



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẢNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ



1-0049192

(51)^{2020.01} C07K 14/55; A61K 47/60; C12P 21/02; (13) B
C07K 19/00; C12N 15/26; C12N 15/63;
A61K 38/20; C07K 17/08

(21) 1-2021-03399

(22) 20/12/2019

(86) PCT/CN2019/126901 20/12/2019

(87) WO2020/125743 25/06/2020

(30) 201811570930.5 21/12/2018 CN; 201910158957.1 04/03/2019 CN

(45) 25/07/2025 448

(43) 25/11/2021 404A

(73) 1. JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO., LTD. (CN)

No.7 Kunlunshan Road, Economic and Technological Development Zone
Lianyungang, Jiangsu 222047, China

2. SHANGHAI HENGRUI PHARMACEUTICAL CO., LTD. (CN)

No.279 Wenjing Road, Minhang District Shanghai 200245, China

3. SHANGHAI SHENGDI PHARMACEUTICAL CO., LTD. (CN)

No.1288 Haike Road, Zhangjiang Town, Pudong New District Shanghai 201210,
China

(72) CHEN, Lei (CN); HU, Qiyue (US); GE, Hu (CN); LIN, Yuan (CN); WANG,
Hongwei (CN); OU, Yangchao (CN); KONG, Xianglin (CN); LIAO, Cheng (US);
ZHANG, Lianshan (US).

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

(54) BIẾN THỂ INTERLEUKIN-2 VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA BIẾN THỂ NÀY

(21) 1-2021-03399

(57) Sáng chế đề cập đến biến thể interleukin-2 có một hoặc nhiều đột biến axit amin. Biến thể interleukin-2 này hoặc dẫn xuất của nó có độ ổn định được gia tăng so với interleukin-2 thể đại và đặc tính được cải thiện dưới dạng hoạt chất miễn dịch. Sáng chế cũng đề cập đến thể tiếp hợp miễn dịch và dược phẩm chứa biến thể interleukin-2 này, axit nucleic mã hóa biến thể này, vector, tế bào vật chủ và phương pháp sản xuất biến thể này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến biến thể interleukin-2 của người hoặc dẫn xuất của nó có một hoặc nhiều đột biến axit amin. Cụ thể, biến thể interleukin-2 này hoặc dẫn xuất của nó có độ ổn định được cải thiện, và đặc tính được cải thiện dưới dạng hoạt chất miễn dịch. Sáng chế cũng đề cập đến thể tiếp hợp miễn dịch chứa biến thể interleukin-2 này hoặc dẫn xuất của nó, axit nucleic mã hóa biến thể này, vectơ, tế bào vật chủ và phương pháp sản xuất biến thể này, cũng như dược phẩm hoặc thể tiếp hợp miễn dịch chứa biến thể interleukin-2 này hoặc dẫn xuất của nó.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Interleukin-2 của người, cũng được gọi là yếu tố sinh trưởng tế bào T, cấu thành từ 133 axit amin, có khối lượng phân tử khoảng 15kD, và gen mã hóa interleukin-2 nằm trên nhiễm sắc thể 4 (4q27), bao gồm trình tự có chiều dài tổng cộng bằng 7kb. Vào năm 1976 và 1977, Doris Morgan, Francis Ruscetti, Robert Gallo and Steven Gillis, Kendal Smith, et al lần lượt đã phát hiện thấy rằng môi trường nuôi cấy tế bào T được hoạt hóa có thể tăng cường quá trình tăng sinh tế bào T. Sau đó, yếu tố kích thích được chứa trong môi trường nuôi cấy được tinh chế và xác định dưới dạng protein đơn, tức là interleukin-2.

Các thử nghiệm về tế bào trước đây *in vitro* cho thấy rằng tế bào T có thể bài tiết interleukin-2 và biểu hiện thụ thể interleukin-2 trên bề mặt tế bào, khi tế bào này được hoạt hóa bởi TCR và CD28. Gắn kết của interleukin-2 với thụ thể của nó có thể hoạt hóa quá trình tăng sinh tế bào T và tạo ra chức năng cho tế bào T. Mô hình này làm cho interleukin-2 trở thành phân tử đóng vai trò trung tâm trong đáp ứng miễn dịch tế bào T. Tuy nhiên, các thử nghiệm *in vivo* tiếp theo cho thấy rằng động vật sẽ phát triển tình trạng tự miễn dịch, khi interleukin-2 hoặc thụ thể của nó được loại bỏ. Các thử nghiệm tiếp theo cho thấy rằng interleukin-2 không chỉ có thể hoạt hóa tế bào tác động (như tế bào T và tế bào giết tự nhiên), mà còn hoạt hóa tế bào T điều hòa, nhờ đó ngăn ngừa tình trạng tự miễn dịch quá mức.

Interleukin-2 có hoạt tính thông qua IL-2R. IL-2R bao gồm ba tiểu đơn vị: IL-2R α (tức là CD25), IL-2R β (tức là CD122) và IL-2R γ (tức là CD132). Ba tiểu đơn vị này có

thể tạo ra ba dạng thụ thể: thụ thể có ái lực gắn kết cao bao gồm toàn bộ ba tiểu đơn vị IL-2R α / β / γ , thụ thể có ái lực gắn kết trung bình bao gồm IL-2R β / γ , và thụ thể có ái lực gắn kết thấp là IL-2R α . Trong số các thụ thể này, IL-2R β và IL-2R γ là cần thiết cho interleukin-2 để hoạt hóa quá trình truyền tín hiệu tiếp theo. Khi interleukin-2 gắn kết với cả IL-2R β và IL-2R γ , thì hai tiểu đơn vị thụ thể này tạo ra heterodime, lần lượt phosphoryl hóa STAT5 nội bào và thâm nhập vào nhân để gây phiên mã và biểu hiện gen tương ứng. IL-2R α không cần thiết cho quá trình truyền tín hiệu, nhưng có thể tăng cường gắn kết của interleukin-2 với thụ thể IL-2R β và IL-2R γ . IL-2R γ được biểu hiện trong toàn bộ các tế bào miễn dịch; IL-2R β được biểu hiện trong tế bào T biểu hiện CD8, tế bào giết tự nhiên và tế bào T điều hòa, và mức độ biểu hiện của IL-2R β sẽ được gia tăng khi các tế bào T được hoạt hóa; IL-2R α được biểu hiện mạnh và liên tục trong tế bào T điều hòa, và biểu hiện tạm thời trong tế bào T biểu hiện CD8 được hoạt hóa, sau đó mức độ biểu hiện sẽ được điều hòa giảm.

Interleukin-2 được tổng hợp chủ yếu bởi tế bào T được hoạt hóa, đặc biệt là tế bào T hỗ trợ biểu hiện CD4. Interleukin-2 kích thích quá trình tăng sinh và biệt hóa của tế bào T, bao gồm quá trình sản sinh tế bào lympho T gây độc tế bào và quá trình biệt hóa của tế bào lympho máu ngoại vi thành tế bào gây độc tế bào và tế bào giết được hoạt hóa bởi yếu tố tế bào lympho, tăng cường biểu hiện cytokin và phân tử phân giải tế bào bởi tế bào T, tăng cường quá trình tăng sinh và biệt hóa tế bào B, và quá trình tổng hợp globulin miễn dịch thông qua tế bào B, cũng như kích thích quá trình sản sinh, tăng sinh và hoạt hóa tế bào giết tự nhiên.

Do có khả năng tăng sinh quần thể tế bào lympho *in vivo* và tăng cường chức năng tác động của các tế bào này, nên interleukin-2 có tác dụng kháng khối u. Phương pháp điều trị miễn dịch bằng interleukin-2 trở thành lựa chọn điều trị cho đối tượng bị bệnh ung thư di căn. Hiện nay, liều cao của interleukin-2 đã được chấp thuận để điều trị bệnh ung thư biểu mô tế bào thận di căn và bệnh u melanin ác tính.

Các nghiên cứu hiện nay về biến thể interleukin-2 cho thấy rằng biến thể interleukin-2 có đột biến ở ít nhất bốn vị trí 38, 42, 45, 62, và 68 có tác dụng kích thích giảm đối với tế bào T điều hòa (WO2012062228); biến thể interleukin-2 có các đột biến ở các vị trí số 72, 42, và 45 làm giảm hoặc loại bỏ ái lực gắn kết với thụ thể interleukin-2 có ái lực gắn kết cao, nhưng vẫn duy trì ái lực gắn kết với thụ thể interleukin-2 có ái lực

gắn kết trung bình (CN201280017730,1); các đột biến ở các vị trí số 91 và 126 cho phép interleukin-2 gắn kết với CD25 (IL2R α), nhưng không hoạt hóa thụ thể interleukin-2 trên tế bào T điều hòa (US8906356); thụ thể interleukin-2 có ít nhất một đột biến E15, H16, Q22, D84, N88 hoặc E95, được sử dụng để điều trị bệnh mảnh ghép chống lại vật chủ ở đối tượng (US9732134); biến thể interleukin-2 chứa ít nhất đột biến R38W có thể làm giảm tính thấm mạch máu, và có thể được sử dụng để điều trị khối u rắn (US7371371; US7514073; US8124066; US7803361); protein dung hợp được điều chế bằng cách dung hợp biến thể interleukin-2 với vùng Fc được sử dụng để điều trị bệnh, interleukin-2 có đột biến N88R (WO2016014428); hIL-2-N88R có thể hoạt hóa chọn lọc tế bào T thay vì tế bào giết tự nhiên, và có thể làm giảm hình thành di căn ở phổi (WO 99/60128); interleukin-2 có các đột biến ở vị trí số 20, 88 hoặc 126 có thể được sử dụng để sản xuất thuốc để điều trị và/hoặc phòng ngừa bệnh tự miễn (WO2009135615); polypeptit thể khảm, chứa xytokin được liên kết với phối tử hướng đích protein trên bề mặt tế bào miễn dịch, trong đó xytokin này có thể là biến thể của interleukin-2 (WO2017136818), v.v

Tuy nhiên, vẫn cần có biến thể interleukin-2 có độ ổn định cao hơn. Cụ thể là, cần có biến thể interleukin-2 như vậy và dẫn xuất của nó để tăng cường hiệu quả điều trị bệnh của interleukin-2.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề cập đến biến thể interleukin-2 hoặc dẫn xuất của nó có một hoặc nhiều đột biến axit amin, thể tiếp hợp miễn dịch chứa biến thể interleukin-2 này hoặc dẫn xuất của nó, axit nucleic mã hóa biến thể này hoặc dẫn xuất của nó, vector, tế bào vật chủ, và được phẩm chứa biến thể interleukin-2 này hoặc dẫn xuất của nó.

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề cập đến biến thể interleukin-2 hoặc dẫn xuất của nó, có một hoặc nhiều đột biến axit amin ở các vị trí số 11, 26, 27, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 70, 71, 72, 78, 82, 88, 132. Theo sáng chế, đột biến được thể hiện ở dạng abc, trong đó a là loại axit amin trước khi đột biến, b là vị trí đột biến, và c là loại axit amin sau khi đột biến. Ví dụ, N26S là đột biến từ asparagin (N) thành serin (S) ở vị trí số 26; N26 có nghĩa là asparagin (N) ở vị trí số 26 được đột biến; 26S có nghĩa là axit amin ở vị trí số 26 được đột biến thành serin (S).

Cụ thể, biến thể interleukin-2 theo sáng chế hoặc dẫn xuất của nó chứa một hoặc nhiều đột biến axit amin hoặc tổ hợp bất kỳ của chúng ở các vị trí sau: 26, 29, 30, 71, 11,

132, 70, 82, 27, và 78. Theo một số phương án, các axit amin trước khi đột biến (ví dụ trong interleukin-2 thể đại của người) là: asparagin (N) ở vị trí số 26, asparagin (N) ở vị trí số 29, asparagin (N) ở vị trí số 30, asparagin (N) ở vị trí số 71, glutamin (Q) ở vị trí số 11, leucin (L) ở vị trí số 132, leucin (L) ở vị trí số 70, prolin (P) ở vị trí số 82, glycin (G) ở vị trí số 27, và phenylalanin (F) ở vị trí số 78. Theo một số phương án, đột biến axit amin của biến thể interleukin-2 này hoặc dẫn xuất của nó là đột biến bất kỳ hoặc tổ hợp đột biến bất kỳ được chọn từ các đột biến sau: đột biến thành Gln (Q) ở vị trí số 26, đột biến thành Serin (S) ở vị trí số 29, đột biến thành Ser (S) ở vị trí số 30, đột biến thành Gln (Q) ở vị trí số 71, đột biến thành Cys (C) ở vị trí số 11, 132, 70, 82, 27, hoặc 78.

Theo một số phương án, biến thể interleukin-2 này hoặc dẫn xuất của nó chứa loại đột biến thứ nhất, và loại đột biến thứ nhất là đột biến bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm đột biến (1) đến (7) hoặc tổ hợp của chúng: (1) N26Q, (2) N29S, (3) N30S, (4) N71Q, (5) Q11C và L132C, (6) L70C và P82C, và (7) G27C và F78C.

Theo một số phương án, biến thể interleukin-2 theo sáng chế hoặc dẫn xuất của nó mô tả nêu trên có độ ổn định được gia tăng, ví dụ độ ổn định khử amin hóa và/hoặc độ ổn định nhiệt được gia tăng; cụ thể loại đột biến thứ nhất theo sáng chế tạo ra độ ổn định được gia tăng cho biến thể interleukin-2 theo sáng chế hoặc dẫn xuất của nó, khi so với interleukin-2 thể đại; độ ổn định bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, độ ổn định khử amin hóa và/hoặc độ ổn định nhiệt được gia tăng.

Mặt khác, biến thể interleukin-2 theo sáng chế hoặc dẫn xuất của nó còn chứa một hoặc nhiều đột biến axit amin ở các vị trí sau hoặc tổ hợp của chúng: 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45 và 72. Theo một số phương án, các axit amin trước khi đột biến (ví dụ trong interleukin-2 thể đại của người) là: asparagin (N) ở vị trí số 29, asparagin (N) ở vị trí số 30, tyrosin (Y) ở vị trí số 31, lysin (K) ở vị trí số 32, asparagin (N) ở vị trí số 33, prolin (P) ở vị trí số 34, lysin (K) ở vị trí số 35, leucin (L) ở vị trí số 36, threonin (T) ở vị trí số 37, arginin (R) ở vị trí số 38, methionin (M) ở vị trí số 39, leucin (L) ở vị trí số 40, threonin (T) ở vị trí số 41, phenylalanin (F) ở vị trí số 42, lysin (K) ở vị trí số 43, phenylalanin (F) ở vị trí số 44, tyrosin (Y) ở vị trí số 45, leucin (L) ở vị trí số 72.

Theo một số phương án, biến thể interleukin-2 này hoặc dẫn xuất của nó còn chứa loại đột biến thứ hai, và loại đột biến thứ hai là đột biến bất kỳ được chọn từ nhóm bao

gồm đột biến (8) đến (11), hoặc tổ hợp bất kỳ của đột biến (8) đến (10): (8) F42A, (9) Y45A, (10) L72G, và (11) NNYKNPKLTRMLTFK ở các vị trí số 29-44 được đột biến thành QSMHIDATL.

Theo một số phương án, loại đột biến thứ hai có thể loại bỏ hoặc làm giảm ái lực của interleukin-2 với thụ thể ái lực cao (IL-2R α / β / γ), và duy trì ái lực của interleukin-2 với thụ thể ái lực trung bình (IL-2R β / γ); loại đột biến thứ hai có thể duy trì tác dụng của interleukin-2 để cảm ứng tăng sinh và hoạt hóa tế bào tác động (như tế bào giết tự nhiên và tế bào T), nhưng làm giảm tác dụng của interleukin-2 để cảm ứng tăng sinh và hoạt hóa tế bào T điều hòa.

Theo khía cạnh thứ ba, biến thể interleukin-2 theo sáng chế hoặc dẫn xuất của nó chứa một hoặc nhiều đột biến axit amin hoặc tổ hợp bất kỳ của chúng ở các vị trí sau: 20, 88, và 126. Theo một số phương án, các axit amin trước khi đột biến (ví dụ trong interleukin-2 thể đại của người) là: aspartic acid (D) ở vị trí số 20, asparagin (N) ở vị trí số 88, và glutamin (Q) ở vị trí số 126. Theo một số phương án, biến thể interleukin-2 này hoặc dẫn xuất của nó chứa axit amin bất kỳ sau hoặc tổ hợp bất kỳ của chúng sau khi đột biến: alanin (A) hoặc histidin (H) hoặc isoleucin (I) hoặc methionin (M) hoặc axit glutamic (E) hoặc serin (S) hoặc valin (V) hoặc tryptophan (W) ở vị trí số 20; alanin (A) hoặc arginin (R) hoặc axit glutamic (E) hoặc leucin (L) hoặc phenylalanin (F) hoặc glycine (G) hoặc isoleucin (I) hoặc methionin (M) hoặc serin (S) hoặc Y hoặc valin (V) ở vị trí số 88; asparagin (N) hoặc leucin (L) hoặc P hoặc phenylalanin (F) hoặc glycine (G) hoặc isoleucin (I) hoặc methionin (M) hoặc arginin (R) hoặc serin (S) hoặc threonin (T) hoặc tyrosin (Y) hoặc valin (V) ở vị trí số 126.

Theo một số phương án, biến thể interleukin-2 này hoặc dẫn xuất của nó còn chứa loại đột biến thứ ba, là đột biến bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm các đột biến (12) đến (14) hoặc tổ hợp của chúng: (12) N88 được đột biến thành A, R, E, L, F, G, I, M, S, Y, V hoặc D, (13) D20 được đột biến thành A, H, I, M, E, S, V, W hoặc Y, (2) (14) Q126 được đột biến thành N, L, P, F, G, I, M, R, S, T, Y hoặc V.

Theo một số phương án, loại đột biến thứ ba có thể làm giảm ái lực của interleukin-2 với cả thụ thể ái lực cao (IL-2R α / β / γ) và thụ thể ái lực trung bình (IL-2R β / γ), và ái lực với thụ thể ái lực cao được giảm hơn so với ái lực với thụ thể ái lực trung bình; loại đột biến thứ ba có thể duy trì tác dụng của interleukin-2 để cảm ứng tăng

sinh và hoạt hóa tế bào T điều hòa, nhưng loại bỏ hoặc làm giảm tác dụng của interleukin-2 để cảm ứng tăng sinh và hoạt hóa tế bào tác động (như tế bào giết tự nhiên và tế bào T).

Theo một số phương án, biến thể interleukin-2 này hoặc dẫn xuất của nó chứa loại đột biến thứ nhất và loại đột biến thứ hai, hoặc bao gồm loại đột biến thứ nhất và loại đột biến thứ ba, như mô tả nêu trên.

Theo một số phương án, loại đột biến thứ nhất trong biến thể interleukin-2 theo sáng chế hoặc dẫn xuất của nó được chọn từ đột biến bất kỳ trong số các đột biến (15) đến (17), hoặc đột biến bất kỳ trong số các đột biến (15) đến (17) kết hợp với đột biến bất kỳ trong số các đột biến (5) đến (7), như mô tả nêu trên: (15) N26Q và N29S, (16) N26Q, N29S và N71Q, và (17) N26Q và N30S;

Loại đột biến thứ hai được chọn từ đột biến bất kỳ trong số các đột biến (18) đến (20) và (11): (18) F42A và Y45A, (19) F42A và L72G, và (20) Y45A và L72G;

Loại đột biến thứ ba là N88R hoặc N88G hoặc N88I hoặc N88D.

Theo một số phương án, biến thể interleukin-2 này hoặc dẫn xuất của nó chứa các đột biến như được thể hiện trong đột biến bất kỳ trong số các đột biến (21) đến (29): (21) N26Q, N29S, F42A, N71Q và L72G, (22) N26Q, N29S và N88R, (23) N26Q, N29S, F42A và L72G, (24) N26Q, N30S, F42A và L72G, (25) Q11C, N26Q, N30S, F42A, L72G và L132C, (26) N26Q, N30S, F42A, L70C, L72G và P82C, (27) N26Q, G27C, N30S, F42A, L72G và F78C, (28) N29S, F42A và L72G, và (29) Q11C, NNYKNPKLTRMLTFKF ở các vị trí số 29-44 được đột biến thành QSMHIDATL, và L132C.

Ngoài các đột biến (1) đến (29) mô tả nêu trên, sáng chế còn đề cập đến biến thể interleukin-2, chứa tổ hợp bất kỳ của các vị trí đột biến và các loại đột biến như được thể hiện trong (1) đến (20), bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở các đột biến (30) đến (208) sau: (30) N26Q/Q11C/L132C; (31) N26Q/L70C/P82C; (32) N26Q/G27C/F78C; (33) N26Q/NNYKNPKLTRMLTFKF ở các vị trí số 29-44 được đột biến thành QSMHIDATL; (34) N26Q/F42A/Y45A; (35) N26Q/F42A/L72G; (36) N26Q/Y45A/L72G; (37) N26Q/F42A/Y45A/L72G; (38) Q11C/N30S/L132C; (39) N30S/L70C/P82C; (40) G27C/N30S/F78C; (41) N30S/F42A/Y45A; (42) N30S/F42A/L72G; (43) N30S/Y45A/L72G; (44) N30S/F42A/Y45A/L72G; (45)

N29S/N30S/F42A/L72G; (46) Q11C/F42A/Y45A; (47) Q11C/F42A/L72G/L132C; (48)
 Q11C/Y45A/L72G/L132C; (49) Q11C/F42A/Y45A/L72G/L132C; (50)
 Q11C/N29S/F42A/L72G/L132C; (51) NNYKNPKLTRMLTFKF ở các vị trí số 29-44
 được đột biến thành QSMHIDATL/L70C/P82C; (52) F42A/Y45A/L70C/P82C; (53)
 F42A/L70C/L72G/P82C; (54) Y45A/L70C/L72G/P82C; (55)
 F42A/Y45A/L70C/L72G/P82C; (56) N29S/F42A/L70C/L72G/P82C; (57)
 G27C/NNYKNPKLTRMLTFKF ở các vị trí số 29-44 được đột biến thành
 QSMHIDATL/F78C; (58) G27C/F42A/Y45A/F78C; (59) G27C/F42A/L72G/F78C; (60)
 G27C/Y45A/L72G/F78C; (61) G27C/F42A/Y45A/L72G/F78C; (62)
 G27C/N29S/F42A/L72G/F78C; (63) NNYKNPKLTRMLTFKF ở các vị trí số 29-44
 được đột biến thành QSMHIDATL/Y45A; (64) NNYKNPKLTRMLTFKF ở các vị trí số
 29-44 được đột biến thành QSMHIDATL/L72G; (65) NNYKNPKLTRMLTFKF ở các vị
 trí số 29-44 được đột biến thành QSMHIDATL/Y45A/ L72G; (66)
 N26Q/N30S/Q11C/L132C; (67) N26Q/N30S/L70C/P82C; (68)
 N26Q/G27C/N30S/F78C; (69) N26Q/N30S/F42A/Y45A; (70) N26Q/N30S/F42A/L72G;
 (71) N26Q/N30S/Y45A/L72G; (72) N26Q/N30S/F42A/Y45A/L72G; (73)
 N26Q/N29S/N30S/F42A/L72G; (74) N26Q/N29S/N30S; (75)
 N26Q/N29S/Q11C/L132C; (76) N26Q/N29S/L70C/P82C; (77)
 N26Q/N29S/G27C/F78C; (78) N26Q/N29S/F42A/Y45A; (79) N26Q/N29S/Y45A/L72G;
 (80) N26Q/N29S/F42A/Y45A/L72G; (81) Q11C/N29S/N30S/L132C; (82)
 N29S/N30S/L70C/P82C; (83) G27C/N29S/N30S/F78C; (84) N29S/N30S/F42A/Y45A;
 (85) N29S/N30S/F42A/L72G; (86) N29S/N30S/Y45A/L72G; (87)
 N29S/N30S/F42A/Y45A/L72G; (88) Q11C/N29S/F42A/Y45A/L132C; (89)
 Q11C/N29S/F42A/L72G/L132C; (90) Q11C/N29S/Y45A/L72G/L132C; (91)
 Q11C/N29S/F42A/Y45A/L72G/L132C; (92) N29S/F42A/Y45A/L70C/P82C; (93)
 N29S/F42A/L70C/L72G/P82C; (94) N29S/Y45A/L70C/L72G/P82C; (95)
 N29S/F42A/Y45A/L70C/L72G/P82C; (96) G27C/N29S/F78C/F42A/Y45A; (97)
 G27C/N29S/F78C/F42A/L72G; (98) G27C/N29S/F78C/Y45A/L72G; (99)
 G27C/N29S/F78C/F42A/Y45A/L72G; (100) N29S/F42A/Y45A; (101)
 N29S/F42A/L72G; (102) N29S/Y45A/L72G; (103) N29S/F42A/Y45A/L72G; (104)
 Q11C/N29S/L132C; (105) N29S/L70C/P82C; (106) G27C/N29S/F78C; (107)
 N29S/N30S; (108) N26Q/N29S; (109) N26Q/N71Q; (110) N30S/N71Q; (111)

Q11C/N71Q/L132C; (112) L70C/N71Q/P82C; (113) G27C/N71Q/F78C; (114)
 NNYKNPKLTRMLTFKF ở các vị trí số 29-44 được đột biến thành
 QSMHIDATL/N71Q; (115) F42A/Y45A/N71Q; (116) F42A/N71Q/L72G; (117)
 Y45A/N71Q/L72G; (118) N26Q/N30S/F42A/N71Q/L72G; (119)
 Q11C/N26Q/N30S/F42A/N71Q/L72G/L132C; (120)
 N26Q/N30S/F42A/L70C/N71Q/L72G/P82C; (121)
 N26Q/G27C/N30S/F42A/N71Q/L72G/F78C; (122) N29S/F42A/N71Q/L72G; (123)
 N26Q/N30S/N71Q; (124) N26Q/Q11C/N71Q/L132C; (125) N26Q/L70C/N71Q/P82C;
 (126) N26Q/G27C/N71Q/F78C; (127) N26Q/NNYKNPKLTRMLTFKF ở các vị trí số
 29-44 được đột biến thành QSMHIDATL/N71Q; (128) N26Q/F42A/Y45A/N71Q; (129)
 N26Q/F42A/N71Q/L72G; (130) N26Q/Y45A/N71Q/L72G; (131)
 N26Q/F42A/Y45A/N71Q/L72G; (132) Q11C/N30S/N71Q/L132C; (133)
 N30S/L70C/N71Q/P82C; (134) G27C/N30S/N71Q/F78C; (135)
 N30S/F42A/Y45A/N71Q; (136) N30S/F42A/N71Q/L72G; (137)
 N30S/Y45A/N71Q/L72G; (138) N30S/F42A/Y45A/N71Q/L72G; (139)
 N29S/N30S/F42A/N71Q/L72G; (140) Q11C/F42A/Y45A/N71Q; (141)
 Q11C/F42A/N71Q/L72G/L132C; (142) Q11C/Y45A/N71Q/L72G/L132C; (143)
 Q11C/F42A/Y45A/N71Q/L72G/L132C; (144) Q11C/N29S/F42A/N71Q/L72G/L132C;
 (145) NNYKNPKLTRMLTFKF ở các vị trí số 29-44 được đột biến thành
 QSMHIDATL/L70C/ N71Q/P82C; (146) F42A/Y45A/L70C/N71Q/P82C; (147)
 F42A/L70C/N71Q/L72G/P82C; (148) Y45A/L70C/N71Q/L72G/P82C; (149)
 F42A/Y45A/L70C/N71Q/L72G/P82C; (150) N29S/F42A/L70C/N71Q/L72G/P82C;
 (151) G27C/NNYKNPKLTRMLTFKF ở các vị trí số 29-44 được đột biến thành
 QSMHIDATL/ N71Q/F78C; (152) G27C/F42A/Y45A/N71Q/F78C; (153)
 G27C/F42A/N71Q/L72G/F78C; (154) G27C/Y45A/N71Q/L72G/F78C; (155)
 G27C/F42A/Y45A/N71Q/L72G/F78C; (156) G27C/N29S/F42A/N71Q/L72G/F78C;
 (157) NNYKNPKLTRMLTFKF ở các vị trí số 29-44 được đột biến thành
 QSMHIDATL/ Y45A/N71Q; (158) NNYKNPKLTRMLTFKF ở các vị trí số 29-44
 được đột biến thành QSMHIDATL/ N71Q/L72G; (159) NNYKNPKLTRMLTFKF ở các
 vị trí số 29-44 được đột biến thành QSMHIDATL/Y45A/ N71Q/L72G; (160)
 N26Q/N30S/Q11C/N71Q/L132C; (161) N26Q/N30S/L70C/N71Q/P82C; (162)
 N26Q/G27C/N30S/N71Q/F78C; (163) N26Q/N30S/F42A/Y45A/N71Q; (164)

N26Q/N30S/F42A/N71Q/L72G; (165) N26Q/N30S/Y45A/N71Q/L72G; (166)
 N26Q/N30S/F42A/Y45A/N71Q/L72G; (167) N26Q/N29S/N30S/F42A/N71Q/L72G;
 (168) N26Q/N29S/N30S/N71Q; (169) N26Q/N29S/Q11C/N71Q/L132C; (170)
 N26Q/N29S/L70C/N71Q/P82C; (171) N26Q/N29S/G27C/N71Q/F78C; (172)
 N26Q/N29S/F42A/Y45A/N71Q; (173) N26Q/N29S/Y45A/N71Q/L72G; (174)
 N26Q/N29S/F42A/Y45A/N71Q/L72G; (175) Q11C/N29S/N30S/N71Q/L132C; (176)
 N29S/N30S/L70C/N71Q/P82C; (177) G27C/N29S/N30S/N71Q/F78C;(178)
 N29S/N30S/F42A/Y45A/N71Q; (179) N29S/N30S/F42A/N71Q/L72G; (180)
 N29S/N30S/Y45A/N71Q/L72G; (181) N29S/N30S/F42A/Y45A/N71Q/L72G; (182)
 Q11C/N29S/F42A/Y45A/N71Q/L132C; (183) Q11C/N29S/F42A/N71Q/L72G/L132C;
 (184) Q11C/N29S/Y45A/N71Q/L72G/L132C; (185)
 Q11C/N29S/F42A/Y45A/N71Q/L72G/L132C; (186)
 N29S/F42A/Y45A/L70C/N71Q/P82C; (187) N29S/F42A/L70C/N71Q/L72G/P82C;
 (188) N29S/Y45A/L70C/N71Q/L72G/P82C; (189)
 N29S/F42A/Y45A/L70C/N71Q/L72G/P82C; (190)
 G27C/N29S/F78C/F42A/Y45A/N71Q; (191) G27C/N29S/F78C/F42A/N71Q/L72G;
 (192) G27C/N29S/F78C/Y45A/N71Q/L72G; (193)
 G27C/N29S/F78C/F42A/Y45A/N71Q/L72G; (194) N29S/F42A/Y45A/N71Q; (195)
 N29S/F42A/N71Q/L72G; (196) N29S/Y45A/N71Q/L72G; (197)
 N29S/F42A/Y45A/N71Q/L72G; (198) Q11C/N29S/N71Q/L132C; (199)
 N29S/L70C/N71Q/P82C; (200) G27C/N29S/N71Q/F78C; (201) N29S/N30S/N71Q;
 (202) N26Q/N29S/N71Q; (203) N26Q/N88R; (204) N29S/N88R; (205) N30S/N88R;
 (206) N26Q/N88R/Q11C/L132C; (207) N29S/N88R/L70C/P82C; và (208)
 N30S/N88R/G27C/F78C; trong đó, “/” có nghĩa là các đột biến có mặt đồng thời trong
 biến thể interleukin-2 đơn. Theo một số phương án, các đột biến mô tả nêu trên có độ
 tương đồng nhất định với interleukin-2 thể đại, và trình tự axit amin của interleukin-2 thể
 đại được thể hiện trong SEQ ID NO. 2. Số thứ tự của vị trí đột biến được tính từ axit
 amin A ở vị trí thứ hai theo trình tự axit amin như được thể hiện trong SEQ ID NO. 2.

Theo một số phương án, biến thể interleukin-2 này hoặc dẫn xuất của nó chứa axit
 amin như được thể hiện trong trình tự bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO.4,
 SEQ ID NO.6, SEQ ID NO.8, SEQ ID NO.10, SEQ ID NO.12, SEQ ID NO.14, SEQ ID
 NO.16, SEQ ID NO.18, SEQ ID NO.20, SEQ ID NO.22, SEQ ID NO.24, SEQ ID

NO.26, SEQ ID NO.28, SEQ ID NO.30, SEQ ID NO.32, SEQ ID NO.34, SEQ ID NO.36 và SEQ ID NO.41. Các trình tự axit amin của các polypeptit và các trình tự nucleotit tương ứng được thể hiện trong Bảng 1 (phần được gạch chân thể hiện đột biến axit amin):

Bảng 1. Trình tự axit amin và trình tự axit nucleic của biến thể interleukin-2

Số thứ tự	Vị trí đột biến	Trình tự axit amin của interleukin-2 thể đại và các biến thể interleukin-2 của người	SEQ ID NO. tương ứng
IL-2-WT	Thể đại	MAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILN GINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATE LKHLQCLEEEELKPLEEVLNLAQSKNFH LRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEY ADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT (SEQ ID NO.2)	SEQ ID NO.1
IL-2-01	N26Q	MAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMIL <u>Q</u> GINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATE LKHLQCLEEEELKPLEEVLNLAQSKNFH LRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEY ADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT (SEQ ID NO.4)	SEQ ID NO.3
IL-2-02	N30S	MAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILN GIN <u>S</u> YKNPKLTRMLTFKFYMPKKATE LKHLQCLEEEELKPLEEVLNLAQSKNFH LRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEY ADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT (SEQ ID NO.6)	SEQ ID NO.5
IL-2-03	Q11C/L132C	MAPTSSSTKKT <u>C</u> LQLEHLLLDLQMILN GINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATE LKHLQCLEEEELKPLEEVLNLAQSKNFH LRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEY ADETATIVEFLNRWITFAQSIIST <u>C</u> T (SEQ ID NO.8)	SEQ ID NO.7
IL-2-04	L70C/P82C	MAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILN GINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATE LKHLQCLEEEELKPLEEVCNLAQSKNF HLR <u>C</u> RDLSNINVIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT (SEQ ID NO.10)	SEQ ID NO.9
IL-2-05	G27C/F78C	MAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILN <u>C</u> INNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATE LKHLQCLEEEELKPLEEVLNLAQSKN <u>C</u> HLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT (SEQ ID NO.12)	SEQ ID NO.11
IL-2-06	NNYKNPKLT RMLTFKF ở các vị trí số 29- 44 được đột biến thành QSMHIDATL	MAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILN <u>GIQSMHIDATL</u> YMPKKATELKHLQCL EEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLI SNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATI VEFLNRWITFAQSIISTLT (SEQ ID NO.14)	SEQ ID NO.13
IL-2-07	F42A/Y45A	MAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILN GINNYKNPKLTRMLT <u>A</u> KF <u>A</u> MPKKATE LKHLQCLEEEELKPLEEVLNLAQSKNFH	SEQ ID NO.15

		LRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEY ADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT (SEQ ID NO.16)	
IL-2-08	F42A/L72G	MAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILN GINNYKNPKLTRMLTAKFYMPKKATE LKHLQCLEEEELKPLEEVLNGAQSKNF HLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT (SEQ ID NO.18)	SEQ ID NO.17
IL-2-09	Y45A/L72G	MAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILN GINNYKNPKLTRMLTFKFAMPKKATE LKHLQCLEEEELKPLEEVLNGAQSKNF HLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT (SEQ ID NO.20)	SEQ ID NO.19
IL-2-10	N26Q/N30S/ F42A/L72G	MAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILQ GINSYKNPKLTRMLTAKFYMPKKATE LKHLQCLEEEELKPLEEVLNGAQSKNF HLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT (SEQ ID NO.22)	SEQ ID NO.21
IL-2-11	Q11C/N26Q/N 30S/F42A/ L72G/L132C	MAPTSSSTKKTCLQLEHLLLDLQMILQ GINSYKNPKLTRMLTAKFYMPKKATE LKHLQCLEEEELKPLEEVLNGAQSKNF HLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFAQSIISTCT (SEQ ID NO.24)	SEQ ID NO.23
IL-2-12	N26Q/N30S/ F42A/L70C/ L72G/P82C	MAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILQ GINSYKNPKLTRMLTAKFYMPKKATE LKHLQCLEEEELKPLEEVCNGAQSKNF HLRCRDLISNINVIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT (SEQ ID NO.26)	SEQ ID NO.25
IL-2-13	N26Q/G27C/N 30S/F42A/ L72G/F78C	MAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILQ CINSYKNPKLTRMLTAKFYMPKKATE LKHLQCLEEEELKPLEEVLNGAQSKNC HLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT (SEQ ID NO.28)	SEQ ID NO.27
IL-2-14	N29S/F42A /L72G	MAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILN GISNYKNPKLTRMLTAKFYMPKKATE LKHLQCLEEEELKPLEEVLNGAQSKNF HLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT (SEQ ID NO.30)	SEQ ID NO.29
IL-2-21	N26Q/N29S/F4 2A/L72G	MAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILQ GISNYKNPKLTRMLTAKFYMPKKATE LKHLQCLEEEELKPLEEVLNGAQSKNF HLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT (SEQ ID NO.32)	SEQ ID NO.31
IL-2-22	N26Q/N29S/F4 2A/N71Q/L72 G	MAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILQ GISNYKNPKLTRMLTAKFYMPKKATE LKHLQCLEEEELKPLEEVLQGAQSKNF HLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT	SEQ ID NO.33

		(SEQ ID NO.34)	
IL-2-23	NNYKNPKLT RMLTFKF ở vị trí số Q11C/29-44 được đột biến thành QSMHIDATL/ L132C	MAPTSSSTKKT <u>C</u> LQLEHLLLDLQMILN GI <u>QSMHIDATL</u> YMPKKATELKHLQCL EEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLI SNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATI VEFLNRWITFAQSIIST <u>C</u> T (SEQ ID NO.36)	SEQ ID NO.35
IL-2-24	N26Q/N29S/N8 8R	MAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMIL <u>Q</u> GI <u>S</u> NYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATE LKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFH LRPRDLIS <u>R</u> INVIVLELKGSETTFMCEY ADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT (SEQ ID NO.41)	SEQ ID NO.40

(Lưu ý: Các vị trí đột biến nêu trên được đánh số thứ tự theo protein interleukin-2 hoàn thiện của người như được thể hiện trong SEQ ID NO. 2. Protein interleukin-2 hoàn thiện của người không chứa axit amin M ở vị trí thứ nhất, do đó quá trình đánh số thứ tự được bắt đầu từ axit amin A ở vị trí thứ hai. Trong số các đột biến này, “/” có nghĩa là các đột biến có mặt đồng thời trong biến thể interleukin-2 đơn. Mỗi biến thể có thể chứa đột biến C125A hoặc không; trong đó sự có mặt của đột biến C125A là để ngăn ngừa hình thành dime).

Theo một số phương án, dẫn xuất của biến thể interleukin-2 bao gồm protein có chiều dài đầy đủ hoặc protein một phần của biến thể interleukin-2 theo sáng chế; hoặc bao gồm protein đột biến, dẫn xuất chức năng, mảnh chức năng, peptit có hoạt tính sinh học, protein dung hợp, dạng đồng phân hoặc muối của chúng được điều chế bằng cách tiếp tục gây đột biến trên cơ sở biến thể interleukin-2 theo sáng chế. Ví dụ, protein dung hợp chứa biến thể interleukin-2, monome hoặc dime hoặc trime hoặc polyme của biến thể interleukin-2, các dạng cải biến khác nhau của biến thể interleukin-2 (như dạng được gắn PEG, dạng được liên kết PEG, dạng được glycosyl hóa, dạng được tiếp hợp với albumin hoặc dạng được dung hợp với albumin, dạng được tiếp hợp với vùng Fc hoặc dạng được dung hợp với vùng Fc, dạng được hydroxyetyl hóa, dạng không được O-glycosyl hóa, v.v), và thể tương đồng của biến thể interleukin-2 trong các loài khác nhau. Việc cải biến của interleukin-2 không gây tác dụng không mong muốn đến khả năng sinh miễn dịch liên quan đến quá trình điều trị.

Theo một số phương án, biến thể interleukin-2 hoặc dẫn xuất của nó được gắn PEG (có thể được biểu diễn dưới dạng PEG-IL-2), ví dụ biến thể mono-PEG-IL-2 hoặc

biến thể di-PEG-IL-2 hoặc dẫn xuất của chúng. Biến thể PEG-IL-2 hoặc dẫn xuất của nó bao gồm nhóm liên kết SC-PEG. Theo các phương án khác, biến thể PEG-IL-2 hoặc dẫn xuất của nó bao gồm nhóm liên kết metoxy-PEG-aldehyt (mPEG-ALD). Theo một số phương án, khối lượng phân tử trung bình của gốc PEG nằm trong khoảng từ 5KD đến 50KD, cụ thể 5, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50 KD; hoặc nằm trong khoảng từ 5KD đến 40KD, hoặc nằm trong khoảng từ 10KD đến 30KD, hoặc nằm trong khoảng từ 10KD đến 30KD, hoặc nằm trong khoảng từ 15KD đến 20KD. Theo một số phương án, nhóm liên kết mPEG-ALD bao gồm phân tử PEG có khối lượng phân tử trung bình được chọn từ nhóm bao gồm khoảng 5KDa, khoảng 12KDa, và khoảng 20KDa. Theo một số phương án, nhóm aldehyt trong mPEG-ALD có thể là axetaldehyt, propionaldehyt, butyraldehyt, hoặc các nhóm tương tự. Theo một phương án, biến thể interleukin-2 theo sáng chế hoặc dẫn xuất của nó có thời gian bán thải trong huyết thanh được kéo dài, khi so với thời gian bán thải trong huyết thanh của interleukin-2 thể đại hoặc dẫn xuất của nó.

Khi biến thể interleukin-2 này hoặc dẫn xuất của nó chứa loại đột biến thứ hai, theo một số phương án, biến thể interleukin-2 theo sáng chế hoặc dẫn xuất của nó có thể hoạt hóa một hoặc nhiều đáp ứng tế bào được chọn từ nhóm bao gồm: tăng sinh tế bào lympho T được hoạt hóa, biệt hóa tế bào lympho T được hoạt hóa, hoạt tính của tế bào T gây độc tế bào, tăng sinh tế bào B được hoạt hóa, biệt hóa tế bào B được hoạt hóa, tăng sinh tế bào giết tự nhiên biệt hóa tế bào giết tự nhiên, bài tiết xytokin bởi tế bào T được hoạt hóa hoặc tế bào giết tự nhiên, và hoạt tính gây độc tế bào kháng khối u của tế bào giết được hoạt hóa bởi tế bào giết tự nhiên/tế bào lympho. Theo một số phương án, biến thể interleukin-2 theo sáng chế hoặc dẫn xuất của nó có khả năng cảm ứng truyền tín hiệu interleukin-2 trong tế bào T điều hòa được giảm, khi so với khả năng cảm ứng truyền tín hiệu interleukin-2 trong tế bào T điều hòa của polypeptit interleukin-2 thể đại. Theo một phương án, biến thể interleukin-2 theo sáng chế hoặc dẫn xuất của nó bao gồm có hoạt tính cảm ứng hoạt hóa gây chết tế bào trong tế bào T nhỏ hơn interleukin-2 thể đại hoặc dẫn xuất của nó. Theo một số phương án, biến thể interleukin-2 theo sáng chế hoặc dẫn xuất của nó độc tính *in vivo* được giảm khi so với độc tính *in vivo* của interleukin-2 thể đại hoặc dẫn xuất của nó.

Khi biến thể interleukin-2 này hoặc dẫn xuất của nó chứa loại đột biến thứ ba, theo một số phương án, biến thể interleukin-2 theo sáng chế hoặc dẫn xuất của nó có thể làm

giảm ái lực của interleukin-2 với cả thụ thể ái lực cao (IL-2R α / β / γ) và thụ thể ái lực trung bình (IL-2R β / γ), tuy nhiên mức độ suy giảm ái lực với thụ thể ái lực cao cao hơn mức độ suy giảm ái lực với thụ thể ái lực trung bình. Theo một số phương án, biến thể interleukin-2 theo sáng chế hoặc dẫn xuất của nó có thể duy trì tác dụng của interleukin-2 để cảm ứng tăng sinh và hoạt hóa tế bào T điều hòa, nhưng loại bỏ hoặc làm giảm tác dụng của interleukin-2 để cảm ứng tăng sinh và hoạt hóa tế bào tác động (như tế bào giết tự nhiên và tế bào T).

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến thể tiếp hợp miễn dịch in which biến thể interleukin-2 theo sáng chế hoặc dẫn xuất của nó được liên kết trực tiếp hoặc liên kết gián tiếp với cấu trúc không interleukin-2 thông qua gốc liên kết. Theo một số phương án, thể tiếp hợp miễn dịch là thể tiếp hợp miễn dịch, trong đó cấu trúc không interleukin-2 này là cấu trúc gắn kết kháng nguyên. Theo một số phương án, cấu trúc gắn kết kháng nguyên hướng đích kháng nguyên có mặt trong tế bào khối u hoặc môi trường của tế bào khối u.

Theo một số phương án, biến thể interleukin-2 được liên kết với ít nhất một cấu trúc không interleukin-2. Theo một số phương án, biến thể interleukin-2 và cấu trúc không interleukin-2 tạo ra protein dung hợp, có nghĩa là biến thể interleukin-2 chia sẻ liên kết peptit với cấu trúc không interleukin-2. Theo một số phương án, biến thể interleukin-2 được liên kết với ít nhất một cấu trúc không interleukin-2, như cấu trúc không interleukin-2 thứ nhất và cấu trúc không interleukin-2 thứ hai. Theo một số phương án, cấu trúc không interleukin-2 này là cấu trúc gắn kết kháng nguyên. Theo một số phương án, biến thể interleukin-2 chia sẻ liên kết peptit với cấu trúc gắn kết kháng nguyên thứ nhất ở đầu tận cùng amin hoặc đầu tận cùng carboxyl, và cấu trúc gắn kết kháng nguyên thứ hai chia sẻ liên kết peptit với các gốc sau ở đầu tận cùng amin hoặc đầu tận cùng carboxyl: i) biến thể interleukin-2; hoặc ii) cấu trúc gắn kết kháng nguyên thứ nhất. Theo một số phương án, biến thể interleukin-2 chia sẻ liên kết peptit với cấu trúc không interleukin-2 thứ nhất ở đầu tận cùng carboxyl, và chia sẻ liên kết peptit với cấu trúc không interleukin-2 thứ hai ở đầu tận cùng amin. Theo một số phương án, cấu trúc không interleukin-2 này là cấu trúc gắn kết kháng nguyên. Cấu trúc gắn kết kháng nguyên có thể là kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở phân tử globulin miễn dịch (ví dụ, phân tử tương tự globulin miễn dịch IgG (ví dụ, IgG1)), kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó. Theo một số phương án,

kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó được chọn từ: phức hợp polypeptit chứa vùng biến đổi chuỗi nặng kháng thể và vùng biến đổi chuỗi nhẹ kháng thể, Fab, Fv, sFv, F(ab')₂, kháng thể mạch thẳng, kháng thể chuỗi đơn, scFv, sdAb, sdFv, kháng thể có kích cỡ nano, kháng thể peptit, kháng thể miễn và kháng thể đa đặc hiệu (kháng thể đặc hiệu kép, kháng thể chứa hai mảnh globulin miễn dịch, kháng thể chứa ba mảnh globulin miễn dịch và kháng thể chứa bốn mảnh globulin miễn dịch, hai scFv tiếp đôi, ba scFv tiếp đôi). Khi biến thể interleukin-2 được liên kết với nhiều hơn một cấu trúc gắn kết kháng nguyên (ví dụ cấu trúc gắn kết kháng nguyên thứ nhất và cấu trúc gắn kết kháng nguyên thứ hai), mỗi cấu trúc gắn kết kháng nguyên có thể độc lập được chọn từ các dạng khác nhau của kháng thể và mảnh gắn kết kháng nguyên, ví dụ cấu trúc gắn kết kháng nguyên thứ nhất có thể là phân tử Fab, và cấu trúc gắn kết kháng nguyên thứ hai có thể là phân tử scFv, hoặc mỗi cấu trúc gắn kết kháng nguyên thứ nhất và cấu trúc gắn kết kháng nguyên thứ hai là phân tử scFv, hoặc mỗi cấu trúc gắn kết kháng nguyên thứ nhất và cấu trúc gắn kết kháng nguyên thứ hai là phân tử Fab. Theo một số phương án, khi biến thể interleukin-2 được liên kết với nhiều hơn một cấu trúc gắn kết kháng nguyên (ví dụ cấu trúc gắn kết kháng nguyên thứ nhất và cấu trúc gắn kết kháng nguyên thứ hai), kháng nguyên được hướng đích bởi mỗi cấu trúc gắn kết kháng nguyên có thể độc lập được chọn, ví dụ cấu trúc gắn kết kháng nguyên thứ nhất và cấu trúc gắn kết kháng nguyên thứ hai được hướng đích chống lại các kháng nguyên khác nhau hoặc hướng đích chống lại cùng một kháng nguyên.

Theo một số phương án, kháng nguyên được gắn kết bởi cấu trúc gắn kết kháng nguyên có thể là được chọn từ nhóm bao gồm: miền A1 của tenascin C (TNC A1), miền A2 của tenascin C (TNC A2), miền ngoại bào của fibronectin (miền ngoại bào B) (EDB), kháng nguyên ung thư biểu mô phôi (CEA) và chondroitin sulfat proteoglycan liên quan đến bệnh u melanin (MCSP). Theo một số phương án, kháng nguyên khối u bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở MAGE, MART-1/Melan-A, gp100, dipeptidyl peptidaza IV (DPPIV), protein gắn kết adenosin deaminaza (ADAbp), cyclophilin b, kháng nguyên liên quan đến đại trực tràng (CRC)-C017-1A/GA733, kháng nguyên ung thư biểu mô phôi (CEA) và epitop sinh miễn dịch của nó CAP-1 và CAP-2, etv6, aml1, kháng nguyên đặc hiệu tuyến tiền liệt (PSA) và epitop sinh miễn dịch của nó PSA-1, PSA-2 và PSA-3, kháng nguyên màng đặc hiệu tuyến tiền liệt (PSMA), thụ thể tế bào T/chuỗi CD3-zeta, họ MAGE của kháng nguyên khối u (như MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4,

MAGE-A5, MAGE-A6, MAGE-A7, MAGE-A8, MAGE-A9, MAGE-A10, MAGE-A11, MAGE-A12, MAGE-Xp2 (MAGE-B2), MAGE-Xp3 (MAGE-B3), MAGE-Xp4 (MAGE-B4), MAGE-C1, MAGE-C2, MAGE-C3, MAGE-C4, MAGE-C5), họ GAGE của kháng nguyên khối u (ví dụ GAGE-1, GAGE-2, GAGE-3, GAGE-4, GAGE-5, GAGE-6, GAGE-7, GAGE-8, GAGE-9), BAGE, RAGE, LAGE-1, NAG, GnT-V, MUM-1, CDK4, tyrosinaza, p53, họ MUC, HER2/neu, p21ras, RCAS1, α -fetoprotein, E-cadherin, α -catenin, β -catenin và γ -catenin, P120ctn, gp100Pmel117, PRAME, NY-ESO-1, cdc27, protein adenomatous polyposis coli (APC), fodrin, connexin 37, Ig idiotype, p15, gp75, GM2 và GD2 gangliosit, sản phẩm virus (như protein virus gây bệnh u nhú ở người), họ Smad của kháng nguyên khối u, Imp-1, P1A, kháng nguyên nhân mã hóa bởi EBV (EBNA)-1, glycogen phosphorylaza não, SSX-1, SSX-2 (HOM-MEL-40), SSX-1, SSX-4, SSX-5, SCP-1 và CT-7 và c-erbB-2. Theo một số phương án, ví dụ không giới hạn về kháng nguyên virus bao gồm hemagglutinin virus cúm, LMP-1 virus Epstein-Barr, glycoprotein E2 virus viêm gan C, HIV gp160, và HIV gp120. Theo một số phương án, ví dụ không giới hạn về kháng nguyên ECM bao gồm syndecan, heparanaza, integrin, osteopontin, link, cadherin, laminin, EGF-type laminin, lectin, fibronectin, notch, tenascin và matrixin.

Theo một số phương án, biến thể interleukin-2 theo sáng chế hoặc dẫn xuất của nó chứa cấu trúc gắn kết kháng nguyên mô tả nêu trên, bao gồm loại đột biến thứ hai, nhưng không chứa loại đột biến thứ ba.

Theo một số phương án, sáng chế đề cập đến phương pháp làm tăng độ ổn định của interleukin-2 hoặc dẫn xuất hoặc thể tiếp hợp miễn dịch của nó, bao gồm bước chèn các đột biến vào interleukin-2 hoặc dẫn xuất hoặc thể tiếp hợp miễn dịch của nó, trong đó các đột biến này là đột biến bất kỳ trong số các đột biến 1) đến 7) hoặc tổ hợp của chúng: 1) N26Q, 2) N29S, 3) N30S, 4) N71Q, 5) Q11C và L132C, 6) L70C và P82C, và 7) G27C và F78C.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến dược phẩm, chứa biến thể interleukin-2 theo sáng chế hoặc dẫn xuất của nó hoặc thể tiếp hợp miễn dịch mô tả nêu trên, tùy ý chứa tá dược pha loãng, chất mang hoặc chất hỗ trợ dược dụng. Dược phẩm có thể là chế phẩm đông khô hoặc dung dịch tiêm.

Theo một số phương án, dược phẩm này có thể chứa biến thể interleukin-2 này hoặc dẫn xuất của nó hoặc thể tiếp hợp miễn dịch ở liều đơn vị ở hàm lượng nằm trong khoảng từ 0,01% đến 99% khối lượng; dược phẩm này có thể chứa biến thể interleukin-2 này hoặc dẫn xuất của nó hoặc thể tiếp hợp miễn dịch ở liều đơn vị ở lượng nằm trong khoảng từ 0,1mg đến 2000mg (ví dụ nằm trong khoảng từ 1mg đến 1000mg).

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến axit nucleic mã hóa biến thể interleukin-2 theo sáng chế hoặc dẫn xuất của nó mô tả nêu trên. Axit nucleic bao gồm polynucleotit có trình tự như nêu trong trình tự bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO.3, SEQ ID NO.5, SEQ ID NO.7, SEQ ID NO.9, SEQ ID NO.11, SEQ ID NO.13, SEQ ID NO.15, SEQ ID NO.17, SEQ ID NO.19, SEQ ID NO.21, SEQ ID NO.23, SEQ ID NO.25, SEQ ID NO.27, SEQ ID NO.29, SEQ ID NO.31, SEQ ID NO.33, SEQ ID NO.35, và SEQ ID NO.40.

Theo một số phương án, sáng chế đề cập đến vector biểu hiện chứa axit nucleic mã hóa biến thể interleukin-2 theo sáng chế hoặc dẫn xuất của nó mô tả nêu trên.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến tế bào vật chủ biểu hiện vector mô tả nêu trên. Tế bào vật chủ có thể là tế bào nhân sơ hoặc tế bào nhân thật. Theo một số phương án, tế bào vật chủ này là tế bào vi khuẩn, tế bào nấm men hoặc tế bào động vật vú; cụ thể *Pichia pastoris* hoặc *Saccharomyces cerevisiae*.

Theo một số phương án, tế bào vật chủ bao gồm (ví dụ, đã được biến nạp hoặc chuyển nhiễm với) vector chứa polynucleotit mã hóa trình tự axit amin của biến thể interleukin-2 theo sáng chế hoặc dẫn xuất của nó, hoặc thể tiếp hợp miễn dịch mô tả nêu trên. Tế bào vật chủ bao gồm sinh vật nhân sơ (như *Escherichia coli*) hoặc các tế bào nhân thật khác nhau (như tế bào buồng trứng chuột đồng Trung Quốc (CHO), tế bào thận phôi người (HEK) hoặc tế bào lympho (như tế bào Y0, tế bào NS0, tế bào Sp20), tế bào côn trùng, v.v). Theo một số phương án, tế bào vật chủ biểu hiện polypeptit được glycosyl hóa có thể được sử dụng, có nguồn gốc từ sinh vật đa bào (ví dụ động vật không xương sống và động vật có xương sống), như tế bào thực vật và tế bào côn trùng. Tế bào động vật có xương sống cũng có thể được sử dụng làm tế bào vật chủ, ví dụ dòng tế bào của động vật có vú được duy trì ở trạng thái hỗn dịch, dòng tế bào thận khỉ CV1 (COS-7), dòng tế bào thận phôi người (tế bào 293 hoặc tế bào 293T), tế bào thận của chuột đồng mới sinh (BHK), tế bào sertoli chuột nhắt (tế bào TM4), tế bào thận khỉ (CV1), tế

bào thận khỉ mông xanh Châu Phi (VERO-76), tế bào ung thư cổ tử cung ở người (HELA), tế bào thận chó (MDCK), tế bào gan chuột cống (BRL3A), tế bào phổi người (W138), tế bào gan người (Hep G2), tế bào khối u vú chuột nhắt (MMT060562), tế bào TRI (ví dụ, các tế bào được mô tả trong tài liệu Mather et al., *Annals N.Y. Acad Sci* 383, 44-68 (1982)), tế bào MRC5 và tế bào FS4, tế bào buồng trứng chuột đồng Trung Quốc (CHO), dòng tế bào u tủy như YO, NS0, P3X63 và Sp2/0, và tế bào chứa trong động vật chuyển gen, thực vật chuyển gen hoặc thực vật được gieo trồng hoặc mô động vật.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế mô tả sử dụng biến thể interleukin-2 này hoặc dẫn xuất của nó, thể tiếp hợp miễn dịch hoặc được phẩm chứa biến thể interleukin-2 này hoặc dẫn xuất của nó mô tả nêu trên để sản xuất thuốc.

Biến thể interleukin-2 theo sáng chế hoặc dẫn xuất của nó sẽ được sử dụng để điều trị bệnh tăng sinh, bệnh miễn dịch, điều hòa đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào T, kích thích hệ miễn dịch ở đối tượng, và sử dụng để sản xuất thuốc liên quan, khi biến thể này chứa loại đột biến thứ hai. Bệnh tăng sinh có thể là khối u hoặc bệnh ung thư (ví dụ, khối u di căn hoặc bệnh ung thư di căn), và có thể là khối u rắn (ví dụ, bệnh ung thư biểu mô tế bào thận di căn và bệnh u melanin ác tính). Theo một số phương án, biến thể interleukin-2 theo sáng chế hoặc dẫn xuất của nó hoặc thể tiếp hợp miễn dịch của nó theo sáng chế có thể được sử dụng để điều trị bệnh hoặc tình trạng bệnh sẽ được điều trị hữu hiệu khi kích thích hệ miễn dịch ở vật chủ, đặc biệt là các tình trạng bệnh cần tăng cường đáp ứng miễn dịch tế bào; các tình trạng bệnh như vậy bao gồm đáp ứng miễn dịch không đầy đủ hoặc thiếu hụt của vật chủ. Theo một số phương án, bệnh hoặc tình trạng bệnh sẽ được điều trị bằng biến thể interleukin-2 theo sáng chế hoặc dẫn xuất của nó hoặc thể tiếp hợp miễn dịch của nó là khối u hoặc bệnh lây nhiễm, trong đó đáp ứng miễn dịch tế bào là cơ chế miễn dịch đặc hiệu chính đối với khối u hoặc bệnh lây nhiễm này, như bệnh ung thư (ví dụ, bệnh ung thư biểu mô tế bào thận hoặc bệnh u melanin), tình trạng suy giảm miễn dịch (như đối tượng dương tính với HIV, đối tượng bị ức chế miễn dịch), bệnh lây nhiễm mãn tính, v.v Theo một số phương án, đáp ứng miễn dịch tế bào được tăng cường có thể bao gồm một hoặc nhiều đáp ứng bất kỳ sau: chức năng miễn dịch được gia tăng, chức năng tế bào T được gia tăng, chức năng tế bào B được gia tăng, chức năng tế bào lympho được phục hồi, tăng biểu hiện thụ thể interleukin-2, đáp ứng tế bào T được gia tăng, hoạt tính của tế bào giết tự nhiên được gia tăng hoặc hoạt tính của tế bào giết được hoạt hóa bởi lymphokine được gia tăng, v.v. Theo một số phương án, bệnh được điều trị

bằng biến thể interleukin-2 theo sáng chế hoặc dẫn xuất của nó hoặc thể tiếp hợp miễn dịch của nó theo sáng chế là bệnh tăng sinh, như bệnh ung thư. Ví dụ không giới hạn về bệnh ung thư bao gồm bệnh ung thư bàng quang, bệnh ung thư não, bệnh ung thư đầu và cổ, bệnh ung thư tuyến tụy, bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư tử cung, bệnh ung thư cổ tử cung, bệnh ung thư nội mạc tử cung, bệnh ung thư thực quản, bệnh ung thư đại tràng, bệnh ung thư đại trực tràng, bệnh ung thư trực tràng, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh ung thư máu, bệnh ung thư da, bệnh ung thư tế bào vảy, bệnh ung thư xương và bệnh ung thư thận. Các rối loạn tăng sinh tế bào khác có thể được điều trị bằng biến thể interleukin-2 theo sáng chế hoặc dẫn xuất của nó theo sáng chế bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, khối u ác tính ở các vị trí sau: bụng, xương, vú, hệ tiêu hóa, gan, tuyến tụy, màng bụng, tuyến nội tiết (tuyến thượng thận, tuyến cận giáp, tuyến yên, tinh hoàn, buồng trứng, tuyến ức, tuyến giáp), mắt, đầu và cổ, hệ thần kinh (trung ương và ngoại vi), hệ bạch huyết, xương chậu, da, mô mềm, lá lách, ngực, và hệ sinh dục. Rối loạn còn bao gồm tình trạng hoặc tổn thương tiền ung thư và tình trạng di căn ung thư. Theo một số phương án, bệnh ung thư được chọn từ nhóm bao gồm bệnh ung thư biểu mô tế bào thận, bệnh ung thư da, bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư đại trực tràng, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư não, bệnh ung thư đầu và cổ. Tương tự, các rối loạn tăng sinh tế bào khác cũng có thể được điều trị bằng biến thể interleukin-2 theo sáng chế hoặc dẫn xuất của nó theo sáng chế, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở: chứng tăng gama globulin máu, rối loạn tăng sinh lympho, chứng paraprotein máu, ban xuất huyết, bệnh u hạt, hội chứng Sezary, chứng macroglobulin máu Waldenström, bệnh Gaucher, hội chứng mô bào; và bệnh tăng sinh tế bào bất kỳ ở hệ cơ quan được liệt kê nêu trên, khác với chứng tạo u. Theo các phương án khác, bệnh bao gồm hội chứng thải loại mảnh ghép tự miễn, đáp ứng miễn dịch sau chấn thương, và bệnh truyền nhiễm (như HIV).

Biến thể interleukin-2 theo sáng chế hoặc dẫn xuất của nó sẽ được sử dụng để điều trị bệnh tự miễn hoặc làm giảm/điều trị/phòng ngừa phản ứng tự miễn do cấy ghép cơ quan, khi biến thể này chứa loại đột biến thứ ba. Bệnh tự miễn có thể là được chọn từ nhóm bao gồm: bệnh đái tháo đường typ I, bệnh viêm khớp dạng thấp, bệnh xơ cứng rải rác, bệnh viêm dạ dày mãn tính, bệnh Crohn, bệnh Basedow, bệnh Bechterew, bệnh vẩy nến, bệnh nhược cơ, bệnh viêm gan tự miễn, hội chứng APECED, hội chứng Churg-Strauss, bệnh viêm loét đại tràng, bệnh viêm cầu thận, hội chứng Guillain-Barré, Bệnh

viêm tuyến giáp hashimoto, bệnh lichen xơ hóa, bệnh lupus ban đỏ hệ thống, hội chứng PANDAS, bệnh thấp tim, bệnh u hạt, hội chứng Sjogren, hội chứng Stiff-Man, bệnh xơ cứng bì, bệnh u hạt Wegener, bệnh bạch biến, bệnh ruột tự miễn, hội chứng viêm thận xuất huyết phổi (hội chứng Goodpasture), bệnh viêm da cơ, bệnh viêm đa cơ, bệnh dị ứng tự miễn và bệnh hen phế quản. Theo một số phương án, biến thể interleukin-2 theo sáng chế hoặc dẫn xuất của nó có thể được sử dụng kết hợp với hoạt chất ức chế miễn dịch. Theo một số phương án, hoạt chất ức chế miễn dịch được chọn từ nhóm bao gồm: glucocorticoid bao gồm decortin và prednisol; azathioprin; cyclosporin A; mycophenolat mofetil; tacrolimus; globulin kháng tế bào lympho T, kháng thể kháng CD3 bao gồm muromonab; kháng thể kháng CD25 bao gồm basiliximab và daclizumab; kháng thể kháng TNF- α bao gồm infliximab và adalimumab; azathioprin; methotrexate; cyclosporin; sirolimus; everolimus; fingolimod; CellCept; myfortic natri bao tan trong ruột (myfortic); và cyclophosphamid.

Theo một số phương án, biến thể interleukin-2 theo sáng chế hoặc dẫn xuất của nó hoặc thể tiếp hợp miễn dịch của nó không thể chữa khỏi bệnh hoàn toàn mà chỉ có thể chữa được một phần. Theo một số phương án, các thay đổi sinh lý có một số lợi ích cũng được coi là có lợi về mặt điều trị. Do đó, theo một số phương án, lượng của biến thể interleukin-2 này hoặc dẫn xuất của nó, thể tiếp hợp miễn dịch của nó tạo ra thay đổi sinh lý được xem là “lượng hữu hiệu” hoặc “lượng hữu hiệu điều trị bệnh”. Đối tượng, đối tượng bị bệnh hoặc đối tượng cần điều trị thường là động vật có vú, và cụ thể hơn là người.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp sử dụng biến thể interleukin-2 theo sáng chế hoặc dẫn xuất của nó hoặc thể tiếp hợp miễn dịch của nó theo sáng chế cho đối tượng, trong đó biến thể interleukin-2 theo sáng chế hoặc dẫn xuất của nó hoặc thể tiếp hợp miễn dịch của nó được sử dụng ít nhất hai lần một ngày, ít nhất một lần một ngày, ít nhất 48 giờ một lần, ít nhất 72 giờ một lần, ít nhất mỗi tuần một lần, ít nhất 2 tuần một lần, ít nhất mỗi tháng một lần, ít nhất 2 tháng một lần hoặc ít nhất 3 tháng một lần. Interleukin-2 có thể được sử dụng theo đường đưa thuốc hữu hiệu bất kỳ, ví dụ đường tiêm bao gồm tiêm dưới da biến thể interleukin-2 này hoặc dẫn xuất của nó, hoặc thể tiếp hợp miễn dịch của nó.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất biến thể interleukin-2 hoặc dẫn xuất hoặc thể tiếp hợp miễn dịch của nó, bao gồm bước đưa các đột biến của biến thể interleukin-2 mô tả nêu trên vào interleukin-2 thể đại của người, hoặc bước sử dụng trình tự axit nucleic mô tả nêu trên, hoặc bước sử dụng vector biểu hiện mô tả nêu trên, hoặc bước sử dụng tế bào vật chủ mô tả nêu trên. Phương pháp sản xuất biến thể interleukin-2 được mô tả trong WO2012/107417 được kết hợp vào sáng chế bằng cách viện dẫn.

Mô tả vắn tắt hình vẽ

Fig.1A-Fig.1F là đồ thị thể hiện kết quả thử nghiệm độ ổn định nhiệt của interleukin-2 thể đại (WT) và các biến thể tương ứng của nó bao gồm IL-2-01, IL-2-02, IL-2-03, IL-2-04 và IL-2-05.

Fig.2 là đồ thị thể hiện ái lực của interleukin-2 thể đại (WT) và các biến thể của nó bao gồm IL-2-01, IL-2-02, IL-2-03, IL-2-04, IL-2-05, IL-2-06, IL-2-07, IL-2-08, IL-2-09 và IL-2-13 với thụ thể IL-2R α được phát hiện bằng thử nghiệm ELISA.

Fig.3A-Fig.3C là đồ thị thể hiện các kết quả thử nghiệm cho thấy quá trình tăng sinh tế bào CTLL2 được tạo điều kiện thuận lợi bởi IL-2-10, IL-2-22, IL-2-23 và IL-2-10 được gắn PEG, IL-2-22 được gắn PEG, và IL-2-23 được gắn PEG, được phát hiện bằng thử nghiệm ELISA.

Fig.4A-Fig.4C là đồ thị thể hiện các kết quả thử nghiệm cho thấy quá trình tăng sinh tế bào Mo7e được tạo điều kiện thuận lợi bởi IL-2-10, IL-2-22, IL-2-23 và IL-2-10 được gắn PEG, IL-2-22 được gắn PEG, và IL-2-23 được gắn PEG, được phát hiện bằng thử nghiệm ELISA.

Fig.5 là đồ thị thể hiện các kết quả thử nghiệm phosphoryl hóa STAT5 trong các tế bào CTLL2 đối với IL-2-01, IL-2-02, IL-2-07, IL-2-08, và IL-2-09, được phát hiện bằng phương pháp đếm tế bào theo dòng chảy.

Fig.6A-Fig.6C là đồ thị thể hiện các kết quả thử nghiệm phosphoryl hóa STAT5 các tế bào T điều hòa máu ngoại vi của người (Fig.6A), tế bào T biểu hiện CD8 (Fig.6B) và tế bào giết tự nhiên (Fig.6C) tương ứng được kích thích bởi IL-2-10, IL-2-22, IL-2-23 và IL-2-10 được gắn PEG, IL-2-22 được gắn PEG, và IL-2-23 được gắn PEG.

Fig.7A-Fig.7D là đồ thị thể hiện các kết quả thử nghiệm cho thấy tác dụng của PEG-IL-2-22 đến số lượng tương ứng của tế bào giết tự nhiên của chuột nhắt (Fig.7A), tế bào T biểu hiện CD8 của chuột nhắt (Fig.7B), tế bào T biểu hiện CD4 của chuột nhắt (Fig.7C) và tế bào T điều hòa của chuột nhắt (Fig.7D).

Fig.8A-Fig.8C là đồ thị thể hiện các kết quả thử nghiệm cho thấy tác dụng của PEG-IL-2-24 đến số lượng tương ứng của tế bào T biểu hiện CD8 của chuột nhắt (Fig.8A), tế bào T biểu hiện CD4 của chuột nhắt (Fig.8B), và tế bào T điều hòa của chuột nhắt (Fig.8C); Fig.8D- Fig.8F là đồ thị tương ứng thể hiện tỷ lệ phần trăm của tế bào T biểu hiện CD8 so với tế bào T biểu hiện CD3 (Fig.8D), tỷ lệ phần trăm của tế bào T biểu hiện CD4 so với tế bào T biểu hiện CD3 (Fig.8E), và tỷ lệ phần trăm của tế bào T điều hòa so với tế bào T biểu hiện CD4 (Fig.8F).

Fig.9 là đồ thị thể hiện kết quả đánh giá tác dụng kháng khối u của PEG-IL-2-22 trên mô hình chuột nhắt CT26 bị bệnh ung thư đại tràng.

Fig.10 là đồ thị thể hiện kết quả đánh giá tác dụng kháng khối u của PEG-IL-2-22 trên mô hình chuột nhắt NCG được cấy ghép dưới da với tế bào bệnh u melanin của người A375 được trộn với tế bào đơn nhân máu ngoại vi của người.

Mô tả chi tiết sáng chế

Để mô tả chi tiết hơn sáng chế, một số thuật ngữ kỹ thuật và khoa học được thể hiện cụ thể dưới đây. Trừ khi có quy định khác, toàn bộ các thuật ngữ kỹ thuật và khoa học khác được sử dụng trong sáng chế có nghĩa thông thường được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này.

Mã một ký tự và mã ba ký tự được sử dụng trong sáng chế để mô tả các axit amin được mô tả trong J. Biol. Chem. 243, p. 3558 (1968).

Thuật ngữ “interleukin-2” hoặc “IL-2” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ IL-2 tự nhiên bất kỳ từ nguồn động vật có xương sống bất kỳ, bao gồm động vật có vú như động vật linh trưởng (như người) và động vật gặm nhấm (như chuột nhắt và chuột cống). Thuật ngữ này cũng được sử dụng trong bản mô tả để chỉ IL-2 chưa được xử lý cũng như dạng được xử lý bất kỳ của interleukin-2 có nguồn gốc từ tế bào. Thuật ngữ này cũng được sử dụng trong bản mô tả để chỉ biến thể interleukin-2 có trong tự nhiên, như biến thể ghép nối hoặc biến thể alen. Trình tự axit amin cụ thể của interleukin-2 thể đại của

người được thể hiện trong SEQ ID NO.2. IL-2 của người chưa được xử lý còn bao gồm peptit tín hiệu chứa 20 axit amin ở đầu tận cùng N (như được thể hiện trong SEQ ID NO.272 trong WO2012107417), và peptit tín hiệu không có mặt trong các phân tử IL-2 hoàn chỉnh.

Thuật ngữ “đột biến axit amin” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ đột biến thay thế, đột biến loại bỏ, đột biến chèn thêm, đột biến cải biến và tổ hợp bất kỳ của chúng để thu được cấu trúc cuối cùng sao cho cấu trúc cuối cùng có đặc tính mong muốn, như độ ổn định được tăng cường. Đột biến loại bỏ và đột biến chèn thêm trình tự axit amin bao gồm đột biến loại bỏ và đột biến chèn thêm các axit amin ở đầu tận cùng amin và/hoặc đầu tận cùng carboxyl. Ví dụ về đột biến loại bỏ ở đầu tận cùng là đột biến loại bỏ gốc alanin ở vị trí thứ nhất của IL-2 của người có chiều dài đầy đủ. Đột biến axit amin được ưu tiên là đột biến thay thế axit amin. Ví dụ, để thay đổi ái lực gắn kết của polypeptit interleukin-2, các axit amin không bảo thủ có thể được thay thế (tức là một axit amin có thể được thay thế bằng một axit amin khác có cấu trúc và/hoặc đặc tính hóa học khác). Đột biến thay thế axit amin được ưu tiên bao gồm đột biến thay thế axit amin thân nước cho axit amin kỵ nước. Đột biến thay thế axit amin bao gồm đột biến thay thế axit amin không có trong tự nhiên hoặc dẫn xuất của 20 axit amin chuẩn có trong tự nhiên (ví dụ 4-hydroxy prolin, 3-metyl histidin, ornithin, homo-serin, 5-hydroxy lysin). Đột biến axit amin có thể được tạo ra bằng cách sử dụng các phương pháp hóa học hoặc di truyền đã biết trong lĩnh vực này, bao gồm các phương pháp như phương pháp đột biến điểm, phương pháp PCR, phương pháp tổng hợp gen, và phương pháp cải biến hóa học.

Thuật ngữ “interleukin-2 thể đại” là tương tự như biến thể polypeptit IL-2 chỉ khác là interleukin-2 thể đại là dạng của interleukin-2 có axit amin thể đại ở mỗi vị trí tương ứng với mỗi vị trí của biến thể polypeptit interleukin-2. Ví dụ, khi biến thể interleukin-2 là IL-2 có chiều dài đầy đủ (tức là IL-2 không được tiếp hợp hoặc dung hợp với phân tử bất kỳ khác), thì dạng thể đại của biến thể này là IL-2 tự nhiên có chiều dài đầy đủ. Khi biến thể interleukin-2 là protein dung hợp của interleukin-2 với một polypeptit mã hóa khác nằm sau interleukin-2 (như chuỗi kháng thể), thì dạng thể đại của biến thể IL-2 như vậy là IL-2 có trình tự axit amin IL-2 thể đại được dung hợp với cùng polypeptit nằm sau. Ngoài ra, khi biến thể interleukin-2 là dạng được cắt ngắn của interleukin-2 (trình tự trong đó các đột biến hoặc các cải biến được tạo ra trong phần không được cắt ngắn của interleukin-2), thì dạng thể đại của biến thể IL-2 như vậy là tương tự IL-2 được cắt ngắn

có trình tự thể đại. Để so sánh ái lực gắn kết với thụ thể IL-2 hoặc hoạt tính sinh học giữa các dạng khác nhau của biến thể interleukin-2 và các dạng thể đại tương ứng của interleukin-2, thuật ngữ “thể đại” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ IL-2 có trong tự nhiên, IL-2 tự nhiên, dạng IL-2 chứa một hoặc nhiều đột biến axit amin không ảnh hưởng đến gắn kết với thụ thể IL-2, ví dụ đột biến thay thế alanin cho xystein ở vị trí tương ứng với gốc thứ 125 của IL-2 của người (C125A). Theo một số phương án, interleukin-2 thể đại bao gồm trình tự axit amin như được thể hiện trong SEQ ID NO.2.

Thuật ngữ “dẫn xuất” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ sản phẩm liên quan đến IL-2 bất kỳ. Ví dụ về dẫn xuất bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở thể tương đồng IL-2, mảnh IL-2 hoặc dạng IL-2 được cắt ngắn của người và không phải của người, protein dung hợp (như protein dung hợp với peptit tín hiệu hoặc protein dung hợp với thành phần hoạt tính hoặc thành phần không có hoạt tính khác, thành phần hoạt tính như kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên), dạng cải biến của nó (như dạng được gắn PRG, dạng được glycosyl hóa, dạng được tiếp hợp/dung hợp với albumin, dạng được tiếp hợp và/hoặc dung hợp với vùng Fc, dạng được hydroxyetyl hóa, v.v), và protein được cải biến bảo thủ.

Thuật ngữ “CD25” hoặc “tiểu đơn vị alpha của thụ thể interleukin-2” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ CD25 tự nhiên bất kỳ từ nguồn động vật có xương sống bất kỳ, bao gồm động vật có vú như động vật linh trưởng (như người) và động vật gặm nhấm (như chuột nhắt và chuột cống), bao gồm CD25 chưa được xử lý “có chiều dài đầy đủ” và dạng được xử lý bất kỳ của CD25 có nguồn gốc từ tế bào, cũng bao gồm biến thể CD25 có trong tự nhiên, như biến thể ghép nối hoặc biến thể alen. Theo một số phương án, CD25 là CD25 của người, và có trình tự cụ thể được thể hiện trong SEQ ID NO.37.

Thuật ngữ “thụ thể IL-2 có ái lực cao” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ dạng heterotrimer của thụ thể interleukin-2, bao gồm tiểu đơn vị thụ thể γ (cũng được gọi là tiểu đơn vị thụ thể γ xytokin tổng thể, γ c hoặc CD132), tiểu đơn vị thụ thể β subunit (cũng được gọi là CD122 hoặc p70) và tiểu đơn vị thụ thể alpha (cũng được gọi là CD25 hoặc p55). Ngược lại, thuật ngữ “thụ thể IL-2 có ái lực trung bình” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ thụ thể IL-2 chỉ bao gồm tiểu đơn vị γ và tiểu đơn vị β subunit, nhưng không bao gồm tiểu đơn vị α (ví dụ, xem Olejniczak and Kasprzak, MedSci Monit 14, RA179-189 (2008)).

Thuật ngữ “ái lực” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ cường độ tổng số của toàn bộ các tương tác không cộng hóa trị giữa vị trí gắn kết đơn của phân tử (như thụ thể) và thành phần gắn kết của nó (như phối tử). Trừ khi có quy định khác, thuật ngữ “ái lực gắn kết” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ ái lực gắn kết nội tại thể hiện tương tác 1:1 giữa các thành phần của cặp gắn kết (ví dụ, thụ thể và phối tử). Ái lực của phân tử X với thành phần gắn kết Y của nó có thể được biểu diễn dưới dạng hằng số phân ly (K_D), là tỷ lệ của hằng số tốc độ phân ly và hằng số tốc độ liên kết (tương ứng là $K_{\text{phân ly}}$ và $K_{\text{liên kết}}$). Theo cách thức này, các ái lực sẽ tương đương nhau miễn là tỷ lệ của các hằng số tốc độ vẫn tương đương nhau, tuy nhiên, các hằng số tốc độ có thể khác nhau. Ái lực có thể là được đo bằng các phương pháp thông thường đã biết trong lĩnh vực này, bao gồm các phương pháp được mô tả trong sáng chế.

Thuật ngữ “tế bào T điều hòa” hoặc “tế bào $T_{\text{điều hòa}}$ ” hoặc “Treg” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ loại tế bào T biểu hiện CD4 đặc hiệu có thể ức chế đáp ứng của các tế bào T khác. Tế bào T điều hòa được đặc trưng bởi quá trình biểu hiện của tiểu đơn vị α của thụ thể interleukin-2 (CD25) và yếu tố phiên mã hộp đầu hình đĩa P3 (FOXP3), và đóng vai trò quan trọng trong quá trình cảm ứng và duy trì khả năng tự dung nạp ngoại vi với các kháng nguyên (bao gồm các kháng nguyên được biểu hiện bởi các khối u). Interleukin-2 là cần thiết để đạt được chức năng, quá trình phát triển và cảm ứng đặc tính ức chế của tế bào T điều hòa.

Thuật ngữ “tế bào tác động” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ quần thể tế bào lympho điều hòa tác dụng gây độc tế bào của interleukin-2. Tế bào tác động bao gồm tế bào T tác động, như tế bào T gây độc tế bào biểu hiện CD8, tế bào giết tự nhiên, tế bào giết được hoạt hóa bởi lymphokine, và đại thực bào/bạch cầu đơn nhân.

Thuật ngữ “cấu trúc gắn kết kháng nguyên” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ phân tử polypeptit gắn kết đặc hiệu với yếu tố quyết định kháng nguyên. Theo một số phương án, cấu trúc gắn kết kháng nguyên có điều khiển gốc được tiếp hợp miễn dịch (ví dụ, xytokine (IL-2 hoặc biến thể của nó) và/hoặc các cấu trúc gắn kết kháng nguyên khác) đến vị trí đích, ví dụ loại tế bào khối u đặc hiệu hoặc chất nền khối u có yếu tố quyết định kháng nguyên đặc hiệu. Cấu trúc gắn kết kháng nguyên bao gồm kháng thể và mảnh gắn kết kháng nguyên của nó. Cấu trúc gắn kết kháng nguyên được ưu tiên bao gồm miền gắn kết kháng nguyên của kháng thể, chứa vùng biến đổi chuỗi nặng kháng thể và vùng biến

đôi chuỗi nhẹ kháng thể. Cấu trúc gắn kết kháng nguyên có thể bao gồm vùng hằng định kháng thể. Như đã biết trong lĩnh vực này, vùng hằng định chuỗi nặng bao gồm isotyp bất kỳ trong số các isotyp sau: α , δ , ϵ , γ , hoặc μ . Vùng hằng định chuỗi nhẹ bao gồm isotyp bất kỳ trong số hai isotyp sau: κ và λ . Interleukin-2 hoặc biến thể của nó có thể được liên kết với một hoặc nhiều cấu trúc gắn kết kháng nguyên thông qua một hoặc nhiều trình tự liên kết để tạo ra “thể tiếp hợp miễn dịch”.

Thuật ngữ “gắn kết đặc hiệu” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ gắn kết chọn lọc đối với kháng nguyên, và có thể được phân biệt với tương tác không mong muốn hoặc không đặc hiệu. Khả năng gắn kết đặc hiệu với yếu tố quyết định kháng nguyên đặc hiệu của cấu trúc gắn kết kháng nguyên có thể được đánh giá bằng thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết enzym (ELISA) hoặc hoặc các phương pháp khác đã biết trong lĩnh vực này, như được đo bằng phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt (được phân tích trên thiết bị BIAcore) (Liljeblad et al., Glyco J17, 323-329 (2000)) và các thử nghiệm gắn kết thông thường (Heeley, Endocr Res 28, 217-229 (2002)).

Thuật ngữ “kháng thể” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ các cấu trúc kháng thể khác nhau, miễn là chúng có hoạt tính gắn kết kháng nguyên mong muốn. Ví dụ cụ thể về kháng thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, kháng thể đơn dòng, kháng thể đa dòng, kháng thể đa đặc hiệu (ví dụ, kháng thể đặc hiệu kép) và mảnh gắn kết kháng nguyên. Kháng thể có thể bao gồm kháng thể của chuột, kháng thể của người, kháng thể nhân tạo, kháng thể thể khảm và kháng thể của lạc đà. Ví dụ, kháng thể có thể là globulin miễn dịch có cấu trúc chuỗi tetra-peptit được tạo ra bởi hai chuỗi nặng giống hệt nhau và hai chuỗi nhẹ giống hệt nhau được liên kết với nhau bằng các liên kết disulfua liên chuỗi. Thành phần axit amin và trình tự của vùng hằng định trong chuỗi nặng globulin miễn dịch là khác nhau, dẫn đến tính kháng nguyên khác nhau. Theo đó, các globulin miễn dịch có thể được chia thành năm loại hoặc isotyp globulin miễn dịch, tức là IgM, IgD, IgG, IgA, và IgE. Các chuỗi nặng tương ứng là chuỗi μ , chuỗi δ , chuỗi γ , chuỗi α và chuỗi ϵ chain. Ig ở cùng một loại có thể được chia thành các phân lớp khác nhau, theo sự khác nhau về thành phần axit amin ở vùng bản lề và theo số lượng và vị trí của liên kết disulfua chuỗi nặng. Ví dụ, IgG có thể được chia thành IgG1, IgG2, IgG3, và IgG4. Chuỗi nhẹ được chia thành chuỗi kapa hoặc chuỗi lambda, theo sự khác nhau về vùng hằng định. Mỗi loại trong số năm loại Ig có thể có chuỗi kapa hoặc chuỗi lambda.

Thuật ngữ “mảnh gắn kết kháng nguyên” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ mảnh Fab, mảnh Fab', mảnh $F(ab')_2$, Fv chuỗi đơn (tức là sFv), kháng thể có kích cỡ nano (tức là VHH), và miền VH/VL có ái lực gắn kết kháng nguyên. Mảnh Fv bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ kháng thể, nhưng không chứa vùng hằng định; mảnh Fv là mảnh gắn kết kháng nguyên nhỏ nhất chứa toàn bộ các vị trí gắn kết kháng nguyên. Nhìn chung, kháng thể Fv cũng bao gồm gốc liên kết polypeptit giữa miền VH và miền VL, và có thể tạo ra cấu trúc cần thiết để gắn kết kháng nguyên. Các gốc liên kết khác nhau có thể được sử dụng để liên kết các vùng biến đổi của hai kháng thể để tạo ra chuỗi polypeptit đơn, được gọi là kháng thể chuỗi đơn hoặc Fv chuỗi đơn (sFv).

Thuật ngữ “gốc cải biến bảo thủ” hoặc “gốc thay thế bảo thủ” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ gốc thay thế axit amin trong protein bằng các axit amin khác có đặc tính tương tự (ví dụ, điện tích, kích cỡ chuỗi bên, đặc tính kỵ nước/thân nước, cấu trúc khung và độ bền, v.v.), sao cho các gốc thay đổi này có thể được tạo ra thường xuyên mà không làm biến đổi hoạt tính sinh học của protein.

Thuật ngữ “đột biến cải biến bảo thủ” được áp dụng cho trình tự axit amin và trình tự nucleotit. Đối với trình tự nucleotit cụ thể, thuật ngữ “đột biến cải biến bảo thủ” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ đột biến axit nucleic mã hóa các trình tự axit amin giống nhau hoặc gần như giống nhau; hoặc khi nucleotit không mã hóa trình tự axit amin, thì thuật ngữ “đột biến cải biến bảo thủ” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ các đột biến trình tự nucleotit gần như giống nhau. Đối với trình tự axit amin, thuật ngữ “đột biến cải biến bảo thủ” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ đột biến thay thế axit amin trong protein cho các axit amin khác có đặc tính tương tự (như điện tích, kích cỡ chuỗi bên, đặc tính kỵ nước/thân nước, cấu trúc mạch chính và độ bền, v.v), các đột biến thay đổi này có thể được tạo ra thường xuyên mà không làm biến đổi hoạt tính sinh học của protein. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rằng đột biến thay thế axit amin duy nhất trong các vùng không thiết yếu của polypeptit gần như không làm biến đổi hoạt tính sinh học (ví dụ, xem Watson et al. (1987) *Molecular Biology of the Gene*, The Benjamin/Cummings Pub. Co., Page 224, (4th edition)).

Thuật ngữ “được gắn PEG” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ quá trình gắn kết của ít nhất một phân tử PEG với một phân tử khác (ví dụ, protein điều trị bệnh). Ví dụ,

adagen (dạng được gắn PEG của adenosin deaminaza) được chấp thuận để điều trị tình trạng suy giảm miễn dịch kết hợp thể nặng. Đã kiểm chứng được rằng quá trình liên kết với polyethylene glycol có thể ngăn ngừa quá trình phân giải protein (ví dụ, xem Sada et al., (1991) J. Fermentation Bioengineering 71: 137-139). Ở dạng phổ biến nhất, PEG là polyete mạch thẳng hoặc mạch nhánh được gắn kết với nhóm hydroxyl ở một đầu, và có công thức sau: $\text{HO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{OH}$. Để ghép cặp PEG với các phân tử (polypeptit, polysacarit, polynucleotit, và phân tử hữu cơ nhỏ), PEG có thể được hoạt hóa bằng cách điều chế một số hoặc hai dẫn xuất PEG mang các nhóm chức ở các đầu. Phương pháp thông thường để tiếp hợp PEG vào protein là phương pháp hoạt hóa PEG mang các nhóm chức, nhóm chức này là thích hợp để phản ứng với lysin và các nhóm axit amin ở đầu tận cùng N. Cụ thể, nhóm phản ứng thông thường được sử dụng để tiếp hợp là nhóm amin α hoặc nhóm amin ϵ của lysin. Phản ứng giữa gốc liên kết được gắn PEG với protein có thể dẫn đến quá trình gắn kết của gốc PEG chủ yếu ở các vị trí sau: nhóm amin alpha trên đầu tận cùng của protein, nhóm amin epsilon trên chuỗi bên của gốc lysin, hoặc imidazolyl trên chuỗi bên của gốc histidin. Do hầu hết các protein tái tổ hợp có một nhóm amin α duy nhất và nhiều nhóm amin ϵ và nhóm imidazol, nên nhiều chất đồng phân vị trí có thể được tạo ra theo đặc tính hóa học của nhóm liên kết.

Thuật ngữ “vector”, “vector biểu hiện” và “cấu trúc biểu hiện” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ phân tử ADN được sử dụng để chèn gen đặc hiệu được liên kết điều khiển với ADN này và điều khiển quá trình biểu hiện trong các tế bào đích, bao gồm vector đóng vai trò là cấu trúc axit nucleic tái bản tự sinh và vector được chèn vào bộ gen của tế bào vật chủ được chèn vector này. Vector biểu hiện theo sáng chế bao gồm cat-xet biểu hiện, cho phép phiên mã lượng lớn ARN thông tin ổn định. Khi vector biểu hiện ở trong tế bào đích, phân tử axit ribonucleic hoặc protein được mã hóa bởi gen được tạo ra thông qua hệ phiên mã và/hoặc dịch mã tế bào.

Thuật ngữ “tế bào vật chủ”, “dòng tế bào vật chủ” và “chủng tế bào vật chủ” được sử dụng thay thế cho nhau trong bản mô tả để chỉ tế bào đã được chèn axit nucleic ngoại sinh, bao gồm tế bào thế hệ sau của các tế bào này. Tế bào vật chủ bao gồm “thể biến nạp” và “tế bào được chuyển gen”, bao gồm tế bào được chuyển gen ban đầu tế bào thế hệ sau của tế bào này (không phụ thuộc vào số lần cấy chuyển). Tế bào thế hệ sau có thể không giống hoàn toàn với tế bào gốc về hàm lượng axit nucleic, nhưng có thể bao gồm các đột biến. Tế bào thế hệ sau được đột biến được thu nhận bằng cách sàng lọc hoặc

chọn lọc có chức năng hoặc hoạt tính sinh học tương tự như chức năng hoặc hoạt tính sinh học của tế bào gốc được chuyển gen, cũng nằm trong phạm vi của sáng chế.

Liên quan đến động vật, người, đối tượng thử nghiệm, tế bào, mô, cơ quan hoặc dịch sinh học, thuật ngữ “sử dụng”, “phân liều” và “điều trị” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ quá trình tiếp xúc của dược chất hoặc dược phẩm điều trị, chẩn đoán ngoại sinh với động vật, người, đối tượng, tế bào, mô, cơ quan hoặc dịch sinh học. Thuật ngữ “sử dụng”, “phân liều” và “điều trị” cũng được sử dụng trong bản mô tả để chỉ phương pháp thử nghiệm, nghiên cứu, chẩn đoán, điều trị bệnh, và nghiên cứu dược động học. Phương pháp điều trị tế bào bao gồm quá trình tiếp xúc của chất phản ứng với tế bào, cũng như quá trình tiếp xúc của chất phản ứng với dịch thể, trong đó dịch thể này tiếp xúc với tế bào. Thuật ngữ “sử dụng”, “phân liều” và “điều trị” cũng được sử dụng trong bản mô tả để chỉ phương pháp xử lý *in vitro* hoặc *ex vivo*, ví dụ cho tế bào, bằng chất phản ứng, chế phẩm gắn kết, chẩn đoán, hoặc bằng một tế bào khác. Liên quan đến người, động vật, hoặc đối tượng nghiên cứu, thuật ngữ “sử dụng” hoặc “điều trị” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ ứng dụng điều trị bệnh, phòng ngừa hoặc ngăn ngừa, nghiên cứu và chẩn đoán.

Thuật ngữ “điều trị” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ quá trình sử dụng dược chất, như biến thể interleukin-2 bất kỳ và dẫn xuất của nó hoặc chế phẩm bất kỳ chứa biến thể interleukin-2 này và dẫn xuất của nó theo sáng chế, bên trong hoặc bên ngoài cơ thể cho đối tượng bị bệnh có một hoặc nhiều triệu chứng bệnh trong đó dược chất này có hoạt tính điều trị bệnh đã biết. Thông thường, dược chất này được sử dụng ở lượng hữu hiệu để làm giảm một hoặc nhiều triệu chứng bệnh ở đối tượng bị bệnh hoặc quần thể đối tượng bị bệnh cần điều trị, nhờ đó làm giảm hoặc ức chế tiến triển của các triệu chứng này ở mức độ bất kỳ đo được trên lâm sàng.

Lượng của dược chất hữu hiệu để làm giảm triệu chứng bệnh bất kỳ (cũng được gọi là “lượng hữu hiệu điều trị bệnh”) có thể thay đổi phụ thuộc vào các yếu tố, như tình trạng bệnh, độ tuổi, và cân nặng của đối tượng, và khả năng của dược chất để tạo ra đáp ứng mong muốn ở đối tượng bị bệnh. Triệu chứng bệnh đã được làm giảm có thể được đánh giá bằng đại lượng đo bất kỳ trên lâm sàng thông thường được sử dụng bởi các bác sĩ hoặc nhân viên chăm sóc sức khỏe khác để đánh giá mức độ nghiêm trọng hoặc tiến triển của triệu chứng đó. Mặc dù một đối tượng theo sáng chế (ví dụ phương pháp điều trị

hoặc vật phẩm sản xuất) có thể không hữu hiệu trong việc làm giảm triệu chứng bệnh cụ thể ở mọi đối tượng bị bệnh, nhưng đối tượng này cần làm giảm triệu chứng bệnh cụ thể ở số lượng đối tượng bị bệnh có ý nghĩa thống kê như được xác định bằng phép kiểm định thống kê bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này, như phép kiểm định student t, phép kiểm định chi bình phương, phép kiểm định U theo Mann và Whitney, phép kiểm định Kruskal-Wallis (phép kiểm định H), phép kiểm định Jonckheere-Terpstra và phép kiểm định Wilcoxon.

Thuật ngữ “lượng hữu hiệu” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ lượng đủ để làm giảm hoặc phòng ngừa triệu chứng hoặc dấu hiệu của tình trạng bệnh. Thuật ngữ “lượng hữu hiệu” cũng được sử dụng trong bản mô tả để chỉ lượng đủ để cho phép hoặc tạo điều kiện thuận lợi cho quá trình chẩn đoán. Lượng hữu hiệu đối với đối tượng hoặc động vật cụ thể có thể thay đổi phụ thuộc vào các yếu tố như tình trạng bệnh cần điều trị, tình trạng sức khỏe chung của đối tượng, đường đưa thuốc và liều lượng sử dụng và mức độ nghiêm trọng của các tác dụng không mong muốn. Lượng hữu hiệu có thể là liều lượng hoặc chế độ phân liều tối đa để ngăn ngừa tác dụng không mong muốn hoặc tác dụng độc tính.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn thông qua các ví dụ sau, nhưng không chỉ giới hạn ở các ví dụ này.

Ví dụ 1: Thiết kế và biểu hiện interleukin-2 thể đại và biến thể của nó

1. Tổng hợp gen và thiết kế vector biểu hiện tái tổ hợp

Trình tự axit nucleic của interleukin-2 thể đại của người được tổng hợp, vị trí giới hạn *Nde I* được chèn vào đầu 5', và *BamH I* restriction site được chèn vào đầu 3', trình tự axit nucleic được thể hiện trong SEQ ID NO.1 (vị trí giới hạn *Nde I* và vị trí giới hạn *BamH I* được in nghiêng). Trình tự axit amin của interleukin-2 thể đại được thể hiện trong SEQ ID NO.2.

> Trình tự axit nucleic của interleukin-2 thể đại

CATATGGCACCGACCAGCAGCAGCACCAAAAAAACCAGCTGCAACTG
GAACATCTGCTGTTAGATCTGCAAATGATTCTGAACGGCATCAACAACACTACA
AAAATCCGAAACTGACCCGTATGCTGACCTTCAAATTCTACATGCCGAAAAA

AGCAACCGAGCTGAAACATCTGCAGTGTCTGGAAGAAGAACTGAAACCGCT
GGAAGAGGTTCTGAATCTGGCACAGAGCAAAAACCTTTCATCTGCGTCCGCGT
GATCTGATTAGCAATATTAACGTTATTGTGCTGGAAGTAAAGGTAGCGAAA
CCACCTTTATGTGTGAATATGCCGATGAAACCGCAACCATTGTGGAATTTCTG
AATCGTTGGATTACCTTTTGTGTCAGAGCATTATTAGCACCTGACCTAATGAGG
ATCC (SEQ ID NO.1).

> Trình tự axit amin của interleukin-2 thể đại

MAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKK
ATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMC
EYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT (SEQ ID NO.2).

Sau khi được tổng hợp, trình tự axit nucleic interleukin-2 được liên kết với vector biểu hiện *E. coli* pET-9a (Novagen, Cat. 69431-3) thông qua hai vị trí giới hạn, *Nde I* và *BamH I*, để thu được vector biểu hiện của interleukin-2 thể đại.

2. Chèn đột biến axit amtrongo sáng chế vào trình tự axit amin của interleukin-2 thể đại.

Theo một biến thể, asparagin ở vị trí số 26 được thay thế bằng glutamin, và bộ ba mã hóa AAC ở các vị trí số 76-78 của trình tự nucleotit tương ứng được đột biến thành CAG, để thu được biến thể IL-2-01.

trong đó, phần được in nghiêng thể hiện vị trí giới hạn, và phần được gạch chân thể hiện vị trí đột biến, các trình tự sau được thể hiện theo cách thức tương tự.

> Trình tự axit nucleic của IL-2-01:

CATATGGCACCGACCAGCAGCAGCACCAAAAAACCCAGCTGCAACTG
GAACATCTGCTGTTAGATCTGCAAATGATTCTGCAGGGCATCAACAACCTACA
AAAATCCGAAACTGACCCGTATGCTGACCTTCAAATTCTACATGCCGAAAAA
AGCAACCGAGCTGAAACATCTGCAGTGTCTGGAAGAAGAACTGAAACCGCT
GGAAGAGGTTCTGAATCTGGCACAGAGCAAAAACCTTTCATCTGCGTCCGCGT
GATCTGATTAGCAATATTAACGTTATTGTGCTGGAAGTAAAGGTAGCGAAA
CCACCTTTATGTGTGAATATGCCGATGAAACCGCAACCATTGTGGAATTTCTG
AATCGTTGGATTACCTTTGCACAGAGCATTATTAGCACCTGACCTAATGAGG
ATCC (SEQ ID NO.3).

> Trình tự axit amin của IL-2-01:

MAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILQGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKK
ATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMC
EYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT (SEQ ID NO.4).

Theo một biến thể, asparagin ở vị trí số 30 được thay thế bằng serin, và bộ ba mã hóa AAC ở các vị trí số 88-90 của trình tự nucleotit tương ứng được đột biến thành AGC để thu được biến thể interleukin-2-02.

> Trình tự axit nucleic của interleukin-2-02:

CATATGGCACCGACCAGCAGCAGCACCAAAAAAACCAGCTGCAACTG
GAACATCTGCTGTTAGATCTGCAAATGATTCTGAACGGCATCAACAGCTTACA
AAAATCCGAAACTGACCCGTATGCTGACCTTCAAATTCTACATGCCGAAAAA
AGCAACCGAGCTGAAACATCTGCAGTGTCTGGAAGAAGAACTGAAACCGCT
GGAAGAGGTTCTGAATCTGGCACAGAGCAAAAACTTTCATCTGCGTCCGCGT
GATCTGATTAGCAATATTAACGTTATTGTGCTGGAAGTAAAGGTAGCGAAA
CCACCTTTATGTGTGAATATGCCGATGAAACCGCAACCATTGTGGAATTTCTG
AATCGTTGGATTACCTTTGCACAGAGCATTATTAGCACCTGACCTAATGAGG
ATCC (SEQ ID NO.5).

> Trình tự axit amin của interleukin-2-02:

MAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINSYKNPKLTRMLTFKFYMPKK
ATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMC
EYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT (SEQ ID NO.6).

Theo một biến thể, glutamin ở vị trí số 11 được thay thế bằng xystein; bộ ba mã hóa CAG ở các vị trí số 31-33 của trình tự nucleotit tương ứng được đột biến thành TGT; leucin ở vị trí số 132 được thay thế bằng xystein; bộ ba mã hóa CTG ở các vị trí số 394-396 của trình tự nucleotit tương ứng được đột biến thành TGT, để thu được biến thể interleukin-2-03.

> Trình tự axit nucleic của interleukin-2-03:

CATATGGCACCGACCAGCAGCAGCACCAAAAAAACCTGTTCTGCAACTG
GAACATCTGCTGTTAGATCTGCAAATGATTCTGAACGGCATCAACAACACTACA
AAAATCCGAAACTGACCCGTATGCTGACCTTCAAATTCTACATGCCGAAAAA

AGCAACCGAGCTGAAACATCTGCAGTGTCTGGAAGAAGAAGCTGAAACCGCT
GGAAGAGGTTCTGAATCTGGCACAGAGCAAAAACTTTCATCTGCGTCCGCGT
GATCTGATTAGCAATATTAACGTTATTGTGCTGGAAGTAAAGGTAGCGAAA
CCACCTTTATGTGTGAATATGCCGATGAAACCGCAACCATTGTGGAATTTCTG
AATCGTTGGATTACCTTTGCACAGAGCATTATTAGCACCTTGTACCTAATGAG
GATCC (SEQ ID NO.7).

> Trình tự axit amin của interleukin-2-03:

MAPTSSSTKKTCLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKK
ATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMC
EYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTCT (SEQ ID NO.8).

Theo một biến thể, leucin ở vị trí số 70 được thay thế bằng xystein; bộ ba mã hóa CTG ở các vị trí số 208-210 của trình tự nucleotit tương ứng được đột biến thành TGT; the prolin ở vị trí số 82 được thay thế bằng xystein; bộ ba mã hóa CCG ở các vị trí số 244-246 của trình tự nucleotit tương ứng được đột biến thành TGT để thu được biến thể interleukin-2-04.

> Trình tự axit nucleic của interleukin-2-04:

CATATGGCACCGACCAGCAGCAGCACCAAAAAAACCAGCTGCAACTG
GAACATCTGCTGTTAGATCTGCAAATGATTCTGAACGGCATCAACAACCTACA
AAAATCCGAAACTGACCCGTATGCTGACCTTCAAATTCTACATGCCGAAAAA
AGCAACCGAGCTGAAACATCTGCAGTGTCTGGAAGAAGAAGCTGAAACCGCT
GGAAGAGGTTTGTAATCTGGCACAGAGCAAAAACTTTCATCTGCGTTGTCGT
GATCTGATTAGCAATATTAACGTTATTGTGCTGGAAGTAAAGGTAGCGAAA
CCACCTTTATGTGTGAATATGCCGATGAAACCGCAACCATTGTGGAATTTCTG
AATCGTTGGATTACCTTTGCACAGAGCATTATTAGCACCTTGACCTAATGAGG
ATCC (SEQ ID NO.9).

> Trình tự axit amin của interleukin-2-04:

MAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKK
ATELKHLQCLEEELKPLEEVCNLAQSKNFHLRCRDLISNINVIVLELKGSETTFMC
EYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT (SEQ ID NO.10).

Theo một biến thể, glycin ở vị trí số 27 được thay thế bằng xystein; bộ ba mã hóa GGC ở các vị trí số 79-81 của trình tự nucleotit tương ứng được đột biến thành TGT; phenylalanin ở vị trí số 78 được thay thế bằng xystein; bộ ba mã hóa TTT ở các vị trí số 232-234 của trình tự nucleotit tương ứng được đột biến thành TGT, để thu được biến thể interleukin-2-05.

> Trình tự axit nucleic của interleukin-2-05:

*CATATGGCACCGACCAGCAGCAGCACCAAAAAAACCAGCTGCAACTG
GAACATCTGCTGTTAGATCTGCAAATGATTCTGAACTGTATCAACAACACTACA
AAAATCCGAAACTGACCCGTATGCTGACCTTCAAATTCTACATGCCGAAAAA
AGCAACCGAGCTGAAACATCTGCAGTGTCTGGAAGAAGAAGCTGAAACCGCT
GGAAGAGGTTCTGAATCTGGCACAGAGCAAAAACTGTCATCTGCGTCCGCGT
GATCTGATTAGCAATATTAACGTTATTGTGCTGGAAGCTGAAAGGTAGCGAAA
CCACCTTTATGTGTGAATATGCCGATGAAACCGCAACCATTTGTGGAATTTCTG
AATCGTTGGATTACCTTTGCACAGAGCATTATTAGCACCTGACCTAATGAGG
ATCC (SEQ ID NO.11).*

> Trình tự axit amin của interleukin-2-05:

*MAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNCINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKK
ATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNCHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMC
EYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT (SEQ ID NO.12).*

Theo một biến thể, peptit ở các vị trí số 29-44 được thay thế bằng QSMHIDATL; bộ ba mã hóa AACAACTACAAAAATCCGAAACTGACCCGTATGCTGACCTTCAAATTC ở các vị trí số 85-132 của trình tự nucleotit tương ứng được đột biến thành CAGAGCATGCATATTGATGCAACCCTG để thu được biến thể interleukin-2-06.

> Trình tự axit nucleic của interleukin-2-06:

*CATATGGCACCGACCAGCAGCAGCACCAAAAAAACCAGCTGCAACTG
GAACATCTGCTGTTAGATCTGCAAATGATTCTGAACGGCATCCAGAGCATGC
ATATTGATGCAACCCTGTACATGCCGAAAAAAGCAACCGAGCTGAAACATC
TGCAGTGTCTGGAAGAAGAAGCTGAAACCGCTGGAAGAGGTTCTGAATCTGGC
ACAGAGCAAAAACCTTCATCTGCGTCCGCGTGATCTGATTAGCAATATTAAC*

GTTATTGTGCTGGAAGGTAGCGAAACCACCTTTATGTGTGAATATG
CCGATGAAACCGCAACCATTGTGGAATTTCTGAATCGTTGGATTACCTTTGCA
CAGAGCATTATTAGCACCTGACCTAATGAGGATCC (SEQ ID NO.13).

> Trình tự axit amin của interleukin-2-06:

MAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGIQSMHIDATLYMPKKATELKHL
QCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETA
TIVEFLNRWITFAQSIISTLT (SEQ ID NO.14).

Theo một biến thể, phenylalanin ở vị trí số 42 được thay thế bằng alanin; bộ ba mã hóa TTC ở các vị trí số 124-126 của trình tự nucleotit tương ứng được đột biến thành GCA; tyrosin ở vị trí số 45 được thay thế bằng alanin; bộ ba mã hóa TAC ở các vị trí số 133-135 của trình tự nucleotit tương ứng được đột biến thành GCA, để thu được biến thể interleukin-2-07.

> Trình tự axit nucleic của interleukin-2-07:

CATATGGCACCGACCAGCAGCAGCACCAAAAAACCCAGCTGCAACTG
GAACATCTGCTGTTAGATCTGCAAATGATTCTGAACGGCATCAACAACCTACA
AAAATCCGAAACTGACCCGTATGCTGACCGCAAAATTCGCAATGCCGAAAA
AAGCAACCGAGCTGAAACATCTGCAGTGTCTGGAAGAAGAACTGAAACCGC
TGGAAGAGGTTCTGAATCTGGCACAGAGCAAAAACTTTCATCTGCGTCCGCG
TGATCTGATTAGCAATATTAACGTTATTGTGCTGGAAGGTAGCGAA
ACCACCTTTATGTGTGAATATGCCGATGAAACCGCAACCATTGTGGAATTTCT
GAATCGTTGGATTACCTTTGCACAGAGCATTATTAGCACCTGACCTAATGAG
GATCC (SEQ ID NO.15).

> Trình tự axit amin của interleukin-2-07:

MAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTAKFAMPKK
ATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMC
EYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT (SEQ ID NO.16).

Theo một biến thể, phenylalanin ở vị trí số 42 được thay thế bằng alanin; bộ ba mã hóa TTC ở các vị trí số 124-126 của trình tự nucleotit tương ứng được đột biến thành GCA; leucin ở vị trí số 72 được thay thế bằng glycine; bộ ba mã hóa CTG ở các vị trí số

214-216 của trình tự nucleotit tương ứng được đột biến thành GGC để thu được biến thể interleukin-2-08.

> Trình tự axit nucleic của interleukin-2-08:

*CATATGGCACCGACCAGCAGCAGCACCAAAAAAACCCAGCTGCAACTG
GAACATCTGCTGTTAGATCTGCAAATGATTCTGAACGGCATCAACAACACTACA
AAAATCCGAAACTGACCCGTATGCTGACCGCAAAAATTCTACATGCCGAAAAA
AGCAACCGAGCTGAAACATCTGCAGTGTCTGGAAGAAGAAGCTGAAACCGCT
GGAAGAGGTTCTGAATGGCGCACAGAGCAAAAACTTTCATCTGCGTCCGCGT
GATCTGATTAGCAATATTAACGTTATTGTGCTGGAAGGTAGCGAAA
CCACCTTTATGTGTGAATATGCCGATGAAACCGCAACCATTTGTGGAATTTCTG
AATCGTTGGATTACCTTTGCACAGAGCATTATTAGCACCTGACCTAATGAGG
ATCC (SEQ ID NO.17).*

> Trình tự axit amin của interleukin-2-08:

*MAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTAKFYMPKK
ATELKHLQCLEEELKPLEEVLNGAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMC
EYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT (SEQ ID NO.18).*

Theo một biến thể, tyrosin ở vị trí số 45 được thay thế bằng alanin; bộ ba mã hóa TAC ở các vị trí số 133-135 của trình tự nucleotit tương ứng được đột biến thành GCA; leucin ở vị trí số 72 được thay thế bằng glycine; bộ ba mã hóa CTG ở các vị trí số 214-216 của trình tự nucleotit tương ứng được đột biến thành GGC để thu được biến thể interleukin-2-09.

> Trình tự axit nucleic của interleukin-2-09:

*CATATGGCACCGACCAGCAGCAGCACCAAAAAAACCCAGCTGCAACTG
GAACATCTGCTGTTAGATCTGCAAATGATTCTGAACGGCATCAACAACACTACA
AAAATCCGAAACTGACCCGTATGCTGACCTTCAAATTCGCAATGCCGAAAAA
AGCAACCGAGCTGAAACATCTGCAGTGTCTGGAAGAAGAAGCTGAAACCGCT
GGAAGAGGTTCTGAATGGCGCACAGAGCAAAAACTTTCATCTGCGTCCGCGT
GATCTGATTAGCAATATTAACGTTATTGTGCTGGAAGGTAGCGAAA
CCACCTTTATGTGTGAATATGCCGATGAAACCGCAACCATTTGTGGAATTTCTG*

AATCGTTGGATTACCTTTGCACAGAGCATTATTAGCACCCCTGACCTAATGAGG
ATCC (SEQ ID NO.19).

> Trình tự axit amin của interleukin-2-09:

MAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFAMPKK
ATELKHLQCLEEELKPLEEVLNGAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMC
EYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT (SEQ ID NO.20).

Theo một biến thể, asparagin ở vị trí số 26 được thay thế bằng glutamin; bộ ba mã hóa AAC ở các vị trí số 76-78 của trình tự nucleotit tương ứng được đột biến thành CAG; asparagin ở vị trí số 30 được thay thế bằng serin; bộ ba mã hóa AAC ở các vị trí số 88-90 của trình tự nucleotit tương ứng được đột biến thành AGC; phenylalanin ở vị trí số 42 được thay thế bằng alanin; bộ ba mã hóa TTC ở các vị trí số 124-126 của trình tự nucleotit tương ứng được đột biến thành GCA; leucin ở vị trí số 72 được thay thế bằng glycine; bộ ba mã hóa CTG ở các vị trí số 214-216 của trình tự nucleotit tương ứng được đột biến thành GGC để thu được biến thể interleukin-2-10.

> Trình tự axit nucleic của interleukin-2-10:

CATATGGCACCGACCAGCAGCAGCACCAAAAAAACCCAGCTGCAACTG
GAACATCTGCTGTTAGATCTGCAAATGATTCTGCAGGGCATCAACAGCTACA
AAAATCCGAAACTGACCCGTATGCTGACCGCAAAAATTCTACATGCCGAAAAA
AGCAACCGAGCTGAAACATCTGCAGTGTCTGGAAGAAGAACTGAAACCGCT
GGAAGAGGTTCTGAATGGCGCACAGAGCAAAAACTTTCATCTGCGTCCGCGT
GATCTGATTAGCAATATTAACGTTATTGTGCTGGAAGTAAAGGTAGCGAAA
CCACCTTTATGTGTGAATATGCCGATGAAACCGCAACCATTTGTGGAATTTCTG
AATCGTTGGATTACCTTTGCACAGAGCATTATTAGCACCCCTGACCTAATGAGG
ATCC (SEQ ID NO.21).

> Trình tự axit amin của interleukin-2-10:

MAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILQGINSYKNPKLTRMLTAKFYMPKK
ATELKHLQCLEEELKPLEEVLNGAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMC
EYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT (SEQ ID NO.22).

Theo một biến thể, glutamin ở vị trí số 11 được thay thế bằng cysteine, và bộ ba mã hóa CAG ở các vị trí số 31-33 của trình tự nucleotit tương ứng được đột biến thành TGT;

asparagin ở vị trí số 26 được thay thế bằng glutamin, bộ ba mã hóa AAC ở các vị trí số 76-78 của trình tự nucleotit tương ứng được đột biến thành CAG; asparagin ở vị trí số 30 được thay thế bằng serin, và bộ ba mã hóa AAC ở các vị trí số 88-90 của trình tự nucleotit tương ứng được đột biến thành AGC; phenylalanin ở vị trí số 42 được thay thế bằng alanin, và bộ ba mã hóa TTC ở các vị trí số 124-126 của trình tự nucleotit tương ứng được đột biến thành GCA; leucin ở vị trí số 72 được thay thế bằng glycine; bộ ba mã hóa CTG ở các vị trí số 214-216 của trình tự nucleotit tương ứng được đột biến thành GGC; leucin ở vị trí số 132 được thay thế bằng cysteine, và bộ ba mã hóa CTG ở các vị trí số 394-396 của trình tự nucleotit tương ứng được đột biến thành TGT để thu được biến thể interleukin-2-11.

> Trình tự axit nucleic của interleukin-2-11:

*CATATGGCACCAGCAGCAGCACCAAAAAAACCT***TGT***CTGCAACTG
GAACATCTGCTGTTAGATCTGCAAATGATTCTG***CAG***GGCATCAAC***AGC***TACA
AAAATCCGAACTGACCCGTATGCTGACC***GCA***AAATTCTACATGCCGAAAAA
AGCAACCGAGCTGAAACATCTGCAGTGTCTGGAAGAAGAACTGAAACCGCT
GGAAGAGGTTCTGAAT***GGC***GCACAGAGCAAAAACTTTCATCTGCGTCCGCGT
GATCTGATTAGCAATATTAACGTTATTGTGCTGGAAGGTAGCGAAA
CCACCTTTATGTGTGAATATGCCGATGAAACCGCAACCATTTGTGGAATTTCTG
AATCGTTGGATTACCTTTGCACAGAGCATTATTAGCACCT***TGT***ACCTAATGAG
GATCC (SEQ ID NO.23).*

> Trình tự axit amin của interleukin-2-11:

*MAPTSSSTKKT***CL***QLEHLLLDLQMIL***Q***GIN***S***YKNPKLTRMLT***A***KFYMPKK
ATELKHLQCLEEELKPLEEVLN***G***AQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMC
EYADETATIVEFLNRWITFAQSIIST***C***T (SEQ ID NO.24).*

Theo một biến thể, asparagin ở vị trí số 26 được thay thế bằng glutamin, và bộ ba mã hóa AAC ở các vị trí số 76-78 của trình tự nucleotit tương ứng được đột biến thành CAG; asparagin ở vị trí số 30 được thay thế bằng serin, bộ ba mã hóa AAC ở các vị trí số 88-90 của trình tự nucleotit tương ứng được đột biến thành AGC; phenylalanin ở vị trí số 42 được thay thế bằng alanin, và bộ ba mã hóa TTC ở các vị trí số 124-126 của trình tự nucleotit tương ứng được đột biến thành GCA; leucin ở vị trí số 70 được thay thế bằng cysteine, và bộ ba mã hóa CTG ở các vị trí số 208-210 của trình tự nucleotit tương ứng

được đột biến thành TGT; leucin ở vị trí số 72 được thay thế bằng glycine; bộ ba mã hóa CTG ở các vị trí số 214-216 của trình tự nucleotit tương ứng được đột biến thành GGC; the proline ở vị trí số 82 được thay thế bằng cysteine, bộ ba mã hóa CCG ở các vị trí số 244-246 của trình tự nucleotit tương ứng được đột biến thành TGT để thu được biến thể interleukin-2-12.

> Trình tự axit nucleic của interleukin-2-12:

*CATATGGCACCGACCAGCAGCAGCACCAAAAAAACCAGCTGCAACTG
GAACATCTGCTGTTAGATCTGCAAATGATTCTGCAGGGCATCAACAGCTTACA
AAAATCCGAAACTGACCCGTATGCTGACCGCAAAAATTCTACATGCCGAAAAA
AGCAACCGAGCTGAAACATCTGCAGTGTCTGGAAGAAGAACTGAAACCGCT
GGAAGAGGTTTTGTAATGGCGCACAGAGCAAAAACCTTTCATCTGCGTTTGTCG
TGATCTGATTAGCAATATTAACGTTATTGTGCTGGAAGGTAGCGAA
ACCACCTTTATGTGTGAATATGCCGATGAAACCGCAACCATTTGTGGAATTTCT
GAATCGTTGGATTACCTTTGCACAGAGCATTATTAGCACCTGACCTAATGAG
GATCC (SEQ ID NO.25).*

> Trình tự axit amin của interleukin-2-12:

*MAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLQGINSYKNPKLTRMLTAKFYMPKK
ATELKHLQCLEEELKPLEEVCNGAQSKNFHLRCRDLISNINVIVLELKGSETTFM
CEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT (SEQ ID NO.26).*

Theo một biến thể, asparagine ở vị trí số 26 được thay thế bằng glutamine, và bộ ba mã hóa AAC ở các vị trí số 76-78 của trình tự nucleotit tương ứng được đột biến thành CAG; the glycine ở vị trí số 27 được thay thế bằng cysteine, bộ ba mã hóa GGC ở các vị trí số 79-81 của trình tự nucleotit tương ứng được đột biến thành TGT; asparagine ở vị trí số 30 được thay thế bằng serine, và bộ ba mã hóa AAC ở các vị trí số 88-90 của trình tự nucleotit tương ứng được đột biến thành AGC; phenylalanine ở vị trí số 42 được thay thế bằng alanine, và bộ ba mã hóa TTC ở các vị trí số 124-126 của nucleosit tương ứng được đột biến thành GCA; leucin ở vị trí số 72 được thay thế bằng glycine, và bộ ba mã hóa CTG ở các vị trí số 214-216 của trình tự nucleotit tương ứng được đột biến thành GGC; phenylalanine ở vị trí số 78 được thay thế bằng cysteine, và bộ ba mã hóa TTT ở các vị trí số 232-234 của trình tự nucleotit tương ứng được đột biến thành TGT để thu được biến thể interleukin-2-13.

> Trình tự axit nucleic của interleukin-2-13:

*CATATGGCACCGACCAGCAGCAGCACCAAAAAAACCAGCTGCAACTG
GAACATCTGCTGTTAGATCTGCAAATGATTCTGCAGTGTATCAACAGCTTACA
AAAATCCGAAACTGACCCGTATGCTGACCGCAAAATTCTACATGCCGAAAAA
AGCAACCGAGCTGAAACATCTGCAGTGTCTGGAAGAAGAACTGAAACCGCT
GGAAGAGGTTCTGAATGGCGCACAGAGCAAAAACTTGTCATCTGCGTCCGCG
TGATCTGATTAGCAATATTAACGTTATTGTGCTGGAAGTAAAGGTAGCGAA
ACCACCTTTATGTGTGAATATGCCGATGAAACCGCAACCATTGTGGAATTTCT
GAATCGTTGGATTACCTTTGCACAGAGCATTATTAGCACCCCTGACCTAATGAG
GATCC (SEQ ID NO.27).*

> Trình tự axit amin của interleukin-2-13:

*MAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILQCINSYKNPKLTRMLTAKFYMPKK
ATELKHLQCLEEELKPLEEVLNGAQSKNCHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMC
EYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT (SEQ ID NO.28).*

Theo một biến thể, asparagin ở vị trí số 29 được thay thế bằng serin, và bộ ba mã hóa AAC ở các vị trí số 85-87 của trình tự nucleotit tương ứng được thay thế bằng AGC; phenylalanin ở vị trí số 42 được thay thế bằng alanin, bộ ba mã hóa TTC ở các vị trí số 124-126 của trình tự nucleotit tương ứng được đột biến thành GCA; leucin ở vị trí số 72 được thay thế bằng glycin, và bộ ba mã hóa CTG ở các vị trí số 214-216 của trình tự nucleotit tương ứng được đột biến thành GGC để thu được biến thể interleukin-2-14.

> Trình tự axit nucleic của interleukin-2-14:

*CATATGGCACCGACCAGCAGCAGCACCAAAAAAACCAGCTGCAACTG
GAACATCTGCTGTTAGATCTGCAAATGATTCTGAACGGCATCAGCAAACTACA
AAAATCCGAAACTGACCCGTATGCTGACCGCAAAATTCTACATGCCGAAAAA
AGCAACCGAGCTGAAACATCTGCAGTGTCTGGAAGAAGAACTGAAACCGCT
GGAAGAGGTTCTGAATGGCGCACAGAGCAAAAACTTTCATCTGCGTCCGCGT
GATCTGATTAGCAATATTAACGTTATTGTGCTGGAAGTAAAGGTAGCGAAA
CCACCTTTATGTGTGAATATGCCGATGAAACCGCAACCATTGTGGAATTTCTG
AATCGTTGGATTACCTTTGCACAGAGCATTATTAGCACCCCTGACCTAATGAGG
ATCC (SEQ ID NO.29).*

> Trình tự axit amin của interleukin-2-14:

MAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGISNYKNPKLTRMLTAKFYMPKK
ATELKHLQCLEEELKPLEEVLNGAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMC
EYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT (SEQ ID NO.30).

Theo một biến thể, asparagin ở vị trí số 26 được thay thế bằng glutamin, và bộ ba mã hóa AAC ở các vị trí số 76-78 của trình tự nucleotit tương ứng được đột biến thành CAG; asparagin ở vị trí số 29 được thay thế bằng serin, bộ ba mã hóa AAC ở các vị trí số 85-87 của trình tự nucleotit tương ứng được đột biến thành AGC; phenylalanin ở vị trí số 42 được thay thế bằng alanin, và bộ ba mã hóa TTC ở các vị trí số 124-126 của trình tự nucleotit tương ứng được đột biến thành GCA; leucin ở vị trí số 72 được thay thế bằng glycin, và bộ ba mã hóa CTG ở các vị trí số 214-216 của trình tự nucleotit tương ứng được đột biến thành GGC để thu được biến thể interleukin-2-21.

> Trình tự axit nucleic của interleukin-2-21:

CATATGGCACCGACCAGCAGCAGCACCAAAAAAACCAGCTGCAACTG
GAACATCTGCTGTTAGATCTGCAAATGATTCTGCAGGGGCATCAGCAACTACA
AAAATCCGAAACTGACCCGTATGCTGACCGCAAAAATTCTACATGCCGAAAAA
AGCAACCGAGCTGAAACATCTGCAGTGTCTGGAAGAAGAACTGAAACCGCT
GGAAGAGGTTCTGAATGGCGCACAGAGCAAAAACTTTCATCTGCGTCCGCGT
GATCTGATTAGCAATATTAACGTTATTGTGCTGGAAGGTAGCGAAA
CCACCTTTATGTGTGAATATGCCGATGAAACCGCAACCATTGTGGAATTTCTG
AATCGTTGGATTACCTTTGCACAGAGCATTATTAGCACCCCTGACCTAATGAG
GATCC (SEQ ID NO.31).

> Trình tự axit amin của interleukin-2-21:

MAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILQGISNYKNPKLTRMLTAKFYMPKK
ATELKHLQCLEEELKPLEEVLNGAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMC
EYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT (SEQ ID NO.32).

Theo một biến thể, asparagin ở vị trí số 26 được thay thế bằng glutamin, và bộ ba mã hóa AAC ở các vị trí số 76-78 của trình tự nucleotit tương ứng được đột biến thành CAG; asparagin ở vị trí số 29 được thay thế bằng serin, bộ ba mã hóa AAC ở các vị trí số 85-87 của trình tự nucleotit tương ứng được đột biến thành AGC; phenylalanin ở vị trí số

42 được thay thế bằng alanin, và bộ ba mã hóa TTC ở các vị trí số 124-126 của trình tự nucleotit tương ứng được đột biến thành GCA; asparagin ở vị trí số 71 được thay thế bằng glutamin, và bộ ba mã hóa AAT ở các vị trí số 211-213 của trình tự nucleotit tương ứng được đột biến thành CAG. Leucin ở vị trí số 72 được thay thế bằng glycine, và bộ ba mã hóa CTG ở các vị trí số 214-216 của trình tự nucleotit tương ứng được đột biến thành GGC để thu được biến thể interleukin-2-22.

> Trình tự axit nucleic của interleukin-2-22:

*CATATGGCACCGACCAGCAGCAGCACCAAAAAAACCAGCTGCAACTG
GAACATCTGCTGTTAGATCTGCAAATGATTCTGCAGGGCATCAGCAACTACA
AAAATCCGAAACTGACCCGTATGCTGACCGCAAAATTCTACATGCCGAAAAA
AGCAACCGAGCTGAAACATCTGCAGTGTCTGGAAGAAGAACTGAAACCGCT
GGAAGAGGTTCTGCAGGGCGCACAGAGCAAAAACCTTTCATCTGCGTCCGCG
TGATCTGATTAGCAATATTAACGTTATTGTGCTGGAAGGTAGCGAA
ACCACCTTTATGTGTGAATATGCCGATGAAACCGCAACCATTGTGGAATTTCT
GAATCGTTGGATTACCTTTGCACAGAGCATTATTAGCACCTTGACCTAATGAG
GATCC (SEQ ID NO.33).*

> Trình tự axit amin của interleukin-2-22:

*MAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILQGISNYKNPKLTRMLTAKFYMPKK
ATELKHLQCLEEELKPLEEVLQGAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMC
EYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT (SEQ ID NO.34).*

Theo một biến thể, glutamin ở vị trí số 11 được thay thế bằng xystein, và bộ ba mã hóa CAG ở các vị trí số 31-33 của trình tự nucleotit tương ứng được đột biến thành TGT; the peptit ở các vị trí số 29-44 được thay thế bằng QSMHIDATL, bộ ba mã hóa AACAACTACAAAAATCCGAAACTGACCCGTATGCTGACCTTCAAATTC ở các vị trí số 85-132 của trình tự nucleotit tương ứng được đột biến thành CAGAGCATGCATATTGATGCAACCCTG; leucin ở vị trí số 132 được thay thế bằng xystein, và bộ ba mã hóa CTG ở các vị trí số 394-396 của trình tự nucleotit tương ứng được đột biến thành TGT để thu được biến thể interleukin-2-23.

> Trình tự axit nucleic của interleukin-2-23:

*CATATGGCACCGACCAGCAGCAGCACCAAAAAAACCTTGTCTGCAACTG
GAACATCTGCTGTTAGATCTGCAAATGATTCTGAACGGCATCCAGAGCATGC
ATATTGATGCAACCCTGTTACATGCCGAAAAAAGCAACCGAGCTGAAACATC
TGCAGTGTCTGGAAGAAGAACTGAAACCGCTGGAAGAGGTTCTGAATCTGGC
ACAGAGCAAAAACTTTCATCTGCGTCCGCGTGATCTGATTAGCAATATTAAC
GTTATTGTGCTGGAAGTAAAGGTAGCGAAACCACCTTTATGTGTGAATATG
CCGATGAAACCGCAACCATTTGTGGAATTTCTGAATCGTTGGATTACCTTTGCA
CAGAGCATTATTAGCACCTTGTACCTAATGAGGATCC (SEQ ID NO.35).*

> Trình tự axit amin của interleukin-2-23:

*MAPTSSSTKKTCLQLEHLLLDLQMILNGIQSMHIDATLYMPKKATELKHL
QCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETA
TIVEFLNRWITFAQSIISTCT (SEQ ID NO.36).*

Theo một biến thể, asparagin ở vị trí số 26 được thay thế bằng glutamin, và bộ ba mã hóa AAC ở các vị trí số 76-78 của trình tự nucleotit tương ứng được đột biến thành CAG; asparagin ở vị trí số 29 được thay thế bằng serin, bộ ba mã hóa AAC ở các vị trí số 85-87 của trình tự nucleotit tương ứng được đột biến thành AGC; asparagin ở vị trí số 88 được thay thế bằng arginin, và bộ ba mã hóa AAT ở các vị trí số 262-264 của trình tự nucleotit tương ứng được đột biến thành CGT, để thu được biến thể interleukin-2-24.

> Trình tự axit nucleic của interleukin-2-24:

*CATATGGCACCGACCAGCAGCAGCACCAAAAAAACCCAGCTGCAACTG
GAACATCTGCTGTTAGATCTGCAAATGATTCTGCAGGGGCATCAGCAACTACA
AAAATCCGAAACTGACCCGTATGCTGACCTTCAAATTCTACATGCCGAAAAA
AGCAACCGAGCTGAAACATCTGCAGTGTCTGGAAGAAGAACTGAAACCGCT
GGAAGAGGTTCTGAATCTGGCACAGAGCAAAAACTTTCATCTGCGTCCGCGT
GATCTGATTAGCCGTATTAACGTTATTGTGCTGGAAGTAAAGGTAGCGAAA
CCACCTTTATGTGTGAATATGCCGATGAAACCGCAACCATTTGTGGAATTTCTG
AATCGTTGGATTACCTTTGCACAGAGCATTATTAGCACCCCTGACCTAATGAGG
ATCC (SEQ ID NO.40).*

> Trình tự axit amin của interleukin-2-24:

MAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLQGISNYKNPKLTRMLTFKFYMPKK
ATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISRINVIVLELKGSETTFMC
EYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT (SEQ ID NO.41).

Sau khi được tổng hợp, trình tự gen của mỗi biến thể nêu trên được liên kết với vector pET-9a thông qua hai vị trí giới hạn, *Nde* I và *Bam*HI, để thu được vector biểu hiện tái tổ hợp đối với mỗi biến thể của interleukin-2.

3. Biểu hiện tái tổ hợp và điều chế interleukin-2 thể đại và biến thể của nó

Vector biểu hiện tái tổ hợp nêu trên được biến nạp vào chủng BL21 (DE3) (Novagen, Cat. 69450-3) để thu được vi khuẩn tái tổ hợp biểu hiện interleukin-2 thể đại và biến thể của nó, và vi khuẩn tái tổ hợp này được cấy trải lên các đĩa LB chứa gen kháng được chất Kan để sàng lọc.

Khuẩn lạc đơn được chọn bằng phương pháp sàng lọc bằng gen kháng được chất Kan và chuyển vào môi trường LB (10mL), nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C, và tốc độ bằng 220 vòng/phút cho đến khi OD₆₀₀ bằng 1,2±0,2, glycerol 50% được bổ sung vào nồng độ cuối cùng bằng 10%, và đóng gói cấp hai vào các ống bảo quản lạnh đông (1mL/ống) và bảo quản ở nhiệt độ -80°C.

Ống glycerol được lạnh đông được lấy ra và phục hồi trong bể nước ở nhiệt độ 37°C, cấy vào môi trường LB (1L), nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C, và tốc độ bằng 220 vòng/phút cho đến khi OD₆₀₀ nằm trong khoảng từ 0,6 đến 1,0, IPTG 1M được bổ sung vào để thu được nồng độ cuối cùng bằng 1mM, ủ và nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C, và tốc độ bằng 220 vòng/phút trong 4 giờ. Sau khi quá trình cảm ứng kết thúc, các vi khuẩn được thu nhận.

Các tế bào vi khuẩn được phá vỡ, các thể vùi được biến tính, tái tạo, và tinh chế, protein đích (interleukin-2 thể đại và các biến thể của nó) được thu nhận bằng cách thử nghiệm.

Ví dụ 2: Điều chế PEG-interleukin-2 và biến thể của nó

Protein interleukin-2 trong hệ đệm chứa dung dịch đệm axit axetic-natri axetat 10M, độ pH bằng 5,0 với nồng độ protein bằng 2mg/mL được điều chế; mPEG-butyraldehyd có khối lượng phân tử bằng 20kDa trong nước được bổ sung vào dung dịch protein interleukin-2, lượng của hợp chất mPEG-butyraldehyd cao gấp 1-2 lần lượng của

protein; dung dịch nước natri xyanobohydrit được bổ sung vào hệ thống phản ứng, lượng của hợp chất natri xyanobohydrit cao gấp 50-100 lần lượng của protein; phản ứng được thực hiện ở nhiệt độ 25°C trong thời gian từ 15 đến 20 giờ kết hợp khuấy, dung dịch nước glycin được bổ sung vào để dừng phản ứng. Nồng độ cuối cùng của glycin bằng 30mM. Sau khi phản ứng kết thúc, dung dịch cải biến PEG được tinh chế bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao pha đảo để phân tách các tạp chất (như protein được cải biến di/multi và protein không phản ứng) ra khỏi mono-PEG-interleukin-2. Hợp chất đích được thu nhận, hệ đệm được thay đổi, và phân tích hoạt tính và khả năng gắn kết được thực hiện. PEG-interleukin-2 và biến thể của nó được thu nhận bằng thử nghiệm.

Ví dụ 3: Nghiên cứu độ ổn định của interleukin-2 và biến thể của nó

1. Độ ổn định hóa học của interleukin-2 thể đại và biến thể của nó

Mẫu interleukin-2 thể đại (hệ đệm là 10mM Tris-HCl, 50mg/mL manitol, 0,18mg/mL SDS, độ pH bằng 8,5), được ủ ở nhiệt độ 40°C trong 30 ngày để nghiên cứu độ ổn định, mẫu được điều chế để phân tích quá trình phân hủy bằng phương pháp lập bản đồ peptit MS dạng lỏng.

Phương pháp phát hiện: mẫu (0,5mL) được điều chế, và dung dịch biến tính (0,5mL) được bổ sung vào (8mol/L guanidin hydroclorua, 0,2mol/L Tris-HCl, pH 9,0), DTT (8μL, 1mol/L, dithiothreitol) được bổ sung vào và trộn kỹ, ủ trong bể nước ở nhiệt độ 25°C trong 1 giờ. Sau đó, IAC (35μL, 0,5mol/L) được bổ sung vào và ủ trong bể nước ở nhiệt độ 25°C trong 1 giờ. Mẫu được hòa tan trong dung dịch đệm phân giải (2mol/L ure, 50mmol/L Tris-HCl, độ pH bằng 8,3) bằng cách trao đổi dung dịch đệm qua cột PD-10. Sau khi trao đổi dung dịch đệm, trypsin (12,5μg) được bổ sung vào mẫu (0,5mL) và ủ trong bể nước ở nhiệt độ 25°C trong 18 giờ, axit hydrocloric được bổ sung vào để dừng phản ứng, và phương pháp phân tích lập bản đồ peptit MS dạng lỏng được thực hiện.

Các kết quả thử nghiệm lập bản đồ peptit MS dạng lỏng được thể hiện trong Bảng

2. Sau khi được duy trì trong 30 ngày, như đối với mảnh giới hạn 9-32 chứa N26 và N29 (tức là mảnh peptit chứa các axit amin ở vị trí số 9-32), ba mảnh có mức độ gia tăng khử amin hóa đáng kể (tức là 9-32A, 9-32B, 9-32C) được phát hiện. Trong quy trình nghiên cứu các biến thể, độ ổn định của hai biến thể IL-2-08 (F42A/L72G) và IL-2-22 (N26Q/N29S/F42A/N71Q/L72G) được đánh giá, và các mẫu được lấy để phát hiện quá

trình phân hủy. Phương pháp đánh giá là tương tự như phương pháp đánh giá interleukin-2 thể đại. Các kết quả được thể hiện trong Bảng 2.

Các kết quả thử nghiệm cho thấy rằng ba mảnh có mức độ gia tăng khử amin hóa đáng kể có thể được phát hiện trên mảnh peptit 9-32 của cả IL-2-08 và interleukin-2 thể đại, với mức độ gia tăng khử amin hóa tương đương, cho thấy rằng đột biến F42A/L72G không có ảnh hưởng đến quá trình khử amin hóa trên mảnh peptit 9-32. Mặt khác, các đột biến N26 và N29 trên cả IL-2-22 và IL-2-24 đã làm giảm quá trình khử amin hóa của các mảnh ở hai vị trí này. Sau 30 ngày, đã phát hiện thấy rằng mức độ gia tăng các mảnh được khử amin hóa là <0,5% (không được thể hiện trong bảng), cho thấy rằng đột biến N26Q và đột biến N29S có thể làm tăng độ ổn định của interleukin-2.

Bảng 2. Các kết quả đánh giá độ ổn định của biến thể interleukin-2 (vị trí N26 và vị trí N29)

Hoạt chất	Mảnh giới hạn IL-2	Vị trí có thể khử amin hóa	Mức độ gia tăng khử amin hóa ở ngày 30
IL-2	9-32 A	Q11/Q13/Q22/N26/N29/N30	7,4%
	9-32 B	Q11/Q13/Q22/N26/N29/N30	1,7%
	9-32 C	Q11/Q13/Q22/N26/N29/N30	4,4%
IL-2-08 (F42A/L72G)	9-32 A	Q11/Q13/Q22/N26/N29/N30	6,2%
	9-32 B	Q11/Q13/Q22/N26/N29/N30	1,2%
	9-32 C	Q11/Q13/Q22/N26/N29/N30	5,2%
IL-2-22 (N26Q/N29S/F42A/N71Q/L72G)	9-32	Q11/Q13/Q22/Q26/N30	/
IL-2-24 (N26Q/N29S/N88R)	9-32	Q11/Q13/Q22/Q26/N30	/

Ngoài ra, trong IL-2-08 (F42A/L72G), bốn mảnh có mức độ gia tăng khử amin hóa đáng kể (tức là 55-76A, 55-76B, 55-76C, 55-76D) được phát hiện trong trình tự giới hạn 55-76. Tác dụng của đột biến N71 thành Q được đánh giá, tức là IL-2-22 (N26Q/N29S/F42A/N71Q/L72G); và các kết quả đánh giá độ ổn định được thể hiện trong Bảng 3. Đột biến ở vị trí N71 làm giảm số lượng mảnh được khử amin hóa trên trình tự giới hạn 55-76, làm giảm mức độ gia tăng khử amin hóa, cải thiện đáng kể quá trình khử amin hóa, và làm ổn định protein; do đó thiết kế này đáp ứng mong đợi.

Bảng 3. Các kết quả đánh giá độ ổn định của biến thể interleukin-2 (vị trí N71)

Hoạt chất	Mảnh giới hạn IL-2	Vị trí có thể khử amin hóa	Mức độ gia tăng khử amin hóa ở ngày 30
-----------	--------------------	----------------------------	--

IL-2-08 (F42A/L72G)	55-76 A	N71/Q57/Q74	14,2%
	55-76 B	N71/Q57/Q74	9,8%
	55-76 C	N71/Q57/Q74	1,2%
	55-76 D	N71/Q57/Q74	10,2%
IL-2-22 (N26Q/N29S/F42A/N71Q/ L72G)	55-76	Q71/Q57/Q74	3,1%

2. Độ ổn định nhiệt của interleukin-2 thể đại và biến thể của nó

Độ ổn định của 1mg/mL IL-2 mẫu (hệ đệm là dung dịch đệm axit axetic-natri axetat 10mM, độ pH bằng 4,5, 10% trehaloza) được nghiên cứu bằng thiết bị Uncle (Unchained labs). Nhiệt độ của mẫu được gia tăng từ 25°C đến 95°C ở tốc độ bằng 0,3°C/phút. Đồng thời, tryptophan trong mẫu được kích thích ở bước sóng bằng 266nm, và quá trình phát xạ của mẫu ở bước sóng nằm trong khoảng từ 300nm đến 400nm được quan sát. Nhiệt độ nóng chảy (T_m) được tính toán theo công thức sau, trong đó λ là bước sóng (nằm trong khoảng từ 300nm đến 400 nm), $I(\lambda)$ là cường độ phát xạ ở bước sóng này, và BCM là trị số trung bình trọng tâm, mà bước sóng được gán trọng số bằng cường độ ánh sáng.

$$BCM = \frac{\sum I(\lambda) \times \lambda}{\sum I(\lambda)}$$

$$T_m = \max \frac{dBCM}{dT}$$

Khi nhiệt độ tăng, các thông số BCM của mẫu thay đổi, phản ánh mức độ thay đổi cấu trúc protein. Interleukin-2 thể đại có hai nhiệt độ nóng chảy, cho thấy rằng interleukin-2 trải qua hai giai đoạn trước khi tháo gấp nếp hoàn toàn. Năng lượng cần thiết cho giai đoạn tháo gấp nếp thứ nhất là thấp hơn năng lượng cần thiết cho giai đoạn tháo gấp nếp thứ hai. Mặc dù các đột biến N26Q và N30S về cơ bản không ảnh hưởng đến nhiệt độ nóng chảy thứ nhất, nhưng làm tăng đáng kể nhiệt độ nóng chảy thứ hai; trong khi các đột biến IL-2-03, IL-2-04, và IL-2-05 không có nhiệt độ nóng chảy thứ nhất, và nhiệt độ nóng chảy thứ hai cũng cao hơn đáng kể so với nhiệt độ nóng chảy thứ hai của thể đại.

Các kết quả thử nghiệm độ ổn định nhiệt của biến thể interleukin-2 được thể hiện trong Fig.1A-1F và Bảng 4. Các kết quả thử nghiệm cho thấy rằng các đột biến N26Q,

N30S, Q11C/L132C, L70C/P82C và G27C/F78C cải thiện độ ổn định nhiệt của interleukin-2.

Bảng 4. Nhiệt độ nóng chảy của interleukin-2 thể đại và biến thể của nó

Hoạt chất	T _{m1} (°C)	T _{m2} (°C)
IL-2	61,5	77,5
IL-2-01	60,8	90,5
IL-2-02	61,8	89,1
IL-2-03	Vắng mặt	92,1
IL-2-04	Vắng mặt	91,8
IL-2-05	Vắng mặt	92,5

Ví dụ 4: Xác định ái lực gắn kết của interleukin-2 biến thể với thụ thể interleukin 2 alpha (IL-2R α)

ELISA được sử dụng để phát hiện đặc tính gắn kết của interleukin-2 và biến thể của nó với thụ thể IL-2R α . Protein tái tổ hợp IL-2R α chứa trình tự đánh dấu his được phủ, và IL-2 được bổ sung vào, sau đó hoạt tính của kháng thể gắn kết với kháng nguyên được phát hiện bằng bổ sung kháng thể đa dòng kháng interleukin-2 được tiếp hợp với HRP và cơ chất HRP TMB.

Đĩa vi chuẩn độ 96 giếng được phủ với protein tái tổ hợp IL-2R α được đánh dấu his (2 μ g/mL) (SinoBiological, mã sản phẩm số 10165-H08H), và ủ qua đêm ở nhiệt độ 4°C. Đĩa này được rửa ba lần bằng dung dịch rửa, 250 μ L/giếng. Đối với mỗi lần rửa, đĩa này được lắc trong 10 giây để đảm bảo rửa đầy đủ. Dung dịch phong bế (200 μ L/giếng) được bổ sung vào và ủ ở nhiệt độ phòng trong 2 giờ. Đĩa này được rửa ba lần bằng dung dịch rửa, 250 μ L/giếng. Đối với mỗi lần rửa, đĩa này được lắc trong 10 giây để đảm bảo rửa đầy đủ. Interleukin-2 (100 μ L) và biến thể của nó được pha loãng bằng dung dịch pha loãng được bổ sung vào mỗi giếng. Đĩa này được ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng. Đĩa này được rửa ba lần bằng dung dịch rửa, 250 μ L/giếng. Kháng thể đa dòng kháng interleukin-2 được đánh dấu HRP (100 μ L) (SinoBiological, mã sản phẩm số 11848-T16) được pha loãng đến nồng độ bằng 0,1 μ g/mL bằng dung dịch pha loãng được bổ sung vào mỗi giếng. Đĩa này được ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng. Đĩa này được rửa ba lần bằng dung dịch rửa, 250 μ L/giếng. TMB (100 μ L) được bổ sung vào mỗi giếng, và phản ứng được thực hiện trong 15 phút trong bóng tối. Axit sulfuric 0,16M (50 μ L) được bổ sung vào mỗi giếng. Thiết bị đọc vi đĩa Thermo MultiSkanFc được sử dụng để đọc trị số OD ở bước sóng bằng 450nm, và trị số EC50 để đánh giá gắn kết của interleukin-2 và biến thể của nó với thụ thể IL-2R α được tính toán.

Dữ liệu gắn kết ELISA của các biến thể theo ví dụ 4 với thụ thể IL-2R α được thể hiện trong Fig.2 và Bảng 5. Các kết quả phân tích cho thấy rằng loại đột biến thứ nhất (tức là các đột biến N26Q, N30S, Q11C/L132C, L70C/P82C, G27C/F78C và N29S) không ảnh hưởng đến gắn kết của interleukin-2 với thụ thể IL-2R α ; trong khi đó loại đột biến thứ hai (tức là F42A/Y45A, F42A/L72G, Y45A/L72G, đột biến thành QSMHIDATL ở các vị trí số 29-44) làm giảm đáng kể gắn kết của interleukin-2 với thụ thể IL-2R α ; gắn kết của interleukin-2 với thụ thể IL-2R α hầu như không thể quan sát được trong các điều kiện thử nghiệm. Gắn kết của interleukin-2 với thụ thể IL-2R α cũng được giảm, do sự có mặt của loại đột biến thứ hai, khi hai loại đột biến này được tổ hợp.

> IL-2R α (trình tự đánh dấu His)

ELCDDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGFRRIKSGSLYMLCTGNS
SHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPEEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHC
REPPPWENEATERIYHFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRW
TQPQLICTGEMETSQFPGEEKPQASPEGRPESETSCHHHHHH (SEQ ID NO.37).

Bảng 5. Phát hiện EC₅₀ để đánh giá gắn kết của interleukin-2 biến thể với thụ thể ái lực thấp IL-2R α bằng phương pháp ELISA

Hoạt chất	Vị trí và loại mutation (Axit amin SEQ ID NO.)	EC ₅₀ (nM)
IL-2	thể đại (SEQ ID NO.2)	0,50
IL-2-01	N26Q (SEQ ID NO.4)	0,50
IL-2-02	N30S (SEQ ID NO.6)	0,41
IL-2-03	Q11C/L132C (SEQ ID NO.8)	1,53
IL-2-04	L70C/P82C (SEQ ID NO.10)	0,87
IL-2-05	G27C/F78C (SEQ ID NO.12)	0,60
IL-2-06	đột biến thành QSMHIDATL ở các vị trí số 29-44 (SEQ ID NO.14)	N.A.
IL-2-07	F42A/Y45A (SEQ ID NO.16)	N.A.
IL-2-08	F42A/L72G (SEQ ID NO.18)	N.A.
IL-2-09	Y45A/L72G (SEQ ID NO.20)	N.A.
IL-2-13	N26Q/N30S/G27C/F78C/F42A/L72G (SEQ ID NO.28)	N.A.

(Lưu ý: N.A., không thể phát hiện, do ái lực gắn kết thấp của các biến thể này với thụ thể IL-2R α , EC₅₀ không thể thu được bằng cách hiệu chỉnh dữ liệu trong khoảng nồng độ được sử dụng trong thử nghiệm).

Octet RED96e (Fortebio) được sử dụng để phát hiện ái lực của interleukin-2, PEG-IL-2-10, PEG-IL-2-22 và PEG-IL-2-23 với thụ thể IL-2R α .

Cảm biến sinh học HIS1K (Fortebio, 18-5120) được nhúng vào dung dịch đệm (200 μ L, PBS, độ pH bằng 7,4, 0,02% tween-20, 0,1% BSA) trong 10 phút, để xử lý ướn. Sau đó, IL-2R α của người chứa trình tự đánh dấu His (SinoBiological, mã sản phẩm số 10165-H08H) được hòa tan trong dung dịch PBS, độ pH bằng 7,4, 0,02% tween-20 và 0,1% BSA, và cảm biến được đặt vào dung dịch này (200 μ L). Cảm biến này được đặt vào dung dịch đệm (200 μ L, PBS, độ pH bằng 7,4, 0,02% tween-20, 0,1% BSA) để rửa sạch IL-2R α còn dư. Sau đó, PEG-IL-2-10, PEG-IL-2-22 và PEG-IL-2-23 được pha loãng tương ứng đến nồng độ bằng 133,3nM bằng dung dịch đệm (PBS, độ pH bằng 7,4, 0,02% tween-20, và 0,1% BSA). Cảm biến này được đặt vào các dung dịch interleukin-2 có nồng độ khác nhau và duy trì trong 300 giây để gắn kết. Sau đó, cảm biến này được đặt vào dung dịch PBS 1 $\times$ (200 μ L, độ pH bằng 7,4, 0,02% tween-20, 0,1% BSA, trong 600 giây để phân ly interleukin-2. Các kết quả thử nghiệm trong Bảng 6 cho thấy rằng PEG-IL-2-10, PEG-IL-2-22 và PEG-IL-2-23 đều không gắn kết với thụ thể IL-2R α .

Bảng 6. Ái lực gắn kết của interleukin-2 biến thể với thụ thể ái lực thấp IL-2R α (Octet)

Hoạt chất	Vị trí và loại đột biến (axit amin SEQ ID NO.)	Ái lực (nM)
IL-2	thể đại (SEQ ID NO.2)	7,83
IL-2-24	N26Q/N29S/N88R (SEQ ID NO.38)	11,8
PEG-IL-2-10	N26Q/N30S/F42A/L72G (SEQ ID NO.22)	N.A.
PEG-IL-2-22	N26Q/N29S/F42A/N71G/L72G (SEQ ID NO.34)	N.A.
PEG-IL-2-23	Q11C/NNYKNPKLTRMLTFKF ở các vị trí số 29-44 được đột biến thành QSMHIDATL/L132C (SEQ ID NO.36)	N.A.

(Lưu ý: N.A., không thể phát hiện, các biến thể này có ái lực gắn kết thấp với thụ thể IL-2R α , ái lực không thể thu được bằng cách hiệu chỉnh dữ liệu trong khoảng nồng độ được sử dụng trong thử nghiệm.)

Ví dụ 5: Xác định ái lực gắn kết của interleukin-2 và biến thể của nó với thụ thể IL-2 beta/gama (IL-2R β / γ)

Thử nghiệm Biacore được sử dụng để phát hiện khả năng gắn kết của interleukin-2 và biến thể của nó theo ví dụ 1 với thụ thể IL-2R β / γ .

Trước tiên, tiểu đơn vị IL-2R β và tiểu đơn vị IL-2R γ được tách dòng và dung hợp tương ứng với Fc dạng khoang và Fc dạng hốc (SEQ ID NO.38 và SEQ ID NO.39) để thu được phân tử khuôn IL-2R β / γ -Fc heterodime. IL-2R β -Fc-dạng khoang và IL-2R γ -Fc-dạng hốc được đồng chuyển nhiễm vào các tế bào HEK293. Heterodime được tinh chế

bằng protein A, sau đó bằng sàng phân tử Superdex 200. Protein IL-2R β / γ được thu nhận bằng thử nghiệm.

>IL-2R β (khoảng Fc)

MDMRVPAQLLGLLLLWPGARCAVNGTSQFTCFYNSRANISCVWSQDGA
LQDTSCQVHAWPDRRRWNQTCELLPVSQASWACNLILGAPDSQKLTTVDIVTLR
VLCREGVRWRVMAIQDFKPFENLRLMAPISLQVVHVETHRCNISWEISQASHYFE
RHLEFEARTLSPGHTWEEAPLLTLKQKQEWICLETLTPDTQYEFQVRVKPLQGEF
TTWSPWSQPLAFRTKPAALGKDTGAQDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD
TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDE
LTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTV
DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO.38).

>IL-2R γ (hóc Fc)

MLKPSLPFTSLLFLQLPLLGVGLNTTILTPNGNEDTTADFFLTMTPTDSLVS
STLPLPEVQCFVFNVEYMNCTWNSSSEPQPTNLTLHYWYKNSDNDKVQKCSHY
LFXEMITSGCQLQKKEIHL YQTFVVQLQDPREPRRQATQMLKLQNLVIPWAPEN
LTLHKLSSESQLELNWNNRFLNHCLEHLVQYRTDWDHSWTEQSVDYRHKFSLPS
VDGQKRYTFRVRSRFPNLCGSAQHWSEWSHPIHWGSNTSKENPFLFALEAGAQD
KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL
PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY
TQKSLSLSPGK (SEQ ID NO.39).

Chip cảm biến protein A (GE, mã sản phẩm số 29127556) của thiết bị Biacore (Biacore T200, GE) được sử dụng để bắt giữ IL-2R β / γ -Fc, trong đó IL-2R β / γ -Fc được pha loãng bằng 1×HBS-EP đến nồng độ bằng 1 μ g/mL, và chảy ở tốc độ dòng bằng 10 μ L/phút trong 30 giây. Sau đó, một dãy gradien nồng độ của interleukin-2 và biến thể của nó được chảy qua bề mặt chip ở tốc độ dòng bằng 30 μ L/phút, gắn kết được duy trì trong 120 giây và phân ly được duy trì trong 360 giây. Thiết bị Biacore (Biacore X100, GE) được sử dụng để phát hiện phản ứng theo thời gian thực, để thu được đường cong liên kết và đường cong phân ly. Sau khi mỗi chu kỳ phân ly được kết thúc, chip được rửa

và tái tạo bằng dung dịch Gly-HCl 10mM, độ pH bằng 1,5. Dữ liệu thử nghiệm được đưa vào mô hình gắn kết 1:1, và các trị số thể hiện khả năng gắn kết của interleukin-2 và biến thể của nó với thụ thể ái lực trung bình IL-2R β / γ được thu nhận, như được thể hiện trong Bảng 7.

Các kết quả phân tích cho thấy rằng toàn bộ các đột biến N26Q, N30S, Q11C/L132C, L70C/P82C, G27C/F78C, F42A/Y45A, F42A/L72G, Y45A/L72G, N26Q/N30S/F42A/L72G, đột biến thành QSMHIDATL ở các vị trí số 29-44, và tổ hợp của chúng, có ít ảnh hưởng đến gắn kết của interleukin-2 với thụ thể IL-2R β / γ .

Bảng 7. Ái lực của interleukin-2 và biến thể của nó với thụ thể ái lực trung bình IL-2R β / γ

Hợp chất	K_{on} (M ⁻¹ giây ⁻¹)	K_{off} (giây ⁻¹)	K_d (nM)
IL-2 (WT)	$9,36 \times 10^5$	$2,40 \times 10^{-4}$	0,257
IL-2-01	$9,02 \times 10^5$	$2,20 \times 10^{-4}$	0,244
IL-2-02	$1,03 \times 10^6$	$2,12 \times 10^{-4}$	0,206
IL-2-03	$5,33 \times 10^5$	$1,35 \times 10^{-4}$	0,253
IL-2-04	$4,98 \times 10^5$	$1,50 \times 10^{-4}$	0,302
IL-2-05	$3,36 \times 10^5$	$9,68 \times 10^{-5}$	0,288
IL-2-06	$8,56 \times 10^5$	$4,36 \times 10^{-4}$	0,509
IL-2-07	$8,22 \times 10^5$	$2,15 \times 10^{-4}$	0,261
IL-2-08	$9,20 \times 10^5$	$2,06 \times 10^{-4}$	0,224
IL-2-09	$6,46 \times 10^5$	$2,22 \times 10^{-4}$	0,344
IL-2-10	$1,62 \times 10^6$	$4,30 \times 10^{-4}$	0,266

Phương pháp tương tự được sử dụng để phát hiện ái lực của PEG-IL-2-10, PEG-IL-2-22 và PEG-IL-2-23 với thụ thể IL-2R β / γ bằng thiết bị Biacore. Các kết quả được thể hiện trong Bảng 8. Các kết quả phân tích cho thấy rằng biến thể interleukin-2 khi được ghép cặp với PEG thể hiện gắn kết giảm với thụ thể IL-2R β / γ đến mức độ nhất định, nhưng vẫn duy trì ái lực mạnh. Các kết quả thử nghiệm cho thấy rằng IL-2-24 gắn kết yếu với thụ thể IL-2R β , khi so với interleukin-2 thể dại, cho thấy rằng N26Q/N29S/N88R làm giảm gắn kết của interleukin-2 với thụ thể IL-2R β (các kết quả không được thể hiện trong thử nghiệm này).

Bảng 8. Ái lực của biến thể PEG-IL-2 với thụ thể ái lực trung bình IL-2R β / γ

Hợp chất	K_{on} (M ⁻¹ giây ⁻¹)	K_{off} (giây ⁻¹)	K_d (nM)
PEG-IL-2-10	$1,38 \times 10^6$	$1,19 \times 10^{-3}$	0,86
PEG-IL-2-22	$1,55 \times 10^5$	$5,49 \times 10^{-4}$	3,54
PEG-IL-2-23	$3,50 \times 10^5$	$6,49 \times 10^{-4}$	1,86

Ví dụ 6: Khả năng sống sót của tế bào được điều hòa bởi thụ thể ái lực cao IL-2R α / β / γ của interleukin-2 và biến thể của nó

CTLL2 là dòng tế bào có nguồn gốc từ chuột nhất biểu hiện đồng thời IL-2R α , IL-2R β , và IL-2R γ , có thể được sử dụng để đánh giá khả năng sống sót của tế bào được điều hòa bởi thụ thể ái lực cao IL-2R α / β / γ của mỗi biến thể. Ở các nồng độ khác nhau của interleukin-2 hoặc biến thể của nó, tốc độ tăng sinh của CTLL-2 được phát hiện để đánh giá hoạt tính sinh học của interleukin-2 hoặc biến thể của nó.

Môi trường nuôi cấy hoàn chỉnh: RPMI 1640 + 2mM L-glutamin + 1mM natri pyruvat + 10% huyết thanh bào thai bê + 10% T-STIM, có bổ sung concanavalin-A (chứa IL-2); Môi trường cơ bản: RPMI 1640 + 2mM L-glutamin + 1mM natri pyruvat + 10% huyết thanh bào thai bò.

Thử nghiệm tăng sinh tế bào CTLL-2: Các tế bào CTLL-2 được nuôi cấy trong môi trường nuôi cấy hoàn chỉnh ở nhiệt độ 37°C, 5% CO₂ để đạt được mật độ bằng 2,0 $\times$ 10⁵ tế bào/mL, các tế bào được nuôi cấy cấp hai, và các tế bào CTLL-2 được thu nhận bằng cách ly tâm sau 3-4 ngày. Các tế bào được rửa ba lần bằng PBS, và tạo hỗn dịch lại trong môi trường nuôi cấy cơ bản để thu được hỗn dịch tế bào có 2,0 $\times$ 10⁵ tế bào/mL, và ủ trong đĩa 96 giếng, với 90 μ L tế bào/giếng. Dung dịch interleukin-2 đậm đặc 10x (10 μ L) được điều chế với môi trường nuôi cấy cơ bản đến nồng độ tương ứng được bổ sung vào. Các tế bào được ủ ở điều kiện nhiệt độ 37°C và 5% CO₂. Sau khi ủ trong 24 giờ, dung phân giải chứa chất phản ứng CELLTITER-Glo (100 μ L, Promega) được bổ sung vào mỗi giếng, và trộn với dung dịch trong đĩa tế bào. Đĩa này được đặt vào thiết bị đọc vi đĩa, với bước sóng tham chiếu bằng 630nm, và độ hấp thụ được đo ở bước sóng bằng 570nm, và các kết quả đo được ghi lại.

Dữ liệu được hiệu chỉnh bằng cách sử dụng chương trình máy tính hoặc thuật toán hồi quy bốn thông số, và các kết quả tính toán được tính toán như sau:

Hoạt tính sinh học tương đối của mẫu thử nghiệm (%) = EC₅₀ của mẫu tham chiếu/EC₅₀ của mẫu thử nghiệm (EC₅₀: nồng độ để tạo ra 50% tác dụng tối đa).

Dữ liệu hoạt tính của interleukin-2 và biến thể của nó được thể hiện trong Bảng 9, Bảng 10 và Fig.3A-Fig.3C. Các kết quả phân tích cho thấy rằng loại đột biến thứ nhất (tức là các đột biến N26Q, N29S, N30S, Q11C/L132C, L70C/P82C và G27C/F78C) không ảnh hưởng hoặc thậm chí tăng cường một chút hoạt tính của interleukin-2 để tăng

cường tăng sinh tế bào CTLL2; trong khi đó loại đột biến thứ hai (tức là, F42A/Y45A, F42A/L72G, Y45A/L72G, và đột biến thành QSMHIDATL ở các vị trí số 29-44) làm giảm gắn kết của interleukin-2 với thụ thể IL-2R α , cũng như làm giảm hoạt tính của interleukin-2 để tăng cường tăng sinh tế bào CTLL2.

Bảng 9. Hoạt tính của biến thể interleukin-2 để tăng cường tăng sinh tế bào CTLL2

Hoạt chất	Vị trí và loại mutation (Axit amin SEQ ID NO.)	Hoạt tính sinh học tương đối
IL-2	thể đại (SEQ ID NO.2)	100%
IL-2-01	N26Q (SEQ ID NO.4)	96%
IL-2-02	N30S (SEQ ID NO.6)	117%
IL-2-03	Q11C/L132C (SEQ ID NO.8)	162%
IL-2-04	L70C/P82C (SEQ ID NO.10)	176%
IL-2-05	G27C/F78C (SEQ ID NO.12)	229%
IL-2-06	đột biến thành QSMHIDATL ở các vị trí số 29-44 (SEQ ID NO.14)	4%
IL-2-07	F42A/Y45A (SEQ ID NO.16)	4%
IL-2-08	F42A/L72G (SEQ ID NO.18)	7%
IL-2-09	Y45A/L72G (SEQ ID NO.20)	2%

Bảng 10. Hoạt tính của biến thể interleukin-2 để tăng cường tăng sinh tế bào CTLL2

Hoạt chất	Vị trí và loại đột biến (axit amin SEQ ID NO.)	EC ₅₀ (nM)	Hoạt tính sinh học tương đối
IL-2	thể đại (SEQ ID NO.2)	0,053	100 %
IL-2-10	N26Q/N30S/F42A/L72G (SEQ ID NO.22)	4,80	1 %
IL-2-22	N26Q/N29S/F42A/N71G/L72G (SEQ ID NO.34)	5,73	0,9 %
IL-2-23	Q11C/NNYKNPKLTRMLTFKF ở các vị trí số 29-44 được đột biến thành QSMHIDATL/L132C (SEQ ID NO.36)	22,71	0,2 %
PEG-IL-2-10	N26Q/N30S/F42A/L72G (SEQ ID NO.22)	35,29	0,2 %
PEG-IL-2-22	N26Q/N29S/F42A/N71G/L72G (SEQ ID NO.34)	39,25	0,1%
PEG-IL-2-23	Q11C/NNYKNPKLTRMLTFKF ở các vị trí số 29-44 được đột biến thành QSMHIDATL/L132C (SEQ ID NO.36)	N.A.	N.A.

(Lưu ý: N.A., không thể phát hiện, có nghĩa là tác dụng của biến thể đến quá trình tăng sinh của tế bào CTLL2 là thấp, và EC₅₀ không thể thu được bằng cách hiệu chỉnh dữ liệu trong khoảng nồng độ được sử dụng trong thử nghiệm.)

Ví dụ 7: Khả năng sống sót của tế bào được điều hòa bởi thụ thể có ái lực trung bình IL-2R β / γ của interleukin-2 và biến thể của nó

Mo7e là dòng tế bào có nguồn gốc từ người chỉ biểu hiện IL-2R β và IL-2R γ , nhưng không biểu hiện IL-2R α . Mo7e có thể được sử dụng để đánh giá khả năng sống sót của tế bào được điều hòa bởi thụ thể ái lực trung bình IL-2R β/γ của mỗi biến thể. Ở các nồng độ khác nhau của interleukin-2 hoặc biến thể của nó, tốc độ tăng sinh phụ thuộc dòng tế bào của Mo7e được phát hiện để đánh giá hoạt tính sinh học của interleukin-2 hoặc biến thể của nó.

Môi trường nuôi cấy hoàn chỉnh: RPMI 1640 + 2mM L-glutamin + 1mM natri pyruvat + 10% huyết thanh bào thai bê + 15 ng/mL GM-CSF; môi trường cơ bản: RPMI 1640 + 2mM L-glutamin + 1mM natri pyruvat + 10% huyết thanh bào thai bò.

Thử nghiệm tăng sinh tế bào Mo7e: các tế bào Mo7e được nuôi cấy trong môi trường nuôi cấy hoàn chỉnh ở nhiệt độ 37°C, 5% CO₂ để đạt được mật độ bằng $2,0 \times 10^5$ tế bào/mL, các tế bào được nuôi cấy cấp hai, và các tế bào Mo7e được thu nhận bằng cách ly tâm sau 3-4 ngày. Các tế bào được rửa ba lần bằng PBS, và tạo hỗn dịch lại trong môi trường nuôi cấy cơ bản để thu được hỗn dịch tế bào có $2,0 \times 10^5$ tế bào/mL, và ủ trong đĩa 96 giếng, với 90 μ L tế bào/giếng. Dung dịch interleukin-2 đậm đặc 10x (10 μ L) được điều chế với môi trường nuôi cấy cơ bản đến nồng độ tương ứng được bổ sung vào. Các tế bào được ủ ở điều kiện nhiệt độ 37°C và 5% CO₂. Sau khi ủ for 72 giờ, dung phân giải chứa chất phản ứng CELLTITER-Glo (100 μ L, Promega) được bổ sung vào mỗi giếng, và trộn với dung dịch trong đĩa tế bào. Đĩa này được đặt vào thiết bị đọc vi đĩa, với bước sóng tham chiếu bằng 630nm, và độ hấp thụ được đo ở bước sóng bằng 570nm, và các kết quả đo được ghi lại. The same method theo ví dụ 6 được sử dụng để tính toán hoạt tính sinh học tương đối.

Dữ liệu hoạt tính tăng sinh tế bào Mo7e của interleukin-2 và biến thể của nó được thể hiện trong Bảng 11 và Fig.4A-4C. Các kết quả phân tích cho thấy rằng loại đột biến thứ nhất (tức là các đột biến N26Q, N29S, N30S, Q11C/L132C, L70C/P82C và G27C/F78C), và loại đột biến thứ hai (tức là F42A/Y45A, F42A/L72G, Y45A/L72G, và đột biến thành QSMHIDATL ở các vị trí số 29-44) đều không ảnh hưởng đến hoạt tính của interleukin-2 để tăng cường tăng sinh các tế bào Mo7e, cho thấy rằng các đột biến này không ảnh hưởng đến ái lực của interleukin-2 với thụ thể IL-2R β/γ . Khi được ghép cặp với PEG, interleukin-2 sẽ làm giảm hoạt tính tăng cường tăng sinh tế bào Mo7e của interleukin-2 đến mức độ nhất định, nhưng vẫn duy trì gắn kết thích hợp.

Bảng 11. Hoạt tính của interleukin-2 và biến thể của nó to promote tăng sinh các tế bào Mo7e

Hoạt chất	Vị trí và loại đột biến (axit amin SEQ ID NO.)	EC ₅₀ (nM)	Hoạt tính sinh học tương đối
IL-2	thể đại (SEQ ID NO.2)	2,44	100 %
IL-2-10	N26Q/N30S/F42A/L72G (SEQ ID NO.22)	1,78	137 %
IL-2-22	N26Q/N29S/F42A/N71G/L72G (SEQ ID NO.34)	2,84	86 %
IL-2-23	Q11C/NNYKNPKLTRMLTFKF ở các vị trí số 29-44 được đột biến thành QSMHIDATL/L132C (SEQ ID NO.36)	2,22	110 %
PEG-IL-2-10	N26Q/N30S/F42A/L72G (SEQ ID NO.22)	13,19	19 %
PEG-IL-2-22	N26Q/N29S/F42A/N71G/L72G (SEQ ID NO.34)	34,81	7 %
PEG-IL-2-23	Q11C/NNYKNPKLTRMLTFKF ở các vị trí số 29-44 được đột biến thành QSMHIDATL/L132C (SEQ ID NO.36)	23,37	10%

Ví dụ 8: Xác định hoạt tính của interleukin-2 và biến thể của nó trong quá trình phosphoryl hóa STAT5 trong các tế bào CTLL2

Hoạt tính sinh học của interleukin-2 hoặc biến thể của nó được phát hiện, trên cơ sở mức độ phosphoryl hóa của STAT5 trong chủng phụ thuộc tế bào CTLL-2 ở các nồng độ khác nhau của interleukin-2 hoặc biến thể của nó.

Môi trường nuôi cấy hoàn chỉnh: RPMI 1640 + 2mM L-glutamin + 1mM natri pyruvat + 10% huyết thanh bào thai bò + 10% môi trường nuôi cấy T-STIM có bổ sung concanavalin-A (chứa IL-2); Môi trường cơ bản: RPMI 1640 + 2mM L-glutamin + 1mM natri pyruvat + 10% huyết thanh bào thai bò.

Thử nghiệm phosphoryl hóa STAT5 trong các tế bào CTLL-2: Các tế bào CTLL-2 được nuôi cấy trong môi trường nuôi cấy hoàn chỉnh ở nhiệt độ 37°C và 5% CO₂ để đạt được mật độ bằng $2,0 \times 10^5$ tế bào/mL, và rửa một lần bằng PBSA (PBS, pH7,2, 1% BSA), và mật độ được điều chỉnh đến $1,0 \times 10^6$ tế bào/mL, và các tế bào được chia vào các ống với 500μL/ống. Các nồng độ tương ứng của dung dịch interleukin-2 đặc được điều chế với môi trường nuôi cấy cơ bản được ủ ở nhiệt độ phòng trong 20 phút; paraformaldehyt được bổ sung ngay lập tức vào nồng độ cuối cùng bằng 1,5% và trộn bằng cách lắc xoáy, và ủ ở nhiệt độ phòng trong 10 phút. PBS (1mL) được bổ sung vào, và ly tâm ở nhiệt độ 4°C, tốc độ bằng 1400 vòng/phút trong 5 phút để loại bỏ paraformaldehyt. Các tế bào được tạo hỗn dịch lại, metanol được làm lạnh trước (1mL, 100%) được bổ sung vào ở nhiệt độ 4°C và trộn bằng cách lắc xoáy, các tế bào được ủ ở nhiệt độ 4°C trong 20 phút. Dung dịch đệm PBSA (3mL) được bổ sung vào, và ly tâm ở nhiệt độ 4°C, tốc độ bằng 1400 vòng/phút trong 5 phút. Các tế bào được rửa hai lần.

Kháng thể kháng STAT5-pY694 được tiếp hợp với Alexa Fluor 647 (BD, mã sản phẩm số 612599) được ủ trong 30 phút ở nhiệt độ phòng trong bóng tối. Các tế bào được rửa hai lần bằng dung dịch PBSA (3mL), và phát hiện bằng thiết bị đếm tế bào theo dòng chảy. Phương pháp như được mô tả trong ví dụ 6 được sử dụng để tính toán hoạt tính sinh học tương đối.

Dữ liệu hoạt tính của interleukin-2 và biến thể của nó trong quá trình phosphoryl hóa STAT5 trong các tế bào CTLL2 được thể hiện trong Fig.5 và Bảng 12. Các kết quả phân tích cho thấy rằng các đột biến N26Q, N29S và N30S không ảnh hưởng hoặc thậm chí tăng cường một chút hoạt tính của interleukin-2 trong quá trình phosphoryl hóa STAT5 trong các tế bào CTLL2, trong khi F42A/Y45A, F42A/L72G và Y45A/L72G làm giảm hoạt tính của interleukin-2 trong quá trình phosphoryl hóa STAT5 trong các tế bào CTLL2. Do đó, có thể khẳng định được rằng N26Q, N29S, và N30S không ảnh hưởng đến gắn kết của interleukin-2 với thụ thể ái lực cao IL-2R α / β / γ , trong khi đó F42A/Y45A, F42A/L72G và Y45A/L72G làm giảm gắn kết của interleukin-2 với thụ thể ái lực cao IL-2R α / β / γ .

Bảng 12. Hoạt tính của interleukin-2 thể đại và biến thể của nó trong quá trình phosphoryl hóa STAT5 trong các tế bào CTLL2

Hoạt chất	Đột biến (axit amin SEQ ID NO.)	EC ₅₀ (nM)	Hoạt tính sinh học tương đối
IL-2	thể đại (SEQ ID NO.2)	0,010	100%
IL-2-01	N26Q (SEQ ID NO.4)	0,0084	119%
IL-2-02	N30S (SEQ ID NO.6)	0,0084	119%
IL-2-07	F42A/Y45A (SEQ ID NO.16)	2,45	0,41%
IL-2-08	F42A/L72G (SEQ ID NO.18)	3,93	0,25%
IL-2-09	Y45A/L72G (SEQ ID NO.20)	4,02	0,25%

Ví dụ 9: Xác định hoạt tính của interleukin-2 và biến thể của nó trong quá trình phosphoryl hóa STAT5 trong tế bào đơn nhân máu ngoại vi của người

Hoạt tính sinh học của interleukin-2 được phát hiện, trên cơ sở mức độ phosphoryl hóa của STAT5 trong các quần thể tế bào khác nhau trong máu ngoại vi của người (bao gồm Tregs, tế bào giết tự nhiên, tế bào T biểu hiện CD4, và tế bào T biểu hiện CD8), ở các nồng độ khác nhau của interleukin-2 hoặc biến thể của nó.

Môi trường cơ bản: RPMI 1640 + 10% huyết thanh bào thai bò.

Hỗn hợp kháng thể: CD3 APC-Cy7 (BD 557832), CD4 BB515 (BD 564419), CD8 BB700 (BD 566452), CD25 BV421 (BD 564033), FOXP3 PE (BD 560852), CD56 BV650 (BD 564057), pSTAT5 AF647 (BD 562076).

Thử nghiệm phosphoryl hóa STAT5 trong tế bào đơn nhân máu ngoại vi của người: các tế bào đơn nhân máu ngoại vi của người mới được phân lập được điều chỉnh đến mật độ bằng $6,0 \times 10^6$ tế bào/mL bằng môi trường cơ bản, và 90 μ L được bổ sung vào đĩa 96 giếng. Interleukin-2 và biến thể của nó và dẫn xuất của nó được pha loãng bằng môi trường cơ bản đến nồng độ bằng 1000nM, 100nM, 10nM, 1nM, 0,1nM, 0,01nM; 10 μ L được bổ sung vào các tế bào đơn nhân máu ngoại vi của người (90 μ L) và kích thích ở nhiệt độ 37°C trong 15 phút. Sau đó, các tế bào được cố định ngay bằng dung dịch đệm cố định tế bào BD được làm ấm trước (BD, mã sản phẩm số 554655) ở nhiệt độ 37°C trong 10 phút. Các tế bào được ly tâm ở tốc độ bằng 350g trong 7 phút ở nhiệt độ 4°C. Dịch nổi được loại bỏ, dung dịch đệm BD Phosflow Perm III (200 μ L, BD, mã sản phẩm số 558050) được làm lạnh trước ở nhiệt độ -20°C được bổ sung vào nước đá trong 30 phút để phân giải màng tế bào. Các tế bào được ly tâm ở tốc độ bằng 450g trong 7 phút ở nhiệt độ 4°C. Dịch nổi được loại bỏ, dung dịch PBS (200 μ L, độ pH bằng 7,4) được bổ sung vào để rửa hai lần. Hợp chất phong bế FcR (100 μ L) được pha loãng ở tỷ lệ bằng 1:200 được bổ sung vào và ủ ở nhiệt độ 4°C trong 20 phút. Mẫu được ly tâm ở tốc độ bằng 450g trong 7 phút ở nhiệt độ 4°C. Dịch nổi được loại bỏ, hỗn hợp kháng thể (100 μ L) được bổ sung vào, và các tế bào được nhuộm màu ở nhiệt độ phòng trong 40 phút. Mẫu được ly tâm ở tốc độ bằng 450g trong 7 phút ở nhiệt độ 4°C. Dịch nổi được loại bỏ, dung dịch PBS (200 μ L, độ pH bằng 7,4) được bổ sung vào để rửa một lần. Dung dịch PBS (200 μ L, độ pH bằng 7,4) được bổ sung vào để tạo hỗn dịch lại các tế bào đơn nhân máu ngoại vi để phát hiện bằng thiết bị đếm tế bào theo dòng chảy. Các tế bào giết tự nhiên được xác định là các tế bào CD3-CD56+, các tế bào T biểu hiện CD8 được xác định là các tế bào CD3+CD4-CD8+, và các tế bào T điều hòa được xác định là các tế bào CD3+CD4+CD25+Foxp3+.

Đối với ba quần thể tế bào mô tả nêu trên, các trị số huỳnh quang pSTAT5 (MFI) các nồng độ khác nhau của interleukin-2 được xác định, hiệu chỉnh bằng cách sử dụng chương trình máy tính hoặc thuật toán hồi quy bốn thông số, và hoạt tính sinh học tương đối được tính toán theo phương pháp tương tự như được mô tả trong ví dụ 6.

Các kết quả phân tích cho thấy rằng F42A/L72G và các đột biến trong IL-2-10 và IL-2-23 chỉ làm giảm gắn kết của interleukin-2 với thụ thể IL-2R α , nhưng không ảnh hưởng đến gắn kết của interleukin-2 với thụ thể IL-2R β/γ ; do đó mức độ suy giảm hoạt tính của tế bào T điều hòa gây ra bởi các đột biến này lớn hơn mức độ suy giảm hoạt tính của tế bào T điều hòa trong tế bào T biểu hiện CD8 và tế bào giết tự nhiên. Ngược lại, do N88R không ảnh hưởng đến gắn kết của interleukin-2 với thụ thể IL-2R α , nhưng làm giảm gắn kết của interleukin-2 với thụ thể IL-2R β , nên mức độ suy giảm hoạt tính của tế bào T điều hòa gây ra bởi interleukin-2 nhỏ hơn mức độ suy giảm hoạt tính của tế bào T điều hòa trong tế bào T biểu hiện CD8. Khi được ghép cặp với PEG, interleukin-2 sẽ làm giảm tác dụng hoạt hóa tế bào T biểu hiện CD8 và tế bào giết tự nhiên của interleukin-2, đến mức độ nhất định.

Dữ liệu hoạt tính của interleukin-2 biến thể trong quá trình phosphoryl hóa STAT5 trong tế bào đơn nhân máu ngoại vi của người được thể hiện trong Bảng 13, Bảng 14, Bảng 15, và Fig.6A-6C.

Bảng 13. Hoạt tính của interleukin-2 và biến thể của nó trong quá trình phosphoryl hóa STAT5 trong tế bào T điều hòa của người

Hoạt chất	Đột biến (axit amin SEQ ID NO.)	EC ₅₀ (nM)	Hoạt tính sinh học tương đối
IL-2	thể đại (SEQ ID NO.2)	0,00046	100 %
PEG-IL-2-10	N26Q/N30S/F42A/L72G (SEQ ID NO.22)	2,65	0,02 %
PEG-IL-2-23	Q11C/NNYKNPKLTRMLTFKF ở các vị trí số 29-44 được đột biến thành QSMHIDATL/L132C (SEQ ID NO.36)	4,24	0,01 %
IL-2-24	N26Q/N29S/N88R (SEQ ID NO.38)	0,209	0,2 %
PEG-IL-2-24		6,02	0,007 %

Bảng 14. Hoạt tính của interleukin-2 và biến thể của nó trong quá trình phosphoryl hóa STAT5 trong tế bào T biểu hiện CD8 của người

Hoạt chất	EC ₅₀ (nM)	Hoạt tính tương đối
IL-2	2,32	100 %
PEG-IL-2-10	8,97	26 %
PEG-IL-2-23	14,41	16 %
IL-2-24	N.A.	N.A.
PEG-IL-2-24	N.A.	N.A.

(Lưu ý: N.A., không thể phát hiện, cho thấy rằng hoạt tính của biến thể trong quá trình phosphoryl hóa STAT5 là nhỏ hơn trong tế bào T biểu hiện CD8, và EC₅₀ không thể

thu được bằng cách hiệu chỉnh dữ liệu trong khoảng nồng độ được sử dụng trong thử nghiệm).

Bảng 15. Hoạt tính của interleukin-2 và biến thể của nó trong quá trình phosphoryl hóa STAT5 trong các tế bào giết tự nhiên của người

Hoạt chất	EC ₅₀ (nM)	Hoạt tính tương đối
IL-2	0,48	100 %
PEG-IL-2-10	2,00	24 %
PEG-IL-2-23	2,88	17 %

Ví dụ 10: Xác định tác dụng của interleukin-2 và biến thể của nó đến các tế bào miễn dịch máu ngoại vi của các chuột nhắt Balb/c

Các chuột nhắt cái BALB/c, 4-8 tuần tuổi, trọng lượng 18-20g (được mua từ Shanghai Lingchang Biotechnology Co., Ltd.), được để thích nghi với điều kiện khí hậu trong 5 ngày trước khi thử nghiệm chính thức. Toàn bộ các chuột nhắt BALB/c được nuôi trong chuồng nuôi động vật loại SPF IVC với hệ thống nhiệt độ và áp suất không đổi, trong đó nhiệt độ nằm trong khoảng từ 20°C đến 26°C, độ ẩm nằm trong khoảng từ 40% đến 70%, và chu kỳ chiếu sáng là 12 giờ chiếu sáng/12 giờ trong bóng tối. Mỗi chuồng không có nhiều hơn 6 chuột nhắt BALB/c. Kích cỡ chuồng là 325mm × 210mm × 180mm. Vật liệu lót chuồng là lõi ngô, được thay mới hai lần một tuần. Trong toàn bộ thử nghiệm, toàn bộ các chuột nhắt thử nghiệm được cho ăn uống đầy đủ, thức ăn và nước uống được hấp khử trùng và thay mới hai lần một tuần. Tất cả nhân viên ra vào chuồng nuôi động vật hoặc người vận hành thử nghiệm đều mặc quần áo thử nghiệm đã được khử trùng, mang khẩu trang y tế dùng một lần và găng tay cao su. Mỗi chuồng có nhãn rõ ràng và chi tiết tương ứng. Nội dung nhãn bao gồm: số cấp phép IACUC LDIACUC006, số lượng chuột nhắt, giới tính, chủng loại, ngày đưa vào thử nghiệm, số hạng mục, phân nhóm, giai đoạn thử nghiệm hiện tại và người phụ trách thử nghiệm, v.v. Trong suốt quá trình thử nghiệm, quá trình vận hành và quan sát động vật thử nghiệm được thực hiện theo các quy định của quản lý và vận hành động vật AAALAC. Theo quy trình thử nghiệm thông thường, hành vi, mức độ hấp thu thức ăn và nước uống, mức độ thay đổi về trọng lượng, độ bóng của lông và các tình trạng bất thường khác của toàn bộ các chuột nhắt thử nghiệm được theo dõi và ghi lại.

Các chuột nhắt được chia nhóm theo trọng lượng cơ thể, và quá trình sử dụng được bắt đầu sau khi chia nhóm. Phương pháp sử dụng, liều và đường đưa thuốc được thể

hiện trong Bảng 16 và Fig.7A-7D. Ngày ở đó chuột nhất được chia nhóm được thiết lập là ngày 0.

Máu được thu nhận ở mỗi thời điểm và thể tích máu được đo, máu đã được chống đông và mới được thu nhận được phân giải bằng chế phẩm phân giải tế bào hồng cầu để phân giải các tế bào hồng cầu, và rửa một lần bằng PBS. Dung dịch nhuộm màu hỗn hợp được điều chế bằng PBS chứa 1% FBS. Dung dịch nhuộm màu hỗn hợp này chứa CD3 APC-Cy7 (Biolegend 100329), CD8 PE (Biolegend 100708), CD4 PE-Cy7 (eBioscience 25-0042-82), CD25 PerCP-Cy5,5 (BD 561112) và CD49b-APC (Biolegend 108909). dung dịch nhuộm màu hỗn hợp này (100 μ L) được bổ sung vào mỗi mẫu và ủ ở nhiệt độ 4°C trong 30 phút. Mẫu được rửa hai lần bằng dung dịch PBS chứa 1% FBS. Hỗn hợp dung dịch đệm yếu tố phiên mã True-Nuclear™ (Biolegend 424401) được sử dụng để cố định các mẫu trong 60 phút, để phân giải màng tế bào. Kháng thể kháng Foxp3 của chuột nhất (100 μ L) (Biolegend 126405) được ủ trong 60 phút ở nhiệt độ phòng. Các mẫu được rửa hai lần bằng dung dịch rửa PBS (độ pH bằng 7,4), và cuối cùng được tạo hỗn dịch lại bằng dung dịch rửa PBS (500 μ L, độ pH bằng 7,4), để phân tích trên máy. Các tế bào giết tự nhiên được xác định là các tế bào CD3-CD49b+, các tế bào T biểu hiện CD8 được xác định là các tế bào CD3+CD4-CD8+, và các tế bào T điều hòa được xác định là các tế bào CD3+CD4+CD25+Foxp3+. Theo thể tích lấy mẫu máu, mật độ tế bào của mỗi nhóm tế bào trong máu ngoại vi được tính toán.

Bảng 16. Chế độ liều để điều trị bằng PEG-IL-2-22

Nhóm	Số lượng chuột nhất	Sử dụng	Liều (mg/kg)	Đường đưa thuốc	Thời gian sử dụng	Thời điểm lấy mẫu máu (ngày)
1	3	PEG-IL-2-22	3	i.v.	sử dụng một lần duy nhất kể từ khi bắt đầu thử nghiệm	0, 3, 5, 10
2	3			i.v.		2, 4, 6
3	3		3	s.c.		0, 3, 5, 10
4	3			s.c.		2, 4, 6
5	3		6	s.c.		3, 5, 10
6	3			s.c.		2, 4, 6
7	3		9	s.c.		3, 5, 10
8	3			s.c.		2, 4, 6

Trong quá trình sử dụng, PEG-IL-2-22 được tiêm tĩnh mạch đuôi ở ngày 0, máu chuột nhất được thu nhận và phân tích bằng phương pháp đếm tế bào theo dòng chảy tương ứng ở ngày 0, 2, 3, 4, 5, 6, và 10. Kết quả phân tích tỷ trọng của mỗi quần thể tế bào trong máu cho thấy rằng mật độ của các tế bào giết tự nhiên CD3⁺CD49b⁺ trong các

tế bào máu toàn phần của chuột nhắt được gia tăng đáng kể ở ngày 3 theo cơ chế phụ thuộc liều, khi so với that ở ngày 0, và ở ngày 10 tỷ trọng cơ bản trở lại mức trước khi sử dụng được chất thử nghiệm. Mật độ của các tế bào T biểu hiện CD8 được gia tăng đáng kể ở ngày 3 theo cơ chế phụ thuộc liều, và cơ bản trở lại mức trước khi sử dụng được chất thử nghiệm ở ngày 5. Mật độ của các tế bào T điều hòa được gia tăng đáng kể ở ngày 3, tỷ trọng cơ bản trở lại mức trước khi sử dụng được chất thử nghiệm ở ngày 4.

Trong quá trình sử dụng, toàn bộ các chuột nhắt được sử dụng với các liều khác nhau của PEG-IL-2-22 được thử nghiệm không thể hiện tình trạng giảm trọng lượng hoặc hành vi bất thường, cho thấy rằng các chuột nhắt này có khả năng dung nạp được chất tốt ở các liều được thử nghiệm.

Bảng 17. Sử dụng và điều trị bằng PEG-IL-2-24

Nhóm	Số lượng chuột nhắt	Điều trị	Liều (mg/kg)	Đường đưa thuốc	Thời gian sử dụng	Thời điểm lấy mẫu máu (ngày)
1	3	PEG-IL-2-24	0,2	i.p.	sử dụng một lần duy nhất kể từ khi bắt đầu thử nghiệm	0, 3, 4, 5
2	3		1	i.p.		0, 3, 4, 5
3	3		5	i.p.		0, 3, 4, 5

(Lưu ý: i.v., tiêm tĩnh mạch đuôi; s.c., tiêm dưới da; i.p., tiêm màng bụng).

Các kết quả phân tích cho thấy rằng PEG-IL-2-24 có thể kích thích tăng sinh tế bào T điều hòa ở liều cao (5mg/kg), liều trung bình (1mg/kg), và liều thấp (0,2mg/kg) sau ba ngày sử dụng theo cơ chế phụ thuộc liều; tỷ lệ phần trăm của các tế bào T biểu hiện CD4 và các tế bào T biểu hiện CD8 trong các tế bào T biểu hiện CD3 không thay đổi ở ba liều, thể hiện quá trình hoạt hóa tăng sinh tế bào T điều hòa bởi PEG-IL-2-24. Các kết quả được thể hiện trong Fig.8A-8F.

Ví dụ 11: Đánh giá hiệu lực của interleukin-2 và biến thể của nó trên mô hình chuột nhắt mang khối u ung thư đại tràng có nguồn gốc từ chuột

Các tế bào ung thư biểu mô tuyến đại tràng có nguồn gốc từ chuột CT26.WT (do Cell Bank, in Chinse Academy of Sciences (SIBC), Shanghai cung cấp) được tăng sinh sau khi làm rã đông các tế bào dòng P4+1, và nuôi cấy trong môi trường DMEM chứa 10% huyết thanh bào thai bò (FBS). Các tế bào CT26.WT ở pha sinh trưởng theo số mũ được thu nhận, tạo hỗn dịch lại trong HBSS để đạt được mật độ tế bào bằng $1 \times 10^6/\text{mL}$, cấy dưới da vào các chuột nhắt BALB/c trong điều kiện vô trùng, và mỗi chuột nhắt được

cấy với 1×10^5 tế bào. Khi thể tích khối u bằng khoảng 80-100 mm³, các chuột nhắt được chia thành các nhóm. Lần sử dụng thứ nhất được bắt đầu sau khi chia nhóm. Phương pháp sử dụng, liều và đường đưa thuốc được thể hiện chi tiết trong Bảng 18. Ngày ở đó các chuột nhắt được chia nhóm được thiết lập là ngày 0.

Bảng 18. Chế độ liều của PEG-IL-2-22

Nhóm	Số lượng chuột nhắt	Điều trị	Liều (mg/kg)	Đường đưa thuốc	Tần suất sử dụng
1	6	PBS	--	s.c.	Q5D
2	6	PEG-IL-2-22	3	s.c.	Q5D
3	6		6	s.c.	Q5D
4	6		9	s.c.	Q5D
5	6		3	i.v.	Q5D
6	6		6	i.v.	Q5D

(Lưu ý: i.v., tiêm tĩnh mạch đuôi; s.c., tiêm dưới da. Q5D, được sử dụng năm ngày một lần. Thể tích tiêm: thể tích tiêm được điều chỉnh theo trọng lượng cơ thể của chuột nhắt (0,1mL/10g)).

Sau khi quá trình sử dụng được bắt đầu, trọng lượng khối u và thể tích khối u của các chuột nhắt được đo 3 lần một tuần, và thể tích khối u được tính toán như sau: thể tích khối u (mm³) = $0,5 \times (\text{chiều dài khối u} \times \text{chiều rộng khối u}^2)$. Tỷ lệ ức chế khối u tương ứng TGI (%) được tính toán như sau: $\text{TGI \%} = (1 - \text{T/C}) \times 100\%$. T/C% là tốc sinh trưởng tương đối của khối u (tức là tỷ lệ phần trăm tương đối của thể tích khối u hoặc trọng lượng khối u giữa nhóm được điều trị và nhóm đối chứng, ở thời điểm nhất định). T và C tương ứng là thể tích khối u (TV) hoặc trọng lượng khối u (TW) của nhóm được điều trị và nhóm đối chứng, ở thời điểm cụ thể. Các kết quả thử nghiệm được thể hiện trong Bảng 19 và Fig.9.

Bảng 19. Tác dụng kháng khối u của PEG-IL-2-22 trên mô hình chuột nhắt mang khối u CT26

Nhóm	Thể tích khối u ở ngày 0 (mm ³)	Thể tích khối u ở ngày 12 (mm ³)	TGI (%)	T/C (%)	Trị số P
1	72,3±5,31	2577,6±360,91			
2	72,2±6,03	1410,5±673,38	47	53	0,1576
3	70,9±5,37	1297,5±263,52	51	49	0,0168
4	71,8±5,33	1168,6±352,3	56	44	0,0190
5	70,1±5,53	2369,4±547,49	8	92	0,7574
6	69,8±5,85	1122,2±418,6	58	42	0,0265

Hiệu lực của PEG-IL-2-22 ở các liều khác nhau và chế độ sử dụng khác nhau được đánh giá trên mô hình chuột nhắt được cấy ghép cùng loài tế bào ung thư đại tràng

CT26 có nguồn gốc từ chuột, trong thử nghiệm này. Các kết quả phân tích cho thấy rằng: ở nhóm được tiêm dưới da với liều trung bình (G3), PEG-IL-2-22 6mg/kg s.c. Q5D*5 thể hiện thể tích khối u trung bình bằng $1297,5 \pm 263,52 \text{ mm}^3$ sau 12 ngày sử dụng, nhỏ hơn đáng kể so với nhóm đối chứng vào cùng một ngày (với thể tích khối u bằng $2577,6 \pm 360,91 \text{ mm}^3$, TGI=51%, $p=0,0168$). Ở nhóm được tiêm dưới da với liều cao (G4), PEG-IL-2-22 9mg/kg s.c. Q5D*5 thể hiện thể tích khối u trung bình bằng $1168,6 \pm 352,3 \text{ mm}^3$ sau 12 ngày sử dụng, nhỏ hơn đáng kể so với nhóm đối chứng vào cùng một ngày (với thể tích khối u bằng $2577,6 \pm 360,91 \text{ mm}^3$, TGI=56%, $p=0,0190$). Ở nhóm được tiêm tĩnh mạch với liều trung bình (G6), PEG-IL-2-22 6mg/kg i.v. Q5D*5 thể hiện thể tích khối u trung bình bằng $1122,2 \pm 418,6 \text{ mm}^3$ sau 12 ngày sử dụng, nhỏ hơn đáng kể so với nhóm đối chứng vào cùng một ngày (với thể tích khối u bằng $2577,6 \pm 360,91 \text{ mm}^3$, TGI=58%, $p=0,0265$).

Ví dụ 12: Đánh giá hiệu lực của interleukin-2 và biến thể của nó trên mô hình chuột nhắt mang khối u melanin của người

Các chuột nhắt cái NCG, 4-8 tuần tuổi, trọng lượng khoảng 18-22g, được mua từ Jiangsu GemPharmatech Biotechnology Co., Ltd. Toàn bộ các chuột nhắt NCG được nuôi trong chuồng nuôi động vật loại SPF IVC với hệ thống nhiệt độ và áp suất không đổi.

Các tế bào A375 được nuôi cấy trong môi trường DMEM chứa 10% huyết thanh bào thai bò (FBS). Các tế bào A375 ở pha sinh trưởng theo số mũ được thu nhận, và HBSS được tạo hỗn dịch lại đến nồng độ thích hợp để cấy dưới da khối u ở các chuột nhắt NCG. Các tế bào A375 được sử dụng để đồng nuôi cấy cần được xử lý bằng Mitomycin C trong 2 giờ, sau đó rửa ba lần bằng PBS. Máu ngoại vi của người bình thường được thu nhận để phân tách các tế bào đơn nhân máu ngoại vi của người bằng phương pháp ly tâm gradien tỷ trọng, và các tế bào được đếm. Sau đó, các tế bào đơn nhân máu ngoại vi được tạo hỗn dịch lại đến nồng độ bằng 3×10^6 tế bào/mL bằng môi trường RPMI1640 (chứa IL-2 và 10% FBS), và đồng nuôi cấy với các tế bào A375 được xử lý bằng Mitomycin C. Sau 8 ngày đồng nuôi cấy, các tế bào đơn nhân máu ngoại vi được thu nhận, và các tế bào A375 mới được phân giải cũng được thu nhận. Mỗi chuột nhắt được cấy với: các tế bào đơn nhân máu ngoại vi ở mật độ bằng 8×10^5 , các tế bào A375 ở mật độ bằng 4×10^6 ; thể tích cấy: 0,2mL/chuột nhắt (chứa 50% Matrigel); cấy

dưới da vào sườn bên phải của các chuột nhắt cái NCG, tổng cộng 30 chuột nhắt được cấy. Các chuột nhắt được chia ngẫu nhiên thành các nhóm theo trọng lượng cơ thể. Chế độ sử dụng, liều và đường đưa thuốc được thể hiện chi tiết trong Bảng 20. Ngày ở đó các chuột nhắt được chia nhóm để sử dụng các hợp chất thử nghiệm được thiết lập là ngày 0.

Bảng 20. chế độ liều của PEG-IL-2-22

Nhóm	Nhóm sử dụng	N	Liều (mg/kg)	Chế độ liều	Đường đưa thuốc
1	PBS	6	--	Q3D	i.v.
2	PEG-IL-2-22	6	0,03	Q3D	i.v.
3		6	0,1	Q3D	i.v.
4		6	0,03	Q3D	s.c.
5		6	0,1	Q3D	s.c.

(Lưu ý: N: số lượng chuột nhắt được sử dụng. i.v.: tiêm tĩnh mạch đuôi; s.c.: tiêm dưới da. Q3D: được sử dụng ba ngày một lần. Thể tích tiêm: thể tích tiêm được điều chỉnh theo trọng lượng của các chuột nhắt mang khối u (0,1mL/10g)).

Khi quá trình sử dụng được bắt đầu, trọng lượng khối u và thể tích khối u của các chuột nhắt được đo hai lần một tuần. Các kết quả thử nghiệm được thể hiện tương ứng trong Bảng 21 và Fig.10.

Bảng 21. Tác dụng kháng khối u của PEG-IL-2-22 trên mô hình chuột nhắt bị khối u A375 của người

Nhóm	Thể tích khối u ở ngày 0 (mm ³)	Thể tích khối u ở ngày 27 (mm ³)	TGI (%)	T/C (%)	Trị số P
1	0±0	1558,55±320,54			
2	0±0	175,75±64,16	88,72	11,28	<0,001
3	0±0	55,62±15,18	96,43	3,57	<0,001
4	0±0	95,08±37,27	93,90	6,10	<0,001
5	0±0	232,23±35,68	85,10	14,90	<0,001

Ở thời điểm kết thúc thử nghiệm (sau 27 ngày sử dụng), thể tích khối u và trọng lượng khối u ở nhóm được sử dụng PEG-IL-2-22 (0,03mg/kg, tiêm tĩnh mạch đuôi), nhóm được sử dụng PEG-IL-2-22 (0,1mg/kg, tiêm tĩnh mạch đuôi), nhóm được sử dụng PEG-IL-2-22 (0,03mg/kg, tiêm dưới da), nhóm được sử dụng PEG-IL-2-22 (0,1mg/kg, tiêm dưới da) là khác biệt đáng kể so với thể tích khối u và trọng lượng khối u ở nhóm được sử dụng PBS (trị số P nhỏ hơn 0,001), thể hiện tác dụng ức chế đáng kể sinh trưởng của khối u.

Ví dụ 13: Phân tích khả năng sinh miễn dịch của interleukin-2 và biến thể của nó

Bảng phân tích mô phỏng trên máy tính, số lượng của epitop tế bào T được mô phỏng (TCE) được tính toán bằng cách sử dụng biến thể interleukin-2 gần như tương đương hoặc nhỏ hơn số lượng của interleukin-2 thể đại (xem Bảng 22). Các kết quả phân tích cho thấy rằng các đột biến axit amin trong mỗi biến thể interleukin-2 sẽ không gây ảnh hưởng bất lợi đến khả năng sinh miễn dịch của interleukin-2, cho các mục đích liên quan đến điều trị bệnh.

Bảng 22. Các epitop tế bào T của biến thể interleukin-2

Số thứ tự	Số thứ tự của epitop tế bào T	Epitop tế bào T					
IL-2	5	LISNINVIV	FKFYMPKKA	MILNGINNY	LTRMLTFKF	MLTFKFYMP	
IL-2-01	4	FKFYMPKKA	LISNINVIV	LTRMLTFKF	MLTFKFYMP		
IL-2-02	6	MILNGINSY	FKFYMPKKA	LTRMLTFKF	LISNINVIV	INSYKNPKL	MLTFKFYMP
IL-2-03	5	LISNINVIV	FKFYMPKKA	MILNGINNY	LTRMLTFKF	MLTFKFYMP	
IL-2-04	5	LISNINVIV	FKFYMPKKA	MILNGINNY	LTRMLTFKF	MLTFKFYMP	
IL-2-05	5	MILNCINNY	FKFYMPKKA	LISNINVIV	LTRMLTFKF	MLTFKFYMP	
IL-2-06	5	LISNINVIV	MHIDATLYM	IQSMHIDAT	MILNGIQSM	LNGIQSMHI	
IL-2-07	4	TRMLTAKFA	LISNINVIV	MILNGINNY	LTRMLTAKF		
IL-2-08	3	LISNINVIV	MILNGINNY	LTRMLTAKF			
IL-2-09	6	FKFAMPKKA	MILNGINNY	LTRMLTFKF	RMLTFKFAM	LISNINVIV	MLTFKFAMP
IL-2-10	3	LISNINVIV	LTRMLTAKF	INSYKNPKL			
IL-2-11	3	LISNINVIV	LTRMLTAKF	INSYKNPKL			
IL-2-12	3	LISNINVIV	LTRMLTAKF	INSYKNPKL			
IL-2-13	3	LISNINVIV	LTRMLTAKF	INSYKNPKL			
IL-2-14	3	LISNINVIV	MILNGISNY	LTRMLTAKF			
IL-2-21	2	LISNINVIV	LTRMLTAKF				
IL-2-22	2	LISNINVIV	LTRMLTAKF				
IL-2-23	5	LISNINVIV	MHIDATLYM	IQSMHIDAT	MILNGIQSM	LNGIQSMHI	

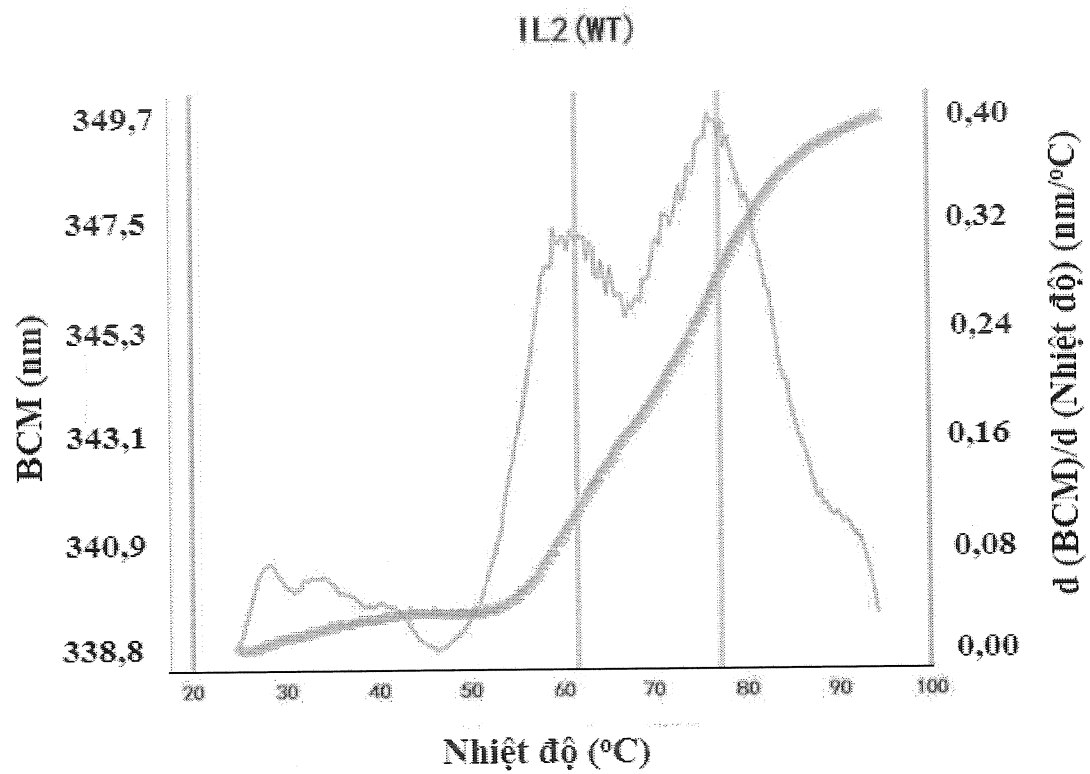
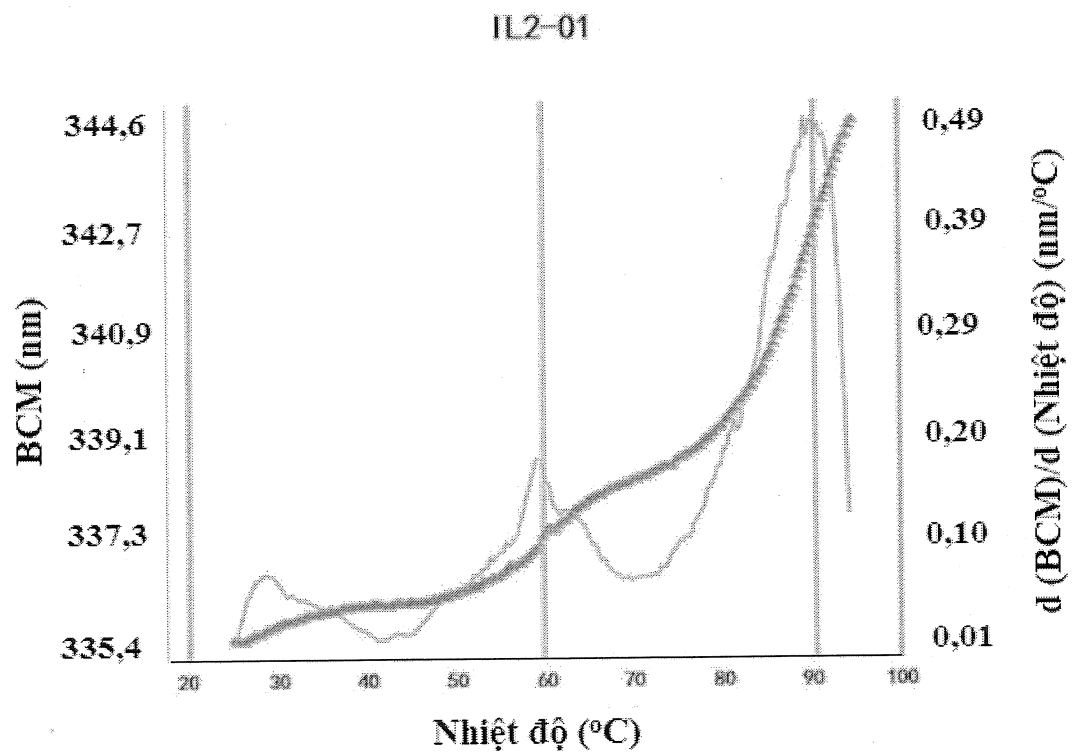
YÊU CẦU BẢO HỘ

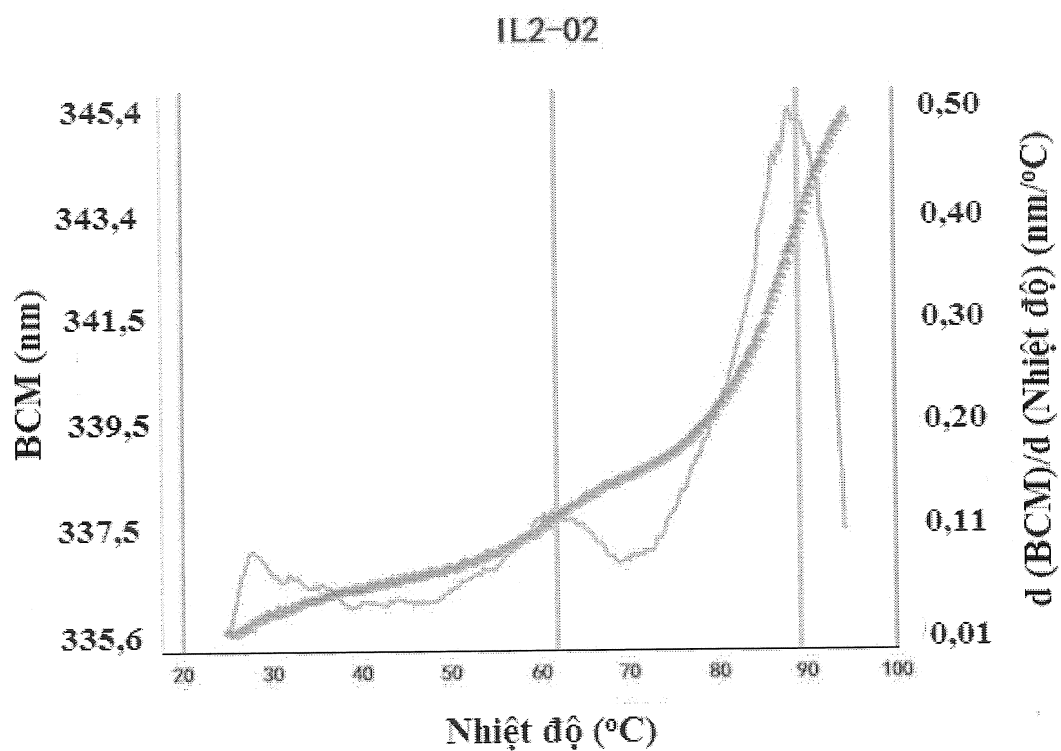
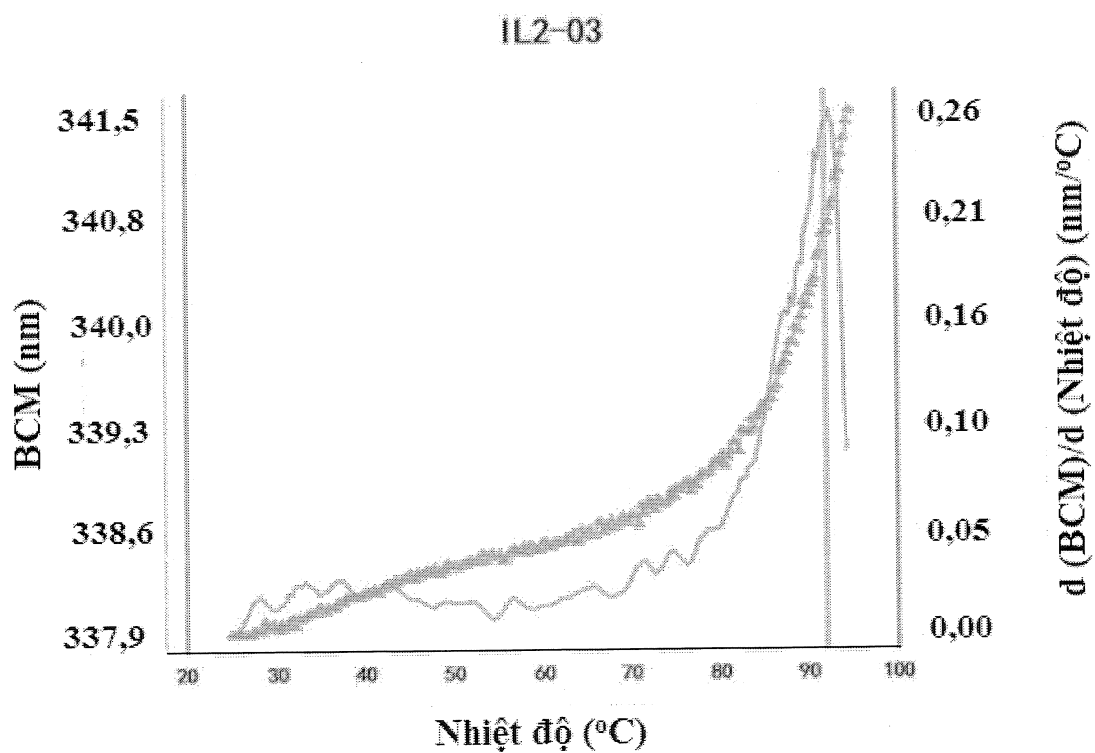
1. Biến thể interleukin-2, trong đó biến thể này chứa các đột biến được chọn từ nhóm bao gồm 21), 24) và 29): 21) N26Q, N29S, F42A, N71Q và L72G, 24) N26Q, N30S, F42A và L72G, 29) Q11C, NNYKNPKLTRMLTFKF ở các vị trí số 29-44 được đột biến thành QSMHIDATL, và L132C; trong đó các đột biến của nó có độ tương đồng nhất định với interleukin-2 thể đại, và số thứ tự của vị trí đột biến được tính từ axit amin A ở vị trí thứ hai theo trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.2.
2. Biến thể interleukin-2 theo điểm 1, độ ổn định của biến thể interleukin-2 này được gia tăng khi so với độ ổn định của interleukin-2 thể đại.
3. Biến thể interleukin-2 theo điểm 1, trong đó biến thể này còn chứa đột biến axit amin C125A.
4. Biến thể interleukin-2 theo điểm 1, trong đó interleukin-2 thể đại có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.2.
5. Biến thể interleukin-2, trong đó biến thể này chứa các axit amin như nêu trong trình tự bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO.22, SEQ ID NO.34, và SEQ ID NO.36.
6. Biến thể interleukin-2 theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong đó biến thể này là monome, và/hoặc được liên kết với PEG, và/hoặc được glycosyl hóa, và/hoặc được tiếp hợp với albumin hoặc được dung hợp với albumin, và/hoặc được dung hợp với vùng Fc, và/hoặc được hydroxyetyl hóa, và/hoặc không được O-glycosyl hóa.
7. Biến thể interleukin-2 theo điểm 6, trong đó PEG được liên kết với đầu tận cùng N của biến thể interleukin-2 này.
8. Biến thể interleukin-2 theo điểm 7, trong đó khối lượng phân tử của PEG nằm trong khoảng từ 5KD đến 50KD.
9. Biến thể interleukin-2 theo điểm 8, trong đó khối lượng phân tử của PEG bằng 20KD.
10. Biến thể interleukin-2, trong đó biến thể này chứa các đột biến sau: 22) N26Q, N29S và N88R, trong đó các đột biến của nó có độ tương đồng nhất định với interleukin-2 thể đại, và số thứ tự của vị trí đột biến được tính từ axit amin A ở vị trí thứ hai theo trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.2.

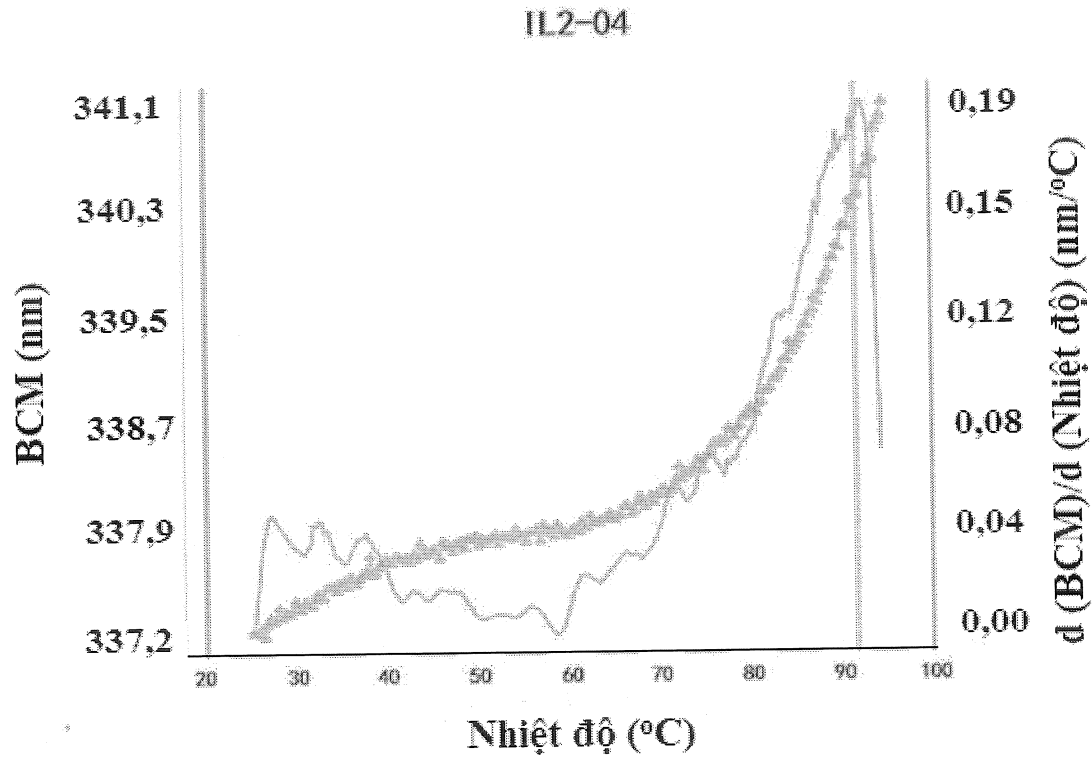
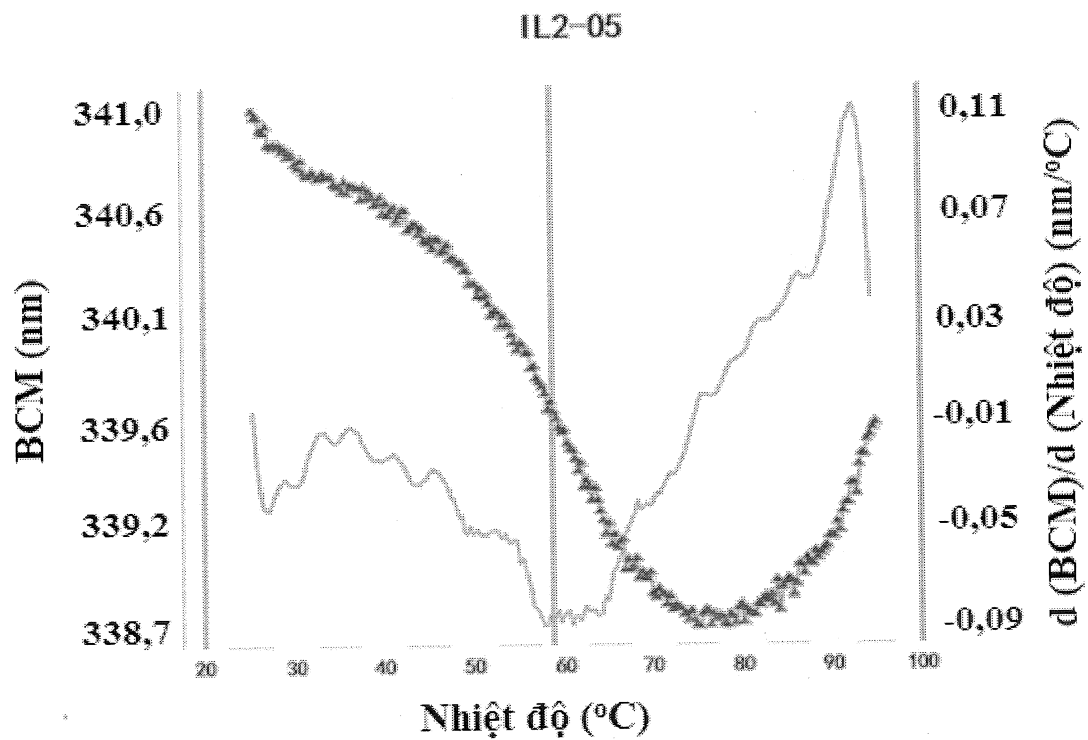
11. Biến thể interleukin-2 theo điểm 10, độ ổn định của biến thể interleukin-2 này được gia tăng khi so với độ ổn định của interleukin-2 thể đại.
12. Biến thể interleukin-2 theo điểm 10, trong đó biến thể này còn chứa đột biến axit amin C125A.
13. Biến thể interleukin-2 theo điểm 10, trong đó interleukin-2 thể đại có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.2.
14. Biến thể interleukin-2, trong đó biến thể này chứa các axit amin như nêu trong trình tự SEQ ID NO.41.
15. Biến thể interleukin-2 theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 10 đến 14, trong đó biến thể này là monome, và/hoặc được liên kết với PEG, và/hoặc được glycosyl hóa, và/hoặc được tiếp hợp với albumin hoặc được dung hợp với albumin, và/hoặc được dung hợp với vùng Fc, và/hoặc được hydroxyetyl hóa, và/hoặc không được O-glycosyl hóa.
16. Biến thể interleukin-2 theo điểm 15, trong đó PEG được liên kết với đầu tận cùng N của biến thể interleukin-2 này.
17. Biến thể interleukin-2 theo điểm 16, trong đó khối lượng phân tử của PEG nằm trong khoảng từ 5KD đến 50KD.
18. Biến thể interleukin-2 theo điểm 17, trong đó khối lượng phân tử của PEG bằng 20KD.
19. Thể tiếp hợp miễn dịch, chứa biến thể interleukin-2 theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 9, trong đó biến thể interleukin-2 này được liên kết trực tiếp với cấu trúc không interleukin-2 hoặc liên kết gián tiếp với cấu trúc không interleukin-2 thông qua gốc liên kết.
20. Thể tiếp hợp miễn dịch theo điểm 19, trong đó cấu trúc không interleukin-2 này là cấu trúc gắn kết kháng nguyên.
21. Thể tiếp hợp miễn dịch theo điểm 20, trong đó cấu trúc gắn kết kháng nguyên này là kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó.
22. Thể tiếp hợp miễn dịch theo điểm 21, trong đó kháng thể này hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó hướng đích kháng nguyên có mặt trên tế bào khối u hoặc trong môi trường của tế bào khối u.

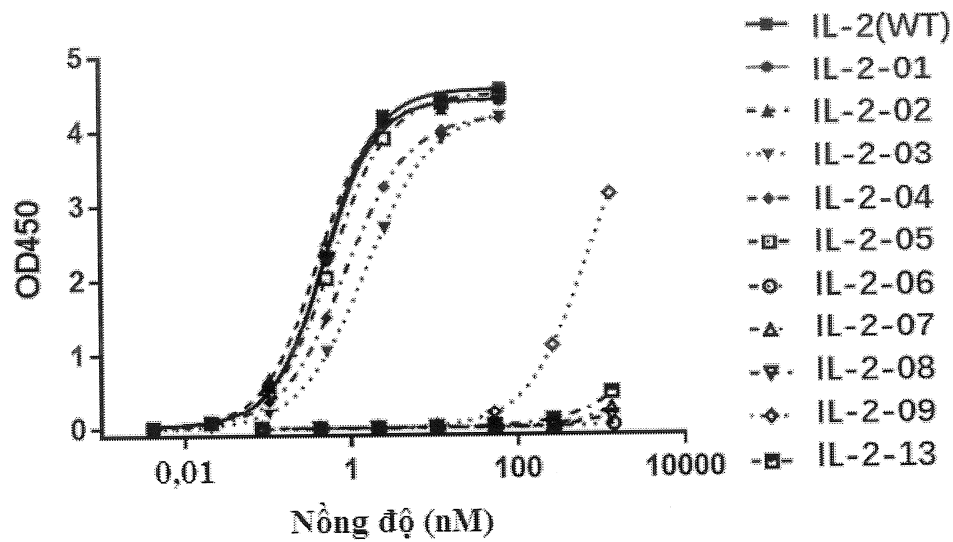
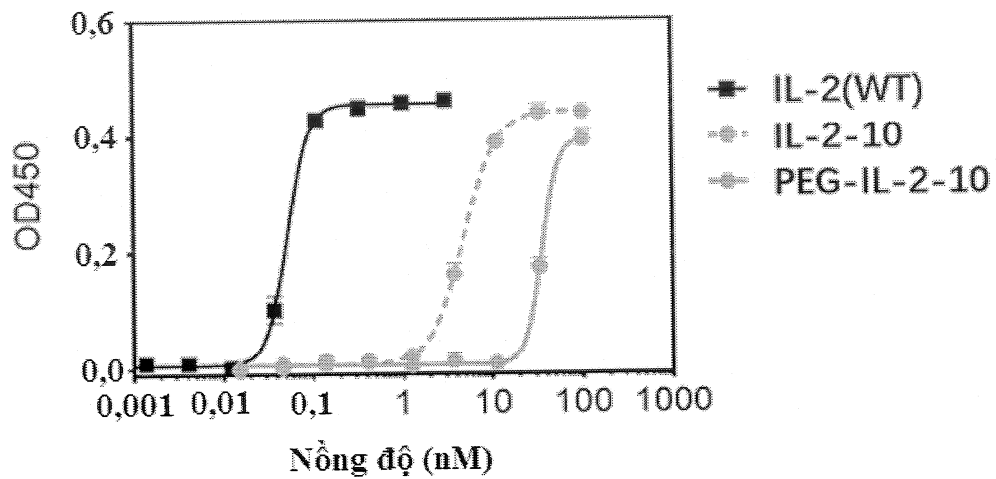
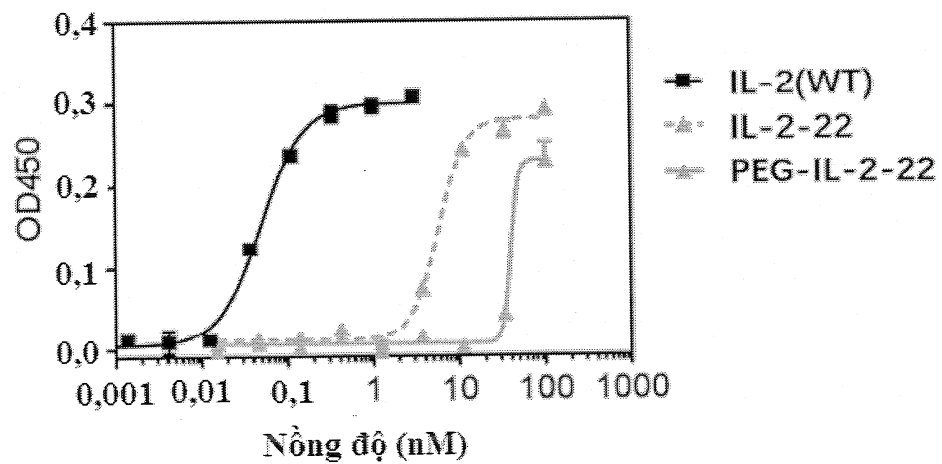
23. Thở tiếp hợp miễn dịch, chứa biến thể interleukin-2 theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 10 đến 18, trong đó biến thể interleukin-2 này được liên kết trực tiếp với cấu trúc không interleukin-2 hoặc liên kết gián tiếp với cấu trúc không interleukin-2 thông qua gốc liên kết.
24. Thở tiếp hợp miễn dịch theo điểm 23, trong đó cấu trúc không interleukin-2 này là cấu trúc gắn kết kháng nguyên.
25. Thở tiếp hợp miễn dịch theo điểm 24, trong đó cấu trúc gắn kết kháng nguyên này là kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó.
26. Dược phẩm, chứa biến thể interleukin-2 theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 9 hoặc thở tiếp hợp miễn dịch theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 19 đến 22, dược phẩm này chứa tá dược pha loãng, chất mang hoặc chất hỗ trợ dược dụng.
27. Dược phẩm, chứa biến thể interleukin-2 theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 10 đến 18 hoặc thở tiếp hợp miễn dịch theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 23 đến 25, dược phẩm này chứa tá dược pha loãng, chất mang hoặc chất hỗ trợ dược dụng.
28. Axit nucleic, mã hóa biến thể interleukin-2 theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 9.
29. Axit nucleic theo điểm 28, trong đó axit nucleic này chứa polynucleotit có trình tự như nêu trong trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO.21, SEQ ID NO.33, SEQ ID NO.35.
30. Axit nucleic, mã hóa biến thể interleukin-2 theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 10 đến 18.
31. Axit nucleic theo điểm 28, trong đó axit nucleic này chứa polynucleotit có trình tự như nêu trong trình tự SEQ ID NO.40.
32. Vector biểu hiện, chứa axit nucleic theo điểm 28 hoặc 29.
33. Vector biểu hiện, chứa axit nucleic theo điểm 30 hoặc 31.
34. Tế bào vật chủ, chứa vector biểu hiện theo điểm 32, hoặc biểu hiện biến thể interleukin-2 theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 9, thở tiếp hợp miễn dịch theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 19 đến 22.

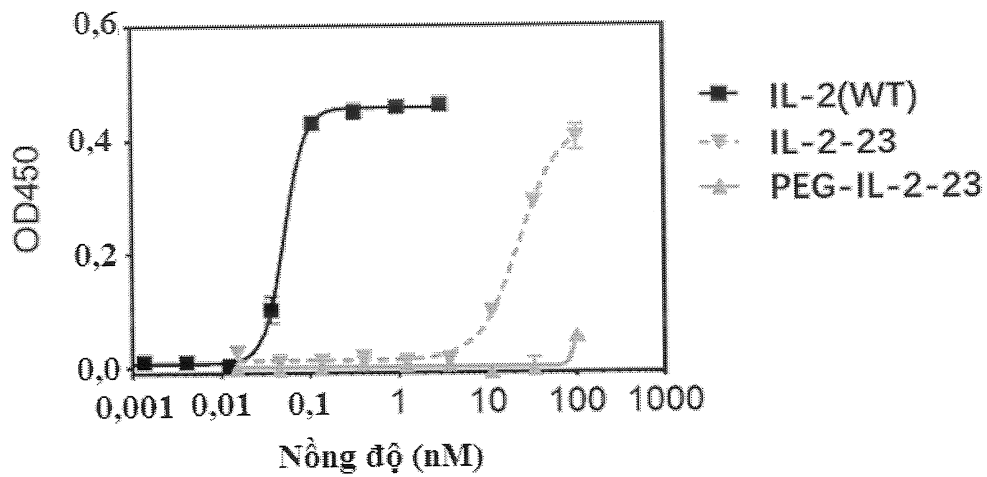
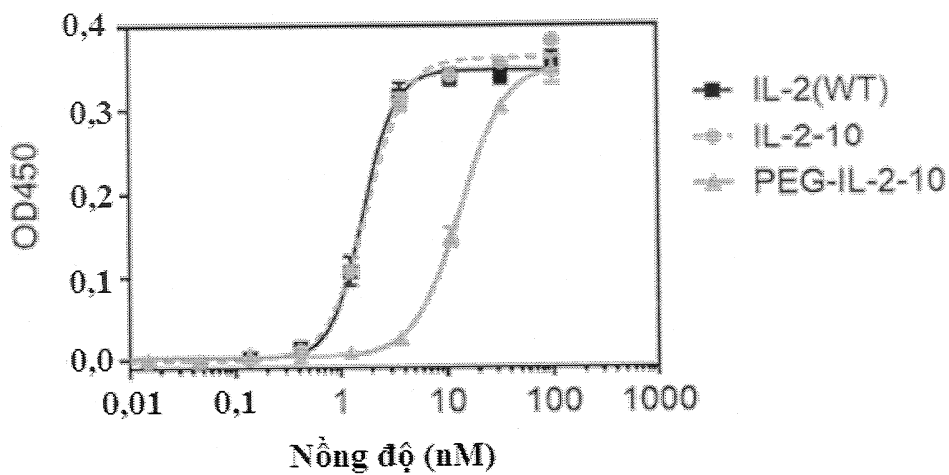
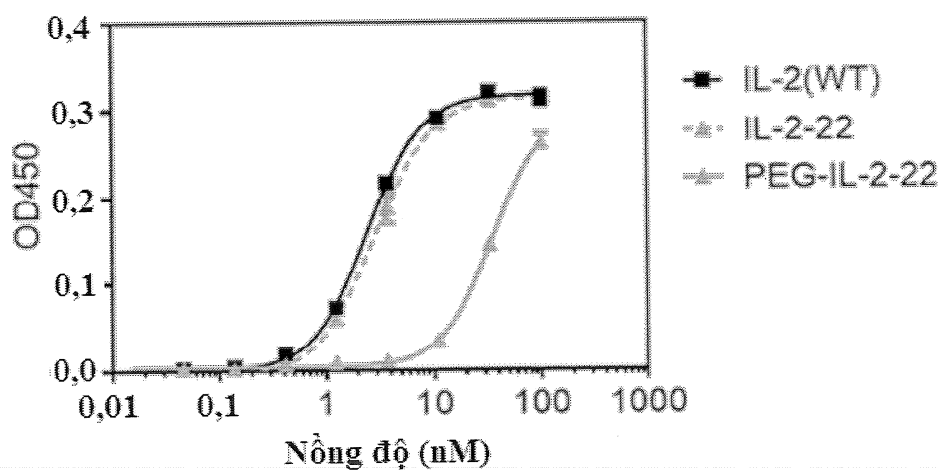
35. Tế bào vật chủ theo điểm 34, trong đó tế bào vật chủ này là tế bào nhân sơ hoặc tế bào nhân thật.
36. Tế bào vật chủ theo điểm 35, trong đó tế bào vật chủ này là tế bào vi khuẩn hoặc tế bào nấm men hoặc tế bào động vật có vú.
37. Tế bào vật chủ theo điểm 36, trong đó tế bào vật chủ này là *Saccharomyces cerevisiae* hoặc *Escherichia coli*.
38. Tế bào vật chủ, chứa vector biểu hiện theo điểm 33, hoặc biểu hiện biến thể interleukin-2 theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 10 đến 18, thể tiếp hợp miễn dịch theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 23 đến 25.
39. Tế bào vật chủ theo điểm 38, trong đó tế bào vật chủ này là tế bào nhân sơ hoặc tế bào nhân thật.
40. Tế bào vật chủ theo điểm 39, trong đó tế bào vật chủ này là tế bào vi khuẩn hoặc tế bào nấm men hoặc tế bào động vật có vú.
41. Tế bào vật chủ theo điểm 40, trong đó tế bào vật chủ này là *Saccharomyces cerevisiae* hoặc *Escherichia coli*.
42. Phương pháp sản xuất biến thể interleukin-2 theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 9, bao gồm các bước sau: chèn các đột biến vào interleukin-2 thể đại của người, hoặc thực hiện biểu hiện tái tổ hợp bằng cách sử dụng axit nucleic theo điểm 28 hoặc 29, hoặc vector biểu hiện theo điểm 32, hoặc biểu hiện biến thể interleukin-2 bằng cách sử dụng tế bào vật chủ theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 34 đến 37.
43. Phương pháp sản xuất biến thể interleukin-2 theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 10 đến 18, bao gồm các bước sau: chèn các đột biến vào interleukin-2 thể đại của người, hoặc thực hiện biểu hiện tái tổ hợp bằng cách sử dụng axit nucleic theo điểm 30 hoặc 31, hoặc vector biểu hiện theo điểm 33, hoặc biểu hiện biến thể interleukin-2 bằng cách sử dụng tế bào vật chủ theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 38 đến 41.

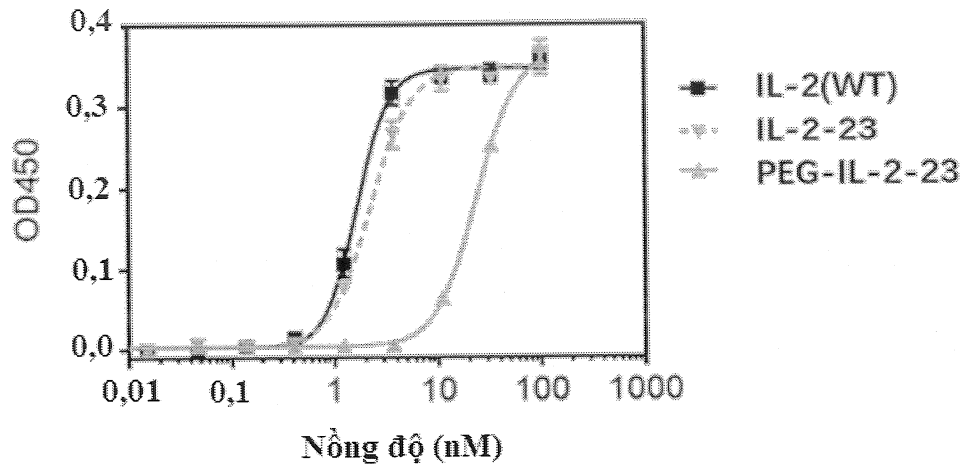
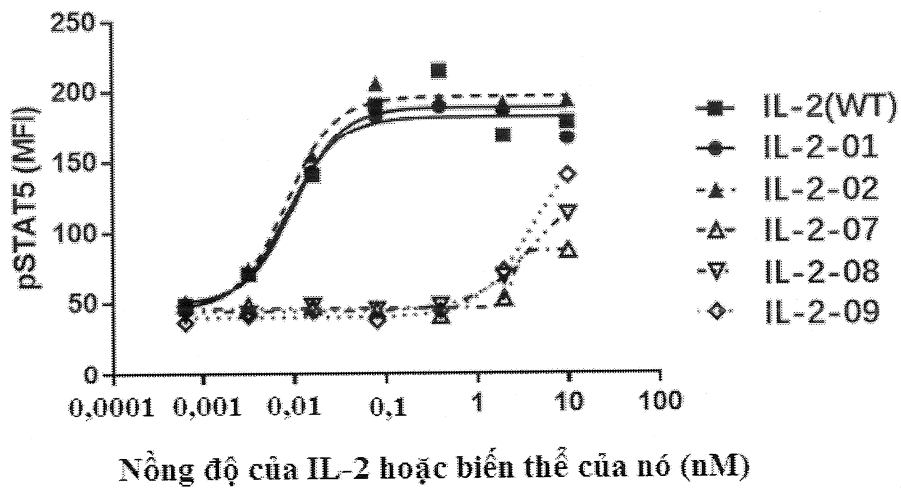
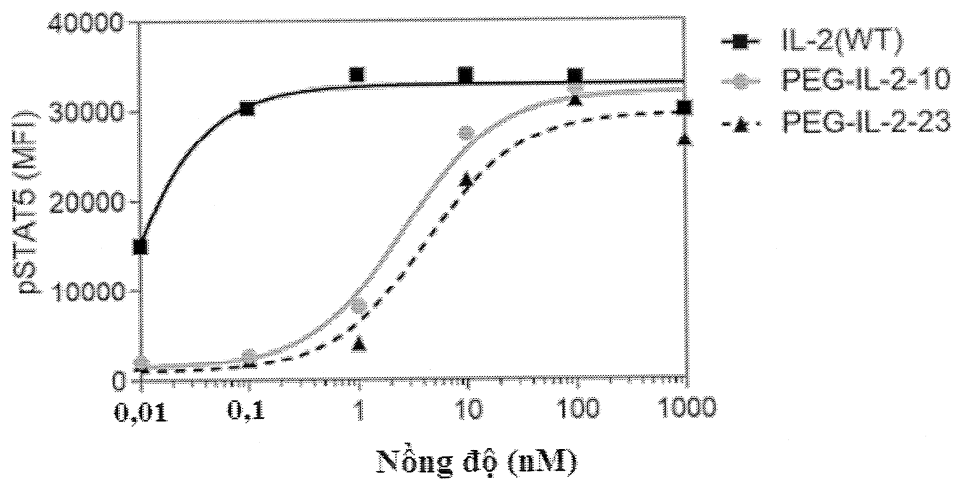
**Fig.1A****Fig.1B**

**Fig.1C****Fig.1D**

**Fig.1E****Fig.1F**

**Fig.2****Fig.3A****Fig.3B**

**Fig.3C****Fig.4A****Fig.4B**

**Fig.4C****Fig.5****Fig.6A**

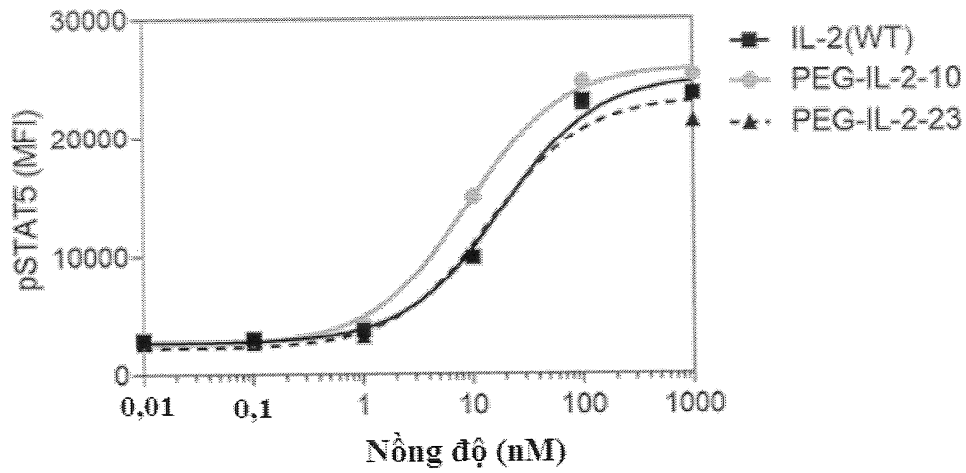


Fig.6B

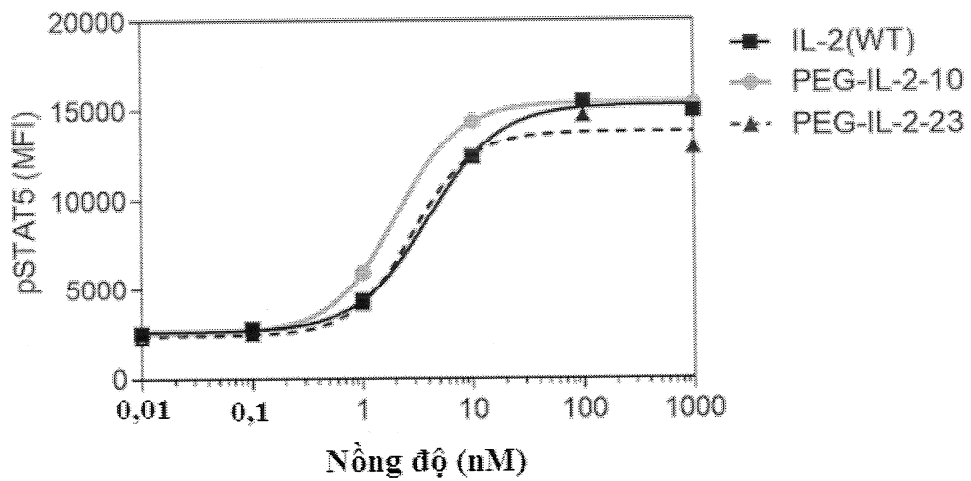


Fig.6C

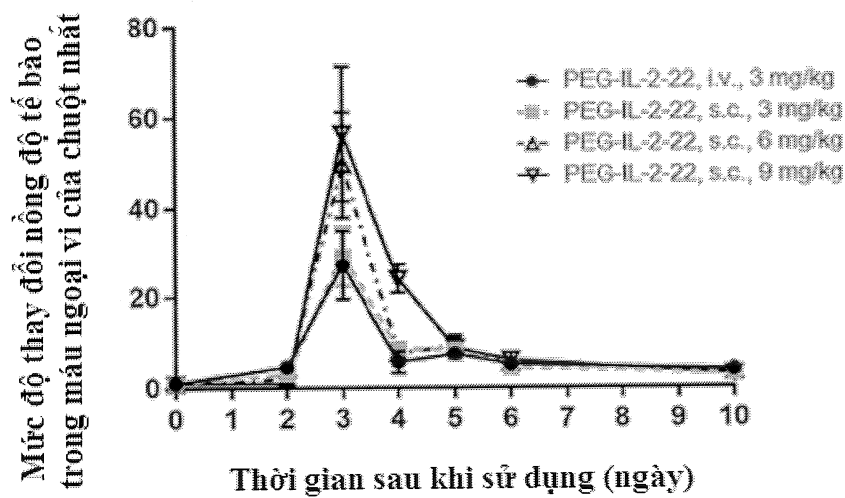
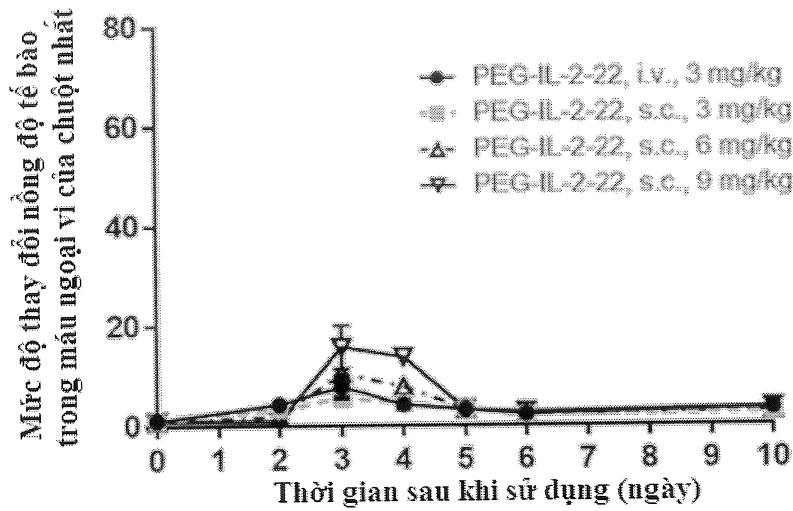
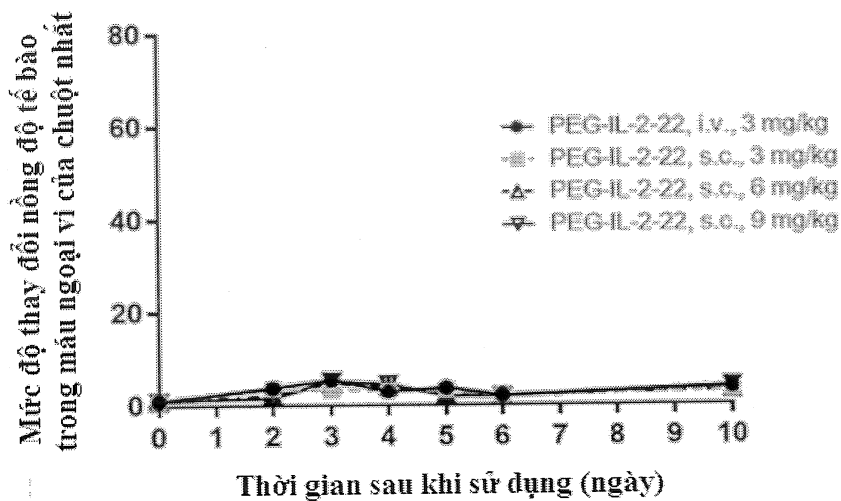
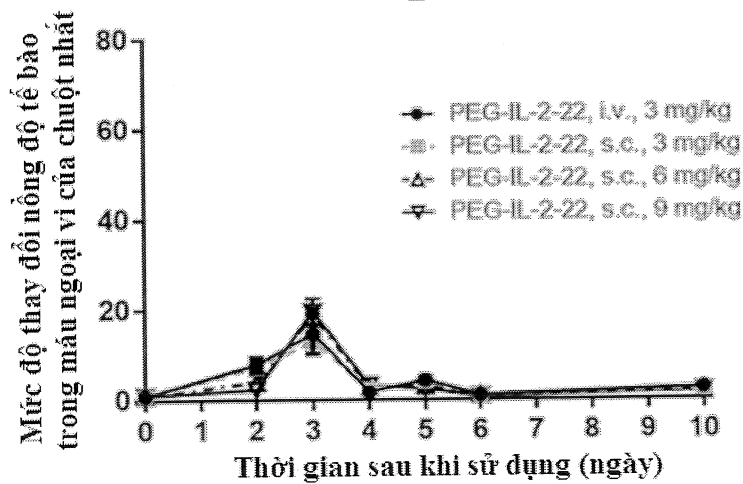
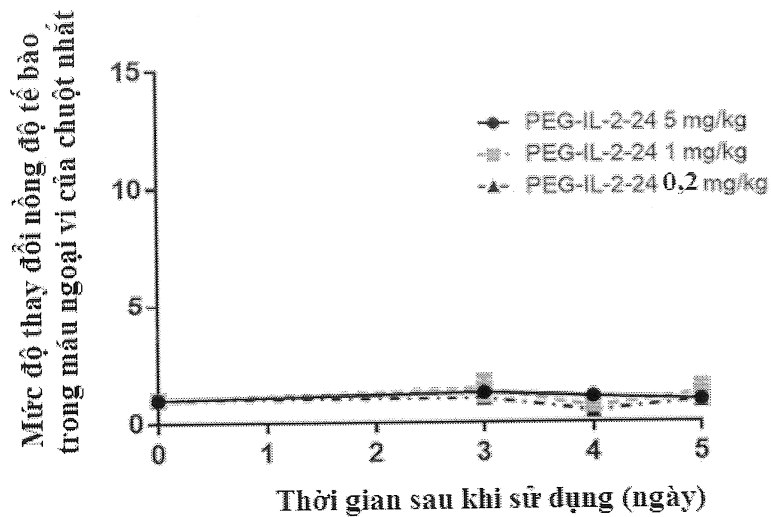
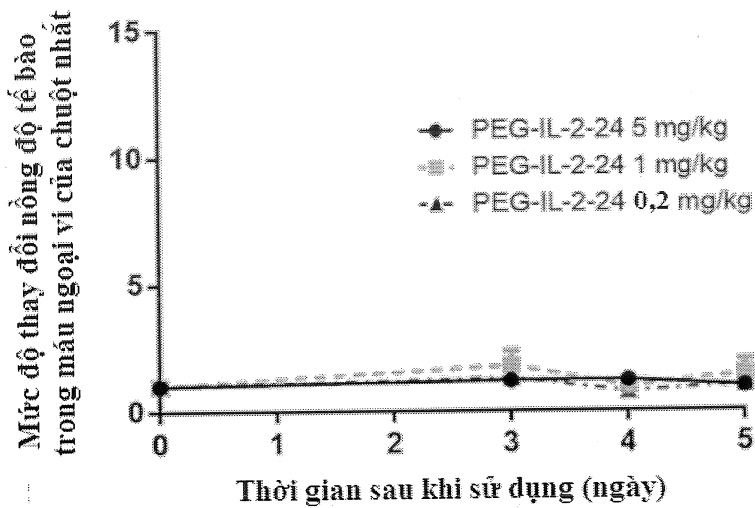
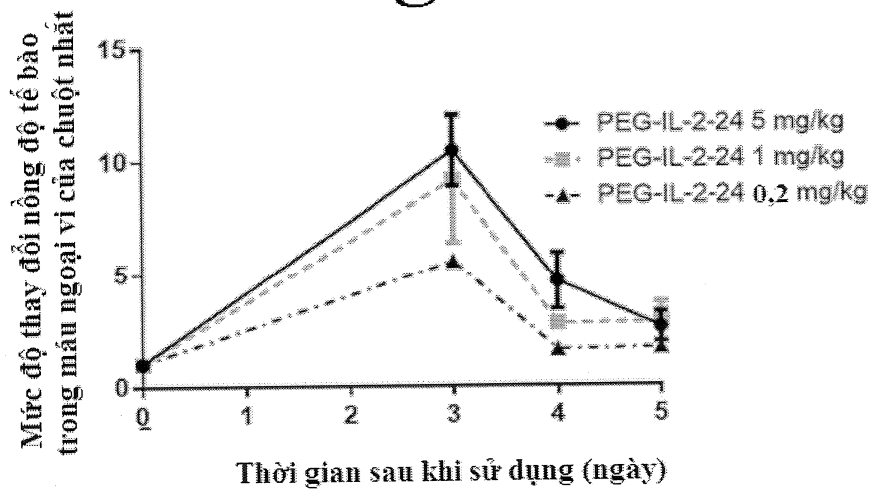
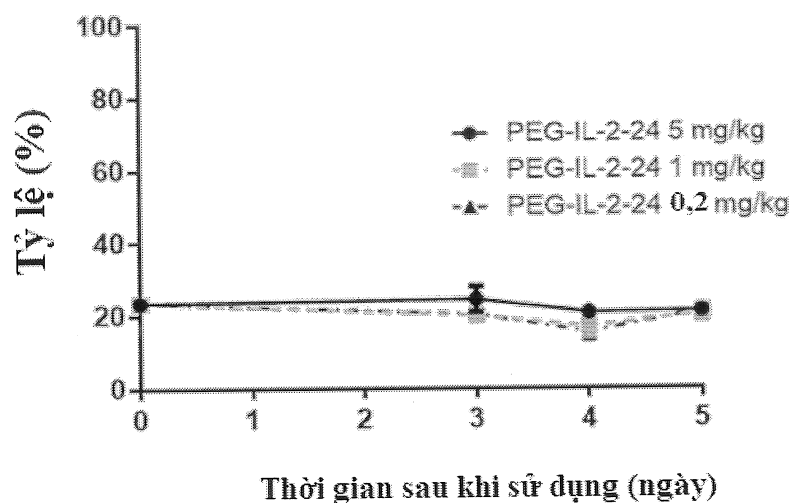
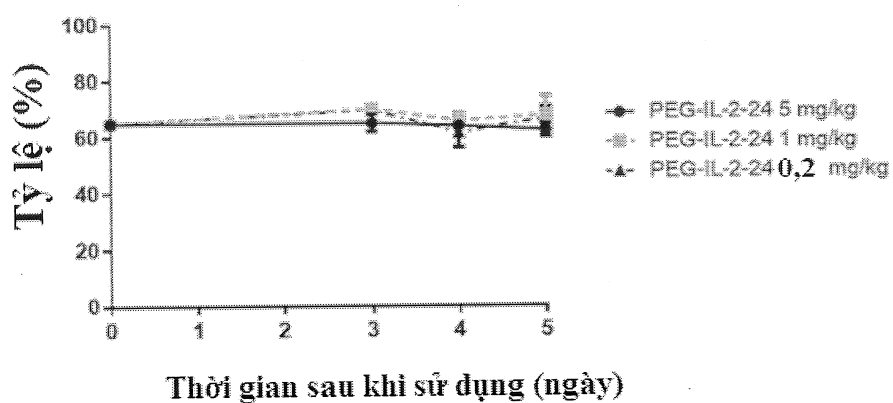
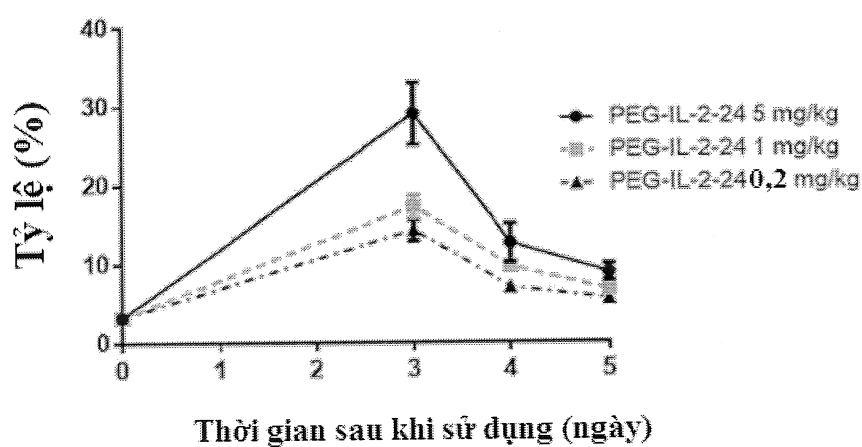


Fig.7A

**Fig.7B****Fig.7C****Fig.7D**

**Fig.8A****Fig.8B****Fig.8C**

**Fig.8D****Fig.8E****Fig.8F**

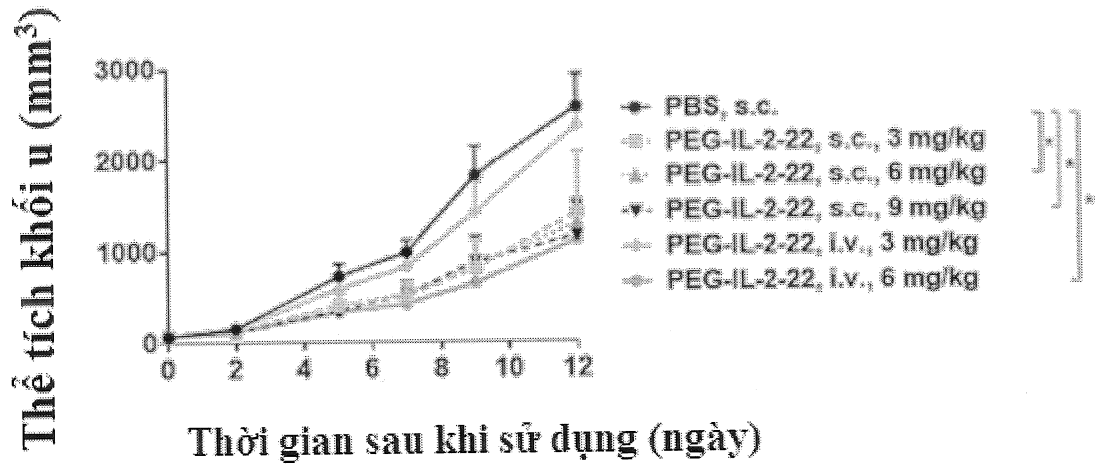


Fig.9

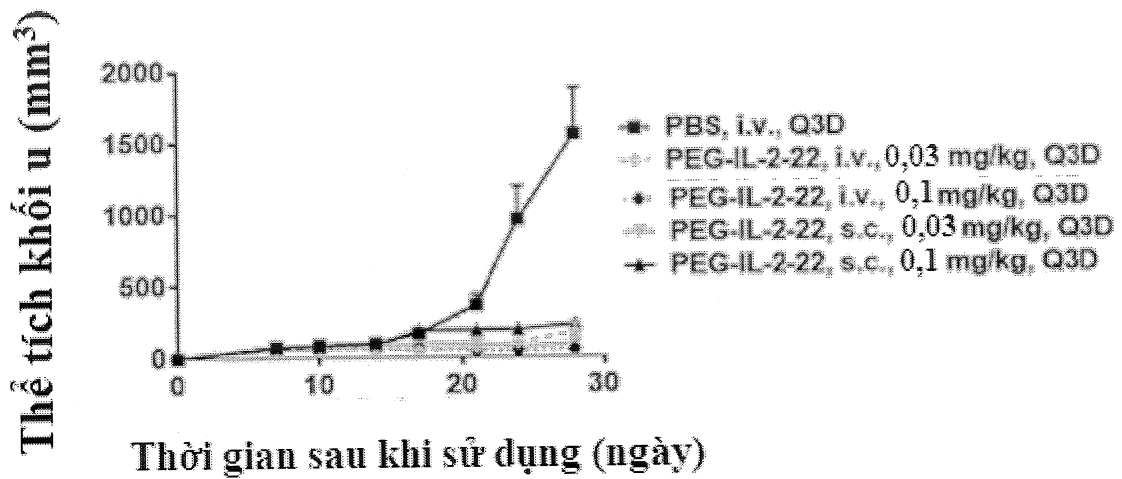


Fig.10

DANH MỤC TRÌNH TỰ

```

<110>  JIANGSU HENGRUI MEDICIN CO., LTD.
        SHANGHAI HENGRUI PHARMACEUTICAL CO., LTD
        SHANGHAI SHENGDI PHARMACEUTICAL CO., LTD
<120>  BIẾN THỂ INTERLEUKIN-2 VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA BIẾN THỂ NÀY
<130>  719086CPCT
<160>  41
<170>  SIPOSequenceListing 1,0
<210>  1
<211>  417
<212>  ADN/ARN
<213>  Trình tự nhân tạo
<220>
<221>  Gen
<222>  (1)..(417)
<223>  Trình tự axit nucleic IL-2 thể đại
<400>  1
catatggcac cgaccagcag cagcaccaaa aaaacccagc tgcaactgga acatctgctg      60
ttagatctgc aaatgattct gaacggcatc aacaactaca aaaatccgaa actgaccctg      120
atgctgacct tcaaattcta catgccgaaa aaagcaaccg agctgaaaca tctgcagtgt      180
ctggaagaag aactgaaacc gctggaagag gttctgaatc tggcacagag caaaaacttt      240
catctgcgtc cgcgtgatct gattagcaat attaacgtta ttgtgctgga actgaaaggt      300
agcgaaacca cctttatgtg tgaatatgcc gatgaaaccg caaccattgt ggaatttctg      360
aatcgttgga ttaccttttg tcagagcatt attagcacc ctagcctaag aggatcc      417
<210>  2
<211>  134
<212>  PRT
<213>  Trình tự nhân tạo
<220>
<221>  Peptit
<222>  (1)..(134)
<223>  Trình tự axit amin IL-2 thể đại
<400>  2
Met Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu
1              5              10              15
His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr
20              25              30
Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro
35              40              45
Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu
50              55              60
Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His
65              70              75              80
Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu
85              90              95
Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr
100             105             110
Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser
115             120             125
Ile Ile Ser Thr Leu Thr
130
<210>  3
<211>  417
<212>  ADN/ARN
<213>  Trình tự nhân tạo
<220>
<221>  Gen
<222>  (1)..(417)
<223>  Trình tự axit nucleic IL-2-01
<400>  3
catatggcac cgaccagcag cagcaccaaa aaaacccagc tgcaactgga acatctgctg      60
ttagatctgc aaatgattct gcagggcatc aacaactaca aaaatccgaa actgaccctg      120
atgctgacct tcaaattcta catgccgaaa aaagcaaccg agctgaaaca tctgcagtgt      180
ctggaagaag aactgaaacc gctggaagag gttctgaatc tggcacagag caaaaacttt      240
catctgcgtc cgcgtgatct gattagcaat attaacgtta ttgtgctgga actgaaaggt      300
agcgaaacca cctttatgtg tgaatatgcc gatgaaaccg caaccattgt ggaatttctg      360
aatcgttgga ttacctttgc acagagcatt attagcacc ctagcctaag aggatcc      417

<210>  4
<211>  134
<212>  PRT
<213>  Trình tự nhân tạo
<220>
<221>  Peptit
<222>  (1)..(134)
<223>  Trình tự axit amin IL-2-01
<400>  4

```

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

<210> 5

<211> 417

<212> ADN/ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> Gen

<222> (1)..(417)

<223> Trình tự axit nucleic IL-2-02

<400> 5

catatggcac cgaccagcag cagcaccaaaa aaaacccagc tgcaactgga acatctgctg 60
 ttagatctgc aaatgattct gaacggcatc aacagctaca aaaatccgaa actgaccctg 120
 atgctgacct tcaaattcta catgccgaaa aaagcaaccg agctgaaaca tctgcagtgt 180
 ctggaagaag aactgaaacc gctggaagag gttctgaatc tggcacagag caaaaacttt 240
 catctgcgtc cgcgtgatct gattagcaat attaacgtta ttgtgctgga actgaaaggt 300
 agcgaaacca cctttatgtg tgaatatgcc gatgaaaccg caaccattgt ggaatttctg 360
 aatcggttga ttacctttgc acagagcatt attagcaccc tgacctaattg aggatcc 417

<210> 6

<211> 134

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> Peptit

<222> (1)..(134)

<223> Trình tự axit amin IL-2-02

<400> 6

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

<210> 7

<211> 417

<212> ADN/ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> Gen

<222> (1)..(417)

<223> Trình tự axit nucleic IL-2-03

<400> 7

catatggcac cgaccagcag cagcaccaaaa aaaacctgtc tgcaactgga acatctgctg 60
 ttagatctgc aaatgattct gaacggcatc aacaactaca aaaatccgaa actgaccctg 120
 atgctgacct tcaaattcta catgccgaaa aaagcaaccg agctgaaaca tctgcagtgt 180
 ctggaagaag aactgaaacc gctggaagag gttctgaatc tggcacagag caaaaacttt 240
 catctgcgtc cgcgtgatct gattagcaat attaacgtta ttgtgctgga actgaaaggt 300
 agcgaaacca cctttatgtg tgaatatgcc gatgaaaccg caaccattgt ggaatttctg 360
 aatcggttga ttacctttgc acagagcatt attagcacct gtacctaattg aggatcc 417

<210> 8

<211> 134

```

<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Peptit
<222> (1)..(134)
<223> Trình tự axit amin IL-2-03
<400> 8
Met Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Cys Leu Gln Leu Glu
1          5          10          15
His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr
20          25          30
Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro
35          40          45
Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu
50          55          60
Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His
65          70          75          80
Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu
85          90          95
Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr
100         105         110
Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ala Gln Ser
115         120         125
Ile Ile Ser Thr Cys Thr
130
<210> 9
<211> 417
<212> ADN/ARN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Alen
<222> (1)..(417)
<223> Trình tự axit nucleic IL-2-04
<400> 9
catatggcac cgaccagcag cagcaccaaaa aaaaccacgc tgcaactgga acatctgctg      60
ttagatctgc aaatgattct gaacggcatc aacaactaca aaaatccgaa actgaccgct      120
atgctgacct tcaaattcta catgccgaaa aaagcaaccg agctgaaaca tctgcagtgt      180
ctggaagaag aactgaaacc gctggaagag gtttgtaatc tggcacagag caaaaacttt      240
catctgcgtt gtcgtgatct gattagcaat attaacgtta ttgtgctgga actgaaaggt      300
agcgaaacca cctttatgtg tgaatatgcc gatgaaaccg caaccattgt ggaatttctg      360
aatcggttga ttacctttgc acagagcatt attagcaccg tgacctaatg aggatcc      417
<210> 10
<211> 134
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Peptit
<222> (1)..(134)
<223> Trình tự axit amin IL-2-04
<400> 10
Met Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu
1          5          10          15
His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr
20          25          30
Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro
35          40          45
Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu
50          55          60
Lys Pro Leu Glu Glu Val Cys Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His
65          70          75          80
Leu Arg Cys Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu
85          90          95
Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr
100         105         110
Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ala Gln Ser
115         120         125
Ile Ile Ser Thr Leu Thr
130
<210> 11
<211> 417
<212> ADN/ARN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Gen
<222> (1)..(417)
<223> Trình tự axit nucleic IL-2-05
<400> 11
catatggcac cgaccagcag cagcaccaaaa aaaaccacgc tgcaactgga acatctgctg      60
ttagatctgc aaatgattct gaactgtatc aacaactaca aaaatccgaa actgaccgct      120

```

```

atgctgacct tcaaattcta catgccgaaa aaagcaaccg agctgaaaca tctgcagtgt      180
ctggaagaag aactgaaacc gctggaagag gttctgaatc tggcacagag caaaaactgt      240
catctgctgc cgcgtgatct gattagcaat attaacgtta ttgtgctgga actgaaaggt      300
agcgaaacca cctttatgtg tgaatatgcc gatgaaaccg caaccattgt ggaatttctg      360
aatcgttgga ttacctttgc acagagcatt attagcaccg tgacctaatg aggatcc      417
<210> 12
<211> 134
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Peptit
<222> (1)..(134)
<223> Trình tự axit amin IL-2-05
<400> 12
Met Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu
1 5 10 15
His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Cys Ile Asn Asn Tyr
20 25 30
Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro
35 40 45
Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu
50 55 60
Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Cys His
65 70 75 80
Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu
85 90 95
Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr
100 105 110
Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ala Gln Ser
115 120 125
Ile Ile Ser Thr Leu Thr
130
<210> 13
<211> 396
<212> ADN/ARN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Gen
<222> (1)..(396)
<223> Trình tự axit nucleic IL-2-06
<400> 13
catatggcac cgaccagcag cagcaccaaaa aaaacccagc tgcaactgga acatctgctg      60
ttagatctgc aaatgattct gaacggcatc cagagcatgc atattgatgc aacctgtac      120
atgccgaaaa aagcaaccga gctgaaacat ctgcagtgtc tggaagaaga actgaaaccg      180
ctggaagagg ttctgaatct ggcacagagc aaaaactttc atctgcgtcc gcgtgatctg      240
attagcaata ttaacgttat tgtgctggaa ctgaaaggta gcgaaaccac ctttatgtgt      300
gaatatgccg atgaaaccgc aaccattgtg gaatttctga atcgttggat tacctttgca      360
cagagcatta ttagcacctt gacctaatga ggatcc      396
<210> 14
<211> 127
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Peptit
<222> (1)..(124)
<223> Trình tự axit amin IL-2-06
<400> 14
Met Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu
1 5 10 15
His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Gln Ser Met
20 25 30
His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys
35 40 45
His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu
50 55 60
Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile
65 70 75 80
Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr
85 90 95
Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu
100 105 110
Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ala Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr
115 120 125
<210> 15
<211> 417
<212> ADN/ARN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Gen

```

```

<222> (1)..(417)
<223> Trình tự axit nucleic IL-2-07
<400> 15
catatggcac cgaccagcag cagcaccaaa aaaaccacgc tgcaactgga acatctgctg      60
ttagatctgc aaatgattct gaacggcatc aacaactaca aaaatccgaa actgaccgct      120
atgctgaccg caaaattcgc aatgccgaaa aaagcaaccg agctgaaaca tctgcagtgt      180
ctggaagaag aactgaaacc gctggaagag gttctgaatc tggcacagag caaaaacttt      240
catctgcgtc cgcgtgatct gattagcaat attaacgtta ttgtgctgga actgaaagggt      300
agcgaaacca cctttatgtg tgaatatgcc gatgaaaccg caaccattgt ggaatttctg      360
aatcgttgga ttacctttgc acagagcatt attagcaccc tgacctaatg aggatcc      417
<210> 16
<211> 134
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Peptit
<222> (1)..(134)
<223> Trình tự axit amin IL-2-07
<400> 16
Met Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu
1          5          10          15
His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr
20        25        30
Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Ala Lys Phe Ala Met Pro
35        40        45
Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu
50        55        60
Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His
65        70        75        80
Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu
85        90        95
Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr
100       105       110
Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ala Gln Ser
115       120       125
Ile Ile Ser Thr Leu Thr
130
<210> 17
<211> 417
<212> ADN/ARN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Gen
<222> (1)..(417)
<223> Trình tự axit nucleic IL-2-08
<400> 17
catatggcac cgaccagcag cagcaccaaa aaaaccacgc tgcaactgga acatctgctg      60
ttagatctgc aaatgattct gaacggcatc aacaactaca aaaatccgaa actgaccgct      120
atgctgaccg caaaattccta catgccgaaa aaagcaaccg agctgaaaca tctgcagtgt      180
ctggaagaag aactgaaacc gctggaagag gttctgaatg gcgcacagag caaaaacttt      240
catctgcgtc cgcgtgatct gattagcaat attaacgtta ttgtgctgga actgaaagggt      300
agcgaaacca cctttatgtg tgaatatgcc gatgaaaccg caaccattgt ggaatttctg      360
aatcgttgga ttacctttgc acagagcatt attagcaccc tgacctaatg aggatcc      417
<210> 18
<211> 134
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Peptit
<222> (1)..(134)
<223> Trình tự axit amin IL-2-08
<400> 18
Met Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu
1          5          10          15
His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr
20        25        30
Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Ala Lys Phe Tyr Met Pro
35        40        45
Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu
50        55        60
Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Gly Ala Gln Ser Lys Asn Phe His
65        70        75        80
Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu
85        90        95
Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr
100       105       110
Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ala Gln Ser
115       120       125
Ile Ile Ser Thr Leu Thr

```

```

130
<210> 19
<211> 417
<212> ADN/ARN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Gen
<222> (1)..(417)
<223> Trình tự axit nucleic IL-2-09
<400> 19
catatggcac cgaccagcag cagcaccaaa aaaacccagc tgcaactgga acatctgctg      60
ttagatctgc aaatgattct gaacggcatc aacaactaca aaaatccgaa actgaccggt      120
atgctgacct tcaaattcgc aatgccgaaa aaagcaaccg agctgaaaca tctgcagtgt      180
ctggaagaag aactgaaacc gctggaagag gttctgaatg gcgcacagag caaaaacttt      240
catctgcgtc cgcgtgatct gattagcaat attaacgtta ttgtgctgga actgaaaggt      300
agcgaaacca cctttatgtg tgaatatgcc gatgaaaccg caaccattgt ggaatttctg      360
aatcggttga ttacctttgc acagagcatt attagcacc tgacctaatg aggatcc      417
<210> 20
<211> 134
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Peptit
<222> (1)..(134)
<223> Trình tự axit amin IL-2-09
<400> 20
Met Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu
1                               10 15
His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr
20 25 30
Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Ala Met Pro
35 40 45
Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu
50 55 60
Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Gly Ala Gln Ser Lys Asn Phe His
65 70 75 80
Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu
85 90 95
Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr
100 105 110
Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ala Gln Ser
115 120 125
Ile Ile Ser Thr Leu Thr
130
<210> 21
<211> 417
<212> ADN/ARN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Gen
<222> (1)..(417)
<223> Trình tự axit nucleic IL-2-10
<400> 21
catatggcac cgaccagcag cagcaccaaa aaaacccagc tgcaactgga acatctgctg      60
ttagatctgc aaatgattct gcaggcatc aacagctaca aaaatccgaa actgaccggt      120
atgctgacct caaaattcta catgccgaaa aaagcaaccg agctgaaaca tctgcagtgt      180
ctggaagaag aactgaaacc gctggaagag gttctgaatg gcgcacagag caaaaacttt      240
catctgcgtc cgcgtgatct gattagcaat attaacgtta ttgtgctgga actgaaaggt      300
agcgaaacca cctttatgtg tgaatatgcc gatgaaaccg caaccattgt ggaatttctg      360
aatcggttga ttacctttgc acagagcatt attagcacc tgacctaatg aggatcc      417
<210> 22
<211> 134
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Peptit
<222> (1)..(134)
<223> Trình tự axit amin IL-2-10
<400> 22
Met Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu
1                               10 15
His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Gln Gly Ile Asn Ser Tyr
20 25 30
Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Ala Lys Phe Tyr Met Pro
35 40 45
Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu
50 55 60
Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Gly Ala Gln Ser Lys Asn Phe His
65 70 75 80

```

```

Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu
      85                      90                      95
Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr
      100                      105                      110
Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ala Gln Ser
      115                      120                      125
Ile Ile Ser Thr Leu Thr
      130
<210> 23
<211> 417
<212> ADN/ARN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Gen
<222> (1)..(417)
<223> Trình tự axit nucleic IL-2-11
<400> 23
catatggcac cgaccagcag cagcaccaaa aaaacctgtc tgcaactgga acatctgctg      60
ttagatctgc aaatgattct gcaggcatc aacagctaca aaaatccgaa actgaccggt      120
atgctgaccg caaaattcta catgccgaaa aaagcaaccg agctgaaaca tctgcagtgt      180
ctggaagaag aactgaaacc gctggaagag gttctgaatg gcgcacagag caaaaacttt      240
catctgcgtc gcgctgatct gattagcaat attaacgtta ttgtgctgga actgaaagg      300
agcgaacca cctttatgtg tgaatatgcc gatgaaaccg caaccattgt ggaatttctg      360
aatcgttgga ttacctttgc acagagcatt attagcacct tgacctaatg aggatcc      417
<210> 24
<211> 134
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Peptit
<222> (1)..(134)
<223> Trình tự axit amin IL-2-11
<400> 24
Met Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Cys Leu Gln Leu Glu
1      5      10      15
His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Gln Gly Ile Asn Ser Tyr
      20      25      30
Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Ala Lys Phe Tyr Met Pro
      35      40      45
Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu
      50      55      60
Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Gly Ala Gln Ser Lys Asn Phe His
      65      70      75      80
Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu
      85      90      95
Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr
      100      105      110
Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ala Gln Ser
      115      120      125
Ile Ile Ser Thr Cys Thr
      130
<210> 25
<211> 417
<212> ADN/ARN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Gen
<222> (1)..(417)
<223> Trình tự axit nucleic IL-2-12
<400> 25
catatggcac cgaccagcag cagcaccaaa aaaaccagc tgcaactgga acatctgctg      60
ttagatctgc aaatgattct gcaggcatc aacagctaca aaaatccgaa actgaccggt      120
atgctgaccg caaaattcta catgccgaaa aaagcaaccg agctgaaaca tctgcagtgt      180
ctggaagaag aactgaaacc gctggaagag gtttgtaatg gcgcacagag caaaaacttt      240
catctgcgtt gtcgtgatct gattagcaat attaacgtta ttgtgctgga actgaaagg      300
agcgaacca cctttatgtg tgaatatgcc gatgaaaccg caaccattgt ggaatttctg      360
aatcgttgga ttacctttgc acagagcatt attagcacc tgacctaatg aggatcc      417
<210> 26
<211> 134
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Peptit
<222> (1)..(134)

```

<223> Trình tự axit amin IL-2-12

<400> 26

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

<210> 27

<211> 417

<212> ADN/ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> Gen

<222> (1)..(417)

<223> Trình tự axit nucleic IL-2-13

<400> 27

```
catatggcac cgaccagcag cagcaccaaaa aaaacccagc tgcaactgga acatctgctg      60
ttagatctgc aaatgattct gcagtgtatc aacagctaca aaaatccgaa actgaccgct      120
atgctgaccg caaaattcta catgccgaaa aaagcaaccg agctgaaaca tctgcagtgt      180
ctggaagaag aactgaaacc gctggaagag gttctgaatg gcgcacagag caaaaactgt      240
catctgcgtc cgcgatgatc gattagcaat attaacgtta ttgtgctgga actgaaaggt      300
agcgaaccac cctttatgtg tgaatatgcc gatgaaaccg caaccattgt ggaatttctg      360
aatcggttga ttacctttgc acagagcatt attagcaccg tgacctaatg aggatcc      417
```

<210> 28

<211> 134

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> Peptit

<222> (1)..(134)

<223> Trình tự axit amin IL-2-13

<400> 28

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

<210> 29

<211> 417

<212> ADN/ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> Gen

<222> (1)..(417)

<223> Trình tự axit nucleic IL-2-14

<400> 29

```
catatggcac cgaccagcag cagcaccaaaa aaaacccagc tgcaactgga acatctgctg      60
ttagatctgc aaatgattct gaacggcatc agcaactaca aaaatccgaa actgaccgct      120
atgctgaccg caaaattcta catgccgaaa aaagcaaccg agctgaaaca tctgcagtgt      180
ctggaagaag aactgaaacc gctggaagag gttctgaatg gcgcacagag caaaaacttt      240
catctgcgtc cgcgatgatc gattagcaat attaacgtta ttgtgctgga actgaaaggt      300
agcgaaccac cctttatgtg tgaatatgcc gatgaaaccg caaccattgt ggaatttctg      360
aatcggttga ttacctttgc acagagcatt attagcaccg tgacctaatg aggatcc      417
```

```

<210> 30
<211> 134
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Peptit
<222> (1)..(134)
<223> Trình tự axit amin IL-2-14
<400> 30
Met Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu
1          5          10          15
His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Ser Asn Tyr
          20          25          30
Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Ala Lys Phe Tyr Met Pro
          35          40          45
Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu
          50          55          60
Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Gly Ala Gln Ser Lys Asn Phe His
65          70          75          80
Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu
          85          90          95
Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr
          100         105         110
Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ala Gln Ser
          115         120         125
Ile Ile Ser Thr Leu Thr
          130
<210> 31
<211> 417
<212> ADN/ARN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Gen
<222> (1)..(417)
<223> Trình tự axit nucleic IL-2-21
<400> 31
catatggcac cgaccagcag cagcaccaaa aaaacccagc tgcaactgga acatctgctg      60
ttagatctgc aaatgattct gcagggcatac agcaactaca aaaatccgaa actgacccgt      120
atgctgaccg caaaattcta catgccgaaa aaagcaaccg agctgaaaca tctgcagtgt      180
ctggaagaag aactgaaacc gctggaagag gttctgaatg gcgcacagag caaaaacttt      240
catctgcgtc cgcgtgatct gattagcaat attaacgtta ttgtgctgga actgaaaggt      300
agcgaaacca cttttatgtg tgaatatgcc gatgaaaccg caaccattgt ggaatttctg      360
aatcgttgga ttacctttgc acagagcatt attagcaccc tgacctaatg aggatcc      417
<210> 32
<211> 134
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Peptit
<222> (1)..(134)
<223> Trình tự axit amin IL-2-21
<400> 32
Met Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu
1          5          10          15
His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Gln Gly Ile Ser Asn Tyr
          20          25          30
Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Ala Lys Phe Tyr Met Pro
          35          40          45
Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu
          50          55          60
Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Gly Ala Gln Ser Lys Asn Phe His
65          70          75          80
Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu
          85          90          95
Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr
          100         105         110
Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ala Gln Ser
          115         120         125
Ile Ile Ser Thr Leu Thr
          130
<210> 33
<211> 417
<212> ADN/ARN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Gen
<222> (1)..(417)
<223> Trình tự axit nucleic IL-2-22
<400> 33

```

```

catatggcac cgaccagcag cagcaccaaa aaaaccagc tgcaactgga acatctgctg      60
ttagatctgc aaatgattct gcagggcatc agcaactaca aaaatccgaa actgaccctg      120
atgctgaccg caaaattcta catgccgaaa aaagcaaccg agctgaaaca tctgcagtgt      180
ctggaagaag aactgaaacc gctggaagag gttctgcagg gcgcacagag caaaaacttt      240
catctgcgtc cgcgatgatc gattagcaat attaacgtta ttgtgctgga actgaaaggt      300
agcgaacca cctttatgtg tgaatatgcc gatgaaaccg caaccattgt ggaatttctg      360
aatcgttgga ttacctttgc acagagcatt attagcaccg tgacctaatg aggatcc      417
<210> 34
<211> 134
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Peptit
<222> (1)..(134)
<223> Trình tự axit amin IL-2-22
<400> 34
Met Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu
1 5 10 15
His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Gln Gly Ile Ser Asn Tyr
20 25 30
Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Ala Lys Phe Tyr Met Pro
35 40 45
Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu
50 55 60
Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Gln Gly Ala Gln Ser Lys Asn Phe His
65 70 75 80
Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu
85 90 95
Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr
100 105 110
Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ala Gln Ser
115 120 125
Ile Ile Ser Thr Leu Thr
130
<210> 35
<211> 396
<212> ADN/ARN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Alen
<222> (1)..(396)
<223> Trình tự axit nucleic IL-2-23
<400> 35
catatggcac cgaccagcag cagcaccaaa aaaacctgtc tgcaactgga acatctgctg      60
ttagatctgc aaatgattct gaacggcatc cagagcatgc atattgatgc aacctgtac      120
atgccgaaaa aagcaaccga gctgaaacat ctgcagtgtc tggaagaaga actgaaaccg      180
ctggaagagg ttctgaatct ggcacagagc aaaaactttc atctgcgtcc gcgtgatctg      240
attagcaata ttaacgttat tgtgtgctgaa ctgaaaggta gcgaaaccac ctttatgtgt      300
gaatatgccg atgaaaccgc aaccattgtg gaatttctga atcgttggat tacctttgca      360
cagagcatta ttagcacctg tacctaata ggaatcc      396
<210> 36
<211> 127
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Peptit
<222> (1)..(127)
<223> Trình tự axit amin IL-2-23
<400> 36
Met Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Cys Leu Gln Leu Glu
1 5 10 15
His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Gln Ser Met
20 25 30
His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys
35 40 45
His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu
50 55 60
Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile
65 70 75 80
Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr
85 90 95
Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu
100 105 110
Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ala Gln Ser Ile Ile Ser Thr Cys Thr
115 120 125
<210> 37
<211> 198
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

```

```

<220>
<221> Miền
<222> (1)..(198)
<223> IL-2R alpha (trình tự đánh dấu His)
<400> 37
Glu Leu Cys Asp Asp Asp Pro Pro Glu Ile Pro His Ala Thr Phe Lys
1 5 10 15
Ala Met Ala Tyr Lys Glu Gly Thr Met Leu Asn Cys Glu Cys Lys Arg
20 25 30
Gly Phe Arg Arg Ile Lys Ser Gly Ser Leu Tyr Met Leu Cys Thr Gly
35 40 45
Asn Ser Ser His Ser Ser Trp Asp Asn Gln Cys Gln Cys Thr Ser Ser
50 55 60
Ala Thr Arg Asn Thr Thr Lys Gln Val Thr Pro Gln Pro Glu Glu Gln
65 70 75 80
Lys Glu Arg Lys Thr Thr Glu Met Gln Ser Pro Met Gln Pro Val Asp
85 90 95
Gln Ala Ser Leu Pro Gly His Cys Arg Glu Pro Pro Pro Trp Glu Asn
100 105 110
Glu Ala Thr Glu Arg Ile Tyr His Phe Val Val Gly Gln Met Val Tyr
115 120 125
Tyr Gln Cys Val Gln Gly Tyr Arg Ala Leu His Arg Gly Pro Ala Glu
130 135 140
Ser Val Cys Lys Met Thr His Gly Lys Thr Arg Trp Thr Gln Pro Gln
145 150 155 160
Leu Ile Cys Thr Gly Glu Met Glu Thr Ser Gln Phe Pro Gly Glu Glu
165 170 175
Lys Pro Gln Ala Ser Pro Glu Gly Arg Pro Glu Ser Glu Thr Ser Cys
180 185 190
His His His His His His
195
<210> 38
<211> 466
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

```

```

<220>
<221> Miền
<222> (1)..(466)
<223> IL-2R beta (khoảng Fc)
<400> 38
Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15
Phe Pro Gly Ala Arg Cys Ala Val Asn Gly Thr Ser Gln Phe Thr Cys
20 25 30
Phe Tyr Asn Ser Arg Ala Asn Ile Ser Cys Val Trp Ser Gln Asp Gly
35 40 45
Ala Leu Gln Asp Thr Ser Cys Gln Val His Ala Trp Pro Asp Arg Arg
50 55 60
Arg Trp Asn Gln Thr Cys Glu Leu Leu Pro Val Ser Gln Ala Ser Trp
65 70 75 80
Ala Cys Asn Leu Ile Leu Gly Ala Pro Asp Ser Gln Lys Leu Thr Thr
85 90 95
Val Asp Ile Val Thr Leu Arg Val Leu Cys Arg Glu Gly Val Arg Trp
100 105 110
Arg Val Met Ala Ile Gln Asp Phe Lys Pro Phe Glu Asn Leu Arg Leu
115 120 125
Met Ala Pro Ile Ser Leu Gln Val Val His Val Glu Thr His Arg Cys
130 135 140
Asn Ile Ser Trp Glu Ile Ser Gln Ala Ser His Tyr Phe Glu Arg His
145 150 155 160
Leu Glu Phe Glu Ala Arg Thr Leu Ser Pro Gly His Thr Trp Glu Glu
165 170 175
Ala Pro Leu Leu Thr Leu Lys Gln Lys Gln Glu Trp Ile Cys Leu Glu
180 185 190
Thr Leu Thr Pro Asp Thr Gln Tyr Glu Phe Gln Val Arg Val Lys Pro
195 200 205
Leu Gln Gly Glu Phe Thr Thr Trp Ser Pro Trp Ser Gln Pro Leu Ala
210 215 220
Phe Arg Thr Lys Pro Ala Ala Leu Gly Lys Asp Thr Gly Ala Gln Asp
225 230 235 240
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
245 250 255
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
260 265 270
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
275 280 285
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
290 295 300

```

```

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
305                      310                      315                      320
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
                      325                      330                      335
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
                      340                      345                      350
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys
                      355                      360                      365
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
                      370                      375                      380
Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
385                      390                      395                      400
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
                      405                      410                      415
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp
                      420                      425                      430
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
                      435                      440                      445
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
450                      455                      460
Gly Lys
465
<210> 39
<211> 492
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Miền
<222> (1)..(492)
<223> IL-2R gama (hồc Fc)
<400> 39
Met Leu Lys Pro Ser Leu Pro Phe Thr Ser Leu Leu Phe Leu Gln Leu
1                      5                      10                      15
Pro Leu Leu Gly Val Gly Leu Asn Thr Thr Ile Leu Thr Pro Asn Gly
20                      25                      30
Asn Glu Asp Thr Thr Ala Asp Phe Leu Thr Thr Met Pro Thr Asp
35                      40                      45
Ser Leu Ser Val Ser Thr Leu Pro Leu Pro Glu Val Gln Cys Phe Val
50                      55                      60
Phe Asn Val Glu Tyr Met Asn Cys Thr Trp Asn Ser Ser Ser Glu Pro
65                      70                      75                      80
Gln Pro Thr Asn Leu Thr Leu His Tyr Trp Tyr Lys Asn Ser Asp Asn
85                      90                      95
Asp Lys Val Gln Lys Cys Ser His Tyr Leu Phe Ser Glu Glu Ile Thr
100                      105                      110
Ser Gly Cys Gln Leu Gln Lys Lys Glu Ile His Leu Tyr Gln Thr Phe
115                      120                      125
Val Val Gln Leu Gln Asp Pro Arg Glu Pro Arg Arg Gln Ala Thr Gln
130                      135                      140
Met Leu Lys Leu Gln Asn Leu Val Ile Pro Trp Ala Pro Glu Asn Leu
145                      150                      155                      160
Thr Leu His Lys Leu Ser Glu Ser Gln Leu Glu Leu Asn Trp Asn Asn
165                      170                      175
Arg Phe Leu Asn His Cys Leu Glu His Leu Val Gln Tyr Arg Thr Asp
180                      185                      190
Trp Asp His Ser Trp Thr Glu Gln Ser Val Asp Tyr Arg His Lys Phe
195                      200                      205
Ser Leu Pro Ser Val Asp Gly Gln Lys Arg Tyr Thr Phe Arg Val Arg
210                      215                      220
Ser Arg Phe Asn Pro Leu Cys Gly Ser Ala Gln His Trp Ser Glu Trp
225                      230                      235                      240
Ser His Pro Ile His Trp Gly Ser Asn Thr Ser Lys Glu Asn Pro Phe
245                      250                      255
Leu Phe Ala Leu Glu Ala Gly Ala Gln Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
260                      265                      270
Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
275                      280                      285
Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
290                      295                      300
Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
305                      310                      315                      320
Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
325                      330                      335
Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
340                      345                      350
Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
355                      360                      365
Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
370                      375                      380

```

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg
 385 390 395 400
 Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly
 405 410 415
 Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
 420 425 430
 Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
 435 440 445
 Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
 450 455 460
 Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
 465 470 475 480
 Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 485 490

<210> 40
 <211> 417
 <212> ADN/ARN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <221> Gen
 <222> (1)..(417)
 <223> Trình tự axit nucleic IL-2-24
 <400> 40

catatggcac cgaccagcag cagcaccaaa aaaacccagc tgcaactgga acatctgctg 60
 ttagatctgc aaatgattct gcagggcac agcaactaca aaaatccgaa actgacccgt 120
 atgctgacct tcaaattcta catgccgaaa aaagcaaccg agctgaaaca tctgcagtgt 180
 ctggaagaag aactgaaacc gctggaagag gttctgaatc tggcacagag caaaaacttt 240
 catctgctgc cgcgtgatct gattagccgt attaacgtta ttgtgctgga actgaaaggt 300
 agcgaaacca cctttatgtg tgaatatgcc gatgaaaccg caaccattgt ggaatttctg 360
 aatcgttgga ttacctttgc acagagcatt attagcacc tgacctaatg aggatcc 417

<210> 41
 <211> 134
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <221> Peptit
 <222> (1)..(134)
 <223> Trình tự axit amin IL-2-24
 <400> 41

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