



(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)



1-0043303

(51)^{2021.01} C12N 5/0783; A61P 35/00; C07K (13) B
14/705; C12N 15/63; A61K 35/17; C07K
14/55

(21) 1-2022-03218

(22) 19/11/2020

(86) PCT/KR2020/016376 19/11/2020

(87) WO2021/101270 27/05/2021

(30) 10-2019-0149779 20/11/2019 KR; 10-2020-0015802 10/02/2020 KR

(45) 25/02/2025 443

(43) 25/08/2022 413

(73) GI CELL, INC. (KR)

#B-1553, 14, Galmachi-ro 288beon-gil, Jungwon-gu Seongnam-si Gyeonggi-do
13201 (KR)

(72) JANG, Myoung Ho (KR); HONG, Chun-Pyo (KR); KO, Dong Woo (KR); LEE, June
Sub (KR).

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

(54) CHẾ PHẨM VÀ PHƯƠNG PHÁP NUÔI CẤY TẾ BÀO DIỆT TỰ NHIÊN

(21) 1-2022-03218

(57) Sáng chế đề cập đến chế phẩm nuôi cấy tế bào diệt tự nhiên, bao gồm thành phần hoạt tính là protein dung hợp gồm protein IL-2 và protein CD80; và phương pháp điều chế tế bào diệt tự nhiên bằng cách sử dụng chế phẩm này. Cụ thể, chế phẩm nuôi cấy tế bào diệt tự nhiên, bao gồm thành phần hoạt tính là protein dung hợp gồm IL-2 hoặc biến thể của nó và CD80 hoặc một đoạn của nó, theo sáng chế, có tác dụng thúc đẩy sự tăng sinh của tế bào diệt tự nhiên, gây cảm ứng sự biểu hiện của CD16 và NKp46, và làm tăng sự biểu hiện và tiết granzym B và perforin, do đó có thể sử dụng hiệu quả trong việc điều chế các tế bào diệt tự nhiên có chức năng miễn dịch chống ung thư ưu việt.

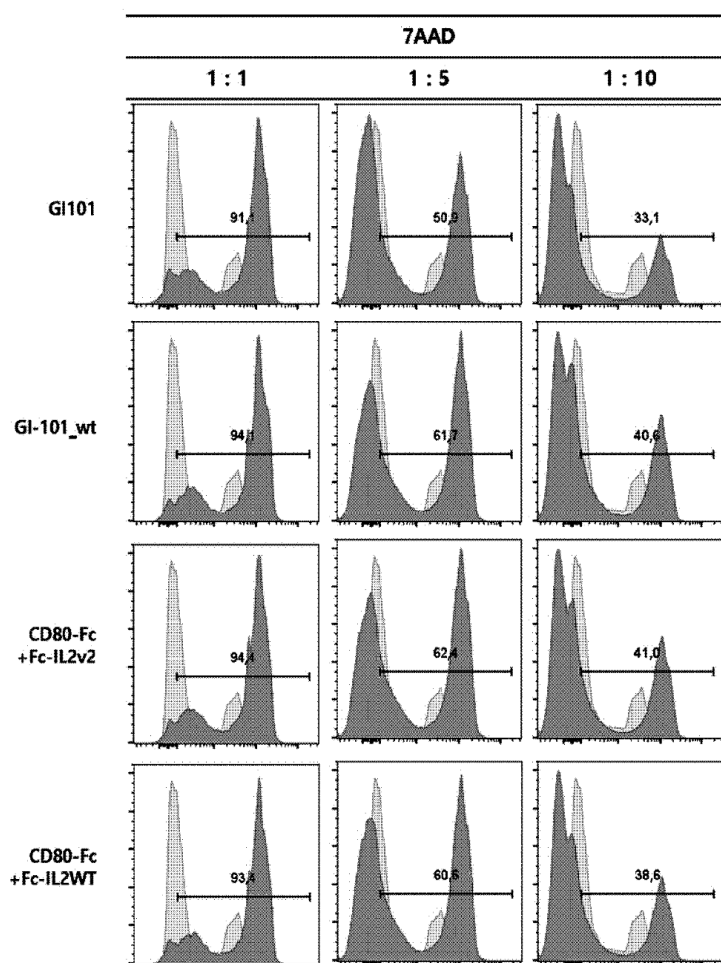


Fig.34

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến chế phẩm nuôi cấy tế bào diệt tự nhiên và phương pháp điều chế tế bào diệt tự nhiên bằng cách sử dụng chế phẩm tương tự.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các phương pháp điều trị khác nhau như phẫu thuật, xạ trị và hóa trị đã được phát triển để điều trị bệnh ung thư, nhưng một số tác dụng phụ đã được báo cáo, do đó gần đây liệu pháp miễn dịch sử dụng chức năng miễn dịch của bệnh nhân đã được phát triển. Cụ thể, đã có nghiên cứu về liệu pháp miễn dịch sử dụng tế bào diệt tự nhiên mà có thể trải qua quá trình điều chế và đông lạnh quy mô lớn.

Cụ thể, tế bào diệt tự nhiên là một loại tế bào lympho được phân bố trong tủy xương, lá lách, các hạch bạch huyết ngoại vi và máu ngoại vi của cơ thể. Chúng chiếm khoảng 10% tế bào lympho máu ngoại vi, và đóng một vai trò quan trọng trong đáp ứng miễn dịch bẩm sinh (Ann Rev Immunol., 24: 257-286, 2006)). Ngoài ra, các tế bào diệt tự nhiên dương tính với CD56 và CD16, nhưng âm tính với CD3. Tế bào diệt tự nhiên tiêu diệt tế bào bằng cách giải phóng các hạt tế bào chứa perforin và granzym. Tế bào diệt tự nhiên tiết ra nhiều cytokin khác nhau như IFN- γ , TNF- α , GM-CSF và IL-10.

Ngoài ra, các tế bào diệt tự nhiên biểu hiện một số thụ thể trên bề mặt tế bào, và các thụ thể này tham gia vào quá trình kết dính tế bào, hoạt hóa khả năng tiêu diệt tế bào hoặc ức chế khả năng tiêu diệt tế bào. Tuy nhiên, hầu hết các tế bào diệt tự nhiên trong cơ thể của đối tượng bình thường đều tồn tại ở trạng thái không hoạt động. Do đó, cần có các tế bào diệt tự nhiên được hoạt hóa để loại bỏ ung thư. Ngoài ra, đối với tế bào diệt tự nhiên có trong cơ thể bệnh nhân ung thư, tế bào diệt tự nhiên có khiếm khuyết về chức năng do cơ chế lẩn tránh miễn dịch của các tế bào ung thư. Vì vậy, việc hoạt hóa các tế bào diệt tự nhiên để sử dụng các tế bào diệt tự nhiên như một chất điều trị là rất quan trọng. Hơn nữa, việc phát triển kỹ thuật để tăng sinh lượng lớn và đông lạnh các tế bào diệt tự nhiên trong máu từ đối tượng bình thường hoặc bệnh nhân là điều cần thiết vì số lượng tế bào diệt tự nhiên có trong cơ thể là có hạn.

Trong khi đó, IL-2, còn được gọi là yếu tố sinh trưởng tế bào T (T-cell growth factor - TCGF), là một glycoprotein hình cầu đóng vai trò trung tâm trong việc sản sinh,

tồn tại và cân bằng nội môi của tế bào lympho. IL-2 có protein kích thước từ 15,5 kDa đến 16 kDa và bao gồm 133 axit amin. IL-2 làm trung gian cho các phản ứng miễn dịch khác nhau bằng cách liên kết với thụ thể IL-2 có ba tiểu đơn vị riêng biệt.

Ngoài ra, CD80 còn được gọi là B7-1 và là một trong các thành viên họ B7 trong số các protein liên kết màng tham gia vào việc điều hòa miễn dịch bằng cách liên kết với phối tử và do đó truyền các phản ứng đồng kích thích và phản ứng đồng ức chế. CD80 là một protein xuyên màng được biểu hiện trên bề mặt của các tế bào T, tế bào B, tế bào đuôi gai và bạch cầu đơn nhân. Được biết là CD80 liên kết với CD28, CTLA4 (CD152) và PD-L1.

Như vậy, việc các tế bào diệt tự nhiên giữ vai trò quan trọng trong việc điều trị chống ung thư đã được biết đến rộng rãi, nhưng các phương pháp cụ thể có thể khuếch đại các tế bào diệt tự nhiên để sử dụng chúng một cách hiệu quả thì vẫn chưa đầy đủ.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề kỹ thuật

Theo đó, các tác giả sáng chế đã tạo ra tế bào diệt tự nhiên bằng cách sử dụng dime protein dung hợp gồm protein IL-2 và protein CD80, là kết quả của việc nghiên cứu để tạo ra tế bào diệt tự nhiên được hoạt hóa với số lượng lớn. Ngoài ra, các tác giả sáng chế đã xác định rằng các tế bào diệt tự nhiên được tạo ra như vậy đã làm tăng hoạt tính và thể hiện tác dụng chống ung thư ưu việt, và do đó đã hoàn thành sáng chế.

Giải pháp cho vấn đề

Để đạt được mục đích trên, theo một phương án ví dụ, sáng chế đề xuất chế phẩm nuôi cấy tế bào diệt tự nhiên bao gồm thành phần hoạt tính là dime protein dung hợp gồm IL-2 hoặc biến thể của nó và CD80 hoặc một đoạn của nó.

Theo một phương án ví dụ khác, sáng chế đề xuất phương pháp nuôi cấy tế bào diệt tự nhiên bao gồm: i) phân lập tế bào không biểu hiện CD3 từ tế bào đơn nhân máu ngoại vi (peripheral blood mononuclear cell- PBMC); ii) phân lập các tế bào biểu hiện CD56 từ các tế bào không biểu hiện CD3, được phân lập ở giai đoạn trên; và iii) nuôi cấy các tế bào phân lập được với sự có mặt của dime protein dung hợp gồm IL-2 hoặc biến thể của nó và CD80 hoặc một đoạn của nó.

Theo một phương án ví dụ khác, được đề xuất là tế bào diệt tự nhiên được tạo ra

bằng phương pháp nuôi cấy tế bào diệt tự nhiên.

Theo một phương án ví dụ khác, được đề xuất là được phẩm để ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh ung thư bao gồm các tế bào diệt tự nhiên làm thành phần hoạt tính.

Theo một phương án ví dụ khác, được đề xuất là phương pháp nuôi cấy tế bào diệt tự nhiên bao gồm: i) phân lập tế bào không biểu hiện CD3 từ PBMC; và ii) nuôi cấy các tế bào phân lập được với sự có mặt của dime protein dung hợp gồm IL-2 hoặc biến thể của nó và CD80 hoặc một đoạn của nó.

Theo một phương án ví dụ khác nữa, sáng chế đề xuất tế bào diệt tự nhiên được tạo ra bằng phương pháp nuôi cấy tế bào diệt tự nhiên.

Theo một phương án ví dụ khác nữa, sáng chế đề xuất được phẩm để ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh ung thư bao gồm các tế bào diệt tự nhiên làm thành phần hoạt tính.

Theo một phương án ví dụ khác nữa, sáng chế đề xuất phương pháp nuôi cấy tế bào diệt tự nhiên bao gồm: i) phân lập tế bào biểu hiện CD56 từ PBMC; và ii) nuôi cấy các tế bào phân lập được với sự có mặt của dime protein dung hợp gồm IL-2 hoặc biến thể của nó và CD80 hoặc một đoạn của nó.

Theo một phương án ví dụ khác nữa, sáng chế đề xuất tế bào diệt tự nhiên được tạo ra bằng phương pháp nuôi cấy tế bào diệt tự nhiên.

Theo một phương án ví dụ khác nữa, sáng chế đề xuất được phẩm để ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh ung thư bao gồm các tế bào diệt tự nhiên làm thành phần hoạt tính.

Theo một phương án ví dụ khác nữa, sáng chế đề xuất phương pháp thúc đẩy hoạt tính của tế bào diệt tự nhiên trong PBMC bao gồm nuôi cấy PBMC với sự có mặt của dime protein dung hợp gồm IL-2 hoặc biến thể của nó và CD80 hoặc một đoạn của nó.

Theo một phương án ví dụ khác nữa, sáng chế đề xuất các PBMC được tạo ra bằng phương pháp thúc đẩy hoạt tính của các tế bào diệt tự nhiên trong PBMC.

Theo một phương án ví dụ khác nữa, sáng chế đề xuất được phẩm để ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh ung thư bao gồm các PBMC làm thành phần hoạt tính.

Hiệu quả của sáng chế

Chế phẩm theo sáng chế để nuôi cấy tế bào diệt tự nhiên bao gồm thành phần hoạt tính là protein dung hợp chứa IL-2 hoặc biến thể của nó và CD80 hoặc một đoạn của nó

thúc đẩy sự tăng sinh tế bào diệt tự nhiên, gây cảm ứng sự biểu hiện của CD16 và NKp46, và làm gia tăng sự biểu hiện và tiết ra của granzym B và perforin, và do đó có thể được sử dụng hữu ích trong việc điều chế các tế bào diệt tự nhiên có chức năng miễn dịch chống ung thư ưu việt.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Các phương án được lấy làm ví dụ có thể được hiểu chi tiết hơn theo phần mô tả dưới đây cùng với các hình vẽ kèm theo, trong đó:

Fig.1A là biểu đồ của đime protein dung hợp được sử dụng trong sáng chế;

Fig.1B thể hiện ảnh SDS-PAGE xác nhận đime protein dung hợp thu được (GI-101);

Fig.1C thể hiện hàm lượng của đime protein dung hợp (GI-101) theo độ hấp thụ;

Fig.1D thể hiện kết quả phân tích sắc ký loại trừ kích thước (size exclusion chromatography - SEC) của đime protein dung hợp thu được (GI-101);

Fig.2A thể hiện ảnh SDS-PAGE xác nhận đime protein dung hợp hCD80-Fc thu được;

Fig.2B thể hiện kết quả phân tích sắc ký loại trừ kích thước (SEC) của đime protein dung hợp hCD80-Fc thu được;

Fig.3A thể hiện ảnh SDS-PAGE xác nhận đime protein dung hợp Fc-IL2v2 thu được;

Fig.3B thể hiện kết quả phân tích sắc ký loại trừ kích thước (SEC) của đime protein dung hợp Fc-IL2v2 thu được;

Fig.3C thể hiện ảnh SDS-PAGE xác nhận đime protein dung hợp Fc-IL2wt thu được;

Fig.3D thể hiện kết quả phân tích sắc ký loại trừ kích thước (SEC) của đime protein dung hợp Fc-IL2wt thu được;

Fig.4A thể hiện ảnh SDS-PAGE xác nhận đime protein dung hợp hCD80-Fc-IL2wt thu được;

Fig.4B thể hiện kết quả phân tích sắc ký loại trừ kích thước (SEC) của đime protein dung hợp hCD80-Fc-IL2wt thu được;

Fig.5A và Fig.5B thể hiện số lượng tế bào NK khi được nuôi cấy trong điều kiện AIM-V (5% SR);

Fig.6A và Fig.6B thể hiện khả năng sống được của tế bào NK khi được nuôi cấy trong điều kiện AIM-V (5% SR);

Fig.7A và Fig.7B thể hiện số lượng tế bào NK khi được nuôi cấy trong điều kiện AIM-V (5% hABS);

Fig.8A và Fig.8B thể hiện khả năng sống được của tế bào NK khi được nuôi cấy trong điều kiện AIM-V (5% hABS);

Fig.9a và Fig.9B thể hiện số lượng tế bào NK khi được nuôi cấy trong điều kiện X-VIVO (5% hABS);

Fig.10A và Fig.10B thể hiện khả năng sống được của tế bào NK khi được nuôi cấy trong điều kiện X-VIVO (5% hABS);

Fig.11A và Fig.11B thể hiện số lượng tế bào NK khi được nuôi cấy trong điều kiện NK MACS (5% hABS);

Fig.12A và Fig.12B thể hiện khả năng sống được của tế bào NK khi được nuôi cấy trong điều kiện NK MACS (5% hABS);

Fig.13 thể hiện kết quả phân tích FACS xác nhận độ tinh khiết của tế bào diệt tự nhiên được nuôi cấy trong chế phẩm chứa môi trường AIM-V (5% SR);

Fig.14 thể hiện kết quả phân tích FACS xác nhận độ tinh khiết của tế bào diệt tự nhiên được nuôi cấy trong chế phẩm chứa môi trường AIM-V (5% hABS);

Fig.15 thể hiện kết quả phân tích FACS xác nhận độ tinh khiết của tế bào diệt tự nhiên được nuôi cấy trong chế phẩm chứa môi trường X-VIVO15 (5% hABS);

Fig.16 thể hiện kết quả phân tích FACS xác nhận độ tinh khiết của tế bào diệt tự nhiên được nuôi cấy trong chế phẩm có môi trường NK MACS (5% hABS);

Fig.17 thể hiện kết quả phân tích đối với các dấu hiệu hoạt hóa của tế bào diệt tự nhiên được nuôi cấy trong chế phẩm chứa môi trường AIM-V (5% SR);

Fig.18 thể hiện kết quả phân tích đối với các dấu hiệu ức chế của tế bào diệt tự nhiên được nuôi cấy trong chế phẩm chứa môi trường AIM-V (5% SR);

Fig.19 thể hiện kết quả phân tích đối với các dấu hiệu hoạt hóa của tế bào diệt tự

nhiên được nuôi cấy trong chế phẩm chứa môi trường AIM-V (5% hABS);

Fig.20 thể hiện kết quả phân tích đối với các dấu hiệu ức chế của tế bào diệt tự nhiên được nuôi cấy trong chế phẩm chứa môi trường AIM-V (5% hABS);

Fig.21 thể hiện kết quả phân tích đối với các dấu hiệu hoạt hóa của tế bào diệt tự nhiên được nuôi cấy trong chế phẩm chứa môi trường X-VIVO (5% hABS);

Fig.22 thể hiện kết quả phân tích đối với các dấu hiệu ức chế của tế bào diệt tự nhiên được nuôi cấy trong chế phẩm chứa môi trường X-VIVO (5% hABS);

Fig.23 thể hiện kết quả phân tích đối với các dấu hiệu hoạt hóa của tế bào diệt tự nhiên được nuôi cấy trong chế phẩm chứa môi trường NK MACS (5% hABS);

Fig.24 thể hiện kết quả phân tích đối với các dấu hiệu ức chế tế bào diệt tự nhiên được nuôi cấy trong chế phẩm chứa môi trường NK MACS (5% hABS);

Fig.25 thể hiện kết quả phân tích đối với các dấu hiệu gây độc tế bào của các tế bào diệt tự nhiên được nuôi cấy trong chế phẩm chứa môi trường AIM-V (5% SR);

Fig.26 thể hiện kết quả phân tích đối với các dấu hiệu gây độc tế bào của các tế bào diệt tự nhiên được nuôi cấy trong chế phẩm chứa môi trường AIM-V (5% hABS);

Fig.27 thể hiện kết quả phân tích đối với các dấu hiệu gây độc tế bào của tế bào diệt tự nhiên được nuôi cấy trong chế phẩm chứa môi trường X-VIVO15 (5% hABS);

Fig.28 thể hiện kết quả phân tích đối với các dấu hiệu gây độc tế bào của các tế bào diệt tự nhiên được nuôi cấy trong chế phẩm có môi trường NK MACS (5% hABS);

Fig.29 thể hiện kết quả phân tích khả năng làm mất hạt nhỏ của tế bào diệt tự nhiên được nuôi cấy trong 21 ngày trong chế phẩm chứa GI-101 (50 nM), GI-101_wt (50 nM), CD80-Fc (50 nM) + Fc-IL2v2 (50 nM), hoặc CD80-Fc (50 nM)+Fc-IL2wt (50 nM) trong môi trường AIM-V (5% hABS);

Fig.30 thể hiện kết quả phân tích hiệu quả tiêu diệt tế bào ung thư của các tế bào diệt tự nhiên được nuôi cấy trong 21 ngày trong chế phẩm chứa GI-101 (50 nM), GI-101_wt (50 nM), CD80-Fc (50 nM)+Fc-IL2v2 (50 nM) hoặc CD80-Fc (50 nM)+Fc-IL2wt (50 nM) trong môi trường AIM-V (5% hABS);

Fig.31 thể hiện kết quả phân tích khả năng làm mất hạt nhỏ của tế bào diệt tự nhiên được nuôi cấy trong 21 ngày trong chế phẩm chứa GI-101 (50 nM), GI-101_wt (50 nM),

CD80-Fc (50 nM) + Fc-IL2v2 (50 nM), hoặc CD80-Fc (50 nM)+Fc-IL2wt (50 nM) trong môi trường X-VIVO15 (5% hABS);

Fig.32 thể hiện kết quả phân tích tác dụng tiêu diệt tế bào ung thư của các tế bào diệt tự nhiên được nuôi cấy trong 21 ngày trong chế phẩm chứa GI-101 (50 nM), GI-101_wt (50 nM), CD80-Fc (50 nM)+Fc-IL2v2 (50 nM), hoặc CD80-Fc (50 nM)+Fc-IL2wt (50 nM) trong môi trường X-VIVO15 (5% hABS);

Fig.33 thể hiện kết quả phân tích khả năng làm mất hạt nhỏ của tế bào diệt tự nhiên được nuôi cấy trong 21 ngày trong chế phẩm chứa GI-101 (50 nM), GI-101_wt (50 nM), CD80-Fc (50 nM) + Fc-IL2v2 (50 nM), hoặc CD80-Fc (50 nM)+Fc-IL2wt (50 nM) trong môi trường NK MACS (5% hABS); và

Fig.34 thể hiện kết quả phân tích tác dụng tiêu diệt tế bào ung thư của các tế bào diệt tự nhiên được nuôi cấy trong 21 ngày trong chế phẩm chứa GI-101 (50 nM), GI-101_wt (50 nM), CD80-Fc (50 nM) + Fc-IL2v2 (50 nM) hoặc CD80-Fc (50 nM)+Fc-IL2wt (50 nM) trong môi trường NK MACS (5% hABS).

Mô tả chi tiết sáng chế

Chế phẩm và môi trường để tăng sinh tế bào NK

Một khía cạnh của sáng chế đề xuất chế phẩm nuôi cấy tế bào diệt tự nhiên (NK) bao gồm thành phần hoạt tính là đime protein dung hợp gồm IL-2 hoặc biến thể của nó và CD80 hoặc một đoạn của nó. Ngoài ra, môi trường nuôi cấy tế bào diệt tự nhiên bao gồm đime protein dung hợp làm thành phần hoạt tính được đề xuất.

Chế phẩm nuôi cấy tế bào diệt tự nhiên có thể bao gồm chế phẩm bất kỳ được chọn từ nhóm gồm môi trường, huyết thanh, chất bổ sung và sự kết hợp của chúng.

Môi trường nuôi cấy tế bào NK có thể là môi trường trong đó đime protein dung hợp gồm protein IL-2 và protein CD80 được thêm vào môi trường nuôi cấy tế bào. Trong trường hợp này, môi trường nuôi cấy tế bào có thể bao gồm môi trường bất kỳ được chọn từ nhóm gồm axit amin, đường, muối vô cơ và vitamin. Tốt hơn là môi trường nuôi cấy tế bào có thể bao gồm tất cả các axit amin, đường, muối vô cơ và vitamin. Theo một phương án cụ thể, môi trường nuôi cấy tế bào NK có thể bao gồm ít nhất một trong các thành phần trong Bảng 1 đến Bảng 4 dưới đây.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “môi trường nuôi cấy tế bào” có nghĩa là môi

trường được sử dụng để nuôi cấy tế bào, cụ thể là tế bào NK và cụ thể hơn là tế bào CD3-CD56+. Môi trường nuôi cấy tế bào bao gồm các thành phần được tế bào yêu cầu để sống và sinh trưởng trong ống nghiệm, hoặc bao gồm các thành phần giúp tế bào sống và sinh trưởng. Cụ thể, các thành phần có thể là vitamin, axit amin thiết yếu hoặc không thiết yếu và các nguyên tố vi lượng. Môi trường có thể là môi trường dùng để nuôi cấy tế bào, tốt hơn là tế bào nhân thực, và tốt hơn là tế bào NK.

Môi trường nuôi cấy tế bào theo sáng chế có thể bao gồm thành phần axit amin, thành phần vitamin, thành phần muối vô cơ, thành phần khác, và nước tinh khiết, trong đó:

a) thành phần axit amin là ít nhất một axit amin được chọn từ nhóm gồm glyxin, L-alanin, L-valin, L-leuxin, L-isoleuxin, L-threonin, L-serin, L-xystein, L-metionin, axit L-aspartic, L-asparagin, axit L-glutamic, L-glutamin, L-lysin, L-arginin, L-histidin, L-phenylalanin, L-tyrosin, L-tryptophan, L-prolin, β -alanin, axit γ -aminobutyric, ornithin, xitrulin, homoserin, tri-iodothyronin, thyroxin và dioxy phenylalanin, hoặc sự kết hợp của các chất này, và tốt hơn là ít nhất một axit amin được chọn từ nhóm gồm glyxin, L-alanin, L-arginin, L-xystein, L-glutamin, L-histidin, L-lysin, L-metionin, L-prolin, L-serin, L-threonin và L-valin, hoặc kết hợp của các chất này;

b) thành phần vitamin là ít nhất một trong các vitamin được chọn từ nhóm gồm biotin, canxi D-pantothenat, axit folic, niacinamit, pyridoxin hydroclorua, riboflavin, thiamin hydroclorua, vitamin B12, cholin clorua, i-inositol và axit ascorbic, hoặc sự kết hợp của chúng, và tốt hơn là ít nhất một vitamin được chọn từ nhóm gồm i-inositol, thiamin hydroclorua, niacinamit và pyridoxin hydroclorua, hoặc sự kết hợp của các chất này;

c) thành phần muối vô cơ là ít nhất một muối vô cơ được chọn từ nhóm gồm canxi clorua (CaCl_2) (khan), pentahydrat đồng sulfat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), sắt (III) sulfat heptahydrat ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), magie clorua (khan), magie sulfat (MgSO_4) (khan), kali clorua (KCl), natri clorua (NaCl), dinatri hydro phosphat (Na_2HPO_4), natri dihydro phosphat mono-hydrat ($\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), kẽm sulfat heptahydrat ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), sắt (III) nitrat nonahydrat ($\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$) và natri hydro cacbonat (NaHCO_3), hoặc kết hợp của các chất này, và tốt hơn là ít nhất một muối vô cơ được chọn từ nhóm gồm natri clorua (NaCl), natri hydro cacbonat (NaHCO_3), kali clorua (KCl), canxi clorua (CaCl_2) (khan) và natri dihydro phosphat mono-hydrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), hoặc kết hợp của các chất này;

d) thành phần còn lại là ít nhất một thành phần khác được chọn từ nhóm gồm D-

glucoza (dextroza), natri pyruvat, hypoxanthin Na, thymidin, axit linoleic, axit lipoic, adenosin, xytidin, guanosin, uridin, 2'- deoxyadenosin, 2'-deoxyxytidin HCl và 2'-deoxyguanosin, hoặc kết hợp của các chất này, và có thể tốt hơn là natri pyruvat; và

e) nước tinh khiết được sử dụng để hòa tan axit amin, vitamin, muối vô cơ, và các thành phần khác, và có thể thu được bằng một hoặc nhiều quy trình chưng cất, hoặc tinh chế qua bộ lọc.

Ngoài ra, môi trường nuôi cấy tế bào theo sáng chế có thể bao gồm thêm yếu tố sinh trưởng hoặc xytokin. Yếu tố sinh trưởng có thể là IGF, bFGF, TGF, HGF, EGF, VEGF, PDGF, hoặc tương tự, một mình hoặc ít nhất hai yếu tố đó, nhưng không giới hạn ở các yếu tố này. Xytokin có thể là IL-1, IL-4, IL-6, IFN- γ , IL-10, IL-15, IL-17, IL-21, hoặc loại tương tự một mình hoặc ít nhất hai loại, nhưng không giới hạn ở các loại này.

Ngoài ra, môi trường nuôi cấy tế bào theo sáng chế có thể bao gồm thêm kháng thể để hoạt hóa các tế bào diệt tự nhiên. Kháng thể để hoạt hóa tế bào diệt tự nhiên có thể là kháng thể kháng CD3, kháng thể kháng CD2, kháng thể kháng CD335, hoặc tương tự, một mình hoặc ít nhất hai kháng thể, nhưng không giới hạn ở các kháng thể này. Hơn nữa, có thể bao gồm hạt mà kháng thể hoạt hóa tế bào diệt tự nhiên được liên kết. Hơn nữa, có thể sử dụng protein dung hợp gồm hai hoặc nhiều loại kháng thể hoặc các đoạn vùng biến đổi của nó để hoạt hóa các tế bào diệt tự nhiên.

Đặc biệt, môi trường nuôi cấy NK có thể bao gồm thêm một loại bất kỳ được chọn từ nhóm gồm IL-15, IL-21, và sự kết hợp của chúng.

IL-15 và IL-21 có thể là một loại interleukin (IL), và có nghĩa là các chất protein có hoạt tính sinh học được tạo ra bởi các tế bào có năng lực miễn dịch như tế bào lympho hoặc bạch cầu đơn nhân và đại thực bào. IL-15 và IL-21 có thể được sử dụng khi nuôi cấy tế bào diệt tự nhiên sử dụng tế bào đơn nhân làm tế bào nguồn bằng cách thúc đẩy sự tăng sinh của tế bào diệt tự nhiên, nhưng có vấn đề là tốc độ tăng sinh và độ tinh khiết thấp khi chỉ sử dụng chúng đơn lẻ hoặc kết hợp (Biossels et al, *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 14, 1031-1038, 2008).

Cụ thể, môi trường có thể là môi trường thông thường để nuôi cấy tế bào động vật, chẳng hạn như môi trường Eagle được cải biến của Dulbecco (Dulbecco's Modified Eagle's Medium - DMEM), môi trường biệt hóa nội mô (Endothelial differentiation medium - EDM), môi trường cần thiết tối thiểu (Minimal Essential Medium - MEM), môi trường

Eagle cơ bản (Basal Medium Eagle - BME), RPMI 1640, F-10, F-12, a-MEM (a-Minimal Essential Medium), G-MEM (Glasgow's Minimal Essential Medium), môi trường Dulbecco được cải biến của Iscove (Iscove's Modified Dulbecco's Medium), môi trường AIM-V, môi trường X-VIVO™ 15, môi trường NK MACS. Theo một phương án của sáng chế, môi trường AIM-V, môi trường X-VIVO™ 15 và môi trường NK MACS được sử dụng làm môi trường.

Thuật ngữ "huyết thanh" như được sử dụng trong sáng chế có nghĩa là phần dịch trong nôi phía trên được tách ra khỏi máu sau khi máu đã đông hoàn toàn. Ngoài ra, việc thêm huyết thanh vào môi trường tổng hợp để nuôi cấy tế bào động vật là điều được yêu cầu, và thông thường người ta sử dụng huyết thanh bò, ngựa hoặc người. Đối với huyết thanh có nguồn gốc từ bò, huyết thanh bào thai bò (FBS), huyết thanh bò mới sinh, huyết thanh bê, huyết thanh bò, hoặc các loại tương tự có thể được sử dụng tùy thuộc vào thời điểm lấy máu. Đối với huyết thanh có nguồn gốc từ người, huyết thanh người từ người cho có nhóm máu AB được sử dụng và huyết thanh AB của người không có kháng thể với kháng nguyên nhóm máu A và B để có thể giảm thiểu khả năng phản ứng miễn dịch có thể được sử dụng. Ngoài ra, tế bào miễn dịch CTS SR, hoặc loại tương tự có thể được sử dụng thay thế cho "huyết thanh". Theo một phương án của sáng chế, huyết thanh AB của người hoặc tế bào miễn dịch CTS SR đã được sử dụng.

GLUTAMAX (GIBCO®), một chất thay thế L-Glutamin, có thể được sử dụng làm chất bổ sung để cải thiện sự ổn định và hoạt tính của tế bào trong quá trình nuôi cấy tế bào. Ngoài ra, chất bổ sung có thể là NK MACS (Miltenyi Biotec, 130-113-102).

Protein dung hợp gồm protein IL-2 và protein CD80

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "IL-2" hoặc "interleukin-2" dùng để chỉ IL-2 kiểu đại thu được từ nguồn động vật có xương sống bất kỳ, bao gồm cả động vật có vú như động vật linh trưởng (chẳng hạn như người) và động vật gặm nhấm (chẳng hạn như chuột và chuột cống), trừ khi có quy định khác. IL-2 có thể được lấy từ tế bào động vật và cũng bao gồm IL-2 thu được từ tế bào tái tổ hợp có khả năng sản sinh IL-2. Ngoài ra, IL-2 có thể là IL-2 kiểu đại hoặc biến thể của nó.

Trong bản mô tả này, IL-2 hoặc biến thể của nó có thể được biểu thị chung bằng thuật ngữ "protein IL-2" hoặc "polypeptit IL-2". IL-2, protein IL-2, polypeptit IL-2 và biến thể IL-2 liên kết đặc hiệu với, ví dụ, thụ thể IL-2. Liên kết đặc hiệu này có thể được xác

định bằng các phương pháp mà những người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này đã biết.

Phương án IL-2 có thể có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 35 hoặc SEQ ID NO: 36. Ở đây, IL-2 cũng có thể ở dạng trưởng thành. Cụ thể, IL-2 trưởng thành có thể không bao gồm trình tự tín hiệu và có thể có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 10. Ở đây, IL-2 có thể được sử dụng theo khái niệm bao gồm một đoạn của IL-2 kiểu đại trong đó một phần của đầu tận cùng N hoặc đầu tận cùng C của IL-2 kiểu đại bị cắt bớt.

Ngoài ra, đoạn IL-2 có thể ở dạng trong đó 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 hoặc 25 axit amin liền kề được cắt ngắn từ đầu tận cùng N của protein có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 35 hoặc SEQ ID NO: 36. Ngoài ra, đoạn IL-2 có thể ở dạng trong đó 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 hoặc 25 axit amin liền kề được cắt ngắn từ đầu tận cùng C của protein có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 35 hoặc SEQ ID NO: 36.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “biến thể IL-2” dùng để chỉ dạng trong đó một phần axit amin trong IL-2 có chiều dài đầy đủ hoặc đoạn IL-2 được mô tả ở trên được thế. Tức là, biến thể IL-2 có thể có trình tự axit amin khác với IL-2 kiểu đại hoặc một đoạn của nó. Tuy nhiên, biến thể IL-2 có thể có hoạt tính tương đương hoặc tương tự với IL-2 kiểu đại. Ví dụ ở đây, “hoạt tính IL-2” có thể đề cập đến liên kết đặc hiệu với thụ thể IL-2, liên kết đặc hiệu này có thể được đo bằng các phương pháp mà những người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này đã biết.

Cụ thể, có thể thu được biến thể IL-2 bằng cách thế một phần axit amin trong IL-2 kiểu đại. Phương án về biến thể IL-2 thu được bằng cách thế axit amin có thể thu được bằng cách thế ít nhất một trong các axit amin thứ 38, 42, 45, 61 và 72 trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 10.

Cụ thể, có thể thu được biến thể IL-2 bằng cách thế ít nhất một trong các axit amin thứ 38, 42, 45, 61 hoặc 72 trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 10 bằng một axit amin khác. Ngoài ra, khi IL-2 ở dạng trong đó một phần của đầu tận cùng N trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 35 bị cắt ngắn, axit amin ở vị trí bổ sung tương ứng với vị trí đó trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 10 có thể được thế bằng một axit amin khác. Ví dụ: khi IL-2 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 35, thì biến thể IL-2 của nó có thể nhận được bằng cách thế ít nhất một trong số các axit amin

thứ 58, 62, 65, axit amin thứ 81 hoặc thứ 92 trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 35 bằng một axit amin khác. Các gốc axit amin này tương ứng với gốc axit amin thứ 38, 42, 45, 61 và 72 tương ứng trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 10. Theo một phương án, một, hai, ba, bốn, năm, sáu, bảy, tám, chín hoặc mười axit amin có thể được thể miễn là biến thể IL-2 đó duy trì hoạt tính của IL-2. Theo một phương án khác, một đến năm axit amin có thể được thể.

Theo một phương án, biến thể IL-2 có thể ở dạng trong đó hai axit amin được thể. Cụ thể, có thể thu được biến thể IL-2 bằng cách thể axit amin thứ 38 và 42 trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 10. Ngoài ra, theo một phương án, có thể thu được biến thể IL-2 bằng cách thể trong số axit amin thứ 38 và 45 trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 10. Ngoài ra, theo một phương án, có thể thu được biến thể IL-2 bằng cách thể axit amin thứ 38 và 61 trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 10. Ngoài ra, theo một phương án, có thể thu được biến thể IL-2 bằng cách thể axit amin thứ 38 và 72 trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 10. Ngoài ra, theo một phương án, có thể thu được biến thể IL-2 bằng cách thể axit amin thứ 42 và 45 trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 10. Ngoài ra, theo một phương án, có thể thu được biến thể IL-2 bằng cách thể axit amin thứ 42 và 61 trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 10. Ngoài ra, theo một phương án, biến thể IL-2 có thể thu được bằng cách thể axit amin thứ 42 và 72 trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 10. Ngoài ra, theo một phương án, có thể thu được biến thể IL-2 bằng cách thể axit amin thứ 45 và 61 trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 10. Ngoài ra, theo một phương án, có thể thu được biến thể IL-2 bằng cách thể axit amin thứ 45 và 72 trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 10. Ngoài ra, theo một phương án, biến thể IL-2 có thể thu được bằng cách thể axit amin thứ 61 và 72 trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 10.

Hơn nữa, biến thể IL-2 có thể ở dạng trong đó ba axit amin được thể. Cụ thể, có thể thu được biến thể IL-2 bằng cách thể axit amin thứ 38, 42 và 45 trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 10. Ngoài ra, theo một phương án, có thể thu được biến thể IL-2 bằng cách thể axit amin thứ 38, 42 và 61 trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 10. Ngoài ra, theo một phương án, có thể thu được biến thể IL-2 bằng cách thể axit amin thứ 38, 42 và 72 trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 10. Ngoài ra, theo một phương án, có thể thu được biến thể IL-2 bằng cách thể axit amin thứ 38, 45 và 61 trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 10. Ngoài ra, theo một phương án, có thể thu

được biến thể IL-2 bằng cách thế axit amin thứ 38, 45 và 72 trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 10. Ngoài ra, theo một phương án, có thể thu được biến thể IL-2 bằng cách thế axit amin thứ 38, 61 và 72 trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 10. Ngoài ra, theo một phương án, có thể thu được biến thể IL-2 bằng cách thế axit amin thứ 42, 45 và 61 trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 10. Ngoài ra, theo một phương án, có thể thu được biến thể IL-2 bằng cách thế axit amin thứ 42, 45 và 72 trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 10. Ngoài ra, theo một phương án, biến thể IL-2 có thể là thu được bằng cách thế axit amin thứ 45, 61 và 72 trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 10.

Ngoài ra, biến thể IL-2 có thể ở dạng trong đó bốn axit amin được thế. Cụ thể, có thể thu được biến thể IL-2 bằng cách thế axit amin thứ 38, 42, 45 và 61 trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 10. Ngoài ra, theo một phương án, biến thể IL-2 có thể thu được bằng cách thế axit amin thứ 38, 42, 45 và 72 trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 10. Ngoài ra, theo một phương án, có thể thu được biến thể IL-2 bằng cách thế axit amin thứ 38, 45, 61 và 72 trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 10. Ngoài ra, theo một phương án, có thể thu được biến thể IL-2 bằng cách thế axit amin thứ 38, 42, 61 và 72 trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 10. Ngoài ra, theo một phương án, có thể thu được biến thể IL-2 bằng cách thế axit amin thứ 42, 45, 61 và 72 trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 10.

Hơn nữa, biến thể IL-2 có thể ở dạng trong đó năm axit amin được thế. Cụ thể, có thể thu được biến thể IL-2 bằng cách thế từng axit amin thứ 38, 42, 45, 61 và 72 trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 10 bằng một axit amin khác.

Ở đây, “một axit amin khác” được đưa vào bằng cách thế có thể là axit amin bất kỳ được chọn từ nhóm gồm alanin, arginin, asparagin, axit aspartic, xystein, axit glutamic, glutamin, histidin, isoleuxin, leuxin, lysin, metionin, phenylalanin, prolin, serin, threonin, tryptophan, tyrosin và valin. Tuy nhiên, về việc thế axit amin cho biến thể IL-2, trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 10, axit amin thứ 38 không thể được thế bằng arginin, axit amin thứ 42 không thể được thế bằng phenylalanin, axit amin thứ 45 không thể được thế bằng tyrosin, axit amin thứ 61 không thể được thế bằng axit glutamic và axit amin thứ 72 không thể được thế bằng leuxin.

Về việc thế axit amin cho biến thể IL-2, trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID

NO: 10, axit amin thứ 38, arginin, có thể được thế bằng một axit amin không phải arginin. Tốt hơn là, về việc thế axit amin cho biến thể IL-2, trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 10, axit amin thứ 38, arginin, có thể được thế bằng alanin (R38A).

Về việc thế axit amin cho biến thể IL-2, trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 10, axit amin thứ 42, phenylalanin, có thể được thế bằng một axit amin không phải là phenylalanin. Tốt hơn là, về việc thế axit amin cho biến thể IL-2, trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 10, axit amin thứ 42, phenylalanin, có thể được thế bằng alanin (F42A).

Về việc thế axit amin cho biến thể IL-2, trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 10, axit amin thứ 45, tyrosin, có thể được thế bằng một axit amin không phải tyrosin. Tốt hơn là, về việc thế axit amin cho biến thể IL-2, trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 10, axit amin thứ 45, tyrosin, có thể được thế bằng alanin (Y45A).

Về việc thế axit amin cho biến thể IL-2, trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 10, axit amin thứ 61, axit glutamic, có thể được thế bằng một axit amin không phải axit glutamic. Tốt hơn là, về việc thế axit amin cho biến thể IL-2, trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 10, axit amin thứ 61, axit glutamic, có thể được thế bằng arginin (E61R).

Về việc thế axit amin cho biến thể IL-2, trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 10, axit amin thứ 72, leuxin, có thể được thế bằng một axit amin không phải leuxin. Tốt hơn là, về việc thế axit amin cho biến thể IL-2, trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 10, axit amin thứ 72, leuxin, có thể được thế bằng glyxin (L72G).

Cụ thể, có thể thu được biến thể IL-2 bằng ít nhất một chất thay thế được chọn từ nhóm gồm R38A, F42A, Y45A, E61R và L72G, trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 10.

Cụ thể, có thể thu được biến thể IL-2 bằng cách thế axit amin ở hai, ba, bốn hoặc năm vị trí trong số các vị trí được chọn từ nhóm gồm R38A, F42A, Y45A, E61R và L72G.

Ngoài ra, biến thể IL-2 có thể ở dạng trong đó hai axit amin được thế. Cụ thể, có thể thu được biến thể IL-2 bằng các chất thay thế R38A và F42A. Ngoài ra, theo một phương án, có thể thu được biến thể IL-2 bằng các chất thay thế R38A và Y45A. Ngoài ra, theo một phương án, có thể thu được biến thể IL-2 bằng các chất thay thế R38A và E61R.

Ngoài ra, theo một phương án, có thể thu được biến thể IL-2 bằng các chất thay thế R38A và L72G. Ngoài ra, theo một phương án, có thể thu được biến thể IL-2 bằng các chất thay thế F42A và Y45A. Ngoài ra, theo một phương án, có thể thu được biến thể IL-2 bằng các chất thay thế F42A và E61R. Ngoài ra, theo một phương án, có thể thu được biến thể IL-2 bằng các chất thay thế F42A và L72G. Ngoài ra, theo một phương án, có thể thu được biến thể IL-2 bằng các chất thay thế E61R và L72G.

Hơn nữa, biến thể IL-2 có thể ở dạng trong đó ba axit amin được thế. Cụ thể, có thể thu được biến thể IL-2 bằng các chất thay thế R38A, F42A và Y45A. Ngoài ra, theo một phương án, có thể thu được biến thể IL-2 bằng các chất thay thế R38A, F42A và E61R. Ngoài ra, theo một phương án, có thể thu được biến thể IL-2 bằng các chất thay thế R38A, F42A và L72G. Ngoài ra, theo một phương án, có thể thu được biến thể IL-2 bằng các chất thay thế R38A, Y45A và E61R. Ngoài ra, theo một phương án, có thể thu được biến thể IL-2 bằng các chất thay thế R38A, Y45A và L72G. Ngoài ra, theo một phương án, có thể thu được biến thể IL-2 bằng các chất thay thế F42A, Y45A và E61R. Ngoài ra, theo một phương án, có thể thu được biến thể IL-2 bằng các chất thay thế F42A, Y45A và L72G. Ngoài ra, theo một phương án, có thể thu được biến thể IL-2 bằng các chất thay thế F42A, E61R và L72G. Ngoài ra, theo một phương án, có thể thu được biến thể IL-2 bằng các chất thay thế Y45A, E61R và L72G.

Ngoài ra, biến thể IL-2 có thể ở dạng trong đó bốn axit amin được thế. Cụ thể, có thể thu được biến thể IL-2 bằng các chất thay thế R38A, F42A, Y45A và E61R. Ngoài ra, theo một phương án, có thể thu được biến thể IL-2 bằng các chất thay thế R38A, F42A, Y45A và L72G. Ngoài ra, theo một phương án, có thể thu được biến thể IL-2 bằng các chất thay thế R38A, F42A, E61R và L72G. Ngoài ra, theo một phương án, có thể thu được biến thể IL-2 bằng các chất thay thế R38A, Y45A, E61R và L72G. Ngoài ra, theo một phương án, có thể thu được biến thể IL-2 bằng các chất thay thế F42A, Y45A, E61R và L72G.

Hơn nữa, có thể thu được biến thể IL-2 bằng các chất thay thế R38A, F42A, Y45A, E61R và L72G.

Tốt hơn là, phương án về biến thể IL-2 có thể bao gồm phương án bất kỳ được chọn từ các tổ hợp thay thế từ (a) đến (d) sau trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 10:

(a) R38A/F42A

(b) R38A/F42A/Y45A

(c) R38A/F42A/E61R

(d) R38A/F42A/L72G

Ở đây, khi IL-2 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 35, sự thể axit amin có thể có ở vị trí bổ sung tương ứng với vị trí trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 10. Ngoài ra, ngay cả khi IL-2 là một đoạn của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 35, sự thể axit amin có thể có ở vị trí bổ sung tương ứng với vị trí đó trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 10.

Cụ thể, biến thể IL-2 có thể có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 6, 22, 23 hoặc 24.

Ngoài ra, biến thể IL-2 có thể khác biệt ở chỗ có độc tính *in vivo* thấp. Ở đây, độc tính *in vivo* thấp có thể là một tác dụng phụ do liên kết của IL-2 với chuỗi alpha của thụ thể IL-2 (IL-2R α). Nhiều biến thể IL-2 khác nhau đã được phát triển để cải thiện tác dụng phụ do liên kết của IL-2 với IL-2R α gây ra, và những biến thể IL-2 như vậy có thể là những biến thể được bộc lộ trong patent Mỹ số 5,229,109 và patent Hàn Quốc số 1667096. Đặc biệt, các biến thể IL-2 được mô tả trong ứng dụng này có ái lực liên kết thấp với chuỗi alpha của thụ thể IL-2 (IL-2R α) và do đó có độc tính *in vivo* thấp hơn IL-2 kiểu đại.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “CD80”, còn được gọi là “B7-1”, là một protein màng có trong tế bào đuôi gai, tế bào B đã hoạt hóa và bạch cầu đơn nhân. CD80 cung cấp các tín hiệu đồng kích thích cần thiết cho sự hoạt hóa và tồn tại của tế bào T. CD80 được biết đến là một phối tử của hai loại protein khác nhau, CD28 và CTLA-4, hiện diện trên bề mặt tế bào T. CD80 có thể bao gồm 288 axit amin và cụ thể có thể có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 11. Ngoài ra, như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “protein CD80” dùng để chỉ CD80 có chiều dài đầy đủ hoặc đoạn CD80.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “đoạn CD80” dùng để chỉ một dạng CD80 bị cắt ngắn. Ngoài ra, đoạn CD80 có thể là miền ngoại bào của CD80. Phương án về đoạn CD80 có thể thu được bằng cách loại bỏ các axit amin từ axit amin thứ 1 đến axit amin thứ 34 từ đầu tận cùng N là trình tự tín hiệu của CD80. Cụ thể, phương án về đoạn CD80 có thể là protein bao gồm các axit amin từ axit amin thứ 35 đến axit amin thứ 288 trong SEQ ID NO: 11. Ngoài ra, phương án về đoạn CD80 có thể là protein bao gồm axit amin thứ 35

đến axit amin thứ 242 trong SEQ ID NO: 11. Ngoài ra, phương án về đoạn CD80 có thể là protein bao gồm axit amin thứ 35 đến axit amin thứ 232 trong SEQ ID NO: 11. Ngoài ra, phương án về đoạn CD80 có thể là protein bao gồm axit amin thứ 35 đến axit amin thứ 139 trong SEQ ID NO: 11. Trong ngoài ra, phương án về đoạn CD80 có thể là protein bao gồm axit amin thứ 142 đến axit amin thứ 242 trong SEQ ID NO: 11. Theo một phương án, đoạn CD80 có thể có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2.

Ngoài ra, protein IL-2 và protein CD80 có thể được gắn vào nhau thông qua đoạn liên kết hoặc chất mang. Cụ thể, IL-2 hoặc biến thể của nó và CD80 (B7-1) hoặc đoạn của nó có thể được gắn với nhau thông qua đoạn liên kết hoặc chất mang. Trong bản mô tả, đoạn liên kết và chất mang có thể được sử dụng thế cho nhau.

Đoạn liên kết liên kết hai protein. Phương án về đoạn liên kết có thể bao gồm 1 đến 50 axit amin, albumin hoặc đoạn của nó, vùng Fc của globulin miễn dịch, hoặc loại tương tự. Ở đây, vùng Fc của globulin miễn dịch dùng để chỉ protein bao gồm vùng hằng định chuỗi nặng 2 (CH2) và vùng hằng định chuỗi nặng 3 (CH3) của globulin miễn dịch, và không bao gồm các vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ và vùng hằng định chuỗi nhẹ 1 (CH1) của globulin miễn dịch. Globulin miễn dịch có thể là IgG, IgA, IgE, IgD hoặc IgM, và tốt hơn là IgG4. Ở đây, vùng Fc của globulin miễn dịch dạng tự nhiên G4 có thể có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 4.

Ngoài ra, vùng Fc của globulin miễn dịch có thể là biến thể vùng Fc cũng như vùng Fc kiểu đại. Ngoài ra, như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “biến thể vùng Fc” có thể đề cập đến dạng khác với vùng Fc kiểu đại về dạng glycosyl hóa, có độ glycosyl hóa cao so với vùng Fc kiểu đại, hoặc có độ glycosyl hóa thấp so với vùng Fc kiểu đại, hoặc dạng đã được khử glycosyl hóa. Ngoài ra, vùng Fc không được glycosyl hóa được bao gồm trong đó. Vùng Fc hoặc biến thể của nó có thể được làm phù hợp để có một số lượng axit sialic, fucosyl hóa hoặc glycosyl hóa được điều chỉnh, thông qua các điều kiện nuôi cấy hoặc thao tác di truyền ở vật chủ.

Ngoài ra, quá trình glycosyl hóa vùng Fc của globulin miễn dịch có thể được cải biến bằng các phương pháp thông thường như phương pháp hóa học, phương pháp enzym và phương pháp kỹ thuật di truyền sử dụng vi sinh vật. Ngoài ra, biến thể vùng Fc có thể ở dạng hỗn hợp của các vùng Fc tương ứng của các globulin miễn dịch, IgG, IgA, IgE, IgD và IgM. Ngoài ra, biến thể vùng Fc có thể ở dạng trong đó một số axit amin của vùng Fc

được thể bằng các axit amin khác. Phương án về biến thể vùng Fc có thể có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 12.

Protein dung hợp có thể có cấu trúc trong đó, sử dụng vùng Fc làm đoạn liên kết (hoặc chất mang), protein CD80 và protein IL-2, hoặc protein IL-2 và protein CD80 lần lượt được liên kết với đầu tận cùng N và đầu tận cùng C của đoạn liên kết hoặc chất mang, tương ứng (Fig. 1A). Liên kết giữa đầu tận cùng N hoặc đầu tận cùng C của vùng Fc, và CD80 hoặc IL-2 có thể đạt được tùy ý bằng peptit liên kết.

Cụ thể, protein dung hợp có thể bao gồm công thức cấu trúc (I) hoặc (II) sau:

$N'-X-[\text{đoạn liên kết (1)}]_n\text{-vùng Fc-}[\text{đoạn liên kết (2)}]_m\text{-Y-C' (I)}$

$N'-Y-[\text{đoạn liên kết (1)}]_n\text{-vùng Fc-}[\text{đoạn liên kết (2)}]_m\text{-X-C' (II)}$

Ở đây, trong công thức cấu tạo (I) và (II),

N' là đầu tận cùng N của protein dung hợp,

C' là đầu tận cùng C của protein dung hợp,

X là protein CD80,

Y là protein IL-2,

đoạn liên kết (1) và đoạn liên kết (2) là các đoạn liên kết peptit, và

mỗi n và m độc lập là 0 hoặc 1.

Tốt hơn là, protein dung hợp có thể bao gồm công thức cấu trúc (I). Protein IL-2 được mô tả ở trên. Ngoài ra, protein CD80 được mô tả ở trên. Theo một phương án, protein IL-2 có thể là biến thể IL-2 có một đến năm axit amin thay thế so với IL-2 kiểu đại. Protein CD80 có thể là đoạn thu được bằng cách cắt ngắn tối đa khoảng 34 gốc axit amin liền kề từ đầu tận cùng N hoặc đầu tận cùng C của CD80 kiểu đại. Ngoài ra, protein CD80 có thể là vùng giống như globulin miễn dịch ngoại bào có hoạt tính liên kết với các thụ thể bề mặt tế bào T là CTLA-4 và CD28.

Cụ thể, protein dung hợp có thể có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 9, 26, 28, hoặc 30. Theo một phương án khác, protein dung hợp gồm polypeptit có độ tương đồng về trình tự là 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 9, 26, 28 hoặc 30. Ở đây, độ tương đồng là, ví dụ phần trăm tương đồng và có thể được xác định thông qua phân

mềm so sánh độ tương đồng như phần mềm BlastN của Trung tâm Thông tin Công nghệ Sinh học Quốc gia (NCBI).

Đoạn liên kết peptit (1) có thể được bao gồm giữa protein CD80 và vùng Fc. Đoạn liên kết peptit (1) có thể bao gồm từ 5 đến 80 axit amin liên kề, từ 20 đến 60 axit amin liên kề, từ 25 đến 50 axit amin liên kề hoặc từ 30 đến 40 axit amin liên kề. Theo một phương án, đoạn liên kết peptit (1) có thể bao gồm 30 axit amin. Ngoài ra, đoạn liên kết peptit (1) có thể bao gồm ít nhất một xystein. Cụ thể, đoạn liên kết peptit (1) có thể bao gồm một, hai hoặc ba xystein. Ngoài ra, đoạn liên kết peptit (1) có thể có nguồn gốc từ vùng bản lề của globulin miễn dịch. Theo một phương án, đoạn liên kết peptit (1) có thể là đoạn liên kết peptit bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 3.

Đoạn liên kết peptit (2) có thể bao gồm từ 1 đến 50 axit amin liên kề, từ 3 đến 30 axit amin liên kề, hoặc từ 5 đến 15 axit amin liên kề. Theo một phương án, đoạn liên kết peptit (2) có thể là $(G4S)_n$ (trong đó n là số nguyên từ 1 đến 10). Ở đây, trong $(G4S)_n$, n có thể là 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, hoặc 10. Theo một phương án, đoạn liên kết peptit (2) có thể là đoạn liên kết peptit bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 5.

Theo một khía cạnh khác của sáng chế, đime thu được bằng cách liên kết hai protein dung hợp, mỗi protein này bao gồm protein IL-2 và protein CD80. Protein dung hợp gồm IL-2 hoặc biến thể của nó và CD80 hoặc một đoạn của nó như được mô tả ở trên.

Ở đây, liên kết giữa các protein dung hợp tạo nên đime có thể đạt được, nhưng không chỉ giới hạn ở, liên kết disulfit được tạo thành bởi các xystein có trong đoạn liên kết. Các protein dung hợp tạo nên đime có thể là các protein dung hợp giống hoặc khác nhau. Tốt hơn là, đime có thể là homodime. Phương án về protein dung hợp tạo nên đime có thể là protein có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 9.

Phương pháp nuôi cấy tế bào NK 1

Một khía cạnh khác của sáng chế đề xuất phương pháp nuôi cấy tế bào diệt tự nhiên, bao gồm các bước: i) phân lập tế bào không biểu hiện CD3 từ tế bào đơn nhân máu ngoại vi (peripheral blood mononuclear cell - PBMC); ii) phân lập tế bào biểu hiện CD56 từ tế bào không biểu hiện CD3 phân lập được ở giai đoạn trên; và iii) nuôi cấy các tế bào phân lập được với sự có mặt của đime protein dung hợp gồm IL-2 hoặc biến thể của nó và CD80 hoặc một đoạn của nó.

Thuật ngữ “PBMC” như được sử dụng trong sáng chế có nghĩa là tế bào đơn nhân máu ngoại vi. PBMC bao gồm các tế bào lympho (tế bào T, tế bào B, tế bào diệt tự nhiên) và bạch cầu đơn nhân, và có thể được phân lập từ máu toàn phần bằng Ficoll và ly tâm. PBMC có thể được phân lập từ máu toàn phần thu được từ một cá thể.

Đime protein dung hợp được mô tả chi tiết cho chế phẩm nuôi cấy tế bào diệt tự nhiên. Đime protein dung hợp có thể được xử lý ở nồng độ từ 1 nM đến 500 nM. Cụ thể, đime protein dung hợp có thể được xử lý ở nồng độ từ 1 nM đến 500 nM, từ 5 nM đến 300 nM hoặc từ 10 nM đến 150 nM. Theo một phương án của sáng chế, đime protein dung hợp được xử lý ở nồng độ 1,6 nM hoặc 50 nM.

Phương pháp nuôi cấy các tế bào phân lập được có thể được thực hiện bằng một phương pháp được biết đến rộng rãi trong lĩnh vực này. Cụ thể, nhiệt độ nuôi cấy trong giai đoạn nuôi cấy tế bào phân lập được có thể là từ 27°C đến 40°C, hoặc từ 30°C đến 37°C. Theo một phương án của sáng chế, bước nuôi cấy được thực hiện ở nhiệt độ 37°C. Ngoài ra, trong giai đoạn nuôi cấy tế bào phân lập được, điều kiện nồng độ CO₂ trong quá trình nuôi cấy có thể là từ 1% đến 10%, và tốt hơn là có thể nuôi cấy trong điều kiện CO₂ 5%.

Trong giai đoạn nuôi cấy tế bào phân lập được, thời gian nuôi cấy có thể từ 5 ngày đến 25 ngày, từ 6 ngày đến 23 ngày, hoặc từ 7 ngày đến 21 ngày. Theo một phương án của sáng chế, thời gian nuôi cấy là 20 ngày và sự khác biệt đáng kể về sự tăng sinh xuất hiện từ ngày thứ 5.

Các tế bào NK thu được và sử dụng chúng

Một khía cạnh khác của sáng chế đề xuất các tế bào diệt tự nhiên được điều chế bằng phương pháp nuôi cấy tế bào diệt tự nhiên.

Các tế bào diệt tự nhiên có thể tăng biểu hiện CD16 và NKp46. Các tế bào diệt tự nhiên có thể tăng biểu hiện của granzym B và perforin. Tế bào diệt tự nhiên được nuôi cấy theo phương pháp nuôi cấy tế bào diệt tự nhiên có thể được đông lạnh và chức năng của tế bào không bị suy giảm ngay cả khi rã đông trở lại.

Do biểu hiện cao các thụ thể hoạt hóa như CD16 và NKp46, các tế bào diệt tự nhiên thể hiện khả năng tiêu diệt tăng lên đối với dòng tế bào ung thư và tăng tiết granzym B và perforin, do đó có thể mong đợi tác dụng chống ung thư ưu việt. Do đó, tác nhân trị liệu

có hiệu quả để điều trị bệnh ung thư có thể được bào chế, bằng cách sử dụng một lượng lớn các tế bào diệt tự nhiên đã được hoạt hóa có thể áp dụng trên lâm sàng. Ngoài ra, các tế bào diệt tự nhiên có thể có sự biểu hiện cao của NKp30 hoặc DNAM1.

Một khía cạnh khác khác nữa của sáng chế đề xuất được phẩm để ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh ung thư bao gồm các tế bào diệt tự nhiên làm thành phần hoạt tính.

Ngoài ra, các tế bào diệt tự nhiên được điều chế bằng phương pháp nuôi cấy tế bào diệt tự nhiên có thể được bao gồm với lượng từ 10 đến 95% trọng lượng dựa trên tổng trọng lượng của dược phẩm. Hơn nữa, dược phẩm có thể bao gồm, ngoài thành phần hoạt chất trên, ít nhất một thành phần hoạt tính có chức năng giống hoặc tương tự.

Liều lượng của dược phẩm có thể được điều chỉnh theo các yếu tố khác nhau bao gồm loại bệnh, mức độ trầm trọng của bệnh, loại và hàm lượng của các thành phần hoạt tính và các thành phần khác có trong chế phẩm, loại chế phẩm và tuổi, cân nặng, tình trạng sức khỏe chung, giới tính và chế độ ăn uống của bệnh nhân, thời gian dùng thuốc, cách sử dụng thuốc và tốc độ bài tiết của chế phẩm, thời gian điều trị và các loại thuốc được sử dụng đồng thời.

Tuy nhiên, để có hiệu quả mong muốn, liều lượng dược phẩm có thể là 1×10^2 tế bào/kg đến $1,0 \times 10^3$ tế bào/kg và 1×10^7 tế bào/kg đến $1,5 \times 10^{11}$ tế bào/kg dựa trên các tế bào diệt tự nhiên, làm thành phần hoạt tính. Trong trường hợp này, có thể dùng liều một lần mỗi ngày, hoặc có thể chia làm nhiều lần.

Ngoài ra, dược phẩm có thể được sử dụng cho cá thể bằng các phương pháp khác nhau đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Đường dùng thuốc có thể được lựa chọn một cách thích hợp bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này khi xem xét đến phương pháp sử dụng, thể tích dịch cơ thể, độ nhớt, hoặc những thứ tương tự.

Bệnh ung thư có thể là bệnh bất kỳ được chọn từ nhóm gồm bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư gan, bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư đại trực tràng, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư tuyến tụy, bệnh ung thư cổ tử cung, bệnh ung thư tuyến giáp, bệnh ung thư thanh quản, bệnh bạch cầu nguyên bào lympho cấp tính, khối u não, u nguyên bào thần kinh, u nguyên bào võng mạc, bệnh ung thư đầu và cổ, bệnh ung thư tuyến nước bọt và bệnh ung thư hạch.

Phương pháp điều trị bằng cách sử dụng các tế bào NK thu được

Một khía cạnh khác của sáng chế đề xuất phương pháp điều trị bệnh ung thư bao gồm việc sử dụng tế bào NK cho cá thể bị bệnh ung thư. Trong trường hợp này, các tế bào NK và bệnh ung thư được mô tả ở trên. Một khía cạnh khác nữa của sáng chế đề xuất việc sử dụng tế bào NK để điều trị bệnh ung thư.

Phương pháp nuôi cấy tế bào NK 2

Một khía cạnh khác của sáng chế đề xuất phương pháp nuôi cấy tế bào diệt tự nhiên, bao gồm các bước: i) phân lập tế bào không biểu hiện CD3 từ PBMC; và ii) nuôi cấy tế bào phân lập được với sự có mặt của dime protein dung hợp gồm IL-2 hoặc biến thể của nó và CD80 hoặc một đoạn của nó.

Một khía cạnh khác của sáng chế đề cập xuất các tế bào diệt tự nhiên được điều chế bằng phương pháp nuôi cấy tế bào diệt tự nhiên. Khía cạnh khác nữa của sáng chế đề xuất được phẩm để ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh ung thư, bao gồm tế bào diệt tự nhiên làm thành phần hoạt tính. Một khía cạnh khác nữa của sáng chế đề xuất phương pháp điều trị bệnh ung thư bao gồm việc sử dụng tế bào NK cho cá thể mắc bệnh ung thư. Trong trường hợp này, tế bào NK và bệnh ung thư được mô tả ở trên. Khía cạnh khác nữa của sáng chế đề xuất việc sử dụng tế bào NK để điều trị bệnh ung thư.

Do biểu hiện cao các thụ thể hoạt hóa như CD16 và NKp46, các tế bào diệt tự nhiên thể hiện khả năng tiêu diệt tăng lên đối với dòng tế bào ung thư và tăng tiết granzym B và perforin, do đó có thể mong đợi tác dụng chống ung thư ưu việt. Do đó, tác nhân trị liệu có hiệu quả để điều trị bệnh ung thư có thể được bào chế, sử dụng lượng lớn các tế bào diệt tự nhiên đã được hoạt hóa có thể áp dụng trên lâm sàng. Ngoài ra, các tế bào diệt tự nhiên có thể có biểu hiện cao NKp30 hoặc DNAM1.

Bệnh ung thư có thể là bệnh bất kỳ được chọn từ nhóm gồm bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư gan, bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư đại trực tràng, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư tuyến tụy, bệnh ung thư cổ tử cung, bệnh ung thư tuyến giáp, bệnh ung thư thanh quản, bệnh bạch cầu nguyên bào lympho cấp tính, khối u não, u nguyên bào thần kinh, u nguyên bào võng mạc, bệnh ung thư đầu và cổ, bệnh ung thư tuyến nước bọt và bệnh ung thư hạch.

Phương pháp nuôi cấy tế bào NK 3

Một khía cạnh khác của sáng chế đề xuất phương pháp nuôi cấy tế bào diệt tự nhiên,

bao gồm các bước: i) phân lập tế bào biểu hiện CD56 từ các PBMC; và ii) nuôi cấy tế bào phân lập được với sự có mặt của đime protein dung hợp gồm IL-2 hoặc biến thể của nó và CD80 hoặc một đoạn của nó.

Tuy nhiên, một khía cạnh khác của sáng chế đề xuất tế bào diệt tự nhiên được điều chế bằng phương pháp nuôi cấy tế bào diệt tự nhiên. Do biểu hiện cao các thụ thể hoạt hóa như CD16 và NKp46, các tế bào diệt tự nhiên thể hiện khả năng tiêu diệt tăng lên đối với dòng tế bào ung thư và tăng tiết granzym B và perforin, từ đó kỳ vọng một tác dụng chống ung thư ưu việt. Do đó, tác nhân trị liệu có hiệu quả để điều trị bệnh ung thư có thể được bào chế, sử dụng một lượng lớn các tế bào diệt tự nhiên đã được hoạt hóa có thể áp dụng trên lâm sàng. Ngoài ra, các tế bào diệt tự nhiên có thể có biểu hiện NKp30 hoặc DNAM1 cao.

Tuy nhiên, một khía cạnh khác của sáng chế đề xuất được phẩm có thể ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh ung thư, bao gồm tế bào diệt tự nhiên làm thành phần hoạt tính. Một khía cạnh khác nữa của sáng chế đề xuất phương pháp điều trị bệnh ung thư bao gồm việc sử dụng tế bào NK cho cá thể bị bệnh ung thư. Trong trường hợp này, tế bào NK và bệnh ung thư được thể hiện như đã mô tả ở trên. Khía cạnh khác nữa của sáng chế đề xuất việc sử dụng các tế bào NK để điều trị bệnh ung thư.

Bệnh ung thư có thể là bệnh bất kỳ được chọn từ nhóm gồm bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư gan, bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư đại trực tràng, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư tuyến tụy, bệnh ung thư cổ tử cung, bệnh ung thư tuyến giáp, bệnh ung thư thanh quản, bệnh bạch cầu nguyên bào lympho cấp tính, khối u não, u nguyên bào thần kinh, u nguyên bào võng mạc, bệnh ung thư đầu và cổ, bệnh ung thư tuyến nước bọt và bệnh ung thư hạch.

Phương pháp nuôi cấy tế bào NK 4

Một khía cạnh khác của sáng chế đề xuất phương pháp thúc đẩy hoạt tính của tế bào diệt tự nhiên trong PBMC, bao gồm nuôi cấy PBMC với sự có mặt của đime protein dung hợp gồm IL-2 hoặc biến thể của nó và CD80 hoặc một đoạn của nó.

Khía cạnh khác của sáng chế đề xuất các PBMC được điều chế theo phương pháp có thể thúc đẩy hoạt tính của các tế bào diệt tự nhiên trong PBMC. Các tế bào diệt tự nhiên trong PBMC có biểu hiện cao thụ thể hoạt hóa như CD16 và NKp46 nhằm tăng khả năng tiêu diệt tế bào chống lại các dòng tế bào ung thư và tiết ra granzym B và perforin, từ đó

có thể mong đợi hiệu quả chống ung thư ưu việt. Do đó, tác nhân trị liệu hiệu quả để điều trị bệnh ung thư có thể được điều chế bằng cách sử dụng các PBMC bao gồm một lượng lớn các tế bào diệt tự nhiên đã được hoạt hóa có thể áp dụng trên lâm sàng. Ngoài ra, các tế bào diệt tự nhiên trong PBMC có thể có biểu hiện NKp30 hoặc DNAM1 cao.

Vẫn còn một khía cạnh khác của sáng chế đề xuất được phẩm có thể ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh ung thư bao gồm các PBMC làm thành phần hoạt tính. Khía cạnh khác nữa của sáng chế đề xuất phương pháp điều trị bệnh ung thư bao gồm việc sử dụng các tế bào NK cho cá thể bị bệnh ung thư. Trong trường hợp này, tế bào NK và bệnh ung thư được mô tả ở trên. Khía cạnh khác nữa của sáng chế đề xuất việc sử dụng các tế bào NK để điều trị bệnh ung thư.

Bệnh ung thư có thể là bệnh bất kỳ được chọn từ nhóm gồm bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư gan, bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư đại trực tràng, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư tuyến tụy, bệnh ung thư cổ tử cung, bệnh ung thư tuyến giáp, bệnh ung thư thanh quản, bệnh bạch cầu nguyên bào lympho cấp tính, khối u não, u nguyên bào thần kinh, u nguyên bào võng mạc, bệnh ung thư đầu và cổ, bệnh ung thư tuyến nước bọt và bệnh ung thư hạch.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn bằng các ví dụ dưới đây. Tuy nhiên, các ví dụ dưới đây chỉ để minh họa sáng chế và phạm vi của sáng chế sẽ không bị giới hạn ở các ví dụ này.

I. Điều chế GI-101, tế bào diệt tự nhiên và chế phẩm nuôi cấy tế bào diệt tự nhiên

Ví dụ điều chế 1. Điều chế biến thể hCD80-Fc-IL-2 (2M): GI-101

Để tạo ra protein dung hợp gồm đoạn CD80 của người, miền Fc và biến thể IL-2, polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit (SEQ ID NO: 8) mã hóa cho protein dung hợp gồm peptit tín hiệu (SEQ ID NO: 1), đoạn CD80 (SEQ ID NO: 2), vùng bản lề Ig liên hợp với đoạn liên kết (SEQ ID NO: 3), miền Fc (SEQ ID NO: 4), đoạn liên kết (SEQ ID NO: 5) và biến thể IL-2 (2M) trong đó hai axit amin được thay thế (R38A, F42A) (SEQ ID NO: 6) theo thứ tự này từ đầu tận cùng N đã được tổng hợp thông qua dịch vụ tổng hợp gen Invitrogen GeneArt của ThermoFisher Scientific Inc., và được tách dòng vào vector pcDNA3_4. Ngoài ra, vector này được đưa vào tế bào CHO (EXPI-CHO™) để biểu hiện

protein dung hợp SEQ ID NO: 9. Sau khi đưa vector vào, tế bào được nuôi cấy trong môi trường có nhiệt độ 37°C, 125 vòng/phút và 8% CO₂ trong 7 ngày, sau đó được thu gom để tinh chế protein dung hợp. Đime protein dung hợp tinh khiết được đặt tên là “GI-101”.

Quá trình tinh chế được thực hiện bằng phương pháp sắc ký bao gồm nhựa MabSelect SuRe protein A. Protein dung hợp được liên kết ở điều kiện 25 mM Tris, 25 mM NaCl và pH 7,4. Sau đó, nó được rửa giải với 100 mM NaCl và 100 mM axit axetic ở độ pH = 3. Sau khi cho 20% Tris-HCl 1M ở pH 9 vào một ống thu, thu được protein dung hợp. Protein dung hợp thu được được thẩm tách vào đệm PBS trong 16 giờ để thay đổi.

Sau đó, độ hấp thụ ở bước sóng 280 nm theo thời gian được đo bằng cách sử dụng sắc ký loại trừ kích thước cột TSKgel G3000SWXL (TOSOH Bioscience) để thu được nồng độ protein dung hợp cao. Tại thời điểm này, protein dung hợp phân lập và tinh chế được đưa vào SDS-PAGE trong các điều kiện khử (R) hoặc không khử (NR), và được nhuộm bằng coomassie blue để xác nhận độ tinh khiết của nó (Fig.1B). Đã xác nhận rằng protein dung hợp được bao gồm ở nồng độ 2,78 mg/ml như được phát hiện bằng cách sử dụng NanoDrop (Fig.1C). Ngoài ra, kết quả được phân tích bằng sắc ký loại trừ kích thước được thể hiện trên Fig.1D.

Ví dụ điều chế 2. Điều chế đime (2M) biến thể Fc-IL-2: Fc-IL-2v2

Để tạo ra protein dung hợp gồm miền Fc và biến thể IL-2, polynucleotit gồm trình tự nucleotit (SEQ ID NO: 45) mã hóa cho protein dung hợp gồm peptit tín hiệu (SEQ ID NO: 1), vùng bản lề Ig (SEQ ID NO: 38), miền Fc (SEQ ID NO: 4), đoạn liên kết (SEQ ID NO: 5) và biến thể IL-2 (2M) trong đó hai axit amin được thay thế (R38A, F42A) (SEQ ID NO: 6) theo thứ tự này từ đầu tận cùng N được tổng hợp thông qua dịch vụ tổng hợp gen Invitrogen GeneArt của ThermoFisher Scientific Inc., và được tách dòng vào vector pcDNA3_4. Ngoài ra, vector này được đưa vào tế bào CHO (EXPI-CHO™) để biểu hiện protein dung hợp nêu trong SEQ ID NO: 44. Sau khi đưa vector vào, các tế bào được nuôi cấy trong môi trường có nhiệt độ 37°C, 125 vòng/phút và 8 % CO₂ trong 7 ngày, và sau đó được thu gom để tinh chế đime protein dung hợp. Đime protein dung hợp tinh khiết được đặt tên là “Fc-IL2v2”.

Quá trình tinh chế và thu gom protein dung hợp được thực hiện theo cách tương tự như trong ví dụ điều chế 1. Protein dung hợp phân lập và tinh chế được đưa vào SDS-PAGE trong các điều kiện khử (R) hoặc không khử (NR), và được nhuộm bằng coomassie

blue để xác nhận độ tinh khiết của nó (Fig.3A). Kết quả là, xác nhận rằng protein dung hợp tạo thành đime. Ngoài ra, kết quả được phân tích bằng sắc ký loại trừ kích thước được thể hiện trên Fig.3B.

Ví dụ điều chế 3. Điều chế đime Fc-IL-2: Fc-IL-2wt

Để tạo ra protein dung hợp gồm miền Fc và IL-2 kiểu đại, polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit (SEQ ID NO: 43) mã hóa cho protein dung hợp gồm peptit tín hiệu (SEQ ID NO: 1), vùng bản lề Ig (SEQ ID NO: 38), miền Fc (SEQ ID NO: 4), đoạn liên kết (SEQ ID NO: 5) và IL-2 kiểu đại (SEQ ID NO: 10) theo thứ tự này từ đầu tận cùng N được tổng hợp thông qua dịch vụ tổng hợp gen Invitrogen GeneArt của ThermoFisher Scientific Inc., và được tách dòng vào vector pcDNA3_4. Ngoài ra, vector này được đưa vào tế bào CHO (EXPI-CHO™) để biểu hiện protein dung hợp nêu trong SEQ ID NO: 42. Sau khi đưa vector vào, các tế bào được nuôi cấy trong môi trường có nhiệt độ 37°C, 125 vòng/phút và 8 % CO₂ trong 7 ngày, và sau đó được thu gom để tinh chế đime protein dung hợp. Đime protein dung hợp tinh khiết được đặt tên là “Fc-IL2wt.”

Quá trình tinh chế và thu gom protein dung hợp được thực hiện theo cách tương tự như trong ví dụ điều chế 1. Protein dung hợp phân lập và tinh chế được đưa vào SDS-PAGE trong các điều kiện khử (R) hoặc không khử (NR), và được nhuộm bằng coomassie blue để xác nhận độ tinh khiết của nó (Fig.3c). Kết quả là, xác nhận được rằng protein dung hợp tạo thành đime. Ngoài ra, kết quả được phân tích bằng sắc ký loại trừ kích thước được thể hiện trên Fig.3D.

Ví dụ điều chế 4. Điều chế đime hCD80-Fc-IL-2 kiểu đại: hCD80-Fc-IL-2wt

Để tạo ra protein dung hợp gồm đoạn CD80 của người, miền Fc và protein IL-2 kiểu đại, polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit (SEQ ID NO: 41) mã hóa protein dung hợp gồm peptit tín hiệu (SEQ ID NO: 1), đoạn CD80 (SEQ ID NO: 2), vùng bản lề Ig liên hợp với đoạn liên kết (SEQ ID NO: 3), miền Fc (SEQ ID NO: 4), đoạn liên kết (SEQ ID NO: 5), và IL-2 kiểu đại (SEQ ID NO: 10) theo thứ tự này từ đầu tận cùng N được tổng hợp thông qua dịch vụ Tổng hợp gen Invitrogen GeneArt của ThermoFisher Scientific Inc., và được tách dòng vào vector pcDNA3_4. Ngoài ra, vector này được đưa vào tế bào CHO (EXPI-CHO™) để biểu hiện protein dung hợp nêu trong SEQ ID NO: 46. Sau khi đưa vector vào, các tế bào được nuôi cấy trong môi trường có nhiệt độ 37°C, 125 vòng/phút và nồng độ 8% CO₂ trong 7 ngày, sau đó được thu gom để tinh chế đime protein dung hợp.

Đime protein dung hợp tinh khiết được đặt tên là “hCD80-Fc-IL2wt”.

Quá trình tinh chế được thực hiện bằng phương pháp sắc ký bao gồm nhựa MabSelect SuRe protein A. Protein dung hợp được liên kết ở điều kiện 25 mM Tris, 25 mM NaCl và pH 7,4. Sau đó, nó được rửa giải với 100 mM NaCl và 100 mM axit axetic ở pH 3. Sau khi cho 20% Tris-HCl 1M ở pH 9 vào một ống thu, thu được protein dung hợp. Protein dung hợp thu được được thẩm tách vào đệm PBS trong 16 giờ để thay đổi.

Sau đó, độ hấp thụ ở bước sóng 280 nm theo thời gian được đo bằng cách sử dụng sắc ký loại trừ kích thước với cột TSKgel G3000SWXL (TOSOH Bioscience) để thu được nồng độ protein dung hợp cao. Tại thời điểm này, protein dung hợp phân lập và tinh chế được đưa vào SDS-PAGE trong các điều kiện khử (R) hoặc không khử (NR), và được nhuộm bằng coomassie blue để xác nhận độ tinh khiết của nó (Fig.4A). Kết quả là, xác nhận được rằng protein dung hợp tạo thành đime. Ngoài ra, kết quả được phân tích bằng sắc ký loại trừ kích thước được thể hiện trên Fig.4B.

Ví dụ điều chế 5. Điều chế đime hCD80-Fc: hCD80-Fc

Để tạo ra protein dung hợp gồm đoạn CD80 của người và miền Fc, polynucleotit (SEQ ID NO: 39) bao gồm trình tự nucleotit mã hóa cho protein dung hợp gồm peptit tín hiệu (SEQ ID NO: 1), đoạn CD80 (SEQ ID NO: 2), vùng bản lề Ig liên hợp với đoạn liên kết (SEQ ID NO: 3) và miền Fc (SEQ ID NO: 4) theo thứ tự này từ đầu tận cùng N được tổng hợp thông qua dịch vụ tổng hợp gen Invitrogen GeneArt của ThermoFisher Scientific Inc., và được tách dòng vào vector pcDNA3_4. Ngoài ra, vector này được đưa vào tế bào CHO (EXPI-CHO™) để biểu hiện protein dung hợp nêu trong SEQ ID NO: 40. Sau khi đưa vector vào, các tế bào được nuôi cấy trong môi trường có nhiệt độ 37°C, 125 vòng/phút và 8 % nồng độ CO₂ trong 7 ngày, sau đó được thu gom để tinh chế đime protein dung hợp. Đime protein dung hợp tinh khiết được đặt tên là “hCD80-Fc.”

Quá trình tinh chế được thực hiện bằng phương pháp sắc ký bao gồm nhựa MabSelect SuRe protein A. Protein dung hợp được liên kết ở điều kiện 25 mM Tris, 25 mM NaCl và pH 7,4. Sau đó, nó được rửa giải với 100 mM NaCl và 100 mM axit axetic ở pH 3. Sau khi cho 20% Tris-HCl 1 M ở pH 9 vào một ống thu, thu được protein dung hợp. Protein dung hợp thu được được thẩm tách vào đệm PBS trong 16 giờ để thay đổi.

Sau đó, độ hấp thụ ở bước sóng 280 nm theo thời gian được đo bằng cách sử dụng sắc ký loại trừ kích thước với cột TSKgel G3000SWXL (TOSOH Bioscience) để thu được

nồng độ protein dung hợp cao. Tại thời điểm này, protein dung hợp phân lập và tinh chế được đưa vào SDS-PAGE trong các điều kiện khử (R) hoặc không khử (NR), và được nhuộm bằng coomassie blue để xác nhận độ tinh khiết của nó (Fig.2A). Kết quả là, xác nhận được rằng protein dung hợp tạo thành dimer. Ngoài ra, kết quả được phân tích bằng sắc ký loại trừ kích thước được thể hiện trên Fig.2B.

Ví dụ điều chế 1. Điều chế môi trường nuôi cấy tế bào diệt tự nhiên

Chế phẩm môi trường nuôi cấy tế bào diệt tự nhiên được điều chế bằng cách thêm các chất tương ứng với các điều kiện thêm từ 1 đến 4 của Bảng 5 vào mỗi môi trường nuôi cấy cơ bản có thành phần từ Bảng 1 đến Bảng 4 dưới đây.

[Bảng 1]

Môi trường nuôi cấy cơ bản 1				
Chế phẩm	Nhà sản xuất	Số loại	Liều lượng	Nồng độ cuối cùng
SR tế bào miễn dịch CTS TM (Thay thế huyết thanh)	Thermo	A2596102	0,5ml	5%
GLUTAMAX 100X	GIBCO	A12860-01	0,5ml	1X
rhIL-15	R&D systems	247-ILB/CF	thêm vào ngay trước khi sử dụng	66,7IU
rhIL-21	R&D systems	8879-IL/CF	thêm vào ngay trước khi sử dụng	0,341IU
Các hạt kháng CD2/CD335	Miltenyi Biotec	130-094-483		
OKT3	Biolegend	317326		10ng/mL
Môi trường AIM-V	GIBCO	0870112-ĐK	đến 50ml	

[Bảng 2]

Môi trường nuôi cấy cơ bản 2				
Chế phẩm	Nhà sản xuất	Số loại	Liều lượng	Nồng độ cuối cùng

Huyết thanh AB của người	Sigma	H4522	2,5ml	5%
GLUTAMAX 100X	GIBCO	A12860-01	0,5ml	1X
rhIL-15	R&D systems	247-ILB/CF	thêm vào ngay trước khi sử dụng	66,7IU
rhIL-21	R&D systems	8879-IL/CF	thêm vào ngay trước khi sử dụng	0,341IU
Các hạt kháng CD2/CD335	Miltenyi Biotec	130-094-483		
OKT3	Biolegend	317326		10ng/mL
Môi trường AIM-V	GIBCO	0870112-ĐK	đến 50ml	

[Bảng 3]

Môi trường nuôi cấy cơ bản 3				
Chế phẩm	Nhà sản xuất	Số loại	Liều lượng	Nồng độ cuối cùng
Huyết thanh AB của người	Sigma	H4522	2,5ml	5%
GLUTAMAX 100X	GIBCO	A12860-01	0,5ml	1X
rhIL-15	R&D systems	247-ILB/CF	thêm vào ngay trước khi sử dụng	66,7IU
rhIL-21	R&D systems	8879-IL/CF	thêm vào ngay trước khi sử dụng	0,341IU
Các hạt kháng CD2/CD335	Miltenyi Biotec	130-094-483		
OKT3	Biolegend	317326		10ng/mL
Môi trường X-VIVO™ 15	Lonza	04-418Q	đến 50ml	

[Bảng 4]

Môi trường nuôi cấy cơ bản 4

Chế phẩm	Nhà sản xuất	Số loại	Liều lượng	Nồng độ cuối cùng
Huyết thanh AB của người	Sigma	H4522	2,5ml	5%
NK MACS bổ sung	Miltenyi Biotec	130-113-102	500 μ l	1%
CD2/CD335	Miltenyi Biotec	130-094-483		
OKT3	Biolegend	317326		10ng/mL
Môi trường NK MACS		130-112-968	đến 50ml	

[Bảng 5]

Nguyên liệu bổ sung				
Phân loại	Thành phần	Nhà sản xuất	Liều lượng	Nồng độ cuối cùng
Điều kiện thêm 1	GI-101	GI-Innovation	thêm vào ngay trước khi sử dụng	1,6nM/50nM
Điều kiện thêm 2	GI-101WT	GI-Cell	thêm vào ngay trước khi sử dụng	1,6nM/50nM
Điều kiện thêm 3	CD80-Fc+Fc-IL2WT	GI-Cell	thêm vào ngay trước khi sử dụng	CD80-Fc (1,6 nM) + Fc-IL2WT (1,6 nM)/CD80-Fc (50nM) + Fc-IL2WT (50nM)
Điều kiện thêm 4	CD80-Fc+Fc-IL2v2	GI-Cell	thêm vào ngay trước khi sử dụng	CD80-Fc (1,6 nM) + Fc-IL2v2 (1,6 nM)/CD80-Fc (50nM) + Fc-IL2v2 (50nM)

Ví dụ 1. Điều chế tế bào diệt tự nhiên CD3(-)CD56 (+) có nguồn gốc từ tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC)

Để thu được tế bào CD3(-), số lượng tế bào PBMC (tế bào đơn nhân máu ngoại vi, Zen-Bio. Inc, NC 27709, USA, Số loại: SER-PBMC-200-F) đã được đếm bằng máy đếm tế bào tự động ADAM-MC2 (NanoEnTek, mua từ Cosmo Genetech Co., Ltd.). Các PBMC

được chuyển sang một ống mới, và sau đó được ly tâm ở 300×g trong 5 phút ở nhiệt độ 4°C. 0,5% (thể tích/thể tích) albumin huyết thanh bò (BSA) và EDTA ở nồng độ 2 mM được đưa vào PBS để điều chế dung dịch đệm MACS (pH 7,2). Sau khi ly tâm hoàn tất, viên tế bào được xử lý với 80 µl dung dịch đệm MAC và 20 µl hạt từ tính CD3 (công nghệ sinh học Miltenyi, 130-050-101) trên 1×10^7 tế bào để tạo huyền phù, và sau đó được ủ ở nhiệt độ 4°C trong 15 phút. 10 ml dung dịch đệm MACs được thêm vào để rửa và ly tâm ở 300×g trong 10 phút ở nhiệt độ 4°C, và sau đó viên tế bào được tạo huyền phù lại trong 0,5 ml dung dịch đệm MACs.

2 ml dung dịch đệm MACs được cho chảy trước vào cột LD (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany, Số loại: 130-042-901), và sau đó huyền phù tế bào được chảy. Sau đó, thu được các tế bào CD3(-) đi qua cột LD. Tại thời điểm này, các tế bào CD3(-) thu được bằng cách cho 2 ml dung dịch đệm MAC chảy ba lần để các tế bào còn lại trong cột LD có thể được tách đủ. Các tế bào CD3(-) thu được được đếm bằng máy đếm tế bào, sau đó được đặt vào một ống mới và ly tâm ở 300×g trong 5 phút ở nhiệt độ 4°C. Sau đó, dịch nổi phía trên được loại bỏ, tiếp đó thêm vào mỗi 1×10^7 tế bào 80 µl dung dịch đệm MAC và 20 µl hạt từ tính CD56 (công nghệ sinh học Miltenyi, Số loại: 130-050-401), tiếp theo là ủ ở nhiệt độ 4°C trong 15 phút. Thêm vào 10 ml dung dịch đệm MACs để rửa và ly tâm ở 300×g trong 10 phút ở nhiệt độ 4°C, và sau đó viên tế bào được tạo huyền phù lại trong 0,5 ml dung dịch đệm MACs.

Đầu tiên cho 3 ml dung dịch đệm MACs chảy vào cột LS (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Đức, Số loại: 130-042-901), và sau đó huyền phù tế bào được chảy. Tại thời điểm này, 2 ml dung dịch đệm MAC được chảy ba lần để các tế bào còn lại trong cột LS có thể được phân tách đủ. Sau đó, sau khi cột LS được tách ra khỏi giá đỡ nam châm, 5 ml dung dịch đệm MAC được thêm vào và tạo áp lực bằng pít-tông để thu được các tế bào diệt tự nhiên CD3(-)CD56 (+). Tế bào diệt tự nhiên CD3(-)CD56 (+) thu được được đặt vào một ống mới và ly tâm ở 300×g trong 5 phút ở nhiệt độ 4°C. Sau khi loại bỏ dịch nổi phía trên, các tế bào được tạo huyền phù trong môi trường nuôi cấy cơ bản được thể hiện trong Bảng 1 đến Bảng 4 có xem xét đến các điều kiện nuôi cấy. Số lượng tế bào được tạo huyền phù được đếm bằng cách sử dụng máy đếm tế bào.

Ví dụ 2. Nuôi cấy tế bào diệt tự nhiên CD3(-)CD56 (+) có nguồn gốc từ tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC)

100 μ L CD335 (NKp46) -biotin và 100 μ L CD2-biotin có trong kit hoạt hóa/mở rộng tế bào NK (Số loại: 130-112-968) (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Đức) được đặt trong vi ống 1,5 mL và trộn, sau đó thêm 500 μ L hạt Anti-Biotin MACSiBead và trộn. Sau đó, thêm 300 μ L dung dịch đệm MAC, và trộn ở 2°C đến 8°C trong 2 giờ bằng cách sử dụng bộ quay vi ống. Xem xét số lượng tế bào, 5 μ L hạt hoạt hóa NK trên 1×10^6 tế bào đã được chuyển sang một ống mới. 1 mL PBS được thêm vào và ly tâm ở $300 \times g$ trong 5 phút. Sau khi loại bỏ phần nổi phía trên, môi trường NK MACs (Số loại: 130-094-483) (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Đức) sẽ được thêm vào trên cơ sở 5 μ L trên 10^6 tế bào NK, và giải phóng các hạt, tiếp theo là cấy vào tế bào diệt tự nhiên CD3(-)CD56 (+) được phân lập trong ví dụ 1.

Tiếp theo, tế bào diệt tự nhiên CD3(-)CD56 (+) điều chế được được tạo huyền trong chế phẩm môi trường nuôi cấy chứa chất thêm vào được điều chế trong ví dụ điều chế 1 sao cho tổng số tế bào là $2,5 \times 10^5$ và được gieo vào đĩa 48 giếng, tiếp theo là nuôi cấy trong điều kiện 37°C và 5% CO₂. Sau đó, số lượng tế bào được xác định cứ sau 2 ngày để nuôi cấy thứ cấp theo thứ tự đĩa 48 giếng, đĩa 24 giếng, đĩa giếng 12, đĩa 6 giếng và bình 25T khi các tế bào hợp dòng 80% trở lên của bình nuôi cấy (nhập dòng), và cuối cùng tất cả các tế bào được thu hoạch vào ngày 21.

Ví dụ 3. Đếm số lượng tế bào và so sánh khả năng sống được của tế bào

Tổng số lượng tế bào và khả năng sống được của các tế bào diệt tự nhiên được nuôi cấy được đếm bằng máy đếm tế bào (ADAM-MC2) vào các ngày 5, 9, 11, 13, 15, 17 và 21. Tại thời điểm này, số lượng tế bào được đếm vào các ngày ở trên khi các tế bào đạt đến mức hợp dòng 80%, đây là một tiêu chí cho quá trình nuôi cấy thứ cấp vì tốc độ tăng sinh của tế bào thay đổi tùy thuộc vào nguyên liệu được xử lý và loại môi trường nuôi cấy.

Kết quả so sánh tổng số lượng tế bào và khả năng sống được của tế bào CD3-CD56+ được nuôi cấy trong các điều kiện của chế phẩm môi trường nuôi cấy được điều chế trong ví dụ điều chế 1 và được trình bày trong các bảng từ bảng 6 đến bảng 13 và các hình từ Fig.5A đến Fig.12B.

Kết quả là, tất cả các chế phẩm môi trường nuôi cấy được bổ sung GI-101 được điều chế theo ví dụ điều chế 1 có tổng số lượng tế bào diệt tự nhiên lớn hơn nhóm đối chứng (bổ sung CD80-Fc+Fc-IL2v2 hoặc CD80-Fc+Fc-IL2WT), không phụ thuộc vào nồng độ xử lý trong bốn điều kiện môi trường nuôi cấy cơ bản (Bảng 1 đến Bảng 4) (Fig.5A,

5B, 7A, 7B, 9A, 9B, 11A và 11B).

Ngoài ra, ngay cả đối với khả năng sống được của tế bào, khi GI-101 được thêm vào, tất cả các chế phẩm môi trường nuôi cấy tế bào đều thể hiện khả năng sống được cao bất kể môi trường nuôi cấy cơ bản và nồng độ (Fig.6A, 6B, 8A, 8B, 10A, 10B, 12A và 12B).

Dựa trên các kết quả này, xác nhận rằng GI-101 đóng một vai trò quan trọng trong việc cải thiện khả năng tăng sinh và khả năng sống được của các tế bào diệt tự nhiên so với nhóm đối chứng (bổ sung CD80-Fc+Fc-IL2v2 hoặc CD80-Fc+Fc-IL2WT), không phụ thuộc vào môi trường nuôi cấy cơ bản và nồng độ.

[Bảng 6]

TỔNG SỐ LƯỢNG TẾ BÀO (X10 ⁵)										
Điều kiện nuôi cấy	Nồng độ	Nguyên liệu xử lý	Tế bào CD3-CD56+							
			NGÀY0 (gieo mầm)	NGÀY 5	NGÀY 9	NGÀY 11	NGÀY 13	NGÀY 15	NGÀY17	NGÀY21
Bảng 1	50nM	GI-101	2,50	3,17	8,56	-	23,84	-	27,38	23,76
		GI-101WT	2,50	2,36	6,40	-	-	-	15,45	13,33
		CD80-Fc+Fc-IL2v2	2,50	2,62	6,61	-	16,16	-	21,93	13,19
		CD80-Fc+Fc-IL2WT	2,50	1,87	-	11,04	13,92	-	17,86	13,33
	1,6nM	GI-101	2,50	2,27	6,79	-	13,98	-	15,62	11,19
		GI-101WT	2,50	1,92	4,65	-	-	-	-	3,58
		CD80-Fc+Fc-IL2v2	2,50	0,23	-	-	-	-	-	-
		CD80-Fc+Fc-IL2WT	2,50	1,76	-	-	6,96	-	6,64	4,46

[Bảng 7]

KHẢ NĂNG SỐNG ĐƯỢC (%)										
Điều kiện nuôi cấy	Nồng độ	Nguyên liệu xử lý	Tế bào CD3-CD56+							
			NGÀY 0 (gieo mầm)	NGÀY 5	NGÀY 9	NGÀY 11	NGÀY 13	NGÀY 15	NGÀY 17	NGÀY 21
Bảng 1	50nM	GI-101	-	76,58	82,41	-	90,94	-	86,68	84,19
		GI-101WT	-	75,98	83,42	-	-	-	89,27	89,53
		CD80-Fc+Fc-IL2v2	-	78,18	81,73	-	90,57	-	88,76	89,64
		CD80-Fc+Fc-IL2WT	-	83,64	-	86,50	92,19	-	89,62	82,36
	1,6nM	GI-101	-	75,08	82,94	-	87,85	-	90,34	88,22
		GI-101WT	-	77,55	82,32	-	-	-	-	87,01
		CD80-Fc+Fc-IL2v2	-	49,77	-	-	-	-	-	-
		CD80-Fc+Fc-IL2WT	-	74,51	-	-	86,47	-	88,90	93,29

[Bảng 8]

TỔNG SỐ LƯỢNG TẾ BÀO ($\times 10^5$)										
Điều kiện nuôi cấy	Nồng độ	Nguyên liệu xử lý	Tế bào CD3-CD56+							
			NGÀY 0 (gieo mầm)	NGÀY 5	NGÀY 9	NGÀY 11	NGÀY 13	NGÀY 15	NGÀY 17	NGÀY 21
Bảng 2	50nM	GI-101	2,5	11,71	38,81	-	214,88	415,25	-	694,59
		GI-101WT	2,5	8,57	30,58	62,31	96,42	-	-	152,16
		CD80-Fc+Fc-IL2v2	2,5	8,12	-	-	90,54	122,27	-	153,14
		CD80-Fc+Fc-IL2WT	2,5	7,80	29,97	-	92,32	118,56	-	152,23
	1,6nM	GI-101	2,5	5,60	28,69	-	55,39	-	-	94,22
		GI-101WT	2,5	6,58	14,92	-	35,18	-	-	37,81
		CD80-Fc+Fc-IL2v2	2,5	6,02	19,85	-	56,26	-	-	75,83
		CD80-Fc+Fc-IL2WT	2,5	6,04	18,39	-	46,50	-	-	55,51

[Bảng 9]

KHẢ NĂNG SỐNG ĐƯỢC (%)											
Điều kiện nuôi cấy	Nồng độ	Nguyên liệu xử lý	Tế bào CD3-CD56+								
			NGÀY0 (gieo mầm)	NGÀY 5	NGÀY 9	NGÀY 11	NGÀY 13	NGÀY 15	NGÀY17	NGÀY21	
Bảng 2	50nM	GI-101	-	93,31	95,64	-	96,47	96,58	-	93,21	
		GI-101WT	-	94,38	95,45	96,06	94,96	-	-	92,14	
		CD80-Fc+Fc-IL2v2	-	93,32	-	-	97,01	95,96	-	91,73	
		CD80-Fc+Fc-IL2WT	-	91,51	96,49	-	96,19	95,23	-	91,81	
	1,6nM	GI-101	-	91,81	93,75	-	95,14	-	-	85,22	
		GI-101WT	-	93,56	93,56	-	94,81	-	-	88,63	
		CD80-Fc+Fc-IL2v2	-	93,57	94,00	-	94,36	-	-	89,53	
		CD80-Fc+Fc-IL2WT	-	90,87	94,04	-	95,01	-	-	87,36	

[Bảng 10]

TỔNG SỐ LƯỢNG TẾ BÀO (X10 ⁵)										
Điều kiện nuôi cấy	Nồng độ	Nguyên liệu xử lý	Tế bào CD3-CD56+							
			NGÀY0 (gieo mầm)	NGÀY 5	NGÀY 9	NGÀY 11	NGÀY 13	NGÀY 15	NGÀY17	NGÀY21
Bảng 3	50nM	GI-101	2,50	6,07	24,64	-	46,13	61,25	-	99,60
		GI-101WT	2,50	6,98	24,90	-	49,75	64,15	-	67,71
		CD80-Fc+Fc-IL2v2	2,50	4,11	-	21,60	-	-	-	56,02
		CD80-Fc+Fc-IL2WT	2,50	5,73	23,52	-	51,17	66,32	-	76,19
	1,6nM	GI-101	2,50	6,47	25,14	-	54,13	69,59	-	86,68
		GI-101WT	2,50	3,34	-	-	-	-	-	10,91
		CD80-Fc+Fc-IL2v2	2,50	1,07	-	-	-	-	-	-
		CD80-Fc+Fc-IL2WT	2,50	4,61	13,16	-	16,27	-	-	13,16

[Bảng 11]

KHẢ NĂNG SỐNG ĐƯỢC (%)											
Điều kiện nuôi cấy	Nồng độ	Nguyên liệu xử lý	Tế bào CD3-CD56+								
			NGÀY 0 (gieo mầm)	NGÀY 5	NGÀY 9	NGÀY 11	NGÀY 13	NGÀY 15	NGÀY 17	NGÀY 21	
Bảng 3	50nM	GI-101	-	89,72	90,65	-	90,59	88,11	-	82,08	
		GI-101WT	-	90,74	92,95	-	93,20	90,52	-	87,38	
		CD80-Fc+Fc-IL2v2	-	87,57	-	88,80	-	-	-	87,63	
		CD80-Fc+Fc-IL2WT	-	88,60	93,44	-	95,13	94,99	-	91,38	
	1,6nM	GI-101	-	90,07	92,11	-	92,64	90,80	-	85,62	
		GI-101WT	-	85,76	-	-	-	-	-	75,98	
		CD80-Fc+Fc-IL2v2	-	66,33	-	-	-	-	-	-	
		CD80-Fc+Fc-IL2WT	-	88,05	90,17	-	89,08	-	-	79,81	

[Bảng 12]

TỔNG SỐ LƯỢNG TẾ BÀO (X10 ⁵)										
Điều kiện nuôi cấy	Nồng độ	Nguyên liệu xử lý	Tế bào CD3-CD56+							
			NGÀY 0 (gieo mầm)	NGÀY 5	NGÀY 9	NGÀY 11	NGÀY 13	NGÀY 15	NGÀY 17	NGÀY 21
Bảng 4	50nM	GI-101	2,50	6,31	37,36	58,21	-	146,76	-	467,75
		GI-101WT	2,50	5,74	30,24	52,00	-	126,99	-	347,59
		CD80-Fc+Fc-IL2v2	2,50	6,96	31,20	51,52	-	130,65	-	285,63
		CD80-Fc+Fc-IL2WT	2,50	6,30	35,52	50,08	-	147,54	-	350,28
	1,6nM	GI-101	2,50	6,75	37,28	63,68	-	166,42	-	419,02
		GI-101WT	2,50	2,46	-	8,08	9,84	-	-	8,93
		CD80-Fc+Fc-IL2v2	2,50	0,73	-	-	-	-	-	-
		CD80-Fc+Fc-IL2WT	2,50	3,86	18,85	-	48,90	67,86	-	134,21

[Bảng 13]

KHẢ NĂNG SỐNG ĐƯỢC (%)										
Điều kiện nuôi cấy	Nồng độ	Nguyên liệu xử lý	Tế bào CD3-CD56+							
			NGÀY 0 (gieo mầm)	NGÀY 5	NGÀY 9	NGÀY 11	NGÀY 13	NGÀY 15	NGÀY 17	NGÀY 21
Bảng 4	50nM	GI-101	-	94,72	96,93	97,24	-	96,20	-	96,04
		GI-101WT	-	94,90	96,79	96,11	-	63,11	-	64,73
		CD80-Fc+Fc-IL2v2	-	95,33	97,83	96,70	-	95,73	-	96,43
		CD80-Fc+Fc-IL2WT	-	95,99	97,86	97,52	-	97,09	-	96,39
	1,6nM	GI-101	-	94,75	97,72	96,89	-	94,67	-	95,00
		GI-101WT	-	89,00	-	88,06	-	-	-	88,22
		CD80-Fc+Fc-IL2v2	-	75,94	-	-	-	-	-	-
		CD80-Fc+Fc-IL2WT	-	91,40	96,61	-	-	96,49	-	95,99

II. Xác định đặc tính của tế bào diệt tự nhiên bằng cách sử dụng chế phẩm nuôi cấy tế bào diệt tự nhiên

Ví dụ 4. Đo độ tinh khiết của tế bào diệt tự nhiên

Tế bào diệt tự nhiên CD3-CD56+ thu được từ ví dụ 2 tương ứng được ly tâm ở điều kiện 300×g trong 5 phút để loại bỏ phần nổi phía trên, và 1 ml dung dịch đệm FACS được thêm vào để giải phóng viên tế bào. Sau đó, 3% (thể tích/thể tích) FBS, 10 mM EDTA, 20 mM HEPES, 10 µg/ml polymyxin B, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, và 1 mM natri pyruvat được thêm vào PBS để điều chế dung dịch đệm FACS, và 1 ml dung dịch đệm FACS đã điều chế được thêm vào để huyền phù lại viên tế bào. Tiếp theo, nó được pha loãng với đệm FACS thành 2×10^6 tế bào/ml bằng cách sử dụng máy đếm tế bào.

100 µl dung dịch tế bào đã pha loãng được thêm vào mỗi ống 5ml FACS, và 100 µl dung dịch đệm FACS được thêm vào đó, tiếp theo là xử lý bằng kháng thể kháng CD3 của người được đánh dấu PerCP (PerCP human anti-CD3 (dòng UCHT1)) và kháng thể kháng CD56 của người được đánh dấu PE/cy7 (PE/cy7 human anti-CD56 (dòng B159)). Sau đó, sau khi ủ ở 4°C trong 20 phút, 200 µl đệm FACS được thêm vào và ly tâm ở tốc độ 1.500 vòng/phút trong 3 phút. Phần nổi phía trên được loại bỏ và 200 µl dung dịch đệm FACS được thêm vào để tạo huyền phù, và sau đó kiểu hình của tế bào được xác định bằng cách sử dụng máy đếm tế bào dòng chảy (CYTEK® Aurora, Xytek, Fremont, CA, USA).

Thông tin về các kháng thể được sử dụng trong thí nghiệm được trình bày trong Bảng 14. Ngoài ra, độ tinh khiết của tế bào diệt tự nhiên CD3-CD56+ được nuôi cấy trong 21 ngày trong điều kiện của các chế phẩm môi trường nuôi cấy được điều chế trong ví dụ điều chế 1 được đo và thể hiện trên các hình vẽ từ Fig.13 đến Fig.16.

[Bảng 14]

	Đích	Màu sắc	Dòng	Nhà sản xuất	Số loại
Dấu hiệu NK	CD3	PerCP	UCHT1	BioLegend	300428
	CD56	APC/cy7	5.1H11	BioLegend	362512

Ví dụ 5. Nhận dạng các dấu hiệu hoạt hóa và ức chế đối với các tế bào diệt tự nhiên

Tế bào diệt tự nhiên CD3-CD56+ thu được từ ví dụ 2 tương ứng được ly tâm ở điều kiện 300×g trong 5 phút để loại bỏ phần nổi phía trên, và 1 ml dung dịch đệm FACS được thêm vào để giải phóng viên tế bào.

3% (thể tích/thể tích) FBS, 10 mM EDTA, 20 mM HEPES, 10 µg/ml polymyxin B, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, và 1 mM natri pyruvat được thêm vào PBS để điều chế dung dịch đệm FACS, và 1 ml dung dịch đệm FACS đã điều chế được thêm vào để tạo huyền phù lại viên tế bào. Sau đó, pha loãng với đệm FACS thành 2×10^6 tế bào/ml bằng cách sử dụng máy đếm tế bào. 100 µl dung dịch tế bào đã pha loãng được thêm vào mỗi ống 5 ml dung dịch FACS và được xác nhận bằng cách sử dụng kháng thể kháng CD16 của người được đánh dấu PE-CF594 của người (PE-CF594 human anti-CD16 (Dòng 3G8)), kháng thể kháng DNAM1 của người được đánh dấu APC (APC human anti-DNAM1 (Dòng 11A8)), kháng thể kháng NKG2C của người được đánh dấu BV605 (BV605 human anti-NKG2C (Dòng 134591)), kháng thể kháng NKG2D của người được đánh dấu BV650 (BV650 human anti-NKG2D (Dòng 1D11)), kháng thể kháng NKp46 của người được đánh dấu BB515 (BB515 human anti-NKp46 (Dòng 9E2)), kháng thể kháng NKp30 của người được đánh dấu BV480 (BV480 human anti-NKp30 (Dòng p30-15)), kháng thể kháng PD-1 của người được đánh dấu PE (PE human anti- PD-1 (Dòng EH12.2H7)), kháng thể kháng NKG2A của người được đánh dấu APC (APC human anti-NKG2A (Dòng 131411)), sử dụng máy đếm tế bào dòng chảy. Sau đó, sau khi ủ ở 4°C trong 20 phút, 100 µl đệm FACS được thêm vào và ly tâm ở tốc độ 1.500 vòng/phút trong 3 phút.

Phần nổi phía trên được loại bỏ và 200 µl dung dịch đệm FACS được thêm vào để tạo huyền phù, và sau đó kiểu hình của tế bào được xác định bằng cách sử dụng máy đếm tế bào dòng chảy (CYTEK® Aurora, Xytek, Fremont, CA, USA). Thông tin về các kháng thể được sử dụng trong thử nghiệm được trình bày trong Bảng 15. Các dấu hiệu hoạt hóa và ức chế đối với tế bào diệt tự nhiên CD3-CD56+ được nuôi cấy trong 21 ngày trong điều kiện của các chế phẩm môi trường nuôi cấy được điều chế trong ví dụ điều chế 1 đã được xác định và thể hiện trên các hình vẽ từ Fig.17 đến Fig.24.

[Bảng 15]

	Đích	Màu sắc	Dòng	Nhà sản xuất	Số loại
Dấu hiệu hoạt hóa	CD16	PE-CF594	3G8	BD	562293
	DNAM1	APC	11A8	BioLegend	338312
	NKp46	BB515	9E2	BD	564536
	NKp30	BV480	tr30-15	BD	746491
	PD-1	PE	EH12.2H7	BioLegend	329906

Dầu hiệu ức ché	NKG2A	APC	131411	R&D systems	FAB1059A- 100
--------------------	-------	-----	--------	-------------	------------------

Ví dụ 6. Xác định khả năng tiết granzym B, perforin, interferon gama của tế bào diệt tự nhiên

Để xác định khả năng tiết granzym và perforin của tế bào diệt tự nhiên CD3-CD56+ thu được từ ví dụ 2, lượng biểu hiện của granzym B, perforin và interferon gama trong tế bào diệt tự nhiên được đo bằng phương pháp nhuộm nội bào. Các tế bào diệt tự nhiên nuôi cấy được ly tâm ở điều kiện 300×g trong 5 phút và phần nổi phía trên được loại bỏ. Sau đó, nó được pha loãng với môi chế phẩm nuôi cấy thành 2×10^6 tế bào/ml bằng cách sử dụng máy đếm tế bào.

200 µl tế bào đã điều chế được phân phối vào mỗi giếng của đĩa 96 giếng, sau đó thêm 1% (thể tích/thể tích) Cocktail kích thích (1X) (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) và ủ ở 37°C, điều kiện CO₂ trong 4 giờ. Sau đó, các đĩa được ly tâm ở điều kiện 300×g trong 5 phút và phần nổi phía trên được loại bỏ. Tiếp theo, 3% (thể tích/thể tích) FBS, 10 mM EDTA, 20 mM HEPES, 10 µg/ml polymyxin B, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, và 1 mM natri pyruvat được thêm vào PBS để điều chế dung dịch đệm FACS, và 100 µl đệm FACS đã điều chế được thêm vào để tạo huyền phù lại viên tế bào. Phần nổi phía trên được loại bỏ và 100 µl đệm BD CYTOFIX/CYTOPERM™ (đệm thâm thấu/cố định, BD science) được thêm vào để cố định và thâm thấu, sau đó được tạo huyền phù, tiếp đó ủ ở 4°C trong 30 phút. 100 µl đệm FACS được thêm vào và ly tâm ở tốc độ 1.500 vòng/phút trong 3 phút.

Kháng thể kháng granzym B của người được đánh dấu PE/cy7 (PE/cy7 anti-human Granzyme B (Dòng NGZB)), kháng thể kháng perforin của người được đánh dấu APC (APC anti-human Perforin (Dòng B-D48)), và kháng thể kháng interferon gama của người được đánh dấu BV421 (BV421 anti-human IFN-gamma (Dòng B27)) đã được xử lý. Sau đó, sau khi ủ ở 4°C trong 20 phút, 100 µl đệm FACS được thêm vào và ly tâm ở tốc độ 1.500 vòng/phút trong 3 phút. Sau khi phần nổi phía trên được loại bỏ và 200 µl đệm FACS (đệm cố định) được thêm vào để tạo huyền phù, lượng biểu hiện của tế bào được xác định bằng cách sử dụng máy đếm tế bào dòng chảy.

Thông tin về các kháng thể được sử dụng trong thí nghiệm được trình bày trong Bảng 16. Các dấu hiệu cho tế bào diệt tự nhiên CD3-CD56+ được nuôi cấy trong 21 ngày

trong các điều kiện của chế phẩm môi trường nuôi cấy được điều chế trong ví dụ điều chế 1 đã được xác định và thể hiện trên các hình vẽ từ Fig.25 đến Fig.28.

[Bảng 16]

	Đích	Màu sắc	Dòng	Nhà sản xuất	Số loại
Tính gây độc tế bào	Perforin	APC	B-D48	BioLegend	353312
	IFN- γ	BV421	B27	BioLegend	506538
	GranzymB (GB11)	PE/cy7	NGZB	ebioscience	25-8898-82

III. Phân tích khả năng tiêu diệt tế bào ung thư của các tế bào diệt tự nhiên theo chế phẩm nuôi cấy

Ví dụ 8. Xác nhận khả năng làm mất hạt nhỏ và tác dụng tiêu diệt của tế bào diệt tự nhiên đối với tế bào ung thư

Cụ thể, dòng tế bào ung thư K562 (American Type Culture Collection, ATCC) được pha loãng trong PBS đến số lượng tế bào được biểu thị trong Bảng 17 dưới đây và được phân phối vào từng giếng.

[Bảng 17]

E:T	1: 1	1: 5	1: 10
(E) Tế bào NK	$2,5 \times 10^5$ tế bào	1×10^5 tế bào	1×10^5 tế bào
(T) K562	$2,5 \times 10^5$ tế bào	5×10^5 tế bào	1×10^6 tế bào

Cụ thể, dòng tế bào ung thư K562 được pha loãng với từng chế phẩm nuôi cấy thành 1×10^7 tế bào/ml, và sau đó được phân phối theo số lượng tế bào quy định trong bảng trên cho mỗi giếng. Sau đó, các tế bào diệt tự nhiên cũng được pha loãng với từng chế phẩm nuôi cấy đến 5×10^6 tế bào/ml, và sau đó phân phối theo số lượng tế bào quy định trong bảng trên cho mỗi giếng, và ly tâm ở điều kiện $30 \times g$ trong 3 phút. Tiếp theo, sau khi nuôi cấy ở 37°C , điều kiện 5% CO_2 trong 4 giờ, kháng thể kháng CD3 của người được đánh dấu BV421 (BV421 human anti-CD3 (dòng UCHT1)), kháng thể kháng CD16 của người được đánh dấu PE (PE human anti-CD16 (dòng 3G8)), kháng thể kháng CD56 của người được đánh dấu PE/cy7 (PE/cy7 human anti-CD56 (dòng B159)), và kháng thể kháng CD107a của người được đánh dấu FITC (FITC anti-human CD107a antibody (dòng H4A3)) được xử lý và ủ trên nước đá trong 20 phút.

Sau đó, 100 μ L đệm FACS được thêm vào và ly tâm ở tốc độ 1.300 vòng/phút, điều kiện 4°C trong 5 phút. Sau khi loại bỏ phần nổi phía trên, dung dịch nhuộm khả năng sống được 7-AAD được xử lý, và chấn ánh sáng để phản ứng ở nhiệt độ phòng trong 15 phút. Sau đó, 100 μ L đệm FACS được thêm vào và ly tâm ở tốc độ 1.300 vòng/phút, điều kiện 4°C trong 5 phút. 200 μ L đệm FACS lại được thêm vào, và ly tâm ở tốc độ 1.300 vòng/phút, điều kiện 4°C trong 5 phút. Sau khi lặp lại quy trình trên một lần nữa, phần nổi phía trên được loại bỏ và 400 μ L dung dịch đệm FACS được thêm vào, tiếp theo là phân tích bằng máy đếm tế bào theo dòng (CYTEL® Aurora, Xytek, Fremont, CA, USA).

Khả năng làm mất hạt nhỏ và hiệu quả tiêu diệt của các tế bào diệt tự nhiên được nuôi cấy trong 21 ngày trong chế phẩm trong đó 50 nM chất thêm vào trong Bảng 5 được thêm vào môi trường nuôi cấy cơ bản trong Bảng 1 đến Bảng 4, được thể hiện trên các hình vẽ từ Fig.29 đến Fig.34.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chế phẩm nuôi cấy in vitro tế bào diệt tự nhiên phân lập được không có tế bào CD3+ hoặc tế bào CD56- chứa đime protein dung hợp gồm IL-2 hoặc biến thể của nó và CD80 hoặc đoạn của nó làm thành phần hoạt tính,

trong đó biến thể protein IL-2 bao gồm thay thế axit amin thứ 38 và axit amin thứ 42 trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 10,

trong đó đoạn protein CD80 bao gồm miền ngoại bào của CD80,

trong đó tế bào diệt tự nhiên phân lập được là tế bào diệt tự nhiên CD3-CD56+.

2. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó đime protein dung hợp gồm công thức cấu trúc (I) hoặc (II) sau:

$N'-X-[đoạn\ liên\ kết\ (1)]_n-miền\ Fc-[đoạn\ liên\ kết\ (2)]_m-Y-C'$ - công thức (I)

$N'-Y-[đoạn\ liên\ kết\ (1)]_n-miền\ Fc-[đoạn\ liên\ kết\ (2)]_m-X-C'$ - công thức (II),

trong đó, N' là đầu tận cùng N của protein dung hợp,

C' là đầu tận cùng C của protein dung hợp,

X là protein CD80 hoặc đoạn của nó,

Y là protein IL-2 hoặc biến thể của nó,

đoạn liên kết (1) và đoạn liên kết (2) là các đoạn liên kết peptit, và

mỗi n và m độc lập là 0 hoặc 1

3. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó biến thể IL-2 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 6.

4. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó đoạn của CD80 bao gồm các axit amin từ axit amin thứ 35 đến axit amin thứ 242 trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 11.

5. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó đime protein dung hợp gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 9.

6. Phương pháp nuôi cấy tế bào diệt tự nhiên, bao gồm các bước:

nuôi cấy tế bào diệt tự nhiên phân lập được mà không có tế bào CD3+ hoặc tế bào CD56- với sự có mặt của đime protein dung hợp bao gồm IL-2 hoặc biến thể của nó và CD80 hoặc đoạn của nó,

trong đó biến thể protein IL-2 bao gồm thay thế axit amin thứ 38 và axit amin thứ 42 trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 10,

trong đó đoạn protein CD80 bao gồm miền ngoại bào của CD80,

trong đó tế bào diệt tự nhiên phân lập được là tế bào diệt tự nhiên CD3-CD56+.

7. Phương pháp theo điểm 6, trong đó dime protein dung hợp được xử lý ở nồng độ nằm trong khoảng từ 1 nM đến 500 nM.

8. Phương pháp theo điểm 6, trong đó thời gian nuôi cấy ở bước nuôi cấy là từ 5 ngày đến 25 ngày.

9. Phương pháp theo điểm 6, trong đó dime protein dung hợp gồm công thức cấu trúc (I) hoặc (II) sau:

$N'-X-[\text{đoạn liên kết (1)}]_n\text{-miền Fc-}[\text{đoạn liên kết (2)}]_m\text{-Y-C'}$ - công thức (I)

$N'-Y-[\text{đoạn liên kết (1)}]_n\text{-miền Fc-}[\text{đoạn liên kết (2)}]_m\text{-X-C'}$ - công thức (II),

trong đó, N' là đầu tận cùng N của protein dung hợp,

C' là đầu tận cùng C của protein dung hợp,

X là protein CD80 hoặc đoạn của nó,

Y là protein IL-2 hoặc biến thể của nó,

đoạn liên kết (1) và đoạn liên kết (2) là các đoạn liên kết peptit, và

mỗi n và m độc lập là 0 hoặc 1.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> GI Cell, Inc.
 <120> CHẾ PHẨM VÀ PHƯƠNG PHÁP NUÔI CẤY TẾ BÀO DIỆT TỰ NHIÊN
 <130> SPO20-036-PCT-GIC
 <150> KR 10-2019-0149779
 <151> 2019-11-20
 <150> KR 10-2020-0015802
 <151> 2020-02-10
 <160> 46
 <170> KopatentIn 3.0
 <210> 1
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> peptit tín hiệu (TPA)
 <400> 1
 Met Asp Ala Met Leu Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly
 1 5 10 15
 Ala Val Phe Val Ser Pro Ser His Ala
 20 25
 <210> 2
 <211> 208
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> hB7-1:35-242
 <400> 2
 Val Ile His Val Thr Lys Glu Val Lys Glu Val Ala Thr Leu Ser Cys
 1 5 10 15
 Gly His Asn Val Ser Val Glu Glu Leu Ala Gln Thr Arg Ile Tyr Trp
 20 25 30
 Gln Lys Glu Lys Lys Met Val Leu Thr Met Met Ser Gly Asp Met Asn
 35 40 45
 Ile Trp Pro Glu Tyr Lys Asn Arg Thr Ile Phe Asp Ile Thr Asn Asn
 50 55 60
 Leu Ser Ile Val Ile Leu Ala Leu Arg Pro Ser Asp Glu Gly Thr Tyr
 65 70 75 80
 Glu Cys Val Val Leu Lys Tyr Glu Lys Asp Ala Phe Lys Arg Glu His
 85 90 95
 Leu Ala Glu Val Thr Leu Ser Val Lys Ala Asp Phe Pro Thr Pro Ser
 100 105 110

Ile Ser Asp Phe Glu Ile Pro Thr Ser Asn Ile Arg Arg Ile Ile Cys
 115 120 125

Ser Thr Ser Gly Gly Phe Pro Glu Pro His Leu Ser Trp Leu Glu Asn
 130 135 140

Gly Glu Glu Leu Asn Ala Ile Asn Thr Thr Val Ser Gln Asp Pro Glu
 145 150 155 160

Thr Glu Leu Tyr Ala Val Ser Ser Lys Leu Asp Phe Asn Met Thr Thr
 165 170 175

Asn His Ser Phe Met Cys Leu Ile Lys Tyr Gly His Leu Arg Val Asn
 180 185 190

Gln Thr Phe Asn Trp Asn Thr Thr Lys Gln Glu His Phe Pro Asp Asn
 195 200 205

<210> 3
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> vùng bản lề liên hợp với đoạn liên kết

<400> 3
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Ala Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro
 20 25 30

<210> 4
 <211> 216
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> fc globulin miễn dịch

<400> 4
 Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 1 5 10 15

Pro Lys Asp Gln Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 20 25 30

Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr
 35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 50 55 60

Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 85 90 95
 Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 100 105 110
 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met
 115 120 125
 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 130 135 140
 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 145 150 155 160
 Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 165 170 175
 Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val
 180 185 190
 Phe Ser Cys Ser Val Leu His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 195 200 205
 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
 210 215

<210> 5
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn liên kết

<400> 5
 Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5

<210> 6
 <211> 133
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> hIL-2M

<400> 6
 Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
 1 5 10 15
 Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
 20 25 30
 Asn Pro Lys Leu Thr Ala Met Leu Thr Ala Lys Phe Tyr Met Pro Lys
 35 40 45
 Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
 50 55 60

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

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

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

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

Ile Ser Thr Leu Thr
130

<210> 7

<211> 617

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> protein dung hợp chứa các biến thể IL-2 và các đoạn CD80

<400> 7

Met Asp Ala Met Leu Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly
1 5 10 15

Ala Val Phe Val Ser Pro Ser His Ala Val Ile His Val Thr Lys Glu
20 25 30

Val Lys Glu Val Ala Thr Leu Ser Cys Gly His Asn Val Ser Val Glu
35 40 45

Glu Leu Ala Gln Thr Arg Ile Tyr Trp Gln Lys Glu Lys Lys Met Val
50 55 60

Leu Thr Met Met Ser Gly Asp Met Asn Ile Trp Pro Glu Tyr Lys Asn
65 70 75 80

Arg Thr Ile Phe Asp Ile Thr Asn Asn Leu Ser Ile Val Ile Leu Ala
85 90 95

Leu Arg Pro Ser Asp Glu Gly Thr Tyr Glu Cys Val Val Leu Lys Tyr
100 105 110

Glu Lys Asp Ala Phe Lys Arg Glu His Leu Ala Glu Val Thr Leu Ser
115 120 125

Val Lys Ala Asp Phe Pro Thr Pro Ser Ile Ser Asp Phe Glu Ile Pro
130 135 140

Thr Ser Asn Ile Arg Arg Ile Ile Cys Ser Thr Ser Gly Gly Phe Pro
145 150 155 160

Glu Pro His Leu Ser Trp Leu Glu Asn Gly Glu Glu Leu Asn Ala Ile
165 170 175

Asn Thr Thr Val Ser Gln Asp Pro Glu Thr Glu Leu Tyr Ala Val Ser
180 185 190

Ser Lys Leu Asp Phe Asn Met Thr Thr Asn His Ser Phe Met Cys Leu
195 200 205

Ile Lys Tyr Gly His Leu Arg Val Asn Gln Thr Phe Asn Trp Asn Thr
 210 215 220
 Thr Lys Gln Glu His Phe Pro Asp Asn Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 225 230 235 240
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Glu Ser Lys Tyr Gly
 245 250 255
 Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser
 260 265 270
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Gln Leu Met Ile Ser Arg
 275 280 285
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro
 290 295 300
 Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 305 310 315 320
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 325 330 335
 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 340 345 350
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr
 355 360 365
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 370 375 380
 Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 385 390 395 400
 Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 405 410 415
 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 420 425 430
 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser
 435 440 445
 Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Leu His Glu Ala
 450 455 460
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Gly
 465 470 475 480
 Gly Gly Gly Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu
 485 490 495
 Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile
 500 505 510
 Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Ala Met Leu Thr Ala Lys Phe
 515 520 525
 Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu
 530 535 540

Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys
545 550 555 560

Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile
565 570 575

Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala
580 585 590

Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe
595 600 605

Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr
610 615

<210> 8
<211> 1857
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> các nucleotit mã hóa protein dung hợp (GI101)

<400> 8
atggatgcta tgctgagagg cctgtgttgc gtgctgctgc tgtgtggcgc tgtgttcgtg 60
tctccttctc acgctgtgat ccacgtgacc aaagaagtga aagaggtcgc cacactgtcc 120
tgccggccaca acgtttcagt ggaagaactg gccagacca ggatctactg gcagaaagaa 180
aagaaaatgg tgctgaccat gatgtccggc gacatgaaca tctggcctga gtacaagaac 240
cggaccatct tcgacatcac caacaacctg tccatcgtga ttctggccct gaggccttct 300
gatgagggca cctatgagtg cgtggtgctg aagtacgaga aggacgcctt caagcgcgag 360
cacctggctg aagtgacact gtccgtgaag gccgactttc ccacaccttc catctccgac 420
ttcgagatcc ctacctcaa catccggcgg atcatctgtt ctacctctgg cggctttcct 480
gagcctcacc tgtcttggct ggaaaacggc gaggaactga acgccatcaa caccaccgtg 540
tctcaggacc ccgaaaaccga gctgtacgct gtgtcctcca agctggactt caacatgacc 600
accaaccaca gcttcatgtg cctgattaag tacggccacc tgagagtga ccagaccttc 660
aactggaaca ccaccaagca agagcacttc cctgacaatg gatctggcgg cggaggttct 720
ggcggaggtg gaagcggagg cggaggatct gctgagtcta agtatggccc tccttgtcct 780
ccatgtcctg ctccagaagc tgctggcggc cctctgtgt tcctgtttcc tccaaagcct 840
aaggaccagc tcatgatctc tcggacaccc gaagtacct gcgtgggtgg ggatgtgtct 900
caagaggacc ctgaggtgca gttcaattgg tacgtggacg gcgtggaagt gcacaacgcc 960
aagaccaagc ctagagagga acagttcaac tccacctaca gagtgggtgc cgtgctgacc 1020
gtgctgcacc aggattggct gaacggcaaa gagtacaagt gcaaggtgtc caacaagggc 1080
ctgccttcca gcatcga aaa gaccatctcc aaggctaagg gccagcctag ggaacccag 1140

gtttacaccc tgcctccaag ccaagaggaa atgaccaaga accaggtgtc cctgacctgc 1200
 ctggtcaagg gcttctaccc ttccgacatt gccgtggaat gggagtccaa tggccagcct 1260
 gagaacaact acaagaccac acctcctgtg ctggactccg acggctcctt ctttctgtac 1320
 tctcgcctga ccgtggacaa gtctagatgg caagagggca acgtgttctc ctgctctgtg 1380
 ctgcacgagg cctgcacaa tcactacacc cagaagtccc tgtctctgtc tcttgagggt 1440
 ggtggcggtt ctgccctac cagctcctct accaagaaaa ccagctcca gttggagcat 1500
 ctgctgctgg acctccagat gattctgaac gggatcaaca actataagaa cccaagctg 1560
 accgccatgc tgaccgctaa gttctacatg cccaagaagg ccaccgagct gaagcacctc 1620
 cagtgcctgg aagaagaact gaagcccctg gaagaggtgc tgaatctggc ccagtccaag 1680
 aacttccacc tgaggccacg ggacctgac agcaacatca acgtgatcgt gctggaactg 1740
 aagggctccg agacaacctt tatgtgctgag tacgccgacg agacagccac catcgtggaa 1800
 tttctgaacc ggtggatcac cttctgccag agcatcatct ccacactgac ctgatga 1857

<210> 9
 <211> 592
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> protein dung hợp (GI101)

<400> 9
 Val Ile His Val Thr Lys Glu Val Lys Glu Val Ala Thr Leu Ser Cys
 1 5 10 15
 Gly His Asn Val Ser Val Glu Glu Leu Ala Gln Thr Arg Ile Tyr Trp
 20 25 30
 Gln Lys Glu Lys Lys Met Val Leu Thr Met Met Ser Gly Asp Met Asn
 35 40 45
 Ile Trp Pro Glu Tyr Lys Asn Arg Thr Ile Phe Asp Ile Thr Asn Asn
 50 55 60
 Leu Ser Ile Val Ile Leu Ala Leu Arg Pro Ser Asp Glu Gly Thr Tyr
 65 70 75 80
 Glu Cys Val Val Leu Lys Tyr Glu Lys Asp Ala Phe Lys Arg Glu His
 85 90 95
 Leu Ala Glu Val Thr Leu Ser Val Lys Ala Asp Phe Pro Thr Pro Ser
 100 105 110
 Ile Ser Asp Phe Glu Ile Pro Thr Ser Asn Ile Arg Arg Ile Ile Cys
 115 120 125
 Ser Thr Ser Gly Gly Phe Pro Glu Pro His Leu Ser Trp Leu Glu Asn
 130 135 140
 Gly Glu Glu Leu Asn Ala Ile Asn Thr Thr Val Ser Gln Asp Pro Glu
 145 150 155 160

Thr Glu Leu Tyr Ala Val Ser Ser Lys Leu Asp Phe Asn Met Thr Thr
 165 170 175
 Asn His Ser Phe Met Cys Leu Ile Lys Tyr Gly His Leu Arg Val Asn
 180 185 190
 Gln Thr Phe Asn Trp Asn Thr Thr Lys Gln Glu His Phe Pro Asp Asn
 195 200 205
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 210 215 220
 Ser Ala Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 225 230 235 240
 Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 245 250 255
 Asp Gln Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 260 265 270
 Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 275 280 285
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
 290 295 300
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 305 310 315 320
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
 325 330 335
 Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 340 345 350
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
 355 360 365
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 370 375 380
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 385 390 395 400
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 405 410 415
 Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
 420 425 430
 Cys Ser Val Leu His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 435 440 445
 Leu Ser Leu Ser Leu Gly Gly Gly Gly Gly Ser Ala Pro Thr Ser Ser
 450 455 460
 Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu
 465 470 475 480
 Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr
 485 490 495

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

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

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

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

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

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

<210> 10
<211> 133
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> hIL-2

<400> 10
Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

Ile Ser Thr Leu Thr
130

<210> 11
<211> 288
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> CD80

<400> 11
 Met Gly His Thr Arg Arg Gln Gly Thr Ser Pro Ser Lys Cys Pro Tyr
 1 5 10 15
 Leu Asn Phe Phe Gln Leu Leu Val Leu Ala Gly Leu Ser His Phe Cys
 20 25 30
 Ser Gly Val Ile His Val Thr Lys Glu Val Lys Glu Val Ala Thr Leu
 35 40 45
 Ser Cys Gly His Asn Val Ser Val Glu Glu Leu Ala Gln Thr Arg Ile
 50 55 60
 Tyr Trp Gln Lys Glu Lys Lys Met Val Leu Thr Met Met Ser Gly Asp
 65 70 75 80
 Met Asn Ile Trp Pro Glu Tyr Lys Asn Arg Thr Ile Phe Asp Ile Thr
 85 90 95
 Asn Asn Leu Ser Ile Val Ile Leu Ala Leu Arg Pro Ser Asp Glu Gly
 100 105 110
 Thr Tyr Glu Cys Val Val Leu Lys Tyr Glu Lys Asp Ala Phe Lys Arg
 115 120 125
 Glu His Leu Ala Glu Val Thr Leu Ser Val Lys Ala Asp Phe Pro Thr
 130 135 140
 Pro Ser Ile Ser Asp Phe Glu Ile Pro Thr Ser Asn Ile Arg Arg Ile
 145 150 155 160
 Ile Cys Ser Thr Ser Gly Gly Phe Pro Glu Pro His Leu Ser Trp Leu
 165 170 175
 Glu Asn Gly Glu Glu Leu Asn Ala Ile Asn Thr Thr Val Ser Gln Asp
 180 185 190
 Pro Glu Thr Glu Leu Tyr Ala Val Ser Ser Lys Leu Asp Phe Asn Met
 195 200 205
 Thr Thr Asn His Ser Phe Met Cys Leu Ile Lys Tyr Gly His Leu Arg
 210 215 220
 Val Asn Gln Thr Phe Asn Trp Asn Thr Thr Lys Gln Glu His Phe Pro
 225 230 235 240
 Asp Asn Leu Leu Pro Ser Trp Ala Ile Thr Leu Ile Ser Val Asn Gly
 245 250 255
 Ile Phe Val Ile Cys Cys Leu Thr Tyr Cys Phe Ala Pro Arg Cys Arg
 260 265 270
 Glu Arg Arg Arg Asn Glu Arg Leu Arg Arg Glu Ser Val Arg Pro Val
 275 280 285

<210> 12
 <211> 215

<212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Fc điều hòa

<400> 12
 Ser His Thr Gln Pro Leu Gly Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 1 5 10 15
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 20 25 30
 Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 35 40 45
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
 50 55 60
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 65 70 75 80
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
 85 90 95
 Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 100 105 110
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
 115 120 125
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 130 135 140
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 145 150 155 160
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 165 170 175
 Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
 180 185 190
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 195 200 205
 Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 210 215

<210> 13
 <211> 306
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> mCD80

<400> 13
 Met Ala Cys Asn Cys Gln Leu Met Gln Asp Thr Pro Leu Leu Lys Phe
 1 5 10 15

Pro Cys Pro Arg Leu Ile Leu Leu Phe Val Leu Leu Ile Arg Leu Ser
 20 25 30
 Gln Val Ser Ser Asp Val Asp Glu Gln Leu Ser Lys Ser Val Lys Asp
 35 40 45
 Lys Val Leu Leu Pro Cys Arg Tyr Asn Ser Pro His Glu Asp Glu Ser
 50 55 60
 Glu Asp Arg Ile Tyr Trp Gln Lys His Asp Lys Val Val Leu Ser Val
 65 70 75 80
 Ile Ala Gly Lys Leu Lys Val Trp Pro Glu Tyr Lys Asn Arg Thr Leu
 85 90 95
 Tyr Asp Asn Thr Thr Tyr Ser Leu Ile Ile Leu Gly Leu Val Leu Ser
 100 105 110
 Asp Arg Gly Thr Tyr Ser Cys Val Val Gln Lys Lys Glu Arg Gly Thr
 115 120 125
 Tyr Glu Val Lys His Leu Ala Leu Val Lys Leu Ser Ile Lys Ala Asp
 130 135 140
 Phe Ser Thr Pro Asn Ile Thr Glu Ser Gly Asn Pro Ser Ala Asp Thr
 145 150 155 160
 Lys Arg Ile Thr Cys Phe Ala Ser Gly Gly Phe Pro Lys Pro Arg Phe
 165 170 175
 Ser Trp Leu Glu Asn Gly Arg Glu Leu Pro Gly Ile Asn Thr Thr Ile
 180 185 190
 Ser Gln Asp Pro Glu Ser Glu Leu Tyr Thr Ile Ser Ser Gln Leu Asp
 195 200 205
 Phe Asn Thr Thr Arg Asn His Thr Ile Lys Cys Leu Ile Lys Tyr Gly
 210 215 220
 Asp Ala His Val Ser Glu Asp Phe Thr Trp Glu Lys Pro Pro Glu Asp
 225 230 235 240
 Pro Pro Asp Ser Lys Asn Thr Leu Val Leu Phe Gly Ala Gly Phe Gly
 245 250 255
 Ala Val Ile Thr Val Val Val Ile Val Val Ile Ile Lys Cys Phe Cys
 260 265 270
 Lys His Arg Ser Cys Phe Arg Arg Asn Glu Ala Ser Arg Glu Thr Asn
 275 280 285
 Asn Ser Leu Thr Phe Gly Pro Glu Glu Ala Leu Ala Glu Gln Thr Val
 290 295 300
 Phe Leu
 305

<210> 14
 <211> 1848
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>

<223> các nucleotit mã hóa protein dung hợp (mGI101)

<400> 14

atggatgcta tgctgagagg cctgtgttgc gtgctgctgc tgtgtggcgc tgtgttcgtg	60
tctccttctc acgctgtgga cgagcagctc tccaagtccg tgaaggataa ggtcctgctg	120
ccttgccggt acaactctcc tcacgaggac gagtctgagg accggatcta ctggcagaaa	180
cacgacaagg tgggtgctgtc cgtgatcgcc ggaaagctga aagtgtggcc tgagtacaag	240
aacaggaccc tgtacgacaa caccacctac agcctgatca tcctgggcct cgtgotgagc	300
gatagaggca cctattcttg cgtggtgcag aagaaagagc ggggcaccta cgaagtgaag	360
cacctggctc tgggtcaagct gtccatcaag gccgacttca gcacccctaa catcaccgag	420
tctggcaacc ctccgccga caccaagaga atcacctgtt tcgcctctgg cggttccct	480
aagcctcgggt tctcttggct ggaaaacggc agagagctgc ccggcatcaa taccaccatt	540
tctcaggacc cagagtccga gctgtacacc atctccagcc agctcgactt taacaccacc	600
agaaaccaca ccatcaagtg cctgattaag tacggcgacg cccacgtgtc cgaggacttt	660
acttgggaga aacctctga ggacctctct gactctggat ctggcggcgg aggttctggc	720
ggaggtggaa gcggaggcgg aggatctgct gagtctaagt atggccctcc ttgtcctcca	780
tgtcctgctc cagaagctgc tggcggaccc tctgtgttcc tgtttcctcc aaagcctaag	840
gaccagctca tgatctctcg gaccttgaa gtgacctgcg tgggtggtgga tgtgtctcaa	900
gaggacctg aggtgcagtt caattggtac gtggacggcg tggaagtga caacgccaag	960
accaagccta gagaggaaca gttcaactcc acctatagag tgggtgtccgt gctgacctg	1020
ctgcaccagg attggctgaa cggcaaagag tacaagtga aggtgtccaa caagggcctg	1080
ccttccagca tcgaaaagac catcagcaag gctaagggcc agcctagggg accccaggtt	1140
tacacctgct ctccaagcca agaggaaatg accaagaacc aggtgtccct gacctgctg	1200
gtcaagggtc tctacccttc cgacattgcc gtggaatggg agtccaatgg ccagcctgag	1260
aacaactaca agaccacacc tcctgtgctg gactccgacg gctccttctt tctgtactct	1320
cgctgaccg tggacaagtc taggtggcaa gagggcaacg tgttctcctg ctctgtgctg	1380
cacgaggctc tgcacaacca ctacaccag aagtcctgt ctctgtctct tggaggtggt	1440
ggcgtttctg ccctacctc cagctctacc aagaaaacc agctccagtt ggagcatctg	1500
ctgctggacc tccagatgat cctgaatggc atcaacaatt acaagaacc caagctgacc	1560
gccatgctga ccgctaagtt ctacatgcc aagaaggcca ccgagctgaa gcacttgacg	1620
tgcttggaa aggaactgaa gccctggaa gaagtgtga atctggcca gtccaagaac	1680
ttccacctga ggctagggg cctgatctcc aacatcaacg tgatcgtgct ggaactgaaa	1740
ggctccgaga caaccttcat gtgcgagtac gccgacgaga cagccaccat cgtggaattt	1800

ctgaaccggt ggatcacctt ctgccagagc atcatctcca cactgacc

1848

<210> 15
 <211> 616
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> protein dung hợp (mGI101)

<400> 15
 Met Asp Ala Met Leu Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly
 1 5 10 15
 Ala Val Phe Val Ser Pro Ser His Ala Val Asp Glu Gln Leu Ser Lys
 20 25 30
 Ser Val Lys Asp Lys Val Leu Leu Pro Cys Arg Tyr Asn Ser Pro His
 35 40 45
 Glu Asp Glu Ser Glu Asp Arg Ile Tyr Trp Gln Lys His Asp Lys Val
 50 55 60
 Val Leu Ser Val Ile Ala Gly Lys Leu Lys Val Trp Pro Glu Tyr Lys
 65 70 75 80
 Asn Arg Thr Leu Tyr Asp Asn Thr Thr Tyr Ser Leu Ile Ile Leu Gly
 85 90 95
 Leu Val Leu Ser Asp Arg Gly Thr Tyr Ser Cys Val Val Gln Lys Lys
 100 105 110
 Glu Arg Gly Thr Tyr Glu Val Lys His Leu Ala Leu Val Lys Leu Ser
 115 120 125
 Ile Lys Ala Asp Phe Ser Thr Pro Asn Ile Thr Glu Ser Gly Asn Pro
 130 135 140
 Ser Ala Asp Thr Lys Arg Ile Thr Cys Phe Ala Ser Gly Gly Phe Pro
 145 150 155 160
 Lys Pro Arg Phe Ser Trp Leu Glu Asn Gly Arg Glu Leu Pro Gly Ile
 165 170 175
 Asn Thr Thr Ile Ser Gln Asp Pro Glu Ser Glu Leu Tyr Thr Ile Ser
 180 185 190
 Ser Gln Leu Asp Phe Asn Thr Thr Arg Asn His Thr Ile Lys Cys Leu
 195 200 205
 Ile Lys Tyr Gly Asp Ala His Val Ser Glu Asp Phe Thr Trp Glu Lys
 210 215 220
 Pro Pro Glu Asp Pro Pro Asp Ser Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 225

FIG. 1A

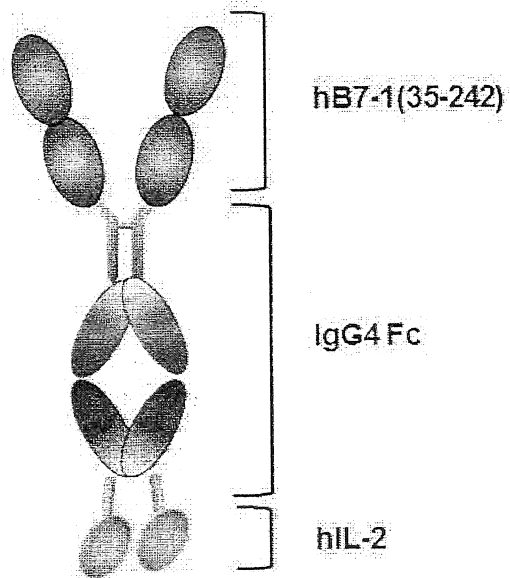


FIG. 1B

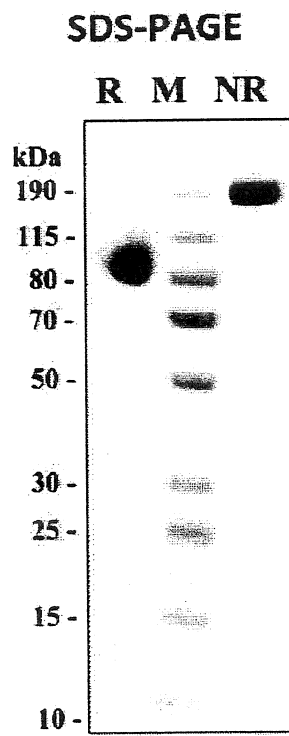


FIG. 1C

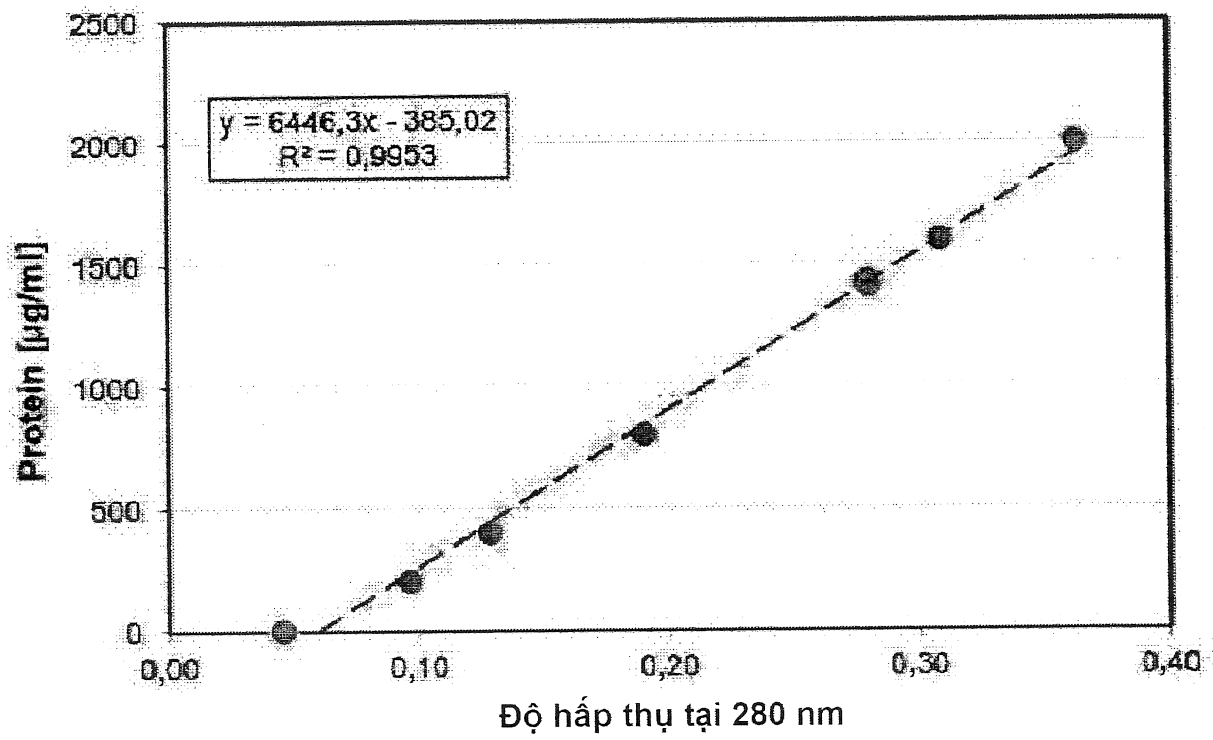


FIG. 1D

Sắc ký loại trừ kích thước phân tích (SEC)

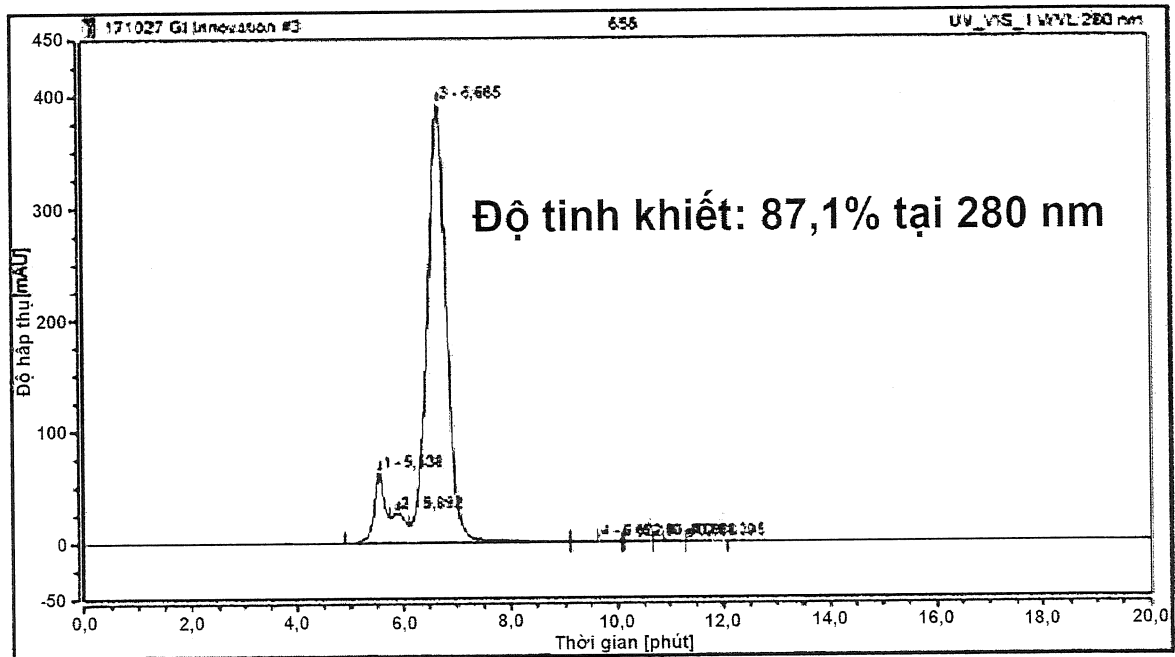
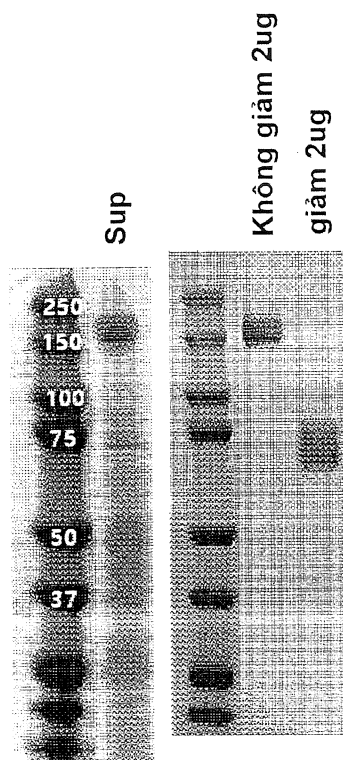
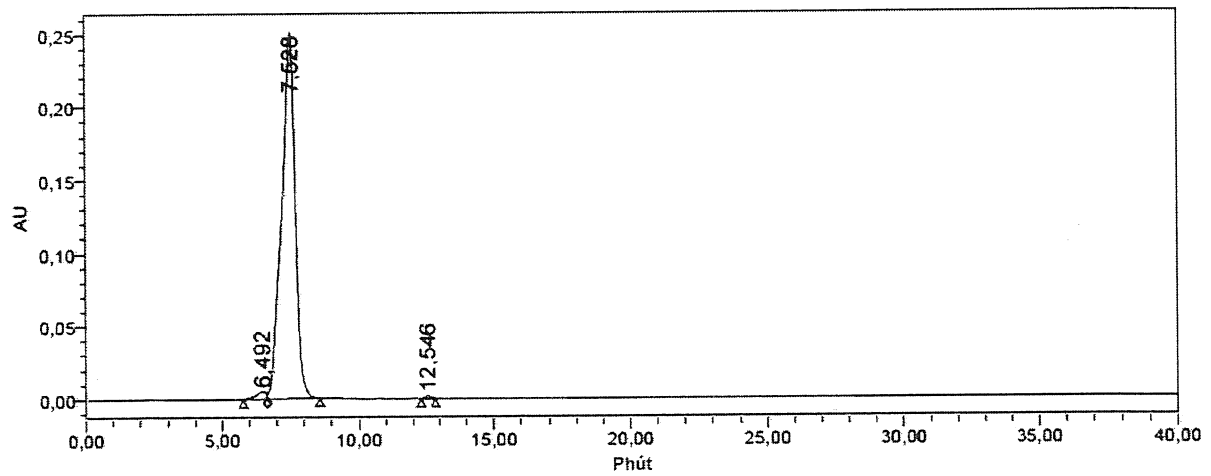


FIG. 2A



Kích thước Dự tính (kDa)
monome: 50,5
Đime : 101

FIG. 2B



	Nhiệt độ phòng	Vùng	% Vùng	Độ cao
1	6,492	143663	1,66	5185
2	7,528	8497629	98,06	250509
3	12,546	24077	0,28	2005

FIG. 3A

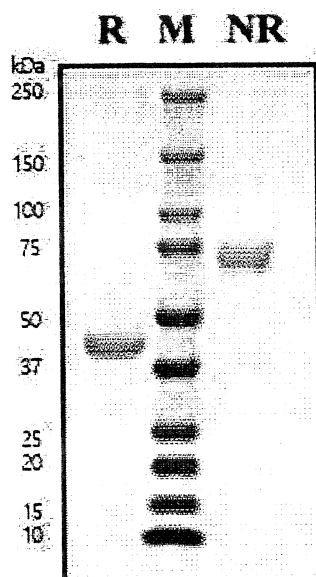
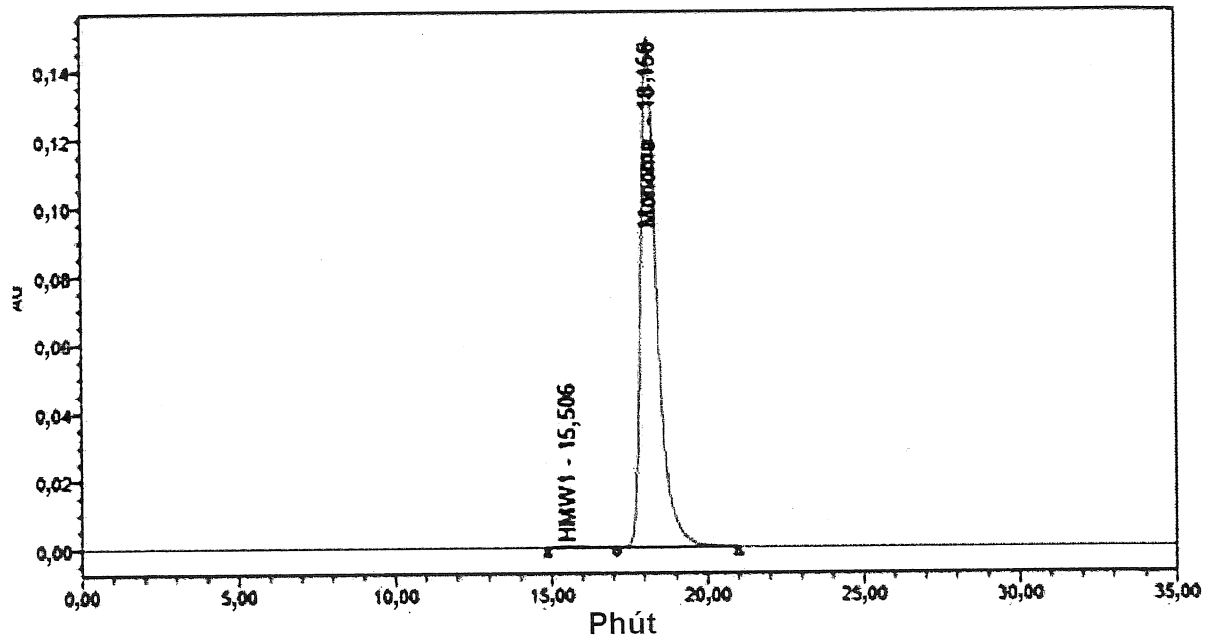
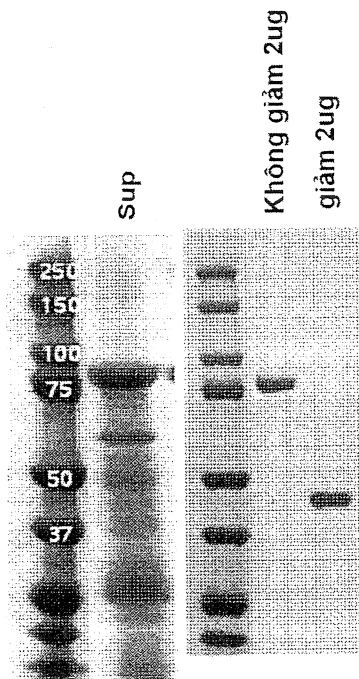


FIG. 3B



	Tên đỉnh	Nhiệt độ phòng	Vùng	% Vùng	Độ cao
1	HMW1	15,506	28137	0,52	426
2	Monome	18,158	5363386	99,48	148945

FIG. 3C

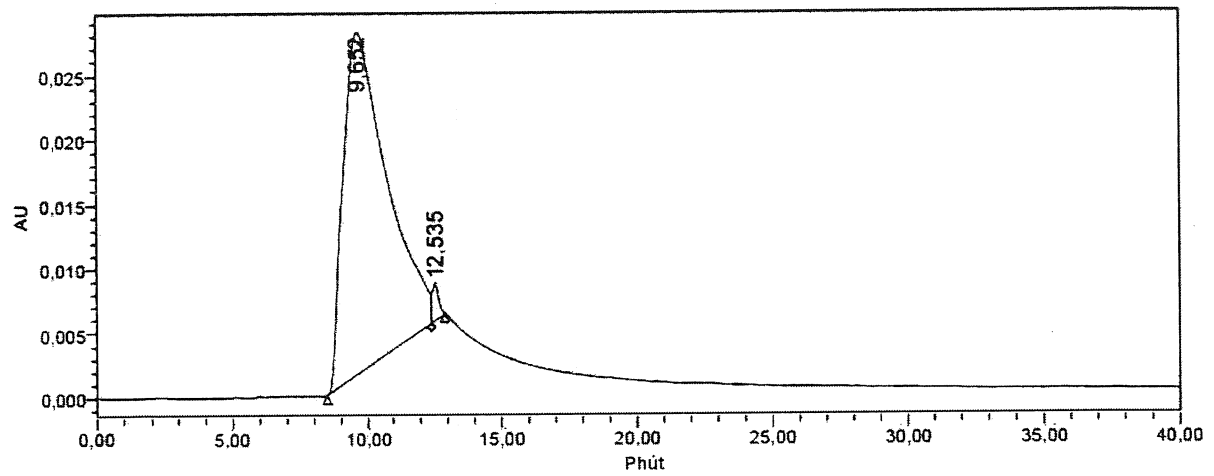


Kích thước dự tính (kDa)

monome: 41,3

Đime : 82,6

FIG. 3D



	Nhiệt độ phòng	Vùng	% Vùng	Độ cao
1	9,652	2996084	98,41	26478
2	12,535	48430	1,59	2882

FIG. 4A

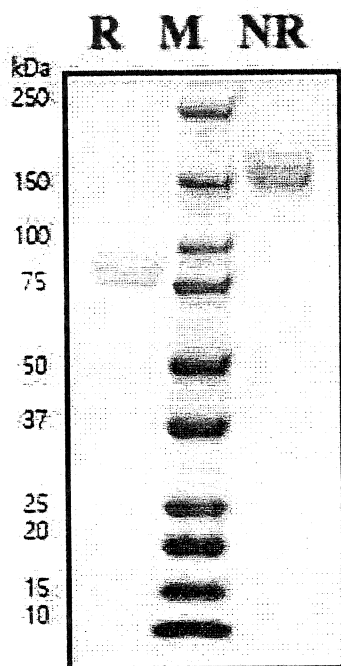
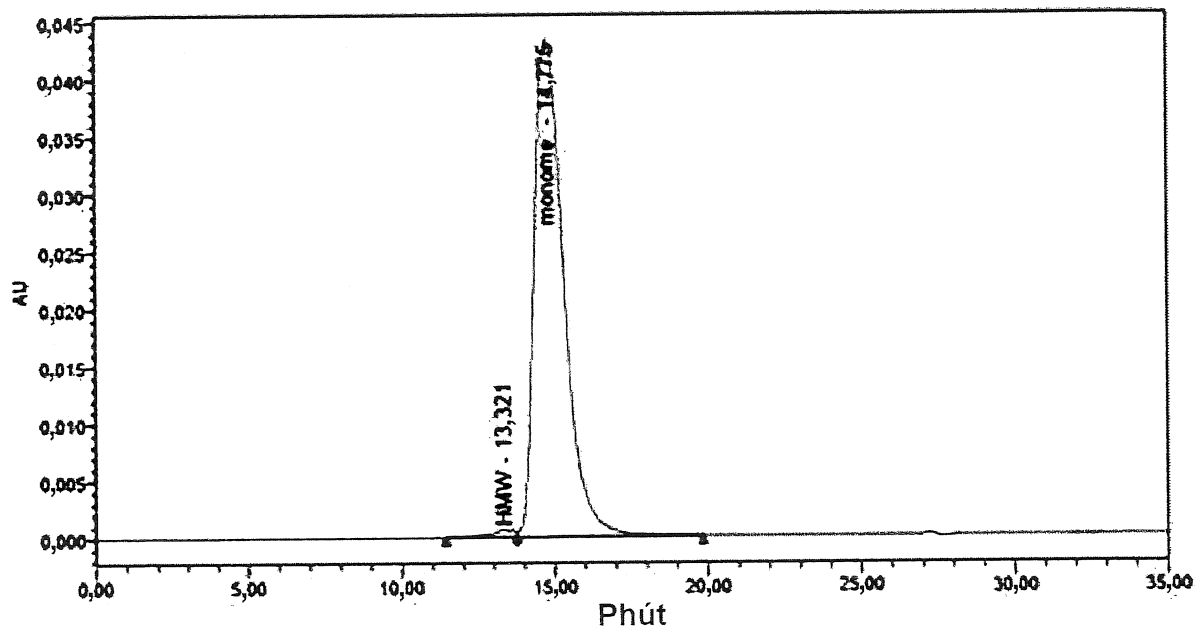


FIG. 4B



	Tên đỉnh	Nhiệt độ phòng	Vùng	% Vùng	Độ cao
1	HMW	13,321	33675	1,13	625
2	monome	14,775	2952831	98,87	43291

FIG. 5A

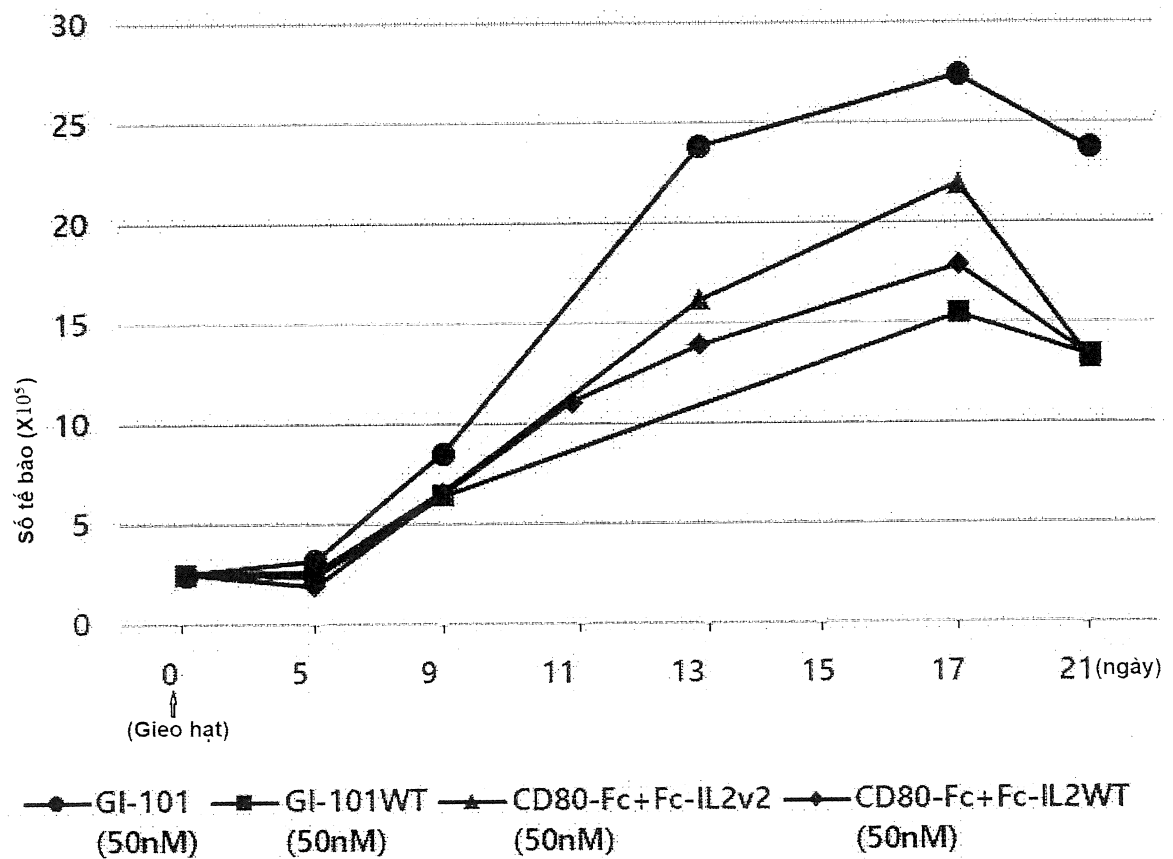


FIG. 5B

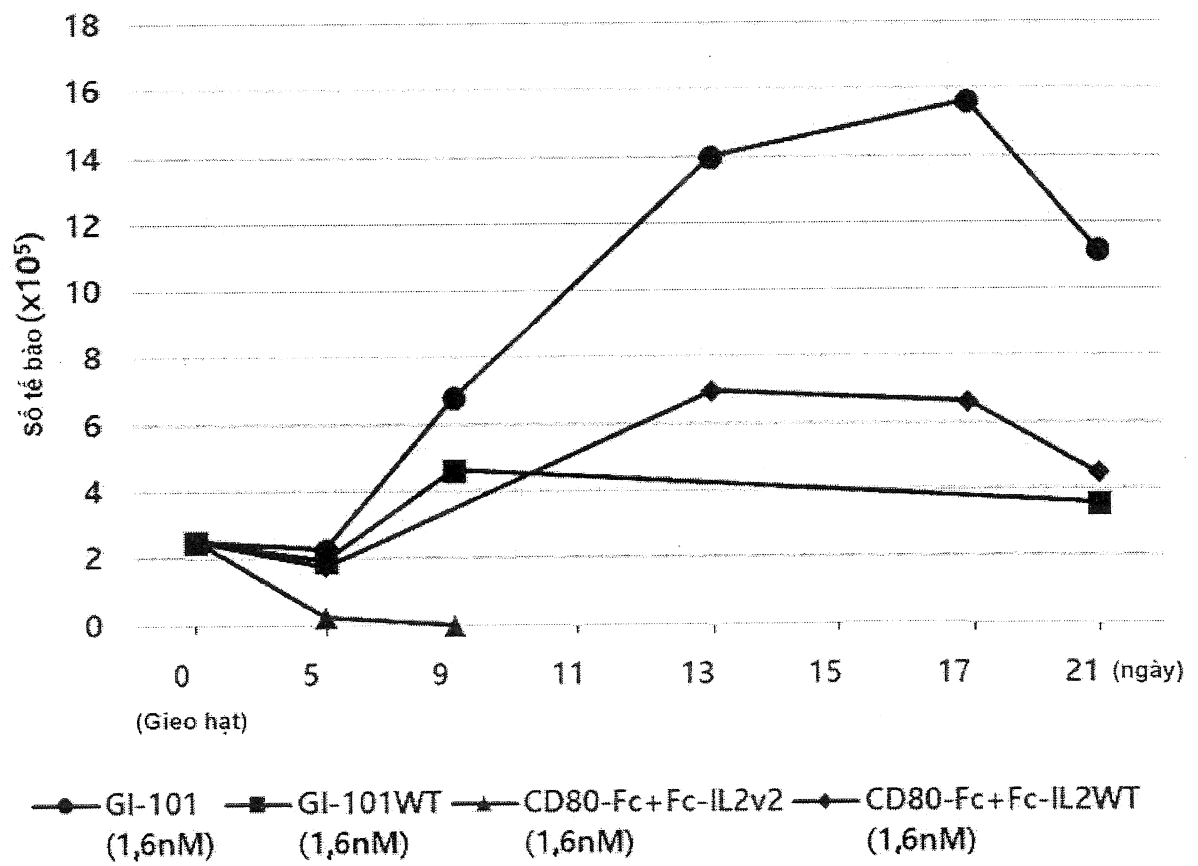


FIG. 6A

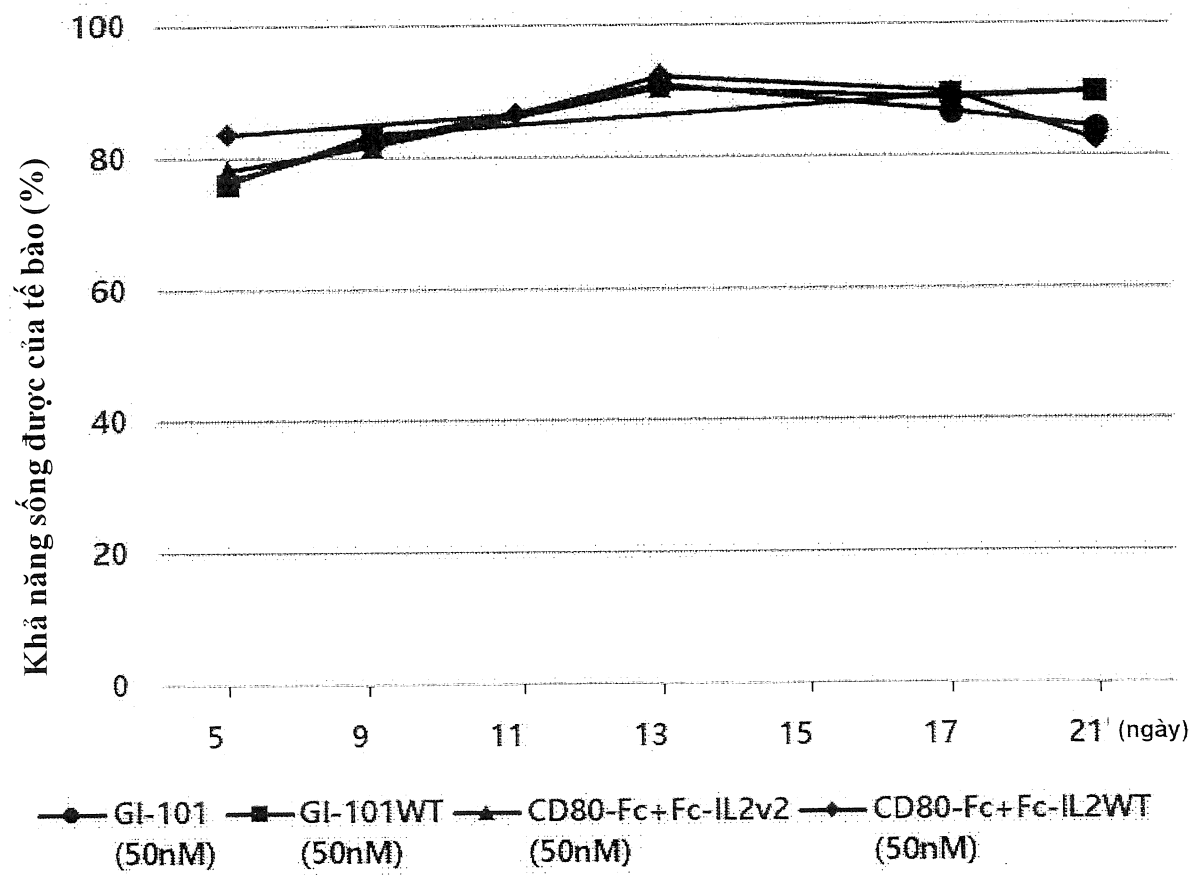


FIG. 6B

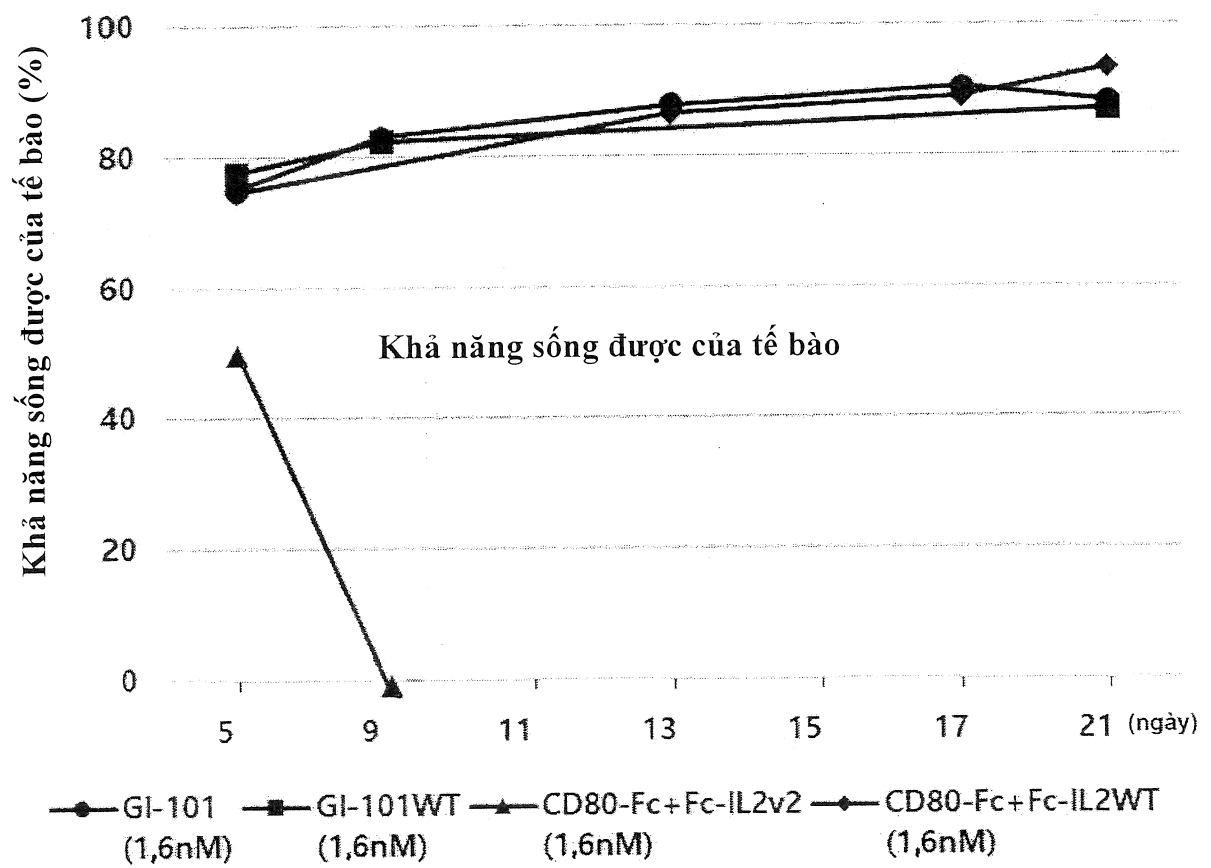


FIG. 7A

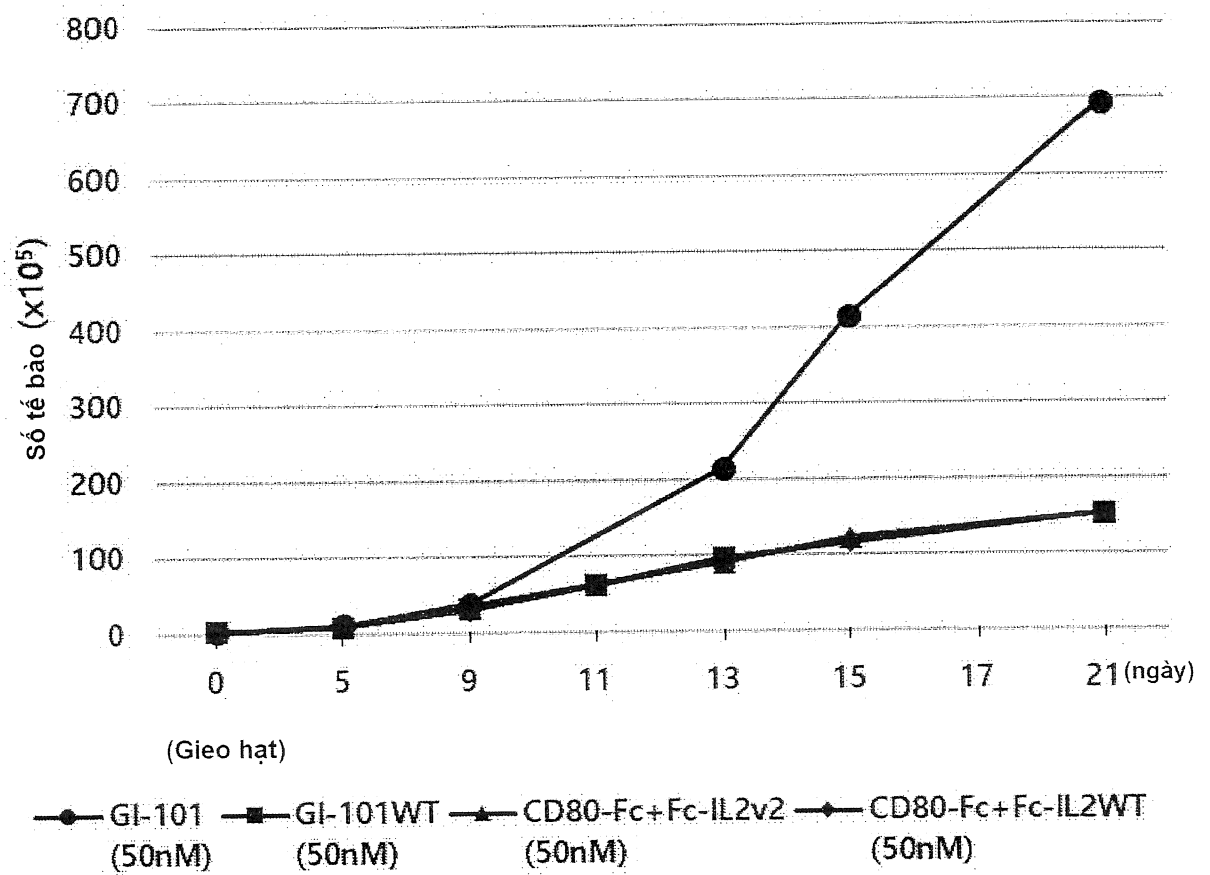


FIG. 7B

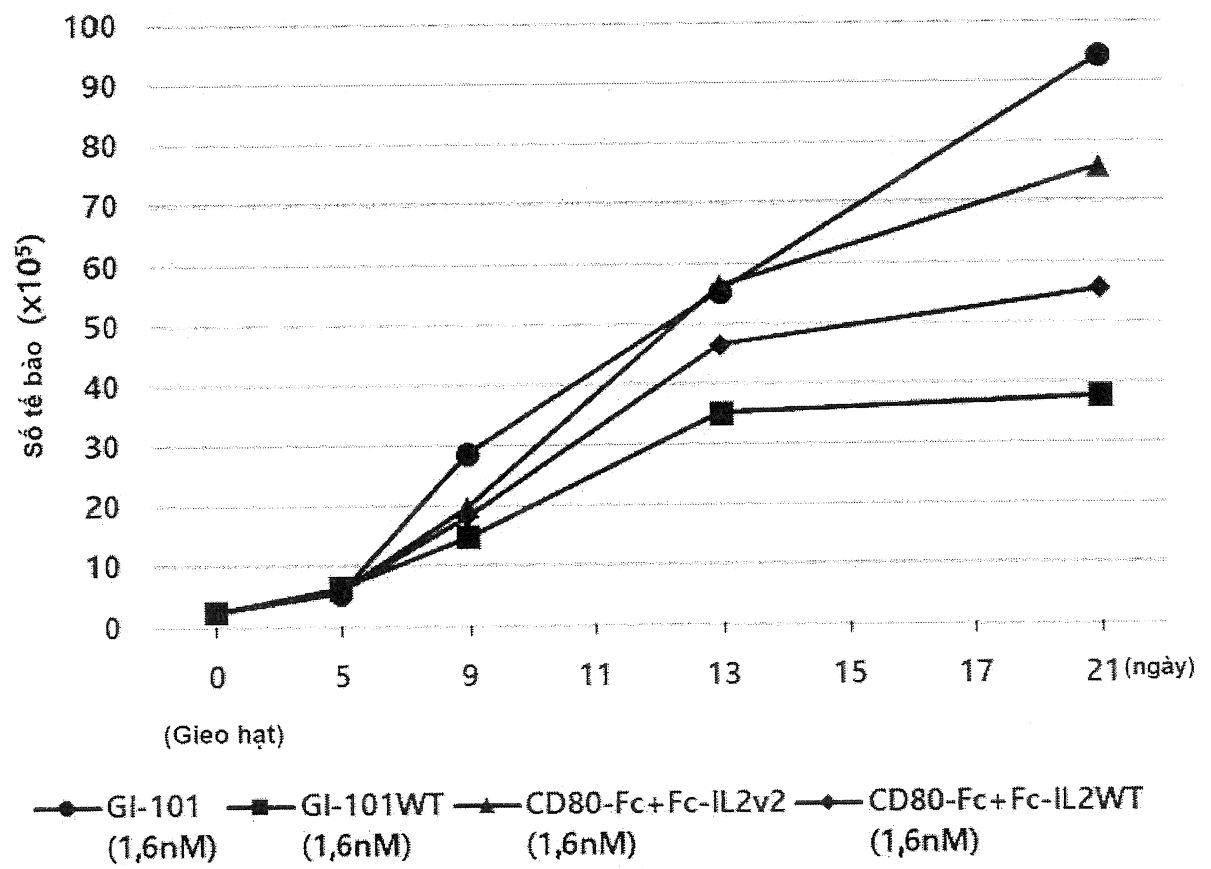


FIG. 8A

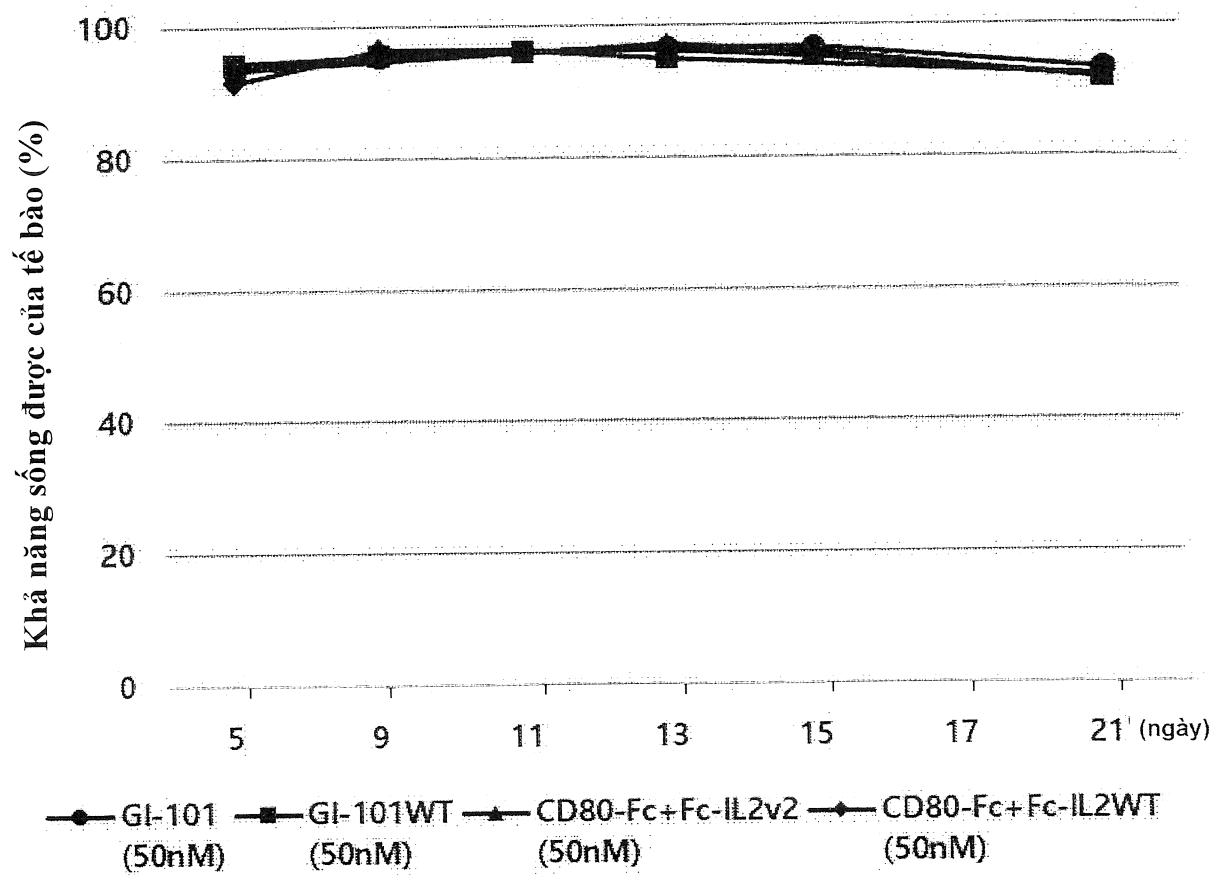


FIG. 8B

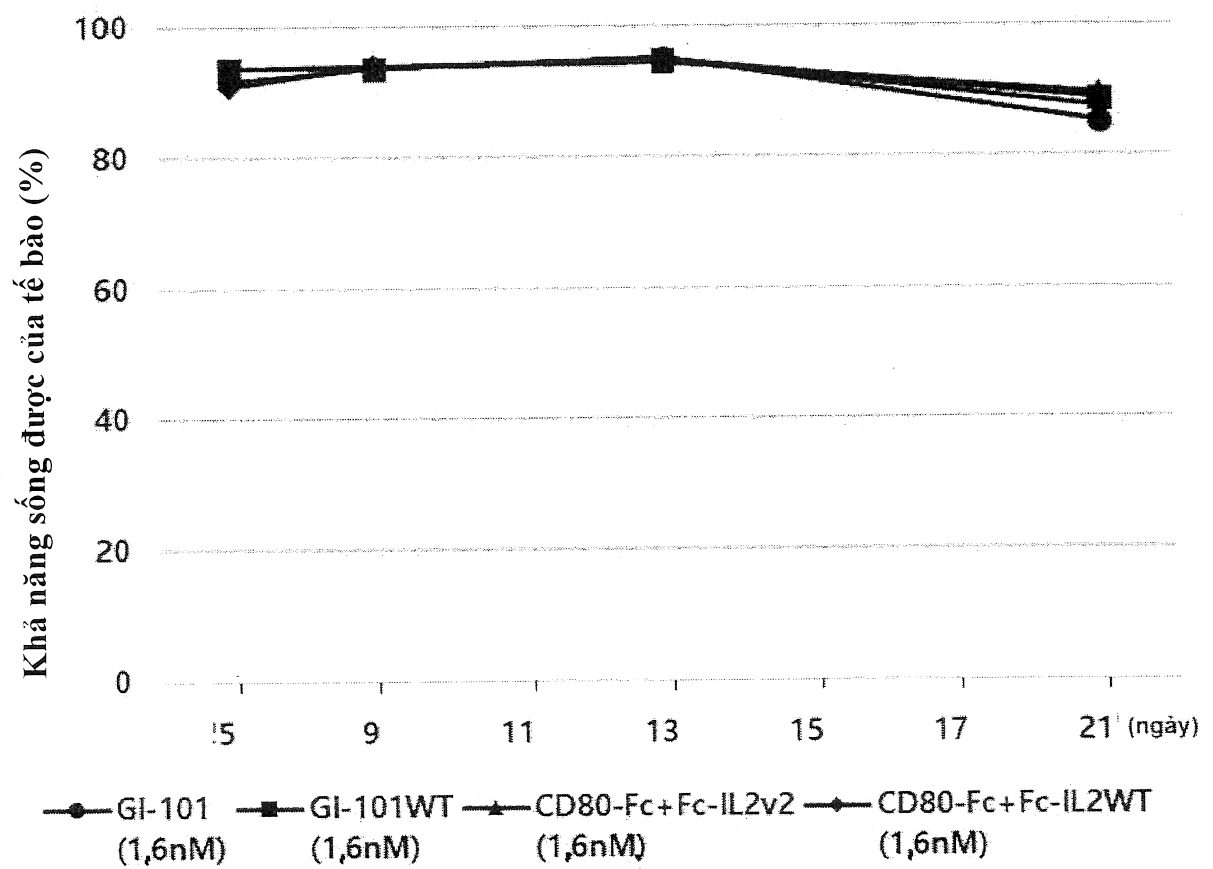


FIG. 9A

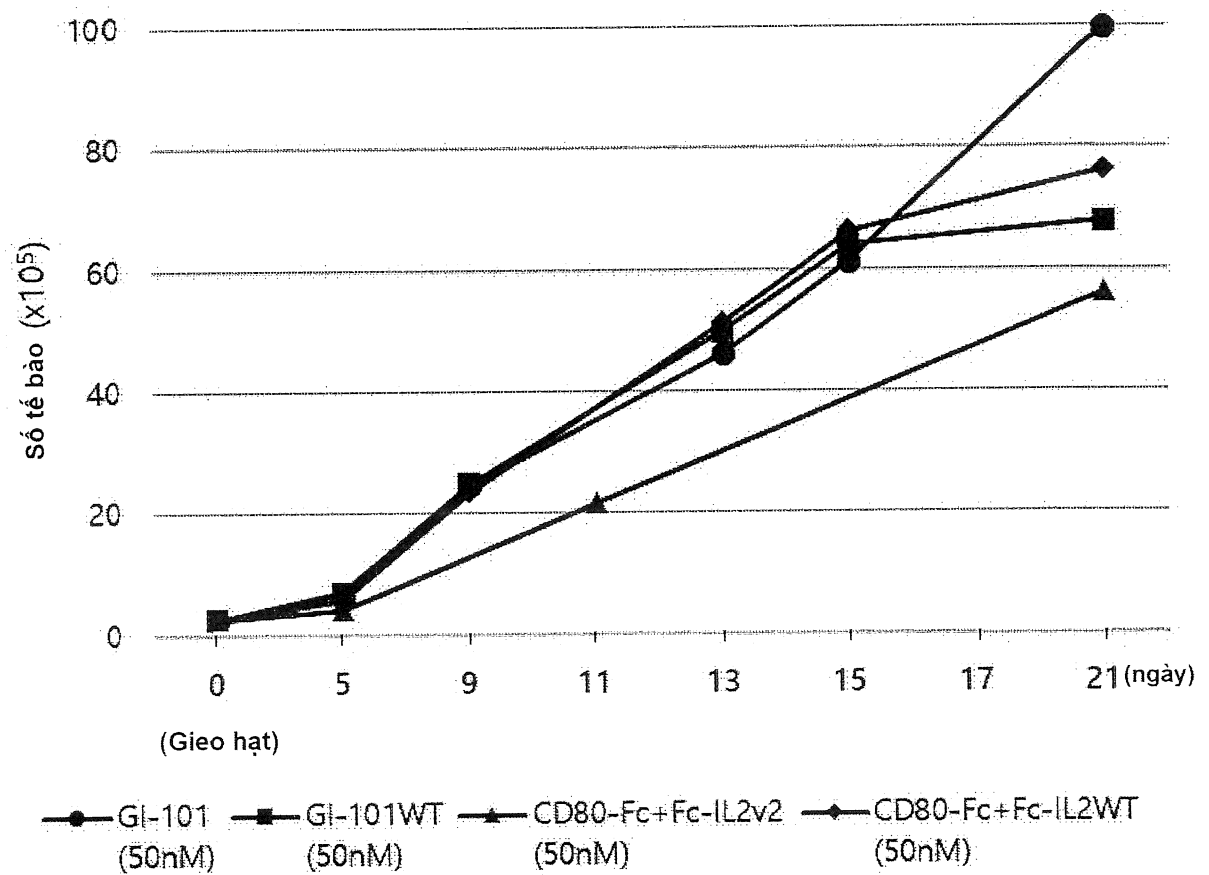


FIG. 9B

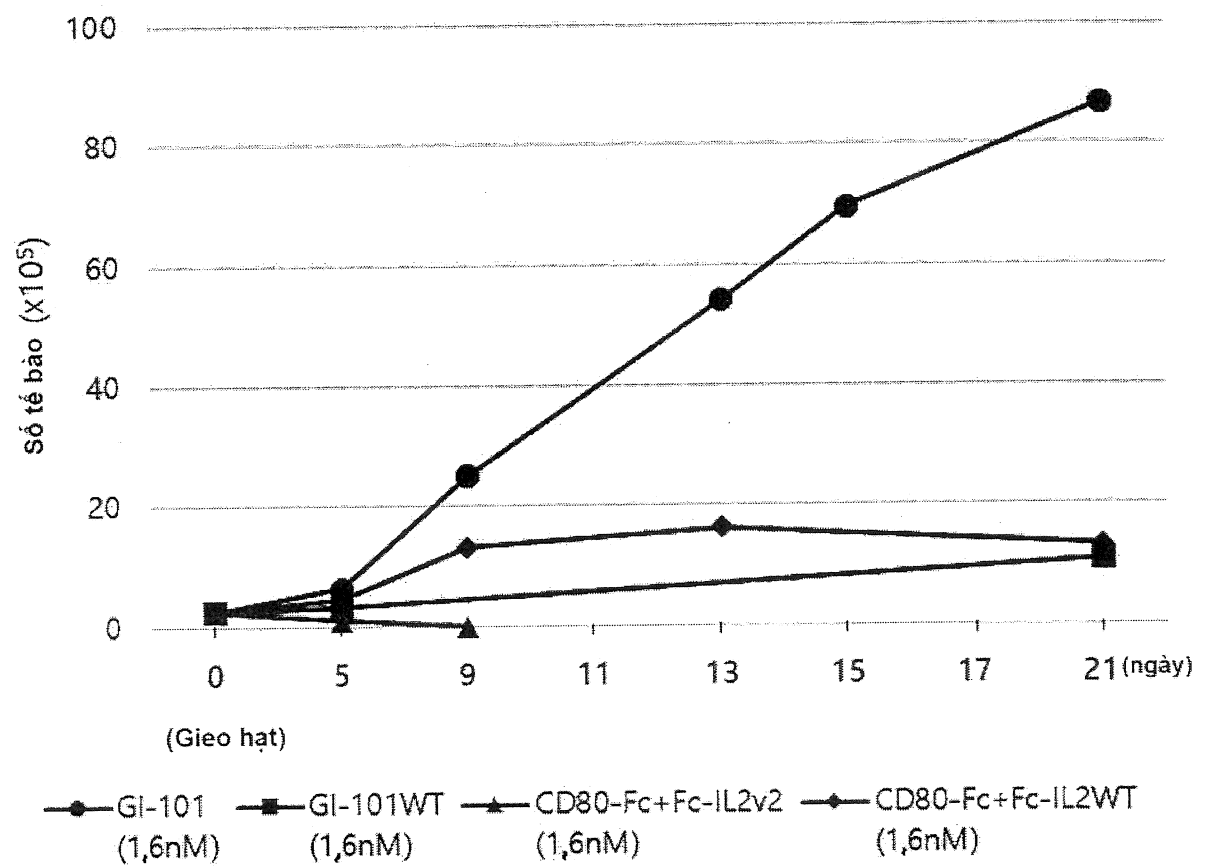


FIG. 10A

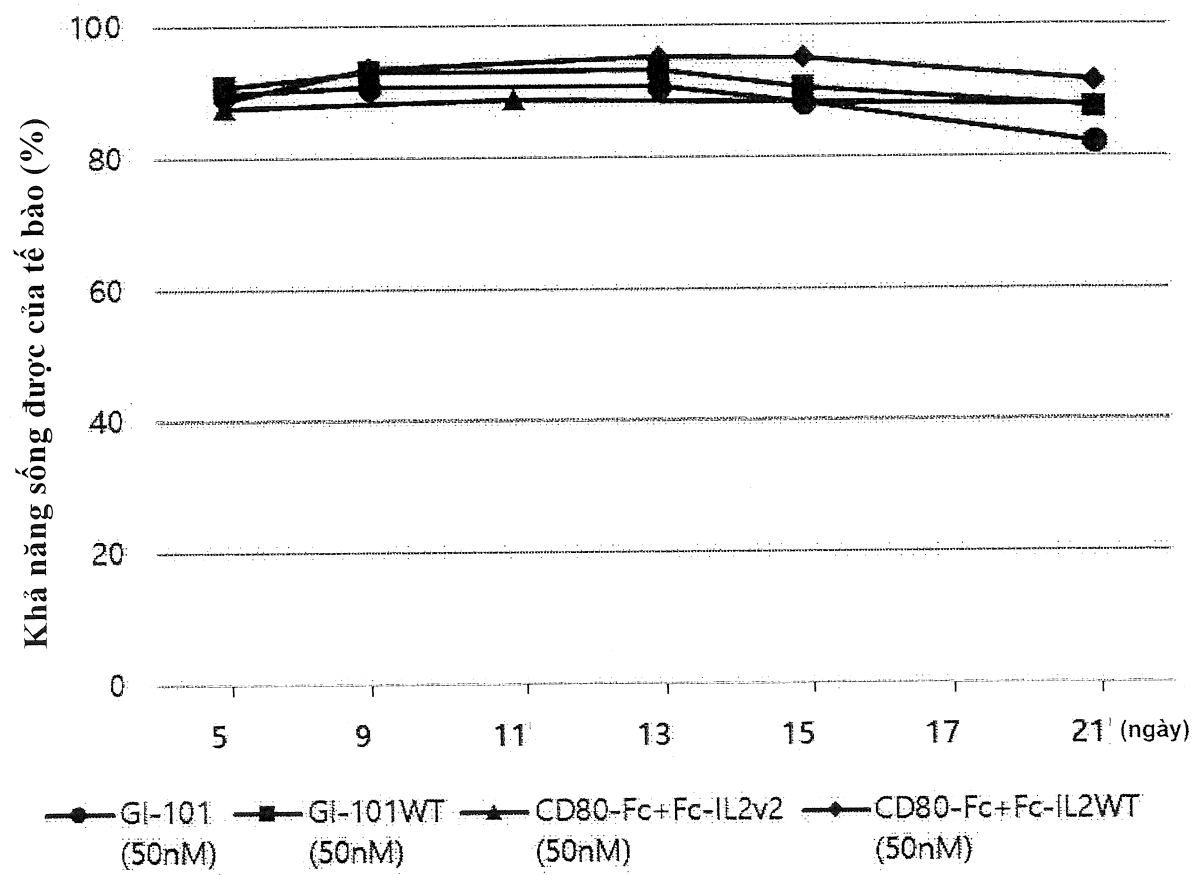


FIG. 10B

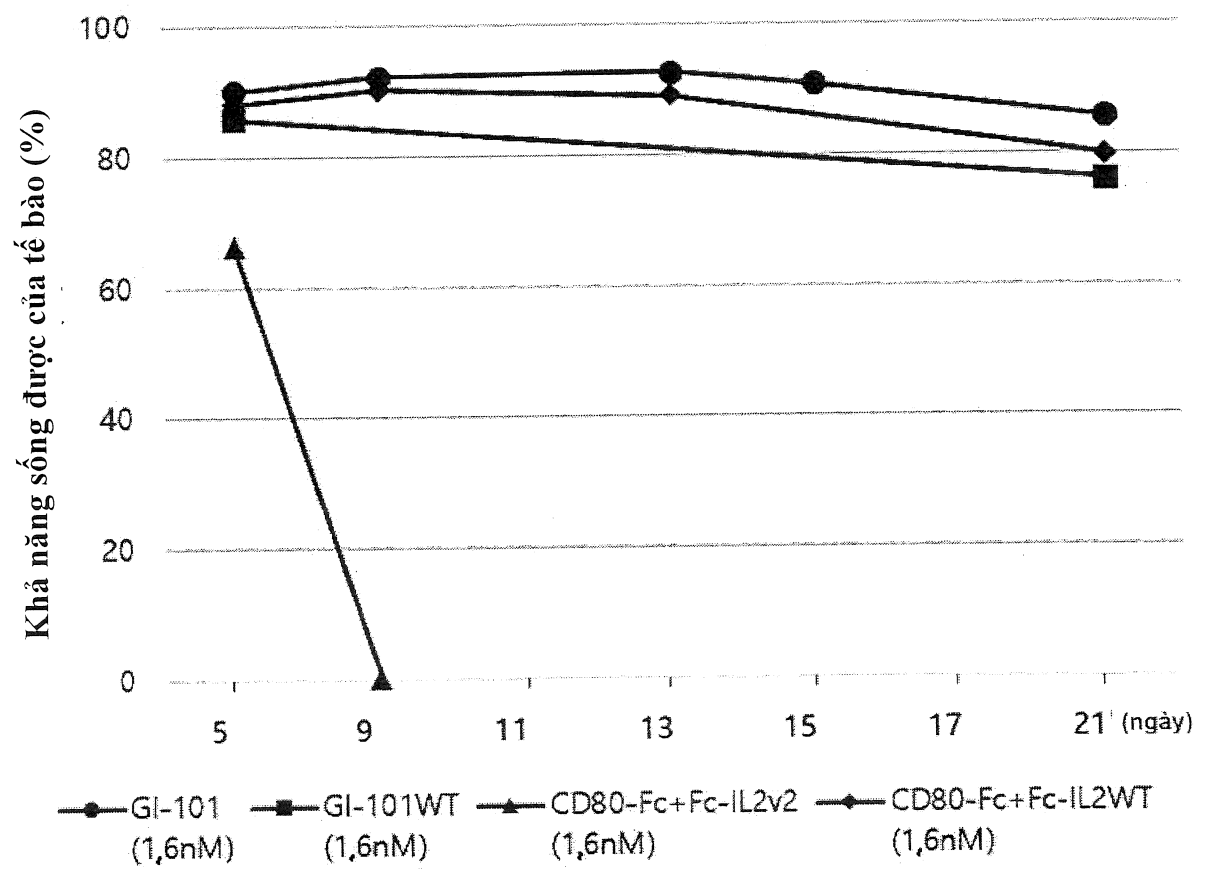


FIG. 11A

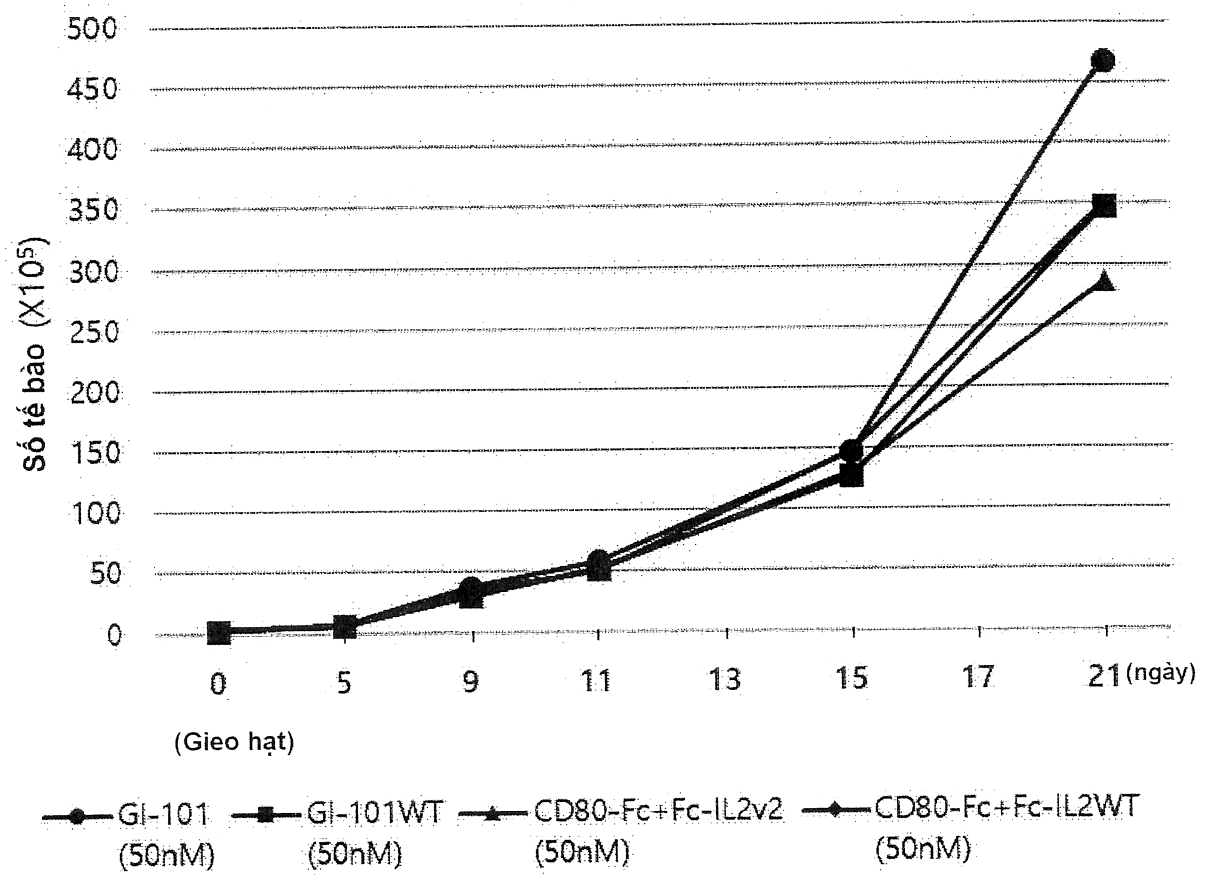


FIG. 11B

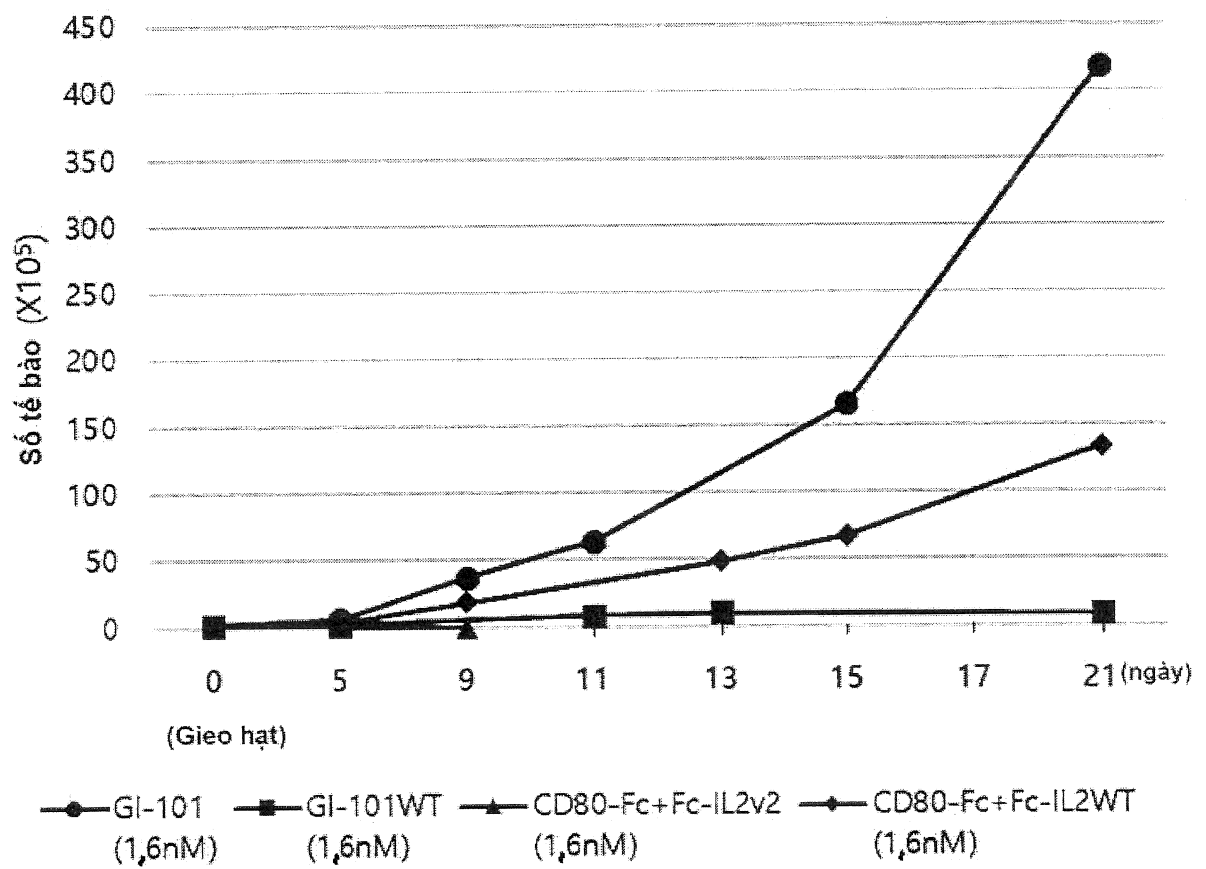


FIG. 12A

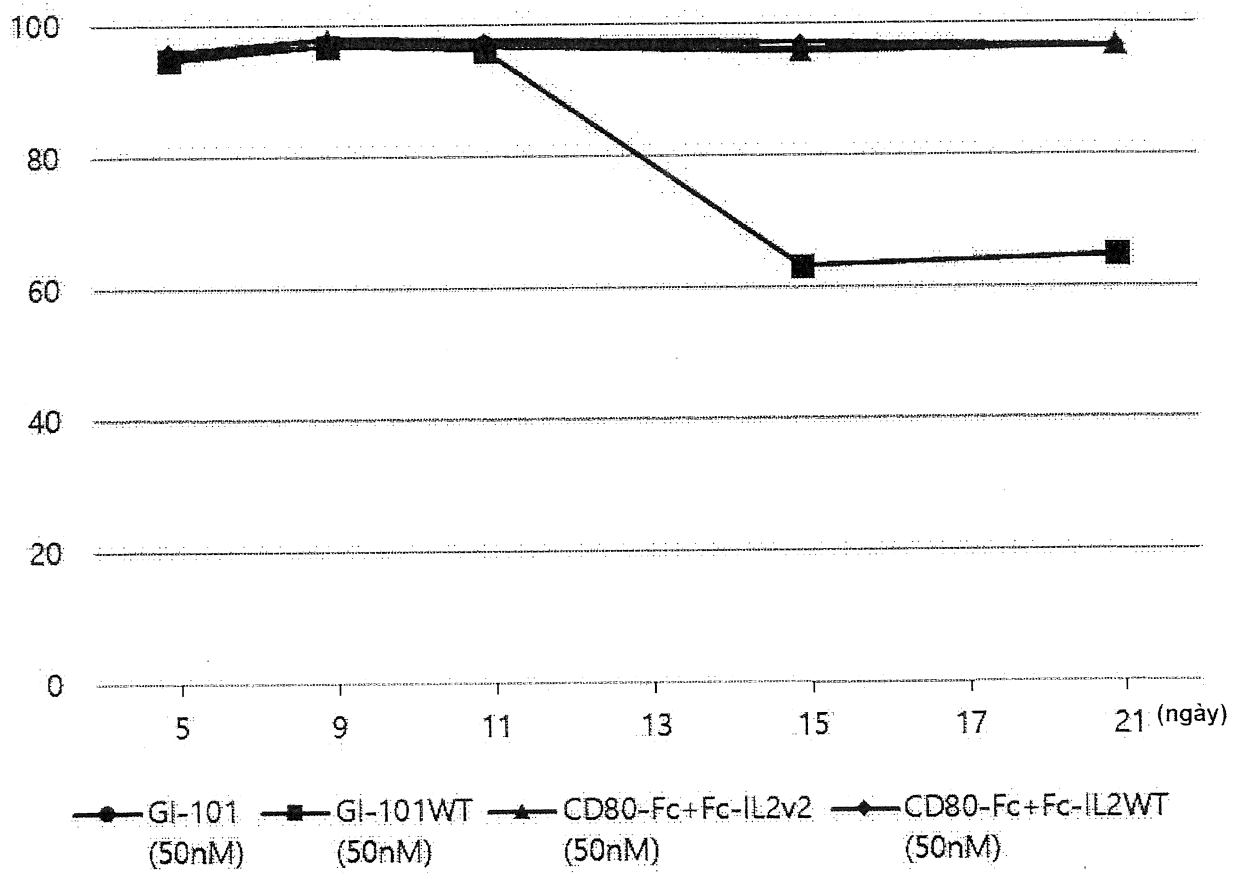


FIG. 12B

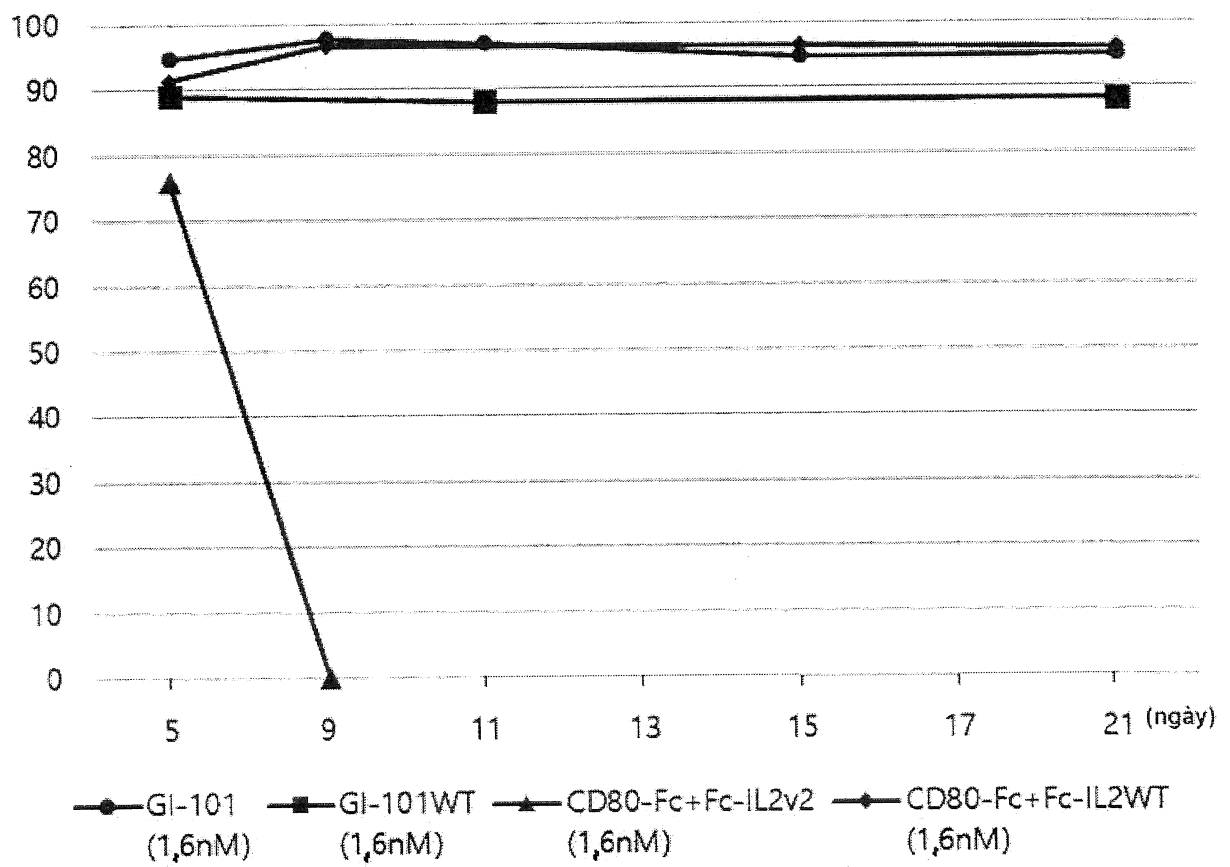


FIG. 13

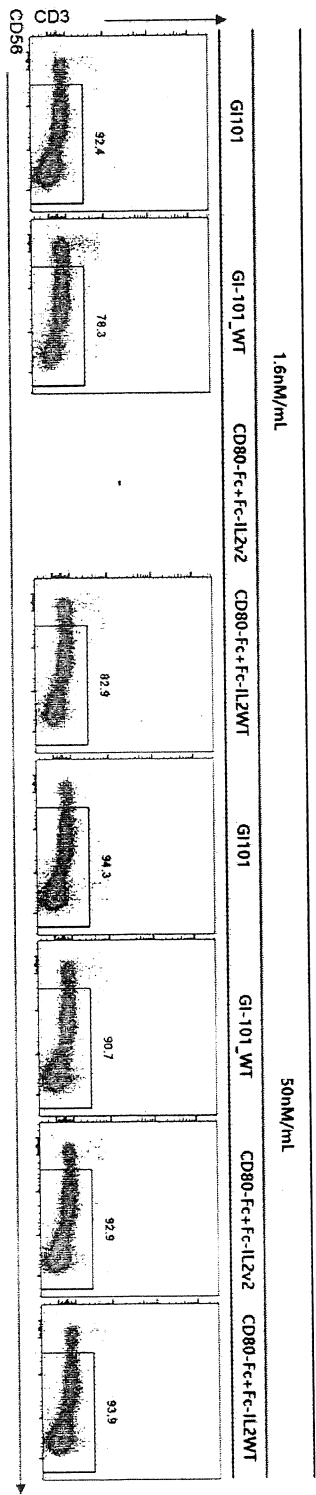


FIG. 14

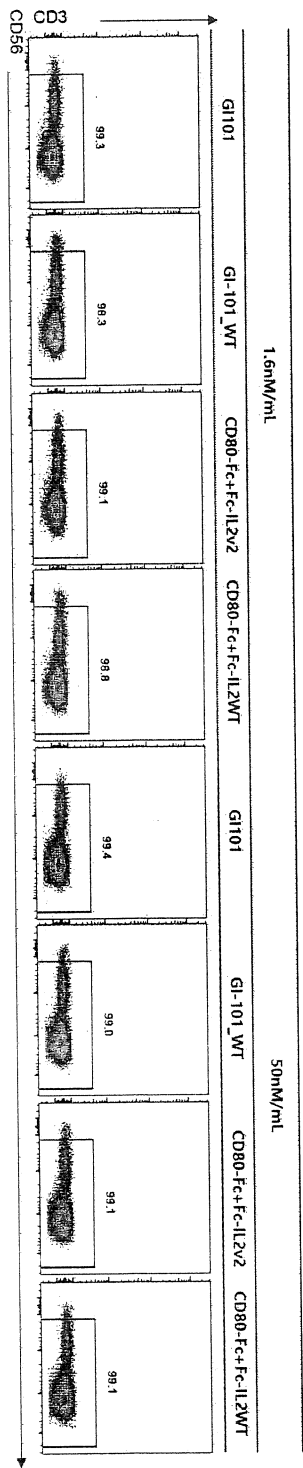


FIG. 15

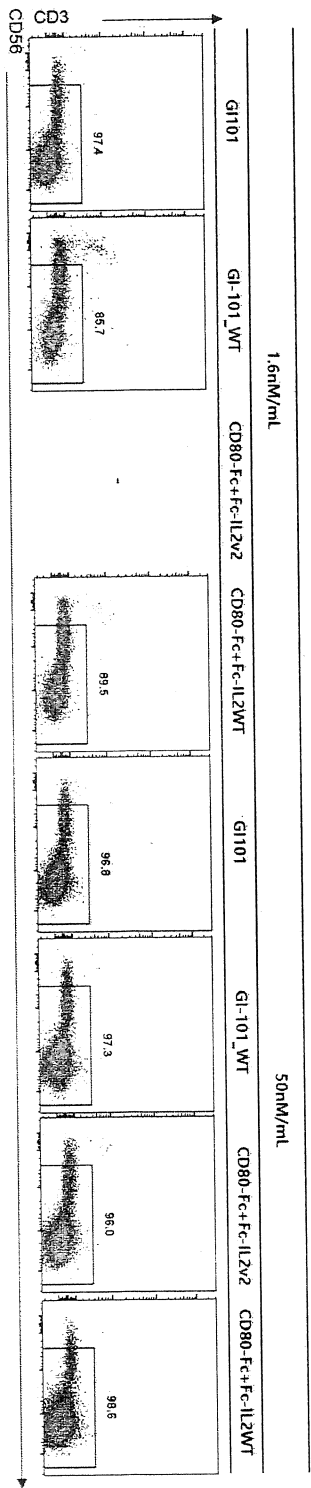


FIG. 16

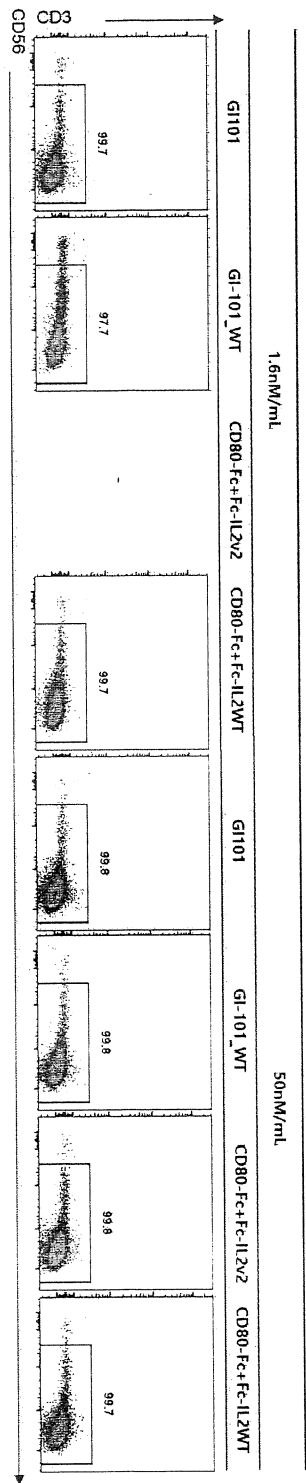


FIG. 17

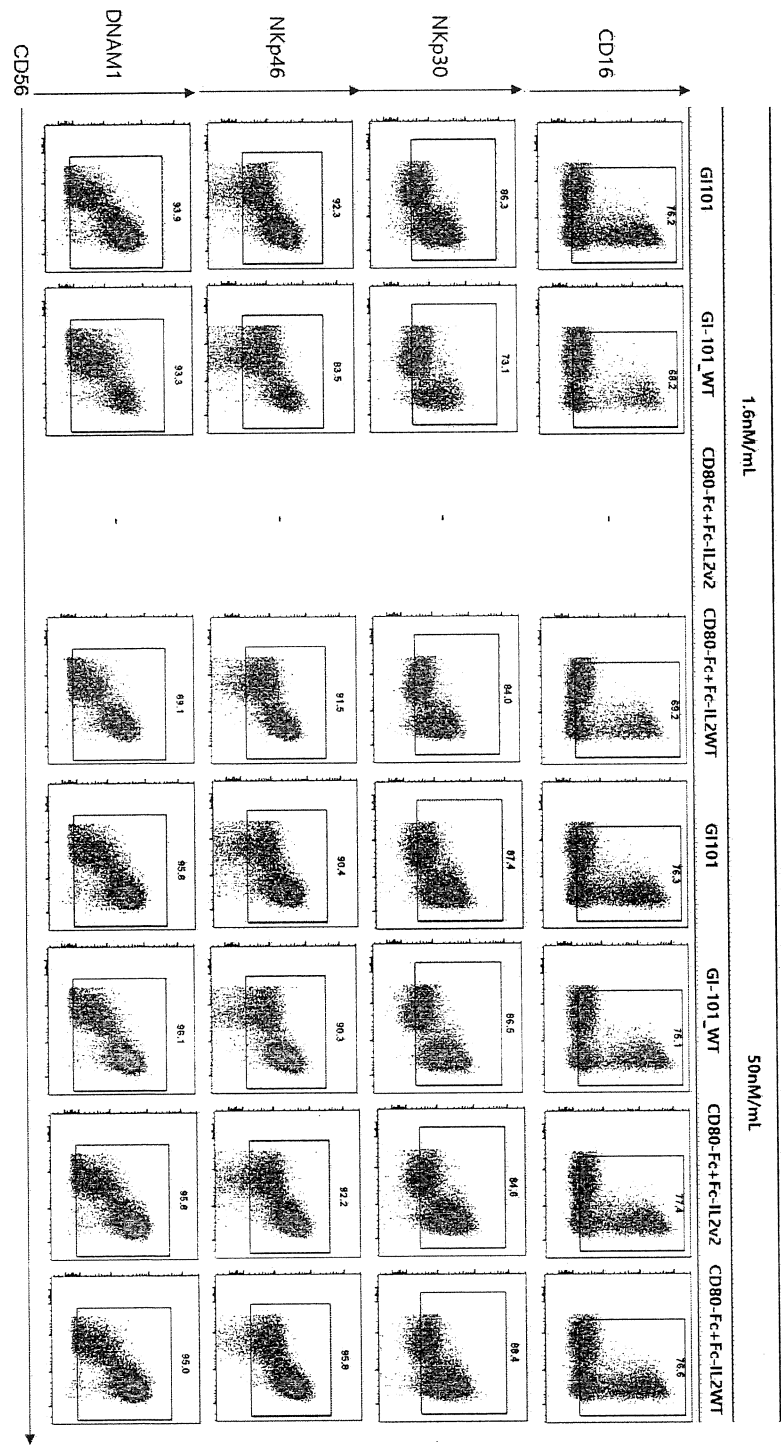


FIG. 18

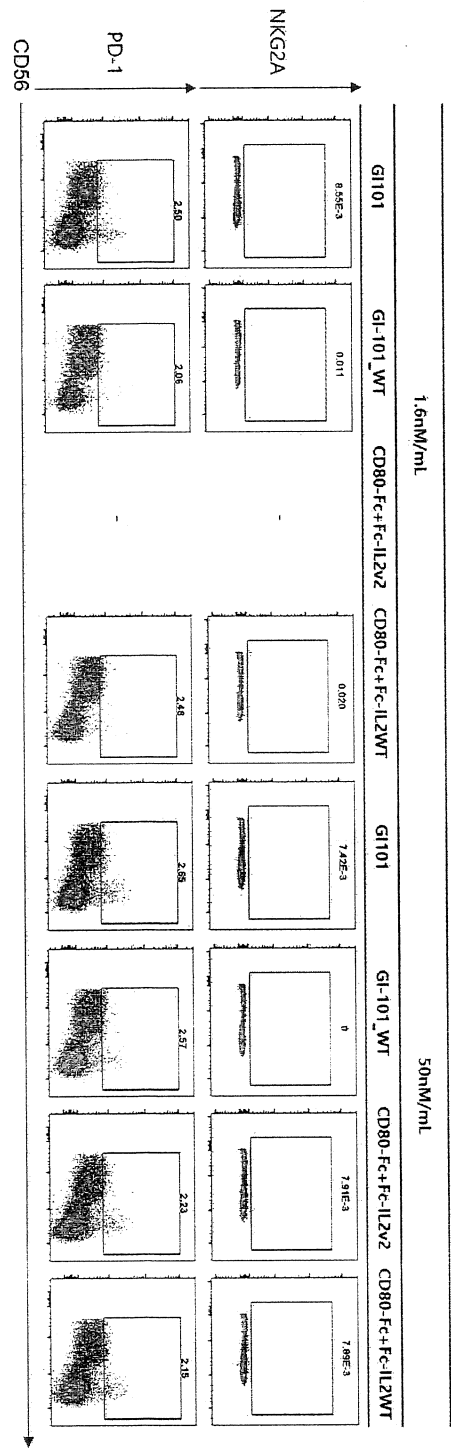


FIG. 19

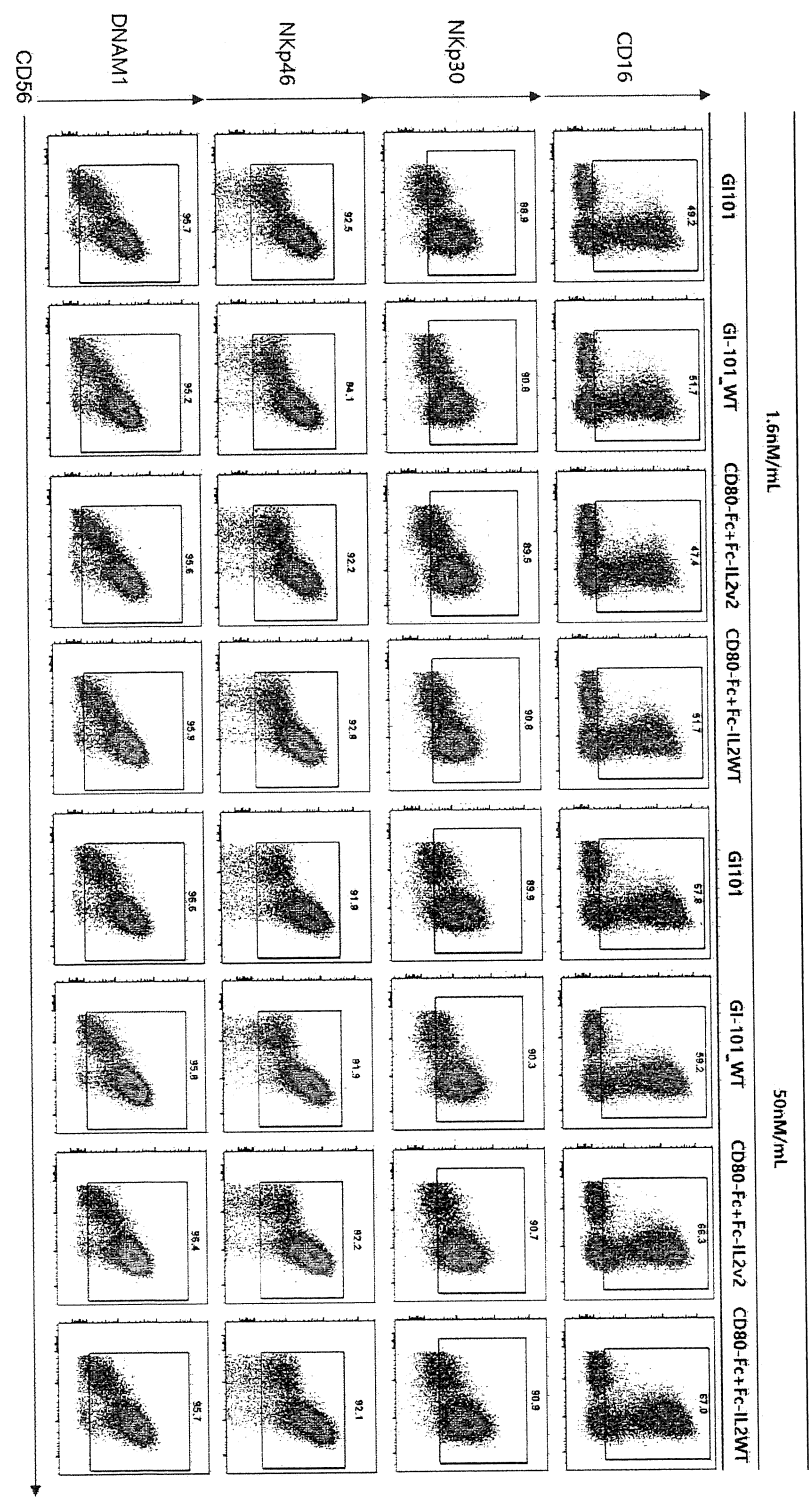


FIG. 20

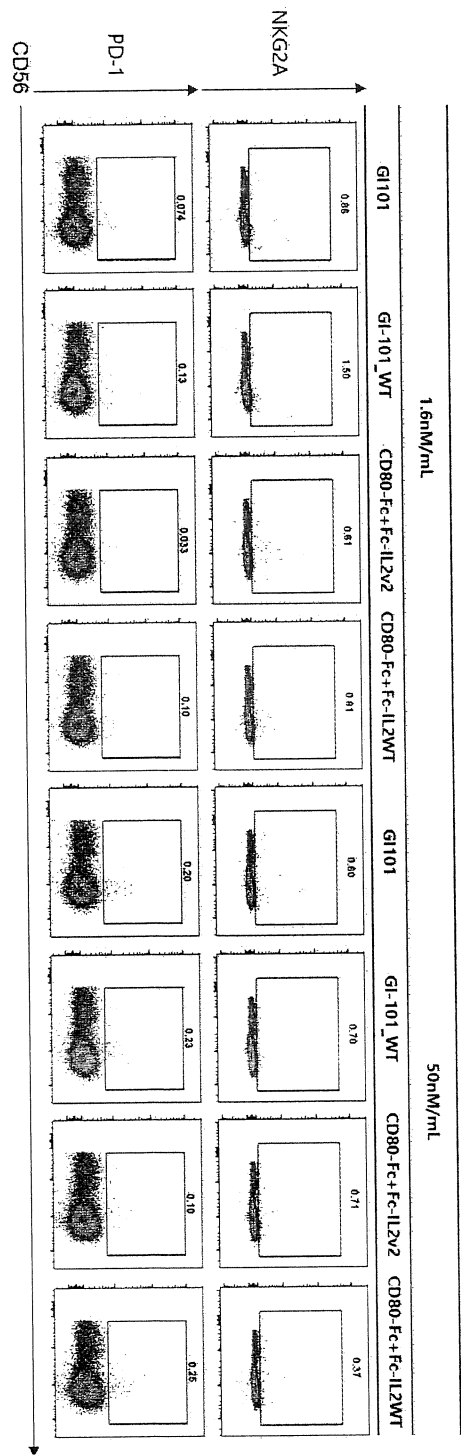


FIG. 21

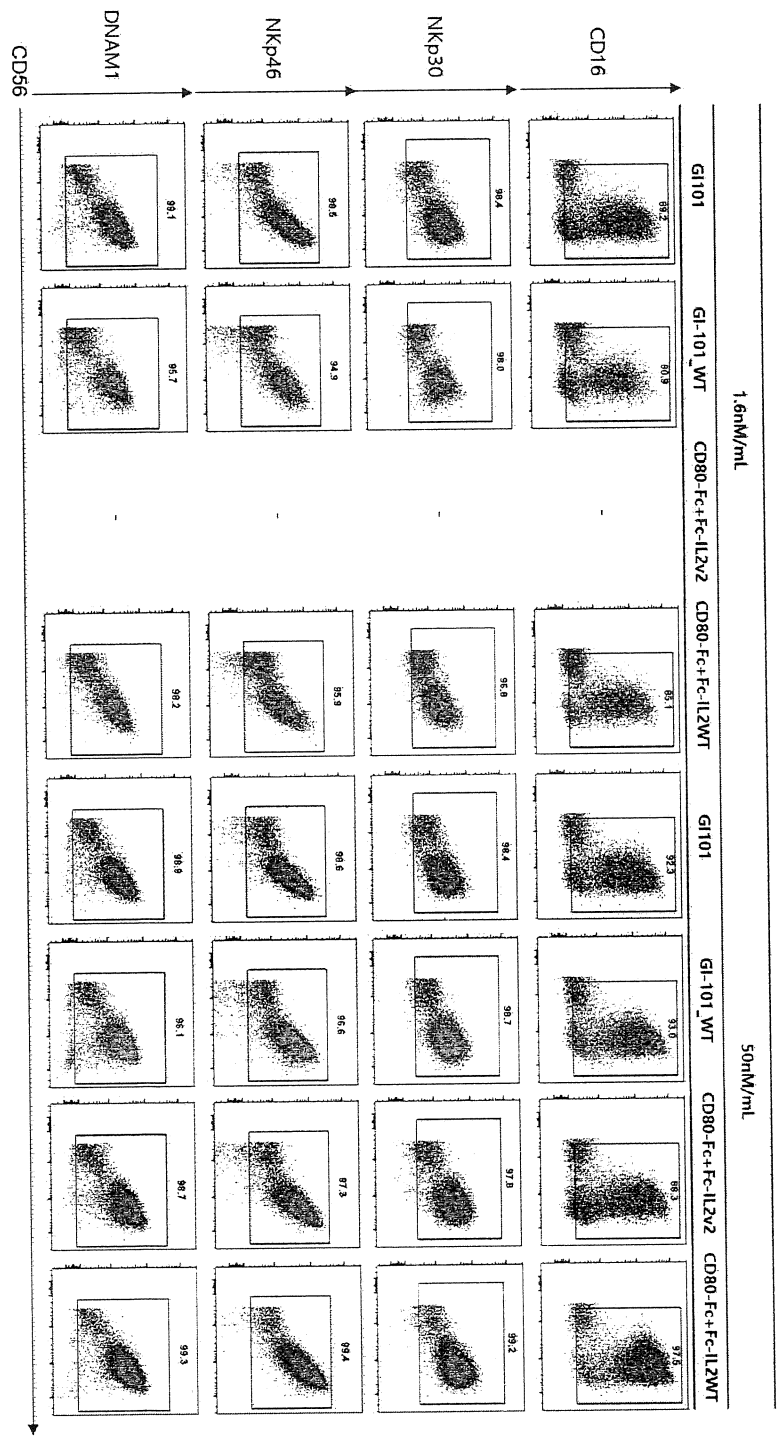


FIG. 22

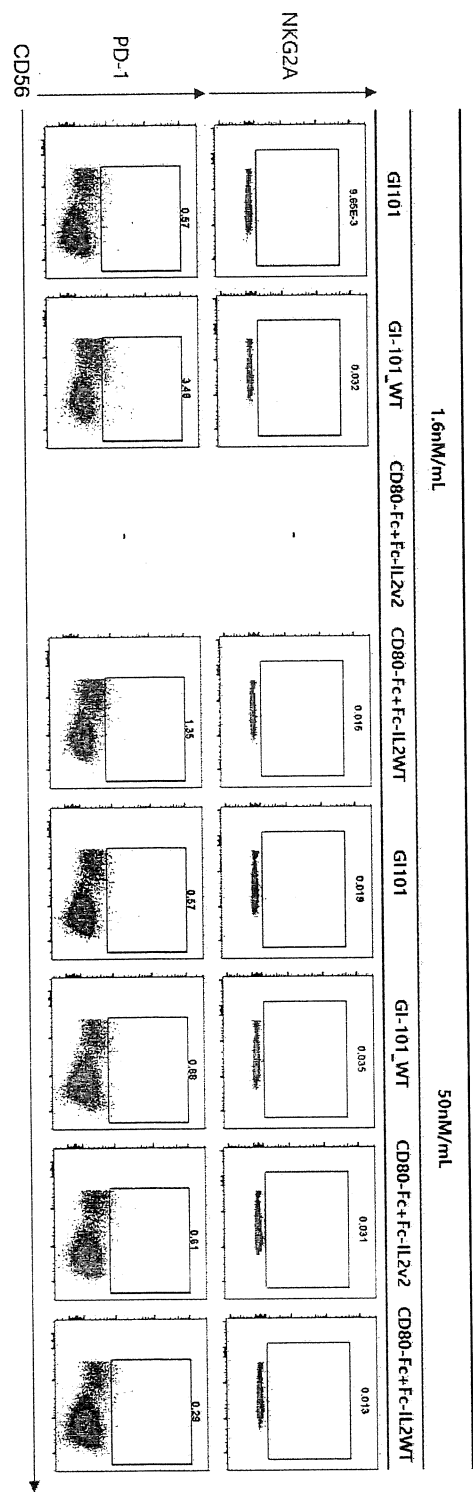


FIG. 23

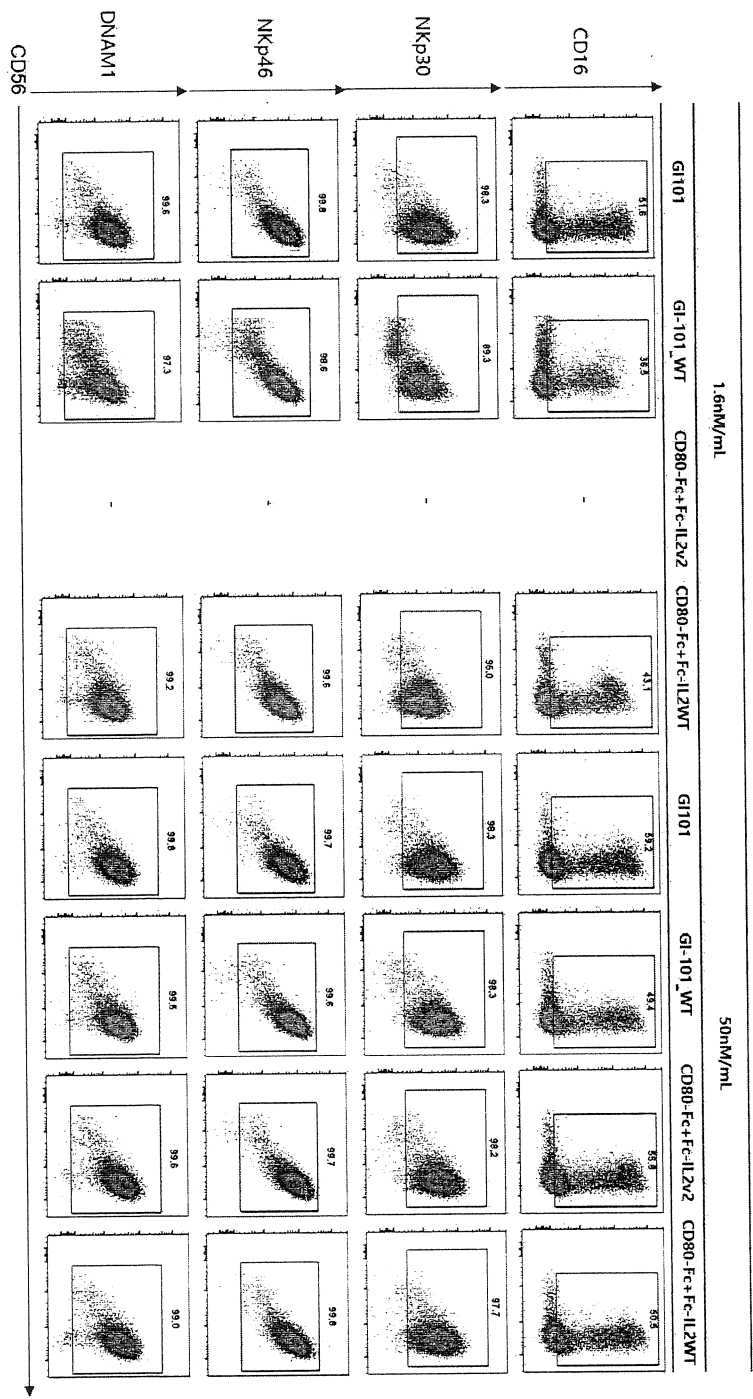


FIG. 24

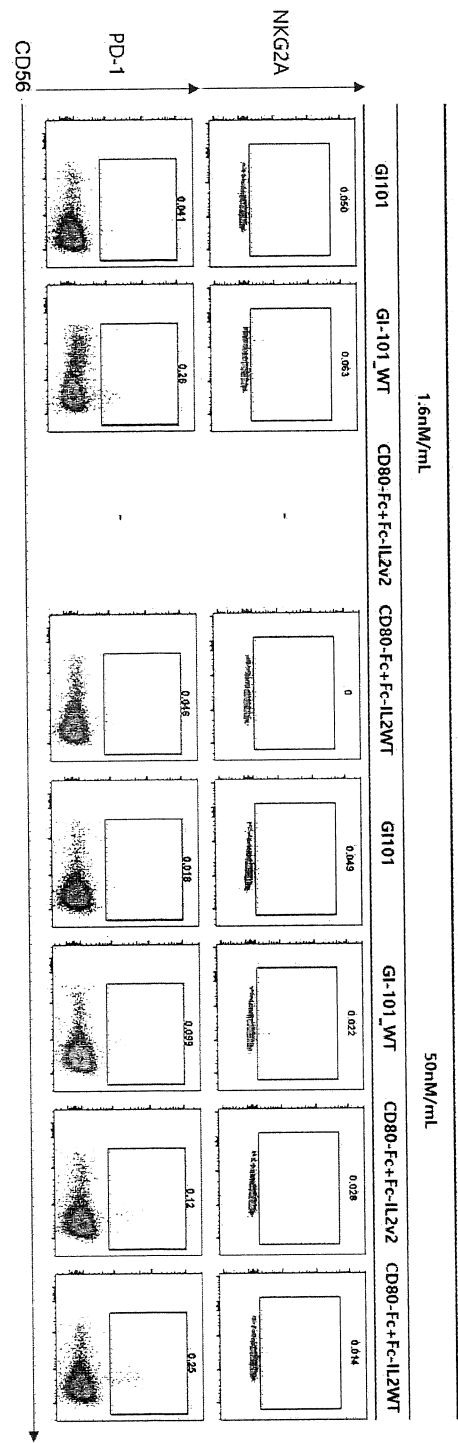


FIG. 25

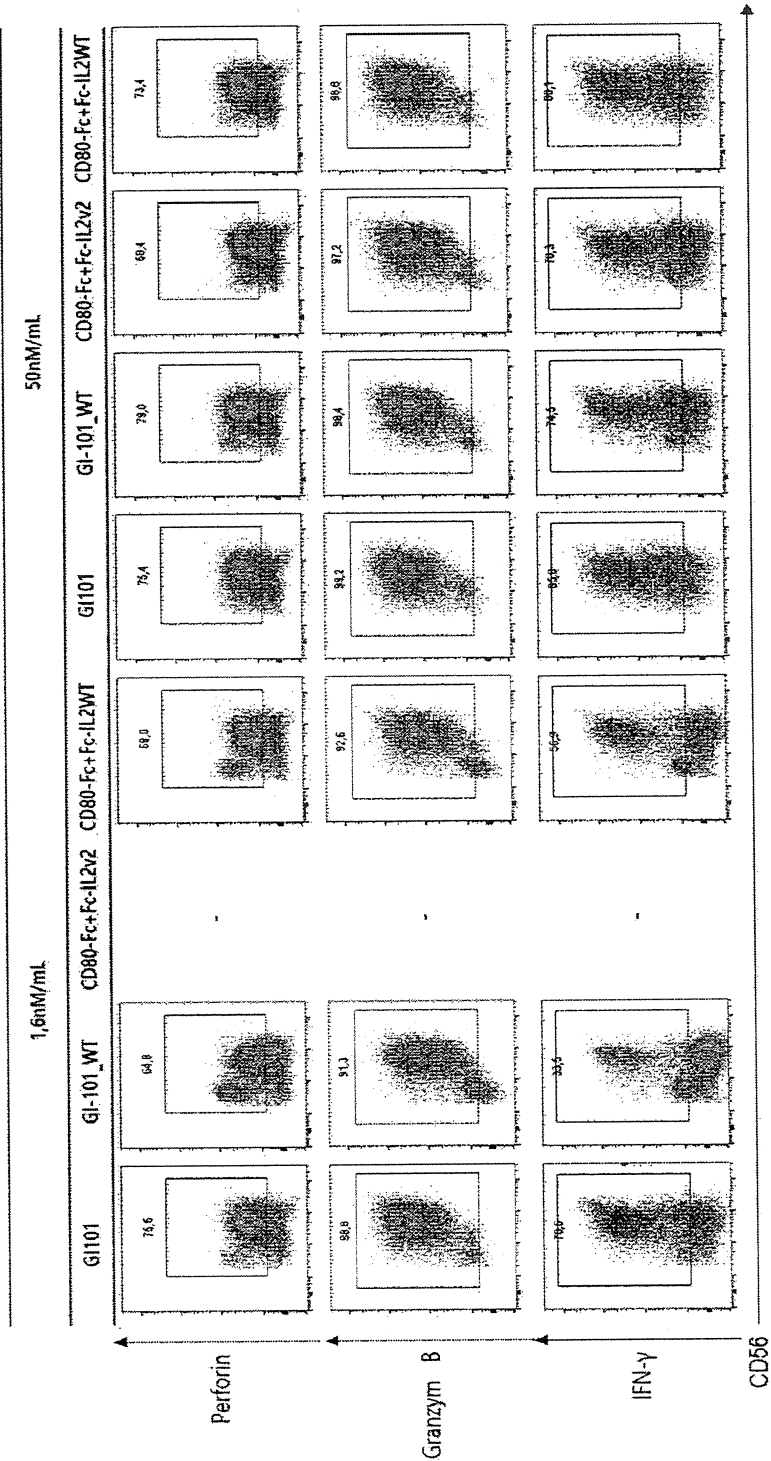


FIG. 26

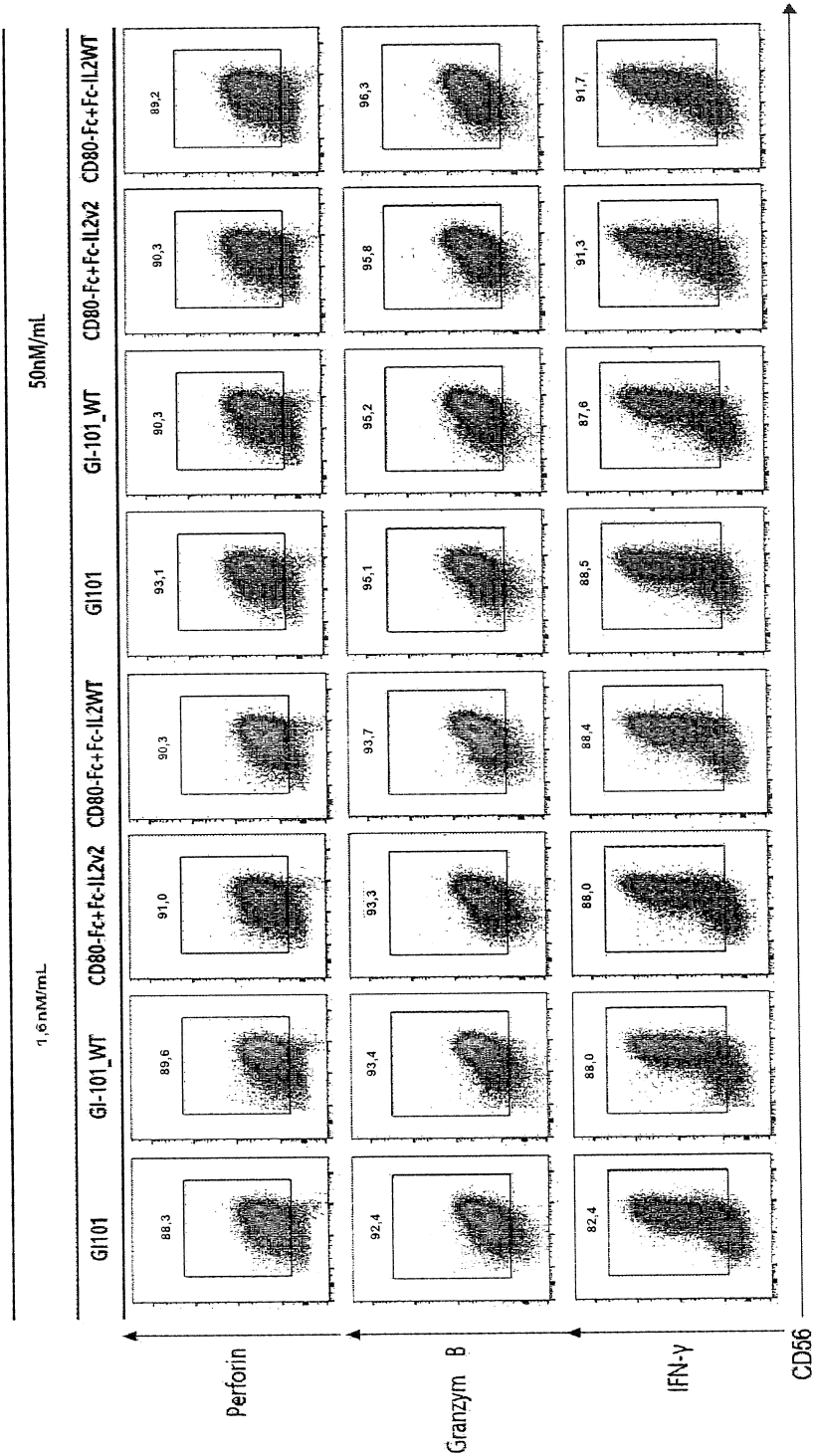


FIG. 27

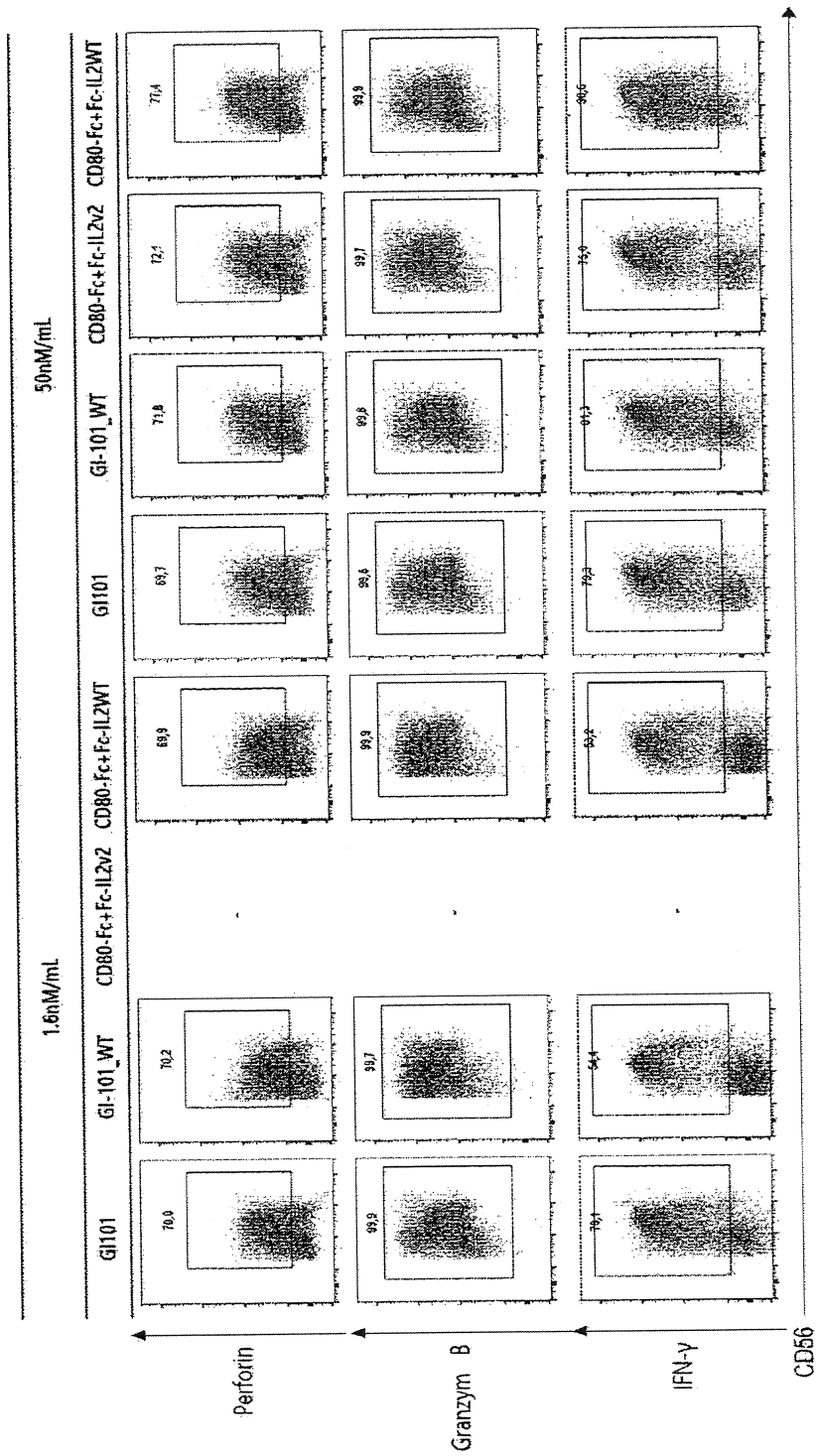


FIG. 28

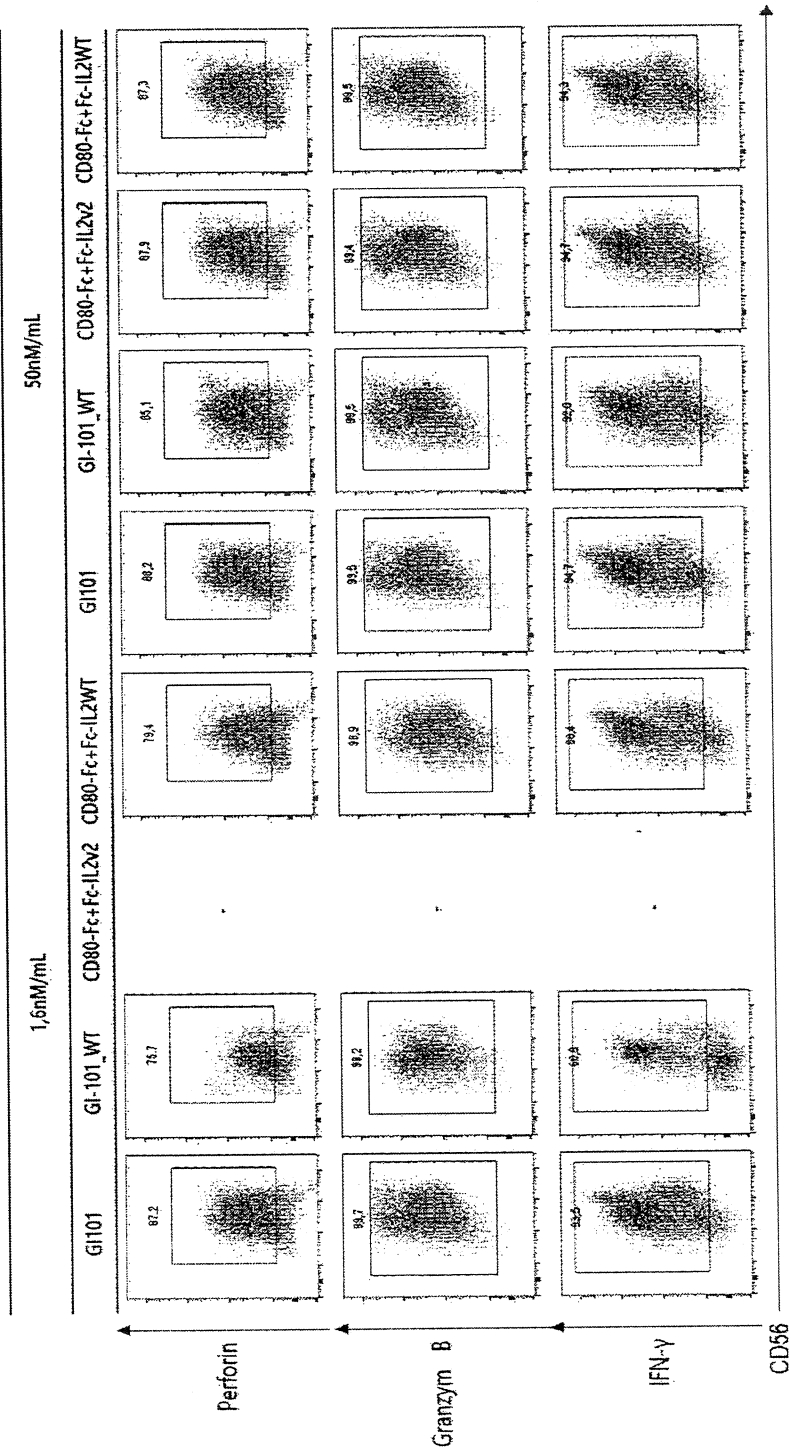


FIG. 29

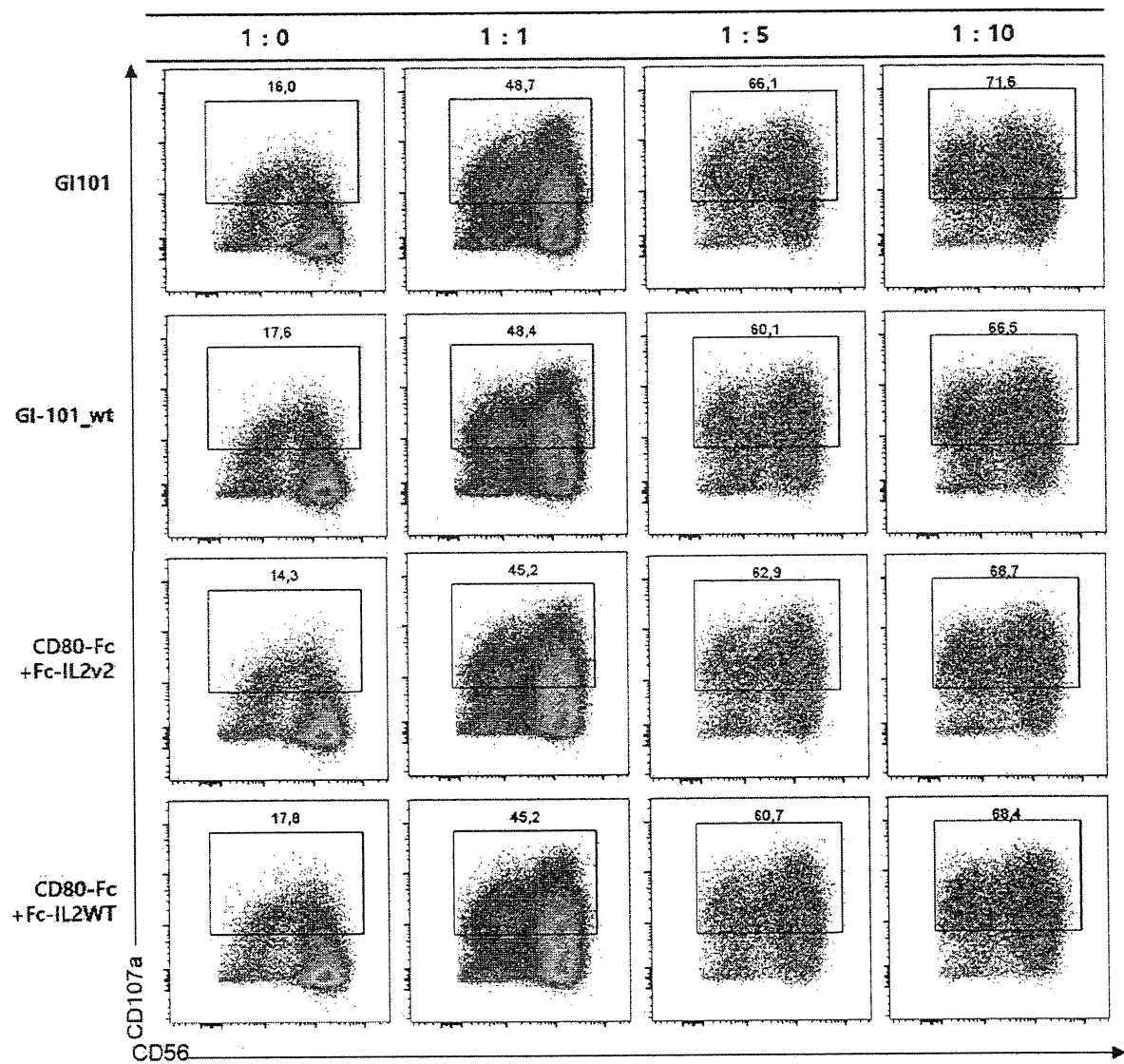


FIG. 30

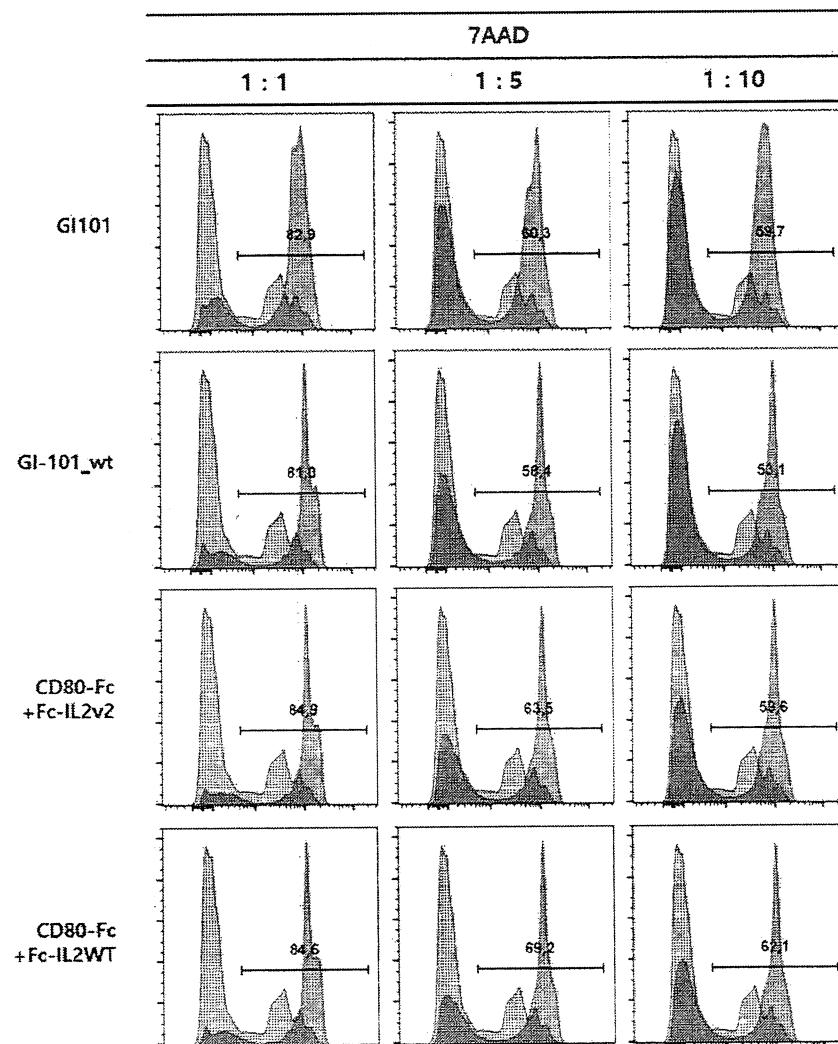


FIG. 31

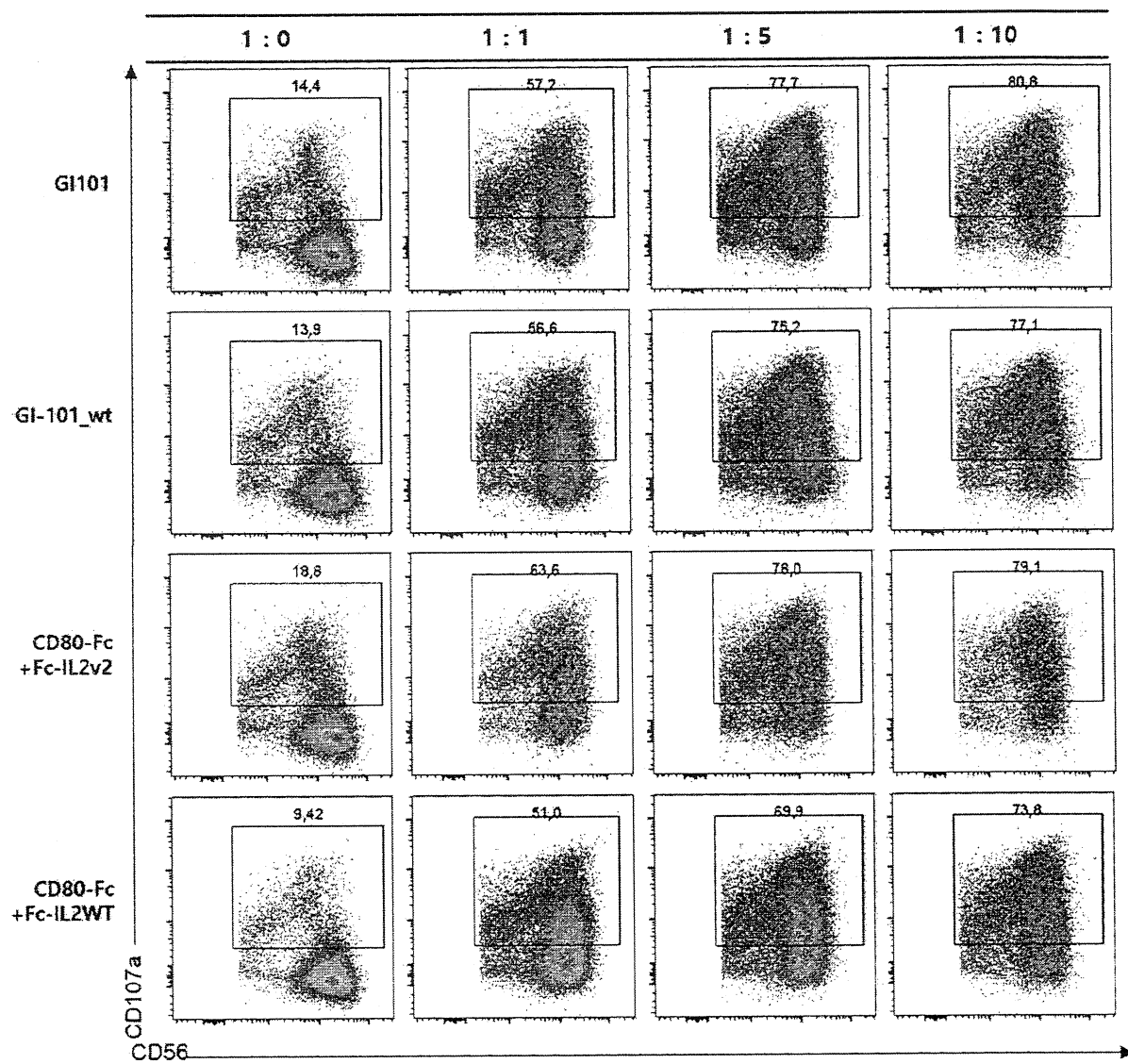


FIG. 32

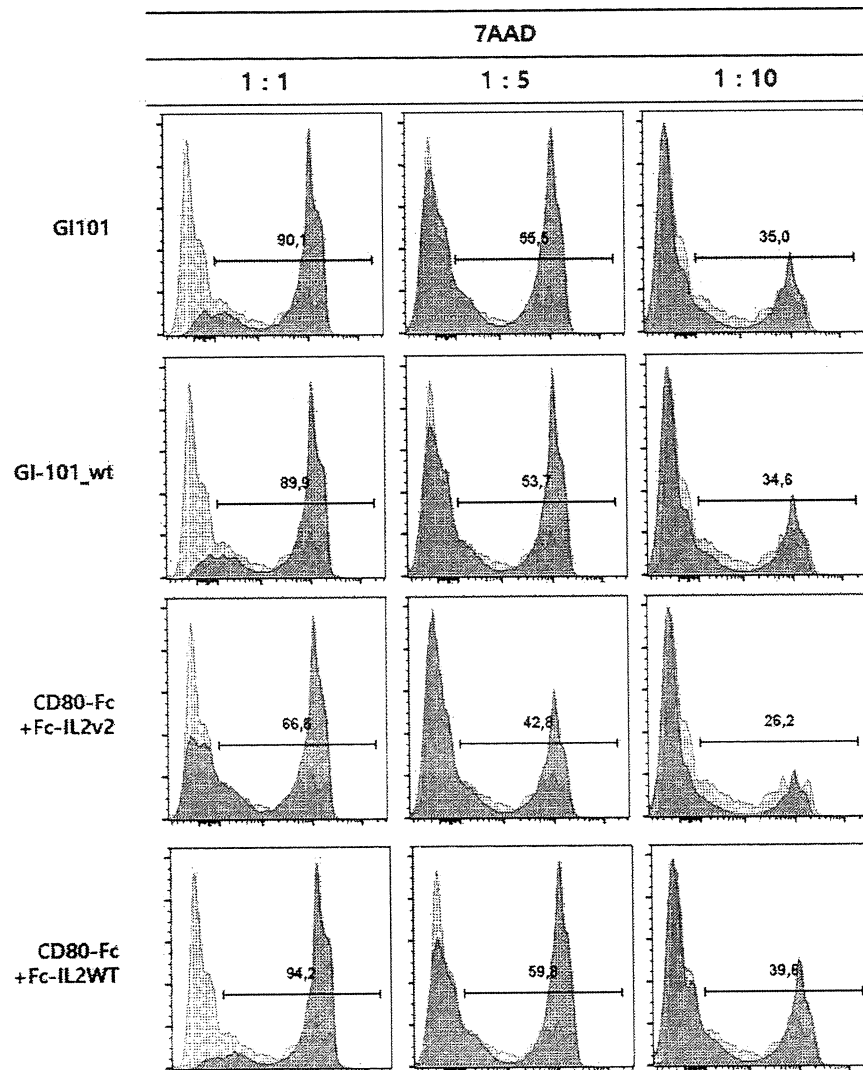


FIG. 33

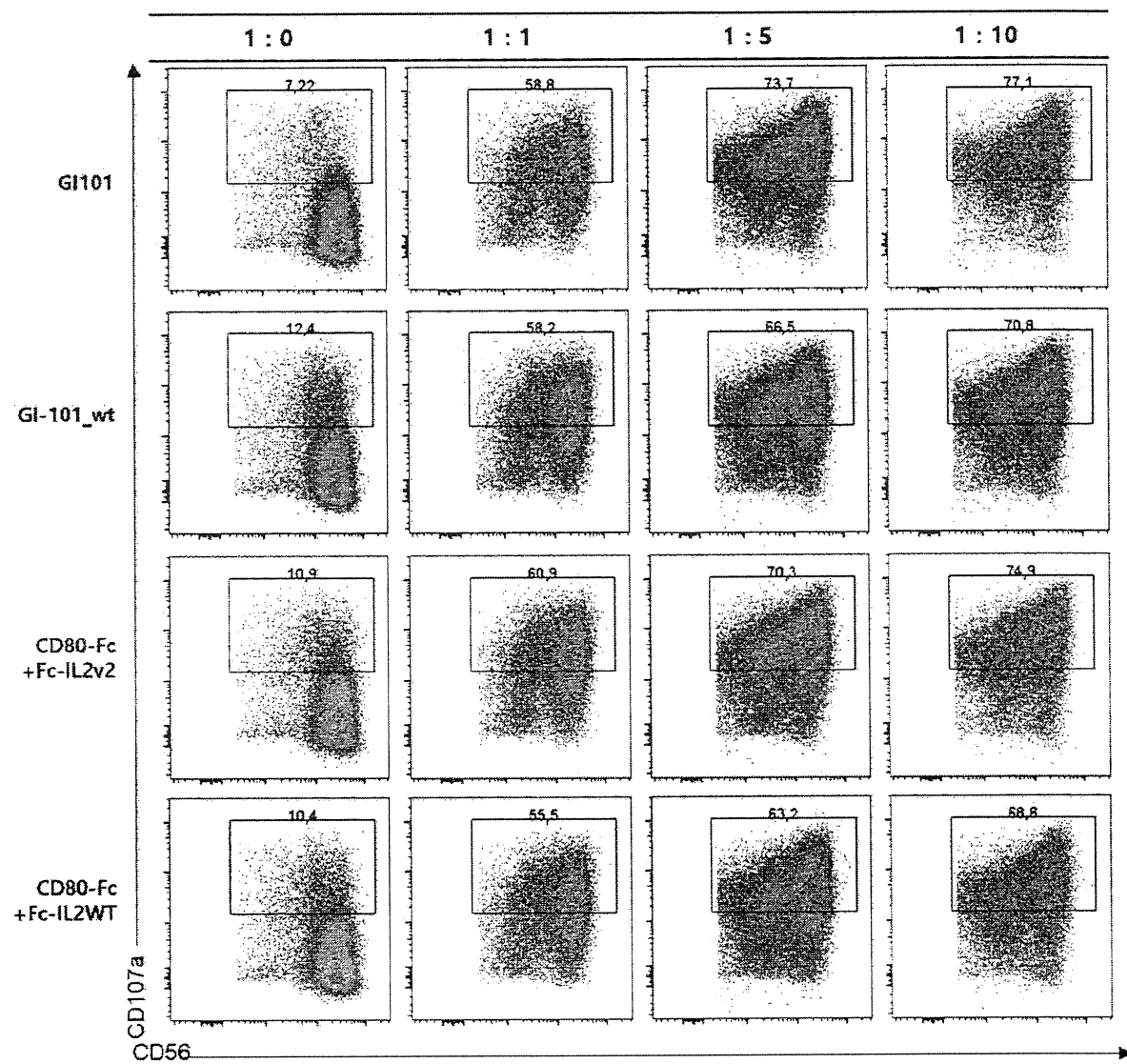


FIG. 34

