



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ
(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11) CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ
(51)⁷ G01N 33/574; G01N 33/68; C07K 14/715; C07K 19/00 (13) B

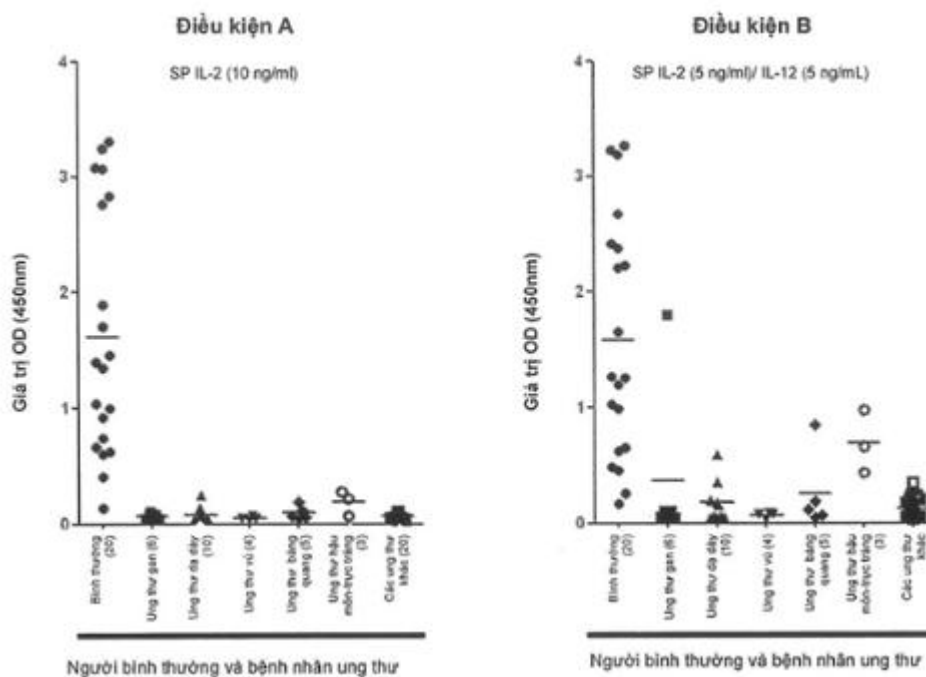


1-0036999

(21) 1-2013-02865 (22) 10/02/2012
(86) PCT/IB2012/000259 10/02/2012 (87) WO 2012/110878 A2 23/08/2012
(30) 10-2011-0012983 14/02/2011 KR
(45) 25/09/2023 426 (43) 25/12/2013 309A
(73) NKMAX Co., Ltd. (KR)
172, Dolma-ro, Bundang-gu, Seongnam-si, Gyeonggi-do, Republic of Korea
(72) LEE, Jae Myun (KR); YOON, Joo Chun (KR); PARK, Sang Woo (KR); KIM, Jong Sun (KR).
(74) Công ty TNHH Lê & Lê (LE & LE)

(54) PHƯƠNG PHÁP VÀ KIT ĐỂ ĐO HOẠT TÍNH TẾ BÀO ĂN MỖI TỰ NHIÊN (NK)

(57) Sáng chế đề xuất phương pháp và kit để đo hoạt tính tế bào NK. Tỷ lệ mắc ung thư có thể được chẩn đoán bằng cách kiểm tra những thay đổi ở hệ miễn dịch *in vivo* qua cách đo hoạt tính tế bào NK trong máu. Như vậy, tỷ lệ mắc bệnh ung thư có thể được dự đoán dễ dàng như được mô tả ở đây bằng cách sử dụng mẫu máu của đối tượng.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề xuất phương pháp và kit để đo hoạt tính tế bào ăn môi tự nhiên (NK).

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Được biết là các tế bào ăn môi tự nhiên (natural killer - NK) tham gia vào miễn dịch bẩm sinh để loại bỏ các mầm bệnh và tế bào ung thư, và tiết interferon-gama ($\text{IFN-}\gamma$), yếu tố hoại tử khối u alpha (tumor necrosis factor-alpha, $\text{TNF-}\alpha$), protein gây viêm đại thực bào- 1β (macrophage inflammatory protein, $\text{MIP-}1\beta$) và các phân tử khác để thực hiện miễn dịch thích ứng. Khi tế bào NK gặp các tế bào khác, các tế bào NK này có cơ chế trong đó, khi MHC Nhóm 1 không tồn tại như trong các tế bào ung thư, hoặc hình dạng bất bình thường của MHC Nhóm 1 như ở các tế bào bị lây nhiễm virus, các phức hợp hòa hợp tổ chức chính của chúng (major histocompatibility complexes, MHCs) truyền các tín hiệu đến các tế bào NK để tấn công các tế bào bất bình thường qua các phản ứng tế bào của chúng. Tuy nhiên, do các tế bào NK được báo cáo là có khiếm khuyết về chức năng và khả năng biệt hóa ở các dạng ung thư khác nhau, hoạt tính tế bào NK liên quan chặt chẽ đến sự sống sót của các tế bào ung thư. Do vậy, nghiên cứu được hướng dẫn rộng rãi đến tăng số lượng, hoặc hoạt tính các tế bào NK đối với liệu pháp miễn dịch điều trị ung thư.

Trong khi đó, các phương pháp chẩn đoán ung thư chủ yếu bao gồm phát hiện ung thư qua hình ảnh đồ họa thu được bằng cách sử dụng chụp ảnh cắt lớp điện toán (computed tomography, CT), chụp cộng hưởng từ (magnetic resonance imaging, MRI) hoặc các tia X. Tuy nhiên, do các thử nghiệm này được hướng dẫn chung chỉ khi bệnh nhân có nhu cầu rõ rệt, chịu các xét nghiệm do bị đau hoặc bất tiện, và chỉ được thực hiện ở các mô nhất định, sự có mặt của ung thư có thể bị bỏ qua. Phương pháp xác định nguy cơ ung thư bằng cách sử dụng xét nghiệm máu đã và đang được phát triển, nhưng sử dụng nó như một phương pháp chẩn đoán ung thư bị giới hạn. Điều này là do bệnh nhân có thể xuất hiện dương tính đối với ung thư khi yếu tố gây bệnh đúng hơn là ung thư có mặt trong cơ quan tương ứng, do phương pháp này được thực hiện bằng cách sử dụng các dấu chuẩn ung thư trong máu, ví dụ, cho ung thư tuyến tiền liệt, ung thư ruột kết, ung thư buồng trứng, ung thư tuyến tụy hoặc ung thư gan. Có nhiều cố gắng chẩn đoán ung thư bằng cách sử dụng các kháng thể, nhưng các cố gắng như vậy bị giới hạn đối với các dạng ung thư nhất định.

Theo đó, nhu cầu về các phương pháp mới để chẩn đoán các dạng ung thư khác nhau vẫn còn tiếp tục.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Do vậy, mục đích của sáng chế là đề xuất phương pháp có thể được sử dụng trong chẩn đoán và đánh giá ung thư, cũng như các kit và các chất phản ứng hữu ích trong phương pháp như vậy.

Theo một khía cạnh theo sáng chế, sáng chế đề xuất phương pháp đo hoạt tính tế bào NK, phương pháp này bao gồm kích hoạt các tế bào NK trong mẫu máu bằng cách đó hoạt hóa nhân tạo các tế bào NK để tạo ra các xytokin được tiết bởi tế bào NK và đo lượng xytokin được tiết bởi tế bào NK này trong mẫu máu.

Theo các phương án nhất định không bị giới hạn, mẫu máu có thể là mẫu máu toàn bộ, các tế bào máu ngoại vi đơn nhân (peripheral blood mononuclear cells, PBMCs) hoặc các tế bào NK.

Theo các phương án khác, kích hoạt các tế bào NK có thể được thực hiện bằng cách ủ mẫu máu với ít nhất một xytokin kích hoạt bao gồm interleukin 2, interleukin 12, interleukin 15 và interleukin 18, hoặc các kết hợp của chúng, hoặc bằng cách ủ mẫu máu với các lipopolysaccharit (lipopolysaccharides, LPSs) hoặc axit polyinosinic:polycytidylic (polyinosinic:polycytidylic acid, poly I:C).

Theo các phương án nhất định, các xytokin được tiết bởi tế bào NK có thể bao gồm interferon-gama ($\text{IFN-}\gamma$), yếu tố hoại tử khối u alpha ($\text{TNF-}\alpha$) hoặc protein gây viêm đại thực bào-1 β (macrophage inflammatory protein, MIP-1 β).

Theo các phương án không bị giới hạn khác của phương pháp này, protein gây viêm đại thực bào-1 β (macrophage inflammatory protein, MIP-1 β) có thể được sử dụng như nhóm đối chứng để so sánh hoạt tính các tế bào NK với hoạt tính đó ở người bình thường.

Ngoài ra, phương pháp này theo các phương án nhất định có thể được thực hiện bằng cách sử dụng ít nhất một xytokin kích hoạt được dung hợp với

peptit tạo ổn định. Ví dụ, vẫn không muốn bị giới hạn, peptit tạo ổn định có thể là peptit vùng đuôi axit đầu C của họ synuclein. Theo các phương án như vậy, peptit tạo ổn định có thể bao gồm các gốc axit amin 103-115 (SEQ ID NO: 22), các gốc axit amin 114-126 (SEQ ID NO: 23), các gốc axit amin 119-140 (SEQ ID NO: 24) hoặc các gốc axit amin 130-140 (SEQ ID NO: 25) của vùng đuôi axit đầu C của α -synuclein, các gốc axit amin 85-134 của vùng đuôi axit đầu C của β -synuclein (SEQ ID NO: 27), các gốc axit amin 1-127 của γ -synuclein (SEQ ID NO: 28), hoặc các gốc axit amin 96-127 của vùng đuôi axit đầu C của γ -synuclein (SEQ ID NO: 29).

Theo các phương án khác, bước kích hoạt các tế bào NK trong mẫu máu bằng cách đó hoạt hóa nhân tạo các tế bào NK để tạo ra các xytokin được tiết bởi tế bào NK được thực hiện trong môi trường chứa protein vận chuyển, ví dụ protein albumin trong huyết thanh.

Phương pháp như được mô tả là hữu ích cụ thể để phát hiện tỷ lệ mắc hoặc tái phát ung thư. Theo các phương án như vậy, lượng xytokin được tiết bởi tế bào NK bị giảm ở đối tượng, khi so với mức này ở các cá thể bình thường, là một chỉ thị về tỷ lệ mắc hoặc tái phát ung thư.

Theo khía cạnh khác theo sáng chế, kit được đề xuất để đo hoạt tính tế bào NK. Kit này sẽ bao gồm tác nhân để kích hoạt các tế bào NK trong mẫu máu bằng cách đó hoạt hóa nhân tạo các tế bào NK để tạo ra xytokin được tiết bởi tế bào NK. Ngoài ra, kit này có thể hữu ích để thực hiện phương pháp như được mô tả trên đây, bao gồm phát hiện tỷ lệ mắc hoặc tái phát ung thư.

Theo các phương án không bị giới hạn khác về kit được mô tả, xytokin được tiết bởi tế bào NK có thể là interferon-gama (IFN- γ) hoặc yếu tố hoại tử khối u alpha (TNF- α).

Theo phương án khác, tác nhân để kích hoạt các tế bào NK trong mẫu máu và hoạt hóa nhân tạo các tế bào NK để tạo ra các xytokin được tiết bởi tế bào NK này có thể bao gồm ít nhất một xytokin kích hoạt, LPS hoặc poly I:C, ít nhất một xytokin kích hoạt bao gồm một hoặc nhiều interleukin 2, interleukin 12, interleukin 15 và interleukin 18.

Theo các phương án nhất định, kit được mô tả có thể cũng bao gồm một hoặc nhiều kháng thể sau: kháng thể kháng INF- γ , kháng thể kháng TNF- α , và kháng thể kháng MIP-1 β . Không muốn bị giới hạn theo cách bất kỳ, kit có thể cũng bao gồm thêm các hướng dẫn để so sánh lượng xytokin được tiết bởi tế bào NK ở đối tượng so với các mức này ở các cá thể bình thường, trong đó mức các xytokin được tiết bởi tế bào NK bị giảm ở đối tượng là một chỉ thị về tỷ lệ mắc hoặc tái phát ung thư.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất protein dung hợp bao gồm xytokin liên kết với peptit vùng đuôi axit đầu C của họ synuclein, xytokin là interleukin 2, interleukin 12, interleukin 15 hoặc interleukin 18.

Theo các phương án nhất định không bị giới hạn về protein dung hợp được mô tả, peptit vùng đuôi axit đầu C của họ synuclein có thể bao gồm các gốc axit amin 103-115 (SEQ ID NO: 22), các gốc axit amin 114-126 (SEQ ID NO: 23), các gốc axit amin 119-140 (SEQ ID NO: 24) hoặc các gốc axit amin

130-140 (SEQ ID NO: 25) của vùng đuôi axit đầu C của α -synuclein, các gốc axit amin 85-134 của vùng đuôi axit đầu C của β -synuclein (SEQ ID NO: 27), các gốc axit amin 1-127 của γ -synuclein (SEQ ID NO: 28), hoặc các gốc axit amin 96-127 của vùng đuôi axit đầu C của γ -synuclein (SEQ ID NO: 29).

Các chế phẩm bao gồm protein dung hợp mô tả trên đây cũng được đề xuất.

Ngoài ra, các kit chẩn đoán ung thư bao gồm các protein dung hợp mô tả trên đây hoặc các chế phẩm mô tả trên đây cũng được đề xuất ở đây.

Theo các phương án nhất định không bị giới hạn, kit chẩn đoán ung thư, như được mô tả trên đây có thể cũng bao gồm ít nhất một kháng thể trong số các kháng thể sau: kháng thể kháng INF- γ , kháng thể kháng TNF- α và kháng thể kháng MIP-1 β .

Sáng chế cũng đề xuất polypeptit bao gồm trình tự axit amin có ít nhất là 80% giống hệt với trình tự axit amin có SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, hoặc SEQ ID NO: 10. Không muốn bị giới hạn, polypeptit có thể có phần trăm giống hệt cao hơn, bao gồm 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% giống hệt với trình tự có SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, và SEQ ID NO: 10.

Các oligonucleotit mã hóa cho các protein dung hợp và các polypeptit mô tả trên đây cũng được đề xuất. Ví dụ, oligonucleotit được đề xuất bao gồm trình tự axit nucleic có ít nhất là 80% giống hệt với trình tự axit nucleic có SEQ ID

NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, hoặc SEQ ID NO: 9, hoặc trình tự bổ sung của nó. Các oligonucleotit như vậy có thể, không bị giới hạn, có phần trăm giống hệt cao hơn, bao gồm 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% giống hệt với trình tự có SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, hoặc SEQ ID NO: 9, hoặc các trình tự bổ sung của chúng.

Các vector bao gồm các oligonucleotit mô tả trên đây cũng được đề xuất, như là các tế bào chủ bao gồm các vector hoặc các oligonucleotit như vậy.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Mục đích nêu trên và các mục đích khác, các đặc điểm đặc trưng và ưu điểm của sáng chế sẽ trở nên rõ ràng hơn đối với người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật bằng cách mô tả chi tiết các phương án làm ví dụ của chúng liên quan đến các hình vẽ, trong đó:

FIG.1 là biểu đồ thể hiện các sản phẩm dung hợp của peptit SP dung hợp với đầu N hoặc đầu C của xytokin, bao gồm hIL2, hIL12, hIL15 và hIL18.

FIG.2 là ảnh thể hiện kết quả điện di của các protein SP dung hợp được tinh chế.

FIG.3 thể hiện hoạt tính tế bào NK được kích hoạt nhân tạo ở người bình thường qua phân tích hàm lượng interferon- γ được tạo ra, khi các tế bào NK được kích hoạt bởi xytokin đơn (FIG 3A) hoặc các xytokin kết hợp (FIGS. 3B - 3D).

FIG.4 là đồ thị thể hiện các xytokin tiết từ tế bào NK được kích hoạt nhân tạo qua ELISA dạng bánh kẹp.

FIG.5 thể hiện việc so sánh hoạt tính protein (A) và độ ổn định (B) giữa SP IL-2 và IL-2.

FIG.6 thể hiện hoạt tính tế bào NK ở người bình thường và bệnh nhân ung thư được điều trị riêng biệt với SP IL-2 (10ng/ml) (Điều kiện A), và SP IL-2 (5ng/ml)+IL-12 (5ng/ml) (Điều kiện B).

FIG.7 là đồ thị thể hiện khả năng tiết interferon- γ của các tế bào NK ở các tế bào T, các tế bào NK, máu toàn bộ và PBMC phù hợp với tác nhân kích hoạt IL2.

FIG.8 là đồ thị thể hiện hàm lượng interferon- γ khác nhau được tiết từ các tế bào NK ở người bình thường, khi được kích hoạt bởi LPS.

FIG.9 là đồ thị thể hiện khả năng tiết interferon- γ khác nhau của các tế bào NK theo các nồng độ điều trị của IL12 và IL15 và khác biệt ở môi trường chế phẩm.

FIG.10 là đồ thị thể hiện hàm lượng interferon- γ khác nhau được tiết theo giai đoạn ung thư.

FIG.11 thể hiện các kết quả phân tích interferon- γ tạo ra từ các tế bào NK ở người bình thường được kích hoạt bởi các xytokin bằng cách sử dụng đĩa ELISA.

FIG.12 thể hiện các kết quả đếm tế bào trong máu toàn bộ ở người bình thường được kích hoạt bởi các xytokin.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề xuất phương pháp, kit, và các chất phản ứng để chẩn đoán tỷ lệ mắc ung thư bằng cách sử dụng mối tương quan giữa ung thư và tế bào NK.

Đối với mục đích này, sáng chế đề xuất phương pháp đo hoạt tính tế bào NK bao gồm kích hoạt các tế bào NK trong mẫu máu bằng cách đó hoạt hóa nhân tạo các tế bào NK để sản sinh ra các xytokin được tiết bởi tế bào NK, và đo hàm lượng các xytokin được tiết bởi tế bào NK này trong mẫu máu.

Các tác giả sáng chế nhận thấy rằng, dựa trên quan sát hoạt tính tế bào NK bị giảm ở các bệnh nhân ung thư, tỷ lệ mắc ung thư có thể được sàng lọc sơ bộ bằng cách đo hoạt tính tế bào NK. Phương pháp được mô tả ở đây có khả năng xác định xem liệu các tế bào NK có chức năng bình thường hay không bằng cách gây kích hoạt nhân tạo các tế bào NK, và đo mức hoạt tính các tế bào NK bằng cách phát hiện những thay đổi về hàm lượng xytokin được tiết bởi tế bào NK có mặt trong mẫu máu, việc đo này là khác nhau giữa các phương pháp khác mà các phương pháp này đơn giản là đo số lượng các tế bào NK hoặc hàm lượng các xytokin có mặt ban đầu trong mẫu máu. Ví dụ, theo phương pháp thông dụng đo mức hoạt tính các tế bào NK, thử nghiệm giải phóng ^{51}Cr được sử dụng như phương pháp đo gây độc tế bào đích đặc hiệu. Tuy nhiên, khi hoạt tính tế bào NK được đo theo cách này, chất đồng vị phóng xạ được sử dụng, và việc đo và phân tích là khó khăn, phức tạp và tốn kém. Do vậy, thử nghiệm này không thích hợp để sử dụng trong các phương pháp sàng lọc/xét nghiệm sơ bộ ung thư mà có thể chẩn đoán một cách dễ dàng tỷ lệ mắc ung thư. Mặt khác,

theo sáng chế, do hoạt tính tế bào NK có thể được đo bằng cách kích hoạt các tế bào NK để sản sinh ra các xytokin được tiết bởi tế bào NK và định lượng các xytokin được tiết bởi tế bào NK được tạo ra này, đối tượng trong đó hoạt tính tế bào NK bị giảm có thể được sàng lọc một cách thuận lợi như đối tượng bị ung thư hoặc có nguy cơ bị ung thư.

Theo sáng chế, mẫu máu có thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở, máu toàn bộ, các tế bào máu ngoại vi đơn nhân (peripheral blood mononuclear cells, PBMCs) và các tế bào NK, mà được lấy từ đối tượng. PBMCs hoặc các tế bào NK có thể được sử dụng nguyên vẹn thay cho máu toàn bộ, nhưng sử dụng máu toàn bộ có thể có ưu điểm theo các phương án nhất định do phương pháp luận đơn giản hơn và giá thành giảm.

Trong khi đó, theo sáng chế, thuật ngữ “đối tượng” chỉ động vật có vú bị nghi ngờ mắc ung thư hoặc có tái phát ung thư, hoặc muốn xác định tỷ lệ mắc hoặc tái phát ung thư.

Các tế bào NK có mặt trong mẫu máu nói chung tồn tại ở trạng thái bất hoạt. Theo sáng chế, ít nhất một xytokin, lipopolysaccharit (lipopolysaccharide, LPS) hoặc axit polyinosinic:polyxytidylic (polyinosinic:polycytidylic acid, poly I:C) có thể được sử dụng như tác nhân, cũng được chỉ ở đây như một chất chủ vận hoặc chất hoạt hóa, mà sử dụng để kích hoạt các tế bào NK như vậy trong mẫu máu và hoạt hóa nhân tạo các tế bào NK để sản sinh các xytokin được tiết bởi tế bào NK. Ở đây, xytokin được sử dụng để hoạt hóa các tế bào NK có thể là interleukin 2, interleukin 12, interleukin 15 và interleukin 18, hoặc kết hợp của

chúng. Interleukin 2, interleukin 12, interleukin 15, interleukin 18, LPS hoặc poly I:C được biết rộng rãi trong nghiên cứu để kích hoạt nhằm sản sinh các xytokin được tiết bởi tế bào NK này. Do vậy, theo một phương án làm ví dụ theo sáng chế, kích hoạt tế bào NK có thể được thực hiện bằng cách ủ mẫu máu với ít nhất một xytokin, bao gồm interleukin 2, interleukin 12, interleukin 15 và/hoặc interleukin 18, hoặc bằng cách ủ mẫu máu với LPS hoặc poly I:C.

Theo một phương án không bị giới hạn, kích hoạt tế bào NK có thể được thực hiện bằng cách ủ mẫu máu với interleukin 2. Interleukin 2 là một trong số các xytokin được tiết bởi các tế bào T, và được biết là có liên quan đến hoạt tính các tế bào NK do các tế bào T trong đáp ứng miễn dịch thích ứng *in vivo*. Ngoài ra, interleukin 2 là một xytokin mà nói chung được sử dụng rộng rãi để hoạt hóa các tế bào NK *in vitro*. Do vậy, kích hoạt các tế bào NK có thể được thực hiện bằng cách ủ mẫu máu với interleukin 2.

Theo phương án không bị giới hạn khác, kích hoạt các tế bào NK có thể được thực hiện bằng cách ủ mẫu máu với interleukin 2 và interleukin 12. Trong trường hợp các bệnh nhân ung thư giai đoạn sớm, hoạt tính các tế bào T có thể cao mặc dù hoạt tính các tế bào NK là thấp. Ngược lại, trong trường hợp các bệnh nhân ung thư giai đoạn muộn, hoạt tính các tế bào T cũng như các tế bào NK có thể thấp. Interleukin 12 tham gia hoạt hóa các tế bào T cũng như các tế bào NK. Như vậy, interleukin 12 với interleukin 2 được xử lý, các xytokin được tiết do kích hoạt các tế bào T được bổ sung vào xytokin được tiết từ các tế bào NK. Do vậy, có khả năng đánh giá mức miễn dịch tổng thể cũng như miễn dịch

chống ung thư của các tế bào NK, và sử dụng mức này như dấu chuẩn thể hiện mức phát triển của ung thư hoặc tiên lượng điều trị ung thư. Interleukin 15 và interleukin 18 là các xytokin được tiết bởi các tế bào có tua được hoạt hóa và các đại thực bào, và cảm ứng hoạt tính và phát triển tế bào NK trong đáp ứng miễn dịch bẩm sinh *in vitro*. Cụ thể là, khi interleukin 12 kết hợp với interleukin 15 hoặc interleukin 18, hàm lượng tương đối nhỏ của interleukin 12 có thể được sử dụng để kích hoạt sự tiết các xytokin được tiết bởi tế bào NK ở các tế bào NK này. Do vậy, kích hoạt các tế bào NK có thể được thực hiện hiệu quả bằng cách ủ mẫu máu với interleukin 12 và interleukin 15, hoặc với interleukin 12 và interleukin 18.

Theo sáng chế, giá trị số của các xytokin được tiết bởi tế bào NK được sử dụng như thước đo để đánh giá hoạt tính tế bào NK. Theo sáng chế, “các xytokin được tiết bởi tế bào NK” chỉ các xytokin được tiết từ các tế bào NK, cụ thể là các xytokin từ các tế bào NK được hoạt hóa bằng cách kích hoạt nhân tạo. Theo một phương án, các xytokin được tiết bởi tế bào NK ít nhất là một xytokin được chọn từ nhóm interferon-gama ($\text{IFN-}\gamma$), yếu tố hoại tử khối u alpha ($\text{TNF-}\alpha$) và protein gây viêm đại thực bào-1 β ($\text{MIP-1}\beta$). Interferon- γ được tiết bởi các tế bào NK, các tế bào tua, các tế bào Tc, các tế bào Th1, và tương tự, và được biết là xytokin có vai trò quan trọng trong miễn dịch bẩm sinh và miễn dịch thích ứng để kiểm soát ung thư. Hơn nữa, yếu tố hoại tử khối u alpha ($\text{TNF-}\alpha$) tiêu diệt các tế bào ung thư và tham gia thêm vào tiêu diệt mầm bệnh thâm nhập từ bên ngoài như vi khuẩn, cảm ứng hoạt hóa các tế bào T, và đóng vai trò như

yếu tố bổ sung để sản sinh kháng thể từ các tế bào B. Do vậy, ví dụ, khi giá trị số của interferon- γ hoặc yếu tố hoại tử khối u alpha nhỏ hơn giá trị số của interferon- γ hoặc yếu tố hoại tử khối u alpha ở người bình thường, điều này biểu thị là hoạt tính tế bào NK để kiểm soát ung thư có vấn đề. Do vậy, có khả năng xác định hoạt tính tế bào NK bằng cách so sánh hàm lượng interferon- γ hoặc yếu tố hoại tử khối u alpha được tiết từ các tế bào NK được kích hoạt nhân tạo với lượng interferon- γ hoặc yếu tố hoại tử khối u alpha ở người bình thường.

Trong khi đó, protein gây viêm đại thực bào-1 β (MIP-1 β) có thể được sử dụng như nhóm đối chứng để so sánh hoạt tính các tế bào NK. Như được thể hiện trong các ví dụ sau, giá trị số của protein gây viêm đại thực bào-1 β (MIP-1 β) là cao tương đương ở cả người bình thường và bệnh nhân ung thư. Như vậy, protein gây viêm đại thực bào-1 β (MIP-1 β) có thể được sử dụng để phân tích hoạt tính các tế bào NK ở người bình thường và ở bệnh nhân ung thư, hoặc có thể được sử dụng như nhóm đối chứng để phân tích bằng cách sử dụng kit chẩn đoán ung thư.

Định lượng các xytokin được tiết bởi tế bào NK có thể được thực hiện bởi các phương pháp bất kỳ được biết trong nghiên cứu, nhưng sáng chế không bị giới hạn theo đó. Ví dụ, định lượng interferon- γ có thể được thực hiện bằng cách sử dụng thử nghiệm chất hấp phụ miễn dịch liên kết enzym đối với interferon- γ (interferon- γ enzyme-linked immunosorbent assay, Interferon- γ ELISA).

Trong khi đó, ít nhất một xytokin bao gồm interleukin 2, interleukin 12, interleukin 15 hoặc interleukin 18, được sử dụng như tác nhân dùng để kích hoạt

các tế bào NK trong mẫu máu và hoạt hóa nhân tạo các tế bào NK để tạo ra các xytokin được tiết bởi tế bào NK, có thể trong dạng protein dung hợp với peptit tạo ổn định.

Interleukin 2, interleukin 12, interleukin 15 hoặc interleukin 18 ở dạng protein dung hợp với peptit tạo ổn định có thể cung cấp hoạt tính sinh học tương tự và độ ổn định cao khi bảo quản, được so với hoạt tính và độ ổn định của interleukin 2, interleukin 12, interleukin 15 hoặc interleukin 18 dạng tự nhiên. Ví dụ, khi xytokin liên kết với peptit tạo ổn định như vậy, xytokin này có hoạt tính bẩm sinh trong khi duy trì độ ổn định bất chấp những thay đổi về môi trường, như lạnh-khô.

Peptit tạo ổn định có thể liên kết với đầu N hoặc đầu C của interleukin 2, interleukin 12, interleukin 15 hoặc interleukin 18, và điều chế protein dung hợp như vậy có thể được thực hiện bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết về điều chế các protein dung hợp.

Theo một phương án làm ví dụ, peptit vùng đuôi axit đầu C (trình tự axit amin đuôi axit của alpha-synuclein, acidic tail amino acid sequence of alpha-synuclein, ATS) của họ synuclein có thể được sử dụng như peptit tạo ổn định mà có thể liên kết với interleukin 2, interleukin 12, interleukin 15 hoặc interleukin 18, nhưng sáng chế không bị giới hạn theo đó. Patent Nam Triều Tiên được đăng ký số No. 10-0506766 bộc lộ là peptit ATS cung cấp protein dung hợp đối tượng có tính kháng lại các căng thẳng của môi trường.

Theo một phương án làm ví dụ, peptit tạo ổn định có thể được sử dụng ở đây bao gồm peptit tạo ổn định được chọn từ các gốc axit amin 103-115, các gốc axit amin 114-126, các gốc axit amin 119-140 và các gốc axit amin 130-140 của vùng đuôi axit đầu C của α -synuclein, các gốc axit amin 85-134 của vùng đuôi axit đầu C của β -synuclein, các gốc axit amin 96-127 của vùng đuôi axit đầu C của γ -synuclein, và các gốc axit amin 96-127 của vùng đuôi axit đầu C của synoretin. Theo sáng chế, trình tự axit amin của peptit ATS, peptit ATS và phương pháp điều chế protein dung hợp bao gồm những trình tự và phương pháp giống như vậy có thể được thực hiện bằng cách sử dụng phương pháp được bộc lộ trong Patent Nam Triều Tiên đăng ký số No. 10-0506766. Liên quan đến các ví dụ sau đây, thể hiện interleukin 2, interleukin 12, interleukin 15 hoặc interleukin 18 được dung hợp với peptit ATS là có độ ổn định cao, và biểu hiện hoạt tính tương tự với dạng tự nhiên khi xytokin được hoạt hóa bởi tế bào lympho T.

Theo một phương án, bước kích hoạt các tế bào NK trong mẫu máu bằng cách đó hoạt hóa nhân tạo các tế bào NK để tạo ra các xytokin được tiết bởi tế bào NK có thể được thực hiện trong môi trường chứa protein vận chuyển. Protein vận chuyển đóng vai trò làm ổn định các xytokin như interleukin 2, interleukin 12, interleukin 15 hoặc interleukin 18 mà được sử dụng như tác nhân để kích hoạt các tế bào NK trong mẫu máu và hoạt hóa nhân tạo các tế bào NK để sản sinh các xytokin được tiết bởi tế bào NK này, và bằng cách đó cảm ứng các tế bào NK sản sinh nhiều hơn các xytokin được tiết bởi tế bào NK. Theo các

phương án nhất định, protein vận chuyển có thể là albumin huyết thanh bò hoặc albumin huyết thanh người, nhưng không bị giới hạn theo đó.

Trong khi đó, phương pháp đo hoạt tính tế bào NK có thể được sử dụng để sàng lọc tỷ lệ mắc hoặc tái phát ung thư.

Hoạt tính tế bào NK có thể được đo bằng cách so sánh hàm lượng xytokin tiết bởi tế bào NK được tiết từ các tế bào NK được kích hoạt nhân tạo với hàm lượng các xytokin được tiết bởi tế bào NK ở người bình thường. Trong trường hợp này, khi hàm lượng các xytokin được tiết bởi tế bào NK nhỏ hơn hàm lượng các xytokin được tiết bởi tế bào NK này ở người bình thường, hoạt tính tế bào NK được cho là bị giảm. Do vậy, có khả năng đánh giá nguy cơ ung thư hoặc sự tái phát ung thư. Khi hoạt tính tế bào NK bị giảm so với người bình thường, đối tượng có thể bị xếp sơ bộ như bệnh nhân bị nghi ngờ mắc ung thư hoặc bệnh nhân có sự tái phát ung thư. Thêm nữa, tỷ lệ mắc hoặc tái phát ung thư có thể được chẩn đoán qua phương pháp chẩn đoán bổ sung như CT, MRI hoặc chụp positron cắt lớp (positron emission tomography PET) thường được thực hiện cho chẩn đoán ung thư, và qua thử nghiệm mô cuối cùng. Mặc dù phương pháp theo sáng chế không là phương pháp chẩn đoán ung thư không thể thay đổi, mục tiêu của phương pháp này có giá trị bởi vì tỷ lệ mắc hoặc tái phát ung thư có thể được sàng lọc sơ bộ bằng cách sử dụng máu.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất kit để đo hoạt tính tế bào NK, bao gồm chất phản ứng, như chất chủ vận hoặc chất hoạt hóa mà sử dụng để kích hoạt các tế bào NK trong mẫu máu và hoạt hóa nhân tạo các tế bào NK để tạo ra các

xytokin được tiết bởi tế bào NK. Kit như vậy để đo hoạt tính tế bào NK có thể được sử dụng để thực hiện dễ dàng phương pháp đề cập trên đây nhằm đo hoạt tính tế bào NK.

Trong kit đo hoạt tính tế bào NK, tác nhân sử dụng để kích hoạt các tế bào NK và hoạt hóa nhân tạo các tế bào NK để tạo ra các xytokin được tiết bởi tế bào NK có thể ít nhất là một xytokin, LPS hoặc poly I:C, và xytokin này có thể được chọn từ nhóm gồm có interleukin 2, interleukin 12, interleukin 15 và interleukin 18.

Ngoài ra, tác nhân sử dụng để kích hoạt các tế bào NK và hoạt hóa nhân tạo các tế bào NK để sản sinh các xytokin được tiết bởi tế bào NK này như interferon- γ , kit chẩn đoán ung thư như vậy có thể bao gồm các thành phần bổ sung để đo hoạt tính tế bào NK, ví dụ kháng thể để định lượng các xytokin được tiết bởi tế bào NK, và cơ chất. Theo một phương án, kit theo sáng chế bao gồm thêm ít nhất một kháng thể được chọn từ nhóm có kháng thể kháng INF- γ , kháng thể kháng TNF- α và kháng thể kháng MIP-1 β .

Kháng thể trong kit theo sáng chế có thể được cố định vào cơ chất rắn. Kháng thể có thể được cố định vào bằng cách sử dụng các phương pháp khác nhau như được mô tả trong tài liệu (*Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlow & Lane; Cold Spring Harbor, 1988). Cơ chất rắn thích hợp có thể bao gồm đĩa nuôi cấy tế bào, đĩa ELISA, ống nghiệm và phim trùng hợp. Ngoài ra, cơ chất rắn bao gồm thanh, thủy tinh tổng hợp, hạt agarosa, ống, hộp phẳng, hoặc các

phim khác hoặc các chất phủ mà được cung cấp hoặc được gắn vào giá đỡ rắn này.

Hơn nữa, kit theo sáng chế có thể bao gồm chất phản ứng được sử dụng để phân tích miễn dịch với kháng thể nhận biết chọn lọc các xytokin được tiết bởi tế bào NK như interferon- γ . Phân tích miễn dịch có thể bao gồm tất cả các phương pháp mà có thể đo liên kết của kháng nguyên với kháng thể theo sáng chế. Các phương pháp như vậy là được biết trong nghiên cứu, và bao gồm, ví dụ, hóa miễn dịch tế bào và hóa mô miễn dịch, thử nghiệm miễn dịch phóng xạ, ELISA, chấm miễn dịch, thử nghiệm Farr, phản ứng precipitin, phương pháp đo độ đục, khuếch tán miễn dịch, điện phân ngược chiều, miễn dịch khuếch tán đơn và huỳnh quang miễn dịch.

Chất phản ứng được sử dụng để phân tích miễn dịch bao gồm chất mang thích hợp, chất đánh dấu có khả năng tạo ra tín hiệu có thể được phát hiện, chất phản ứng hòa tan, và chất tẩy. Hơn nữa, khi nguyên liệu đánh dấu là enzym, chất phản ứng có thể bao gồm cơ chất, mà có thể đo hoạt tính enzym, và chất phản ứng dừng phản ứng. Chất mang thích hợp có thể bao gồm, không bị giới hạn ở, chất mang tan, ví dụ một trong số các đệm sinh lý có sẵn được biết trong nghiên cứu (ví dụ, PBS) hoặc chất mang không tan, ví dụ polyme như các hạt từ tính thu được bằng cách phủ kim loại trên polystyren, polyetylen, polypropylen, polyeste, polyacrylonitril, nhựa flo, dextran có thể liên kết chéo, polysacarit và mủ cao su, và giấy, thủy tinh, các kim loại, agarosa khác, và kết hợp của chúng.

Khi chất đánh dấu có thể tạo ra tín hiệu có thể được phát hiện, enzym, nguyên liệu huỳnh quang, nguyên liệu phát quang và nguyên liệu phóng xạ có thể được sử dụng. Khi enzym, peroxidaza, alkaline phosphatase, β -D-galactosidase, glucose oxidase, malate dehydrogenase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, invertase và tương tự có thể được sử dụng, và isothiocyanate fluorescein hoặc phycoerythrin có thể được sử dụng như nguyên liệu huỳnh quang, luciferin hoặc luciferase có thể được sử dụng như nguyên liệu phát quang, và I_{131} , C_{14} hoặc H_3 có thể được sử dụng như nguyên liệu phóng xạ. Tuy nhiên, bổ sung vào các nguyên liệu làm ví dụ này là các nguyên liệu bất kỳ mà có thể được sử dụng để phân tích miễn dịch có thể được sử dụng ở đây.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất protein dung hợp bao gồm cytokin liên kết với peptit vùng đuôi axit đầu C của họ synclestin. Ở đây, cytokin có thể là interleukin 2, interleukin 12, interleukin 15 hoặc interleukin 18. Như được mô tả trên đây, protein dung hợp như vậy có thể được sử dụng như tác nhân dùng để kích hoạt các tế bào NK và hoạt hóa nhân tạo các tế bào NK để tạo ra các cytokin được tiết bởi tế bào NK, và cung cấp độ ổn định cao hơn bất chấp những thay đổi về môi trường như lạnh-khô hoặc thời gian bảo quản dài, so với interleukin 2, interleukin 12, interleukin 15 hoặc interleukin 18 dạng tự nhiên.

Theo một phương án làm ví dụ, protein dung hợp có thể là một protein dung hợp trong đó interleukin 2 liên kết với peptit vùng đuôi axit đầu C của họ synclestin.

Theo phương án khác làm ví dụ, protein dung hợp có thể là một protein dung hợp trong đó interleukin 12 liên kết với peptit vùng đuôi axit đầu C của họ synuclein.

Theo phương án vẫn khác làm ví dụ, protein dung hợp có thể là một protein dung hợp trong đó interleukin 15 liên kết với peptit vùng đuôi axit đầu C của họ synuclein.

Theo phương án khác nữa làm ví dụ, protein dung hợp có thể là một protein dung hợp trong đó interleukin 18 liên kết với peptit vùng đuôi axit đầu C của họ synuclein.

Trong protein dung hợp, peptit vùng đuôi axit đầu C của họ synuclein có thể cũng được chọn từ các gốc axit amin 103-115, các gốc axit amin 114-126, các gốc axit amin 119-140 và các gốc axit amin 130-140 của vùng đuôi axit đầu C của α -synuclein, các gốc axit amin 85-134 của vùng đuôi axit đầu C của β -synuclein, các gốc axit amin 96-127 của vùng đuôi axit đầu C của γ -synuclein, và các gốc axit amin 96-127 của vùng đuôi axit đầu C của synoretin.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất sử dụng protein dung hợp để hoạt hóa các tế bào NK. Như được mô tả trên đây, protein dung hợp như vậy có thể được sử dụng để hoạt hóa các tế bào NK trong máu đầy mạnh tiết các xytokin được tiết bởi tế bào NK.

Do vậy, sáng chế đề xuất chế phẩm để hoạt hóa các tế bào NK. Ở đây, chế phẩm bao gồm ít nhất một protein dung hợp được chọn từ nhóm gồm có interleukin 2 liên kết với peptit vùng đuôi axit đầu C của họ synuclein,

interleukin 12 liên kết với peptit vùng đuôi axit đầu C của họ synuclein, interleukin 15 liên kết với peptit vùng đuôi axit đầu C của họ synuclein, và interleukin 18 liên kết với peptit vùng đuôi axit đầu C của họ synuclein.

Theo một phương án làm ví dụ, peptit vùng đuôi axit đầu C của họ synuclein có thể được chọn từ các gốc axit amin 103-115, các gốc axit amin 114-126, các gốc axit amin 119-140 và các gốc axit amin 130-140 của vùng đuôi axit đầu C của α -synuclein, các gốc axit amin 85-134 của vùng đuôi axit đầu C của β -synuclein, các gốc axit amin 96-127 của vùng đuôi axit đầu C của γ -synuclein, và các gốc axit amin 96-127 của vùng đuôi axit đầu C của synoretin.

Trong khi đó, chế phẩm để hoạt hóa các tế bào NK có thể bao gồm đệm có khả năng giữ và bảo quản protein dung hợp, ngoài các xytokin dung hợp với peptit tạo ổn định.

Hơn nữa, sáng chế đề xuất kit chẩn đoán ung thư bao gồm ít nhất một protein dung hợp được chọn từ nhóm gồm có interleukin 2 liên kết với peptit vùng đuôi axit đầu C của họ synuclein, interleukin 12 liên kết với peptit vùng đuôi axit đầu C của họ synuclein, interleukin 15 liên kết với peptit vùng đuôi axit đầu C của họ synuclein, và interleukin 18 liên kết với peptit vùng đuôi axit đầu C của họ synuclein. Như được mô tả trên đây, khi mẫu máu lấy từ đối tượng được ủ với protein dung hợp, các tế bào NK trong mẫu máu được hoạt hóa. Do vậy, hoạt tính tế bào NK ở đối tượng có thể được đo bằng cách định lượng interferon- γ tạo ra bằng cách hoạt hóa các tế bào NK, bằng cách đó sơ bộ chẩn đoán ung thư bằng cách phân loại các đối tượng người có hoạt tính tế bào NK

thấp hơn hoạt tính này ở người bình thường như các bệnh nhân có nguy cơ bị ung thư hoặc có tái phát ung thư.

Theo một phương án làm ví dụ, peptit vùng đuôi axit đầu C của họ synuclein có thể được chọn từ các gốc axit amin 103-115, các gốc axit amin 114-126, các gốc axit amin 119-140 và các gốc axit amin 130-140 của vùng đuôi axit đầu C của α -synuclein, các gốc axit amin 85-134 của vùng đuôi axit đầu C của β -synuclein, các gốc axit amin 96-127 của vùng đuôi axit đầu C của γ -synuclein, và các gốc axit amin 96-127 của vùng đuôi axit đầu C của synoretin.

Ngoài protein dung hợp, kit chẩn đoán ung thư như vậy có thể bao gồm các thành phần bổ sung được sử dụng để thực hiện phương pháp chẩn đoán theo sáng chế, ví dụ kháng thể để định lượng các xytokin được tiết bởi tế bào NK, và cơ chất. Các thành phần này được mô tả trên đây đề cập đến kit đo hoạt tính tế bào NK. Hướng dẫn sử dụng các thành phần này theo phương pháp mô tả trên đây có thể cũng được bao gồm trong kit.

Sẽ trở nên rõ ràng là các đặc điểm đặc trưng, các khía cạnh, và các ưu điểm này và các ưu điểm khác của các phương án ưu tiên hơn theo sáng chế sẽ được mô tả đầy đủ hơn trong các ví dụ sau đây. Cũng được hiểu là các ví dụ này được cung cấp chỉ với mục đích minh họa, và không dự định giới hạn phạm vi của sáng chế. Một chuyên gia có kỹ năng trong nghiên cứu sẽ hiểu là các dạng tương đương và biến đổi khác có thể được tạo ra không trệtch phạm vi của sáng chế như được yêu cầu bảo hộ.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ điều chế 1: Xây dựng vector biểu hiện peptit tạo ổn định - Protein dung hợp IL

Để điều chế IL-2, IL-12 IL-15 hoặc IL-18 dung hợp với peptit tạo ổn định, vector biểu hiện được xây dựng. Peptide chứa các gốc axit amin 119-140 của α -synuclein (SEQ ID NO: 24; sau đây, được chỉ như “SP”) được sử dụng như peptit tạo ổn định. Các cADN của IL2, IL12p35, IL12p40, IL15 và IL-18 thu được bằng cách phân tách ARN tổng số từ tế bào lympho ở người bằng cách sử dụng kit tách chiết ARN tổng số (Invitron Biotechnology) và phiên mã ngược ARN tổng số bằng cách sử dụng enzym phiên mã ngược (reverse transcriptaza) (Invitrogen). cADN tạo ra được sử dụng làm khuôn, và được khuếch đại bởi PCR bằng cách sử dụng các môi đặc hiệu cho mỗi gen cADN sau đây:

IL2-22-BamH1-F: ACAGGATCCCCTACTTCAAGTTCT (SEQ ID NO:11)

IL2-153-Xho-R: CACTCTCGAGTCAAGTCAGTGTTGAGAT (SEQ ID NO:12)

IL12-p40-23-BamH: GTGGATCCATATGGGAACTGAAGAAAGATG (SEQ ID NO:13)

IL12-p40-328-CT-His: ATGGTGATGATGACTGCAGGGCACAGATGCCC (SEQ ID NO:14)

IL12-p35-23-BamH: GTGGATCCAGAAACCTCCCCGTGGC (SEQ ID NO:15)

IL12-p35-219-CT-His: ATGGTGATGATGGGAAGCATTTCAGATAGC (SEQ ID NO:16)

IL15-49-Nde: GAGTCAAGCATATGAACTGGGTGAATGTAA (SEQ ID NO:17)

IL15-162-BamH-R: GTGGATCCAGAAGTGTTGATGAAC (SEQ ID NO:18)

IL18-37-BamH: GTGGATCCTACTTTGGCAAGCTTG (SEQ ID NO:19)

IL18-193-EcoR1: AGACTGGAATTCCTAGTCTTCGTTTTG (SEQ ID NO:20).

FIG.1 là cách nhìn dưới dạng biểu đồ thể hiện cấu trúc các sản phẩm dung hợp SP với các xytokin được chú ý, bao gồm IL2, IL12p35, IL12p40, IL15 và IL-18. Như được minh họa trong hình, sản phẩm dung hợp SP-hIL2 được xây dựng bằng cách lần lượt nhân dòng tiếp sau các gen mã hóa cho hIL2 được khuếch đại bằng PCR và các gốc axit amin 119-140 của α -synuclein vào vector biểu hiện pRSETA. Sản phẩm dung hợp SP-hIL12p40 được xây dựng bằng cách lần lượt nhân dòng tiếp sau các gen mã hóa cho hIL12p40 được khuếch đại bằng PCR và các gốc axit amin 119-140 của α -synuclein vào vector biểu hiện pVL1393. Sản phẩm dung hợp SP-hIL12p35 được xây dựng bằng cách lần lượt nhân dòng tiếp sau các gen mã hóa cho hIL12p35 được khuếch đại bằng PCR và các gốc axit amin 119-140 của α -synuclein vào vector biểu hiện pVL1393. Sản phẩm dung hợp hIL15-SP được xây dựng bằng cách lần lượt nhân dòng tiếp sau các gen mã hóa cho hIL15 được khuếch đại bằng PCR và các gốc axit amin 119-140 của α -synuclein vào vector biểu hiện pRSETA. Sản phẩm dung hợp SP-hIL18 được xây dựng bằng cách lần lượt nhân dòng tiếp sau mã hóa cho hIL18 được khuếch đại bằng PCR và các gốc axit amin 119-140 của α -synuclein vào vector biểu hiện pRSETA. Các trình tự của tất cả các cấu trúc được khẳng định bằng xác định trình tự ADN.

Các trình tự axit nucleic và axit amin của sản phẩm dung hợp SP-hIL2 được trình bày trong các SEQ ID NO: 1 và 2, tương ứng. Các trình tự axit

nucleic và axit amin của sản phẩm dung hợp SP-hIL12p40 được trình bày trong các SEQ ID NO: 3 và 4, tương ứng. Các trình tự axit nucleic và axit amin của sản phẩm dung hợp SP-hIL12p35 được trình bày trong các SEQ ID NO: 5 và 6, tương ứng. Như được thể hiện trong FIG.1, trình tự đuôi 6X His được bao gồm trong mỗi vector cho mục đích phân tách và tinh chế sản phẩm dung hợp SP-hIL12p40 và sản phẩm dung hợp SP-hIL12p35 mà được biểu hiện bởi các virus. Các trình tự axit nucleic và axit amin của sản phẩm dung hợp hIL15-SP được trình bày trong các SEQ ID NO: 7 và 8, tương ứng. Hơn nữa, các trình tự axit nucleic và axit amin của sản phẩm dung hợp SP-hIL18 được trình bày trong các SEQ ID NO: 9 và 10, tương ứng.

Ví dụ điều chế 2: Biểu hiện và tinh chế protein SP dung hợp tái tổ hợp

Vector biểu hiện được xây dựng để biểu hiện protein SP-hIL2 tái tổ hợp được biến nạp vào *Escherichia coli* BL21(DE3)RIPL (Invitrogen), và được ủ. Dịch nuôi cấy được ly tâm tại 10.000 vòng/phút trong 10 phút để thu được viên tế bào. Viên tế bào này được làm tái huyền phù trong đệm muối phosphat (PBS, độ pH 7,4), và sau đó được làm đồng nhất bằng cách siêu âm. Protein SP dung hợp được biểu hiện trong dạng không tan ở *E. coli* là đối tượng cho quy trình cuộn gấp lại, và sau đó được tinh chế bằng cách sử dụng nhựa trao đổi ion.

Hai vector biểu hiện được xây dựng để biểu hiện protein SP-hIL12 tái tổ hợp được chuyển nhiễm vào các dòng tế bào côn trùng, các tế bào sf21, để sản sinh các dịch nuôi cấy virus, tương ứng. Hai dịch nuôi cấy virus tạo ra được chuyển nhiễm vào dòng tế bào côn trùng sf21 tại cùng thời gian để sản sinh

protein IL12p70 dị đime trong đó IL12p40 liên kết với IL12p35, mà sau đó được tinh chế.

Vecto biểu hiện được xây dựng để biểu hiện protein hIL15-SP tái tổ hợp biến nạp vào *E. coli* BL21(DE3)RIPL (Invitrogen), và sau đó được ủ. Dịch nuôi cấy được ly tâm tại 10.000 vòng/phút trong 10 phút để thu được viên tế bào. Viên tế bào này được làm tái huyền phù trong PBS (độ pH 7,4), và sau đó được làm đồng nhất bằng cách siêu âm. Protein SP dung hợp được biểu hiện trong dạng hòa tan ở *E. coli* được tinh chế bằng cách sử dụng nhựa trao đổi ion.

Vecto biểu hiện được xây dựng để biểu hiện protein SP-hIL1 tái tổ hợp biến nạp vào *E. coli* BL21(DE3)RIPL (Invitrogen), và sau đó được ủ. Dịch nuôi cấy được ly tâm tại 10.000 vòng/phút trong 10 phút để thu được viên tế bào. Viên tế bào này được làm tái huyền phù trong PBS (độ pH 7,4), và sau đó được làm đồng nhất bằng cách siêu âm. Protein SP dung hợp được biểu hiện trong dạng hòa tan ở *E. coli* được tinh chế bằng cách sử dụng nhựa trao đổi ion.

Protein SP dung hợp tinh chế (3 μ g) được điện di bằng cách sử dụng SDS-PAGE 15% để khẳng định protein cuối cùng được tinh chế (FIG.2; (a) protein SP-hIL2 (ATGen, Cat# ATGK04), (b) protein IL15-SP (ATGen, Cat# ATGK06), và (c) protein SP-IL18 (ATGen, Cat# ATGK07)).

Ví dụ thực nghiệm 1: Khẳng định dạng xytokin có khả năng hoạt hóa các tế bào NK trong máu toàn bộ

1ml máu toàn bộ ở người bình thường và 1ml môi trường RPMI1640 được cho vào đĩa nuôi cấy tế bào 24 giếng, được trộn với 10ng/ml mỗi

interleukin tái tổ hợp ở người IL-2, IL-12, IL-15 và IL-18, và sau đó được nuôi cấy trong 24 giờ. Sau 24-giờ nuôi cấy, dịch nổi phía trên được lấy, và hàm lượng interferon- γ trong dịch nổi phía trên được đo bằng cách sử dụng phương pháp ELISA dạng bánh kẹp (FIG.3A). Kết quả là, các xytokin được tiết bởi các tế bào NK trong mẫu máu ở người bình thường không được phát hiện do lượng của chúng rất nhỏ, nhưng khi mẫu máu được xử lý với ít nhất một trong số IL-2, IL-12, IL-15 và IL-18, các mức xytokin được tiết bởi các tế bào NK trong mẫu máu tăng. Khi mẫu máu này chỉ được xử lý với chất kích hoạt tế bào NK, mức interferon- γ trong mẫu máu cho thấy là tăng lên đặc biệt ở các nhóm được xử lý với IL-2 và với IL-12 (FIG.3A).

Ngoài ra, 1ml máu toàn bộ của người bình thường và 1ml môi trường RPMI1640 được cho vào đĩa nuôi cấy tế bào 24 giếng, được xử lý với các kết hợp khác nhau của interleukin tái tổ hợp ở người như được thể hiện trong FIG.3B (mỗi interleukin 10ng/ml), và được nuôi cấy trong 24 giờ. Sau 24-giờ nuôi cấy, dịch nổi phía trên được lấy, và mức interferon- γ được đo theo cách giống nhau như được mô tả trên đây. Khi máu toàn bộ được xử lý với các kết hợp khác nhau của các chất kích hoạt tế bào NK, mức interferon- γ được thấy là tăng lên đặc biệt khi có mặt IL-2+IL-12 (FIG.3B).

Hơn nữa, để đo mức interferon- γ sau xử lý với IL-12 và IL-15 kết hợp, máu toàn bộ được xử lý với chất kích hoạt tế bào NK có nồng độ như được thể hiện trong FIG.3C, và được nuôi cấy trong 24 giờ. Sau 24-giờ nuôi cấy, dịch nổi

phía trên được lấy, và mức interferon- γ được đo theo cách giống như được mô tả trên đây.

Để đo mức interferon- γ sau xử lý với IL-12 và IL-18 kết hợp, máu toàn bộ cũng được xử lý với chất kích hoạt tế bào NK có nồng độ như được thể hiện trong FIG.3D, và sau đó được nuôi cấy trong 24 giờ. Sau 24-giờ nuôi cấy, dịch nổi phía trên được lấy, và mức interferon- γ được đo theo cách giống như được mô tả trên đây.

Ví dụ thực nghiệm 2: Kháng định các dạng xytokin tiết từ tế bào NK được hoạt hóa nhân tạo với IL-2

Các mẫu máu toàn bộ được lấy từ 61 người bình thường và 50 bệnh nhân ung thư. 1ml máu toàn bộ và 1ml môi trường RPMI1640 được cho vào đĩa nuôi cấy tế bào 24 giếng, được xử lý với 10ng/ml interleukin SP IL-2 tái tổ hợp ở người, và sau đó được nuôi cấy trong 24 giờ. Sau 24-giờ nuôi cấy, dịch nổi phía trên được lấy, và sau đó các mức interferon- γ , TNF- α và MIP-1 β được đo bằng cách sử dụng phương pháp ELISA dạng bánh kẹp. Kết quả kháng định là, interferon- γ và TNF- α được tiết từ máu toàn bộ của người bình thường có hàm lượng nhỏ hơn hàm lượng đó ở bệnh nhân ung thư, nhưng MIP-1 β được tiết từ mẫu máu toàn bộ của người bình thường và bệnh nhân ung thư, như được thể hiện trong FIG.4.

Trong trường hợp chẩn đoán *in vitro* các chất phản ứng được sử dụng trong xét nghiệm bệnh, hàng loạt các kỹ thuật xác nhận được sử dụng. Nói chung là, mức bình thường và thử nghiệm giới hạn được sử dụng ở đây. Mức

bình thường là mức tham chiếu mà được sử dụng để đo giá trị trung bình và độ lệch chuẩn của mỗi nhóm mẫu, và thử nghiệm giới hạn là phương pháp đo độ nhạy và độ đặc hiệu lâm sàng bằng cách tính toán giá trị đánh giá của chất phản ứng chẩn đoán *in vitro*. Độ nhạy lâm sàng nghĩa là xác suất được chứng minh thể hiện các kết quả dương tính trong xét nghiệm chẩn đoán khi bệnh nhân bị bệnh, và độ đặc hiệu lâm sàng nghĩa là xác suất được chứng minh thể hiện kết quả âm tính trong xét nghiệm chẩn đoán khi bệnh nhân không bị bệnh.

Được cho là, khi giá trị giới hạn lớn hơn 10% và nhỏ hơn 10%, giá trị giới hạn này là tập hợp các giá trị dương tính và âm tính, tương ứng. Sau đó, độ nhạy lâm sàng và độ đặc hiệu lâm sàng được đo bằng cách sử dụng thử nghiệm giới hạn. Các kết quả này được liệt kê trong Bảng 1.

Bảng 1

	IFN- γ	TNF- α	MIP-1 β
Độ nhạy lâm sàng (%)	98,4	90,9	100
Độ đặc hiệu lâm sàng (%)	98,0	69,0	50

Trong các nhóm bệnh nhân ung thư và người bình thườngs, IFN- γ được đo có độ nhạy là 98,4% và độ đặc hiệu là 98%. Mặc dù TNF- α được đo có độ nhạy là 90,9% và độ đặc hiệu là 69%, thấp hơn độ nhạy và độ đặc hiệu này của IFN- γ , các kit chẩn đoán ung thư được phát triển cho đến hiện nay có độ đặc hiệu tối đa là 20 đến 30%. Như vậy, dự kiến là TNF- α có độ đặc hiệu là khoảng

70% hoặc cao hơn có thể cũng được sử dụng như dấu chuẩn cho các kit chẩn đoán ung thư để đo hoạt tính tế bào NK.

Ví dụ thực nghiệm 3: So sánh độ ổn định của SP IL-2 và IL-2

Để so sánh độ ổn định của SP IL-2 và IL-2, các mẫu máu toàn bộ được lấy từ hai người. 1ml mỗi mẫu máu toàn bộ thu được và 1ml môi trường RPMI1640 được cho vào đĩa nuôi cấy tế bào 24 giếng, và SP IL-2 và IL-2 sau đó được bổ sung, được trộn kỹ, và sau đó được nuôi cấy trong 24 giờ. Sau 24 giờ nuôi cấy, dịch nổi phía trên được lấy, và mức interferon- γ được đo bằng cách sử dụng phương pháp ELISA dạng bánh kẹp. Từ các kết quả của các thử nghiệm hoạt tính IL-2 và SP IL-2 này, hai protein (FIG.5A) được thấy là không có sai khác về hoạt tính. Tuy nhiên, khi máu toàn bộ được xử lý với SP IL-2 thay vì IL-2 trong các điều kiện nuôi cấy máu toàn bộ, tương ứng, khẳng định là các tế bào NK được hoạt hóa bởi SP IL-2, bằng cách đó làm tăng mức interferon- γ (FIG.5B). Điều này biểu thị là không có sự sai khác về hoạt tính của hai protein này nhưng độ ổn định của IL-2 tăng lên do dùng SP.

Ví dụ thực nghiệm 4: So sánh hoạt tính tế bào NK ở người bình thường và các bệnh nhân ung thư theo điều kiện kích hoạt các tế bào NK

1ml mỗi mẫu trong các mẫu máu toàn bộ được lấy từ 20 người bình thường và 48 bệnh nhân ung thư giai đoạn cuối (giai đoạn 3 đến 4), và 1ml môi trường RPMI1640 được cho vào đĩa nuôi cấy 24 giếng, mỗi mẫu được chia thành hai nhóm phụ, và các nhóm phụ này được xử lý với SP IL-2 (10ng/ml) (Điều kiện A) và SP IL-2 (5ng/ml) + IL-12 (5ng/ml) (Điều kiện B), tương ứng,

và sau đó được nuôi cấy trong 24 giờ. Sau nuôi cấy, dịch nổi phía trên được lấy, và mức interferon- γ được đo bằng cách sử dụng phương pháp ELISA dạng bán kẹp.

Kết quả cho thấy là khoảng 90% người bình thường có mức interferon- γ cao nhưng hầu hết các bệnh nhân ung thư có mức interferon- γ thấp trong trường hợp Điều kiện A, như được thể hiện trong FIG.6. Trong trường hợp Điều kiện B, cũng cho thấy là người bình thường có mức interferon- γ cao nhưng hầu hết các bệnh nhân ung thư có mức interferon- γ thấp. Tuy nhiên, mức interferon- γ cao này là cao hơn ở các bệnh nhân ung thư trong trường hợp Điều kiện B, so với trường hợp Điều kiện A. Khi mẫu máu toàn bộ chỉ được xử lý với SP IL-2, chỉ các tế bào NK được hoạt hóa đặc hiệu (xem Ví dụ thực nghiệm 5 và FIG.7 sau đây), nhưng các tế bào NK này có khả năng được hoạt hóa cùng với các tế bào T khi mẫu máu toàn bộ được xử lý với SP IL-2 và IL-12 kết hợp, và như vậy mức interferon- γ có khả năng tăng lên bằng cách hoạt hóa các tế bào T. Do vậy, mức interferon- γ cao được xem là có khả năng quan sát được ở một số bệnh nhân ung thư trong đó hoạt tính tế bào T giữ nguyên. Khi các bệnh nhân ung thư có mức interferon- γ thấp thậm chí khi được điều trị ở Điều kiện B, có thể suy đoán là miễn dịch chống ung thư của các tế bào NK và miễn dịch hệ thống chung bị giảm ở các bệnh nhân ung thư này. Điều này được xem là như dấu chuẩn quan trọng được sử dụng để xác định sự tiến triển hoặc tiên lượng ung thư.

Ví dụ thực nghiệm 5: So sánh hoạt tính tế bào NK ở người bình thường và bệnh nhân ung thư theo IL2 theo các kiểu mẫu máu

Để xác định khác biệt về khả năng tiết interferon- γ bởi IL2 theo kiểu mẫu máu ở người bình thường, thí nghiệm sau đây được thực hiện. (a) Khả năng tiết interferon- γ của các tế bào NK đối với IL2 1ng/ml từ các tế bào T, (b) khả năng tiết interferon- γ của các tế bào NK đối với IL2 1ng/ml từ các tế bào NK, (c) khả năng tiết interferon- γ của các tế bào NK đối với IL2 1ng/ml từ máu toàn bộ, và (d) khả năng tiết interferon- γ của các tế bào NK theo nồng độ IL2 từ PBMC được đo. Các kết quả được thể hiện trong FIG.7. Interferon- γ được đo theo cách giống như mô tả trên đây. Kết quả là, do hàm lượng interferon- γ được tiết bằng cách hoạt hóa IL2 trong các tế bào T bị thay đổi, nhưng không có sai khác lớn so với hàm lượng đó của interferon- γ trong nhóm không được điều trị, các tế bào T không thích hợp để sử dụng như mẫu máu. Trong máu toàn bộ, các PBMC và các tế bào NK, ở đó có sự khác biệt rõ rệt về hàm lượng interferon- γ , so với hàm lượng interferon- γ của nhóm không được điều trị. Do vậy, máu toàn bộ, các PBMC và các tế bào NK được đánh giá là các mẫu máu thích hợp để áp dụng đối với phương pháp và kit theo sáng chế.

Ví dụ thực nghiệm 6: So sánh hoạt tính tế bào NK ở người bình thường theo LPS

Như ví dụ khác về tác nhân sử dụng để kích hoạt các tế bào NK trong mẫu máu và hoạt hóa nhân tạo các tế bào NK để sản sinh interferon- γ , LPS được sử dụng để đo hàm lượng interferon- γ từ máu toàn bộ ở người. Như được thể hiện trong FIG.8, phát hiện là tiết interferon- γ được cảm ứng bởi LPS 50ng/ml, biểu

thì là các tế bào NK có thể được hoạt hóa nhân tạo để sản sinh interferon- γ thậm chí khi các tế bào NK được kích hoạt với chất chủ vận không đặc hiệu như LPS.

Ví dụ thực nghiệm 7: Kích hoạt các tế bào NK bằng hIL12 và hIL15 được dung hợp với peptit tạo ổn định

Như ống nghiệm để ủ các tế bào NK, ống nghiệm (BD) chứa chất chống đông máu, heparin natri, được mua và được sử dụng để ngăn ngừa đông máu. 5ml máu toàn bộ được lấy và cho vào ống nghiệm chứa chất chống đông máu (heparin natri). 1ml máu toàn bộ thu được trộn với môi trường RPMI1640, và các chất hoạt hóa các tế bào NK, SP-hIL2/hIL12 được bổ sung vào đó. Hỗn hợp tạo ra được ủ tại 37°C trong 16 đến 24 giờ. Kích hoạt các tế bào NK trong máu toàn bộ bởi SP hIL2 dung hợp với peptit tạo ổn định và hIL12 được xác định bằng cách đo hàm lượng interferon- γ trong máu được ủ theo phương pháp được mô tả trong ví dụ thực nghiệm trên đây.

Trong khi đó, hàm lượng interferon- γ được tiết theo các điều kiện nuôi cấy của máu toàn bộ được đo. Như được thể hiện trong FIG.9, khả năng tiết interferon- γ của các tế bào NK được phát hiện là tăng lên khi các tế bào NK được ủ trong PBS có bổ sung protein vận chuyển như albumin huyết thanh bò, được so sánh khi các tế bào NK được ủ trong PBS.

Ví dụ thực nghiệm 8: Khác biệt về tiết interferon- γ theo giai đoạn tiến triển ung thư

Để xác định hàm lượng interferon- γ được tiết theo giai đoạn tiến triển ung thư, máu toàn bộ từ bệnh nhân ung thư 1 (bệnh nhân hoàn toàn hồi phục từ ung

thư vú), bệnh nhân ung thư 2 (bệnh nhân bị nghi ngờ bị ung thư não), và người bình thường được ủ 24 giờ trong môi trường RPMI1640 có bổ sung IL12 100ng/ml và IL15 1000ng/ml, và lượng interferon- γ tiết được đo như mô tả trên đây. Hơn nữa, máu toàn bộ là đối tượng cho kỹ thuật đếm tế bào.

Kết quả là, khả năng tiết interferon- γ được khẳng định theo thứ tự là người bình thường, bệnh nhân ung thư 1 và bệnh nhân ung thư 2, như được thể hiện trong FIG.10. Do vậy, khẳng định là lượng interferon- γ được tiết theo giai đoạn tiến triển ung thư là khác nhau. Thực tế này cho thấy phương pháp theo sáng chế có thể được sử dụng để đo hàm lượng interferon- γ được tiết bởi các tế bào NK trong mẫu máu, bằng cách đó dự đoán tỷ lệ mắc và giai đoạn tiến triển ung thư, hoặc dự đoán sự tái phát ung thư.

Ví dụ thực nghiệm 9: Định lượng Interferon- γ tạo ra bằng cách kích hoạt các tế bào NK

Như ống nghiệm để ủ các tế bào NK, ống nghiệm (BD) chứa chất chống đông máu, heparin natri, được mua và được sử dụng để ngăn ngừa đông máu. 5ml máu toàn bộ được lấy từ tám người bình thường và cho vào ống nghiệm chứa chất chống đông máu (heparin natri). 1ml máu toàn bộ thu được trộn với môi trường RPIM1640, và SP-hIL12/hIL15-SP liên kết với peptit tạo ổn định được bổ sung vào đó. Hỗn hợp tạo ra được ủ tại 37°C trong 16 đến 24 giờ.

Máu toàn bộ từ tám người bình thường ủ tại 37°C được ly tâm 1500 đến 2000g để thu được huyết thanh như dịch nổi phía trên. Sau đó, 150 đến 200ul huyết thanh này được lấy và làm đối tượng cho ELISA xác định interferon- γ .

Kháng thể sơ cấp có Tween 0,05% (kháng thể đơn dòng kháng interferon- γ ở người, ATGen Cat# ATGK02) được pha loãng với đệm phủ (natri cacbonat 0,1, độ pH 9,5) với tỷ lệ là 1:1000. Kháng thể sơ cấp pha loãng này được chia vào đĩa ELISA vi hiệu giá 96 giếng (Nunc Maxisorp; NUNC, Naperville, IL) với lượng là 100ul/giếng, và giữ ở 4°C trong 16 đến 18 giờ. Sau đó, dung dịch trong đĩa được loại bỏ, và đĩa này được rửa với dung dịch rửa (PBS chứa Tween 20 0,05%) với lượng là 400ul/giếng. Trong trường hợp này, quá trình rửa được thực hiện ba lần. Sau đó, PBS chứa 10% huyết thanh bào thai bò (FBS) được chia với lượng là 300ul/giếng, và giữ ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ. Sau đó, dung dịch trong đĩa được loại bỏ, và đĩa được rửa với PBST (dung dịch PBS chứa Tween 20 0,05%) với lượng là 400ul/giếng. Trong trường hợp này, quá trình rửa được thực hiện ba lần. Đĩa ELISA vi hiệu giá 96 giếng phủ với kháng thể sơ cấp này được dán kín, và giữ ở 4 °C để sử dụng.

Dung dịch chuẩn interferon- γ (PBS chứa 200ng interferon- γ tái tổ hợp ở người (ATGen, Cat# IFG4001) và Proclin 300 0,05%) được pha loãng và được chia với lượng là 100ul/giếng trên đĩa ELISA vi hiệu giá 96 giếng được phủ với kháng thể sơ cấp, và huyết thanh của bệnh nhân được chuẩn bị trong giai đoạn thí nghiệm này được chia với lượng là 100ul/giếng, và sau đó giữ ở nhiệt độ phòng trong 2 giờ.

Bảng 2

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Nền	Nền	UK	UK	UK	UK	UK	UK	UK	UK	UK	UK
B	Nền	Nền	UK	UK	UK	UK	UK	UK	UK	UK	UK	UK
C	S1	S1	UK	UK	UK	UK	UK	UK	UK	UK	UK	UK
D	S2	S2	UK	UK	UK	UK	UK	UK	UK	UK	UK	UK
E	S3	S3	UK	UK	UK	UK	UK	UK	UK	UK	UK	UK
F	S4	S4	UK	UK	UK	UK	UK	UK	UK	UK	UK	UK
G	S5	S5	UK	UK	UK	UK	UK	UK	UK	UK	UK	UK
H	S6	S6	UK	UK	UK	UK	UK	UK	UK	UK	UK	UK

Nền: chỉ có đệm, S1-S6: chuẩn pha loãng theo dãy, và UK (không được biết): huyết thanh bệnh nhân

Sau 2 giờ, dung dịch trong đĩa ELISA vi hiệu giá 96 giếng được loại bỏ, và đĩa được rửa với dung dịch rửa với lượng là 400ul/giếng. Trong trường hợp này, quá trình rửa được thực hiện ba lần. Sau đó, kháng thể thứ cấp (kháng thể đơn dòng được biotin hóa kháng interferon- γ của người (ATGen Cat# ATGK03)) được pha loãng với dung dịch pha loãng với tỷ lệ là 1:500, được chia với lượng là 100ul/giếng, và sau đó giữ ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ. Sau đó, dung dịch trong đĩa được loại bỏ, và đĩa được rửa ba lần với dung dịch rửa với lượng là 400ul/giếng. Dung dịch streptavidin được cộng hợp với HRP (Thermo Scientific, Cat# 21130) được pha loãng với dung dịch pha loãng với tỷ lệ là 1:3000, được chia với lượng là 100ul/giếng, và sau đó giữ ở nhiệt độ phòng trong 30 phút. Sau đó, dung dịch streptavidin pha loãng được cộng hợp với HRP được chia vào đĩa ELISA, và được ủ trong 1 giờ. Sau một giờ ủ, dung dịch trong đĩa ELISA vi hiệu giá 96 giếng được loại bỏ, và đĩa được rửa ba lần với dung dịch rửa với lượng là 400ul/giếng.

Tetrametylbendidin (TMB) 1mg được hòa tan trong 1ml dimethylsulfoxit (DMSO), và hỗn hợp tạo ra được pha loãng với 9ml đệm phosphat xitrat 0,05M để chuẩn bị dung dịch cơ chất. Sau đó, dung dịch cơ chất được chia vào đĩa với lượng là 100ul/giếng, và giữ ở nhiệt độ phòng trong 30 phút.

Dung dịch dừng phản ứng (dung dịch axit sulfuric 2N pha loãng) được chia với lượng là 100ul/giếng để dừng phản ứng, và dung dịch phản ứng tạo ra được đo tại 450nm bằng cách sử dụng máy đọc ELISA.

Khả năng tiết interferon- γ của các tế bào NK được đo bằng cách sử dụng máu toàn bộ từ tám người bình thường được thể hiện trong FIG.11. Các kết quả này biểu thị là, khi máu toàn bộ được kích hoạt bởi xytokin, các tế bào miễn dịch có mặt trong máu được hoạt hóa hiệu quả để cảm ứng sự tiết interferon- γ .

Hơn nữa, sau khi máu toàn bộ từ tám người bình thường được kích hoạt bởi xytokin, máu toàn bộ là đối tượng cho kỹ thuật đếm tế bào. Các kết quả được thể hiện trong FIG.12. Các kết quả này phát hiện là các tế bào NK biểu hiện gây độc tế bào như các tế bào NK được hoạt hóa bằng cách kích hoạt máu toàn bộ. CD56 là dấu chuẩn của các tế bào NK, và CD107a là dấu chuẩn biểu thị các tế bào NK tiết các hạt gây độc tế bào. Do các kết quả tiết interferon- γ trong FIG.11 tương quan rõ rệt với các kết quả gây độc tế bào bởi các tế bào NK trong FIG.12, cho thấy là khả năng tiết interferon- γ của các tế bào NK bằng cách kích hoạt máu toàn bộ biểu hiện gián tiếp tính gây độc tế bào của các tế bào NK.

Theo sáng chế, tỷ lệ mắc hoặc tái phát ung thư có thể được chẩn đoán bằng cách kiểm tra những thay đổi trong hệ miễn dịch *in vivo* và đo hoạt tính tế

bào NK trong máu, ví dụ ở đối tượng bị hoặc bị nghi ngờ mắc ung thư. Do vậy sáng chế có thể hữu ích để dự đoán tỷ lệ mắc hoặc tái phát ung thư bằng cách sử dụng mẫu máu của đối tượng.

Trong khi các phương án làm ví dụ được bộc lộ ở đây, nó được hiểu là các biến thể khác có thể là có khả năng. Các biến thể như vậy không được đánh giá bị lệch hướng phạm vi theo các phương án làm ví dụ của đơn này, và tất cả những cải biến như vậy sẽ là hiển nhiên đối với một chuyên gia có kỹ năng trong nghiên cứu, được dự định bao gồm trong phạm vi của những yêu cầu bảo hộ sau đây.

Tất cả các tài liệu trích dẫn ở đây được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp để đo hoạt tính tế bào ăn môi tự nhiên (NK), bao gồm:

kích hoạt các tế bào NK trong toàn bộ mẫu máu bằng cách ủ toàn bộ mẫu máu với một tác nhân bao gồm ít nhất một xytokin kích thích được chọn từ nhóm bao gồm interleukin 2, interleukin 15 và interleukin 18, bằng cách đó hoạt hóa nhân tạo các tế bào NK để tạo ra và tiết các xytokin được tiết bởi tế bào NK; và đo hàm lượng xytokin được tiết bởi tế bào NK được tiết vào trong toàn bộ mẫu máu và sử dụng hàm lượng này làm thước đo để đánh giá hoạt tính của tế bào NK;

trong đó các xytokin được tiết bởi tế bào NK chứa interferon gamma (IFN- γ), yếu tố hoại tử khối u alpha (TNF- α), hoặc cả hai.

2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó việc kích hoạt các tế bào NK được thực hiện bằng cách ủ toàn bộ mẫu máu với interleukin 2.

3. Phương pháp theo điểm 1, trong đó việc kích hoạt các tế bào NK được thực hiện bằng cách ủ toàn bộ mẫu máu với interleukin 2 và interleukin 12.

4. Phương pháp theo điểm 1, trong đó việc kích hoạt các tế bào NK được thực hiện bằng cách ủ toàn bộ mẫu máu với interleukin 12 and interleukin 15.

5. Phương pháp theo điểm 1, trong đó việc kích hoạt các tế bào NK được thực hiện bằng cách ủ toàn bộ mẫu máu với interleukin 15.

6. Phương pháp theo điểm 1, trong đó các xytokin tiết bởi tế bào NK còn bao gồm protein gây viêm đại thực bào-1 β (MIP-1 β).

7. Phương pháp theo điểm 6, trong đó protein gây viêm đại thực bào-1 β (MIP-1 β) được sử dụng như nhóm đối chứng để so sánh hoạt tính các tế bào NK với hoạt tính này của người bình thường.
8. Phương pháp theo điểm 1, trong đó việc đo hàm lượng xytokin tiết bởi tế bào NK được thực hiện bằng thử nghiệm miễn dịch.
9. Phương pháp theo điểm 8, trong đó thử nghiệm miễn dịch bao gồm thử nghiệm chất hấp thụ miễn dịch liên kết enzym (ELISA).
10. Phương pháp theo điểm 1, trong đó ít nhất một xytokin kích hoạt là trong dạng protein dung hợp với peptit tạo ổn định.
11. Phương pháp theo điểm 10, trong đó peptit tạo ổn định là peptit vùng đuôi axit đầu C của họ synuclein.
12. Phương pháp theo điểm 11, trong đó peptit tạo ổn định bao gồm các gốc axit amin 103-115 (SEQ ID NO: 22), các gốc axit amin 114-126 (SEQ ID NO: 23), các gốc axit amin 119-140 (SEQ ID NO: 24) hoặc các gốc axit amin 130-140 (SEQ ID NO: 25) của vùng đuôi axit đầu C của α -synuclein, các gốc axit amin 85-134 của vùng đuôi axit đầu C của β -synuclein (SEQ ID NO: 27), các gốc axit amin 1-127 của γ -synuclein (SEQ ID NO: 28), hoặc các gốc axit amin 96-127 của vùng đuôi axit đầu C của γ -synuclein (SEQ ID NO: 29).
13. Phương pháp theo điểm 1, trong đó bước kích hoạt các tế bào NK trong toàn bộ mẫu máu bằng cách đó hoạt hóa nhân tạo các tế bào NK này để tạo ra và tiết các xytokin được tiết bởi tế bào NK được thực hiện trong môi trường chứa protein vận chuyển.

14. Protein dung hợp để sử dụng trong việc kích hoạt các tế bào NK trong toàn bộ mẫu máu để thúc đẩy sự tiết các cytokin được tiết bởi tế bào NK, protein dung hợp này bao gồm cytokin liên kết với peptit vùng đuôi axit đầu C của α -synuclein, cytokin này được chọn từ nhóm gồm có interleukin 2, interleukin 12, interleukin 15 và interleukin 18, trong đó peptit vùng đuôi axit đầu C của α -synuclein được chọn từ nhóm gồm có các gốc axit amin 103-115 (SEQ ID NO: 22), các gốc axit amin 114-126 (SEQ ID NO: 23), các gốc axit amin 119-140 (SEQ ID NO: 24) và các gốc axit amin 130-140 (SEQ ID NO: 25) của vùng đuôi axit đầu C của α -synuclein, các gốc axit amin 85-134 của vùng đuôi axit đầu C của β -synuclein (SEQ ID NO: 27), các gốc axit amin 1-127 của γ -synuclein (SEQ ID NO: 28), và các gốc axit amin 96-127 của vùng đuôi axit đầu C của γ -synuclein (SEQ ID NO: 29).

15. Chế phẩm để kích hoạt các tế bào NK bao gồm ít nhất một protein dung hợp như được xác định trong điểm 14.

16. Kit để đo hoạt tính của tế bào NK bao gồm ít nhất một protein dung hợp như được xác định theo điểm 14.

17. Kit theo điểm 16, bao gồm thêm ít nhất một kháng thể được chọn từ nhóm gồm có kháng thể kháng IFN, kháng thể kháng TNF- α và kháng thể kháng MIP-1 β .

18. Phương pháp theo điểm 1, trong đó ít nhất một cytokin kích thích ở dạng protein dung hợp với một peptit ổn định hóa, trong đó protein dung hợp bao gồm trình tự axit amin có ít nhất 80% giống với, hoặc ít nhất 90% giống với,

hoặc ít nhất 95% giống với, hoặc bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 2, 8, hoặc 10.

19. Phương pháp theo điểm 1, trong đó phương pháp này là để phát hiện tỷ lệ mắc hoặc tái phát bệnh ung thư, trong đó việc giảm lượng xytokin được tiết bởi tế bào NK trong một chủ thể, so với mức độ ở người bình thường, là chỉ số về tỷ lệ mắc hoặc tái phát bệnh ung thư.

20. Phương pháp theo điểm 1, trong đó việc đo độ hoạt hóa tế bào NK bao gồm việc so sánh hàm lượng đo được của các xytokin được tiết bởi tế bào NK được tiết vào trong toàn bộ mẫu máu với hàm lượng đo được của các xytokin được tiết bởi tế bào NK của người bình thường.

21. Phương pháp theo điểm 1, trong đó hoạt tính tế bào NK được theo dõi những thay đổi.

22. Phương pháp theo điểm 1, trong đó việc kích thích các tế bào NK được thực hiện bằng cách ủ toàn bộ mẫu máu với interleukin 2, hoặc với interleukin 2 ở dạng protein dung hợp với một peptit ổn định hóa.

23. Phương pháp theo điểm 1, trong đó việc kích thích các tế bào NK được thực hiện bằng cách ủ toàn bộ mẫu máu với interleukin 15, hoặc với interleukin 15 ở dạng protein dung hợp với một peptit ổn định hóa.

24. Phương pháp theo điểm 1, trong đó xytokin được tiết bởi tế bào NK là interferon gamma (IFN- γ).

25. Phương pháp theo điểm 22, trong đó xytokin được tiết bởi tế bào NK là interferon gamma (IFN- γ).

26. Phương pháp theo điểm 1, trong đó khi tác nhân chứa interleukin 18, tác nhân không bao gồm interleukin 12 và không bao gồm lipopolysacarit (LPS).

Fig.1

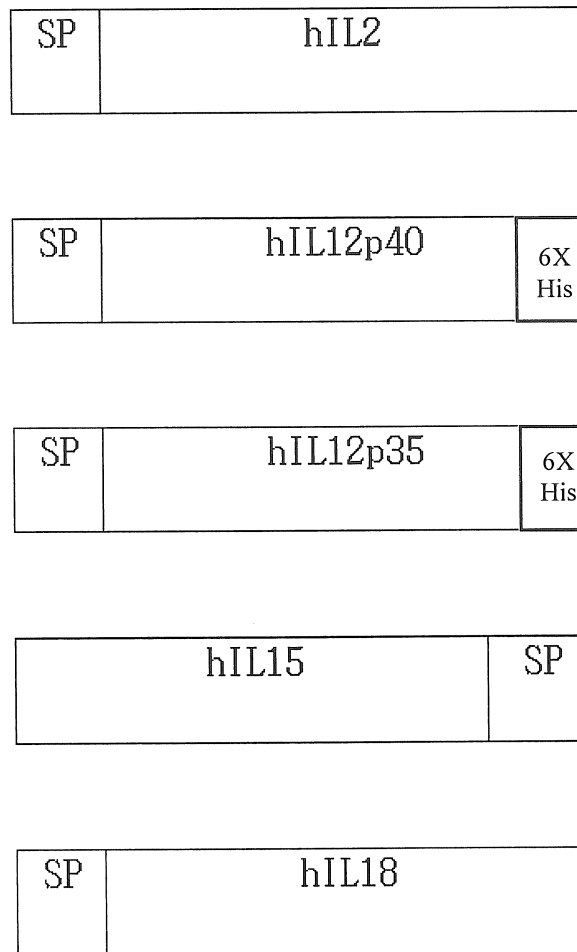


Fig.2

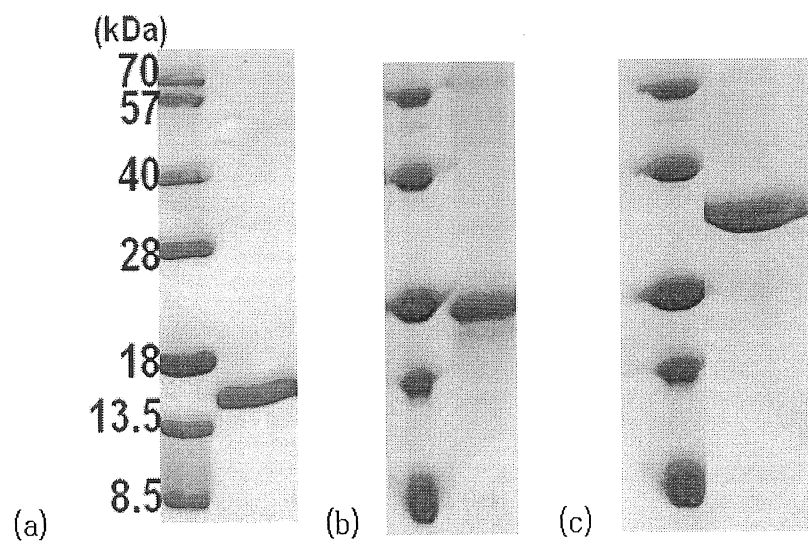
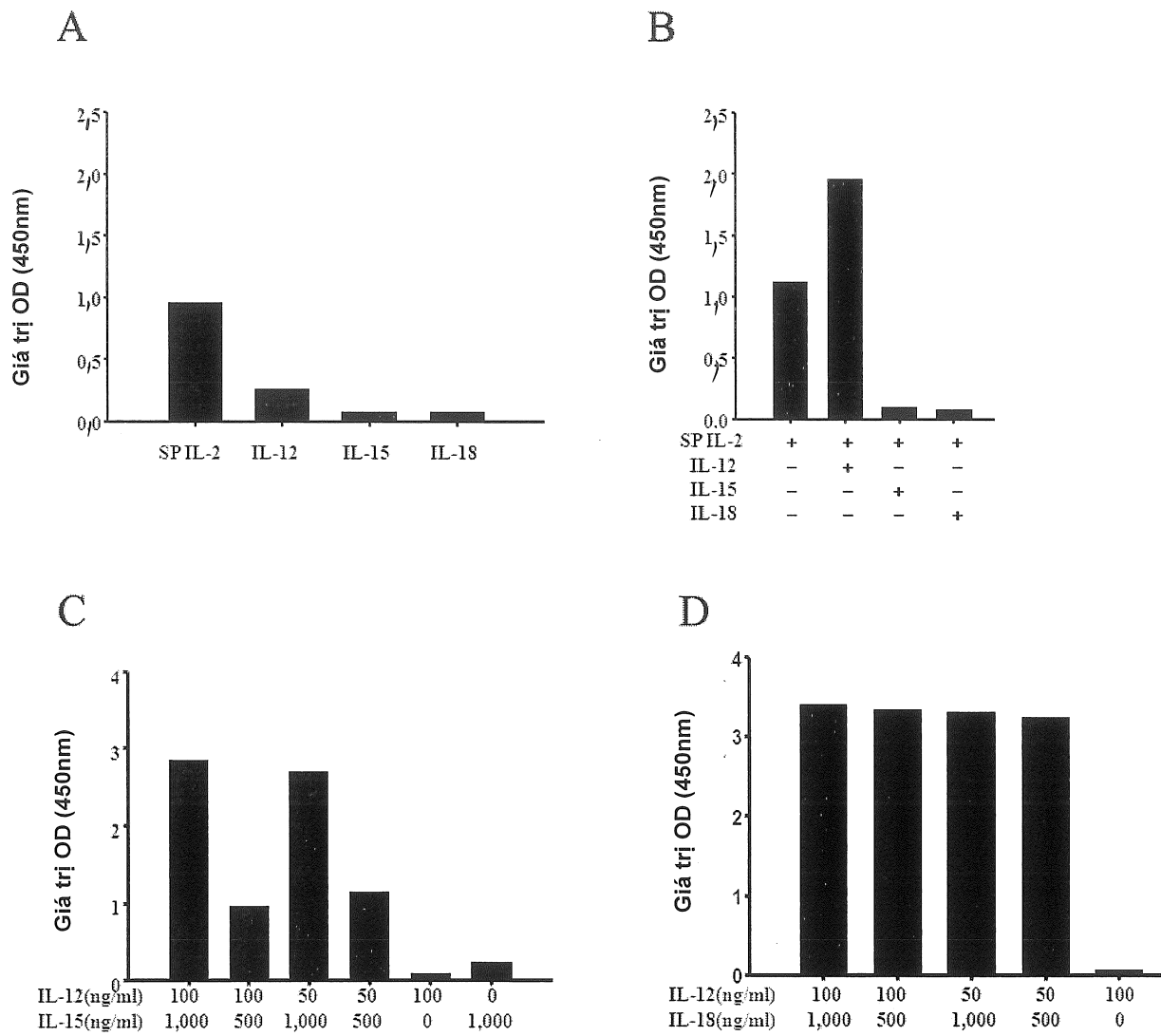


Fig.3



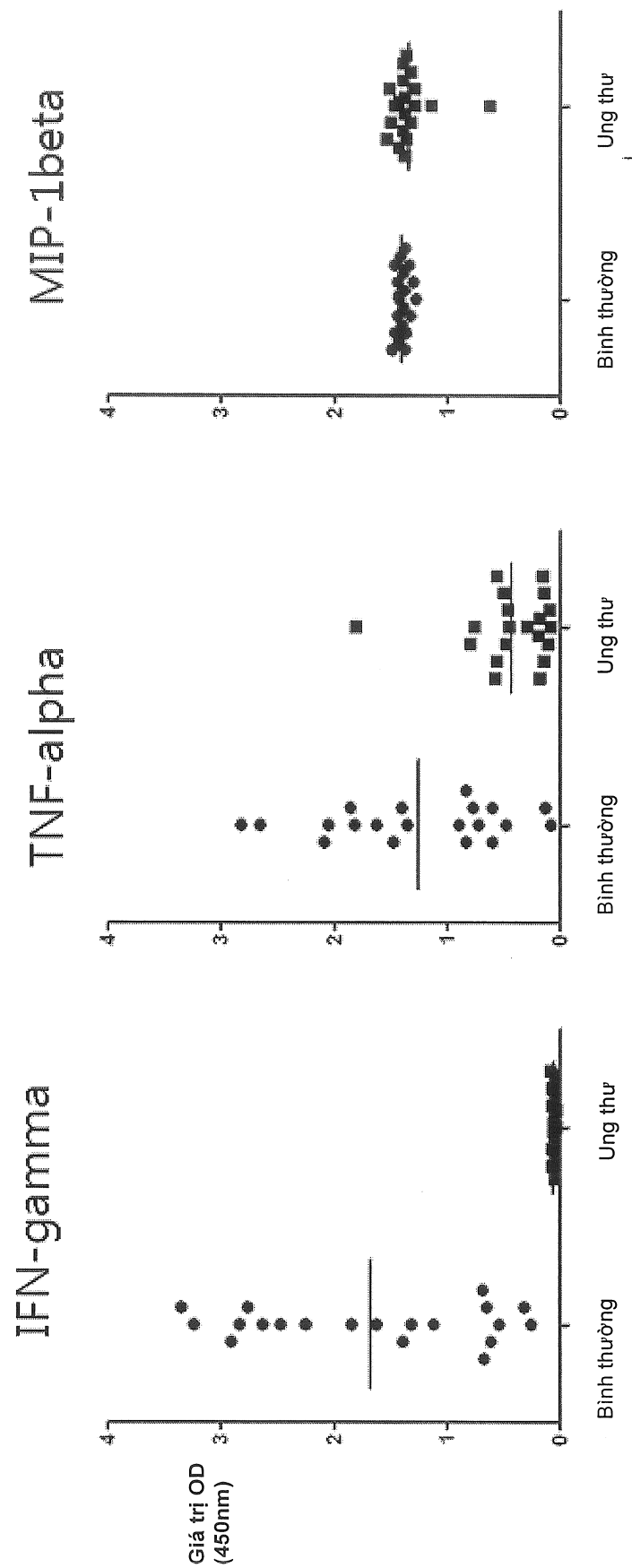


Fig.4

Fig.5

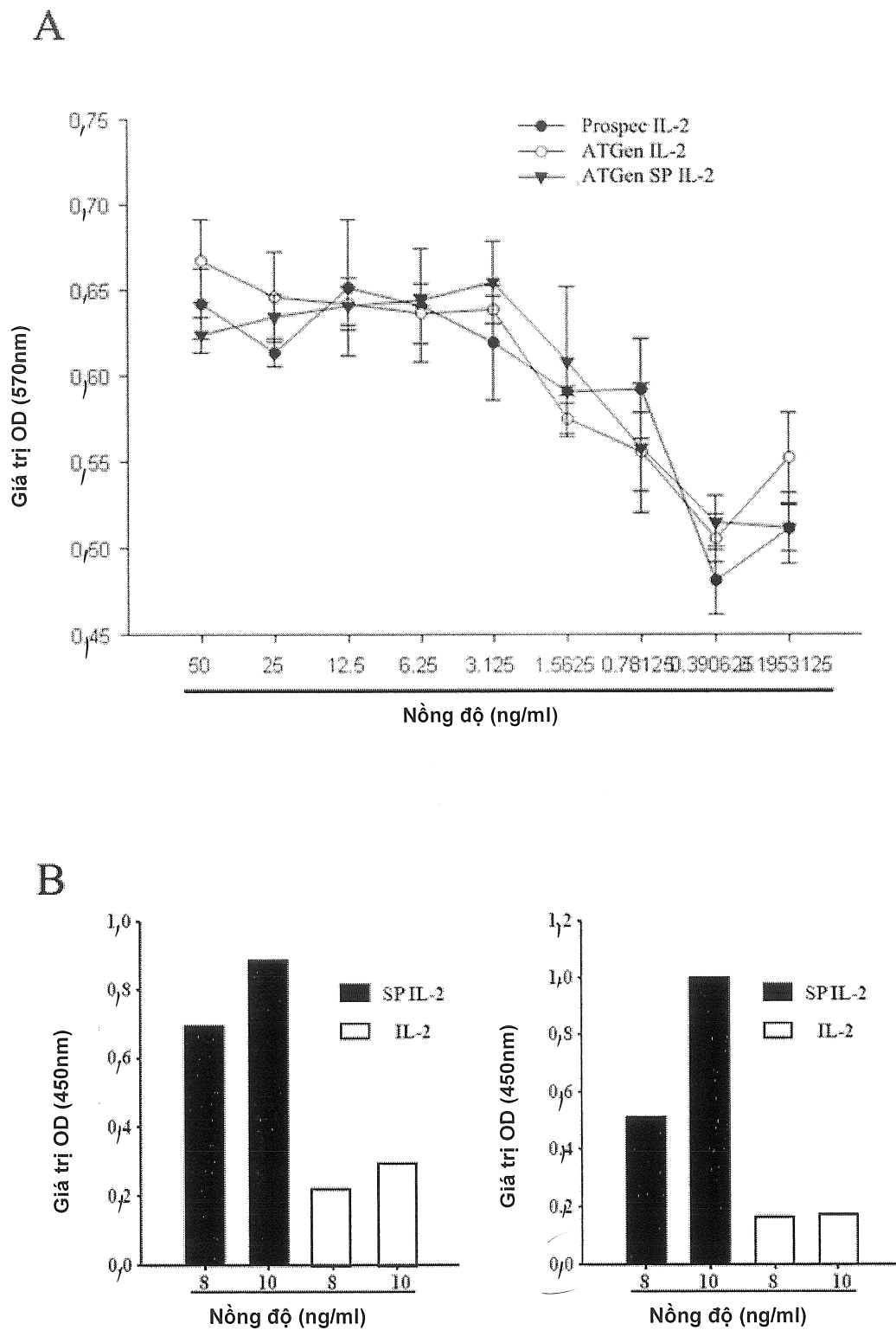


Fig.6

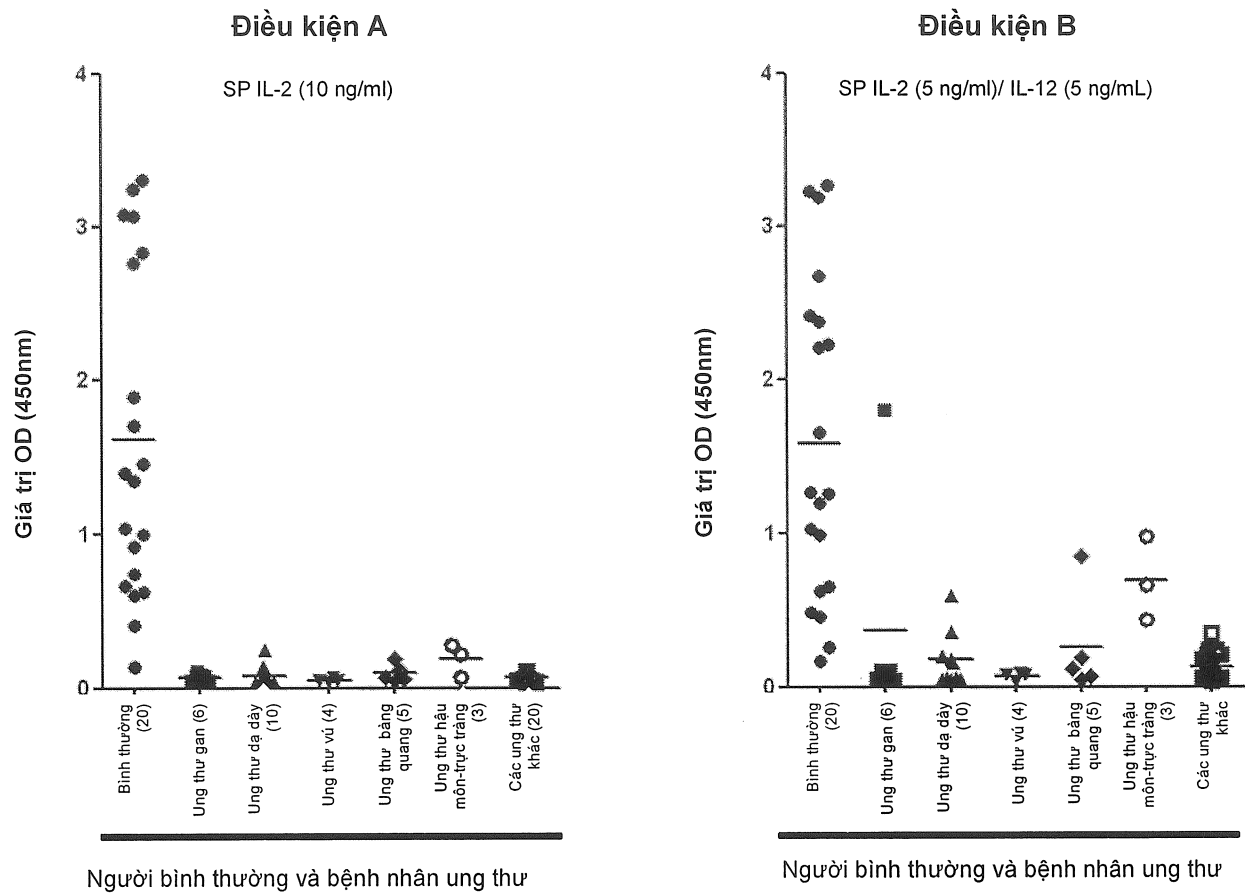


Fig.7

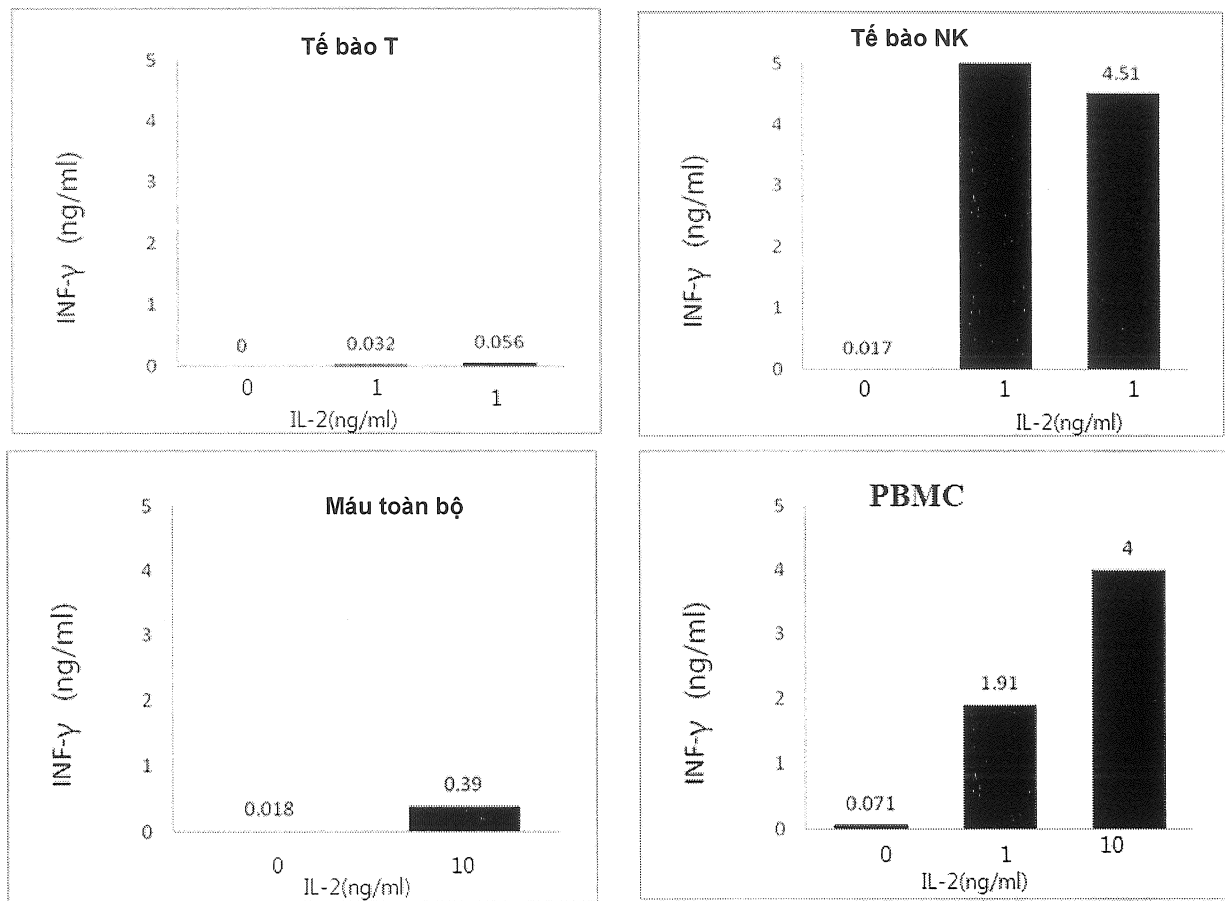


Fig.8

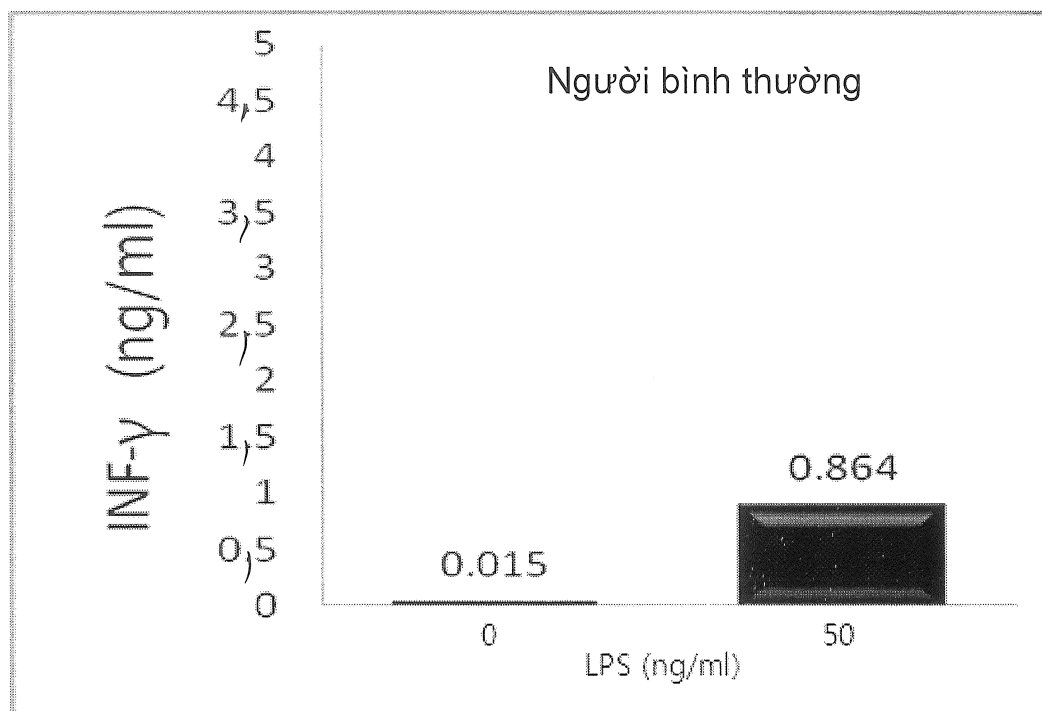


Fig.9

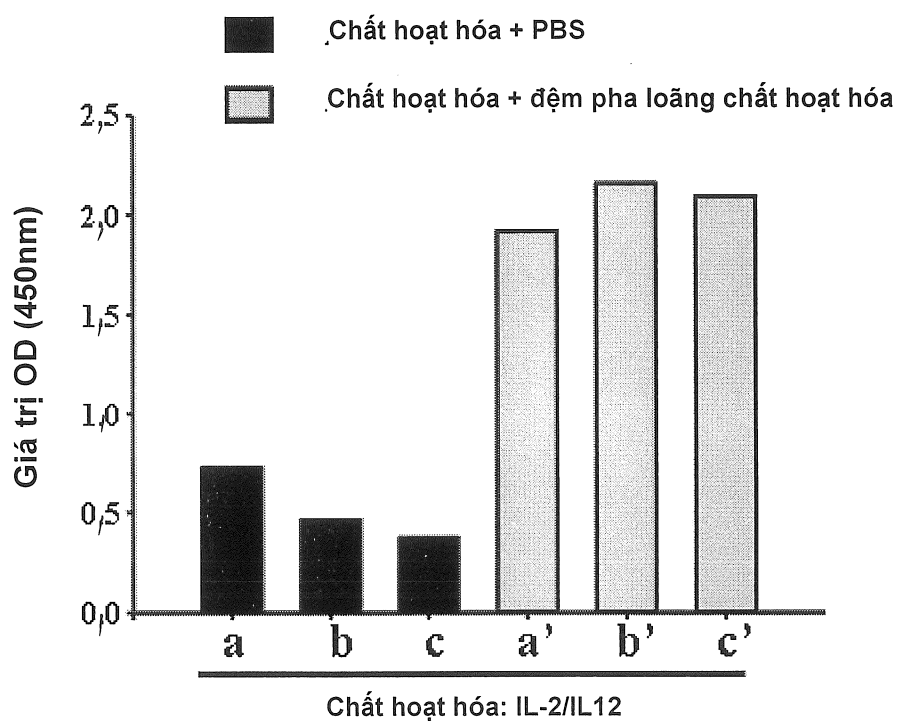


Fig.10

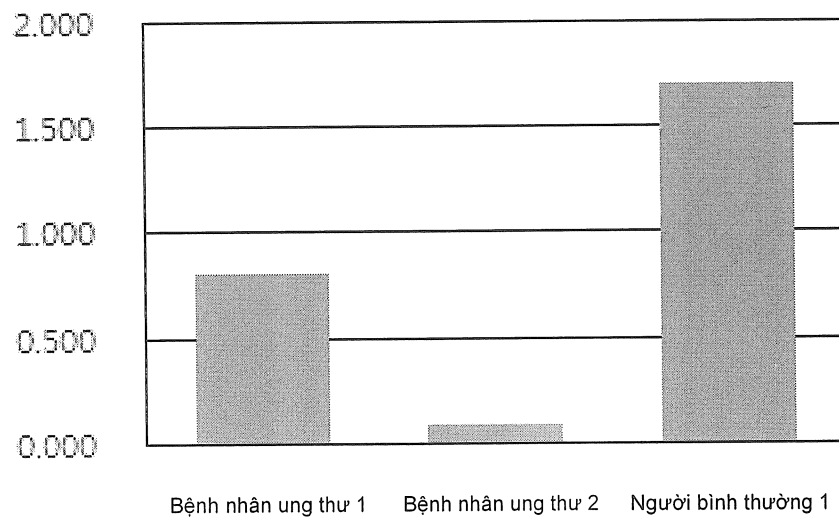
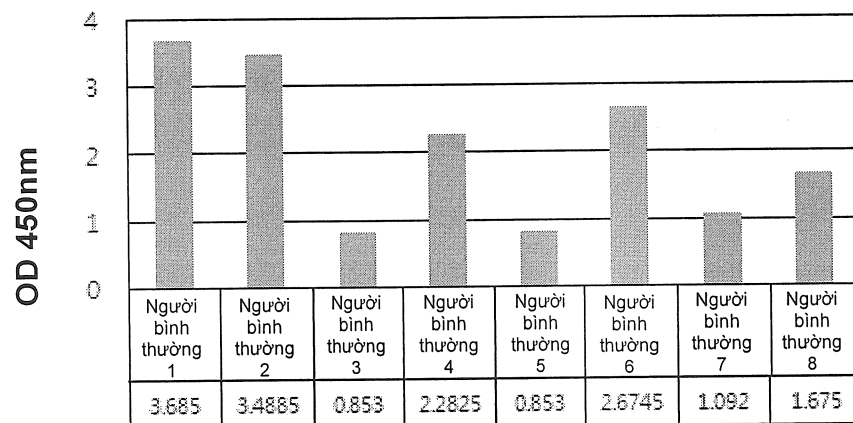


Fig.11



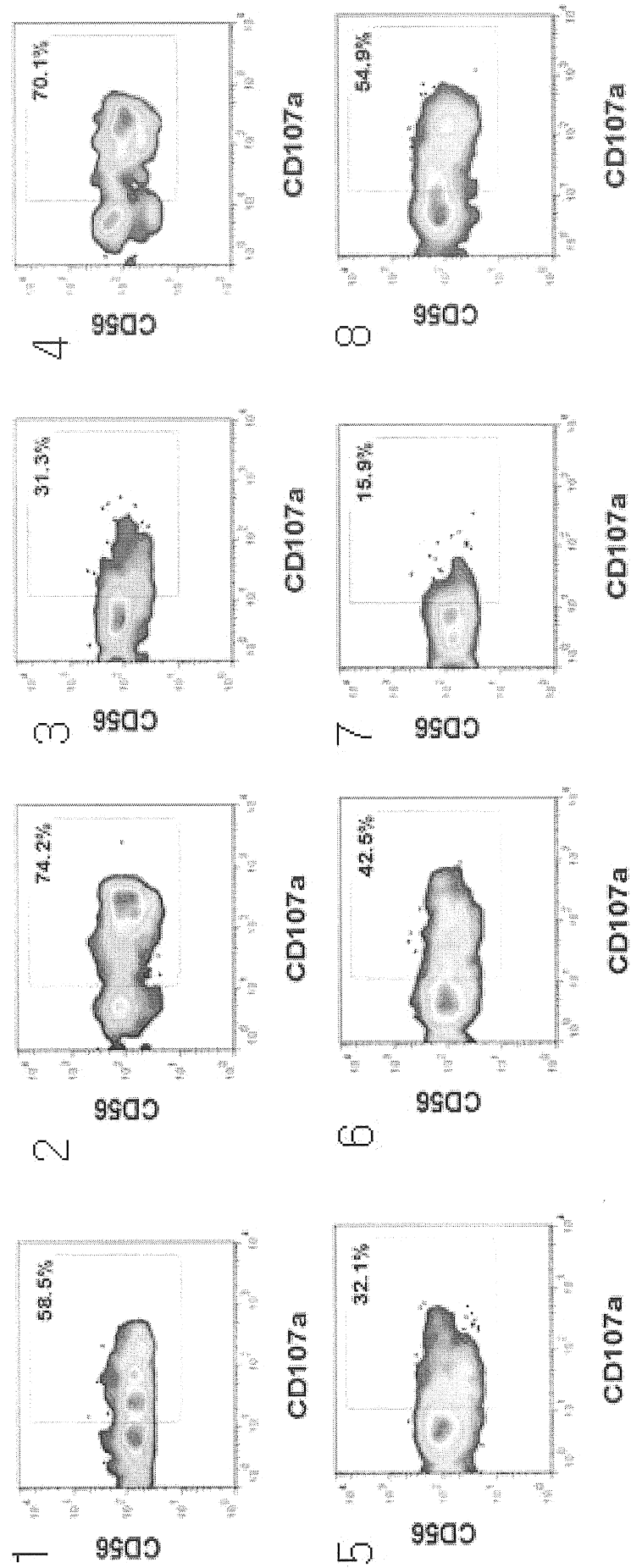


Fig.12

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> ATGen Co. Ltd.
 <120> PHƯƠNG PHÁP VÀ KIT ĐỂ ĐO HOẠT TÍNH TẾ BÀO ĂN MỖI TỰ NHIÊN (NK)
 <130> 08921046CA
 <140> PCT/IB2012/000259
 <141> 2012-02-10
 <150> KR 2011-0012983
 <151> 2011-02-14
 <160> 29
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 474
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Trình tự mã hóa dung hợp SP-hIL2
 <400> 1
 atggaccctg acaatgaggc ttatgaaatg cttctgagg aagggtatca agactacgaa 60
 cctgaagccg gatccctac ttcaagttct acaaagaaaa cacagctaca actggagcat 120
 ttactgctgg atttacagat gattttgaat ggaattaata attacaagaa tcccaaactc 180
 accaggatgc tcacatttaa gttttacatg cccaagaagg ccacagaact gaaacatctt 240
 cagtgtctag aagaagaact caaacctctg gaggaagtgc taaatttagc tcaaagcaaa 300
 aactttcact taagaccag ggacttaatc agcaatatca acgtaatagt tctggaacta 360
 aagggatctg aaacaacatt catgtgtgaa tatgctgatg agacagcaac cattgtagaa 420
 tttctgaaca gatggattac cttttgtcaa agcatcatct caacactgac ttga 474
 <210> 2
 <211> 157
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> polypeptit dung hợp SP-hIL2
 <400> 2
 Met Asp Pro Asp Asn Glu Ala Tyr Glu Met Pro Ser Glu Glu Gly Tyr
 1 5 10 15
 Gln Asp Tyr Glu Pro Glu Ala Gly Ser Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys
 20 25 30
 Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile
 35 40 45
 Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu
 50 55 60

Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu
65 70 75 80

Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu
85 90 95

Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn
100 105 110

Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met
115 120 125

Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg
130 135 140

Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr
145 150 155

<210> 3
<211> 1014
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự mã hóa dung hợp SP-hIL12p40

<400> 3
atggaccctg acaatgaggc ttatgaaatg ccttctgagg aagggtatca agactacgaa 60
cctgaagccg gatccatatg ggaactgaag aaagatgttt atgtcgtaga attggattgg 120
tatccggatg cccctggaga aatggtggtc ctcacctgtg acaccctga agaagatggt 180
atcacctgga ccttggacca gagcagttag gtcttaggct ctggcaaaac cctgaccatc 240
caagtcaaag agtttggaga tgctggccag tacacctgtc acaaaggagg cgaggttcta 300
agccattcgc tcctgctgct tcacaaaaag gaagatggaa tttgggtccac tgatatttta 360
aaggaccaga aagaacccaa aaataagacc tttctaagat gcgaggccaa gaattattct 420
ggacgtttca cctgctgggt gctgacgaca atcagtactg atttgacatt cagtgtcaaa 480
agcagcagag gctcttctga cccccaaggg gtgacgtgct gagctgctac actctctgca 540
gagagagtca gaggggacaa caaggagtat gactactcag tggagtgccg ggaggacagt 600
gcctgcccag ctgctgagga gagtctgccc attgaggtca tggaggatgc cgttcacaag 660
ctcaagtatg aaaactacac cagcagcttc ttcacaggg acatcatcaa acctgaccca 720
cccaagaact tgcagctgaa gccattaaag aattctcggc aggtggaggt cagctgggag 780
taccctgaca cctggagtac tccacattcc tacttctccc tgacattctg cgttcagggtc 840
cagggcaaga gcaagagaga aaagaaagat agagtcttca cggacaagac ctgagccacg 900
gtcatctgcc gcaaaaatgc cagcattagc gtgcgggccc aggaccgcta ctatagctca 960
tcttgagcgc aatgggcatc tgtgccctgc agtcatcatc accatcacca ctga 1014

<210> 4
 <211> 337
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> polypeptit dung hợp SP-hIL12p40

<400> 4

Met Asp Pro Asp Asn Glu Ala Tyr Glu Met Pro Ser Glu Glu Gly Tyr
 1 5 10 15

Gln Asp Tyr Glu Pro Glu Ala Gly Ser Ile Trp Glu Leu Lys Lys Asp
 20 25 30

Val Tyr Val Val Glu Leu Asp Trp Tyr Pro Asp Ala Pro Gly Glu Met
 35 40 45

Val Val Leu Thr Cys Asp Thr Pro Glu Glu Asp Gly Ile Thr Trp Thr
 50 55 60

Leu Asp Gln Ser Ser Glu Val Leu Gly Ser Gly Lys Thr Leu Thr Ile
 65 70 75 80

Gln Val Lys Glu Phe Gly Asp Ala Gly Gln Tyr Thr Cys His Lys Gly
 85 90 95

Gly Glu Val Leu Ser His Ser Leu Leu Leu His Lys Lys Glu Asp
 100 105 110

Gly Ile Trp Ser Thr Asp Ile Leu Lys Asp Gln Lys Glu Pro Lys Asn
 115 120 125

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

Cys Trp Trp Leu Thr Thr Ile Ser Thr Asp Leu Thr Phe Ser Val Lys
 145 150 155 160

Ser Ser Arg Gly Ser Ser Asp Pro Gln Gly Val Thr Cys Gly Ala Ala
 165 170 175

Thr Leu Ser Ala Glu Arg Val Arg Gly Asp Asn Lys Glu Tyr Glu Tyr
 180 185 190

Ser Val Glu Cys Gln Glu Asp Ser Ala Cys Pro Ala Ala Glu Glu Ser
 195 200 205

Leu Pro Ile Glu Val Met Val Asp Ala Val His Lys Leu Lys Tyr Glu
 210 215 220

Asn Tyr Thr Ser Ser Phe Phe Ile Arg Asp Ile Ile Lys Pro Asp Pro
225 230 235 240

Pro Lys Asn Leu Gln Leu Lys Pro Leu Lys Asn Ser Arg Gln Val Glu
245 250 255

Val Ser Trp Glu Tyr Pro Asp Thr Trp Ser Thr Pro His Ser Tyr Phe
260 265 270

Ser Leu Thr Phe Cys Val Gln Val Gln Gly Lys Ser Lys Arg Glu Lys
275 280 285

Lys Asp Arg Val Phe Thr Asp Lys Thr Ser Ala Thr Val Ile Cys Arg
290 295 300

Lys Asn Ala Ser Ile Ser Val Arg Ala Gln Asp Arg Tyr Tyr Ser Ser
305 310 315 320

Ser Trp Ser Glu Trp Ala Ser Val Pro Cys Ser His His His His His
325 330 335

His

<210> 5
<211> 687
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự mã hóa dung hợp SP-hIL12p35

<400> 5
atggaccctg acaatgaggc ttatgaaatg cttctgagg aagggtatca agactacgaa 60
cctgaagccg gatccagaaa cctccccgtg gccactccag acccaggaat gttcccatgc 120
cttcaccact cccaaaacct gctgagggcc gtcagcaaca tgctccagaa ggccagacaa 180
actctagaat tttacccttg cacttctgaa gagattgatc atgaagatat cacaaaagat 240
aaaaccagca cagtggaggc ctgtttacca ttggaattaa ccaagaatga aagctgtctt 300
aactcaagag aaacttcatt tatcacaac ggtagtgtgc tggcctccag aaagacctct 360
tttatgatgg ccctgtgcct tagtagtatt tatgaagact tgaagatgta ccaggtggag 420
ttcaagacca tgaatgcaa gcttctgatg gaccctaaga ggcaaatctt tctagatcaa 480
aacatgctgg cagttattga tgagctgatg caggccctga attcaacag tgagactgtg 540
ccacaaaaat cctcccttga agaaccggat ttttataaaa ctaaaatcaa gctctgcata 600
cttcttcatt ctttcagaat tcgggcagtg actattgata gagtggatgag ctatctgaat 660
gcttcccatc atcaccatca ccactga 687

<210> 6
<211> 228

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> polypeptit dung hợp SP-hIL12p35

<400> 6

Met Asp Pro Asp Asn Glu Ala Tyr Glu Met Pro Ser Glu Glu Gly Tyr
 1 5 10 15

Gln Asp Tyr Glu Pro Glu Ala Gly Ser Arg Asn Leu Pro Val Ala Thr
 20 25 30

Pro Asp Pro Gly Met Phe Pro Cys Leu His His Ser Gln Asn Leu Leu
 35 40 45

Arg Ala Val Ser Asn Met Leu Gln Lys Ala Arg Gln Thr Leu Glu Phe
 50 55 60

Tyr Pro Cys Thr Ser Glu Glu Ile Asp His Glu Asp Ile Thr Lys Asp
 65 70 75 80

Lys Thr Ser Thr Val Glu Ala Cys Leu Pro Leu Glu Leu Thr Lys Asn
 85 90 95

Glu Ser Cys Leu Asn Ser Arg Glu Thr Ser Phe Ile Thr Asn Gly Ser
 100 105 110

Cys Leu Ala Ser Arg Lys Thr Ser Phe Met Met Ala Leu Cys Leu Ser
 115 120 125

Ser Ile Tyr Glu Asp Leu Lys Met Tyr Gln Val Glu Phe Lys Thr Met
 130 135 140

Asn Ala Lys Leu Leu Met Asp Pro Lys Arg Gln Ile Phe Leu Asp Gln
 145 150 155 160

Asn Met Leu Ala Val Ile Asp Glu Leu Met Gln Ala Leu Asn Phe Asn
 165 170 175

Ser Glu Thr Val Pro Gln Lys Ser Ser Leu Glu Glu Pro Asp Phe Tyr
 180 185 190

Lys Thr Lys Ile Lys Leu Cys Ile Leu Leu His Ala Phe Arg Ile Arg
 195 200 205

Ala Val Thr Ile Asp Arg Val Met Ser Tyr Leu Asn Ala Ser His His
 210 215 220

His His His His
 225

<210> 7
 <211> 420
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự mã hóa dung hợp hIL15-SP

<400> 7
 atgaactggg tgaatgtaat aagtgatttg aaaaaaattg aagatcttat tcaatctatg 60
 catattgatg ctactttata tacggaaagt gatgttcacc ccagttgcaa agtaacagca 120
 atgaagtgct ttctcttgga gttacaagtt atttcacttg agtccggaga tgcaagtatt 180
 catgatacag tagaaaatct gatcatccta gcaaacaaca gtttgccttc taatgggaat 240
 gtaacagaat ctggatgcaa agaattgtgag gaactggagg aaaaaaatat taaagaattt 300
 ttgcagagtt ttgtacatat tgtccaaatg ttcatcaaca cttctggatc cgatcctgac 360
 aatgaggcctt atgaaatgcc ttctgaggaa gggatatcaag actacgaacc tgaagcctaa 420

<210> 8
 <211> 139
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> polypeptit dung hợp hIL15-SP

<400> 8

Met Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile Glu Asp Leu
 1 5 10 15
 Ile Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu Ser Asp Val
 20 25 30
 His Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu Glu Leu
 35 40 45
 Gln Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His Asp Thr Val
 50 55 60
 Glu Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser Ser Asn Gly Asn
 65 70 75 80
 Val Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu Lys Asn
 85 90 95
 Ile Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln Met Phe Ile
 100 105 110
 Asn Thr Ser Gly Ser Asp Pro Asp Asn Glu Ala Tyr Glu Met Pro Ser
 115 120 125
 Glu Glu Gly Tyr Gln Asp Tyr Glu Pro Glu Ala
 130 135

<210> 9
 <211> 549
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự mã hóa dung hợp SP-hIL18

<400> 9
 atggaccctg acaatgaggc ttatgaaatg cttctgagg aagggtatca agactacgaa 60
 cctgaagccg gatcctactt tggcaagctt gaatctaaat tatcagtcac aagaaatttg 120
 aatgaccaag ttctcttcat tgaccaagga aatcggcctc tatttgaaga tatgactgat 180
 tctgactgta gagataatgc accccggacc atatttatta taagtatgta taaagatagc 240
 cagcctagag gtatggctgt aactatctct gtgaagtgtg agaaaatttc aactctctcc 300
 tgtgagaaca aaattatttc ctttaaggaa atgaatctc ctgataacat caaggataca 360
 aaaagtgaca tcatattctt tcagagaagt gtcccaggac atgataataa gatgcaattt 420
 gaatcttcat catacgaagg atactttcta gcttgatgaaa aagagagaga cctttttaaa 480
 ctcatcttga aaaaagagga tgaattgggg gatagatcta taatgttcac tgttcaaaac 540
 gaagactag 549

<210> 10
 <211> 182
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> polypeptit dung hợp SP-hIL18

<400> 10

Met Asp Pro Asp Asn Glu Ala Tyr Glu Met Pro Ser Glu Glu Gly Tyr
 1 5 10 15

Gln Asp Tyr Glu Pro Glu Ala Gly Ser Tyr Phe Gly Lys Leu Glu Ser
 20 25 30

Lys Leu Ser Val Ile Arg Asn Leu Asn Asp Gln Val Leu Phe Ile Asp
 35 40 45

Gln Gly Asn Arg Pro Leu Phe Glu Asp Met Thr Asp Ser Asp Cys Arg
 50 55 60

Asp Asn Ala Pro Arg Thr Ile Phe Ile Ile Ser Met Tyr Lys Asp Ser
 65 70 75 80

Gln Pro Arg Gly Met Ala Val Thr Ile Ser Val Lys Cys Glu Lys Ile
 85 90 95

Ser Thr Leu Ser Cys Glu Asn Lys Ile Ile Ser Phe Lys Glu Met Asn
 100 105 110

Pro Pro Asp Asn Ile Lys Asp Thr Lys Ser Asp Ile Ile Phe Phe Gln
 115 120 125

Arg Ser Val Pro Gly His Asp Asn Lys Met Gln Phe Glu Ser Ser Ser
 130 135 140

Tyr Glu Gly Tyr Phe Leu Ala Cys Glu Lys Glu Arg Asp Leu Phe Lys
 145 150 155 160

Leu Ile Leu Lys Lys Glu Asp Glu Leu Gly Asp Arg Ser Ile Met Phe
 165 170 175

Thr Val Gln Asn Glu Asp
 180

<210> 11
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> môi thuận chiều IL2-22-BamH1

<400> 11
 acaggatccc ctacttcaag ttct 24

<210> 12
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> môi đảo chiều IL2-153-Xho

<400> 12
 cactctcgag tcaagtcagt gttgagat 28

<210> 13
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> môi thuận chiều IL12-p40-23-BamH1

<400> 13
 gtggatccat atgggaactg aagaaagatg 30

<210> 14
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> môi đảo chiều IL12-p40-328-CT-His

<400> 14
 atgggtgatga tgactgcagg gcacagatgc cc 32

<210> 15
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> môi thuận chiều IL12-p35-23-BamH1

 <400> 15
 gtggatccag aaacctcccc gtggc 25

 <210> 16
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> môi đảo chiều IL12-p35-219-CT-His

 <400> 16
 atggtgatga tgggaagcat tcagatagc 29

 <210> 17
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> môi thuận chiều IL15-49-Nde

 <400> 17
 gagtcaagca tatgaactgg gtgaatgtaa 30

 <210> 18
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> môi đảo chiều IL15-162-BamH1

 <400> 18
 gtggatccag aagtgttgat gaac 24

 <210> 19
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> môi thuận chiều IL18-37-BamH1

 <400> 19
 gtggatccta ctttggcaag cttg 24

 <210> 20
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>

<223> mỗi đảo chiều IL18-193-EcoR1

<400> 20

agactggaat tcctagtctt cgttttg

27

<210> 21

<211> 140

<212> PRT

<213> Homo Sapien

<220>

<223> alpha synuclein ở người

<400> 21

Met Asp Val Phe Met Lys Gly Leu Ser Lys Ala Lys Glu Gly Val Val
1 5 10 15

Ala Ala Ala Glu Lys Thr Lys Gln Gly Val Ala Glu Ala Ala Gly Lys
20 25 30

Thr Lys Glu Gly Val Leu Tyr Val Gly Ser Lys Thr Lys Glu Gly Val
35 40 45

Val His Gly Val Ala Thr Val Ala Glu Lys Thr Lys Glu Gln Val Thr
50 55 60

Asn Val Gly Gly Ala Val Val Thr Gly Val Thr Ala Val Ala Gln Lys
65 70 75 80

Thr Val Glu Gly Ala Gly Ser Ile Ala Ala Ala Thr Gly Phe Val Lys
85 90 95

Lys Asp Gln Leu Gly Lys Asn Glu Glu Gly Ala Pro Gln Glu Gly Ile
100 105 110

Leu Glu Asp Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala Tyr Glu Met Pro
115 120 125

Ser Glu Glu Gly Tyr Gln Asp Tyr Glu Pro Glu Ala
130 135 140

<210> 22

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo Sapien

<220>

<223> alpha synuclein ở người / các gốc 103-115 vùng đuôi axit đầu C

<400> 22

Asn Glu Glu Gly Ala Pro Gln Glu Gly Ile Leu Glu Asp
1 5 10

<210> 23
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo Sapien

<220>
 <223> alpha synuclein ở người / các gốc 114-126 vùng đuôi axit đầu C

<400> 23

Glu Asp Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala Tyr Glu
 1 5 10

<210> 24
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Homo Sapien

<220>
 <223> alpha synuclein ở người / các gốc 119-140 vùng đuôi axit đầu C

<400> 24

Asp Pro Asp Asn Glu Ala Tyr Glu Met Pro Ser Glu Glu Gly Tyr Gln
 1 5 10 15

Asp Tyr Glu Pro Glu Ala
 20

<210> 25
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo Sapien

<220>
 <223> alpha synuclein ở người / các gốc 130-140 vùng đuôi axit đầu C

<400> 25

Glu Glu Gly Tyr Gln Asp Tyr Glu Pro Glu Ala
 1 5 10

<210> 26
 <211> 134
 <212> PRT
 <213> Homo Sapien

<220>
 <223> beta synuclein ở người

<400> 26

Met Asp Val Phe Met Lys Gly Leu Ser Met Ala Lys Glu Gly Val Val
 1 5 10 15

Ala Ala Ala Glu Lys Thr Lys Gln Gly Val Thr Glu Ala Ala Glu Lys
 20 25 30

Thr Lys Glu Gly Val Leu Tyr Val Gly Ser Lys Thr Arg Glu Gly Val
35 40 45

Val Gln Gly Val Ala Ser Val Ala Glu Lys Thr Lys Glu Gln Ala Ser
50 55 60

His Leu Gly Gly Ala Val Phe Ser Gly Ala Gly Asn Ile Ala Ala Ala
65 70 75 80

Thr Gly Leu Val Lys Arg Glu Glu Phe Pro Thr Asp Leu Lys Pro Glu
85 90 95

Glu Val Ala Gln Glu Ala Ala Glu Glu Pro Leu Ile Glu Pro Leu Met
100 105 110

Glu Pro Glu Gly Glu Ser Tyr Glu Asp Pro Pro Gln Glu Glu Tyr Gln
115 120 125

Glu Tyr Glu Pro Glu Ala
130

<210> 27

<211> 50

<212> PRT

<213> Homo Sapien

<220>

<223> beta synuclein ở người/ các gốc 85-134 vùng đuôi axit đầu C

<400> 27

Lys Arg Glu Glu Phe Pro Thr Asp Leu Lys Pro Glu Glu Val Ala Gln
1 5 10 15

Glu Ala Ala Glu Glu Pro Leu Ile Glu Pro Leu Met Glu Pro Glu Gly
20 25 30

Glu Ser Tyr Glu Asp Pro Pro Gln Glu Glu Tyr Gln Glu Tyr Glu Pro
35 40 45

Glu Ala
50

<210> 28

<211> 127

<212> PRT

<213> Homo Sapien

<220>

<223> gamma synuclein ở người (synoretin)

<400> 28

Met Asp Val Phe Lys Lys Gly Phe Ser Ile Ala Lys Glu Gly Val Val
1 5 10 15

Gly Ala Val Glu Lys Thr Lys Gln Gly Val Thr Glu Ala Ala Glu Lys
20 25 30

Thr Lys Glu Gly Val Met Tyr Val Gly Ala Lys Thr Lys Glu Asn Val
35 40 45

Val Gln Ser Val Thr Ser Val Ala Glu Lys Thr Lys Glu Gln Ala Asn
50 55 60

Ala Val Ser Glu Ala Val Val Ser Ser Val Asn Thr Val Ala Thr Lys
65 70 75 80

Thr Val Glu Glu Ala Glu Asn Ile Ala Val Thr Ser Gly Val Val Arg
85 90 95

Lys Glu Asp Leu Arg Pro Ser Ala Pro Gln Gln Glu Gly Glu Ala Ser
100 105 110

Lys Glu Lys Glu Glu Val Ala Glu Glu Ala Gln Ser Gly Gly Asp
115 120 125

<210> 29

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo Sapien

<220>

<223> gamma synuclein (synoretin) ở người/ các gốc 96-127 vùng đuôi axit đầu C

<400> 29

Arg Lys Glu Asp Leu Arg Pro Ser Ala Pro Gln Gln Glu Gly Glu Ala
1 5 10 15

Ser Lys Glu Lys Glu Glu Val Ala Glu Glu Ala Gln Ser Gly Gly Asp
20 25 30