



(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)



1-0031426

(51)⁷ C07K 14/55; C07K 19/00; C07K 16/46 (13) B

(21) 1-2016-02907

(22) 04/02/2015

(86) PCT/EP2015/052312 04/02/2015

(87) WO 2015/118016 13/08/2015

(30) 61/936,564 06/02/2014 US

(45) 25/03/2022 408

(43) 27/02/2017 347A

(73) F. Hoffmann-La Roche AG (CH)

Grenzacherstrasse 124, CH-4070 Basel, Switzerland

(72) KLEIN, Christian (DE); UMANA, Pablo (CR); MOESSNER, Ekkehard (DE);

HOSSE, Ralf (DE); PETERSON, Laurence Bernard (US); WICKER, Linda (US).

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

(54) PROTEIN DUNG HỢP INTERLEUKIN-2, PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT
PROTEIN DUNG HỢP VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA PROTEIN NÀY

(57) Sáng chế đề cập chung đến protein dung hợp của globulin miễn dịch và interleukin-2 (IL-2). Đặc biệt hơn là, sáng chế đề cập đến protein dung hợp của globulin miễn dịch và IL-2 đột biến có các tính chất cải tiến để sử dụng làm chất điều trị bệnh, ví dụ, điều trị các bệnh tự miễn và bệnh viêm qua trung gian miễn dịch. Ngoài ra, sáng chế đề cập đến polynucleotit mã hóa protein dung hợp này, và vectơ và tế bào chủ chứa polynucleotit này, Sáng chế còn đề cập đến phương pháp sản xuất protein dung hợp theo sáng chế.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập chung đến protein dung hợp của globulin miễn dịch và interleukin-2 (IL-2). Cụ thể hơn là, sáng chế đề cập đến protein dung hợp của globulin miễn dịch và IL-2 đột biến có nhiều đặc tính được cải thiện để sử dụng làm chất điều trị bệnh, ví dụ, để điều trị các bệnh tự miễn và bệnh viêm qua trung gian miễn dịch. Ngoài ra, sáng chế đề cập đến polynucleotit mã hóa protein dung hợp này, và các vectơ và tế bào chủ chứa polynucleotit này. Sáng chế còn đề cập đến phương pháp sản xuất protein dung hợp theo sáng chế.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Tế bào T điều hòa (Treg) là nhóm con đặc hiệu của lympho bào T, một yếu tố cần quyết định để duy trì sự tự dung nạp. Các tế bào $CD4^+CD25^{cao}$ có chức năng ức chế có thể được phân biệt với các tế bào T tác động thông qua việc biểu hiện nội bào yếu tố phiên mã FOXP3, cũng như các gen đánh dấu tế bào khác như $CD127^{thấp}$, $CTLA-4^+$, LAP , $CD39^+$, $PD-1^+$, $GARP$, v.v. FOXP3 cần cho quá trình biệt hóa và chức năng của Treg, và sự thiếu hụt và đột biến gen FOXP3, ở cả chuột nhất bị rung lông, lở loét và bệnh nhân mắc bệnh đa tuyến nội tiết mất điều hòa miễn dịch, bệnh đường ruột, hội chứng liên quan đến nhiễm sắc thể X (IPEX), dẫn đến việc phá vỡ sự tự dung nạp và sự phát triển của các bệnh tự miễn do thiếu hụt Treg hoặc thiếu chức năng.

Các đáp ứng tự miễn ở bệnh đái tháo đường typ 1, bệnh luput ban đỏ toàn thân (SLE), bệnh xơ cứng rải rác, và các bệnh khác liên quan đến sự thiếu hụt Treg hoặc chức năng của Treg. Số liệu thu được từ các mô hình động vật hỗ trợ giả thiết rằng các đáp ứng tự miễn được hỗ trợ bằng việc Treg mất kiểm soát đáp ứng miễn dịch phá hủy đối bản thân, phần lớn do các tác động của tế bào tác động T ghi nhớ $CD4^+$ tự phản ứng. Bệnh đái tháo đường typ 1 là bệnh tự miễn xuất hiện sau khi phần lớn các tế bào β sản sinh insulin trong tuyến tụy bị phá vỡ. Tỷ lệ mắc bệnh đái tháo đường typ 1 ~0,3% dân số ở Mỹ và tỷ lệ mắc bệnh này tiếp tục gia tăng ở Mỹ, châu Âu, và đặc biệt là khu

vực Bắc Âu (gần 1%) và được ước tính là gia tăng gấp đôi trong vòng hai mươi năm tới.

Xytokin IL-2 đóng vai trò chính trong phương pháp hoạt hóa và thực hiện chức năng của cả Treg cũng như tế bào T tác động (Teff). Việc sản xuất thiếu IL-2 hoặc thiếu tính đáp ứng thường làm mất chức năng của Treg và gia tăng khả năng tự miễn. Do Treg chủ yếu biểu hiện thụ thể IL-2 ái lực cao ở mức cao hơn so với Teff nên IL-2 ở liều thấp hơn sẽ nghiêng về việc hỗ trợ duy trì Treg so với các tế bào Teff.

Với tác động chủ yếu của IL-2 là hoạt hóa các Treg *in vitro* và *in vivo*, nên liệu pháp điều trị kéo dài sự sống thông qua IL-2 ở liều thấp có khả năng thành công cao đối với các bệnh tự miễn. Một thử nghiệm lâm sàng đối với bệnh đái tháo đường typ 1 được kiểm soát bằng giả dược, mù kép trên 200 bệnh nhân, với IL-2 (Proleukin®, IL-2 ở người tái tổ hợp) được bắt đầu vào cuối năm 2013. Các thử nghiệm lâm sàng gần đây thực hiện đối với Proleukin với liều lượng hằng ngày thấp đã cho tác dụng cải thiện một số dấu hiệu và triệu chứng của bệnh mảnh ghép kháng vật chủ mạn tính (graft-versus-host disease-GVHD) và bệnh viêm mạch do virus viêm gan C gây ra (Koreth et al., New Engl J Med 365, 2055-2066 (2011), Saadoun et al., New Engl J Med 365, 2067-2077 (2011)). Trong cả hai nghiên cứu, Proleukin® liều thấp đều gây cảm ứng cho tế bào Treg và làm tăng tỷ lệ Treg:Teff. Tuy nhiên, tính chất dược động học kém của Proleukin® dẫn đến khả năng duy trì mức IL-2 thấp ổn định ở người luôn dưới ngưỡng tối ưu. Các phương pháp khác được thử nghiệm trong các thử nghiệm lâm sàng là quá trình mở rộng tế bào Treg theo từng cá thể *ex vivo* sau đó là truyền lại, nhưng phương pháp này ít lý tưởng hơn và tạo ra một tập hợp những vấn đề khó khăn trong việc kiểm soát chất lượng.

Do đó, một phương pháp điều trị bệnh mới có thể khôi phục tính thiết lập lại sự dung nạp miễn dịch trội qua trung gian tế bào T điều hòa tự nhiên (Treg) và giảm mạnh tác động kích thích tiềm ẩn bất kỳ đến các tế bào tác động T ghi nhớ CD4⁺ sẽ làm tăng đáng kể khả năng điều trị cho bệnh nhân mắc các bệnh tự miễn như bệnh đái tháo đường typ 1, bệnh xơ cứng rải rác, bệnh luput ban đỏ toàn thân, bệnh Crohn cũng như các bệnh tự miễn khác và các bệnh tiền viêm dựa trên miễn dịch như bệnh mảnh ghép

kháng vật chủ mạn tính, bệnh hen, bệnh xơ phổi, bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính, các bệnh tim mạch như chứng xơ vữa động mạch và hội chứng mạch vành cấp, và chứng thải loại mảnh ghép bao gồm cả cơ quan rắn lẫn tủy xương.

WO 2009/135615 mô tả việc sử dụng mutein IL-2 đã biết trước đó (IL-2 N88R, BAY50-4798, được mô tả trong WO 1999/60128) để điều trị hoặc phòng ngừa bệnh tự miễn. Tài liệu này nêu rằng mutein IL-2 có hoạt tính tăng trên tế bào Treg so với IL-2 kiểu đại, trong khi tác động của nó đối với tế bào T CD8⁺ và tế bào NK lại thấp. Không protein dung hợp nào của mutein IL-2 được mô tả.

WO 2010/85495 mô tả các biến thể IL-2 làm tăng chọn lọc hoạt tính của các tế bào Treg so với các tế bào T không điều hòa, để điều trị các rối loạn viêm. Các biến thể IL-2 được mô tả bao gồm tổ hợp của tám hoặc nhiều đột biến thay thế axit amin ảnh hưởng đến khả năng liên kết với các cấu trúc siêu phân tử khác nhau của thụ thể IL-2.

Protein dung hợp IL-2 theo sáng chế ưu tiên hoạt hóa tế bào Treg ở người và không phải ở người với ít tác động hoặc không có tác động đến các tế bào tác động T ghi nhớ CD4⁺ ở người, làm mất trạng thái cân bằng, có xu hướng nghiêng về việc tỷ lệ Treg:Teff cao hơn và làm giảm đáp ứng tự miễn. Các protein dung hợp này tồn tại lâu, cho phép một chế độ liều lượng thuận tiện và không có chức năng tác động, làm giảm tác dụng phụ có thể có, và làm giảm hiệu quả.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất protein dung hợp chứa (i) phân tử globulin miễn dịch, và (ii) hai phân tử interleukin-2 (IL-2) đột biến chứa đột biến axit amin mà làm giảm ái lực của phân tử IL-2 đột biến đối với thụ thể IL-2 ái lực trung bình, so với phân tử IL-2 kiểu đại.

Theo một phương án, phân tử globulin miễn dịch nêu trên là phân tử globulin miễn dịch lớp IgG, đặc biệt là phân tử globulin miễn dịch phân lớp IgG₁. Theo một phương án, phân tử globulin miễn dịch nêu trên là phân tử globulin miễn dịch ở người. Theo một phương án, phân tử globulin miễn dịch nêu trên có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên. Theo một phương án, phân tử globulin miễn dịch nêu trên là kháng

thể đơn dòng. Theo một phương án, phân tử globulin miễn dịch nêu trên không có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên. Theo một phương án, phân tử globulin miễn dịch nêu trên bao gồm trình tự vùng biến đổi của chuỗi nặng dựa trên trình tự dòng mầm Vh3-23 ở người. Theo phương án cụ thể, phân tử globulin miễn dịch nêu trên bao gồm trình tự vùng biến đổi của chuỗi nặng là SEQ ID NO: 9. Theo một phương án, phân tử globulin miễn dịch nêu trên bao gồm trình tự vùng biến đổi của chuỗi nhẹ dựa trên trình tự dòng mầm Vk3-20 ở người. Theo phương án cụ thể, phân tử globulin miễn dịch nêu trên bao gồm trình tự vùng biến đổi của chuỗi nhẹ là SEQ ID NO: 11. Theo một phương án cụ thể hơn nữa, phân tử globulin miễn dịch nêu trên bao gồm trình tự vùng biến đổi của chuỗi nặng là SEQ ID NO: 9 và trình tự vùng biến đổi của chuỗi nhẹ là SEQ ID NO: 11. Theo một phương án, phân tử globulin miễn dịch nêu trên không có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên, và bao gồm trình tự vùng biến đổi của chuỗi nặng dựa trên trình tự dòng mầm Vh3-23 ở người và trình tự vùng biến đổi của chuỗi nhẹ dựa trên trình tự dòng mầm Vk3-20 ở người.

Theo một phương án, phân tử globulin miễn dịch nêu trên bao gồm cải biến làm giảm ái lực gắn kết của phân tử globulin miễn dịch với thụ thể Fc so với phân tử globulin miễn dịch tương ứng không có cải biến này. Theo một phương án, thụ thể Fc nêu trên là thụ thể Fc γ , đặc biệt là thụ thể Fc γ người. Theo một phương án, thụ thể Fc nêu trên là thụ thể Fc hoạt hóa. Theo một phương án, thụ thể Fc nêu trên được chọn từ nhóm bao gồm Fc γ RIIIa (CD16a), Fc γ RI (CD64), Fc γ RIIa (CD32) và Fc α RI (CD89). Theo phương án cụ thể, thụ thể Fc nêu trên là Fc γ RIIIa, đặc biệt là Fc γ RIIIa người. Theo một phương án, cải biến nêu trên làm giảm chức năng tác động của phân tử globulin miễn dịch. Theo phương án cụ thể, chức năng tác động này là tính gây độc tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC). Theo một phương án, cải biến nêu trên nằm trong vùng Fc, đặc biệt nằm trong vùng CH2, của phân tử globulin miễn dịch nêu trên. Theo một phương án, phân tử globulin miễn dịch nêu trên bao gồm đột biến thay thế axit amin ở vị trí 329 (đánh số theo EU) của chuỗi nặng của globulin miễn dịch. Theo phương án cụ thể, đột biến thay thế axit amin nêu trên là P329G. Theo một phương án, phân tử globulin miễn dịch nêu trên chứa các đột biến thay thế axit amin ở vị trí 234 và 235 (đánh số theo EU) của chuỗi nặng của globulin miễn dịch.

Theo phương án cụ thể, các đột biến thay thế axit amin nêu trên là L234A và L235A (LALA). Theo một phương án, phân tử globulin miễn dịch nêu trên chứa các đột biến thay thế axit amin ở vị trí 234, 235 và 329 (đánh số theo EU) của chuỗi nặng của globulin miễn dịch. Theo một phương án cụ thể, phân tử globulin miễn dịch nêu trên chứa các đột biến thay thế axit amin L234A, L235A và P329G (đánh số theo EU) trong chuỗi nặng của globulin miễn dịch.

Theo một phương án, phân tử IL-2 đột biến nêu trên chứa đột biến axit amin ở vị trí tương ứng với gốc 88 của IL-2 ở người (SEQ ID NO: 1). Theo một phương án, đột biến axit amin nêu trên là đột biến thay thế axit amin. Theo một phương án cụ thể, đột biến thay thế axit amin nêu trên là N88D. Theo một phương án, phân tử IL-2 nêu trên còn chứa đột biến axit amin không làm thay đổi ái lực gắn kết của phân tử IL-2 nêu trên với thụ thể IL-2 so với IL-2 chưa quen thí nghiệm có trong tự nhiên. Theo một phương án, phân tử IL-2 nêu trên chứa đột biến axit amin ở vị trí tương ứng với gốc 125 của IL-2 ở người. Theo một phương án cụ thể hơn, đột biến axit amin nêu trên là đột biến thay thế axit amin C125A. Theo một phương án, phân tử IL-2 đột biến nêu trên còn chứa đột biến axit amin loại bỏ vị trí O-glycosyl hóa của IL-2 ở vị trí tương ứng với gốc 3 của IL-2 ở người. Theo một phương án, đột biến axit amin nêu trên loại bỏ vị trí O-glycosyl hóa của IL-2 ở vị trí tương ứng với gốc 3 của IL-2 ở người là đột biến thay thế axit amin được chọn từ nhóm bao gồm T3A, T3G, T3Q, T3E, T3N, T3D, T3R, T3K, và T3P. Theo phương án cụ thể, đột biến axit amin loại bỏ vị trí O-glycosyl hóa của IL-2 ở vị trí tương ứng với gốc 3 của IL-2 ở người là T3A. Theo một phương án, phân tử IL-2 đột biến nêu trên là phân tử IL-2 ở người. Theo phương án cụ thể, phân tử IL-2 đột biến nêu trên bao gồm trình tự được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 62 và SEQ ID NO: 64, đặc biệt là trình tự SEQ ID NO: 58. Theo một phương án, phân tử IL-2 đột biến nêu trên có trình tự được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 62 và SEQ ID NO: 64, đặc biệt là trình tự SEQ ID NO: 58. Theo một phương án, mỗi phân tử IL-2 đột biến nêu trên được dung hợp tại axit amin ở đầu tận cùng N của chúng với axit amin ở đầu tận cùng C của một trong các chuỗi nặng của globulin miễn dịch của phân tử globulin miễn dịch nêu trên, tùy ý thông qua tác nhân liên kết peptit. Theo một phương

án, mỗi phân tử IL-2 đột biến nêu trên được dung hợp với phân tử globulin miễn dịch nêu trên qua tác nhân liên kết peptit. Theo một phương án, tác nhân liên kết peptit nêu trên bao gồm ít nhất 10, đặc biệt là ít nhất 15 axit amin. Theo một phương án, tác nhân liên kết peptit nêu trên chứa trình tự axit amin (G4S)₃ (SEQ ID NO: 66).

Theo phương án cụ thể, protein dung hợp nêu trên chứa trình tự polypeptit là SEQ ID NO: 19 và SEQ ID NO: 50. Theo phương án cụ thể, protein dung hợp nêu trên chứa chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch SEQ ID NO: 19 và polypeptit dung hợp IL-2 của chuỗi nặng của globulin miễn dịch SEQ ID NO: 50. Theo một phương án, protein dung hợp nêu trên chủ yếu bao gồm phân tử globulin miễn dịch, hai phân tử interleukin-2 (IL-2) đột biến chứa đột biến axit amin mà làm giảm ái lực của phân tử IL-2 đột biến với thụ thể IL-2 ái lực trung bình, so với phân tử IL-2 kiểu dại, và tùy ý một hoặc nhiều tác nhân liên kết peptit. Theo một phương án, protein dung hợp nêu trên chủ yếu bao gồm hai chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch SEQ ID NO: 19 và hai polypeptit dung hợp IL-2 của chuỗi nặng của globulin miễn dịch SEQ ID NO: 50.

Theo một phương án, protein dung hợp nêu trên hoạt hóa chọn lọc các tế bào T điều hòa. Theo một phương án, protein dung hợp nêu trên hoạt hóa chọn lọc các tế bào T điều hòa so với tế bào T tác động, đặc biệt là so với tế bào T CD4⁺ thông thường và tế bào T CD8⁺. Theo một phương án, protein dung hợp nêu trên hoạt hóa chọn lọc các tế bào T điều hòa so với tế bào T ghi nhớ CD4⁺ thông thường. Theo một phương án, protein dung hợp nêu trên hoạt hóa các tế bào T điều hòa gấp ít nhất 10 lần, ít nhất 100 lần hoặc ít nhất 1000 lần so với các tế bào T ghi nhớ CD4⁺ thông thường. Theo một phương án, mức độ hoạt hóa này được xác định bằng cách đo mức độ phosphoryl hóa STAT nội bào, đặc biệt là STAT5. Theo một phương án, quá trình đo mức độ phosphoryl hóa STAT nội bào nêu trên được thực hiện bằng kỹ thuật phân tích đo dòng tế bào.

Sáng chế còn đề xuất polynucleotit mã hóa protein dung hợp theo sáng chế. Sáng chế còn đề xuất vector, đặc biệt là vector biểu hiện, chứa polynucleotit theo sáng chế. Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất tế bào chủ chứa polynucleotit hoặc vector theo sáng chế. Sáng chế còn đề xuất phương pháp sản xuất protein dung hợp theo

sáng chế, bao gồm các bước (i) nuôi cấy tế bào chủ theo sáng chế trong các điều kiện thích hợp để biểu hiện protein dung hợp, và (i) thu hồi protein dung hợp. Sáng chế cũng đề xuất protein dung hợp chứa (i) phân tử globulin miễn dịch và (ii) hai phân tử interleukin-2 (IL-2) chứa đột biến axit amin mà làm giảm ái lực của phân tử IL-2 đột biến đối với thụ thể IL-2 ái lực trung bình, so với phân tử IL-2 kiểu dại, được sản xuất bằng phương pháp nêu trên.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất dược phẩm chứa protein dung hợp theo sáng chế và chất mang dược dụng. Protein dung hợp hoặc dược phẩm theo sáng chế cũng được đề xuất để sử dụng làm thuốc, và để sử dụng để điều trị hoặc phòng ngừa bệnh tự miễn, đặc biệt là bệnh đái tháo đường typ 1, bệnh xơ cứng rải rác (MS), bệnh luput ban đỏ toàn thân (SLE), bệnh viêm ruột, bệnh Crohn hoặc bệnh viêm loét đại tràng, đặc biệt nhất là bệnh đái tháo đường typ 1, hoặc bệnh mảnh ghép chống lại vật chủ hoặc chứng thải loại mảnh ghép. Sáng chế cũng đề xuất việc sử dụng protein dung hợp theo sáng chế để sản xuất thuốc để điều trị bệnh ở cá thể cần điều trị, và phương pháp điều trị bệnh ở cá thể, bao gồm việc cho cá thể này dùng lượng cho tác dụng điều trị bệnh của dược phẩm chứa protein dung hợp theo sáng chế ở dạng dược dụng. Theo một phương án, bệnh nêu trên là bệnh tự miễn. Theo một phương án cụ thể hơn, bệnh tự miễn nêu trên là bệnh đái tháo đường typ 1, bệnh xơ cứng rải rác (MS), bệnh luput ban đỏ toàn thân (SLE), bệnh viêm ruột, bệnh Crohn hoặc bệnh viêm loét đại tràng. Theo một phương án cụ thể hơn nữa, bệnh tự miễn nêu trên là bệnh đái tháo đường typ 1. Theo một phương án khác, bệnh nêu trên là chứng thải loại mảnh ghép hoặc bệnh mảnh ghép chống lại vật chủ. Theo một phương án, cá thể nêu trên là động vật có vú, đặc biệt là người.

Sáng chế còn đề xuất protein dung hợp theo sáng chế để sử dụng để hoạt hóa chọn lọc các tế bào T điều hòa *in vitro* hoặc *in vivo*. Theo một phương án, phương pháp hoạt hóa này bao gồm việc cảm ứng sự tăng sinh của các tế bào T điều hòa và/hoặc cảm ứng sự truyền tín hiệu của thụ thể IL-2, đặc biệt là sự phosphoryl hóa của STAT5, trong các tế bào T điều hòa. Theo một phương án, việc sử dụng này là *in vitro* và protein dung hợp nêu trên được sử dụng ở nồng độ bằng khoảng 10ng/mL hoặc thấp hơn, đặc biệt là khoảng 1ng/mL hoặc thấp hơn. Theo một phương án khác, việc sử

dụng này là *in vivo* và protein dung hợp nêu trên được sử dụng ở liều bằng khoảng 100µg/kg trọng lượng cơ thể hoặc thấp hơn, đặc biệt là bằng khoảng 25µg/kg trọng lượng cơ thể hoặc thấp hơn, đặc biệt hơn là bằng khoảng 10µg/kg trọng lượng cơ thể hoặc thấp hơn.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp hoạt hóa chọn lọc các tế bào T điều hòa *in vitro* hoặc *in vivo*, bao gồm bước cho các tế bào T điều hòa này tiếp xúc với protein dung hợp theo sáng chế. Theo một phương án, phương pháp hoạt hóa này bao gồm việc cảm ứng sự tăng sinh các tế bào T điều hòa và/hoặc cảm ứng sự truyền tín hiệu của thụ thể IL-2, đặc biệt là sự phosphoryl hóa của STAT5, trong các tế bào T điều hòa. Theo một phương án, phương pháp nêu trên là *in vitro* và protein dung hợp nêu trên được sử dụng ở nồng độ bằng khoảng 10ng/mL hoặc thấp hơn, đặc biệt là bằng khoảng 1ng/mL hoặc thấp hơn. Theo một phương án khác, phương pháp nêu trên là *in vivo* và protein dung hợp nêu trên được sử dụng ở liều bằng khoảng 100µg/kg trọng lượng cơ thể hoặc thấp hơn, đặc biệt là bằng khoảng 25µg/kg trọng lượng cơ thể hoặc thấp hơn, đặc biệt hơn là khoảng 10µg/kg trọng lượng cơ thể hoặc thấp hơn.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1. Tinh chế protein dung hợp DP47GS IgG-IL-2 (xem SEQ ID NO 13, 15, 19). (A) Profin rửa giải ở bước chạy sắc ký ái lực protein A. (B) Profin rửa giải ở bước chạy sắc ký loại theo kích thước. Hiệu suất 4mg/L. (C) Điện di mao quản phân tích SDS (Caliper) thành phẩm. Dải sau được quan sát: không giảm – 7,5% diện tích ở 111 kDa, 92,5% diện tích ở 174 kDa; giảm - 23,6% diện tích ở 29 kDa, 23,5% diện tích ở 67 kDa, 52,9% diện tích ở 82 kDa. Sản phẩm chứa khoảng 7,5% “IgG bán phần”. (D) Sắc ký loại theo kích thước phân tích thành phẩm trên cột TSKgel G3000 SW XL (91% hàm lượng monome).

Fig. 2. Tinh chế protein dung hợp DP47GS IgG-(IL-2)₂ (xem SEQ ID NO 17, 19). (A) Profin rửa giải ở bước chạy sắc ký ái lực protein A. (B) Profin rửa giải ở bước chạy sắc ký loại theo kích thước. Hiệu suất 13mg/L. (C) Điện di mao quản phân tích SDS (Caliper) của thành phẩm. Dải sau được quan sát: không giảm – 2,3% diện tích ở 172,5 kDa, 97,7% diện tích ở 185 kDa; giảm- 18,3% diện tích ở 27,3 kDa, 0,6% diện

tích ở 29,2 kDa, 81,1% diện tích ở 78,3 kDa. (D) Sắc ký loại theo kích thước phân tích thành phẩm trên cột Superdex 200 (100% hàm lượng monome).

Fig. 3. Tinh chế protein dung hợp DP47GS IgG-IL-2 N88D (xem SEQ ID NO 15, 19, 48). (A) Profin rửa giải ở bước chạy sắc ký ái lực protein A. (B) Profin rửa giải ở bước chạy sắc ký loại theo kích thước. Hiệu suất 23,7mg/L. Các phân gom được được đóng khung. (C) Điện di mao quản phân tích SDS (Caliper) của thành phẩm. Các vạch chính sau được quan sát: không giảm – 100% diện tích ở 167,0 kDa; giảm - 31,5% diện tích ở 28,6 kDa, 31,7% diện tích ở 63,5 kDa, 35,3% diện tích ở 77,5 kDa. (D) Sắc ký loại theo kích thước phân tích thành phẩm trên cột TSKgel G3000 SW XL (97,3% hàm lượng monome).

Fig. 4. Tinh chế protein dung hợp DP47GS IgG-(IL-2 N88D)₂ (xem SEQ ID NO 19 và 50). (A) Profin rửa giải ở bước chạy sắc ký ái lực protein A. (B) Profin rửa giải ở bước chạy sắc ký loại theo kích thước. Hiệu suất 32,9mg/L. Các phân gom được được đóng khung. (C) Điện di mao quản phân tích SDS (Caliper) của thành phẩm. Các vạch chính sau được quan sát: không giảm – 20,7% diện tích ở 180,4 kDa, 78,0% diện tích ở 184,0 kDa; giảm- 16,2% diện tích ở 27,3 kDa, 82,7% diện tích ở 76,0 kDa. (D) Sắc ký loại theo kích thước phân tích thành phẩm trên cột TSKgel G3000 SW XL (98,3% hàm lượng monome).

Fig. 5. Tinh chế protein dung hợp DP47GS IgG-(IL-2 E95A)₂ (xem SEQ ID NO 19 và 52). (A) Profin rửa giải ở bước chạy sắc ký ái lực protein A. (B) Profin rửa giải ở bước chạy sắc ký loại theo kích thước. Hiệu suất 8,0mg/L. Các phân gom được được đóng khung. (C) Điện di mao quản phân tích SDS (Caliper) của thành phẩm. Các vạch chính sau được quan sát: không giảm - 10,3% diện tích ở 166,0 kDa, 61,4% diện tích ở 175,5 kDa, 28,2% diện tích ở 181,2 kDa; giảm - 16,0% diện tích ở 26,1 kDa, 83,1% diện tích ở 75,0 kDa. (D) Sắc ký loại theo kích thước phân tích thành phẩm trên cột TSKgel G3000 SW XL (100% hàm lượng monome).

Fig. 6. biểu hiện CD25 (IL-2RA) và CD122 (IL-2RB) trên tiểu quần thể tế bào Treg CD4⁺, tập hợp con tế bào NK và tế bào NKT. Các gen đánh dấu bề mặt tế bào được sử dụng để xác định tiểu quần thể tế bào Treg CD4⁺, tế bào NKT và tế bào NK.

Để tối ưu hóa việc nhuộm CD25 và CD122, việc nhuộm FOXP3 nội bào không được tiến hành. (A, B) Ba tập hợp tế bào T CD4⁺ điều hòa (Treg): chưa quen thí nghiệm (CD45RA⁺, CD25⁺; đường chấm chấm), ghi nhớ (CD45RA⁻, CD25⁺; đường nét liền) và hoạt hóa (CD45RA⁻, CD25^{cao}; đường nét đứt). (C, D) NKT (đường chấm chấm), tế bào NK CD56^{rõ} (đường nét đứt), tế bào NK của CD56^{trung bình} (đường nét liền). Xám: đối chứng isotyp (IC).

Fig. 7. Biểu hiện CD25 (IL-2RA) và CD122 (IL-2RB) trên tập hợp con tế bào T thông thường CD4⁺ và CD8⁺. Các gen đánh dấu bề mặt tế bào được sử dụng để xác định tế bào T CD4⁺ thông thường (A, B) chưa quen thí nghiệm (CD45RA⁺; đường chấm chấm) và ghi nhớ (CD45RA⁻; đường nét liền), tế bào T ghi nhớ thông thường CD8⁺ (CD45RA⁻; đường nét liền) và tế bào T CD45RA⁺ CD8 (tổ hợp của tập hợp con chưa quen thí nghiệm và TEMRA; TEMRA dùng để chỉ tế bào ghi nhớ hiệu lực đã khôi phục để biểu hiện CD45RA; đường chấm chấm) (C, D). Xám: đối chứng isotyp (IC).

Fig. 8. Gây cảm ứng pSTAT5a trong tập hợp con tế bào máu ngoại vi ở người đáp ứng với DP47GS IgG-IL-2. Ba đối tượng cho ở người khác nhau (C4 đến C6) được đánh giá ở các thời điểm riêng rẽ về ảnh hưởng của các liều lượng khác nhau của DP47GS IgG-IL-2 đến sự cảm ứng quá trình phosphoryl hóa STAT5a. Các kết quả được thể hiện đối với các tiểu quần thể tế bào Treg CD4⁺: Treg được hoạt hóa, ghi nhớ và chưa quen thí nghiệm; tế bào tác động T ghi nhớ CD4⁺ thông thường; tế bào NK CD56^{rõ}; tế bào tác động T ghi nhớ CD8⁺; tế bào tác động T chưa quen thí nghiệm CD4⁺; tế bào NK; tế bào NKT; và tế bào tác động T chưa quen thí nghiệm CD8⁺ tế bào ghi nhớ CD45RA⁺.

Fig. 9. Gây cảm ứng pSTAT5a ở tập hợp con tế bào máu ngoại vi ở người đáp ứng với DP47GS IgG-(IL-2)₂. Năm đối tượng cho ở người khác nhau (N1, N2, C4-C6) được đánh giá ở các thời điểm riêng rẽ về ảnh hưởng của các liều lượng khác nhau của thể liên hợp miễn dịch DP47GS IgG-(IL-2)₂ đến sự cảm ứng quá trình phosphoryl hóa STAT5a. Các kết quả được thể hiện đối với các tiểu quần thể tế bào Treg CD4⁺: Treg được hoạt hóa, ghi nhớ và chưa quen thí nghiệm; tế bào tác động T ghi nhớ CD4⁺

thông thường; tế bào NK CD56^{ro}; tế bào tác động T ghi nhớ CD8⁺; tế bào tác động T chưa quen thí nghiệm CD4⁺; tế bào NK; tế bào NKT; và tế bào tác động T chưa quen thí nghiệm CD8⁺ tế bào ghi nhớ CD45RA⁺.

Fig. 10. Gây cảm ứng pSTAT5a ở tập hợp con tế bào máu ngoại vi ở người: so sánh giữa DP47GS IgG-IL-2 và DP47GS IgG-(IL-2)₂. Kết quả đối với từng tập hợp con tế bào được chuẩn hóa thành ảnh hưởng quan sát được tối đa từ từng tập hợp con và EC50 thích hợp trong Treg được thể hiện trong Bảng 2. (A) Các kết quả được chuẩn hóa đối với DP47GS IgG-IL-2, (B) các kết quả được chuẩn hóa đối với DP47GS IgG-(IL-2)₂.

Fig. 11. Thử nghiệm chi tiết về độ nhạy của tiểu quần thể tế bào Treg ở ba đối tượng cho so sánh giữa DP47GS IgG-IL-2 và DP47GS IgG-(IL-2)₂. Các đồ thị thể hiện giá trị trung bình $\pm$ SD của pSTAT5a MFI đối với ba đối tượng cho. (A) Tổng số lượng tế bào Treg CD3⁺CD4⁺FOXP3⁺. (B) Treg được hoạt hóa. (C) Treg ghi nhớ. (D) Treg chưa quen thí nghiệm.

Fig. 12. Gây cảm ứng pSTAT5a ở tập hợp con tế bào máu ngoại vi ở người đáp ứng với DP47GS IgG-(IL-2E95A)₂. Ba đối tượng cho ở người khác nhau (C4 đến C6) được đánh giá ở các thời điểm riêng rẽ về ảnh hưởng của các liều lượng khác nhau của DP47GS IgG-(IL-2E95A)₂ đến sự cảm ứng quá trình phosphoryl hóa STAT5a. Các kết quả được thể hiện đối với tiểu quần thể tế bào Treg CD4⁺: Treg được hoạt hóa, ghi nhớ và chưa quen thí nghiệm; tế bào tác động T ghi nhớ CD4⁺ thông thường; tế bào NK CD56^{ro}; tế bào tác động T ghi nhớ CD8⁺; tế bào tác động T chưa quen thí nghiệm CD4⁺; tế bào NK; tế bào NKT; và tế bào tác động T chưa quen thí nghiệm CD8⁺CD45RA⁺.

Fig. 13. Gây cảm ứng pSTAT5a ở tập hợp con tế bào máu ngoại vi ở người đáp ứng với DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂. Năm đối tượng cho ở người khác nhau (C4, C5, C6, N1, N2) được đánh giá ở các thời điểm riêng rẽ về ảnh hưởng của các liều lượng khác nhau của DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ đến sự cảm ứng quá trình phosphoryl hóa STAT5a. Các kết quả được thể hiện đối với tiểu quần thể tế bào Treg CD4⁺: Treg được hoạt hóa, ghi nhớ và chưa quen thí nghiệm; tế bào tác động T ghi nhớ CD4⁺ thông

thường; tế bào NK CD56^{ro}; tế bào tác động T ghi nhớ CD8⁺; tế bào tác động T chưa quen thí nghiệm CD4⁺; tế bào NK; tế bào NKT; và tế bào tác động T chưa quen thí nghiệm CD8⁺ CD45RA⁺.

Fig. 14. Gây cảm ứng pSTAT5a ở tập hợp con tế bào máu ngoại vi ở người: so sánh giữa DP47GS IgG-IL-2, DP47GS IgG-(IL-2)₂, DP47GS IgG-(IL-2E95A)₂, DP47GS IgG-(IL-2 N88D)₂, và DP47GS IgG-IL-2N88D. Các kết quả được thể hiện đối với tiểu quần thể tế bào Treg CD4⁺ (A-C): Treg được hoạt hóa (A), ghi nhớ (C) và chưa quen thí nghiệm (B); tế bào tác động T ghi nhớ CD4⁺ thông thường (D); tế bào NK CD56^{ro} (E).

Fig. 15. Gây cảm ứng pSTAT5a ở tập hợp con tế bào máu ngoại vi ở người đáp ứng với cả DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ và DP47GS IgG-(IL-2)₂. Mười đối tượng cho ở người khác nhau được đánh giá vào các ngày riêng rẽ về tác dụng của khoảng rộng liều lượng (≥ 6 log) của DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ và DP47GS IgG-(IL-2)₂ đến sự cảm ứng quá trình phosphoryl hóa STAT5a. Các kết quả được thể hiện đối với các tập hợp con tế bào sau: (A) Treg ghi nhớ, (B) Treg chưa quen thí nghiệm, (C) tế bào NK CD56^{ro}, (D) toàn bộ tế bào NK, (E) tế bào T CD4⁺ ghi nhớ trung tâm, (F) tế bào T CD4⁺ ghi nhớ hiệu lực, (G) tế bào T CD4⁺ chưa quen thí nghiệm, (H) tế bào T CD8⁺ ghi nhớ trung tâm, (I) tế bào T CD8⁺ ghi nhớ hiệu lực, (J) tế bào T CD8⁺ chưa quen thí nghiệm, (K) tế bào T CD8⁺ Temra [Teff ghi nhớ RA⁺], (L) tế bào NKT và (M) tế bào T CD3⁺CD4⁻CD8⁻CD56⁻. Tất cả các kết quả được thể hiện là giá trị trung bình $\pm$ SEM (n=10 đối tượng cho).

Fig. 16. So sánh giữa ảnh hưởng *in vitro* của DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ và DP47GS IgG-(IL-2)₂ đến tế bào NK ở người và tế bào T CD8⁺. PBMC từ đối tượng cho ở người bình thường (n=10) được nuôi cấy với mật độ 5×10^6 tế bào/lỗ có đáy hình chữ U với 50ng/mL DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ (biểu tượng rỗng) hoặc DP47GS IgG-(IL-2)₂ (biểu tượng màu xám đậm) trong 6 ngày, tại thời điểm này số lượng tế bào được xác định bằng kỹ thuật đo dòng tế bào. Các ảnh hưởng đến tế bào NK được định lượng trên tế bào NK biểu hiện không rõ CD56 và CD56^{ro} (A). Các ảnh hưởng đến tế bào T CD8⁺ được thể hiện trong (B). Các kết quả được thể hiện là giá trị trung bình $\pm$

khoảng tứ phân vị, các sai khác thống kê được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm Mann-Whitney U .

Fig. 17. So sánh các ảnh hưởng *in vivo* của DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ và DP47GS IgG-(IL-2)₂ đến chuột nhắt được người hóa tế bào gốc CD34⁺. 10 đến 12 tuần sau khi ghép tế bào gốc CD34⁺, chuột nhắt được điều trị hai lần hằng tuần bằng chất dẫn thuốc (DP47GS IgG, không IL-2), DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ hoặc DP47GS IgG-(IL-2)₂. Lượng tối đa tế bào Treg ở người và tế bào NK tăng trong máu được thấy sau 3 lần điều trị và các kết quả được thể hiện trong (A) đối với Treg và (B) đối với tế bào NK. Các kết quả được thể hiện là giá trị trung bình $\pm$ khoảng tứ phân vị; chất dẫn thuốc (n=21), IgG-(IL-2N88D)₂ (n=22) và IgG-(IL-2)₂ (n=24).

Fig. 18. So sánh các ảnh hưởng *in vivo* của DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ và DP47GS IgG-(IL-2)₂ đến sự sống sót của chuột nhắt được người hóa tế bào gốc CD34⁺. 10 đến 12 tuần sau khi ghép tế bào gốc CD34⁺, chuột nhắt được điều trị hai lần hằng tuần bằng chất dẫn thuốc (DP47GS IgG, không IL-2), DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ hoặc DP47GS IgG-(IL-2)₂ cho đến khi mức độ trầm trọng của đáp ứng vật chủ kháng mảnh ghép khác loại ở người đạt đến cấp độ định trước (giảm trọng lượng $\geq 15\%$) cần loại bỏ chúng ra khỏi thử nghiệm. Các kết quả được vẽ sơ đồ ở dạng đường cong sống sót Kaplan-Meier từ GraphPad Prism cho chất dẫn thuốc (n=7), DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ (n=12) và DP47GS IgG-(IL-2)₂ (n=13).

Fig. 19. So sánh các ảnh hưởng *in vivo* của DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ và DP47GS IgG-(IL-2)₂ đến tế bào Treg, tế bào NK và tế bào T CD8⁺ ở chuột nhắt được người hóa tế bào gốc CD34⁺. 10 đến 12 tuần sau khi ghép tế bào gốc CD34⁺, chuột nhắt được điều trị hai lần hằng tuần bằng chất dẫn thuốc (DP47GS IgG, không IL-2), DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ hoặc DP47GS IgG-(IL-2)₂ cho đến khi mức độ nghiêm trọng của đáp ứng vật chủ kháng mảnh ghép khác loại ở người đạt đến cấp độ định trước (giảm trọng lượng $\geq 15\%$) cần loại bỏ chúng ra khỏi nghiên cứu, tại thời điểm này mức máu sẽ được đánh giá đối với quần thể tế bào ở từng người. Số lượng tế bào Treg ở người, tế bào NK và tế bào CD8⁺ trong máu được thể hiện dưới dạng % tế bào

CD45⁺ ở người. Các kết quả được thể hiện dưới dạng giá trị trung bình $\pm$ SEM cho chất dẫn thuốc (n=6), DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ (n=9) hoặc DP47GS IgG-(IL-2)₂ (n=9).

Fig. 20. Gây cảm ứng Treg pSTAT5a trong máu khi đầu chó đáp ứng với DP47GS IgG-(IL-2)₂ và DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂. Ba đối tượng cho là các đối tượng có khỏe mạnh bình thường (C1-C3) sẽ được đánh giá tại cùng thời điểm về ảnh hưởng của liều tối đa (20ng/mL) của DP47GS IgG-(IL-2)₂ và DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ đến mức độ gây cảm ứng tạo ra quá trình phosphoryl hóa STAT5a ở tế bào Treg. (A) phương pháp tạo cổng để đo dòng tế bào bằng FOXP3 (trục y) và CD45RA (trục x) được sử dụng để xác định các tiểu quần thể tế bào Treg CD4⁺CD25⁺: Treg chưa quen thí nghiệm (CD45RA⁺FOXP3⁺), Treg ghi nhớ (CD45RA⁻FOXP3⁺), và được hoạt hóa (CD45RA⁻FOXP3^{hi}). (B) biểu hiện của quá trình nhuộm bề mặt tế bào CD25⁺ trong các tiểu quần thể tế bào Treg ở trước khi kích thích. (C) đáp ứng pSTAT5a đối với tiểu quần thể tế bào Treg CD4⁺CD25⁺: được hoạt hóa, ghi nhớ và chưa quen thí nghiệm đối với từng trong số ba con khi đầu chó (C1-C3).

Fig. 21. Hoạt hóa tế bào tác động T ghi nhớ CD4⁺ thông thường pSTAT5a trong máu khi đầu chó đáp ứng với DP47GS IgG-(IL-2)₂ hoặc DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂. Sử dụng cùng 20ng/mL mẫu máu được kích thích từ ba đối tượng cho ở khi được mô tả trên Fig. 11, cảm ứng pSTAT5a trong tế bào tác động T ghi nhớ CD4⁺ thông thường được thử nghiệm. (A) chiến lược rút tế bào theo dòng chảy được sử dụng để nhận biết tế bào tác động T ghi nhớ CD4⁺FOXP3⁻CD45RA⁻ thông thường với CD45RA trên trục y và CD25 trên trục x. (B) đáp ứng pSTAT5a đối với toàn bộ tế bào tác động T ghi nhớ CD4⁺FOXP3⁻CD45RA⁻. (C) đáp ứng pSTAT5a trong tế bào tác động T ghi nhớ mà cũng là CD25⁻. (D) đáp ứng pSTAT5a trong tế bào tác động T ghi nhớ mà cũng là CD25⁺.

Fig. 22. Gây cảm ứng pSTAT5a trong tập hợp con tế bào T trong máu ngoại vi ở khi đầu chó đáp ứng với DP47GS IgG-(IL-2)₂ và DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂. Hai đối tượng cho trưởng thành khỏe mạnh được đánh giá về ảnh hưởng trong việc thay đổi liều lượng (0,03-300ng/mL) của DP47GS IgG-(IL-2)₂ và DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ đến sự cảm ứng quá trình phosphoryl hóa STAT5a. Các kết quả được thể hiện đối với

tiểu quần thể tế bào Treg CD4⁺ (A-C): Treg được hoạt hóa (A), ghi nhớ (C), và chưa quen thí nghiệm (B) và tế bào tác động T ghi nhớ CD4⁺ thông thường (D). Các kết quả tương tự thu được đối với cả khi và các kết quả từ một đối tượng cho thấy là minh họa các ảnh hưởng của DP47GS IgG-(IL-2)₂ và DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂.

Fig. 23. Ở chuột nhắt, DP47GS IgG-IL-2 có các tính chất dược động học (PK) tốt hơn so với DP47GS IgG-(IL-2)₂ trong khi DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ chỉ ở mức độ trung bình. (A) chuột nhắt NOD và NOD.*scid* được tiêm trong tĩnh mạch (i.v.) bằng 0,3mg/kg DP47GS IgG-IL-2 hoặc 0,3mg/kg DP47GS IgG-(IL-2)₂. (B) chuột nhắt NOD.*scid*.*IL2Rα*^{-/-} được tiêm trong tĩnh mạch bằng 0,1mg/kg DP47GS IgG-IL-2, 0,3mg/kg DP47GS IgG-(IL-2)₂ hoặc 0,1mg/kg DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂. IL-2 ở người được đánh giá trong các mẫu huyết thanh ở các thời điểm đã định bằng thử nghiệm bắt giữ dựa trên kháng thể (mAb).

Fig. 24. Cả CD25 và FoxP3 đều tăng lên trong tế bào Treg chuột sau khi điều trị bằng Proleukin®, DP47GS IgG-IL-2, DP47GS IgG-(IL-2)₂, và DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂. Chuột nhắt BALB/c được điều trị bằng Proleukin® (20.000 và 100.000 IU/con, n=3), DP47GS IgG-IL-2, DP47GS IgG-(IL-2)₂, hoặc DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ (60, 300, hoặc 1500 IU/con, n=3), chuột nhắt được điều trị bằng chất dẫn thuốc được dùng làm đối chứng không kích thích (n=4). Hai mươi bốn giờ sau khi điều trị, Treg ở lá lách được đánh giá về nồng độ CD25 và FOXP3. (A) các thay đổi phụ thuộc vào liều của CD25 trên bề mặt tế bào và (B) thay đổi phụ thuộc vào liều của FoxP3 nội bào được quan sát đối với tất cả bốn phân tử IL2. Số liệu được thể hiện dưới dạng giá trị trung bình ± SD, các thanh màu đen là liều cao nhất được sử dụng và các đường màu xám là liều thấp nhất.

Fig. 25. Các tính chất PK của DP47GS IgG-IL-2 và DP47GS IgG-(IL-2)₂ được đánh giá ở khi đầu chó trưởng thành có khỏe mạnh bình thường chưa quen thí nghiệm sinh học. (A) DP47GS IgG-IL-2 được tiêm trong tĩnh mạch (i.v.) dưới dạng tiêm liều lớn tác động nhanh ở các liều bằng 10, 25, và 100µg/kg (n=2 với mỗi liều). (B) DP47GS IgG-(IL-2)₂ được tiêm trong tĩnh mạch dưới dạng tiêm liều lớn tác động nhanh ở các liều bằng 10 và 25µg/kg (n=2 với mỗi liều). IL-2 ở người được đánh giá

trong các mẫu huyết thanh ở các thời điểm đã định bằng thử nghiệm bắt giữ dựa trên mAb.

Fig. 26. DP47GS IgG-IL2 có tác động làm tăng tế bào T điều hòa theo cách phụ thuộc vào liều ở khi đầu chó. Các thay đổi của tế bào T điều hòa $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ trong máu toàn phần (Treg) vào ngày 7 sau điều trị được thể hiện dưới dạng (A) số lượng tế bào Treg tuyệt đối/mm³ máu toàn phần và (B) số lần thay đổi của Treg. Tất cả số liệu nêu trên được biểu thị ở dạng giá trị trung bình $\pm$ SD. Các cột rỗng: DP47GS IgG-IL-2 (n=6); các cột đặc: chất dẫn thuốc (n=3).

Fig. 27. Các ảnh hưởng theo thời gian và liều thấp của DP47GS IgG-IL-2 đến tế bào Treg ở khi đầu chó. (A) thay đổi phụ thuộc vào thời gian ở tế bào Treg tăng theo số lần sau khi dùng liều 2 hoặc 6 μ g/kg DP47GS IgG-IL-2 (lần lượt n=4 và 6). (B) thay đổi phụ thuộc vào thời gian ở số lượng Treg tuyệt đối trong máu sau khi dùng liều 2 hoặc 6 μ g/kg DP47GS IgG-IL-2 (lần lượt n=4 và 6). Tất cả số liệu được thể hiện dưới dạng giá trị trung bình $\pm$ SD.

Fig. 28. Proleukin ở dạng kiếu đơn cho tác dụng kích thích đáp ứng Treg phụ thuộc vào liều tác động ngắn ở khi đầu chó. (A) thay đổi về số lượng Treg trong máu ngoại vi sau khi điều trị bằng liều đơn Proleukin từ 3×10^4 đến 3×10^5 IU/kg. (B) thay đổi về Treg pSTAT5a sau khi điều trị bằng liều đơn Proleukin 3×10^4 đến 3×10^5 IU/kg. Các số liệu được thể hiện dưới dạng giá trị trung bình $\pm$ SD.

Fig. 29. DP47GS IgG-IL-2 ở liều thấp nhưng cho hiệu quả cao hơn nhiều so với Proleukin[®] liều cao trong việc gây cảm ứng Treg ở khi đầu chó. Khi đầu chó có khỏe mạnh bình thường (nhóm có n=5) được điều trị bằng DP47GS IgG-IL-2 ở liều thấp hoặc Proleukin ở liều cao và sự thay đổi của tế bào T điều hòa được thử nghiệm vào ngày 10. Vào ngày 0 và 7, DP47GS IgG-IL-2 được dùng SC ở liều bằng 16800 IU/kg (12 μ g/kg). Việc điều trị bằng Proleukin (200000 IU/kg) được dùng SC 3 lần/tuần (MWF) với tổng số liều là 5. Các kết quả được thể hiện dưới dạng giá trị trung bình $\pm$ SD với (A) thay đổi trong tổng số tế bào Treg/mm³ máu, (B) số lần tăng của tế bào Treg, và (C) thay đổi về tỷ lệ giữa tế bào Treg/tế bào $CD4^+FOXP3^-$ thông thường. Các cột rỗng chỉ kết quả điều trị bằng IL-2 và các cột đặc là đối chứng dẫn thuốc.

Fig. 30. STAT5 được phosphoryl hóa trong máu toàn phần *Ex vivo* là gen đánh dấu sinh học nhạy dùng để hoạt hóa DP47GS IgG-IL-2 Treg *in vivo*. Một và 3 ngày sau khi dùng *in vivo* DP47GS IgG-IL-2 ở dạng liều đơn, thấp (12 μ g/kg) cho khỉ đầu chó khỏe mạnh (n=5), máu toàn phần được thu gom và được thử nghiệm ngay mà không cần kích thích đối với STAT5 đã phosphoryl hóa (pSTAT5a). Mỗi con khỉ được lấy máu vào ngày 0 trước khi điều trị và lượng pSTAT5a được đo (các cột đặc) và được sử dụng riêng lẻ để đánh giá số lần thay đổi sau điều trị (các cột rỗng). (A) số lần thay đổi của tế bào Treg pSTAT5a vào ngày 1 và 3, (B) số lần thay đổi pSTAT5a trong tế bào T ghi nhớ CD4⁺CD45⁻ thông thường, và (C) số lần thay đổi của pSTAT5a trong tế bào T chưa quen thí nghiệm được thể hiện. Số liệu được thể hiện dưới dạng giá trị trung bình $\pm$ SD.

Fig. 31. pSTAT5a trong máu toàn phần *Ex vivo* là gen đánh dấu sinh học nhạy dùng để hoạt hóa DP47GS IgG-IL-2 Treg ở liều thấp *in vivo*. Từ một đến bảy ngày sau khi dùng *in vivo* ở dạng đơn liều thấp DP47GS IgG-IL-2 cho khỉ đầu chó khỏe mạnh, của máu toàn phần được thu gom và được thử nghiệm ngay mà không kích thích đối với pSTAT5a. Mỗi con khỉ được lấy máu vào ngày 0 trước khi điều trị đối với các nồng độ không kích thích của pSTAT5a và so với các thay đổi ở pSTAT5a sau điều trị. (A) Treg pSTAT5a trước và sau khi điều trị bằng 2 μ g/kg DP47GS IgG-IL-2 (n=4). (B) Treg pSTAT5a trước và sau khi điều trị bằng 6 μ g/kg DP47GS IgG-IL-2 (n=6). Số liệu được thể hiện dưới dạng giá trị trung bình $\pm$ SD.

Fig. 32. Ki-67 trong máu toàn phần ở khỉ đầu chó *Ex vivo* dùng làm chất gen đánh dấu cho sự tăng sinh tế bào T được cảm ứng bởi DP47GS IgG-IL-2 *in vivo*. Khỉ đầu chó được điều trị bằng 2 và 6 μ g/kg DP47GS IgG-IL-2 như được mô tả trong Fig. 14 cũng được theo dõi *ex vivo* về các thay đổi trong gen đánh dấu nội bào Ki-67 để đánh giá phạm vi tăng sinh *in vivo*. Phần trăm trạng thái ổn định bình thường của các tế bào trong chu kỳ tế bào (Ki-67⁺) được định lượng vào ngày 0 trước khi điều trị và sau đó theo dõi hằng ngày trong 7 đến 11 ngày tiếp theo. (A) % Ki-67⁺ trong Treg, (B) % Ki-67⁺ trong tế bào T ghi nhớ/tế bào T tác động CD4⁺CD45⁻ thông thường, và (C) %

Ki-67⁺ trong tế bào T CD4⁺CD45RA⁺ tự nhiên được thể hiện. Số liệu được thể hiện dưới dạng giá trị trung bình $\pm$ SD.

Fig. 33. Ảnh hưởng theo thời gian và liều thấp của DP47GS IgG-(IL-2)₂ đến tế bào Treg ở khi đầu chó chưa quen thí nghiệm khỏe mạnh. (A) các thay đổi phụ thuộc vào thời gian về số lượng Treg tuyệt đối sau 6 μ g/kg DP47 IgG-(IL-2)₂. (B) thay đổi phụ thuộc vào thời gian về Treg pSTAT5a sau khi điều trị, (C) thay đổi phụ thuộc vào thời gian về số lần tăng Treg, và (D) so sánh số lần thay đổi của Treg từ khi được điều trị bằng DP47Gs IgG-IL-2 (các cột rỗng, 2 đến 36 μ g/kg) so với được điều trị bằng DP47GS IgG-(IL-2)₂ (đường đậm, 6 μ g/kg). Tất cả số liệu được thể hiện dưới dạng giá trị trung bình $\pm$ SD (n=4 đến 6).

Fig. 34. Ảnh hưởng phụ thuộc vào thời gian và liều lượng của liều lượng rất thấp DP47GS IgG-(IL-2)₂ đến tế bào Treg ở khi đầu chó khỏe mạnh chưa quen thí nghiệm. (A) Thay đổi phụ thuộc vào thời gian về số lần tăng Treg sau khi dùng 0,7 và 2 μ g/kg DP47GS IgG-(IL-2)₂. (B) thay đổi phụ thuộc vào thời gian đến Treg pSTAT5a được xác định vào ngày 0 trước khi điều trị và vào ngày 1-4 sau khi điều trị, (C) thay đổi phụ thuộc vào thời gian đến tế bào Teff/mem pSTAT5a. Tất cả số liệu được thể hiện dưới dạng giá trị trung bình $\pm$ SD (n=3 ở 0,7 μ g/kg và n=8 ở 2 μ g/kg).

Fig. 35. So sánh phụ thuộc vào liều lượng giữa DP47GS IgG-IL-2 với DP47GS IgG-(IL-2)₂ và khả năng làm tăng Treg trong máu toàn phần ở khi đầu chó của chúng. Tất cả số liệu được biểu thị ở dạng giá trị trung bình $\pm$ SD (n=3 đến 6).

Fig. 36. Kỹ thuật giải trình tự gen thế hệ mới (NGS) được sử dụng để phân tích sự khử methyl ADN đặc hiệu tập hợp con tế bào T đối với yếu tố phiên mã FOXP3 và phân tử ức chế miễn dịch CTLA-4. Máu từ khi đầu chó trưởng thành chưa quen thí nghiệm sinh học được phân tích trước và sau khi điều trị bằng liều tối ưu của DP47GS IgG-IL-2 (25 μ g/kg, n=4) và DP47GS IgG-(IL-2)₂ (6 μ g/kg, n=4). Tập hợp con tế bào T CD4⁺ được phân loại bằng BD FACSAria từ máu toàn phần PBMC và 100000 tế bào/tập hợp con được sử dụng để khử methyl ADN đặc hiệu gen. Các kết quả tương tự được thấy ở cả quá trình điều trị và số liệu từ khi được điều trị bằng DP47GS IgG-(IL-

2)₂ được thể hiện đối với FOXP3 ở bảng phía trên và đối với CTLA-4 ở bảng phía dưới (n=4, trung bình $\pm$ SD).

Fig. 37. Các tính chất PK của DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ được đánh giá ở khi đầu chó khỏe mạnh bình thường chưa quen thí nghiệm sinh học. (A) DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ được tiêm trong tĩnh mạch (iv) dưới dạng tiêm liều lớn tác động nhanh ở các liều bằng 30 và 100 μ g/kg (n=2 với mỗi liều). (B) DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ được tiêm dưới da (sc) trong 0,2ml ở ngang lưng ở các liều bằng 30 và 100 μ g/kg (n=2 với mỗi liều). IL-2 ở người được đánh giá trong các mẫu huyết tương ở các thời điểm đã định bằng thử nghiệm bắt giữ dựa trên kháng thể đơn dòng. (C) Ở dạng gen đánh dấu sinh học khi tiếp xúc IL-2, CD25 hòa tan được đo trong huyết tương sau khi tiêm IgG-(IL-2N88D)₂ ở các liều bằng 30 và 100 μ g/kg; sCD25 khi đầu chó được đo ở thử nghiệm bắt giữ dựa trên mAb của sCD25 ở người đã biết là phản ứng chéo với sCD25 khi đầu chó. Các kết quả được thể hiện dưới dạng giá trị trung bình $\pm$ SEM (n=4).

Fig. 38. Các ảnh hưởng phụ thuộc vào thời gian và liều lượng *in vivo* của DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ đến tế bào Treg ở khi đầu chó khỏe mạnh chưa quen thí nghiệm. Thay đổi phụ thuộc vào thời gian về số lượng tuyệt đối ($\times 10^6$ /ml máu) của tổng số tế bào Treg, Treg ghi nhớ CD4⁺, Treg chưa quen thí nghiệm CD4⁺ và Treg CD8⁺FOXP3⁺ sau khi tiêm (A) 100 μ g/kg DP47 IgG-(IL-2N88D)₂ hoặc (B) 30 μ g/kg DP47 IgG-(IL-2N88D)₂. Thay đổi phụ thuộc vào thời gian ở tế bào Treg ở dạng % tế bào T CD4⁺ hoặc CD8⁺ đối với tổng số tế bào Treg, Treg ghi nhớ CD4⁺, Treg chưa quen thí nghiệm của và Treg CD8⁺ FOXP3⁺ sau khi tiêm 100 μ g/kg DP47 IgG-(IL-2N88D)₂ (C) hoặc 30 μ g/kg DP47 IgG-(IL-2N88D)₂ (D). Các kết quả được thể hiện dưới dạng giá trị trung bình $\pm$ SEM (n=4).

Fig. 39. Ảnh hưởng phụ thuộc vào thời gian và liều lượng *in vivo* của DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ đến lympho bào ở khi đầu chó khỏe mạnh chưa quen thí nghiệm. Thay đổi phụ thuộc vào thời gian ở tế bào tác động T ghi nhớ CD4⁺ được thể hiện dưới dạng % trong tổng số tế bào T CD4⁺ sau khi tiêm 100 μ g/kg DP47 IgG-(IL-2N88D)₂ hoặc 30 μ g/kg DP47 IgG-(IL-2N88D)₂ (A). Thay đổi phụ thuộc vào thời gian ở tế bào tác động T ghi nhớ CD4⁺CD25^{cao} được thể hiện dưới dạng % của tế bào tác động T ghi

nhớ CD4⁺ sau khi tiêm 100µg/kg DP47 IgG-(IL-2N88D)₂ hoặc 30µg/kg DP47 IgG-(IL-2N88D)₂ (B). Các kết quả được thể hiện dưới dạng giá trị trung bình $\pm$ SEM (n=4).

Fig. 40. pSTAT5a máu toàn phần *ex vivo* là gen đánh dấu sinh học nhạy để hoạt hóa IL-2 *in vivo*. Từ 1 đến 11 ngày sau khi dùng *in vivo* liều đơn của DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ cho khỉ đầu chó, máu toàn phần được thu gom và được thử nghiệm ngay mà không kích thích đối với pSTAT5a. Mỗi con khỉ được lấy máu vào ngày 0 trước khi điều trị đối với nồng độ không kích thích của pSTAT5a và so với các thay đổi ở pSTAT5a sau điều trị. (A) pSTAT5a (MFI, mật độ huỳnh quang trung bình tối đa) trước và sau khi điều trị bằng 100µg/kg DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂, n=4. (B) pSTAT5a trước và sau khi điều trị bằng 30µg/kg DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂, n=4. Số liệu được thể hiện dưới dạng giá trị trung bình $\pm$ SEM đối với tập hợp con tế bào được chỉ định.

Fig. 41. Việc nhuộm bề mặt tế bào máu toàn phần CD25 *ex vivo* là gen đánh dấu sinh học nhạy để hoạt hóa IL-2 *in vivo*. Từ 1 đến 14 ngày sau khi dùng *in vivo* liều đơn của DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ cho khỉ đầu chó, máu toàn phần được thu gom và được thử nghiệm ngay mà không kích thích đối với bề mặt CD25 trên loại tế bào được chỉ định. Mỗi con khỉ được lấy máu vào ngày 0 trước khi điều trị đối với nồng độ không kích thích của CD25 và so với thay đổi ở CD25 sau điều trị. (A) Việc nhuộm CD25 (MFI tối đa, mật độ huỳnh quang trung bình) trước và sau khi điều trị bằng 100µg/kg DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂, n=4. (B) việc nhuộm CD25 trước và sau khi điều trị bằng 30µg/kg DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂, n=4. Số liệu được thể hiện dưới dạng giá trị trung bình $\pm$ SEM đối với tập hợp con tế bào được chỉ định.

Fig. 42. Việc nhuộm Ki-67 nội bào trong máu toàn phần *ex vivo* là gen đánh dấu sinh học nhạy để tăng sinh tế bào sau khi hoạt hóa IL-2 *in vivo*. Từ 1 đến 14 ngày sau khi dùng *in vivo* liều đơn của DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ cho khỉ đầu chó, máu toàn phần được thu gom và được thử nghiệm ngay mà không kích thích đối với Ki-67 nội bào trên các loại tế bào được chỉ định. Mỗi con khỉ được lấy máu vào ngày 0 trước khi điều trị đối với nồng độ không kích thích của tế bào Ki-67⁺ và so với các thay đổi ở tế bào % Ki-67⁺ sau điều trị. (A) việc nhuộm Ki-67 (% tế bào Ki-67⁺) trước và sau khi điều trị bằng 100µg/kg DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂, n=4. (B) việc nhuộm Ki-67 (% tế

bào Ki-67⁺) trước và sau khi điều trị bằng 30µg/kg DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂, n=4. Các kết quả được thể hiện dưới dạng giá trị trung bình $\pm$ SEM đối với tập hợp con tế bào được chỉ định.

Fig. 43. Tóm tắt quá trình so sánh các ảnh hưởng *in vivo* của IL-2 đến tế bào Treg khi đầu chó. Tổng số tế bào Treg tăng tối đa ở dạng % tế bào T CD4⁺ được thể hiện đối với Proleukin, IgG-IL-2, IgG-(IL-2)₂ và IgG-(IL-2N88D)₂; để so sánh, tất cả các liều lượng *in vivo* được chuyển đổi thành pmol/kg. Proleukin được dùng 3 lần/tuần (MWF) trong 2 tuần và protein dung hợp IL-2 được dùng ở dạng tiêm liều duy nhất. Các kết quả được thể hiện dưới dạng giá trị trung bình $\pm$ SEM; Proleukin (n=5), IgG-IL-2 (n=6), IgG-(IL-2)₂ (n=6) và IgG-(IL-2N88D)₂ (n=4).

Fig. 44. IL-2 Liều cao cảm ứng tính ưa eozin ở khi đầu chó. Các thay đổi ở số lượng ưa eozin trong máu được theo dõi ở tất cả các thử nghiệm bằng Proleukin hoặc thể liên hợp miễn dịch của IL-2. Tính ưa eozin được phát hiện 7 đến 14 ngày sau khi điều trị bằng Proleukin liều cao (2×10^5 IU/kg 3 lần/tuần trong 2 tuần) hoặc liều cao hơn của DP47GS IgG-IL-2 nhưng không bằng DP47GS IgG-(IL-2)₂ hoặc DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂. Việc đếm số lượng ưa eozin ở đường cơ sở là đường tròn rỗng được thể hiện là “0” đối với liều lượng của IL-2 và được thực hiện hai lần, một lần để thử nghiệm phân tử IL-2 kiểu đại và một lần để thử nghiệm DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂. Số liệu được thể hiện dưới dạng giá trị trung bình $\pm$ SD.

Fig. 45. Điều trị *in vivo* bằng DP47GS IgG-IL-2 làm ức chế tính quá mẫn typ muện của tế bào hồng cầu chuột (DTH). Tất cả số liệu được thể hiện đối với từng con chuột nhất được điều trị bằng chất dẫn thuốc (đáp ứng 100%), IgG-IL-2 (4000 IU/con), hoặc CTLA-4-Ig chuột nhất làm đối chứng dương (200µg/con). (A) kết quả từ chuột nhất NOD và (B) chuột nhất C57BL/6. Biên độ của đáp ứng DTH ngày bốn được thể hiện dưới dạng thay đổi trọng lượng chân so với chuột nhất không được miễn dịch (Δ trọng lượng chân). Số liệu được thể hiện dưới dạng giá trị trung bình $\pm$ SD.

Fig. 46. Điều trị *in vivo* bằng DP47GS IgG-IL-2 (4000 IU/con) làm ức chế đáp ứng kháng thể IgG chuột đối với KLH ở (A) chuột nhất C57BL/6 21 ngày sau khi tạo

miễn dịch và (B) chuột nhắt NOD bảy ngày sau khi tạo miễn dịch. Số liệu được thể hiện dưới dạng giá trị trung bình $\pm$ SD.

Mô tả chi tiết sáng chế

Các định nghĩa

Thông thường, các thuật ngữ được sử dụng ở đây được sử dụng trong lĩnh vực kỹ thuật, trừ khi được định nghĩa khác đi trong phần sau đây.

Như được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ "protein dung hợp" được dùng để chỉ phân tử polypeptit dung hợp chứa phân tử globulin miễn dịch và phân tử IL-2, trong đó các thành phần của protein dung hợp được liên kết với nhau bằng liên kết peptit, trực tiếp hoặc thông qua tác nhân liên kết peptit. Để hiểu rõ hơn, các chuỗi peptit riêng lẻ của thành phần globulin miễn dịch của protein dung hợp có thể được liên kết không đồng hóa trị, ví dụ, bằng liên kết disulfua.

"Được dung hợp" được dùng để chỉ các thành phần được liên kết bằng liên kết peptit, trực tiếp hoặc thông qua một hoặc nhiều tác nhân liên kết peptit.

Thuật ngữ "gắn kết đặc hiệu" có nghĩa là sự gắn kết có chọn lọc đối với kháng nguyên và có thể được phân biệt với các tương tác không mong muốn hoặc không đặc hiệu. Khả năng gắn kết với kháng nguyên đặc hiệu của globulin miễn dịch có thể được xác định thông qua thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết với enzym (ELISA) hoặc các kỹ thuật khác quen thuộc đối với một chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ, kỹ thuật cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR) (được phân tích trên công cụ BIAcore) (Liljeblad et al., Glyco J 17, 323-329 (2000)), và các thử nghiệm gắn kết truyền thống (Heeley, Endocr Res 28, 217-229 (2002)). Theo một phương án, mức độ gắn kết của globulin miễn dịch với protein không liên quan ít hơn khoảng 10% mức độ gắn kết của globulin miễn dịch với kháng nguyên như được xác định, ví dụ, bằng SPR. Theo một số phương án nhất định, globulin miễn dịch gắn kết với kháng nguyên có hằng số phân ly (K_D) $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 100 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ nM}$, $\leq 1 \text{ nM}$, $\leq 0,1 \text{ nM}$, $\leq 0,01 \text{ nM}$, hoặc $\leq 0,001 \text{ nM}$ (ví dụ, 10^{-8} M hoặc thấp hơn, ví dụ, từ 10^{-8} M đến 10^{-13} M , ví dụ, từ 10^{-9} M đến 10^{-13} M).

“Ái lực” hoặc “ái lực gắn kết” được dùng để chỉ độ bền của tổng số tương tác không đồng hóa trị giữa vị trí gắn kết đơn của phân tử (ví dụ, kháng thể) và thành cặp kết đi kèm của nó (ví dụ, kháng nguyên). Trừ khi có quy định khác, như được sử dụng trong bản mô tả, “ái lực gắn kết” được dùng để chỉ ái lực gắn kết thực chất phản ánh tương tác 1:1 giữa các thành viên của cặp gắn kết (ví dụ, kháng thể và kháng nguyên). Ái lực của phân tử X đối với phân tử đi kèm Y của nó nhìn chung có thể được biểu thị bằng hằng số phân ly (K_D), là tỷ lệ giữa hằng số tốc độ phân ly và hằng số tốc độ kết hợp (k_{off} và k_{on} , một cách lần lượt). Do đó, các ái lực tương đương có thể bao gồm các hằng số tốc độ khác nhau, miễn là tỷ lệ giữa các hằng số tốc độ vẫn giống nhau. Ái lực có thể được xác định bằng phương pháp thông thường đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, bao gồm các kỹ thuật được mô tả ở đây. Phương pháp cụ thể để đo ái lực là cộng hưởng Plasmon bề mặt (SPR).

“Gắn kết giảm”, ví dụ, khả năng gắn kết giảm với thụ thể Fc hoặc thụ thể IL-2, được dùng để chỉ sự giảm ái lực đối với tương tác tương ứng, như được xác định bằng, ví dụ, SPR. Rõ ràng hơn là, thuật ngữ còn bao gồm giảm ái lực đến không (hoặc dưới giới hạn phát hiện được của phương pháp phân tích), tức là hủy bỏ hoàn toàn tương tác. Ngược lại, “gắn kết tăng” được dùng để chỉ sự tăng ái lực gắn kết đối với tương tác tương ứng.

Như được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ “quyết định kháng nguyên” là đồng nghĩa với “kháng nguyên” và được dùng để chỉ vị trí (ví dụ, sự mở rộng ra lân cận của các axit amin hoặc cấu dạng hình thành từ các vùng khác nhau của các axit amin không liên kề) trên đại phân tử polypeptit mà kháng thể gắn kết với, tạo ra phức kháng thể-kháng nguyên. Chất quyết định kháng nguyên hữu ích có thể được phát hiện, ví dụ, trên bề mặt các tế bào, tự do trong huyết thanh, và/hoặc trong cơ chất ngoại bào (ECM).

Như được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ “chuỗi đơn” được dùng để chỉ phân tử chứa các monome axit amin liên kết thẳng bằng liên kết peptit.

Thuật ngữ “kháng thể” ở đây được sử dụng theo nghĩa rộng nhất và bao gồm các cấu trúc kháng thể khác nhau, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, kháng thể đơn

dòng, kháng thể đa dòng, kháng thể đa hiệu (ví dụ, kháng thể đặc hiệu kép), và các mảnh kháng thể miễn là chúng có hoạt tính gắn kết kháng nguyên mong muốn.

"Mảnh kháng thể" được dùng để chỉ phân tử khác với kháng thể trơ bao gồm một phần kháng thể trơ gắn kết với kháng nguyên mà kháng thể trơ gắn kết với. Các ví dụ về mảnh kháng thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở, Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, kháng thể thể đôi, kháng thể thẳng, phân tử kháng thể chuỗi đơn (ví dụ, scFv), và kháng thể miễn đơn.

Thuật ngữ "phân tử globulin miễn dịch" được dùng để chỉ protein có cấu trúc của kháng thể có trong tự nhiên. Ví dụ, globulin miễn dịch của lớp IgG là glycoprotein heterotetrame khoảng 150000 dalton, gồm hai chuỗi nhẹ và hai chuỗi nặng được liên kết disulfua. Từ đầu tận cùng N đến đầu tận cùng C, mỗi chuỗi nặng của globulin miễn dịch có vùng biến đổi (VH), còn được gọi là miền nặng biến đổi hoặc miền biến đổi chuỗi nặng, sau đó là ba miền hằng định (CH1, CH2, và CH3), còn được gọi là miền hằng định chuỗi nặng. Tương tự, từ đầu tận cùng N đến đầu tận cùng C, mỗi chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch có vùng biến đổi (VL), còn được gọi là miền nhẹ biến đổi hoặc miền biến đổi chuỗi nhẹ, sau đó là miền nhẹ hằng định (CL), còn được gọi là vùng hằng định chuỗi nhẹ. Chuỗi nặng của globulin miễn dịch có thể được phân chia vào một trong năm lớp, gọi là α (IgA), δ (IgD), ϵ (IgE), γ (IgG), hoặc μ (IgM), một số lớp còn có thể phân chia thành phân lớp, ví dụ, γ_1 (IgG₁), γ_2 (IgG₂), γ_3 (IgG₃), γ_4 (IgG₄), α_1 (IgA₁) và α_2 (IgA₂). Chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch có thể được phân chia vào một trong hai loại, gọi là kappa (κ) và lambda (λ), dựa trên trình tự axit amin của miền hằng định của nó. Globulin miễn dịch hầu hết gồm có hai phân tử Fab và miền Fc, liên kết qua vùng bản lề globulin miễn dịch.

Như được sử dụng trong bản mô tả, "mảnh Fab" được dùng để chỉ mảnh globulin miễn dịch chứa miền VL và miền hằng định của chuỗi nhẹ (CL), và miền VH và miền hằng định thứ nhất (CH1) của chuỗi nặng.

"Lớp" kháng thể hoặc globulin miễn dịch được dùng để chỉ loại miền hằng định hoặc vùng hằng định được chứa trong chuỗi nặng của nó. Có năm lớp globulin miễn dịch chính: IgA, IgD, IgE, IgG, và IgM, và một vài trong số chúng có thể còn được

phân chia thành các phân lớp (isotyp), ví dụ, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁, và IgA₂. Miền hằng định chuỗi nặng tương ứng với các lớp globulin miễn dịch khác nhau được gọi là α , δ , ϵ , γ , và μ , một cách lần lượt.

Thuật ngữ “vùng biến đổi” hoặc “miền biến đổi” được dùng để chỉ miền của globulin miễn dịch hoặc chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ kháng thể thường liên quan đến việc gắn kết giữa globulin miễn dịch hoặc kháng thể với kháng nguyên. Tuy nhiên, globulin miễn dịch này được chứa trong protein dung hợp theo sáng chế có thể chứa các vùng biến đổi không mang lại tính đặc hiệu gắn kết kháng nguyên. Các miền biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ (VH và VL, một cách lần lượt) của globulin miễn dịch hoặc kháng thể thường có các cấu trúc tương tự, với mỗi miền chứa bốn vùng khung làm việc bảo toàn (FR) và ba vùng siêu biến (HVR). Xem, ví dụ Kindt et al., Kuby Immunology, 6th ed., W.H. Freeman and Co., trang 91 (2007). Miền VH hoặc miền VL đơn có thể thích hợp để mang lại tính đặc hiệu gắn kết kháng nguyên.

Thuật ngữ “vùng siêu biến” hoặc “HVR”, như được sử dụng trong bản mô tả, được dùng để chỉ từng vùng của globulin miễn dịch hoặc miền biến đổi của kháng thể siêu biến về trình tự và/hoặc tạo ra các vòng được xác định về mặt cấu trúc (“vùng siêu biến”). Nhìn chung, các kháng thể bốn chuỗi tự nhiên chứa sáu HVR; ba ở VH (H1, H2, H3), và ba ở VL (L1, L2, L3). HVR thường chứa các gốc axit amin từ vùng siêu biến và/hoặc từ vùng quyết định bổ thể (CDR), vùng quyết định bổ thể có tính biến đổi trình tự cao nhất và/hoặc liên quan đến việc nhận diện kháng nguyên. Các vòng siêu biến lấy làm ví dụ xuất hiện ở gốc axit amin 26 đến 32 (L1), 50 đến 52 (L2), 91 đến 96 (L3), 26 đến 32 (H1), 53 đến 55 (H2), và 96 đến 101 (H3) (Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196, 901-917 (1987)). Các CDR lấy làm ví dụ (CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2, và CDR-H3) xuất hiện ở gốc axit amin 24 đến 34 của L1, 50 đến 56 của L2, 89 đến 97 của L3, 31 đến 35B của H1, 50 đến 65 của H2, và 95 đến 102 của H3 (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)). Với ngoại lệ là CDR1 trong VH, các CDR thường chứa các gốc axit amin tạo ra các vòng siêu biến. CDR còn chứa “gốc quyết định tính đặc hiệu,” hoặc “SDR,” là gốc tiếp xúc với kháng nguyên. SDR được chứa trong các vùng của CDR được gọi là CDR viết tắt, hoặc a-

CDR. a-CDR lấy làm ví dụ (a-CDR-L1, a-CDR-L2, a-CDR-L3, a-CDR-H1, a-CDR-H2, và a-CDR-H3) xuất hiện ở gốc axit amin 31 đến 34 của L1, 50 của 55 của L2, 89 đến 96 của L3, 31 đến 35B của H1, 50 đến 58 của H2, và 95 đến 102 của H3 (xem Almagro and Fransson, *Front. Biosci.* 13, 1619-1633 (2008)). Trừ khi có quy định khác, các gốc HVR và các gốc khác trong miền biến đổi (ví dụ, gốc FR) được đánh số ở đây theo Kabat et al., nêu trên (được gọi là “đánh số theo Kabat”).

"Khung làm việc" hoặc "FR" được dùng để chỉ các gốc trong miền biến đổi không phải gốc trong vùng siêu biến (HVR). FR của miền biến đổi thường gồm bốn miền FR: FR1, FR2, FR3, và FR4. Do đó, trình tự HVR và FR thường xuất hiện trong trình tự sau trong VH (hoặc VL): FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.

“Globulin miễn dịch ở người” là globulin miễn dịch có trình tự axit amin tương ứng với trình tự axit amin của globulin miễn dịch được sản sinh bởi người hoặc tế bào người hoặc có nguồn gốc từ nguồn không phải người sử dụng kho globulin miễn dịch ở người hoặc các trình tự mã hóa globulin miễn dịch ở người khác. Định nghĩa về globulin miễn dịch ở người này đặc biệt không bao gồm globulin miễn dịch được người hóa chứa gốc gắn kết kháng nguyên không phải ở người.

Thuật ngữ “kháng thể đơn dòng” như được sử dụng trong bản mô tả được dùng để chỉ kháng thể thu được từ quần thể kháng thể hầu như đồng nhất, tức là, các kháng thể riêng rẽ chứa trong quần thể giống hệt và/hoặc gắn kết với cùng một epitop, ngoại trừ các kháng thể biến thể có thể có, ví dụ, chứa các đột biến có trong tự nhiên hoặc hình thành trong quá trình sản xuất chế phẩm kháng thể đơn dòng, các biến thể này thường có mặt với các lượng nhỏ. Đối lập với chế phẩm kháng thể đa dòng, mà thường chứa các kháng thể khác nhau dựa vào các yếu tố xác định khác nhau (epitop), mỗi kháng thể đơn dòng của chế phẩm kháng thể đơn dòng dựa vào yếu tố xác định riêng trên kháng nguyên. Do đó, từ bỏ nghĩa “đơn dòng” chỉ đặc tính của kháng thể là thu được từ quần thể kháng thể hầu như đồng nhất, và không được hiểu là cần để sản sinh kháng thể bằng phương pháp cụ thể bất kỳ. Ví dụ, kháng thể đơn dòng cần được sử dụng theo sáng chế có thể được tạo ra bằng các kỹ thuật khác nhau, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, phương pháp lai, phương pháp ADN tái tổ hợp, phương pháp biểu

hiện thực khuẩn thể, và phương pháp sử dụng động vật chuyển gen chứa tất cả hoặc một phần locus của globulin miễn dịch ở người, các phương pháp này và các phương pháp minh họa khác để tạo ra kháng thể đơn dòng được mô tả ở đây.

Thuật ngữ “miền Fc” hoặc “vùng Fc” ở đây được sử dụng để xác định vùng đầu tận cùng C của chuỗi nặng của globulin miễn dịch chứa ít nhất một phần vùng hằng định. Thuật ngữ bao gồm vùng Fc trình tự tự nhiên và vùng Fc biến thể. Vùng Fc của IgG chứa CH2 của IgG và miền CH3 của IgG. “Miền CH2” của vùng Fc của IgG ở người thường kéo dài từ gốc axit amin ở vị trí khoảng 231 đến gốc axit amin ở vị trí khoảng 340. Theo một phương án, chuỗi hydrat cacbon được gắn vào miền CH2. Miền CH2 ở đây có thể là miền CH2 trình tự tự nhiên hoặc miền CH2 biến thể. “Miền CH3” chứa độ dài các gốc đầu tận cùng C đến miền CH2 trong vùng Fc (tức là từ gốc axit amin ở vị trí khoảng 341 đến gốc axit amin ở vị trí khoảng 447 của IgG). Vùng CH3 ở đây có thể là miền CH3 trình tự tự nhiên hoặc miền CH3 biến thể (ví dụ, miền CH3 có “phần lồi” (“phần phình”) được đưa vào một chuỗi của nó và “hốc” (“lỗ”) được đưa vào tương ứng ở chuỗi còn lại của nó; xem, patent Mỹ số 5,821,333, được đưa vào đây để tham khảo). Các miền CH3 biến thể này có thể được sử dụng để thúc đẩy quá trình dị dim hóa của hai chuỗi nặng của globulin miễn dịch không giống nhau như được mô tả ở đây. Theo một phương án, vùng Fc của chuỗi nặng IgG ở người kéo dài từ Cys226, hoặc từ Pro230, đến đầu tận cùng carboxyl của chuỗi nặng. Tuy nhiên, lysin đầu tận cùng C (Lys447) của vùng Fc có thể có mặt hoặc có thể không có mặt. Trừ khi có quy định khác trong bản mô tả, việc đánh số các gốc axit amin trong vùng Fc hoặc vùng hằng định là theo hệ đánh số theo EU, còn được gọi là chỉ số EU, như được mô tả trong Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991.

Thuật ngữ “chức năng tác động” được dùng để chỉ các hoạt tính sinh học có thể quy cho vùng Fc của globulin miễn dịch, thay đổi theo isotyp của globulin miễn dịch. Các ví dụ về chức năng tác động của globulin miễn dịch bao gồm: khả năng gắn kết với C1q và sự gây độc tế bào phụ thuộc vào bổ thể (CDC), khả năng gắn kết với thụ thể Fc, tính gây độc tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC), thực bào phụ thuộc vào kháng thể (ADCP), sự tiết xytokin, sự hấp thụ kháng nguyên qua

trung gian phức miễn dịch bằng tế bào trình diện kháng nguyên, sự điều hòa giảm của các thụ thể bề mặt tế bào (ví dụ, thụ thể tế bào B), và sự hoạt hóa tế bào B.

“Thụ thể Fc hoạt hóa” là thụ thể Fc mà sau khi gắn kết bởi vùng Fc của globulin miễn dịch tạo ra các sự kiện phát tín hiệu kích thích tế bào mang thụ thể thực hiện chức năng tác động. Thụ thể Fc hoạt hóa bao gồm FcγRIIIa (CD16a), FcγRI (CD64), FcγRIIa (CD32), và FcαRI (CD89). Thụ thể Fc hoạt hóa đặc biệt là FcγRIIIa người (xem, UniProt số gia nhập P08637 (phiên bản 141)).

Thuật ngữ “interleukin-2” hoặc “IL-2” như được sử dụng trong bản mô tả, được dùng để chỉ IL-2 chưa quen thí nghiệm bất kỳ từ nguồn động vật có xương sống bất kỳ, bao gồm các động vật có vú như động vật linh trưởng (ví dụ, người) và loài gặm nhấm (ví dụ, chuột nhắt và chuột cống), trừ khi có quy định khác. Thuật ngữ này bao gồm IL-2 không được xử lý cũng như dạng IL-2 bất kỳ thu được từ quá trình xử lý trong tế bào. Thuật ngữ này còn bao gồm các biến thể có trong tự nhiên của IL-2, ví dụ, biến thể ghép hoặc biến thể alen. Trình tự axit amin của IL-2 ở người lấy làm ví dụ được thể hiện trong SEQ ID NO: 1. IL-2 không được xử lý ở người còn bao gồm peptit tín hiệu có 20 axit amin ở đầu tận cùng N, mà không có mặt trong phân tử IL-2 trưởng thành.

Thuật ngữ “IL-2 chưa quen thí nghiệm”, còn được gọi là “IL-2 kiểu dại”, là IL-2 có trong tự nhiên. Trình tự của phân tử IL-2 ở người tự nhiên được thể hiện trong SEQ ID NO: 1. Cho mục đích của sáng chế, thuật ngữ kiểu dại còn bao gồm các dạng IL-2 chứa một hoặc nhiều đột biến axit amin mà không làm thay đổi khả năng gắn kết thụ thể IL-2 so với IL-2 chưa quen thí nghiệm có trong tự nhiên, ví như đột biến thay thế cysteine ở vị trí tương ứng với gốc 125 của IL-2 ở người cho alanin. Theo một số phương án, IL-2 kiểu dại nhằm mục đích của sáng chế chứa đột biến thay thế axit amin C125A (xem SEQ ID NO: 3).

Thuật ngữ “CD25” hoặc “thụ thể IL-2 α” như được sử dụng trong bản mô tả, được dùng để chỉ CD25 tự nhiên bất kỳ từ nguồn động vật có xương sống bất kỳ, bao gồm động vật có vú như động vật linh trưởng (ví dụ, người) và loài gặm nhấm (ví dụ, chuột nhắt và chuột cống), trừ khi có quy định khác. Thuật ngữ này bao gồm CD25 “độ dài đầy đủ”, không được xử lý cũng như dạng CD25 bất kỳ thu được khi xử lý trong tế

bào. Thuật ngữ này còn bao gồm các biến thể có trong tự nhiên của CD25, ví dụ, biến thể ghép hoặc biến thể alen. Theo một số phương án nhất định, CD25 là CD25 ở người. Trình tự axit amin của CD25 người lấy làm ví dụ (với trình tự tín hiệu, Avi-tag và His-tag) được thể hiện trong SEQ ID NO: 25.

Thuật ngữ “thụ thể IL-2 ái lực cao” như được sử dụng trong bản mô tả được dùng để chỉ dạng heterotrimer của thụ thể IL-2, gồm có thụ thể cấu trúc siêu phân tử γ (còn được biết đến là thụ thể xytokin cấu trúc siêu phân tử γ thông thường, γ_c , hoặc CD132), thụ thể cấu trúc siêu phân tử β (còn được biết đến là CD122 hoặc p70) và thụ thể cấu trúc siêu phân tử α (còn được biết đến là CD25 hoặc p55). Thuật ngữ “thụ thể IL-2 ái lực trung bình” hoặc “thụ thể IL-2 $\beta\gamma$ ” ngược lại được dùng để chỉ thụ thể IL-2 chỉ bao gồm cấu trúc siêu phân tử γ và cấu trúc siêu phân tử β , không bao gồm cấu trúc siêu phân tử α (để tìm hiểu thêm, xem, ví dụ Olejniczak and Kasprzak, Med Sci Monit 14, RA179-189 (2008)). Trình tự axit amin của CD122 và CD132 ở người lấy làm ví dụ (được dung hợp với vùng Fc với His-tag) được thể hiện trong SEQ ID NO 21 và 23, một cách lần lượt.

Thuật ngữ “tế bào T điều hòa” hoặc “tế bào Treg” là dạng cụ thể của tế bào T CD4⁺ có thể ức chế đáp ứng của các tế bào T khác (tế bào T tác động). Các tế bào Treg được đặc trưng bởi biểu hiện của CD4, cấu trúc siêu phân tử α của thụ thể IL-2 (CD25), và yếu tố phiên mã hộp hình đĩa P3 (FOXP3) (Sakaguchi, Annu Rev Immunol 22, 531-62 (2004)) và đóng vai trò quyết định trong việc cảm ứng và duy trì sự tự dung nạp ngoại biên với kháng nguyên, bao gồm sự tự dung nạp được biểu hiện bởi khối u.

Thuật ngữ “tế bào T CD4⁺ thông thường” là tế bào T CD4⁺ khác với tế bào T điều hòa. Tế bào T ghi nhớ CD4⁺ thông thường được đặc trưng bởi biểu hiện của CD4, CD3, mà không phải của FOXP3. “Tế bào T ghi nhớ CD4⁺ thông thường” là tập hợp con của tế bào T CD4⁺ thông thường, còn được đặc trưng bởi sự thiếu biểu hiện CD45RA, đối lập với “tế bào T chưa quen thí nghiệm CD4⁺ thông thường” biểu hiện CD45RA.

Thuật ngữ “hoạt hóa chọn lọc của tế bào Treg” có nghĩa là sự hoạt hóa của các tế bào Treg hầu như không có sự hoạt hóa đi kèm của các tập hợp con tế bào T khác

(như tế bào trợ giúp T CD4⁺, tế bào T gây độc tế bào CD8⁺, tế bào T của NK) hoặc tế bào tiêu diệt tự nhiên (NK). Các phương pháp nhận biết và phân biệt các loại tế bào này được mô tả trong các ví dụ thực hiện. Phương pháp hoạt hóa có thể bao gồm việc cảm ứng sự truyền tín hiệu của thụ thể IL-2 (như được xác định bằng, ví dụ, sự phát hiện STAT5a được phosphoryl hóa), cảm ứng sự tăng sinh (như được xác định bằng, ví dụ, sự phát hiện Ki-67) và/hoặc điều hòa tăng sự biểu hiện của các gen đánh dấu hoạt hóa (ví như CD25).

Thuật ngữ “tác nhân liên kết peptit” được dùng để chỉ peptit chứa một hoặc nhiều axit amin, thường là khoảng 2 đến 20 axit amin. Tác nhân liên kết peptit là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này hoặc được mô tả ở đây. Tác nhân liên kết peptit thích hợp, không gây miễn dịch bao gồm, ví dụ, tác nhân liên kết peptit (G₄S)_n, (SG₄)_n hoặc G₄(SG₄)_n. “n” thường là số nằm trong khoảng từ 1 đến 10, đặc biệt là từ 2 đến 4.

Thuật ngữ “cải biến” được dùng để chỉ thao tác thủ công bất kỳ của mạch chính peptit (ví dụ, trình tự axit amin) hoặc cải biến sau dịch mã (ví dụ, glycosyl hóa) của polypeptit.

“Cải biến phần phình trong lỗ” được dùng để chỉ cải biến trong bề mặt chung giữa hai chuỗi nặng của globulin miễn dịch trong miền CH3, trong đó i) trong miền CH3 của một chuỗi nặng, gốc axit amin được thay thế bằng gốc axit amin có thể tích chuỗi bên lớn hơn, do đó tạo ra phần lồi (“phần phình”) bên trong bề mặt chung trong miền CH3 của một chuỗi nặng có thể định vị được trong khoảng (“lỗ”) bên trong bề mặt chung trong miền CH3 của chuỗi nặng còn lại, và ii) trong miền CH3 của chuỗi nặng còn lại, gốc axit amin được thay thế bằng gốc axit amin có thể tích chuỗi bên nhỏ hơn, nhờ đó tạo ra hốc (“lỗ”) bên trong bề mặt chung trong miền CH3 thứ hai mà phần lồi (“phần phình”) bên trong bề mặt chung trong miền CH3 thứ nhất có thể định vị được trong đó. Theo một phương án, “cải biến phần phình trong lỗ” bao gồm đột biến thay thế axit amin T366W và tùy ý đột biến thay thế axit amin S354C ở một trong các chuỗi nặng của kháng thể, và đột biến thay thế axit amin T366S, L368A, Y407V và tùy ý Y349C ở một trong số chuỗi nặng còn lại của kháng thể. Công nghệ cải biến phần phình trong lỗ được mô tả trong, ví dụ, US 5,731,168; US 7,695,936; Ridgway et al.,

Prot Eng 9, 617-621 (1996) and Carter, J Immunol Meth 248, 7-15 (2001). Nhìn chung, phương pháp này bao gồm bước đưa phần lõi (“phần phình”) ở bề mặt chung của polypeptit thứ nhất và hốc (“lỗ”) tương ứng ở bề mặt chung của polypeptit thứ hai, sao cho phần lõi có thể được định vị trong hốc để thúc đẩy sự hình thành dị dimer và hình thành homodimer cản trở. Phần lõi được cấu tạo bằng cách thay thế các chuỗi bên axit amin nhỏ từ bề mặt chung của polypeptit thứ nhất bằng chuỗi bên lớn hơn (ví dụ, tyrosin hoặc tryptophan). Các hốc bù có kích cỡ giống nhau hoặc tương tự với phần lõi được tạo ra ở bề mặt chung của polypeptit thứ hai bằng cách thay thế chuỗi bên axit amin lớn bằng chuỗi bên axit amin nhỏ hơn (ví dụ, alanin hoặc threonin). Việc đưa hai gốc xystein ở vị trí S354 và Y349 vào, một cách lần lượt, dẫn đến việc hình thành cầu disulfua giữa hai chuỗi nặng của kháng thể trong vùng Fc, còn làm ổn định thêm dimer (Carter, J Immunol Methods 248, 7-15 (2001)).

“Đột biến thay thế” axit amin được dùng để chỉ sự thay thế một axit amin bằng một axit amin khác ở polypeptit. Theo một phương án, axit amin được thay thế bằng một axit amin khác có cấu trúc và/hoặc tính chất hóa học tương tự, ví dụ, thay thế axit amin bảo toàn. Đột biến thay thế axit amin “bảo toàn” có thể được tạo ra trên cơ sở tính tương đồng về độ phân cực, điện tích, độ hòa tan, độ kỵ nước, độ ưa nước, và/hoặc bản chất lưỡng cực của các gốc liên quan. Ví dụ, axit amin không phân cực (kỵ nước) bao gồm alanin, leuxin, isoleuxin, valin, prolin, phenylalanin, tryptophan, và metionin; axit amin phân cực trung tính bao gồm glyxin, serin, threonin, xystein, tyrosin, asparagin, và glutamin; axit amin (axit) tích điện dương bao gồm arginin, lysin, và histidin; và axit amin (bazo) tích điện âm bao gồm axit aspartic và axit glutamic. Các đột biến thay thế không bảo toàn tạo ra sự trao đổi thành viên của một trong các nhóm này bằng một nhóm khác. Ví dụ, đột biến thay thế axit amin còn có thể dẫn đến việc thay thế một axit amin bằng một axit amin khác có cấu trúc và/hoặc tính chất hóa học khác nhau, ví dụ, thay thế axit amin từ một nhóm (ví dụ, phân cực) bằng một axit amin khác từ nhóm khác (ví dụ, bazo). Đột biến thay thế axit amin có thể được tạo ra bằng cách sử dụng phương pháp di truyền hoặc phương pháp hóa học đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các phương pháp di truyền có thể bao gồm đột biến định hướng điểm, PCR, tổng hợp gen và phương pháp tương tự. Nên hiểu rằng, phương pháp làm thay đổi nhóm

chuỗi bên của axit amin bằng các phương pháp khác với kỹ thuật thiết kế di truyền, như cải biến hóa học, còn có thể hữu ích. Các ký hiệu khác nhau có thể được sử dụng ở đây để chỉ cùng một đột biến thay thế axit amin. Ví dụ, đột biến thay thế từ prolin ở vị trí 329 của chuỗi nặng của globulin miễn dịch cho glyxin có thể được chỉ định là 329G, G329, G₃₂₉, P329G, hoặc Pro329Gly.

"Tỷ lệ phần trăm (%) mức đồng nhất của trình tự axit amin" đối với trình tự polypeptit tham chiếu được xác định là tỷ lệ phần trăm của gốc axit amin trong trình tự ứng viên giống hệt với các gốc axit amin trong trình tự polypeptit đối chiếu, sau khi sắp hàng trình tự và đưa vào các khoảng trống, nếu cần, để đạt được tỷ lệ phần trăm mức đồng nhất của trình tự tối đa, và không coi đột biến thay thế bảo toàn bất kỳ là một phần của mức đồng nhất trình tự. Việc sắp hàng nhằm mục đích xác định tỷ lệ phần trăm mức đồng nhất của trình tự axit amin có thể đạt được theo các cách khác nhau thuộc kỹ năng trong lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ, bằng cách sử dụng phần mềm máy tính có bán trên thị trường như phần mềm BLAST, BLAST-2, ALIGN hoặc Megalign (DNASTAR). Chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể xác định các thông số thích hợp để sắp hàng trình tự, bao gồm các thuật toán bất kỳ cần để đạt được sự sắp hàng tối đa so với độ dài đầy đủ của của trình tự được so sánh. Tuy nhiên, nhằm mục đích theo sáng chế, các giá trị % đồng nhất trình tự axit amin được tạo ra bằng cách sử dụng chương trình máy tính so sánh trình tự ALIGN-2. Chương trình máy tính so sánh trình tự ALIGN-2 được tạo ra bởi Genentech, Inc., và mã nguồn được nộp với tài liệu hướng dẫn sử dụng tại Cục Bản quyền Mỹ U.S. Copyright Office, Washington D.C., 20559, nơi nó được đăng ký dưới số đăng ký bản quyền Mỹ số U.S. Copyright TXU510087. Chương trình ALIGN-2 có thể mua được trên thị trường từ Genentech, Inc., South San Francisco, California, hoặc có thể được biên soạn từ mã nguồn. Chương trình ALIGN-2 nên được biên soạn để sử dụng trên hệ điều hành UNIX, bao gồm UNIX V4.0D dạng số. Tất cả các thông số so sánh trình tự được thiết lập bởi chương trình ALIGN-2 và không thay đổi. Trong các trường hợp trong đó ALIGN-2 được sử dụng để so sánh trình tự axit amin, % mức đồng nhất trình tự axit amin của trình tự axit amin A cho trước đối với, với, hoặc dựa vào trình tự axit amin B cho trước (theo một cách khác có thể gọi là trình tự axit amin A cho trước có hoặc chứa % mức

đồng nhất trình tự axit amin nhất định đối với, với, hoặc dựa vào trình tự axit amin B cho trước) được tính như sau:

100 lần phân đoạn X/Y

trong đó X là số gốc axit amin được ghi điểm bằng các cặp số giống nhau bằng chương trình sắp thẳng hàng trình tự ALIGN-2 trong sự sắp xếp thẳng hàng A và B của chương trình đó, và trong đó Y là tổng số gốc axit amin trong B. Nên hiểu rằng khi độ dài của trình tự axit amin A không bằng độ dài của trình tự axit amin B, thì % độ đồng nhất trình tự axit amin giữa A với B sẽ không bằng % độ đồng nhất trình tự axit amin giữa B với A. Trừ khi có quy định khác, tất cả % giá trị đồng nhất trình tự axit amin được sử dụng ở đây thu được như được mô tả trong đoạn mô tả ngay trên đây bằng cách sử dụng chương trình máy tính ALIGN-2.

“Polynucleotit” hoặc “axit nucleic” như được sử dụng thay thế cho nhau ở đây, được dùng để chỉ polyme của nucleotit có độ dài bất kỳ, và bao gồm ADN và ARN. Các nucleotit có thể là deoxyribonucleotit, ribonucleotit, nucleotit cải biến hoặc bazơ, và/hoặc các chất tương tự của chúng, hoặc cơ chất bất kỳ có thể được kết hợp vào polyme bằng phản ứng ADN hoặc ARN polymeraza hoặc bằng phản ứng tổng hợp. Polynucleotit có thể chứa nucleotit cải biến, như nucleotit được metyl hóa và các chất tương tự của chúng. Trình tự nucleotit có thể được xen vào bởi các thành phần không phải nucleotit. Polynucleotit có thể chứa (các) cải biến được tạo ra sau khi tổng hợp, như liên hợp với nhãn dán.

Axit nucleic hoặc polynucleotit có trình tự nucleotit ít nhất, ví dụ, 95% "giống hệt" với trình tự nucleotit đối chiếu theo sáng chế, được dự định rằng trình tự nucleotit của polynucleotit giống hệt với trình tự đối chiếu ngoại trừ việc trình tự polynucleotit có thể bao gồm đến tối đa năm đột biến điểm cho mỗi 100 nucleotit của trình tự nucleotit đối chiếu. Nói cách khác, để thu được polynucleotit có trình tự nucleotit ít nhất 95% giống hệt với trình tự nucleotit đối chiếu, lên đến 5% nucleotit trong trình tự đối chiếu có thể được làm khuyết hoặc thay thế bằng một nucleotit khác, hoặc số lượng nucleotit lên đến 5% tổng số nucleotit trong trình tự đối chiếu có thể được xen vào trình tự đối chiếu. Các thay đổi này của trình tự đối chiếu có thể xuất hiện ở vị trí tận

cùng 5' hoặc 3' của trình tự nucleotit đối chiếu hoặc ở vị trí bất kỳ giữa các vị trí tận cùng này, được bố trí rải rác riêng rẽ trong các gốc trong trình tự đối chiếu hoặc trong một hoặc nhiều nhóm liền kề trong trình tự đối chiếu. Đối với vấn đề thực tế, việc liệu rằng trình tự polynucleotit cụ thể bất kỳ có trình tự nucleotit giống hệt ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% với trình tự nucleotit theo sáng chế có thể được xác định theo phương pháp thông thường bằng cách sử dụng các chương trình máy tính đã biết, như các chương trình nêu trên dùng cho polypeptit (ví dụ, ALIGN-2).

Thuật ngữ “vector” như được sử dụng trong bản mô tả, được dùng để chỉ phân tử axit nucleic có khả năng nhân giống một axit nucleic khác mà nó liên kết với. Thuật ngữ này bao gồm vector ở dạng cấu trúc axit nucleic tự sao chép cũng như vector được kết hợp vào hệ gen của tế bào chủ mà nó được đưa vào. Một số vector nhất định có khả năng hướng sự biểu hiện của axit nucleic mà chúng liên kết có điều khiển với. Các vector này trong bản mô tả được gọi là “vector biểu hiện”.

Thuật ngữ “tế bào chủ”, “dòng tế bào chủ”, và “nuôi cấy tế bào chủ” được sử dụng thay thế cho nhau và dùng để chỉ tế bào mà axit nucleic ngoại sinh được đưa vào, bao gồm thế hệ con của các tế bào này. Tế bào chủ bao gồm “thể biến nạp” và “tế bào được biến nạp,” bao gồm tế bào được biến nạp nguyên phát và thế hệ con thu được từ đó không quan tâm đến số lần cấy chuyển. Thế hệ con có thể không hoàn toàn giống hệt về hàm lượng axit nucleic với tế bào gốc, mà có thể chứa các đột biến. Thế hệ con đột biến có cùng chức năng hoặc hoạt tính sinh học như được sàng lọc hoặc được chọn lọc trong tế bào được biến nạp gốc được bao gồm ở đây. Tế bào chủ là loại bất kỳ của hệ tế bào mà có thể được sử dụng để tạo ra protein dung hợp theo sáng chế. Tế bào chủ bao gồm tế bào được nuôi cấy, ví dụ, tế bào được nuôi cấy của động vật có vú, như tế bào CHO, tế bào BHK, tế bào NS0, tế bào SP2/0, tế bào u tủy YO, tế bào u tủy ở chuột nhắt P3X63, tế bào PER, tế bào PER.C6 hoặc tế bào lai, tế bào nấm men, tế bào côn trùng, và tế bào thực vật, chỉ kể tên một số, nhưng gồm cả các tế bào có trong động vật chuyển gen, thực vật chuyển gen hoặc cây canh tác hoặc mô động vật.

“Lượng hữu hiệu” của một chất được dùng để chỉ lượng cần để có được thay đổi sinh lý ở tế bào hoặc mô sử dụng nó.

"Lượng cho tác dụng điều trị bệnh" của một chất, ví dụ, dược phẩm, được dùng để chỉ lượng hữu hiệu, ở liều lượng và trong các khoảng thời gian cần thiết, để đạt được kết quả điều trị hoặc phòng ngừa bệnh mong muốn. Lượng cho tác dụng điều trị bệnh của một chất ví dụ, loại bỏ, làm giảm, trì hoãn, giảm thiểu hoặc ngăn chặn các ảnh hưởng bất lợi của bệnh.

"Cá thể" hoặc "đối tượng" là động vật có vú. Động vật có vú bao gồm, nhưng không giới hạn ở, động vật thuần hóa (ví dụ, bò, cừu, mèo, chó, và ngựa), động vật linh trưởng (ví dụ, người và động vật linh trưởng không phải người như khỉ), thỏ, và loài gặm nhấm (ví dụ, chuột nhắt và chuột cống). Đặc biệt là, cá thể hoặc đối tượng này là người.

Thuật ngữ "dược phẩm" được dùng để chỉ chế phẩm ở dạng để cho phép hoạt tính sinh học của thành phần hoạt tính chứa trong đó hữu hiệu, và không chứa thành phần bổ sung gây độc không chấp nhận được cho đối tượng mà chế phẩm được sử dụng.

"Chất mang dược dụng" được dùng để chỉ thành phần trong dược phẩm, khác với thành phần hoạt tính, không độc đối với đối tượng. Chất mang dược dụng bao gồm, nhưng không giới hạn ở, dung dịch đệm, tá dược, chất ổn định, hoặc chất bảo quản.

Như được sử dụng trong bản mô tả, "sự điều trị" (và các biến thể về ngữ pháp của nó như "điều trị" hoặc "việc điều trị") được dùng để chỉ sự can thiệp lâm sàng nhằm mục đích làm thay đổi tiến trình tự nhiên của bệnh ở cá thể được điều trị, và có thể được tiến hành để phòng ngừa hoặc trong tiến trình bệnh học lâm sàng. Các tác dụng điều trị bệnh mong muốn bao gồm, nhưng không giới hạn ở, ngăn chặn sự xuất hiện hoặc tái phát của bệnh, làm dịu các triệu chứng, làm giảm hậu quả gây bệnh trực tiếp hoặc gián tiếp bất kỳ của bệnh, ngăn chặn di căn, làm giảm tốc độ tiến triển bệnh, cải thiện hoặc giảm nhẹ tình trạng bệnh, và thuyên giảm hoặc cải thiện sự tiên lượng bệnh. Theo một số phương án, kháng thể theo sáng chế được sử dụng để trì hoãn sự phát triển của bệnh hoặc làm chậm sự tiến triển của bệnh.

"Bệnh tự miễn" được dùng để chỉ bệnh lành tính hoặc rối loạn phát sinh từ và được định hướng dựa trên mô của cá thể. Các ví dụ về bệnh tự miễn hoặc rối loạn tự

miễn bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các đáp ứng viêm như bệnh viêm da bao gồm bệnh vẩy nến và chứng viêm da (ví dụ, chứng viêm da dị ứng); các đáp ứng liên quan đến bệnh viêm ruột (như bệnh Crohn và bệnh viêm loét đại tràng); chứng viêm da; các tình trạng bệnh dị ứng như eczema và bệnh hen; bệnh viêm khớp dạng thấp; bệnh luput ban đỏ toàn thân (SLE) (bao gồm, nhưng không giới hạn ở, bệnh cầu thận, bệnh luput da); bệnh đái tháo đường (ví dụ, bệnh đái tháo đường typ 1 hoặc bệnh đái tháo đường phụ thuộc insulin); bệnh xơ cứng rải rác và bệnh đái tháo đường thời niên thiếu.

Protein dung hợp theo sáng chế

Sáng chế đề xuất protein dung hợp của globulin miễn dịch-IL-2 có các tính chất đặc biệt có lợi để sử dụng trong phương pháp điều trị bệnh như được mô tả ở đây.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất protein dung hợp chứa (i) phân tử globulin miễn dịch và (ii) hai phân tử interleukin-2 (IL-2) đột biến chứa đột biến axit amin làm giảm ái lực của phân tử IL-2 đột biến đối với thụ thể IL-2 ái lực trung bình, so với phân tử IL-2 kiểu dại.

Theo một phương án, protein dung hợp nêu trên chủ yếu bao gồm phân tử globulin miễn dịch, hai phân tử interleukin-2 (IL-2) đột biến chứa đột biến axit amin làm giảm ái lực của phân tử IL-2 đột biến đối với thụ thể IL-2 ái lực trung bình, so với phân tử IL-2 kiểu dại, và tùy ý một hoặc nhiều tác nhân liên kết peptit.

Như được thể hiện trong các ví dụ, ngạc nhiên là protein dung hợp chứa hai phân tử IL-2 tạo ra hiệu quả và tính chọn lọc cải tiến thiện đáng kể trong việc hoạt hóa tế bào T điều hòa, so với protein dung hợp tương ứng chứa một phân tử IL-2. Hơn nữa, chỉ có protein dung hợp chứa hai (thay vì chỉ có một protein) phân tử IL-2 đột biến có khả năng gắn kết với thụ thể IL-2 ái lực trung bình giảm giữ được hoạt tính kích thích đáng kể đến tế bào T điều hòa.

Theo một phương án, phân tử globulin miễn dịch nêu trên là phân tử globulin miễn dịch lớp IgG, đặc biệt là phân tử globulin miễn dịch phân lớp IgG₁. Theo một phương án, phân tử globulin miễn dịch nêu trên là phân tử globulin miễn dịch ở người, tức là nó chứa vùng biến đổi và vùng hằng định đầy đủ ở người. Trình tự của vùng

hằng định IgG₁ ở người được lấy làm ví dụ được thể hiện trong SEQ ID NO: 8. Phân tử globulin miễn dịch lớp IgG chứa (i) hai chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch, mỗi chuỗi chứa miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) và miền hằng định chuỗi nhẹ (CL) từ đầu tận cùng N đến đầu tận cùng C, và (ii) hai chuỗi nặng của globulin miễn dịch, mỗi chuỗi chứa miền biến đổi chuỗi nặng (VH), miền hằng định chuỗi nặng (CH) 1, vùng bản lề globulin miễn dịch, miền CH2 và miền CH3 từ đầu tận cùng N đến đầu tận cùng C. Hai miền CH2 và CH3 tạo thành một phần vùng Fc của phân tử globulin miễn dịch. Hai chuỗi nặng dime hóa trong vùng Fc.

Theo một phương án về protein dung hợp theo sáng chế, hai phân tử IL-2 đột biến nêu trên mỗi phân tử được dung hợp tại axit amin ở đầu tận cùng N của chúng với axit amin ở đầu tận cùng C của một trong các chuỗi nặng của globulin miễn dịch của phân tử globulin miễn dịch nêu trên, tùy ý thông qua tác nhân liên kết peptit. Việc dung hợp của hai phân tử IL-2 (giống hệt) với chuỗi nặng của globulin miễn dịch cho phép sản xuất protein dung hợp một cách đơn giản, tránh tạo ra các sản phẩm phụ không mong muốn và không cần các cải biến để kích thích thúc đẩy quá trình dị dime hóa của các chuỗi nặng không giống hệt nhau, như cải biến phân phình trong lỗ.

Theo một số phương án nhất định về protein dung hợp theo sáng chế, hai phân tử IL-2 đột biến nêu trên được dung hợp với phân tử globulin miễn dịch nêu trên thông qua tác nhân liên kết peptit. Theo một phương án, hai phân tử IL-2 đột biến nêu trên mỗi phân tử được dung hợp với phân tử globulin miễn dịch nêu trên thông qua tác nhân liên kết peptit. Theo một phương án, hai phân tử IL-2 đột biến nêu trên mỗi phân tử được dung hợp tại axit amin ở đầu tận cùng N của chúng với axit amin ở đầu tận cùng C của một trong số các chuỗi nặng của globulin miễn dịch của phân tử globulin miễn dịch nêu trên thông qua tác nhân liên kết peptit. Theo một phương án, mỗi phân tử IL-2 đột biến nêu trên được dung hợp với phân tử globulin miễn dịch nêu trên thông qua tác nhân liên kết peptit có trình tự axit amin giống hệt. Theo một phương án, tác nhân liên kết peptit nêu trên chứa ít nhất 10 axit amin. Theo một phương án cụ thể, tác nhân liên kết peptit nêu trên chứa ít nhất 15 axit amin. Không mong muốn bị giới hạn bởi lý thuyết, tác nhân liên kết peptit có độ dài này có thể tạo ra tính linh hoạt để gắn kết tối ưu các phân tử IL-2 đột biến với thụ thể IL-2, cụ thể là thụ thể IL-2 (heterotrimer) ái lực

cao. Theo phương án cụ thể, tác nhân liên kết peptit nêu trên chứa 15 axit amin. Theo một phương án cụ thể hơn nữa, tác nhân liên kết peptit nêu trên chứa trình tự axit amin (G₄S)₃ (SEQ ID NO: 66). Theo một phương án, tác nhân liên kết peptit nêu trên có độ dài 15 axit amin. Theo một phương án, tác nhân liên kết peptit nêu trên có trình tự axit amin (G₄S)₃ (SEQ ID NO: 66). Theo một phương án, tác nhân liên kết peptit nêu trên gồm 15 axit amin. Theo một phương án, tác nhân liên kết peptit nêu trên gồm trình tự axit amin (G₄S)₃ (SEQ ID NO: 66).

Việc dung hợp các phân tử IL-2 với phân tử globulin miễn dịch tạo ra các tính chất được động học thích hợp, bao gồm, thời gian bán thải huyết thanh dài (do lặp lại chu trình thông qua việc gắn kết với FcRn, và kích thích phân tử cao hơn ngưỡng để lọc thận), so với IL-2 tự do (không được dung hợp). Hơn nữa, sự có mặt của phân tử globulin miễn dịch còn khiến việc tinh chế protein dung hợp trở nên đơn giản ví dụ, bằng sắc ký ái lực protein A. Thử ví là, như được thể hiện trong các ví dụ, protein dung hợp chứa hai phân tử IL-2 đột biến có khả năng gắn kết với thụ thể IL-2 ái lực trung bình giảm có thời gian bán thải huyết thanh lâu hơn so với protein dung hợp chứa hai phân tử IL-2 kiểu đại tương ứng. Việc dung hợp với phân tử globulin miễn dịch, tức là loại phân tử có trong tự nhiên, còn có thể giảm thiểu độc tính của protein dung hợp thông qua việc hình thành kháng thể kháng thuốc.

Trong khi có mặt của phân tử globulin miễn dịch, cụ thể là vùng Fc của phân tử globulin miễn dịch, thích hợp là đối với tính chất được động học của protein dung hợp, tại cùng thời điểm nó có thể tạo ra việc hướng đích không mong muốn của protein dung hợp đến các tế bào biểu hiện thụ thể Fc thay vì đến các tế bào mang thụ thể IL-2 được ưu tiên. Hơn nữa, việc gắn thụ thể Fc có thể làm giải phóng xytokin (tiền viêm) và việc hoạt hóa không mong muốn các tế bào miễn dịch khác nhau khác với tế bào T điều hòa. Do đó, theo một số phương án nhất định, phân tử globulin miễn dịch nêu trên chứa trong protein dung hợp theo sáng chế bao gồm cải biến làm giảm ái lực gắn kết của phân tử globulin miễn dịch với thụ thể Fc, so với phân tử globulin miễn dịch tương ứng không có cải biến này. Theo phương án cụ thể, thụ thể Fc nêu trên là thụ thể Fc γ , đặc biệt là thụ thể Fc γ ở người. Ái lực gắn kết với thụ thể Fc có thể dễ dàng được xác định bằng, ví dụ, ELISA, hoặc bằng Cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR) bằng cách sử

dụng cụ tiêu chuẩn như dụng cụ BIAcore (GE Healthcare) và thụ thể Fc như vậy có thể thu được bằng cách biểu hiện tái tổ hợp. Phương án minh họa cụ thể và được lấy làm ví dụ để đo ái lực gắn kết được mô tả sau đây. Theo một phương án, ái lực gắn kết với thụ thể Fc được đo bằng cộng hưởng plasmon bề mặt sử dụng máy BIACORE® T100 (GE Healthcare) ở nhiệt độ 25°C với phối tử (thụ thể Fc) được cố định trên chip CM5. Nói ngắn gọn là, chip cảm biến sinh học dextran được carboxymetyl hóa (CM5, GE Healthcare) được hoạt hóa bằng N-ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide hydroclorua (EDC) và N-hydroxysuccinimide (NHS) theo chỉ dẫn của nhà sản xuất. Phối tử tái tổ hợp được pha loãng bằng natri axetat 10nM, pH 5,5, đến nồng độ 0,5 đến 30 µg/ml trước khi tiêm ở tốc độ chảy bằng 10 µl/phút để đạt được khoảng 100 đến 5000 đơn vị đáp ứng (RU) protein được kết hợp. Sau khi tiêm phối tử, etanolamin 1M được tiêm để phong bế các nhóm không phản ứng. Để xác định động lực, các phân pha loãng theo dãy ba đến năm lần của kháng thể (nằm trong khoảng từ ~0,01nM đến 300nM) được tiêm trong HBS-EP+ (GE Healthcare, 10mM HEPES, 150mM NaCl, 3mM EDTA, 0,05% Chất hoạt động bề mặt P20, pH 7,4) ở nhiệt độ 25°C ở tốc độ chảy bằng khoảng 30 đến 50 µl/phút. Tốc độ kết hợp (k_{on}) và tốc độ phân ly (k_{off}) được tính bằng cách sử dụng mô hình liên kết Langmuir đơn giản theo kiểu một-một (phần mềm đánh giá BIACORE® T100 phiên bản 1.1.1) bằng cách khớp đồng thời biểu đồ cảm biến kết hợp và cảm biến phân ly. Hằng số phân ly cân bằng (K_D) được tính bằng tỷ lệ k_{off}/k_{on} . Xem, ví dụ, Chen et al., J Mol Biol 293, 865-881 (1999). Theo một cách khác, các kháng thể ái lực gắn kết với thụ thể Fc có thể được đánh giá bằng cách sử dụng dòng tế bào đã biết để biểu hiện các thụ thể Fc cụ thể, như các tế bào NK biểu hiện thụ thể FcγIIIa.

Theo một phương án, cải biến bao gồm một hoặc nhiều đột biến axit amin làm giảm ái lực gắn kết của globulin miễn dịch với thụ thể Fc. Theo một phương án, đột biến axit amin là đột biến thay thế axit amin. Cụ thể là, một hoặc nhiều đột biến axit amin giống nhau có mặt ở từng chuỗi trong hai chuỗi nặng của globulin miễn dịch. Theo một phương án, đột biến axit amin nêu trên làm giảm ái lực gắn kết của globulin miễn dịch với thụ thể Fc ít nhất 2 lần, ít nhất 5 lần, hoặc ít nhất 10 lần. Theo các phương án mà có nhiều hơn một đột biến axit amin làm giảm ái lực gắn kết của

globulin miễn dịch với thụ thể Fc, tổ hợp các đột biến axit amin này có thể làm giảm ái lực gắn kết của globulin miễn dịch với thụ thể Fc ít nhất là 10 lần, ít nhất 20 lần, hoặc thậm chí ít nhất 50 lần. Theo một phương án, phân tử globulin miễn dịch nêu trên thể hiện ái lực gắn kết với thụ thể Fc ít hơn 20%, đặc biệt là ít hơn 10%, đặc biệt hơn là ít hơn 5% so với phân tử globulin miễn dịch tương ứng không có cải biến này.

Theo một phương án, thụ thể Fc nêu trên là thụ thể Fc hoạt hóa. Theo phương án cụ thể, thụ thể Fc nêu trên được chọn từ nhóm bao gồm FcγRIIIa (CD16a), FcγRI (CD64), FcγRIIa (CD32) và FcαRI (CD89). Theo phương án cụ thể, thụ thể Fc là thụ thể Fcγ, cụ thể hơn là thụ thể FcγRIIIa, FcγRI hoặc FcγRIIa. Tốt hơn là, ái lực gắn kết với mỗi một trong các thụ thể này giảm xuống. Theo một phương án cụ thể hơn nữa, thụ thể Fc nêu trên là FcγIIIa, đặc biệt là FcγIIIa người. Theo một số phương án, ái lực gắn kết với thành phần bổ sung, cụ thể là ái lực gắn kết với C1q, cũng được giảm xuống. Theo một phương án, ái lực gắn kết với thụ thể Fc sơ sinh (FcRn) không bị giảm xuống. Khả năng gắn kết hầu như tương đương với FcRn, tức là sự duy trì ái lực gắn kết của phân tử globulin miễn dịch với thụ thể này, đạt được khi phân tử globulin miễn dịch biểu hiện nhiều hơn khoảng 70% ái lực gắn kết của dạng không được cải biến của phân tử globulin miễn dịch với FcRn. Phân tử globulin miễn dịch chứa trong protein dung hợp theo sáng chế có thể biểu hiện lớn hơn khoảng 80% và thậm chí lớn hơn khoảng 90% ái lực này.

Theo một phương án, cải biến nêu trên làm giảm ái lực gắn kết của phân tử globulin miễn dịch với thụ thể Fc là trong vùng Fc, đặc biệt là vùng CH2, của phân tử globulin miễn dịch. Theo một phương án, phân tử globulin miễn dịch nêu trên chứa đột biến thay thế axit amin ở vị trí 329 (đánh số theo EU) của chuỗi nặng của globulin miễn dịch. Theo một phương án cụ thể hơn, đột biến thay thế axit amin nêu trên là P329A hoặc P329G, đặc biệt là P329G. Theo một phương án, phân tử globulin miễn dịch nêu trên chứa đột biến thay thế axit amin ở vị trí 234 và 235 (đánh số theo EU) của chuỗi nặng của globulin miễn dịch. Theo phương án cụ thể, đột biến thay thế axit amin nêu trên là L234A và L235A (LALA). Theo một phương án, phân tử globulin miễn dịch nêu trên chứa đột biến thay thế axit amin ở vị trí 329 (đánh số theo EU) của chuỗi nặng của kháng thể và thêm cả đột biến thay thế axit amin ở vị trí được chọn từ

vị trí 228, 233, 234, 235, 297 và 331 của chuỗi nặng của globulin miễn dịch (đánh số theo EU). Theo một phương án cụ thể hơn, đột biến thay thế axit amin thêm này là S228P, E233P, L234A, L235A, L235E, N297A, N297D hoặc P331S. Theo một phương án cụ thể, phân tử globulin miễn dịch nêu trên chứa đột biến thay thế axit amin ở vị trí P329, L234 và L235 (đánh số theo EU) của chuỗi nặng của globulin miễn dịch. Theo một phương án cụ thể hơn, phân tử globulin miễn dịch nêu trên chứa đột biến thay thế axit amin L234A, L235A và P329G (LALA P329G; đánh số theo EU) trong chuỗi nặng của globulin miễn dịch. Tổ hợp các đột biến thay thế axit amin này loại bỏ một cách đặc biệt hiệu quả khả năng gắn kết thụ thể Fc γ của globulin miễn dịch lớp IgG ở người, như được mô tả trong công bố đơn PCT số WO 2012/130831, được đưa vào đây để tham khảo. Công bố đơn PCT số WO 2012/130831 cũng mô tả phương pháp điều chế globulin miễn dịch được cải biến này và phương pháp xác định các tính chất của nó như khả năng gắn kết với thụ thể Fc hoặc chức năng tác động.

Globulin miễn dịch chứa các cải biến trong chuỗi nặng của globulin miễn dịch có thể được tạo ra bằng cách làm khuyết, thay thế, xen axit amin vào hoặc cải biến sử dụng phương pháp di truyền hoặc phương pháp hóa học đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các phương pháp di truyền có thể bao gồm đột biến gen đặc hiệu điểm của trình tự ADN mã hóa, PCR, tổng hợp gen, và phương pháp tương tự. Các thay đổi nucleotit chính xác có thể được xác minh bằng cách, ví dụ, giải trình tự.

Globulin miễn dịch hoặc kháng thể chứa các cải biến làm giảm khả năng gắn kết với thụ thể Fc thường đã giảm các chức năng tác động, đặc biệt là giảm ADCC, so với globulin miễn dịch hoặc kháng thể không được cải biến tương ứng. Do đó, theo một phương án, cải biến làm giảm ái lực gắn kết của phân tử globulin miễn dịch với thụ thể Fc nêu trên làm giảm chức năng tác động của phân tử globulin miễn dịch. Theo phương án cụ thể, chức năng tác động nêu trên là tính gây độc tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC). Theo một phương án, ADCC được làm giảm xuống ít hơn 20% ADCC được cảm ứng bởi phân tử globulin miễn dịch tương ứng không có cải biến này. Chức năng tác động của globulin miễn dịch hoặc kháng thể có thể được xác định bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các ví dụ về thử nghiệm *in vitro* để đánh giá hoạt tính ADCC của phân tử đang quan tâm được mô tả

trong patent Mỹ số US 5,500,362; Hellstrom et al. Proc Natl Acad Sci USA 83, 7059-7063 (1986) và Hellstrom et al., Proc Natl Acad Sci USA 82, 1499-1502 (1985); patent Mỹ số US 5,821,337; Bruggemann et al., J Exp Med 166, 1351-1361 (1987). Theo một cách khác, phương pháp thử nghiệm không có hoạt tính phóng xạ có thể được sử dụng (xem, ví dụ, thử nghiệm tính gây độc tế bào không có hoạt tính phóng xạ ACTI™ để đo lường tế bào dòng chảy (CellTechnology, Inc. Mountain View, CA); và thử nghiệm tính gây độc tế bào không có hoạt tính phóng xạ CytoTox 96® (Promega, Madison, WI)). Các tế bào tác động hữu ích dùng cho các thử nghiệm này bao gồm tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC) và tế bào tiêu diệt tự nhiên (NK). Theo một cách khác, hoặc ngoài ra, hoạt tính ADCC của phân tử đang quan tâm có thể được đánh giá *in vivo*, ví dụ, trong mô hình động vật như được bộc lộ trong Clynes et al., Proc Natl Acad Sci USA 95, 652-656 (1998). Theo một số phương án, khả năng gắn kết của phân tử globulin miễn dịch với thành phần bổ sung, cụ thể là C1q, cũng được làm giảm. Do đó, tính gây độc tế bào phụ thuộc thành phần bổ sung (CDC) cũng có thể được làm giảm. Thử nghiệm khả năng gắn kết với C1q có thể được tiến hành để xác định liệu rằng globulin miễn dịch có khả năng gắn kết với C1q hay không và do đó có hoạt tính CDC hay không. Xem ví dụ, ELISA gắn kết C1q và C3c trong WO 2006/029879 và WO 2005/100402. Để đánh giá hoạt tính bổ sung, thử nghiệm CDC có thể được thực hiện (xem, ví dụ, Gazzano-Santoro et al., J Immunol Methods 202, 163 (1996); Cragg et al., Blood 101, 1045-1052 (2003); và Cragg and Glennie, Blood 103, 2738-2743 (2004)).

Ngoài phân tử globulin miễn dịch được mô tả trên đây và trong công bố đơn PCT số WO 2012/130831, các globulin miễn dịch có khả năng gắn kết với thụ thể Fc và/hoặc chức năng tác động giảm cũng bao gồm các globulin miễn dịch có đột biến thay thế một hoặc nhiều gốc vùng Fc 238, 265, 269, 270, 297, 327 và 329 (patent Mỹ số 6,737,056). Các thể đột biến Fc này bao gồm thể đột biến Fc có đột biến thay thế ở hai hoặc nhiều vị trí axit amin 265, 269, 270, 297 và 327, bao gồm thể đột biến Fc còn gọi là “DANA” với đột biến thay thế các gốc 265 và 297 cho alanin (patent Mỹ số 7,332,581).

Các globulin miễn dịch phân lớp IgG₄ có ái lực gắn kết với thụ thể Fc giảm và chức năng tác động giảm so với globulin miễn dịch IgG₁. Do đó, theo một số phương án, phân tử globulin miễn dịch nêu trên được chứa trong protein dung hợp theo sáng chế là globulin miễn dịch phân lớp IgG₄, đặc biệt là globulin miễn dịch phân lớp IgG₄ của người. Theo một phương án, globulin miễn dịch phân lớp IgG₄ nêu trên chứa các đột biến thay thế axit amin trong vùng Fc ở vị trí S228 (đánh số theo EU), cụ thể là đột biến thay thế axit amin S228P. Để làm giảm hơn nữa ái lực gắn kết của nó với thụ thể Fc và/hoặc chức năng tác động của nó, Theo một phương án, globulin miễn dịch phân lớp IgG₄ chứa đột biến thay thế axit amin ở vị trí L235, cụ thể là đột biến thay thế axit amin L235E (đánh số theo EU). Theo một phương án khác, globulin miễn dịch phân lớp IgG₄ nêu trên chứa đột biến thay thế axit amin ở vị trí P329, cụ thể là đột biến thay thế axit amin P329G (đánh số theo EU). Theo một phương án cụ thể, globulin miễn dịch phân lớp IgG₄ nêu trên chứa đột biến thay thế axit amin ở vị trí S228, L235 và P329, cụ thể là đột biến thay thế axit amin S228P, L235E và P329G (đánh số theo EU). Globulin miễn dịch phân lớp IgG₄ được cải biến này và các tính chất gắn kết với thụ thể Fc γ của chúng được mô tả trong công bố đơn PCT số WO 2012/130831, được đưa vào đây để tham khảo.

Theo một phương án, phân tử globulin miễn dịch nêu trên có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên. Theo một phương án, phân tử globulin miễn dịch nêu trên là kháng thể đơn dòng. Theo một phương án, phân tử globulin miễn dịch nêu trên không có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên, đặc biệt là không có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên ở người. Việc không có gắn kết đặc hiệu của phân tử globulin miễn dịch này với kháng nguyên (tức là không có sự gắn kết bất kỳ mà có thể được phân biệt với tương tác không đặc hiệu) có thể được xác định bằng, ví dụ, ELISA hoặc cộng hưởng plasmon bề mặt như được mô tả ở đây. Phân tử globulin miễn dịch này đặc biệt hữu ích để, ví dụ, tăng cường thời gian bán thải huyết thanh của protein dung hợp, khi việc hướng đích đến mô cụ thể không được mong muốn.

Theo một phương án, phân tử globulin miễn dịch nêu trên chứa trình tự vùng biến đổi của chuỗi nặng dựa trên trình tự dòng mầm Vh3-23 ở người. Theo phương án cụ thể, phân tử globulin miễn dịch nêu trên chứa trình tự vùng biến đổi của chuỗi nặng

mà có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với trình tự của SEQ ID NO: 9. Theo một phương án, phân tử globulin miễn dịch nêu trên chứa trình tự vùng biến đổi của chuỗi nhẹ dựa trên trình tự dòng mầm Vk3-20 ở người. Theo phương án cụ thể, phân tử globulin miễn dịch nêu trên chứa trình tự vùng biến đổi của chuỗi nhẹ mà có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với trình tự của SEQ ID NO: 11. Theo một phương án cụ thể hơn nữa, phân tử globulin miễn dịch nêu trên chứa trình tự vùng biến đổi của chuỗi nặng là SEQ ID NO: 9 và trình tự vùng biến đổi của chuỗi nhẹ là SEQ ID NO: 11. Phân tử globulin miễn dịch chứa các trình tự vùng biến đổi này không có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên, đặc biệt là kháng nguyên ở người. Chúng thiếu khả năng gắn kết với các mô bình thường cũng như PBMC, không có tính đa phản ứng và không thể hiện sự tích tụ không đặc hiệu *in vivo* bằng cách chụp hình (dữ liệu không được thể hiện). Trình tự vùng biến đổi hoàn toàn dựa trên trình tự dòng mầm ở người, ngoại trừ CDR 3 của chuỗi nặng trong đó trình tự GSG được đưa vào để tạo ra globulin miễn dịch không gắn kết.

Theo một phương án, phân tử IL-2 đột biến nêu trên chứa đột biến axit amin ở vị trí tương ứng với gốc 88 của IL-2 ở người (SEQ ID NO: 1). Theo một phương án, đột biến axit amin nêu trên là đột biến thay thế axit amin. Theo một phương án cụ thể hơn, đột biến thay thế axit amin nêu trên được chọn từ nhóm bao gồm N88D, N88R, N88I, và N88G. Theo một phương án cụ thể, đột biến thay thế axit amin nêu trên là N88D. Theo một phương án, phân tử IL-2 đột biến nêu trên là phân tử IL-2 ở người. Theo phương án cụ thể, phân tử IL-2 đột biến nêu trên chứa trình tự là SEQ ID NO: 60 (IL-2 N88D). Theo một phương án, phân tử IL-2 đột biến nêu trên chỉ chứa một đột biến axit amin làm giảm ái lực của phân tử IL-2 đột biến với thụ thể IL-2 ái lực trung bình, so với phân tử IL-2 kiểu dại. Theo một phương án, phân tử IL-2 đột biến nêu trên không chứa đột biến axit amin làm thay đổi ái lực của phân tử IL-2 đột biến với thụ thể IL-2 ái lực cao, so với phân tử IL-2 kiểu dại. Theo một phương án, phân tử IL-2 đột biến nêu trên chỉ chứa duy nhất một đột biến axit amin làm thay đổi ái lực của phân tử IL-2 đột biến với thụ thể IL-2, so với phân tử IL-2 kiểu dại.

Theo một phương án, phân tử IL-2 đột biến nêu trên còn chứa đột biến thay thế axit amin ở vị trí tương ứng với gốc 125 của IL-2 ở người. Theo một phương án, đột biến thay thế axit amin nêu trên là C125A. Theo phương án cụ thể, phân tử IL-2 đột biến nêu trên chứa trình tự là SEQ ID NO: 62 (IL-2 N88D với đột biến thay thế axit amin C125A). Theo một cách khác, xystein ở vị trí 125 có thể được thay thế bằng một axit amin trung tính khác như serin, threonin hoặc valin, lần lượt thu được C125S IL-2, C125T IL-2 hoặc C125V IL-2, như được mô tả trong patent Mỹ số US 4,518,584. Như được mô tả trong đó, axit amin còn có thể làm khuyết gốc analin đầu tận cùng N của IL-2 thu được các thể đột biến như vậy ở dạng des-A1 C125S hoặc des-A1 C125A. Theo một cách khác hoặc tiếp nối, phân tử IL-2 có thể bao gồm đột biến mà từ đó metionin thường xuất hiện ở vị trí 104 của IL-2 ở người kiểu dại được thay thế bằng axit amin trung tính như alanin (xem patent Mỹ số US 5,206,344). Các cải biến ở IL-2 ở người có thể tạo ra các ưu điểm khác như gia tăng sự biểu hiện hoặc độ ổn định.

Phân tử IL-2 đột biến được chứa trong protein dung hợp theo sáng chế cũng có thể là phân tử IL-2 không được glycosyl hóa. Ví dụ, việc loại bỏ vị trí O-glycosyl hóa của phân tử IL-2 thu được sản phẩm đồng nhất hơn khi protein dung hợp được biểu hiện ở tế bào động vật có vú như tế bào CHO hoặc HEK. Do đó, theo một số phương án nhất định, phân tử IL-2 đột biến còn chứa cải biến loại bỏ vị trí O-glycosyl hóa của IL-2 ở vị trí tương ứng với gốc 3 của IL-2 ở người. Theo một phương án, cải biến nêu trên loại bỏ vị trí O-glycosyl hóa của IL-2 ở vị trí tương ứng với gốc 3 của IL-2 ở người là đột biến thay thế axit amin. Các đột biến thay thế axit amin được lấy làm ví dụ minh họa bao gồm T3A, T3G, T3Q, T3E, T3N, T3D, T3R, T3K, và T3P. Theo một phương án cụ thể, cải biến nêu trên là đột biến thay thế axit amin T3A. Theo phương án cụ thể, phân tử IL-2 đột biến nêu trên chứa trình tự là SEQ ID NO: 64 (IL-2 T3A N88D).

Theo một phương án cụ thể, phân tử IL-2 đột biến chứa đột biến thay thế axit amin T3A, N88D và C125A. Theo phương án cụ thể, phân tử IL-2 đột biến nêu trên chứa trình tự là SEQ ID NO: 58 (IL-2 T3A N88D C125A).

Theo một phương án, khả năng gắn kết của protein dung hợp theo sáng chế với thụ thể IL-2 $\beta\gamma$ giảm ít nhất 1,5 lần, tốt hơn là ít nhất 2 lần hoặc ít nhất 3 lần so với khả năng gắn kết của protein dung hợp tương ứng chứa hai phân tử IL-2 kiểu đại với thụ thể IL-2 $\beta\gamma$. Theo một phương án, protein dung hợp theo sáng chế gắn kết với thụ thể IL-2 $\beta\gamma$ với hằng số ái lực (K_D) cao hơn ít nhất 2 lần so với K_D của protein dung hợp tương ứng chứa hai phân tử IL-2 kiểu đại, khi được đo bằng SPR ở nhiệt độ 25°C. Theo phương án cụ thể, thụ thể IL-2 $\beta\gamma$ nêu trên là thụ thể IL-2 $\beta\gamma$ ở người. Theo một phương án, khả năng gắn kết của protein dung hợp theo sáng chế với thụ thể IL-2 α khoảng bằng khả năng gắn kết của protein dung hợp tương ứng chứa hai phân tử IL-2 kiểu đại với thụ thể IL-2 α . Theo một phương án, protein dung hợp theo sáng chế gắn kết với thụ thể IL-2 α với hằng số ái lực (K_D) khoảng bằng K_D của protein dung hợp tương ứng chứa hai phân tử IL-2 kiểu đại, khi được đo bằng SPR ở nhiệt độ 25°C. Theo một phương án cụ thể, thụ thể IL-2 α này là thụ thể IL-2 α ở người. Phương pháp đo ái lực gắn kết với thụ thể IL-2 $\beta\gamma$ hoặc thụ thể IL-2 α bằng SPR được mô tả ở đây. Theo một phương án, ái lực gắn kết (K_D) được đo bằng kỹ thuật cộng hưởng plasmon bề mặt bằng cách sử dụng máy BIACORE® T200 (GE Healthcare) ở nhiệt độ 25°C có các thụ thể IL-2 được cố định trên chip CM5 hoặc Streptavidin. Hằng số ái lực (K_D) được tính là tỷ lệ k_{off}/k_{on} . Xem, ví dụ, Chen et al., J Mol Biol 293, 865-881 (1999).

Theo một phương án cụ thể, sáng chế đề xuất protein dung hợp chứa (i) phân tử globulin miễn dịch phân lớp IgG₁ chứa đột biến thay thế axit amin L234A, L235A và P329G (đánh số theo EU) trong chuỗi nặng của globulin miễn dịch, và (ii) hai phân tử interleukin-2 (IL-2) đột biến chứa đột biến thay thế axit amin N88D, mỗi phân tử được dung hợp tại axit amin ở đầu tận cùng N của nó với axit amin ở đầu tận cùng C của một trong các chuỗi nặng của globulin miễn dịch thông qua tác nhân liên kết peptit. Theo một phương án, phân tử globulin miễn dịch nêu trên và phân tử IL-2 nêu trên là người. Theo phương án cụ thể, phân tử globulin miễn dịch nêu trên chứa trình tự vùng biến đổi của chuỗi nặng là SEQ ID NO: 9 và trình tự vùng biến đổi của chuỗi nhẹ là SEQ ID NO: 11. Theo một phương án cụ thể khác, mỗi phân tử IL-2 nêu trên chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO: 58. Theo phương án khác, tác nhân liên kết peptit nêu trên chứa trình tự axit amin (G₄S)₃ (SEQ ID NO: 66). Theo một phương án cụ thể hơn nữa,

protein dung hợp nêu trên chứa trình tự polypeptit có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng khoảng 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với trình tự của SEQ ID NO: 50, và có độ tương đồng trình tự polypeptit ít nhất bằng khoảng 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với trình tự SEQ ID NO: 19.

Như được thể hiện trong các ví dụ, protein dung hợp theo sáng chế hoạt hóa chọn lọc các tế bào T điều hòa (tức là gần như không hoạt hóa đồng thời các tập hợp con tế bào T khác và/hoặc tế bào tiêu diệt tự nhiên (NK)). Do đó, theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất protein dung hợp chứa phân tử globulin miễn dịch và hai phân tử IL-2 đột biến, trong đó protein dung hợp nêu trên hoạt hóa chọn lọc các tế bào T điều hòa so với các tế bào T tác động và tế bào NK, đặc biệt là so với tế bào T CD4⁺ thông thường, tế bào T CD8⁺ và tế bào NK. Theo một phương án, protein dung hợp nêu trên hoạt hóa các tế bào T điều hòa nhiều hơn ít nhất 10 lần, ít nhất 100 lần hoặc ít nhất 1000 lần so với các tế bào T tác động và tế bào NK. Theo một phương án, protein dung hợp nêu trên hoạt hóa chọn lọc các tế bào T điều hòa so với tế bào T ghi nhớ CD4⁺ thông thường. Theo một phương án, protein dung hợp nêu trên hoạt hóa các tế bào T điều hòa nhiều hơn ít nhất 10 lần, ít nhất 100 lần hoặc ít nhất 1000 lần so với các tế bào T ghi nhớ CD4⁺ thông thường. Theo một phương án, mức độ hoạt hóa này được xác định bằng cách đo mức độ phosphoryl hóa STAT nội bào, đặc biệt là STAT5. Theo một phương án, việc đo mức độ phosphoryl hóa STAT nội bào được thực hiện bằng kỹ thuật phân tích đo dòng tế bào. Theo một phương án, giá trị EC₅₀ của protein dung hợp nêu trên để cảm ứng sự truyền tín hiệu của thụ thể IL-2 trong các tế bào T điều hòa thấp hơn ít nhất 10 lần, ít nhất 100 lần hoặc ít nhất 1000 lần so với giá trị EC₅₀ của nó để cảm ứng sự truyền tín hiệu của thụ thể IL-2 trong các tế bào T tác động và tế bào NK. Theo một phương án, việc cảm ứng sự truyền tín hiệu của thụ thể IL-2 nêu trên là sự cảm ứng sự phosphoryl hóa STAT. Theo một phương án, giá trị EC₅₀ của protein dung hợp nêu trên để cảm ứng sự truyền tín hiệu của thụ thể IL-2 trong các tế bào T điều hòa thấp hơn ít nhất 10 lần, ít nhất 100 lần hoặc ít nhất 1000 lần so với giá trị EC₅₀ của nó để cảm ứng sự truyền tín hiệu của thụ thể IL-2 trong tế bào T ghi nhớ CD4⁺ thông thường. Theo một phương án, việc cảm ứng sự truyền tín hiệu của thụ thể IL-2 nêu trên là cảm ứng sự phosphoryl hóa STAT.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đặc biệt đề xuất protein dung hợp để sử dụng để hoạt hóa chọn lọc các tế bào T điều hòa *in vitro* hoặc *in vivo*. Theo một phương án, việc sử dụng này bao gồm bước cho các tế bào T điều hòa tiếp xúc với protein dung hợp nêu trên *in vitro* hoặc *in vivo*. Theo một phương án, việc sử dụng này còn bao gồm việc cho các tế bào T (không điều hòa) khác tiếp xúc với protein dung hợp nêu trên. Theo một phương án, việc sử dụng này là *in vitro* và protein dung hợp nêu trên được sử dụng ở nồng độ bằng khoảng 10ng/mL hoặc thấp hơn, đặc biệt là bằng khoảng 1ng/mL hoặc thấp hơn. Theo một phương án khác, việc sử dụng này là *in vivo* và protein dung hợp nêu trên được sử dụng ở liều bằng khoảng 100µg/kg trọng lượng cơ thể hoặc thấp hơn, đặc biệt là bằng khoảng 25µg/kg trọng lượng cơ thể hoặc thấp hơn, đặc biệt hơn là khoảng 10µg/kg trọng lượng cơ thể hoặc thấp hơn (trong đó “trọng lượng cơ thể” được dùng để chỉ trọng lượng cơ thể của cá thể dùng protein dung hợp được dùng cho cá thể đó).

Sáng chế còn đề xuất phương pháp hoạt hóa chọn lọc các tế bào T điều hòa *in vitro* hoặc *in vivo*, bao gồm bước cho các tế bào T điều hòa này tiếp xúc với protein dung hợp theo sáng chế. Theo một phương án, phương pháp nêu trên còn bao gồm bước cho các tế bào T (không điều hòa) khác tiếp xúc với protein dung hợp nêu trên. Theo một phương án, phương pháp hoạt hóa này bao gồm việc cảm ứng sự tăng sinh và/hoặc cảm ứng sự truyền tín hiệu của thụ thể IL-2. Theo một phương án, phương pháp nêu trên là *in vitro* và protein dung hợp nêu trên được sử dụng ở nồng độ bằng khoảng 10ng/mL hoặc thấp hơn, đặc biệt là bằng khoảng 1ng/mL hoặc thấp hơn. Theo một phương án khác, phương pháp nêu trên là *in vivo* và protein dung hợp nêu trên được sử dụng ở liều bằng khoảng 100µg/kg trọng lượng cơ thể hoặc thấp hơn, đặc biệt là bằng khoảng 25µg/kg trọng lượng cơ thể hoặc thấp hơn, đặc biệt hơn là khoảng 10µg/kg trọng lượng cơ thể hoặc thấp hơn (trong đó “trọng lượng cơ thể” được dùng để chỉ trọng lượng cơ thể của cá thể mà protein dung hợp được áp dụng cho cá thể đó).

Theo các phương án nhất định về protein dung hợp, việc sử dụng hoặc phương pháp được mô tả trong các đoạn nêu trên, phương pháp hoạt hóa này bao gồm việc cảm ứng sự tăng sinh của các tế bào T điều hòa và/hoặc cảm ứng sự truyền tín hiệu của thụ thể IL-2 trong các tế bào T điều hòa. Việc cảm ứng sự tăng sinh có thể được xác định

bằng cách, ví dụ, phát hiện gen đánh dấu tăng sinh nội bào Ki-67, như được mô tả trong các ví dụ. Theo một phương án, mức độ tăng sinh các tế bào T điều hòa được hoạt hóa bằng protein dung hợp theo sáng chế tăng lên ít nhất khoảng 1,5 lần, ít nhất khoảng 2 lần, hoặc ít nhất khoảng 3 lần, so với mức độ tăng sinh của các tế bào T điều hòa không được hoạt hóa. Theo một phương án, mức độ tăng sinh của các tế bào T (không điều hòa) khác và/hoặc tế bào NK tiếp xúc với protein dung hợp theo sáng chế tăng lên ít hơn khoảng 1,5 lần, ít hơn khoảng 1,2 lần, hoặc ít hơn khoảng 1,1 lần, so với mức độ tăng sinh của các tế bào tương ứng không tiếp xúc với protein dung hợp nêu trên. Việc cảm ứng sự truyền tín hiệu của thụ thể IL-2 có thể được xác định bằng cách, ví dụ, phát hiện STAT5 được phosphoryl hóa, như được mô tả trong các ví dụ. Theo một phương án, mức độ truyền tín hiệu thụ thể IL-2 trong tế bào T điều hòa được hoạt hóa bằng protein dung hợp theo sáng chế tăng lên ít nhất khoảng 1,5 lần, ít nhất khoảng 2 lần, ít nhất khoảng 3 lần, hoặc ít nhất khoảng 5 lần, so với mức độ truyền tín hiệu thụ thể IL-2 trong các tế bào T điều hòa không được hoạt hóa. Theo một phương án, mức độ truyền tín hiệu thụ thể IL-2 trong tế bào T (không điều hòa) khác và/hoặc tế bào NK tiếp xúc với protein dung hợp hoặc sáng chế tăng lên ít hơn khoảng 1,5 lần, hoặc ít hơn khoảng 1,2 lần, hoặc ít hơn khoảng 1,1 lần, so với mức độ truyền tín hiệu thụ thể IL-2 trong các tế bào tương ứng không được tiếp xúc với protein dung hợp nêu trên.

Polynucleotit

Sáng chế còn đề xuất polynucleotit mã hóa quá trình dung hợp như được mô tả ở đây hoặc mảnh của nó.

Polynucleotit theo sáng chế bao gồm các polynucleotit có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng khoảng 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với các trình tự nêu trong SEQ ID NO 10, 12, 20, 51, 59, 61, 63 và 65 bao gồm các mảnh chức năng hoặc biến thể của chúng.

Polynucleotit mã hóa protein dung hợp theo sáng chế có thể được biểu hiện ở dạng polynucleotit duy nhất mã hóa toàn bộ protein dung hợp hoặc ở dạng nhiều (ví dụ, hai hoặc nhiều) polynucleotit được đồng biểu hiện. Polypeptit được mã hóa bằng polynucleotit được đồng biểu hiện có thể kết hợp thông qua, ví dụ, liên kết disulfua

hoặc phương tiện khác để tạo ra protein dung hợp chức năng. Ví dụ, phần chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch có thể được mã hóa bằng polynucleotit riêng rẽ từ phần chuỗi nặng của globulin miễn dịch. Khi được đồng biểu hiện, polypeptit của chuỗi nặng sẽ kết hợp với polypeptit của chuỗi nhẹ để tạo ra globulin miễn dịch.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất polynucleotit mã hóa protein dung hợp của phân tử globulin miễn dịch và hai phân tử IL-2, hoặc mảnh của nó, trong đó polynucleotit này chứa trình tự mã hóa trình tự vùng biến đổi như được thể hiện trong SEQ ID NO 9 hoặc 11. Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất polynucleotit mã hóa protein dung hợp của phân tử globulin miễn dịch và hai phân tử IL-2, hoặc mảnh của nó, trong đó polynucleotit này chứa trình tự mã hóa trình tự polypeptit như được thể hiện trong SEQ ID NO 19 hoặc 50. Theo một phương án khác, sáng chế còn đề xuất polynucleotit mã hóa protein dung hợp của phân tử globulin miễn dịch và hai phân tử IL-2, hoặc mảnh của nó, trong đó polynucleotit này chứa trình tự có độ đồng nhất trình tự ít nhất khoảng 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% với trình tự axit nucleic được thể hiện trong SEQ ID NO 10, 12, 20, 51, 59, 61, 63 hoặc 65. Theo một phương án khác nữa, sáng chế đề xuất polynucleotit mã hóa protein dung hợp của phân tử globulin miễn dịch và hai phân tử IL-2, hoặc mảnh của nó, trong đó polynucleotit này chứa trình tự axit nucleic được thể hiện trong SEQ ID NO 10, 12, 20, 51, 59, 61, 63 hoặc 65. Theo một phương án khác nữa, sáng chế đề xuất polynucleotit mã hóa protein dung hợp của phân tử globulin miễn dịch và hai phân tử IL-2, hoặc mảnh của nó, trong đó polynucleotit này chứa trình tự mã hóa trình tự vùng biến đổi có độ mà có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng khoảng 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% với trình tự axit amin của SEQ ID NO 9 hoặc 11. Theo một phương án khác nữa, sáng chế đề xuất polynucleotit mã hóa protein dung hợp của phân tử globulin miễn dịch và hai phân tử IL-2, hoặc mảnh của nó, trong đó polynucleotit này chứa trình tự mã hóa trình tự polypeptit mà có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% với trình tự axit amin của SEQ ID NO 19 hoặc 50. Sáng chế bao gồm polynucleotit mã hóa protein dung hợp của phân tử globulin miễn dịch và hai phân tử IL-2, hoặc mảnh của nó, trong đó polynucleotit này chứa trình tự mã hóa trình tự vùng biến đổi của SEQ ID NO 9 hoặc 11 có các đột biến

thay thế axit amin bảo toàn. Sáng chế còn bao gồm polynucleotit mã hóa protein dung hợp của phân tử globulin miễn dịch và hai phân tử IL-2, hoặc mảnh của nó, trong đó polynucleotit này chứa trình tự mã hóa trình tự polypeptit của SEQ ID NO. 19 hoặc 50 có các đột biến thay thế axit amin bảo toàn.

Theo một số phương án nhất định, polynucleotit hoặc axit nucleic là ADN. Theo các phương án khác, polynucleotit theo sáng chế là ARN, ví dụ, ở dạng ARN thông tin (mARN). ARN theo sáng chế có thể là chuỗi đơn hoặc chuỗi kép.

Phương pháp tái tổ hợp

Protein dung hợp theo sáng chế có thể thu được, ví dụ, bằng cách tổng hợp peptit ở trạng thái rắn (ví dụ, tổng hợp pha rắn Merrifield) hoặc sản xuất tái tổ hợp. Để sản xuất tái tổ hợp một hoặc nhiều polynucleotit mã hóa protein dung hợp (phần), ví dụ, như được mô tả trên đây, được phân lập và được xen vào một hoặc nhiều vector để tách dòng và/hoặc biểu hiện thêm trong tế bào chủ. Polynucleotit này có thể dễ dàng được phân lập và giải trình tự bằng cách sử dụng các quy trình thông thường. Theo một phương án, sáng chế đề xuất vector, tốt hơn là vector biểu hiện, chứa một hoặc nhiều polynucleotit. Phương pháp đã biết rõ đối với chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể được sử dụng để cấu trúc vector biểu hiện chứa trình tự mã hóa của protein dung hợp (phần) cùng với các tín hiệu kiểm soát phiên mã/dịch mã thích hợp. Các phương pháp này bao gồm kỹ thuật ADN tái tổ hợp *in vitro*, kỹ thuật tổng hợp và tái tổ hợp *in vivo*/tái tổ hợp di truyền. Xem, ví dụ, các kỹ thuật được mô tả trong Maniatis et al., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. (1989); và Ausubel et al., CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. (1989). Vector biểu hiện có thể là một phần của plasmit, virus, hoặc có thể là phần axit nucleic. Vector biểu hiện bao gồm cát-xét biểu hiện mà polynucleotit mã hóa protein dung hợp (phần) (tức là vùng mã hóa) được tách dòng trong quá trình liên kết có điều khiển với gen khởi đầu và/hoặc thành phần kiểm soát phiên mã hoặc dịch mã khác. Như được sử dụng trong bản mô tả, "vùng mã hóa" là một phần của axit nucleic gồm các codon được dịch mã thành axit amin. Mặc dù "codon kết thúc" (TAG, TGA, hoặc TAA) không được dịch

mã thành axit amin, nó có thể được coi là một phần của vùng mã hóa, nếu có, nhưng trình tự bên sườn bất kỳ, ví dụ, gen khởi đầu, vị trí gắn kết ribosom, đầu cuối phiên mã, intron, vùng không được dịch mã 5' và 3', và vùng tương tự, không phải một phần của vùng mã hóa. Hai hoặc nhiều vùng mã hóa có thể có mặt trong cấu trúc polynucleotit đơn, ví dụ, trên vector đơn, hoặc trong các cấu trúc polynucleotit riêng rẽ, ví dụ, trên các vector (khác nhau) riêng rẽ. Hơn nữa, vector bất kỳ có thể chứa vùng mã hóa đơn, hoặc có thể chứa hai hoặc nhiều vùng mã hóa, ví dụ, vector theo sáng chế có thể mã hóa một hoặc nhiều polypeptit, được tách sau dịch mã hoặc đồng dịch mã thành các protein cuối cùng thông qua phân tách protein phân giải. Ngoài ra, vector, polynucleotit, hoặc axit nucleic theo sáng chế có thể mã hóa các vùng mã hóa khác loại, được dung hợp hoặc không được dung hợp với polynucleotit mã hóa protein dung hợp (phần) theo sáng chế, hoặc biến thể hoặc dẫn xuất của nó. Các vùng mã hóa khác loại bao gồm, nhưng không giới hạn, các thành phần hoặc mô-típ được cụ thể hóa, như peptit tín hiệu bài tiết hoặc miền chức năng khác loại. Sự liên kết có điều khiển được là khi vùng mã hóa sản phẩm gen, ví dụ, polypeptit, có liên quan đến một hoặc nhiều trình tự điều hòa theo cách để biểu hiện sản phẩm gen dưới sự ảnh hưởng hoặc kiểm soát của (các) trình tự điều hòa. Hai mảnh ADN (như vùng mã hóa polypeptit và gen khởi đầu được kết hợp với nó) "được liên kết có điều khiển" nếu sự cảm ứng của chức năng gen khởi đầu tạo ra sự phiên mã mRNA mã hóa sản phẩm gen mong muốn và nếu bản chất của liên kết giữa hai phần ADN không can thiệp vào khả năng định hướng biểu hiện của sản phẩm gen của trình tự điều hòa biểu hiện hoặc can thiệp vào khả năng được phiên mã của mẫu ADN. Do đó, vùng gen khởi đầu được liên kết có điều khiển với axit nucleic mã hóa polypeptit nếu gen khởi đầu này có khả năng ảnh hưởng đến sự phiên mã của axit nucleic này. Gen khởi đầu có thể là gen khởi đầu đặc hiệu tế bào định hướng sự phiên mã chính của ADN chỉ ở các tế bào được xác định trước. Các thành phần kiểm soát sự phiên mã khác, ngoài gen khởi đầu, ví dụ, gen tăng cường, gen thực hiện, gen kìm hãm, và tín hiệu kết thúc phiên mã, có thể được liên kết có điều khiển với polynucleotit để định hướng sự phiên mã đặc hiệu tế bào. Các gen khởi đầu thích hợp và các vùng kiểm soát phiên mã khác được bộc lộ ở đây. Các vùng kiểm soát phiên mã khác nhau đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các vùng này bao

gồm, nhưng không giới hạn ở, vùng kiểm soát phiên mã, có chức năng trong các tế bào động vật có xương sống, như, nhưng không giới hạn ở, đoạn gen khởi đầu và gen tăng cường từ xytomegalovirut (ví dụ, gen khởi đầu sớm tức thời, liên hợp với intron-A), virut khỉ không đuôi 40 (ví dụ, gen khởi đầu sớm), và retrovirut (như, ví dụ, virut sarcom Rous). Các vùng kiểm soát phiên mã khác bao gồm các vùng có nguồn gốc từ gen động vật có xương sống như actin, protein sốc nhiệt, hormon sinh trưởng bò và â-globin thỏ, cũng như các trình tự khác có khả năng kiểm soát sự biểu hiện gen trong các tế bào nhân chuẩn. Các vùng kiểm soát phiên mã thích hợp khác bao gồm gen khởi đầu và gen tăng cường đặc hiệu mô cũng như gen khởi đầu cảm ứng được (ví dụ, gen khởi đầu cảm ứng được tetracyclin). Tương tự, các thành phần kiểm soát dịch mã khác nhau đã biết đối với người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các thành phần này bao gồm, nhưng không giới hạn ở, vị trí gắn kết ribosom, codon bắt đầu và kết thúc dịch mã, và các thành phần có nguồn gốc từ hệ virut (cụ thể là vị trí vào của ribosom bên trong, hoặc IRES, còn được gọi là trình tự CITE). Cát-xét biểu hiện còn có thể bao gồm các dấu hiệu khác như gốc sao chép, và/hoặc thành phần kết hợp nhiễm sắc thể như kiểu lặp đoạn cuối dài của retrovirut (LTR), hoặc kiểu lặp đoạn cuối đảo ngược (ITR) của virut liên quan đến adeno (AAV).

Vùng mã hóa polynucleotit và axit nucleic theo sáng chế có thể liên quan đến các vùng mã hóa bổ sung mà mã hóa peptit tiết hoặc peptit tín hiệu, hướng sự tiết của polypeptit đã được mã hóa bởi polynucleotit theo sáng chế. Ví dụ, nếu sự tiết khi dung hợp được mong muốn, ADN mã hóa trình tự tín hiệu có thể được bố trí ngược dòng axit nucleic mã hóa protein dung hợp theo sáng chế hoặc mảnh của nó. Theo giả thiết tín hiệu, protein được tiết ra bởi tế bào động vật có vú có peptit tín hiệu hoặc trình tự gen dẫn hướng tiết được phân tách ra từ protein trưởng thành ngay khi xuất chuỗi protein sinh trưởng qua màng nội chất nhám được bắt đầu. Người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ nhận thức được rằng polypeptit được tiết ra bởi các tế bào động vật có xương sống thường có peptit tín hiệu được dung hợp với đầu tận cùng N của polypeptit, được phân tách từ polypeptit được dịch mã để sản sinh dạng được tiết hoặc "trưởng thành" của polypeptit. Theo một số phương án nhất định, peptit tín hiệu tự nhiên, ví dụ, peptit tín hiệu của chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ của globulin

miễn dịch được sử dụng, hoặc dẫn xuất chức năng của trình tự đó giữ được khả năng định hướng sự tiết của polypeptit được liên kết có điều khiển với nó. Theo một cách khác, peptit tín hiệu của động vật có vú khác loại, hoặc dẫn xuất chức năng của nó, có thể được sử dụng. Ví dụ, trình tự gen dẫn hướng kiểu đại có thể được thay thế bằng trình tự gen dẫn hướng của gen hoạt hóa plasminogen mô người (TPA) hoặc β -glucuronidaza ở chuột nhắt. Trình tự axit amin và trình tự nucleotit của peptit tín hiệu bài tiết được lấy làm ví dụ được thể hiện trong SEQ ID NO 39-47.

ADN mã hóa trình tự protein ngắn mà có thể được sử dụng để tạo điều kiện thuận lợi cho quá trình tinh chế sau này (ví dụ, đuôi histidin) hoặc hỗ trợ trong việc đánh dấu protein dung hợp có thể được bao gồm trong hoặc ở cuối của polynucleotit mã hóa protein dung hợp (phần).

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất tế bào chủ chứa một hoặc nhiều polynucleotit. Theo một số phương án nhất định, tế bào chủ chứa một hoặc nhiều vector theo sáng chế được đề xuất. Polynucleotit và vector này có thể kết hợp dấu hiệu bất kỳ trong số các dấu hiệu này, một mình hoặc kết hợp, được mô tả ở đây lần lượt liên quan đến polynucleotit và vector. Theo một phương án, tế bào chủ chứa (ví dụ, được biến nạp hoặc chuyển nhiễm với) vector chứa polynucleotit mã hóa (một phần) protein dung hợp theo sáng chế. Như được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ "tế bào chủ" được dùng để chỉ loại bất kỳ của hệ tế bào có thể được xử lý kỹ thuật để tạo ra protein dung hợp theo sáng chế hoặc các mảnh của nó. Tế bào chủ thích hợp để sao chép và hỗ trợ sự biểu hiện của protein dung hợp là đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các tế bào này có thể được chuyển nhiễm hoặc tải nạp ở dạng thích hợp với vector biểu hiện cụ thể và lượng lớn các tế bào chứa vector có thể được sinh trưởng để nuôi cấy chất gây men phạm vi lớn để thu được lượng protein dung hợp đủ để ứng dụng lâm sàng. Các tế bào chủ thích hợp bao gồm các vi sinh vật nhân rải rác, như E. coli, hoặc các tế bào nhân chuẩn khác nhau, như tế bào buồng trứng chuột lang Trung Quốc (CHO), tế bào côn trùng, hoặc tế bào tương tự. Ví dụ, polypeptit có thể được sản sinh trong vi khuẩn đặc biệt là khi quá trình glycosyl hóa là không cần thiết. Sau khi biểu hiện, polypeptit có thể được phân lập từ hồ nhão chứa tế bào vi khuẩn trong phần hòa tan được và có thể được tinh chế thêm. Ngoài sinh vật chưa có nhân điển hình, các vi sinh vật nhân chuẩn

như nấm sợi hoặc nấm men là các vật chủ tách dòng hoặc biểu hiện thích hợp cho vector mã hóa polypeptit, bao gồm chủng nấm và nấm men kiểu con đường glycosyl hóa đã được “nhân hóa”, làm sản sinh polypeptit với kiểu glycosyl hóa ở người một phần hoặc đầy đủ. Xem Gerngross, Nat Biotech 22, 1409-1414 (2004), và Li et al., Nat Biotech 24, 210-215 (2006). Các tế bào chủ thích hợp để biểu hiện polypeptit (được glycosyl hóa) cũng có nguồn gốc từ sinh vật đa bào (sinh vật không xương sống và có xương sống). Các ví dụ về các tế bào sinh vật không có xương sống bao gồm tế bào thực vật và tế bào côn trùng. Nhiều chủng baculovirus được nhận biết có thể được sử dụng kết hợp với tế bào côn trùng, đặc biệt là để chuyển nhiễm các tế bào *Spodoptera frugiperda*. Môi trường nuôi cấy tế bào thực vật còn có thể được sử dụng làm vật chủ. Xem, ví dụ, patent Mỹ số 5,959,177, 6,040,498, 6,420,548, 7,125,978, và 6,417,429 (mô tả công nghệ PLANTIBODIES™ để sản xuất kháng thể ở thực vật chuyển gen). Tế bào sinh vật có xương sống còn có thể được sử dụng làm vật chủ. Ví dụ, dòng tế bào động vật có vú được làm thích hợp để sinh trưởng trong huyền phù có thể hữu ích. Các ví dụ khác về dòng tế bào chủ động vật có vú hữu ích là dòng CV1 thận khỉ được chuyển nhiễm bằng SV40 (COS-7); dòng thận phôi người (tế bào 293 hoặc 293T như được mô tả, ví dụ, trong Graham et al., J Gen Virol 36, 59 (1977)); tế bào thận chuột lang con (BHK), tế bào sertoli chuột nhắt (tế bào TM4 như được mô tả, ví dụ, trong Mather, Biol Reprod 23, 243-251 (1980)), tế bào thận khỉ (CV1), tế bào thận khỉ lông xanh Châu Phi (VERO-76), tế bào caxinom cổ tử cung người (HELA), tế bào thận chó (MDCK), tế bào gan chuột cống (BRL 3A), tế bào phổi người (W138), tế bào gan người (Hep G2), tế bào u vú chuột nhắt (MMT 060562), tế bào TRI (như được mô tả, ví dụ, trong Mather et al., Annals N.Y. Acad Sci 383, 44-68 (1982)), tế bào MRC 5, và tế bào FS4. Các dòng tế bào chủ động vật có vú hữu ích khác bao gồm tế bào buồng trứng chuột lang Trung Quốc (CHO), bao gồm tế bào dhfr-CHO (Urlaub et al., Proc Natl Acad Sci USA 77, 4216 (1980)); và dòng tế bào u tủy như YO, NS0, P3X63 và Sp2/0. Để tìm hiểu thêm về các dòng tế bào chủ động vật có vú đã biết thích hợp để sản xuất protein, xem, ví dụ, Yazaki and Wu, Methods in Molecular Biology, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), trang 255-268 (2003). Tế bào chủ bao gồm tế bào được nuôi cấy, ví dụ, tế bào động vật có vú được nuôi cấy, tế bào nấm men,

tế bào côn trùng, tế bào vi khuẩn và tế bào thực vật, chỉ kể tên một số, nhưng bao gồm cả các tế bào có trong động vật chuyển gen, thực vật chuyển gen hoặc cây canh tác hoặc mô động vật. Theo một phương án, tế bào chủ là tế bào nhân chuẩn, tốt hơn là tế bào động vật có vú, như tế bào buồng trứng chuột lang Trung Quốc (CHO), tế bào thận phôi người (HEK) hoặc tế bào bạch huyết (ví dụ, tế bào Y0, NS0, Sp20).

Các công nghệ chuẩn để biểu hiện gen ngoại lai trong các hệ này là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các tế bào biểu hiện polypeptit chứa chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch, có thể được xử lý kỹ thuật sao cho cũng biểu hiện chuỗi còn lại trong các chuỗi globulin miễn dịch sao cho sản phẩm được biểu hiện là globulin miễn dịch có cả chuỗi nặng và chuỗi nhẹ.

Theo một phương án, phương pháp sản xuất protein dung hợp theo sáng chế được đề xuất, trong đó phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ chứa polynucleotit mã hóa protein dung hợp, như được đề xuất ở đây, trong các điều kiện thích hợp để biểu hiện protein dung hợp, và thu hồi protein dung hợp từ tế bào chủ (hoặc môi trường nuôi cấy tế bào chủ).

Trong protein dung hợp theo sáng chế, các thành phần (phân tử globulin miễn dịch và phân tử IL-2) được dung hợp theo phương pháp di truyền với nhau. Protein dung hợp có thể được thiết kế sao cho các thành phần của nó được dung hợp trực tiếp với nhau hoặc gián tiếp thông qua trình tự liên kết. Chế phẩm và độ dài tác nhân liên kết có thể được xác định theo phương pháp đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này và có thể được thử nghiệm về tính hiệu quả. Các trình tự bổ sung còn có thể được bao gồm để kết hợp vị trí phân tách để tách các thành phần riêng rẽ của protein dung hợp nếu muốn, ví dụ, trình tự nhận diện endopeptidaza.

Theo một số phương án nhất định, protein dung hợp theo sáng chế chứa ít nhất một vùng biến đổi globulin miễn dịch có khả năng gắn kết với kháng nguyên. Vùng biến đổi có thể tạo thành một phần và có nguồn gốc từ kháng thể có trong tự nhiên hoặc không có trong tự nhiên và các mảnh của nó. Phương pháp sản xuất kháng thể đa dòng và kháng thể đơn dòng là đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này (xem, ví dụ, Harlow and Lane, "Antibodies, a laboratory manual", Cold Spring Harbor Laboratory,

1988). Các kháng thể không có trong tự nhiên có thể được cấu tạo bằng cách sử dụng kỹ thuật tổng hợp peptit pha rắn, có thể được sản xuất tái tổ hợp (ví dụ như được mô tả trong patent Mỹ số US 4,186,567) hoặc có thể thu được, ví dụ, bằng cách sàng lọc các thư viện tổ hợp bao gồm các chuỗi nặng biến đổi và chuỗi nhẹ biến đổi (xem ví dụ patent Mỹ số 5,969,108 được cấp cho McCafferty).

Các loài động vật bất kỳ có globulin miễn dịch có thể được sử dụng trong sáng chế. Globulin miễn dịch không làm giới hạn phạm vi của sáng chế hữu ích trong sáng chế có thể có nguồn gốc từ chuột, động vật linh trưởng, hoặc người. Nếu protein dung hợp được dự định sử dụng ở người, dạng khảm của globulin miễn dịch có thể được sử dụng, trong đó các vùng hằng định của globulin miễn dịch là từ người. Dạng được người hóa hoặc người hoàn toàn của globulin miễn dịch còn có thể được điều chế theo phương pháp đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này (xem ví dụ, patent Mỹ số US 5,565,332 được cấp cho Winter). Có thể đạt được việc nhân hóa bằng các phương pháp khác nhau bao gồm, nhưng không giới hạn ở (a) ghép CDR không phải của người (ví dụ, kháng thể cho) lên trên khung làm việc ở người (ví dụ, kháng thể nhận) và các vùng hằng định có hoặc không giữ được gốc khung làm việc mang tính quyết định (ví dụ, vùng hằng định quan trọng để giữ được ái lực gắn kết kháng nguyên hoặc chức năng kháng thể tốt), (b) chỉ ghép vùng xác định tính đặc hiệu không ở người (SDR hoặc a-CDR; các gốc mang tính quyết định đối với sự tương tác kháng thể-kháng nguyên) lên trên khung làm việc ở người và vùng hằng định, hoặc (c) cấy toàn bộ các miền biến đổi không phải người, nhưng "che giấu" chúng bằng đoạn tương tự ở người bằng cách thay thế các gốc bề mặt. Kháng thể được người hóa và phương pháp tạo ra chúng được tìm hiểu thêm, ví dụ, trong tài liệu: Almagro and Fransson, *Front Biosci* 13, 1619-1633 (2008), và còn được mô tả, ví dụ, trong tài liệu: Riechmann et al., *Nature* 332, 323-329 (1988); Queen et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 86, 10029-10033 (1989); patent Mỹ số 5821337, 7527791, 6982321, và 7087409; Jones et al., *Nature* 321, 522-525 (1986); Morrison et al., *Proc Natl Acad Sci* 81, 6851-6855 (1984); Morrison and Oi, *Adv Immunol* 44, 65-92 (1988); Verhoeyen et al., *Science* 239, 1534-1536 (1988); Padlan, *Molec Immun* 31(3), 169-217 (1994); Kashmiri et al., *Methods* 36, 25-34 (2005) (mô tả quá trình ghép SDR (a-CDR)); Padlan, *Mol Immunol*

28, 489-498 (1991) (mô tả quá trình “tái tạo bề mặt”); Dall’Acqua et al., *Methods* 36, 43-60 (2005) (mô tả “sự di chuyển FR”); và Osbourn et al., *Methods* 36, 61-68 (2005) and Klimka et al., *Br J Cancer* 83, 252-260 (2000) (mô tả phương pháp “chọn lọc có hướng dẫn” để di chuyển FR). Các globulin miễn dịch cụ thể theo sáng chế là globulin miễn dịch ở người. Kháng thể người và vùng biến đổi người có thể được sản xuất bằng cách sử dụng các kỹ thuật khác nhau đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Kháng thể người được mô tả tổng quát trong van Dijk and van de Winkel, *Curr Opin Pharmacol* 5, 368-74 (2001) và Lonberg, *Curr Opin Immunol* 20, 450-459 (2008). Vùng biến đổi ở người có thể tạo thành một phần và có nguồn gốc từ kháng thể đơn dòng người được tạo ra nhờ phương pháp lai (xem ví dụ *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, trang 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)). Kháng thể người và vùng biến đổi người còn có thể được điều chế bằng cách sử dụng chất kháng nguyên cho động vật chuyển gen đã được cải biến để sản sinh kháng thể người trơ hoặc kháng thể trơ với vùng biến đổi người đáp ứng với thách thức kháng nguyên (xem ví dụ Lonberg, *Nat Biotech* 23, 1117-1125 (2005). Kháng thể người và vùng biến đổi người còn có thể được tạo ra bằng cách phân lập trình tự vùng biến đổi dòng Fv được chọn từ thư viện biểu hiện thực khuẩn thể có nguồn gốc từ người (xem ví dụ, Hoogenboom et al. trong tài liệu: *Methods in Molecular Biology* 178, 1-37 (O’Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001); và McCafferty et al., *Nature* 348, 552-554; Clackson et al., *Nature* 352, 624-628 (1991)). Thực khuẩn thể thường biểu hiện các mảnh kháng thể, ở dạng các mảnh chuỗi đơn Fv (scFv) hoặc ở dạng mảnh Fab.

Theo một số phương án nhất định, globulin miễn dịch được chứa trong protein dung hợp theo sáng chế được xử lý kỹ thuật để có ái lực gắn kết tăng cường theo, ví dụ, phương pháp được bộc lộ trong công bố đơn PCT số WO 2012/020006 (xem các ví dụ liên quan đến quá trình trưởng thành ái lực) hoặc công bố đơn yêu cầu cấp bằng độc quyền sáng chế Mỹ số 2004/0132066, toàn bộ nội dung được đưa vào đây để tham khảo. Khả năng gắn kết với thành phần quyết định đặc hiệu kháng nguyên của protein dung hợp theo sáng chế có thể được xác định thông qua thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết với enzyme (ELISA) hoặc các kỹ thuật khác quen thuộc với một chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ, kỹ thuật cộng hưởng plasmon bề mặt (Liljeblad, et

al., Glyco J 17, 323-329 (2000)), và thử nghiệm gắn kết truyền thống (Heeley, Endocr Res 28, 217-229 (2002)). Các thử nghiệm cạnh tranh có thể được sử dụng để nhận biết kháng thể cạnh tranh với kháng thể đối chiếu để gắn kết với kháng nguyên cụ thể. Theo một số phương án nhất định, kháng thể cạnh tranh này gắn kết với cùng một epitop (ví dụ, epitop thẳng hoặc cấu dạng) mà được gắn kết bởi kháng thể đối chiếu. Phương pháp được lấy làm ví dụ chi tiết để vẽ sơ đồ epitop mà kháng thể gắn kết được nêu trong Morris (1996) "Epitope Mapping Protocols", trong *Methods in Molecular Biology* vol. 66 (Humana Press, Totowa, NJ). Trong thử nghiệm cạnh tranh được lấy làm ví dụ, kháng nguyên đã được cố định được ủ trong dung dịch chứa kháng thể được đánh dấu thứ nhất mà gắn kết với kháng nguyên và kháng thể không được đánh dấu thứ hai được thử nghiệm về khả năng cạnh tranh của nó với kháng thể thứ nhất trong việc gắn kết với kháng nguyên. Kháng thể thứ hai có thể có mặt trong dịch nổi trên bề mặt tế bào lai. Để làm đối chứng, kháng nguyên đã được cố định được ủ trong dung dịch chứa kháng thể được đánh dấu thứ nhất mà không chứa kháng thể không được đánh dấu thứ hai. Sau khi ủ trong các điều kiện cho phép gắn kết kháng thể thứ nhất với kháng nguyên, kháng thể không gắn kết dư thừa được loại bỏ, và lượng nhãn đánh dấu kết hợp với kháng nguyên đã được cố định được đo. Nếu lượng nhãn đánh dấu kết hợp với kháng nguyên đã được cố về cơ bản giảm đi trong mẫu thử nghiệm so với mẫu đối chứng, thì điều này chỉ ra rằng kháng thể thứ hai đang cạnh tranh với kháng thể thứ nhất trong việc gắn kết với kháng nguyên. Xem Harlow and Lane (1988) *Các kháng thể: A Laboratory Manual* ch.14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).

Protein dung hợp được điều chế như được mô tả ở đây có thể được tinh chế bằng các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực như sắc ký lỏng cao áp, sắc ký trao đổi ion, điện di gel, sắc ký ái lực, sắc ký loại theo kích thước, và kỹ thuật tương tự. Các điều kiện thực tế được sử dụng để tinh chế protein cụ thể phụ thuộc một phần vào các yếu tố như điện tích lưới, độ kỵ nước, độ ưa nước v.v., và sẽ rõ ràng đối với chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này. Để tinh chế bằng sắc ký ái lực, kháng thể, phối tử, thụ thể hoặc kháng nguyên có thể được sử dụng mà protein dung hợp gắn kết với. Ví dụ, để tinh chế bằng sắc ký ái lực của protein dung hợp theo sáng chế, cơ chất có protein A hoặc

protein G có thể được sử dụng. Sắc ký ái lực và sắc ký loại theo kích thước lần lượt Protein A hoặc G có thể được sử dụng để phân lập protein dung hợp chủ yếu như được mô tả trong các ví dụ. Độ tinh khiết của protein dung hợp có thể được xác định bằng phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp phân tích đã được biết rõ bao gồm điện di gel, sắc ký lỏng cao áp, và kỹ thuật tương tự. Ví dụ, protein dung hợp được biểu hiện như được mô tả trong các ví dụ được thể hiện là trơ và được lắp ráp chính xác như được thể hiện bằng SDS-PAGE khử và không khử (xem ví dụ Fig. 4).

Chế phẩm, dạng phối trộn, và đường dùng

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất được phẩm chứa protein dung hợp bất kỳ được đề xuất ở đây, ví dụ, để sử dụng trong phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp điều trị bệnh nêu dưới đây. Theo một phương án, được phẩm chứa protein dung hợp bất kỳ được đề xuất ở đây và chất mang được dùng. Theo một phương án khác, được phẩm chứa protein dung hợp bất kỳ được đề xuất ở đây và ít nhất một chất điều trị bệnh khác, ví dụ, như được mô tả dưới đây.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp sản xuất protein dung hợp theo sáng chế ở dạng thích hợp để dùng *in vivo*, phương pháp này bao gồm các bước (a) thu protein dung hợp theo sáng chế, và (b) phối trộn protein dung hợp với ít nhất một chất mang được dùng, từ đó chế phẩm chứa protein dung hợp được phối trộn để dùng *in vivo*.

Dược phẩm theo sáng chế chứa lượng cho tác dụng điều trị bệnh của một hoặc nhiều protein dung hợp được hòa tan hoặc được phân tán trong chất mang được dùng. Cụm từ "dược lý hoặc được dùng" được dùng để chỉ các phân tử được chất và chế phẩm thường không độc đối với người nhận ở liều lượng và nồng độ được sử dụng, tức là không tạo ra phản ứng có hại, dị ứng hoặc rủi ro khác khi dùng cho động vật, như, ví dụ, người, ở dạng thích hợp. Việc bào chế được phẩm chứa ít nhất một protein dung hợp và tùy ý thành phần hoạt tính bổ sung là đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này theo phần mô tả, như được lấy làm ví dụ trong Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. Mack Printing Company, 1990, được đưa vào đây để tham khảo. Ngoài ra, để dùng cho động vật (ví dụ, người), nên hiểu rằng dược phẩm cần phải đáp ứng các tiêu chuẩn về độ vô trùng, gây sốt, độ an toàn chung và độ tinh

khuyết như được yêu cầu bởi cơ quan FDA về các tiêu chuẩn sinh học hoặc các tổ chức tương tự ở các nước khác. Chế phẩm được ưu tiên là dạng phối trộn được làm khô lạnh hoặc dung dịch chứa nước. Như được sử dụng trong bản mô tả, "chất mang được dụng" bao gồm bất kỳ và tất cả các dung môi, dung dịch đệm, môi trường phân tán, lớp phủ, chất hoạt động bề mặt, chất chống oxy hóa, chất bảo quản (ví dụ, chất kháng khuẩn, chất chống nấm), chất đẳng trương, chất trì hoãn hấp thụ, muối, chất bảo quản, chất chống oxy hóa, protein, thuốc, chất ổn định dược chất, polyme, gel, tác nhân liên kết, tá dược, chất phân tán, chất bôi trơn, chất làm ngọt, chất tạo hương, thuốc nhuộm, các chất liệu tương tự và các hỗn hợp của chúng, như đã biết đối với một người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này (xem, ví dụ, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. Mack Printing Company, 1990, trang 1289-1329, được đưa vào đây để tham khảo). Ngoại trừ chất mang thông thường bất kỳ không tương hợp với thành phần hoạt tính, việc sử dụng nó trong chế phẩm điều trị bệnh hoặc dược phẩm được dự tính.

Chế phẩm có thể chứa các loại chất mang khác nhau phụ thuộc vào việc liệu nó được dùng ở dạng rắn, lỏng hay sol khí, và liệu rằng nó có cần vô trùng để dùng qua các đường như đường tiêm hay không. Protein dung hợp theo sáng chế (và chất trị liệu bệnh bổ sung bất kỳ) có thể được dùng bằng phương pháp bất kỳ hoặc kết hợp bất kỳ của các phương pháp như đã biết đối với một người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này (xem, ví dụ, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. Mack Printing Company, 1990, được đưa vào đây để tham khảo). Dùng ngoài đường tiêu hóa, cụ thể là tiêm trong tĩnh mạch, được sử dụng nhiều nhất để sử dụng phân tử polypeptit như protein dung hợp theo sáng chế.

Chế phẩm dùng ngoài đường tiêu hóa bao gồm chế phẩm được thiết kế để dùng bằng cách tiêm, ví dụ, tiêm dưới da, trong da, trong thương tổn, trong tĩnh mạch, trong động mạch, trong cơ, trong tủy mạc hoặc trong bụng. Để tiêm, protein dung hợp theo sáng chế có thể được phối trộn trong dung dịch chứa nước, tốt hơn là trong dung dịch đệm tương thích sinh lý như dung dịch Hanks, dung dịch Ringer, hoặc dung dịch đệm nước muối sinh lý. Dung dịch này có thể chứa các chất phối trộn như chất tạo huyền phù, làm ổn định và/hoặc chất phân tán. Theo một cách khác, protein dung hợp có thể

ở dạng bột để cấu thành với chất dẫn thuốc thích hợp, ví dụ, nước không có pyrogen vô trùng, trước khi sử dụng. Dung dịch tiêm vô trùng được điều chế bằng cách kết hợp protein dung hợp theo sáng chế với lượng được yêu cầu trong dung môi thích hợp với các thành phần khác nhau khác được liệt kê dưới đây, như được yêu cầu. Độ vô trùng có thể dễ dàng đạt được, ví dụ, bằng cách lọc qua màng lọc vô trùng. Nhìn chung, các phần phân tán được điều chế bằng cách kết hợp các thành phần hoạt tính vô trùng khác nhau vào chất dẫn thuốc vô trùng chứa môi trường phân tán bazơ và/hoặc các thành phần khác. Trong trường hợp bột vô trùng để điều chế dung dịch tiêm vô trùng, huyền phù hoặc nhũ tương, phương pháp bào chế được ưu tiên là kỹ thuật sấy chân không hoặc sấy đông lạnh mà thu được bột chứa thành phần hoạt tính cộng thêm thành phần mong muốn khác bất kỳ từ môi trường lỏng được lọc vô trùng trước đó của nó. Môi trường lỏng cần được đệm thích hợp nếu cần thiết và chất pha loãng lỏng trước tiên được làm đẳng trương trước khi tiêm với lượng nước muối hoặc glucoza đủ. Chế phẩm này ã phải ổn định trong điều kiện sản xuất và bảo quản, và được bảo quản chống lại tác động nhiễm bẩn của vi sinh vật, như vi khuẩn và nấm. Nên hiểu rằng sự nhiễm bẩn do nội độc tố nên được duy trì tối thiểu ở mức độ an toàn, ví dụ, ít hơn 0,5 ng/mg protein. Các chất mang được dụng thích hợp bao gồm, nhưng không giới hạn ở: dung dịch đệm như phosphat, xitrat, và các axit hữu cơ khác; chất chống oxy hóa bao gồm axit ascorbic và metionin; chất bảo quản (như octadexyldimetylbenzyl amoni clorua; hexametoni clorua; benzalkoni clorua; benzetoni clorua; phenol, rượu butylic hoặc rượu benzylic; alkyl paraben như metyl hoặc propyl paraben; catecol; resorxinol; xyclohexanol; 3-pentanol; và m-cresol); polypeptit phân tử lượng thấp (ít hơn khoảng 10 gốc); protein, như albumin huyết thanh, gelatin, hoặc globulin miễn dịch; polyme ưa nước như polyvinylpyrrolidon; axit amin như glyxin, glutamin, asparagin, histidin, arginin, hoặc lysin; monosacarit, disacarit, và các hydrat cacbon khác bao gồm glucoza, mannoza, hoặc dextrin; chất tạo chelat như EDTA; đường như suctroza, mannitol, trehaloza hoặc sorbitol; ion trái dấu tạo muối như natri; phức kim loại (ví dụ, phức Zn-protein); và/hoặc chất hoạt động bề mặt không ion như polyetylen glycol (PEG). Huyền phù tiêm chứa nước có thể chứa các hợp chất làm tăng độ nhớt của huyền phù, như natri carboxymetyl xeluloza, sorbitol, dextran, hoặc hợp chất tương tự.

Tùy ý, huyền phù này còn có thể chứa chất ổn định hoặc chất thích hợp mà làm tăng độ hòa tan của hợp chất để cho phép điều chế được dung dịch nồng độ cao. Ngoài ra, huyền phù chứa hợp chất hoạt tính có thể được điều chế ở dạng huyền phù tiêm dạng dầu thích hợp. Dung môi ưa béo thích hợp hoặc chất dẫn thuốc bao gồm dầu béo như dầu vừng, hoặc este của axit béo tổng hợp, như etyl cleat hoặc triglyxerit, hoặc liposom.

Dược phẩm chứa protein dung hợp theo sáng chế có thể được sản xuất bằng các quy trình trộn, hòa tan, nhũ hóa, đóng kín, sấy hoặc làm khô lạnh thông thường. Dược phẩm có thể được phối trộn theo cách thông thường bằng cách sử dụng một hoặc nhiều chất mang, chất pha loãng, tá dược hoặc chất hỗ trợ có thể chấp nhận về mặt sinh lý mà tạo điều kiện cho việc xử lý protein thành chế phẩm mà có thể được sử dụng theo mục đích dược lý. Dạng phối trộn thích hợp phụ thuộc vào đường dùng được chọn.

Protein dung hợp có thể được phối trộn thành chế phẩm ở dạng axit hoặc bazơ tự do, dạng trung tính hoặc dạng muối. Muối được dùng là muối gần như giữ được hoạt tính sinh học của axit hoặc bazơ tự do. Các muối này bao gồm muối cộng axit, ví dụ, muối được tạo ra với nhóm amin tự do của chế phẩm có protein, hoặc được tạo ra với các axit vô cơ ví như, axit clohydric hoặc phosphoric, hoặc các axit hữu cơ như axit axetic, axit oxalic, axit tartric hoặc axit mandelic. Muối được tạo thành với nhóm carboxyl tự do còn có thể có nguồn gốc từ bazơ vô cơ ví như, natri, kali, amoni, canxi hoặc sắt hydroxit; hoặc các bazơ hữu cơ như isopropylamin, trimetylamin, histidin hoặc procain. Muối được liệu có xu hướng tan nhiều hơn trong dung môi chứa nước và dung môi phân cực có proton khác so với dạng bazơ tự do tương ứng.

Phương pháp điều trị bệnh và chế phẩm

Protein dung hợp bất kỳ trong số các protein dung hợp được đề xuất ở đây có thể được sử dụng trong phương pháp điều trị bệnh.

Để sử dụng trong các phương pháp điều trị bệnh, protein dung hợp theo sáng chế được phối trộn, được định liều, và được dùng theo cách phù hợp với thực tiễn y học tốt. Các yếu tố cần cân nhắc trong ngữ cảnh này bao gồm rối loạn cụ thể được điều trị, động vật có vú cụ thể được điều trị, tình trạng bệnh lâm sàng của từng bệnh nhân,

nguyên nhân rối loạn, vị trí phân phối chất, phương pháp dùng, chế độ dùng, và các yếu tố khác đã được người đang hành nghề y biết.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất protein dung hợp để sử dụng làm thuốc. Theo các khía cạnh khác, sáng chế đề xuất protein dung hợp để sử dụng để điều trị bệnh. Theo một số phương án nhất định, sáng chế còn đề xuất protein dung hợp để sử dụng trong phương pháp điều trị bệnh. Theo một phương án, sáng chế đề xuất protein dung hợp như được mô tả ở đây để sử dụng để điều trị bệnh ở cá thể cần điều trị. Theo một số phương án nhất định, sáng chế đề xuất protein dung hợp để sử dụng trong phương pháp điều trị cho cá thể mắc bệnh, phương pháp này bao gồm việc cho cá thể này dùng lượng cho tác dụng điều trị bệnh của protein dung hợp. Theo một số phương án nhất định, bệnh được điều trị là bệnh tự miễn. Bệnh tự miễn lấy làm ví dụ bao gồm bệnh đái tháo đường typ 1, bệnh vẩy nến, bệnh hen, bệnh viêm khớp dạng thấp, bệnh viêm ruột, bệnh Crohn, bệnh viêm loét đại tràng, bệnh luput ban đỏ toàn thân (SLE) và bệnh xơ cứng rải rác. Theo một phương án, bệnh này là chứng thải loại mảnh ghép hoặc bệnh mảnh ghép chống lại vật chủ. Theo một phương án cụ thể, bệnh được chọn từ nhóm bao gồm bệnh đái tháo đường typ 1, bệnh viêm ruột, bệnh Crohn, bệnh viêm loét đại tràng, SLE, và bệnh xơ cứng rải rác. Theo một phương án cụ thể hơn, bệnh này là bệnh đái tháo đường typ 1. Theo một phương án cụ thể khác, bệnh này là bệnh viêm ruột. Theo một phương án cụ thể khác, bệnh này là bệnh xơ cứng rải rác. Theo các phương án khác, bệnh này là bệnh hen, bệnh xơ phổi hoặc bệnh phổi tắc nghẽn. Theo các phương án khác đó, bệnh này là bệnh tim mạch, đặc biệt là chứng xơ vữa động mạch và hội chứng mạch vành cấp. Theo các phương án khác, bệnh này là tình trạng bệnh dị ứng, đặc biệt là chứng dị ứng thực phẩm. Theo một số phương án nhất định, phương pháp còn bao gồm việc cho cá thể này dùng lượng cho tác dụng điều trị bệnh của ít nhất một chất điều trị bệnh bổ sung, ví dụ, chất ức chế miễn dịch nếu bệnh cần điều trị là bệnh tự miễn. “Cá thể” theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên là động vật có vú, tốt hơn là người.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất việc sử dụng protein dung hợp theo sáng chế để sản xuất hoặc bào chế thuốc để điều trị bệnh ở cá thể cần điều trị. Theo một phương án, thuốc này để sử dụng trong phương pháp điều trị bệnh, phương pháp này

bao gồm việc cho cá thể mắc bệnh dùng lượng thuốc cho tác dụng điều trị bệnh. Theo một số phương án nhất định, bệnh cần điều trị là bệnh tự miễn. Theo một phương án, bệnh này là chứng thái loại mảnh ghép hoặc bệnh mảnh ghép chống lại vật chủ. Theo một phương án cụ thể, bệnh được chọn từ nhóm bao gồm bệnh đái tháo đường typ 1, bệnh viêm ruột, bệnh Crohn, bệnh viêm loét đại tràng, SLE, và bệnh xơ cứng rải rác. Theo một phương án cụ thể hơn, bệnh này là bệnh đái tháo đường typ 1. Theo một phương án cụ thể khác, bệnh này là bệnh viêm ruột. Theo một phương án cụ thể khác, bệnh này là bệnh xơ cứng rải rác. Theo các phương án khác, bệnh này là bệnh hen, bệnh xơ phổi hoặc bệnh phổi tắc nghẽn. Theo các phương án khác đó, bệnh này là bệnh tim mạch, đặc biệt là chứng xơ vữa động mạch và hội chứng mạch vành cấp. Theo các phương án khác, bệnh này là tình trạng bệnh dị ứng, đặc biệt là chứng dị ứng thực phẩm. Theo một phương án, phương pháp này còn bao gồm việc cho cá thể này dùng lượng cho tác dụng điều trị bệnh của ít nhất một chất điều trị bệnh bổ sung, ví dụ, chất ức chế miễn dịch nếu bệnh cần điều trị là bệnh tự miễn. “Cá thể” theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên có thể là động vật có vú, tốt hơn là người.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị bệnh ở cá thể, phương pháp này bao gồm việc cho cá thể này dùng lượng protein dung hợp theo sáng chế cho tác dụng điều trị bệnh. Theo một phương án, chế phẩm được dùng cho cá thể nêu trên, chứa protein dung hợp theo sáng chế ở dạng dược dụng. Theo một số phương án nhất định, bệnh cần điều trị là bệnh tự miễn. Theo một phương án, bệnh này là chứng thái loại mảnh ghép hoặc bệnh mảnh ghép chống lại vật chủ. Theo một phương án cụ thể, bệnh được chọn từ nhóm bao gồm bệnh đái tháo đường typ 1, bệnh viêm ruột, bệnh Crohn, bệnh viêm loét đại tràng, SLE, và bệnh xơ cứng rải rác. Theo một phương án cụ thể hơn, bệnh này là bệnh đái tháo đường typ 1. Theo một phương án cụ thể khác, bệnh này là bệnh viêm ruột. Theo một phương án cụ thể khác, bệnh này là bệnh xơ cứng rải rác. Theo các phương án khác, bệnh này là bệnh hen, bệnh xơ phổi hoặc bệnh phổi tắc nghẽn. Theo các phương án khác, bệnh này là tình trạng bệnh dị ứng, đặc biệt là chứng dị ứng thực phẩm. Theo các phương án khác đó, bệnh này là bệnh tim mạch, đặc biệt là chứng xơ vữa động mạch và hội chứng mạch vành cấp. Theo một số phương án nhất định, phương pháp này còn bao gồm việc cho cá thể này

dùng lượng cho tác dụng điều trị bệnh của ít nhất một chất điều trị bệnh bổ sung, ví dụ, chất ức chế miễn dịch nếu bệnh cần điều trị là bệnh tự miễn. “Cá thể” theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên có thể là động vật có vú, tốt hơn là người.

Theo một số phương án, lượng hữu hiệu của protein dung hợp theo sáng chế được dùng cho tế bào. Theo các phương án khác, lượng cho tác dụng điều trị bệnh của protein dung hợp theo sáng chế được dùng cho cá thể để điều trị bệnh.

Để ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh, liều lượng thích hợp của protein dung hợp theo sáng chế (khi được sử dụng một mình hoặc kết hợp với một hoặc nhiều chất điều trị bệnh bổ sung khác) phụ thuộc vào loại bệnh cần điều trị, đường dùng, trọng lượng cơ thể của bệnh nhân, loại protein dung hợp, mức độ nghiêm trọng và tiến trình bệnh xem liệu protein dung hợp được dùng nhằm mục đích ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh, các can thiệp điều trị bệnh trước đó hoặc xảy ra đồng thời, tiền sử bệnh lâm sàng của bệnh nhân và đáp ứng với protein dung hợp, và sự thận trọng của bác sĩ theo dõi. Bác sĩ chịu trách nhiệm về việc dùng sẽ, trong trường hợp bất kỳ, xác định nồng độ của (các) thành phần hoạt tính trong chế phẩm và (các) liều lượng thích hợp cho từng đối tượng. Các chế độ chia liều khác nhau bao gồm, nhưng không giới hạn ở, một lần dùng duy nhất hoặc nhiều lần dùng ở các thời điểm khác nhau, dùng bolus, và truyền qua mạch được dự định ở đây.

Protein dung hợp được dùng một cách thích hợp cho bệnh nhân tại một thời điểm hoặc trong hàng loạt lần điều trị. Phụ thuộc vào loại và mức nghiêm trọng của bệnh, khoảng $1\mu\text{g/kg}$ đến 15mg/kg (ví dụ, $0,1\text{mg/kg}$ đến 10mg/kg) protein dung hợp có thể là liều lượng ứng cử ban đầu để dùng cho bệnh nhân, ví dụ, bằng một hoặc nhiều lần dùng riêng rẽ, hoặc bằng cách truyền liên tục. Một liều lượng hằng ngày điển hình có thể nằm trong khoảng từ $1\mu\text{g/kg}$ đến 100mg/kg hoặc nhiều hơn, phụ thuộc vào các yếu tố nêu trên. Để dùng lặp lại trong một vài ngày hoặc lâu hơn, phụ thuộc vào tình trạng bệnh, việc điều trị thường được duy trì cho đến khi xuất hiện mức độ ức chế mong muốn các triệu chứng của bệnh. Một liều lượng lấy làm ví dụ của protein dung hợp sẽ nằm trong khoảng từ $0,005\text{mg/kg}$ đến khoảng 10mg/kg . Trong các ví dụ không làm giới hạn phạm vi của sáng chế khác, liều lượng còn có thể bao gồm từ khoảng

1µg/kg trọng lượng cơ thể, khoảng 5µg/kg trọng lượng cơ thể, khoảng 10µg/kg trọng lượng cơ thể, khoảng 50µg/kg trọng lượng cơ thể, khoảng 100µg/kg trọng lượng cơ thể, khoảng 200µg/kg trọng lượng cơ thể, khoảng 350µg/kg trọng lượng cơ thể, khoảng 500µg/kg trọng lượng cơ thể, khoảng 1mg/kg trọng lượng cơ thể, khoảng 5mg/kg trọng lượng cơ thể, khoảng 10mg/kg trọng lượng cơ thể, khoảng 50mg/kg trọng lượng cơ thể, khoảng 100mg/kg trọng lượng cơ thể, khoảng 200mg/kg trọng lượng cơ thể, khoảng 350mg/kg trọng lượng cơ thể, khoảng 500mg/kg trọng lượng cơ thể, đến khoảng 1000mg/kg trọng lượng cơ thể hoặc nhiều hơn trong một lần dùng, và khoảng bất kỳ thu được từ đó. Trong các ví dụ không làm giới hạn phạm vi của sáng chế về khoảng thu được từ các con số được liệt kê ở đây, khoảng từ khoảng 5mg/kg trọng lượng cơ thể đến khoảng 100mg/kg trọng lượng cơ thể, khoảng 5µg/kg trọng lượng cơ thể đến khoảng 500mg/kg trọng lượng cơ thể v.v., có thể được dùng, dựa trên các con số được mô tả trên đây. Do đó, một hoặc nhiều liều lượng bằng khoảng 0,5mg/kg, 2,0mg/kg, 5,0mg/kg hoặc 10mg/kg (hoặc tổ hợp bất kỳ của chúng) có thể được dùng cho bệnh nhân. Các liều lượng này có thể được dùng ngắt quãng, ví dụ, hằng tuần hoặc mỗi ba tuần (ví dụ sao cho bệnh nhân nhận từ khoảng hai đến khoảng hai mươi, hoặc ví dụ khoảng sáu liều lượng protein dung hợp). Liều lượng nạp ban đầu cao hơn, sau đó là một hoặc nhiều liều thấp hơn có thể được dùng. Tuy nhiên, các chế độ liều lượng khác cũng có thể hữu ích. Tiến trình của liệu pháp này được theo dõi dễ dàng nhờ các kỹ thuật và thử nghiệm thông thường.

Protein dung hợp theo sáng chế thường được sử dụng với lượng hữu hiệu để đạt được mục đích được dự định. Để sử dụng để điều trị hoặc ngăn ngừa tình trạng bệnh, protein dung hợp theo sáng chế, hoặc được phẩm của nó, được dùng hoặc được áp dụng với lượng cho tác dụng điều trị bệnh. Việc xác định lượng cho tác dụng điều trị bệnh là nằm trong khả năng của chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này, đặc biệt là theo phần mô tả chi tiết nêu ở đây.

Để dùng toàn thân, liều lượng cho tác dụng điều trị bệnh có thể được ước tính ngay từ đầu từ thử nghiệm *in vitro*, như thử nghiệm nuôi cấy tế bào. Liều lượng này sau đó có thể được phối trộn trong mô hình động vật để đạt được khoảng nồng độ tuần

hoàn bao gồm IC_{50} như được xác định trong môi trường nuôi cấy tế bào. Thông tin này có thể được sử dụng để xác định chính xác hơn liều lượng hữu ích ở người.

Liều lượng ban đầu còn có thể được ước tính từ dữ liệu *in vivo*, ví dụ, mô hình động vật, sử dụng các kỹ thuật đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này. Một người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể dễ dàng tối ưu hóa việc dùng cho người dựa trên dữ liệu từ động vật.

Liều lượng và khoảng cách có thể được điều chỉnh riêng rẽ để tạo ra nồng độ huyết tương của protein dung hợp đủ để duy trì tác dụng điều trị bệnh. Liều lượng thông thường dùng cho bệnh nhân bằng cách tiêm nằm trong khoảng từ 0,1 đến 50mg/kg/ngày, cụ thể là từ khoảng 0,5 đến 1mg/kg/ngày. Nồng độ huyết tương cho tác dụng điều trị bệnh có thể đạt được bằng cách dùng nhiều liều mỗi ngày. Nồng độ huyết tương có thể được xác định, ví dụ, bằng HPLC.

Trong trường hợp dùng cục bộ hoặc hấp thụ có chọn lọc, nồng độ cục bộ hữu hiệu của protein dung hợp có thể không liên quan đến nồng độ huyết tương. Một chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể tối ưu hóa liều lượng cục bộ cho tác dụng điều trị bệnh mà không thử nghiệm bất thường.

Liều lượng cho tác dụng điều trị bệnh của protein dung hợp được mô tả ở đây thường cho lợi ích điều trị bệnh mà không gây ra độc tính cơ bản. Độc tính và hiệu quả điều trị bệnh của protein dung hợp có thể được xác định bằng các quy trình được lý chuẩn trong môi trường nuôi cấy tế bào hoặc động vật thử nghiệm. Thử nghiệm nuôi cấy tế bào và các nghiên cứu ở động vật có thể được sử dụng để xác định LD_{50} (liều lượng gây chết người đến 50% dân số) và ED_{50} (liều lượng hữu hiệu để điều trị bệnh ở 50% dân số). Tỷ lệ liều lượng giữa ảnh hưởng gây độc và điều trị bệnh là chỉ số điều trị bệnh, có thể được biểu hiện ở dạng tỷ lệ LD_{50}/ED_{50} . Protein dung hợp biểu hiện các chỉ số điều trị bệnh lớn thì được ưu tiên. Theo một phương án, protein dung hợp theo sáng chế biểu hiện chỉ số điều trị bệnh cao. Số liệu thu được từ thử nghiệm nuôi cấy tế bào và các nghiên cứu ở động vật có thể được sử dụng để phối trộn khoảng liều lượng thích hợp để sử dụng ở người. Liều lượng này tốt hơn là nằm trong khoảng nồng độ tuần hoàn bao gồm ED_{50} có ít hoặc không có độc tính. Liều lượng này có thể thay đổi trong

khoảng này phụ thuộc vào các yếu tố khác nhau, ví dụ, dạng liều lượng được sử dụng, đường dùng được sử dụng, tình trạng bệnh lý của đối tượng, và yếu tố tương tự. Dạng phối trộn, đường dùng và liều lượng chính xác có thể được chọn lựa bởi từng bác sĩ xét theo tình trạng của bệnh nhân (xem, ví dụ, Fingl et al., 1975, trong tài liệu: *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, Ch. 1, p. 1, được đưa vào đây để tham khảo).

Bác sĩ theo dõi của bệnh nhân được điều trị bằng protein dung hợp theo sáng chế sẽ biết cách thức và thời điểm kết thúc, ngắt quãng, hoặc điều chỉnh việc dùng do độc tính, chức năng bất thường trong cơ quan, và dạng tương tự. Ngược lại, bác sĩ theo dõi cũng sẽ biết cách điều chỉnh việc điều trị đến mức độ cao hơn nếu đáp ứng lâm sàng là không đủ (loại trừ độc tính). Mức độ liều lượng được dùng để giám sát rối loạn đang quan tâm sẽ thay đổi theo mức độ nghiêm trọng của tình trạng bệnh lý cần điều trị, theo đường dùng, và yếu tố tương tự. Mức độ nghiêm trọng của tình trạng bệnh lý có thể, ví dụ, được đánh giá, một phần, bằng phương pháp đánh giá tiên lượng chuẩn. Ngoài ra, liều lượng và có thể là tần suất dùng liều cũng thay đổi theo độ tuổi, trọng lượng cơ thể, và đáp ứng của từng bệnh nhân.

Các chất và cách điều trị khác

Protein dung hợp theo sáng chế có thể được dùng kết hợp với một hoặc nhiều chất khác trong liệu pháp điều trị. Ví dụ, protein dung hợp theo sáng chế có thể được cùng sử dụng với ít nhất một chất điều trị bệnh bổ sung. Thuật ngữ "chất điều trị bệnh" bao gồm chất bất kỳ được dùng để điều trị triệu chứng hoặc bệnh ở cá thể cần điều trị. Chất điều trị bệnh bổ sung này có thể chứa thành phần hoạt tính bất kỳ thích hợp cho chỉ định cụ thể được điều trị, tốt hơn là các thành phần hoạt tính có hoạt tính bổ sung không ảnh hưởng bất lợi đến nhau. Theo một số phương án nhất định, chất điều trị bệnh bổ sung là chất ức chế miễn dịch.

Các tác nhân khác như vậy có mặt một cách thích hợp kết hợp với lượng hữu hiệu cho mục đích dự định. Lượng hữu hiệu của các tác nhân khác này phụ thuộc vào lượng protein dung hợp được sử dụng, loại rối loạn hoặc điều trị, và các yếu tố khác nêu trên. Protein dung hợp thường được sử dụng ở liều lượng giống nhau và với đường dùng như được mô tả ở đây, hoặc khoảng từ 1 đến 99% liều lượng được mô tả ở đây,

hoặc với liều lượng bất kỳ và bằng đường bất kỳ mà được xác định theo kinh nghiệm/lâm sàng là thích hợp.

Những liệu pháp kết hợp nêu trên bao gồm việc dùng kết hợp (trong đó hai hoặc nhiều chất điều trị bệnh được bao gồm trong cùng một chế phẩm hoặc các chế phẩm riêng rẽ), và việc dùng riêng rẽ, trong trường hợp đó, việc dùng protein dung hợp theo sáng chế có thể xảy ra trước, đồng thời, và/hoặc sau khi dùng chất điều trị bệnh bổ sung và/hoặc chất bổ trợ.

Vật phẩm

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất vật phẩm chứa các nguyên liệu hữu ích để điều trị, ngăn ngừa và/hoặc chẩn đoán các rối loạn được mô tả trên đây. Vật phẩm bao gồm vật chứa và nhãn dán hoặc tờ rời kèm trong bao gói trên hoặc kết hợp với vật chứa. Vật chứa thích hợp bao gồm, ví dụ, chai, lọ nhỏ, xy lanh, túi dung dịch tiêm trong tĩnh mạch, v.v. Vật chứa có thể được tạo ra từ các vật liệu khác nhau như thủy tinh hoặc nhựa dẻo. Vật chứa này giữ chế phẩm bởi chính vật chứa này hoặc được kết hợp với một chế phẩm khác hữu hiệu để điều trị, ngăn ngừa và/hoặc chẩn đoán tình trạng bệnh lý và có thể có cổng vào vô trùng (ví dụ, vật chứa có thể là túi dung dịch truyền trong tĩnh mạch hoặc lọ nhỏ có nắp đậy xuyên qua được bởi kim tiêm dưới da). Ít nhất một hoạt chất trong chế phẩm là protein dung hợp theo sáng chế. Nhãn dán hoặc tờ rời kèm trong bao gói chỉ ra rằng, chế phẩm được sử dụng để điều trị tình trạng bệnh lý đã chọn. Hơn nữa, vật phẩm có thể bao gồm (a) vật chứa thứ nhất có chế phẩm chứa trong đó, trong đó chế phẩm này chứa protein dung hợp theo sáng chế; và (b) vật chứa thứ hai có chế phẩm chứa trong đó, trong đó chế phẩm này chứa chất điều trị bệnh khác. Vật phẩm theo phương án này theo sáng chế có thể còn chứa tờ rời kèm trong bao gói chỉ ra rằng chế phẩm có thể được sử dụng để điều trị tình trạng bệnh cụ thể. Theo một cách khác, hoặc ngoài ra, vật phẩm có thể còn chứa vật chứa thứ hai (hoặc thứ ba) chứa dung dịch đệm được dùng, như nước kim khuẩn dùng để tiêm (BWFI), nước muối đệm phosphat, dung dịch Ringer và dung dịch dextroza. Nó còn có thể bao gồm các vật liệu khác được mong muốn theo quan điểm thương mại và người sử dụng, bao gồm các dung dịch đệm khác, chất pha loãng, thiết bị lọc, kim tiêm, và xy lanh.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sau đây là các ví dụ về các phương pháp và các chế phẩm theo sáng chế. Nên hiểu rằng các phương án khác nhau khác có thể được thử nghiệm, tạo ra phần mô tả tổng quát nêu trên.

Kỹ thuật ADN tái tổ hợp

Các phương pháp chuẩn được sử dụng để thao tác thủ công ADN như được mô tả trong tài liệu: Sambrook et al., *Molecular cloning: A laboratory manual*; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989. Các chất phản ứng sinh học phân tử được sử dụng theo các chỉ dẫn của nhà sản xuất. Thông tin chung về trình tự nucleotit của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của globulin miễn dịch ở người được nêu trong tài liệu: Kabat, E.A. et al., (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Ed., NIH Publication No 91-3242.

Giải trình tự ADN

Các trình tự ADN được xác định bằng kỹ thuật giải trình tự chuỗi kép.

Tổng hợp gen

Các đoạn gen mong muốn khi cần được tạo ra hoặc là bằng PCR bằng cách sử dụng các mẫu thích hợp hoặc được tổng hợp bằng Geneart AG (Regensburg, Đức) từ oligonucleotit tổng hợp và các sản phẩm PCR bằng cách tổng hợp gen tự động. Trong các trường hợp trong đó không có sẵn trình tự gen chính xác, các đoạn mỗi oligonucleotit được thiết kế dựa trên các trình tự từ các thể tương đồng gần nhất và các gen này được phân lập bằng RT-PCR từ ARN có nguồn gốc từ mô thích hợp. Các đoạn gen được đặt bên sườn bằng các vị trí phân cắt endonucleaza hạn chế duy nhất được tách dòng vào vector tách dòng / giải trình tự tiêu chuẩn. ADN plasmit được tinh chế từ vi khuẩn được chuyển nhiễm và hàm lượng được xác định bằng phổ UV. Trình tự ADN của các mảnh gen được tách dòng phụ được xác nhận bằng kỹ thuật giải trình tự ADN. Đoạn gen được thiết kế với các điểm giới hạn thích hợp để cho phép tách dòng phụ vào các vector biểu hiện tương ứng. Tất cả các cấu trúc được thiết kế với trình tự ADN đầu 5' mã hóa peptit dẫn mà hướng tới các protein để tiết ra trong các tế bào

nhân chuẩn. SEQ ID NO 39-47 lần lượt tạo ra các peptit dẫn minh họa và trình tự polynucleotit mã hóa chúng.

Điều chế phần dung hợp Fc cấu trúc siêu phân tử $\beta\gamma$ của IL-2R và phần dung hợp Fc cấu trúc siêu phân tử α của IL-2R

Để nghiên cứu ái lực gắn kết thụ thể IL-2, một công cụ được tạo ra cho phép biểu hiện thụ thể IL-2 dị đimer. Cấu trúc siêu phân tử β của thụ thể IL-2 được dung hợp với phân tử Fc được xử lý kỹ thuật để dị đimer hóa (Fc (lỗ)) (xem SEQ ID NO 21 và 22 (ở người), SEQ ID NO 27 và 28 (ở chuột nhắt) và SEQ ID NO 33 và 34 (ở khỉ đầu chó)) sử dụng công nghệ “phần phình trong lỗ” (Merchant et al., Nat Biotech. 16, 677-681 (1998)). Cấu trúc siêu phân tử γ của thụ thể IL-2 sau đó được dung hợp với biến thể Fc (phần phình) (xem SEQ ID NO 23 và 24 (ở người), SEQ ID NO 29 và 30 (ở chuột nhắt) và SEQ ID NO 35 và 36 (ở khỉ đầu chó)), được dị đimer hóa bằng Fc(lỗ). Protein dung hợp với Fc dị đimer hóa này sau đó được sử dụng ở dạng cơ chất để phân tích sự tương tác thụ thể IL-2/IL-2. Cấu trúc siêu phân tử α của IL-2R được biểu hiện ở dạng chuỗi monome với vị trí phân tách AcTev và nhãn Avi His (SEQ ID NO 25 và 26 (người), SEQ ID NO 31 và 32 (chuột nhắt) và SEQ ID NO 37 và 38 (ở khỉ đầu chó)). Các cấu trúc siêu phân tử IL-2R tương ứng được biểu hiện tạm thời trong tế bào HEK EBNA 293 có huyết thanh đối với cấu trúc cấu trúc siêu phân tử $\beta\gamma$ của IL-2R và không có huyết thanh đối với cấu trúc cấu trúc siêu phân tử α . Cấu trúc cấu trúc siêu phân tử $\beta\gamma$ của IL-2R được tinh chế trên protein A (GE Healthcare), sau đó là sắc ký loại theo kích thước (GE Healthcare, Superdex 200). Cấu trúc siêu phân tử α của IL-2R được tinh chế thông qua nhãn His trên cột NiNTA (Qiagen), sau đó là sắc ký loại theo kích thước (GE Healthcare, Superdex 75). Axit amin và các trình tự nucleotit tương ứng có các cấu trúc thụ thể khác nhau được nêu trong SEQ ID NO 21-38.

Điều chế protein dung hợp

Trình tự ADN được tạo ra bằng kỹ thuật tổng hợp gen và/hoặc kỹ thuật sinh học phân tử cổ điển và được tách dòng phụ vào vector biểu hiện của động vật có vú dưới sự kiểm soát của gen khởi đầu MPSV và vị trí ngược dòng của vị trí polyA tổng hợp, mỗi vector mang trình tự EBV OriP. Protein dung hợp như được áp dụng trong các ví dụ

dưới đây được sản xuất bằng cách đồng chuyển nhiễm các tế bào HEK293-EBNA sinh trưởng theo hàm mũ bằng vector biểu hiện của động vật có vú bằng cách sử dụng kỹ thuật chuyển nhiễm canxi phosphat. Theo một cách khác, các tế bào HEK293 sinh trưởng trong huyền phù được chuyển nhiễm bằng vector biểu hiện tương ứng bằng polyetylenimin (PEI). Theo một cách khác, nhóm tế bào CHO được chuyển nhiễm ổn định hoặc dòng tế bào CHO được sử dụng để sản xuất trong môi trường không huyết thanh. Tiếp đó, protein dung hợp được tinh chế từ phần dịch nổi trên bề mặt. Nói ngắn gọn là, protein dung hợp được tinh chế bằng một bước ái lực với protein A (HiTrap ProtA, GE Healthcare) được cân bằng trong natri phosphat 20mM, natri xitrat 20mM, độ pH = 7,5. Sau khi nạp phần dịch nổi trên bề mặt, cột trước tiên được rửa bằng natri phosphat 20mM, natri xitrat 20mM, độ pH = 7,5 và tiếp đó được rửa bằng natri phosphat 13,3mM, natri xitrat 20mM, natri clorua 500mM, độ pH = 5,45. Protein dung hợp được rửa giải bằng natri xitrat 20mM, natri clorua 100mM, glyxin 100mM, độ pH = 3 hoặc natri xitrat 10mM độ pH = 3,0. Các phần được trung hòa bằng Na_2HPO_4 0,5M độ pH = 8,0 (1:10), được gom và được tinh chế bằng sắc ký loại theo kích thước (HiLoad 16/60 Superdex 200, GE Healthcare hoặc HiLoad 26/60 Superdex 200, GE Healthcare) trong dung dịch đệm phối trộn cuối cùng: histidin 20mM, NaCl 140mM có độ pH = 6,0. Nồng độ protein của các mẫu protein đã tinh chế được xác định bằng cách đo mật độ quang (OD) ở 280nm, sử dụng hệ số tắt phân tử được tính trên cơ sở của trình tự axit amin. Phân tử lượng cũng được xác định trên cơ sở trình tự axit amin. Độ tinh khiết và phân tử lượng của protein dung hợp được phân tích bằng SDS-PAGE khi có mặt và không có mặt của chất khử (5mM 1,4-dithiotreitol) và được nhuộm bằng màu xanh da trời Coomassie (SimpleBlue™ SafeStain, Invitrogen). Hệ gel NuPAGE® Pre-Cast (Invitrogen) được sử dụng theo các chỉ dẫn của nhà sản xuất (4-20% gel Tris-glyxin hoặc 3-12% Bis-Tris). Theo một cách khác, độ tinh khiết và phân tử lượng của các phân tử được phân tích bằng phép phân tích CE-SDS khi có mặt và không có mặt của chất khử, sử dụng hệ Caliper LabChip GXII (Caliper Lifescience) theo các chỉ dẫn của nhà sản xuất. Hàm lượng kết tụ của các mẫu protein dung hợp được phân tích bằng cách sử dụng cột loại theo kích thước phân tích Superdex 200 10/300GL (GE Healthcare) trong MOPS 2mM, NaCl 150mM, NaN_3 0,02%, dung dịch đệm chạy, độ

pH = 7,3 ở nhiệt độ 25°C. Theo một cách khác, hàm lượng kết tụ của các mẫu kháng thể được phân tích bằng cách sử dụng cột loại theo kích thước phân tích TSKgel G3000 SW XL (Tosoh) trong K₂HPO₄ 25mM, NaCl 125mM, L-arginin monohydroclorua 200mM, NaN₃ 0,02% (trọng lượng/thể tích), dung dịch đệm chạy độ pH = 6,7 ở nhiệt độ 25°C.

Các kết quả của quá trình tinh chế và đặc trưng của cấu trúc DP47GS IgG-IL-2, DP47GS IgG-(IL-2)₂, DP47GS IgG-IL-2 N88D, DP47GS IgG-(IL-2 N88D)₂ và DP47GS IgG-(IL-2 E95A)₂ lần lượt được thể hiện trên các hình vẽ Fig. 1, Fig. 2, Fig. 3, Fig. 4 và Fig. 5.

Ái lực đối với thụ thể IL-2

Ái lực của protein dung hợp được xác định bằng kỹ thuật cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR) trên Biacore T200 (GE Healthcare) đối với dị đime của IL-2R $\beta\gamma$ ở người, ở chuột và ở khỉ đầu chó bằng cách sử dụng dị đime của IL-2R $\beta\gamma$ tái tổ hợp trong các điều kiện sau: phối tử: dị đime có phần phình β lỗ γ của IL-2R ở người, ở chuột và ở khỉ đầu chó được biotinyl hóa được cố định trên chip SA (mức độ cố định lần lượt là 194, 114 và 116 RU), chất phân tích: DP47GS IgG-IL-2 (xem SEQ ID NO 13, 15 và 19), DP47GS IgG-(IL-2)₂ (xem SEQ ID NO 17 và 19), DP47GS IgG-IL-2 N88D (xem SEQ ID NO 15, 19 và 48), DP47GS IgG-(IL-2 N88D)₂ (xem SEQ ID NO 19 và 50), và DP47GS IgG-(IL-2 E95A)₂ (xem SEQ ID NO 19 và 52), nhiệt độ: 25°C, dung dịch đệm: HBS-EP, nồng độ chất phân tích: 100nM xuống đến 1,2nM (pha loãng tỷ lệ 1:3), tốc độ chảy: 30 μ l/phút, kết hợp: 120 giây, phân ly: 600 giây đối với 2 nồng độ cao nhất và 120 giây đối với các nồng độ thấp hơn, tái tạo: 60 giây 3M MgCl₂, khớp: mô hình gắn kết 1:1 Langmuir, RI $\neq$ 0, Rmax=cục bộ. Ái lực được xác định dựa trên hằng số tốc độ động học k_{on} và k_{off} . Ái lực của protein dung hợp cũng được xác định đối với cấu trúc siêu phân tử α của IL-2R ở người, chuột và khỉ đầu chó bằng cách sử dụng cấu trúc siêu phân tử α của IL-2R monome tái tổ hợp trong các điều kiện sau: phối tử: cấu trúc siêu phân tử α của IL-2R ở người, chuột và khỉ đầu chó được cố định trên chip CM5 bằng cách kết hợp amin (mức độ cố định lần lượt là 240, 245 và 220 RU), chất phân tích: DP47GS IgG-IL-2 (xem SEQ ID NO 13, 15 và 19), DP47GS IgG-

(IL-2)₂ (xem SEQ ID NO 17 và 19), DP47GS IgG-IL-2 N88D (xem SEQ ID NO 15, 19 và 48), DP47GS IgG-(IL-2 N88D)₂ (xem SEQ ID NO 19 và 50), và DP47GS IgG-(IL-2 E95A)₂ (xem SEQ ID NO 19 và 52), nhiệt độ: 25°C, dung dịch đệm: HBS-EP, nồng độ chất phân tích 300nM xuống đến 0,41nM (pha loãng tỷ lệ 1:3), tốc độ chảy: 30 µl/phút, kết hợp: 120 giây, phân ly: 180 giây, tái tạo: glyxin 10mM, độ pH = 1,5 trong 60 giây. Ái lực được xác định bằng kỹ thuật phân tích trạng thái ổn định.

Các kết quả về phép đo ái lực dựa trên động học đối với dị đime của IL-2R βγ và trạng thái ổn định đối với cấu trúc siêu phân tử α của IL-2R được nêu trong Bảng 1.

Bảng 1. Khả năng gắn kết của protein dung hợp với IL-2R βγ và IL-2R α.

K _D tính theo nM	Hu IL-2R $\beta\gamma$	Cy IL-2R $\beta\gamma$	Mu IL-2R $\beta\gamma$	Hu IL-2R α	Cy IL-2R α	Mu IL-2R α
DP47GS IgG-IL-2	0,15	0,60	0,85	51	81	112
DP47GS IgG-(IL-2) ₂	0,11	0,17	0,37	20	31	26
DP47GS IgG-IL-2 N88D	0,93	1,3	2,4	18	31	48
DP47GS IgG-(IL-2 N88D) ₂	0,24	0,57	2,1	22	30	25
DP47GS IgG-(IL-2 E95A) ₂	0,16	0,29	0,36	24	32	26

Phản dung hợp DP47GS IgG – IL-2 ở người và các thể đột biến của nó không chỉ gắn kết với 3 chuỗi thụ thể IL-2 ở người khác nhau α , β và γ mà còn gắn kết với các chuỗi thụ thể tương ứng từ khỉ đầu chó và chuột nhắt, mặc dù các ái lực, về trung bình, có xu hướng giảm nhẹ đối với hai loài khỉ đầu chó và chuột nhắt. Ái lực của các phản dung hợp xytokin này đối với chuỗi α ở người và ở khỉ đầu chó là tương thích, với chuỗi α chuột có ~2 lần ái lực khác nhau so với chuỗi α người được quan sát đối với các phân tử chỉ mang một phần xytokin. Đối với các phân tử có hai phần xytokin, hầu như do ái lực, sự khác nhau này không tồn tại. Các ái lực của DP47GS IgG-IL-2 và DP47GS IgG-IL-2 N88D đối với chuỗi α theo lý thuyết nên bằng đột biến N88D nên không ảnh hưởng đến bề mặt chung đối với chuỗi α . N88 được định vị trong bề mặt

chung đối với chuỗi β của thụ thể IL-2 và đột biến thành D dẫn đến ái lực giảm do có thể được quan sát so với khả năng gắn kết của DP47GS IgG-IL-2 và DP47GS IgG-IL-2 N88D đối với IL-2R $\beta\gamma$ của tất cả ba loài (0,15nM, 0,60nM và 0,85nM so với 0,93nM, 1,3nM và 2,4nM, một cách lần lượt). Đối với DP47GS IgG-(IL-2 N88D)₂ mang hai IL-2-xytokin đột biến, ít nhất đối với IL-2R $\beta\gamma$ ở người, sự khác nhau này ít được thông báo, hầu như do ái lực. DP47GS IgG-(IL-2)₂ và DP47GS IgG-(IL-2 E95A)₂ có các ái lực rất giống nhau khi gắn kết với IL-2R $\beta\gamma$ của tất cả ba loài. Mặc dù E95 cũng được định vị trong bề mặt chung đối với chuỗi β của thụ thể IL-2, đột biến thành A, ít nhất khi hai trong các thể đột biến này được dung hợp với IgG, không dẫn đến việc giảm đáng kể ái lực.

Biểu hiện của thụ thể IL-2 trên tế bào miễn dịch

Thụ thể IL-2 trime ái lực cao gồm chuỗi α (IL-2RA, CD25), β (IL-2RB, CD122) và γ (IL-2RG, CD132) và có K_D bằng ~ 10 pM. Một mình CD25 chỉ có ái lực thấp ($K_D \sim 10$ nM) đối với IL-2. Dime IL-2RB/IL-2RG, được biểu hiện ở một số loại tế bào khi không có IL-2RA, cũng gắn kết IL-2 nhưng với ái lực trung bình ($K_D \sim 1$ nM). Việc truyền tín hiệu thông qua thụ thể IL-2 được điều tiết bằng chuỗi IL-2RB và IL-2RG. Từ việc phân tích cấu trúc tinh thể, IL-2RA dường như không tiếp xúc với IL-2RB hoặc IL-2RG. Được đề xuất là, cơ sở đồng gắn kết của thụ thể trime là sự giảm entropy khi CD25 bắt IL-2 ở bề mặt tế bào để biểu hiện đối với IL-2RB và IL-2RG, hoặc theo một cách khác, sự thay đổi cảm ứng bởi CD25 trong cấu dạng IL-2 xuất hiện, do đó làm ổn định phức. Trong tế bào T CD4⁺ điều hòa FOXP3⁺, có lượng dư lớn hệ số tỷ lệ IL-2RA so với chuỗi β và γ của thụ thể hỗ trợ giả thiết là dime, hoặc thậm chí các phức lớn hơn, của chuỗi α hỗ trợ việc gắn kết của IL-2. Cũng có bằng chứng cho thấy CD25 trên một tế bào có thể biểu hiện IL-2 đối với dime IL-2RB/IL-2RG ở một tế bào khác, trong tương tác gian bào ái lực cao làm nổi bật mối liên hệ đồng đều giữa ba chuỗi hình thành thụ thể IL-2 ái lực cao.

Sự biểu hiện của CD25 (IL-2RA) và CD122 (IL-2RB) trên tiểu quần thể tế bào Treg CD4⁺, tập hợp con tế bào NK và tế bào NKT, cũng như trên tập hợp con tế bào T thông thường CD4⁺ và CD8⁺ được xác định bằng FACS (Fig. 6 và Fig. 7). Gen đánh

dấu bề mặt tế bào được sử dụng để xác định tiểu quần thể tế bào Treg CD4⁺, tế bào NKT và tế bào NK (Fig. 6). Để tối ưu hóa việc nhuộm màu đối với CD25 và CD122, việc nhuộm FOXP3 nội bào không được tiến hành. Nói ngắn gọn là, việc sử dụng 150µl máu được hiến bởi tình nguyện viên khỏe mạnh, các kháng thể huỳnh quang được ủ trong 45 phút ở nhiệt độ trong phòng trong bóng tối (khuấy khi bắt đầu và sau 20 phút). Các tế bào hồng cầu được dung giải bằng dung dịch đệm dung giải BD (dung dịch dung giải BD FACS, 349202) trong 9 phút và các tế bào còn lại được rửa (2ml PBS + 0,1% BSA) và được cố định (1% PFA). Các tế bào được phân tích trên máy phân tích tế bào LSRFortessa™ (Becton Dickinson) và dữ liệu được phân tích bằng cách sử dụng phần mềm FloJo (TreeStar). Các tiểu quần thể tế bào Treg ở được nhận biết bằng cách sử dụng các kháng thể đặc hiệu với TCRαβ-FITC (IP26, BioLegend), CD4-Alexa Fluor® 700 (RPA-T4, BioLegend), CD127-PE/CY7 (ebioRDR5, Ebioscience), CD45RA-Pacific Blue (HI100, BioLegend), CD25-APC (2A3, M-A251, BD Biosciences) và CD122-PE (TU27, BioLegend). Tế bào NK và tế bào NKT được nhuộm màu trong ống tách bằng các kháng thể đặc hiệu với TCRαβ-FITC, CD4-Alexa Fluor® 700, CD8-PE/CY7 (HTT8a, BioLegend), CD56-Pacific Blue (HCD56, BioLegend), CD25-APC và CD122-PE. Sau khi rút các lympho bào dựa trên FSC/SSC và ngoại trừ nhóm đôi, Treg chưa quen thí nghiệm được nhận biết là TCRαβ⁺CD4⁺CD127⁻CD25⁺CD45RA⁺, Treg ghi nhớ được nhận biết là TCRαβ⁺CD4⁺CD127⁻CD25⁺CD45RA⁻ và Treg được hoạt hóa được nhận biết là TCRαβ⁺CD4⁺CD127⁻CD25^{cao}CD45RA⁻. Các tế bào NK được nhận biết là TCRαβ⁻CD56^{-mờ} và các tế bào NK được hoạt hóa được nhận biết là TCRαβ⁻CD56^{rõ}. Các tế bào NKT được nhận biết là TCRαβ⁺CD56⁺. Đối chứng isotyp (IC) được liên hợp với APC và PE được sử dụng để ước tính huỳnh quang nền lần lượt đối với CD25 và CD122.

Tương tự, gen đánh dấu bề mặt tế bào được sử dụng để xác định tế bào T CD4⁺ thông thường chưa quen thí nghiệm và ghi nhớ (Fig. 7A và Fig. 7B), tế bào T CD8⁺ ghi nhớ thông thường và tế bào T CD45RA⁺ CD8 (tổ hợp của tập hợp con chưa quen thí nghiệm và TEMRA; TEMRA được dùng để chỉ tế bào T ghi nhớ hiệu lực đã khôi phục để biểu hiện CD45RA) (Fig. 7C và 7D). Việc nhuộm màu và phân tích được thực hiện như được mô tả trên đây. Việc sử dụng ống giống như được mô tả trên đây để đặc

trung CD4⁺ Treg, tế bào T chưa quen thí nghiệm CD4⁺ thông thường được nhận biết là TCRαβ⁺CD4⁺CD127⁺CD25^{-/+}CD45RA⁺ và tế bào T ghi nhớ thông thường CD4⁺ được nhận biết là TCRαβ⁺CD4⁺CD127⁺CD25^{-/+}CD45RA⁻. Tế bào T của CD8 được xác định bằng cách sử dụng TCRαβ-FITC, CD8-Alexa Fluor[®] 700 (HTT8a, BioLegend), CD28-PE/CY7 (CD28.2, BioLegend), CD45RA-Pacific Blue, CD25-APC và CD122-PE. Tế bào T ghi nhớ CD8⁺ được nhận biết là TCRαβ⁺CD8⁺CD45RA⁻. Tế bào CD8⁺ chưa quen thí nghiệm và tế bào TEMRA được nhận biết là TCRαβ⁺CD8⁺CD45RA⁺. CD28 không được sử dụng để phân biệt tế bào T chưa quen thí nghiệm CD8⁺ từ tế bào T CD8⁺ TEMRA do gen đánh dấu CD28 không được bao gồm trong phép phân tích pSTAT5a được mô tả dưới đây (xem Fig. 8). Trong một số thử nghiệm (Fig. 15), các tập hợp con bổ sung được xác định như sau: tế bào T CD4⁺ ghi nhớ trung tâm (TCRαβ⁺CD4⁺CD56⁻FOXP3⁺CD45RA⁻CD127⁺CD25^{-/+}), tế bào T CD4⁺ ghi nhớ hiệu lực (TCRαβ⁺CD4⁺CD56⁺FOXP3⁻CD45RA⁻CD127⁺CD25^{-/+}), tế bào T CD8⁺ ghi nhớ trung tâm (TCRαβ⁺CD8⁺CD56⁻FOXP3⁺CD45RA⁻CD127⁺CD25^{-/+}), tế bào T CD8⁺ ghi nhớ hiệu lực (TCRαβ⁺CD8⁺CD56⁺FOXP3⁻CD45RA⁻CD127⁺CD25^{-/+}), và tế bào TEMRA CD8⁺ (TCRαβ⁺CD8⁺CD56⁺FOXP3⁻CD45RA⁺CD127⁺CD25^{-/+}).

Trên Fig. 6 và Fig.7, sự biểu hiện đặc hiệu tế bào của IL-2RA và IL-2RB được thể hiện đối với tập hợp con của tế bào T, tế bào NK và tế bào T của NK ở máu ngoại vi ở người (IL-2RG hầu như biểu hiện khắp nơi trên các tế bào tạo huyết do đối tượng đi kèm của nó có số lượng lớn thụ thể xytokin). Nồng độ IL-2RA cao nhất có trên ba tập hợp tế bào T CD4⁺ điều hòa (Treg): chưa quen thí nghiệm (CD45RA⁺CD25⁺), ghi nhớ (CD45RA⁻CD25⁺) và được hoạt hóa (CD45RA⁻CD25^{cao}) (Fig. 6A). Trung bình, tế bào T CD4⁺ ghi nhớ thông thường biểu hiện CD25 ít hơn khoảng 10 lần so với Treg (Fig. 7A). Sự biểu hiện của CD25 trên tế bào T CD4⁺ chưa quen thí nghiệm thay đổi đáng kể giữa đối tượng cho nhưng luôn thấp hơn so với sự biểu hiện được quan sát thấy trên tế bào T CD4⁺ ghi nhớ (Fig. 7A). Sự biểu hiện của CD25 trên NK, NKT và tế bào T của CD8 là rất thấp hoặc không phát hiện ra được ngoại trừ tế bào NK CD56^{rõ} (Fig. 6C và Fig. 7C). Các tế bào của NK^{rõ} CD56^{rõ} và tế bào NK của CD56⁺ biểu hiện nồng độ IL-2RB cao nhất (Fig. 6D), nhiều hơn khoảng 10 lần so với tập hợp con tế bào T bất kỳ, bao gồm tế bào NKT (Fig. 6B, Fig. 6D, Fig. 7B, Fig. 7D).

Cảm ứng pSTAT5a trong tập hợp con tế bào máu ngoại vi ở người

Sau quá trình oligome hóa cảm ứng bởi IL-2 của IL-2R trime, protein tyrosin kinaza bào tương JAK1 và JAK3, được kết hợp lần lượt với các miền nội bào của IL-2RB và IL-2RG, trở nên được hoạt hóa. Các kinaza này phosphoryl hóa một số gốc tyrosin của IL-2RB nhất định mà tác động như vị trí nối đôi với STAT5a và STAT5b lần lượt được phosphoryl hóa. Phương pháp hoạt hóa cảm ứng bởi IL-2 của một vài đường truyền tín hiệu cuối cùng dẫn đến sự phiên mã của gen đích mà góp phần vào các chức năng khác nhau kết hợp với con đường IL-2/IL-2R. Do các loại tế bào khác nhau biểu hiện nồng độ thụ thể IL-2 IL-2RA và phân tử IL-2RB khác nhau (Fig. 6 và 7), các tác giả sáng chế đo nồng độ pSTAT5a trong từng tế bào bằng kỹ thuật đếm tế bào theo dòng chảy đa sắc để hiểu đáp ứng truyền tín hiệu được kết hợp đối với IL-2 được điều tiết bởi các tổ hợp khác nhau của thụ thể ái lực cao và ái lực trung bình.

Tác dụng của liều lượng DP47GS IgG-IL-2, DP47GS IgG-(IL-2)₂, DP47GS IgG-(IL-2E95A)₂, DP47GS IgG-IL-2N88D và DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ khác nhau đến quá trình cảm ứng sự phosphoryl hóa STAT5a được đánh giá trong tiểu quần thể tế bào Treg CD4⁺ ở người, tế bào T CD4⁺ thông thường chưa quen thí nghiệm và ghi nhớ, tế bào T ghi nhớ thông thường CD8⁺, tế bào T CD45RA⁺ CD8, tế bào NKT và tế bào NK (Fig. 8-14 và Bảng 2 và 3.). Tất cả các tập hợp con được đặc trưng trong ống đơn đối với từng liều lượng. Nói ngắn gọn là, máu lấy từ tình nguyện viên là người trưởng thành khỏe mạnh được gom vào ống được heparin hóa. Các nồng độ protein dung hợp DP47GS IgG-IL-2 khác nhau được bổ sung vào 500µl máu và được ủ ở nhiệt độ 37°C. Sau 30 phút, máu được dung giải và cố định bằng cách sử dụng dung dịch đệm dung giải/cố định được làm ấm trước (Becton Dickinson #558049) trong 10 phút ở nhiệt độ 37°C, được rửa 2 lần bằng PBS chứa BSA 0,2%, sau đó là thấm bằng metanol được làm lạnh trước xuống -20°C (Sigma, Biotech grade #494437) trong 20 phút trên đá. Các tế bào sau đó được rửa thêm 4 lần bằng PBS chứa BSA 0,2% trước khi tiến hành nhuộm màu FACS bằng cách sử dụng bảng kháng thể huỳnh quang để phân biệt các nhóm con lympho bào và tế bào NK khác nhau và tình trạng pSTAT5a. Kháng thể được sử dụng là kháng CD4-Alexa Fluor® 700 (clone RPA-T4), CD3-PerCP/Cy5.5 (UCHT1), CD45RA-PE/Cy7 (HI100), CD8-Brilliant Violet 605 (RPA-T8), CD56-

Brilliant Violet 421 (HCD56), FOXP3-PE (259D) (tất cả từ BioLegend), CD25-APC (dòng vô tính M-A251 & 2A3) và pSTAT5a-Alexa Fluor® 488 (pY694) (Becton Dickinson). Các mẫu thu được bằng cách sử dụng máy phân tích tế bào LSRIFortessa™ (Becton Dickinson) và số liệu được phân tích bằng cách sử dụng phần mềm FlowJo (FlowJo, LLC). Sau khi đi vào trên lympho bào và ngoại trừ các nhóm đôi, Treg được xác định là $CD3^+CD4^+FOXP3^+$ và được chia nhỏ thành $CD45^-FOXP3^{hi}$ (Treg được hoạt hóa), $CD3^+CD4^+CD45RA^-FOXP3^+$ (Treg ghi nhớ) và $CD3^+CD4^+CD45^+FOXP3^+$ (Treg chưa quen thí nghiệm). Tế bào T $CD4^+$ thông thường được xác định là $CD3^+CD4^+CD45RA^+$ (chưa quen thí nghiệm) và $CD3^+CD4^+CD45RA^-$ (ghi nhớ). Tế bào T $CD8$ được xác định là $CD3^+CD8^+CD45RA^-$ (ghi nhớ) và $CD3^+CD8^+CD45RA^+$. Các tế bào NKT được xác định là $CD3^+CD56^+$ và tế bào NK được xác định là $CD3^-CD56^{rõ}$ (tế bào NK được hoạt hóa) hoặc $CD3^-CD56^+$ (tế bào NK). Mức độ pSTAT5a nội bào được định lượng trong tất cả các tập hợp con tế bào ở tất cả các liều lượng.

Fig. 8 thể hiện đáp ứng liều lượng của thể liên hợp miễn dịch DP47GS IgG-IL-2 đến tế bào T, tế bào NK và tế bào T của NK ở máu ngoại vi ở người từ ba đối tượng cho riêng rẽ, mỗi đối tượng được thử nghiệm vào các ngày khác nhau. Thứ bậc của độ đáp ứng đối với DP47GS IgG-IL-2 là giống nhau ở tất cả ba đối tượng cho và giống nhau như được quan sát khi IL-2 ở người tái tổ hợp (Proleukin®) được sử dụng (dữ liệu không được thể hiện). Tất cả ba tập hợp Treg, được hoạt hóa ($CD45RA^-CD25^{cao}$), ghi nhớ ($CD45RA^-CD25^+$), và chưa quen thí nghiệm ($CD45RA^+CD25^+$) làm tăng nồng độ pSTAT5a ở nồng độ 0,1ng/mL của DP47GS IgG-IL-2 trong khi đó các tập hợp tế bào khác yêu cầu lớn hơn 1ng/mL (NK $CD56^{rõ}$ và tế bào T $CD4^+$ ghi nhớ) hoặc 10-100ng/mL (tế bào T $CD8^+$ ghi nhớ, tế bào NK $CD56^+$, tế bào T $CD4^+$ chưa quen thí nghiệm, tế bào NKT và tế bào T $CD45RA^+CD8$) của DP47 IgG-IL-2 để tạo ra các lượng tăng phát hiện được ở pSTAT5a. Cũng xem trên Fig. 11 về đáp ứng liều lượng chi tiết hơn bởi tập hợp Treg biểu hiện độ nhạy cao của chúng đối với DP47GS IgG-IL-2. Đáng chú ý là sự biểu hiện cao của IL-2RB trên tế bào NK với mức độ trung bình $CD56$ (Fig. 6D) so với sự biểu hiện IL-2RB trên tập hợp con tế bào T không đủ để cho phép độ nhạy IL-2 giống như Treg. Nhìn chung, các tiểu quần thể tế bào Treg ở được hoạt hóa, ghi nhớ và chưa quen thí nghiệm cho thấy độ nhạy lớn nhất đối với DP47GS

IgG-IL-2, trong khi tế bào NK CD56^{ro} và tế bào tác động T ghi nhớ thông thường CD4⁺ ít nhạy hơn gấp 20-50 lần. Giữa các tập hợp con tế bào khác được phân tích về sự tăng pSTAT5a, tế bào tác động T ghi nhớ CD8⁺, tế bào tác động T chưa quen thí nghiệm CD4⁺, tế bào NKT, tế bào NK “ngủ” (dương, không nhuộm màu sáng đối với CD56), và tế bào tác động T chưa quen thí nghiệm CD8⁺ tế bào ghi nhớ CD45RA⁺ tương đối không nhạy đối với thể liên hợp miễn dịch IgG-IL-2.

Fig. 9 thể hiện đáp ứng liều lượng của DP47GS IgG-(IL-2)₂ lên tế bào T, tế bào NK và tế bào T của NK ở máu ngoại vi ở người từ năm đối tượng cho riêng rẽ, mỗi đối tượng được thử nghiệm vào các ngày khác nhau. Như quan sát được đối với DP47GS IgG-IL-2 (Fig. 8), ba tiểu quần thể tế bào Treg ở là các tế bào nhạy nhất với pSTAT5a được cảm ứng DP47GS IgG-(IL-2)₂ (Fig. 9 và Fig. 11) và đáp ứng liều lượng có cấp bậc tương tự được phát hiện đối với các tập hợp con tế bào khác ở tất cả năm đối tượng cho.

Để dễ so sánh hơn giữa DP47GS IgG-IL-2 và DP47GS IgG-(IL-2)₂, giá trị pSTAT5a được chuẩn hóa (Fig. 10). Để trở về bình thường các giá trị MFI, giá trị pSTAT5a MFI không kích thích đặc hiệu với mỗi tập hợp con được đưa vào được trừ đi bởi tất cả các giá trị MFI được kích thích đối với tập hợp con tế bào này. Các giá trị thu được được chia bởi giá trị pSTAT5a MFI cao nhất thu được bằng tập hợp con trong đáp ứng liều lượng. Các giá trị EC₅₀ được ước tính dựa trên lượng protein dung hợp IL-2 được yêu cầu để đạt được 50% pSTAT5a MFI tối đa quan sát được đối với tập hợp con này. Như được thể hiện trong Fig. 10, thể liên hợp miễn dịch DP47GS IgG-(IL2)₂ tạo ra cảm ứng có hiệu lực hơn của pSTAT5a ở các tế bào chủ yếu biểu hiện CD25, có khả năng là do tăng ái lực của thể liên hợp miễn dịch đối với thụ thể IL-2 ái lực cao. EC₅₀ để hoạt hóa pSTAT5a được quan sát là thấp hơn 5-9 lần ở tế bào Treg khi so sánh trực tiếp DP47GS IgG-(IL-2)₂ với DP47GS IgG-IL-2. Bảng 2 tóm tắt các giá trị EC₅₀ tương ứng và số lần khác nhau đối với việc hoạt hóa pSTAT5a bằng DP47GS IgG-IL-2 so với DP47GS IgG-(IL-2)₂ trong các tập hợp con tế bào khác nhau.

Bảng 2. Giá trị EC₅₀ và số lần khác nhau đối với pSTAT5a bằng DP47GS IgG-IL-2 so với DP47GS IgG-(IL-2)₂ ở các tập hợp con tế bào khác nhau.

Tế bào T	IgG-IL-2	IgG-(IL-2) ₂	Thay đổi gấp số lần
Treg được hoạt hóa	0,10ng/mL	0,020ng/mL	5
Treg ghi nhớ	0,22ng/mL	0,033ng/mL	7
Treg chưa quen thí nghiệm	0,20ng/mL	0,023ng/mL	9
NK CD56 ^{r0}	2,0ng/mL	0,63ng/mL	3
Teff ghi nhớ CD4 ⁺	5ng/mL	0,7ng/mL	7
Tế bào NK	35ng/mL	10ng/mL	4

Thậm chí ở nồng độ cực kì hạn chế, DP47GS IgG-(IL-2)₂ tạo ra nồng độ pSTAT5a cao hơn so với DP47GS IgG-IL-2 (Fig. 11). Đối với thử nghiệm này, máu lấy từ ba tình nguyện viên khỏe mạnh được thử nghiệm riêng rẽ vào cùng một ngày về đáp ứng đối với việc chuẩn độ 2 lần của DP47 IgG-IL-2 và DP47 IgG-(IL-2)₂ ở nồng độ hạn chế của IL-2. Các biểu đồ trên Fig. 11 thể hiện giá trị trung bình $\pm$ SD của pSTAT5a MFI đối với ba đối tượng cho. Ngoài ba tiểu quần thể tế bào Treg ở được thử nghiệm riêng rẽ (Fig. 11B-D), công được áp dụng để đánh giá pSTAT5a trong tổng số lượng các tế bào Treg CD3⁺CD4⁺FOXP3⁺ (Fig. 11A). Các kết quả rõ ràng chỉ ra sự tăng gấp 5-10 lần về hiệu lực đối với sự hoạt hóa DP47GS IgG-(IL-2)₂ của Treg mặc dù chỉ tăng gấp 2 lần ở IL-2 cho mỗi phân tử IgG. Việc đếm tế bào theo dòng chảy đa sắc được thực hiện như được mô tả trên đây (xem Fig. 8).

Tế bào tác động T ghi nhớ thông thường CD4⁺ cũng được đáp ứng để làm giảm (7 lần) nồng độ của DP47GS IgG-(IL-2)₂ so với DP47GS IgG-IL-2. Trong khi giá trị

EC₅₀ thấp hơn đối với tế bào NK CD56^{ro} và tế bào NK CD56⁺ khi so sánh DP47GS IgG-(IL-2)₂ với DP47 IgG-IL-2, mức giảm lần lượt chỉ là 3 lần và 4 lần. Điều này dường như là do độ tin cậy của các tế bào này đối với thụ thể IL-2 ái lực trung bình để truyền tín hiệu qua trung gian IL-2. Sự thay đổi chênh lệch này ở ED₅₀ trong Treg so với tế bào NK làm tăng sự ưu tiên đối với việc hoạt hóa Treg một vài lần.

Fig. 12 thể hiện đáp ứng liều lượng của DP47GS IgG-(IL-2E95A)₂ đến tế bào T, tế bào NK và tế bào T của NK ở máu ngoại vi ở người từ ba đối tượng cho riêng rẽ, mỗi đối tượng được thử nghiệm vào các ngày khác nhau. Phân tử IL-2E95A được thiết kế và được dự đoán là làm giảm hoạt tính gắn kết IL-2Rβγ nhưng trên thực tế biểu hiện các tính chất gắn kết tương tự với thụ thể IL-2Rβγ như IL-2 kiểu đại. Mức độ đáp ứng đối với DP47GS IgG-(IL-2E95A)₂ là giống nhau ở tất cả ba đối tượng cho và giống như quan sát được ở cùng đối tượng cho với DP47GS IgG-(IL-2)₂ của thể liên hợp miễn dịch IL-2 kiểu đại. Tất cả ba tập hợp Treg, hoạt hóa (CD45RA⁻CD25^{cao}), ghi nhớ (CD45RA⁻CD25⁺), và chưa quen thí nghiệm (CD45RA⁺CD25⁺) làm tăng nồng độ pSTAT5a ở nồng độ dưới 0,1ng/mL của DP47GS IgG-(IL-2E95A)₂ trong khi đó các tập hợp tế bào khác yêu cầu 1ng/mL (NK biểu hiện CD56 rõ và tế bào tác động T ghi nhớ thông thường CD4⁺) hoặc 10-100ng/mL (tế bào T CD8⁺ ghi nhớ, tế bào NK CD56⁺, tế bào T CD4⁺ chưa quen thí nghiệm, tế bào NKT và tế bào T CD45RA⁺CD8⁺) của DP47 IgG-(IL-2E95A)₂ để tạo ra các lượng tăng phát hiện được ở pSTAT5a. Đáng chú ý rằng, sự biểu hiện cao của IL-2RB đến tế bào NK với nồng độ trung bình của CD56 (Fig. 6D) so với sự biểu hiện IL-2RB trên các tập hợp con tế bào T là không đủ để cho phép độ nhạy IL-2 như Treg. Nhìn chung, tiểu quần thể tế bào Treg ở được hoạt hóa, ghi nhớ và chưa quen thí nghiệm cho thấy độ nhạy lớn nhất đối với DP47GS IgG-(IL-2E95A)₂, trong khi tế bào NK CD56^{ro} và tế bào tác động T ghi nhớ thông thường CD4⁺ ít nhạy hơn gấp 20-50 lần. Giữa các tập hợp con tế bào khác được phân tích về sự tăng pSTAT5a, tế bào tác động T ghi nhớ CD8⁺, tế bào tác động T chưa quen thí nghiệm CD4⁺, tế bào NKT, tế bào NK “ngủ” (dương, không nhuộm sáng đối với CD56), và Tế bào tác động T chưa quen thí nghiệm CD8⁺ CD45RA⁺ là tương đối nhạy đối với thể liên hợp miễn dịch IgG-(IL-2E95A)₂.

Fig. 13 thể hiện đáp ứng liều lượng của DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ lên tế bào T, tế bào NK và tế bào T của NK ở máu ngoại vi ở người từ năm đối tượng cho riêng rẽ, mỗi đối tượng được thử nghiệm vào các ngày khác nhau. Phân tử IL-2N88D được thiết kế để làm giảm hoạt tính gắn kết IL2R $\beta\gamma$ và không giống như đột biến điểm E95A, nó có ái lực gắn kết ít hơn 6,2 lần so với IL2R $\beta\gamma$ nhờ phân tích Biacore (Bảng 1, K_D 0,15nM so với 0,93nM). Như được quan sát đối với tất cả các thể liên hợp miễn dịch IL-2 theo thời gian, ba tiểu quần thể tế bào Treg ở là tế bào nhạy nhất đối với sự hoạt hóa pSTAT5a bởi DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ và các đáp ứng liều lượng có thứ bậc tương tự được phát hiện đối với các tập hợp con tế bào khác ở tất cả năm đối tượng cho. Được chú ý đặc biệt là sự thiếu độ đáp ứng của tế bào tác động T ghi nhớ CD4⁺ khi được kích thích bằng DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂; thậm chí ở các liều bằng 1000ng/mL nó có ít tác dụng kích thích đến tập hợp tế bào tự miễn quan trọng này.

Trong ví dụ này, đột biến điểm đơn IL-2 được thiết kế đồng đều, N88D, làm giảm đột ngột hoạt tính kích thích đến tập hợp tế bào mong muốn, tế bào tác động T ghi nhớ CD4⁺, trong khi tất cả duy trì tác dụng kích thích Treg được yêu cầu đối với tác nhân điều trị bệnh mới và cải tiến.

Để so sánh IL-2 DP47GS IgG-(IL-2)₂ kiểu đại với thể liên hợp miễn dịch có đột biến điểm E95A và N88D IL-2, giá trị pSTAT5a được vẽ sơ đồ so với nhau đối với từng loại tế bào được thử nghiệm (Fig. 14). DP47GS IgG-(IL-2E95A)₂ cho thấy hoạt tính giống hệt như DP47GS IgG-(IL-2)₂ đối chiều kiểu đại của nó kích thích từng tập hợp tế bào người với các đường cong đáp ứng liều lượng chồng khít lên nhau. Ngược lại, phân tử gắn kết IL2R $\beta\gamma$ được khử, DP47GS IgG-IL-2N88D và DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂, có ít ảnh hưởng đến tế bào tác động T ghi nhớ CD4⁺ và chỉ có DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ liên hợp hóa trị hai giữ được hoạt tính kích thích đáng kể đến các tập hợp Treg khác nhau.

Các kết quả trên Fig. 15 cho thấy đáp ứng pSTAT5a ở máu toàn phần được thu gom từ mười người cho máu khác. Vào các ngày riêng rẽ, mỗi người cho được thử nghiệm so sánh khoảng chuẩn độ rộng (≥ 6 log) của DP47GS IgG-(IL-2)₂ và DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂. Như đã thấy trước đó với DP47GS IgG-(IL-2)₂ (Fig. 9), Treg ghi

nhớ và Treg chưa quen thí nghiệm là các tế bào nhạy nhất với pSTAT5a được cảm ứng bởi DP47GS IgG-(IL-2)₂ và DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ (Fig. 15A, B); trong khi từng đáp ứng pSTAT5a tối đa được kích thích bởi protein dung hợp, chúng khác nhau về nồng độ cần cho điểm phản ánh phương pháp hoạt hóa cũng như liều lượng tối đa để hoạt hóa. Các tế bào NK CD56⁺ có mặt ở dạng tập hợp con tế bào ít nhạy hơn so với Treg đối với DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ so với protein dung hợp IL-2 kiểu đại (Fig. 15C); điểm phản ánh sự hoạt hóa là cao hơn và trong trường hợp này không bao giờ đạt được tác dụng tối đa thậm chí ở liều lượng thử nghiệm cao nhất (5000ng/mL). Không giống DP47GS IgG-(IL-2)₂, các tế bào NK không đáp ứng với DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ (Fig. 15D). Cả tế bào T CD4⁺ ghi nhớ trung tâm (Fig. 15E) và tế bào T CD4⁺ ghi nhớ hiệu lực (Fig. 15F) tương đối không đáp ứng với DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ với điểm uốn sự hoạt hóa cao hơn 1000 lần so với DP47GS IgG-(IL-2)₂ và chỉ cảm ứng các đáp ứng một phần ở liều lượng thử nghiệm cao nhất (5000ng/mL). Trong khi DP47GS IgG-(IL-2)₂ được cảm ứng làm thay đổi mức độ hoạt hóa, DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ không có ảnh hưởng đến các tập hợp con tế bào sau: tế bào T CD4⁺ chưa quen thí nghiệm (Fig. 15G), tế bào T CD8⁺ ghi nhớ trung tâm (Fig. 15H), tế bào T CD8⁺ ghi nhớ hiệu lực (Fig. 15I), tế bào T CD8⁺ chưa quen thí nghiệm (Fig. 15J), tế bào T CD45RA⁺CD8⁺ ghi nhớ hiệu lực (Fig. 15K), tế bào NKT (Fig. 15L) và tế bào T CD3⁺CD4⁻CD8⁻CD56⁻ (Fig. 15M).

Các giá trị EC₅₀ được thể hiện trong Bảng 3 và dựa trên lượng protein dung hợp IL-2 cần để đạt 50% đáp ứng pSTAT5a tối đa quan sát được đối với tập hợp con tế bào này. DP47GS IgG-(IL-2E95A)₂ như đối chứng IL-2 kiểu đại của nó DP47GS IgG-(IL-2)₂ tạo ra cảm ứng hiệu lực nhất của pSTAT5a ở tế bào Treg, tế bào chủ yếu biểu hiện thụ thể ái lực cao CD25 (IL2R α), có thể là kết quả của việc gia tăng ái lực của nó đối với thụ thể IL-2 ái lực cao. Đáp ứng liều lượng đối với DP47GS IgG-(IL-2E95A)₂ và DP47GS IgG-(IL-2)₂ là không chồng khít lên nhau. EC₅₀ để hoạt hóa pSTAT5a ở tế bào Treg là thấp hơn 6 đến 7 lần so với DP47GS IgG-(IL-2E95A)₂ và DP47GS IgG-(IL-2)₂ so với DP47GS IgG-IL-2 hóa trị một. Tương tự, EC₅₀ để hoạt hóa Treg thấp hơn 7 đến 10 lần với DP47GS IgG-IL-2 hóa trị một so với DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂

hóa trị hai. Và cuối cùng là, EC_{50} để hoạt hóa Treg thấp hơn 36 đến 61 lần với DP47GS IgG-(IL-2)₂ hóa trị hai so với DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ hóa trị hai.

Ưu điểm miễn dịch đáng kể nhất mà DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ có để điều trị các rối loạn tự miễn được minh họa tốt nhất trong Bảng 3 thể hiện lượng dư độ đặc hiệu đáng kể mà DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ có để hoạt hóa Treg so với tế bào tác động T ghi nhớ $CD4^+$ (>320 lần đến >500 lần). Trong quá trình so sánh, lượng dư độ đặc hiệu trong Treg so với tế bào tác động T ghi nhớ $CD4^+$ về cơ bản là ít hơn đối với DP47GS IgG-(IL-2)₂ (13 đến 14 lần) và DP47GS IgG-IL-2 (10 đến 16 lần).

Bảng 3. Giá trị EC_{50} và số lần chênh lệch độ đặc hiệu để hoạt hóa pSTAT5a bởi DP47GS IgG-(IL-2E95A)₂, DP47GS IgG-IL-2, và DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ ở các tập hợp con tế bào khác nhau.

Tập hợp con tế bào người	IgG-IL-2 ED_{50} (pM)	IgG-(IL-2) ₂ ED_{50} (pM)	IgG-(IL-2N88D) ₂ ED_{50} (pM)
Treg ghi nhớ	2,2	0,31	11,4
Treg chưa quen thí nghiệm	1,8	0,29	17,7
Tế bào tác động T ghi nhớ $CD4^+$	29	4	>5700
<u>Số lần đặc hiệu của:</u>			
Treg ghi nhớ so với Treg chưa quen thí nghiệm của Teff ghi nhớ	10	13	>500
$CD4^+$ so với Teff ghi nhớ $CD4^+$	16	14	>320

Tác dụng biệt hóa của protein dung hợp IL-2 đến tế bào NK ở người và tế bào T $CD8^+$ *in vitro*

Các tế bào đơn nhân máu ngoại vi sạch của người (PBMC) được nuôi cấy *in vitro* mà không cần kích thích thêm khác với IL-2, các điều kiện đã biết để ưu tiên sự sống sót và sinh trưởng của tế bào NK và tế bào T CD8⁺. Tế bào NK ở người có thể được chia nhỏ thành các tế bào biểu hiện CD56 thấp hoặc không CD56 phát hiện được (gọi là CD56^{-mở}) và tập hợp con “được hoạt hóa” biểu hiện nồng độ CD56 cao (gọi là CD56^{rở}); phần lớn tế bào NK trong máu là CD56^{-mở} với phần nhỏ được phân loại là CD56^{rở}. Các tế bào NK “được hoạt hóa” là CD56^{rở} được cho là tiền chất của tế bào NK mà thiếu sự biểu hiện CD56 (tức là CD56^{-mở}). Sau sáu ngày *in vitro* với DP47GS IgG-(IL-2)₂ và DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ (mỗi liều là 0, 5, 50 và 500ng/mL) sự khác biệt về sự sinh trưởng và sống sót của các tế bào NK CD56^{-mở}, các tế bào NK CD56^{rở} và tế bào T CD8⁺ được phát hiện ra. Các khác nhau đáng kể về số lượng tế bào được thấy giữa các tác nhân kích thích với DP47GS IgG-(IL-2)₂ kích thích lượng tăng lớn nhất ở tế bào CD56^{rở} (trung bình là 101×10^3 so với 38×10^3 , $p < 0,005$) (Fig. 16A) và cả ở các tế bào T CD8⁺ (trung bình là $13,6 \times 10^3$ tế bào so với $2,5 \times 10^3$ tế bào, $p < 0,0001$) (Fig. 16B).

Ảnh hưởng của protein dung hợp IL-2 ở chuột nhất được người hóa

Chuột nhất được người hóa được xây dựng cấu trúc bằng cách sử dụng chuột nhất mới sinh được chiếu xạ nhẹ NOD.*Prkdc^{scid} IL2rg^{null}* (NSG) để làm vật chủ được dàn xếp miễn dịch và ghép chúng với tế bào gốc CD34⁺ gan phôi thai người được tiêm IP. Ở 8 đến 10 tuần tuổi, máu lấy ra từ từng con chuột nhất này được thử nghiệm để đảm bảo rằng đã xuất hiện sự ghép từ người. So sánh Proleukin và DP47GS IgG-(IL-2)₂, các tác giả sáng chế phát hiện ra rằng, các tế bào sơ cấp bị ảnh hưởng *in vivo* là các tế bào NK và Treg; sau khi điều trị DP47GS IgG-(IL-2)₂, có sự tăng cơ bản ở cả tế bào NK và Treg với tế bào NK đáp ứng theo tỷ lệ lớn hơn. Các ảnh hưởng *in vivo* của Proleukin là tương tự nhưng các ảnh hưởng đến các tế bào NK và Treg trong nhóm là ít phù hợp và phạm vi tăng giảm đi so với DP47GS IgG-(IL-2)₂. Chuột nhất được người hóa cũng có thể biệt hóa các ảnh hưởng *in vivo* của protein dung hợp IL-2. DP47GS IgG-(IL-2)₂ kiểu đại tăng lên ở cả các tế bào Treg (Fig. 17A) và các tế bào NK (Fig. 17B) trong khi DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ không có ảnh hưởng đến các tế bào NK (Fig. 17B) nhưng làm tăng Tregs đến mức độ lớn hơn đáng kể (Fig. 17A) so với IgG-(IL-2)₂ kiểu đại.

Hậu quả về lâu dài khi nhân hóa NSG chuột nhất là thời gian sống sót của chúng ngắn hơn do đáp ứng vật chủ kháng mảnh ghép khác loại ở người dẫn đến việc giảm trọng lượng và sai sót trong cơ quan đa hệ. Việc dùng chất dẫn thuốc hai lần hằng tuần không có tác dụng và dẫn đến khả năng sống sót trung bình là 36 ngày sau khi bắt đầu điều trị (Fig. 18). Tương tự như chất dẫn thuốc, việc điều trị bằng DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ dẫn đến khả năng sống sót trung bình là 37 ngày. Ngược lại, việc điều trị bằng DP47GS IgG-(IL-2)₂ hai lần hằng tuần rút ngắn thời gian sống sót trung bình của nhóm này xuống 21 ngày (Fig. 18, $p < 0,0037$ so với DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂).

Khi mức độ nghiêm trọng được xác định trước của đáp ứng vật chủ chống lại mảnh ghép gây bức chế sự kết thúc đối với cuộc sống của từng con chuột nhất (giảm trọng lượng $\geq 15\%$), chế phẩm tế bào người được đánh giá trong máu. Với đường đáp ứng vật chủ chống lại mảnh ghép đe dọa sự sống, sự khác biệt rõ nét nhất trong phương pháp điều trị được thấy ở chế phẩm cuối cùng chứa các tế bào Treg, các tế bào NK và tế bào T CD8⁺ trong máu (Fig. 19). Ở chuột nhất được điều trị bằng chất dẫn thuốc, Treg ở người chiếm ít hơn 1% tổng số tế bào CD45⁺ ở người và các tế bào NK và tế bào T CD8⁺ chứa ~ 3% tổng số tế bào CD45⁺ người trong máu. Việc điều trị bằng DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ làm tăng NK và tế bào T CD8⁺ lần lượt xuống 2% và 5%, trong khi Treg làm tăng đến 6%. Ngược lại, việc điều trị bằng DP47GS IgG-(IL-2)₂ kiểu đại làm tăng phần các tế bào NK và tế bào T CD8⁺ đến 30% trong tổng số tế bào CD45⁺ ở người và Treg đến 3,5%, có thể giải thích sự giảm đáng kể về thời gian sống sót trong nhóm này so với chuột nhất được điều trị bằng DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂.

Cảm ứng pSTAT5a ở tập hợp con tế bào máu ngoại vi của khi đầu chó

Như quan sát thấy trong máu ngoại vi ở người, có sự cảm ứng phụ thuộc vào liều lượng ưu tiên và tương tự của pSTAT5a trong các tiểu quần thể tế bào Treg ở máu ngoại vi của khi đầu chó được kích thích bằng IL-2 (Proleukin) (dữ liệu không được thể hiện). Khi so sánh trực tiếp khả năng của DP47GS IgG-(IL-2)₂ và DP47GS IgG-IL-2 trong việc cảm ứng pSTAT5a trong ba tiểu quần thể tế bào Treg, DP47GS IgG-(IL-2)₂ ít hơn 2 đến 8 lần được yêu cầu để đạt 50% nồng độ pSTAT5a tối đa so với DP47GS IgG-IL-2. Bảng 4 tóm tắt giá trị EC₅₀ đối với sự hoạt hóa pSTAT5a bằng

DP47GS IgG-IL-2 so với DP47GS IgG-(IL-2)₂ ở các tiểu quần thể tế bào Treg ở khi đầu chó khác nhau, các kết quả là tương tự với các kết quả được quan sát thấy ở máu ngoại vi ở người (Bảng 3).

Tương tự như máu toàn phần ở người, bề mặt tế bào và gen đánh dấu nội bào được sử dụng để xác định các tập hợp con tế bào T điều hòa và tế bào T thông thường trong máu toàn phần từ khi đầu chó khỏe mạnh bình thường. Các mẫu máu được gom vào cùng một ngày từ ba con khi đầu chó khỏe mạnh trong ống natri heparin và bổ sung các nồng độ khác nhau của DP47GS IgG-IL-2 hoặc DP47GS IgG-(IL-2)₂ vào 500µl máu và được ủ ở nhiệt độ 37°C. Sau 10 phút ở nhiệt độ 37°C, các mẫu được dung giải và cố định bằng dung dịch đệm dung giải/cố định BD được làm ấm trước (BD Biosciences). Sau khi rửa, các tế bào được thấm 1mL metanol trong 30 phút trên đá. Các mẫu được rửa 3 lần và được nhuộm bằng bảng FOXP3-Alexa Fluor® 647 (dòng vô tính: 259D, BioLegend), CD4-V500 (dòng vô tính: L200, BD Biosciences), CD45RA-V450 (dòng vô tính: 5H9, BD Biosciences), CD25-PE (dòng vô tính: 4E3, eBioscience), pSTAT5a- Alexa Fluor® 488 (dòng vô tính: 47, BD Biosciences), và Ki-67-PerCP-Cy5,5 (dòng vô tính: B56, BD Biosciences) trong 1 giờ ở nhiệt độ 4°C. Tất cả các mẫu thu được bằng máy phân tích tế bào LSRFortessa™ (Becton Dickinson) và sau đó được phân tích bằng phần mềm FlowJo (FlowJo, LLC).

Bảng 4. Gây cảm ứng pSTAT5a trong tiểu quần thể tế bào Treg ở máu ngoại vi của khi đầu chó đáp ứng với DP47GS IgG-IL-2 và DP47GS IgG-(IL-2)₂.

Tế bào T	IgG-IL-2	IgG-(IL-2) ₂	Số lần thay đổi
Treg được hoạt hóa	0,07ng/mL	0,02ng/mL	4
Treg ghi nhớ	0,21ng/mL	0,025ng/mL	8
Treg chưa quen thí nghiệm	0,04ng/mL	0,02ng/mL	2

Trong thử nghiệm khác, tương tự như thử nghiệm pSTAT5a với máu người, máu được heparin sạch từ khi đầu chó trưởng thành khỏe mạnh bình thường được kích thích in vitro với PBS là đối chứng dẫn thuốc, DP47GS IgG-(IL-2)₂ và DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ và các ảnh hưởng đến sự phosphoryl hóa STAT5a trong tiểu quần thể tế bào Treg và tế bào tác động T ghi nhớ CD4⁺ thông thường được kiểm tra. Liều lượng kích thích 20ng/mL được chọn dựa trên các đáp ứng Treg ở người tối đa ở ≤ 1 ng/mL và các đáp ứng gần tối đa của tế bào tác động T ghi nhớ CD4⁺ thông thường ở khoảng liều lượng đó (kết quả trên Fig. 9).

Các điều kiện thử nghiệm là như được mô tả trên đây. Mẫu máu được gom vào cùng một ngày từ ba con khi đầu chó khỏe mạnh (đối tượng cho C1, C2, C3) trong ống natri heparin và bổ sung 20ng/mL DP47GS IgG-(IL-2)₂ hoặc DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ vào 500 μ l máu và được ủ ở nhiệt độ 37°C trong 20 phút trước khi dung giải và phân tích.

Chiến lược rút tế bào theo dòng chảy để chia CD4⁺CD25⁺ Treg ở khi đầu chó thành tập hợp con chưa quen thí nghiệm (FOXP3⁺CD45RA⁺), ghi nhớ (FOXP3⁺CD45RA⁻), và được hoạt hóa (FOXP3^{hi}CD45RA⁻) để phân tích được thể hiện trên Fig. 20A. Như ở người, ba tập hợp con CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ Treg từ mỗi đối tượng cho biểu hiện mức độ cao của thụ thể IL-2 ái lực cao CD25 (Fig. 20B). Sau khi kích thích in vitro với 20ng/mL của cả DP47GS IgG-(IL-2)₂ và DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂, Treg từ tất cả ba đối tượng cho tạo ra sự phosphoryl hóa STAT5a đáng kể (Fig. 20C). Tương tự đối với Treg được hoạt hóa và ghi nhớ ở khi đầu chó, ở người cho thấy hiệu lực lớn hơn đối với quá trình cảm ứng pSTAT5a so với Treg chưa quen thí nghiệm.

Các tế bào tác động T ghi nhớ CD4⁺ thông thường ở người, trong khi không nhạy như Treg, có thể được kích thích bằng IL-2 với ED₉₀ được ước tính là 20ng/mL đối với DP47GS IgG-(IL-2)₂ bằng cách sử dụng pSTAT5a làm gen đánh dấu sinh học để hoạt hóa (Fig. 14). Tế bào tác động T ghi nhớ CD4⁺ thông thường của khi đầu chó tương tự có thể được nhận biết trong máu ở dạng tế bào CD4⁺FOXP3⁻CD45RA⁻ với

phần lớn các tế bào là CD25⁻ và tập hợp con nhỏ hơn là CD25⁺ (Fig. 21A). Khi được lấy làm tập hợp chung, tế bào Teff ghi nhớ của khi đầu chó từ tất cả ba đối tượng cho đáp ứng với 20ng/mL DP47GS IgG-(IL-2)₂ với lượng pSTAT5A tăng trong khi 20ng/mL DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ có ít (Cyno2) hoặc không có ảnh hưởng (Cyno1 và 3) đến pSTAT5a (Fig. 21B). Khi tế bào Teff ghi nhớ được chia nhỏ tiếp thành tập hợp con CD25⁻ và CD25⁺, đáp ứng với DP47GS IgG-(IL-2)₂ về cơ bản là được phát hiện là cư trú trong tập hợp con CD25⁺ (Fig. 21D) có đáp ứng thấp trong tập hợp con CD25⁻ (Fig. 21C). Ngược lại, DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ không có ảnh hưởng đến các tế bào Teff ghi nhớ CD25⁻ (Fig. 21C) và có 70-80% hoạt tính kích thích ít hơn trên tập hợp con CD25⁺ (Fig. 21D).

Các nghiên cứu khác ở máu khi đầu chó sạch bình thường so sánh trực tiếp các nồng độ thay đổi của DP47GS IgG-(IL-2)₂ và DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ theo kiểu đáp ứng liều lượng về khả năng kích thích pSTAT5a của chúng trong các tập hợp con tế bào T khác nhau, tức là Treg được hoạt hóa, chưa quen thí nghiệm, và ghi nhớ và tế bào tác động T ghi nhớ CD4⁺. Cả Treg được kích thích bằng DP47GS IgG-(IL-2)₂ và DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ theo cách phụ thuộc liều lượng với protein dung hợp IL-2 hóa trị hai kiểu đại có hoạt lực gấp ~10 lần so với protein dung hợp IL-2N88D hóa trị hai trong từng tiểu quần thể tế bào Treg (Fig. 22A-C). Ngược lại, sự khác nhau lớn giữa hai phân tử được thấy khi tế bào tác động T ghi nhớ CD4⁺ được đánh giá về sự cảm ứng pSTAT5a (Fig. 22D). DP47GS IgG-(IL-2)₂ có mặt với ~EC90 ở 300ng/mL trong khi DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ hầu như không có ảnh hưởng ở liều cao. Giá trị EC₅₀ để kích thích pSTAT5a của khi đầu chó được thể hiện trong Bảng 5 cũng như độ đặc hiệu gấp số lần tương ứng để kích thích Treg so với tế bào tác động T ghi nhớ CD4⁺. Các kết quả này trong máu toàn phần ở khi đầu chó khá giống với các kết quả sử dụng máu toàn phần ở người (Fig. 14 và Bảng 3) và gợi ý rằng các nghiên cứu ở khi đầu chó có thể có giá trị dự đoán cao đối với các thử nghiệm lâm sàng ở người.

Bảng 5. Giá trị EC₅₀ và sự khác nhau theo số lần đặc hiệu để hoạt hóa pSTAT5a bởi DP47GS IgG-(IL-2)₂ và DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ ở tập hợp con tế bào T ở khi đầu chó.

Treg ở khi	IgG-(IL-2) ₂ (ng/mL)	IgG-(IL-2 N88D) ₂ (ng/mL)
Treg được hoạt hóa	0,1	0,7
Treg ghi nhớ	0,1	1,1
Treg chưa quen thí nghiệm	0,06	0,8
Tế bào tác động T ghi nhớ CD4 ⁺	1,2	>1,000
<u>Số lần đặc hiệu của:</u>		
Treg hoạt hóa so với Teff ghi nhớ CD4 ⁺	12	>1,400
Treg ghi nhớ so với Teff ghi nhớ CD4 ⁺	12	>900
Treg chưa quen thí nghiệm so với Teff ghi nhớ CD4 ⁺	20	>1,200

Tính chất được động học ở chuột nhắt

Trước khi tiến hành các thử nghiệm chức năng ở chuột nhắt, các tính chất được động học (PK) của thể liên hợp miễn dịch IL-2 kiểu đại và N88D hóa trị một và hóa trị hai được tính ở chuột nhắt NOD, NOD.*scid*, và NOD.*scid*.*Il2ra*^{-/-} (Fig. 23).

Chuột nhắt NOD và NOD.*scid* (n=3) được tiêm trong tĩnh mạch (i.v.) 0,3mg/kg/chuột nhắt DP47GS IgG-IL-2 hoặc DP47GS IgG-(IL-2)₂ trong PBS chứa huyết thanh chuột nhắt 0,5% và lấy máu ở các thời điểm khác nhau sau khi tiêm, nằm trong khoảng từ 2 phút đến 168 giờ (Fig. 23A). IL-2 ở người được đánh giá ở mẫu

huyết thanh của chuột nhất bằng cách sử dụng mAb ở chuột kháng IL-2 ở người (BD Pharmingen, #555051, dòng vô tính 5344.111) để phủ các đĩa có 96 lỗ để bắt IL-2. IL-2 ở người sau đó được phát hiện ra bằng cách sử dụng mAb ở chuột kháng IL-2 ở người được biotinyl hóa (BD Pharmingen, #555040, dòng vô tính B33-2). Khả năng gắn kết IL-2 được quan sát bằng mắt và được định lượng bằng cách sử dụng streptavidin được liên hợp với Europi. Trong 24 giờ đầu tiên, DP47GS IgG-(IL-2)₂ được thanh thải nhanh hơn so với DP47GS IgG-IL-2 ở cả chuột nhất NOD và NOD.*scid*. Trước 48 giờ, nồng độ huyết thanh ở từng con là ở các nồng độ tương tự và tất cả đều thấp hơn giới hạn phát hiện được ở 72 giờ. Giới hạn phát hiện của IL-2 là 0,05ng/mL và được thể hiện bằng đường chấm chấm. Mức độ thanh thải nhanh đáng ngạc nhiên của cả thể liên hợp miễn dịch IgG-IL-2 hóa trị một và hóa trị hai ở chuột nhất không có hệ miễn dịch thích ứng gợi ý rằng khoang hoặc “bể” IL-2 không sinh huyết tồn tại ở chuột nhất và có thể điều khiển độ thanh thải nhanh in vivo của thể liên hợp miễn dịch IL-2.

Để kiểm định giả thiết này, các tác giả sáng chế đã tiến hành các nghiên cứu PK ở chuột nhất NOD.*scid* cũng thiếu thụ thể IL-2 ái lực cao, IL2R α (CD25), tức là chuột nhất NOD.*scid*.*Il2r α ^{-/-}* (Fig. 23B). Ở chuột nhất NOD.*scid*.*Il2r α ^{-/-}*, DP47GS IgG-(IL-2)₂, mặc dù được dùng ở liều cao hơn gấp ba lần (0,3mg/kg), được làm sạch nhanh hơn trong 24 giờ đến 48 giờ đầu tiên so với 0,1mg/kg DP47GS IgG-IL-2 và 0,1mg/kg DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂. Tuy nhiên, sau 48 giờ, nồng độ máu của từng thể liên hợp thể hiện pha loại bỏ ổn định chậm với IL-2 để phát hiện ra trong máu đến 6 ngày. Thú vị là, ở các con chuột nhất thiếu thụ thể IL-2 ái lực cao này, phân tử DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ có pha phân bố 24 giờ ban đầu hơi nhanh hơn so với IgG-IL-2 nhưng sau đó biểu hiện pha loại bỏ tương tự với thể liên hợp miễn dịch hóa trị một kiểu đại đến sáu ngày, thời điểm cuối cùng chúng được thử nghiệm. Các số liệu đối với DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ này đặc biệt có liên quan do các kết quả PK ở chuột nhất NOD.*scid*.*Il2r α ^{-/-}* có vẻ như dự đoán gần nhất với các kết quả PK ở động vật linh trưởng không phải người.

Tăng FOXP3 và CD25 trong Treg ở chuột nhất sau khi điều trị bằng IL-2

Để so sánh khả năng của các dạng và cấu hình phân tử khác nhau của IL-2 ở người trong việc kích thích FOXP3⁺ Treg *in vivo*, chuột nhắt được tiêm chất dẫn thuốc dưới da, Proleukin (IL-2 ở người tái tổ hợp), DP47GS IgG-IL-2, DP47GS IgG-(IL-2)₂, hoặc DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ và Treg được đánh giá về các thay đổi đối với sự biểu hiện bề mặt tế bào CD25 và FoxP3 nội bào ở thời điểm tối ưu được xác định trước là 24 giờ (Fig. 24). Chuột nhắt non khỏe mạnh BALB/c (n=3/nhóm điều trị, n=4/nhóm chất dẫn thuốc) được tiêm dưới da với Proleukin (20000 hoặc 100000 IU/con), DP47GS IgG-IL-2 (60, 300, hoặc 1500 IU/con), DP47GS IgG-(IL-2)₂ (60, 300, hoặc 1500 IU/con), hoặc DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ (60, 300, hoặc 1500 IU/con). Các liều lượng được phân phối trong chất dẫn thuốc chứa 100μl PBS vô trùng có độ pH = 7,2 chứa 0,5% huyết thanh chuột nhắt được lọc vô trùng. Sau 24 giờ, chuột nhắt bị giết chết và lá lách được cắt bỏ. Huyền phù tế bào đơn của các tế bào lá lách được tạo ra trong 1ml môi trường L-15 và được bảo quản trên đá, cho đến khi xử lý thêm. Phần phân ước đã lọc của huyền phù tế bào đơn, 40μl, được chuyển vào ống FACS và được rửa bằng 2ml dung dịch đệm FACS (600 x g, 5 phút). Sau đó, các mẫu được ủ với kháng thể được liên hợp floccrom được định hướng kháng kháng nguyên bề mặt tế bào: CD4 (dòng vô tính RM4-5, floccrom A700), CD25 (eBio7D4, Af488), CD44 (IM7, e605), CD62L (MEL-14, PE), ICOS (C398.4A, PE/Cy7), CD103 (2E7, APC). Việc nhuộm màu được tiến hành trong 30 phút, ở nhiệt độ 4°C trong 100μl dung dịch đệm FACS (PBS pH 7,2 + 0,2% BSA). Sau khi nhuộm bề mặt tế bào, các mẫu được rửa bằng 4ml dung dịch đệm FACS (600 x g, 5 phút) trước khi nhuộm nội bào (theo quy trình nhuộm nội bào eBioscience). Nói ngắn gọn là, các mẫu được tái tạo huyền phù lại trong 200μl dung dịch đệm cố định/thẩm thấu (eBioscience #00-5521) và được ủ trong 1 giờ, 4°C. 1ml 1 x dung dịch đệm thẩm thấu (eBioscience #00-8333) được bổ sung vào các mẫu trước khi bổ sung 3ml dung dịch đệm FACS và rửa (600 x g, 5 phút). Kháng nguyên nội bào, Ki-67 (B56, PerCP Cy5.5) và FOXP3 (FJK-16S, e450), được nhuộm màu trong 100μl 1x dung dịch đệm thẩm thấu trong 1 giờ, 4°C. Các mẫu được rửa bằng 4 ml dung dịch đệm FACS (600 x g, 5 phút - hai lần) và dữ liệu thu được trên máy phân tích BD FortessaTM và được phân tích bằng cách sử dụng phần mềm FlowJo (FlowJo, LLC). Treg được xác định là CD4⁺FOXP3⁺ từ các bộ đơn trong cổng lympho

bào; từ tập hợp này, mật độ huỳnh quang trung bình (MFI) CD25 và FOXP3 được tính đối với tất cả các mẫu.

Như được thể hiện trong Fig. 24, ba thể liên hợp miễn dịch IL-2 là đẳng năng khi kích thích sự biểu hiện của CD25 (24A) và FoxP3 (24B) ở tế bào Treg chuột nhắt và cho thấy đáp ứng phụ thuộc liều lượng thích hợp vượt qua khoảng liều lượng 60, 300, và 1500 IU/con. Trong mọi trường hợp, 1500 IU của từng thể liên hợp miễn dịch (đường màu đen) hiệu quả hơn một cách đáng kể so với 100000 IU Proleukin (đường màu đen). Trong hầu hết các trường hợp, 300 IU thể liên hợp miễn dịch (đường xám đậm) là tương đương với 100000 IU Proleukin, và 60 IU thể liên hợp miễn dịch (đường xám nhạt) là tương đương với 20000 IU Proleukin (đường xám nhạt). Trong tất cả các nhóm điều trị, số liệu được thể hiện dưới dạng giá trị trung bình $\pm$ SD.

Tính chất dược động học ở khỉ đầu chó

Trước khi tiến hành các thử nghiệm chức năng ở động vật linh trưởng không phải người, các tính chất dược động học (PK) của thể liên hợp miễn dịch IL-2 được ước tính ở khỉ đầu chó trưởng thành khỏe mạnh chưa quen thí nghiệm sinh học (Fig. 25). Các con khỉ ($n=2$ /liều lượng) được tiêm trong tĩnh mạch (i.v.) với liều tiêm liều lớn tác động nhanh DP47GS IgG-IL-2 hoặc DP47GS IgG-(IL-2)₂ vô trùng trong PBS chứa 0,5% huyết thanh khỉ đầu chó và lấy máu ở các thời điểm khác nhau sau khi tiêm, trong khoảng từ 30 phút đến 72 giờ. IL-2 ở người được đánh giá trong mẫu huyết thanh của khỉ đầu chó bằng cách sử dụng mAb ở chuột kháng IL-2 ở người (BD Pharmingen, Catalog #555051, dòng vô tính 5344.111) để phủ các đĩa có 96 lỗ để bắt IL-2 ở người. IL-2 ở người sau đó được phát hiện ra bằng cách sử dụng mAb ở chuột kháng IL-2 ở người được biotinyl hóa (BD Pharmingen, Catalog #555040, dòng vô tính B33-2). Khả năng gắn kết IL-2 được quan sát bằng mắt và được định lượng bằng cách sử dụng streptavidin được liên hợp với Europi. Mức độ phát hiện ra bằng cách sử dụng huyết thanh khỉ đầu chó trong thử nghiệm là 0,05ng/mL IL-2 (đường chấm chấm trong các hình vẽ). Huyết thanh khỉ đầu chó được lấy trước khi điều trị không có IL-2 phát hiện được (do đó $< 0,05$ ng/mL).

IL-2 được phát hiện trong huyết thanh khi đầu chó từ 30 phút đến 48 giờ sau khi tiêm trong tĩnh mạch với tất cả các liều lượng DP47GS IgG-IL-2 (Fig. 25A) và DP47GS IgG-(IL-2)₂ (Fig. 25B). Trước 72 giờ, nồng độ huyết thanh của IL-2 thấp hơn giới hạn phát hiện (0,05ng/mL, đường chấm chấm) đối với tất cả các con vật được điều trị bằng 10 và 25µg/kg DP47GS IgG-IL-2 hoặc DP47GS IgG-(IL-2)₂. Sau liều lượng 100µg/kg DP47GS IgG-IL-2, IL-2 của huyết thanh phát hiện được vẫn có mặt ở thời điểm 72 giờ.

Cảm ứng số Treg ở khi đầu chó

Động vật khi đầu chó đã được điều trị *in vivo* bằng DP47GS IgG-IL-2 có sự tăng phụ thuộc liều lượng về số lượng tuyệt đối của Treg cũng như số lần tăng trên đường cơ sở định liều sau 7 ngày (Fig. 26A và 26B, một cách lần lượt). Khi đầu chó khỏe mạnh bình thường có cả hai giới tính ở độ tuổi từ 3 đến 6 năm tuổi được sử dụng trong tất cả các thử nghiệm và không con vật nào được sử dụng quá một lần. Trong khi gây mê, các liều lượng khác nhau của DP47GS IgG-IL-2 (n=4-6) hoặc chất dẫn thuốc (n=3) được tiêm SC ở ngang lưng. Các liều lượng riêng của DP47GS IgG-IL-2 là dựa trên trọng lượng cơ thể và được phối trộn để tiêm trong chất dẫn thuốc chứa PBS vô trùng, độ pH = 7,2 chứa 0,5% huyết thanh khi đầu chó vô trùng bình thường. Mẫu máu được gom ở các thời điểm khác nhau sau khi điều trị và được thử nghiệm về thay đổi trong máu (CBC và biệt hóa) bằng máy phân tích máu tự động Advia cũng như bề mặt tế bào và gen đánh dấu nội bào được nêu chi tiết trên đây (các quy trình thử nghiệm đối với Bảng 4). Các thay đổi ở máu toàn phần CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺, tế bào T điều hòa vào ngày 7 sau điều trị được thể hiện trên Fig. 26 ở dạng số lượng tế bào tuyệt đối trong mỗi mm³ máu toàn phần (Fig. 26A) và số lần thay đổi của tế bào Treg (Fig. 26B); tất cả số liệu được biểu thị ở dạng giá trị trung bình ± SD. Ở liều cao hơn là 25µg/kg và 36µg/kg DP47GS IgG-IL-2, lượng Treg trung bình tăng gần 3 lần (khoảng từ 111 đến 255%, n=6) và 4 lần (khoảng từ 110 đến 470%, n=6), một cách lần lượt, được quan sát. Sự giảm tiếp ở liều lượng SC của DP47GS IgG-IL-2 (12, 6, và 2µg/kg) tiếp tục tạo ra các thay đổi giảm tương ứng ở số lượng Treg và số lần thay đổi. Không mong muốn bị giới hạn bởi lý thuyết, Treg tăng gấp ~2 lần (nằm trong khoảng từ 67 đến 133%, n=6)

với liều lượng 12 μ g/kg DP47GS IgG-IL2 có thể là lượng Treg tăng mong muốn đối với một số bệnh tự miễn và bệnh viêm. Có khoảng lớn lượng Treg ở người (20-90 Treg trong mỗi mm³ máu; 4 đến 10% tế bào T CD4⁺) và hợp lý khi giả sử rằng sự tăng Treg được cảm ứng bởi IL-2 ở cá thể sẽ dẫn đến sự tăng tổng thể sự ức chế chức năng.

Khi liều lượng DP47GS IgG-IL-2 thấp hơn được đánh giá (2-6 μ g/kg), các mẫu máu thường xuyên hơn được gom để nhận biết thời điểm tối ưu để phát hiện các thay đổi ở tế bào Treg, sau đó là dùng DP47GS IgG-IL-2 (Fig. 27). Trong khi các thay đổi ở tế bào Treg xuất hiện ở 7 ngày, sự kích thích tối đa xảy ra vào ngày 4, sớm hơn so với đo được với liều lượng DP47GS IgG-IL-2 cao hơn (ngày 7, Fig. 26).

Proleukin và DP47GS IgG-IL-2 so sánh được *in vitro* trong thử nghiệm máu toàn phần ở người và khi đầu chó khi được so sánh trực tiếp bởi các đơn vị hoạt tính IL-2 được sử dụng để kích thích pSTAT5a trong Treg và các tế bào đáp ứng IL-2 khác (dữ liệu không được thể hiện). Với thời gian bán thải ngắn đã biết của Proleukin ở người, nghiên cứu liều đơn được tiến hành ở khi đầu chó để đánh giá sự cảm ứng và hoạt hóa của Treg *in vivo*. Proleukin làm thay đổi phụ thuộc vào liều lượng và thời gian ở tế bào Treg được đo bằng số lần thay đổi trong số lượng tuyệt đối cũng như mức độ hoạt hóa pSTAT5a. Trong khi việc tăng số lượng Treg là không đáng kể (Fig. 28A: 10-40%), sự tăng được cảm ứng bởi Proleukin[®] ở tế bào Treg pSTAT5a là chủ yếu và liều lượng phụ thuộc vào một ngày sau khi điều trị (Fig. 28B) nhưng có khoảng thời gian ngắn *in vivo* để trở lại bình thường trước ngày 2 đến 3.

Việc so sánh khả năng của DP47GS IgG-IL-2 để kích thích tăng Treg *in vivo* ở khi đầu chó với khả năng của Proleukin được thể hiện trên Fig. 29. Khi đầu chó khỏe mạnh bình thường (nhóm có n=5) được điều trị bằng liều thấp của DP47GS IgG-IL-2 hoặc liều cao của Proleukin và sự thay đổi ở tế bào T điều hòa được thử nghiệm vào ngày 10. Vào ngày 0 và 7, DP47 IgG-IL-2 được dùng SC ở liều bằng 16800 IU/kg (liều lượng 12 μ g/kg được thể hiện trên Fig. 26). Dựa trên công việc được công bố khi Proleukin được dùng cho bệnh nhân mắc bệnh đái tháo đường typ 1 (4,5x10⁶ IU/người, 3 lần/tuần) và được thể hiện là tăng Treg và dữ liệu liều đơn trong Fig. 28, Proleukin được dùng SC 3 lần/tuần (M/W/F) trong tổng cộng 5 liều lượng, mỗi liều là 200000

IU/kg (đương lượng của khí đầu chó là $4,5 \times 10^6$ IU/người). Các kết quả được thể hiện trên Fig. 29 ở dạng giá trị trung bình $\pm$ SD về thay đổi trong tổng số tế bào Treg trong mỗi mm^3 máu (Fig. 29A), tăng số lượng Treg gấp theo số lần (Fig. 29B), và thay đổi về tỷ lệ Treg đối với tế bào CD4^+ FOXP3 $^-$ thông thường (Fig. 29C).

Mặc dù hoạt tính DP47GS IgG-IL-2 ít hơn gần 30 lần được dùng trong giai đoạn 10 ngày, DP47GS IgG-IL-2 cảm ứng sự tăng về số lượng Treg lớn hơn so với Proleukin (Fig. 29A, $p=0,06$). Sự tăng số lượng Treg tính theo số lần so với đường cơ sở (Fig. 29B) và sự tăng Treg so với tế bào T của CD4 thông thường (Fig. 29C) cũng lớn hơn ($p=0,0011$ và $p=0,016$, một cách lần lượt) ở khi được định liều bằng DP47GS IgG-IL-2 so với Proleukin. Ở người, tỷ lệ tế bào T điều hòa CD4^+ (thường được xác định là FOXP3 $^+$ và tổ hợp của các gen đánh dấu bề mặt) với tế bào T của CD4 không điều hòa (còn được gọi là tế bào thông thường hoặc tế bào tác động) thường được sử dụng để xác định nồng độ chức năng của Treg trong bệnh nhân theo thời gian.

Đáp ứng *in vivo* của tập hợp con tế bào máu ngoại vi của khí đầu chó với việc điều trị bằng liều thấp DP47GS IgG-IL-2

Tính đặc hiệu tế bào *in vivo* khi điều trị bằng liều thấp IL-2 là thông số có yếu tố quyết định. Các tác giả sáng chế đã xác định rằng sự hoạt hóa tế bào *in vivo* được cảm ứng bằng DP47GS IgG-IL-2 hoặc Proleukin có thể được theo dõi chính xác bằng cách đo nồng độ pSTAT5a *ex vivo* trong máu được lấy ở các thời điểm khác nhau sau khi chia liều khí đầu chó hoặc chuột nhắt. Đáp ứng *in vivo* của tất cả các tập hợp tế bào có thể được theo dõi *in vitro* (Fig. 8-10) còn có thể được thử nghiệm *ex vivo*.

1 và 3 ngày sau khi dùng *in vivo* liều lượng đơn thấp của DP47GS IgG-IL-2 ($12\mu\text{g/kg}$) cho khí đầu chó khỏe mạnh ($n=5$), máu toàn phần được thu gom và được thử nghiệm về sự phosphoryl hóa STAT5a như được mô tả trên đây (quy trình thử nghiệm đối với Bảng 4). Mỗi con khí được lấy máu vào ngày 0 trước khi điều trị và lượng phosphoryl hóa STAT5a được đo và được sử dụng riêng rẽ để đánh giá số lần thay đổi sau điều trị. Số lần thay đổi trong pSTAT5a trong Treg vào ngày 1 và 3 được thể hiện trên Fig. 30A, số lần thay đổi trong pSTAT5a trong tế bào tác động T ghi nhớ $\text{CD4}^+\text{CD45RA}^-$ thông thường là trên Fig. 30B, và số lần thay đổi trong pSTAT5a trong

tế bào tác động T chưa quen thí nghiệm $CD4^+CD45RA^+$ thông thường trên Fig. 30C. Các kết quả chỉ ra rõ ràng là máu khi đầu chó thu được từ một đến ba ngày sau liều lượng đơn thấp ($12\mu\text{g/kg}$) của DP47GS IgG-IL-2 cho thấy sự tăng pSTAT5a chiếm ưu thế trong tế bào Treg so với tế bào T $CD4^+$ ghi nhớ và chưa quen thí nghiệm (Fig. 30A-C). Liều lượng đơn thấp DP47GS IgG-IL-2 rõ ràng tốt hơn so với liều lượng đơn cao Proleukin (Fig. 28B) trong việc kiểm soát trạng thái hoạt hóa của Treg *in vivo* được duy trì.

Các nghiên cứu ban đầu sử dụng sự phosphoryl hóa của STAT5a làm gen đánh dấu sinh học *in vivo* của phương pháp hoạt hóa Treg cho thấy pSTAT5a tối đa chỉ ở 1 ngày với liều đơn Proleukin (Fig. 28B) và 1 và 3 ngày ở liều thấp ($12\mu\text{g/kg}$) DP47GS IgG-IL-2 (Fig. 30A). Việc chuẩn độ thêm DP47GS IgG-IL-2 kết hợp với các thời điểm lấy mẫu bổ sung cho thấy rằng các tín hiệu pSTAT5a *in vivo* có thể được duy trì trong 4 ngày trước khi giảm ngược để trở về bình thường ở 7 ngày (Fig. 31A, 31B). MFI (mật độ huỳnh quang trung bình) của tín hiệu pSTAT5a đối với cả liều lượng $2\mu\text{g/kg}$ (31A, $n=4$) và $6\mu\text{g/kg}$ (31B, $n=6$) gợi ý rằng xảy ra sự truyền tín hiệu pSTAT5a tối đa ít hơn (xem Fig. 33B). Thậm chí các liều lượng rất thấp của DP47GS IgG-IL-2 đem lại sự truyền tín hiệu *in vivo* được duy trì của Treg và tốt hơn đối với Proleukin (Fig. 28B). Các kết quả này hỗ trợ cho giả thiết của các tác giả sáng chế rằng nồng độ rất thấp của IL-2 sống lâu, tức là DP47GS IgG-IL-2 mà không phải Proleukin, có thể kích thích Treg trong khoảng thời gian kéo dài *in vivo* nhờ đó làm giảm tần suất điều trị cần để tái thiết lập sự tự dung nạp ưu thế và cải thiện các tác động của bệnh. Sự tăng tế bào Treg trong máu ngoại vi sau khi điều trị bằng liều thấp IL-2 có thể phản ánh sự thay đổi về sự phân bố tế bào trong cơ thể thay cho sự tăng tế bào thực tế. Để chứng minh rằng Treg tăng *in vivo* ít nhất một phần là do sự cảm ứng khi phân chia tế bào do điều trị bằng IL-2, gen đánh dấu nội bào của Ki-67 tăng sinh được đánh giá. Ki-67 là protein có thể được phát hiện trong nhân trong G_1 , S, G_2 , và khi phân bào có tơ nhưng không có mặt trong các tế bào thu được mà ở pha G_0 của chu kỳ tế bào. Khi đầu chó được điều trị bằng 2 và $6\mu\text{g/kg}$ DP47GS IgG-IL-2 được mô tả trên đây (Fig. 31) cũng được theo dõi đối với thay đổi *ex vivo* trong gen đánh dấu nội bào Ki-67 như được mô tả (quy trình thử nghiệm đối với Bảng 4) để đánh giá phạm vi tăng sinh *in vivo*. Phần

trăm tế bào trong chu kỳ tế bào (Ki-67⁺) vào ngày 0 được so sánh với phần trăm tế bào Ki-67⁺ ở từ 1 đến 11 ngày sau điều trị. Ki-67⁺ Treg được thể hiện trên Fig. 32A, tế bào tác động T ghi nhớ CD4⁺CD45RA⁻ thông thường là trên Fig. 32B, và tế bào tác động T chưa quen thí nghiệm CD4⁺CD45RA⁺ thông thường là trên Fig. 32C. Tế bào máu khi đầu chó thu được từ một đến bảy ngày sau liều lượng đơn thấp của DP47GS IgG-IL-2 (6µg/kg) cho thấy sự tăng Ki-67 chiếm ưu tiên trong Treg so với tế bào tác động T chưa quen thí nghiệm CD4⁺ thông thường (Fig. 32A so với 32C). Không giống tế bào tác động T chưa quen thí nghiệm, DP47GS IgG-IL-2 (6µg/kg) có thể kích thích sự tăng sinh của tế bào hiệu T CD4⁺ ghi nhớ thông thường (Fig. 32B). Tại liều thấp nhất của DP47GS IgG-IL-2 (2µg/kg), có sự hoạt hóa tối thiểu vào chu kỳ tế bào và sự tăng sinh so với liều lượng 6µg/kg.

Trong thử nghiệm máu toàn phần của người và khi đầu chó, hoạt tính *in vitro* của DP47GS IgG-(IL-2)₂ hóa trị hai là trong thể kết tụ, hoạt lực lớn hơn khoảng 6 lần trên Treg so với DP47GS IgG-IL-2 hóa trị một (Bảng 2 và 4). Do đó, liều lượng thứ nhất vào khi đầu chó ít hơn 6 lần so với liều cao nhất của DP47GS IgG-IL-2 được thử nghiệm (36µg/kg). DP47GS IgG-(IL-2)₂ được dùng ở 6µg/kg (n=4) tạo ra sự tăng lớn ở tế bào Treg tuần hoàn (Fig. 33A) mà vẫn duy trì được tốt so với bình thường 14 ngày sau khi điều trị, pSTAT5a đáng kể và kéo dài trong Treg quay trở lại bình thường ở 1 tuần (Fig. 33B), và gần như tăng 3 lần về số lượng Treg (Fig. 33C). Số lần thay đổi được cảm ứng bằng DP47GS IgG-IL-2 (từ Fig. 26, các cột rỗng) được so sánh với liều lượng 6µg/kg của DP47GS IgG-(IL-2)₂ hóa trị hai (đường đậm) (Fig. 33D). Tương tự như thử nghiệm máu toàn phần ở người và khi đầu chó, DP47GS IgG-(IL-2)₂ thử nghiệm hoạt lực tăng cường *in vivo* ngoài việc tăng 2 lần về IL-2 trong mỗi phân tử IgG của nó.

Các liều lượng bổ sung của DP47GS IgG-(IL-2)₂ hóa trị hai được dùng cho khi đầu chó để đánh giá ảnh hưởng *in vivo* của nó ở liều lượng rất thấp (2 và 0,7µg/kg) (Fig. 34). Trong khi 2µg/kg tạo ra sự số lần thay đổi vừa phải (trung bình là 46%, nằm trong khoảng từ 20 đến 70%, n=8), liều lượng 0,7µg/kg có ít ảnh hưởng hơn đến số lượng tế bào T (tăng trung bình là 16%, n=3) (Fig. 34A). Cả hai liều thấp kích thích

pSTAT5a đều làm tăng Treg (Fig. 34B, n=3 mỗi liều) trong khi có ít ảnh hưởng hơn đến tế bào Teff/ghi nhớ pSTAT5a (Fig. 34C, n=3 mỗi liều).

Các ảnh hưởng bao quát của liệu pháp protein dung hợp IL-2 kiểu đại hóa trị một và hóa trị hai và khả năng làm tăng Treg của nó ở khi đầu chó được thể hiện trên Fig. 35. Cả hai dạng IgG-IL-2 sống lâu đều là chất cảm ứng hoạt lực của Treg mà có thể được tuân theo *in vivo* với pSTAT5a làm gen đánh dấu sinh học của phương pháp hoạt hóa và trong hình vẽ này là số lần tăng số lượng Treg tuần hoàn. DP47GS IgG-(IL-2)₂ có hoạt lực tăng cường của nó đạt được bằng cách nhân đôi phân tử IL-2 ở đầu tận cùng C của IgG có tính ưu việt phụ thuộc vào liều lượng so với DP47GS IgG-IL-2.

Khử methyl hóa ADN của FOXP3 và CTLA-4 trong tập hợp con tế bào T ở khi đầu chó.

Treg hoạt hóa chức năng có thể tạo ra các xytokin ức chế miễn dịch CTLA-4, IL-10 và TGFβ và đòi hỏi sự biểu hiện ổn định của yếu tố phiên mã FOXP3. Biểu hiện của FOXP3 ở tế bào Treg ở người và khi đầu chó phụ thuộc vào sự khử methyl hóa của mười vị trí methyl hóa ADN của CpG trong vùng được khử methyl hóa đặc hiệu Treg (TSDR) trong locus FOXP3. Tương tự, việc biểu hiện và sản sinh CTLA-4 dựa vào sự khử methyl hóa của bảy vị trí methyl hóa ADN CpG ở locus CTLA-4 của người và khi đầu chó. Do đó, các tác giả sáng chế đánh giá tình trạng khử methyl hóa của cả FOXP3 và CTLA-4 trong các tập hợp con tế bào T CD4⁺ khác nhau trước và sau khi điều trị bằng DP47GS IgG-IL-2 (n=4, 25μg/kg s.c.) và DP47GS IgG-(IL-2)₂ (n=4, 6μg/kg s.c.) dùng ở liều lượng và thời gian trước đó được thể hiện là làm tăng đáng kể số lượng Treg trong máu. Chỉ khi đầu chó đực trưởng thành chưa quen thí nghiệm sinh học được sử dụng trong nghiên cứu và trọng lượng của chúng nằm trong khoảng từ 9,1 đến 10,9 kg. Việc điều trị được sử dụng 3 tuần sau khi gom máu đường cơ sở ban đầu và máu sau điều trị được gom 4 đến 5 ngày sau đó. PBMC từ 30mL máu được heparin hóa được phân loại bằng cách sử dụng FACSAria™ (Becton Dickinson) thành các tập hợp con CD4⁺ tương ứng bao gồm Treg (CD4⁺CD25⁺CD127^{thấp}), tế bào tác động T ghi nhớ (CD4⁺CD45RA⁻), tế bào tác động T chưa quen thí nghiệm (CD4⁺CD45RA⁺), và tế bào CD4⁺CD25⁻CD127⁻.

Các tập hợp con tế bào đã được phân loại được làm đông lạnh trong các phân phân ước là 100000 tế bào và được bảo quản ở dạng viên khô ở -80°C để cho phép xử lý tất cả các mẫu cùng nhau. Các viên tế bào được làm tan đông và ADN được chiết và bisulfit được xử lý trong một bước duy nhất bằng cách sử dụng bộ kit Epiect Fast Lyse All (Qiagen) theo các chỉ dẫn của nhà sản xuất. 5ng (trong $2\mu\text{l}$) bisulfit ADN được sử dụng trong $20\mu\text{l}$ PCR vòng kép thứ nhất chứa $10\mu\text{l}$ bộ kit Multiplex PCR (Qiagen), $6\mu\text{l}$ nước, $0,5\mu\text{l}$ FOXP3 đoạn môi xuôi tgtaaacgacggccagtTTTAGAAGTTGTATGGGGGATGTT (SEQ ID NO: 54), $0,5\mu\text{l}$ FOXP3 đoạn môi ngược caggaaacagctatgaccAAAATATCTACCCTCTTCTCTTCCTC (SEQ ID NO: 55), $0,5\mu\text{l}$ CTLA-4 đoạn môi xuôi tgtaaacgacggccagtGGGTTTGGTTATGAAGGAGTA TGA (SEQ ID NO: 56) và $0,5\mu\text{l}$ CTLA-4 đoạn môi ngược caggaaacagctatgaccTTCCTACTAATTTCCACTAAAAATACCC (SEQ ID NO: 57). Chu kỳ PCR vòng thứ nhất là ở 95°C trong 15 phút, sau đó là 20 chu kỳ ở 95°C trong 30 giây, 60°C trong 90 giây và 72°C trong 60 giây, sau đó là 10 phút ở 72°C . Sản phẩm PCR được tinh chế bằng cách sử dụng chùm AMPure XP (Becton Coulter) theo các chỉ dẫn của nhà sản xuất, và được rửa giải trong $20\mu\text{l}$ nước. PCR vòng thứ hai được thực hiện là bổ sung trình tự chỉ số đồng đều vào đầu của từng mẫu, thông qua $15\mu\text{l}$ PCR chứa $7,5\mu\text{l}$ bộ kit Multiplex PCR (Qiagen), $6,5\mu\text{l}$ sản phẩm PCR vòng thứ nhất và $1\mu\text{l}$ đoạn môi chỉ số. Điều kiện chu kỳ PCR vòng thứ hai là 95°C trong 15 phút, sau đó là 7 chu kỳ ở 95°C trong 30 giây, 54°C trong 90 giây và 72°C trong 60 giây, sau đó là 5 phút ở 72°C . Các sản phẩm PCR được tinh chế bằng cách sử dụng chùm AMPure XP và rửa giải trong $15\mu\text{l}$ nước, và $4\mu\text{l}$ được sử dụng để xác định lượng sản phẩm PCR bằng cách sử dụng Shimadzu MultiNA. Nồng độ đẳng mol của từng mẫu được gom, để tạo ra thư viện giải trình tự được định lượng bằng cách sử dụng bộ kit định lượng thư viện Kapa Illumina. Thư viện này được giải trình tự bằng cách sử dụng Illumina MiSeq với chất phản ứng v3 và 2×300 bp được bắt cặp đến cuối. Dữ liệu giải trình tự được tách kênh bằng cách sử dụng ngôn ngữ lập trình đặt làm riêng và chương trình Cutadapt được sử dụng để loại bỏ các bộ thích nghi giải trình tự. Số liệu xuôi và ngược được kết hợp bằng cách sử dụng FLASH và trình tự của từng vị trí metyl hóa được chiết.

Việc điều trị khi đầu chó bằng cả DP47GS IgG-IL-2 và DP47GS IgG-(IL-2)₂ được cảm ứng hầu như làm tăng số lượng Treg trong máu ở tất cả các con vật được điều trị, tương tự với những gì được thấy trước khi sử dụng cùng một phương pháp điều trị (Fig. 33 và 35). Quan trọng là, việc tăng nhanh và đột ngột Treg sau khi điều trị bằng cả DP47GS IgG-IL-2 và DP47GS IgG-(IL-2)₂ không ảnh hưởng bất lợi hoặc làm giảm trạng thái khử methyl hóa của FOXP3 (Fig. 36, bảng trên) hoặc CTLA-4 (Fig. 36, bảng dưới). Các kết quả tương tự được thấy đối với cả phân tử và số liệu với DP47GS IgG-(IL-2)₂ được thể hiện trên Fig. 36. Trạng thái khử methyl hóa của cả FOXP3 và CTLA-4 không bị ảnh hưởng và giảm đi do điều trị chỉ ra rằng tất cả các Treg duy trì phenotyp ức chế miễn dịch chức năng trưởng thành tự nhiên của chúng mặc dù về cơ bản là tăng số lượng tuyệt đối. Các kết quả khử methyl hóa Treg FOXP3 và CTLA-4 này ở động vật linh trưởng không phải người gợi ý rằng việc điều trị ở liều thấp của phân tử như IgG-(IL-2)₂ sống lâu ở người nên có khả năng làm tăng số lượng Treg trưởng thành đầy đủ chức năng mà lần lượt hiệu chỉnh sự mất cân bằng điều hòa miễn dịch có trong bệnh tự miễn ở người cũng như các bệnh viêm mạn tính qua trình gian miễn dịch mạn tính khác.

Dược động học của DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ ở khi đầu chó

Các tính chất PK của DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ được đánh giá ở khi đầu chó chưa quen thí nghiệm sinh học (Fig. 37). Khi (n=2/liều) được tiêm trong tĩnh mạch (iv) và dưới da (sc) với 30 hoặc 100µg/kg DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ vô trùng trong PBS chứa 0,5% huyết thanh khi đầu chó và được lấy máu ở các thời điểm khác nhau sau khi tiêm, nằm trong khoảng từ 30 phút đến 14 ngày. IL-2 ở người được đánh giá trong các mẫu huyết tương khi đầu chó như được mô tả trên đây. Mức độ phát hiện bằng cách sử dụng huyết tương khi đầu chó trong thử nghiệm này là 0,05ng/mL IL-2. Huyết tương khi đầu chó được lấy trước khi điều trị không có IL-2 phát hiện được (do đó < 0,05ng/mL).

Không giống PK của protein dung hợp kiểu đại (Fig. 25) khi nồng độ máu chỉ có thể được phát hiện ra ngoài 48 đến 72 giờ, DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ được phát hiện trong huyết tương khi đầu chó từ tất cả các con vật ở tất cả các thời điểm ngoài 14

ngày qua đường tiêm trong tĩnh mạch (Fig. 37A) và tiêm dưới da (Fig. 37B). Nồng độ huyết tương là tỷ lệ liều lượng trong hai đến ba ngày đầu tiên và thể hiện thời gian bán thải kéo dài so với phân tử dung hợp IL-2 kiểu đại.

Để làm gen đánh dấu sinh học để tiếp xúc IL-2 *in vivo*, nồng độ huyết tương của CD25 hòa tan (sCD25, IL-2RA) được đo (Fig. 37C). Chất phản ứng kháng thể đơn dòng dùng cho sCD25 ở người đã biết là phản ứng chéo với sCD25 khi đầu chó được sử dụng trong thử nghiệm miễn dịch kẹp giữa sử dụng kháng thể bắt (MAB623, R&D Systems) và kháng thể phát hiện được biotinyl hóa (BAF223, R&D Systems) sử dụng streptavidin tiếp hợp Eu⁺⁺- để phát hiện sCD25 được gắn kết. Sự tăng sCD25 sau khi dùng DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ là phụ thuộc liều lượng và có trong khoảng thời gian từ 1 đến 7 ngày, trở lại mức độ bình thường trước ngày 8.

Cảm ứng của Treg ở khi đầu chó với DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂

Các thử nghiệm được mô tả trước đó ở khi đầu chó được điều trị *in vivo* bằng DP47GS IgG-IL-2 và DP47GS IgG-(IL-2)₂ kiểu đại cho thấy sự tăng phụ thuộc vào liều lượng từ 2 đến 4 lần về số lượng Treg tuyệt đối (Fig. 26 và 33, một cách lần lượt) mà phản ánh các hoạt tính *in vitro* của chúng trong thử nghiệm máu toàn phần ở người, tức là chênh lệch 6 đến 9 lần *in vitro* (Bảng 2 và 3). Với sự mất hoạt lực của nó *in vitro* trong máu toàn phần ở người (Bảng 3), liều lượng *in vivo* bằng 30 và 100µg/kg được chọn đối với DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂. Tương tự như các thử nghiệm trước, DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ được tiêm qua đường trong tĩnh mạch hoặc dưới da với các liều lượng riêng rẽ dựa trên trọng lượng cơ thể và được phối trộn để tiêm trong chất dẫn thuốc chứa PBS vô trùng có độ pH = 7,2 chứa 0,5% huyết thanh khi đầu chó vô trùng bình thường (n=2 với mỗi liều và đường tiêm). Các mẫu máu được gom trước khi điều trị (ngày 4 và 5), ngay trước khi điều trị (ngày 0) và ở các thời điểm khác nhau sau điều trị (ngày 1 đến 14) và được thử nghiệm về các thay đổi sinh huyết (CBC và biệt hóa) cũng như bề mặt tế bào và gen đánh dấu nội bào được mô tả trước đó.

Sự tăng tổng số tế bào Treg CD4⁺, Treg ghi nhớ CD4⁺, Treg chưa quen thí nghiệm CD4⁺ và Treg CD8⁺FOXP3⁺ được thể hiện dưới dạng các đáp ứng phụ thuộc

vào thời gian ở dạng số lượng tế bào tuyệt đối/ml máu (Fig. 38A và 38B) hoặc ở dạng % tổng số tế bào T CD4⁺ hoặc CD8⁺ (Fig. 38C và 38D).

Tổng số tế bào Treg CD4⁺ tăng về số lượng sau 100µg/kg từ 90000/ml đến 810000/ml (9 lần) và từ 4,2% đến 26% tổng số tế bào T CD4⁺ (6,2 lần) và vẫn được gia tăng ở 14 ngày. Ở liều 30µg/kg, tổng số tế bào Treg CD4⁺ tăng từ 62000/ml đến 447000/ml (7,2 lần) và từ 4,5% đến 16,7% tổng số tế bào CD4⁺ (3,7 lần).

Treg ghi nhớ tăng số lượng tại nồng độ 100µg/kg từ 42000/ml đến 536000/ml (12,8 lần) và từ 2% đến 17,4% tổng số tế bào T CD4⁺ (8,7 lần). Tại nồng độ 30µg/kg, Treg ghi nhớ tăng từ 51000/ml đến 280000/ml (5,5 lần) và từ 2,3% đến 10,5% tổng số tế bào T CD4⁺ (4,6 lần).

Treg chưa quen thí nghiệm tăng số lượng tại nồng độ 100µg/kg từ 35000/ml đến 272000/ml (7,8 lần) và từ 2% đến 8,6% tổng số tế bào T CD4⁺ (4,3 lần). Tại nồng độ 30µg/kg, Treg chưa quen thí nghiệm tăng từ 46000/ml đến 166000/ml (3,6 lần) và từ 2,2% đến 6,2% tổng số tế bào T CD4⁺ (2,8 lần).

Sau khi dùng 100µg/kg DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂, CD8⁺FOXP3⁺ Treg tăng từ loại tế bào hiếm ở mức từ 16000/ml đến 183000/ml (11,4 lần) và từ 0,7% đến 7,8% tổng số tế bào T CD8⁺ (11,1 lần). Ở liều lượng 30µg/kg DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂, tổng số tế bào Treg CD8⁺ tăng từ 17000/ml đến 101000/ml (5,9 lần) và từ 0,5% đến 4,3% tổng số tế bào T CD8⁺ (8,6 lần). Không có sự tăng liên quan đến điều trị ở tế bào Teff ghi nhớ CD4⁺ sau khi 100µg/kg hoặc 30µg/kg DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ (Fig. 39A); trên thực tế, phần trăm giảm vào ngày 4 có thể do lượng tăng lớn ở tế bào Treg CD4⁺ tại thời điểm đó. Các tế bào Teff ghi nhớ CD4⁺CD25^{cao} không thay đổi sau khi 30µg/kg DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ nhưng tăng lên 1,6 lần vào ngày 4 với sự trở lại đường cơ sở ở 7-10 ngày (Fig. 39B).

Cảm ứng pSTAT5a, CD25 và Ki-67 ở khi đầu chó với DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂

Như được mô tả ở trên, độ đặc hiệu tế bào *in vivo* khi điều trị IL-2 là thông số quyết định và các tác giả sáng chế chứng minh được rằng sự hoạt hóa tập hợp con tế

bào *in vivo* có thể được theo dõi bằng cách đo *ex vivo* pSTAT5a, bề mặt tế bào CD25 và Ki-67 nội bào trong máu được lấy ở các thời điểm khác nhau sau khi định liều.

Các kết quả trên Fig. 40A và Fig. 40B cho thấy sự cảm ứng pSTAT5a chiếm ưu thế và các đáp ứng truyền tín hiệu pSTAT5a kéo dài của Treg CD4⁺ và CD8⁺ sau khi điều trị bằng DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂; các đáp ứng tối đa được duy trì từ ngày 1 đến ngày 4 bằng cả 100µg/kg và 30µg/kg, quay trở lại đường cơ sở ở 7 ngày. Teff ghi nhớ CD4⁺CD25^{cao} đáp ứng với các đáp ứng ~ nửa tối đa vào ngày 1 và quay trở lại bình thường trước ngày 4. Tất cả các loại tế bào được thử nghiệm khác thể hiện ít hoặc không có cảm ứng pSTAT5a sau khi điều trị.

Sự tăng ở bề mặt tế bào CD25 là kết quả của sự hoạt hóa IL-2 và là gen đánh dấu sinh học nhạy của quá trình hoạt hóa *in vivo*. Ngay sau khi điều trị bằng cả 100µg/kg và 30µg/kg DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂, CD25 được tăng lên chiếm ưu thế ở tế bào Treg ghi nhớ và chưa quen thí nghiệm CD4⁺ cũng như Treg CD8⁺FOXP3⁺ (Fig. 41A, 41B). Các đáp ứng CD25 của Treg ghi nhớ và chưa quen thí nghiệm CD4⁺ đạt đỉnh vào ngày 4 và quay trở lại đường cơ sở trước 7 ngày trong khi các gia tăng CD25 trong Treg CD8⁺FOXP3⁺ được duy trì từ 10 đến 14 ngày.

Trong thử nghiệm với protein dung hợp IL-2 kiểu đại, các tác giả sáng chế cho thấy rằng Ki-67 là gen đánh dấu nội bào nhạy đối với các tế bào đã bắt đầu tăng sinh *in vivo* và là gen đánh dấu sinh học nhạy đối với sự hoạt hóa được cảm ứng bởi IL-2 ở khi đầu chó. Các đáp ứng với 100µg/kg DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ cho thấy 80-90% Treg CD4⁺ và CD8⁺ trở thành Ki-67⁺ (Fig. 42A) trong khi 60-90% trở thành Ki-67⁺ sau 30µg/kg (Fig. 42B). Như được thể hiện, các tập hợp con tế bào được thử nghiệm khác ít đáp ứng hơn so với Treg.

Để bắt các ảnh hưởng *in vivo* gần cuối trong việc tăng số lượng Treg bằng phân tử IL-2 được xử lý kỹ thuật mới, tất cả các liều của khi đầu chó được chuyển hóa thành pmol/kg cho phép so sánh trực tiếp bất kể phân tử lượng; các đáp ứng phụ thuộc vào liều lượng được so sánh từ đầu này đến đầu kia ở dạng tăng tối đa Treg CD4⁺ dưới dạng % tổng số tế bào T CD4⁺ (Fig. 43). Mặc dù sự hao hụt hoạt lực *in vitro* của nó so với protein dung hợp kiểu đại, DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ cảm ứng sự tăng lớn không

mong muốn ở tế bào Treg khi đầu chó, có thể một phần là do sự tăng của nó khi tiếp xúc toàn thân khi dùng cả trong tĩnh mạch và tiêm dưới da.

Tính ưa eozin là kết quả của việc dùng IL-2 *in vivo*

Proleukin ở người kích thích tính ưa eozin khi được dùng hằng ngày ở các liều bằng 1×10^6 đến $4,5 \times 10^6$ IU/người. Ở khi đầu chó, các đáp ứng tương tự ở các tế bào ưa eozin được thấy ở 100% con vật sau khi điều trị nhắc lại bằng Proleukin liều cao hoặc liều lượng đơn 226 pmol/kg của DP47GS IgG-IL-2 (Fig. 44). Các kết quả được thể hiện trên Fig. 44 thể hiện mọi con vật được thử nghiệm (đường cơ sở cụm khuẩn được lấy đối với các con vật trước khi thử nghiệm: $n=44$ và $n=30$) và đối với các nhóm điều trị bằng IL-2 khác nhau ($n=5-9$) bất kể nếu số lượng tế bào ưa eozin là bình thường hay tăng lên. Trái ngược hẳn với các ảnh hưởng của Proleukin và DP47GS IgG-IL-2 là sự thiếu tác động thực sự đến các tế bào ưa eozin với DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ ở liều lượng *in vivo* là 170 và 570 pmol/kg (lần lượt là 30 và 100 $\mu\text{g/kg}$). Sự thiếu cảm ứng tính ưa eozin toàn thân bởi DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ này là rõ nét xét về mức độ mở rộng Treg được cảm ứng bởi các điều trị bệnh khác nhau (được so sánh trên Fig. 43).

Điều trị *in vivo* bằng DP47GS IgG-IL-2 làm ức chế đáp ứng miễn dịch ở chuột nhắt

Trong các nghiên cứu sơ bộ, các tác giả sáng chế đã quan sát thấy rằng liều lượng 4000 IU DP47GS IgG-IL-2 hoạt hóa tế bào T điều hòa của FOXP3⁺ ở chuột nhắt *in vivo*; liều này sau đó được sử dụng để đánh giá khả năng của nó trong việc ức chế đáp ứng miễn dịch phụ thuộc vào T cổ điển ở chuột nhắt, tức là độ siêu nhạy dạng trì hoãn (Fig. 45) và đáp ứng IgG kháng KLH (Fig. 46).

Chuột nhắt NOD và chuột nhắt C57BL/6 ($n=7$) được miễn dịch IV bằng tế bào hồng cầu cừu (srbc) và được thách thức 3 ngày sau đó bằng cách tiêm liều lớn srbc ở một gót chân để kích thích đáp ứng tính quá mẫn dạng trì hoãn (DTH). Một ngày sau thách thức, chuột nhắt bị giết chết bằng CO₂ và các chi được cắt bỏ và cân lên. Biên độ đáp ứng DTH được thể hiện dưới dạng thay đổi về trọng lượng chi so với chuột nhắt không được miễn dịch (Δ trọng lượng chi). DP47GS IgG-IL-2 được dùng SC ở 4000 IU trong mỗi con chuột nhắt 3 ngày trước và vào ngày miễn dịch hóa bằng srbc và chất

dẫn thuốc là PBS vô trùng có độ pH = 7,2. Ý nghĩa thống kê có nguồn gốc từ thử nghiệm Mann Whitney trong GraphPad Prism.

Việc chia liều DP47GS IgG-IL-2 ba ngày trước và vào ngày miễn dịch hóa bằng tế bào hồng cầu cừu làm ức chế đáp ứng tính quá mẫn dạng trì hoãn sau đó với thách thức tế bào máu cừu là 51% ở chuột nhắt NOD (Fig. 45A; $p=0,0023$) và 38% ở chuột nhắt C57BL/6 (Fig. 45B; $p=0,002$). CTLA-4-Ig ở chuột nhắt làm chất ức chế miễn dịch đối chứng dương đã ức chế đáp ứng DTH đến mức độ tương tự như DP47GS IgG-IL-2.

DP47GS IgG-IL-2 cũng có thể ức chế đáp ứng IgG đặc hiệu KLH ở chuột nhắt C57BL/6 (ức chế 78%, $p=0,0007$, Fig. 46A) và NOD (ức chế 67%, $p=0,004$, Fig. 46B). Đối với thử nghiệm này, chuột nhắt non khỏe mạnh C57BL/6 ($n=7-10$) và chuột nhắt NOD ($n=13-14$) được gây miễn dịch IP bằng 100 μ g vắc-xin người loại KLH không có chất bổ trợ như được khuyến cáo bởi nhà sản xuất (Stellar). Việc điều trị bằng DP47GS IgG-IL-2 gồm điều trị hằng tuần bằng 1 (NOD) hoặc 2 (C57BL/6) với 4000 IU trong mỗi con chuột nhắt SC được bắt đầu vào ngày tạo miễn dịch. Bảy ngày (NOD) và 21 ngày (C57BL/6) sau khi tạo miễn dịch, máu được gom và các đáp ứng IgG đặc hiệu KLH huyết thanh được đo bằng ELISA.

Khả năng của DP47GS IgG-IL-2 trong việc ức chế các đáp ứng miễn dịch *in vivo* hỗ trợ giả thiết rằng phương pháp hoạt hóa tế bào T điều hòa được cảm ứng bởi liều thấp IL-2 tạo ra các tế bào T điều hòa chức năng điều tiết sự giảm đáp ứng miễn dịch.

Mặc dù sáng chế đã được mô tả chi tiết bằng cách minh họa và ví dụ nhằm mục đích hiểu rõ, phần mô tả và ví dụ thực hiện không nên được hiểu là làm giới hạn phạm vi của sáng chế. Phần mô tả tất cả các patent và tài liệu khoa học được trích dẫn ở đây được đưa vào đây để tham khảo.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Protein dung hợp chứa (i) phân tử globulin miễn dịch không có khả năng liên kết đặc hiệu với kháng nguyên và (ii) hai phân tử interleukin-2 (IL-2) đột biến chứa đột biến axit amin làm giảm ái lực của phân tử IL-2 đột biến đối với thụ thể IL-2 ái lực trung bình, khi so với phân tử IL-2 kiểu dại, trong đó phân tử IL-2 đột biến này chứa trình tự của SEQ ID NO: 58.
2. Protein dung hợp theo điểm 1, trong đó phân tử globulin miễn dịch nêu trên là phân tử globulin miễn dịch lớp IgG, cụ thể là phân tử globulin miễn dịch phân lớp IgG₁.
3. Protein dung hợp theo điểm 1 hoặc 2, trong đó phân tử globulin miễn dịch nêu trên là phân tử globulin miễn dịch ở người.
4. Protein dung hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó phân tử globulin miễn dịch nêu trên chứa trình tự vùng biến đổi của chuỗi nặng dựa trên trình tự dòng mầm Vh3-23 ở người.
5. Protein dung hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó phân tử globulin miễn dịch nêu trên chứa trình tự vùng biến đổi của chuỗi nặng SEQ ID NO: 9.
6. Protein dung hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó phân tử globulin miễn dịch nêu trên chứa trình tự vùng biến đổi của chuỗi nhẹ dựa trên trình tự dòng mầm Vk3-20 ở người.
7. Protein dung hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó phân tử globulin miễn dịch nêu trên chứa trình tự vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 11.
8. Protein dung hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó phân tử globulin miễn dịch nêu trên chứa cải biến làm giảm ái lực gắn kết của phân tử globulin miễn dịch đối với thụ thể Fc so với phân tử globulin miễn dịch tương ứng không có cải biến này.
9. Protein dung hợp theo điểm 8, trong đó thụ thể Fc nêu trên là thụ thể Fc γ , cụ thể là thụ thể Fc γ ở người.

10. Protein dung hợp theo điểm 8 hoặc 9, trong đó thụ thể Fc nêu trên là thụ thể Fc hoạt hóa.
11. Protein dung hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 8 đến 10, trong đó thụ thể Fc nêu trên được chọn từ nhóm bao gồm FcγRIIIa (CD16a), FcγRI (CD64), FcγRIIa (CD32) và FcαRI (CD89).
12. Protein dung hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 8 đến 11, trong đó thụ thể Fc nêu trên là FcγRIIIa, cụ thể là FcγRIIIa ở người.
13. Protein dung hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó phân tử globulin miễn dịch nêu trên chứa đột biến thay thế axit amin ở vị trí 329 (đánh số theo EU) của chuỗi nặng của globulin miễn dịch.
14. Protein dung hợp theo điểm 13, trong đó đột biến thay thế axit amin nêu trên là P329G.
15. Protein dung hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó phân tử globulin miễn dịch nêu trên chứa đột biến thay thế axit amin ở vị trí 234 và 235 (đánh số theo EU) của chuỗi nặng của globulin miễn dịch.
16. Protein dung hợp theo điểm 15, trong đó đột biến thay thế axit amin nêu trên là L234A và L235A (LALA).
17. Protein dung hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó phân tử globulin miễn dịch nêu trên chứa đột biến axit amin L234A, L235A và P329G (đánh số theo EU) trong chuỗi nặng của globulin miễn dịch.
18. Protein dung hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó mỗi phân tử IL-2 đột biến nêu trên được dung hợp tại axit amin ở đầu tận cùng N của chúng với axit amin ở đầu tận cùng C của một trong số các chuỗi nặng của globulin miễn dịch của phân tử globulin miễn dịch nêu trên, tùy ý thông qua tác nhân liên kết peptit.
19. Protein dung hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó mỗi phân tử IL-2 đột biến nêu trên được dung hợp với phân tử globulin miễn dịch nêu trên thông qua tác nhân liên kết peptit.

20. Protein dung hợp theo điểm 19, trong đó tác nhân liên kết peptit nêu trên chứa ít nhất 10, cụ thể là ít nhất 15 axit amin.
21. Protein dung hợp theo điểm 19 hoặc 20, trong đó tác nhân liên kết peptit nêu trên chứa trình tự axit amin (G₄S)₃ (SEQ ID NO: 66).
22. Protein dung hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó protein dung hợp chứa trình tự polypeptit của SEQ ID NO: 19 và SEQ ID NO: 50.
23. Protein dung hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó protein dung hợp nêu trên hoạt hóa có chọn lọc tế bào T điều hòa.
24. Polynucleotit mã hóa protein dung hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên.
25. Vector, cụ thể là vector biểu hiện, chứa polynucleotit theo điểm 24.
26. Tế bào chủ chứa polynucleotit theo điểm 24 hoặc vector theo điểm 25.
27. Phương pháp sản xuất protein dung hợp chứa phân tử globulin miễn dịch và hai phân tử IL-2 đột biến chứa đột biến axit amin làm giảm ái lực của phân tử IL-2 đột biến đối với thụ thể IL-2 ái lực trung bình khi so với phân tử IL-2 kiểu dại, bao gồm các bước (i) nuôi cấy thể bào chủ theo điểm 26 trong các điều kiện thích hợp để biểu hiện protein dung hợp, và (ii) thu hồi protein dung hợp.
28. Protein dung hợp được sản xuất bằng phương pháp theo điểm 27.
29. Dược phẩm chứa protein dung hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 23 hoặc 28 và chất mang dược dụng.
30. Polynucleotit mã hóa protein dung hợp chứa (i) phân tử globulin miễn dịch không có khả năng liên kết đặc hiệu với kháng nguyên và (ii) hai phân tử interleukin-2 (IL-2) đột biến chứa đột biến axit amin làm giảm ái lực của phân tử IL-2 đột biến đối với thụ thể IL-2 ái lực trung bình, khi so với phân tử IL-2 kiểu dại, trong đó phân tử IL-2 đột biến này chứa trình tự của SEQ ID NO: 58.

31. Phương pháp hoạt hóa có chọn lọc tế bào T điều hòa *in vitro*, phương pháp này bao gồm bước cho tế bào T điều hòa đã nêu tiếp xúc với protein dung hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 23 hoặc 28.

32. Phương pháp theo điểm 31, trong đó phương pháp hoạt hóa này bao gồm bước gây cảm ứng sự tăng sinh tế bào T điều hòa và/hoặc gây cảm ứng việc truyền tín hiệu thụ thể IL-2 trong tế bào T điều hòa.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> F. Hoffmann-La Roche AG

<120> PROTEIN DUNG HỢP INTERLEUKIN-2, PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT PROTEIN DUNG HỢP VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA PROTEIN NÀY

<130> 31142

<150> US 61/936564

<151> 2014-02-06

<160> 66

<170> PatentIn phiên bản 3.5

<210> 1

<211> 133

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

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

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

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

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

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

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

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

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

Ile Ser Thr Leu Thr
130

<210> 2
<211> 399
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> IL-2 ở người kiểu đại

<400> 2
gcacctactt caagttctac aaagaaaaca cagctacaac tggagcattt actgctggat 60
ttacagatga ttttgaatgg aattaataat tacaagaatc ccaaactcac caggatgctc 120
acattttaagt ttacatgcc caagaaggcc acagaactga aacatcttca gtgtctagaa 180
gaagaactca aacctctgga ggaagtgcta aatttagctc aaagcaaaaa ctttcactta 240
agacccaggg acttaatcag caatatcaac gtaatagttc tggaactaaa gggatctgaa 300
acaacattca tgtgtgaata tgctgatgag acagcaacca ttgtagaatt tctgaacaga 360
tggattacct tttgtcaaag catcatctca acactgact 399

<210> 3
<211> 133
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> IL-2 ở người kiểu đại (C125A)

<400> 3

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

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

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

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

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

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

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

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

Ile Ser Thr Leu Thr
130

<210> 4
<211> 399
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> IL-2 ở người kiểu đại (C125A) (1)

<400> 4
gctcctacat cctccagcac caagaaaacc cagctccagc tggaacatct cctgctggat 60
ctgcagatga tcctgaacgg catcaacaac tacaagaacc ccaagctgac ccggatgctg 120
accttcaagt tctacatgcc caagaaggcc accgagctga aacatctgca gtgcctggaa 180
gaggaactga agcctctgga agaggtgctg aacctggccc agtccaagaa cttccacctg 240
aggcctcggg acctgatctc caacatcaac gtgatcgtgc tggaactgaa gggctccgag 300
acaaccttca tgtgcgagta cgccgacgag acagctacca tcgtggaatt tctgaaccgg 360
tggatcacct tcgcccagtc catcatctcc accctgacc 399

<210> 5
<211> 399
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> IL-2 ở người kiểu đại (C125A) (2)

<400> 5
gcacctactt caagttctac aaagaaaaca cagctacaac tggagcattt actgctggat 60
ttacagatga ttttgaatgg aattaataat tacaagaatc ccaaactcac caggatgctc 120
acatttaagt tttacatgcc caagaaggcc acagaactga aacatcttca gtgtctagaa 180

gaagaactca aacctctgga ggaagtgcta aatttagctc aaagcaaaaa ctttcaactta 240
 agaccaggg acttaatcag caatatcaac gtaatagttc tggaactaaa gggatctgaa 300
 acaacattca tgtgtgaata tgctgatgag acagcaacca ttgtagaatt tctgaacaga 360
 tggattacct ttgcccaaag catcatctca acactgact 399

<210> 6
 <211> 399
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> IL-2 ở người kiểu đại (C125A) (3)

<400> 6
 gctcctacta gcagctccac caagaaaacc cagctccagc tggaacatct gctgctggat 60
 ctgcagatga tcctgaacgg catcaacaac tacaagaacc ccaagctgac ccggatgctg 120
 accttcaagt tctacatgcc caagaaggcc accgaactga aacatctgca gtgcctggaa 180
 gaggaactga agcctctgga agaggtgctg aacctggccc agagcaagaa cttccacctg 240
 aggcccaggg acctgatcag caacatcaac gtgatcgtgc tggaactgaa gggcagcgag 300
 acaaccttca tgtgcgagta cgccgacgag acagccacca tcgtggaatt tctgaaccgg 360
 tggatcacct tcgcccagag catcatcagc acctgaca 399

<210> 7
 <211> 399
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> IL-2 kiểu đại (C125A) (4)

<400> 7
 gcacctactt caagttctac aaagaaaaca cagctacaac tggagcattt actgctggat 60
 ttacagatga ttttgaatgg aattaataat tacaagaatc ccaaactcac caggatgctc 120
 acatttaagt tttacatgcc caagaaggcc acagaactga aacatcttca gtgtctagaa 180
 gaagaactca aacctctgga ggaagtgcta aatttagctc aaagcaaaaa ctttcaactta 240
 agaccaggg acttaatcag caatatcaac gtaatagttc tggaactaaa gggatctgaa 300
 acaacattca tgtgtgaata tgctgatgag acagcaacca ttgtagaatt tctgaacaga 360
 tggattacct ttgcccaaag catcatctca acactgact 399

<210> 8
 <211> 227
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 8

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 130 135 140

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 145 150 155 160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 210 215 220

Pro Gly Lys
 225

<210> 9
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> DP47GS VH

<400> 9

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Lys Gly Ser Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110

Val Ser Ser
 115

<210> 10
 <211> 345
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> DP47GS VH

<400> 10

gaggtgcaat tgttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctccggatt cacctttagc agttatgcc a tgagctgggt ccgccaggct 120
 ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaggcagc 300
 ggatttgact actggggcca aggaaccctg gtcaccgtct cgagt 345

<210> 11

<211> 108

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> DP47GS VL

<400> 11

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
 85 90 95

Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 12

<211> 324

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> DP47GS VL

<400> 12

```

gaaatcgtgt taacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc      60
ctctcttgca gggccagtca gagtgttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa      120
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggagcatcca gcagggccac tggcatccca      180
gacaggttca gtggcagtgg atccgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag      240
cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtatggta gctcaccgct gacgttcggc      300
caggggacca aagtggaaat caaa                                             324

```

<210> 13

<211> 592

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> DP47GS HC(lỗ Fc,P329G LALA)-IL2

<400> 13

```

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1           5           10           15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20           25           30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35           40           45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50           55           60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65           70           75           80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85           90           95

Ala Lys Gly Ser Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100          105          110

```

Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
 115 120 125

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
 130 135 140

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
 145 150 155 160

Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
 165 170 175

Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
 180 185 190

Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
 195 200 205

Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
 210 215 220

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
 225 230 235 240

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 245 250 255

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
 260 265 270

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 275 280 285

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
 290 295 300

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 305 310 315 320

Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 325 330 335

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys
 340 345 350

Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys
 355 360 365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 370 375 380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 405 410 415

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Gly Gly
 435 440 445

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Pro Thr Ser Ser
 450 455 460

Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu
 465 470 475 480

Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr
 485 490 495

Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu
 500 505 510

Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val
 515 520 525

Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu
 530 535 540

Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr
 545 550 555 560

Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe

565

570

575

Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ala Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr
 580 585 590

<210> 14

<211> 1776

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> DP47GS HC(1ổ Fc,P329G LALA)-IL2

<400> 14

```

gaggtgcaat tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagaactc      60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttagc agttatgcc a tgagctgggt cgcgcaggct      120
ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac      180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat      240
ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaggcagc      300
ggatttgact actggggcca aggaaccctg gtcaccgtct cgagtgctag caccaagggc      360
ccatcggtct tccccctggc accctcctcc aagagcacct ctggggggcac agcgggccctg      420
ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa cgggtgacgg tgtcgtggaa ctcaggcgcc      480
ctgaccagcg gcgtgcacac cttccccggt gtcctacagt cctcaggact ctactccctc      540
agcagcgtgg tgaccgtgcc ctccagcagc ttgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg      600
aatcacaagc ccagcaacac caaggtggac aagaaagttg agcccaaadc ttgtgacaaa      660
actcacacat gccaccgtg cccagcacct gaagctgcag ggggaccgtc agtcttcctc      720
ttccccccaa aacccaagga caccctcatg atctcccga cccctgaggt cacatgcgtg      780
gtggtggacg tgagccacga agaccctgag gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg      840
gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg      900
gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta caagtgcag      960
gtctccaaca aagccctcgg cgccccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag      1020
ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc ccatgccggg atgagctgac caagaaccag      1080
gtcagcctgt ggtgcctggc caaaggcttc tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag      1140
agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc      1200
tccttcttcc tctacagcaa gtcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc      1260

```

```

ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc 1320
ctgtctccgg gtggcggcgg aggctccgga ggcggagggt ctggaggcgg aggctccgca 1380
cctacttcaa gttctacaaa gaaaacacag ctacaactgg agcatttact gctggattta 1440
cagatgattt tgaatggaat taataattac aagaatccca aactcaccag gatgctcaca 1500
tttaagtttt acatgcccaa gaaggccaca gaactgaaac atcttcagtg tctagaagaa 1560
gaactcaaac ctctggagga agtgctaaat ttagctcaaa gcaaaaactt tcacttaaga 1620
cccagggact taatcagcaa tatcaacgta atagttctgg aactaaaggg atctgaaaca 1680
acattcatgt gtgaatatgc tgatgagaca gcaaccattg tagaatttct gaacagatgg 1740
attacctttg cccaaagcat catctcaaca ctgact 1776

```

<210> 15
 <211> 445
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> DP47GS HC(1 α Fc, P329G LALA)

<400> 15

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Lys Gly Ser Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110

Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
 115 120 125

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
 130 135 140

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
 145 150 155 160

Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
 165 170 175

Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
 180 185 190

Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
 195 200 205

Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
 210 215 220

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
 225 230 235 240

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 245 250 255

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
 260 265 270

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 275 280 285

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
 290 295 300

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 305 310 315 320

Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 325 330 335

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser
 340 345 350

Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys
 355 360 365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 370 375 380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 405 410 415

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

<210> 16
 <211> 1335
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> DP47GS HC(1Ổ Fc, P329G LALA)

<400> 16
 gaggtgcaat tggttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctccggatt caccttttagc agttatgcc aagagctgggt ccgccaggct 120
 ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaggcagc 300
 ggatttgact actggggcca aggaaccctg gtcaccgtct cgagtgctag caccaagggc 360
 ccctccgtgt tccccctggc cccagcagc aagagcacca gcggcgccac agccgctctg 420
 ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgag cccgtgaccg tgtcctggaa cagcggagcc 480
 ctgacctccg gcgtgcacac cttccccgcc gtgctgcaga gttctggcct gtatagcctg 540
 agcagcgtgg tcaccgtgcc ttctagcagc ctgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg 600

```

aaccacaagc ccagcaacac caaggtggac aagaaggtgg agcccaagag ctgcgacaaa      660
actcacacat gccaccgtg cccagcacct gaagctgcag ggggaccgtc agtcttcctc      720
ttccccccaa aaccaagga caccctcatg atctcccgga cccctgaggt cacatgctgtg      780
gtggtggacg tgagccacga agaccctgag gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg      840
gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg      900
gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta caagtgaag      960
gtctccaaca aagccctcgg cgcccccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag     1020
ccccgagaac cacaggtgtg caccctgccc ccatcccggg atgagctgac caagaaccag     1080
gtcagcctct cgtgcgcagt caaaggcttc tatccagcg acatcgccgt ggagtgggag     1140
agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc     1200
tccttcttcc tcgtgagcaa gtcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc     1260
ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc     1320
ctgtctccgg gtaaa                                     1335

```

<210> 17

<211> 592

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> DP47GS HC (Fc wt, P329G LALA)-IL2

<400> 17

```

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1              5              10              15

```

```

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20              25              30

```

```

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35              40              45

```

```

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50              55              60

```

```

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65              70              75              80

```

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Lys Gly Ser Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110

Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
 115 120 125

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
 130 135 140

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
 145 150 155 160

Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
 165 170 175

Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
 180 185 190

Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
 195 200 205

Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
 210 215 220

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
 225 230 235 240

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 245 250 255

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
 260 265 270

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 275 280 285

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
 290 295 300

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys

305		310		315		320
Val Ser Asn Lys	Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys					
	325		330			335
Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser						
	340		345			350
Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys						
	355		360			365
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln						
	370		375			380
Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly						
	385		390			395
Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln						
	405		410			415
Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn						
	420		425			430
His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Gly Gly						
	435		440			445
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Pro Thr Ser Ser						
	450		455			460
Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu						
	465		470			480
Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr						
	485		490			495
Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu						
	500		505			510
Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val						
	515		520			525
Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu						
	530		535			540

Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr
 545 550 555 560

Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe
 565 570 575

Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ala Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr
 580 585 590

<210> 18

<211> 1776

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> DP47GS HC (Fc wt, P329G LALA)-IL2

<400> 18

gagggtgcaat tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc	60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttagc agttatgcc a tgagctgggt ccgccaggct	120
ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac	180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgtgtat	240
ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaggcagc	300
ggatttgact actggggcca aggaaccctg gtcaccgtct cgagtgctag caccaagggc	360
ccatcgggtct tccccctggc accctcctcc aagagcacct ctggggggcac agcgggcctg	420
ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa ccggtgacgg tgtcgtggaa ctcaggcgcc	480
ctgaccagcg gcgtgcacac cttcccgggt gtcctacagt cctcaggact ctactccctc	540
agcagcgtgg tgaccgtgcc ctccagcagc ttgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg	600
aatcacaagc ccagcaacac caaggtggac aagaaagttg agcccaaadc ttgtgacaaa	660
actcacacat gccaccgtg cccagcacct gaagctgcag ggggagcgtc agtcttcctc	720
ttccccccaa aacccaagga caccctcatg atctcccga cccctgaggt cacatgcgtg	780
gtggtggacg tgagccacga agaccctgag gtcaagttca actggtacgt ggacggcggtg	840
gagggtgcata atgccaagac aaagccgcgg gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg	900
gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta caagtgcaag	960
gtctccaaca aagccctcgg cgcacctatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag	1020

```

ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc ccatcccggg atgagctgac caagaaccag 1080
gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag 1140
agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc cctgctgga ctccgacggc 1200
tcctttcttcc tctacagcaa gctcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc 1260
ttctcatgct cctgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc 1320
ctgtctccgg gtggcggcgg aggctccgga ggcggagggt ctggaggcgg aggctccgca 1380
cctacttcaa gttctacaaa gaaaacacag ctacaactgg agcatttact gctggattta 1440
cagatgattt tgaatggaat taataattac aagaatccca aactcaccag gatgctcaca 1500
tttaagtttt acatgcccaa gaaggccaca gaactgaaac atcttcagtg tctagaagaa 1560
gaactcaaac ctctggagga agtgctaaat ttagctcaaa gcaaaaactt tcaacttaaga 1620
cccagggact taatcagcaa tatcaacgta atagtctctg aactaaaggg atctgaaaca 1680
acattcatgt gtgaatatgc tgatgagaca gcaaccattg tagaatttct gaacagatgg 1740
attacctttg cccaaagcat catctcaaca ctgact 1776

```

<210> 19

<211> 215

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> DP47GS LC

<400> 19

```

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1           5           10           15

```

```

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20           25           30

```

```

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35           40           45

```

```

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50           55           60

```

```

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65           70           75           80

```

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
85 90 95

Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
100 105 110

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
115 120 125

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
130 135 140

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
145 150 155 160

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
165 170 175

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
180 185 190

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
195 200 205

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 20

<211> 645

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> DP47GS LC

<400> 20

gaaatcgtgt taacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60

ctctcttgca gggccagtca gagggttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120

cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggagcatcca gcagggccac tggcatccca 180

gacaggttca gtggcagtgg atccgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240

cctgaagatt ttgcagtgtg ttactgtcag cagtatggta gctcaccgct gacgttcggc 300

caggggacca aagtggaaat caaacgtacg gtggctgcac catctgtctt catcttcccg 360

```

ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc      420
tatcccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg ccctccaatc gggtaactcc      480
caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcaccctg      540
acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt cacccatcag      600
ggcctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgt                       645

```

<210> 21
 <211> 466
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Protein dung hợp IL-2R-beta-(lỗ)Fc ở người

<400> 21

```

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1           5           10           15

```

```

Phe Pro Gly Ala Arg Cys Ala Val Asn Gly Thr Ser Gln Phe Thr Cys
          20           25           30

```

```

Phe Tyr Asn Ser Arg Ala Asn Ile Ser Cys Val Trp Ser Gln Asp Gly
          35           40           45

```

```

Ala Leu Gln Asp Thr Ser Cys Gln Val His Ala Trp Pro Asp Arg Arg
50           55           60

```

```

Arg Trp Asn Gln Thr Cys Glu Leu Leu Pro Val Ser Gln Ala Ser Trp
65           70           75           80

```

```

Ala Cys Asn Leu Ile Leu Gly Ala Pro Asp Ser Gln Lys Leu Thr Thr
          85           90           95

```

```

Val Asp Ile Val Thr Leu Arg Val Leu Cys Arg Glu Gly Val Arg Trp
          100          105          110

```

```

Arg Val Met Ala Ile Gln Asp Phe Lys Pro Phe Glu Asn Leu Arg Leu
          115          120          125

```

```

Met Ala Pro Ile Ser Leu Gln Val Val His Val Glu Thr His Arg Cys
          130          135          140

```

Asn Ile Ser Trp Glu Ile Ser Gln Ala Ser His Tyr Phe Glu Arg His
 145 150 155 160

Leu Glu Phe Glu Ala Arg Thr Leu Ser Pro Gly His Thr Trp Glu Glu
 165 170 175

Ala Pro Leu Leu Thr Leu Lys Gln Lys Gln Glu Trp Ile Cys Leu Glu
 180 185 190

Thr Leu Thr Pro Asp Thr Gln Tyr Glu Phe Gln Val Arg Val Lys Pro
 195 200 205

Leu Gln Gly Glu Phe Thr Thr Trp Ser Pro Trp Ser Gln Pro Leu Ala
 210 215 220

Phe Arg Thr Lys Pro Ala Ala Leu Gly Lys Asp Thr Gly Ala Gln Asp
 225 230 235 240

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 245 250 255

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 260 265 270

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 275 280 285

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 290 295 300

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 305 310 315 320

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 325 330 335

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 340 345 350

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys
 355 360 365

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu

370 375 380
 Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 385 390 395 400
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 405 410 415
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp
 420 425 430
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 435 440 445
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 450 455 460

Gly Lys
465

<210> 22
 <211> 1401
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Protein dung hợp IL-2R-beta-(lỗ)Fc ở người

<400> 22
 atggacatga ggggtccccgc tcagctcctg ggctcctgc tgctctgggt cccaggtgcc 60
 aggtgtgctg tgaatggcac ttcccagttc acatgcttct acaactcgag agccaacatc 120
 tcctgtgtct ggagccaaga tggggctctg caggacactt cctgccaagt ccatgcctgg 180
 ccggacagac ggcggtggaa ccaaacctgt gagctgctcc ccgtgagtca agcatcctgg 240
 gcctgcaacc tgatcctcgg agccccagat tctcagaaac tgaccacagt tgacatcgtc 300
 accctgaggg tgctgtgccg tgaggggggtg cgatggaggg tgatggccat ccaggacttc 360
 aagccctttg agaaccttcg cctgatggcc cccatctccc tccaagttgt ccacgtggag 420
 acccacagat gcaacataag ctgggaaatc tccaagcct ccactactt tgaaagacac 480
 ctggagttcg aggcccgac gctgtcccca ggccacacct gggaggaggc cccctgctg 540
 actctcaagc agaagcagga atggatctgc ctggagacgc tcaccccaga caccagtat 600
 gagtttcagg tgcgggtcaa gcctctgcaa ggcgagttca cgacctggag cccctggagc 660

cagccccctgg ccttcagaac aaagcctgca gcccttggga aggacaccgg agctcaggac 720
 aaaactcaca catgcccacc gtgcccagca cctgaactcc tgggggggacc gtcagtcttc 780
 ctcttccccc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc 840
 gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc 900
 gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt 960
 gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc 1020
 aaggtctcca acaaagccct cccagcccc atcgagaaaa ccatctcaa agccaaaggg 1080
 cagccccgag aaccacaggt gtgcaccctg ccccatccc gggatgagct gaccaagaac 1140
 caggtcagcc tctcgtgcgc agtcaaaggc ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg 1200
 gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac 1260
 ggctccttct tcctcgtgag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac 1320
 gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc 1380
 tccctgtctc cgggtaaattg a 1401

<210> 23

<211> 492

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Protein dung hợp IL-2R-gamma-(phần phình)Fc ở người

<400> 23

Met Leu Lys Pro Ser Leu Pro Phe Thr Ser Leu Leu Phe Leu Gln Leu
1 5 10 15

Pro Leu Leu Gly Val Gly Leu Asn Thr Thr Ile Leu Thr Pro Asn Gly
20 25 30

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

Ser Leu Ser Val Ser Thr Leu Pro Leu Pro Glu Val Gln Cys Phe Val
50 55 60

Phe Asn Val Glu Tyr Met Asn Cys Thr Trp Asn Ser Ser Ser Glu Pro
65 70 75 80

Gln Pro Thr Asn Leu Thr Leu His Tyr Trp Tyr Lys Asn Ser Asp Asn
85 90 95

Asp Lys Val Gln Lys Cys Ser His Tyr Leu Phe Ser Glu Glu Ile Thr
100 105 110

Ser Gly Cys Gln Leu Gln Lys Lys Glu Ile His Leu Tyr Gln Thr Phe
115 120 125

Val Val Gln Leu Gln Asp Pro Arg Glu Pro Arg Arg Gln Ala Thr Gln
130 135 140

Met Leu Lys Leu Gln Asn Leu Val Ile Pro Trp Ala Pro Glu Asn Leu
145 150 155 160

Thr Leu His Lys Leu Ser Glu Ser Gln Leu Glu Leu Asn Trp Asn Asn
165 170 175

Arg Phe Leu Asn His Cys Leu Glu His Leu Val Gln Tyr Arg Thr Asp
180 185 190

Trp Asp His Ser Trp Thr Glu Gln Ser Val Asp Tyr Arg His Lys Phe
195 200 205

Ser Leu Pro Ser Val Asp Gly Gln Lys Arg Tyr Thr Phe Arg Val Arg
210 215 220

Ser Arg Phe Asn Pro Leu Cys Gly Ser Ala Gln His Trp Ser Glu Trp
225 230 235 240

Ser His Pro Ile His Trp Gly Ser Asn Thr Ser Lys Glu Asn Pro Phe
245 250 255

Leu Phe Ala Leu Glu Ala Gly Ala Gln Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
260 265 270

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
275 280 285

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
290 295 300

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
305 310 315 320

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
325 330 335

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
340 345 350

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
355 360 365

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
370 375 380

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg
385 390 395 400

Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly
405 410 415

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
420 425 430

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
435 440 445

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
450 455 460

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
465 470 475 480

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
485 490

<210> 24
<211> 1479
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Protein dung hợp IL-2R-gamma-(phần phình)Fc ở người

<400> 24

atgttgaagc catcattacc attcacatcc ctcttattcc tgcagctgcc cctgctggga 60
 gtggggctga acacgacaat tctgacgcc aatgggaatg aagacaccac agctgatttc 120
 ttctgacca ctatgccac tgactccctc agtggtttcca ctctgcccct cccagagggt 180
 cagtgttttg tgttcaatgt cgagtacatg aattgcactt ggaacagcag ctctgagccc 240
 cagcctacca acctcactct gcattattgg tacaagaact cggataatga taaagtccag 300
 aagtgcagcc actatctatt ctctgaagaa atcacttctg gctgtcagtt gcaaaaaaag 360
 gagatccacc tctaccaaac atttgttgtt cagctccagg acccacggga acccaggaga 420
 caggccacac agatgctaaa actgcagaat ctggtgatcc cctgggctcc agagaaccta 480
 acacttcaca aactgagtga atcccagcta gaactgaact ggaacaacag attcttgaac 540
 cactgttttg agcacttggg gcagtaccgg actgactggg accacagctg gactgaacaa 600
 tcagtggatt atagacataa gttctccttg cctagtgtgg atgggcagaa acgctacag 660
 tttcgtgttc ggagccgctt taaccactc tgtggaagtg ctacagcattg gagtgaatgg 720
 agccacccaa tccactgggg gagcaatact tcaaaagaga atcctttcct gtttgcatg 780
 gaagccggag ctacaggaaa aactcacaca tgcccaccgt gccagcacc tgaactcctg 840
 gggggaccgt cagtcttctt cttccccca aaacccaagg acaccctcat gatctcccg 900
 acccctgagg tcacatgcgt ggtggtggac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc 960
 aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaga caaagccgag ggaggagcag 1020
 tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat 1080
 ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaagccctcc cagcccccat cgagaaaacc 1140
 atctccaaag ccaaggggca gccccgagaa ccacaggtgt acaccctgcc cccatgccgg 1200
 gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg tggcgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc 1260
 gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct 1320
 cccgtgctgg actccgacgg ctcttcttct ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc 1380
 aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac 1440
 tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg ggtaaatga 1479

<210> 25

<211> 219

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc siêu phân tử IL-2R alpha ở người + đuôi Avi + đuôi His

<400> 25

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser Glu Leu Cys Asp Asp Asp Pro Pro Glu Ile Pro His Ala
20 25 30

Thr Phe Lys Ala Met Ala Tyr Lys Glu Gly Thr Met Leu Asn Cys Glu
35 40 45

Cys Lys Arg Gly Phe Arg Arg Ile Lys Ser Gly Ser Leu Tyr Met Leu
50 55 60

Cys Thr Gly Asn Ser Ser His Ser Ser Trp Asp Asn Gln Cys Gln Cys
65 70 75 80

Thr Ser Ser Ala Thr Arg Asn Thr Thr Lys Gln Val Thr Pro Gln Pro
85 90 95

Glu Glu Gln Lys Glu Arg Lys Thr Thr Glu Met Gln Ser Pro Met Gln
100 105 110

Pro Val Asp Gln Ala Ser Leu Pro Gly His Cys Arg Glu Pro Pro Pro
115 120 125

Trp Glu Asn Glu Ala Thr Glu Arg Ile Tyr His Phe Val Val Gly Gln
130 135 140

Met Val Tyr Tyr Gln Cys Val Gln Gly Tyr Arg Ala Leu His Arg Gly
145 150 155 160

Pro Ala Glu Ser Val Cys Lys Met Thr His Gly Lys Thr Arg Trp Thr
165 170 175

Gln Pro Gln Leu Ile Cys Thr Gly Val Asp Glu Gln Leu Tyr Phe Gln
180 185 190

Gly Gly Ser Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp
195 200 205

His Glu Ala Arg Ala His His His His His His

210

215

<210> 26
 <211> 660
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc siêu phân tử IL-2R alpha ở người + đuôi Avi + đuôi His

<400> 26
 atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctaccggtgt gcattccgag 60
 ctctgtgacg atgacccgcc agagatccca cacgccacat tcaaagccat ggcctacaag 120
 gaaggaacca tgttgaactg tgaatgcaag agaggtttcc gcagaataaa aagcgggtca 180
 ctctatatgc tctgtacagg aaactctagc cactcgctct gggacaacca atgtcaatgc 240
 acaagctctg ccactcggaa cacaacgaaa caagtgcacac ctcaacctga agaacagaaa 300
 gaaaggaaaa ccacagaaat gcaaagtcca atgcagccag tggaccaagc gagccttcca 360
 ggtcactgca gggaacctcc accatgggaa aatgaagcca cagagagaat ttatcatttc 420
 gtggtggggc agatggttta ttatcagtgc gtccagggat acagggctct acacagaggt 480
 cctgctgaga gcgtctgcaa aatgaccac ggggaagacaa ggtggacca gcccagctc 540
 atatgcacag gtgtcgacga acagttatat tttcagggcg gctcaggcct gaacgacatc 600
 ttcgaggccc agaagatcga gtggcacgag gctcgagctc accaccatca ccatcactga 660

<210> 27
 <211> 473
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Protein dung hợp IL-2R-beta-(lỗ)Fc ở chuột

<400> 27

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
 1 5 10 15

Phe Pro Leu Leu Leu Leu Trp Phe Pro Gly Ala Arg Cys Ala Val Lys
 20 25 30

Asn Cys Ser His Leu Glu Cys Phe Tyr Asn Ser Arg Ala Asn Val Ser
 35 40 45

Cys Met Trp Ser His Glu Glu Ala Leu Asn Val Thr Thr Cys His Val
50 55 60

His Ala Lys Ser Asn Leu Arg His Trp Asn Lys Thr Cys Glu Leu Thr
65 70 75 80

Leu Val Arg Gln Ala Ser Trp Ala Cys Asn Leu Ile Leu Gly Ser Phe
85 90 95

Pro Glu Ser Gln Ser Leu Thr Ser Val Asp Leu Leu Asp Ile Asn Val
100 105 110

Val Cys Trp Glu Glu Lys Gly Trp Arg Arg Val Lys Thr Cys Asp Phe
115 120 125

His Pro Phe Asp Asn Leu Arg Leu Val Ala Pro His Ser Leu Gln Val
130 135 140

Leu His Ile Asp Thr Gln Arg Cys Asn Ile Ser Trp Lys Val Ser Gln
145 150 155 160

Val Ser His Tyr Ile Glu Pro Tyr Leu Glu Phe Glu Ala Arg Arg Arg
165 170 175

Leu Leu Gly His Ser Trp Glu Asp Ala Ser Val Leu Ser Leu Lys Gln
180 185 190

Arg Gln Gln Trp Leu Phe Leu Glu Met Leu Ile Pro Ser Thr Ser Tyr
195 200 205

Glu Val Gln Val Arg Val Lys Ala Gln Arg Asn Asn Thr Gly Thr Trp
210 215 220

Ser Pro Trp Ser Gln Pro Leu Thr Phe Arg Thr Arg Pro Ala Asp Pro
225 230 235 240

Met Lys Glu Gly Ala Gln Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
245 250 255

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
260 265 270

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val

275 280 285
 Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
 290 295 300
 Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 305 310 315 320
 Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 325 330 335
 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 340 345 350
 Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 355 360 365
 Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
 370 375 380
 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 385 390 395 400
 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 405 410 415
 Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 420 425 430
 Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 435 440 445
 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 450 455 460
 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470

<210> 28
 <211> 1422
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Protein dung hợp IL-2R-beta-(1 α)Fc ở chuột

<400> 28

```

atggacatga ggggtccccgc tcagctcctg ggcctcctgc tgctctggtt cccctcctg      60
ctgctctggt tcccaggtgc caggtgtgca gtgaaaaact gttcccatct tgaatgcttc      120
tacaactcaa gagccaatgt ctcttgcatg tggagccatg aagaggctct gaatgtcaca      180
acctgccacg tccatgccaa gtcgaacctg cgacactgga acaaaacctg tgagctaaact      240
cttgtgaggc aggcatacctg ggcctgcaac ctgatacctcg ggtcgttccc agagtcccag      300
tcaactgacct ccgtggacct ccttgacata aatgtggtgt gctgggaaga gaaggggttg      360
cgtagggtaa agacctgcga cttccatccc tttgacaacc ttgcctggt ggccccctcat      420
tccctccaag ttctgcacat tgatacccag agatgtaaca taagctggaa ggtctcccag      480
gtctctcact acattgaacc atacttgaa tttgaggccc gtagacgtct tctgggccac      540
agctgggagg atgcatccgt attaagcctc aagcagagac agcagtggct cttcttgagg      600
atgctgatcc ctagtacctc atatgaggtc caggtgaggg tcaaagctca acgaaacaat      660
accgggacct ggagtccttg gagccagccc ctgacctttc ggacaaggcc agcagatccc      720
atgaaggagg gagctcagga caaaactcac acatgcccac cgtgcccagc acctgaactc      780
ctgggggggac cgtcagtcctt cctcttcccc ccaaaaccca aggacaccct catgatctcc      840
cggacccttg aggtcacatg cgtggtggtg gacgtgagcc acgaagaccc tgaggtcaag      900
ttcaactggt acgtggacgg cgtggagggtg cataatgcc aagacaaagcc gcgggaggag      960
cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc gtcctcaccg tcctgcacca ggactggctg     1020
aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa     1080
accatctcca aagccaaagg gcagccccga gaaccacagg tgtgcaccct gccccatcc     1140
cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc ctctcgtgcg cagtcaaagg cttctatccc     1200
agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccacg     1260
cctcccgtgc tggactccga cggctccttc ttcctcgtga gcaagctcac cgtggacaag     1320
agcaggtggc agcaggggaa cgtctttctc tgctccgtga tgcattgaggc tctgcacaac     1380
cactacacgc agaagagcct ctccctgtct ccgggtaaata ga                        1422

```

<210> 29

<211> 500

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Protein dung hợp IL-2R-gamma-(phần phình)Fc ở chuột

<400> 29

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
 1 5 10 15

Phe Pro Leu Leu Leu Leu Trp Phe Pro Gly Ala Arg Cys Trp Ser Ser
 20 25 30

Lys Val Leu Met Ser Ser Ala Asn Glu Asp Ile Lys Ala Asp Leu Ile
 35 40 45

Leu Thr Ser Thr Ala Pro Glu His Leu Ser Ala Pro Thr Leu Pro Leu
 50 55 60

Pro Glu Val Gln Cys Phe Val Phe Asn Ile Glu Tyr Met Asn Cys Thr
 65 70 75 80

Trp Asn Ser Ser Ser Glu Pro Gln Ala Thr Asn Leu Thr Leu His Tyr
 85 90 95

Arg Tyr Lys Val Ser Asp Asn Asn Thr Phe Gln Glu Cys Ser His Tyr
 100 105 110

Leu Phe Ser Lys Glu Ile Thr Ser Gly Cys Gln Ile Gln Lys Glu Asp
 115 120 125

Ile Gln Leu Tyr Gln Thr Phe Val Val Gln Leu Gln Asp Pro Gln Lys
 130 135 140

Pro Gln Arg Arg Ala Val Gln Lys Leu Asn Leu Gln Asn Leu Val Ile
 145 150 155 160

Pro Arg Ala Pro Glu Asn Leu Thr Leu Ser Asn Leu Ser Glu Ser Gln
 165 170 175

Leu Glu Leu Arg Trp Lys Ser Arg His Ile Lys Glu Arg Cys Leu Gln
 180 185 190

Tyr Leu Val Gln Tyr Arg Ser Asn Arg Asp Arg Ser Trp Thr Glu Leu
 195 200 205

Ile Val Asn His Glu Pro Arg Phe Ser Leu Pro Ser Val Asp Glu Leu
210 215 220

Lys Arg Tyr Thr Phe Arg Val Arg Ser Arg Tyr Asn Pro Ile Cys Gly
225 230 235 240

Ser Ser Gln Gln Trp Ser Lys Trp Ser Gln Pro Val His Trp Gly Ser
245 250 255

His Thr Val Glu Glu Asn Pro Ser Leu Phe Ala Leu Glu Ala Gly Ala
260 265 270

Gln Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
275 280 285

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
290 295 300

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
305 310 315 320

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
325 330 335

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
340 345 350

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
355 360 365

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
370 375 380

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
385 390 395 400

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
405 410 415

Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
420 425 430

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro

435

440

445

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
 450 455 460

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 465 470 475 480

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 485 490 495

Ser Pro Gly Lys
 500

<210> 30

<211> 1503

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Protein dung hợp IL-2R-gamma-(phần phình)Fc ở chuột

<400> 30

atggacatga ggggtccccgc tcagctcctg ggcctcctgc tgctctgggt cccctcctg	60
ctgctctgggt tcccaggtgc caggtgttgg agttccaagg tcctcatgtc cagtgcgaat	120
gaagacatca aagctgattt gatcctgact tctacagccc ctgaacacct cagtgtcct	180
actctgcccc ttccagaggt tcagtgtttt gtgttcaaca tagagtacat gaattgcact	240
tggaatagca gttctgagcc tcaggcaacc aacctcacgc tgcactatag gtacaaggta	300
tctgataata atacattcca ggagtgcagt cactatttgt tctccaaaga gattacttct	360
ggctgtcaga tacaaaaaga agatatccag ctctaccaga catttggtgt ccagctccag	420
gacccccaga aaccccagag gcgagctgta cagaagctaa acctacagaa tcttgtgatc	480
ccacgggctc cagaaaaatct aacactcagc aatctgagtg aatcccagct agagctgaga	540
tggaagca gacatattaa agaacgctgt ttacaatact tgggtgcagta ccggagcaac	600
agagatcgaa gctggacgga actaatagtg aatcatgaac ctagattctc cctgcctagt	660
gtggatgagc tgaaacggta cacatttcgg gttcggagcc gctataaccc aatctgtgga	720
agttctcaac agtggagtaa atggagccag cctgtccact gggggagtca tactgtagag	780
gagaatcctt ccttgtttgc actggaagct ggagctcagg aaaaaactca cacatgcccc	840
ccgtgcccag cacctgaact cctgggggga ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc	900

aaggacaccc tcatgatctc ccggacccct gaggtcacat gcgtgggtggt ggacgtgagc 960
cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc 1020
aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac agcacgtacc gtgtgggtcag cgtcctcacc 1080
gtcctgcacc aggactgggt gaatggcaag gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc 1140
ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag 1200
gtgtacaccc tgcccccatg ccgggatgag ctgaccaaga accaggtcag cctgtggtgc 1260
ctgggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg 1320
gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg ctggactccg acggctcctt ctctctctac 1380
agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg 1440
atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa 1500
tga 1503

<210> 31

<211> 213

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc siêu phân tử IL-2R alpha ở chuột + đuôi Avi + đuôi His

<400> 31

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser Glu Leu Cys Leu Tyr Asp Pro Pro Glu Val Pro Asn Ala
20 25 30

Thr Phe Lys Ala Leu Ser Tyr Lys Asn Gly Thr Ile Leu Asn Cys Glu
35 40 45

Cys Lys Arg Gly Phe Arg Arg Leu Lys Glu Leu Val Tyr Met Arg Cys
50 55 60

Leu Gly Asn Ser Trp Ser Ser Asn Cys Gln Cys Thr Ser Asn Ser His
65 70 75 80

Asp Lys Ser Arg Lys Gln Val Thr Ala Gln Leu Glu His Gln Lys Glu
85 90 95

Gln Gln Thr Thr Thr Asp Met Gln Lys Pro Thr Gln Ser Met His Gln
100 105 110

Glu Asn Leu Thr Gly His Cys Arg Glu Pro Pro Pro Trp Lys His Glu
115 120 125

Asp Ser Lys Arg Ile Tyr His Phe Val Glu Gly Gln Ser Val His Tyr
130 135 140

Glu Cys Ile Pro Gly Tyr Lys Ala Leu Gln Arg Gly Pro Ala Ile Ser
145 150 155 160

Ile Cys Lys Met Lys Cys Gly Lys Thr Gly Trp Thr Gln Pro Gln Leu
165 170 175

Thr Cys Val Asp Glu Gln Leu Tyr Phe Gln Gly Gly Ser Gly Leu Asn
180 185 190

Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Glu Ala Arg Ala His
195 200 205

His His His His His
210

<210> 32
<211> 642
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc siêu phân tử IL-2R alpha ở chuột + đuôi Avi + đuôi His

<400> 32
atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctaccggtgt gcattccgaa 60
ctgtgtctgt atgaccacc cgagggtccc aatgccacat tcaaagccct ctctacaag 120
aacggcacca tcctaaactg tgaatgcaag agagggttcc gaagactaaa ggaattggtc 180
tatatgcgtt gcttaggaaa ctcttgagc agcaactgcc agtgcaccag caactcccat 240
gacaaatcga gaaagcaagt tacagctcaa cttgaacacc agaaagagca acaaaccaca 300
acagacatgc agaagccaac acagtctatg caccaagaga accttacagg tcaactgcagg 360
gagccacctc cttggaacaa tgaagattcc aagagaatct atcatttcgt ggaaggacag 420
agtgttcact acgagtgtat tccgggatac aaggctctac agagaggtcc tgctattagc 480

atctgcaaga tgaagtgtgg gaaaacgggg tggactcagc cccagctcac atgtgtcgac 540
 gaacagttat attttcaggg cggctcaggc ctgaacgaca tcttcgaggc ccagaagatc 600
 gagtggcacg aggctcgagc tcaccaccat caccatcact ga 642

<210> 33
 <211> 480
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Protein dung hợp IL-2R-beta-(phần phình)Fc ở khi đầu chó + đuôi Avi
 <400> 33

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15

Val His Ser Ala Val Asn Gly Thr Ser Arg Phe Thr Cys Phe Tyr Asn
 20 25 30

Ser Arg Ala Asn Ile Ser Cys Val Trp Ser Gln Asp Gly Ala Leu Gln
 35 40 45

Asp Thr Ser Cys Gln Val His Ala Trp Pro Asp Arg Arg Arg Trp Asn
 50 55 60

Gln Thr Cys Glu Leu Leu Pro Val Ser Gln Ala Ser Trp Ala Cys Asn
 65 70 75 80

Leu Ile Leu Gly Thr Pro Asp Ser Gln Lys Leu Thr Ala Val Asp Ile
 85 90 95

Val Thr Leu Arg Val Met Cys Arg Glu Gly Val Arg Trp Arg Met Met
 100 105 110

Ala Ile Gln Asp Phe Lys Pro Phe Glu Asn Leu Arg Leu Met Ala Pro
 115 120 125

Ile Ser Leu Gln Val Val His Val Glu Thr His Arg Cys Asn Ile Ser
 130 135 140

Trp Lys Ile Ser Gln Ala Ser His Tyr Phe Glu Arg His Leu Glu Phe
 145 150 155 160

Glu Ala Arg Thr Leu Ser Pro Gly His Thr Trp Glu Glu Ala Pro Leu
 165 170 175

Met Thr Leu Lys Gln Lys Gln Glu Trp Ile Cys Leu Glu Thr Leu Thr
 180 185 190

Pro Asp Thr Gln Tyr Glu Phe Gln Val Arg Val Lys Pro Leu Gln Gly
 195 200 205

Glu Phe Thr Thr Trp Ser Pro Trp Ser Gln Pro Leu Ala Phe Arg Thr
 210 215 220

Lys Pro Ala Ala Leu Gly Lys Asp Thr Gly Ala Gln Asp Lys Thr His
 225 230 235 240

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
 245 250 255

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 260 265 270

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 275 280 285

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 290 295 300

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 305 310 315 320

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 325 330 335

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 340 345 350

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 355 360 365

Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu
 370 375 380

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
385 390 395 400

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
405 410 415

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
420 425 430

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
435 440 445

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Ser
450 455 460

Gly Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Glu
465 470 475 480

<210> 34

<211> 1443

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Protein dung hợp IL-2R-beta-(phần phình)Fc Ở khí đầu chó + đuôi Avi

<400> 34

atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctaccggtgt gcattccgcg	60
gtcaacggca cttcccggtt cacatgcttc tacaactcga gagccaacat ctctgtgtgc	120
tggagccaag atggggctct gcaggacact tcctgccaag tccacgcctg gccggacaga	180
cggcgggtgga accaaacctg tgagctgctc cctgtgagtc aagcatcctg ggcctgcaac	240
ctgatcctcg gaaccccaga ttctcagaaa ctgaccgcag tggatatcgt caccctgagg	300
gtgatgtgcc gtgaaggggt gcgatggagg atgatggcca tccaggactt caaaccttt	360
gagaaccttc gcctgatggc ccccatctcc ctccaagtcg tccacgtgga gaccacaga	420
tgcaacataa gctggaaaat ctcccaagcc tcccactact ttgaaagaca cctggagttt	480
gaggcccgga cgctgtcccc aggccacacc tgggaggagg cccccctgat gaccctcaag	540
cagaagcagg aatggatctg cctggagacg ctaccccag acaccagta tgagtttcag	600
gtgcgggtca agcctctgca aggcgagttc acgacctgga gccctggag ccagcccctg	660
gccttcagga caaagcctgc agcccttggg aaggacaccg gagctcagga caaaactcac	720

```

acatgcccac cgtgcccagc acctgaactc ctggggggac cgtcagtctt cctcttcccc      780
ccaaaaccca aggacaccct catgatctcc cggacccttg aggtcacatg cgtggtggtg      840
gacgtgagcc acgaagaccc tgagggtcaag ttcaactggt acgtggacgg cgtggagggtg      900
cataatgccà agacaaagcc gcgggaggag cagtacaaca gcacgtaccg tgtgggtcagc      960
gtcctcaccg tcctgcacca ggactggctg aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc      1020
aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa accatctcca aagccaaagg gcagccccga      1080
gaaccacagg tgtacaccct gcccccatgc cgggatgagc tgaccaagaa ccagggtcagc      1140
ctgtggtgcc tgggtcaaagg cttctatccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat      1200
gggcagccgg agaacaacta caagaccacg cctcccgctg tggactccga cggctccttc      1260
ttcctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca      1320
tgctccgtga tgcatgaggg tctgcacaac cactacacgc agaagagcct ctccctgtct      1380
ccgggtaaat ccggaggcct gaacgacatc ttcgaggccc agaagattga atggcacgag      1440
tga                                                                           1443

```

<210> 35

<211> 489

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Protein dung hợp IL-2R-gamma-(lỗ)Fc Ở khi đầu chó

<400> 35

```

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1           5           10           15

```

```

Val His Ser Leu Asn Thr Thr Ile Leu Thr Pro Asn Gly Asn Glu Asp
          20           25           30

```

```

Ala Thr Thr Asp Phe Phe Leu Thr Ser Met Pro Thr Asp Ser Leu Ser
          35           40           45

```

```

Val Ser Thr Leu Pro Leu Pro Glu Val Gln Cys Phe Val Phe Asn Val
          50           55           60

```

```

Glu Tyr Met Asn Cys Thr Trp Asn Ser Ser Ser Glu Pro Gln Pro Thr
65           70           75           80

```

Asn Leu Thr Leu His Tyr Trp Tyr Lys Asn Ser Asp Asn Asp Lys Val
85 90 95

Gln Lys Cys Ser His Tyr Leu Phe Ser Glu Glu Ile Thr Ser Gly Cys
100 105 110

Gln Leu Gln Lys Lys Glu Ile His Leu Tyr Gln Thr Phe Val Val Gln
115 120 125

Leu Gln Asp Pro Arg Glu Pro Arg Arg Gln Ala Thr Gln Met Leu Lys
130 135 140

Leu Gln Asn Leu Val Ile Pro Trp Ala Pro Glu Asn Leu Thr Leu Arg
145 150 155 160

Lys Leu Ser Glu Ser Gln Leu Glu Leu Asn Trp Asn Asn Arg Phe Leu
165 170 175

Asn His Cys Leu Glu His Leu Val Gln Tyr Arg Thr Asp Trp Asp His
180 185 190

Ser Trp Thr Glu Gln Ser Val Asp Tyr Arg His Lys Phe Ser Leu Pro
195 200 205

Ser Val Asp Gly Gln Lys Arg Tyr Thr Phe Arg Val Arg Ser Arg Phe
210 215 220

Asn Pro Leu Cys Gly Ser Ala Gln His Trp Ser Glu Trp Ser His Pro
225 230 235 240

Ile His Trp Gly Ser Asn Ser Ser Lys Glu Asn Pro Phe Leu Phe Ala
245 250 255

Leu Glu Ala Gly Ala Gln Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
260 265 270

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
275 280 285

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
290 295 300

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr

305

310

315

320

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 325 330 335

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 340 345 350

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 355 360 365

Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 370 375 380

Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
 385 390 395 400

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 405 410 415

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 420 425 430

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 435 440 445

Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 450 455 460

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 465 470 475 480

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 485

<210> 36

<211> 1470

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Protein dung hợp IL-2R-gamma-(lỗ)Fc Ở khí đầu chó

<400> 36

atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctaccggtgt gcattccctg

60

```

aacacgacaa ttctgacgcc caatgggaat gaagacgcc caactgattt cttcctgacc 120
tctatgcccc ctgactccct cagtgtttcc actctgcccc tcccagaggt tcagtgtttt 180
gtgttcaatg tcgagtacat gaattgcact tggaacagca gctctgagcc ccagcctacc 240
aacctcactc tgcattattg gtacaagaat tcggataatg ataaagtcca gaagtgcagc 300
cactatctat tctctgaaga aatcacttct ggctgtcagt tgcaaaaaaa ggagatccac 360
ctctacaaaa cgtttgttgt tcagctccag gaccacggg aaccaggag acaggccaca 420
cagatgctaa aactgcagaa tctggtgatc ccctgggctc cggagaacct aacacttcgc 480
aaactgagtg aatcccagct agaactgaac tggaacaaca gattcttgaa ccaactgttg 540
gagcacttgg tgcagtaccg gactgactgg gaccacagct ggactgaaca atcagtggat 600
tatagacata agttctcctt gcctagtgtg gatgggcaga aacgctacac gtttcgtgtc 660
cggagccgct ttaaccact ctgtggaagt gctcagcatt ggagtgaatg gagccacca 720
atccactggg ggagcaatag ttcaaaagag aatcctttcc tgtttgcatt ggaagccgga 780
gctcaggaca aaactcacac atgcccaccg tgcccagcac ctgaactcct ggggggaccg 840
tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gaccctgag 900
gtcacatgcg tgggtggtgga cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac 960
gtggacggcg tggaggtgca taatgccaa acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc 1020
acgtaccgtg tggtcagcgt cctcacgctc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag 1080
tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc ggcgccccca tcgagaaaac catctccaaa 1140
gccaaagggc agccccgaga accacaggtg tgcaccctgc cccatcccg ggatgagctg 1200
accaagaacc aggtcagcct ctctgtgcga gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc 1260
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg 1320
gactccgacg gctccttctt cctcgtgagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1380
caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 1440
aagagcctct ccctgtctcc gggtaaatga 1470

```

<210> 37
 <211> 217
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc siêu phân tử IL-2R alpha Ở khi đầu chó + đuôi Avi + đuôi His

<400> 37

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Glu Leu Cys Asp Asp Asp Pro Pro Lys Ile Thr His Ala Thr Phe Lys
20 25 30

Ala Met Ala Tyr Lys Glu Gly Thr Met Leu Asn Cys Glu Cys Lys Arg
35 40 45

Gly Phe Arg Arg Ile Lys Ser Gly Ser Pro Tyr Met Leu Cys Thr Gly
50 55 60

Asn Ser Ser His Ser Ser Trp Asp Asn Gln Cys Gln Cys Thr Ser Ser
65 70 75 80

Ala Ala Arg Asn Thr Thr Lys Gln Val Thr Pro Gln Pro Glu Glu Gln
85 90 95

Lys Glu Arg Lys Thr Thr Glu Met Gln Ser Gln Met Gln Leu Ala Asp
100 105 110

Gln Val Ser Leu Pro Gly His Cys Arg Glu Pro Pro Pro Trp Glu Asn
115 120 125

Glu Ala Thr Glu Arg Ile Tyr His Phe Val Val Gly Gln Thr Val Tyr
130 135 140

Tyr Gln Cys Val Gln Gly Tyr Arg Ala Leu His Arg Gly Pro Ala Glu
145 150 155 160

Ser Val Cys Lys Met Thr His Gly Lys Thr Arg Trp Thr Gln Pro Gln
165 170 175

Leu Ile Cys Thr Gly Glu Val Asp Glu Gln Leu Tyr Phe Gln Gly Gly
180 185 190

Ser Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Glu
195 200 205

Ala Arg Ala His His His His His His
210 215

<210> 38
<211> 654
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc siêu phân tử IL-2R alpha Ở khi đầu chó + đuôi Avi + đuôi His

<400> 38
atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctaccggtga gctctgtgac 60
gatgaccgcg caaaaatcac acatgccaca ttcaaagcca tggcctacaa ggaaggaacc 120
atgttgaact gtgaatgcaa gagaggtttc cgcagaataa aaagcgggtc accctatatg 180
ctctgtacag gaaactctag ccactcgtcc tgggacaacc aatgtcaatg cacaagctct 240
gctgctcgga acacaacaaa acaagtgaca cctcaacctg aagaacagaa agaaagaaaa 300
accacagaaa tgcaaagtca aatgcagctg gcggaccaag tgagccttcc aggtcactgc 360
agggaacctc caccgtggga aaatgaagcc acagaaagaa tttatcattt cgtggtgggg 420
cagacggttt actaccagtg cgtccaggga tacagggtc tacacagagg tcctgctgag 480
agcgtctgca aaatgaccca cggaagaca agatggaccc agccccagct catatgcaca 540
ggtgaagtcg acgaacagtt atattttcag ggcgggtcag gcctgaacga catcttcgag 600
gccagaaga tcgagtggca cgaggctcga gctcaccacc atcaccatca ctga 654

<210> 39
<211> 19
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự dẫn

<400> 39

Met Asp Trp Thr Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly
1 5 10 15

Ala His Ser

<210> 40
<211> 57

<212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự dẫn

<400> 40
 atggactgga cctggagaat cctcttcttg gtggcagcag ccacaggagc ccactcc 57

<210> 41
 <211> 57
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự dẫn

<400> 41
 atggactgga cctggaggat cctcttcttg gtggcagcag ccacaggagc ccactcc 57

<210> 42
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự dẫn

<400> 42

Met	Asp	Met	Arg	Val	Pro	Ala	Gln	Leu	Leu	Gly	Leu	Leu	Leu	Leu	Trp
1				5				10					15		

Phe	Pro	Gly	Ala	Arg	Cys
			20		

<210> 43
 <211> 66
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự dẫn

<400> 43
 atggacatga gggccccgc tcagctcctg ggcctcctgc tgctctgggt cccaggtgcc 60

aggtgt 66

<210> 44
 <211> 19
 <212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự dẫn

<400> 44

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser

<210> 45

<211> 57

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự dẫn

<400> 45

atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctaccggtgt gcattcc

57

<210> 46

<211> 57

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự dẫn

<400> 46

atgggctggg cctgcatcat cctgtttctg gtggctaccg ccactggagt gcattcc

57

<210> 47

<211> 57

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự dẫn

<400> 47

atgggctggg cctgcatcat cctgtttctg gtcgccacag ccaccggcgt gcactct

57

<210> 48

<211> 592

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> DP47GS HC(18 Fc, P329G LALA)-IL2 N88D

<400> 48

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Gly Ser Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
115 120 125

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
130 135 140

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
145 150 155 160

Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
165 170 175

Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
180 185 190

Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
195 200 205

Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys

210	215	220
Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu 225 230 235 240		
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu 245 250 255		
Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys 260 265 270		
Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys 275 280 285		
Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu 290 295 300		
Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys 305 310 315 320		
Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys 325 330 335		
Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys 340 345 350		
Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys 355 360 365		
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln 370 375 380		
Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly 385 390 395 400		
Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln 405 410 415		
Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn 420 425 430		
His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Gly Gly 435 440 445		

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Pro Ala Ser Ser
450 455 460

Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu
465 470 475 480

Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr
485 490 495

Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu
500 505 510

Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val
515 520 525

Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu
530 535 540

Ile Ser Asp Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr
545 550 555 560

Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe
565 570 575

Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ala Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr
580 585 590

<210> 49

<211> 1776

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> DP47GS HC(1ỗ Fc, P329G LALA)-IL2 N88D

<400> 49

gagggtgcaat tggttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctccggatt caccttttagc agttatgcc a tgagctgggt cgcagggt 120
ccaggaagg ggctggagt ggtctcagct attagtggta gtgggtggtag cacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaggcagc 300

ggatttgact actggggcca aggaaccctg gtcaccgtct cgagtgctag caccaagggc 360
 ccatcgggtct tccccctggc accctcctcc aagagcacct ctggggggcac agcggccctg 420
 ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa ccggtgacgg tgtcgtggaa ctcaggcgcc 480
 ctgaccagcg gcgtgcacac cttccccggt gtcctacagt cctcaggact ctactccctc 540
 agcagcgtgg tgaccgtgcc ctccagcagc ttgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg 600
 aatcacaagc ccagcaacac caaggtggac aagaaagttg agcccaaadc ttgtgacaaa 660
 actcacacat gccaccgtg cccagcacct gaagctgcag ggggaccgtc agtcttcctc 720
 ttccccccaa aaccaagga caccctcatg atctcccgga cccctgaggt cacatgcgtg 780
 gtggtggacg tgagccacga agaccctgag gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg 840
 gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg 900
 gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta caagtgcaag 960
 gtctccaaca aagccctcgg cgccccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag 1020
 ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc ccatgccggg atgagctgac caagaaccag 1080
 gtcagcctgt ggtgcctggt caaaggcttc tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag 1140
 agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc 1200
 tccttcttcc tctacagcaa gtcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc 1260
 ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc 1320
 ctgtctccgg gtggcgggcg aggtccgga ggcggaggtt ctggaggcgg aggtccgca 1380
 cctgcctcaa gttctacaaa gaaaacacag ctacaactgg agcatttact gctggattta 1440
 cagatgattt tgaatggaat taataattac aagaatccca aactcaccag gatgctcaca 1500
 tttaagtttt acatgcccaa gaaggccaca gaactgaaac atcttcagtg tctagaagaa 1560
 gaactcaaac ctctggagga agtgctaaat ttagctcaaa gcaaaaactt tacttaaga 1620
 cccagggact taatcagcga tatcaacgta atagttctgg aactaaaggg atctgaaaca 1680
 acattcatgt gtgaatatgc tgatgagaca gcaaccattg tagaatttct gaacagatgg 1740
 attacctttg cccaaagcat catctcaaca ctgact 1776

<210> 50
 <211> 592
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> DP47GS HC(Fc wt, P329G LALA)-IL2 N88D

<400> 50

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Gly Ser Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
115 120 125

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
130 135 140

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
145 150 155 160

Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
165 170 175

Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
180 185 190

Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
195 200 205

Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys

210	215	220
Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu 225 230 235 240		
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu 245 250 255		
Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys 260 265 270		
Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys 275 280 285		
Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu 290 295 300		
Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys 305 310 315 320		
Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys 325 330 335		
Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser 340 345 350		
Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys 355 360 365		
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln 370 375 380		
Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly 385 390 395 400		
Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln 405 410 415		
Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn 420 425 430		
His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Gly Gly 435 440 445		

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Pro Ala Ser Ser
450 455 460

Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu
465 470 475 480

Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr
485 490 495

Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu
500 505 510

Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val
515 520 525

Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu
530 535 540

Ile Ser Asp Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr
545 550 555 560

Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe
565 570 575

Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ala Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr
580 585 590

<210> 51

<211> 1776

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> DP47GS HC(Fc wt, P329G LALA)-IL2 N88D

<400> 51

gagggtgcaat tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc	60
tcctgtgcag cctccggatt caccttttagc agttatgcc a tgagctgggt cgcagggt	120
ccaggaagg ggctggagt ggtctcagct attagtggta gtgggtggtag cacatactac	180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat	240
ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaggcagc	300

ggatttgact actggggcca aggaaccctg gtcaccgtct cgagtgctag caccaagggc 360
 ccatcggtct tccccctggc accctcctcc aagagcacct ctggggggcac agcgggccctg 420
 ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa ccggtgacgg tgctcgtggaa ctcaggcgcc 480
 ctgaccagcg gcgtgcacac cttccccggt gtcctacagt cctcaggact ctactccctc 540
 agcagcggtg tgaccgtgcc ctccagcagc ttgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg 600
 aatcacaagc ccagcaacac caaggtggac aagaaagttg agcccaaadc ttgtgacaaa 660
 actcacacat gccaccgtg cccagcacct gaagctgcag ggggaccgtc agtcttcctc 720
 tttcccccaa aaccaagga caccctcatg atctcccgga cccctgaggt cacatgcgtg 780
 gtgggtggacg tgagccacga agaccctgag gtcaagttca actggtacgt ggacggcggtg 840
 gaggtgcata atgccaagac aaagccgagg gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg 900
 gtcagcgctc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta caagtgcaag 960
 gtctccaaca aagccctcgg cgccccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag 1020
 ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc ccatcccgga atgagctgac caagaaccag 1080
 gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc tatccagcg acatcgccgt ggagtgggag 1140
 agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc 1200
 tcctttcttc tctacagcaa gtcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc 1260
 ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc 1320
 ctgtctccgg gtggcgggcg aggctccgga ggcggagggt ctggaggcg aggctccgca 1380
 cctgcctcaa gttctacaaa gaaaacacag ctacaactgg agcatttact gctggattta 1440
 cagatgattt tgaatggaat taataattac aagaatccca aactcaccag gatgctcaca 1500
 ttttaagttt acatgcccaa gaaggccaca gaactgaaac atcttcagt tctagaagaa 1560
 gaactcaaac ctctggagga agtgctaaat ttagctcaaa gcaaaaactt tcaactaaga 1620
 cccagggact taatcagcga tatcaacgta atagttctgg aactaaagg atctgaaaca 1680
 acattcatgt gtgaatatgc tgatgagaca gcaaccattg tagaatttct gaacagatgg 1740
 attaccttg cccaaagcat catctcaaca ctgact 1776

<210> 52

<211> 592

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> DP47GS HC(Fc wt, P329G LALA)-IL2 E95A

<400> 52

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Gly Ser Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
115 120 125

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
130 135 140

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
145 150 155 160

Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
165 170 175

Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
180 185 190

Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
195 200 205

Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys

210	215	220
Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu 225 230 235 240		
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu 245 250 255		
Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys 260 265 270		
Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys 275 280 285		
Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu 290 295 300		
Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys 305 310 315 320		
Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys 325 330 335		
Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser 340 345 350		
Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys 355 360 365		
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln 370 375 380		
Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly 385 390 395 400		
Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln 405 410 415		
Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn 420 425 430		
His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Gly Gly 435 440 445		

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Pro Ala Ser Ser
450 455 460

Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu
465 470 475 480

Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr
485 490 495

Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu
500 505 510

Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val
515 520 525

Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu
530 535 540

Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Pro Leu Lys Gly Ser Glu Thr
545 550 555 560

Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe
565 570 575

Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ala Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr
580 585 590

<210> 53

<211> 1776

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> DP47GS HC(Fc wt, P329G LALA)-IL2 E95A

<400> 53

gagggtgcaat tggttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc	60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttagc agttatgcca tgagctgggt ccgccaggct	120
ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac	180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat	240
ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaggcagc	300

ggatttgact actggggcca aggaaccctg gtcaccgtct cgagtgctag caccaagggc 360
 ccatcggtct tccccctggc accctcctcc aagagcacct ctgggggcac agcgggccctg 420
 ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa ccggtgacgg tgctgtggaa ctcaggcgcc 480
 ctgaccagcg gcgtgcacac cttccccggt gtcctacagt cctcaggact ctactccctc 540
 agcagcggtg tgaccgtgcc ctccagcagc ttgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg 600
 aatcacaagc ccagcaacac caaggtggac aagaaagttg agcccaaadc ttgtgacaaa 660
 actcacacat gccaccgtg cccagcacct gaagctgcag ggggaccgtc agtcttcctc 720
 ttccccccaa aaccaagga caccctcatg atctcccgga cccctgaggt cacatgcgtg 780
 gtgggtggacg tgagccacga agaccctgag gtcaagttca actggtacgt ggacggcggtg 840
 gaggtgcata atgccaagac aaagccgagg gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg 900
 gtcagcgctc tcaccgtcct gcaccaggac tgggtgaatg gcaaggagta caagtgaag 960
 gtctccaaca aagccctcgg cgccccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag 1020
 ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc ccatcccggt atgagctgac caagaaccag 1080
 gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc tatccagcg acatcgccgt ggagtgggag 1140
 agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc 1200
 tccttcttcc tctacagcaa gtcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc 1260
 ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc 1320
 ctgtctccgg gtggcgggcg aggctccgga ggcggagggt ctggaggcgg aggctccgca 1380
 cctgcctcaa gttctacaaa gaaaacacag ctacaactgg agcatttact gctggattta 1440
 cagatgattt tgaatggaat taataattac aagaatccca aactcaccag gatgctcaca 1500
 tttaagtttt acatgcccaa gaaggccaca gaactgaaac atcttcagtg tctagaagaa 1560
 gaactcaaac ctctggagga agtgctaaat ttagctcaaa gcaaaaactt tacttaaga 1620
 cccagggact taatcagcaa tatcaacgta atagttctgc cactaaaggg atctgaaaca 1680
 acattcatgt gtgaatatgc tgatgagaca gcaaccattg tagaatttct gaacagatgg 1740
 attacctttg cccaaagcat catctcaaca ctgact 1776

<210> 54

<211> 42

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi xuôi FOXP3

<400> 54

tgtaaaacga cggccagttt tagaagttgt atgggggatg tt

42

<210> 55

<211> 44

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi ngược FOXP3

<400> 55

caggaaacag ctatgaccaa aatatctacc ctcttctctt cctc

44

<210> 56

<211> 42

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi xuôi CTLA-4

<400> 56

tgtaaaacga cggccagtgg gtttggttat gaaggagtat ga

42

<210> 57

<211> 45

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi ngược CTLA-4

<400> 57

caggaaacag ctatgacctt cacttaattt ccactaaaaa taccc

45

<210> 58

<211> 133

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> IL-2 N88D T3A C125A

<400> 58

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

Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys

20

25

30

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

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

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

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

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

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

Ile Ser Thr Leu Thr
 130

<210> 59
 <211> 399
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> IL-2 N88D T3A C125A

<400> 59
 gcacctgcct caagttctac aaagaaaaca cagctacaac tggagcattt actgctggat 60
 ttacagatga ttttgaatgg aattaataat tacaagaatc ccaaactcac caggatgctc 120
 acatttaagt tttacatgcc caagaaggcc acagaactga aacatcttca gtgtctagaa 180
 gaagaactca aacctctgga ggaagtgcta aatttagctc aaagcaaaaa ctttcactta 240
 agaccaggagg acttaatcag cgatatcaac gtaatagttc tggaactaaa gggatctgaa 300
 acaacattca tgtgtgaata tgctgatgag acagcaacca ttgtagaatt tctgaacaga 360
 tggattacct ttgccc aaag catcatctca acactgact 399

<210> 60
 <211> 133

<212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> IL-2 N88D

<400> 60

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

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

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

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

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

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

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

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

Ile Ser Thr Leu Thr
 130

<210> 61
 <211> 399
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> IL-2 N88D

<400> 61
 gcacctactt caagttctac aaagaaaaca cagctacaac tggagcattt actgctggat 60
 ttacagatga ttttgaatgg aattaataat tacaagaatc ccaaactcac caggatgctc 120

acattttaagt tttacatgcc caagaaggcc acagaactga aacatcttca gtgtctagaa 180
gaagaactca aacctctgga ggaagtgcta aatttagctc aaagcaaaaa ctttcactta 240
agacccaggg acttaatcag cgatatcaac gtaatagttc tggaactaaa gggatctgaa 300
acaacattca tgtgtgaata tgctgatgag acagcaacca ttgtagaatt tctgaacaga 360
tggtattacct tttgtcaaag catcatctca acactgact 399

<210> 62
<211> 133
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> IL-2 N88D C125A

<400> 62

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

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

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

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

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

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

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

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

Ile Ser Thr Leu Thr
130

<210> 63
 <211> 399
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> IL-2 N88D C125A

<400> 63
 gcacctacttt caagttctac aaagaaaaca cagctacaac tggagcattt actgctggat 60
 ttacagatga ttttgaatgg aattaataat tacaagaatc ccaaactcac caggatgctc 120
 acattttaagt tttacatgcc caagaaggcc acagaactga aacatcttca gtgtctagaa 180
 gaagaactca aacctctgga ggaagtgcta aatttagctc aaagcaaaaa ctttcactta 240
 agaccaggg acttaatcag cgatatcaac gtaatagttc tggaactaaa gggatctgaa 300
 acaacattca tgtgtgaata tgctgatgag acagcaacca ttgtagaatt tctgaacaga 360
 tggattacct ttgcccaaag catcatctca acactgact 399

<210> 64
 <211> 133
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> IL-2 N88D T3A

<400> 64

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

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

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

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

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

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

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

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

Ile Ser Thr Leu Thr
 130

<210> 65
 <211> 399
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> IL-2 N88D T3A

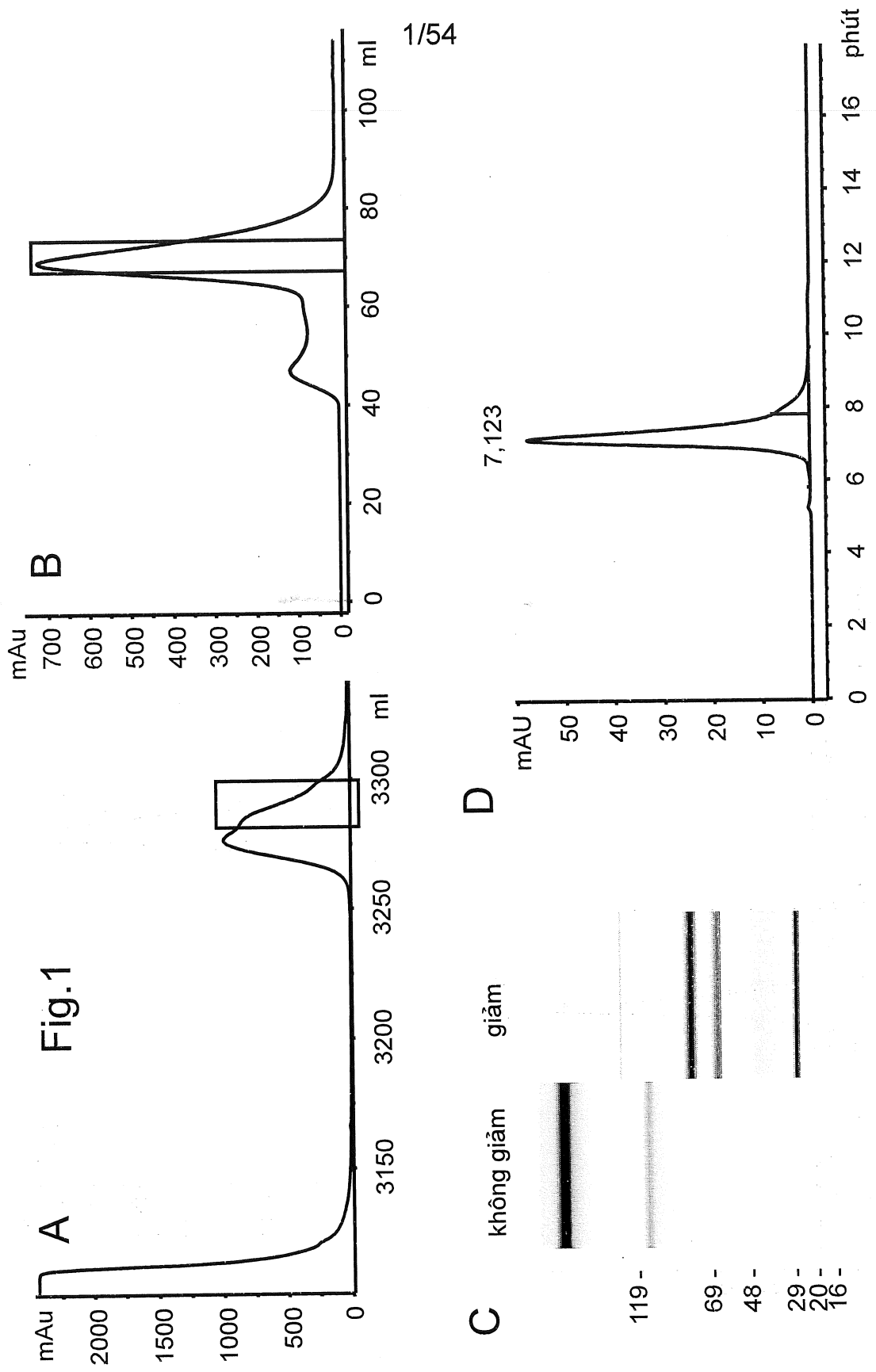
<400> 65
 gcacctgcct caagttctac aaagaaaaca cagctacaac tggagcattt actgctggat 60
 ttacagatga ttttgaatgg aattaataat tacaagaatc ccaaactcac caggatgctc 120
 acattttaagt ttacatgcc caagaaggcc acagaactga aacatcttca gtgtctagaa 180
 gaagaactca aacctctgga ggaagtgcta aatttagctc aaagcaaaaa ctttcactta 240
 agacccaggg acttaatcag cgatatcaac gtaatagttc tggaactaaa gggatctgaa 300
 acaacattca tgtgtgaata tgctgatgag acagcaacca ttgtagaatt tctgaacaga 360
 tggattacct tttgtcaaag catcatctca acactgact 399

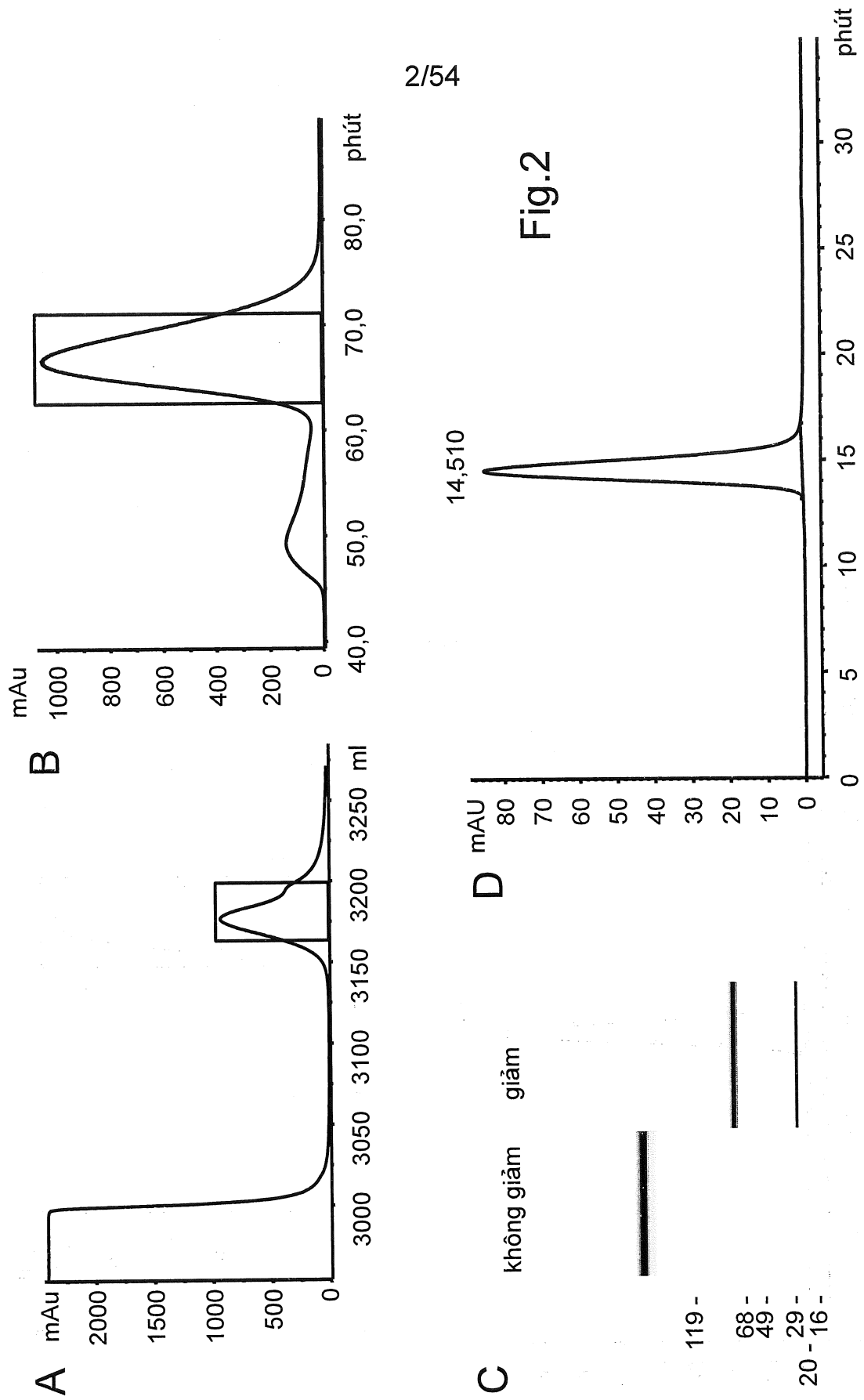
<210> 66
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tác nhân liên kết (G4S)3

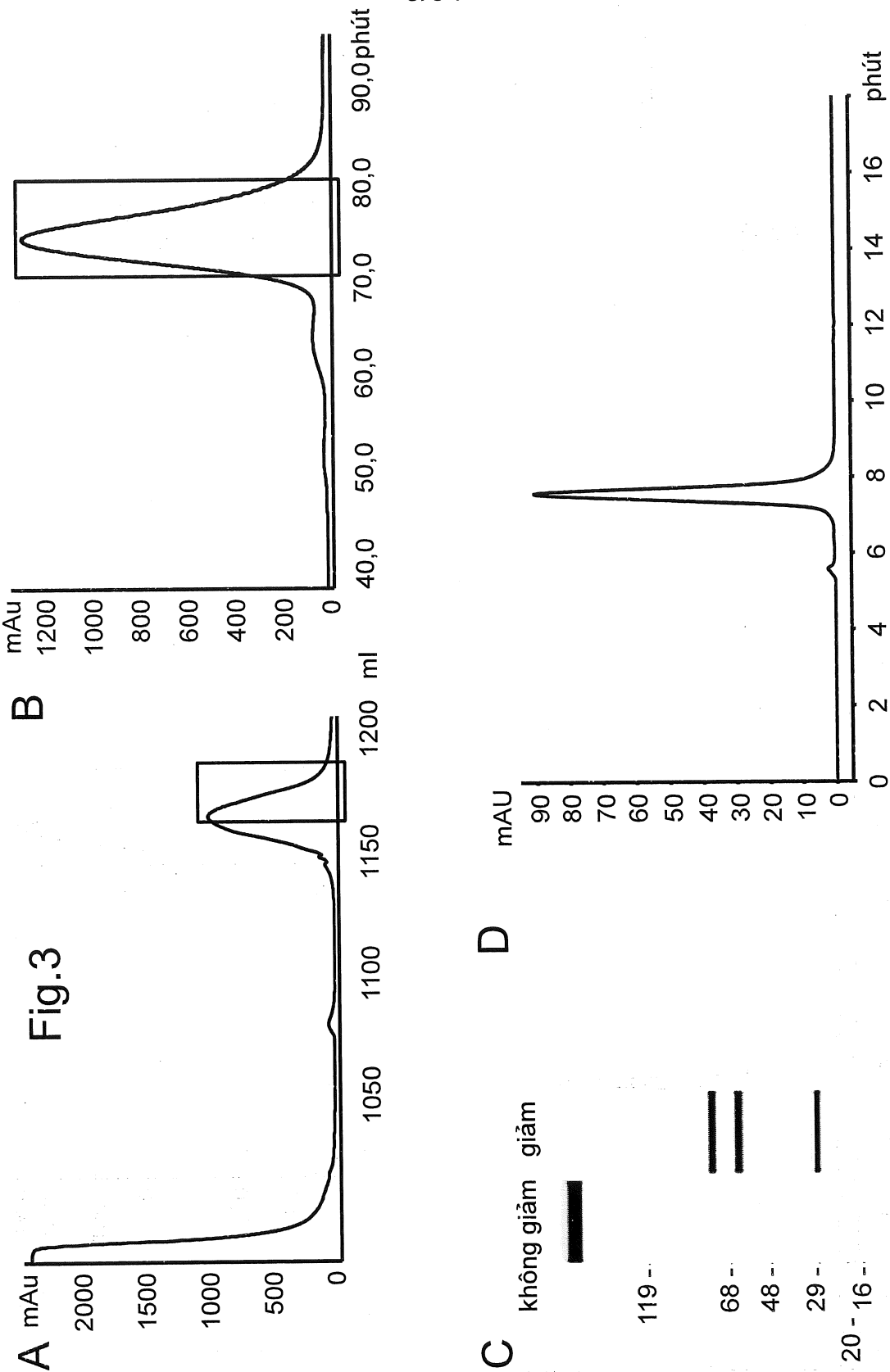
<400> 66

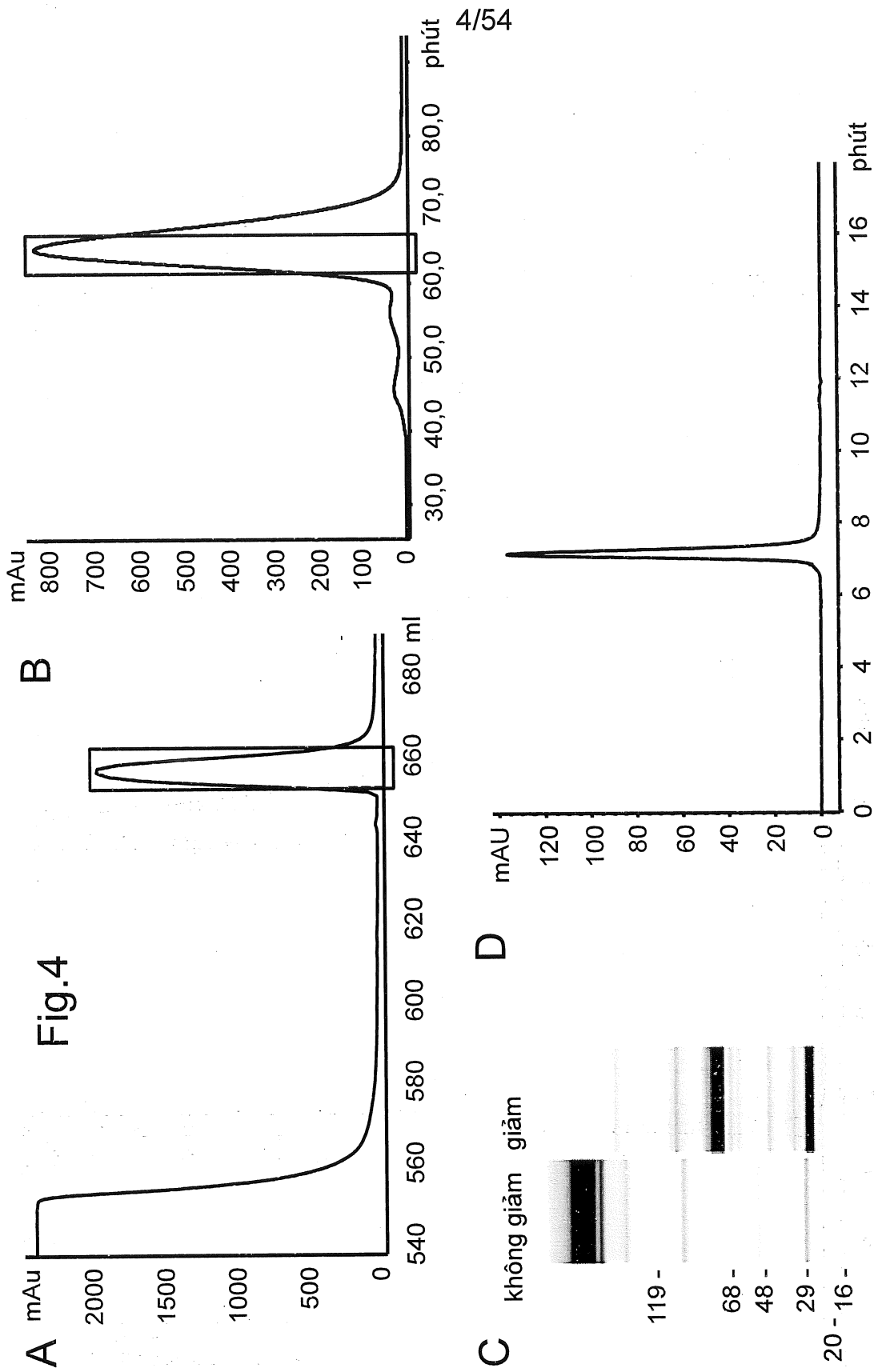
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15

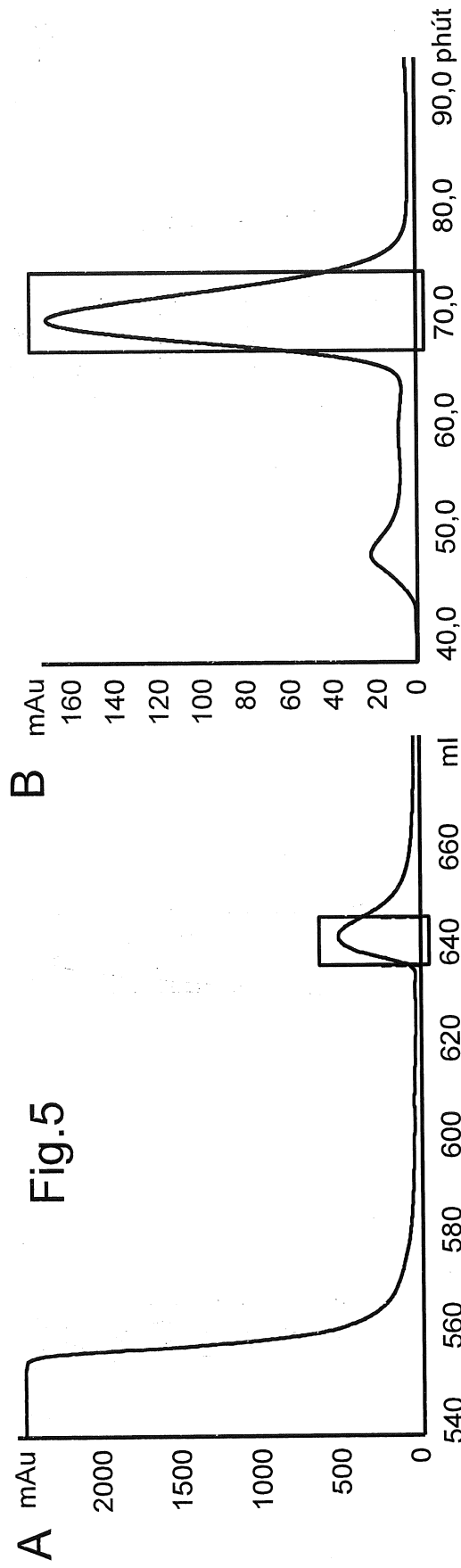




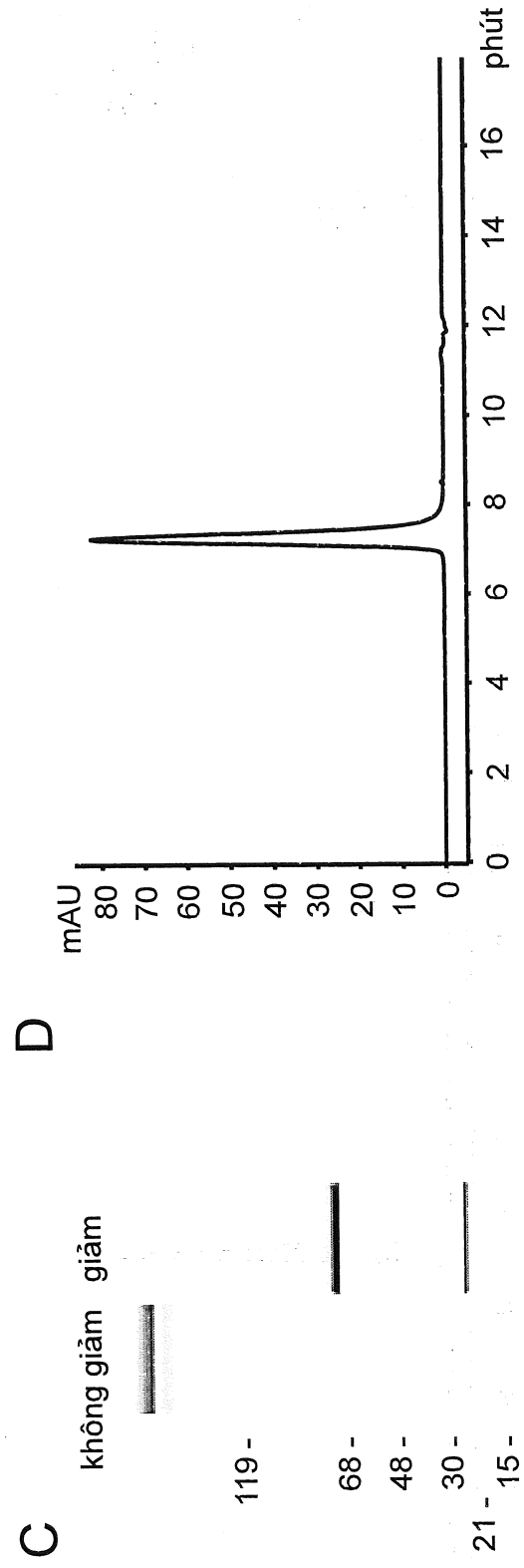
3/54



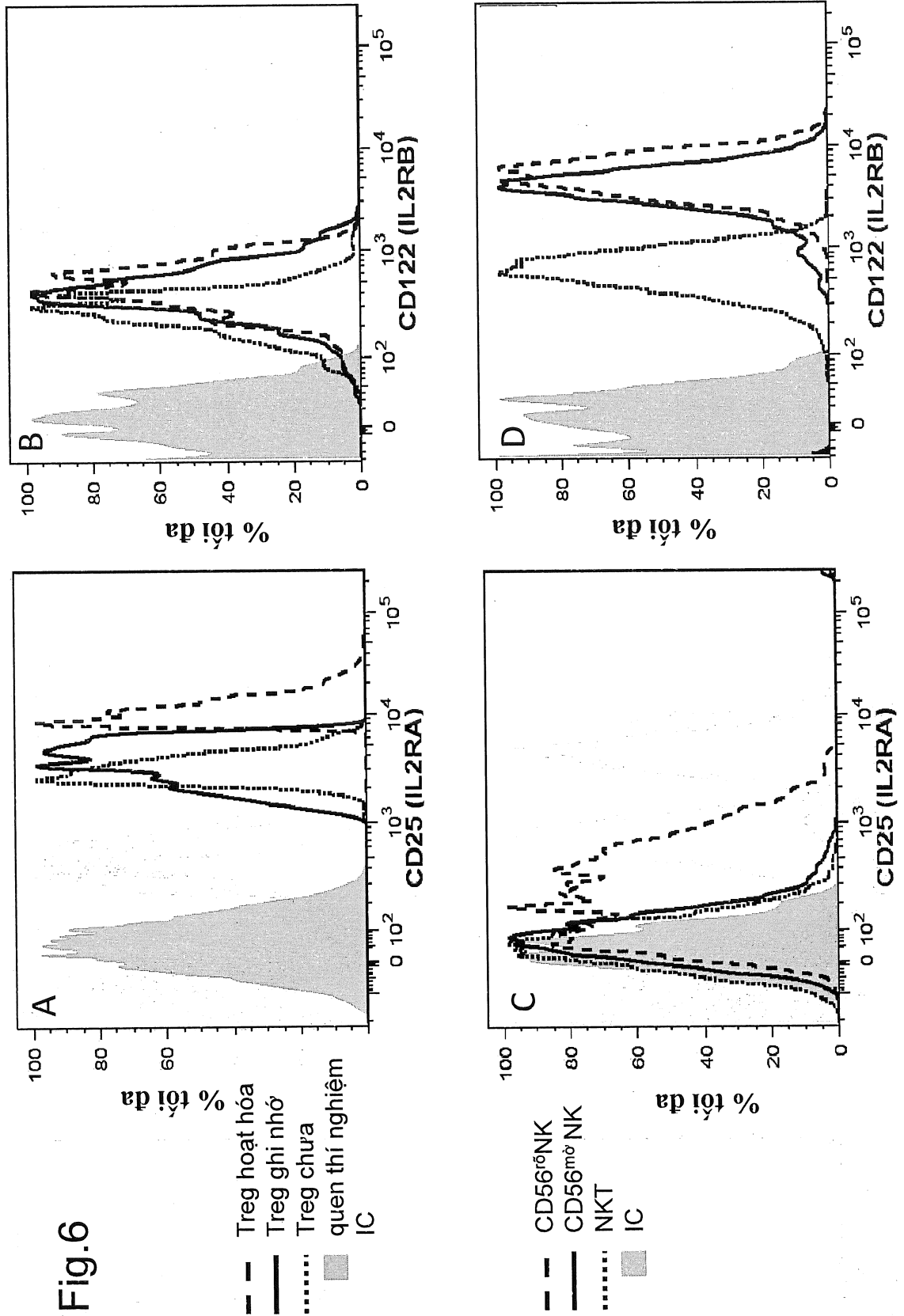




5/54



6/54



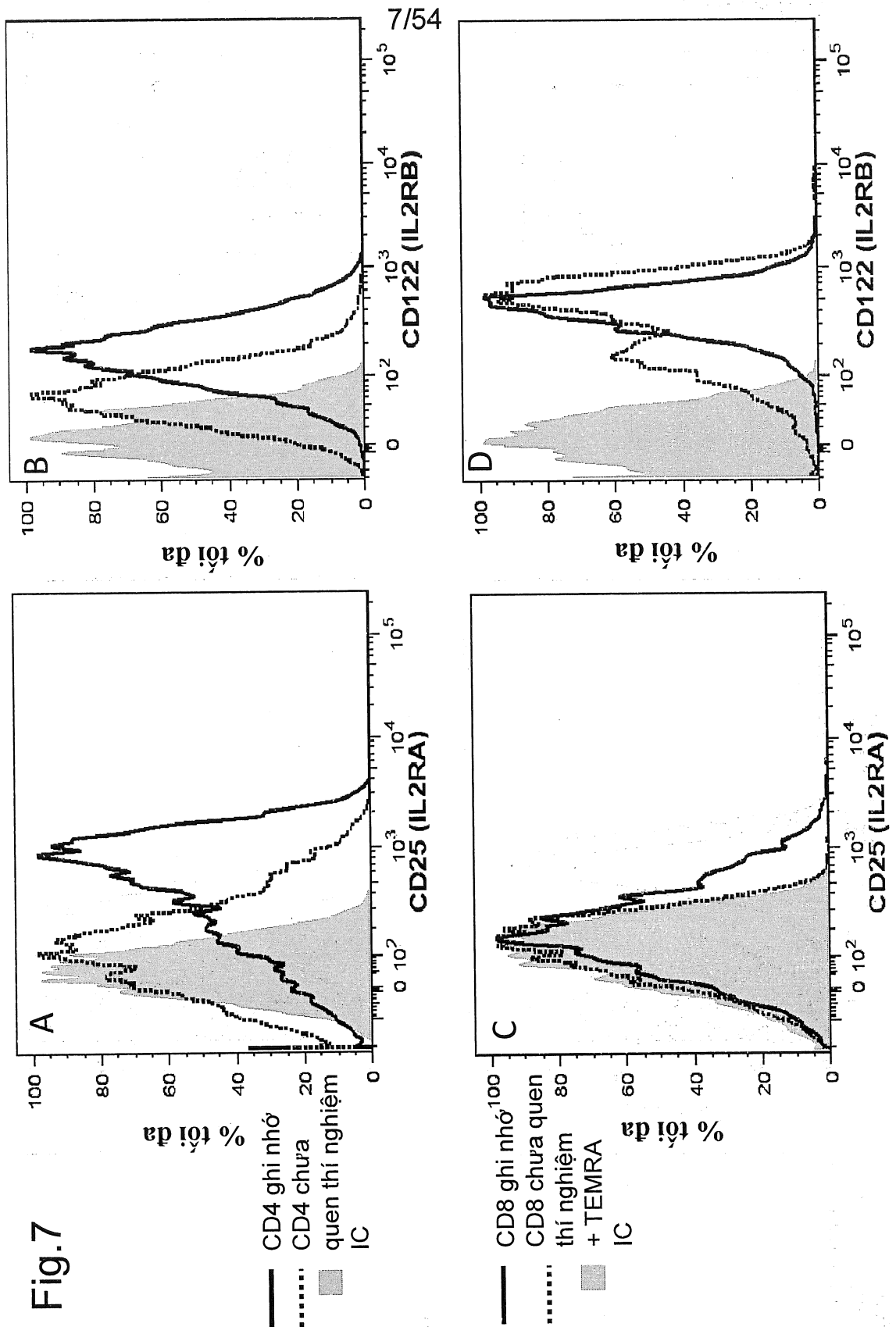
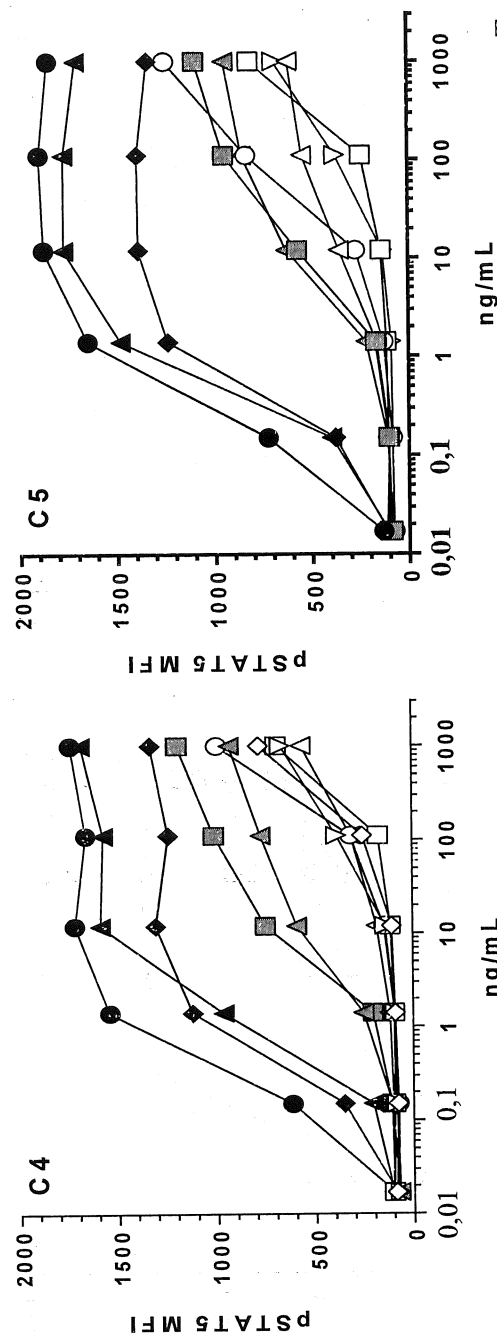
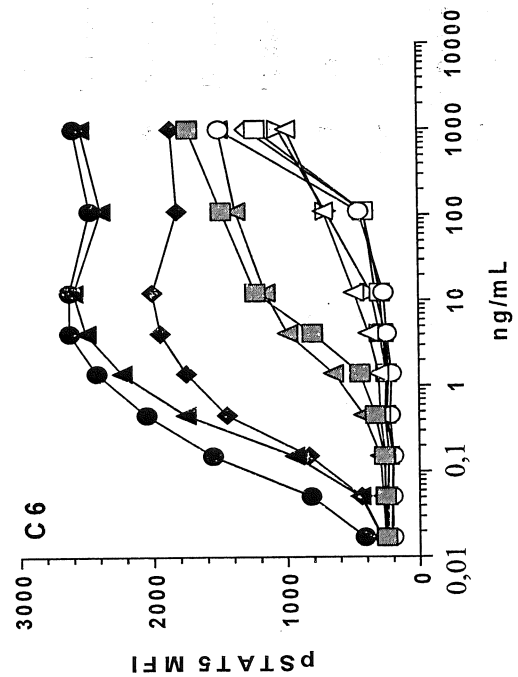


Fig.8



8/54

- Treg hoạt hóa
- ▲ Treg ghi nhớ
- ◆ Treg chưa quen thí nghiệm
- Tế bào tác động T ghi nhớ CD4⁺
- △ NK CD56 rõ
- Tế bào tác động T ghi nhớ của CD8⁺
- ▽ Tế bào tác động T chưa quen thí nghiệm CD4⁺
- ◇ NK
- ◇ NKT
- + CDR5RA⁺ ghi nhớ

Tế bào tác động T chưa quen thí nghiệm của CD8⁺

9/54

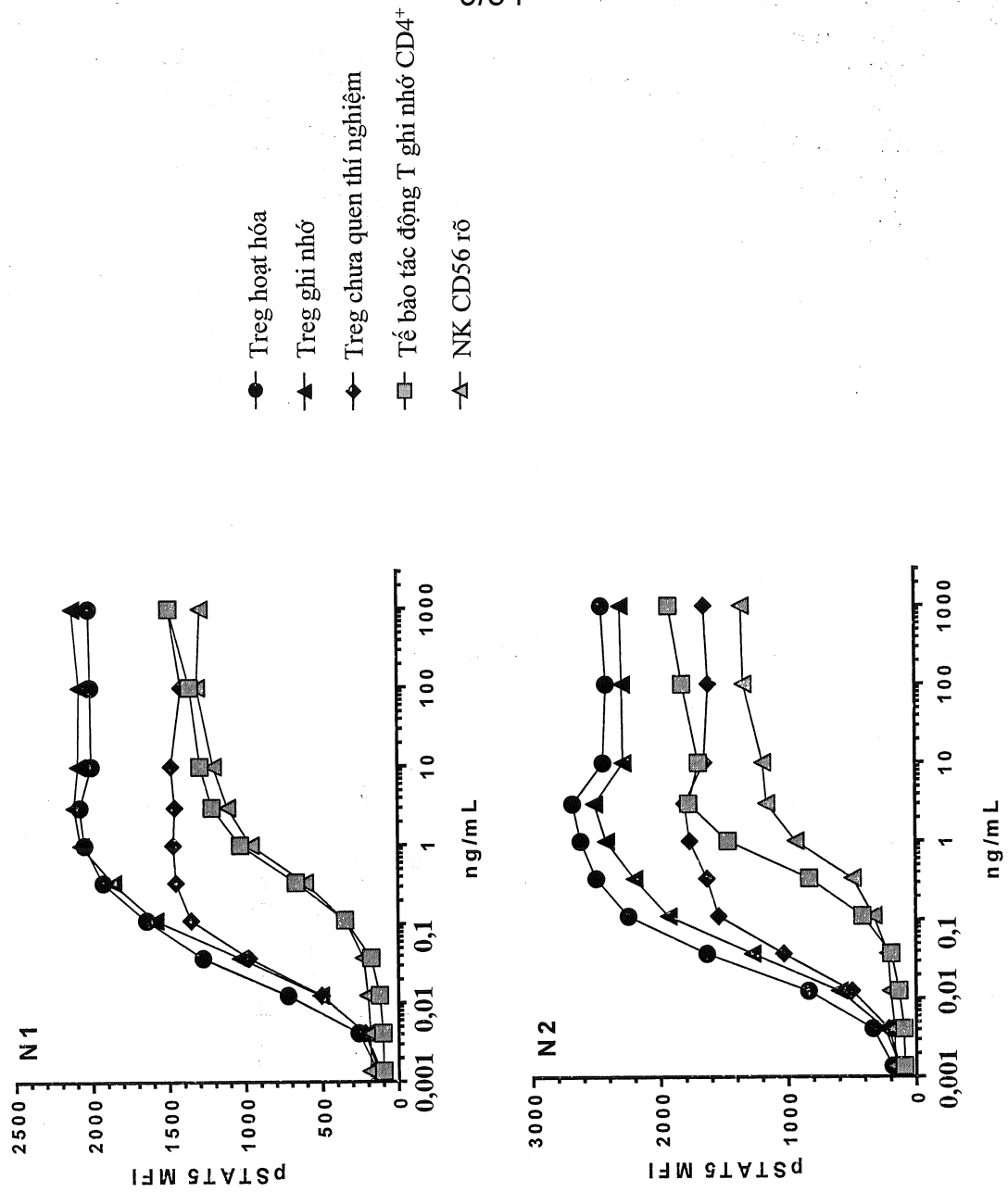
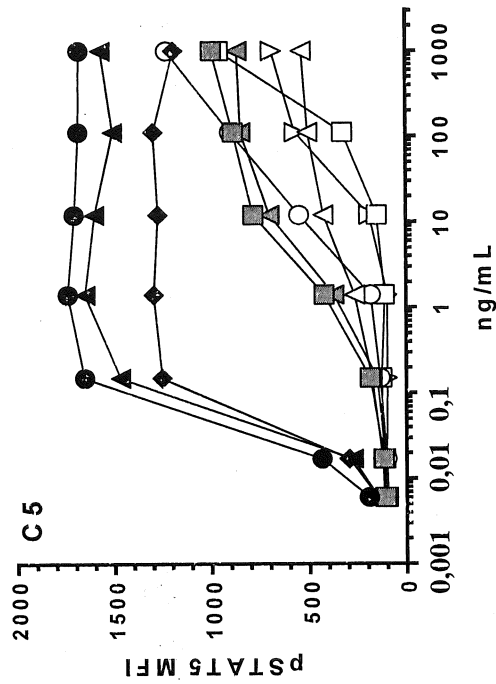


Fig.9

Fig.9



10/54

Treg hoạt hóa

Treg ghi nhớ

Treg chưa quen thí nghiệm

Tế bào tác động T ghi nhớ CD4⁺

NK CD56 rõ

Tế bào tác động T ghi nhớ của CD8⁺Tế bào tác động T chưa quen thí nghiệm CD4⁺

NK

NKT

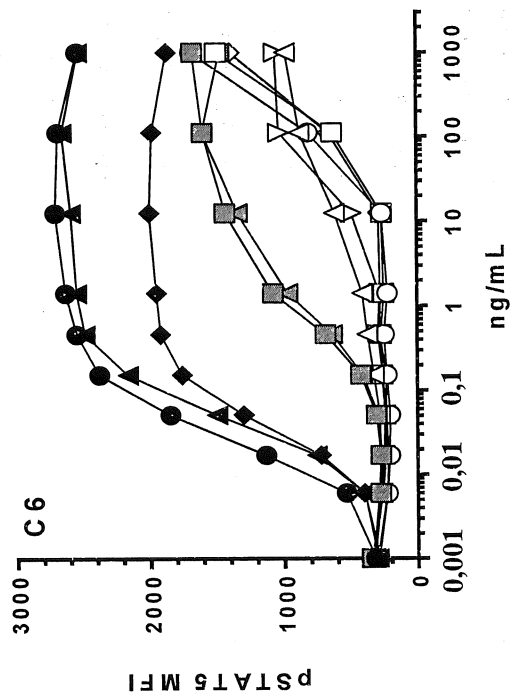
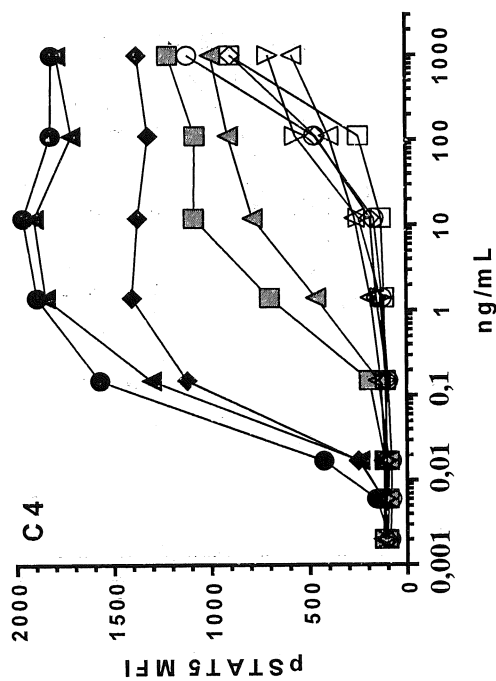
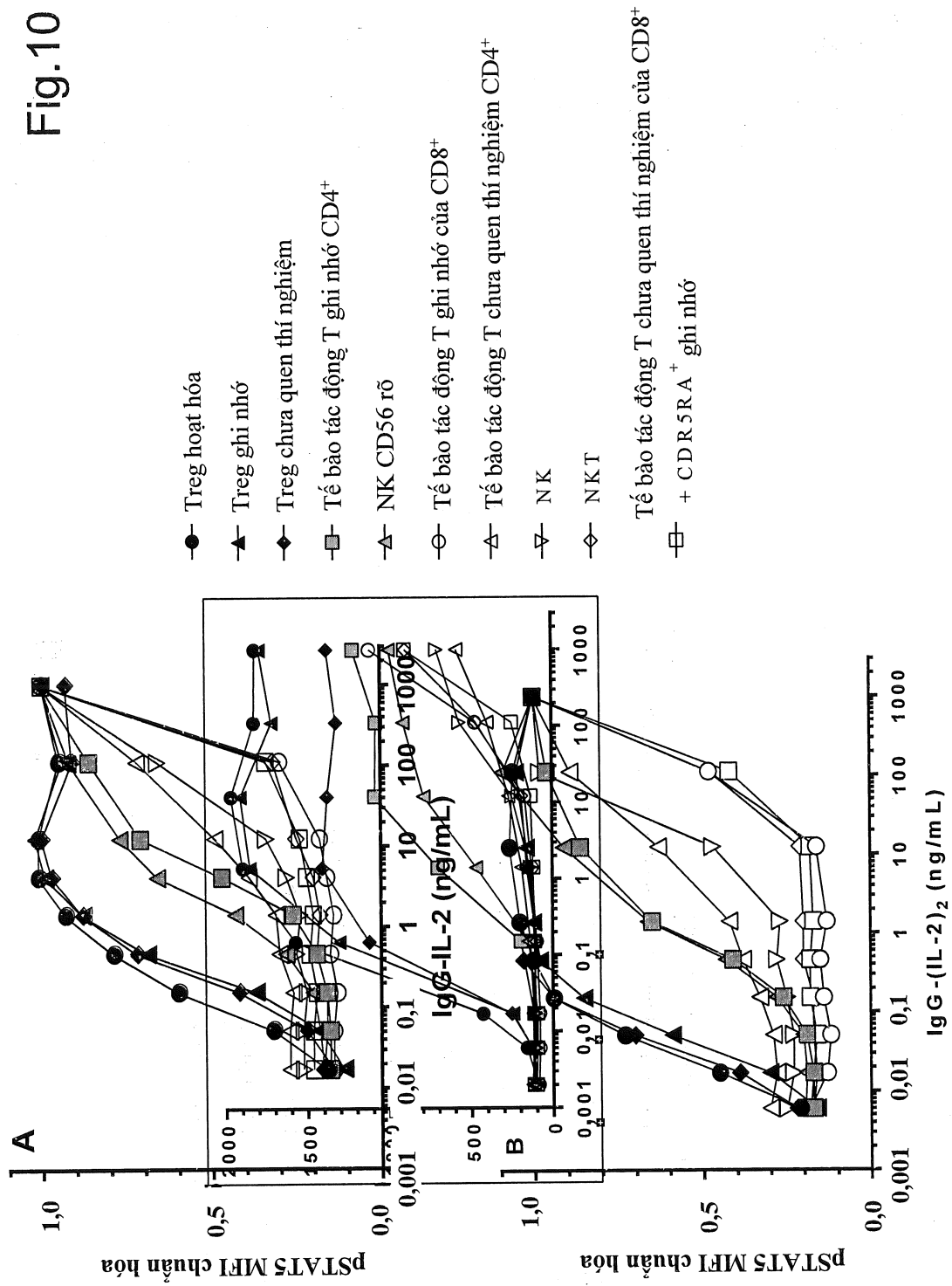
Tế bào tác động T chưa quen thí nghiệm của CD8⁺+ CDR5RA⁺ ghi nhớ

Fig.10



12/54

Fig.11

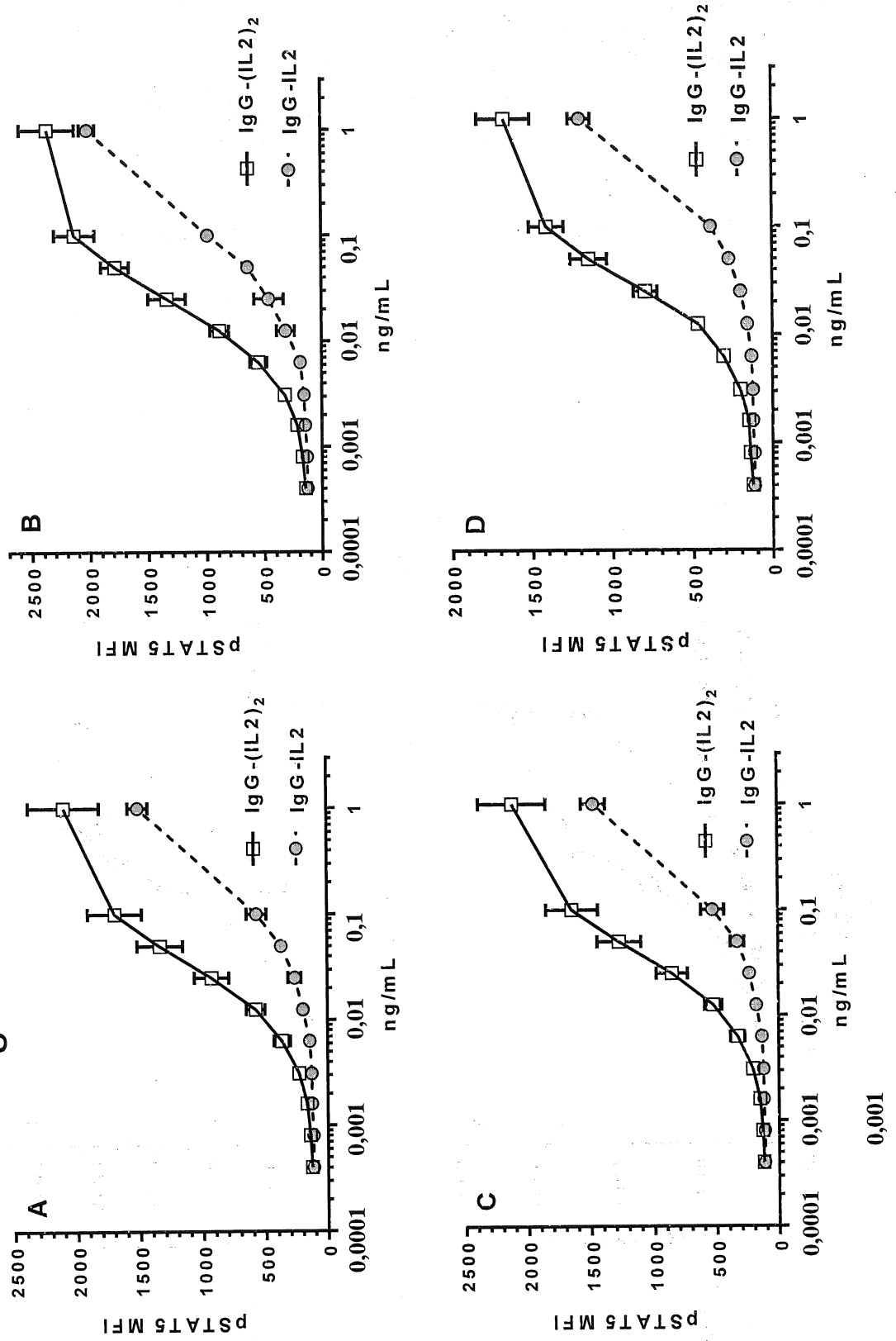
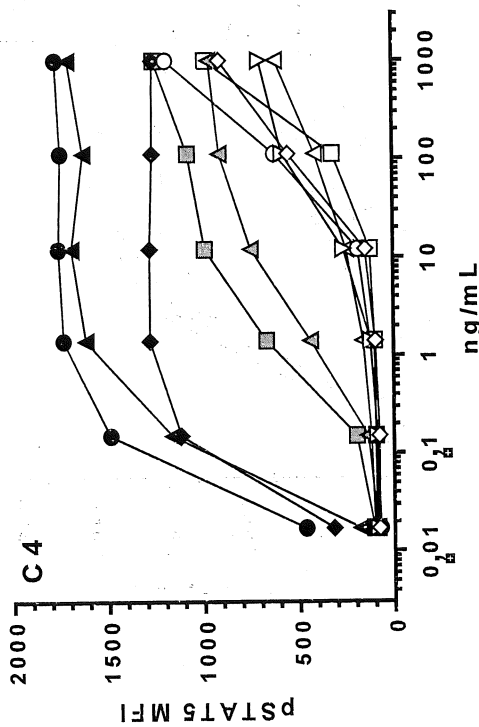
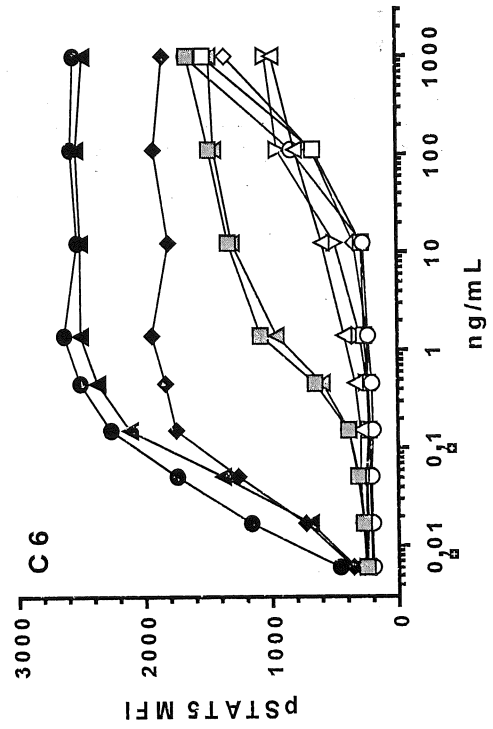
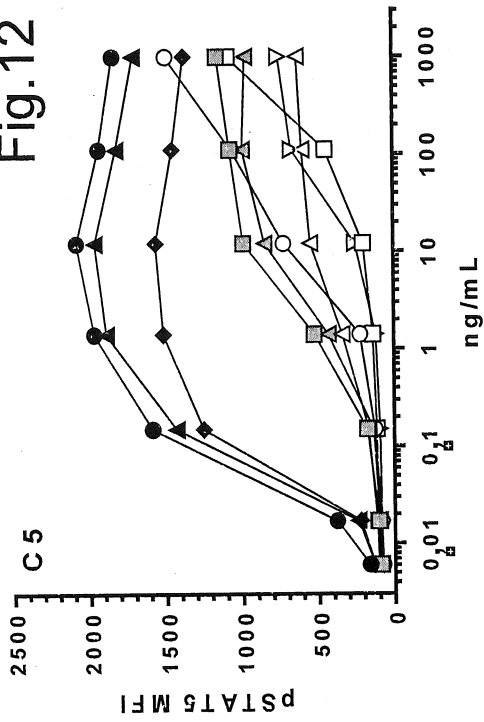


Fig.12



- Treg hoạt hóa
- ▲ Treg ghi nhớ
- ◆ Treg chưa quen thí nghiệm
- Tế bào tác động T ghi nhớ CD4⁺
- △ NK CD56 rõ
- Tế bào tác động T ghi nhớ của CD8⁺
- ▽ Tế bào tác động T chưa quen thí nghiệm
- ▽ NK
- ◇ NKT
- Tế bào tác động T chưa quen thí nghiệm CD45RA⁺ CD8⁺

14/54

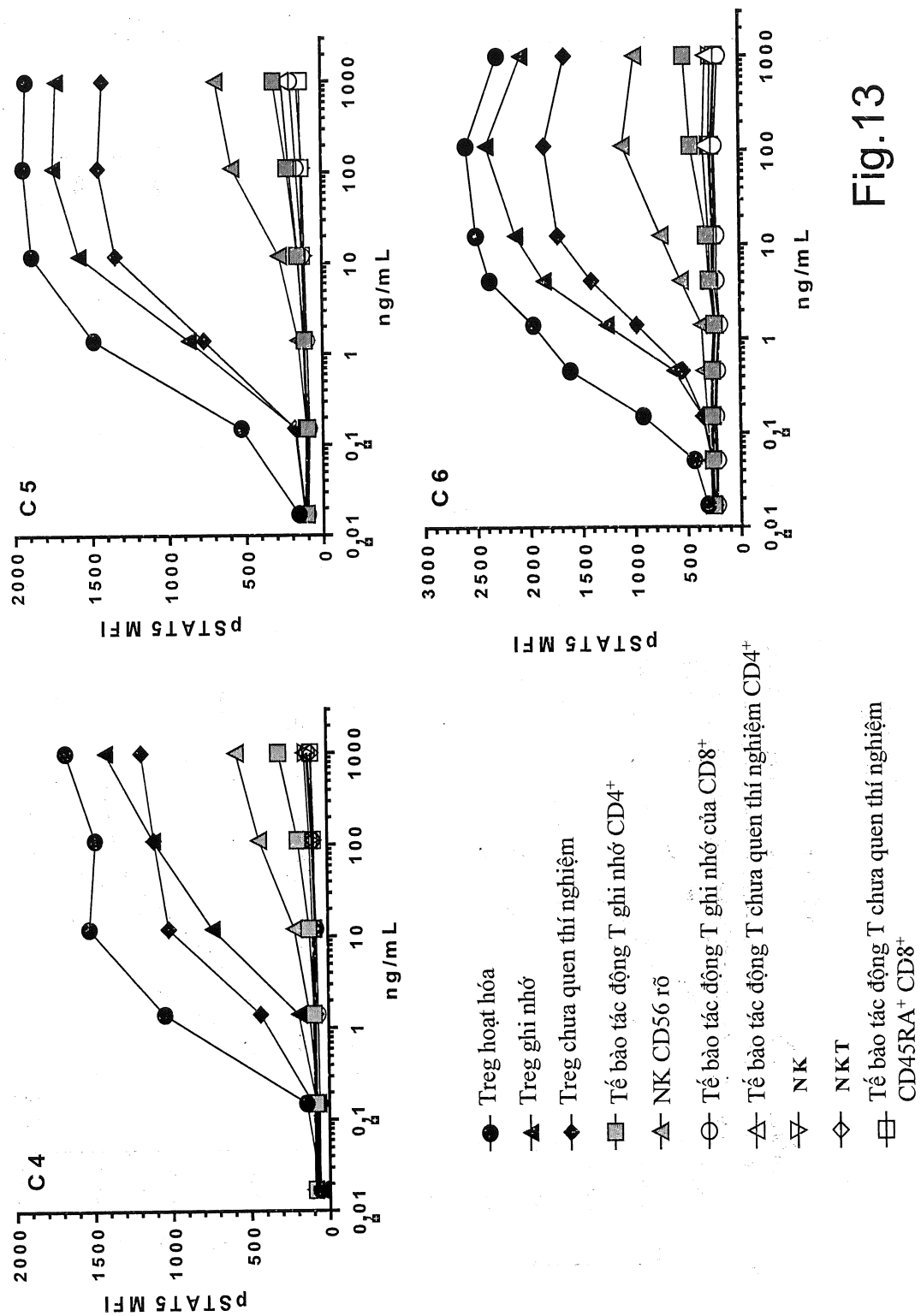
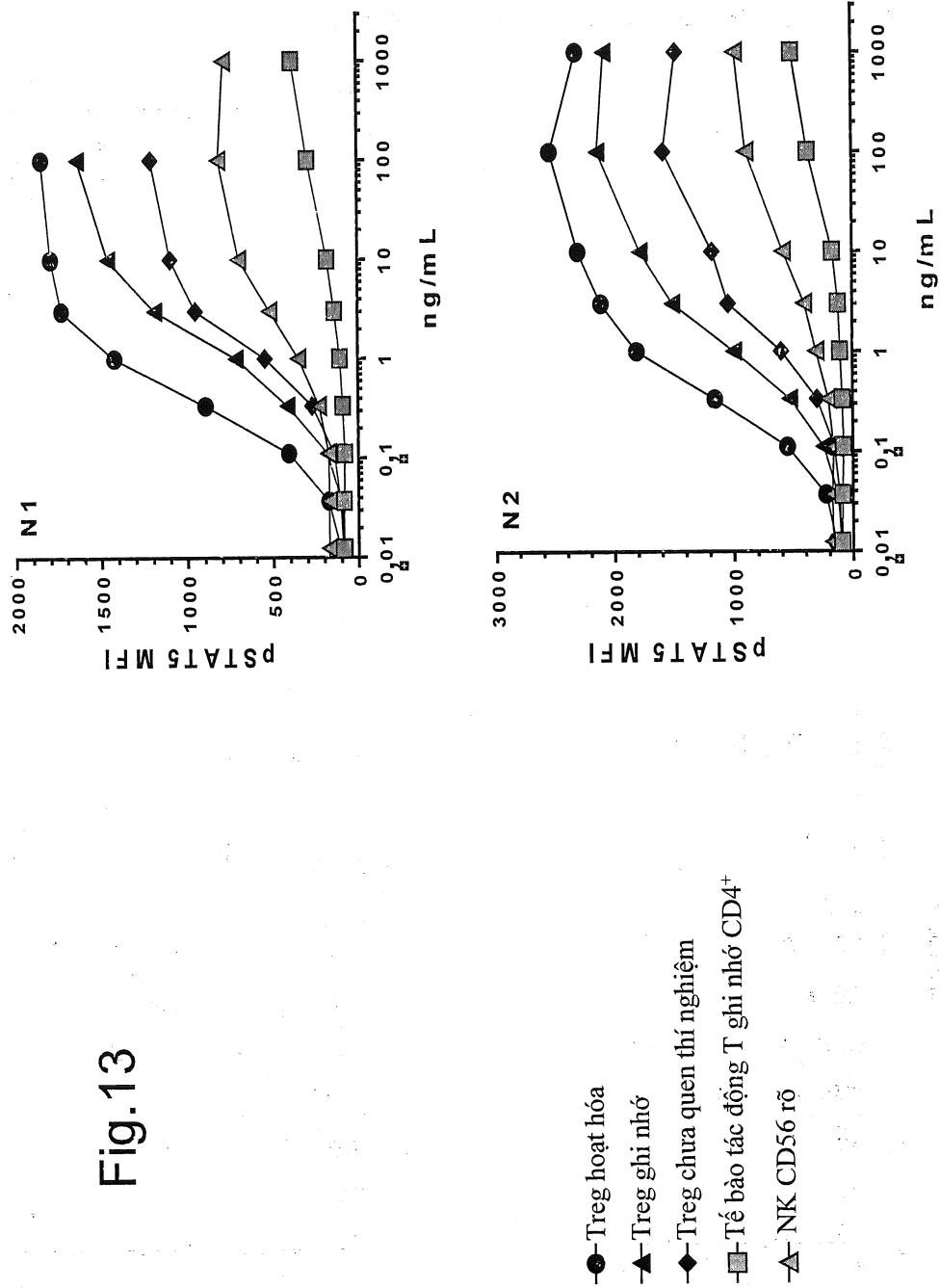


Fig.13

15/54



16/54

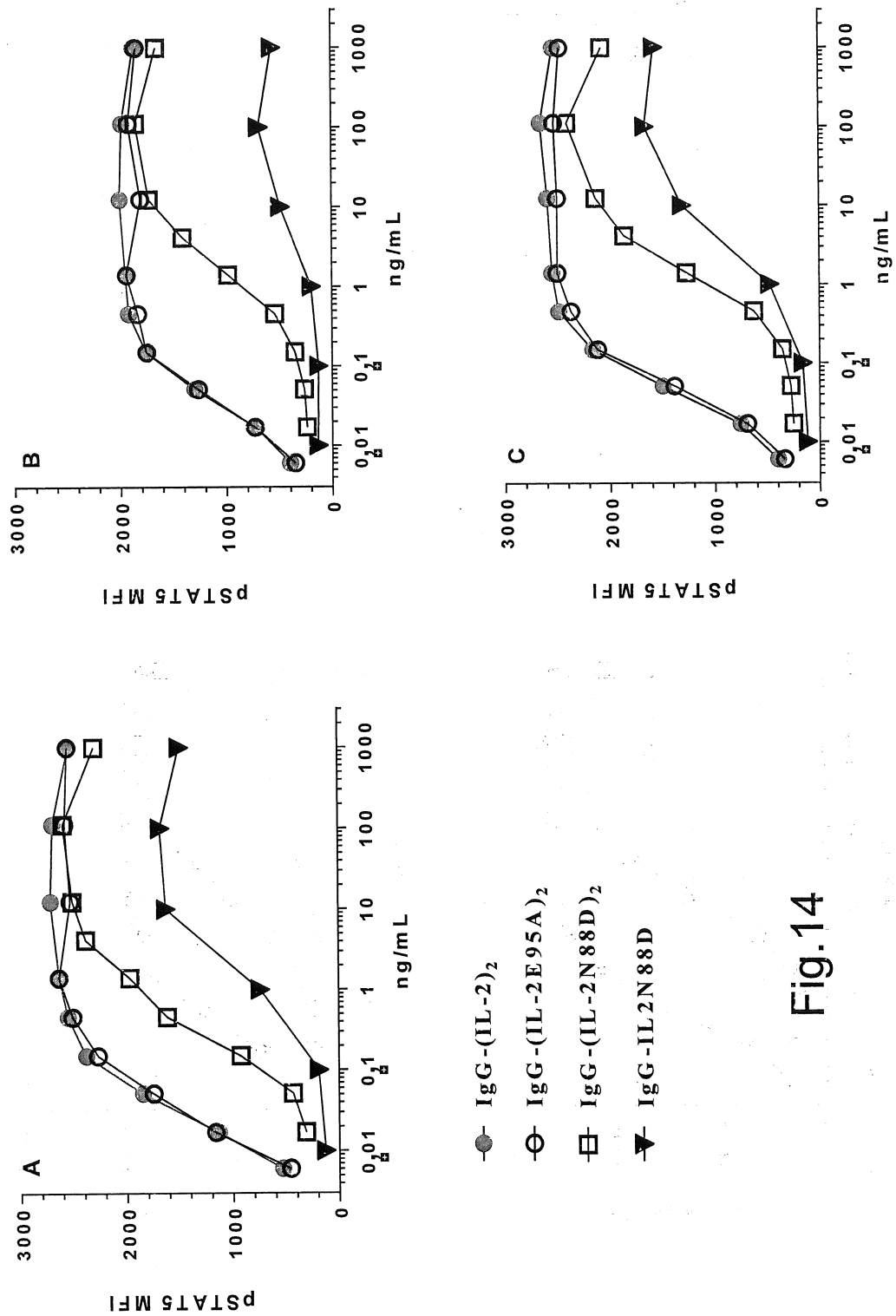
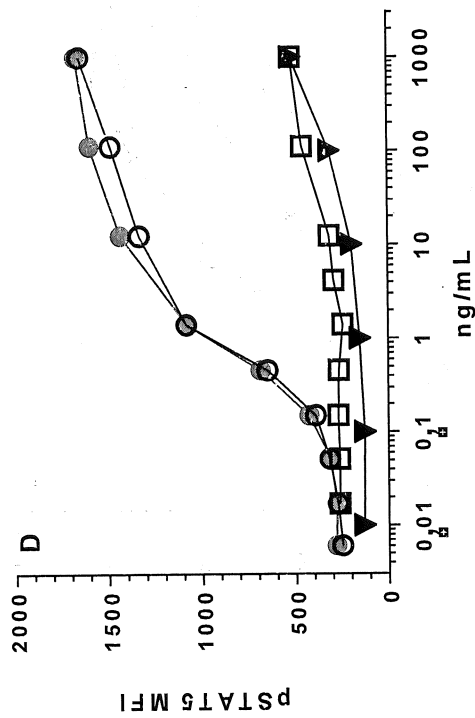
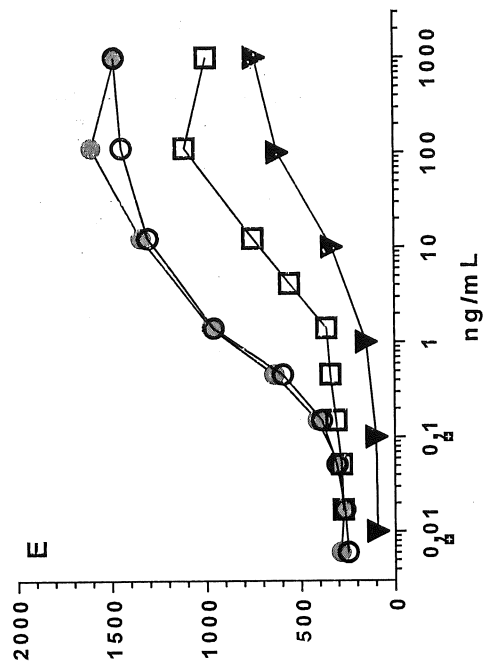


Fig.14

17/54



- IgG-(IL-2)₂
- IgG-(IL-2E95A)₂
- IgG-(IL-2N88D)₂
- ▼ IgG-IL2N88D

Fig.14

18/54

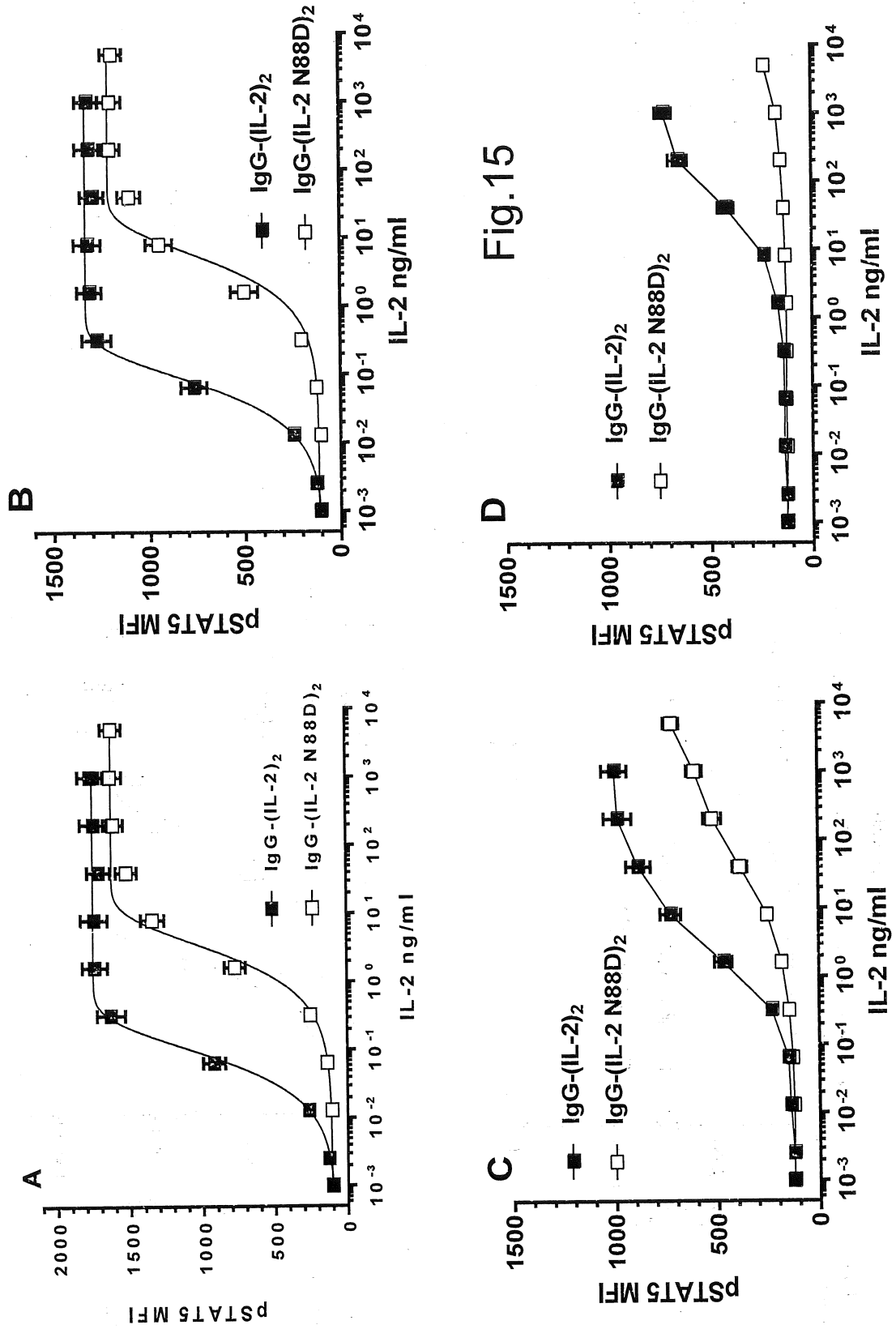


Fig.15

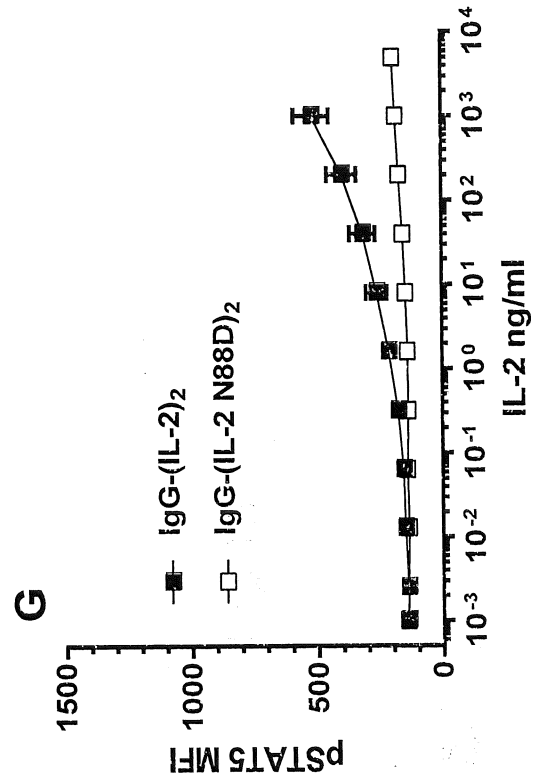
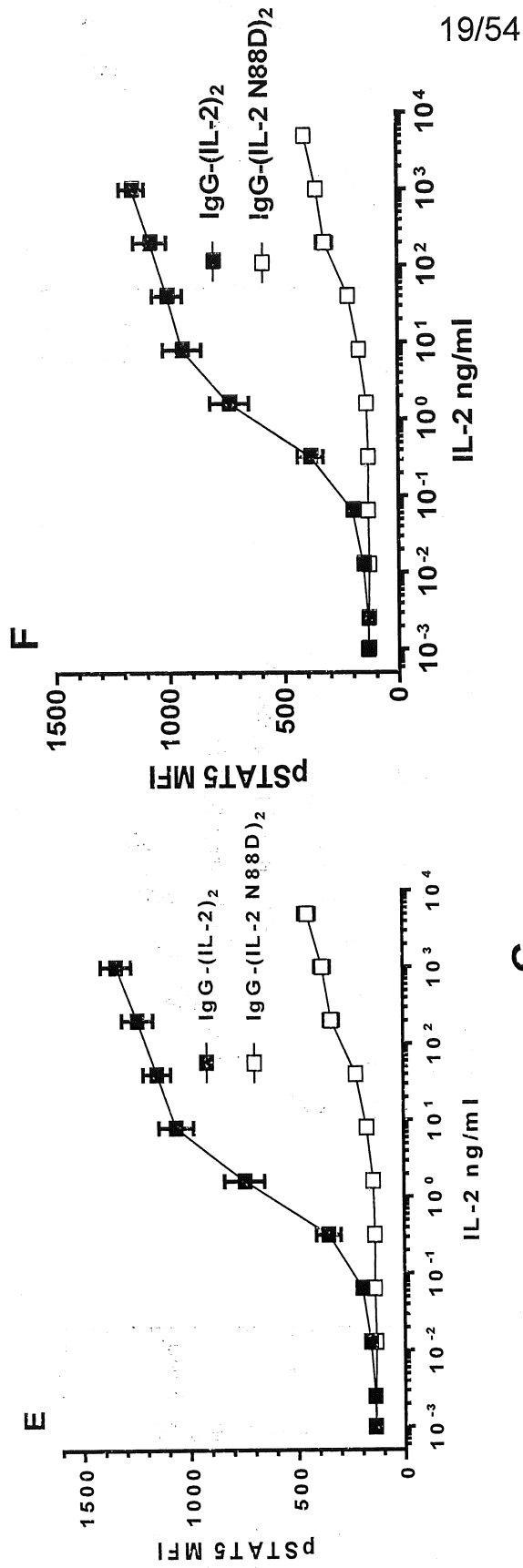
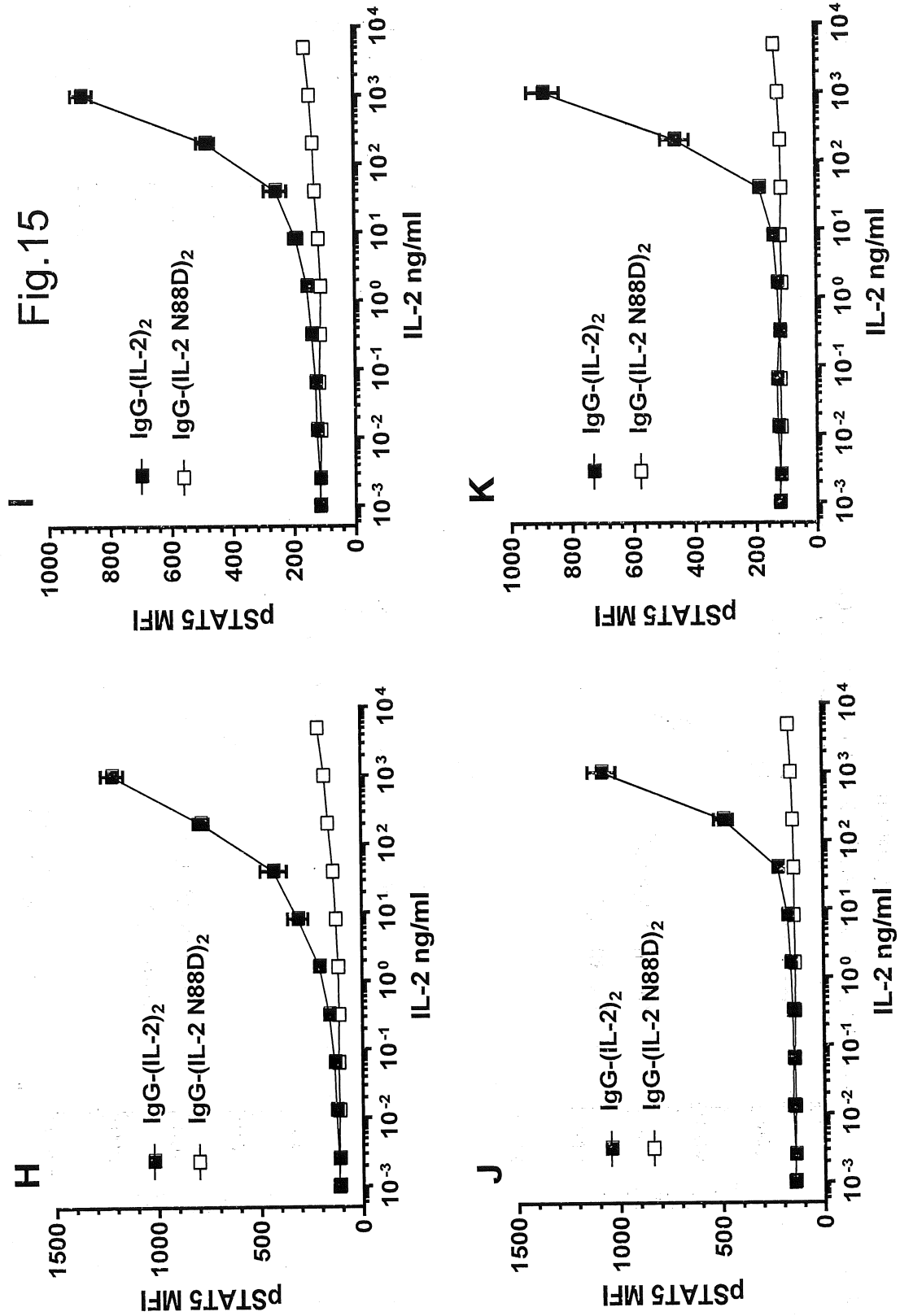


Fig.15

20/54



21/54

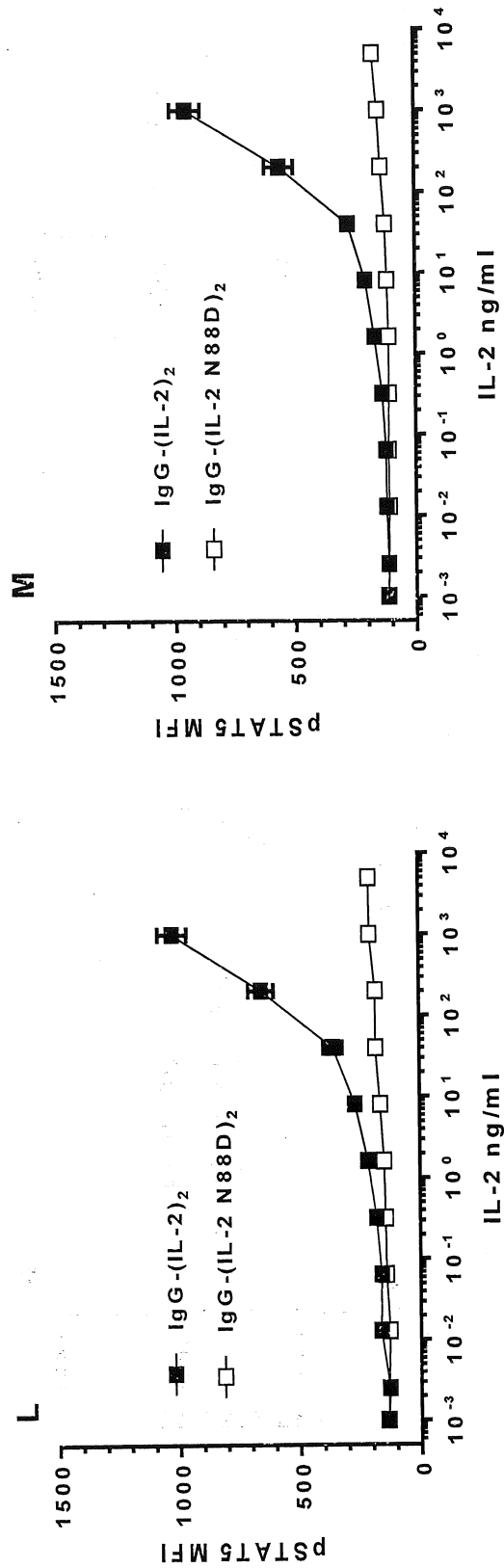


Fig.15

22/54

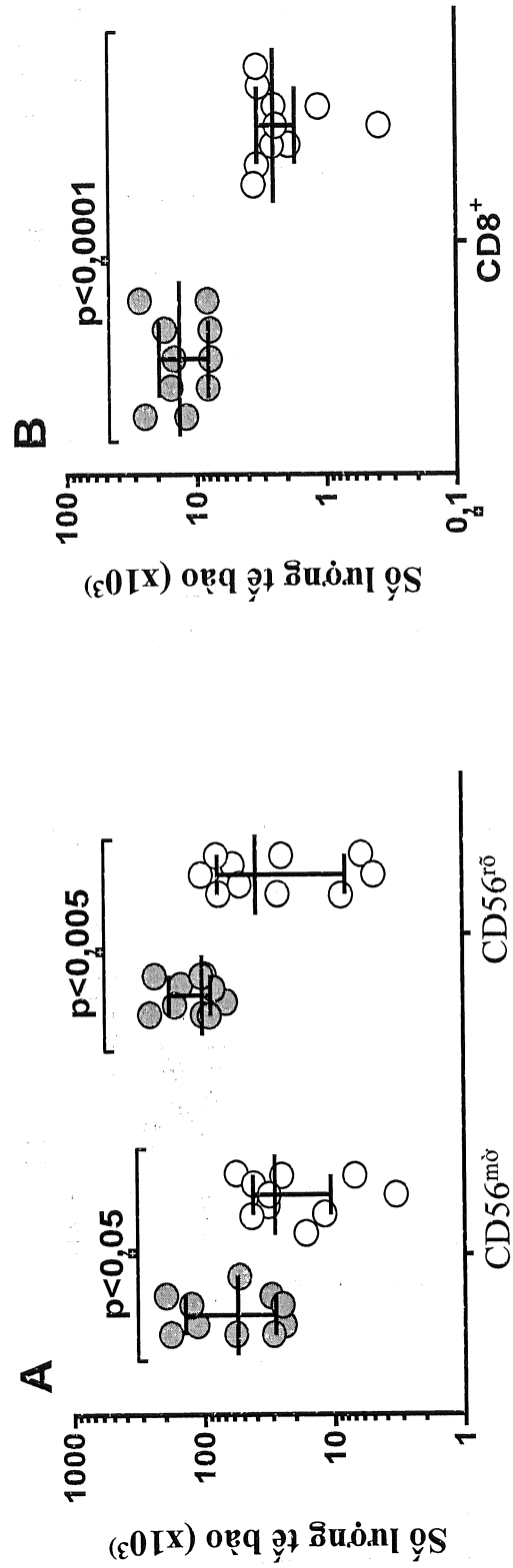


Fig.16

23/54

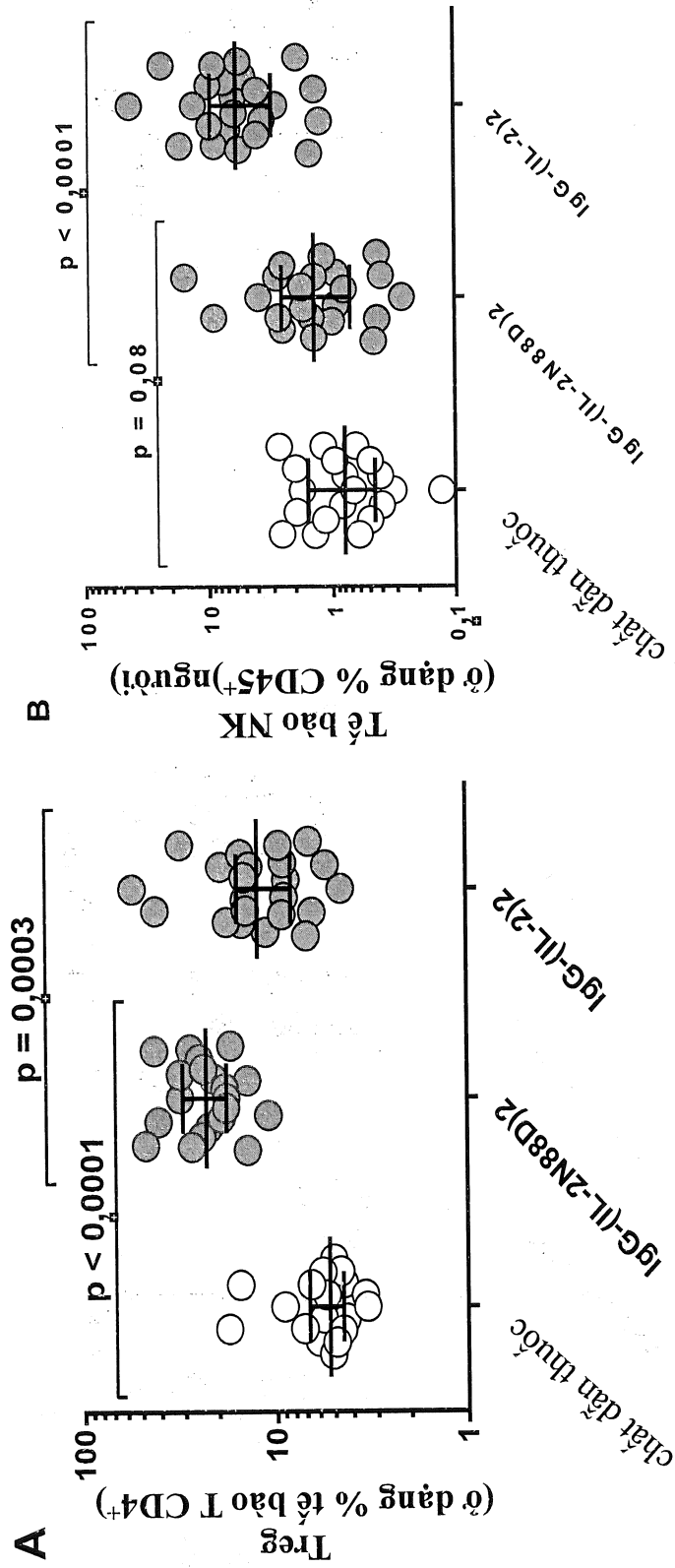
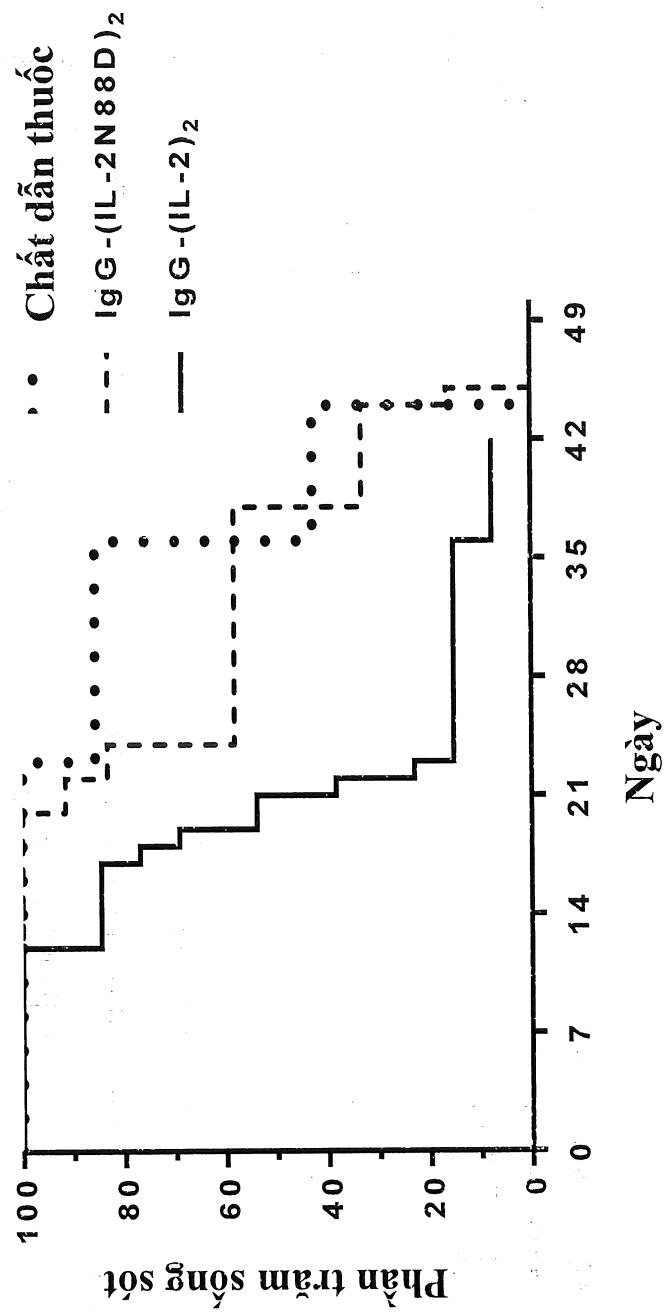


Fig.17

24/54



25/54

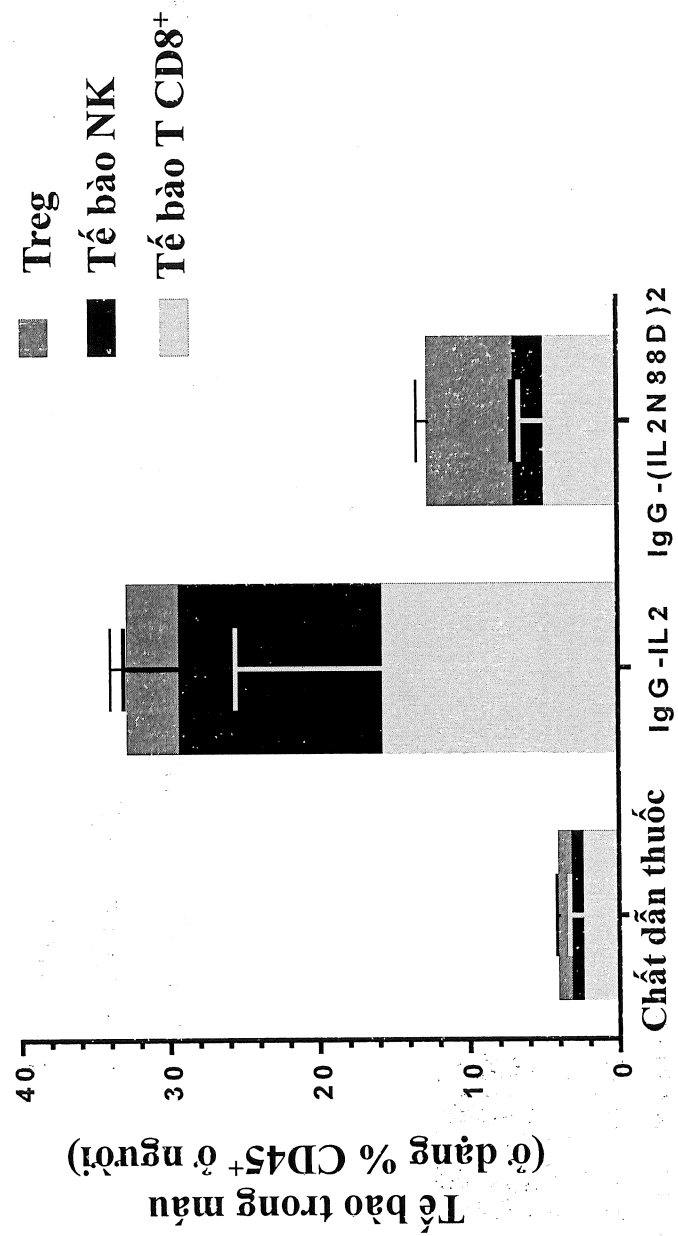
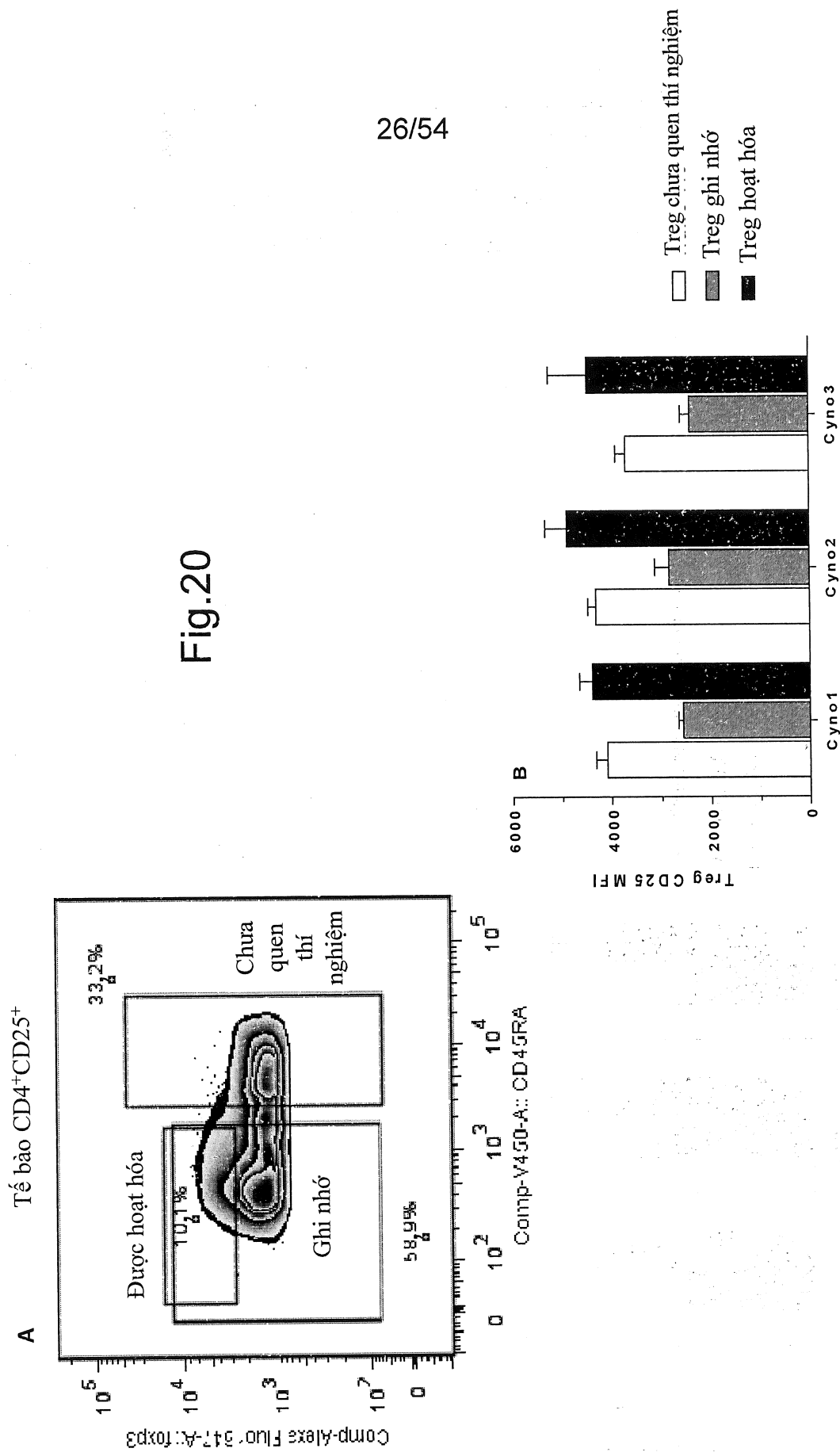
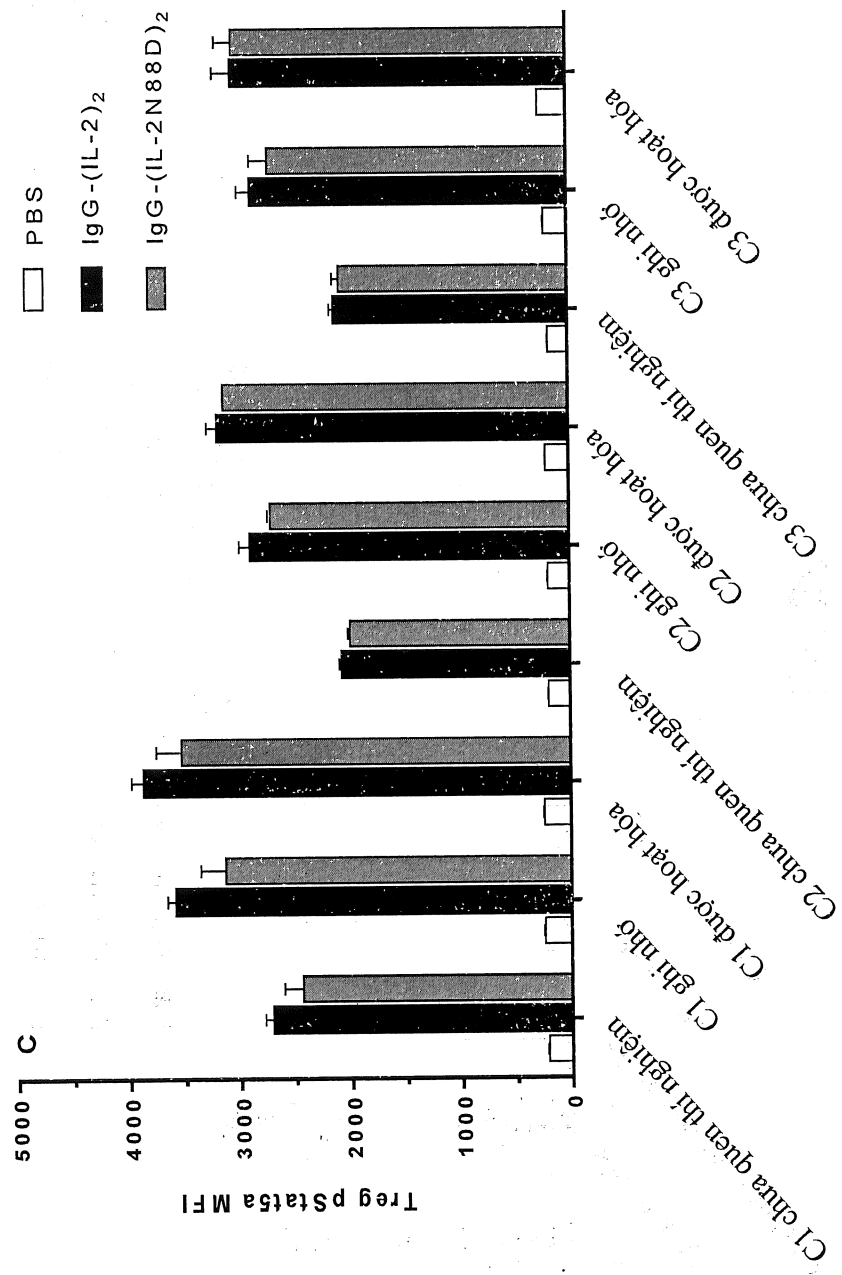


Fig.19

Fig.20



27/54



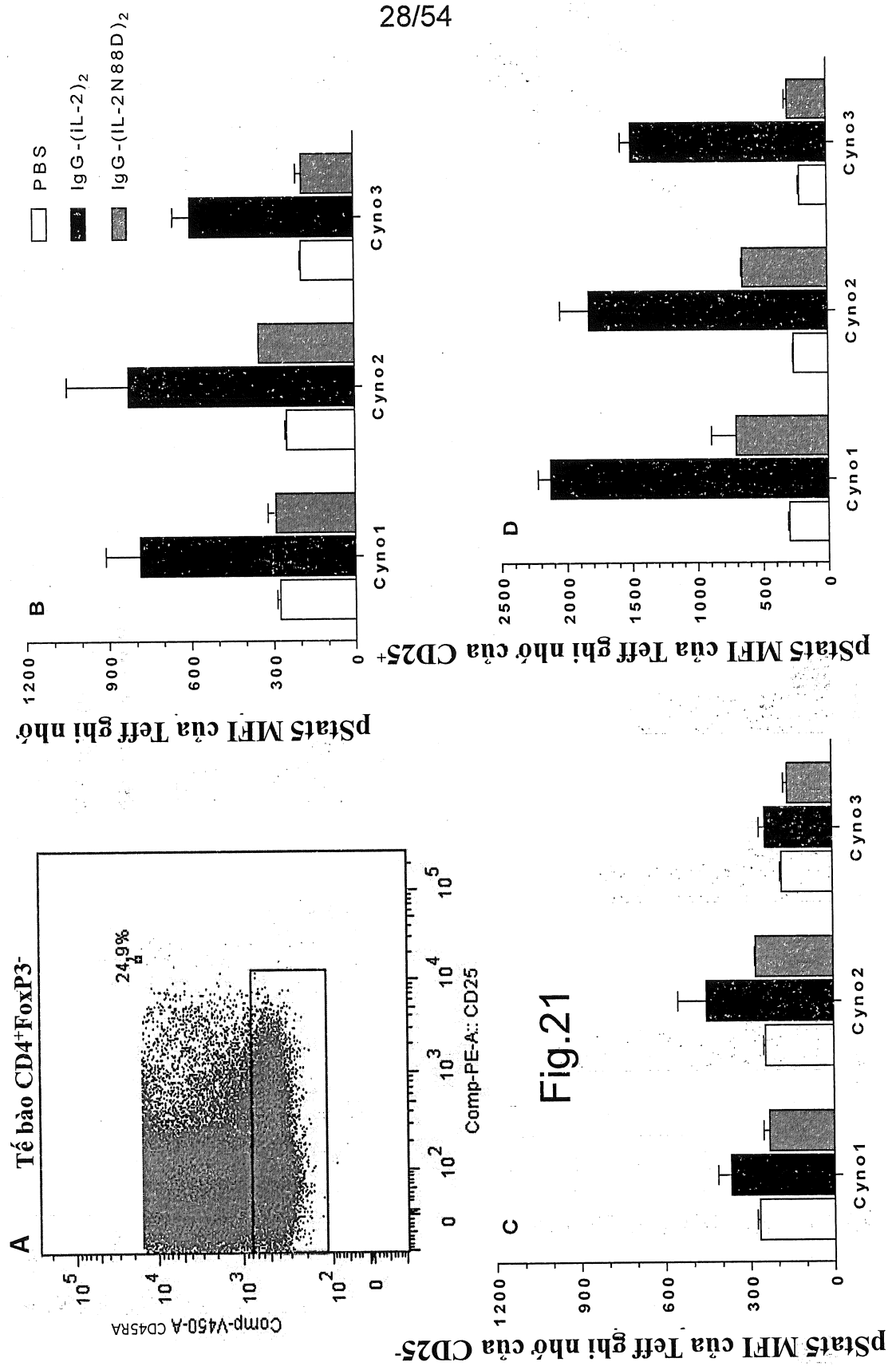
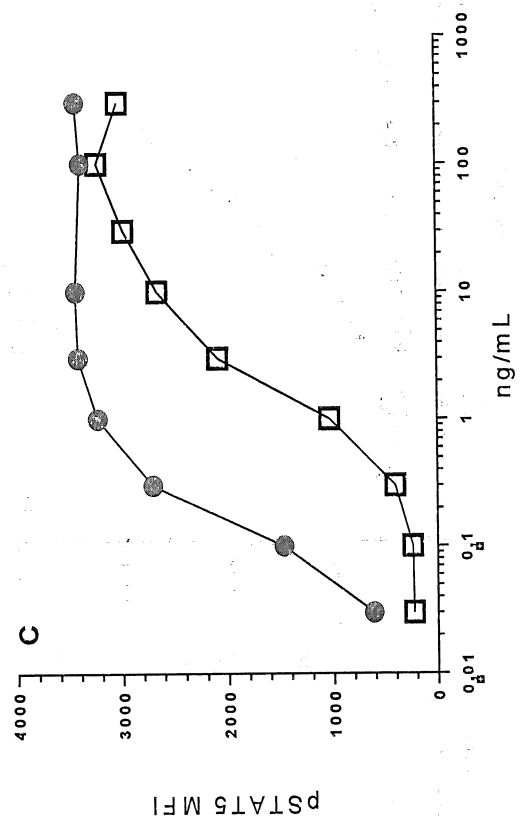
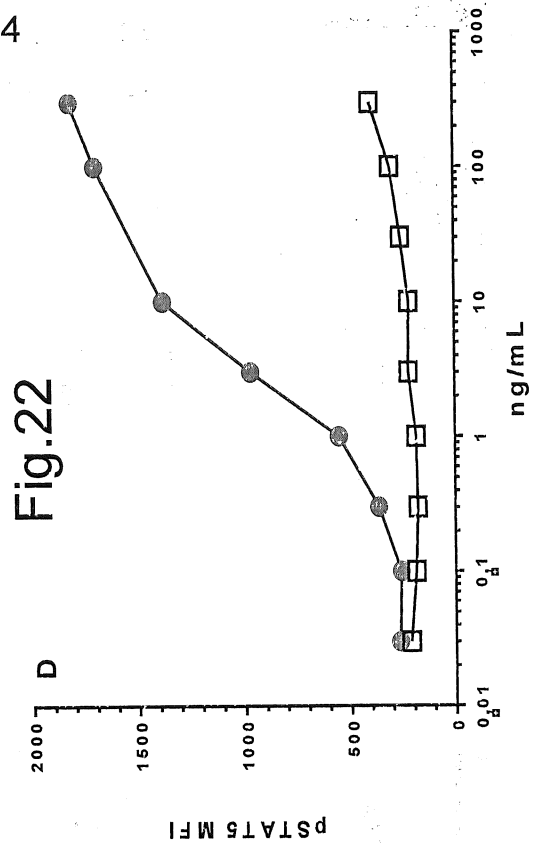
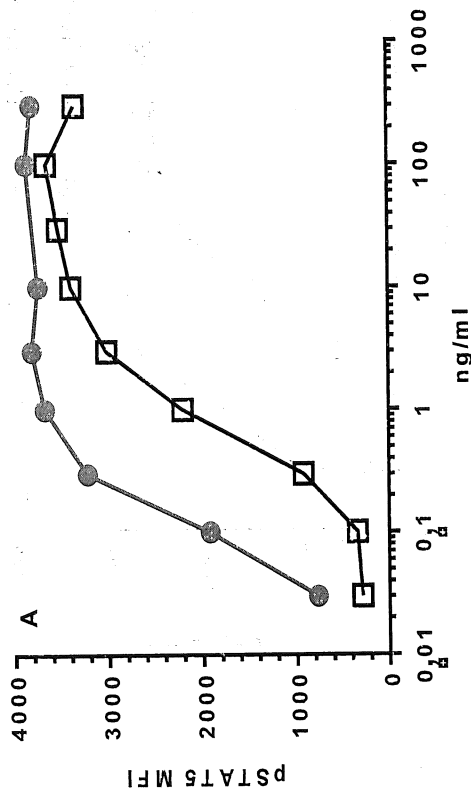
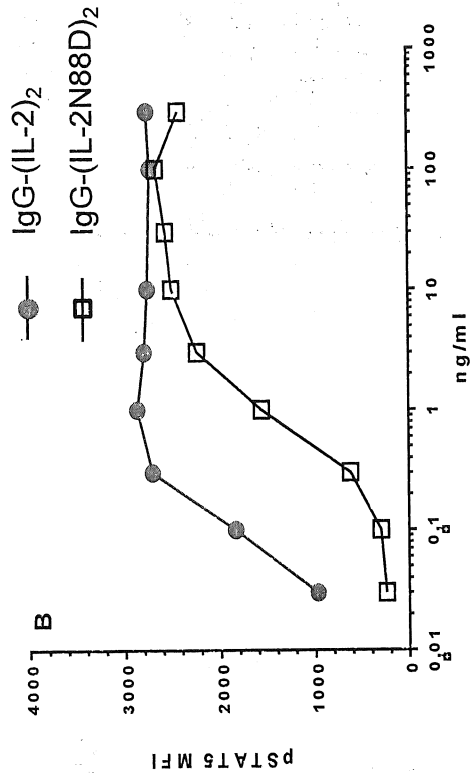


Fig.21

28/54



29/54

Fig.22

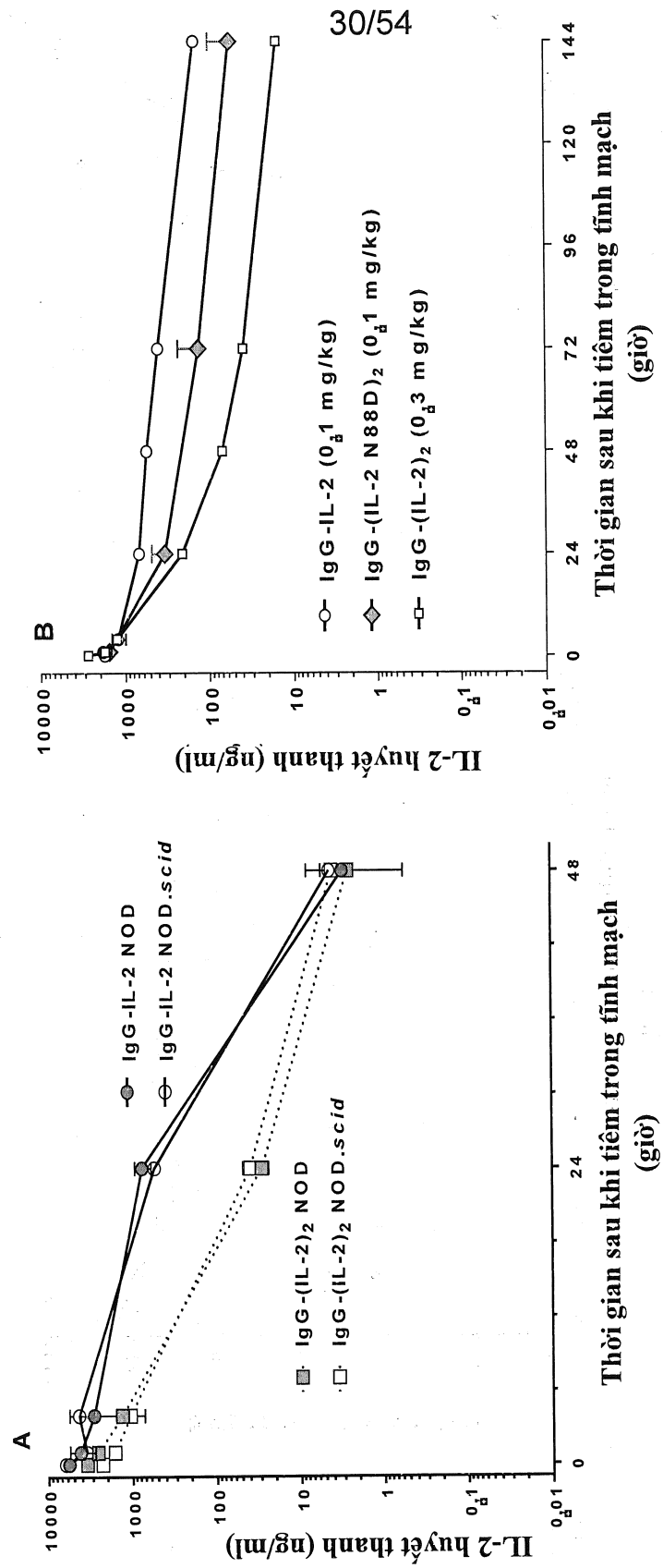


Fig.23

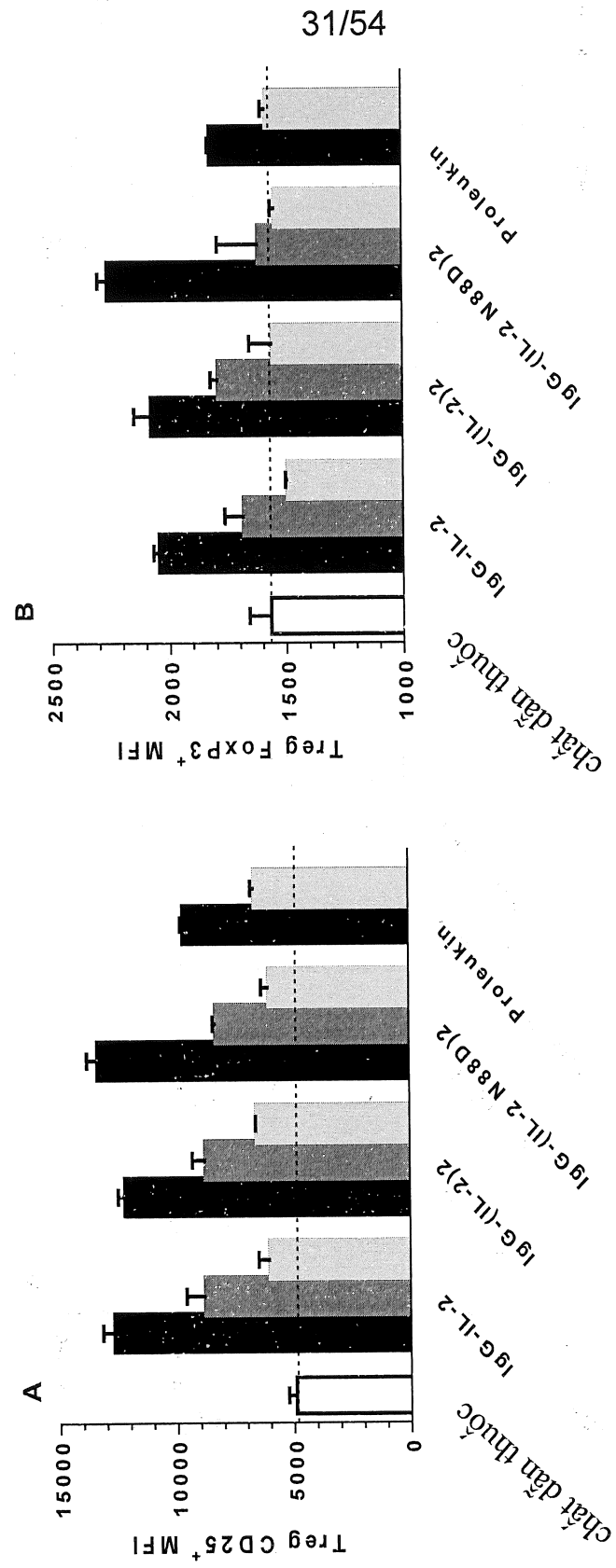


Fig.24

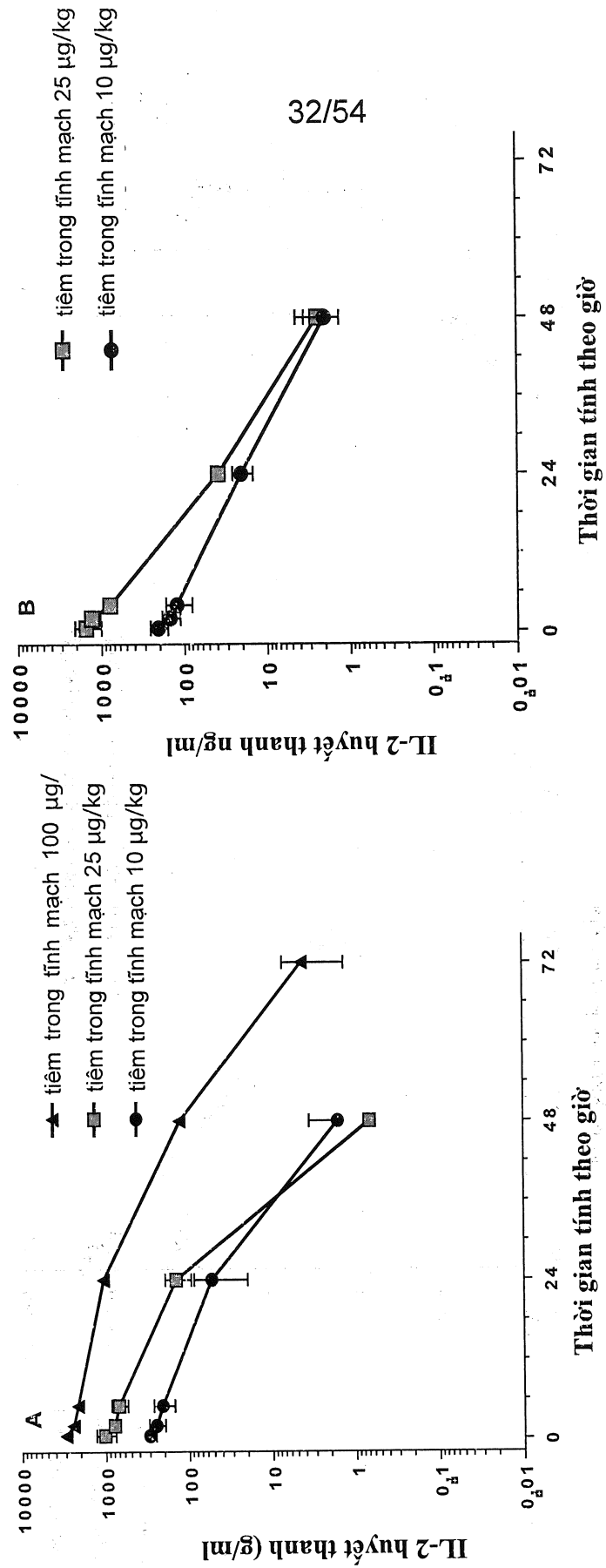


Fig.25

Fig.26

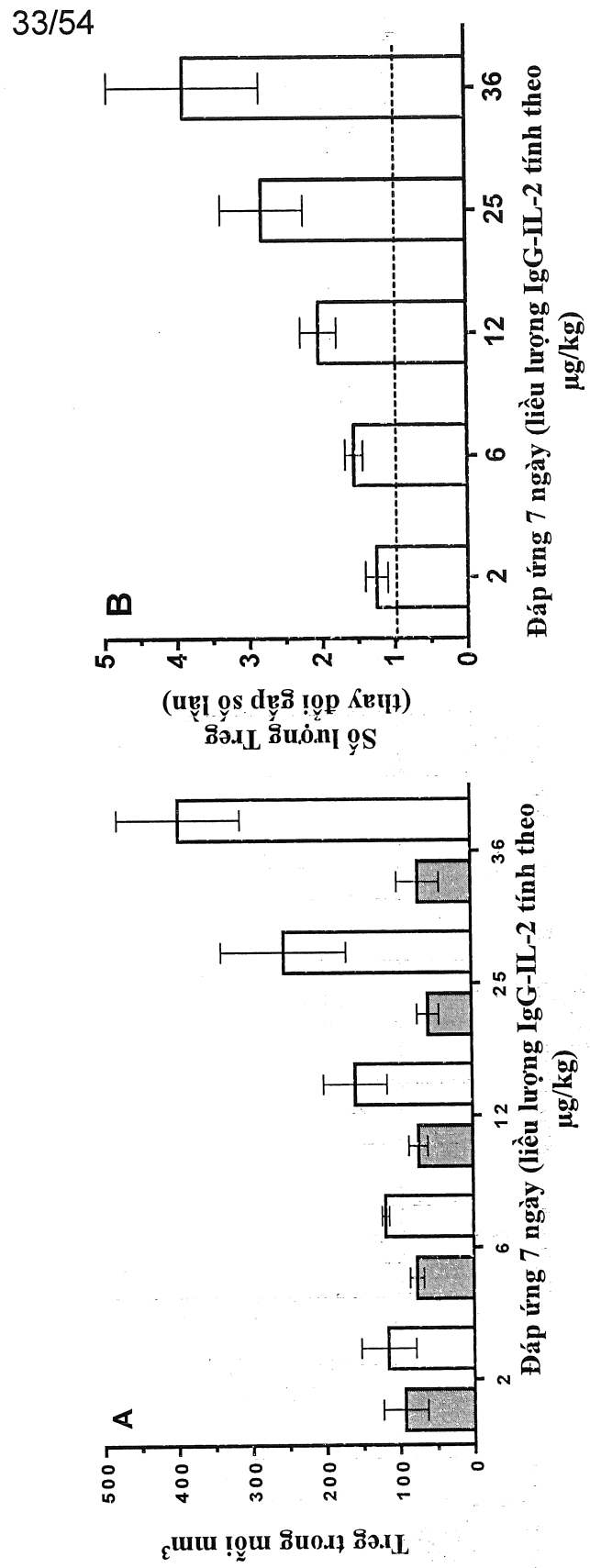
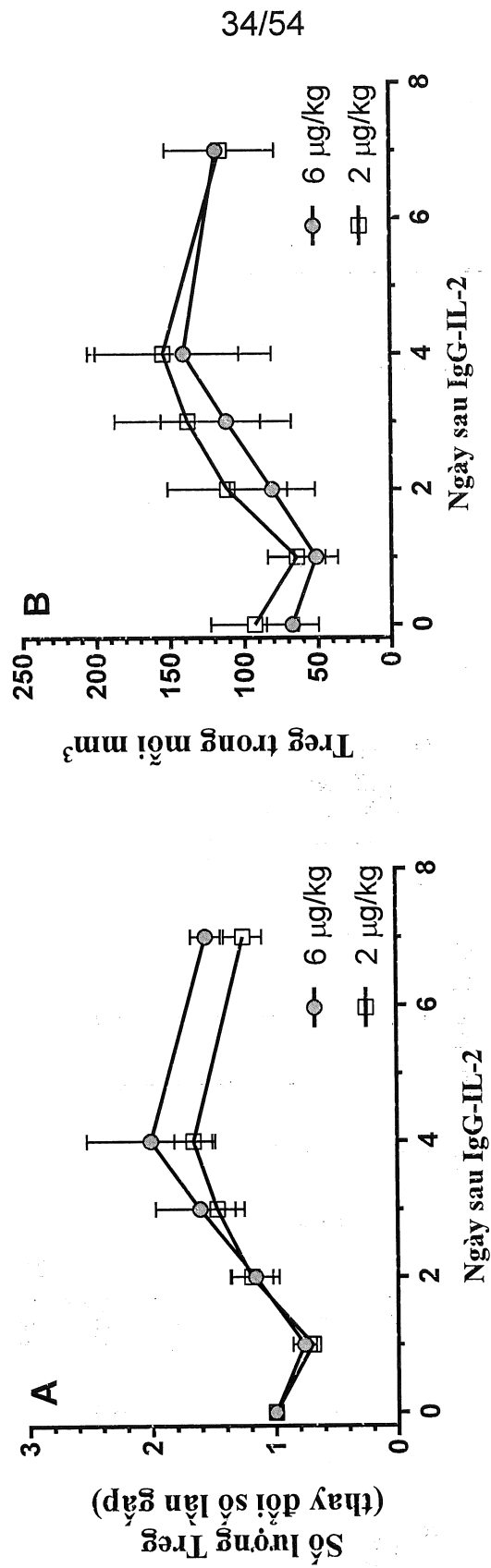


Fig.27



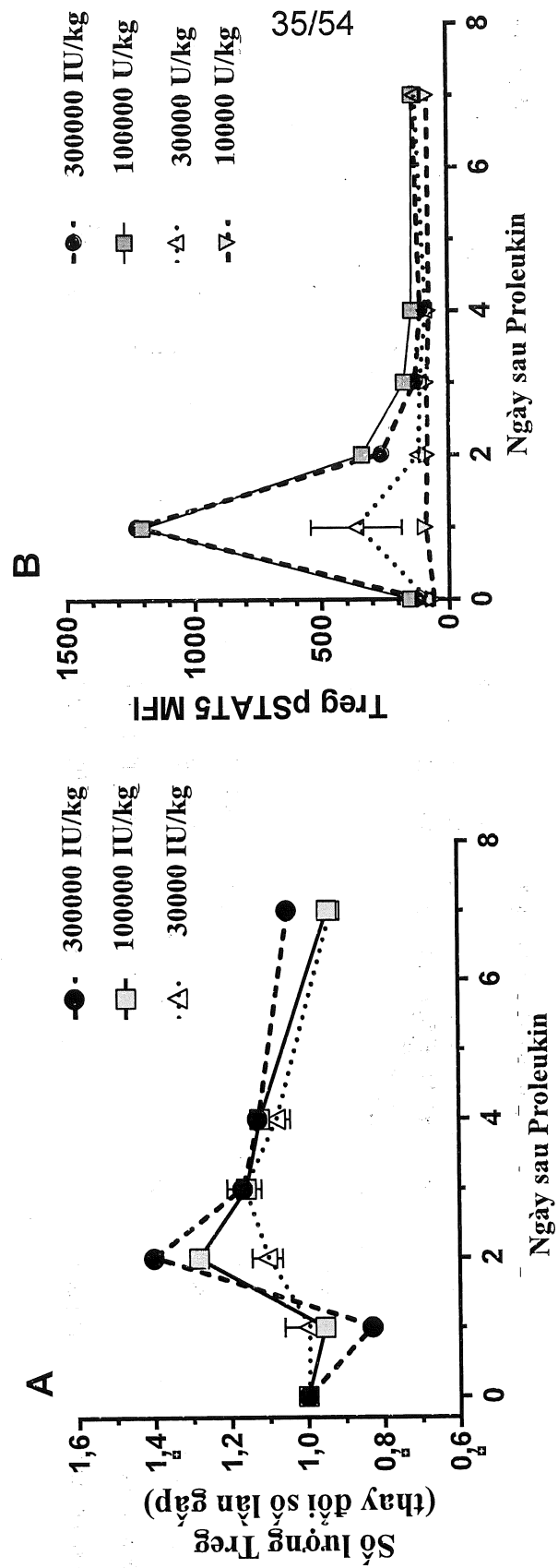


Fig.28

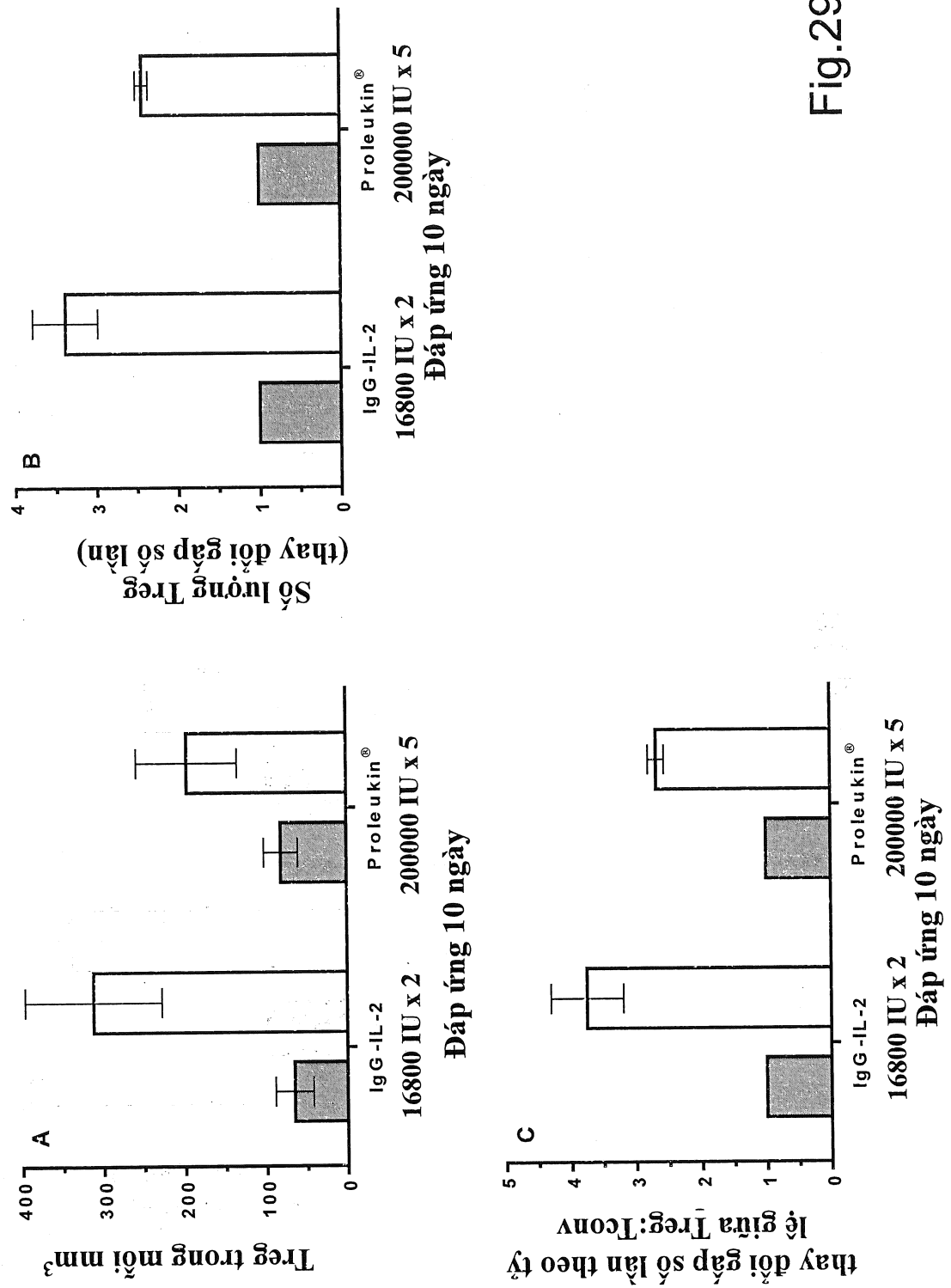


Fig.29

37/54

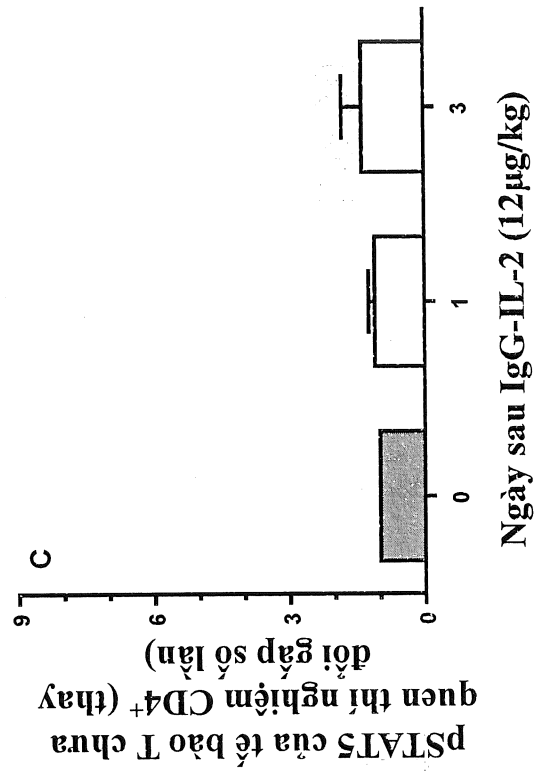
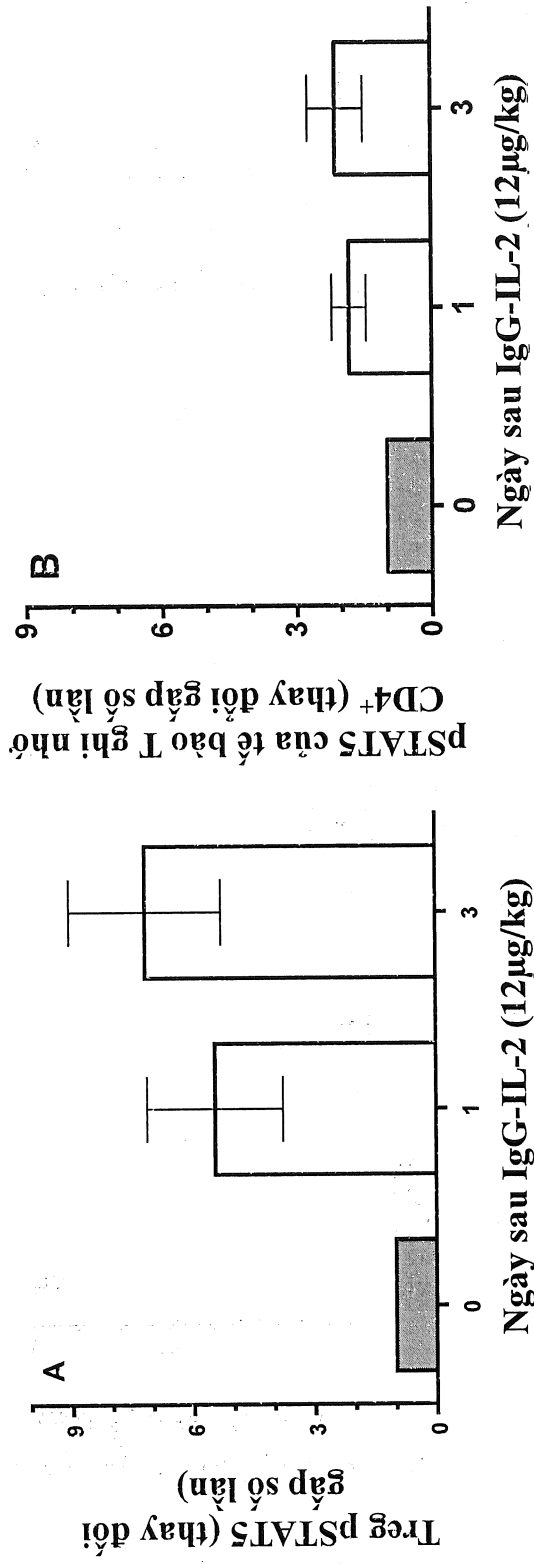


Fig.30

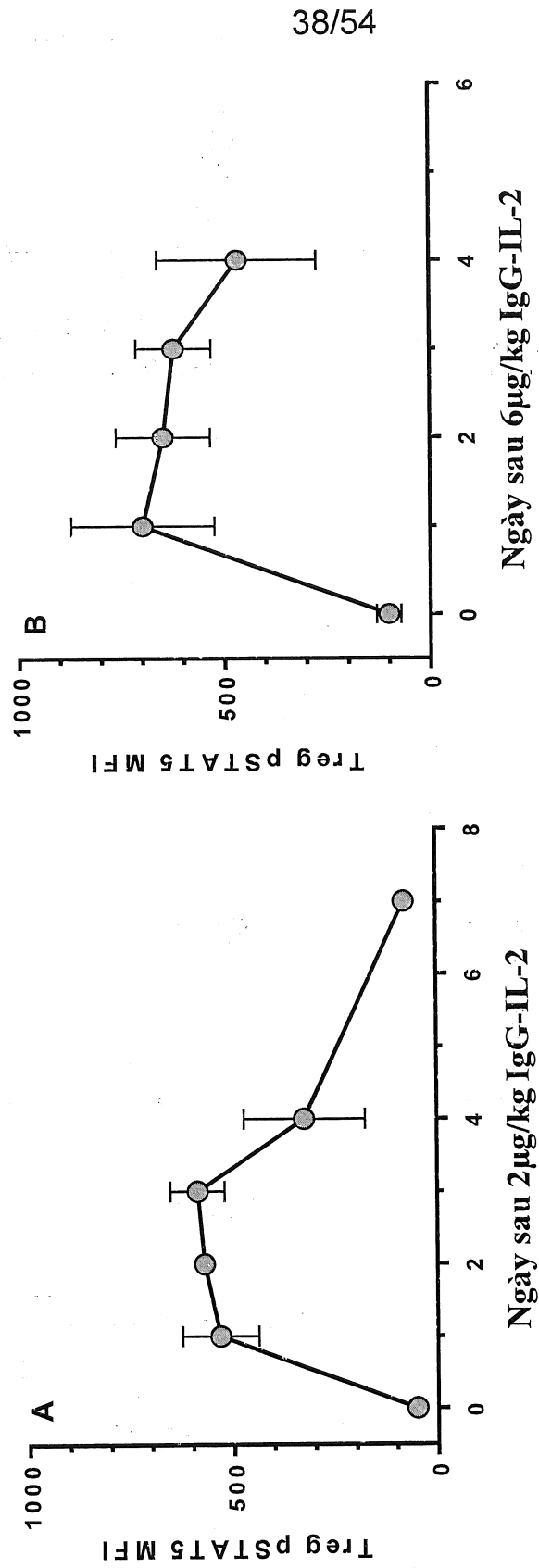


Fig.31

39/54

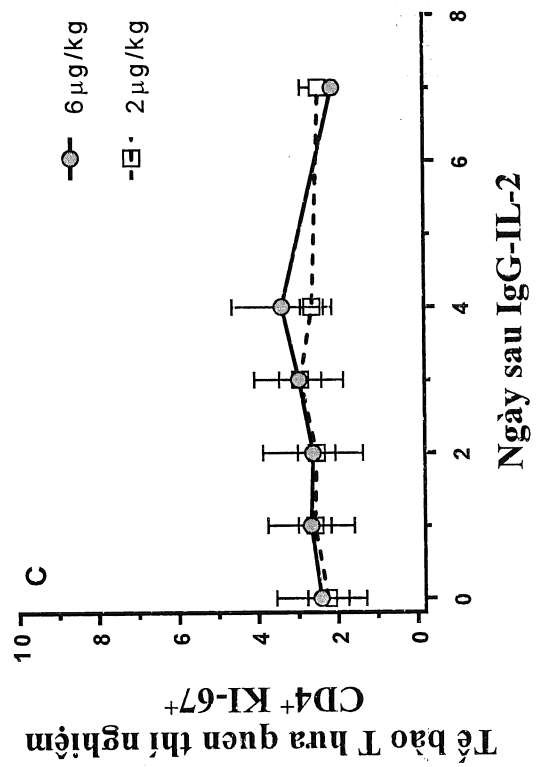
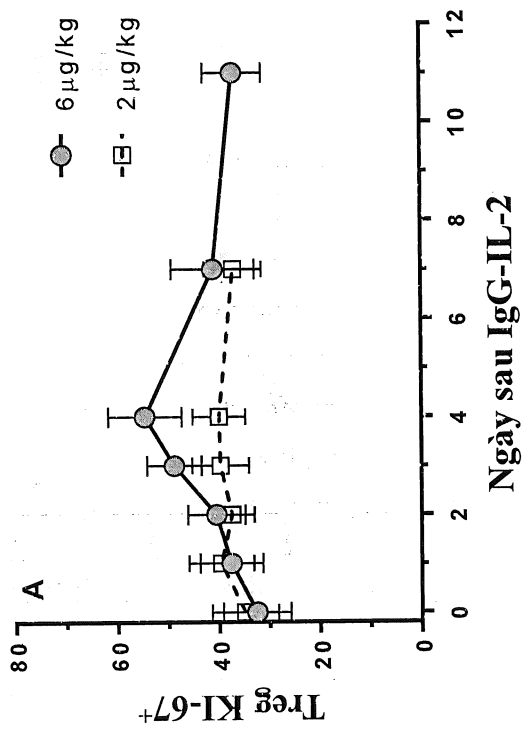
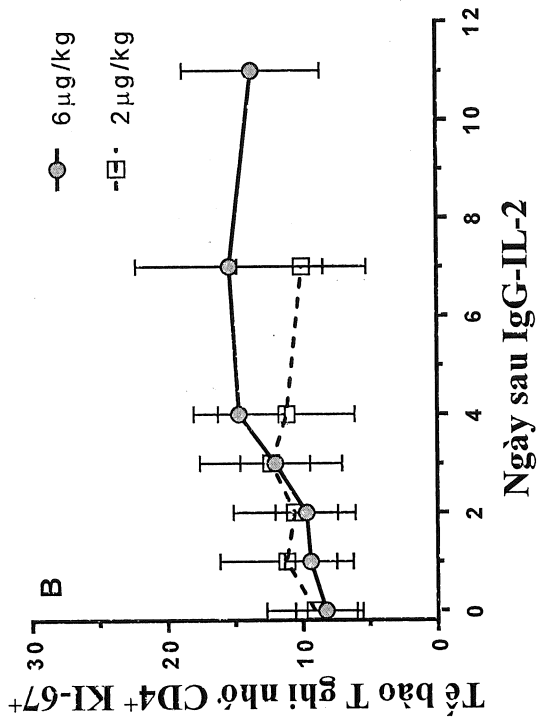


Fig.32

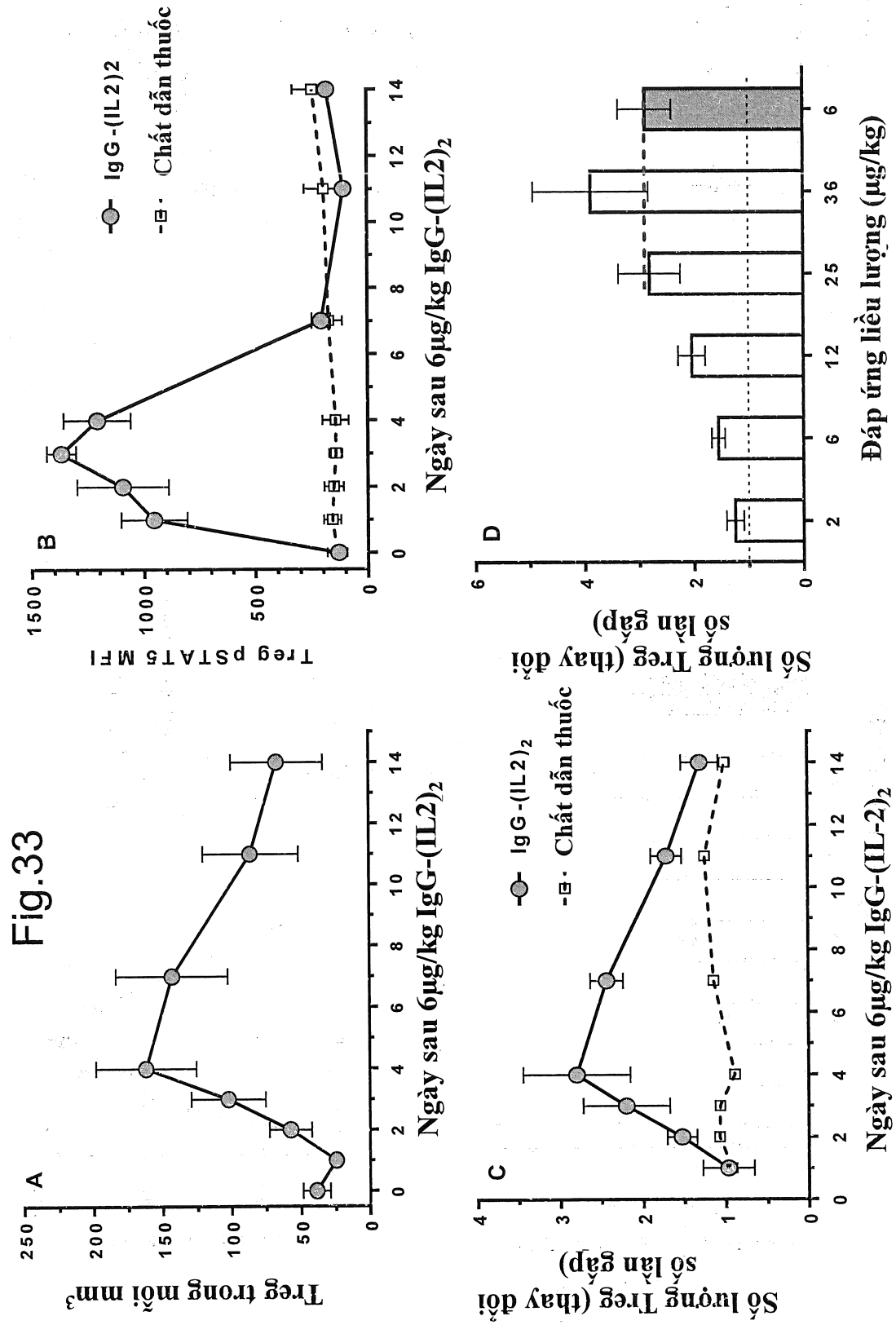
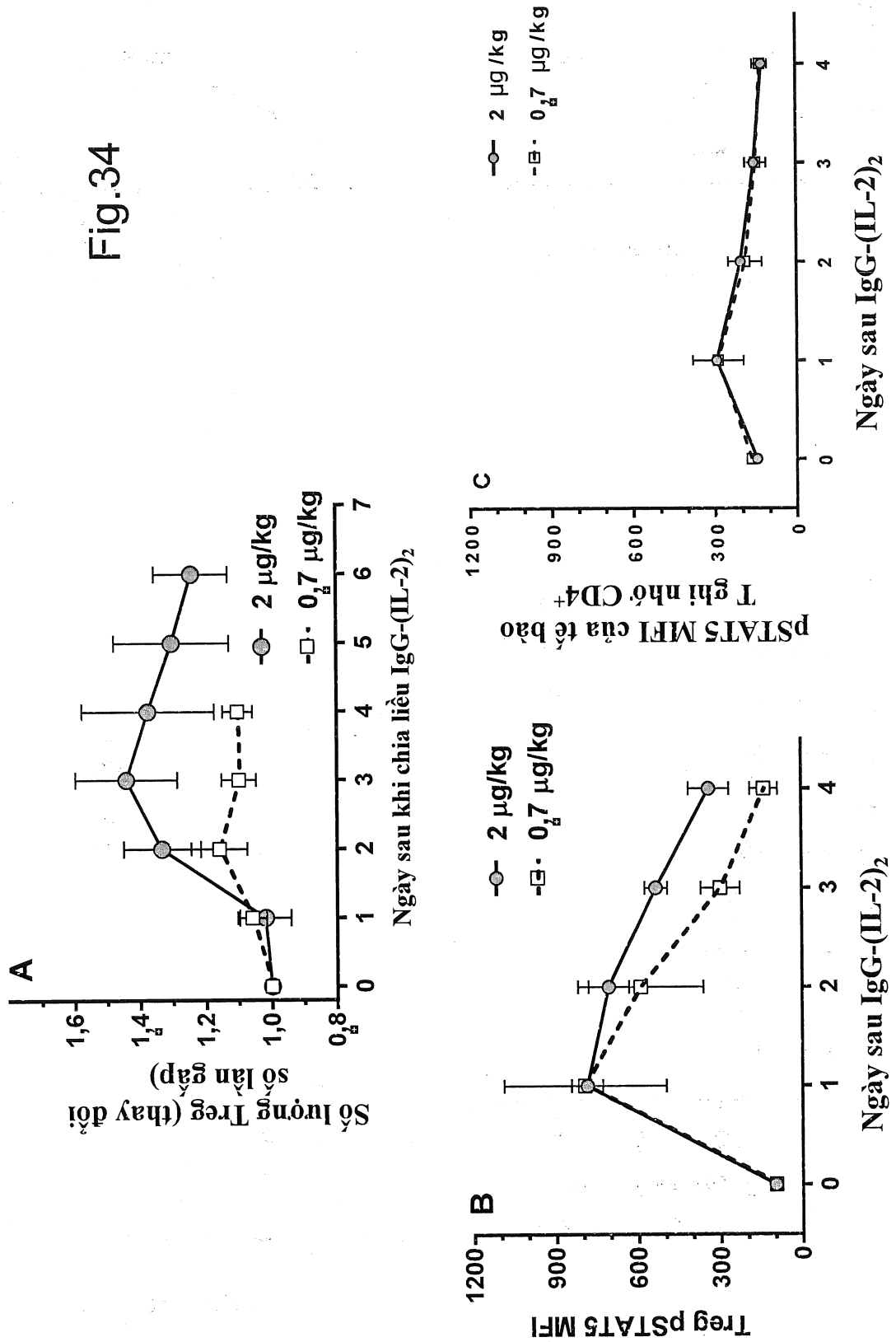


Fig.34



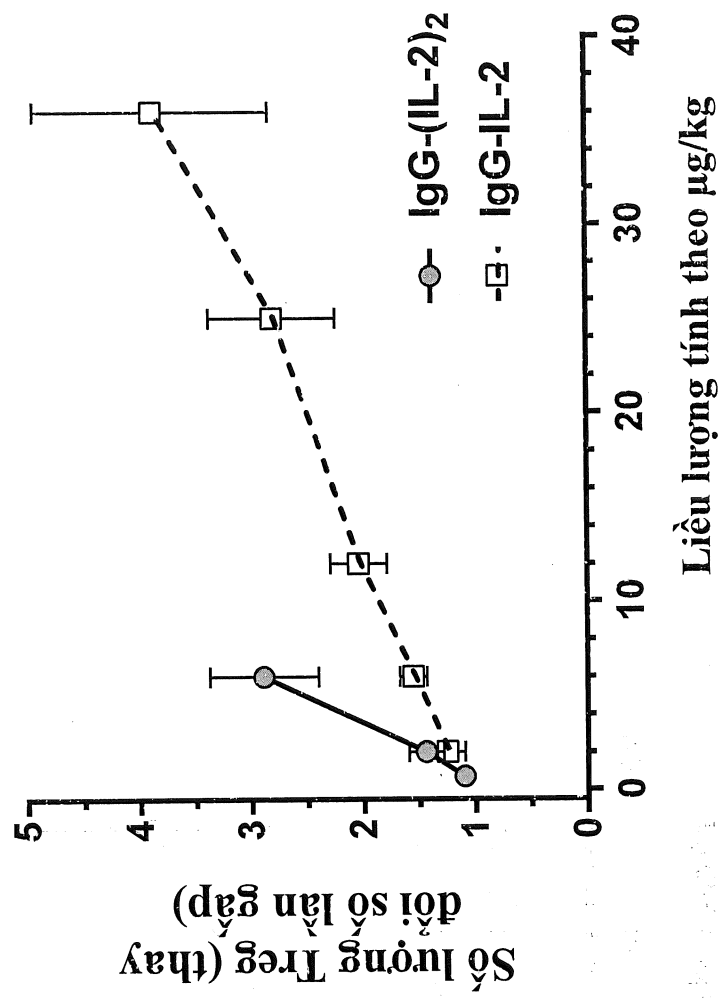
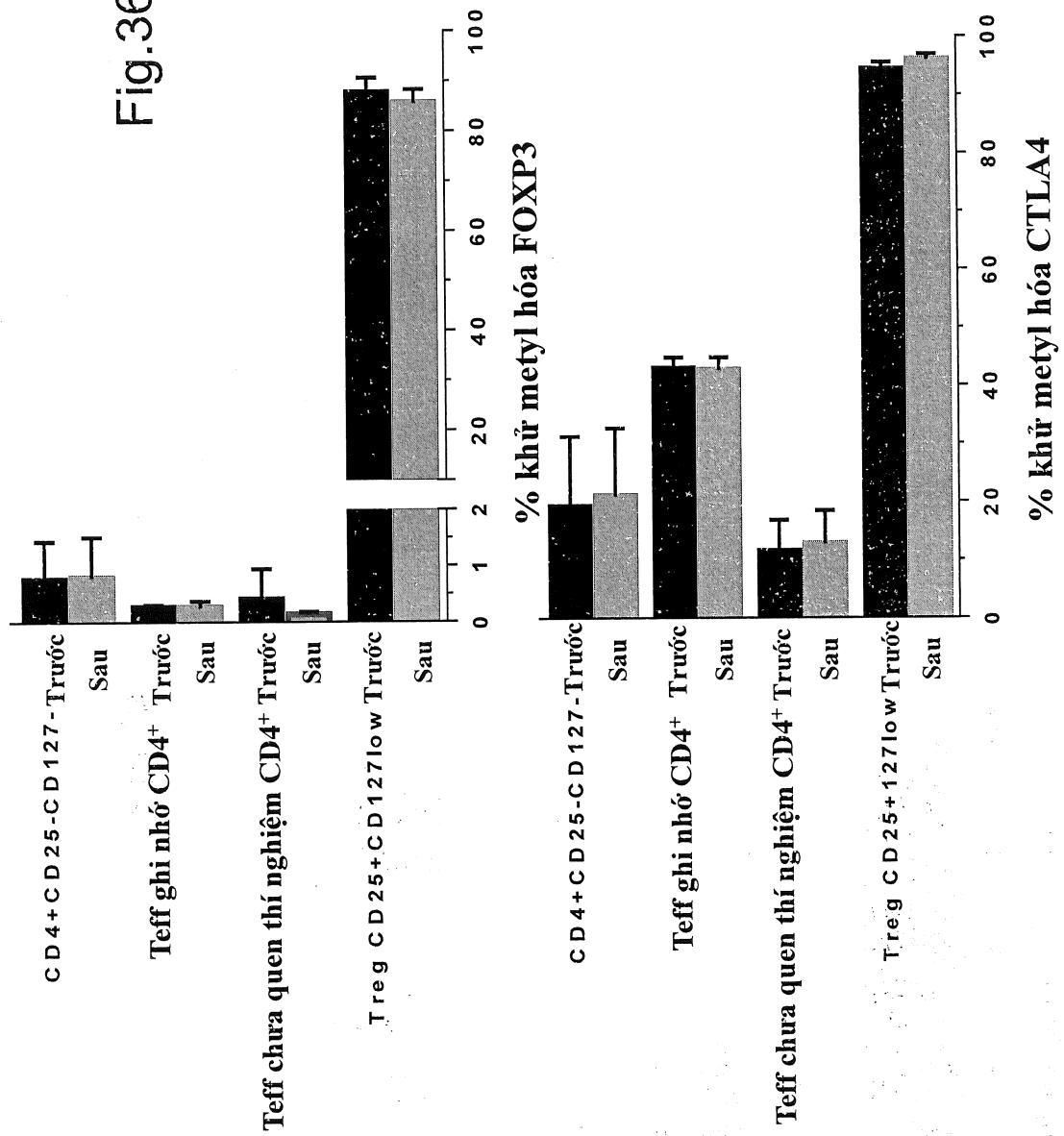


Fig.35

Fig.36



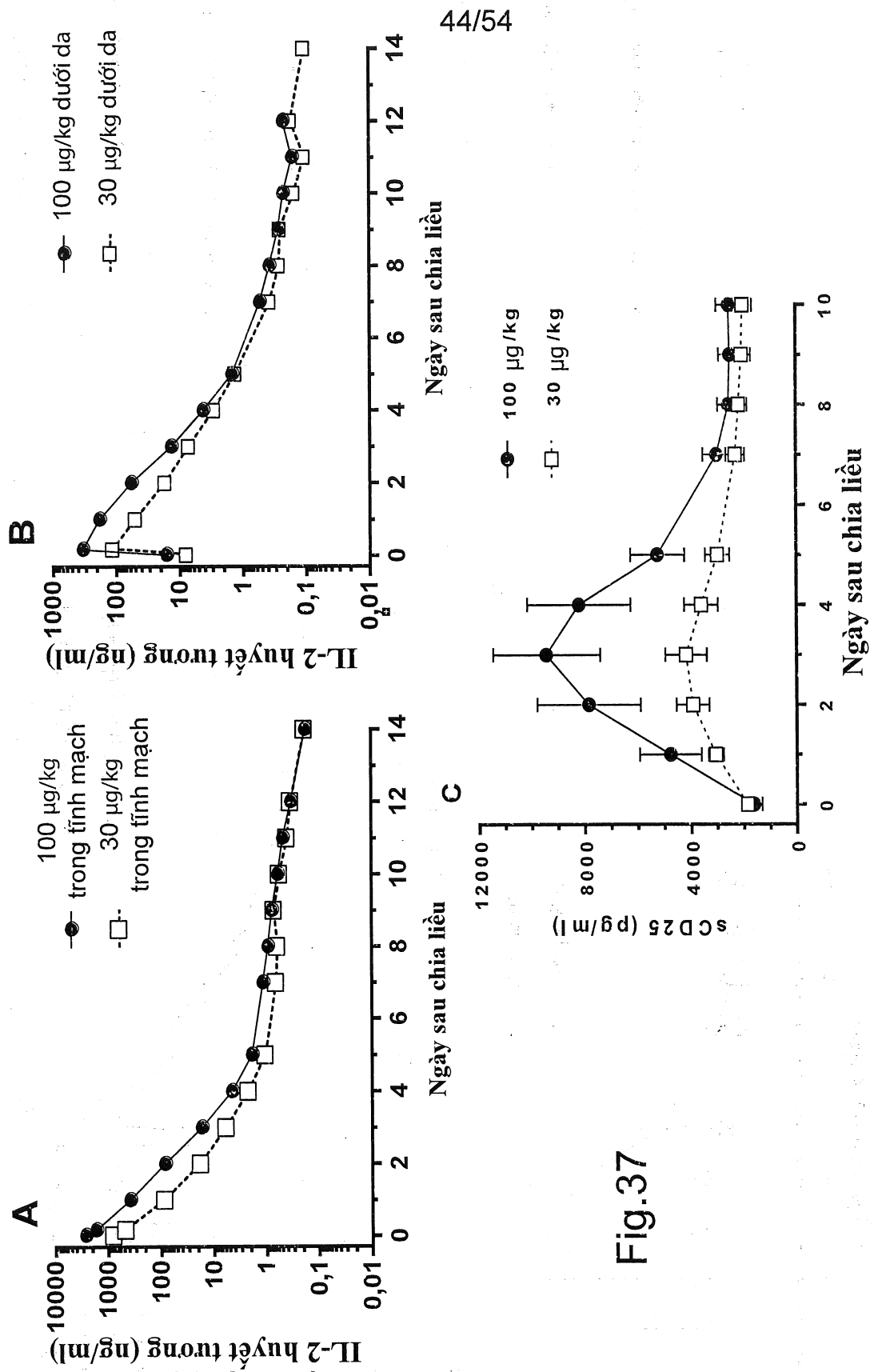
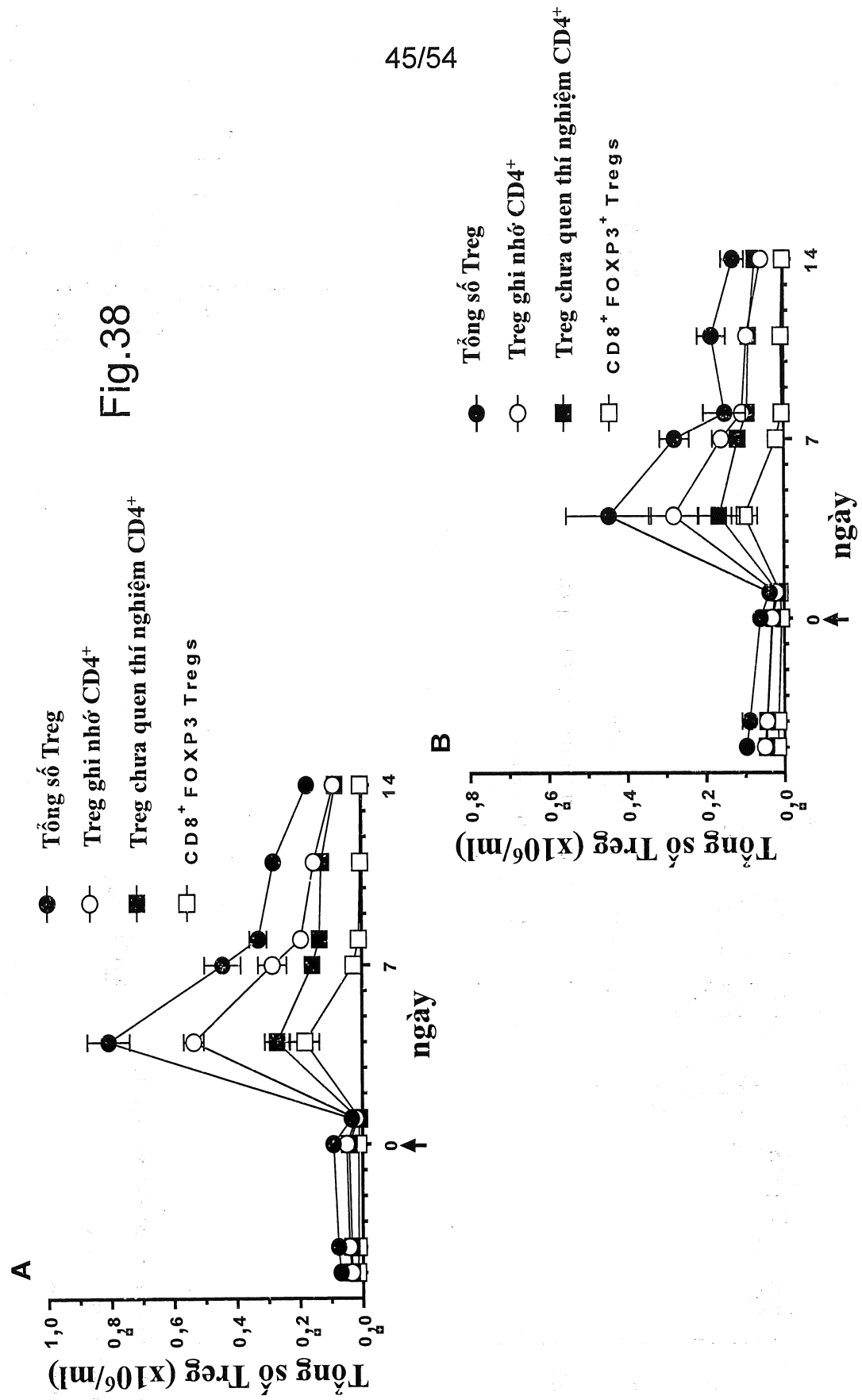


Fig.37

Fig.38



C

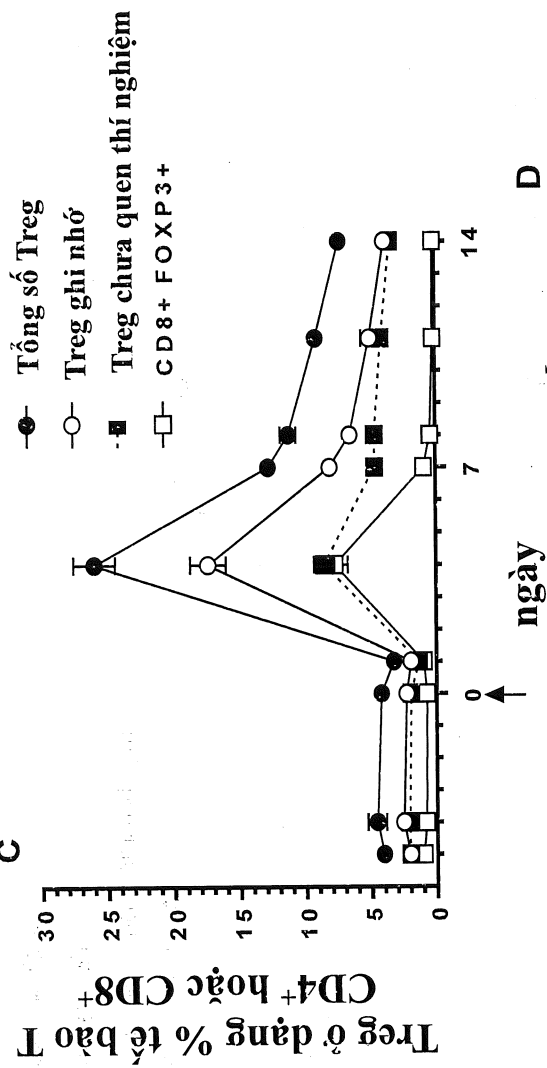
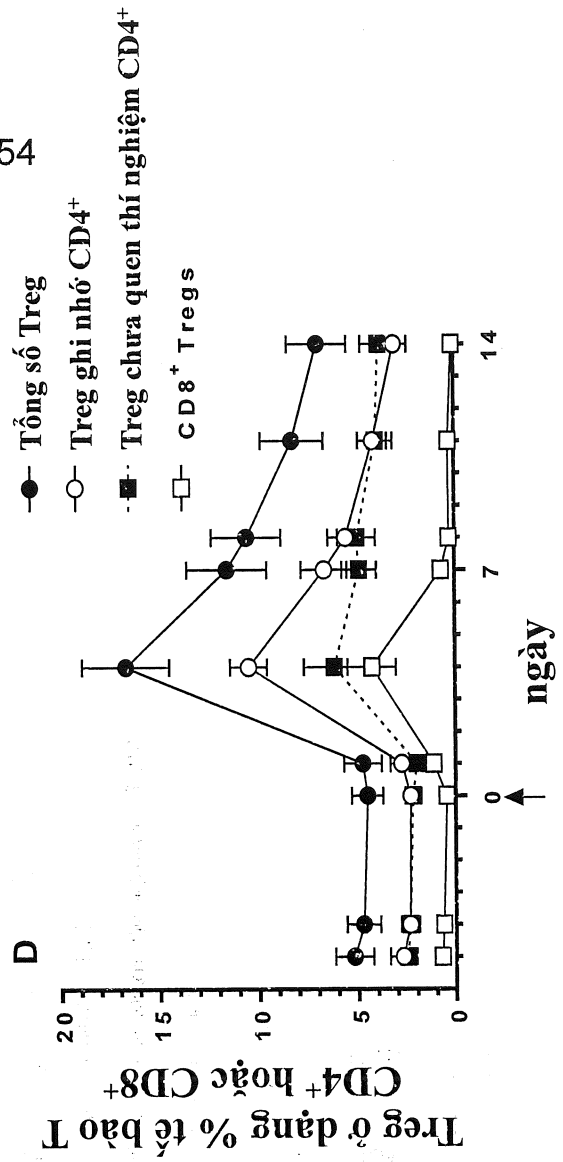


Fig.38

D



47/54

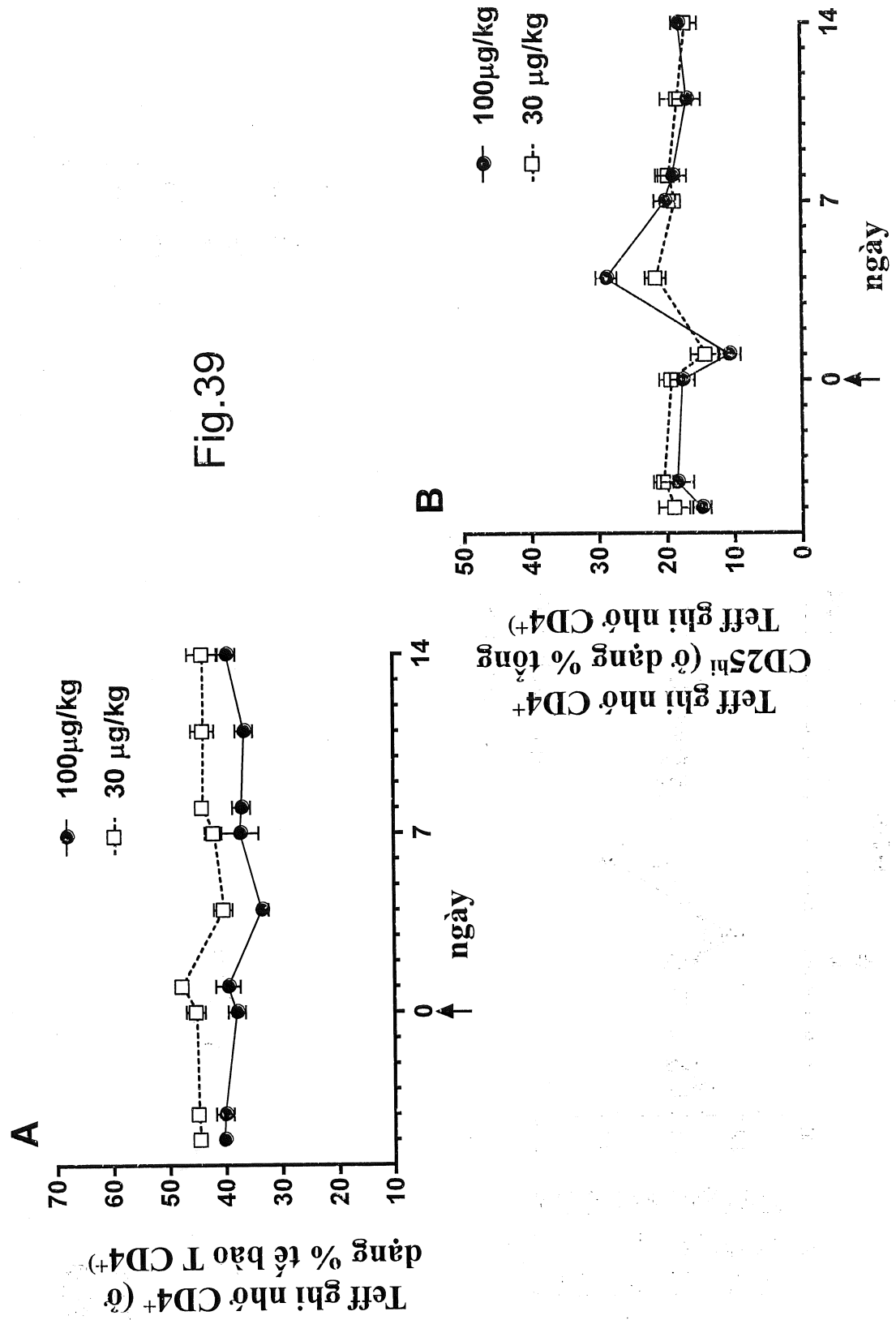


Fig.39

48/54

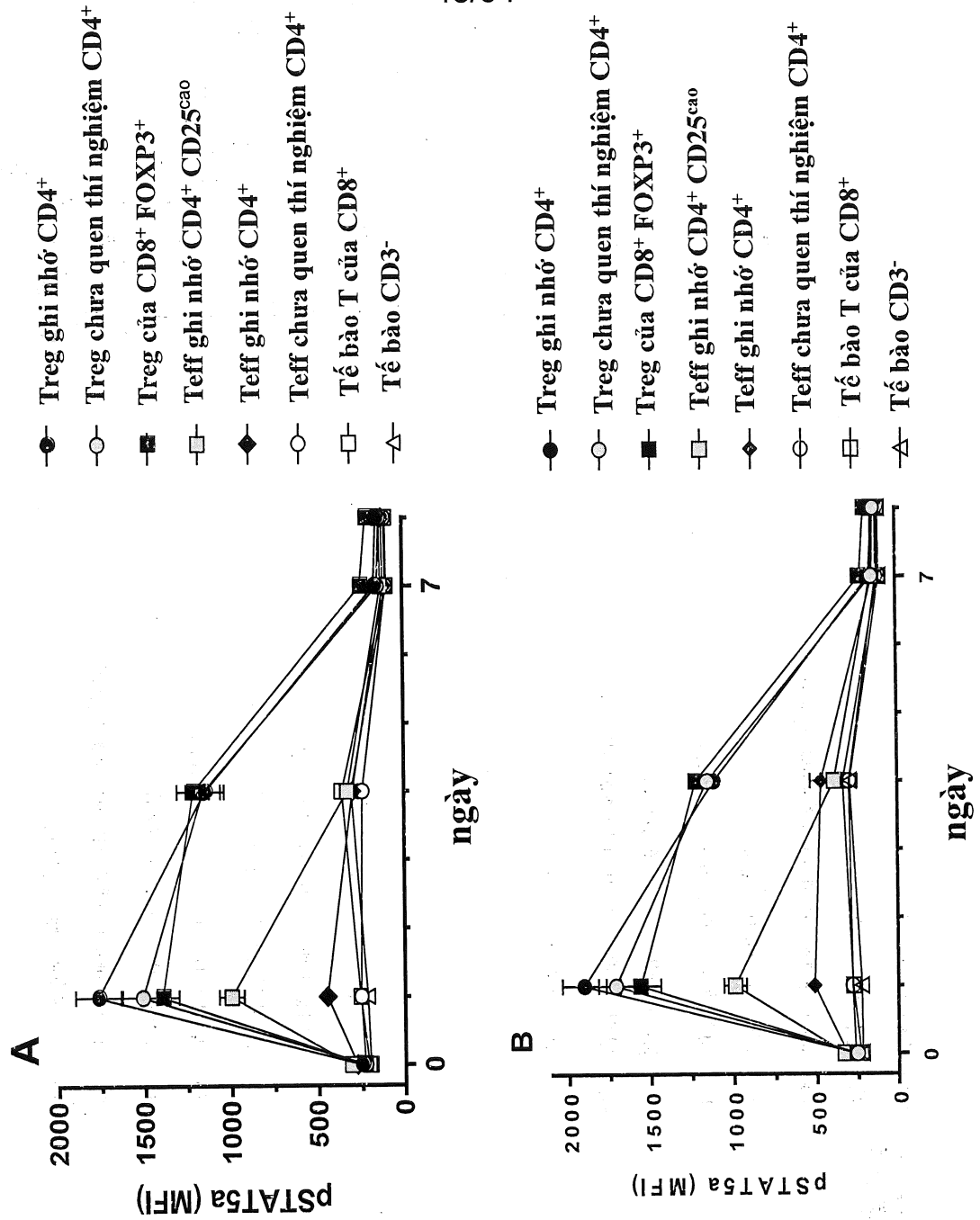
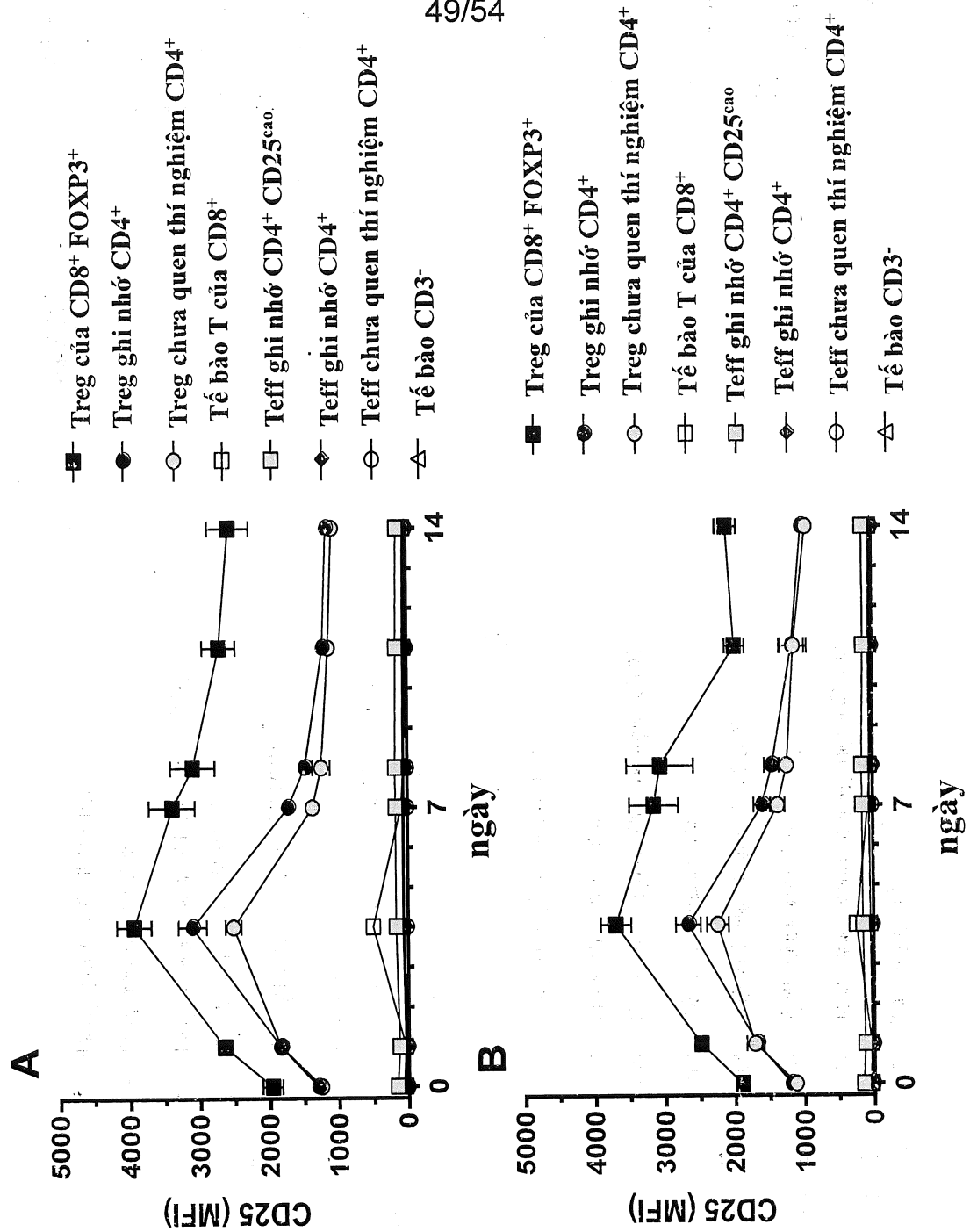
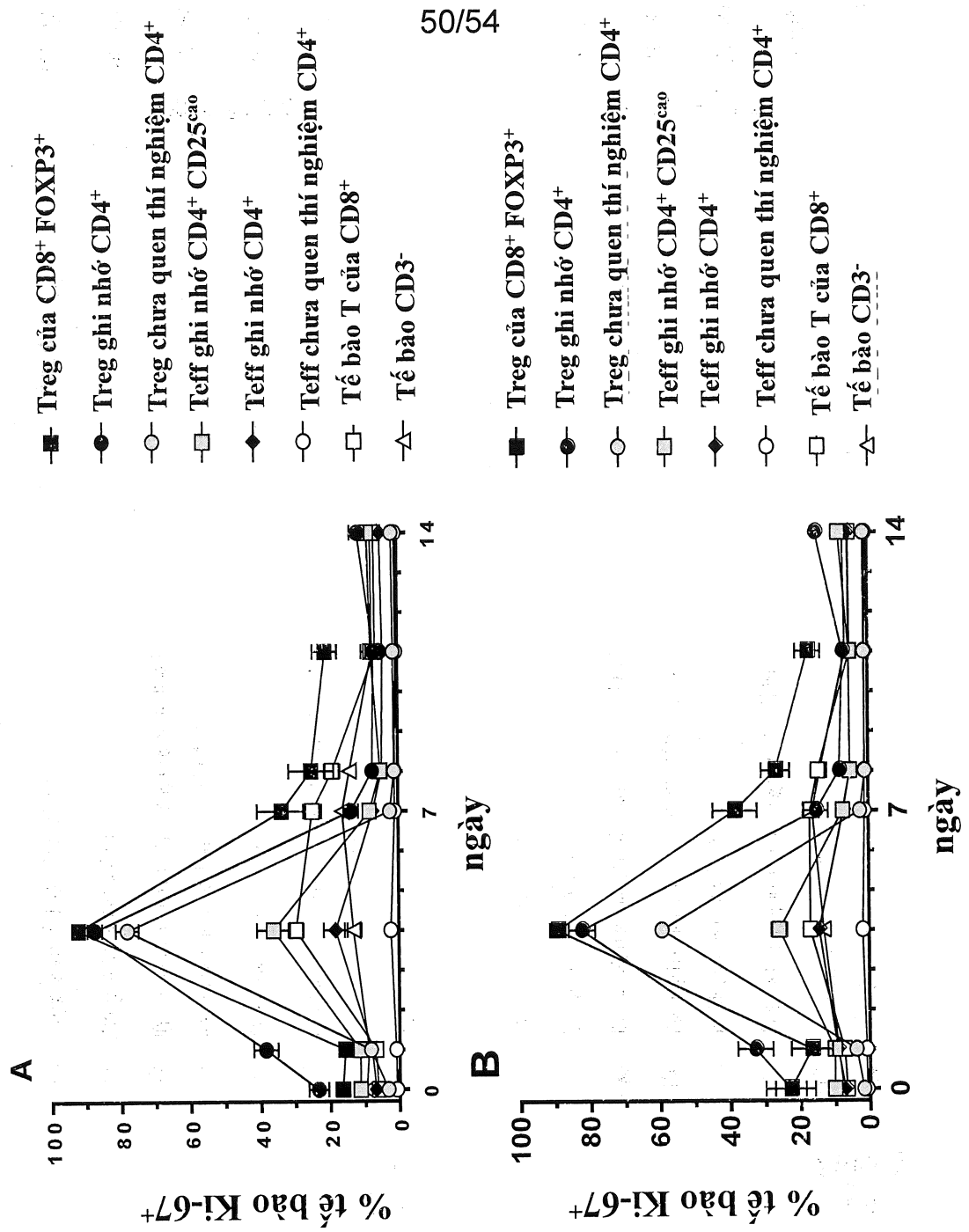


Fig.40

49/54





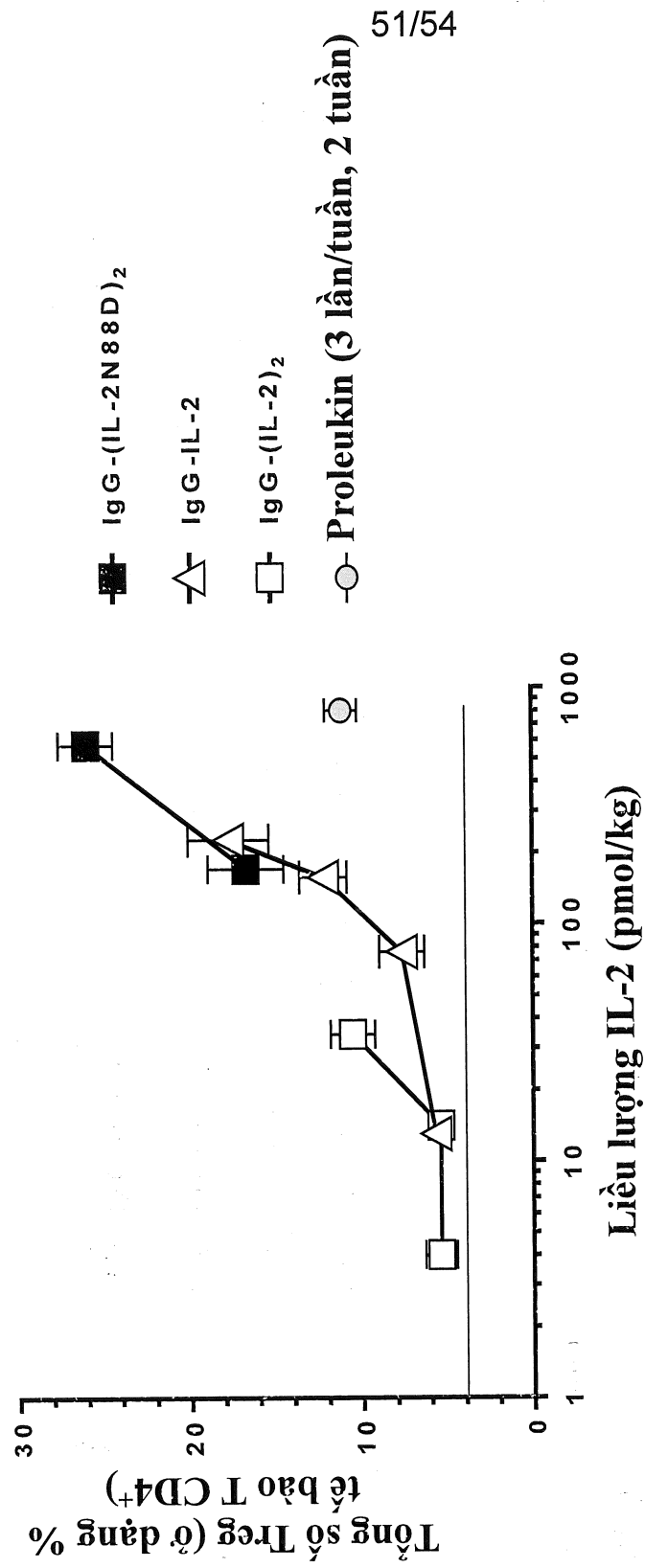
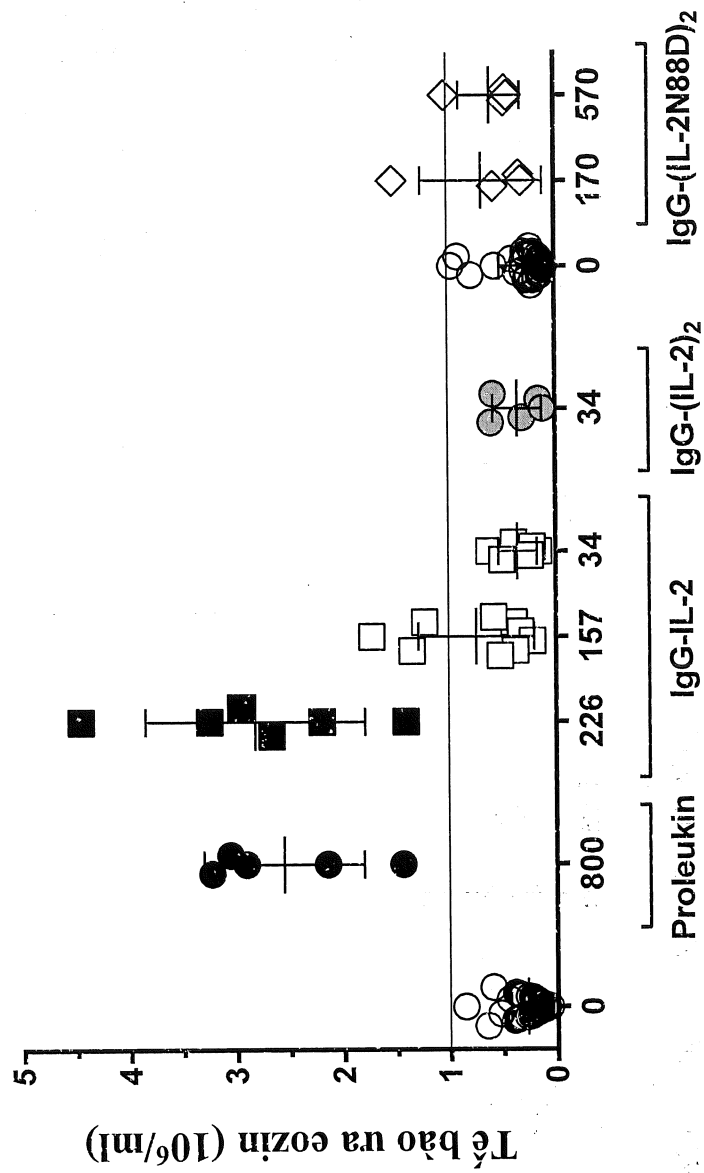


Fig.43



Liều lượng IL-2 tính theo pmol/kg

Fig.44



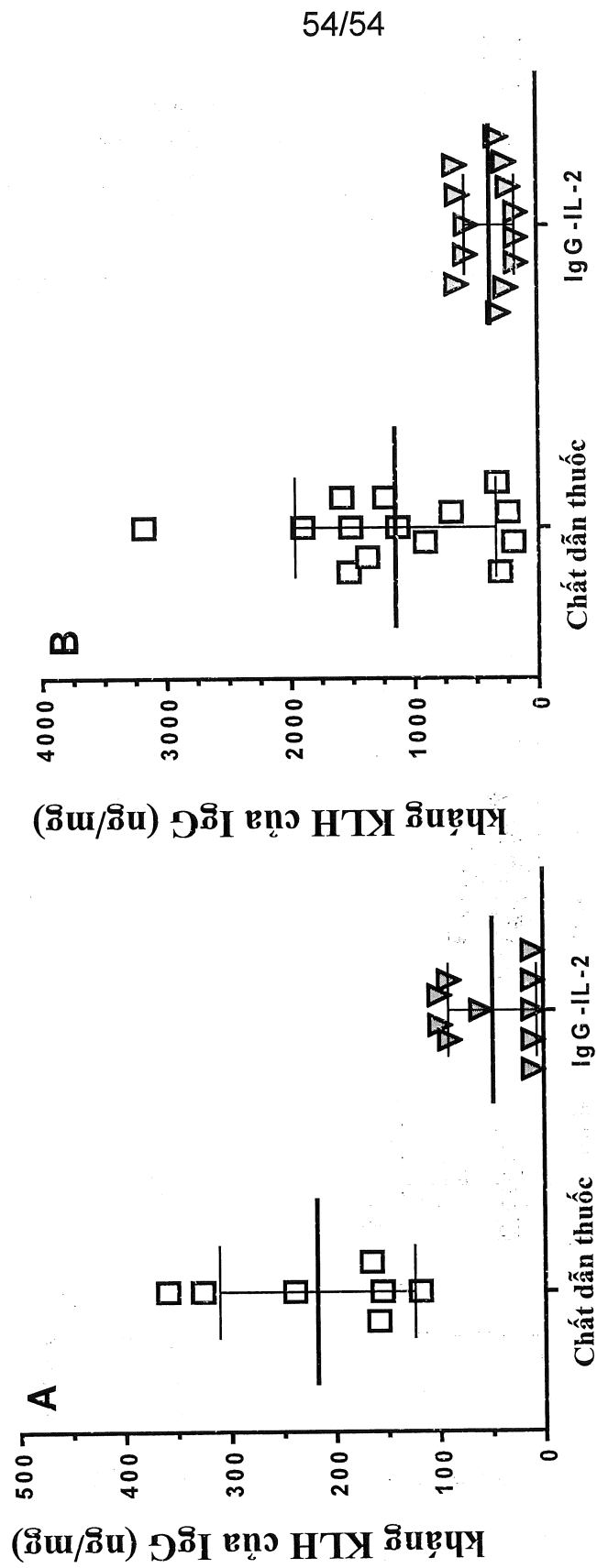


Fig.46