện a) Cấu trúc tinh thể của sFcγRIIB (PDB entry: 2FCB) của người. Cấu trúc lõi không đổi như được thể hiện bởi trình tự axit amin của biến thể 1 (SEQ ID NO: 7) mà giống nhau ở tất cả các biến thể sFcR được thử nghiệm trong nghiên cứu này được thể hiện bằng màu xám đậm, các vòng mà được cho là quan trọng để gắn kết với IgG được thể hiện bằng màu xám nhạt và các phần kéo dài đầu tận cùng N và C được thể hiện bằng màu đen. Hai cầu disunfit được thể hiện bằng hình cầu và hình que. Sự giống nhau về cấu trúc lõi giữa tất cả các biến thể được thử nghiệm cũng được thể hiện rõ ràng từ trình tự canh thẳng được thể hiện trên Fig.1b.

b) Trình tự canh thẳng của các biến thể sFcR từ 1 đến 4 (viết tắt là “var.”) được sử dụng trong nghiên cứu này. SEQ ID NO: được viết tắt thành SEQ.

Fig.2 thể hiện các kết quả từ sàng lọc kết tủa FcR. Các biến thể FcR từ 1 đến 4 được ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ 25°C và ở nồng độ amoni sunfat và độ pH được chỉ định. Sau khi ly tâm hàm lượng FcR trong dịch nổi được xác định bằng phép đo OD₂₈₀ và được vẽ đồ thị với nồng độ amoni sunfat.

Các trình tự

Các trình tự dưới đây mô tả khái quát về các trình tự được sử dụng ở đây:

SEQ ID NO: 1 (đôi khi ở đây còn được gọi là “biến thể 3”)

MAPPKAVLKL EPQWINVLQE DSVTLTCRGT HSPESDSIQW

FHNGNLIPTH TQPSYRFKAN

NNDSGEYTCQ TGQTSLSDPV HLTVLSEWL V LQTPHLEFQE

GETIVLRCHS WKDKPLVKVT

FFQNGKSKKF SRSDPNFSIP QANHSHSGDY HCTGNIGYTL

YSSKPVTITV QAPSSSP

SEQ ID NO: 2

APPKAVLKLE PQWINVLQED SVTLTCRGTH SPESDSIQWF
 HNGNLIPHTHT QPSYRFKANN
 NDSGEYTCQT GQTSLSDPVH LTVLSEWLVL QTPHLEFQEG
 ETIVLRCHSW KDKPLVKVTF
 FQNGKSKKFS RSDPNFSIPQ ANHSHSGDYH CTGNIGYTLY
 SSKPVTITVQ APSSSP

SEQ ID NO: 3

PPKAVLKLEP QWINVLQEDS VTLTCRGTHS PESDSIQWFH
 NGNLIPHTHTQ PSYRFKANN
 DSGEYTCQTG QTSLSDPVHL TVLSEWLVLQ TPHLEFQEGE
 TIVLRCHSWK DKPLVKVTFF
 QNGKSKKFSR SDPNFSIPQA NHSHSGDYHC TGNIGYTLYS
 SKPVTITVQA PSSSP

SEQ ID NO: 4

PKAVLKLEPQ WINVLQEDSV TLTCRGTHSP ESDSIQWFHN
 GNLIPHTHTQP SYRFKANNND
 SGEYTCQTGQ TSLSDPVHLT VLSEWLVLQT PHLEFQEGET
 IVLRCHSWKD KPLVKVTFFQ
 NGKSKKFSRS DPNFSIPQAN HSHSGDYHCT GNIGYTLYSS
 KPVTITVQAP SSSP

SEQ ID NO: 5

AVLKLEPQWI NVLQEDSVTL TCRGTHSPES DSIQWFHNGN
 LIPHTHTQPSY RFKANNND SG
 EYTCQTGQTS LSDPVHLTVL SEWLVLQTPH LEFQEGETIV
 LRCHSWKDKP LVKVTFQNG
 KSKKFSRSDP NFSIPQANHS HSGDYHCTGN IGYTLYSSKP
 VTITVQAPSS SP

SEQ ID NO: 6

atggcaccgc cgaaagcagt tctgaaactg gaaccgcagt ggattaacgt tctgcaggaa

gatagegtta ccctgacctg tcgtggcacc catagcccgg aaagcgatag cattcagtgg
 ttccacaacg gcaatctgat tccgacccat acccagccga gctatcggtt taaagcgaac
 aacaacgata gcggcgaata tacctgtcag accggtcaga ccagcctgag cgatccggtt
 catctgaccg ttctgagcga atggctgggt ctgcagaccc cgcacttgga attcaggaa
 ggcgaaacca ttgtctgcg ttgccacagc tggaagata aaccgctggt taaagttacc
 ttctccaga acggcaaaag caaaaaattc agccgtagcg atccgaattt tagcattccg
 caggcgaatc atagccatag cggcgattat cattgtaccg gcaacattgg ctataccctg
 tatagcagca aaccggtgac cattaccgtt caggcgccga gcagcagccc gtaa

SEQ ID NO: 7 (đôi khi ở đây còn được gọi là “biến thể 1”, trình tự này được mô tả là
 SEQ ID NO: 1 trong công bố đơn quốc tế WO 03/043648)

MAVLKLEPQW INVLQEDSVT LTCRGTHSPE SDSIQWFHNG
 NLIPHTHTQPS YRFKANNNDG GEYTCQTGQT SLSDPVHLTV
 LSEWLVLQTP HLEFQEGETI VLRCHSWKDK PLVKVTFFQN
 GKSKKFSRSD PNFSIPQANH SHSGDYHCTG NIGYTLYSSK PVTITV

SEQ 8 (đôi khi ở đây còn được gọi là “biến thể 2”, trình tự này được mô tả là SEQ ID
 NO: 3 trong công bố đơn quốc tế WO 00/32767)

MGTPAAPPKA VLKLEPQWIN VLQEDSVTLT CRGTHSPESD
 SIQWFHNGNL IPTHTQPSYR FKANNNDGGE YTCQTGQTSL
 SDPVHLTVLS EWLVLQTPHL EFQEGETIVL RCHSWKDKPL
 VKVTFFQNGK SKKFSRSDPN FSIPQANHSH SGDYHCTGNI
 GYTLYSSKPV TITVQAPSSS

PMGII

SEQ ID 9 (đôi khi ở đây còn được gọi là “biến thể 4”)

MTPAAPPKAV LKLEPQWINV LQEDSVTLTC RGTHSPESDS
 IQWFHNGNLI PTHTQPSYRF KANNNDGGEY TCQTGQTSL
 DPVHLTVLSE WLVLQTPHLE FQEGETIVLR CHSWKDKPLV
 KVTFQNGKS KKFSRSDPNF SIPQANHSHS GDYHCTGNIG
 YTLYSSKPV ITVQAPSSSP

MGI

Mô tả chi tiết sáng chế

Cần lưu ý rằng các danh từ ở dạng số ít được sử dụng ở đây có ngụ ý bao gồm cả dạng số nhiều trừ khi ngữ cảnh chỉ rõ ý nghĩa khác. Do đó, ví dụ, đề cập đến “thuốc thử” là bao gồm một hoặc nhiều thuốc thử khác nhau này và đề cập đến “phương pháp” là đề cập đến các phương pháp và các bước tương đương mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực đã biết mà có thể được biến đổi hoặc thay thế cho các phương pháp được mô tả ở đây.

Tất cả các công bố đơn và bằng độc quyền sáng chế được viện dẫn trong phần mô tả này được đưa vào bằng cách viện dẫn toàn bộ. Mở rộng hơn, nếu các tài liệu được đưa vào bằng cách viện dẫn phủ nhận hoặc mâu thuẫn với phần mô tả này, thì phần mô tả này sẽ được dùng thay cho bất kỳ tài liệu nào trong số này.

Trừ khi có quy định khác, thuật ngữ “ít nhất” đặt trước một chuỗi các yếu tố cần được hiểu là đề cập đến mỗi yếu tố trong đó. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực sẽ nhận ra, hoặc có khả năng hiểu rõ bằng cách chỉ sử dụng thử nghiệm thông thường, nhiều phương án tương đương với các phương án cụ thể của sáng chế được mô tả ở đây. Sáng chế nhằm bao gồm các phương án tương đương này.

Trong toàn bộ phần mô tả này và yêu cầu bảo hộ kèm theo, trừ khi ngữ cảnh yêu cầu khác, cụm từ “bao gồm”, và các biến thể chia động từ của nó, sẽ được hiểu là bao hàm số nguyên hoặc bước được nhắc đến hoặc nhóm các số nguyên hoặc bước chứ không loại trừ số nguyên hoặc bước hoặc nhóm các số nguyên hoặc các bước bất kỳ khác. Khi được sử dụng ở đây thuật ngữ “bao gồm” có thể được thay thế bằng thuật ngữ “chứa” hoặc đôi khi được sử dụng ở đây với thuật ngữ “có”.

Khi được sử dụng ở đây, cụm từ “gồm có” loại trừ bất kỳ yếu tố, bước, hoặc thành phần không được chỉ định trong yếu tố yêu cầu bảo hộ. Khi được sử dụng ở đây, cụm từ “về cơ bản là gồm có” không loại trừ các vật liệu hoặc các bước mà không ảnh hưởng cụ thể đến các đặc điểm cơ bản và mới của yêu cầu bảo hộ.

Trong mỗi ví dụ ở đây, thuật ngữ bất kỳ trong số “bao gồm”, “về cơ bản là gồm có” và “gồm có” có thể được dùng thay thế cho nhau.

Rất nhiều tài liệu được trích dẫn trong suốt nội dung của phần mô tả này. Mỗi tài liệu được trích dẫn ở đây (bao gồm toàn bộ các patent, đơn yêu cầu cấp patent, tài liệu xuất bản khoa học, bản mô tả của nhà sản xuất, chỉ dẫn, v.v.), hoặc trên đây hoặc

dưới đây, được đưa vào bằng cách viện dẫn toàn bộ. Không có thông tin nào ở đây sẽ được hiểu là sự thừa nhận rằng sáng chế không được quyền đề ngày lùi lại so với phần bộc lộ này theo sáng chế trước đó.

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề cập đến trình tự axit nucleic mã hóa protein có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1.

Khi được sử dụng ở đây, thuật ngữ "axit nucleic" và "trình tự nucleotit" hoặc "trình tự axit nucleic" bao gồm các phân tử ADN (ví dụ, cADN hoặc ADN thuộc hệ gen), các phân tử ARN (ví dụ, mARN), sự kết hợp của các phân tử ADN và ARN hoặc các phân tử lai ADN/ARN, và các chất tương tự phân tử ADN hoặc ARN. Các chất tương tự này có thể được tạo ra bằng cách sử dụng, ví dụ, các chất tương tự nucleotit, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở các bazơ inosin hoặc được trityl hóa. Các chất tương tự này còn có thể bao gồm các phân tử ADN hoặc ARN bao gồm các khung chính bị biến đổi mà thêm vào các thuộc tính có lợi cho các phân tử này như, ví dụ, tính kháng nucleaza hoặc tăng khả năng đi qua màng tế bào. Các axit nucleic hoặc các trình tự nucleotit này có thể là sợi đơn, sợi kép, có thể chứa cả phần sợi đơn và phần sợi kép, và có thể chứa các phần sợi ba, nhưng tốt hơn là ADN sợi kép.

Nhiều dạng cải biến khác nhau có thể được tạo ra đối với ADN và ARN; do đó, thuật ngữ "phân tử axit nucleic" hoặc "trình tự axit nucleic" bao gồm các dạng biến đổi bằng hóa học, enzym, hoặc chuyển hóa. Ví dụ, phân tử axit nucleic hoặc trình tự axit nucleic theo sáng chế có thể được biến đổi sau quá trình dịch mã hoặc sau quá trình phiên mã.

Trình tự axit nucleic theo sáng chế mã hóa protein có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1. Trình tự của polypeptit này được mã hóa bởi SEQ ID NO: 1 có thể được biến đổi do các biến thể sau quá trình dịch mã hoặc sau quá trình phiên mã, phụ thuộc vào tế bào chủ biểu hiện polypeptit được mã hóa bởi SEQ ID NO: 1 này.

Khi được sử dụng ở đây, thuật ngữ "protein có trình tự nêu trong SEQ ID NO: X", với X là 1, 2, 3, 4, 5, hoặc 9, có nghĩa là protein có trình tự axit amin được thể hiện hoặc như được nêu trong SEQ ID NO: X, với X là 1, 2, 3, 4, 5 hoặc 9.

Thuật ngữ "polypeptit" hoặc "protein" khi được sử dụng ở đây có nghĩa là peptit, protein, hoặc polypeptit được sử dụng thay thế cho nhau và bao gồm các chuỗi

axit amin có độ dài xác định, trong đó các gốc axit amin được liên kết bằng các liên kết peptit cộng hóa trị. Tuy nhiên, các chuỗi tương tự peptit (peptidomimetic) của các protein/polypeptit này trong đó (các) axit amin và/hoặc (các) liên kết peptit được thay thế bởi các chất thực hiện chức năng tương tự cũng được bao gồm bởi sáng chế cũng như các dạng khác ngoài 20 axit amin được mã hóa bởi gen, như selenoxystein. Các peptit, oligopeptit và protein có thể được gọi là các polypeptit. Như đã nêu trên, thuật ngữ polypeptit và protein thường được sử dụng theo cách thay thế cho nhau. Thuật ngữ polypeptit còn đề cập đến, và không loại trừ các biến đổi của polypeptit. Các biến đổi bao gồm sự glycosyl hóa, axetyl hóa, axyl hóa, phosphoryl hóa, ribosyl hóa ADP, amit hóa, gắn cộng hóa trị của flavin, gắn cộng hóa trị của gốc heme, gắn cộng hóa trị của nucleotit hoặc dẫn xuất nucleotit, gắn cộng hóa trị của lipid hoặc dẫn xuất lipid, gắn cộng hóa trị của phosphatidylinositol, liên kết ngang, vòng hóa, tạo liên kết disulfide, khử methyl, tạo các liên kết ngang cộng hóa trị, tạo cystein, tạo pyroglutamat, tạo công thức, gamma-carboxyl hóa, glycosyl hóa, tạo neo GPI, hydroxyl hóa, iôt hóa, methyl hóa, myristoyl hóa, oxy hóa, PEG hóa, quá trình phân giải protein, phosphoryl hóa, prenyl hóa, racemic hóa, selenoyl hóa, sunfat hóa, quá trình bổ sung axit amin vào protein nhờ ARN vận chuyển như arginyl hóa, và ubiquitin hóa; ví dụ, xem ấn phẩm: *PROTEINS – STRUCTURE AND MOLECULAR PROPERTIES*, 2nd Ed., T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, New York (1993); *POST-TRANSLATIONAL COVALENT MODIFICATION PROTEINS*, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, New York (1983), trang 1-12; Seifter, Meth. Enzymol. 182 (1990); 626-646, Rattan, Ann. NY Acad. Sci. 663 (1992); 48-62.

Các protein theo sáng chế được nêu trong SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, hoặc 9. Do đó, sáng chế đề xuất các protein được nêu trong SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, hoặc 9.

Thuật ngữ "biểu hiện" hoặc "biểu hiện trình tự axit nucleic" có nghĩa là quá trình phiên mã của axit nucleic cụ thể hoặc cấu trúc di truyền cụ thể. Thuật ngữ "biểu hiện" hoặc "biểu hiện của axit nucleic" cụ thể là chỉ quá trình phiên mã của trình tự axit nucleic hoặc cấu trúc di truyền như vector chứa axit nucleic nêu trong SEQ ID NO: 1 thành ARN cấu trúc (rARN, tARN) hoặc mARN có hoặc không có quá trình dịch mã sau đó của mARN thành protein. Tốt hơn là, sau đó protein được dịch mã. Quá trình này bao gồm quá trình phiên mã của ADN và xử lý sản phẩm mARN thu được. Sau đó mARN được dịch mã thành các chuỗi polypeptit, mà cuối cùng được cuộn gấp thành

các polypeptit/protein hoàn chỉnh. Sự biểu hiện protein thường được sử dụng bởi các nhà nghiên cứu hệ protein để biểu thị phép đo sự có mặt và đa dạng của một hoặc nhiều protein trong tế bào hoặc mô cụ thể. Sự biểu hiện của protein của tế bào có thể được đo bằng nhiều cách. Ví dụ, bằng phương pháp hóa mô miễn dịch hoặc phân tích thâm tách phương tây (western blot). Các kết quả thu được ở đây có thể được đánh giá bởi tế bào được chuyển nhiễm vector chứa axit nucleic theo sáng chế khi so sánh với tế bào được chuyển nhiễm giả. Tế bào (tế bào chủ) biểu hiện mạnh hơn thể hiện sự nhuộm màu, mà tăng lên, ví dụ, về cường độ, khi so sánh với tế bào đối chứng (giả) trong cùng điều kiện. Sự biểu hiện của mRNA cũng có thể được đo, ví dụ, bằng RT-PCR. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực biết các kỹ thuật khác nhau, cách xác định sự biểu hiện của một protein hoặc mRNA nhất định của tế bào. Cũng được dự tính là các protein, thu được do các biến đổi sau quá trình phiên mã hoặc sau quá trình dịch mã.

“Biến thể” của polypeptit bao gồm polypeptit trong đó một hoặc nhiều gốc axit amin được thay thế, tốt hơn là được thay thế theo cách bảo thủ so với với polypeptit nêu trên và trong đó biến thể nêu trên tốt hơn là có thể liên kết với phần Fc của các kháng thể (xem liên kết của FcγR) và có khả năng liên kết với tế bào lympho. Các biến thể này bao gồm mất đoạn, chèn, đảo, lặp lại, và thay thế được chọn theo các quy tắc chung đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, hướng dẫn cách tạo ra các biến thể cam về kiểu hình do thay thế axit amin được đưa ra trong ấn phẩm: Bowie, Science 247: (1990) 1306-1310, trong đó các tác giả chỉ ra rằng có hai hướng chính để nghiên cứu dung sai thay đổi của trình tự axit amin. Các biến thể ưu tiên của FcγRIIB được nêu trong SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, hoặc 9, với FcγRIIB được thể hiện trong SEQ ID NO: 1 được ưu tiên.

Thuật ngữ “thụ thể Fc gamma” ở đây được sử dụng theo cách có thể thay thế với “FcγR” hoặc “thụ thể Fcγ” hoặc “FcγR” và bao gồm cả các FcγR thuộc màng và các FcγR có thể tan được (tức là phần ngoại bào của thụ thể Fcγ). Các thụ thể Fc gamma thuộc siêu họ globulin miễn dịch gồm các protein và được tìm thấy trên nhiều giống tạo huyết. Như được chỉ rõ từ tên của chúng, các thụ thể Fc nhận diện và liên kết với phần Fc (phân đoạn, kết tinh được) của các kháng thể, tức là phân đoạn mà tương ứng với hai vùng đầu tận cùng C của cả hai chuỗi nặng của kháng thể và thường tương tác với các phân tử và tế bào phản ứng.

Tốt hơn, protein có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1 là FcγR có thể tan được. Tương tự, tốt hơn, protein có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, hoặc 9 là FcγR có thể tan được. Ngoài ra, tốt hơn, protein có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, hoặc 9 là protein có thể tan được trong chất lỏng thích hợp, như chất lỏng dạng nước.

Các FcγR nhận diện các kháng thể IgG. Có bốn lớp phụ IgG ở người, được đặt tên theo thứ tự về sự đa dạng của chúng trong huyết thanh (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, trong đó IgG1 là loại IgG đa dạng nhất). Ba lớp FcγR tồn tại trong cơ thể người là: FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) và FcγRIIIA (CD16). Ngoài ra, các FcγR xuất hiện dưới nhiều dạng đồng phân khác nhau, tức là các thụ thể Fc gamma tương tự nhau về mặt chức năng mà có trình tự axit amin tương tự nhưng không giống hệt nhau. Các dạng đồng phân nêu trên bao gồm FcγRIA, B1, B2, C; FcγRIIA1-2, B1-3, C và, ngoài ra còn có nhiều alen (FcγRIIa1-HR, -LR; FcγRIIb-NA1,-NA2) (van de Winkel and Capel, *Immunol. Today* 1993, 14:215-221). Các lớp và dạng đồng phân khác nhau của FcγR có thể khác nhau về ái lực của chúng với IgG và đặc biệt là với các lớp phụ IgG khác nhau. Thông thường, FcγR xuất hiện như các protein xuyên màng loại I hoặc dưới các dạng có thể tan được nhưng cũng tồn tại dạng glycosylphosphatidylinositol được neo của FcγRIII (FcγRIIIB).

“Các FcγR có thể tan được” còn được gọi là “các FcγR”. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “thụ thể Fcγ có thể tan được” và các thuật ngữ tương tự để chỉ phần ngoại bào của thụ thể Fcγ. Phần này có thể được hòa tan trong chất lỏng. Thông thường, các dạng có thể tan được của lớp FcγR bất kỳ, đồng phân hoặc alen có thể được xác định bởi chữ “s” đứng trước, ví dụ, sCD32 hoặc sFcγRII để chỉ thụ thể Fc gamma RII tan được. Thông thường, trái ngược với FcγR thuộc màng (tức là, được liên kết với màng), FcγR có thể tan được không bao gồm vùng xuyên màng hoặc đuôi trong huyết tương nội bào.

Tốt hơn là, FcγR theo sáng chế là có nguồn gốc từ người hoặc FcγR của người. Thuật ngữ “có nguồn gốc từ người” được hiểu theo nghĩa rộng nhất. Thông thường, nó có nghĩa là FcγR (hoặc một vùng hoặc một phân đoạn của nó) giống hoặc tương tự với FcγR của người (tức là, protein được tìm thấy trong cơ thể con người) về trình tự axit amin và/hoặc cấu trúc.

Theo cách khác, FcγR “có nguồn gốc từ người” có thể là FcγR tái tổ hợp thu được bằng cách biểu hiện axit nucleic tái tổ hợp trong tế bào chủ, ví dụ như được mô tả

bởi Sondermann và Jacob (1999), *Bioll. Chem.* 380(6), 717-721. Nói một cách ngắn gọn, gen được quan tâm thu được từ một sinh vật và được đưa vào vectơ, ví dụ plasmid hoặc virus, mà sau đó được sử dụng để chuyển gen vào tế bào chủ mà biểu hiện gen tái tổ hợp và tạo ra sản phẩm protein tái tổ hợp. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực sẽ dễ dàng hiểu được cần chọn tế bào chủ nào để thu được FcγR, tức là ví dụ phù hợp để bào chế dược phẩm. Ví dụ, theo một số phương án, FcγR không glycosyl hóa có thể được yêu cầu. Do đó, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực có thể chọn tế bào chủ nhân sơ để biểu hiện FcγR mà không có bộ máy enzym cần cho sự glycosyl hóa protein. Theo một phương án, các FcγR có thể được biểu hiện trong các tế bào nhân sơ và sau đó được tinh chế và cuộn gấp lại theo bản mô tả của công bố đơn quốc tế WO 00/32767.

Theo phương án khác, các FcγR có thể được tạo ra một cách dễ dàng và không tốn kém với độ tinh khiết cao trong các hệ biểu hiện nhân thực. Các hệ hữu dụng bao gồm tế bào nhân thực cùng thiết bị chuyên dụng để sản xuất protein ngoại bào, ví dụ tế bào B. Các hệ biểu hiện nhân thực có khả năng khác bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, tế bào CHO hoặc HEK. Do đó FcγR có thể tan được nêu trên là tái tổ hợp, FcγR có thể tan được và được glycosyl hóa.

Các FcγR được đề cập ở đây còn bao gồm các FcγR mà so với FcγR kiểu đại đã được cải biến hoặc thay đổi về trình tự axit amin, và bao gồm, ví dụ, các vị trí glycosyl hóa bổ sung hoặc tương tự. Tuy nhiên, các dạng không được glycosyl hóa của FcγR cũng được dự tính và là phương án ưu tiên của các FcγR.

Thụ thể Fcγ theo sáng chế bao gồm ít nhất một trong số các trình tự axit amin như được nêu trong SEQ ID NO:1 (trình tự axit amin của SM101, ở đây còn được gọi là biến thể 3). FcγR theo sáng chế được mã hóa bởi ít nhất một trong số các trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:6 (trình tự axit nucleic mã hóa SM101, ở đây còn được gọi là biến thể 3). Các trình tự này có thể được tách dòng trong vectơ biểu hiện để tạo ra FcγR tương ứng bằng cách biểu hiện tái tổ hợp.

Sáng chế còn đề cập đến vectơ chứa trình tự axit nucleic mã hóa protein có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1. Vectơ này có thể là, ví dụ, plasmid, cosmit, virus, thể thực khuẩn hoặc các vectơ khác thường được sử dụng, ví dụ, trong kỹ thuật di truyền, và có thể còn chứa các gen như các gen đánh dấu cho phép chọn lọc và/hoặc sao chép vectơ này trong tế bào chủ thích hợp và trong các điều kiện thích hợp. Theo một phương án

ưu tiên, vectơ nêu trên là vectơ biểu hiện, trong đó phân tử axit nucleic theo sáng chế được liên kết theo cách hoạt động được và với (các) trình tự kiểm soát sự biểu hiện cho phép sự biểu hiện trong các tế bào chủ nhân sơ hoặc nhân thực như được mô tả ở đây. Thuật ngữ “được liên theo cách hoạt động được”, như được sử dụng trong ngữ cảnh này, để chỉ liên kết giữa một hoặc nhiều trình tự kiểm soát sự biểu hiện và vùng mã hóa trong polynucleotit cần được biểu hiện theo cách mà đạt được sự biểu hiện trong các điều kiện tương thích với trình tự kiểm soát sự biểu hiện.

Do đó, các phân tử axit nucleic theo sáng chế có thể được chèn vào nhiều vectơ có bán sẵn trên thị trường. Các ví dụ không giới hạn bao gồm các vectơ plasmid tương thích với tế bào động vật có vú, như pUC, pBluescript (Stratagene), pET (Novagen), pREP (Invitrogen), pCRTopo (Invitrogen), pcDNA3 (Invitrogen), pCEP4 (Invitrogen), pMC1 neo (Stratagene), pXT1 (Stratagene), pSG5 (Stratagene), EBO-pSV2neo, pBPV-1, pdBPVMMTneo, pRSVgpt, pRSVneo, pSV2-dhfr, pUCTag, pIZD35, pLXIN và pSIR (Clontech) và pIRES-EGFP (Clontech). Tốt hơn, các phân tử axit nucleic theo sáng chế được chèn vào vectơ “pET” dưới sự kiểm soát của Promoter T7 có thể cảm ứng được bởi IPTG. Các vectơ baculovirus như pBlueBac, Hệ biểu hiện Baculovirus BacPacz (CLONTECH), và Hệ biểu hiện Baculovirus MaxBac™, tế bào côn trùng và các quy trình thực hiện (Invitrogen) có bán sẵn trên thị trường và có thể còn được sử dụng để sản xuất lượng lớn protein có hoạt tính sinh học. (cũng xem ấn phẩm: Miller (1993), Curr. Op. Genet. Dev., 3, 9; O'Reilly, Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual, p. 127). Ngoài ra, các vectơ nhân sơ như pcDNA2; và vectơ nấm men như pYes2 là các ví dụ không giới hạn về các vectơ khác thích hợp sử dụng theo sáng chế.

Các vectơ biểu hiện được ưu tiên khác theo sáng chế là các vectơ dùng để biểu hiện các protein trong tế bào *Drosophila* mà đã được biết rộng rãi trong lĩnh vực kỹ thuật này, như DES2-series của Invitrogen. Tốt hơn, vectơ biểu hiện tế bào *Drosophila* nêu trên là pMTBiP/V5-His B (Invitrogen). Vectơ pMT/BiP/V5-His cho các đặc tính bổ sung sau đây. Nó có kích thước nhỏ (3.6 kb) để cải thiện lượng ADN và làm tăng hiệu quả tách dòng phụ, nó có đuôi epitop V5 đầu tận cùng C để nhanh chóng phát hiện kháng thể kháng V5 và nó có đuôi 6xHis đầu tận cùng C để dễ dàng tinh chế các protein dung hợp tái tổ hợp bằng cách sử dụng nhựa tạo chelat với niken.

Về các kỹ thuật biến đổi vectơ, xem ấn phẩm: Sambrook and Russel (2001), loc. cit. Các vectơ có thể chứa một hoặc nhiều hệ thống sao chép và di truyền để tách dòng hoặc biểu hiện, một hoặc nhiều dấu chuẩn để chọn lọc trong vật chủ, ví dụ, tính kháng kháng sinh, và một hoặc nhiều cắt-xét biểu hiện.

Các trình tự mã hóa được chèn vào vectơ có thể được tổng hợp bằng các phương pháp chuẩn, được phân lập từ các nguồn tự nhiên, hoặc được điều chế dưới dạng thể lai. Việc gắn các trình tự mã hóa vào các yếu tố điều hòa phiên mã (ví dụ, vùng khởi đầu, vùng tăng cường, và/hoặc vùng cô lập) và/hoặc vào các trình tự mã hóa axit amin khác có thể được thực hiện bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết.

Ngoài ra, các vectơ có thể, ngoài các trình tự axit nucleic theo sáng chế, bao gồm các yếu tố kiểm soát sự biểu hiện, cho phép sự biểu hiện chính xác của các vùng mã hóa trong các vật chủ thích hợp. Các yếu tố kiểm soát này là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực và có thể bao gồm vùng khởi đầu, bộ ba khởi đầu dịch mã, vị trí dịch mã và chèn hoặc các vị trí tiếp nhận ribosom bên trong (internal ribosomal entry sites - IRES) (Owens, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98 (2001), 1471-1476) để đưa một đoạn chèn vào vectơ. Tốt hơn, phân tử axit nucleic theo sáng chế được liên kết theo cách hoạt động được với các trình tự kiểm soát sự biểu hiện nêu trên cho phép sự biểu hiện trong các tế bào nhân thực hoặc nhân sơ.

Các yếu tố kiểm soát đảm bảo sự biểu hiện trong tế bào nhân thực và nhân sơ là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Như đã đề cập trên đây, chúng thường bao gồm các trình tự điều hòa đảm bảo sự khởi đầu quá trình phiên mã và tùy ý các tín hiệu poly-A đảm bảo sự kết thúc quá trình phiên mã và sự làm ổn định các bản phiên mã. Các yếu tố điều hòa bổ sung có thể bao gồm các vùng tăng cường quá trình phiên mã cũng như quá trình dịch mã, và/hoặc các vùng khởi đầu khác nguồn gốc hoặc liên quan đến tự nhiên. Các yếu tố điều hòa có thể cho phép sự biểu hiện trong, ví dụ, tế bào chủ của động vật có vú bao gồm vùng khởi đầu CMV-HSV thymidin kinase, SV40, vùng khởi đầu RSV (virus sarcome), vùng khởi đầu 1alpha của yếu tố nối dài ở người, vùng tăng cường CMV, vùng khởi đầu CaM kinase hoặc vùng tăng cường SV40,

Đối với sự biểu hiện trong tế bào nhân sơ, vô số vùng khởi đầu bao gồm, ví dụ, vùng khởi đầu tac-lac, vùng khởi đầu lacUV5 hoặc trp, đã được mô tả. Bên cạnh các yếu tố chịu trách nhiệm cho sự khởi đầu quá trình phiên mã, các yếu tố điều hòa này

còn có thể bao gồm các tín hiệu kết thúc quá trình phiên mã, như vị trí poly-A của SV40 hoặc vị trí poly-A của tk, cùng phía polynucleotit. Trong ngữ cảnh này, các vector biểu hiện thích hợp đã được biết trong lĩnh vực kỹ thuật này là như pcDV1 vector biểu hiện Okayama-Berg cADN (Pharmacia), pRc/CMV, pcADN1, pcADN3 (In-VitroGene, như được sử dụng, không kể những ví dụ kèm theo khác), pSPORT1 (GIBCO BRL) hoặc pGEMHE (Promega), hoặc các vector biểu hiện là tế bào nhân sơ, như lambda gt11.

Vector biểu hiện theo sáng chế ít nhất có khả năng điều khiển quá trình sao chép, và tốt hơn là quá trình biểu hiện, của các axit nucleic và protein theo sáng chế. Các điểm khởi đầu quá trình sao chép thích hợp bao gồm, ví dụ, các điểm khởi đầu quá trình sao chép Col E1, virus SV40 và M 13. Các vùng khởi đầu thích hợp bao gồm, ví dụ, vùng khởi đầu cytomegalovirus (cytomegalovirus - CMV), vùng khởi đầu lacZ, vùng khởi đầu gal10 và vùng khởi đầu đa diện của virus đa diện đa nhân *Autographa californica* (*Autographa californica* multiple nuclear polyhedrosis virus - AcMNPV). Các trình tự kết thúc thích hợp bao gồm, ví dụ, hormon tăng trưởng ở bò, SV40, lacZ và các tín hiệu polyadenyl hóa đa diện của AcMNPV. Ví dụ về các dấu chuẩn có thể chọn lọc được bao gồm tính kháng kháng sinh neomycin ampicilin, và hygromycin và kháng sinh tương tự, tốt hơn là kanamycin. Các vector được thiết kế đặc biệt cho phép sự qua lại của ADN giữa các tế bào chủ khác nhau, như vi khuẩn-nấm men, hoặc tế bào vi khuẩn - tế bào động vật, hoặc tế bào vi khuẩn - tế bào nấm, hoặc tế bào vi khuẩn - tế bào động vật không xương sống.

Ngoài các phân tử axit nucleic theo sáng chế, vector có thể còn bao gồm các trình tự axit nucleic mã hóa cho các tín hiệu tiết. Các trình tự tín hiệu tiết này là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Ngoài ra, tùy thuộc vào hệ biểu hiện được sử dụng, các trình tự dẫn đầu có khả năng dẫn hướng polypeptit được biểu hiện đến khoang tế bào có thể được bổ sung vào trình tự mã hóa của các phân tử axit nucleic theo sáng chế và đã được biết rộng rãi trong lĩnh vực kỹ thuật này. (Các) trình tự dẫn đầu được lắp ghép trong giai đoạn thích hợp với các trình tự dịch mã, khởi đầu và kết thúc, và tốt hơn, một trình tự dẫn đầu có khả năng điều khiển sự tiết của protein được dịch mã, hoặc một phần của nó, không kể những cái khác, vào màng ngoại bào. Tùy ý, trình tự khác loại có thể mã hóa protein dung hợp bao gồm peptit nhận dạng đầu tận cùng C hoặc đầu tận cùng N tạo ra các đặc tính mong muốn, ví dụ, sự làm ổn định

hoặc làm đơn giản quá trình tinh chế sản phẩm tái tổ hợp được biểu hiện. Khi vector đã được đưa vào vật chủ thích hợp, vật chủ được duy trì trong các điều kiện thích hợp cho sự biểu hiện của các trình tự nucleotit ở mức độ cao, và, như mong muốn, việc thu gom và tinh chế các protein, phân đoạn kháng nguyên hoặc protein dung hợp theo sáng chế có thể theo sau. Tất nhiên là, vector cũng có thể bao gồm các vùng điều hòa từ các sinh vật gây bệnh.

Tốt hơn là, vector có thể là vector biểu hiện có thể cảm ứng được, ví dụ, vector có thể cảm ứng bằng IPTG.

Hơn nữa, bên cạnh vector biểu hiện, vector này còn có thể là vector vận chuyển gen và/hoặc vector định hướng gen. Liệu pháp gen, dựa trên việc đưa các gen chữa bệnh (ví dụ để chủng ngừa) vào các tế bào bằng các kỹ thuật *ex-vivo* hoặc *in-vivo*, là một trong các ứng dụng quan trọng nhất của chuyển gen. Các vector, hệ vector thích hợp và các phương pháp dùng cho liệu pháp gen *in-vitro* hoặc *in-vivo* được mô tả trong tài liệu và đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này; ví dụ, xem trong, Giordano, *Nature Medicine* 2 (1996), 534-539; Schaper, *Circ. Res.* 79 (1996), 911-919; Anderson, *Science* 256 (1992), 808-813, Isner, *Lancet* 348 (1996), 370-374; Muhlhauser, *Circ. Res.* 77 (1995), 1077-1086; Wang, *Nature Medicine* 2 (1996), 714-716; công bố đơn WO 94/29469; công bố đơn WO 97/00957; Schaper, *Current Opinion in Biotechnology* 7 (1996), 635-640 hoặc Verma, *Nature* 389 (1997), 239-242 và các tài liệu tham khảo được viện dẫn ở đây.

Các phân tử axit nucleic theo sáng chế và các vector như được mô tả trên đây có thể được thiết kế để dẫn hướng sự đưa vào hoặc để đưa vào thông qua các liposom, hoặc các vector virus (ví dụ adenovirus, retrovirus) vào tế bào. Ngoài ra, các hệ baculovirus hoặc các hệ dựa trên virus bệnh đậu mùa hoặc virus Semliki Forest có thể được sử dụng làm hệ biểu hiện nhân thực cho các phân tử axit nucleic theo sáng chế. Ngoài việc sản xuất tái tổ hợp, các đoạn của protein, protein dung hợp hoặc các phân đoạn kháng nguyên theo sáng chế có thể được sản xuất bằng cách tổng hợp peptit trực tiếp bằng cách sử dụng các kỹ thuật pha rắn (cf Stewart et al. (1969) *Solid Phase Peptide Synthesis*; Freeman Co, San Francisco; Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85 (1963), 2149-2154). Tổng hợp protein *in vitro* có thể được thực hiện bằng cách sử dụng các kỹ thuật thủ công hoặc tự động. Tổng hợp tự động có thể đạt được, ví dụ, bằng cách sử dụng thiết bị tổng hợp peptit Applied Biosystems 431A Peptide Synthesizer (Perkin

Elmer, Foster City CA) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Nhiều đoạn khác nhau có thể được tổng hợp hóa học một cách riêng lẻ và được nối với nhau bằng cách sử dụng các phương pháp hóa học để sản xuất các phân tử có độ dài hoàn chỉnh.

Sáng chế còn đề cập đến tế bào chủ chứa trình tự axit nucleic mã hóa protein có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1 hoặc vector chứa trình tự axit nucleic mã hóa protein có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1.

“Vật chủ” nêu trên, có thể được tạo ra bằng cách đưa vector hoặc trình tự nucleotit nêu trên vào tế bào chủ mà dựa vào sự có mặt của nó trong tế bào gây ra sự biểu hiện của protein được mã hóa bởi trình tự nucleotit theo sáng chế hoặc chứa trình tự nucleotit hoặc vector theo sáng chế trong đó trình tự nucleotit và/hoặc polypeptit được mã hóa không thuộc tế bào chủ. Thuật ngữ “vật chủ” khi được sử dụng ở đây bao gồm các tế bào chủ.

Thuật ngữ "ngoại lai" có nghĩa là trình tự nucleotit và/hoặc polypeptit được mã hóa hoặc là khác loại với vật chủ, tức là nó có nguồn gốc từ tế bào hoặc sinh vật có nền tảng bộ gen khác, hoặc là cùng loại với vật chủ nhưng nằm trong môi trường gen khác so với bản sao có trong tự nhiên của trình tự nucleotit nêu trên. Điều này có nghĩa là, nếu trình tự nucleotit là khác loại so với vật chủ, nó không nằm ở vị trí tự nhiên của nó trong hệ gen vật chủ nêu trên, cụ thể là nó được bao quanh bởi các gen khác. Trong trường hợp này, trình tự nucleotit có thể hoặc chịu sự kiểm soát của vùng khởi đầu của chính nó hoặc chịu sự kiểm soát của vùng khởi đầu khác loại. Vị trí của phân tử axit nucleic hoặc vector được đưa vào có thể được xác định bởi người có hiểu biết trung bình bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ, thẩm tách phương nam, Southern Blotting. Vector hoặc trình tự nucleotit theo sáng chế mà có mặt trong vật chủ có thể hoặc là được tích hợp vào hệ gen của vật chủ hoặc nó có thể được duy trì dưới một số dạng nằm ngoài nhiễm sắc thể. Theo khía cạnh này, cũng được hiểu rằng trình tự nucleotit theo sáng chế có thể được sử dụng phục hồi hoặc tạo ra gen đột biến thông qua tái tổ hợp tương đồng.

Theo một phương án, tế bào chủ chứa trình tự axit nucleic mã hóa protein có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1 hoặc vector chứa trình tự axit nucleic mã hóa protein có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1 là tế bào chủ nhân sơ hoặc nhân thực. Tốt hơn là, tế bào chủ nhân sơ là *E. coli*, tốt hơn nữa là *E. coli* BL21, như BL21 (DE3).

Các tế bào nhân sơ/vi khuẩn là các tế bào thường được sử dụng để tách dòng như *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescens* hoặc *Bacillus subtilis*. Vật chủ nhân thực nêu trên có thể là tế bào động vật có vú, tế bào động vật lưỡng cư, tế bào cá, tế bào côn trùng, tế bào nấm, tế bào thực vật hoặc tế bào vi khuẩn (ví dụ, *E. coli* các chủng HB101, DH5a, XL1 Blue, Y1090 và JM101). Các tế bào chủ tái tổ hợp nhân sơ được ưu tiên, trong đó *E. coli* được ưu tiên nhất.

Các ví dụ khác của các tế bào chủ nhân thực bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, nấm men, ví dụ *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces lactis* hoặc các tế bào *Pichia pastoris*, các dòng tế bào có nguồn gốc từ người, bò, lợn, khỉ, và loài gặm nhấm, cũng như các tế bào côn trùng, bao gồm nhưng không giới hạn ở, các tế bào côn trùng *Spodoptera frugiperda* và các tế bào côn trùng có nguồn gốc từ *Drosophila* cũng như các tế bào ở cá ngựa vằn. Các dòng tế bào có nguồn gốc từ các loài động vật có vú thích hợp để sử dụng và có sẵn trên thị trường bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, tế bào L, tế bào CV-1, tế bào COS-1 (ATCC CRL 1650), tế bào COS-7 (ATCC CRL 1651), tế bào HeL (ATCC CCL 2), C1271 (ATCC CRL 1616), BS-C-1 (ATCC CCL 26) và MRC-5 (ATCC CCL 171).

Các tế bào có nguồn gốc từ *Drosophila* nêu trên có thể là *Drosophila* S2 (ATCC CRL-1963) mà tốt hơn là được sử dụng cho sự biểu hiện protein khác loại trong các hệ biểu hiện *Drosophila*, ví dụ, *Drosophila* Expression System (DES®).

Các dòng tế bào có nguồn gốc từ các loài động vật có vú thích hợp để sử dụng và có sẵn trên thị trường bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các tế bào L, tế bào CV-1, tế bào COS-1 (ATCC CRL 1650), tế bào COS-7 (ATCC CRL 1651), tế bào HeLa (ATCC CCL 2), C1271 (ATCC CRL 1616), BS-C-1 (ATCC CCL 26) và MRC-5 (ATCC CCL 171).

Theo một phương án ưu tiên hơn khác, tế bào của động vật lưỡng cư nêu trên là noãn bào. Theo một phương án ưu tiên hơn nữa, noãn bào nêu trên là noãn bào của ếch, đặc biệt ưu tiên là noãn bào của ếch *Xenopus laevis*.

Theo một phương án ưu tiên hơn, vật chủ theo sáng chế là sinh vật chuyển gen không phải người. Sinh vật không phải người nêu trên có thể là động vật có vú, lưỡng cư, cá, côn trùng, nấm hoặc thực vật. Các động vật chuyển gen không phải người được đặc biệt ưu tiên là các loài *Drosophila*, *Caenorhabditis elegans*, các loài *Xenopus*, cá ngựa vằn, *Spodoptera frugiperda*, *Autographa californica*, chuột nhắt và chuột. Các

thực vật chuyển gen bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, lúa mì, thuốc lá, rau mùi tây và *Arabidopsis*. Nấm chuyển gen cũng được biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và bao gồm, không kể những loài khác, nấm men, như *S. pombe* hoặc *S. cerevisiae*, hoặc các loài *Aspergillus*, *Neurospora* hoặc *Ustilago* hoặc các loài *Pichia*.

Sáng chế còn đề cập đến protein thu được hoặc có thể thu được bằng cách biểu hiện trình tự axit nucleic mã hóa protein có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1 hoặc vector chứa trình tự axit nucleic mã hóa protein có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1 trong tế bào chủ, tốt hơn là tế bào chủ nhân sơ, tốt hơn nữa là trong *E. coli*, tốt nhất là ở *E. coli* BL21, như *E. coli* BL21 (D3).

Dưới đây là phần mô tả về phương pháp sản xuất polypeptit được mã hóa bởi phân tử axit nucleic theo sáng chế bao gồm nuôi cấy/nuôi vật chủ theo sáng chế và phân lập polypeptit sản xuất được.

Có nhiều phương pháp thích hợp trong lĩnh vực kỹ thuật này để sản xuất các polypeptit ở các vật chủ thích hợp. Nếu vật chủ là sinh vật đơn bào hoặc tế bào từ động vật có vú hoặc côn trùng, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực có thể đưa chúng vào nhiều điều kiện nuôi cấy khác nhau mà có thể được tối ưu hóa hơn nữa mà không phải thực hiện khối lượng công việc quá lớn. Protein được sản xuất có thể được thu hồi một cách tiện lợi từ môi trường nuôi cấy hoặc từ thể vùi được phân lập (sinh học) bằng các kỹ thuật đã biết. Ngoài ra, polypeptit được sản xuất có thể được phân lập trực tiếp từ tế bào chủ. Tế bào chủ nêu trên có thể là một phần hoặc có nguồn gốc từ một phần của sinh vật chủ, ví dụ tế bào chủ nêu trên có thể là một phần của mô, ví dụ hệ thần kinh trung ương (central nervous system – CNS), da, v.v., của động vật hoặc phần có thể thu hoạch được của thực vật. Ngoài ra, polypeptit được sản xuất có thể được phân lập từ các dịch có nguồn gốc từ vật chủ nêu trên, như máu, sữa hoặc dịch não tủy.

Ngoài ra, sáng chế đề cập đến các polypeptit được mã hóa bởi trình tự axit nucleic mã hóa protein có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1 theo sáng chế.

Theo đó, polypeptit theo sáng chế có thể được sản xuất bằng các phương pháp vi sinh hoặc bằng các động vật có vú chuyển gen. Polypeptit theo sáng chế cũng được dự tính là được thu hồi từ các thực vật chuyển gen. Theo cách khác, polypeptit theo sáng chế có thể được sản xuất bằng cách tổng hợp hoặc bán tổng hợp.

Ví dụ, tổng hợp hóa học, như có thể sử dụng quy trình pha rắn được mô tả bởi Houghton, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (82) (1985), 5131-5135. Một phương pháp khác là dịch mã *in vitro* của mARN. Phương pháp ưu tiên bao gồm việc sản xuất tái tổ hợp protein trong các tế bào chủ như được mô tả trên đây. Ví dụ, các trình tự axit nucleotit chứa toàn bộ hoặc một phần của một trong số các trình tự nucleotit bất kỳ theo sáng chế có thể được tổng hợp bằng PCR, được chèn vào vector biểu hiện, và tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện. Sau đó, tế bào chủ được nuôi cấy để sản sinh polypeptit mong muốn, polypeptit này được tách chiết và tinh chế. Việc tách chiết và tinh chế protein có thể đạt được bằng bất kỳ cách nào trong số các kỹ thuật đã biết; ví dụ và không chỉ giới hạn ở, sắc ký trao đổi ion, sắc ký lọc gel và sắc ký ái lực, sắc ký lỏng cao áp (high pressure liquid chromatography - HPLC), HPLC pha đảo, điện di trên gel đĩa điều chế. Ngoài ra, các hệ dịch mã phi tế bào có thể được sử dụng để sản xuất các polypeptit theo sáng chế. Các hệ biểu hiện phi tế bào thích hợp để sử dụng theo sáng chế bao gồm dịch ly giải hồng cầu lưới ở thỏ, chiết xuất mầm lúa mì, các màng vi lập thể ở tụy chó, chiết xuất *E. coli* S30, và các hệ phiên mã/dịch mã được kết hợp như hệ TNT (Promega). Các hệ này cho phép sự biểu hiện của các polypeptit hoặc các peptit tái tổ hợp theo sự bổ sung các vector tách dòng, các đoạn ADN, hoặc các trình tự ARN chứa các vùng mã hóa và yếu tố vùng khởi đầu thích hợp. Như nêu trên, các kỹ thuật phân lập/tinh chế protein có thể yêu cầu sự cải biến protein theo sáng chế bằng cách sử dụng các phương pháp thông thường. Ví dụ, đuôi histidin có thể được thêm vào protein để cho phép việc tinh chế trên cột niken. Các cải biến khác có thể dẫn đến hoạt tính cao hơn hoặc thấp hơn, cho phép sản xuất protein ở nồng độ cao hơn, hoặc làm đơn giản quá trình tinh chế protein. Các đuôi khác cũng bao gồm đuôi flag. Các đuôi này tốt hơn là được dùng cho các vật chủ nhân thực.

Tốt hơn, protein theo sáng chế có trình tự axit amin được mã hóa bởi phân tử axit nucleic theo sáng chế như được mô tả ở đây hoặc thu được hoặc có thể thu được bằng cách biểu hiện trình tự axit nucleic nêu trên được mô tả ở đây. Khi các vector chứa trình tự SEQ ID NO: 1 như, ví dụ, trong các vector biểu hiện, có thể được sử dụng để đạt được sự biểu hiện của protein thu được hoặc có thể thu được bằng cách biểu hiện trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO: 1.

Ví dụ, các chủng *E. coli* BL21(DE3) có thể được sử dụng để gây ra sự biểu hiện của protein có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1 hoặc vector chứa trình tự axit nucleic

mã hóa protein có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1. Việc tạo cấu trúc vector, ví dụ, cho sự biểu hiện dưới sự điều khiển của Promoter T7 có thể cảm ứng được bằng IPTG là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các tế bào *E. coli* BL21(DE3) khả biến điện có thể được biến nạp với ADN plasmit, ví dụ vector biểu hiện như được mô tả trên đây. Các tế bào đã được xử lý sau đó được nuôi cấy trong môi trường. Sau khi nuôi cấy, thu tế bào bằng cách ly tâm hoặc tế bào có thể được ly giải trực tiếp, ví dụ, bằng cách dùng sóng âm và sau đó huyền phù này được ly tâm hoặc xử lý như được minh họa trong ví dụ. Sau đó, viên, tức là thể vùi thô, có thể được tạo huyền phù lại trong dung dịch đệm, ví dụ dung dịch đệm ly giải. Thể vùi ẩm sau đó được hòa tan. Sau lần ly tâm lần nữa, có thể thu được protein quan tâm hoặc trước đó protein này có thể được cuộn gấp lại, ví dụ, như được minh họa trong ví dụ. Sự biểu hiện protein, sự phá hủy tế bào, thu hồi thể vùi, và cuộn gấp lại thể vùi thường được thực hiện như đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ, được mô tả ở đây trong phần ví dụ thực hiện sáng chế.

Một cách tinh chế protein bao gồm việc tạo kết tủa bằng amoni sunfat, đây là một phương pháp dùng để tinh chế các protein bằng cách thay đổi độ hòa tan của chúng. Trường hợp cụ thể của kỹ thuật thường thấy hơn là phương pháp tách bằng muối (salting out). Amoni sunfat thường được sử dụng vì độ hòa tan của nó rất cao đến mức cho phép các dung dịch muối có cường độ ion cao. Độ hòa tan của các protein thay đổi theo cường độ ion của dung dịch, và do đó theo nồng độ muối. Hai hiệu ứng khác nhau được quan sát: ở nồng độ muối thấp, độ hòa tan của protein tăng cùng với việc tăng nồng độ muối (tức là cường độ ion tăng lên), hiệu ứng này được gọi là salting in. Khi nồng độ muối (cường độ ion) tăng lên hơn nữa, độ hòa tan của protein bắt đầu giảm. Ở cường độ ion đủ cao, protein sẽ hầu như được kết tủa hoàn toàn từ dung dịch (salting out).

Do các protein khác biệt rõ ràng về độ hòa tan ở cường độ ion cao, phương pháp tách bằng muối là quá trình rất hữu dụng để giúp tinh chế protein cho trước. Bằng cách bổ sung amoni sunfat kosmotropic, các sản phẩm phụ của quá trình cuộn gấp như các loại không được cuộn gấp hoặc cuộn gấp sai và cả các tạp chất có nguồn gốc từ tế bào chủ như các thành phần của thành tế bào và các protein sẽ bị kết tủa. Khi nồng độ chất kết tủa tăng, thì hiệu quả tạo kết tủa sẽ tăng lên và do đó thu được chế phẩm FcR có độ tinh khiết cao miễn là biến thể FcR chịu được sự tạo kết tủa ở nồng độ amoni sunfat cao

như vậy. Bởi vậy có thể mong muốn có biến thể FcR mà có thể hòa tan tốt ở các nồng độ amoni sunfat bằng hoặc thậm chí lớn hơn 1,5M.

Protein kết tủa sau đó được loại bỏ bằng cách ly tâm và nồng độ amoni sunfat tăng lên đến trị số mà sẽ làm kết tủa hầu hết protein đích ra trong khi để lại một lượng tối đa các tạp chất protein vẫn còn ở lại trong dung dịch. Protein đích được kết tủa được thu hồi bằng cách ly tâm và hòa tan trong dung dịch đệm mới cho giai đoạn tinh chế tiếp theo.

Tốt hơn là, protein theo sáng chế có độ hòa tan cao ở các nồng độ amoni sunfat bằng hoặc lớn hơn 1,5M.

Sáng chế còn đề cập đến protein được mã hóa bởi trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO: 6.

Protein có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, hoặc 9 có thể được mã hóa bởi trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO: 6, trong đó

(i) codon thứ nhất (ATG) được loại ra khỏi trình tự SEQ ID NO: 6 tạo ra protein có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 2,

(ii) codon thứ nhất (ATG) và thứ hai (GCA) được loại ra khỏi SEQ ID NO: 6 tạo ra protein có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 3,

(iii) codon thứ nhất (ATG), thứ hai (GCA) và thứ ba (CCG) được loại ra khỏi SEQ ID NO: 6 tạo ra protein có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 4,

(iv) codon thứ nhất (ATG), thứ hai (GCA), thứ ba (CCG), thứ tư (CCG) và thứ năm (AAA) được loại ra khỏi SEQ ID NO: 6 tạo ra protein có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 5,

(v) các codon mã hóa các axit amin TPA từ đầu tận cùng N đến đầu tận cùng C được thêm vào giữa codon thứ nhất (ATG) và thứ hai (GCA) của trình tự SEQ ID NO: 6 và các codon mã hóa trình tự axit amin MGI được thêm vào đầu 3' đến codon áp chót (CCG) của SEQ ID NO: 6 tạo ra protein có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 9.

Sáng chế còn đề cập đến được phẩm chứa protein thu được hoặc có thể thu được bằng cách biểu hiện axit nucleic mã hóa protein có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1 hoặc vector chứa axit nucleic mã hóa protein có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1 hoặc protein được mã hóa bởi trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO: 6.

Thuật ngữ “dược phẩm”, như được sử dụng theo sáng chế, đề cập đến

(a) (các) dược phẩm mà chứa ít nhất một protein thu được hoặc có thể thu được bằng cách biểu hiện axit nucleic mã hóa protein có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1;

(b) hoặc vector chứa axit nucleic mã hóa protein có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, hoặc 9;

(c) hoặc protein được mã hóa bởi trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO: 6;

(d) hoặc trình tự axit nucleic mã hóa protein có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 hoặc 9.

Các dược phẩm theo sáng chế mà được mô tả dưới đây cũng được dự tính là chứa các protein nêu trên dưới dạng kết hợp bất kỳ. Tùy ý, dược phẩm này có thể còn chứa các phân tử mà có khả năng liên kết với các protein khác, ví dụ, các kháng thể hoặc các tế bào lympho. Dược phẩm có thể ở dạng rắn, lỏng hoặc khí và có thể, không kể những dạng khác, ở dạng thuốc bột, viên nén, dung dịch, sol khí, cốm, viên tròn, huyền phù, nhũ tương, viên nang, siro, chất lỏng, cồn ngọt, cao, cồn thuốc hoặc cao lỏng hoặc ở dạng mà đặc biệt thích hợp để dùng qua đường miệng hoặc ngoài đường tiêu hóa hoặc khu trú.

Dược phẩm ưu tiên khác theo sáng chế là dược phẩm còn có thể bao gồm chất mang và/hoặc tá dược được dụng. Dược phẩm nêu trên bao gồm, không kể những cái khác, trình tự axit nucleic theo sáng chế hoặc polypeptit theo sáng chế mà có thể được liên kết với polypeptit khác, ví dụ kháng thể hoặc protein khác có trong huyết thanh.

Dược phẩm này có thể được sử dụng cùng với chất mang sinh lý dụng, như được mô tả ở đây. Theo một phương án cụ thể, thuật ngữ "dược dụng" có nghĩa là được cơ quan quản lý hoặc dược thư được thừa nhận rộng rãi chấp thuận dùng để sử dụng cho động vật, và cụ thể hơn là cho người.

Thuật ngữ "chất mang" đề cập đến chất pha loãng, tá dược, hoặc chất dẫn thuốc mà dược phẩm được sử dụng cùng. Các chất mang dược dụng này có thể là các chất lỏng vô trùng, như nước và dầu. Nước là chất mang được ưu tiên khi dược phẩm được cho dùng trong tĩnh mạch. Các dung dịch nước muối và dung dịch dextroza và glyxerol trong nước cũng có thể được sử dụng làm các chất mang dạng lỏng, đặc biệt là cho các dung dịch dùng để tiêm.

Các tá dược được phẩm thích hợp bao gồm tinh bột, glucoza, lactoza, sucroza, gelatin, mạch nha, gạo, bột mì, đá phấn, silicagel, natri stearat, glyxerol monostearat, bột talc, ion natri, bột sữa tách kem, glyxerol, propylen, glycol, nước, etanol và tá dược tương tự. Dược phẩm này, nếu mong muốn, cũng có thể chứa lượng nhỏ các chất làm ẩm hoặc nhũ hóa, hoặc các chất đệm độ pH. Các dược phẩm này có thể ở dạng dung dịch, huyền phù, nhũ tương, viên nén, thuốc viên, viên nang, thuốc bột, các dạng giải phóng duy trì và tương tự. Dược phẩm này có thể được bào chế dưới dạng thuốc đạn, với các chất liên kết và các chất mang truyền thống như triglyxerit. Dạng bào chế dùng qua đường miệng có thể bao gồm các chất mang chuẩn như các dạng dùng trong dược phẩm của manitol, lactoza, tinh bột, magie stearat, natri sacarin, xenluloza, magie cacbonat, v.v. Các ví dụ về các chất mang dược phẩm thích hợp được mô tả trong "Remington's Pharmaceutical Sciences" của E.W. Martin. Các dược phẩm này sẽ chứa lượng có tác dụng chữa bệnh của các hợp chất nêu trên, tốt hơn là ở dạng đã được tinh chế, cùng với một lượng chất mang thích hợp để tạo ra dạng sử dụng phù hợp cho đối tượng. Dạng bào chế cần phù hợp với phương thức dùng thuốc.

Theo phương án ưu tiên khác, dược phẩm được tạo bào chế theo quy trình thông thường như dược phẩm được làm cho phù hợp để dùng trong tĩnh mạch cho người. Thông thường, các dược phẩm để dùng trong tĩnh mạch là các dung dịch trong dung dịch đệm có nước đẳng trương vô trùng. Khi cần thiết, dược phẩm này còn có thể chứa chất hòa tan và chất gây mê cục bộ như lidocain để làm dịu cơn đau ở vị trí tiêm. Thông thường, các thành phần được cung cấp riêng lẻ hoặc được trộn với nhau dưới dạng liều đơn vị, ví dụ, bột được làm khô lạnh hoặc sản phẩm cô đặc không chứa nước trong bình chứa kín như ống thuốc tiêm hoặc túi hàn kín có chỉ rõ lượng hoạt chất. Khi dược phẩm này được dùng bằng cách truyền, nó có thể được pha chế trong chai truyền dịch chứa nước hoặc nước muối vô trùng loại dùng trong dược phẩm. Khi dược phẩm này được dùng bằng cách tiêm, ống thuốc tiêm chứa nước vô trùng dùng để tiêm hoặc nước muối có thể được cung cấp, do đó các thành phần có thể được trộn lẫn vào nhau trước khi sử dụng.

Dược phẩm theo sáng chế có thể được tạo bào chế thành các dạng trung tính hoặc muối. Các muối được dụng bao gồm các muối được tạo ra từ các anion, như các muối có nguồn gốc từ axit clohydric, axit phosphoric, axit axetic, axit oxalic, axit tartaric, v.v., và các muối được tạo ra từ các cation, như các muối có nguồn gốc từ các

hydroxit của natri, kali, amoni, canxi, sắt, isopropylamin, trietylamin, 2-ethylamino etanol, histidin, procain, v.v..

Tùy ý, các thử nghiệm *in vitro* có thể được sử dụng để giúp xác định khoảng liều dùng tối ưu. Liều dùng chính xác được sử dụng trong được phẩm còn phụ thuộc vào đường dùng thuốc, và mức độ nghiêm trọng của bệnh hoặc rối loạn, và nên được quyết định theo sự đánh giá của thầy thuốc và tình trạng của mỗi đối tượng. Các liều hiệu dụng có thể được ngoại suy từ các đường cong đáp ứng với liều lượng thu được từ các hệ thử nghiệm trên mô hình động vật hoặc *in vitro*. Tốt hơn là, được phẩm này được cho dùng trực tiếp hoặc kết hợp với tá dược.

Dược phẩm có thể được thiết kế để áp dụng trong liệu pháp gen. Kỹ thuật liệu pháp gen đã được mô tả trên đây cùng với các tế bào chủ theo sáng chế và tất cả những gì đã được nêu ở đó cũng được áp dụng cho được phẩm. Ví dụ, phân tử axit nucleic hoặc protein bao gồm protein thu được hoặc có thể thu được bằng cách biểu hiện axit nucleic nêu trong SEQ ID NO: 1 hoặc vector chứa axit nucleic mã hóa protein có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1 hoặc protein được mã hóa bởi trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO: 6 trong được phẩm, tốt hơn là dưới dạng mà cho phép việc đưa vào, biểu hiện và/hoặc tích hợp ổn định chúng vào các tế bào của đối tượng cá thể cần được điều trị.

Đối với liệu pháp gen, nhiều vector virus khác nhau có thể được dùng, ví dụ, adenovirus, virus herpes, virus đậu mùa, hoặc tốt hơn là, virus ARN như retrovirus. Ví dụ về các vector retrovirus mà trong đó một gen ngoại lai có thể được chèn bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở: virus gây bệnh bạch cầu ở chuột Moloney (MoMuLV), virus gây sarcoma ở chuột Harvey (HaMuSV), virus gây u vú ở chuột (MuMTV), và virus gây sarcoma Rous (RSV). Nhiều vector retrovirus bổ sung cũng có thể kết hợp nhiều gen. Tất cả các vector này có thể chuyển hoặc kết hợp gen cho dấu chuẩn có thể chọn lọc được, do đó các tế bào được tải nạp có thể được nhận diện và tạo ra. Các vector retrovirus có thể làm được tạo đặc hiệu đích bằng cách chèn, ví dụ, polynucleotit mã hóa đường, glycolipit, hoặc protein. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ biết, hoặc có thể đã biết rõ mà không cần các thử nghiệm đặc biệt, các trình tự polynucleotit cụ thể mà có thể được chèn vào hệ gen retrovirus để cho phép tạo ra đặc hiệu đích của vector retrovirus chứa trình tự polynucleotit được chèn.

Do các retrovirus tái tổ hợp tốt hơn là có khiếm khuyết, chúng cần hỗ trợ để tạo ra các hạt vector gây nhiễm. Sự hỗ trợ này có thể được cung cấp, ví dụ, bằng cách sử dụng các dòng tế bào hỗ trợ mà chứa các plasmid mã hóa tất cả các gen cấu trúc của retrovirus dưới sự kiểm soát của các trình tự điều hòa trong LTR. Các plasmid này thiếu trình tự nucleotit mà cho phép cơ chế đóng gói nhận ra bản phiên mã ARN cho việc đóng gói. Các dòng tế bào hỗ trợ mà có sự mất tín hiệu đóng gói bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, ví dụ, w2, PA317 và PA12. Các dòng tế bào này tạo ra các hạt virus rỗng, do không có hệ gen nào được đóng gói. Nếu vector retrovirus được đưa vào các tế bào này, trong đó tín hiệu đóng gói là nguyên vẹn, nhưng các gen cấu trúc được thay thế bằng các gen đích khác, vector có thể được đóng gói và vector hạt virus được tạo ra. Theo cách khác, NIH 3T3 hoặc các tế bào nuôi cấy mô khác có thể được chuyển nhiễm trực tiếp với các plasmid mã hóa các gen cấu trúc của retrovirus gag, pol và env, bằng cách chuyển nhiễm canxi phosphat thông thường. Các tế bào này sau đó được chuyển nhiễm với vector plasmid chứa các gen đích. Các tế bào thu được giải phóng vector retrovirus vào môi trường nuôi cấy. Hệ phân phối hướng đích khác cho các phân tử axit nucleic theo sáng chế là hệ phân tán keo. Các hệ phân tán keo bao gồm các phức hợp đại phân tử, nang nano, vi cầu, hạt, và các hệ dựa trên lipid bao gồm nhũ tương dạng dầu trong nước, vi hạt, vi hạt trộn, và các liposom. Hệ keo được ưu tiên theo sáng chế là liposom. Liposom là các túi màng nhân tạo có tác dụng như các phương tiện vận chuyển in vitro và in vivo. Thấy rằng các túi một lớp kích thước lớn (large unilamellar vesicles - LUV), mà kích thước nằm trong khoảng từ 0,2 đến 4,0µm có thể đóng gói hầu hết dung dịch đậm đặc nước chứa các phân tử kích thước lớn. ARN, ADN và các hạt virus nguyên vẹn có thể được đóng gói trong phân bên trong dạng nước và được vận chuyển đến các tế bào dưới dạng hoạt có động tính học (Fraley, et al., *Trends Biochem. Sci.*, 6:77, 1981). Ngoài tế bào của các loài động vật có vú, liposom được sử dụng để vận chuyển các polynucleotit ở tế bào thực vật, nấm men và vi khuẩn. Để liposom là phương tiện chuyển gen hiệu quả, cần phải có các đặc tính sau: (1) việc đóng gói các gen đích với hiệu quả cao trong khi không gây ảnh hưởng đến hoạt tính sinh học của chúng; (2) liên kết ưu tiên và bền chặt với tế bào đích hơn là các tế bào không phải là tế bào đích; (3) vận chuyển hàm lượng nước của túi đến tế bào chất của tế bào đích với hiệu quả cao; và (4) biểu hiện thông tin di truyền một cách chính xác và hiệu quả (Mannino, et al., *Biotechniques*, 6:682, 1988). Dược phẩm chứa liposom thường là sự kết hợp của phospholipit, đặc biệt là phospholipit có nhiệt độ chuyển pha cao, thường

kết hợp với steroid, đặc biệt là cholesterol. Phospholipit hoặc các lipid khác cũng có thể được sử dụng. Các đặc tính vật lý của liposom phụ thuộc vào độ pH, cường độ ion, và sự có mặt của các cation hóa trị hai. Ví dụ về lipid hữu dụng trong việc sản xuất liposom bao gồm các hợp chất phosphatidyl, như phosphatidylglycerol, phosphatidylcolin, phosphatidylserin, phosphatidyletanolamin, sphingolipit, cerebrosit, và gangliosit. Đặc biệt hữu dụng là diacylphosphatidylglycerol, trong đó gốc lipid chứa từ 14 đến 18 nguyên tử cacbon, đặc biệt là từ 16 đến 18 nguyên tử cacbon, và là no. Phospholipit ví dụ bao gồm phosphatidylcolin, dipalmitoylphosphatidylcolin và distearoylphosphatidylcolin trong trứng. Đích của liposom có thể được phân loại dựa trên các yếu tố giải phẫu và cơ học. Phân loại giải phẫu dựa trên cấp độ chọn lọc, ví dụ, cấp cơ quan, cấp tế bào, và cấp vi cơ quan. Đích cơ học có thể được phân biệt dựa vào việc nó là thụ động hay chủ động. Đích thụ động sử dụng xu hướng tự nhiên của các liposom để phân phối đến tế bào của hệ lưới nội mô (reticulo-endothelial system - RES) trong các cơ quan chứa các mao dẫn hình sin.

Trong ngữ cảnh của sáng chế, thuật ngữ "đối tượng" có nghĩa là một cá thể cần điều trị rối loạn dễ xúc động. Tốt hơn, đối tượng là động vật có xương sống, ưu tiên hơn là động vật có vú, đặc biệt ưu tiên là người. Theo một phương án, người là người bệnh hoặc cá thể.

Thuật ngữ "được sử dụng" chỉ việc sử dụng liều có hiệu quả để chẩn đoán hoặc điều trị của phân tử axit nucleic nêu trên mã hóa polypeptit theo sáng chế cho cá thể.

Khi được sử dụng ở đây, "lượng có hiệu quả chữa bệnh" đề cập đến lượng thành phần hoặc tác nhân có hoạt tính chữa bệnh mà đủ để điều trị hoặc cải thiện bệnh hoặc rối loạn, để trì hoãn sự khởi phát bệnh hoặc tạo ra lợi ích về mặt điều trị bất kỳ trong việc điều trị hoặc kiểm soát bệnh.

Như đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và được mô tả trên đây, có thể cần đến sự điều chỉnh về phân phối cục bộ so với toàn thân, độ tuổi, trọng lượng cơ thể, tình trạng chung về sức khỏe, giới tính, chế độ ăn, thời gian dùng thuốc, độ tương tác thuốc và mức độ nghiêm trọng của tình trạng, và có thể được xác định bằng cách thực hiện thử nghiệm thông thường bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các phương pháp này có thể được áp dụng để điều trị cho cả người và động vật. Các hợp chất được mô tả ở đây có hoạt tính chữa bệnh mong muốn có thể được dùng trong chất mang sinh lý dụng cho người bệnh, như được mô tả ở đây. Tùy thuộc vào

cách đưa vào, các hợp chất có thể được bào chế theo nhiều cách khác nhau như được thảo luận dưới đây. Nồng độ của hợp chất có hoạt tính chữa bệnh trong chế phẩm có thể thay đổi từ khoảng 0,1 đến 100% khối lượng. Các tác nhân có thể được sử dụng riêng hoặc kết hợp với các phương pháp điều trị khác.

Việc dùng dược phẩm có thể được thực hiện theo nhiều cách đã được thảo luận trên đây, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, qua đường miệng, dưới da, trong tĩnh mạch, trong động mạch, trong hạch, trong tủy xương, trong vỏ, trong dịch não thất, trong mũi, trong phế quản, qua chân bì, trong hạch, trong trực tràng, trong màng bụng, trong cơ, trong phổi, qua đường âm đạo, qua trực tràng, hoặc trong mắt. Trong một số trường hợp đặc biệt, ví dụ như, trong việc điều trị các vết thương và viêm, các tác nhân đề cử có thể được dùng trực tiếp như phun khô dung dịch.

Dược phẩm tốt hơn là được tiêm. Việc tiêm này được sử dụng bằng cách truyền trong tĩnh mạch, dưới da hoặc trong cơ. Dược phẩm còn có thể chứa các chất mang và/hoặc tá dược được dụng khác. Thuật ngữ "dược dụng" thường có nghĩa là dược điển được nhận biết là dùng cho động vật, và cụ thể hơn là cho con người.

Khi dược phẩm được dùng bằng cách truyền, nó có thể được pha chế trong chai truyền dịch chứa nước hoặc nước muối vô trùng loại dùng trong dược phẩm. Khi dược phẩm được dùng bằng cách tiêm, có thể cung cấp ống thuốc tiêm chứa nước vô trùng dùng để tiêm hoặc nước muối, do đó các thành phần có thể được trộn lẫn trước khi dùng. Ngoài ra, dược phẩm có thể được dùng kết hợp với một hoặc nhiều tác nhân điều trị hoặc kháng thể khác, như steroid hoặc globulin miễn dịch trong tĩnh mạch, cụ thể là các tiền dược chất corticosteroid, glucocorticoid, ví dụ prednison, IVIG, anti-D, vincalcalcin, ví dụ vincristin hoặc vinblastin, danazol, các tác nhân ức chế miễn dịch, ví dụ azathioprin, cyclophosphamid hoặc cyclosporin A, dapsone, các tác nhân trombopoietic, rituximab, mycophenolat mofetil, romiplostim, eltrombopag, mycophenolat mofetil. Khi được sử dụng ở đây, thuật ngữ "kết hợp" đề cập đến việc sử dụng nhiều hơn một tác nhân phòng bệnh và/hoặc chữa bệnh. Việc sử dụng thuật ngữ "kết hợp" không giới hạn thứ tự mà trong đó các tác nhân phòng bệnh và/hoặc chữa bệnh được dùng cho người bệnh.

Bác sĩ điều trị và các yếu tố lâm sàng sẽ quyết định chế độ dùng liều. Như đã biết trong các lĩnh vực y tế, liều dùng cho người bệnh bất kỳ phụ thuộc vào nhiều yếu tố, bao gồm thể trọng của người bệnh, diện tích bề mặt cơ thể, độ tuổi, hợp chất cụ thể

cần được dùng, giới tính, thời gian và đường dùng thuốc, tình trạng chung về sức khỏe, và các loại thuốc khác cần được dùng đồng thời. Một liều thông thường có thể, ví dụ, nằm trong khoảng từ 0,001 đến 1000 μ g; tuy nhiên, các liều thấp hơn hoặc cao hơn khoảng ví dụ này cũng được dự tính, đặc biệt là khi xem xét các yếu tố đã được đề cập trên đây.

Tốt hơn, liều dùng được đưa ra một lần mỗi tuần, tuy nhiên, trong quá trình điều trị liều dùng có thể được đưa ra với các khoảng thời gian lâu hơn nhiều và nếu cần thiết có thể được đưa ra với các khoảng thời gian ngắn hơn nhiều, ví dụ, hàng ngày. Trong trường hợp ưu tiên, đáp ứng miễn dịch được theo dõi bằng cách sử dụng các phương pháp được mô tả ở đây và các phương pháp khác mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực đã biết và liều dùng được tối ưu, ví dụ, về thời gian, lượng và/hoặc được phẩm. Liều dùng sẽ thay đổi nhưng liều dùng được ưu tiên để dùng trong tĩnh mạch của ADN là xấp xỉ từ 10^6 đến 10^{12} bản sao của phân tử ADN. Nếu chế độ điều trị là truyền liên tục, liều dùng cũng cần nằm trong khoảng từ 1 μ g đến 10 mg đơn vị trên kilogam khối lượng cơ thể trên phút, tương ứng. Quá trình có thể được theo dõi bằng cách đánh giá định kỳ. Dược phẩm theo sáng chế có thể được cho dùng cục bộ hoặc toàn thân. Tốt hơn, việc dùng thuốc là dùng ngoài đường tiêu hóa, ví dụ, trong tĩnh mạch. Các chế phẩm để dùng ngoài đường tiêu hóa bao gồm các dung dịch có nước hoặc không có nước, huyền phù, và nhũ tương vô trùng. Các ví dụ về dung môi không có nước là propylen glycol, polyetylen glycol, các loại dầu thực vật như dầu oliu, và este hữu cơ tiêm được như etyl oleat. Các chất mang có nước bao gồm nước, các dung dịch rượu/nước, nhũ tương hoặc huyền phù, bao gồm nước muối và các môi trường đệm. Các chất dẫn thuốc dùng ngoài đường tiêu hóa bao gồm dung dịch ion natri, dextroza Ringer, dextroza và ion natri, Ringer lactat hóa, hoặc các dầu không bay hơi. Các chất dẫn thuốc dùng trong tĩnh mạch bao gồm chất lỏng và các chất dinh dưỡng làm đầy, các chất điện giải làm đầy (như các chất dựa trên dextroza Ringer), và chất tương tự. Cũng có thể có chất bảo quản và các phụ gia khác như, ví dụ, chất kháng vi khuẩn, chất chống oxy hóa, chất tạo phức, và các khí trơ và tương tự.

Các dược phẩm cũng được dự tính là được sử dụng trong các phương pháp đồng trị liệu cùng với các tác nhân khác, ví dụ, hữu dụng trong việc dò ADN được metyl hóa và, do đó, ví dụ, hữu dụng trong việc chẩn đoán bệnh ác tính mà có thể thể hiện mô hình được metyl hóa điển hình.

Sáng chế đề xuất kit mà có thể được sử dụng cho các phương pháp được mô tả trên đây. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực cũng hiểu rõ rằng dược phẩm có thể ở dạng kit nhiều liều gồm có các lượng đủ của các liều dùng FcγR để điều trị hoặc ngăn ngừa các bệnh viêm và/hoặc các bệnh tự miễn ở người bệnh một cách hiệu quả. Theo một phương án, gói dược phẩm hoặc kit bao gồm một hoặc nhiều vật chứa được nạp dược phẩm theo sáng chế. Ngoài ra, một hoặc nhiều tác nhân phòng bệnh hoặc chữa bệnh bổ sung mà hữu dụng cho việc điều trị bệnh cũng có thể được bao gồm trong gói dược phẩm hoặc kit.

Ngoài ra, dược phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng để điều trị và ngăn ngừa các rối loạn hoặc các bệnh.

Khi được sử dụng ở đây, thuật ngữ “điều trị” và các thuật ngữ tương tự đề cập đến việc kiểm soát và chăm sóc người bệnh và/hoặc việc chống lại bệnh hoặc rối loạn. Khi được sử dụng ở đây, thuật ngữ “ngăn ngừa”, “việc ngăn ngừa”, và “sự ngăn ngừa” chỉ việc ngăn ngừa sự tái phát hoặc sự khởi phát của một hoặc nhiều triệu chứng của rối loạn ở đối tượng là kết quả của việc dùng tác nhân phòng bệnh hoặc chữa bệnh.

Khi được sử dụng ở đây, các thuật ngữ “rối loạn” và “bệnh” được sử dụng thay thế được cho nhau để chỉ tình trạng của một đối tượng. Cụ thể là, thuật ngữ “bệnh tự miễn” được sử dụng thay thế được cho nhau với thuật ngữ “rối loạn tự miễn” để chỉ tình trạng của đối tượng được đặc trưng bởi tổn thương tế bào, mô và/hoặc cơ quan gây ra bởi phản ứng tự miễn của đối tượng với các tế bào, mô và/hoặc cơ quan của chính nó. Thuật ngữ “bệnh viêm” được sử dụng thay thế được cho nhau với thuật ngữ “rối loạn viêm” để chỉ tình trạng của đối tượng được đặc trưng bởi sự viêm, tốt hơn là viêm mãn tính. Rối loạn tự miễn có thể đi kèm hoặc không đi kèm với viêm. Hơn nữa, viêm có thể được gây ra bởi hoặc không gây ra bởi rối loạn tự miễn. Do đó, các rối loạn cụ thể có thể được đặc trưng bởi cả các rối loạn tự miễn và viêm.

Theo một phương án ưu tiên, các bệnh viêm mà có thể được điều trị bằng các phương pháp hiện nay là giảm tiểu cầu miễn dịch nguyên phát (ITP), luput ban đỏ hệ thống (SLE), viêm khớp dạng thấp (RA), hoặc thiếu máu do huyết tán tự miễn (AIHA).

Sáng chế còn đề cập đến chế phẩm chất chứa protein có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 2 và/hoặc 3.

Thuật ngữ “chế phẩm chất” có nghĩa là tất cả các chế phẩm chứa hai hay nhiều chất và tất cả các chất là hợp chất, cho dù chúng là kết quả của các phản ứng hóa học, hoặc hỗn hợp cơ học, hoặc sản phẩm sinh học. Chế phẩm chất có thể được tạo nên từ hỗn hợp của hai hoặc nhiều thành phần. Hỗn hợp của các thành phần trong chế phẩm chất có thể được tạo ra bằng hoạt động cơ học hoặc hóa học hoặc bằng các quy trình sinh học.

Các chế phẩm chất có thể chứa 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 hay nhiều thành phần hoạt tính. Với "thành phần hoạt tính" có nghĩa là thành phần có hiệu quả chữa bệnh. Thành phần hoạt tính này có thể liên kết với các kháng thể IgG như được mô tả ở đây và có thể liên kết với tế bào lympho, ví dụ, tế bào T, tế bào B, tế bào giết tự nhiên. Thành phần hoạt tính này chỉ liên kết với các vùng hằng định. Tốt hơn là trong chế phẩm chất, protein theo sáng chế là thành phần hoạt tính duy nhất như được mô tả trên đây.

Theo một phương án, chế phẩm chất chứa protein có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 2 và 3. Theo phương án khác, chế phẩm chất chứa protein có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 2 hoặc 3. Theo phương án khác, chế phẩm chất chứa protein có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 2. Theo phương án khác nữa chế phẩm chất chứa protein có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 3.

Theo một phương án, chế phẩm chất theo sáng chế còn chứa protein có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 4 và/hoặc 5. Theo phương án khác, chế phẩm chất theo sáng chế còn chứa protein có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 4 và 5. Theo phương án khác, chế phẩm chất theo sáng chế còn chứa protein có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 4 hoặc 5. Theo phương án khác, chế phẩm chất theo sáng chế còn chứa protein có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 4. Theo phương án khác, chế phẩm chất theo sáng chế còn chứa protein có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 5.

Theo phương án khác, chế phẩm chất theo sáng chế khác biệt ở chỗ lượng protein có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 2 lớn hơn lượng protein có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 3.

Theo phương án khác, chế phẩm chất theo sáng chế khác biệt ở chỗ lượng protein có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 3 lớn hơn lượng protein có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 2.

Theo phương án khác chế phẩm chất theo sáng chế khác biệt ở chỗ lượng protein có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 2 lớn hơn lượng protein có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 3 và lượng protein có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 2 và 3 lớn hơn lượng protein có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 4 và/hoặc 5.

Theo một phương án, chế phẩm chất bao gồm protein có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 9.

Chế phẩm chất theo một phương án ưu tiên là dược phẩm.

Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp sản xuất dược phẩm bao gồm nuôi cấy tế bào chủ theo sáng chế trong các điều kiện cho phép sự biểu hiện của protein được mã hóa, và thu hồi dược phẩm thu được.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ dưới đây minh họa cho sáng chế. Các ví dụ này không nên được hiểu là để giới hạn phạm vi bảo hộ của sáng chế. Các ví dụ này được đưa vào với mục đích minh họa và sáng chế chỉ bị giới hạn bởi yêu cầu bảo hộ.

Vật liệu và phương pháp

Tạo các biến thể FcR

75mL LB có bổ sung 50 μ g/mL kanamycin trong bình nón có vách ngăn, dung tích 250mL, được cấy 5 μ L dung dịch glyxerol gốc và lắc trong 15 giờ ở nhiệt độ 37°C, 170 vòng/phút (Multitron Standard, Infors HT). Tiếp theo, 1L LB trong bình nón có vách ngăn, dung tích 2L được cấy 10ml dịch nuôi cấy qua đêm và lắc ở nhiệt độ 37°C, 170 vòng/phút. Tại trị số OD₆₀₀ bằng 1,6, gây cảm ứng biểu hiện bằng cách bổ sung 1mM IPTG. Sau khi ủ thêm 3 giờ ở nhiệt độ 37°C, 170 vòng/phút, thu tế bào bằng cách ly tâm (10 phút ở 5'000•g, 4°C), rửa một lần bằng 200mL PBS giữ lạnh trong nước đá và bảo quản ở nhiệt độ -20°C.

Phá vỡ tế bào và tách chiết thể vùi

Làm tan 6-8g tế bào *E.coli* đóng băng ở nhiệt độ trong phòng và tạo huyền phù lại trong 30mL dung dịch đệm ly giải (50mM Tris/HCl, 25mM NaCl, 2mM EDTA, độ pH 8,0) được bổ sung 100 μ g/mL lysozym bằng cách sử dụng thiết bị đồng nhất mẫu teflon trong thủy tinh. Sau khi ủ 15 phút trên nước đá, tế bào được phá vỡ bằng cách tạo sóng âm (đặt công suất bằng 6, chu kỳ hoạt động 30%, 30 phút, bộ phát sóng âm 250

được gắn với microtip, Branson) và huyền phù được ly tâm (45 phút ở 13'000•g, 4°C). Lấy 1mL dịch nổi làm mẫu và loại bỏ chất lỏng còn dư. Viên kết tủa, tức là thể vùi thô, được tạo huyền phù lại trong 35mL dung dịch đệm ly giải có 0,5% (thể tích/thể tích) Polysorbat 20 bằng cách sử dụng thiết bị đồng nhất mẫu teflon trong thủy tinh và ly tâm (15 phút ở 13'000•g, 4°C). Sau một bước rửa bổ sung bằng chất làm sạch, tiến hành bước rửa cuối cùng bằng cách chỉ sử dụng dung dịch đệm ly giải. Các thể vùi đã được rửa được bảo quản ở nhiệt độ -20°C cho đến khi sử dụng.

Cuộn gấp lại và tinh chế các biến thể FcR

Hòa tan các thể vùi ướt ở nồng độ 200mg/mL trong 20mM Tris/HCl, 6M guanidin, 3mM EDTA, 5mM DTT, độ pH 8,0 trong 2,5 giờ ở 20°C trong điều kiện khuấy liên tục (400 vòng/phút) trong ống ly tâm kín. Sau khi ly tâm (20'000•g, 10 phút, 20°C), thu phần dịch nổi bằng cách gạn và hàm lượng FcR được xác định sau khi pha loãng ở tỉ lệ 1:60 bằng RP-HPLC trên Knauer Bioselect C4. Dựa trên các kết quả phân tích, pha loãng các thể vùi hòa tan với 20mM Tris/HCl, 6M guanidin, 3mM EDTA, 5mM DTT, pH 8,0 để tạo ra hàm lượng FcR là 21mg/mL và một phần dung dịch FcR đã được pha loãng được bổ sung nhỏ giọt vào 20 phần dung dịch đệm cuộn gấp lại (20mM Tris/HCl, 2M ure, 0,5M arginin, 2mM xysteamine, 2mM xystamine, độ pH 7,7 ở nhiệt độ 6°C) được khuấy (800 vòng/phút). Sau khi ủ trong thời gian 16 tiếng ở nhiệt độ 10°C trong hộp kín và không khuấy, dung dịch cuộn gấp lại được làm ấm tới nhiệt độ trong phòng. Dung dịch cuộn gấp lại được làm ấm này được điều chỉnh đến 1,1M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ bằng cách bổ sung từng giọt $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3,5M, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 20mM, độ pH 7,0 trong điều kiện khuấy liên tục (400 vòng/phút). Sau khi khuấy thêm 1 giờ ở tốc độ 200 vòng/phút, huyền phù này được ly tâm (20'000•g, 20 phút, 20°C), lọc phần dịch nổi (0,2µm Durapore®, Millipore) và dịch lọc được nạp ở tốc độ 4mL/phút, ≤ 4mg protein/mL nhựa lên cột Phenyl Sepharose HP 35mL (h=6,6cm, d=2,6cm, GE Healthcare), được cân bằng trong $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,2M, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 20mM, độ pH 7,0. Rửa cột bằng 100mL $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,2M, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 20mM, độ pH 7,0 và protein được liên kết được rửa giải bằng 350mL dung dịch $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ gradien tuyến tính từ 1,2M tới 0M trong $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 20mM, độ pH 7,0 với tốc độ 5mL/phút. Thu dịch rửa giải trong các phân đoạn 7,5mL, được đưa vào phân tích RP-HPLC trên Phenomenex Jupiter C4. Các phân đoạn có độ tinh khiết trên 85% đối với biến thể FcR sau tìm kiếm được gom lại, cô khoảng 2 lần và được tinh lọc qua L-histidin 20mM độ pH 6,5 bằng cách lọc dòng

tiếp tuyến (Vivaflow 50, 5 kDa MWCO, 0,01m², dòng ngang 200mL/phút, pIN = 200kPa (2bar); Sartorius) tới khi độ dẫn giảm xuống xấp xỉ 5mS/cm. Sau khi dung dịch trao đổi dung dịch đệm đã được nạp ở tốc độ 2mL/phút, ≤20mg protein/mL nhựa lên cột SP Sepharose HP 9mL (h=4,5 cm, d=1,6 cm, GE Healthcare), được cân bằng trong L-histidin 20mM, độ pH 6,5. Rửa cột bằng 30mL L-histidin 20mM, NaCl 30mM, độ pH 6,5 và protein được liên kết được rửa giải bằng 90mL dung dịch NaCl gradient tuyến tính từ 20mM đến 400mM trong L-histidin 20mM, độ pH 6,5 ở tốc độ 3mL/phút. Các phân đoạn chứa đỉnh chính được gom lại, điều chỉnh lên 15,4mS/cm bằng L-histidin 20mM độ pH 6,5, cô đến xấp xỉ 20mg/mL bằng phương pháp siêu lọc (4'000•g, 5 kDa MWCO, Vivaspın 20, Sartorius) và được pha loãng đến 15mg/mL bằng L-histidin 20mM, NaCl 150mM, pH 6,5. Lọc dung dịch FcR đã được pha loãng (màng PES 0,45µm, Puradisc™ 25mm, Whatman), chia phần phân ước, kết đông nhanh trong nitơ lỏng và bảo quản ở nhiệt độ -80°C.

Sàng lọc kết tủa

Điều chỉnh dung dịch FcR đến nồng độ 0,7mg/mL với sự có mặt của histidin 20mM, NaCl 150mM và amoni sunfat 0 - 2,8M bằng cách bổ sung một lượng ddH₂O phù hợp, dung dịch gốc histidin/NaCl 10X (histidin 200mM, NaCl 1,5M) và dung dịch gốc amoni sunfat (4M trong ddH₂O). Độ pH được đặt ở trị số 6, 7 hoặc 8 bằng cách sử dụng histidin/NaCl 10X và dung dịch gốc amoni sunfat ở độ pH phù hợp. Mỗi điều kiện được thiết lập thành hai lần. Các mẫu được ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ 25°C, ly tâm (20'000xg, 10 phút) và 30µL dịch nổi được chuyển lên đĩa 384 giếng (µclear, không liên kết, màu đen, Greiner Bio-one). Đo độ hấp thụ ở bước sóng 280nm (Spectrofluor plus, Tecan) và hàm lượng protein được tính theo định luật Lambert Beers, bằng cách sử dụng hệ số khối tắt 1,5625mL x mg-1 x cm-1 và chiều dài ống là 0,24cm. Độ hấp thụ của giếng mẫu được hiệu chỉnh theo độ hấp thụ của giếng chỉ chứa hoàn toàn dung dịch đệm.

Điện di gel natri dodecyl sulfat polyacrylamit (SDS page)

Để ngăn chặn việc trao đổi disunfit sau đó, thiol tự do được alkyl hóa với iodoacetamid bằng cách trộn 18µL IB đã hòa tan hoặc dung môi cuộn gấp lại với 2µL iodoacetamid 250mM mới được điều chế trong H₂O. Ủ hỗn hợp trong 45 phút ở nhiệt độ 30°C, 750 vòng/phút trong bóng tối và trực tiếp sử dụng để điều chế mẫu SDS-PAGE theo hướng dẫn của NuPAGE® Novex® (Invitrogen). Protein được tách trên gel

Bis-Tris 4-12% trong dung dịch đệm chạy điện MES (cả hai đều của hãng NuPAGE® Novex®, Invitrogen) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Gel được rửa 3 lần với ddH₂O và được nhuộm Simply Blue™ Safe Stain (Invitrogen) trong ít nhất 6 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Sử dụng 10µL mẫu chuẩn được nhuộm trước bằng SeeBlue® Plus2 (Invitrogen) làm dấu chuẩn về khối lượng phân tử.

LC-MS

Khối lượng phân tử của protein được biểu hiện nguyên vẹn được xác định bằng phương pháp đo khối phổ phối hợp với MPI Hóa Sinh (Martinsried). Phân tích các mẫu trên thiết bị phân tích khối lượng ESI-TOF (microTOF, Bruker), được trang bị cột Phenomenex Aeris™ Widepore C4 (100mm x 2,1mm, kích thước hạt 3,6µM, kích thước lỗ 300Å), được cân bằng trước đó trong axetonitril 30%, 0,05% TFA. Dung dịch FcR chứa các mẫu được bơm ở tốc độ 0,25mL/phút, 20°C và protein được liên kết được rửa giải trong 15 phút, bằng dung dịch axetonitril gradien tuyến tính từ 30% đến 80%, 0,05% TFA.

Quang phổ UV/VIS

Nếu cần thiết, dung dịch protein được pha loãng với dung dịch đệm tương ứng đến trị số OD₂₈₀ nằm trong khoảng 0,2 và 0,8. Chuyển 400µL dung dịch vào microcuvet UV (UV-cuvette micro, Brand). Ghi lại độ hấp thu ở bước sóng 280nm và 320nm (TidasE, J&M Analytik) và nồng độ protein trong mg/ml được tính toán theo phương trình sau:

$$C_{\text{protein}} = (OD_{280} - OD_{320}) \times 0,64 \text{mg/mL}$$

Dung dịch đệm tương ứng được sử dụng làm mẫu trắng. Thử nghiệm được thực hiện 3 lần và tính kết quả trung bình.

Ví dụ 1: Sàng lọc kết tủa

Việc sản xuất protein FcR bằng quá trình dựa vào sự cuộn gấp lại thường bao gồm bước tạo kết tủa bằng ammoni sulfat. Bằng cách bổ sung amoni sulfat kosmotropic, các sản phẩm phụ của quá trình cuộn gấp như các loại không cuộn gấp và cuộn gấp sai, và còn các tạp chất có nguồn gốc từ tế bào chủ như các thành phần của thành tế bào và các protein sẽ bị kết tủa. Với việc tăng nồng độ chất kết tủa, hiệu quả tạo kết tủa sẽ tăng và nhờ đó thu được chế phẩm FcR có độ tinh khiết cao, miễn là biến thể FcR chịu được sự tạo kết tủa ở nồng độ amoni sunfat cao như vậy. Do đó, có thể

mong muốn có biến thể FcR có thể hòa tan tốt ở các nồng độ amoni sunfat bằng hoặc vượt quá 1,5M. Bên cạnh đó, kết tủa thấy ngay của các tạp chất ở nồng độ amoni sunfat cao sẽ tạo điều kiện thuận lợi để liên kết hiệu quả với nhựa HIC. Do khả năng liên kết động lực cao luôn luôn là mục tiêu phát triển quan trọng cho bước bắt giữ bằng sắc ký, độ hòa tan với sự có mặt của nồng độ amoni sunfat cao là điều bắt buộc.

Để đánh giá khả năng hòa tan của các biến thể FcR với sự có mặt của amoni sunfat, mỗi biến thể được ủ với nồng độ amoni sunfat tăng dần ở độ pH từ 6 đến 8. Sau 1 giờ ủ ở nhiệt độ 25°C, nồng độ FcR trong dịch nổi được xác định bằng phép đo quang phổ UV/vis. Như được thể hiện trên Fig.2, biến thể 3 kháng lại sự kết tủa bằng amoni sunfat nhất với độ kết tủa bán cực đại, ở 2,05M đến 2,13M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Ngược lại, "biến thể 2" (SEQ ID NO: 8) và "biến thể 4" (SEQ ID NO: 9) ít hòa tan hơn ở nồng độ amoni sunfat cao, cho thấy kết tủa bán cực đại với nồng độ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ nằm trong khoảng 1,70M – 1,76M. Tuy nhiên, "biến thể 4" vẫn có thể tan được ở nồng độ amoni sunfat cao. Sự phụ thuộc vào độ pH của độ hòa tan đối với tất cả biến thể FcR là không đáng kể.

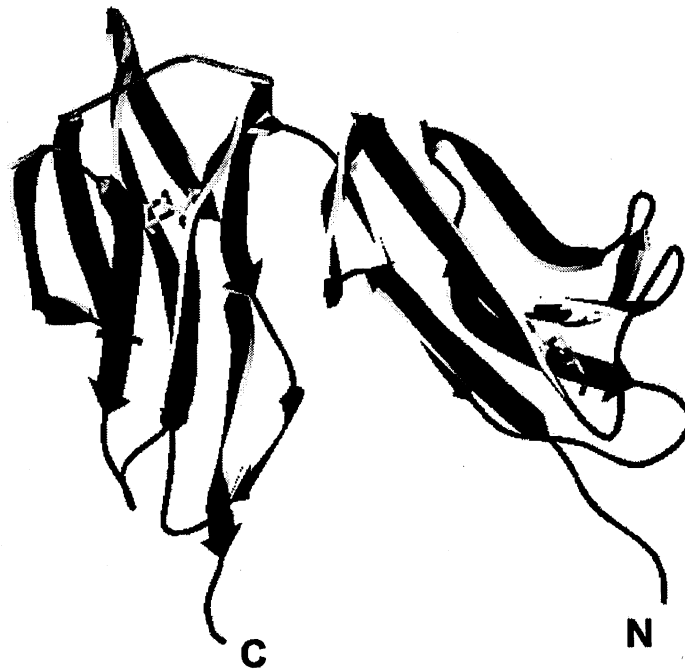
Lưu ý rằng không thể thực hiện sàng lọc kết tủa và do đó việc xác định độ hòa tan của "biến thể 1" trong nồng độ amoni sunfat cao, bởi vì "biến thể 1" không tái cuộn gấp đủ và do đó không thu được protein hòa tan để sàng lọc kết tủa.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Trình tự axit nucleic mã hóa protein có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1.
2. Vector chứa trình tự axit nucleic theo điểm 1.
3. Protein thu được bằng cách biểu hiện trình tự axit nucleic theo điểm 1 hoặc vector theo điểm 2 trong tế bào chủ.
4. Protein theo điểm 3, trong đó tế bào chủ là tế bào chủ nhân sơ.
5. Protein theo điểm 3 hoặc 4, trong đó tế bào chủ là *E. coli*.
6. Protein được mã hóa bởi trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO: 6.
7. Dược phẩm chứa protein theo điểm 3 hoặc 4.
8. Chế phẩm chất chứa protein có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 2 và/hoặc 3.
9. Chế phẩm chất theo điểm 8, trong đó chế phẩm này còn chứa protein có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 4 và/hoặc 5.
10. Chế phẩm chất theo điểm 8 hoặc 9, trong đó lượng protein có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 2 lớn hơn lượng protein có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 3.
11. Chế phẩm chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm 8 đến 10, trong đó lượng protein có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 2 và 3 lớn hơn lượng protein có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 4 và/hoặc 5.
12. Tế bào chủ chứa trình tự axit nucleic theo điểm 1 hoặc vector theo điểm 2.
13. Tế bào chủ theo điểm 12, trong đó tế bào chủ này là tế bào chủ nhân sơ hoặc nhân thực.
14. Tế bào chủ theo điểm 13, trong đó tế bào chủ nhân sơ là *E. coli*, tốt hơn là *E. coli* BL21.
15. Phương pháp sản xuất dược phẩm bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ theo điểm bất kỳ trong số các điểm 12 đến 14 trong các điều kiện cho phép sự biểu hiện của protein được mã hóa, và thu hồi dược phẩm thu được.

Fig. 1

a)



b)

```

Seq.7: "var.1"  -----MAVLKLEPQWINVLQEDSVTLTCRGTHSPESDSIQWFHNGNLIPTHTQPSYR
Seq.8: "var.2"  MGTPAAPPKAVLKLEPQWINVLQEDSVTLTCRGTHSPESDSIQWFHNGNLIPTHTQPSYR
Seq.1: "var.3"  ----MAPPKAVLKLEPQWINVLQEDSVTLTCRGTHSPESDSIQWFHNGNLIPTHTQPSYR
Seq.9: "var.4"  -MTPAAPPKAVLKLEPQWINVLQEDSVTLTCRGTHSPESDSIQWFHNGNLIPTHTQPSYR
                *****

Seq.7: "var.1"  FKANNDSGEYTCQTGQTSLSDPVHLTVLSEWLVLPHPLEFQEGETIVLRCHSWKDKPL
Seq.8: "var.2"  FKANNDSGEYTCQTGQTSLSDPVHLTVLSEWLVLPHPLEFQEGETIVLRCHSWKDKPL
Seq.1: "var.3"  FKANNDSGEYTCQTGQTSLSDPVHLTVLSEWLVLPHPLEFQEGETIVLRCHSWKDKPL
Seq.9: "var.4"  FKANNDSGEYTCQTGQTSLSDPVHLTVLSEWLVLPHPLEFQEGETIVLRCHSWKDKPL
                *****

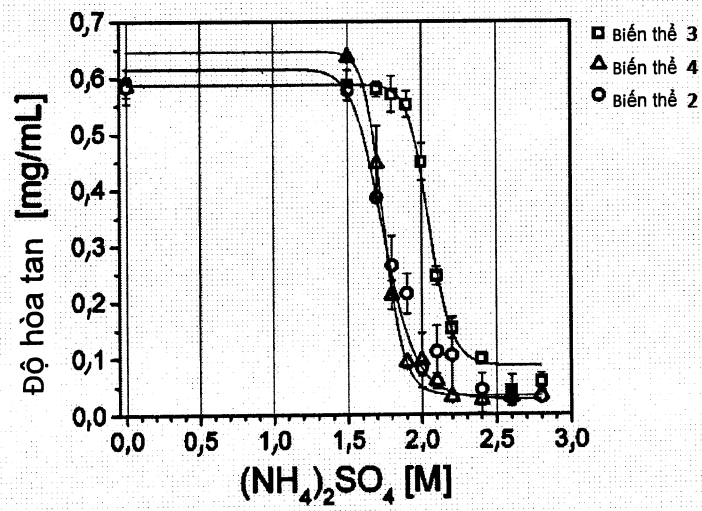
Seq.7: "var.1"  VKVTFQNGKSKKFSRSDPNFSIPQANHSHSGDYHCTGNIGYTLYSSKPVITV-----
Seq.8: "var.2"  VKVTFQNGKSKKFSRSDPNFSIPQANHSHSGDYHCTGNIGYTLYSSKPVITVQAPSSS
Seq.1: "var.3"  VKVTFQNGKSKKFSRSDPNFSIPQANHSHSGDYHCTGNIGYTLYSSKPVITVQAPSSS
Seq.9: "var.4"  VKVTFQNGKSKKFSRSDPNFSIPQANHSHSGDYHCTGNIGYTLYSSKPVITVQAPSSS
                *****

Seq.7: "var.1"  -----
Seq.8: "var.2"  PMGII
Seq.1: "var.3"  P----
Seq.9: "var.4"  PMGI-

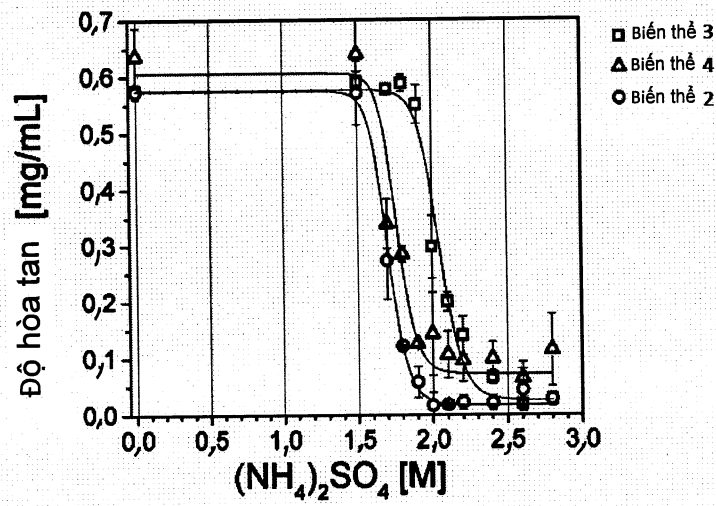
```


Fig. 2

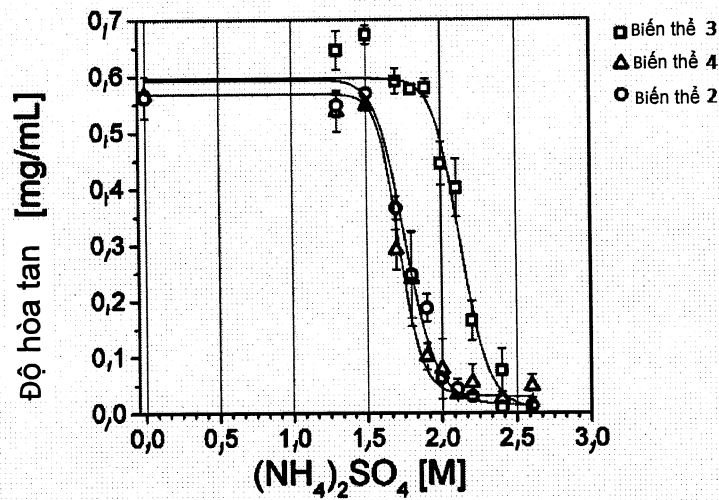
pH 6



pH 7



pH 8



DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Supremol GmbH

<120> **Trình tự axit nucleic mã hóa protein IIB của thụ thể Fc gamma, protein, vectơ, tế bào vật chủ chứa chúng, dược phẩm chứa protein và phương pháp sản xuất dược phẩm này**

<130> SUP14715PCT

<150> US13/663,527

<151> 30/10/2012

<160> 9

<170> Phiên bản PatentIn 3.5

<210> 1

<211> 177

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> Biến thể IIB của thụ thể Fc gamma

<400> 1

Met Ala Pro Pro Lys Ala Val Leu Lys Leu Glu Pro Gln Trp Ile Asn
 1 5 10 15

Val Leu Gln Glu Asp Ser Val Thr Leu Thr Cys Arg Gly Thr His Ser
 20 25 30

Pro Glu Ser Asp Ser Ile Gln Trp Phe His Asn Gly Asn Leu Ile Pro
 35 40 45

Thr His Thr Gln Pro Ser Tyr Arg Phe Lys Ala Asn Asn Asn Asp Ser
 50 55 60

Gly Glu Tyr Thr Cys Gln Thr Gly Gln Thr Ser Leu Ser Asp Pro Val
 65 70 75 80

His Leu Thr Val Leu Ser Glu Trp Leu Val Leu Gln Thr Pro His Leu
 85 90 95

Glu Phe Gln Glu Gly Glu Thr Ile Val Leu Arg Cys His Ser Trp Lys
 100 105 110

Asp Lys Pro Leu Val Lys Val Thr Phe Phe Gln Asn Gly Lys Ser Lys
 115 120 125

Lys Phe Ser Arg Ser Asp Pro Asn Phe Ser Ile Pro Gln Ala Asn His
 130 135 140

Ser His Ser Gly Asp Tyr His Cys Thr Gly Asn Ile Gly Tyr Thr Leu
 145 150 155 160

Tyr Ser Ser Lys Pro Val Thr Ile Thr Val Gln Ala Pro Ser Ser Ser
 165 170 175

Pro

<210> 2

<211> 176

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> Biến thể IIB của thụ thể Fc gamma

<400> 2

Ala Pro Pro Lys Ala Val Leu Lys Leu Glu Pro Gln Trp Ile Asn Val
 1 5 10 15

Leu Gln Glu Asp Ser Val Thr Leu Thr Cys Arg Gly Thr His Ser Pro
 20 25 30

Glu Ser Asp Ser Ile Gln Trp Phe His Asn Gly Asn Leu Ile Pro Thr
 35 40 45
 His Thr Gln Pro Ser Tyr Arg Phe Lys Ala Asn Asn Asn Asp Ser Gly
 50 55 60
 Glu Tyr Thr Cys Gln Thr Gly Gln Thr Ser Leu Ser Asp Pro Val His
 65 70 75 80
 Leu Thr Val Leu Ser Glu Trp Leu Val Leu Gln Thr Pro His Leu Glu
 85 90 95
 Phe Gln Glu Gly Glu Thr Ile Val Leu Arg Cys His Ser Trp Lys Asp
 100 105 110
 Lys Pro Leu Val Lys Val Thr Phe Phe Gln Asn Gly Lys Ser Lys Lys
 115 120 125
 Phe Ser Arg Ser Asp Pro Asn Phe Ser Ile Pro Gln Ala Asn His Ser
 130 135 140
 His Ser Gly Asp Tyr His Cys Thr Gly Asn Ile Gly Tyr Thr Leu Tyr
 145 150 155 160
 Ser Ser Lys Pro Val Thr Ile Thr Val Gln Ala Pro Ser Ser Ser Pro
 165 170 175
 <210> 3
 <211> 175
 <212> PRT
 <213>nhân tạo
 <220>
 <223>Biến thể IIB của thụ thể Fc gamma
 <400> 3
 Pro Pro Lys Ala Val Leu Lys Leu Glu Pro Gln Trp Ile Asn Val Leu
 1 5 10 15
 Gln Glu Asp Ser Val Thr Leu Thr Cys Arg Gly Thr His Ser Pro Glu
 20 25 30
 Ser Asp Ser Ile Gln Trp Phe His Asn Gly Asn Leu Ile Pro Thr His
 35 40 45
 Thr Gln Pro Ser Tyr Arg Phe Lys Ala Asn Asn Asn Asp Ser Gly Glu
 50 55 60
 Tyr Thr Cys Gln Thr Gly Gln Thr Ser Leu Ser Asp Pro Val His Leu
 65 70 75 80
 Thr Val Leu Ser Glu Trp Leu Val Leu Gln Thr Pro His Leu Glu Phe
 85 90 95
 Gln Glu Gly Glu Thr Ile Val Leu Arg Cys His Ser Trp Lys Asp Lys
 100 105 110
 Pro Leu Val Lys Val Thr Phe Phe Gln Asn Gly Lys Ser Lys Lys Phe
 115 120 125
 Ser Arg Ser Asp Pro Asn Phe Ser Ile Pro Gln Ala Asn His Ser His
 130 135 140
 Ser Gly Asp Tyr His Cys Thr Gly Asn Ile Gly Tyr Thr Leu Tyr Ser
 145 150 155 160
 Ser Lys Pro Val Thr Ile Thr Val Gln Ala Pro Ser Ser Ser Pro
 165 170 175

<210> 4
 <211> 174
 <212> PRT
 <213>nhân tạo
 <220>
 <223>Biến thể IIB của thụ thể Fc gamma
 <400> 4
 Pro Lys Ala Val Leu Lys Leu Glu Pro Gln Trp Ile Asn Val Leu Gln
 1 5 10 15
 Glu Asp Ser Val Thr Leu Thr Cys Arg Gly Thr His Ser Pro Glu Ser
 20 25 30
 Asp Ser Ile Gln Trp Phe His Asn Gly Asn Leu Ile Pro Thr His Thr
 35 40 45
 Gln Pro Ser Tyr Arg Phe Lys Ala Asn Asn Asn Asp Ser Gly Glu Tyr
 50 55 60
 Thr Cys Gln Thr Gly Gln Thr Ser Leu Ser Asp Pro Val His Leu Thr
 65 70 75 80
 Val Leu Ser Glu Trp Leu Val Leu Gln Thr Pro His Leu Glu Phe Gln
 85 90 95
 Glu Gly Glu Thr Ile Val Leu Arg Cys His Ser Trp Lys Asp Lys Pro
 100 105 110
 Leu Val Lys Val Thr Phe Phe Gln Asn Gly Lys Ser Lys Lys Phe Ser
 115 120 125
 Arg Ser Asp Pro Asn Phe Ser Ile Pro Gln Ala Asn His Ser His Ser
 130 135 140
 Gly Asp Tyr His Cys Thr Gly Asn Ile Gly Tyr Thr Leu Tyr Ser Ser
 145 150 155 160
 Lys Pro Val Thr Ile Thr Val Gln Ala Pro Ser Ser Ser Pro
 165 170

<210> 5
 <211> 172
 <212> PRT
 <213>nhân tạo
 <220>
 <223>Biến thể IIB của thụ thể Fc gamma
 <400> 5
 Ala Val Leu Lys Leu Glu Pro Gln Trp Ile Asn Val Leu Gln Glu Asp
 1 5 10 15
 Ser Val Thr Leu Thr Cys Arg Gly Thr His Ser Pro Glu Ser Asp Ser
 20 25 30
 Ile Gln Trp Phe His Asn Gly Asn Leu Ile Pro Thr His Thr Gln Pro
 35 40 45
 Ser Tyr Arg Phe Lys Ala Asn Asn Asn Asp Ser Gly Glu Tyr Thr Cys
 50 55 60
 Gln Thr Gly Gln Thr Ser Leu Ser Asp Pro Val His Leu Thr Val Leu
 65 70 75 80
 Ser Glu Trp Leu Val Leu Gln Thr Pro His Leu Glu Phe Gln Glu Gly
 85 90 95
 Glu Thr Ile Val Leu Arg Cys His Ser Trp Lys Asp Lys Pro Leu Val
 100 105 110

Lys Val Thr Phe Phe Gln Asn Gly Lys Ser Lys Lys Phe Ser Arg Ser
115 120 125

Asp Pro Asn Phe Ser Ile Pro Gln Ala Asn His Ser His Ser Gly Asp
130 135 140

Tyr His Cys Thr Gly Asn Ile Gly Tyr Thr Leu Tyr Ser Ser Lys Pro
145 150 155 160

Val Thr Ile Thr Val Gln Ala Pro Ser Ser Ser Pro
165 170

<210> 6

<211> 534

<212>ADN

<213>nhân tạo

<220>

<223>Biến thể IIB của thụ thể Fc gamma

<400> 6

atggcaccgc	cgaagcagct	tctgaaactg	gaaccgcagct	ggattaacgt	tctgcaggaa	60
gatatcggtta	ccctgacctg	tcgtggcacc	catagcccgg	aaagcgatag	cattcagtg	120
tttcacaacg	gcaatctgat	tccgacccat	accagccga	gctatcggtt	taaagcgaac	180
aacaacgata	gcggcgaata	tacctgtcag	accggtcaga	ccagcctgag	cgatccggtt	240
catctgaccg	ttctgagcga	atggctggtt	ctgcagaccc	cgcactctgga	atttcaggaa	300
ggcgaaacca	ttgttctgcg	ttgccacagc	tggaaagata	aaccgctggt	taaagttacc	360
ttcttccaga	acggcaaaaag	caaaaaattc	agccgtagcg	atccgaattt	tagcattccg	420
caggcgaatc	atagccatag	cggcgattat	cattgtaccg	gcaacattgg	ctataccctg	480
tatagcagca	aaccggtgac	cattaccgtt	caggcgccga	gcagcagccc	gtaa	534

<210> 7

<211> 166

<212> PRT

<213>nhân tạo

<220>

<223>Biến thể IIB của thụ thể Fc gamma

<400> 7

Met Ala Val Leu Lys Leu Glu Pro Gln Trp Ile Asn Val Leu Gln Glu
1 5 10 15

Asp Ser Val Thr Leu Thr Cys Arg Gly Thr His Ser Pro Glu Ser Asp
20 25 30

Ser Ile Gln Trp Phe His Asn Gly Asn Leu Ile Pro Thr His Thr Gln
35 40 45

Pro Ser Tyr Arg Phe Lys Ala Asn Asn Asn Asp Ser Gly Glu Tyr Thr
50 55 60

Cys Gln Thr Gly Gln Thr Ser Leu Ser Asp Pro Val His Leu Thr Val
65 70 75 80

Leu Ser Glu Trp Leu Val Leu Gln Thr Pro His Leu Glu Phe Gln Glu
85 90 95

Gly Glu Thr Ile Val Leu Arg Cys His Ser Trp Lys Asp Lys Pro Leu
100 105 110

Val Lys Val Thr Phe Phe Gln Asn Gly Lys Ser Lys Lys Phe Ser Arg
115 120 125

Ser Asp Pro Asn Phe Ser Ile Pro Gln Ala Asn His Ser His Ser Gly
130 135 140

Asp Tyr His Cys Thr Gly Asn Ile Gly Tyr Thr Leu Tyr Ser Ser Lys
145 150 155 160

Pro Val Thr Ile Thr Val
165

<210> 8

<211> 185

<212> PRT

<213>nhân tạo

<220>

<223>Biến thể IIB của thụ thể Fc gamma

<400> 8

Met Gly Thr Pro Ala Ala Pro Pro Lys Ala Val Leu Lys Leu Glu Pro
1 5 10 15

Gln Trp Ile Asn Val Leu Gln Glu Asp Ser Val Thr Leu Thr Cys Arg
20 25 30

Gly Thr His Ser Pro Glu Ser Asp Ser Ile Gln Trp Phe His Asn Gly
35 40 45

Asn Leu Ile Pro Thr His Thr Gln Pro Ser Tyr Arg Phe Lys Ala Asn
50 55 60

Asn Asn Asp Ser Gly Glu Tyr Thr Cys Gln Thr Gly Gln Thr Ser Leu
65 70 75 80

Ser Asp Pro Val His Leu Thr Val Leu Ser Glu Trp Leu Val Leu Gln
85 90 95

Thr Pro His Leu Glu Phe Gln Glu Gly Glu Thr Ile Val Leu Arg Cys
100 105 110

His Ser Trp Lys Asp Lys Pro Leu Val Lys Val Thr Phe Phe Gln Asn
115 120 125

Gly Lys Ser Lys Lys Phe Ser Arg Ser Asp Pro Asn Phe Ser Ile Pro
130 135 140

Gln Ala Asn His Ser His Ser Gly Asp Tyr His Cys Thr Gly Asn Ile
145 150 155 160

Gly Tyr Thr Leu Tyr Ser Ser Lys Pro Val Thr Ile Thr Val Gln Ala
165 170 175

Pro Ser Ser Ser Pro Met Gly Ile Ile
180 185

<210> 9

<211> 183

<212> PRT

<213>nhân tạo

<220>

<223>Biến thể IIB của thụ thể Fc gamma

<400> 9

Met Thr Pro Ala Ala Pro Pro Lys Ala Val Leu Lys Leu Glu Pro Gln
1 5 10 15

Trp Ile Asn Val Leu Gln Glu Asp Ser Val Thr Leu Thr Cys Arg Gly
20 25 30

Thr His Ser Pro Glu Ser Asp Ser Ile Gln Trp Phe His Asn Gly Asn
35 40 45

Leu Ile Pro Thr His Thr Gln Pro Ser Tyr Arg Phe Lys Ala Asn Asn
50 55 60

Asn Asp Ser Gly Glu Tyr Thr Cys Gln Thr Gly Gln Thr Ser Leu Ser
65 70 75 80

Asp	Pro	Val	His	Leu	Thr	Val	Leu	Ser	Glu	Trp	Leu	Val	Leu	Gln	Thr			
				85					90					95				
Pro	His	Leu	Glu	Phe	Gln	Glu	Gly	Glu	Thr	Ile	Val	Leu	Arg	Cys	His			
			100					105					110					
Ser	Trp	Lys	Asp	Lys	Pro	Leu	Val	Lys	Val	Thr	Phe	Phe	Gln	Asn	Gly			
		115					120					125						
Lys	Ser	Lys	Lys	Phe	Ser	Arg	Ser	Asp	Pro	Asn	Phe	Ser	Ile	Pro	Gln			
	130					135					140							
Ala	Asn	His	Ser	His	Ser	Gly	Asp	Tyr	His	Cys	Thr	Gly	Asn	Ile	Gly			
145					150					155					160			
Tyr	Thr	Leu	Tyr	Ser	Ser	Lys	Pro	Val	Thr	Ile	Thr	Val	Gln	Ala	Pro			
				165					170					175				
Ser	Ser	Ser	Pro	Met	Gly	Ile												
			180															