



(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)



1-0035606

(51)⁸ C07K 14/52; A61K 38/19; A61K 47/50 (13) B

(21) 1-2018-05201

(22) 19/04/2017

(86) PCT/KR2017/004199 19/04/2017

(87) WO 2017/188653 A1 02/11/2017

(30) 10-2016-0053018 29/04/2016 KR

(45) 25/05/2023 422

(43) 25/04/2019 373A

(73) YUHAN CORPORATION (KR)

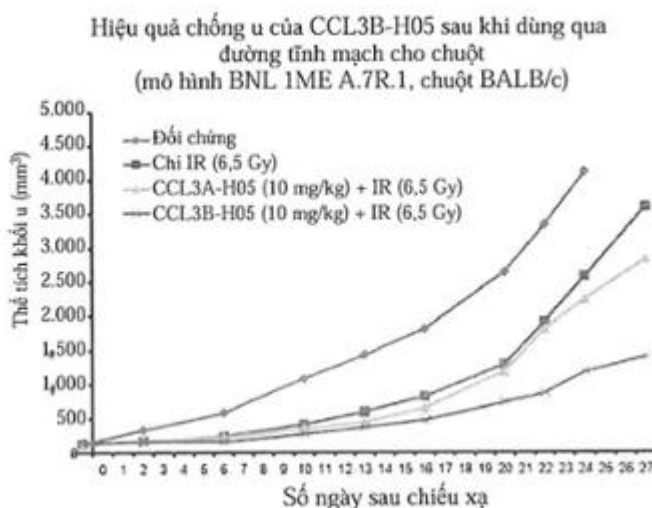
74, Noryangjin-ro, Dongjak-gu, Seoul, 06927, Republic of Korea

(72) NAM, Su Youn (KR); KIM, Jong Gyun (KR); CHOI, Byung Hyun (KR); LEE, June Hyung (KR); PARK, Ju Young (KR); LEE, Jun Kyung (KR); LEE, Na Rae (KR); KIM, Ki Hong (KR); KIM, Seul Gi (KR); OH, Se Woong (KR); SHIN, Seung Yub (KR); KANG, Ho Woong (KR); AHN, Su Jin (KR); CHUNG, Soo Yong (KR).

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

(54) PROTEIN DUNG HỢP BAO GỒM BIẾN THỂ PHỐI TỬ LOẠI CC 3 (CCL3),
AXIT NUCLEIC MÃ HÓA PROTEIN DUNG HỢP NÀY VÀ PHƯƠNG PHÁP
ĐIỀU CHẾ PROTEIN DUNG HỢP NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến protein dung hợp bao gồm biến thể CCL3 có tính ổn định *in vivo*, độ bền protein, và hoạt tính dược lý cải thiện, cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến protein dung hợp bao gồm biến thể CCL3 và vùng Fc của globulin miễn dịch làm tác nhân chữa bệnh cho chứng giảm lympho bào, bệnh ung thư hoặc bệnh lây nhiễm, trong đó axit amin đầu tận cùng N của CCL3 α hoặc CCL3 β kiểu đại được loại bỏ và axit amin ở vị trí đặc hiệu được thế bởi axit amin khác ở cùng vị trí của CCL3 α hoặc CCL3 β kiểu đại trong biến thể CCL3. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến axit nucleic mã hóa protein dung hợp này và phương pháp điều chế protein dung hợp này.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến protein dung hợp bao gồm biến thể CCL3 có tính ổn định in vivo, độ bền protein, và hoạt tính được lý cải thiện, cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến protein dung hợp bao gồm biến thể CCL3 và vùng Fc của globulin miễn dịch, và sử dụng chúng làm tác nhân chữa bệnh cho chúng giảm lympho bào, bệnh ung thư hoặc bệnh lây nhiễm, trong đó axit amin đầu tận cùng N của CCL3 α hoặc CCL3 β kiểu đại được loại bỏ và axit amin ở vị trí đặc hiệu được thế bởi axit amin khác ở cùng vị trí của CCL3 α hoặc CCL3 β kiểu đại trong biến thể CCL3.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Chemokin được tiết ra bởi các tế bào miễn dịch khác nhau dưới dạng các xytokin có tính hướng hóa chất và gắn vào các thụ thể chemokin được biểu hiện trong các tế bào miễn dịch để thúc đẩy tính di động in vivo của các tế bào miễn dịch. Trong số các chemokin, phối tử loại CC 3 (CCL3) là chemokin mà được tiết ra trong các tế bào miễn dịch bao gồm các tiểu thực bào và được biết là tham gia vào tính di động của các tế bào miễn dịch biểu hiện thụ thể loại CC CCR1/CCR5, như tế bào tua, tế bào T, bạch cầu đơn nhân, và bạch cầu trung tính (Cytokine & Growth Factor Reviews (2002) 13:455-481).

CCL3, được biết là protein đại thực bào gây viêm-1 α (MIP-1 α), chỉ có một typ phụ ở chuột, nhưng có hai typ phụ ở người (Cytokine & Growth Factor Reviews (2002) 13:455-481). Theo đó, CCL3 gồm typ α (LD78 α hoặc CCL3 α , dưới đây gọi là CCL3 α) có độ tương đồng với CCL3 của chuột và typ β (LD78 β hoặc CCL3 β , dưới đây gọi là CCL3 β) được tạo ra do sự đột biến gen trong quá trình tiến hóa.

Trong lĩnh vực kỹ thuật liên quan, biết rằng CCL3 ức chế quá trình phân chia và biệt hóa của các tế bào gốc tạo máu chưa trưởng thành trong tủy xương của chuột và có thể làm tăng nồng độ của các tế bào miễn dịch trong máu (Nat Rev Immunol.(2006) 6(2):159-64). Kết quả là, CCL3 đã được sử dụng làm đích cho tác nhân chữa bệnh để

điều trị chứng giảm lympho bào hay thấy ở các thuốc kháng ung thư khác nhau (Exp. Hematol. (1999) 27:195-202, Cytokine & Growth Factor Reviews (2002) 13:455-481). Ngoài ra, do CCL3 có tác dụng làm tăng nồng độ của các tế bào tua trong máu, biết rằng CCL3 có thể có tiềm năng làm tác nhân miễn dịch chống ung thư mới khi được kết hợp với phương pháp điều trị có khả năng bộc lộ kháng nguyên đặc hiệu khối u trong máu (Clin Cancer Res. (2008) 14(4):1159-1166, European Journal of Cancer (1998) 34(7):1023-1029).

Trong khi đó, do CCL3 có chu kỳ bán rã rất ngắn và có xu hướng dễ bị kết tủa, CCL3 không thích hợp để sử dụng làm tác nhân trị liệu sinh học mà không cần cải biến. Vì chu kỳ bán rã in vivo của CCL3 được tiêm trong tĩnh mạch vào cơ thể người chỉ ngắn khoảng 1,7 giờ hoặc ít hơn, nếu CCL3 được phát triển làm tác nhân chống ung thư hoặc tác nhân điều trị cho chứng giảm lympho bào, tác nhân này cần được dùng hàng ngày (European Journal of Cancer (1998) 34(7):1023-1029). Hơn nữa, CCL3 bị kết tủa do sự tạo chất polyme ngay cả khi ở nồng độ thấp là 0,1 mg/mL.

Do đó, để phát triển CCL3 làm thuốc hoặc tác nhân miễn dịch chống ung thư, biến thể CCL3 có thể được tạo ra bằng cách thế hoặc loại bỏ một số axit amin của CCL3 kiểu đại, và/hoặc protein dung hợp có thể được tạo ra bằng cách kết hợp polyme hoặc protein bổ sung với CCL3. Biết rằng chu kỳ bán rã có thể được tăng lên bằng cách kết hợp polyme hoặc protein bổ sung. Chẳng hạn, protein hoạt tính có thể được gắn vào albumin của người hoặc polyetylen glycol (PEG). Tuy nhiên, thời gian tồn tại chỉ tăng nhẹ khi gắn vào albumin của người, và ái lực gắn kết thụ thể có thể bị giảm do sự cản trở về không gian khi gắn với PEG.

Cần nhắc điều này, gần đây nhiều nghiên cứu và phát triển đã được thực hiện để làm tăng chu kỳ bán rã in vivo nhờ protein dung hợp được tạo ra bằng cách sử dụng globulin miễn dịch (Ig). Ig của người (hIg) gồm các lớp khác nhau, như IgG, IgM, IgA, IgD, và IgE, và có thể còn được phân loại thành nhiều typ phụ khác nhau được biết là IgG1 của người (hIgG1), IgG2 của người (hIgG2), IgG3 của người (hIgG3), và IgG4 của người (hIgG4).

Globulin miễn dịch gồm bốn chuỗi polypeptit; hai chuỗi nặng và hai chuỗi nhẹ được nối qua cầu nối disulfid để tạo ra tetrame. Mỗi chuỗi gồm vùng biến đổi và vùng hằng định. Vùng hằng định của chuỗi nặng còn được phân loại thành ba phần, là CH1, CH2, và CH3, hoặc bốn phần, là CH1, CH2, CH3, và CH4, theo các lớp kháng thể, và gồm vùng bản lề, domain CH2, CH3 và/hoặc CH4.

Theo tình trạng kỹ thuật đã biết, các tác giả sáng chế xác minh rằng chu kỳ bán rã in vivo đã tăng lên, độ ổn định được cải thiện, và hiệu lực thuốc được cải thiện ở protein dung hợp bao gồm biến thể CCL3 và vùng Fc của globulin miễn dịch, trong đó axit amin đầu tận cùng N của CCL3 α hoặc CCL3 β kiểu dại được loại bỏ và axit amin ở vị trí đặc hiệu được thế bởi axit amin khác ở cùng vị trí của CCL3 α hoặc CCL3 β kiểu dại trong biến thể CCL3.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất protein dung hợp bao gồm biến thể CCL3 và vùng Fc của globulin miễn dịch, trong đó một số axit amin của CCL3 kiểu dại được thế và loại bỏ trong biến thể CCL3.

Sáng chế đề xuất axit nucleic mã hóa protein dung hợp, vector bao gồm axit nucleic này, và tế bào được biến nạp bằng cách sử dụng vector này.

Sáng chế đề xuất phương pháp tạo protein dung hợp.

Sáng chế đề xuất dược phẩm bao gồm protein dung hợp.

Sáng chế đề xuất biến thể CCL3 β , trong đó một số axit amin của CCL3 kiểu dại được thế và loại bỏ trong biến thể CCL3 β .

Sáng chế đề xuất protein dung hợp bao gồm biến thể CCL3 bao gồm các đột biến sau và vùng Fc của globulin miễn dịch, trong đó các đột biến này bao gồm: (1) loại bỏ một hoặc hai axit amin từ đầu tận cùng N của CCL3 kiểu dại; và (2) thế axit aspartic ở vị trí axit amin thứ 27 từ đầu tận cùng N của CCL3 kiểu dại bằng alanin.

Sáng chế đề xuất axit nucleic mã hóa protein dung hợp.

Sáng chế đề xuất vector bao gồm axit nucleic này.

Sáng chế đề xuất tế bào được biến nạp bằng vector này.

Sáng chế đề xuất phương pháp điều chế protein dung hợp.

Sáng chế đề xuất được phẩm bao gồm protein dung hợp.

Sáng chế đề xuất biến thể phối tử loại CC 3 β (CCL3 β) bao gồm các đột biến sau: (1) loại bỏ một hoặc hai axit amin từ đầu tận cùng N của CCL3 β kiểu đại; và (2) thế axit aspartic ở vị trí axit amin thứ 27th từ đầu tận cùng N của CCL3 kiểu đại bằng alanin.

Protein dung hợp theo sáng chế bao gồm biến thể CCL3 có đặc tính được động học mong muốn vì sự giảm hoạt tính của biến thể CCL3 là thấp nhất, nguy cơ gây miễn dịch thấp, và chu kỳ bán rã in vivo tăng mà không có vấn đề về độ ổn định, nhờ đó cải thiện tính ổn định in vivo, các đặc tính vật lý và hiệu lực dược lý của protein. Dược phẩm bao gồm protein dung hợp bao gồm biến thể CCL3 có thể được sử dụng làm tác nhân chữa bệnh cho chứng giảm lympho bào, bệnh ung thư hoặc bệnh lây nhiễm.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 là biểu đồ thể hiện kết quả đo in vitro tính hướng hóa chất của các protein dung hợp của biến thể CCL3 CCL3B-H05 và CCL3B-H40 bằng cách sử dụng dòng tế bào THP-1.

Fig.2 là biểu đồ thể hiện kết quả đo in vitro tính hướng hóa chất của các protein dung hợp CCL3 và biến thể CCL3 CCL3A-H05 và CCL3B-H05 bằng cách sử dụng dòng tế bào THP-1.

Fig.3 thể hiện kết quả đo hoạt tính in vitro của protein dung hợp CCL3 và biến thể CCL3 CCL3A-H05 và CCL3B-H05 bằng cách sử dụng dòng tế bào trong đó CCR1 được biểu hiện, để đánh giá khả năng phản ứng của thụ thể CCR1 của các protein dung hợp.

Fig.4 thể hiện kết quả tính thông số dược động học bằng cách đo nồng độ trong máu của CCL3B-H05 trong mẫu máu cho đến 144 giờ sau khi tiêm tĩnh mạch protein dung hợp của biến thể CCL3 CCL3B-H05 vào chuột ở liều lần lượt là 3 mg/kg và 10 mg/kg.

Fig.5 thể hiện hiệu quả ức chế sự phát triển khối u của protein dung hợp của biến thể CCL3 CCL3B-H05 trên bệnh ung thư gan chuột.

Fig.6 thể hiện phác đồ điều trị bằng thuốc trong ví dụ thử nghiệm 4.

Mô tả chi tiết sáng chế

Trừ khi được định nghĩa khác, tất cả các thuật ngữ kỹ thuật và khoa học được sử dụng trong bản mô tả này có nghĩa giống như được hiểu thông thường bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Nói chung, danh pháp được sử dụng trong bản mô tả là đã biết và thường được sử dụng trong lĩnh vực này.

Trong số các công nghệ khác nhau có tác dụng lâu dài để làm tăng chu kỳ bán rã của protein bình thường, công nghệ dung hợp Fc được sử dụng rộng rãi nhất vì công nghệ này có thể làm tăng chu kỳ bán rã in vivo với ít mối lo về tác dụng phụ như độc tính hoặc gây đáp ứng miễn dịch. Việc phát triển CCL3 dung hợp Fc và/hoặc biến thể của nó làm thuốc để điều trị liên tục cần thỏa mãn vài điều kiện như sau.

Thứ nhất, sự giảm hoạt tính in vitro do sự dung hợp cần phải nhỏ. Nhìn chung, khi các protein nhỏ như chemokin được dung hợp với Fc có kích thước tương đối lớn, biết rằng hoạt tính phụ thuộc nhiều vào vị trí dung hợp và cầu nối. Theo đó, hoạt tính của CCL3 và/hoặc biến thể của nó và protein dung hợp Fc có thể thay đổi theo sự có mặt của dung hợp hoặc vị trí dung hợp.

Thứ hai, xét rằng hầu hết các dược phẩm sinh học có thể gây ra tính sinh miễn dịch ở người bệnh, nguy cơ sinh miễn dịch do các cầu nối dung hợp hoặc đột biến cần phải thấp.

Thứ ba, cũng cần không có vấn đề về độ ổn định do vị trí dung hợp hoặc việc đưa đột biến vào.

Thứ tư, vì có thể gây ra đáp ứng miễn dịch không mong muốn tùy thuộc vào lớp kháng thể của globulin miễn dịch được dung hợp, sự lựa chọn thay thế lớp kháng thể của globulin miễn dịch dung hợp là cần thiết.

Trong khi các tác giả sáng chế nỗ lực cải thiện hoạt tính sinh lý và đặc tính vật lý

của CCL3 bằng cách xem xét các điều kiện nêu trên, thấy rằng việc loại bỏ axit amin đầu tận cùng N, đưa đột biến vào vị trí đặc hiệu của CCL3, và dung hợp với vùng Fc của globulin miễn dịch theo cách nhân tạo có thể làm tăng hoạt tính của CCL3 để làm tăng mức độ bộc lộ in vivo và chu kỳ bán rã và để cải thiện hiệu lực dược lý.

Dựa trên đó, một khía cạnh của sáng chế đề xuất protein dung hợp bao gồm biến thể phối tử loại CC 3 (CCL3) bao gồm các đột biến sau và vùng Fc của globulin miễn dịch, trong đó các đột biến này là: (1) loại bỏ một hoặc hai axit amin từ đầu tận cùng N của CCL3 kiểu đại; và (2) thế axit aspartic ở vị trí axit amin thứ 27 từ đầu tận cùng N của CCL3 kiểu đại bằng alanin.

CCL3 là chemokin được biết là đóng vai trò quan trọng trong nội cân bằng di động của tế bào tua và tế bào miễn dịch như tế bào T, bạch cầu đơn nhân, và bạch cầu trung tính, và có thể có nguồn gốc từ động vật có vú như người, chuột, lợn và khỉ. Chẳng hạn, hai typ phụ có ở người. Hai typ phụ này là typ α (dưới đây, được gọi là CCL3 α) có tính tương đồng với typ của chuột và β (dưới đây, được gọi là CCL3 β) được tạo ra do đột biến gen trong quá trình tiến hóa. Cụ thể, CCL3 kiểu đại có thể là, ví dụ, protein CCL3 α kiểu đại của người bao gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1 hoặc protein CCL3 β kiểu đại của người có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 3.

Theo một ví dụ, biến thể CCL3 có thể bao gồm biến thể CCL3 α , trong đó biến thể CCL3 α được tạo ra bằng cách loại bỏ alanin là axit amin đầu tiên từ đầu tận cùng N và bằng cách thế axit aspartic là axit amin thứ 27 từ đầu tận cùng N bằng alanin ở CCL3 α kiểu đại của người có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1. Biến thể CCL3 α có thể bao gồm, ví dụ, trình tự nêu trong SEQ ID NO: 2.

Theo một ví dụ khác, biến thể CCL3 có thể bao gồm biến thể CCL3 β , trong đó biến thể CCL3 β được tạo ra bằng cách loại bỏ alanin và prolin (AP) là hai axit amin từ đầu tận cùng N và bằng cách thế axit aspartic là axit amin thứ 27 từ đầu tận cùng N bằng alanin ở CCL3 β kiểu đại của người có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 3. Biến thể CCL3 β có thể bao gồm, ví dụ, trình tự nêu trong SEQ ID NO: 4.

Thuật ngữ “vùng Fc” ở đây nghĩa là protein không có các vùng biến đổi ở chuỗi

nặng và chuỗi nhẹ và vùng hằng định 1 ở chuỗi nhẹ (CL1) của globulin miễn dịch, và vùng Fc có thể là Fc lai bao gồm ít nhất một vùng Fc được chọn từ nhóm bao gồm IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, và IgD và các đoạn của chúng hoặc tổ hợp của chúng.

Theo một ví dụ, ví dụ Fc lai có thể bao gồm vùng IgG4 và vùng IgD. Hơn nữa, vùng Fc lai có thể bao gồm phần trình tự vùng bản lề và CH2 của Fc IgD và trình tự CH2 và CH3 của Fc IgG4, ví dụ, trình tự nêu trong SEQ ID NO: 14. Fc lai có thể tương đương với, ví dụ, dạng Fc lai được bộc lộ trong patent Hàn Quốc số 0897938, và được đưa vào bản mô tả này dưới dạng tham chiếu.

Theo một ví dụ khác, vùng Fc có thể là Fc lai bao gồm ít nhất một vùng Fc được chọn từ nhóm bao gồm IgG1, IgG2, IgG3, và IgG4, và các đoạn của chúng hoặc tổ hợp của chúng.

Vùng Fc có thể bao gồm toàn bộ vùng Fc cấu thành globulin miễn dịch hoặc có thể bao gồm một đoạn hoặc biến thể vùng Fc của nó. Vùng Fc có thể còn bao gồm biến thể vùng Fc được tạo ra bằng cách thế một số axit amin hoặc kết hợp các loại vùng Fc khác nhau. Biến thể vùng Fc có thể được cải biến để ngăn chặn sự phân cắt ở vùng bản lề. Ngoài ra, một phần trình tự axit amin của trình tự vùng bản lề của Fc có thể được thế để làm giảm tính gây độc tế bào do tế bào phụ thuộc kháng thể (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity - ADCC) hoặc tính gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể (complement-dependent cytotoxicity - CDC). Hơn nữa, ở trình tự vùng bản lề của Fc, một phần trình tự axit amin có thể được thế để ức chế sự tái sắp xếp của vùng Fab. Hơn thế nữa, lysin (K) ở đầu tận cùng C của vùng Fc có thể được loại bỏ.

Hơn nữa, đoạn Fc theo sáng chế có thể là chuỗi đường kiểu đại, chuỗi đường được làm tăng so với kiểu đại, chuỗi đường được làm giảm so với kiểu đại, hoặc dạng trong đó chuỗi đường được loại bỏ. Việc tăng, giảm hoặc loại bỏ chuỗi đường có thể được thực hiện bằng phương pháp thông thường đã biết trong lĩnh vực này, như phương pháp hóa học, phương pháp enzym, phương pháp công nghệ di truyền nhờ sử dụng vi sinh vật.

Vùng Fc của globulin miễn dịch có thể là dạng trong đó biến thể CCL3 được nối trực tiếp vào đầu tận cùng N hoặc đầu tận cùng C của vùng Fc hoặc nối với đầu tận cùng

N hoặc đầu tận cùng C của vùng Fc qua cầu nối. Khi vùng Fc của globulin miễn dịch được nối trực tiếp vào biến thể CCL3, ví dụ, theo sáng chế, biến thể CCL3 α có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 2 hoặc biến thể CCL3 β có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 4 có thể được nối vào đầu tận cùng N hoặc đầu tận cùng C của vùng Fc có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 14. Dạng nối của CCL3 và Fc có thể thích hợp là dạng trong đó CCL3 được nối với đầu tận cùng N của vùng Fc.

Khi vùng Fc của globulin miễn dịch được nối qua cầu nối, cầu nối này có thể được nối với đầu tận cùng N, đầu tận cùng C, hoặc gốc tự do của đoạn Fc và có thể được nối vào đầu tận cùng N, đầu tận cùng C, hoặc gốc tự do của biến thể CCL3. Khi cầu nối là cầu nối peptit, sự nối này có thể xuất hiện ở phần bất kỳ. Chẳng hạn, cầu nối này có thể được nối với đầu tận cùng C của vùng Fc của globulin miễn dịch và đầu tận cùng N của biến thể CCL3.

Sau khi cầu nối và Fc được biểu hiện riêng biệt và sau đó được nối với nhau, cầu nối có thể là liên kết ngang được biết trong lĩnh vực này. Liên kết ngang có thể là, ví dụ, N-hydroxysuccinimide este như 1,1-bis(diazoacetyl)-2-phenyletan, glutaraldehyt, và axit 4-azidosalicylic, các imidoeste bao gồm các disuccinimidyl este như 3,3'-dithiobis(succinimidylpropionat), và các maleimide hai chức như bis-N-maleimido-1,8-octan, nhưng không chỉ giới hạn ở đó.

Ngoài ra, cầu nối có thể là peptit. Cụ thể, cầu nối có thể là peptit gồm có 10 đến 30 gốc axit amin. Theo một ví dụ, vùng Fc của globulin miễn dịch có thể được nối với biến thể CCL3 qua cầu nối như nêu ở công thức 1 dưới đây.

Công thức 1



Trong công thức 1, n và m lần lượt bằng 1 đến 5. Trong công thức 1, n là số lần lặp lại của các axit amin arginin-asparagin-threonin, m là số lần lặp lại của các axit amin glutamat-glutamat-lysin-lysin-lysin, và tốt hơn là, n và m có thể lần lượt bằng 1 đến 3.

Theo một ví dụ, xét rằng n và m có thể lần lượt bằng 1 đến 3, cầu nối có thể bao gồm một trình tự bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO:

5 đến SEQ ID NO: 13.

Một ví dụ cụ thể của sáng chế gồm cấu trúc trong đó vùng Fc của globulin miễn dịch được nối với biến thể CCL3 qua cầu nối có trình tự RNTGRGGEEKKK (SEQ ID NO: 5). Một ví dụ thử nghiệm của sáng chế thể hiện rằng protein dung hợp của biến thể CCL3 được gắn vào Fc của globulin miễn dịch qua cầu nối có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 5 có hoạt tính tính hướng hóa chất tuyệt vời.

Protein dung hợp đó có thể là dạng mà trong đó biến thể CCL3 dime hoặc multime được gắn vào vùng Fc của globulin miễn dịch, trong đó biến thể CCL3 dime hoặc multime được tạo ra khi một hoặc nhiều biến thể CCL3 được nối với nhau. Ngoài ra, protein dung hợp có thể là dạng dime hoặc multime, trong đó dạng dime hoặc multime này có thể là hai hoặc nhiều vùng Fc được liên kết, trong đó vùng Fc của globulin miễn dịch có biến thể CCL3 được nối vào đó.

Một khía cạnh khác của sáng chế đề xuất axit nucleic mã hóa protein dung hợp bao gồm biến thể CCL3.

Axit nucleic mã hóa protein dung hợp bao gồm biến thể CCL3 có thể được phân lập để tạo theo cách tái tổ hợp protein dung hợp bao gồm biến thể CCL3. Axit nucleic được phân lập và chèn vào vector sao chép được để thực hiện việc tách dòng hoặc biểu hiện bổ sung. Trên cơ sở đó, một khía cạnh khác của sáng chế đề xuất vector bao gồm axit nucleic này.

Thuật ngữ “axit nucleic” được sử dụng ở đây có nghĩa chung bao gồm các phân tử ADN (gADN và cADN) và ARN, và nucleotit làm khối cấu trúc cơ sở của axit nucleic gồm không chỉ nucleotit tự nhiên mà còn các dạng tương tự của chúng bao gồm vị trí đường hoặc bazơ cải biến. Trình tự axit nucleic mã hóa protein dung hợp bao gồm biến thể CCL3 theo sáng chế có thể được cải biến. Cải biến này bao gồm thêm, bớt hoặc thể không bảo toàn hoặc thể bảo toàn nucleotit.

Theo sáng chế, thuật ngữ “axit nucleic” gồm trình tự nucleotit có sự giống nhau lớn về trình tự. Sự giống nhau lớn nghĩa là trình tự axit amin có độ tương đồng ít nhất 80%, tốt hơn nữa là tương đồng ít nhất 90%, và tốt nhất là tương đồng ít nhất 95%, trong

phân tích được thực hiện bằng cách canh thẳng trình tự axit nucleic theo sáng chế để tương ứng với trình tự bất kỳ khác càng nhiều càng tốt và sau đó phân tích trình tự được canh thẳng nhờ sử dụng thuật toán thường được sử dụng trong lĩnh vực này.

ADN mã hóa protein dung hợp bao gồm biến thể CCL3 được phân lập hoặc tổng hợp dễ dàng bằng cách sử dụng quy trình thường được sử dụng trong lĩnh vực này.

Thuật ngữ “vector” được sử dụng ở đây chỉ phương tiện để biểu hiện gen đích trong tế bào vật chủ, và gồm vector plasmit; vector cosmit; vector virus như vector thực khuẩn thể, vector adenovirus, vector retrovirus, và vector virus liên hợp adeno; và vector tương tự. Các thành phần vector được chấp nhận thường bao gồm một hoặc nhiều thành phần trong số trình tự tín hiệu, điểm khởi đầu sao chép, một hoặc nhiều gen đánh dấu, yếu tố tăng cường, gen khởi đầu, và trình tự dừng phiên mã, nhưng không chỉ giới hạn ở các thành phần này.

Ở vector, axit nucleic mã hóa protein dung hợp bao gồm biến thể CCL3 được liên kết theo cách có tác dụng với gen khởi đầu.

Thuật ngữ “liên kết theo cách có tác dụng” được sử dụng ở đây nghĩa là liên kết nhóm chức giữa trình tự điều hòa biểu hiện axit nucleic (ví dụ, gen khởi đầu, trình tự tín hiệu, hoặc dãy ở vị trí gắn kết của yếu tố điều hòa phiên mã) và trình tự nucleic khác, và trình tự điều hòa để điều hòa qua liên kết nhóm chức quá trình phiên mã và/hoặc dịch mã của trình tự nucleic khác.

Trong trường hợp sử dụng tế bào nhân sơ làm vật chủ, thông thường, gen khởi đầu mạnh (ví dụ, gen khởi đầu tac, gen khởi đầu lac, gen khởi đầu lacUV5, gen khởi đầu lpp, gen khởi đầu pL λ , gen khởi đầu rac5, gen khởi đầu amp, gen khởi đầu recA, gen khởi đầu SP6, gen khởi đầu trp, gen khởi đầu T7, và tương tự), vị trí gắn ribosom để khởi đầu dịch mã, và trình tự dừng phiên mã/dịch mã thường được bao gồm. Ngoài ra, ví dụ, trong trường hợp sử dụng các tế bào nhân thật làm vật chủ, các gen khởi đầu có nguồn gốc từ bộ gen của tế bào động vật có vú (ví dụ, gen khởi đầu metallothionein, gen khởi đầu β -actin, gen khởi đầu nguyên bào gan của người và gen khởi đầu creatin cơ của người) hoặc các gen khởi đầu có nguồn gốc từ các virus ở động vật có vú (ví dụ, gen khởi đầu

pha muộn của adenovirut, gen khởi đầu virut đậu mùa 7.5K, gen khởi đầu SV40, gen khởi đầu cytomegalovirut (CMV), gen khởi đầu HSV tk, gen khởi đầu virut khối u vú ở chuột (MMTV), gen khởi đầu LTR của HIV, gen khởi đầu moloney, gen khởi đầu virut Epstein-Barr (EBV), và gen khởi đầu của virut rosacekoma (RSV)) có thể được sử dụng, và trình tự polyadenyl hóa thường được bao gồm làm trình tự dừng phiên mã.

Trong một số trường hợp, vector có thể được dung hợp với trình tự khác để tạo thuận lợi cho việc tinh sạch protein dung hợp bao gồm biến thể CCL3 được biểu hiện từ đó. Trình tự dung hợp gồm, ví dụ, glutathion S-transferaza (Pharmacia, Mỹ), protein gắn kết maltoza (NEB, Mỹ), FLAG (IBI, Mỹ), 6x His (hexahistidin; Quiagen, Mỹ), và tương tự.

Vector gồm, dưới dạng gen đánh dấu chọn lọc được, gen kháng kháng sinh thường được sử dụng trong lĩnh vực này, như gen có sự kháng với ampicilin, gentamycin, carbenicilin, cloramphenicol, streptomycin, kanamycin, genetixin, neomycin và tetracyclin.

Một khía cạnh khác của sáng chế đề xuất tế bào được biến nạp bởi vector nêu trên. Tế bào này có thể là tế bào nhân sơ, nấm men hoặc tế bào nhân thật cao hơn, nhưng không chỉ giới hạn ở đó.

Escherichia coli, các chủng loài bacillus, như *bacillus subtilis* và *bacillus tulignensis*, và tế bào chủ nhân sơ, như streptomyces, pseudomonas (ví dụ, *pseudomonas putida*), *proteus mirabilis*, và staphylococcus (ví dụ, *staphylococcus carnosus*), có thể được sử dụng.

Tuy nhiên, sự quan tâm đối với các tế bào động vật là lớn nhất, và ví dụ về dòng tế bào vật chủ hữu dụng có thể là COS-7, BHK, CHO, CHOK1, DXB-11, DG-44, CHO/-DHFR, CV1, COS-7, HEK293, BHK, TM4, VERO, HELA, MDCK, BRL 3A, W138, Hep G2, SK-Hep, MMT, TRI, MRC 5, FS4, 3T3, RIN, A549, PC12, K562, PER.C6, SP2/0, NS-0, U20S, hoặc HT1080, nhưng không chỉ giới hạn ở đó.

Một khía cạnh khác của sáng chế đề xuất phương pháp tạo protein dung hợp bao gồm biến thể CCL3, trong đó phương pháp này gồm (a) nuôi cấy tế bào; và (b) thu nhận

protein dung hợp trong tế bào nuôi cấy được.

Tế bào có thể được nuôi cấy trong các môi trường khác nhau. Các môi trường có bán trên thị trường có thể được sử dụng làm môi trường nuôi cấy mà không có hạn chế nào. Tất cả các chất bổ sung thiết yếu khác được biết bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể được đưa vào ở nồng độ thích hợp. Sẽ là hiển nhiên đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này để chọn các điều kiện nuôi cấy tối ưu, ví dụ, nhiệt độ, pH, và tương tự khi nuôi cấy tế bào vật chủ.

Việc thu hồi protein dung hợp bao gồm biến thể CCL3 có thể được thực hiện bằng cách loại bỏ tạp chất bằng cách, ví dụ, ly tâm hoặc siêu lọc, và tinh sạch sản phẩm thu được bằng cách sử dụng, ví dụ, sắc ký ái lực và tương tự. Các kỹ thuật tinh sạch bổ sung khác, ví dụ, sắc ký trao đổi anion hoặc cation, sắc ký tương tác kỵ nước, sắc ký hydroxylapatit, và tương tự có thể được sử dụng.

Một khía cạnh khác của sáng chế đề xuất được phẩm chứa protein dung hợp bao gồm biến thể CCL3.

Dược phẩm này có thể bao gồm protein dung hợp bao gồm biến thể CCL3 ở lượng có hiệu quả điều trị và chất mang dược dụng. Thuật ngữ “chất mang dược dụng” chỉ vật chất mà có thể được bổ sung vào thành phần hoạt tính để hỗ trợ việc bào chế hoặc làm ổn định dạng bào chế, và không gây tác dụng độc nguy hại đáng kể lên người bệnh.

Chất mang nghĩa là chất mang hoặc chất pha loãng không gây kích ứng cho người bệnh và cũng không ức chế hoạt tính và đặc tính sinh học. Chất mang dược dụng cho chế phẩm được bào chế thành dung dịch lỏng là thích hợp để vô trùng và tương hợp sinh học. Dung dịch muối, nước vô trùng, dung dịch ringer, nước muối đậm, dung dịch tiêm albumin, dung dịch dextroza, dung dịch maltodextrin, glyxerol, etanol, và hỗn hợp của một hoặc nhiều trong số chúng có thể được sử dụng, và nếu cần, các chất phụ gia thông thường khác như chất chống oxy hóa, chất đệm, và chất hãm vi khuẩn có thể được bổ sung. Ngoài ra, chất mang dược lý có thể được bào chế dưới dạng dung dịch tiêm được, như dung dịch nước, huyền phù, nhũ tương, và tương tự, viên tròn, viên nang, cốm hoặc viên nén bằng cách bổ sung thêm chất pha loãng, chất phân tán, chất hoạt động bề mặt,

chất gắn kết và chất làm trơn.

Chất mang được dụng gồm dung dịch nước vô trùng hoặc bột phân tán và vô trùng để tùy ứng điều chế dung dịch hoặc thể phân tán vô trùng tiêm được. Việc sử dụng môi trường và tác nhân cho chất có hoạt tính được lý là đã biết trong lĩnh vực này. Dược phẩm tốt hơn là được bào chế để tiêm ngoài đường tiêu hóa. Dược phẩm có thể được bào chế dưới dạng dung dịch, vi nhũ tương, liposom, hoặc các cấu trúc có trật tự khác thích hợp cho nồng độ thuốc cao. Chất mang có thể là dung môi hoặc môi trường phân tán chứa, ví dụ, nước, etanol, polyol (ví dụ, glyxerin, propylen glycol, polyetylen glycol lỏng, và tương tự), và hỗn hợp thích hợp của chúng. Trong một số trường hợp, các chất đẳng trương, ví dụ, đường, rượu đa chức như manitol và sorbitol, hoặc natri clorua có thể được đưa vào dược phẩm. Dung dịch tiêm vô trùng có thể được tạo ra bằng cách trộn lượng yêu cầu của hoạt chất trong dung môi thích hợp với một hoặc tổ hợp của các thành phần nêu trên theo nhu cầu, và bằng cách thực hiện vi lọc vô trùng hỗn hợp thu được này. Nói chung, tác nhân phân tán được tạo ra bằng cách bổ sung hoạt chất vào tá dược lỏng vô trùng chứa môi trường phân tán cơ bản và các thành phần cần thiết khác trong số các thành phần nêu trên. Một số phương pháp điều chế dung dịch tiêm được vô trùng bằng cách sử dụng bột vô trùng bao gồm làm khô trong chân không và làm đông khô để tạo ra bột hoạt chất và thành phần mong muốn bổ sung bất kỳ từ dung dịch của chúng mà đã được vô trùng và lọc.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất dược phẩm để điều trị hoặc ngăn ngừa các rối loạn liên quan đến CCL3 bao gồm protein dung hợp bao gồm biến thể CCL3 hoặc đề cập đến phương pháp điều trị hoặc ngăn ngừa các rối loạn liên quan đến CCL3 bao gồm việc dùng protein dung hợp bao gồm biến thể CCL3 cho người bệnh cần điều trị.

Các rối loạn liên quan đến CCL3 có thể bao gồm, ví dụ, chứng giảm lympho bào, các bệnh ung thư khác nhau, và bệnh lây nhiễm. Protein dung hợp bao gồm biến thể CCL3 theo sáng chế có thể gây ra sự chết mô ung thư và/hoặc tế bào ung thư do sự hoạt hóa đáp ứng miễn dịch liên quan đến sự chết của tế bào ung thư gây ra bởi xạ trị. Trên cơ sở đó, theo một ví dụ của sáng chế, protein dung hợp có thể là chế phẩm kết hợp hoặc hỗ trợ phép xạ trị để điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh ung thư.

Các tia chiếu xạ có thể là, ví dụ, tia gama hoặc tia X, và không chỉ giới hạn ở đó, nhưng có thể được chiếu ở liều 0,1 đến 50 Gy và, tốt hơn là, 0,1 đến 10 Gy. Liều chiếu xạ có thể được điều chỉnh trong khoảng thích hợp bằng cách cân nhắc sự suy giảm miễn dịch và tương tự do các tác dụng phụ của xạ trị.

Protein dung hợp bao gồm biến thể CCL3 có thể được dùng qua đường bất kỳ. Chẳng hạn, protein dung hợp bao gồm biến thể CCL3 có thể được cung cấp cho động vật theo cách trực tiếp (ví dụ, bằng cách tiêm, cấy, hoặc dùng khu trú protein dung hợp cho một phần mô, theo kiểu cục bộ) hoặc toàn thân (ví dụ, ngoài đường tiêu hóa hoặc đường miệng) bằng phương tiện thích hợp bất kỳ.

Trong trường hợp dùng ngoài đường tiêu hóa, như dùng trong tĩnh mạch, dưới da, qua mắt, trong màng bụng, trong cơ, miệng, trực tràng, trong hốc mắt, trong não, trong sọ, trong cột sống, trong não thất, nội tủy mạc, trong bể lớn, trong vỏ, trong mũi, hoặc sol khí, ví dụ, một phần của huyền phù hoặc dung dịch thể dịch tương hợp sinh lý hoặc chứa nước có thể được bao gồm. Theo đó, do chất mang hoặc tá dược lỏng là sinh lý dụng, chất mang hoặc tá dược lỏng có thể được bổ sung vào protein dung hợp để truyền vào người bệnh. Do đó, thông thường, dung dịch muối có thể được đưa vào làm chất mang như thể dịch để bào chế.

Tần suất dùng liều thay đổi theo các thông số dược động học của protein dung hợp bao gồm biến thể CCL3 trong chế phẩm được sử dụng. Phổ biến là, bác sĩ lâm sàng có thể dùng protein dung hợp cho đến khi đạt đến liều cho tác dụng mong muốn. Theo đó, protein dung hợp có thể được dùng dưới dạng một liều, dưới dạng hai hoặc nhiều liều (có hoặc không bao gồm cùng lượng protein dung hợp đích) với thời gian cách quãng, hoặc dưới dạng tiêm liên tục qua thiết bị ghép hoặc ống thông. Việc làm chính xác hơn liều thích hợp đạt được theo cách thông thường bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này và tương ứng với lĩnh vực làm việc được thực hiện thông thường bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này.

Liều đơn vị là 0,01 $\mu\text{g/kg}$ đến 100 mg/kg , đặc biệt là, 1 $\mu\text{g/kg}$ trọng lượng đến 30 mg/kg trọng lượng ở người. Liều này là liều tối ưu, nhưng có thể tùy thuộc vào bệnh cần

điều trị và sự xuất hiện các tác dụng phụ, và liều tối ưu có thể được xác định bằng cách thực hiện các thử nghiệm được tiến hành thông thường. Việc dùng protein dung hợp có thể được thực hiện bằng cách tiêm liều lớn định kỳ hoặc dùng liên tục trong tĩnh mạch, dưới da, hoặc trong màng bụng từ chỗ chứa bên ngoài (ví dụ, túi truyền trong tĩnh mạch) hoặc chỗ chứa bên trong (ví dụ, vật cấy có thể thoái hóa sinh học).

Tần suất dùng thay đổi theo mức độ trầm trọng của bệnh. Tần suất dùng có thể nằm trong khoảng ba lần một tuần đến một lần một tuần hoặc một lần mỗi hai tuần.

Trong một số trường hợp, protein dung hợp bao gồm biến thể CCL3 có thể được dùng cho thụ thể đích với các phân tử có hoạt tính sinh học khác. Tuy nhiên, tổ hợp tối ưu, được phẩm dạng liều, và lượng protein dung hợp và các phân tử khác có thể được xác định qua thử nghiệm thông thường đã biết trong lĩnh vực này.

Thuật ngữ “lượng có tác dụng để điều trị” được sử dụng ở đây chỉ lượng đủ để điều trị bệnh với tỉ lệ lợi ích/nguy cơ hợp lý thích hợp cho việc điều trị y tế và nghĩa là lượng protein dung hợp bao gồm biến thể CCL3 theo sáng chế. Lượng chính xác thay đổi theo nhiều yếu tố mà bao gồm các thành phần và các đặc tính vật lý của chế phẩm điều trị, nhóm người bệnh dự tính, các cân nhắc riêng từng người bệnh, và tương tự, nhưng không chỉ giới hạn ở đó, và có thể được xác định dễ dàng bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Khi đã cân nhắc đầy đủ các yếu tố trên, quan trọng là dùng lượng tối thiểu đủ để đạt được tác dụng tối đa mà không có tác dụng phụ và liều này có thể được xác định dễ dàng bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này.

Liều được phẩm theo sáng chế không bị giới hạn cụ thể, nhưng sẽ thay đổi bởi các yếu tố khác nhau bao gồm tình trạng sức khỏe và thể trọng của người bệnh, độ trầm trọng của bệnh, loại thuốc, đường dùng và thời gian dùng thuốc. Dược phẩm có thể được dùng cho động vật có vú bao gồm chuột, chuột nhắt, gia súc, người và tương tự một lần hoặc nhiều lần mỗi ngày qua đường phổ dụng, ví dụ, miệng, trực tràng, trong tĩnh mạch, dưới da, trong tử cung, hoặc trong mạch não.

Một khía cạnh khác của sáng chế đề xuất biến thể phối tử loại CC 3 β (CCL3 β) bao gồm các đột biến sau: (1) loại bỏ một hoặc hai axit amin từ đầu tận cùng N của

CCL3 β kiểu đại; và (2) thể axit aspartic ở vị trí axit amin thứ 27 từ đầu tận cùng N của CCL3 kiểu đại bằng alanin.

Theo một ví dụ của sáng chế, biến thể CCL3 β có thể bao gồm, ví dụ, trình tự nêu trong SEQ ID NO: 4. Biến thể CCL3 β của sáng chế đều bao gồm các cấu trúc nêu trên và việc mô tả các cấu hình giống hệt được áp dụng như nhau ngay cả với biến thể CCL3 β .

Trừ khi có định nghĩa khác về các thuật ngữ khoa học và kỹ thuật được sử dụng theo sáng chế, sáng chế có nghĩa như thường được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Hơn nữa, việc mô tả lặp lại đối với cùng cấu trúc và thao tác kỹ thuật như trong lĩnh vực liên quan sẽ được lược bỏ.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Dưới đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn bằng các ví dụ. Tuy nhiên, hiển nhiên đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này là sáng chế không bị giới hạn ở các ví dụ này, và các cải biến và thay đổi khác nhau có thể được thực hiện mà vẫn nằm trong phạm vi của sáng chế.

Ví dụ điều chế 1: Điều chế và tinh sạch protein dung hợp bao gồm biến thể CCL3

Nghiên cứu đột biến trên CCL3 được tiến hành để cải thiện đặc tính vật lý và đặc tính hoạt động của CCL3 trong cấu trúc CCL3-Fc.

Cụ thể, để xác định liệu sự chênh lệch về hoạt tính giữa typ α (dưới đây, được gọi là CCL3 α) và typ β (dưới đây, được gọi là CCL3 β) của protein CCL3 có được duy trì ngay cả sau khi dung hợp Fc, các biến thể khác nhau được tạo ra. Ngoài ra, để ức chế sự kết tủa của CCL3 ở loại protein dung hợp Fc, biến thể trong đó axit aspartic ở vị trí thứ 27 được thể bằng alanin được thiết kế.

Các vị trí, thông tin trình tự, đối tượng, và các tác dụng kỳ vọng của mỗi đột biến được đưa vào CCL3 được tóm tắt trong bảng 1 dưới đây.

Bảng 1

Ký hiệu trình tự	Vị trí	Trình tự gốc	Trình tự đột biến	Đối tượng	Tác dụng kỳ vọng
D27A	27	D	A	Đột biến điểm	Cải thiện các đặc tính vật lý thông qua việc ức chế sự kết tủa
$\Delta 1$	1	A	-	Loại bỏ axit amin	Cải thiện các đặc tính vật lý
$\Delta 1-2$	1-2	AS hoặc AP	-	Loại bỏ axit amin	Cải thiện tác dụng dược lý
CCL3 α	2, 39, 47	S, G, S	-	-	-
CCL3 β	2, 39, 47	P, S, G	-	-	-

Các axit amin được mã hóa trong vector biểu hiện để biểu hiện ba phần tử cấu thành theo thứ tự biến thể CCL3, cầu nối, và phần tử mang dung hợp từ đầu tận cùng N đến đầu tận cùng C. Bảng 2 dưới đây tóm tắt các ký hiệu của các protein dung hợp của biến thể CCL3, các trình tự đột biến được đưa vào CCL3, các trình tự phần tử mang dung hợp, và các trình tự cầu nối.

Bảng 2

Mã protein	Trình tự đột biến CCL3	Trình tự phần tử mang dung hợp	Trình tự cầu nối
CCL3	D27A, $\Delta 1$, CCL3 α (SEQ ID NO: 2)	N/A	N/A
CCL3A-H05 (SEQ ID NO: 15)	D27A, $\Delta 1$, CCL3 α (SEQ ID NO: 2)	hyFc (SEQ ID No: 14)	H05 (SEQ ID No: 5)
CCL3B-H05 (SEQ ID NO: 16)	D27A, $\Delta 1-2$, CCL3 β (SEQ ID NO: 4)	hyFc (SEQ ID No: 14)	H05 (SEQ ID No: 5)
CCL3B-H40 (SEQ ID NO: 17)	D27A, $\Delta 1-2$, CCL3 β (SEQ ID NO: 4)	hyFc (SEQ ID No: 14)	N/A

Để tạo ra protein dung hợp của biến thể CCL3, trình tự nucleotit được mã hóa dựa trên trình tự axit amin của protein dung hợp của biến thể CCL3 được tổng hợp bởi công

ty Bioneer Co., Ltd. (Hàn Quốc). Các trình tự enzym cắt giới hạn *NheI* và *NotI* lần lượt được bổ sung vào đầu 5' và đầu 3' của trình tự nucleotit mã hóa mỗi protein dung hợp của biến thể CCL3, và bộ ba mở đầu để dịch mã protein và trình tự cảm ứng để tiết protein được biểu hiện ra ngoại bào được chèn vào sau trình tự enzym cắt giới hạn của đầu 5'. Bộ ba kết thúc được chèn vào sau trình tự nucleotit mã hóa mỗi protein dung hợp của biến thể CCL3. Trình tự nucleotit mã hóa mỗi protein dung hợp của biến thể CCL3 được tách dòng trong vector biểu hiện không có pTrans bằng cách sử dụng hai trình tự enzym cắt giới hạn *NheI* và *NotI*. Vector biểu hiện không có pTrans thu được từ công ty CEVEC Corporation của Đức là vector biểu hiện cấu trúc đơn giản có gen khởi đầu CMV, điểm khởi đầu sao chép có nguồn gốc từ pUC, điểm khởi đầu sao chép có nguồn gốc từ SV40, và gen kháng ampicillin.

Ví dụ điều chế 1-2: Điều chế ADN plasmit để biểu hiện protein dung hợp của biến thể CCL3

Lượng lớn ADN plasmit cần sử dụng để biểu hiện thu được bằng cách biến nạp mỗi vector biểu hiện được điều chế trong ví dụ điều chế 1-1 vào *E. coli*. Mỗi vector biểu hiện được chuyển nạp thông qua sốc nhiệt vào *E. coli* có thành tế bào được làm yếu, và *E. coli* chuyển nạp thu được được cấy điểm lên đĩa LB để thu được khuẩn lạc. Khuẩn lạc thu được được cấy trong môi trường LB và nuôi cấy ở 37°C trong 16 giờ, và 100 mL *E. coli* có vector biểu hiện tương ứng trong tế bào này lần lượt được thu nhận. Sau khi loại bỏ môi trường nuôi cấy bằng cách ly tâm, các dung dịch P1, P2, và P3 (QIAGEN, Cat# 12963) được bổ sung vào *E. coli* để thu được dung dịch ADN đục bằng cách phá vỡ thành tế bào và tách protein và ADN. ADN plasmit được tinh sạch từ dung dịch ADN đục thu được bằng cách sử dụng cột tinh sạch ADN Qiagen. ADN plasmit đã tách rửa được xác nhận bằng điện di trên gel agarosa và sử dụng để biểu hiện sau khi đo nồng độ và độ tinh sạch bằng cách sử dụng thiết bị giọt nano (Thermo scientific, Nanodrop Lite).

Ví dụ điều chế 1-3: Biểu hiện protein dung hợp ở tế bào CAP-T

Dòng tế bào của người được biến nạp bằng mỗi ADN plasmit phân lập được trong ví dụ điều chế 1-2. Mỗi ADN plasmit được chuyển nạp vào tế bào CAP-T (CEVEC)

trong khi được nuôi cấy trong môi trường PEM (Life technologies) bằng cách sử dụng dung dịch PEI (Polypius, Cat # 101-10N). Dung dịch hỗn hợp của ADN và dung dịch PEI được trộn với tế bào lơ lửng bằng cách sử dụng môi trường biểu hiện Freestyle 293 của công ty Invitrogen Corporation, được nuôi cấy ở 37°C trong thời gian 5 giờ, và sau đó bổ sung môi trường PEM vào. Sau khi nuôi cấy ở 37°C trong thời gian 5 đến 7 ngày, tế bào được lấy ra bằng cách ly tâm để thu được dịch nổi chứa protein dung hợp của biến thể CCL3.

Ví dụ điều chế 1-4: Tinh sạch protein dung hợp của biến thể CCL3

Loại bỏ tạp chất ra khỏi dịch nổi nuôi cấy chứa protein dung hợp của biến thể CCL3 bằng cách sử dụng bộ lọc 0,2µm và sau đó cột sắc ký ái lực protein A (GE Healthcare) được cân bằng bằng dung dịch đệm PBS 1X (pH 7,4). Rửa cột bằng dung dịch đệm PBS 1X (pH 7,4) và sau đó protein được rửa giải bằng dung dịch đệm glyxin 100mM (pH 3,0). Protein dung hợp CCL3A-H05 (SEQ ID NO: 15) thu được bằng cách sắc ký ái lực được tinh sạch bằng cách sử dụng cột hydroxyapatit loại I (Hydroxyapatit gồm loại I, 40µM, Bio-rad), và protein dung hợp CCL3B-H05 (SEQ ID NO: 16) và protein dung hợp CCL3B-H40 (SEQ ID NO: 17) được tinh sạch bằng cách sử dụng cột hydroxyapatit loại I (Hydroxyapatit gồm loại II, 40µM, Bio-rad). Cột hydroxyapatit được cân bằng bằng dung dịch đệm natri phosphat 20mM (pH 7,2) và sau đó protein dung hợp của biến thể CCL3 đã tách rửa được đưa lên sắc ký ái lực. Cụ thể là, rửa cột bằng dung dịch đệm natri phosphat 20mM (pH 7,2), dung dịch đệm natri phosphat 20mM (pH 7,2) được chảy ở gradien nồng độ, và sau đó phân tích các phân đoạn rửa giải được. Mỗi phân đoạn được phân tích bằng cách sử dụng thử nghiệm sắc ký loại trừ kích thước (SEC-HPLC), và các phân đoạn giàu protein dung hợp của biến thể CCL3 có độ tinh khiết cao được thu gom và sau đó thẩm tách qua đệm ở 4°C với dung dịch đệm cuối PBS 1X. Dung dịch protein thô thu được bằng cách thẩm tách được cô lại ở tốc độ 3.000 vòng/phút ở 4°C bằng cách sử dụng bộ lọc ly tâm cắt trọng lượng phân tử 30.000. Nồng độ của protein dung hợp của biến thể CCL3 được đo bằng phân tích định lượng BCA.

Ví dụ thử nghiệm 1: Kết quả đo hoạt tính in vitro của protein dung hợp

Ví dụ thử nghiệm 1-1: Kết quả đo hoạt tính theo trình tự cầu nối

Đo hoạt tính in vitro của protein dung hợp của biến thể CCL3 CCL3B-H05 (SEQ ID NO: 16) và CCL3B-H40 (SEQ ID NO: 17) được điều chế theo các ví dụ điều chế nêu trên.

Cụ thể, để đánh giá hoạt tính in vitro của protein dung hợp, sử dụng dòng tế bào THP-1 ATCC trong đó các thụ thể CCR1 và CCR5 của CCL3 được biểu hiện. Để đánh giá hoạt tính, phần cô bao gồm protein dung hợp thu được trong các ví dụ điều chế được pha loãng hai lần và điều chế ở nồng độ 100 µg/mL bằng cách sử dụng môi trường phân tích (BSA 0,01% trong môi trường RPMI 1640), và dòng tế bào THP-1 được chuyển vào môi trường phân tích và sau đó pha loãng ở nồng độ 5.000.000 tế bào/mL. Hệ thống chuyển lỗ polycarbonat (Costar, Cat # 3422) được sử dụng để xử lý các lỗ đáy bằng 600µL protein dung hợp pha loãng và các vật lỏng trên đỉnh bằng 100µL dòng tế bào THP-1 pha loãng, và sau đó hệ này được giữ ở tủ nuôi cấy 5% CO₂ ở 37°C để phản ứng. Sau 24 giờ, các vật lỏng được lấy ra, và nhuộm tế bào bằng dung dịch trypan xanh dương (Sigma, Cat # T8154-100ML) và số lượng các tế bào được chuyển được đo bằng cách sử dụng bộ đếm tế bào (Invitrogen, bộ đếm tế bào Luna). Hoạt tính được so sánh bằng cách tính sự tăng số lượng tối đa của tế bào di chuyển so với số lượng tế bào ở nhóm đối chứng được xử lý bằng môi trường phân tích, và kết quả được thể hiện trên Fig.1.

Như được thể hiện trên Fig.1, kết quả về hoạt tính đo được phụ thuộc vào các cầu nối thể hiện rằng tính hướng hóa chất của protein dung hợp CCL3B-H05 là cao hơn của CCL3B-H40.

Ví dụ thử nghiệm 1-2: Kết quả đo hoạt tính theo biến thể CCL3

Đo hoạt tính in vitro của protein dung hợp CCL3A-H05 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 15 và protein dung hợp CCL3B-H05 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 16 điều chế được trong các ví dụ điều chế nêu trên.

Cụ thể, trong phần cô bao gồm protein dung hợp thu được trong các ví dụ điều chế, tính hướng hóa chất của protein dung hợp được đo bằng cùng phương pháp như ở ví dụ thử nghiệm 1-1, và kết quả được thể hiện trên Fig.2.

Ví dụ thử nghiệm 1-3: Kết quả đo hoạt tính theo biến thể CCL3

Do hoạt tính in vitro của protein dung hợp CCL3A-H05 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 15 và protein dung hợp CCL3B-H05 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 16 điều chế được trong ví dụ điều chế nêu trên.

Cụ thể, để đánh giá khả năng phản ứng của thụ thể CCR1 của protein dung hợp, sử dụng dòng tế bào TangoTM CCR1-*bla* U2OS DA trong đó thụ thể CCR1 của protein dung hợp được biểu hiện và kit phân tích (Invitrogen, Cat# K1793). Để đánh giá hoạt tính, dòng tế bào TangoTM CCR1-*bla* U2OS DA được pha loãng bằng môi trường cơ bản (môi trường biểu hiện FreeStyleTM) đến nồng độ 312.500 tế bào/mL, 32 μ L dòng tế bào được pha loãng được bổ sung vào đĩa 384 lỗ (Corning, Cat# 3712), và sau đó giữ trong tủ nuôi cấy 5% CO₂ trong thời gian 16 đến 24 giờ. Phần cô bao gồm protein dung hợp thu được trong ví dụ điều chế được pha loãng đến các nồng độ 10 μ M đối với CCL3 và 25 μ M đối với CCL3A-H05, là cao hơn 5 lần so với nồng độ xử lý bằng cách sử dụng môi trường phân tích (DMSO 0,5% trong môi trường biểu hiện FreeStyleTM). Các protein dung hợp điều chế được được bổ sung vào các lỗ chứa tế bào ở mức 8 μ L vào mỗi lỗ để xử lý tế bào này bằng protein dung hợp pha loãng hai lần ở nồng độ thực là 2 μ M đối với CCL3 và 5 μ M đối với CCL3A-H05 và CCL3B-H05, và tế bào xử lý được giữ trong tủ nuôi cấy 5% CO₂ ở 37°C trong thời gian 5 giờ để phản ứng. Dung dịch hỗn hợp cơ chất 6X (6 μ L cơ chất LiveBLAzerTM-FRET B/G (CCF4-AM) 1mM + 60 μ L dung dịch B + 904 μ L dung dịch C + 30 μ L dung dịch D) được điều chế bằng cách sử dụng dung dịch chứa trong kit phân tích, và sau đó 8 μ L dung dịch hỗn hợp thu được được bổ sung vào mỗi lỗ của đĩa 384 lỗ được xử lý bằng protein dung hợp, và sau đó các tế bào được giữ ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 2 giờ để phản ứng. Tỷ lệ (tỷ lệ phát ra màu xanh dương/xanh lá) của tế bào phản ứng và tế bào không phản ứng được đo và tính bằng máy đọc vi đĩa (Thiết bị phân tử, Flexstation 3), và kết quả được thể hiện trên Fig.3.

Như được thể hiện trên Fig.3, độ phản ứng của thụ thể CCR1 ở các mức 0,63 nM đối với CCL3, 16,0 nM đối với CCL3A-H05, và 11,6 nM đối với CCL3B-H05.

Ví dụ thử nghiệm 2: Đánh giá đặc tính vật lý của protein dung hợp

Ví dụ thử nghiệm 2-1: Phương pháp thử nghiệm để đánh giá độ ổn định

Để xác định lượng protein kết tụ ở trạng thái ban đầu của mẫu, hàm lượng (% HMW) của cụm kết tụ có trọng lượng phân tử cao được đo bằng cách sử dụng phương pháp sắc ký loại trừ kích thước (SEC-HPLC).

Cụ thể là, phương pháp SEC-HPLC được thực hiện bằng cách sử dụng cột Tosol mã TSK-GEL G3000SW_{XL}. Dung dịch đệm PBS 1X được cho chảy vào cột ở tốc độ chảy 1 mL/phút để cân bằng cột. Dung dịch gốc protein CCL3B-H05 thu được trong ví dụ điều chế 1-4 được cô ở tốc độ 3000 vòng/phút và 4°C đến nồng độ đích là 9,5 mg/mL hoặc cao hơn bằng cách sử dụng bộ lọc ly tâm cắt trọng lượng phân tử 30.000. Nồng độ của mỗi mẫu được đo bằng phân tích định lượng BCA, và sau đó mẫu được giữ ở -70°C trong thời gian 5 tuần để đánh giá độ ổn định. Để đo tỉ lệ kết tụ trọng lượng phân tử cao (% HMW), 9,57 mg/mL mẫu được pha loãng bằng PBS 1X đến nồng độ bằng 1 mg/mL, và tỉ lệ kết tụ trọng lượng phân tử cao được phân tích bằng cách bơm 100µL mẫu pha loãng vào cột SEC-HPLC.

Như được thể hiện trên bảng 3, các kết quả xác minh rằng % HMW của CCL3B-H05 là thấp và đặc tính vật lý của protein dung hợp của biến thể CCL3 được cải thiện mà không bị ảnh hưởng do sự dung hợp Fc, do đột biến D27A được đưa vào và do đó % HMW giảm đáng kể.

Bảng 3. Độ ổn định (% HMW) của CCL3B-H05 ở nồng độ 9,5 mg/mL

CCL3B-H05 ở ngày 0	CCL3B-H05 ở 5 tuần (37°C)
1,2%	1,0%

Như thể hiện trên bảng 3, lượng % HMW ở giai đoạn đầu (ngày 0) của quá trình bảo quản không tăng mà duy trì sau 5 tuần bảo quản ở -70°C. Cho thấy rằng độ ổn định của protein dung hợp CCL3B-H05 được duy trì bất chấp có đột biến.

Ví dụ thử nghiệm 3: Đo được động học của protein dung hợp

Ví dụ kiểm định 3-1: Phương pháp thử nghiệm để đo được động học

Chuột đực C57BL/6 bảy tuần tuổi được mua từ công ty Orient BIO Corporation ở

Hàn Quốc được chia nhóm ($n=3$ mỗi lần lấy máu) có trọng lượng cơ thể trung bình tương đương vào ngày bắt đầu điều trị bằng thuốc, và sau đó liều 3 mg/kg và 10 mg/kg mẫu lần lượt được dùng trong tĩnh mạch một lần, và các mẫu máu được lấy ở 0,083, 0,5, 1, 4, 8, 12, 24, 48, 72, 96 và 144 giờ. Để đo nồng độ trong máu của protein dung hợp, sử dụng kit ELISA CCL3/MIP-1 α Quantikine (R&D systems, Cat# SMA00) có khả năng phản ứng miễn dịch với CCL3 trong thử nghiệm này. Các thông số dược động học được tính bằng cách đo nồng độ trong máu của CCL3B-H05 trong mẫu máu cho đến 144 giờ sau khi mỗi protein dung hợp được tiêm trong tĩnh mạch cho chuột.

Ví dụ thử nghiệm 3-2: Kết quả đo hoạt tính dược động học

Các thông số dược động học được tính dựa trên biểu đồ nồng độ trong máu (Fig.4) theo thời gian sau khi dùng trong tĩnh mạch protein dung hợp cho chuột, và kết quả tính được thể hiện trong bảng 4 dưới đây.

Bảng 4

Thông số	3 mg/kg	10 mg/kg
AUC _{cuối} ($\mu\text{g}\cdot\text{giờ}/\text{mL}$)	1639403,7	6549244,7
Vòng đời (Giờ)	20,4	45,6
Độ thanh thải tổng ($\text{mL}/\text{giờ}/\text{kg}$)	0,0018	0,0018
Vd _{ss} (mL/kg)	0,0635	0,0636
C ₀ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	46741,6	227907,4

Đặc tính dược động học của protein dung hợp được so sánh và đánh giá dựa trên vùng dưới đường cong (AUC), chỉ ra mức độ tiếp xúc với thuốc.

Như thể hiện trên bảng 4, khi CCL3B-H05 được dùng trong tĩnh mạch cho chuột ở liều 3 và 10 mg/kg, mức tiếp xúc thuốc của cơ thể thường tăng tỉ lệ với liều dùng, và thanh thải (CL) và thể tích phân bố (Vd_{ss}) không phụ thuộc đáng kể vào liều dùng, và do đó PK tuyến tính được phát hiện ở khoảng liều 3 đến 10 mg/kg. Các kết quả này còn cho thấy rằng chu kỳ bán rã ($t_{1/2}$) của CCL3B-H05 là 20,4 giờ và 45,6 giờ đối với mỗi liều 3 và 10 mg/kg và tăng xấp xỉ 12 đến 27 lần so với chu kỳ bán rã (trong khoảng 1,7 giờ trong quá trình dùng trong tĩnh mạch ở người) của CCL3. Xét rằng chu kỳ bán rã ở chuột

thường nhỏ hơn chu kỳ bán rã ở người, sự tăng chu kỳ bán rã của CCL3B-H05 so với chu kỳ bán rã CCL3 được kỳ vọng là lớn hơn ở chuột.

Ví dụ thử nghiệm 4. Đánh giá hoạt tính protein dung hợp ở chuột

Ví dụ thử nghiệm 4-1: Phương pháp thử nghiệm hiệu quả chống ung thư ở chuột ghép mô ung thư gan BNL 1ME A.7R.1

Chuột đực Balb/c bảy tuần tuổi mua từ công ty Orient BIO Corporation của Hàn Quốc được nuôi thích nghi trong một tuần, và sau đó 1×10^7 tế bào BNL 1ME A.7R.1 (ATCC) là dòng tế bào ung thư gan chuột được tiêm vào chân sau bên phải. Ở thời điểm khi thể tích khối u là 120 đến 150mm³, chia nhóm sao cho thể tích khối u là tương đương. Các nhóm thử nghiệm và phác đồ điều trị thuốc lần lượt được thể hiện trên bảng 5 và Fig.6. Từ ngày đầu tiên điều trị bằng thuốc, thể tích khối u được đo bằng cách sử dụng thước kẹp mỗi 3 đến 4 ngày để quan sát hiệu quả ức chế sự phát triển khối u của thuốc (thể tích khối u = trục X dài (trục ngắn)²/2) .

Bảng 5

Nhóm	Đường dùng		Liều lượng	Phác đồ	Số
G1	Đối chứng	-	-	-	8
G2	IR	-	6,5 Gy	-	8
G3	IR + CCL3A-H05	IV	6,5 Gy/10 mg/kg	q2dx3	8
G4	IR + CCL3B-H05	IV	6,5 Gy/10 mg/kg	q2dx3	8

Ví dụ thử nghiệm 4-2: Kết quả đánh giá hiệu quả chống ung thư ở chuột ghép mô ung thư gan BNL 1ME A.7R.1

Hiệu quả ức chế sự phát triển khối u của protein dung hợp CCL3A-H05 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 15 và protein dung hợp CCL3B-H05 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 16 được tạo ra trong các ví dụ điều chế được xác minh trên bệnh ung thư gan ở chuột on BNL 1ME A.7R.1. Như được thể hiện trên Fig.5, hiệu quả ức chế sự phát triển khối u là xấp xỉ 25% ở nhóm được điều trị bằng CCL3A-H05 10 mg/kg và xấp xỉ 72% ở nhóm được điều trị bằng CCL3B-H05 10 mg/kg so với nhóm được điều trị bằng 6,5 Gy một lần xạ trị sau một tháng kể từ khi xạ trị.

Mặc dù một phần cụ thể của sáng chế đã được mô tả chi tiết, sẽ là hiển nhiên đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực rằng phần mô tả cụ thể chỉ là phương án ưu tiên và phạm vi của sáng chế không bị giới hạn ở phần mô tả đó. Do đó, phạm vi thực chất của sáng chế sẽ được xác định bởi các điểm yêu cầu bảo hộ kèm theo và dạng tương đương của nó.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Protein dung hợp bao gồm biến thể phối tử loại CC 3 β (CC type ligand 3 β -CCL3 β) và vùng Fc của globulin miễn dịch:

trong đó biến thể CCL3 β bao gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO: 4

trong đó biến thể CCL3 β được nối với vùng Fc của globulin miễn dịch qua cầu nối chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 5, và

trong đó vùng Fc của globulin miễn dịch chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 14.

2. Axit nucleic mã hóa protein dung hợp theo điểm 1.

3. Vector bao gồm axit nucleic này theo điểm 2.

4. Tế bào được biến nạp bằng vector theo điểm 3.

5. Phương pháp điều chế protein dung hợp theo điểm 1, phương pháp này bao gồm bước:

(a) nuôi cấy tế bào được biến nạp bằng vector chứa axit nucleic mã hóa protein dung hợp nói trên; và

(b) thu nhận protein dung hợp từ tế bào nuôi cấy được.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> YUHAN CORPORATION

<120> PROTEIN DUNG HỢP BAO GỒM BIẾN THỂ PHỐI TỬ LOẠI CC 3 (CCL3),
AXIT NUCLEIC MÃ HÓA PROTEIN DUNG HỢP NÀY VÀ PHƯƠNG PHÁP ĐIỀU CHẾ PROTEIN
DUNG HỢP NÀY

<130> PP-B1850

<150> KR 10-2016-0053018

<151> 2016-04-29

<160> 17

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 70

<212> PRT

<213> CCL3 alpha của người

<400> 1

Ala	Ser	Leu	Ala	Ala	Asp	Thr	Pro	Thr	Ala	Cys	Cys	Phe	Ser	Tyr	Thr
1			5					10				15			

Ser	Arg	Gln	Ile	Pro	Gln	Asn	Phe	Ile	Ala	Asp	Tyr	Phe	Glu	Thr	Ser
		20				25				30					

Ser	Gln	Cys	Ser	Lys	Pro	Gly	Val	Ile	Phe	Leu	Thr	Lys	Arg	Ser	Arg
		35				40				45					

Gln	Val	Cys	Ala	Asp	Pro	Ser	Glu	Glu	Trp	Val	Gln	Lys	Tyr	Val	Ser
		50				55				60					

Asp	Leu	Glu	Leu	Ser	Ala
65				70	

<210> 2

<211> 69

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Bién thể CCL3 alpha

<400> 2

Ser Leu Ala Ala Asp Thr Pro Thr Ala Cys Cys Phe Ser Tyr Thr Ser
 1 5 10 15
 Arg Gln Ile Pro Gln Asn Phe Ile Ala Ala Tyr Phe Glu Thr Ser Ser
 20 25 30
 Gln Cys Ser Lys Pro Gly Val Ile Phe Leu Thr Lys Arg Ser Arg Gln
 35 40 45
 Val Cys Ala Asp Pro Ser Glu Glu Trp Val Gln Lys Tyr Val Ser Asp
 50 55 60
 Leu Glu Leu Ser Ala
 65

<210> 3

<211> 70

<212> PRT

<213> CCL3 beta của người

<400> 3

Ala Pro Leu Ala Ala Asp Thr Pro Thr Ala Cys Cys Phe Ser Tyr Thr
 1 5 10 15
 Ser Arg Gln Ile Pro Gln Asn Phe Ile Ala Asp Tyr Phe Glu Thr Ser
 20 25 30
 Ser Gln Cys Ser Lys Pro Ser Val Ile Phe Leu Thr Lys Arg Gly Arg
 35 40 45
 Gln Val Cys Ala Asp Pro Ser Glu Glu Trp Val Gln Lys Tyr Val Ser
 50 55 60
 Asp Leu Glu Leu Ser Ala
 65 70

<210> 4

<211> 68

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Bién thể CCL3 beta

<400> 4

Leu Ala Ala Asp Thr Pro Thr Ala Cys Cys Phe Ser Tyr Thr Ser Arg

1 5 10 15

Gln Ile Pro Gln Asn Phe Ile Ala Ala Tyr Phe Glu Thr Ser Ser Gln

20 25 30

Cys Ser Lys Pro Ser Val Ile Phe Leu Thr Lys Arg Gly Arg Gln Val

35 40 45

Cys Ala Asp Pro Ser Glu Glu Trp Val Gln Lys Tyr Val Ser Asp Leu

50 55 60

Glu Leu Ser Ala

65

<210> 5

<211> 12

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cầu nối

<400> 5

Arg Asn Thr Gly Arg Gly Gly Glu Glu Lys Lys Lys

1 5 10

<210> 6

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cầu nối

<400> 6

Arg Asn Thr Gly Arg Gly Gly Glu Glu Lys Lys Lys Glu Glu Lys Lys

1 5 10 15

Lys

<210> 7

<211> 22

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cầu nối

<400> 7

Arg Asn Thr Gly Arg Gly Gly Glu Glu Lys Lys Lys Glu Glu Lys Lys

1 5 10 15

Lys Glu Glu Lys Lys Lys

20

<210> 8

<211> 15

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cầu nối

<400> 8

Arg Asn Thr Arg Asn Thr Gly Arg Gly Gly Glu Glu Lys Lys Lys

1 5 10 15

<210> 9

<211> 20

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cầu nối

<400> 9

Arg Asn Thr Arg Asn Thr Gly Arg Gly Gly Glu Glu Lys Lys Lys Glu

1 5 10 15

Glu Lys Lys Lys

20

<210> 10

<211> 25

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cầu nối

<400> 10

Arg Asn Thr Arg Asn Thr Gly Arg Gly Gly Glu Glu Lys Lys Lys Glu

1 5 10 15

Glu Lys Lys Lys Glu Glu Lys Lys Lys

20

25

<210> 11

<211> 18

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cầu nối

<400> 11

Arg Asn Thr Arg Asn Thr Arg Asn Thr Gly Arg Gly Gly Glu Glu Lys

1 5 10 15

Lys Lys

<210> 12

<211> 23

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cầu nối

<400> 12

Arg Asn Thr Arg Asn Thr Arg Asn Thr Gly Arg Gly Gly Glu Glu Lys

1

5

10

15

Lys Lys Glu Glu Lys Lys Lys

20

<210> 13

<211> 28

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cầu nối

<400> 13

Arg Asn Thr Arg Asn Thr Arg Asn Thr Gly Arg Gly Gly Glu Glu Lys

1

5

10

15

Lys Lys Glu Glu Lys Lys Lys Glu Glu Lys Lys Lys

20

25

<210> 14

<211> 233

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> HyFc

<400> 14

Glu Lys Glu Lys Glu Glu Gln Glu Glu Arg Glu Thr Lys Thr Pro Glu
 1 5 10 15
 Cys Pro Ser His Thr Gln Pro Leu Gly Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 20 25 30
 Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 35 40 45
 Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr
 50 55 60
 Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 65 70 75 80
 Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 85 90 95
 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 100 105 110
 Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 115 120 125
 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met
 130 135 140
 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 145 150 155 160
 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 165 170 175
 Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 180 185 190
 Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val
 195 200 205
 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 210 215 220
 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys

225 230

<210> 15

$\langle 211 \rangle$ 314

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

 $\langle 220 \rangle$

<223> CCL3A-H05

<400> 15

Ser Leu Ala Ala Asp Thr Pro Thr Ala Cys Cys Phe Ser Tyr Thr Ser

1 5 10 15

Arg Gln Ile Pro Gln Asn Phe Ile Ala Ala Tyr Phe Glu Thr Ser Ser

20 25 30

Gln Cys Ser Lys Pro Gly Val Ile Phe Leu Thr Lys Arg Ser Arg Gln

35 40 45

Val Cys Ala Asp Pro Ser Glu Glu Trp Val Gln Lys Tyr Val Ser Asp

50 55 60

Leu Glu Leu Ser Ala Arg Asn Thr Gly Arg Gly Gly Glu Glu Lys Lys

65 70 75 80

Lys Glu Lys Glu Lys Glu Glu Gln Glu Glu Arg Glu Thr Lys Thr Pro

85 90 95

Glu Cys Pro Ser His Thr Gln Pro Leu Gly Val Phe Leu Phe Pro Pro

100 105 110

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

115 120 125

Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp

130 135 140

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu

145 150 155 160

Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu

	165		170		175										
His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn
	180		185		190										
Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly
	195		200		205										
Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu	Glu
	210		215		220										
Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr
	225		230		235		240								
Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn
	245		250		255										
Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe
	260		265		270										
Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Glu	Gly	Asn
	275		280		285										
Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr
	290		295		300										
Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Leu	Gly	Lys						

305

310

<210> 16

<211> 313

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CCL3B-H05

<400> 16

Leu Ala Ala Asp Thr Pro Thr Ala Cys Cys Phe Ser Tyr Thr Ser Arg

1

5

10

15

Gln Ile Pro Gln Asn Phe Ile Ala Ala Tyr Phe Glu Thr Ser Ser Gln
 20 25 30
 Cys Ser Lys Pro Ser Val Ile Phe Leu Thr Lys Arg Gly Arg Gln Val
 35 40 45
 Cys Ala Asp Pro Ser Glu Glu Trp Val Gln Lys Tyr Val Ser Asp Leu
 50 55 60
 Glu Leu Ser Ala Arg Asn Thr Gly Arg Gly Gly Glu Glu Lys Lys Lys
 65 70 75 80
 Glu Lys Glu Lys Glu Glu Gln Glu Glu Arg Glu Thr Lys Thr Pro Glu
 85 90 95
 Cys Pro Ser His Thr Gln Pro Leu Gly Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 100 105 110
 Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 115 120 125
 Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr
 130 135 140
 Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 145 150 155 160
 Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 165 170 175
 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 180 185 190
 Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 195 200 205
 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met
 210 215 220
 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 225 230 235 240
 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn

35606

245 250 255
 Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 260 265 270
 Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val
 275 280 285
 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 290 295 300
 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 305 310
 <210> 17
 <211> 301
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> CCL3B-H40
 <400> 17
 Leu Ala Ala Asp Thr Pro Thr Ala Cys Cys Phe Ser Tyr Thr Ser Arg
 1 5 10 15
 Gln Ile Pro Gln Asn Phe Ile Ala Ala Tyr Phe Glu Thr Ser Ser Gln
 20 25 30
 Cys Ser Lys Pro Ser Val Ile Phe Leu Thr Lys Arg Gly Arg Gln Val
 35 40 45
 Cys Ala Asp Pro Ser Glu Glu Trp Val Gln Lys Tyr Val Ser Asp Leu
 50 55 60
 Glu Leu Ser Ala Glu Lys Glu Lys Glu Glu Gln Glu Glu Arg Glu Thr
 65 70 75 80
 Lys Thr Pro Glu Cys Pro Ser His Thr Gln Pro Leu Gly Val Phe Leu
 85 90 95
 Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu

35606

100	105	110	
Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln			
115	120	125	
Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys			
130	135	140	
Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu			
145	150	155	160
Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys			
165	170	175	
Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys			
180	185	190	
Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser			
195	200	205	
Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys			
210	215	220	
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln			
225	230	235	240
Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly			
245	250	255	
Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln			
260	265	270	
Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn			
275	280	285	
His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys			
290	295	300	

FIG. 1

Thử nghiệm về tính hướng hóa chất
(dòng tế bào THP-1, kết quả di chuyển 24 giờ)

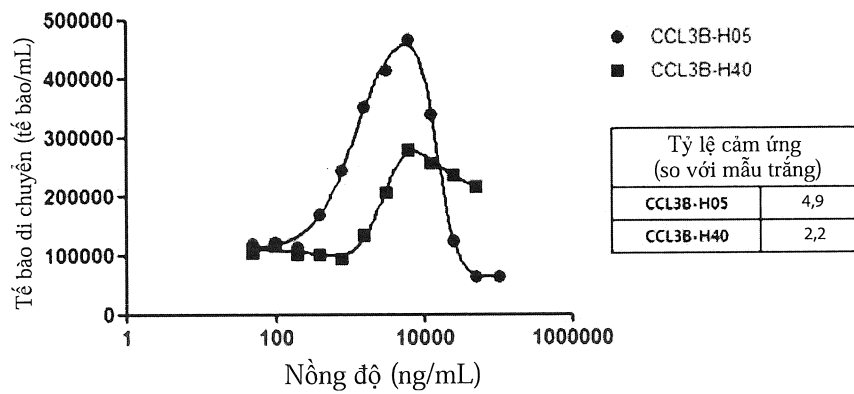


FIG. 2

Thử nghiệm về tính hướng hóa chất
(dòng tế bào THP-1, kết quả di chuyển 24 giờ)

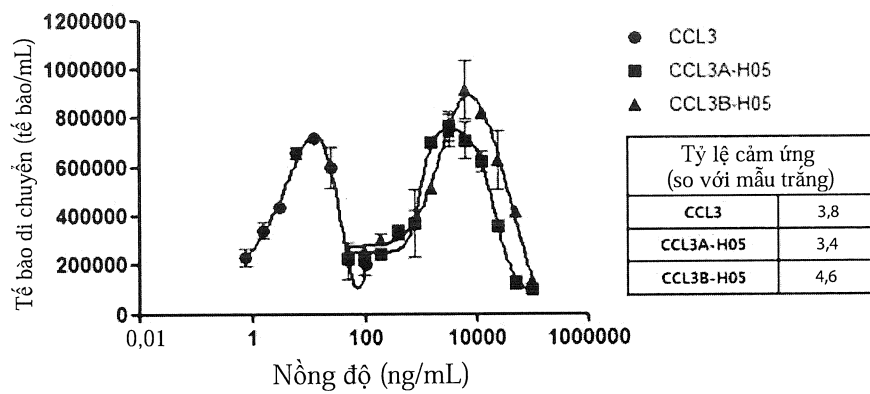


FIG. 3

Thử nghiệm dựa vào tế bào CCR1-bla USOS DA

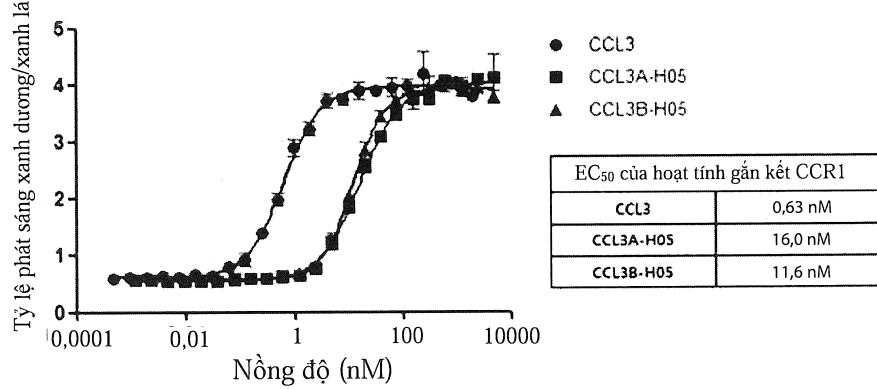


FIG. 4

Đặc tính dược động học của CCL3B-H05 sau khi dùng
qua đường tĩnh mạch cho chuột
(chuột C57BL/6, n=3)

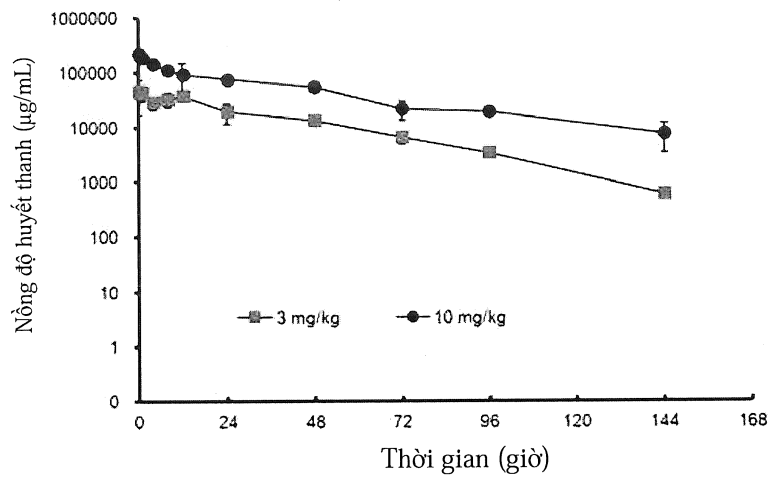


FIG. 5

Hiệu quả chống u của CCL3B-H05 sau khi dùng qua
đường tĩnh mạch cho chuột
(mô hình BNL 1ME A.7R.1, chuột BALB/c)

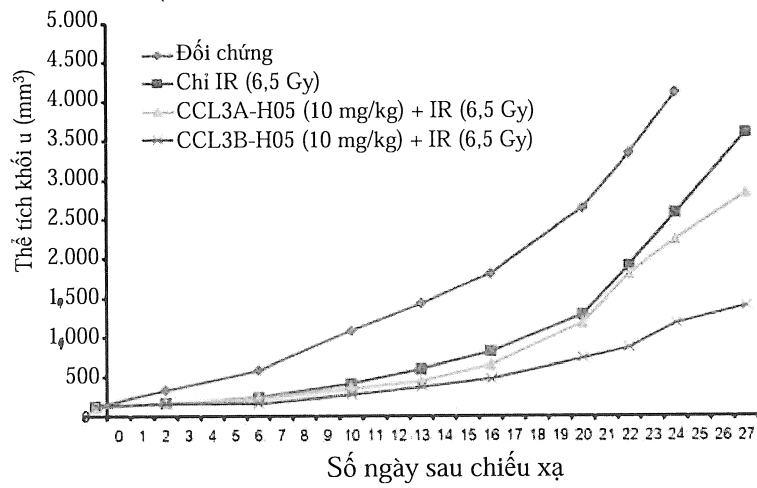


FIG. 6

