



(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)



1-0032591

(51)⁷ C07K 14/55; A61K 38/20

(13) B

(21) 1-2013-01350

(22) 10/11/2011

(86) PCT/CU2011/000007 10/11/2011

(87) WO2012/062228 18/05/2012

(30) P/2010/216 12/11/2010 CU

(45) 25/07/2022 412

(43) 25/12/2013 309A

(73) CENTRO DE INMUNOLOGIA MOLECULAR (CU)

Calle 216 Esq. a 15, Atabey, Playa., La Habana 11600, Cuba

(72) LEÓN MONZÓN Kalet (CU); CARMENATE PORTILLA Tania (CU); PÉREZ RODRÍGUEZ Saumel (CU); ENAMORADO ESCALONA Neris Michel (CU); LAGE DAVILA Agustón Bienvenido (CU).

(74) Công ty Luật TNHH Phạm và Liên danh (PHAM & ASSOCIATES)

(54) POLYPEPTIT CHỦ VẬN PHÂN LẬP ĐƯỢC CỦA IL-2, PROTEIN DUNG HỢP VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA POLYPEPTIT NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến polypeptit có trình tự cơ bản giống với IL-2 của người, chỉ khác ở một vài axit amin đã được gây đột biến. Các đột biến này được đưa vào làm giảm về cơ bản khả năng kích thích *in vitro* và *in vivo* các tế bào T điều hoà (T CD4+CD25+FoxP3+) của polypeptit này và làm cho chúng hiệu quả hơn trong việc điều trị khối u có thể cấy ghép được của chuột. Các biến thể đột biến này có thể được sử dụng, ở dạng riêng rẽ hoặc kết hợp với các vaccin, để điều trị các bệnh như bệnh ung thư hoặc nhiễm khuẩn có liên quan tới hoạt tính của các tế bào T điều hoà (Tregs). Sáng chế còn đề cập đến dược phẩm chứa hoạt chất chính là polypeptit này. Ngoài ra, polypeptit và dược phẩm theo sáng chế có khả năng điều biến hệ miễn dịch đối với các bệnh như bệnh ung thư và các bệnh lây nhiễm mạn tính.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến lĩnh vực miễn dịch học. Cụ thể, sáng chế đề cập đến các chất tương tự phân tử tự nhiên có tác động chủ vận của phân tử gốc, nhưng bất ngờ là chúng có tác dụng điều trị vượt trội để điều biến hệ miễn dịch trong trị liệu.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Interleukin 2 (IL-2) là yếu tố tăng trưởng đầu tiên được mô tả đối với tế bào T. Từ khi được phát hiện, nó đã thể hiện khả năng thúc đẩy mạnh mẽ sự tăng sinh và sống sót của tế bào T *in vitro* (Smith, KA (1988) Science. 240, 1169-76) cũng như làm tăng đáp ứng miễn dịch của tế bào T *in vivo*, trong trường hợp nhiễm virus T (Blattman, JN, et al. (2003) Nat Med 9, 540-7) hoặc dùng vaccin (Fishman, M., et al. (2008) J Immunother. 31, 72-80, Kudo-Saito, C., et al. (2007) Cancer Immunol Immunother. 56, 1897-910; Lin, CT, et al. (2007) Immunol Lett. 114, 86-93). Tuy nhiên, vai trò kinh điển này của IL-2 như là gen khởi đầu của đáp ứng miễn dịch T gần đây đã bị nghi ngờ bởi nhiều số liệu thử nghiệm (Almeida, A.R., et al. (2002) J Immunol. 169, 4850-60; de la Rosa, M., et al. (2004) Eur J Immunol. 34, 2480-8; Malek, T.R., et al. (2004) Nat Rev Immunol. 4, 665-74) cho thấy rằng xytokin này là yếu tố tăng trưởng nội môi đối với tế bào T điều hòa tự nhiên CD4 + CD25 + FoxP3 + (Tregs).

Interleukin-2 cũng đã được cho là có vai trò chủ yếu trong cơ chế theo đó tế bào T điều hòa ức chế hoạt tính và phát triển các tế bào hiệu ứng khác như tế bào T trợ giúp CD4, tế bào T độc CD8 và tế bào giết tự nhiên NK. Đặc biệt, gần đây đã có ý kiến rằng tế bào T điều hòa ức chế các tế bào T khác, gây ra sự giảm cục bộ mức IL-2 (Pandiyani, P., et al. (2007) Nat Immunol. 8, 1353-1362). Tác dụng ngăn chặn này dựa trên: a) khả năng của chúng ức chế trực tiếp các tế bào T hiệu ứng sản xuất IL-2 mới (Almeida, A.R., et al. (2002) J Immunol. 169, 4850-60; Takahashi, T., et al. (1998) Int Immunol. 10, 1969-80; Thornton, A.M., et al. (1998) J Exp Med. 188, 287-96; Wolf, M., et al. (2001) Eur J Immunol. 31, 1637-45); b) khả năng cô lập, tiêu thụ và làm suy biến một cách nhanh chóng IL-2 trong vi môi trường của chúng (Pandiyani, P., et al. (2007) Nat Immunol. 8, 1353-62); và c) khả năng biểu hiện quá mức chuỗi thụ thể alpha IL-2 (Kuniyasu, Y., et al. (2000) Int Immunol. 12, 1145-55), cho phép chúng sử dụng IL-2 hiệu quả hơn khi ở nồng độ thấp.

Tóm lại, IL-2 là xytokin đa tác động cao có ý nghĩa quan trọng đối với hoạt tính sinh học của các quần thể tế bào khác nhau. Đặc tính này làm cho IL-2 là nút quan trọng trong việc điều hòa đáp ứng miễn dịch, làm cho nó là đích hấp dẫn đối với các phép trị liệu và điều biến miễn dịch phức tạp.

IL-2 đã được sử dụng vài năm trong điều trị bệnh ung thư. Đặc biệt, việc sử dụng nó với liều cao là phép trị liệu đã được phê chuẩn ở một số quốc gia để điều trị u melanin và bệnh caxinom tế bào thận. Tuy nhiên, việc sử dụng trực tiếp IL-2 ở bệnh nhân bị hạn chế khắt khe do tác dụng gây độc và hiệu quả thấp của nó. Đến mức mà chỉ có 20% bệnh nhân thích hợp được tiếp tục trị liệu bằng IL-2 và chỉ có 17% bệnh nhân thể hiện đáp ứng khách quan. Một cách có thể giải thích sự thất bại bất ngờ này trong giai đoạn lâm sàng là việc trị liệu bằng IL-2 nguyên thể cũng kích thích các quần thể tế bào T điều hòa (Ahmadzadeh, M., *et al.* (2006) *Blood*. 107, 2409-14) cản trở sự kích thích miễn dịch mong muốn. Ngày nay, nhiều bằng chứng tiền lâm sàng đã khẳng định ý kiến này. Cụ thể, các thí nghiệm trên mô hình chuột cho thấy rằng hoạt tính cơ bản của IL-2 được tiêm *in vivo* là việc phát triển nội cân bằng của các tế bào T điều hòa tự nhiên.

Một số phương pháp đã được nghiên cứu để làm giảm tác dụng gây độc của việc trị liệu bằng IL-2. Một số trong các phương pháp này dựa trên việc sử dụng các biến thể đột biến của IL-2, được thiết kế để làm tăng khả năng tạo tín hiệu của phân tử này chủ yếu bằng thụ thể có ái lực cao (chuỗi alpha, beta và gama) và không phải bằng thụ thể ái lực trung bình (chuỗi beta và gama). Ý tưởng cơ bản là thúc đẩy việc tạo tín hiệu ở tế bào T thay vì tạo tín hiệu ở tế bào NK là các tế bào được cho là chịu trách nhiệm về các tác dụng gây độc quan sát được. Các sáng chế sau có cùng cơ chế: Patent Mỹ số 7,186,804, patent Mỹ số 7,105,653, patent Mỹ số 6,955,807, patent Mỹ số 5,229,109, đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 20050142106. Cần lưu ý rằng không có sáng chế nào trên đây đề cập đến các mutein IL-2 có hiệu quả trị liệu tốt hơn so với IL-2 nguyên thể dựa vào khả năng kích thích các tế bào T điều hòa tự nhiên giảm đi của chúng.

Các biến thể đột biến khác của IL-2 đã được tạo ra với mục đích là làm tăng tác dụng dược lý của chúng nhờ, ví dụ, cải thiện việc tạo nếp gấp hoặc làm tăng thời gian tồn tại của chúng trong máu. Trong các sáng chế khác thì các sáng chế sau có cùng cơ chế: Patent Mỹ số 4,959,314, patent Mỹ số 5,116,943, patent Mỹ số 4,853,332. Ngoài ra, không có mutein nào giảm khả năng hoạt hóa các tế bào T điều hòa hoặc thể hiện hiệu quả trị liệu tốt hơn.

Cuối cùng, cần chỉ ra rằng trong tài liệu có nhiều đề xuất về các chất trị liệu có thể điều biến hoặc làm giảm hoạt tính của tế bào T điều hòa *in vivo* (Kreitman, R.J. (2009) *Curr Pharm Des.* 15, 2652-64; Litzinger, M.T., Fernando, R., Curiel, T.J., Grosenbach, D.W., Schlom, J. và Palena, C. (2007)

Blood. 110, 3192-201; Morse, M.A., Hobeika, A.C., Osada, T., Serra, D., Niedzwiecki, D., Lyster, H.K. và Clay, T.M. (2008) Blood. 112, 610-8; Onizuka, S., Tawara, I., Shimizu, J., Sakaguchi, S., Fujita, T. và Nakayama, E. (1999) Cancer Res. 59, 312833; Quezada, S.A., Peggs, K.S., Curran, M.A. và Allison, J.P. (2006) J Clin Invest. 116, 1935-45). Các chất trị liệu này đã được thử nghiệm trong các mô hình động vật và ngay cả trên bệnh nhân để trị liệu trực tiếp bệnh ung thư hoặc làm tăng tác dụng của vacxin. Cũng có một số báo cáo đề xuất việc điều biến hoạt tính của IL-2, đặc biệt là bằng các kháng thể đơn dòng (Boyman, O., Kovar, M., Rubinstein, M.P., Surh, C.D. và Sprent, J. (2006) Science. 311, 1924-1927; Boyman, O., et al. (2006) Expert Opin Biol Ther. 6, 1323-31; Kamimura, D., et al. (2006) J Immunol. 177, 306-14; Murakami, M., Sakamoto, A., Bender, J., Kappler, J. và Marrack, P. (2002) Proc Natl Acad Sci USA. 99, 8832-7; Tomala, J., Chmelova, H., Mrkvan, T., Rihova, B. và Kovar, M. (2009) J Immunol. 183, 4904-4912), để thúc đẩy tốt hơn hoặc hiệu quả hơn các đáp ứng miễn dịch. Tuy nhiên, theo hiểu biết của các tác giả sáng chế, không có báo cáo nào trong các tài liệu này, dựa vào các biến thể đột biến của IL-2, cho thấy khả năng thu được hiệu quả trị liệu tốt hơn dựa vào khả năng kích thích các tế bào T điều hòa tự nhiên bị giảm.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất việc tạo ra các biến thể đột biến của IL-2, có hiệu quả điều trị cao hơn so với IL-2 nguyên thể ở mô hình u chuột có thể cấy ghép được. Các đột biến này khác biệt ở chỗ là chất chủ vận một phần của hoạt tính IL-2 và được chọn lọc do khả năng kích thích đặc biệt của chúng đối với các tế bào T điều hòa tự nhiên (T CD4+CD25 +FoxP3+) *in vitro* và/hoặc *in vivo*. Hiệu quả điều trị *in vivo* của mutein này là cơ sở của giải pháp thực tế để cải thiện hiệu quả điều trị của IL-2 ở khối u ác tính. Cụ thể, mutein này sẽ giúp khắc phục những hạn chế tồn tại trong điều trị bằng IL-2 nguyên thể nhờ khả năng phát triển các tế bào T điều hòa tự nhiên *in vivo*.

Sáng chế đề xuất polypeptit có trình tự ban đầu của chúng giống với IL-2 của người, chỉ khác ở một vài axit amin đã được gây đột biến. Các đột biến được đưa vào làm giảm về cơ bản khả năng kích thích các tế bào T điều hòa *in vitro* và *in vivo* (T CD4+CD25+FoxP3+) của polypeptit và thu được IL-2 với hiệu quả cao hơn trong việc điều trị chuột khối u có thể cấy ghép được. Các biến thể đột biến này có thể được sử dụng, riêng rẽ hoặc kết hợp với các vacxin,

để điều trị các bệnh như bệnh ung thư hoặc nhiễm khuẩn có liên quan đến hoạt tính của các tế bào T điều hoà (Tregs).

Sáng chế cho phép cải thiện đáng kể các phương pháp điều biến miễn dịch trên cơ sở IL-2 hiện nay, cả trong điều trị trực tiếp bệnh ung thư và kết hợp với các vacxin khác nhau. Cụ thể, việc thay thế IL-2 nguyên thể bằng các biến thể đột biến được mô tả trong bản mô tả này, sẽ ngăn ngừa việc phát triển các tế bào T điều hoà, dẫn đến làm giảm một cách đáng kể tác dụng điều trị mong muốn.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1. Thu nhận mutein. a) Biểu hiện của mutein ở chủng BL21DE3 của *E.coli* được đánh giá bằng điện di trên gel SDS-polyacrylamit (SDS-PAGE), Dải 1: Protein tổng của chủng BL21DE3, mẫu kiểm chứng biểu hiện âm tính; Dải 2 và 3: Hai ví dụ về các mức biểu hiện đạt được ở chủng này, mũi tên cho biết dải tương ứng với mutein. b) Sắc ký pha đảo thể hiện bước tinh chế protein cuối, mũi tên cho biết đỉnh tương ứng với protein đang quan tâm. c) Tinh chế mutein được đánh giá bằng SDS-PAGE 1: Kết quả của quá trình phân lập thể vùi, 2: mutein thu được sau khi tinh chế bằng pha đảo.

Fig. 2. Đánh giá đặc tính chủ vận của mutein IL-2. a) Đo bằng cách đếm tế bào dòng về khả năng gắn kết của mutein với bề mặt của dòng tế bào CTLL2. Cả IL-2 lẫn mutein được dò bằng cách sử dụng MAb nhãn kháng 6His b) Đồ thị cho thấy khả năng gây tăng sinh CTLL2 dòng tế bào T phụ thuộc IL-2 của mutein so với IL-2 nguyên thể. Mức tăng sinh này được đo bằng cách kết hợp MTT.

Fig. 3. Mutein không gây tăng sinh *in vitro* các tế bào T điều hoà. a) Đồ thị đếm tế bào dòng cho thấy độ tinh khiết của quần thể CD3+CD4+CD25+ được tinh chế từ hạch bạch huyết chuột C57BL/6. b) các tế bào Treg được kích thích *in vitro* bằng kháng CD3 mAb và IL-2 nguyên thể được dùng cho chúng ở nồng độ là 0,5 ng/mL hoặc mutein ở nồng độ là 32 ng/mL trong 72 giờ, đồ thị cho thấy số lượng các tế bào gan thu hồi được sau mỗi điều trị so với mẫu kiểm chứng không được bổ sung xytokin. Nồng độ đã chọn tương ứng với nồng độ tại đó mỗi phân tử gây ra cùng mức tăng sinh dòng CTLL2.

Fig. 4. đánh giá hiệu quả của việc điều trị bằng mutein đối với sự tăng sinh của quần thể tế bào. a) định lượng trọng lượng tương đối của lá lách chuột được xử lý bằng mutein trong 5 ngày. Trọng lượng lá lách của chuột được xử lý cao hơn về mặt thống kê so với trọng lượng lá lách của nhóm đối chứng. Thử nghiệm phi thông số Kruskal-Wallis và so sánh nhiều nhóm Dunn. b) đo quần thể các tế bào T CD8 +, đồ thị cho thấy tỷ lệ phần trăm của quần thể này.

Fig. 5. Mutein có hiệu quả hơn so với IL-2 nguyên thể trong việc làm giảm sự di căn ở mô hình khối u ác tính di căn thử nghiệm dòng MB16F0. a) ảnh chụp đại diện của phổi trong mỗi điều trị. b) định lượng mức di căn phổi trong mỗi nhóm.

Fig. 6. Điều trị kết hợp mutein và vacxin OVA/VSSP làm tăng hiệu quả kháng khối u của vacxin. Chuột có khối u được xử lý bằng vacxin OVA/VSSP riêng rẽ hoặc kết hợp với mutein. Đồ thị cho thấy sự phát triển của đường cong khối u, nhóm được xử lý bằng phác đồ kết hợp có mức phát triển của khối u giảm nhiều hơn, khác về mặt thống kê so với nhóm đối chứng.

Mô tả chi tiết sáng chế

Thu nhận polypeptit tương tự IL-2.

Sáng chế đề xuất polypeptit có chiều dài nằm trong khoảng từ 100 đến 500 axit amin, tốt hơn là có kích thước 140 gốc với trọng lượng phân tử biểu kiến bằng ít nhất 15 kD. Polypeptit này có mức tương đồng trình tự cao, lớn hơn 90%, với IL-2 nguyên thể. Trong vùng trình tự của chúng chứa từ 3 đến 6 đột biến so với IL-2 nguyên thể. Ở các vị trí này, polypeptit này được gây đột biến bằng cách đưa vào các gốc axit amin khác với các gốc axit amin ở cùng vị trí trong IL-2 nguyên thể. Các axit amin thay thế các gốc ban đầu được chọn lọc để có các đặc tính hóa lý hơi khác so với các gốc axit amin ban đầu, làm thay đổi gốc không phân cực thành phân cực, tích điện thành không tích điện, nhỏ thành lớn, bazơ thành axit, trong số những thay đổi khác.

Polypeptit theo sáng chế có thể được dùng để chỉ polypeptit điều biến miễn dịch, chất tương tự IL-2 hoặc mutein IL-2, trong số các tên gọi khác. Polypeptit này được thiết kế dựa trên cấu trúc 3D của phức hệ thụ thể IL-2 (sẵn có trong nguồn dữ liệu công khai PDB), đưa vào các đột biến chủ yếu ở các vị trí của IL-2 tương ứng với axit amin tiếp xúc đáng kể với dung môi và được bảo

toàn cao trong IL-2 so với các dạng khác (các trình tự thu được từ nguồn dữ liệu Swissprot). Axit amin tiếp xúc với các dạng dung môi trên đây được nhận diện bằng cách sử dụng các phần mềm tin sinh học để hiển thị cấu trúc protein như RASMOL, SwissPDBviewer hoặc các phần mềm khác. Các vị trí bảo toàn trong trình tự của IL-2 được nhận diện bằng cách sử dụng các phần mềm tin sinh học để sắp xếp nhiều trình tự, ví dụ, Fasta, ClusterW hoặc các phần mềm khác.

Polypeptit theo sáng chế này có thể thu được bằng các phương pháp khác nhau, bao gồm phương pháp tổng hợp protein. Chúng cũng có thể thu được bằng kỹ thuật di truyền, ví dụ, bằng cách biểu hiện chúng trong vi khuẩn như *E. coli* hoặc các vi khuẩn khác và cả ở trong các tế bào động vật có vú như các tế bào NSO hoặc các tế bào động vật có vú khác. Đột biến điểm ở các vị trí đặc hiệu cũng có thể thu được bằng kỹ thuật gây đột biến gen trực tiếp tại vị trí nhờ thử nghiệm phản ứng chuỗi polymeraza (PCR).

Bất ngờ là, các tác giả sáng chế đã phát hiện ra một lợi ích đáng kể của các đột biến này so với việc sử dụng truyền thống IL-2 nguyên thể. Lợi ích này là hiệu quả điều trị khối u của chúng tăng, xuất phát từ khả năng ngăn ngừa của chúng đối với việc phát triển của các tế bào T điều hoà.

Chọn lọc chất tương tự polypeptit của IL-2 về hoạt tính sinh học

Polypeptit theo sáng chế được chọn lọc bởi các đặc tính sau:

1) Tác động chủ vận của IL-2 nguyên thể. Đặc tính này có thể được đánh giá trực tiếp trong thử nghiệm tăng sinh *in-vitro* với dòng tế bào phụ thuộc IL-2 như CTLL2 hoặc Kitt225, hoặc với các thử nghiệm với hỗn hợp lymphô bào T của chuột và/hoặc người. Các mutein này phải có hoạt tính kích thích đặc hiệu thấp hơn từ 5 đến 50 lần so với hoạt tính của IL-2 nguyên thể trong các thử nghiệm này.

2) Việc mất khả năng, so với IL-2 nguyên thể, kích thích quần thể tế bào T điều hoà *in vitro* và/hoặc *in vivo*. Đặc tính này có thể được đánh giá, ví dụ, bằng cách nghiên cứu khả năng của mutein theo sáng chế so với mutein của IL-2 nguyên thể, để gây ra trực tiếp việc phát triển của các tế bào T CD4+CD25+, được tinh chế từ chuột nguyên thể và được kích thích bằng kháng thể kháng CD3 *in vitro*. Cũng có thể đánh giá bằng cách tiêm, tiêm trong màng bụng hoặc dưới da, các mutein này hoặc IL-2 nguyên thể

ở chuột, trong 5 ngày, và đánh giá hiệu quả của chúng đối với việc phát triển hoặc tăng tốc độ tăng sinh của quần thể tế bào T điều hoà (TCD4+CD25+FoxP3+). Hoạt tính của IL-2 đột biến trên các tế bào Treg phải thấp hơn ít nhất 1000 lần so với IL-2 nguyên thể trong các thử nghiệm này.

3) Hiệu quả điều trị đối với IL2 nguyên thể tăng ở các mô hình động vật. Đặc tính này có thể được đánh giá, ví dụ, bằng cách so sánh tác dụng kháng khối u hoặc chống di căn của mutein và IL-2 nguyên thể trong đơn điều trị mô hình khối u có thể cấy ghép được (ví dụ, khối u ác tính B16). Cũng có thể đánh giá thông qua hiệu quả tiềm năng của đáp ứng tế bào và/hoặc thể dịch đối với vacxin đang quan tâm. Mutein phải có hiệu quả điều trị cao hơn so với IL-2 nguyên thể ở các liều lượng chứa tổng lượng protein bằng nhau của IL-2 và mutein.

Cụ thể, sáng chế đề xuất mutein đặc hiệu trên Bảng 1. Các mutein này có nhiều thay thế axit amin giúp chúng có các đặc tính trên đây.

Bảng 1: Mutein được thiết kế có ba đặc tính cơ bản được mô tả trong sáng chế này. Các đột biến này được viện dẫn theo đánh số IL-2 của người.

Đột biến
R38K, F42I, Y45N, E62L, E68V
R38K, F42Q, Y45E, E68V
R38A, F42I, Y45N, E62L, E68V
R38K, F42K, Y45R, E62L, E68V
R38K, F42I, Y45E, E68V
R38A, F42A, Y45A, E62A

Sáng chế cũng bao gồm các cải biến bổ sung khác đối với lớp mutein IL-2 trên đây và đặc biệt là đối với các lớp được mô tả trong Bảng 1. Nó có thể làm tăng ái lực của chúng với thành phần đặc hiệu của thụ thể IL-2, mà không gây ảnh hưởng hoặc thậm chí giúp cải thiện đặc tính chủ vận của nó mà không kích thích các tế bào T điều hoà, hoặc để cải thiện được động học *in vivo* của chúng:

tăng thời gian bán huỷ hoặc giảm sự tiếp nhận chúng bởi các tế bào T. Các đột biến bổ sung này có thể thu được nhờ thiết kế hợp lý bằng công cụ tin sinh học, hoặc bằng cách sử dụng thư viện phân tử tổ hợp của trạng thái tự nhiên khác nhau (thư viện thực khuẩn thể, thư viện biểu hiện gen ở nấm hoặc vi khuẩn).

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất protein dung hợp bao gồm polypeptit điều biến miễn dịch bất kỳ trong số polypeptit điều biến miễn dịch được mô tả trên đây, kết hợp với protein vận chuyển. Protein vận chuyển có thể là albumin hoặc cùng Fc của globulin miễn dịch của người.

Ứng dụng điều trị của polypeptit tương tự IL-2;

Sáng chế này cũng đề xuất dược phẩm chứa hoạt chất mutein của IL-2 và chất tương tự của nó, và ứng dụng điều trị tiềm năng của nó để tăng cường đáp ứng miễn dịch tự nhiên hoặc do vacxin gây ra ở các bệnh như bệnh ung thư hoặc nhiễm khuẩn mạn tính trong đó các tế bào T điều hoà có liên quan một phần.

Nhằm mục đích điều trị, polypeptit theo sáng chế sẽ được dùng cho đối tượng mắc bệnh độc lập hoặc kết hợp với polypeptit khác hoặc chất khác tạo thuận lợi hoặc tăng cường tác động điều trị của nó. Đường dùng có thể là đường dùng bất kỳ được mô tả trong tình trạng kỹ thuật để dùng thuốc ngoài đường tiêu hóa. Tốt hơn là, nó được dùng tiêm tĩnh mạch, tiêm bắp, dưới da hoặc qua da.

Polypeptit được mô tả trong bản mô tả này cũng có thể được dùng dưới dạng một phần của dược phẩm được sử dụng trong điều trị bệnh ung thư và các bệnh lây nhiễm mạn tính hoặc để tăng cường đáp ứng tế bào và/hoặc thể dịch đối với các vacxin, dưới dạng thay thế cho IL2 nguyên thể. Polypeptit theo sáng chế có thể được sử dụng kết hợp với các vacxin trong điều trị bệnh ung thư hoặc với các vacxin phòng bệnh trong các bệnh lây nhiễm có liên quan tới tế bào T điều hoà.

Để thu được tác dụng điều trị mong muốn, polypeptit theo sáng chế phải được dùng ở liều lượng đủ cao để đảm bảo nồng độ của nó trong hạch lympho ngoại biên hoặc ở vị trí ngoại biên liên quan đến bệnh đang nghiên cứu và trong khoảng nồng độ trong đó đột biến có hiệu ứng miễn dịch-kích thích. Vì vậy, liều lượng đang nói đến phải được điều chỉnh theo dạng bệnh và đường dùng

đang nghiên cứu. Ví dụ trong trường hợp điều trị khối u, liều lượng phải được điều chỉnh để đạt được nồng độ của mutein bên trong khối u và/hoặc trong hạch lympho tại chỗ-vùng để đảm bảo kích thích đáp ứng miễn dịch kháng khối u. Khoảng liều lượng để thăm dò có thể nằm trong khoảng từ hàng trăm microgam đến hàng trăm miligam cho mỗi liều lượng. Đối với các ứng dụng trong đó mutein thay thế điều trị truyền thống bằng IL-2 nguyên thể, liều lượng mutein được sử dụng phải thấp hơn hoặc tương đương về hoạt tính (được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm với dòng CTLL2) với liều lượng truyền thống được sử dụng đối với IL-2 nguyên thể.

Số lần dùng cũng phải được điều chỉnh theo sự phân bố sinh học của mutein đang nói đến. Nói chung, mức hữu hiệu trên đây phải được duy trì trong khoảng thời gian từ 2 đến 30 ngày liên tục. Cần lưu ý rằng, ví dụ, nếu mutein được kết hợp với protein vận chuyển, tần suất dùng nó sẽ được điều chỉnh theo đó. Đối với các ứng dụng trong đó IL-2 nguyên thể được thay thế, phác đồ dùng mutein có thể tương tự với phác đồ được sử dụng trong điều trị truyền thống.

Tác động điều trị phải được hiểu là việc thuyên giảm hoàn toàn hoặc một phần các triệu chứng của bệnh. ở bệnh ung thư, giảm thể tích khối u hoặc tăng thời gian trước khi tái phát sẽ là, trong số những cái khác, tiêu chuẩn đánh giá mức thuyên giảm bệnh.

Polypeptit theo sáng chế đặc biệt hữu ích trong việc điều trị khối u như khối u ác tính và khối u thận.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1. Thiết kế mutein IL-2

Mutein được thiết kế theo tính toán, từ kỹ thuật tin sinh học, bằng cách sử dụng cơ sở cấu trúc đã báo cáo của IL-2 của người trong nguồn dữ liệu PDB (Ngân hàng dữ liệu Protein) và trình tự axit amin của IL-2 ở các loài khác nhau sẵn có trong Nguồn dữ liệu Swissprot. Một số mutein được thiết kế gồm từ 3 đến 6 đột biến (đưa vào thay thế axit amin không bảo toàn) in solvent-exposed và các gốc bảo toàn cao. Các đột biến này được biểu hiện trong *E.coli* từ cấu trúc plasmit trong vật truyền pET28a gồm trình tự đích gồm 6 histidin ở đầu tận amino. Mutein được tinh chế bằng pha đảo (Fig. 1) và thu được độ tinh khiết cao (> 95%). Mutein thu được được chọn từ các đặc tính của chúng trong thử

nghiệm thí nghiệm cả in vitro và in vivo, để cho thấy 3 đặc tính cơ bản được mô tả trong nội dung của sáng chế này. Tất cả các cấu trúc mutein Bảng 1 đều mô tả nhóm đột biến đặc hiệu có đặc tính mong muốn của chất chủ vận có hoạt tính của IL-2 mà không kích thích các tế bào T điều hoà đáng kể và có hiệu quả điều trị cao hơn so với IL-2 nguyên thể trong điều trị khối u chuột có thể cấy ghép được. Bảng 2 cho thấy mutein được cấu trúc không có các đặc tính mong muốn.

Bảng 2: Cấu trúc mutein không có các đặc tính cơ bản được mô tả trong sáng chế này. Các đột biến được đánh số theo số IL-2 của người.

Đột biến
Q22V, Q126A, I129D, S130G
L18N, Q126Y, S130R
Q13Y, Q126Y, I129D, S130R
L18N, Q22V, T123A, I129D, S130R
R38A, F42A, Q126Y, I129D
Q126Y, I129D, E62L, E68V

Ví dụ 2. Chứng minh bản chất chủ vận của mutein IL-2 được thiết kế.

Fig. 2 minh họa cách mutein được đề cập trong Bảng 1 gắn kết với các hợp phần của thụ thể IL-2 trên bề mặt của dòng tế bào CTLL2 (Fig.2a). Cấu trúc mutein gắn kết với các tế bào CTLL2, đã biết có trên bề mặt của chúng cả thụ thể ái lực cao và thụ thể ái lực trung bình đối với IL-2. Gắn kết được dò trong thử nghiệm của các tác giả sáng chế đường như tương tự với gắn kết thu được với IL-2 nguyên thể. Fig. 2b minh họa khả năng của mutein được thể hiện trong Bảng 1 để kích thích sự phát triển của dòng tế bào CTLL2 (FIG. 2b). Các đột biến này hoạt động như chất chủ vận một phần của hoạt tính của IL-2 trong thử nghiệm này. Hoạt tính đặc hiệu của chúng thấp hơn trong khoảng từ 5 đến 50 lần so với hoạt tính của IL-2 nguyên thể.

Ví dụ 3. Hiệu quả của mutein IL-2 đối với tế bào T điều hoà.

Mutein được mô tả trong Bảng 1 có khả năng kích thích các tế bào T điều hoà in vitro rất thấp (Fig. 3). Như được thể hiện trong Fig. n^oy, trong khi

IL-2 nguyên thể có thể gây ra tăng sinh mạnh các tế bào T điều hoà (T CD4+CD25+FoxP3+) đã được kích thích bằng kháng thể kháng CD3 gắn kết mảng. Mutein được mô tả trong Bảng 1 có nồng độ chất cao hơn đáng kể so với nồng độ chất của IL-2 nguyên thể không kích thích các tế bào T điều hoà. Cần phải bổ sung rằng các kết quả được mô tả trên đây là hợp lý ngay cả khi số lượng mutein sử dụng tăng đến mức sử dụng một lượng tương đương về hoạt tính với IL-2 nguyên thể trong thử nghiệm tăng sinh với dòng CTLL2. Mutein được mô tả trong Bảng 1 thường có khả năng kích thích các tế bào T điều hoà thấp hơn ít nhất 1000 lần so với khả năng kích thích của IL-2 nguyên thể

Ví dụ 4. Xác định đặc điểm của hoạt tính kích thích miễn dịch *in vivo* của mutein được thiết kế.

Mutein được mô tả trong Bảng 1 có khả năng kích thích miễn dịch *in vivo* tăng. Các Fig. 4 a, b thể hiện cách mutein gây ra chứng to lá lách lớn hơn so với IL2 nguyên thể ở chuột nguyên thể, sau khi điều trị trong 5 ngày bằng hai liều lượng hằng ngày là 20 ug mutein được dùng qua con đường tiêm trong màng bụng. Điều này kích thích các yếu tố tương quan với mức tăng hiệu ứng quần thể rõ ràng, giống lymphô bào T CD8+. Như đã quan sát, có thể thấy rằng điều trị bằng các đột biến này không kích thích lan rộng các tế bào T điều hoà (T CD4+CD25+FoxP3+) trái ngược với những gì quan sát được trong trường hợp của IL2 nguyên thể (Fig. 4c, d).

Ví dụ 5. Đo hiệu quả điều trị của mutein ở mô hình chuột của khối u có thể cấy ghép được.

Việc tăng hiệu quả điều trị của mutein được thiết kế ở mô hình chuột của khối u có thể cấy ghép được đã được chứng minh. Mutein được mô tả trong Bảng 1 có hiệu quả điều trị tăng đối với sự di căn phổi ở mô hình khối u ác tính của chuột MB16. Fig. 5 thể hiện cách điều trị trong 5 ngày bằng hai liều lượng hằng ngày là 20 ug mutein trong Bảng 1 được dùng tiêm trong màng bụng có hiệu quả chống di căn mạnh, là đặc tính không quan sát được ở các nhóm được xử lý bằng cùng liều lượng IL-2 nguyên thể.

Ví dụ 6. Đo khả năng làm tăng cường hiệu quả vacxin kháng khối u của mutein

Khả năng của mutein được thiết kế, để làm tăng cường hiệu quả vaccin kháng khối u được chứng minh. Đã sử dụng mô hình khối u nguyên phát với dòng tế bào EG7, dòng tế bào khối u được cải biến di truyền để biểu hiện kháng nguyên OVA. Chuột có khối u được gây miễn dịch bằng kháng nguyên OVA được bổ trợ VSSP riêng rẽ, hoặc kết hợp với mutein. Fig. 6 cho thấy mức giảm sự phát triển của khối u là lớn hơn đối với chuột được xử lý bằng phác đồ kết hợp so với chuột chỉ được xử lý bằng vaccin.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Polypeptit chủ vận phân lập được của IL-2, khác biệt ở chỗ có 95% trình tự tương đồng với trình tự của IL-2 nguyên thể và trong đó polypeptit này được chọn từ nhóm bao gồm (i) polypeptit bao gồm các đột biến R38K, F42I, Y45N, E62L và E68V (SEQ ID NO. 1); (ii) polypeptit bao gồm các đột biến R38K, F42Q, Y45E và E68V (SEQ ID NO. 2); (iii) polypeptit bao gồm các đột biến R38A, F42I, Y45N, E62L và E68V (SEQ ID NO. 3); (iv) polypeptit bao gồm các đột biến R38K, F42K, Y45R, E62L và E68V (SEQ ID NO. 4); (v) polypeptit bao gồm các đột biến R38K, F42I, Y45E và E68V (SEQ ID NO. 5); (vi) R38A, F42A, Y45A và E62A (SEQ ID NO. 6).
2. Protein dung hợp bao gồm polypeptit bất kỳ trong số các polypeptit theo điểm 1 kết hợp với protein mang.
3. Protein dung hợp theo điểm 2, trong đó protein mang là albumin.
4. Protein dung hợp theo điểm 2 trong đó protein mang là vùng Fc của globulin miễn dịch của người.
5. Dược phẩm, khác biệt ở chỗ dược phẩm này chứa hoạt chất là polypeptit bất kỳ trong số các polypeptit theo điểm 1.
6. Dược phẩm, khác biệt ở chỗ dược phẩm này chứa hoạt chất là protein dung hợp bất kỳ trong số các protein dung hợp theo điểm 2 đến 4.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Centro de Inmunología Molecular

<120> POLYPEPTIT CHỦ VẬN PHÂN LẬP ĐƯỢC CỦA IL-2, PROTEIN DUNG HỢP VÀ ĐƯỢC PHẢI CHỨA POLYPEPTIT NÀY

<130> 402010CU00

<140> CU/P/2010/216

<141> 2010-11-12

<160> 6

<170> Phiên bản PatentIn 3.5

<210> 1

<211> 133

<212> PRT

<213> E. coli

<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 Lys Met Leu Thr Ile Lys Phe Asn Met Pro Lys
35 40 45

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

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

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

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

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

Ile Ser Thr Leu Thr
130

<210> 2

<211> 133

<212> PRT

<213> E. coli

<400> 2

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

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

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

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

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

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

Ile Ser Thr Leu Thr
130

<210> 3

<211> 133

<212> PRT

<213> E. coli

<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 Ala Met Leu Thr Ile Lys Phe Asn Met Pro Lys
35 40 45

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

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

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

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

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

Ile Ser Thr Leu Thr
130

<210> 4
<211> 133
<212> PRT
<213> E. coli

<400> 4

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

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

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

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

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

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

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

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

Ile Ser Thr Leu Thr
130

<210> 5
 <211> 133
 <212> PRT
 <213> E. coli

<400> 5

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

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

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

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

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

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

Ile Ser Thr Leu Thr
 130

<210> 6
 <211> 133
 <212> PRT
 <213> E. coli

<400> 6

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

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

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

Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Ala Leu Lys

50

55

60

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

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

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

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

Ile Ser Thr Leu Thr
130

Fig. 1

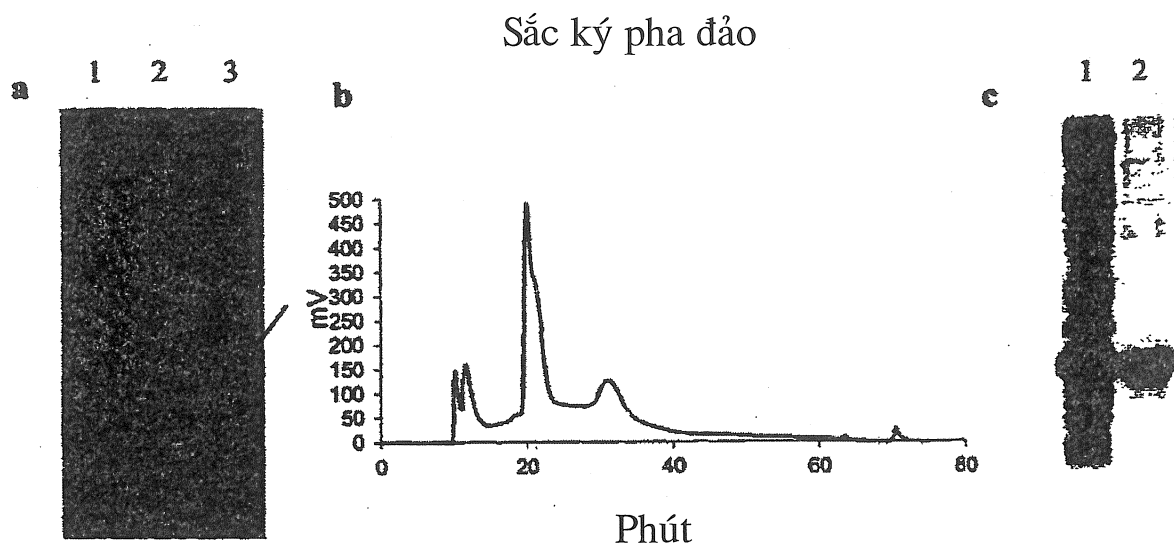
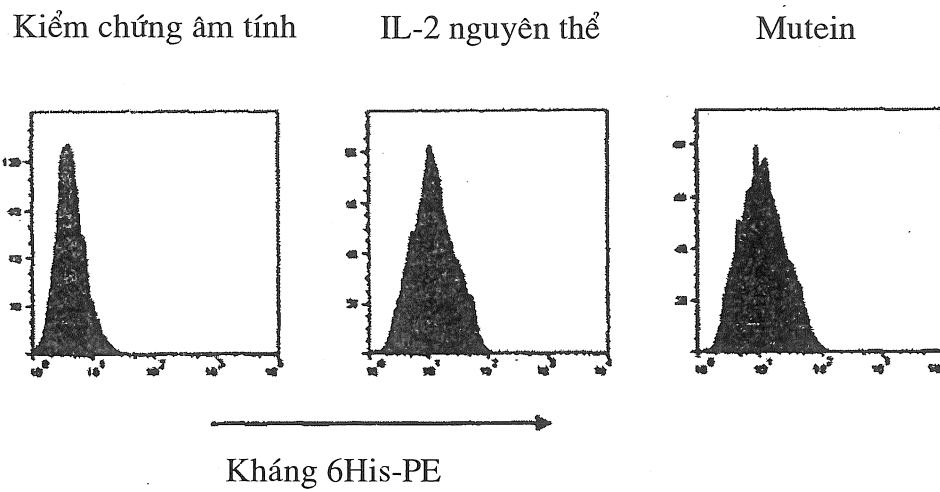


Fig. 2

a



b

Đường cong tăng sinh dòng tế bào CTLL2

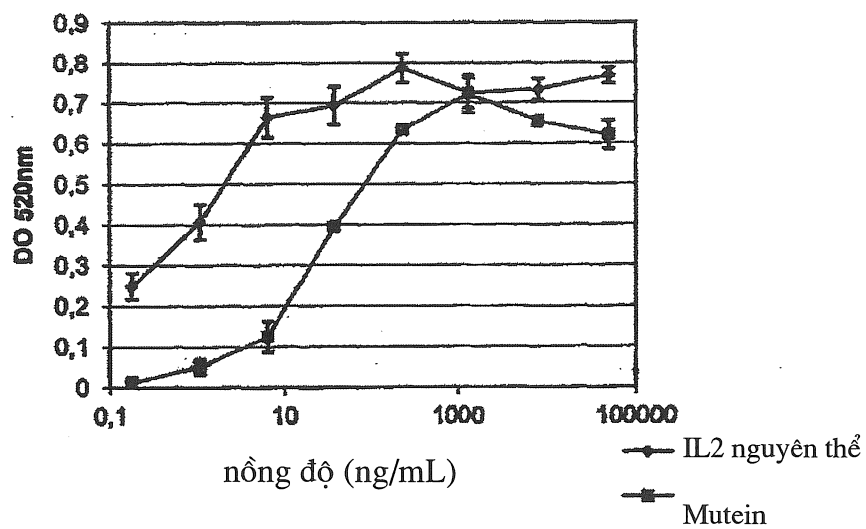
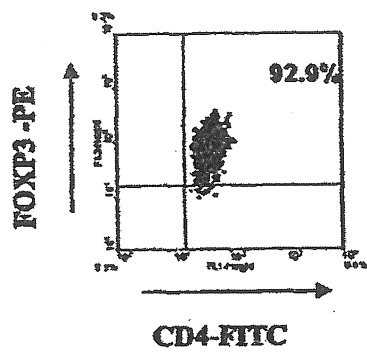


Fig. 3

A**B**

Tăng sinh tế bào T điều hòa

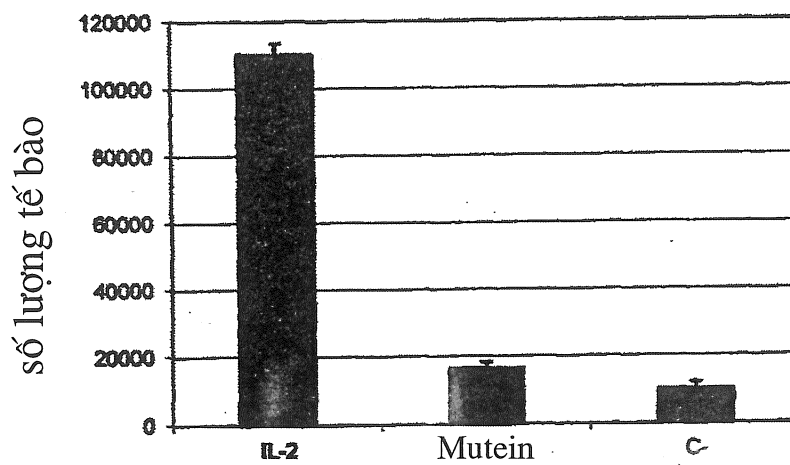


Fig. 4

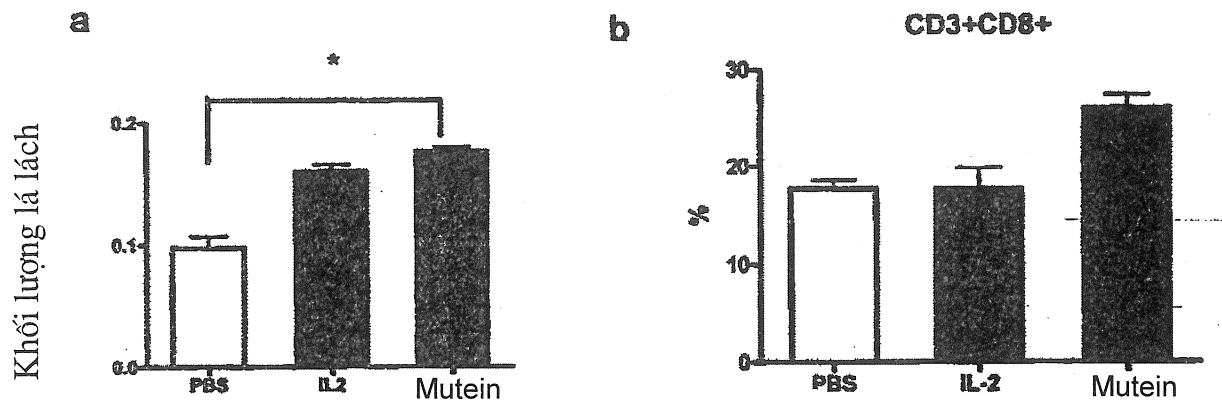
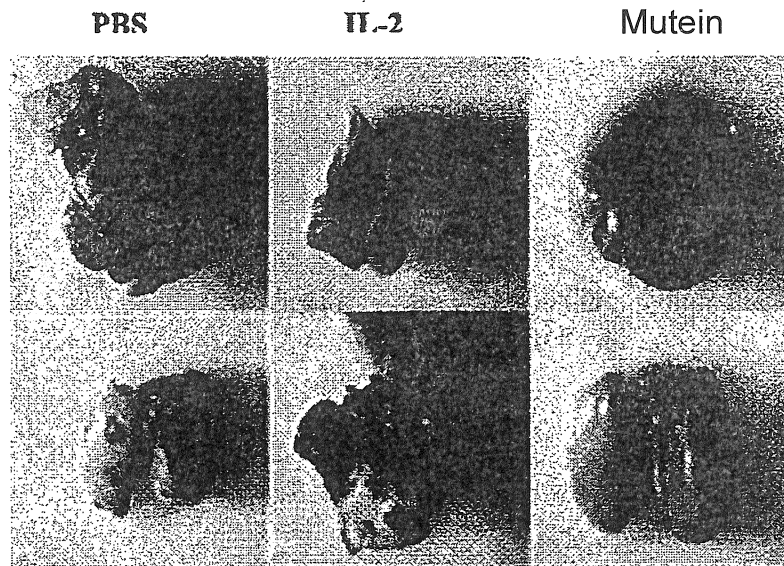


Fig. 5

a



b

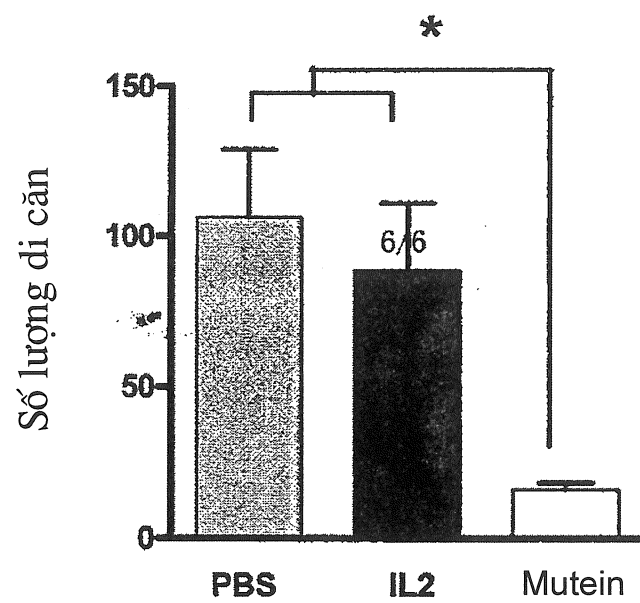


Fig. 6

