



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

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

(11)



1-0052005

(51)^{2020.01} A61K 38/20; A61P 35/00; C07K 14/54; (13) B
C12N 15/62; C07K 16/28; C07K 19/00;
C12N 15/13; C12N 15/24; A61K 39/395;
C07K 14/715

(21) 1-2022-02422

(22) 20/09/2020

(86) PCT/RU2020/050233 20/09/2020

(87) WO 2021/054867 25/03/2021

(30) 2019129569 19/09/2019 RU

(45) 25/09/2025 450

(43) 26/12/2022 417A

(73) JOINT STOCK COMPANY "BIOCAD" (RU)

Liter A, bld. 34, Svyazi st., Strelna, Petrodvortsoviy district, Saint Petersburg,
198515, Russian Federation

(72) ULITIN, Andrei Borisovich (RU); KONONOV, Aleksey Vladimirovich (RU);
AGEEV, Sergei Andreevich (RU); GORDEEV, Aleksandr Andreevich (RU);
VINOGRADOVA, Elena Vladimirovna (RU); EVDOKIMOV, Stanislav
Rudolfovich (RU); SHMAKOVA, Aleksandra Pavlovna (RU); MITROSHIN, Ivan
Vladimirovich (RU); MOROZOV, Dmitry Valentinovich (RU).

(74) Công ty Luật TNHH WINCO (WINCO LAW FIRM)

(54) XYTOKIN MIỄN DỊCH CHỨA PHỨC HỢP PROTEIN HETERODIME TRÊN CƠ
SỞ IL-15/IL-15RA VÀ ĐƯỢC PHÂN CHỨA XYTOKIN NÀY

(21) 1-2022-02422

(57) Sáng chế đề cập đến xytokin miễn dịch chứa phức hợp protein heterodime trên cơ sở IL-15/IL-15R α , và xytokin này dùng làm chất điều trị, cụ thể là chất để điều trị bệnh ung thư và bệnh tự miễn. Sáng chế còn đề cập đến xytokin miễn dịch chứa phức hợp protein heterodime trên cơ sở IL-15/IL-15R α và kháng thể điều biến miễn dịch, kháng thể này dùng làm chất điều trị, cụ thể là chất để điều trị bệnh ung thư và bệnh tự miễn, và dược phẩm chứa xytokin này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến xytokin miễn dịch chứa phức hợp protein heterodime trên cơ sở IL-15/IL-15R α , và xytokin này dùng làm chất điều trị, cụ thể chất để điều trị bệnh ung thư và bệnh tự miễn. Sáng chế còn đề cập đến xytokin miễn dịch chứa phức hợp protein heterodime trên cơ sở IL-15/IL-15R α và kháng thể điều biến miễn dịch, kháng thể này dùng làm chất điều trị, cụ thể là chất để điều trị bệnh ung thư và bệnh tự miễn, và được phẩm chứa xytokin này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các xytokin là nhóm các protein và glycoprotein truyền tín hiệu mà giống như các hormon và chất dẫn truyền thần kinh, được sử dụng rộng rãi trong việc truyền thông tin trong tế bào. Trong khi các hormon được tiết ra từ các cơ quan cụ thể đến máu, và các chất dẫn truyền thần kinh có liên quan đến sự hoạt động của dây thần kinh, các xytokin là nhóm hợp chất đa dạng hơn về nguồn gốc và mục đích. Chúng được tạo ra bởi rất nhiều loại tế bào tạo máu và tế bào không tạo máu và có thể ảnh hưởng đến cả các tế bào lân cận và toàn bộ cơ thể, và đôi khi phụ thuộc đáng kể vào sự có mặt của các hóa chất khác. Họ xytokin chủ yếu bao gồm các protein và glycoprotein nhỏ, tan trong nước, có khối lượng nằm trong khoảng từ 8 đến 30 kDa. Các xytokin rất quan trọng cho sự phát triển và chức năng của cả đáp ứng miễn dịch bẩm sinh và đáp ứng miễn dịch thích ứng. Chúng thường được tiết ra bởi các tế bào miễn dịch đã gặp phải tác nhân gây bệnh, nhờ đó hoạt hóa và huy động thêm các tế bào miễn dịch để làm gia tăng mức độ đáp ứng của hệ thống với tác nhân gây bệnh.

Trong số các xytokin, intolokin 15 (IL-15) là xytokin có tính tương tự về cấu trúc với IL-2; intolokin này được tiết ra bởi các thể thực bào đơn nhân (và một số tế bào khác) sau khi nhiễm (các) virus hoặc kích thích gián tiếp bằng các tế bào được thừa nhận là "không tự thân" hoặc bị yếu đi. Xytokin này cảm ứng sự tăng sinh tế bào của các tế bào giết tự nhiên; các tế bào của hệ miễn dịch bẩm sinh có vai trò chính là tiêu diệt các tế bào đã nhiễm virus. Protein được mã hóa bởi gen này là xytokin điều hòa sự hoạt hóa và sự tăng sinh của tế bào T và tế bào giết tự nhiên.

Intolokin-15 (IL-15) là glycoprotein có khối lượng 14-15 kDa được nhận biết đồng

thời bởi hai nhóm dưới dạng yếu tố hoạt hóa tế bào T (Grabstein, K.H. et al., Science 1994, 264, 965; Burton, J.D. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1994, 91, 4935). mRNA của IL-15 được biểu hiện rộng rãi trong các tế bào và mô khác nhau, tuy nhiên, rất khó tìm thấy protein trong các tế bào này hoặc trong dịch nội bề mặt tế bào do sự kiểm soát sau phiên mã mạnh đối với sự biểu hiện của chúng ở cấp độ dịch mã và giao lưu nội bào (Bamford RN. et al., J. Immunol. 1998, 160: 4418-4426; Kurys G, et al., J. Biol. Chem. 2000, 275: 30653-30659). Ngoài ra, đã chứng minh được rằng IL-15 có thể tồn tại ở dạng hoạt hóa làm protein màng (Musso et al., Blood 1999, Vol. 93, No 10 (May 15): pp 3531-3539), và gần đây, đã nhận thấy được rằng nó có thể có chức năng làm phôi tử hoặc thụ thể (Budalgian et al., JBC 2004, vol 279, No 40: pp 42192-42201) cảm ứng sự tiết ra các cytokin tiền viêm thông qua con đường này. Sự biểu hiện ở mức cao của protein hòa tan có liên quan đến sinh bệnh học của bệnh viêm và bệnh tự miễn. IL-15 đã được phát hiện trong một số bệnh bao gồm bệnh Crohn (Kirman I., 1996, Am. J. Gastroenterol. 91, 1789), psoriasis (Ruckert R. 2000, 165: 2240-2250), bệnh bạch cầu (Yamada Y. 1999, Leukemia and Lymphoma, 35(1-2): 37-45) và bệnh viêm đa khớp dạng thấp (rheumatoid arthritis: RA), (McInnes I.B. 1998, Immunology Today, 19, 75-79). Sự gắn kết của phôi tử với thụ thể tế bào T cảm ứng sự biểu hiện của IL-15R α và sự biểu hiện của một số kháng nguyên hoạt hóa như CD69, CD25 và TNFR2. Ngoài ra, IL-15 là chất hóa ứng động đối với các tế bào lympho T trong máu của người (Wilkinson 1995, J. Exp. Med. 181, 1255-1259). Tất cả các số liệu này gợi ý rằng IL-15 được biểu hiện bởi các tế bào trình diện kháng nguyên có thể là quan trọng đối với sự hoạt hóa tế bào sớm ở vị trí viêm.

IL-15 là thành viên của họ các cytokin có bốn bó xoắn- α nhỏ. Hiệu quả sinh học của IL-15 được trung gian bởi sự gắn kết của nó với thụ thể màng tế bào gồm ba tiểu đơn vị α , β , và γ . IL-15R α là tiểu đơn vị đặc hiệu với cytokin này mà nó được gắn kết với ái lực rất cao Kd 10^{-11} , và có thể được tìm thấy dưới dạng thụ thể màng hoặc ở dạng hòa tan (Budalgian V. et al., JBC 2004, 279, 39: 40368-40375; Mortier et al., The Journal of Immunology, 2004, 173: 1681-1688). IL-15R α chứa miền Sushi, có khả năng gắn kết với IL-15, và rất cần thiết cho chức năng sinh học của IL-15 sau khi gắn kết.

IL-15 có các hạn chế liên quan đến trọng lượng phân tử thấp, thời gian bán hủy *in vivo* ngắn, liều lượng lặp lại khó được kiểm soát, và có thể gây ra tác dụng phụ miễn dịch toàn thân. Do đó, rất cần tìm ra phương pháp có thể làm gia tăng thời gian bán hủy *in vivo*, và kích thích hoặc làm gia tăng hoạt tính sinh học của IL-15 *in vivo*.

Gần đây, đã phát hiện được rằng phức hợp được tạo bởi IL-15 và thụ thể của nó IL-15R α có thể làm gia tăng đáng kể hoạt tính sinh học của IL-15. Các nghiên cứu cho thấy rằng phức hợp được tạo bởi IL-15 và thụ thể hòa tan IL-15R α là tốt hơn đáng kể so với IL-15 một mình trong việc kích thích sự tăng sinh của các tế bào lymphô T CD8+ trí nhớ và các tế bào NT/NKT. Phức hợp IL-15/IL-15R α có hiệu quả cao hơn 10 lần so với IL-15 một mình trong việc kích thích sự tăng sinh của các tế bào T CD8+ trí nhớ và trong việc duy trì sự sống của chúng, và cơ chế này có thể có liên quan đến sự trình diện cis.

Các Công bố đơn quốc tế số WO2007046006, WO2016095642 bộc lộ protein dung hợp được dùng để kích thích con đường truyền tín hiệu IL-15Rbeta/gama để nhờ đó cảm ứng và/hoặc kích thích sự hoạt hóa và/hoặc tăng sinh của các tế bào dương tính với IL-15Rbeta/gama, như các tế bào NK và/hoặc T, khác biệt ở chỗ, nó chứa IL-15 được liên kết theo cách gián tiếp bằng các liên kết cộng hóa trị với polypeptit chứa miền sushi của vùng ngoại bào của IL-15Ralpha, và việc sử dụng chúng trong điều trị bệnh ung thư. Tuy nhiên, Công bố đơn quốc tế số WO2007046006 cung cấp số liệu thử nghiệm và các đặc điểm của chất siêu chủ vận duy nhất đối với IL-15 được liên kết với IL-15Ralpha bằng peptit của nhóm liên kết thông qua các axit amin ở đầu tận cùng N và đầu tận cùng C, trong khi Công bố đơn quốc tế số WO2016095642 cung cấp số liệu thử nghiệm và các đặc điểm của chất siêu chủ vận duy nhất đối với IL-15 được liên kết bằng liên kết S-S thể khảm được tạo ra bởi sự đột biến Cys trong phối tử IL-15 và IL-15Ralpha của chính chúng. Cả hai tài liệu này đều không cung cấp bằng chứng bất kỳ về hoạt tính và các đặc điểm hóa lý của các biến thể siêu chủ vận IL15 bao gồm các miền protein dung hợp được liên kết bằng (các) liên kết S-S hoặc không có liên kết cầu S-S.

Các đối tượng này có các hạn chế liên quan đến trọng lượng phân tử thấp, thời gian bán hủy *in vivo* ngắn. Chúng có hoạt tính của interleukin 15 bị hạn chế, và rất khó tạo ra chúng, cụ thể là trong các tế bào buồng trứng chuột đồng Trung Quốc, và có liên quan đến hiệu suất thấp.

Các Công bố đơn quốc tế số WO WO 2015103928, WO2018071919 bộc lộ các biến thể cho giải pháp của vấn đề trên đây, cụ thể là protein của chất chủ vận heterodime IL-15 bao gồm protein (I) và protein (II), trong đó protein (I) nêu trên được tạo ra bởi IL-15 dung hợp với biến thể Fc thứ nhất, biến thể Fc thứ nhất này được liên kết với đầu tận cùng C của IL-15, và protein (II) nêu trên là biến thể Fc thứ hai hoặc được tạo bởi IL-15R α hoặc biến thể của nó dung hợp với biến thể Fc thứ hai, biến thể Fc thứ hai này được liên kết với đầu

tận cùng C của IL-15R α . Protein (I) và protein (II) tạo thành protein heterodime ổn định thông qua sự tương tác "chỗ phình vào chỗ lõm" giữa biến thể Fc thứ nhất và biến thể Fc thứ hai.

Sự tạo ra các xytokin miễn dịch trên cơ sở IL-15 được đặc biệt quan tâm để kết hợp các đặc tính có lợi của kháng thể đặc hiệu khối u hướng đích các khối u có hiệu quả điều biến miễn dịch của intolokin 15.

Các Công bố đơn quốc tế số WO WO2015018528, WO2018071918 bộc lộ xytokin miễn dịch chứa thể liên hợp và kháng thể điều biến miễn dịch hoặc mảnh của nó, được liên kết theo cách trực tiếp hoặc gián tiếp bằng các liên kết cộng hóa trị với thể liên hợp nêu trên, trong đó thể liên hợp chứa polypeptit có trình tự axit amin của intolokin-15 hoặc các dẫn xuất của nó, và trình tự axit amin của miền sushi của IL-15R α hoặc các dẫn xuất của nó.

Công bố đơn quốc tế số WO 2012175222 bộc lộ xytokin miễn dịch để điều trị bệnh ung thư, xytokin này chứa thể liên hợp, và kháng thể hoặc mảnh của nó được chọn từ nhóm bao gồm mảnh Fab, mảnh Fab', mảnh F(ab')₂, Facb, Fd, và scFv, trong đó thể liên hợp nêu trên chứa polypeptit có trình tự axit amin của intolokin 15, và polypeptit chứa trình tự axit amin miền sushi của IL-15R α . Thể liên hợp và kháng thể hoặc mảnh của nó được liên kết cộng hóa trị bằng cách sử dụng các chất liên hợp có hai chức để tạo ra sự liên hợp protein.

Công bố đơn quốc tế số WO2019006472 bộc lộ protein heterodime có hai chức bao gồm:

protein dung hợp IL-15/IL-15R α chứa protein IL-15R α , protein IL-15, và miền Fc thứ nhất; và

monome của miền gắn kết kháng nguyên để gắn kết với kháng nguyên được chọn từ nhóm bao gồm CD8 của người, NKG2A của người, và NKG2D của người, bao gồm chuỗi nặng chứa monome VH-CH1-miền bản lề-CH2-CH3, trong đó VH là miền biến đổi chuỗi nặng và CH2-CH3 là miền Fc thứ hai, và chuỗi nhẹ chứa miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) và miền ổn định chuỗi nhẹ (CL),

trong đó các miền Fc thứ nhất và thứ hai nêu trên có tập hợp sự thay thế axit amin được chọn từ nhóm bao gồm:

S267K / L368D / K370S: S267K / S364K / E357Q;

S364K / E357Q: L368D / K370S;

L368D / K370S: S364K;

L368E / K370S: S364K;

T411T / K360E / Q362E: D401K;
 L368D / K370S: S364K / E357L và
 K370S:S364K / E357Q.

Mặc dù đã có các giải pháp theo tài liệu đã biết trên đây đối với phức hợp của IL-15 và thụ thể của nó IL-15R α , vẫn cần có phân tử trên cơ sở IL15 mà sẽ tính ổn định cao, thời gian bán hủy *in vivo* kéo dài, hoạt tính sinh học *in vivo* tăng lên và khả năng sản sinh ở các tế bào của động vật có vú tăng lên.

Định dạng của xytokin miễn dịch mới đã được phát triển bởi các tác giả sáng chế này chứa các phân tử heterodime trên cơ sở IL-15 và IL-15R α , có tính ổn định cao, khả năng sản sinh ở các tế bào của động vật có vú tăng lên, thời gian bán hủy *in vivo* kéo dài và hoạt tính sinh học *in vivo* tăng lên. Ngoài ra, chúng là các định dạng thường dung cho xytokin miễn dịch đặc hiệu kép có đặc tính của hoạt tính IL15. Định dạng của xytokin miễn dịch mới đã được phát triển bởi các tác giả sáng chế này có độc tính giảm theo kết quả của các nghiên cứu tiền lâm sàng.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến xytokin miễn dịch để kích thích sự hoạt hóa và/hoặc tăng sinh của các tế bào dương tính với IL-15R β /gamma, xytokin này chứa an IL-15/IL-15R α phức hợp protein heterodime bao gồm:

- 1) IL-15R α , được liên kết với
 - a) miền ổn định chuỗi nhẹ của kháng thể, hoặc
 - b) các miền ổn định chuỗi nặng của kháng thể chứa miền ổn định chuỗi nặng thứ nhất (CH1) và monome của mảnh Fc chứa các miền ổn định chuỗi nặng thứ hai (CH2) và thứ ba (CH3);
- 2) IL-15 được liên kết với
 - a) các miền ổn định chuỗi nặng của kháng thể chứa miền ổn định chuỗi nặng thứ nhất (CH1) và monome của mảnh Fc chứa các miền ổn định chuỗi nặng thứ hai (CH2) và thứ ba (CH3), hoặc
 - b) miền ổn định chuỗi nhẹ của kháng thể ;
 trong đó miền ổn định chuỗi nặng của kháng thể thứ nhất và miền ổn định chuỗi nhẹ của kháng thể trong phức hợp heterodime có hoặc không có sự liên kết cộng hóa trị bằng liên kết cầu S-S tự nhiên, và

trong đó, nếu IL-15 hoặc IL-15R α được liên kết với miền ổn định chuỗi nhẹ của kháng thể, thì phần còn lại, được chọn từ IL-15R α hoặc IL-15, của phức hợp protein heterodime được liên kết với các miền ổn định chuỗi nặng của kháng thể.

Theo một số phương án, xytokin miễn dịch chứa miền ổn định chuỗi nặng của kháng thể thứ nhất và miền ổn định chuỗi nhẹ của kháng thể nằm trong phức hợp heterodime, có sự liên kết cộng hóa trị bằng liên kết cầu S-S tự nhiên.

Theo một số phương án, xytokin miễn dịch chứa miền ổn định chuỗi nặng của kháng thể thứ nhất và miền ổn định chuỗi nhẹ của kháng thể nằm trong phức hợp heterodime, không có sự liên kết cộng hóa trị bằng liên kết cầu S-S tự nhiên.

Theo một số phương án, xytokin miễn dịch chứa miền ổn định chuỗi nhẹ của kháng thể được chọn từ CK hoặc CL.

Theo một số phương án, xytokin miễn dịch chứa IL-15R α có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:9, hoặc biến thể IL-15R α của thể đột biến đã biết bất kỳ có hoạt tính sinh học tương tự.

Theo một số phương án, xytokin miễn dịch chứa IL-15 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:10, hoặc biến thể IL-15 của thể đột biến đã biết bất kỳ có hoạt tính sinh học tương tự.

Theo một số phương án, xytokin miễn dịch chứa IL-15R α được liên kết với miền ổn định chuỗi nhẹ của kháng thể.

Theo một số phương án, xytokin miễn dịch chứa IL-15R α được liên kết với miền ổn định chuỗi nhẹ của kháng thể có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:1 hoặc SEQ ID NO:19.

Theo một số phương án, xytokin miễn dịch chứa IL-15 được liên kết với miền ổn định chuỗi nhẹ của kháng thể.

Theo một số phương án, xytokin miễn dịch chứa IL-15 được liên kết với miền ổn định chuỗi nhẹ của kháng thể có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:3 hoặc SEQ ID NO:21.

Theo một số phương án, xytokin miễn dịch chứa miền ổn định chuỗi nặng thứ nhất (CH1) và monome của mảnh Fc chứa các miền ổn định chuỗi nặng thứ hai (CH2) và thứ ba (CH3) được liên kết bằng miền bản lề.

Theo một số phương án, xytokin miễn dịch chứa IL-15 hoặc IL-15R α được liên kết với các miền ổn định chuỗi nặng của kháng thể được sắp xếp theo thứ tự sau: CH1-miền bản

lê-CH₂-CH₃.

Theo một số phương án, xytokin miễn dịch chứa IL-15R α được liên kết với các miền ổn định chuỗi nặng của kháng thể.

Theo một số phương án, xytokin miễn dịch chứa IL-15R α được liên kết với các miền ổn định chuỗi nặng của kháng thể có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:4 hoặc SEQ ID NO:22.

Theo một số phương án, xytokin miễn dịch chứa IL-15 được liên kết với các miền ổn định chuỗi nặng của kháng thể.

Theo một số phương án, xytokin miễn dịch chứa IL-15 được liên kết với các miền ổn định chuỗi nặng của kháng thể có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:2 hoặc SEQ ID NO:20.

Theo một số phương án, xytokin miễn dịch chứa:

IL-15R α được liên kết với miền ổn định chuỗi nhẹ của kháng thể có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:1 hoặc SEQ ID NO:19, và

IL-15 được liên kết với các miền ổn định chuỗi nặng của kháng thể có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:2 hoặc SEQ ID NO:20.

Theo một số phương án, xytokin miễn dịch chứa:

IL-15R α được liên kết với các miền ổn định chuỗi nặng của kháng thể có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:4 hoặc SEQ ID NO:22, và

IL-15 được liên kết với miền ổn định chuỗi nhẹ của kháng thể có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:3 hoặc SEQ ID NO:21.

Theo một số phương án, xytokin miễn dịch chứa sự đột biến trong monome của mảnh Fc, gây ra sự thiếu hụt các đặc tính của ADCC, CDC, và/hoặc ADCP trong xytokin miễn dịch nêu trên.

Theo một số phương án, xytokin miễn dịch chứa mảnh Fc thuộc về IgG.

Theo một số phương án, xytokin miễn dịch chứa mảnh Fc được chọn từ nhóm bao gồm: IgG1, IgG2, hoặc IgG4 của người.

Theo một số phương án, xytokin miễn dịch chứa hai phức hợp protein heterodime IL-15/IL-15R α nêu trên.

Theo một số phương án, xytokin miễn dịch được sử dụng làm chất điều trị để điều trị bệnh ung thư hoặc bệnh tự miễn.

Theo một số phương án, xytokin miễn dịch được sử dụng làm chất điều trị để điều trị

bệnh ung thư.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến xytokin miễn dịch để kích thích sự hoạt hóa và/hoặc tăng sinh của các tế bào dương tính với IL-15R β /gama, xytokin này chứa phức hợp protein heterodime trên cơ sở IL-15/IL-15R α và kháng thể điều biến miễn dịch hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, ức chế đặc hiệu con đường PD-1,

trong đó phức hợp protein heterodime IL-15/IL-15R α chứa:

1) IL-15R α được liên kết với

a) miền ổn định chuỗi nhẹ của kháng thể, hoặc

b) các miền ổn định chuỗi nặng của kháng thể chứa miền ổn định chuỗi nặng thứ nhất (CH1) và monome của mảnh Fc chứa các miền ổn định chuỗi nặng thứ hai (CH2) và thứ ba (CH3);

2) IL-15 được liên kết với

a) các miền ổn định chuỗi nặng của kháng thể chứa miền ổn định chuỗi nặng thứ nhất (CH1) và monome của mảnh Fc chứa các miền ổn định chuỗi nặng thứ hai (CH2) và thứ ba (CH3), hoặc

b) miền ổn định chuỗi nhẹ của kháng thể ;

trong đó miền ổn định chuỗi nặng của kháng thể thứ nhất và miền ổn định chuỗi nhẹ của kháng thể trong phức hợp heterodime có hoặc không có sự liên kết cộng hóa trị bằng liên kết cầu S-S tự nhiên, và

trong đó, nếu IL-15 hoặc IL-15R α được liên kết với miền ổn định chuỗi nhẹ của kháng thể, thì phần còn lại, được chọn từ IL-15R α hoặc IL-15, của phức hợp protein heterodime được liên kết với các miền ổn định chuỗi nặng của kháng thể.

Theo một số phương án, xytokin miễn dịch chứa miền ổn định chuỗi nặng của kháng thể thứ nhất và miền ổn định chuỗi nhẹ của kháng thể nằm trong phức hợp heterodime, có sự liên kết cộng hóa trị bằng liên kết cầu S-S tự nhiên.

Theo một số phương án, xytokin miễn dịch chứa miền ổn định chuỗi nặng của kháng thể thứ nhất và miền ổn định chuỗi nhẹ của kháng thể nằm trong phức hợp heterodime, không có sự liên kết cộng hóa trị bằng liên kết cầu S-S tự nhiên.

Theo một số phương án, xytokin miễn dịch chứa miền ổn định chuỗi nhẹ của kháng thể được chọn từ CK hoặc CL.

Theo một số phương án, xytokin miễn dịch chứa IL-15R α có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:9, hoặc biến thể IL-15R α của thể đột biến đã biết bất kỳ có hoạt tính sinh

học tương tự.

Theo một số phương án, xytokin miễn dịch chứa IL-15 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:10, hoặc biến thể IL-15 của thể đột biến đã biết bất kỳ có hoạt tính sinh học tương tự.

Theo một số phương án, xytokin miễn dịch chứa IL-15 α được liên kết với miền ổn định chuỗi nhẹ của kháng thể.

Theo một số phương án, xytokin miễn dịch chứa IL-15 α được liên kết với miền ổn định chuỗi nhẹ của kháng thể có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:1 hoặc SEQ ID NO:19.

Theo một số phương án, xytokin miễn dịch chứa IL-15 được liên kết với miền ổn định chuỗi nhẹ của kháng thể.

Theo một số phương án, xytokin miễn dịch chứa IL-15 được liên kết với miền ổn định chuỗi nhẹ của kháng thể có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:3 hoặc SEQ ID NO:21.

Theo một số phương án, xytokin miễn dịch chứa miền ổn định chuỗi nặng thứ nhất (CH1) và monome của mảnh Fc chứa các miền ổn định chuỗi nặng thứ hai (CH2) và thứ ba (CH3) được liên kết bằng miền bản lề.

Theo một số phương án, xytokin miễn dịch chứa IL-15 hoặc IL-15 α được liên kết với các miền ổn định chuỗi nặng của kháng thể được sắp xếp theo thứ tự sau: CH1-miền bản lề-CH2-CH3.

Theo một số phương án, xytokin miễn dịch chứa IL-15 α được liên kết với các miền ổn định chuỗi nặng của kháng thể.

Theo một số phương án, xytokin miễn dịch chứa IL-15 α được liên kết với các miền ổn định chuỗi nặng của kháng thể có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:6 hoặc SEQ ID NO:24.

Theo một số phương án, xytokin miễn dịch chứa IL-15 được liên kết với các miền ổn định chuỗi nặng của kháng thể.

Theo một số phương án, xytokin miễn dịch chứa IL-15 được liên kết với các miền ổn định chuỗi nặng của kháng thể có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:5 hoặc SEQ ID NO:23.

Theo một số phương án, xytokin miễn dịch chứa kháng thể điều biến miễn dịch hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, ức chế đặc hiệu con đường PD-1, và là kháng thể gắn

kết đặc hiệu với PD-1.

Theo một số phương án, xytokin miễn dịch chứa kháng thể điều biến miễn dịch bao gồm:

- a) chuỗi nhẹ chứa miền biến đổi chuỗi nhẹ và miền ổn định chuỗi nhẹ;
- b) chuỗi nặng chứa miền biến đổi chuỗi nặng và các miền ổn định chuỗi nặng của kháng thể chứa miền ổn định chuỗi nặng thứ nhất (CH1) và monome của mảnh Fc chứa các miền ổn định chuỗi nặng thứ hai (CH2) và thứ ba (CH3).

Theo một số phương án, xytokin miễn dịch chứa miền biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm các vùng LCDR 1, 2, và 3 (các vùng siêu biến 1, 2, và 3), được thể hiện bằng các trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, và SEQ ID NO:16, tương ứng.

Theo một số phương án, xytokin miễn dịch chứa miền biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:18.

Theo một số phương án, xytokin miễn dịch chứa miền biến đổi chuỗi nặng chứa các vùng HCDR 1, 2, và 3 (các vùng siêu biến 1, 2, và 3), được thể hiện bằng các trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, và SEQ ID NO:13, tương ứng.

Theo một số phương án, xytokin miễn dịch chứa miền biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:17.

Theo một số phương án, xytokin miễn dịch chứa:

1) miền biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm các vùng LCDR 1, 2, và 3 (các vùng siêu biến 1, 2, và 3), được thể hiện bằng các trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, và SEQ ID NO:16, tương ứng.

2) miền biến đổi chuỗi nặng bao gồm các vùng HCDR 1, 2, và 3 (các vùng siêu biến 1, 2, và 3), được thể hiện bằng các trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, và SEQ ID NO:13, tương ứng.

Theo một số phương án, xytokin miễn dịch chứa:

1) miền biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:18.

2) miền biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:17.

Theo một số phương án, xytokin miễn dịch chứa kháng thể điều biến miễn dịch bao gồm chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:8.

Theo một số phương án, xytokin miễn dịch chứa kháng thể điều biến miễn dịch bao gồm chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:7.

Theo một số phương án, xytokin miễn dịch chứa kháng thể điều biến miễn dịch bao

gồm:

chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:7;

chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:8.

Theo một số phương án, xytokin miễn dịch chứa kháng thể điều biến miễn dịch hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, ức chế đặc hiệu con đường PD-1, là kháng thể gắn kết đặc hiệu với PD-L1.

Theo một số phương án, xytokin miễn dịch chứa:

a) phức hợp protein heterodime trên cơ sở IL-15/IL-15R α bao gồm:

IL-15R α được liên kết với miền ổn định chuỗi nhẹ của kháng thể có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:1 hoặc SEQ ID NO:19, và

IL-15 được liên kết với các miền ổn định chuỗi nặng của kháng thể có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:5 hoặc SEQ ID NO:23;

b) kháng thể điều biến miễn dịch bao gồm:

chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:7;

chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:8.

Theo một số phương án, xytokin miễn dịch chứa:

a) IL-15R α được liên kết với các miền ổn định chuỗi nặng của kháng thể có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:6 hoặc SEQ ID NO:24, và

IL-15 được liên kết với miền ổn định chuỗi nhẹ của kháng thể có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:3 hoặc SEQ ID NO:21;

b) điều biến miễn dịch kháng thể bao gồm:

chuỗi nặng chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:7;

chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:8.

Theo một số phương án, xytokin miễn dịch có sự đột biến trong các miền ổn định của kháng thể để tạo ra sự heterodime hóa của hai phần khác nhau, một phần trong đó chứa IL-15R α đã liên kết cộng hóa trị hoặc không cộng hóa trị được liên kết với các miền ổn định của kháng thể và IL-15 được liên kết với miền ổn định kháng thể, và phần còn lại chứa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể đã liên kết cộng hóa trị hoặc không cộng hóa trị.

Theo một số phương án, xytokin miễn dịch chứa:

monome Fc thứ nhất và monome Fc thứ hai, được chọn từ nhóm sau đây: monome Fc thứ nhất Fc được cải biến bằng chỗ phình, và monome Fc thứ hai Fc được cải biến bằng chỗ lõm, hoặc khi monome Fc thứ hai Fc được cải biến bằng chỗ phình, và monome Fc thứ

nhất Fc được cải biến bằng chỗ lõm.

Theo một số phương án, xytokin miễn dịch chứa monome Fc thứ nhất có sự thay thế axit amin S354C/T366W, và a monome Fc thứ hai có sự thay thế axit amin Y349C/T366S/L368A/Y407V.

Theo một số phương án, xytokin miễn dịch chứa monome Fc thứ nhất có sự thay thế axit amin Y349C/T366S/L368A/Y407, và monome Fc thứ hai có sự thay thế axit amin S354C/T366W.

Theo một số phương án, xytokin miễn dịch chứa mảnh Fc thuộc về IgG.

Theo một số phương án, xytokin miễn dịch chứa mảnh Fc, trong đó isotyp của mảnh Fc được chọn từ nhóm bao gồm: IgG1, IgG2, hoặc IgG4 của người.

Theo một số phương án, xytokin miễn dịch chứa sự đột biến trong monome của mảnh Fc, gây ra sự thiếu hụt các đặc tính của ADCC, CDC, và/hoặc ADCP trong xytokin miễn dịch nêu trên.

Theo một số phương án, xytokin miễn dịch được sử dụng để điều trị bệnh ung thư hoặc bệnh tự miễn.

Theo một số phương án, xytokin miễn dịch được sử dụng để điều trị bệnh ung thư.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến axit nucleic được phân lập mã hóa xytokin bất kỳ trong số các xytokin miễn dịch nêu trên.

Theo một số phương án, axit nucleic là ADN.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến vector biểu hiện chứa axit nucleic nêu trên.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến phương pháp tạo ra tế bào chủ để tạo ra xytokin miễn dịch nêu trên, phương pháp này bao gồm bước biến nạp tế bào này với vector trên đây.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến tế bào chủ để tạo ra xytokin miễn dịch trên đây, tế bào này chứa axit nucleic trên đây.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến phương pháp tạo ra dược chất chứa xytokin miễn dịch trên đây, phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ trên đây trong môi trường nuôi cấy trong các điều kiện đủ để tạo ra xytokin miễn dịch nêu trên, nếu cần, sau đó phân lập và tinh chế xytokin miễn dịch tạo thành.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến dược phẩm để kích thích sự hoạt hóa và/hoặc tăng sinh của các tế bào dương tính với IL-15Rbeta/gama, dược phẩm này chứa xytokin miễn dịch trên đây với lượng có hiệu quả điều trị, kết hợp với một hoặc nhiều tá

được được dùng.

Theo một số phương án, được phẩm được sử dụng để điều trị bệnh ung thư hoặc bệnh tự miễn.

Theo một số phương án, được phẩm được sử dụng để điều trị bệnh ung thư.

Theo một số phương án, được phẩm được sử dụng để điều trị bệnh ung thư được chọn từ nhóm bao gồm: HNSCC (bệnh caxinom tế bào có vảy vùng đầu và cổ), bệnh ung thư cổ tử cung, bệnh ung thư nguyên phát chưa rõ nguyên nhân, u nguyên bào xộp, bệnh ung thư thực quản, bệnh ung thư bàng quang, TNBC (bệnh ung thư vú bộ ba âm tính), CRC (bệnh ung thư kết-trực tràng), bệnh caxinom tế bào gan, u melanin, NSCLC (bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ), bệnh ung thư thận, bệnh ung thư buồng trứng, MSI CRC (bệnh ung thư kết-trực tràng có tính không ổn định vi vệ tinh), bệnh bạch cầu (bệnh bạch cầu cấp tính hoặc bệnh bạch cầu nguyên thủy bào), u lymphô, bệnh đa u tủy, u melanin, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư kết-trực tràng, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh ung thư bàng quang, bệnh sacôm, bệnh caxinom tế bào gan, u nguyên bào xộp, u lymphô Hodgkin, bệnh bạch cầu nguyên bào lymphô cấp tính tế bào T và B, bệnh ung thư phổi tế bào nhỏ, bệnh bạch cầu nguyên thủy bào cấp tính, u lymphô tế bào B không Hodgkin dai dẳng, u lymphô thể nang, u lymphô tế bào B vùng rìa, u lymphô tế bào B lớn lan tỏa, bệnh caxinom tế bào có vảy vùng đầu và cổ, bệnh ung thư tụy, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh bạch cầu nguyên thủy bào cấp tính và hội chứng loạn sản tủy nguy cơ cao.

Theo một khía cạnh, sáng chế mô tả phương pháp điều trị bệnh ung thư, phương pháp này bao gồm bước cho đối tượng cần điều trị sử dụng xytokin miễn dịch nêu trên hoặc được phẩm nêu trên, với lượng có hiệu quả điều trị.

Theo một số phương án của phương pháp điều trị, bệnh ung thư được chọn từ nhóm bao gồm: HNSCC (bệnh caxinom tế bào có vảy vùng đầu và cổ), bệnh ung thư cổ tử cung, bệnh ung thư nguyên phát chưa rõ nguyên nhân, u nguyên bào xộp, bệnh ung thư thực quản, bệnh ung thư bàng quang, TNBC (bệnh ung thư vú bộ ba âm tính), CRC (bệnh ung thư kết-trực tràng), bệnh caxinom tế bào gan, u melanin, NSCLC (bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ), bệnh ung thư thận, bệnh ung thư buồng trứng, MSI CRC (bệnh ung thư kết-trực tràng có tính không ổn định vi vệ tinh), bệnh bạch cầu (bệnh bạch cầu cấp tính hoặc bệnh bạch cầu nguyên thủy bào), u lymphô, bệnh đa u tủy, u melanin, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư kết-trực tràng, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh ung thư bàng quang, bệnh sacôm, bệnh caxinom tế bào gan, u nguyên bào xộp, u lymphô Hodgkin, bệnh bạch cầu nguyên bào

lymphô cấp tính tế bào T và B, bệnh ung thư phổi tế bào nhỏ, bệnh bạch cầu nguyên thủy bào cấp tính, u lymphô tế bào B không Hodgkin dai dẳng, u lymphô thể nang, u lymphô tế bào B vùng rìa, u lymphô tế bào B lớn lan tỏa, bệnh caxinom tế bào có vảy vùng đầu và cổ, bệnh ung thư tụy, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh bạch cầu nguyên thủy bào cấp tính và hội chứng loạn sản tủy nguy cơ cao.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến phương pháp hoạt hóa hoạt tính sinh học của quần thể tế bào T hoặc quần thể tế bào NK ở đối tượng cần có sự hoạt hóa này, phương pháp này bao gồm bước cho đối tượng sử dụng lượng hữu hiệu của xytokin miễn dịch trên đây hoặc được phẩm trên đây.

Theo một khía cạnh, sáng chế mô tả việc sử dụng xytokin miễn dịch nêu trên hoặc được phẩm nêu trên để điều trị ở đối tượng cần điều trị bệnh ung thư.

Trong một số ứng dụng, bệnh ung thư được chọn từ nhóm bao gồm: HNSCC (bệnh caxinom tế bào có vảy vùng đầu và cổ), bệnh ung thư cổ tử cung, bệnh ung thư nguyên phát chưa rõ nguyên nhân, u nguyên bào xộp, bệnh ung thư thực quản, bệnh ung thư bàng quang, TNBC (bệnh ung thư vú bộ ba âm tính), CRC (bệnh ung thư kết-trực tràng), bệnh caxinom tế bào gan, u melanin, NSCLC (bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ), bệnh ung thư thận, bệnh ung thư buồng trứng, MSI CRC (bệnh ung thư kết-trực tràng có tính không ổn định vi vệ tinh), bệnh bạch cầu (bệnh bạch cầu cấp tính hoặc bệnh bạch cầu nguyên thủy bào), u lymphô, bệnh đa u tủy, u melanin, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư kết-trực tràng, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh ung thư bàng quang, bệnh sacôm, bệnh caxinom tế bào gan, u nguyên bào xộp, u lymphô Hodgkin, bệnh bạch cầu nguyên bào lymphô cấp tính tế bào T và B, bệnh ung thư phổi tế bào nhỏ, bệnh bạch cầu nguyên thủy bào cấp tính, u lymphô tế bào B không Hodgkin dai dẳng, u lymphô thể nang, u lymphô tế bào B vùng rìa, u lymphô tế bào B lớn lan tỏa, bệnh caxinom tế bào có vảy vùng đầu và cổ, bệnh ung thư tụy, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh bạch cầu nguyên thủy bào cấp tính và hội chứng loạn sản tủy nguy cơ cao.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 thể hiện định dạng của xytokin miễn dịch chứa phức hợp protein heterodime IL-15/IL-15R α (CK_IL15R α _Hc_IL15CH1FcLALA).

Fig.2 thể hiện định dạng của xytokin miễn dịch chứa phức hợp protein heterodime IL-15/IL-15R α (CK_IL15_Hc_IL15R α CH1FcLALA).

Fig.3 thể hiện định dạng của xytokin miễn dịch chứa phức hợp protein heterodime

IL-15/IL-15R α và kháng thể điều biến miễn dịch kháng thể ức chế đặc hiệu con đường PD-1 (Fab- CK_IL15_Hc_IL15R α CH1Fcchỗ phìnhLALA).

Thuật ngữ "chỗ phình" cần được hiểu với nghĩa là các đột biến tạo ra "chỗ phình vào chỗ lõm: cấu trúc giữa biến thể Fc thứ nhất và biến thể Fc thứ hai trong miền CH3.

Fig.4 thể hiện định dạng của xytokin miễn dịch chứa phức hợp protein heterodime IL-15/IL-15R α và kháng thể điều biến miễn dịch ức chế đặc hiệu con đường PD-1 (Fab-CK_IL15R α _Hc_IL15CH1Fcchỗ phìnhLALA).

Thuật ngữ "chỗ phình" cần được hiểu với nghĩa là các đột biến tạo ra "chỗ phình vào chỗ lõm: cấu trúc giữa biến thể Fc thứ nhất và biến thể Fc thứ hai trong miền CH3.

Fig.5 thể hiện vector pEE-IL15R α -CK.

AmpR là gen beta-lactamaza tạo ra sự kháng lại ampicillin,
 Nguồn gốc pUC là nguồn gốc sao chép pUC ở vi khuẩn,
 Gen khởi đầu CMV là gen khởi đầu của gen sớm của virus cự bào,
 đoạn dẫn đầu là trình tự đoạn dẫn đầu,
 IL15R α là gen mã hóa tiểu đơn vị alpha của thụ thể intolokin 15,
 CK là gen mã hóa miền ổn định chuỗi nhẹ,
 Poly A là trình tự tín hiệu polyadenyl hóa, để làm gia tăng tính ổn định của mARN,
 OriP là nguồn gốc sao chép ở vi khuẩn, hoặc
 số lượng bản sao cao ColE1/pMB1/pBR322/nguồn gốc sao chép pUC ở các tế bào vi khuẩn.

Fig.6 thể hiện vector pEE-IL15-CH1-Fc-LALA.

AmpR là gen beta-lactamaza tạo ra sự kháng lại ampicillin,
 Nguồn gốc pUC là nguồn gốc sao chép pUC ở vi khuẩn,
 Gen khởi đầu CMV là gen khởi đầu của gen sớm của virus cự bào,
 đoạn dẫn đầu là trình tự đoạn dẫn đầu,
 IL15 là gen mã hóa intolokin 15,
 CH1 là gen mã hóa miền ổn định chuỗi nặng thứ nhất,
 Fc-LALA là gen mã hóa mảnh Fc mang sự đột biến LALA (sự đột biến L234A và L235A trong miền ổn định CH2 của mảnh Fc),
 Poly A là trình tự tín hiệu polyadenyl hóa, để làm gia tăng mRNA tính ổn định,
 OriP là nguồn gốc sao chép ở vi khuẩn, hoặc
 số lượng bản sao cao ColE1/pMB1/pBR322/nguồn gốc sao chép pUC ở các tế bào vi

khuẩn.

Fig.7 thể hiện vector pEE-BCD100-02-VL-CK.

AmpR là gen beta-lactamaza tạo ra sự kháng lại ampicillin,

Nguồn gốc pUC là nguồn gốc sao chép pUC ở vi khuẩn,

Gen khởi đầu CMV là gen khởi đầu của gen sớm của virus cự bào,

đoạn dẫn đầu là trình tự đoạn dẫn đầu,

aPD1-VL là gen mã hóa chuỗi nhẹ của kháng thể gắn kết đặc hiệu với PD1,

CK là gen mã hóa miền ổn định chuỗi nhẹ,

Poly A là trình tự tín hiệu polyadenyl hóa, để làm gia tăng mRNA tính ổn định,

OriP là nguồn gốc sao chép ở vi khuẩn, hoặc

số lượng bản sao cao ColE1/pMB1/pBR322/nguồn gốc sao chép pUC ở các tế bào vi khuẩn.

Fig.8 thể hiện vector pEE-BCD100-02-VH-CH1-Fc-chỗ lõm-LALA.

AmpR là gen beta-lactamaza tạo ra sự kháng lại ampicillin,

Nguồn gốc pUC là nguồn gốc sao chép pUC ở vi khuẩn,

Gen khởi đầu là gen khởi đầu của gen sớm của virus cự bào,

đoạn dẫn đầu là trình tự đoạn dẫn đầu,

aPD1-VH là gen mã hóa miền biến đổi chuỗi nặng của kháng thể gắn kết đặc hiệu với PD1,

CH1 là gen mã hóa miền ổn định chuỗi nặng thứ nhất,

Fc-chỗ lõm-LALA là gen mã hóa mảnh Fc mang sự đột biến để tạo thành sự đột biến "chỗ lõm" và sự đột biến LALA (sự đột biến L234A và L235A trong miền ổn định CH2 của mảnh Fc),

STOP là codon kết thúc ,

OriP là nguồn gốc sao chép ở vi khuẩn, hoặc

số lượng bản sao cao ColE1/pMB1/pBR322/nguồn gốc sao chép pUC ở các tế bào vi khuẩn.

Fig.9 là vector pEE-IL15-CH1-Fc-chỗ phình-LALA.

AmpR là gen beta-lactamaza tạo ra sự kháng lại ampicillin,

Nguồn gốc pUC là nguồn gốc sao chép pUC ở vi khuẩn,

Gen khởi đầu CMV là gen khởi đầu của gen sớm của virus cự bào,

đoạn dẫn đầu là trình tự đoạn dẫn đầu,

IL15 là gen mã hóa intolokin 15,
 CH1 là gen mã hóa miền ổn định chuỗi nặng thứ nhất,
 Fc-chỗ phình-LALA là gen mã hóa mảnh Fc mang sự đột biến để tạo thành sự đột biến "chỗ phình" và sự đột biến LALA (L234A và L235A sự đột biến trong miền ổn định CH2 của mảnh Fc),

STOP là codon kết thúc ,
 OriP là nguồn gốc sao chép ở vi khuẩn, hoặc
 số lượng bản sao cao ColE1/pMB1/pBR322/nguồn gốc sao chép pUC ở các tế bào vi khuẩn.

Fig.10 A thể hiện kết quả của phương pháp điện di trên gel SDS cùng với beta-mercaptoethanol

1. Kháng thể đối chứng 5 μ l
2. Dầu ấn không được nhuộm khi lên men
3. –
4. Môi trường sinh trưởng với CK_IL15R α _Hc_IL15CH1FcLALA trước khi tinh chế 10 μ l
5. Môi trường sinh trưởng với CK_IL15R α _Hc_IL15CH1FcLALA sau khi tinh chế 10 μ l
6. CK_IL15R α _Hc_IL15CH1FcLALA đã tinh chế 10 μ l
7. -
8. Môi trường sinh trưởng với CK_IL15_Hc_IL15R α CH1FcLALA trước khi tinh chế 10 μ l
9. Môi trường sinh trưởng với CK_IL15_Hc_IL15R α CH1FcLALA sau khi tinh chế 10 μ l
10. CK_IL15_Hc_IL15R α CH1FcLALA đã tinh chế 10 μ l

Fig.10B thể hiện kết quả của phương pháp điện di trên gel SDS mà không có beta-mercaptoethanol

1. CK_IL15R α _Hc_IL15CH1FcLALA đã tinh chế 10 μ l
2. CK_IL15_Hc_IL15R α CH1FcLALA đã tinh chế 10 μ l
3. Dầu ấn không được nhuộm khi lên men
4. Kháng thể đối chứng 5 μ l

Fig.11 thể hiện kết quả xác định hoạt tính tăng sinh. Dòng tế bào NK-92 được sử

dụng trong thử nghiệm này. Thử nghiệm được tiến hành trong đĩa nuôi cấy có 96 lỗ. Hỗn dịch chứa các tế bào NK-92, kháng thể thử nghiệm ở nồng độ như được thể hiện trên đồ thị. Tất cả các thành phần của hỗn dịch được điều chế trong môi trường RPMI-1640 được bổ sung huyết thanh bào thai bò và glutamin. Sau khi tất cả các thành phần được thêm vào, các đĩa được ủ ở nhiệt độ 37°C, CO₂ 5%. Sau đó, thuốc nhuộm xanh Alamar được cho thêm vào các lỗ. Sau khi ủ, cường độ phát huỳnh quang trong các lỗ được xác định.

Fig.12 thể hiện kết quả xác định hoạt tính tăng sinh. Thử nghiệm này sử dụng các tế bào giết tự nhiên được phân lập từ PBMC của người cho khỏe mạnh bằng cách chọn lọc âm tính. Thử nghiệm được tiến hành trong đĩa nuôi cấy có 96 lỗ. Hỗn dịch chứa các tế bào giết tự nhiên, kháng thể thử nghiệm ở nồng độ như được thể hiện trên đồ thị. Tất cả các thành phần của hỗn dịch được điều chế trong môi trường nuôi cấy được bổ sung huyết thanh của người tự thân. Sau khi tất cả các thành phần được thêm vào, các đĩa được ủ ở nhiệt độ 37°C, CO₂ 5%. Sau đó, thuốc nhuộm xanh Alamar được cho thêm vào các lỗ. Sau khi ủ, cường độ phát huỳnh quang trong các lỗ được xác định.

Fig.13 thể hiện kết quả xác định hoạt tính đặc hiệu với aPD.1 Để thử nghiệm, các tác giả sáng chế sử dụng dòng tế bào Jurkat NFAT-FLuc PD-1 được tạo ra trên cơ sở dòng tế bào Jurkat này và biểu hiện ổn định PD-1 trên bề mặt của nó và chứa gen mã hóa luxiferaza của đom đóm dưới sự kiểm soát của gen khởi đầu NFAT; và dòng tế bào Raji PDL1 được tạo ra trên cơ sở dòng tế bào Raji và biểu hiện ổn định PDL1 trên bề mặt của nó. Thử nghiệm được tiến hành trong đĩa nuôi cấy có 96 lỗ. Hỗn dịch trong mỗi lỗ chứa các tế bào Jurkat NFAT-FLuc PD-1, các tế bào Raji PDL1, các tế bào aCD3/aTAA1 ở nồng độ 1 ng/ml, và kháng thể thử nghiệm ở nồng độ như được thể hiện trên đồ thị. Sau khi tất cả các thành phần được thêm vào, các đĩa được ủ ở nhiệt độ 37°C, CO₂ 5%, và sau đó, cường độ luxiferaza trong các lỗ được xác định bằng cách sử dụng kit thử nghiệm sự phát sáng.

Fig.14 thể hiện kết quả xác định hoạt tính đặc hiệu của các kháng thể kháng PDL1/IL15SA đối với dòng tế bào gen thông báo.

Fig.15 thể hiện kết quả xác định hiệu quả của các tế bào giết tự nhiên đối với ADCC. Thử nghiệm này sử dụng các tế bào giết tự nhiên được phân lập từ PBMC của người cho khỏe mạnh bằng cách chọn lọc âm tính. Thử nghiệm được tiến hành trong đĩa nuôi cấy có 96 lỗ. Hỗn dịch chứa các tế bào giết tự nhiên và tế bào Raji, kháng thể tác động Rituximab, và kháng thể thử nghiệm ở nồng độ như được thể hiện trên đồ thị. Tất cả các thành phần của hỗn dịch được điều chế trong môi trường nuôi cấy được bổ sung huyết thanh bào thai bò và

glutamin. Sau khi tất cả các thành phần được thêm vào, các đĩa được ủ ở nhiệt độ 37°C, CO₂ 5%. Sau đó, dịch nuôi cấy được thu gom, và hàm lượng lactat dehydrogenaza được xác định bằng cách sử dụng kit thử nghiệm LDH.

Fig.16 thể hiện kết quả xác định hoạt tính đặc hiệu của xytokin miễn dịch liên quan đến việc làm gia tăng khả năng ADCC của rituximab đối với dòng tế bào thông báo TAA.

Fig.17 thể hiện kết quả của nghiên cứu về tính gây độc tế bào đối với các biến thể của xytokin miễn dịch chứa phức hợp protein heterodime IL-15/IL-15R α (IL15SA), đối với các tế bào NK.

Các kết quả chứng minh hiệu quả gây độc tế bào không đáng kể của các sản phẩm thử nghiệm, nghĩa là làm giảm không quá 10% về số lượng tế bào có khả năng phản ứng miễn dịch so với đối chứng âm tính AB (không có mặt kháng thể ngoại sinh bất kỳ).

Fig.18 thể hiện kết quả nghiên cứu tính gây độc tế bào của các biến thể IL15SA đối với các tế bào B.

Các kết quả chứng minh hiệu quả gây độc tế bào không đáng kể của các sản phẩm thử nghiệm, nghĩa là làm giảm không quá 10% về số lượng tế bào có khả năng phản ứng miễn dịch so với đối chứng âm tính AB (không có mặt kháng thể ngoại sinh bất kỳ).

Fig.19 thể hiện kết quả nghiên cứu tính gây độc tế bào của các biến thể IL15SA đối với các tế bào CD3+.

Các kết quả chứng minh hiệu quả gây độc tế bào không đáng kể của các sản phẩm thử nghiệm, nghĩa là làm giảm không quá 10% về số lượng tế bào có khả năng phản ứng miễn dịch so với đối chứng âm tính AB (không có mặt kháng thể ngoại sinh bất kỳ).

Fig.20 thể hiện kết quả nghiên cứu tính gây độc tế bào của các biến thể IL15SA đối với các tế bào CD4+.

Các kết quả chứng minh hiệu quả gây độc tế bào không đáng kể của các sản phẩm thử nghiệm, nghĩa là làm giảm không quá 10% về số lượng tế bào có khả năng phản ứng miễn dịch so với đối chứng âm tính AB (không có mặt kháng thể ngoại sinh bất kỳ).

Fig.21 thể hiện kết quả nghiên cứu tính gây độc tế bào của các biến thể IL15SA đối với các tế bào CD8+.

Các kết quả chứng minh hiệu quả gây độc tế bào không đáng kể của các sản phẩm thử nghiệm, nghĩa là làm giảm không quá 10% về số lượng tế bào có khả năng phản ứng miễn dịch so với đối chứng âm tính AB (không có mặt kháng thể ngoại sinh bất kỳ).

Fig.22 thể hiện kết quả của phổ sắc ký. Phổ sắc ký này chứng minh độ đồng nhất cao

(hàm lượng chất kết tụ trong dung dịch không quá 5%) của xytokin miễn dịch chứa phức hợp protein heterodime trên cơ sở IL-15/IL-15R α (chất siêu chủ vận IL15).

Fig.23 thể hiện sơ đồ thử nghiệm để xác định hoạt tính kháng u của các sản phẩm xytokin miễn dịch, xytokin miễn dịch này chứa phức hợp protein heterodime trên cơ sở IL-15/IL-15R α (BCD-225) trong mô hình khối u của chuột *in vivo*.

Fig.24 thể hiện kết quả của thử nghiệm xác định hoạt tính kháng u của các biến thể là sản phẩm xytokin miễn dịch, xytokin miễn dịch này chứa phức hợp protein heterodime trên cơ sở IL-15/IL-15R α (BCD-225) (đồ thị) trong mô hình khối u của chuột *in vivo*.

Fig.25 thể hiện kết quả của thử nghiệm xác định hoạt tính kháng u của các biến thể là sản phẩm xytokin miễn dịch, xytokin miễn dịch này chứa phức hợp protein heterodime trên cơ sở IL-15/IL-15R α (BCD-225) (biểu đồ) trong mô hình khối u của chuột *in vivo*.

Mô tả chi tiết sáng chế

Các định nghĩa và phương pháp chung

Nếu không được định nghĩa theo cách khác, tất cả các thuật ngữ khoa học và kỹ thuật được sử dụng ở đây có nghĩa giống như thường được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này.

Ngoài ra, trừ khi có yêu cầu theo cách khác do ngữ cảnh, các thuật ngữ số ít sẽ bao gồm cả số nhiều và các thuật ngữ số nhiều sẽ bao gồm cả số ít. Thông thường, sự phân loại và phương pháp nuôi cấy tế bào, sinh học phân tử, miễn dịch học, vi sinh, di truyền học, hóa học phân tích, hoặc hóa hữu cơ tổng hợp, y học và hóa dược, cũng như kỹ thuật lai và hóa học protein và axit nucleic được mô tả ở đây là đã được biết rõ và sử dụng rộng rãi bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Các phản ứng enzym và phương pháp tinh chế được thực hiện theo các hướng dẫn của nhà sản xuất, như thường được tiến hành trong lĩnh vực này, hoặc như được mô tả ở đây.

Trừ khi được chỉ rõ theo cách khác, thuật ngữ "có hoạt tính về mặt sinh học" và "hoạt tính sinh học" và "đặc tính sinh học" đối với polypeptit của sáng chế có nghĩa là có khả năng gắn kết với phân tử sinh học.

Thuật ngữ "protein tái tổ hợp" có nghĩa là protein (polypeptit) được biểu hiện trong tế bào hoặc dòng tế bào chứa các trình tự nucleotit mã hóa protein nêu trên, trong đó (các) trình tự nucleotit nêu trên không kết hợp với tế bào trong tự nhiên.

Thuật ngữ "kháng thể đặc hiệu kép" để chỉ kháng thể có có (các) gắn kết kháng

nguyên có khả năng gắn kết đặc hiệu với hai epitop khác nhau trên một phân tử sinh học hoặc có khả năng gắn kết đặc hiệu với các epitop trên hai phân tử sinh học khác nhau. Kháng thể đặc hiệu kép còn được gọi ở đây là có "tính đặc hiệu đôi" hoặc là kháng thể "có tính đặc hiệu đôi".

Thuật ngữ "kháng thể đơn dòng" hoặc "mAb" để chỉ kháng thể được tổng hợp và phân lập bởi quần thể dòng vô tính riêng lẻ của các tế bào. Quần thể dòng vô tính có thể là quần thể dòng vô tính của tế bào bất tử. Theo một số phương án, các tế bào bất tử trong quần thể dòng vô tính là các tế bào lai -thể lai - thường được tạo ra bằng cách dung hợp các tế bào lymphô B riêng biệt từ các động vật được gây miễn dịch bằng các tế bào riêng biệt từ khối u dạng lymphô. Thể lai là loại tế bào được tạo cấu trúc và không tồn tại trong tự nhiên.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "Ka" để chỉ tốc độ kết hợp của sự tương tác kháng thể-kháng nguyên cụ thể.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "Kd" để chỉ tốc độ phân ly của sự tương tác kháng thể-kháng nguyên cụ thể.

Thuật ngữ "ái lực gắn kết" thường để chỉ độ bền của tổng các tương tác không cộng hóa trị giữa một vị trí gắn kết của một phân tử (ví dụ, kháng thể) và đối tác gắn kết của nó (ví dụ, kháng nguyên). Trừ khi được chỉ rõ theo cách khác, "ái lực gắn kết" để chỉ ái lực gắn kết nội tại (vốn có, thực) thể hiện sự tương tác theo tỷ lệ 1:1 giữa các thành viên của cặp gắn kết (ví dụ, kháng thể và kháng nguyên). Ái lực của phân tử X đối với đối tác gắn kết Y của nó có thể thường được thể hiện bằng hằng số phân ly (Kd). Giá trị Kd được ưu tiên là khoảng 200nM, 150nM, 100nM, 60nM, 50nM, 40nM, 30nM, 20nM, 10nM, 8nM, 6nM, 4nM, 2nM, 1nM, hoặc nhỏ hơn. Ái lực có thể được xác định bằng các phương pháp thông thường đã biết trong lĩnh vực này, bao gồm cả các phương pháp được mô tả ở đây. Nhiều phương pháp xác định ái lực gắn kết là đã biết trong lĩnh vực này, phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp này có thể được sử dụng cho mục đích của sáng chế.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "nhóm liên kết peptit" được dự định để chỉ peptit bất kỳ có khả năng kết hợp các miền có độ dài phụ thuộc vào các miền mà nó gắn kết với nhau, và chứa trình tự axit amin bất kỳ. Tốt hơn nếu nhóm liên kết peptit có độ dài lớn hơn 5 axit amin và gồm tập hợp bất kỳ của các axit amin được chọn từ G, A, S, P, E, T, D, K.

Thuật ngữ "*in vitro*" để chỉ thực thể sinh học, quy trình sinh học, hoặc phản ứng sinh học bên ngoài cơ thể trong các điều kiện nhân tạo. tế bào được phát triển *in vitro* cần

được hiểu là tế bào được phát triển trong môi trường bên ngoài cơ thể, ví dụ, trong ống thử nghiệm, lọ nuôi cấy, hoặc đĩa vi chuẩn.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, các từ “chứa”, “có”, “bao gồm” hoặc các phương án như “có chứa”, “gồm có”, “có”, “việc có”, “bao gồm cả” hoặc “kể cả”, và tất cả các phương án ngữ pháp của chúng sẽ được hiểu là bao gồm cả các số nguyên hoặc nhóm các số nguyên đã nêu mà không loại trừ số nguyên hoặc nhóm các số nguyên khác bất kỳ.

Mô tả chi tiết sáng chế

Xytokin miễn dịch

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến xytokin miễn dịch để kích thích sự hoạt hóa và/hoặc tăng sinh của các tế bào dương tính với IL-15R β /gamma, xytokin chứa phức hợp protein heterodime trên cơ sở IL-15/IL-15R α bao gồm:

1) IL-15R α được liên kết với

a) miền ổn định chuỗi nhẹ của kháng thể, hoặc

b) các miền ổn định chuỗi nặng của kháng thể bao gồm miền ổn định chuỗi nặng thứ nhất (CH1) và monome của mảnh Fc chứa các miền ổn định chuỗi nặng thứ hai (CH2) và thứ ba (CH3);

2) IL-15 được liên kết với

a) các miền ổn định chuỗi nặng của kháng thể bao gồm miền ổn định chuỗi nặng thứ nhất (CH1) và monome của mảnh Fc chứa các miền ổn định chuỗi nặng thứ hai (CH2) và thứ ba (CH3), hoặc

b) miền ổn định chuỗi nhẹ của kháng thể ;

trong đó miền ổn định chuỗi nặng của kháng thể thứ nhất và miền ổn định chuỗi nhẹ của kháng thể trong phức hợp heterodime có hoặc không có sự liên kết cộng hóa trị bằng liên kết cầu S-S tự nhiên, và

trong đó, nếu IL-15 hoặc IL-15R α được liên kết với miền ổn định chuỗi nhẹ của kháng thể, thì phần còn lại, được chọn từ IL-15R α hoặc IL-15, của phức hợp protein heterodime được liên kết với các miền ổn định chuỗi nặng của kháng thể.

Định dạng của xytokin miễn dịch trên đây được thể hiện trên Fig.1 và Fig.2.

Thuật ngữ “xytokin miễn dịch” có nghĩa là phân tử chứa kháng thể hoặc các mảnh của nó được liên kết theo cách trực tiếp hoặc gián tiếp bằng cách liên kết cộng hóa trị với xytokin hoặc các dẫn xuất của nó. Kháng thể nêu trên và xytokin nêu trên có thể được liên

kết bằng nhóm liên kết peptit.

Xytokin miễn dịch của sáng chế được dự định để chỉ xytokin miễn dịch được phân lập.

Thuật ngữ "được phân lập" được dùng để mô tả các xytokin miễn dịch khác nhau trong bản mô tả này có nghĩa là xytokin miễn dịch đã được xác định và tách ra tái tạo từ tế bào hoặc môi trường nuôi cấy tế bào, mà trong đó xytokin miễn dịch được biểu hiện. Các tạp chất (các thành phần không mong muốn) từ môi trường tự nhiên của nó là các chất sẽ cản trở các ứng dụng để chẩn đoán hoặc điều trị của polypeptit, và có thể bao gồm các enzym, hormon, và các chất tan là protein hoặc không phải protein khác. Theo các phương án được ưu tiên, xytokin miễn dịch được tinh chế (1) đến mức độ đủ để thu được ít nhất 15 gốc của trình tự axit amin bên trong hoặc ở đầu tận cùng N bằng cách sử dụng thiết bị xác định trình tự dạng chén quay (thiết bị xác định trình tự Edman), hoặc (2) đến độ đồng nhất bằng phương pháp SDS-PAGE rong điều kiện khử hoặc không khử bằng cách sử dụng thuốc nhuộm xanh Coomassie Brilliant, hoặc tốt hơn là thuốc nhuộm bạc. Xytokin miễn dịch được phân lập bao gồm xytokin miễn dịch tại chỗ trong các tế bào tái tổ hợp do ít nhất một thành phần của môi trường tự nhiên của polypeptit sẽ không có mặt. Polypeptit được phân lập thường được tạo ra bằng ít nhất một bước tinh chế.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "phức hợp protein heterodime" để chỉ protein được tạo ra từ sự kết hợp của IL-15 và IL-15R α .

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "IL-15" hoặc "IL-15 peptit" hoặc "intolokin-15" có thể là IL-15 (intolokin-15) bất kỳ hoặc thể đột biến của nó, như IL-15 của động vật có vú hoặc IL-15 không phải của động vật có vú là người hoặc không phải người. Các động vật có vú không phải người làm ví dụ bao gồm các động vật có vú như lợn, thỏ, khỉ, hắc tinh tinh, chuột, và động vật tương tự; và các động vật không phải động vật có vú bao gồm gà và động vật tương tự. Tốt hơn nếu phân tử trưởng thành intolokin-15 của người được tìm thấy trong cơ sở dữ liệu UniProtKB, Mã số truy cập P40933, 49-162aa. Thuật ngữ "biến thể IL-15" để chỉ phân tử của biến thể có ái lực tăng hoặc giảm với thụ thể của nó, hoặc hoạt tính tăng hoặc giảm để kích thích các tế bào T hoặc tế bào NK, do một hoặc nhiều sự thay thế, bổ sung hoặc làm khuyết đoạn axit amin.

Thuật ngữ "IL-15R α " để chỉ tiểu đơn vị alpha (α) của thụ thể intolokin 15, và, theo sáng chế, có thể là hợp chất IL-15R α bất kỳ hoặc mảnh chức năng của nó, như IL-15R α của người hoặc IL-15R α của động vật có vú không phải người hoặc IL-15R α của động vật có vú

không phải người. Các động vật có vú không phải người làm ví dụ bao gồm các động vật có vú như lợn, thỏ, khỉ, hắc tinh tinh, chuột, và động vật tương tự; và các động vật không phải các động vật có vú bao gồm gà và động vật tương tự. Phân tử IL-15R α được ưu tiên được tìm thấy trong cơ sở dữ liệu UniProtKB, mã số truy cập Q13261 (<https://www.uniprot.org/uniprot/Q13261>).

Vùng có thể kết tinh của mảnh ("vùng Fc, Fc") của globulin miễn dịch là vùng "đuôi" của phân tử globulin miễn dịch tương tác với thụ thể Fc của bề mặt tế bào, cũng như một số protein của hệ hỗ trợ. Đặc tính này cho phép các kháng thể hoạt hóa hệ miễn dịch. Trong các isotyp IgG, IgA và IgD, vùng Fc gồm hai mảnh protein giống tương ứng, từ các miền ổn định thứ hai và thứ ba của hai chuỗi nặng; trong các isotyp IgM và IgE, vùng Fc chứa ba miền ổn định chuỗi nặng (các miền CH₂, CH₃, và CH₄) trong mỗi chuỗi polypeptit.

Thuật ngữ "monome mảnh Fc" cần được hiểu với nghĩa là vùng Fc từ các miền ổn định thứ hai và thứ ba của một trong hai chuỗi nặng (đối với các isotyp IgG, IgA và IgD); đối với các isotyp IgM và IgE, monome Fc chứa ba miền ổn định của một trong hai chuỗi nặng (các miền CH₂, CH₃ và CH₄).

Theo một số phương án, xytokin miễn dịch chứa miền ổn định chuỗi nặng của kháng thể thứ nhất và miền ổn định chuỗi nhẹ của kháng thể nằm trong phức hợp heterodime, xytokin này có sự liên kết cộng hóa trị bằng liên kết cầu S-S tự nhiên.

Theo một số phương án, xytokin miễn dịch chứa miền ổn định chuỗi nặng của kháng thể thứ nhất và miền ổn định chuỗi nhẹ của kháng thể nằm trong phức hợp heterodime, không có sự liên kết cộng hóa trị bằng liên kết cầu S-S tự nhiên.

Theo một số phương án, xytokin miễn dịch chứa miền ổn định chuỗi nhẹ của kháng thể được chọn từ CK hoặc CL.

Ở các động vật có vú, đã biết là chỉ có hai loại chuỗi nhẹ được ký hiệu là lambda (λ) và kapa (κ). Miền ổn định của chuỗi nhẹ lambda được ký hiệu là CL, và miền ổn định của chuỗi nhẹ kapa được ký hiệu là CK.

Theo một số phương án, xytokin miễn dịch chứa IL-15R α có trình tự axit amin được thể hiện bằng

DTCPPPMSEVHADIWVKSYSLSYRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHW
TTPSLKCIRDPALVHQRPAAPPSTVTTAGVTPQPESLSPSGKEPAASS (SEQ ID NO:9),
hoặc biến thể đã biết bất kỳ của IL-15R α chứa sự đột biến có hoạt tính sinh học tương tự.

Thể đột biến IL-15R α , IL-15R α có hoạt tính sinh học tương tự được hiểu là để chỉ

IL-15R α bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này chứa sự đột biến và có hoạt tính sinh học tương tự so với hoạt tính sinh học của IL-15R α “kiểu đại”.

Theo một số phương án, xytokin miễn dịch chứa IL-15 có trình tự axit amin được thể hiện bằng

DNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGD
ASIHDTVENLIILANDSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS
(SEQ ID NO:10), hoặc biến thể đã biết bất kỳ của IL-15 chứa sự đột biến có hoạt tính sinh học tương tự.

Thế đột biến IL-15, IL-15 có hoạt tính sinh học tương tự có nghĩa là IL-15 bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này chứa sự đột biến và có hoạt tính sinh học tương tự so với IL-15 “kiểu đại”.

Theo một số phương án, xytokin miễn dịch chứa IL-15R α được liên kết với miền ổn định chuỗi nhẹ của kháng thể.

Theo một số phương án, xytokin miễn dịch chứa IL-15R α được liên kết với miền ổn định chuỗi nhẹ của kháng thể có trình tự axit amin được thể hiện bằng
DTCPPPMSEHADIWVKSYSLSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHW
TTPSLKCIRDPALVHQRPAAPPSTVTTAGVTPQPESLSPSGKEPAASSGAEGGGRTVA
APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD
SKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID
NO:1).

Theo một số phương án, xytokin miễn dịch chứa IL-15R α được liên kết với miền ổn định chuỗi nhẹ của kháng thể có trình tự axit amin được thể hiện bằng
DTCPPPMSEHADIWVKSYSLSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHW
TTPSLKCIRDPALVHQRPAAPPSTVTTAGVTPQPESLSPSGKEPAASSGAEGGGRTVA
APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD
SKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEA (SEQ ID
NO:19).

Trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:19 được cải biến từ trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:1 bằng một sự thay thế axit amin Xystein (X) thành Alanin (A) ở vị trí 216. Sự thay thế này cho phép tạo ra xytokin miễn dịch chứa miền ổn định chuỗi nặng của kháng thể thứ nhất và miền ổn định chuỗi nhẹ của kháng thể nằm trong phức hợp heterodime, không có sự liên kết cộng hóa trị bằng liên kết cầu S-S tự nhiên.

Theo một số phương án, xytokin miễn dịch chứa IL-15 được liên kết với miền ổn định chuỗi nhẹ của kháng thể.

Theo một số phương án, xytokin miễn dịch chứa IL-15 được liên kết với miền ổn định chuỗi nhẹ của kháng thể có trình tự axit amin được thể hiện bằng DNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGD ASIHDTVENLIILANDSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTSA GGKPGGSAGGRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC (SEQ ID NO:3).

Theo một số phương án, xytokin miễn dịch chứa IL-15 được liên kết với miền ổn định chuỗi nhẹ của kháng thể có trình tự axit amin được thể hiện bằng DNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGD ASIHDTVENLIILANDSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTSA GGKPGGSAGGRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEA (SEQ ID NO:21).

Trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:21 được cải biến từ trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:3 bằng một sự thay thế axit amin Xystein (X) thành Alanin (A) ở vị trí 233. Sự thay thế này cho phép tạo ra xytokin miễn dịch chứa miền ổn định chuỗi nặng của kháng thể thứ nhất và miền ổn định chuỗi nhẹ của kháng thể nằm trong phức hợp heterodime, không có sự liên kết cộng hóa trị bằng liên kết cầu S-S tự nhiên.

Theo một số phương án, xytokin miễn dịch chứa miền ổn định chuỗi nặng thứ nhất (CH1) và monome của mảnh Fc chứa các miền ổn định chuỗi nặng thứ hai (CH2) và thứ ba (CH3) được liên kết bằng miền bản lề.

Theo một số phương án, xytokin miễn dịch chứa IL-15 hoặc IL-15R α được liên kết với các miền ổn định chuỗi nặng của kháng thể được sắp xếp theo thứ tự sau: CH1-miền bản lề-CH2-CH3.

Theo một số phương án, xytokin miễn dịch chứa IL-15R α được liên kết với các miền ổn định chuỗi nặng của kháng thể.

Theo một số phương án, xytokin miễn dịch chứa IL-15R α được liên kết với các miền ổn định chuỗi nặng của kháng thể có trình tự axit amin được thể hiện bằng DTCPPPMSEVHADIIWVKSYSLSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAAHW

TTPSLKCIRDPALVHQRPAAPPSTVTTAGVTPQPESLSPSGKEPAASSGAEGGGASTKG
 PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
 YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG
 GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR
 EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
 YTLPPSRDELTNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL
 YSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSP (SEQ ID NO:4).

Theo một số phương án, xytokin miễn dịch chứa IL-15R α được liên kết với các miền
 ổn định chuỗi nặng của kháng thể có trình tự axit amin được thể hiện bằng
 DTCPPPMSEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHW
 TTPSLKCIRDPALVHQRPAAPPSTVTTAGVTPQPESLSPSGKEPAASSGAEGGGASTKG
 PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
 YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSADKTHTCPPCPAPEAAG
 GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR
 EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
 YTLPPSRDELTNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL
 YSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSP (SEQ ID NO:22).

Trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:22 được cải biến từ trình tự axit amin nêu
 trong SEQ ID NO:4 bằng một sự thay thế axit amin Xystein (X) thành Alanin (A) ở vị trí
 212. Sự thay thế này cho phép tạo ra xytokin miễn dịch chứa miền ổn định chuỗi nặng của
 kháng thể thứ nhất và miền ổn định chuỗi nhẹ của kháng thể nằm trong phức hợp
 heterodime, không có sự liên kết cộng hóa trị bằng liên kết cầu S-S tự nhiên.

Theo một số phương án, xytokin miễn dịch chứa IL-15 được liên kết với các miền ổn
 định chuỗi nặng của kháng thể.

Theo một số phương án, xytokin miễn dịch chứa IL-15 được liên kết với các miền ổn
 định chuỗi nặng của kháng thể có trình tự axit amin được thể hiện bằng
 DNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLESGD
 ASIHDVTENLIILANDSLSSNGNVTESGCKECEEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTSA
 GGKPGGSAGGASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL
 TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC
 DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW
 YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP

IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
NNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SP (SEQ ID NO:2).

Theo một số phương án, xytokin miễn dịch chứa IL-15 được liên kết với các miền ổn định chuỗi nặng của kháng thể có trình tự axit amin được thể hiện bằng
DNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLLELQVISLESGD
ASIHDTVENLIILANDSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTSA
GGKPGGSAGGASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL
TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSA
DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP
IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
NNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SP (SEQ ID NO:20).

Trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:20 được cải biến từ trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:2 bằng một sự thay thế axit amin Xystein (X) thành Alanin (A) ở vị trí 229. Sự thay thế này cho phép tạo ra xytokin miễn dịch chứa miền ổn định chuỗi nặng của kháng thể thứ nhất và miền ổn định chuỗi nhẹ của kháng thể nằm trong phức hợp heterodime, không có sự liên kết cộng hóa trị bằng liên kết cầu S-S tự nhiên.

Theo một số phương án, xytokin miễn dịch chứa:

IL-15 α được liên kết với miền ổn định chuỗi nhẹ của kháng thể có trình tự axit amin được thể hiện bằng

DTCPPPMMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHW
TTPSLKCIRDPALVHQRPAAPPSTVTTAGVTPQPESLSPSGKEPAASSGAEGGGRTVA
APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD
SKDSTYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID
NO:1) hoặc

DTCPPPMMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHW
TTPSLKCIRDPALVHQRPAAPPSTVTTAGVTPQPESLSPSGKEPAASSGAEGGGRTVA
APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD
SKDSTYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEA (SEQ ID
NO:19), và

IL-15 được liên kết với các miền ổn định chuỗi nặng của kháng thể có trình tự axit amin được thể hiện bằng

DNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGD
 ASIHDVTENLIILANDSLSSNGNVTESGCKECEEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTSA
 GGKPGGSAGGASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL
 TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC
 DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW
 YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP
 IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
 NNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQVMHEALHNHYTQKSLSL
 SP (SEQ ID NO:2) hoặc

DNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGD
 ASIHDVTENLIILANDSLSSNGNVTESGCKECEEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTSA
 GGKPGGSAGGASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL
 TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSA
 DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW
 YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP
 IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
 NNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQVMHEALHNHYTQKSLSL
 SP (SEQ ID NO:20).

Theo một số phương án, xytokin miễn dịch chứa:

IL-15 α được liên kết với miền ổn định chuỗi nhẹ của kháng thể có trình tự axit amin được thể hiện bằng

DTCPPMMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHW
 TTPSLKCIRDPALVHQRPAAPPSTVTTAGVTPQPESLSPSGKEPAASSGAEGGGRTVA
 APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD
 SKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID
 NO:1), và

IL-15 được liên kết với các miền ổn định chuỗi nặng của kháng thể có trình tự axit amin được thể hiện bằng

DNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGD
 ASIHDVTENLIILANDSLSSNGNVTESGCKECEEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTSA

GGKPGGSAGGASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL
 TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC
 DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW
 YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP
 IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
 NNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSL
 SP (SEQ ID NO:2).

Theo một số phương án, xytokin miễn dịch chứa:

IL-15 α được liên kết với miền ổn định chuỗi nhẹ của kháng thể có trình tự axit amin được thể hiện bằng

DTCPPPMSEHADIWVKSYSLSYRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHW
 TTPSLKCIRDPALVHQRPAAPPSTVTTAGVTPQPESLSPSGKEPAASSGAEGGGRTVA
 APSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPPREAAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD
 SKDSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEA (SEQ ID
 NO:19), và

IL-15 được liên kết với các miền ổn định chuỗi nặng của kháng thể có trình tự axit amin được thể hiện bằng

DNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLESGD
 ASIHDTVENLILANDSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTSA
 GGKPGGSAGGASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL
 TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSA
 DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW
 YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP
 IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
 NNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSL
 SP (SEQ ID NO:20).

Theo một số phương án, xytokin miễn dịch chứa:

IL-15 α được liên kết với các miền ổn định chuỗi nặng của kháng thể có trình tự axit amin được thể hiện bằng

DTCPPPMSEHADIWVKSYSLSYRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHW
 TTPSLKCIRDPALVHQRPAAPPSTVTTAGVTPQPESLSPSGKEPAASSGAEGGGASTKG
 PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL

YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR
EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSRDELTNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL
YSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSP (SEQ ID NO:4) hoặc
DTCPPPMSEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHW
TTPSLKCIKDPALVHQRPAAPPSTVTTAGVTPQPESLSPSGKEPAASSGAEGGGASTKG
PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKRVEPKSADKTHTCPPCPAPEAAG
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR
EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSRDELTNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL
YSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSP (SEQ ID NO:22), và

IL-15 được liên kết với an miên ổn định chuỗi nhẹ của kháng thể có trình tự axit amin được thể hiện bằng

DNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLESGD
ASIHDTVENLIILANDSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTSA
GGKPGGSAGGRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN
ALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS
FNRGEC (SEQ ID NO:3) hoặc

DNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLESGD
ASIHDTVENLIILANDSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTSA
GGKPGGSAGGRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN
ALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS
FNRGEA (SEQ ID NO:21).

Theo một số phương án, xytokin miễn dịch chứa:

IL-15 α được liên kết với các miên ổn định chuỗi nặng của kháng thể có trình tự axit amin được thể hiện bằng

DTCPPPMSEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHW
TTPSLKCIKDPALVHQRPAAPPSTVTTAGVTPQPESLSPSGKEPAASSGAEGGGASTKG
PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG

GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR
EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSRDELTNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL
YSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSP (SEQ ID NO:4), và

IL-15 được liên kết với an miễn ổn định chuỗi nhẹ của kháng thể có trình tự axit amin được thể hiện bằng

DNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLESGD
ASIHDTVENLIILANDSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTSA
GGKPGGSAGGRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN
ALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS
FNRGEC (SEQ ID NO:3).

Theo một số phương án, xytokin miễn dịch chứa:

IL-15 α được liên kết với các miễn ổn định chuỗi nặng của kháng thể có trình tự axit amin được thể hiện bằng

DTCPPPMSEHADIWVKSYSLSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHW
TTPSLKCIRDPAHVHQRPAAPPSTVTTAGVTPQPESLSPSGKEPAASSGAEGGGASTKG
PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSADKTHTCPPCPAPEAAG
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR
EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSRDELTNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL
YSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSP (SEQ ID NO:22), và

IL-15 được liên kết với an miễn ổn định chuỗi nhẹ của kháng thể có trình tự axit amin được thể hiện bằng

DNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLESGD
ASIHDTVENLIILANDSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTSA
GGKPGGSAGGRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN
ALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS
FNRGEA (SEQ ID NO:21).

Theo một số phương án, xytokin miễn dịch chứa sự đột biến trong monome của mảnh Fc, gây ra sự thiếu hụt các đặc tính của ADCC, CDC, và/hoặc ADCP trong xytokin miễn dịch nêu trên.

Sự đột biến trong Fc mảnh cần được hiểu với nghĩa là (các) cải biến của trình tự axit amin của các kháng thể được mô tả ở đây. Các biến thể của trình tự axit amin của kháng thể được tạo ra bằng cách đưa sự thay đổi nucleotit thích hợp vào axit nucleic của kháng thể, hoặc bằng cách tổng hợp peptit. (Các) cải biến này bao gồm, ví dụ, sự làm khuyết đoạn, và/hoặc sự chèn đoạn, và/hoặc sự thay thế đoạn của các gốc trong trình tự axit amin của kháng thể. Sự kết hợp bất kỳ của sự làm khuyết đoạn, sự chèn đoạn, và sự thay thế đoạn được thực hiện để thu được cấu trúc cuối, với điều kiện là cấu trúc cuối này có các đặc tính mong muốn.

Biến thể của sự cải biến các trình tự axit amin của kháng thể bằng cách sử dụng sự thay thế axit amin, là sự thay thế đoạn của ít nhất một gốc axit amin trong phân tử kháng thể bằng gốc khác.

Sự thay thế bảo toàn, được thể hiện trong Bảng A trong điều kiện "sự thay thế được ưu tiên".

Bảng A		
Gốc ban đầu	Sự thay thế làm ví dụ	Sự thay thế được ưu tiên
Ala(A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg(R)	Lys; Gin; Asn	Lys
Asn(N)	Gin; His; Asp, Lys; Arg	Gin
Asp(D)	Glu; Asn	Glu
Asn(X)	Ser; Ala	Ser
Gln(Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gin	Asp
Gly(G)	Ala	Ala
His(H)	Asn; Gin; Lys; Arg	Arg
Ile(I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleuxin	Leu
Leu (L)	Norleuxin; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gin; Asn	Arg
Met(M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe(F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro(P)	Ala	Ala
Ser(S)	Thr	Thr
Thr(T)	Val; Ser	Ser

Trp(W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr(Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val(V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleuxin	Leu

Thuật ngữ "chức năng hiệu ứng" của kháng thể để chỉ các hoạt tính sinh học liên quan đến vùng Fc (trình tự vùng Fc tự nhiên hoặc các biến thể axit amin của vùng Fc) của kháng thể, có thể thay đổi theo isotyp của kháng thể. Ví dụ về các chức năng hiệu ứng của kháng thể bao gồm: sự gắn kết Cl_q và tính gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể; sự gắn kết thụ thể Fc; tính gây độc tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity: ADCC); sự thực bào; sự điều hòa giảm của các thụ thể bề mặt tế bào (ví dụ, thụ thể tế bào B (B-cell receptor: BCR), và sự hoạt hóa tế bào B.

Thuật ngữ "tính gây độc tế bào của tế bào phụ thuộc kháng thể" hoặc "ADCC" để chỉ sự đáp ứng qua trung gian tế bào, trong đó các tế bào gây độc tế bào không đặc hiệu biểu hiện thụ thể Fc (Fc receptor: FcR) (ví dụ, các tế bào giết tự nhiên (natural killer: NK), bạch cầu trung tính, và đại thực bào) nhận biết kháng thể đã gắn kết trên tế bào đích và sau đó gây ra sự phân giải hoặc sự thực bào của tế bào đích. Các tế bào sơ cấp để làm trung gian cho ADCC, các tế bào NK, chỉ biểu hiện Fc γ RII, trong khi bạch cầu đơn nhân to biểu hiện Fc γ RI, Fc γ RII và Fc γ RIII. Sự biểu hiện của FcR trên các tế bào tạo máu được tóm tắt trong Bảng 3 ở trang 464 của tài liệu: Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol 9: 457-92 (1991). Để đánh giá hoạt tính ADCC của phân tử quan tâm, thử nghiệm ADCC *in vitro*, như thử nghiệm được mô tả trong các Bằng độc quyền sáng chế Mỹ số US 5.500.362 hoặc 5.821.337 có thể được thực hiện. Các tế bào hiệu ứng hữu ích cho các thử nghiệm này bao gồm các tế bào đơn nhân máu ngoại vi (peripheral blood mononuclear cell: PBMC) và các tế bào giết tự nhiên (NK). Theo cách khác, hoặc ngoài ra, hoạt tính ADCC của phân tử quan tâm có thể được đánh giá *in vivo*, ví dụ, ở mô hình động vật như mô hình được bộc lộ trong tài liệu: Clynes et al. PNAS (Mỹ) 95: 652-656 (1998).

Thuật ngữ "các tế bào hiệu ứng ở người" là các bạch cầu biểu hiện một hoặc nhiều FcR và thực hiện các chức năng hiệu ứng. Tốt hơn nếu các tế bào này biểu hiện ít nhất là Fc γ RIII và thực hiện chức năng hiệu ứng ADCC. Ví dụ về các bạch cầu ở người làm trung gian cho ADCC bao gồm các tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC), các tế bào giết tự nhiên (NK), bạch cầu đơn nhân to, các tế bào T gây độc tế bào và bạch cầu trung tính; với các tế bào PBMC và NK được ưu tiên. Các tế bào hiệu ứng có thể được phân lập từ nguồn tự nhiên của nó, ví dụ, từ máu hoặc tế bào PBMC như được mô tả trong tài liệu công bố

này.

Cụm từ "tính gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể" và "CDC" để chỉ khả năng của phân tử làm tan đích với sự có mặt của bổ thể. Con đường hoạt hóa bổ thể được khơi mào bằng sự gắn kết của thành phần thứ nhất của hệ bổ thể thứ nhất (C1q) với phân tử {ví dụ, kháng thể} được tạo phức với kháng nguyên cùng nguồn gốc. Để đánh giá sự hoạt hóa bổ thể, thử nghiệm CDC có thể được thực hiện, ví dụ, như được mô tả trong tài liệu: Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202: 163 (1996).

Theo một số phương án, xytokin miễn dịch chứa mảnh Fc thuộc về IgG.

Theo một số phương án, xytokin miễn dịch chứa mảnh Fc được chọn từ nhóm bao gồm: IgG1, IgG2, hoặc IgG4 của người.

Theo một số phương án, xytokin miễn dịch chứa hai phức hợp protein heterodime trên cơ sở IL-15/IL-15R α trên đây.

Chất siêu chủ vận IL15 (còn được gọi là BCD225 hoặc IL15SA hoặc (IL15SA)₂-Fc) của sáng chế cần được hiểu là để chỉ CK_IL15R α _Hc_IL15CH1FcLALA và CK_IL15_Hc_IL15R α CH1FcLALA.

Ý nghĩa của các ký hiệu CK, IL15R α , IL15, CH1FcLALA được đưa ra trong toàn bộ nội dung của đơn sáng chế này.

CK_IL15R α _Hc_IL15CH1FcLALA là xytokin miễn dịch trên đây chứa hai phức hợp protein heterodime trên cơ sở IL-15/IL-15R α , xytokin này bao gồm IL15R α được liên kết với miền ổn định chuỗi nhẹ của kháng thể CK, và IL15 được liên kết với các miền ổn định chuỗi nặng của kháng thể chứa miền ổn định chuỗi nặng thứ nhất (CH1) và monome của mảnh Fc chứa các miền ổn định chuỗi nặng thứ hai (CH2) và thứ ba (CH3), trong đó Fc chứa sự đột biến LALA.

CK_IL15_Hc_IL15R α CH1FcLALA là xytokin miễn dịch trên đây chứa hai phức hợp protein heterodime trên cơ sở IL-15/IL-15R α , xytokin này bao gồm IL15 được liên kết với miền ổn định chuỗi nhẹ của kháng thể CK, và IL15R α được liên kết với các miền ổn định chuỗi nặng của kháng thể chứa miền ổn định chuỗi nặng thứ nhất (CH1) và monome của mảnh Fc chứa các miền ổn định chuỗi nặng thứ hai (CH2) và thứ ba (CH3), trong đó Fc chứa sự đột biến LALA.

Xytokin miễn dịch trên đây có thể được tạo ra theo cả định dạng mà trong đó miền ổn định chuỗi nặng của kháng thể thứ nhất và miền ổn định chuỗi nhẹ của kháng thể trong phức hợp heterodime có sự liên kết cộng hóa trị bằng liên kết cầu S-S tự nhiên, và trong

định dạng mà trong đó miền ổn định chuỗi nặng của kháng thể thứ nhất và miền ổn định chuỗi nhẹ của kháng thể trong phức hợp heterodime không có sự liên kết cộng hóa trị bằng liên kết cầu S-S tự nhiên; nhằm mục đích này, trong trường hợp cụ thể, cả hai xystein được thay thế bằng alanin.

Các nghiên cứu thực nghiệm về các xytokin miễn dịch trên đây ở cả định dạng mà trong đó miền ổn định chuỗi nặng của kháng thể thứ nhất và miền ổn định chuỗi nhẹ của kháng thể trong phức hợp heterodime có sự liên kết cộng hóa trị bằng liên kết cầu S-S tự nhiên, và ở định dạng mà trong đó miền ổn định chuỗi nặng của kháng thể thứ nhất và miền ổn định chuỗi nhẹ của kháng thể trong phức hợp heterodime không có sự liên kết cộng hóa trị bằng liên kết cầu S-S tự nhiên, đã chứng minh sự khác biệt không đáng kể về hoạt tính của các xytokin miễn dịch trên đây.

Định dạng của xytokin miễn dịch trên đây được thể hiện trên Fig.1 và Fig.2.

Theo một số phương án, xytokin miễn dịch được sử dụng làm chất điều trị để điều trị bệnh ung thư hoặc bệnh tự miễn.

Theo một số phương án, xytokin miễn dịch được sử dụng làm a chất điều trị để điều trị bệnh ung thư.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến xytokin miễn dịch để kích thích sự hoạt hóa và/hoặc tăng sinh của các tế bào dương tính với IL-15Rbeta/gama, xytokin này chứa phức hợp protein heterodime trên cơ sở IL-15/IL-15R α , và kháng thể điều biến miễn dịch hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, ức chế đặc hiệu con đường PD-1,

trong đó phức hợp protein heterodime trên cơ sở IL-15/IL-15R α

chứa:

- 1) IL-15R α được liên kết với
 - a) miền ổn định chuỗi nhẹ của kháng thể, hoặc
 - b) các miền ổn định chuỗi nặng của kháng thể chứa miền ổn định chuỗi nặng thứ nhất (CH1) và monome của mảnh Fc chứa các miền ổn định chuỗi nặng thứ hai (CH2) và thứ ba (CH3);
- 2) IL-15 được liên kết với
 - a) các miền ổn định chuỗi nặng của kháng thể chứa miền ổn định chuỗi nặng thứ nhất (CH1) và monome của mảnh Fc chứa các miền ổn định chuỗi nặng thứ hai (CH2) và thứ ba (CH3), hoặc
 - b) miền ổn định chuỗi nhẹ của kháng thể ;

trong đó miền ổn định chuỗi nặng của kháng thể thứ nhất và miền ổn định chuỗi nhẹ của kháng thể trong phức hợp heterodime có hoặc không có sự liên kết cộng hóa trị bằng liên kết cầu S-S tự nhiên, và

trong đó, nếu IL-15 hoặc IL-15R α được liên kết với miền ổn định chuỗi nhẹ của kháng thể, thì phần còn lại, được chọn từ IL-15R α hoặc IL-15, của phức hợp protein heterodime được liên kết với các miền ổn định chuỗi nặng của kháng thể.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "kháng thể" hoặc "globulin miễn dịch" (Ig) bao gồm các kháng thể toàn phần và mảnh gắn kết kháng nguyên bất kỳ (nghĩa là "phần gắn kết kháng nguyên") hoặc các chuỗi đơn của nó. Thuật ngữ "kháng thể" để chỉ glycoprotein chứa ít nhất hai chuỗi nặng (H) và hai chuỗi nhẹ (L) được liên kết với nhau bằng các liên kết disulfua, hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó. Mỗi chuỗi nặng bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng (được viết tắt ở đây là VH) và vùng ổn định chuỗi nặng. Đã biết là có năm loại chuỗi nặng Ig ở động vật có vú, được ký hiệu bằng chữ cái Hy Lạp: α , δ , ϵ , γ và μ . Loại chuỗi nặng nặng có mặt xác định nhóm của kháng thể; các chuỗi này được tìm thấy trong các kháng thể IgA, IgD, IgE, IgG, và IgM tương ứng. Các chuỗi nặng riêng biệt khác nhau về kích thước và thành phần; α và γ chứa khoảng 450 axit amin, trong khi μ và ϵ có khoảng 550 axit amin. Mỗi chuỗi nặng có hai vùng, vùng ổn định và vùng biến đổi. Vùng ổn định là giống nhau trong tất cả các kháng thể của cùng kiểu isotyp. Các chuỗi nặng γ , α và δ có vùng ổn định gồm ba miền ổn định CH1, CH2 và CH3 (thẳng hàng), và vùng bản lề để tạo ra tính linh hoạt bổ sung (Woof J., Burton D., Nat Rev Immunol 4, 2004, cc.89-99); các chuỗi nặng μ và ϵ có vùng ổn định gồm bốn miền ổn định CH1, CH2, CH3 và CH4. Ở các động vật có vú, đã biết là chỉ có hai loại chuỗi nhẹ được ký hiệu bằng lambda (λ) và kappa (κ). Mỗi chuỗi nhẹ gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ (được viết tắt ở đây là VL) và vùng ổn định chuỗi nhẹ. Chiều dài gần đúng của chuỗi nhẹ là từ 211 đến 217 axit amin. Tốt hơn nếu chuỗi nhẹ là chuỗi nhẹ kappa (κ), và tốt hơn nếu miền ổn định CL là miền kappa C (κ).

"Kháng thể" theo sáng chế có thể thuộc về nhóm bất kỳ (ví dụ, IgA, IgD, IgE, IgG, và IgM, tốt hơn nếu là IgG), hoặc phân nhóm (ví dụ, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 và IgA2, tốt hơn nếu là IgG1).

Các vùng VL và VH có thể được chia nhỏ tiếp thành các vùng siêu biến được gọi là vùng quyết định tính bổ trợ (complementarity determining region: CDR), xen kẽ giữa các vùng được bảo toàn hơn, được gọi là vùng khung (framework region: FR). Mỗi vùng VH và

VL gồm ba vùng CDR và bốn vùng FR, được sắp xếp từ đầu tận cùng amino đến đầu tận cùng carboxy theo thứ tự sau: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Các vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ chứa miền gắn kết tương tác với kháng nguyên. Các vùng ổn định của kháng thể có thể làm trung gian cho sự gắn kết của globulin miễn dịch với các mô của vật chủ hoặc các yếu tố, bao gồm các tế bào khác nhau của hệ miễn dịch (ví dụ, các tế bào hiệu ứng) và thành phần thứ nhất (Clq) của hệ bổ trợ cổ điển.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "phần gắn kết kháng nguyên" của kháng thể hoặc "mảnh gắn kết kháng nguyên" (hoặc đơn giản là "phần kháng thể" hoặc "mảnh kháng thể"), để chỉ một hoặc nhiều mảnh của kháng thể vẫn duy trì được khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên. Đã chứng minh được rằng chức năng gắn kết kháng nguyên của kháng thể có thể được thực hiện bằng các mảnh của kháng thể có chiều dài đầy đủ. Ví dụ về các mảnh gắn kết được bao gồm trong thuật ngữ "phần gắn kết kháng nguyên" của kháng thể bao gồm (i) mảnh Fab, mảnh hóa trị hai gồm các miền VL, VH, CL và CH1; (ii) mảnh F(ab')₂, mảnh hóa trị hai chứa hai mảnh Fab được liên kết bằng liên kết cầu disulfua ở vùng bản lề; (iii) mảnh Fd gồm các miền VH và CH1; (iv) mảnh Fv gồm các miền VL và VH của nhánh đơn của kháng thể; (v) mảnh dAb (Ward et al., (1989) Nature 341:544-546), mảnh này gồm miền VH/VHH; và (vi) vùng quyết định tính bổ trợ (CDR) chiết được. Ngoài ra, hai vùng của mảnh Fv, là VL và VH, được mã hóa bởi các gen riêng biệt, chúng có thể được liên kết bằng cách sử dụng các phương pháp tái tổ hợp sử dụng nhóm liên kết tổng hợp để cho phép chúng nhận chuỗi protein đơn mà trong đó vùng VL và VH được ghép đôi để tạo thành các phân tử hóa trị một (được gọi là Fv chuỗi đơn (scFv); ví dụ, xem tài liệu: Bird et al. (1988) Science 242:423-426; và Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883). Các phân tử sợi đơn này được cho là cũng được bao gồm trong thuật ngữ "phần gắn kết kháng nguyên" của kháng thể. Các mảnh kháng thể này thu được bằng cách sử dụng các kỹ thuật thông thường đã biết với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, và các mảnh này được sàng lọc theo cách giống như là kháng thể nguyên vẹn.

Tốt hơn nếu vùng CDR của phần gắn kết kháng nguyên, hoặc phần gắn kết kháng nguyên của kháng thể toàn phần theo sáng chế có nguồn gốc từ thư viện thể cho là chuột, lạc đà không bướu hoặc người hoặc về cơ bản là có nguồn gốc từ người với một số gốc axit amin được thay đổi, ví dụ, được thể bằng các gốc axit amin khác nhau để tối ưu hóa các đặc tính cụ thể của kháng thể, ví dụ, KD, koff, IC50, EC50, ED50. Tốt hơn nếu các vùng khung

của kháng thể theo sáng chế là vùng có nguồn gốc từ người hoặc về cơ bản là có nguồn gốc từ người (ít nhất 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 hoặc 99% có nguồn gốc từ người).

Theo các phương án khác, phần gắn kết kháng nguyên của kháng thể theo sáng chế có thể có nguồn gốc từ các loài không phải người bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, chuột, lạc đà không biểu, thỏ, chuột nhắt hoặc chuột đồng. Theo cách khác, vùng gắn kết kháng nguyên có thể có nguồn gốc từ người.

Thuật ngữ "biến đổi" để chỉ việc một số phần của miền biến đổi có khác biệt lớn về trình tự giữa các kháng thể. Miền V làm trung gian cho sự gắn kết kháng nguyên và quyết định tính đặc hiệu của mỗi kháng thể cụ thể đối với kháng nguyên cụ thể của nó. Tuy nhiên, tính biến đổi này được phân bố không đều trên khoảng 110-axit amin của các miền biến đổi. Thay vào đó, các vùng V gồm các mảnh bất biến được gọi là vùng khung (FR) chứa từ 15 đến 30 axit amin được ngăn cách bằng các vùng ngắn hơn có tính biến đổi rất lớn được gọi là "vùng siêu biến" hoặc CDR. Mỗi miền biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ tự nhiên chứa bốn vùng FR, chủ yếu chọn cấu hình nếp gấp beta, được liên kết bởi ba vùng siêu biến, để tạo thành các vòng liên kết, và trong một số trường hợp tạo thành một phần của cấu trúc nếp gấp beta. Các vùng siêu biến trong mỗi chuỗi được duy trì với nhau ở khoảng rất gần bằng các vùng FR và, cùng với các vùng siêu biến từ chuỗi khác, góp phần vào sự tạo ra vị trí gắn kết kháng nguyên của các kháng thể. Các miền ổn định không tham gia trực tiếp vào sự gắn kết kháng thể với kháng nguyên nhưng có nhiều chức năng hiệu ứng khác nhau, như sự tham gia của kháng thể vào tính gây độc tế bào của tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC).

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "vùng siêu biến" để chỉ các gốc axit amin của kháng thể gây ra sự gắn kết kháng nguyên. Vùng siêu biến thường chứa các gốc axit amin từ "vùng quyết định tính bổ trợ" hoặc "CDR" và/hoặc các gốc axit amin từ "vùng siêu biến".

Trong một số trường hợp, tốt hơn là cũng có thể làm thay đổi một hoặc nhiều gốc axit amin của vùng CDR để cải thiện ái lực gắn kết với epitop đích. Quá trình này được gọi là "sự trưởng thành ái lực" và có thể tùy ý được thực hiện đối với việc làm cho giống với của người, ví dụ, trong các trường hợp mà trong đó việc làm cho kháng thể giống với của người dẫn đến làm giảm tính đặc hiệu hoặc ái lực gắn kết và không thể cải thiện đủ tính đặc hiệu hoặc ái lực gắn kết chỉ bằng cách đột biến ngược. Các phương pháp làm trưởng thành ái lực khác nhau là đã biết trong lĩnh vực này, ví dụ, phương pháp gây đột biến bão hòa quét *in vitro* được mô tả trong tài liệu: Burks et al., Proc Natl Acad Sci USA, 94:412–417 (1997)

và phương pháp trưởng thành ái lực *in vitro* từng bước được mô tả trong tài liệu: Wu et al., Proc Natl Acad Sci USA 95:6037-6042 (1998).

"Các vùng khung" (FR) là các gốc của miền biến đổi khác với các gốc của vùng CDR. Mỗi miền biến đổi thường có bốn vùng FRs được xác định theo FR1, FR2, FR3 và FR4. Nếu các vùng CDR được xác định theo phương pháp Kabat, các gốc của vùng FR chuỗi nhẹ nằm trong khoảng vị trí các gốc 1-23 (LCFR1), 35-49 (LCFR2), 57-88 (LCFR3), và 98-107 (LCFR4) và các gốc của vùng FR chuỗi nặng nằm trong khoảng vị trí các gốc 1-30 (HCFR1), 36-49 (HCFR2), 66-94 (HCFR3), và 103-113 (HCFR4) trong chuỗi nặng. Nếu các vùng CDR chứa các gốc axit amin từ vòng siêu biến, các gốc của vùng FR chuỗi nhẹ nằm trong khoảng vị trí các gốc 1-25 (LCFR1), 33-49 (LCFR2), 53-90 (LCFR3), và 97-107 (LCFR4) trong chuỗi nhẹ và các gốc của vùng FR chuỗi nặng nằm trong khoảng vị trí các gốc 1-25 (HCFR1), 33-52 (HCFR2), 56-95 (HCFR3), và 102-113 (HCFR4) trong các gốc của chuỗi nặng. Trong một số trường hợp, khi vùng CDR chứa các axit amin từ cả hai vùng CDR như được xác định theo phương pháp Kabat và các axit amin của vòng siêu biến, các gốc của vùng FR sẽ được điều chỉnh cho phù hợp. Ví dụ, khi CDRH1 bao gồm các axit amin H26-H35, các gốc của vùng FR1 chuỗi nặng nằm ở vị trí 1-25 và các gốc của vùng FR2 nằm ở vị trí 36-49.

Kháng thể của sáng chế "gắn kết" kháng nguyên đích để chỉ kháng thể có khả năng gắn kết kháng nguyên với ái lực đủ sao cho kháng thể này có thể được sử dụng làm chất chẩn đoán và/hoặc điều trị để hướng đích protein hoặc tế bào hoặc mô biểu hiện kháng nguyên này, và có khả năng phản ứng chéo ở mức nhẹ với các protein khác. Theo các phương pháp phân tích: phương pháp phân loại tế bào được hoạt hóa huỳnh quang (fluorescence-activated cell sorting: FACS), phương pháp thử nghiệm miễn dịch phóng xạ (RIA) hoặc phương pháp thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết enzym (ELISA), trong các phương án này, mức độ gắn kết của kháng thể với protein không phải đích là nhỏ hơn 10% so với mức độ gắn kết của kháng thể với protein đích cụ thể. Liên quan đến sự gắn kết của kháng thể với phân tử đích, thuật ngữ "sự gắn kết đặc hiệu" hoặc "gắn kết đặc hiệu với" hoặc là "đặc hiệu với" polypeptit cụ thể hoặc an epitop trên đích polypeptit cụ thể có nghĩa là sự gắn kết có thể phát hiện được khác với sự tương tác không đặc hiệu.

Theo một số phương án, xytokin miễn dịch chứa miền ổn định chuỗi nặng của kháng thể thứ nhất và miền ổn định chuỗi nhẹ của kháng thể nằm trong phức hợp heterodime, xytokin này có sự liên kết cộng hóa trị bằng liên kết cầu S-S tự nhiên.

Theo một số phương án, xytokin miễn dịch chứa miền ổn định chuỗi nặng của kháng thể thứ nhất và miền ổn định chuỗi nhẹ của kháng thể nằm trong phức hợp heterodime, không có sự liên kết cộng hóa trị bằng liên kết cầu S-S tự nhiên.

Theo một số phương án, xytokin miễn dịch chứa miền ổn định chuỗi nhẹ của kháng thể được chọn từ CK hoặc CL.

Theo một số phương án, xytokin miễn dịch chứa IL-15R α có trình tự axit amin được thể hiện bằng

DTCPPPMMSVEHADIWVKSYSLSYRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHW
TTPSLKCIRDPALVHQRPPAPPSTVTTAGVTPQPESLSPSGKEPAASS (SEQ ID NO:9),
hoặc biến thể đã biết bất kỳ của IL-15R α chứa sự đột biến có hoạt tính sinh học tương tự.

Thể đột biến IL-15R α , IL-15R α có hoạt tính sinh học tương tự được hiểu là để chỉ IL-15R α bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này chứa sự đột biến và có hoạt tính sinh học tương tự so với hoạt tính sinh học của IL-15R α “kiểu đại”.

Theo một số phương án, xytokin miễn dịch chứa IL-15 có trình tự axit amin được thể hiện bằng

DNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGD
ASIHDTVENLIILANDSLSSNGNVTESGCKECEEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS
(SEQ ID NO:10), hoặc biến thể đã biết bất kỳ của IL-15 chứa sự đột biến có hoạt tính sinh học tương tự.

Thể đột biến IL-15, IL-15 có hoạt tính sinh học tương tự có nghĩa là IL-15 bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này chứa sự đột biến và có hoạt tính sinh học tương tự so với IL-15 “kiểu đại”.

Theo một số phương án, xytokin miễn dịch chứa IL-15R α được liên kết với miền ổn định chuỗi nhẹ của kháng thể.

Theo một số phương án, xytokin miễn dịch chứa IL-15R α được liên kết với miền ổn định chuỗi nhẹ của kháng thể có trình tự axit amin được thể hiện bằng
DTCPPPMMSVEHADIWVKSYSLSYRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHW
TTPSLKCIRDPALVHQRPPAPPSTVTTAGVTPQPESLSPSGKEPAASSGAEGGGRTVA
APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD
SKDSTYSLSSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:1).

Theo một số phương án, xytokin miễn dịch chứa IL-15R α được liên kết với miền ổn

định chuỗi nhẹ của kháng thể có trình tự axit amin được thể hiện bằng
 DTCPPMMSVEHADIWVKSYSLSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHW
 TTPSLKCIRDPALVHQRPAAPPSTVTTAGVTPQPESLSPSGKEPAASSGAEGGGRTVA
 APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD
 SKDSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEA (SEQ ID
 NO:19).

Trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:19 được cải biến từ trình tự axit amin nêu
 trong SEQ ID NO:1 bằng một sự thay thế axit amin Xystein (X) thành Alanin (A) ở vị trí
 216. Sự thay thế này cho phép tạo ra xytokin miễn dịch chứa miền ổn định chuỗi nặng của
 kháng thể thứ nhất và miền ổn định chuỗi nhẹ của kháng thể nằm trong phức hợp
 heterodime, không có sự liên kết cộng hóa trị bằng liên kết cầu S-S tự nhiên.

Theo một số phương án, xytokin miễn dịch chứa IL-15 được liên kết với miền ổn
 định chuỗi nhẹ của kháng thể.

Theo một số phương án, xytokin miễn dịch chứa IL-15 được liên kết với miền ổn
 định chuỗi nhẹ của kháng thể có trình tự axit amin được thể hiện bằng
 DNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLESGD
 ASIHDVTENLIILANDSLSSNGNVTESGCKECEEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTSA
 GGKPGGSAGGRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN
 ALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS
 FNRGEC (SEQ ID NO:3).

Theo một số phương án, xytokin miễn dịch chứa IL-15 được liên kết với miền ổn
 định chuỗi nhẹ của kháng thể có trình tự axit amin được thể hiện bằng
 DNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLESGD
 ASIHDVTENLIILANDSLSSNGNVTESGCKECEEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTSA
 GGKPGGSAGGRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN
 ALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS
 FNRGEA (SEQ ID NO:21).

Trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:21 được cải biến từ trình tự axit amin nêu
 trong SEQ ID NO:3 bằng một sự thay thế axit amin Xystein (X) thành Alanin (A) ở vị trí
 233. Sự thay thế này cho phép tạo ra xytokin miễn dịch chứa miền ổn định chuỗi nặng của
 kháng thể thứ nhất và miền ổn định chuỗi nhẹ của kháng thể nằm trong phức hợp
 heterodime, không có sự liên kết cộng hóa trị bằng liên kết cầu S-S tự nhiên.

Theo một số phương án, xytokin miễn dịch chứa miền ổn định chuỗi nặng thứ nhất (CH1) và monome của mảnh Fc chứa các miền ổn định chuỗi nặng thứ hai (CH2) và thứ ba (CH3) được liên kết bằng miền bản lề.

Theo một số phương án, xytokin miễn dịch chứa IL-15 hoặc IL-15R α được liên kết với các miền ổn định chuỗi nặng của kháng thể được sắp xếp theo thứ tự sau: CH1-miền bản lề-CH2-CH3.

Theo một số phương án, xytokin miễn dịch chứa IL-15R α được liên kết với các miền ổn định chuỗi nặng của kháng thể.

Theo một số phương án, xytokin miễn dịch chứa IL-15R α được liên kết với các miền ổn định chuỗi nặng của kháng thể có trình tự axit amin được thể hiện bằng DTCPPPMMSVEHADIWVKSYSLSYRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHW TTPSLKCIRDPALVHQRPAAPPSTVTTAGVTPQPESLSPSGKEPAASSGAEGGGASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP (SEQ ID NO:6).

Theo một số phương án, xytokin miễn dịch chứa IL-15R α được liên kết với các miền ổn định chuỗi nặng của kháng thể có trình tự axit amin được thể hiện bằng DTCPPPMMSVEHADIWVKSYSLSYRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHW TTPSLKCIRDPALVHQRPAAPPSTVTTAGVTPQPESLSPSGKEPAASSGAEGGGASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSADKTHTCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP (SEQ ID NO:24).

Trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:24 được cải biến từ trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:6 bằng một sự thay thế axit amin Xystein (X) thành Alanin (A) ở vị trí 212. Sự thay thế này cho phép tạo ra xytokin miễn dịch chứa miền ổn định chuỗi nặng của kháng thể thứ nhất và miền ổn định chuỗi nhẹ của kháng thể nằm trong phức hợp

heterodime, không có sự liên kết cộng hóa trị bằng liên kết cầu S-S tự nhiên.

Theo một số phương án, xytokin miễn dịch chứa IL-15 được liên kết với các miền ổn định chuỗi nặng của kháng thể.

Theo một số phương án, xytokin miễn dịch chứa IL-15 được liên kết với các miền ổn định chuỗi nặng của kháng thể có trình tự axit amin được thể hiện bằng DNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLESGD ASIHDTVENLIILANDSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTSA GGKPGGSAGGASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SP (SEQ ID NO:5).

Theo một số phương án, xytokin miễn dịch chứa IL-15 được liên kết với các miền ổn định chuỗi nặng của kháng thể có trình tự axit amin được thể hiện bằng DNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLESGD ASIHDTVENLIILANDSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTSA GGKPGGSAGGASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSA DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SP (SEQ ID NO:23).

Trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:23 được cải biến từ trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:5 bằng một sự thay thế axit amin Xystein (X) thành Alanin (A) ở vị trí 229. Sự thay thế này cho phép tạo ra xytokin miễn dịch chứa miền ổn định chuỗi nặng của kháng thể thứ nhất và miền ổn định chuỗi nhẹ của kháng thể nằm trong phức hợp heterodime, không có sự liên kết cộng hóa trị bằng liên kết cầu S-S tự nhiên.

Theo một số phương án, xytokin miễn dịch chứa kháng thể điều biến miễn dịch hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, ức chế đặc hiệu con đường PD-1, và là kháng thể gắn

kết đặc hiệu với PD-1.

Sự gắn kết đặc hiệu có thể được xác định, ví dụ, bằng cách xác định sự gắn kết của một phân tử so với sự gắn kết của phân tử đối chứng. Ví dụ, sự gắn kết đặc hiệu có thể được xác định theo mức độ cạnh tranh với phân tử đối chứng tương tự với đích, ví dụ, lượng dư của đích không được đánh dấu. Trong trường hợp này, sự gắn kết đặc hiệu được thể hiện nếu sự gắn kết của đích được đánh dấu với đoạn dò bị ức chế cạnh tranh bởi lượng dư của đích không được đánh dấu. Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "sự gắn kết đặc hiệu" hoặc "gắn kết đặc hiệu với" hoặc "đặc hiệu với" a polypeptit cụ thể hoặc epitop trên đích polypeptit cụ thể có thể được mô tả bằng phân tử có giá trị K_d đối với đích ít nhất là khoảng 200nM, hoặc ít nhất là khoảng 150nM, hoặc ít nhất là khoảng 100nM, hoặc ít nhất là khoảng 60nM, hoặc ít nhất là khoảng 50nM, hoặc ít nhất là khoảng 40nM, hoặc ít nhất là khoảng 30nM, hoặc ít nhất là khoảng 20nM, hoặc ít nhất là khoảng 10nM, hoặc ít nhất là khoảng 8nM, hoặc ít nhất là khoảng 6nM, hoặc ít nhất là khoảng 4nM, hoặc ít nhất là khoảng 2nM, hoặc ít nhất là khoảng 1nM, hoặc lớn hơn. Theo một phương án, thuật ngữ "sự gắn kết đặc hiệu" để chỉ sự gắn kết trong đó một phân tử gắn kết với polypeptit cụ thể hoặc epitop trên polypeptit cụ thể mà gần như không gắn kết với polypeptit hoặc epitop polypeptit khác bất kỳ.

Theo một số phương án, xytokin miễn dịch chứa kháng thể điều biến miễn dịch bao gồm:

- a) chuỗi nhẹ chứa miền biến đổi chuỗi nhẹ và miền ổn định chuỗi nhẹ;
- b) chuỗi nặng chứa miền biến đổi chuỗi nặng và các miền ổn định chuỗi nặng của kháng thể chứa miền ổn định chuỗi nặng thứ nhất (CH1) và monome của mảnh Fc chứa các miền ổn định chuỗi nặng thứ hai (CH2) và thứ ba (CH3).

Theo một số phương án, xytokin miễn dịch chứa miền biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm các vùng LCDR 1, 2, và 3 (các vùng siêu biến 1, 2, và 3), được thể hiện bằng các trình tự axit amin GGNNIGSKNVH (SEQ ID NO:14), RDSNRPS (SEQ ID NO:15), và CQVWDSSTAV (SEQ ID NO:16), tương ứng.

Theo một số phương án, xytokin miễn dịch chứa miền biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin được thể hiện bằng

QPVL TQPLSVSVALGQTARITCGGNNIGSKNVHWYQQKPGQAPVLVIYRDSNRPSG
IPERFSGSNSGNTATLTISRAGDEADYYCQVWDSSTAVFGTGTKLTVLQ (SEQ ID
NO: 18).

Theo một số phương án, xytokin miễn dịch chứa miền biến đổi chuỗi nặng bao gồm các vùng HCDR 1, 2, và 3 (các vùng siêu biến 1, 2, và 3), được thể hiện bằng các trình tự axit amin FTFSSYWMY (SEQ ID NO:11), AIDTGGGRITYYADSVKG (SEQ ID NO:12), và CARDEGGGTGWGVLDKWPYGLDA (SEQ ID NO:13), tương ứng.

Theo một số phương án, xytokin miễn dịch chứa miền biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin được thể hiện bằng

QVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMYWVRQVPGKGLEWVSAIDTG
GGRTYYADSVKGRFAISRVNAKNTMYLQMNSLRAEDTAVYYCARDEGGGTGWG
VLKDWPYGLDAWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 17).

Theo một số phương án, xytokin miễn dịch chứa:

1) miền biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm các vùng LCDR 1, 2, và 3 (các vùng siêu biến 1, 2, và 3), được thể hiện bằng các trình tự axit amin GGNNIGSKNVH (SEQ ID NO: 14), RDSNRPS (SEQ ID NO: 15), và CQVWDSSTAV (SEQ ID NO: 16), tương ứng;

2) miền biến đổi chuỗi nặng bao gồm các vùng HCDR 1, 2, và 3 (các vùng siêu biến 1, 2, và 3), được thể hiện bằng các trình tự axit amin FTFSSYWMY (SEQ ID NO: 11), AIDTGGGRITYYADSVKG (SEQ ID NO: 12) và CARDEGGGTGWGVLDKWPYGLDA (SEQ ID NO: 13), tương ứng.

Theo một số phương án, xytokin miễn dịch chứa:

1) miền biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin được thể hiện bằng QPVLVTQPLSVSVALGQTARITCGGNNIGSKNVHWYQQKPGQAPVLVIYRDSNRPSG
IPERFSGSNSGNTATLTISRAQAGDEADYYCQVWDSSTAVFGTGTKLTVLQ (SEQ ID NO:18);

2) miền biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin được thể hiện bằng QVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMYWVRQVPGKGLEWVSAIDTG
GGRTYYADSVKGRFAISRVNAKNTMYLQMNSLRAEDTAVYYCARDEGGGTGWG
VLKDWPYGLDAWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:17).

Theo một số phương án, xytokin miễn dịch chứa kháng thể điều biến miễn dịch kháng thể bao gồm chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin được thể hiện bằng QPVLVTQPLSVSVALGQTARITCGGNNIGSKNVHWYQQKPGQAPVLVIYRDSNRPSG
IPERFSGSNSGNTATLTISRAQAGDEADYYCQVWDSSTAVFGTGTKLTVLQRTVAA
PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS
KDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO 8).

Theo một số phương án, xytokin miễn dịch chứa kháng thể điều biến miễn dịch bao gồm chuỗi nặng chứa trình tự axit amin được thể hiện bằng QVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMYWVRQVPGKGLEWVSAIDTG GGRTYYADSVKGRFAISRVNAKNTMYLQMNSLRAEDTAVYYCARDEGGGTGWG VLKDWPYGLDAWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVTVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSP (SEQ ID NO 7).

Theo một số phương án, xytokin miễn dịch chứa kháng thể điều biến miễn dịch bao gồm:

chuỗi nặng chứa trình tự axit amin được thể hiện bằng QVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMYWVRQVPGKGLEWVSAIDTG GGRTYYADSVKGRFAISRVNAKNTMYLQMNSLRAEDTAVYYCARDEGGGTGWG VLKDWPYGLDAWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVTVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSP (SEQ ID NO 7);

chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin được thể hiện bằng QPVLVTQPLSVSVALGQTARITCGGNNIGSKNVHWYQQKPGQAPVLVIYRDSNRPSG IPERFSGSNSGNTATLTISRAQAGDEADYYCQVWDSSTAVFGTGTKLTVLQRTVAA PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO 8).

Theo một số phương án, xytokin miễn dịch chứa kháng thể điều biến miễn dịch prolgolimab (BCD100, WO2018013017).

Theo một số phương án, xytokin miễn dịch chứa kháng thể điều biến miễn dịch hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, ức chế đặc hiệu con đường PD-1, là kháng thể gắn kết

đặc hiệu với PD-L1.

Theo một số phương án, kháng thể gắn kết đặc hiệu với PD-L1 là BCD135, đã được bộc lộ tornt Bằng độc quyền sáng chế Nga số RU2665790 (Công bố đơn quốc tế số WO2018194496).

Theo một số phương án, xytokin miễn dịch chứa:

a) phức hợp protein heterodime trên cơ sở IL-15/IL-15R α bao gồm:

IL-15R α được liên kết với miền ổn định chuỗi nhẹ của kháng thể có trình tự axit amin được thể hiện bằng

DTCPPMMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHW
TTPSLKCIRDPALVHQRPAAPPSTVTTAGVTPQPESLSPSGKEPAASSGAEGGGRTVA
APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD
SKDSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID
NO:1), và

IL-15 được liên kết với các miền ổn định chuỗi nặng của kháng thể có trình tự axit amin được thể hiện bằng

DNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGD
ASIHDTVENLIILANDSLSSNGNVTESGCKECEEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTSA
GGKPGGSAGGASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL
TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC
DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP
IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
NNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SP (SEQ ID NO:5);

b) điều biến miễn dịch kháng thể bao gồm:

chuỗi nặng chứa trình tự axit amin được thể hiện bằng
QVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMYWVRQVPGKGLEWVSAIDTG
GGRTYYADSVKGRFAISRVNAKNTMYLQMNSLRAEDTAVYYCARDEGGGTGWG
VLKDWPYGLDAWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF
PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS
NTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV
DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE

YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSLSCAVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE
ALHNHYTQKSLSLSP (SEQ ID NO 7);

chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin được thể hiện bằng
QPVLTPQLSVSVALGQTARITCGGNNIGSKNVHWYQQKPGQAPVLVIYRDSNRPSG
IPERFSGSNSGNTATLTISRAQAGDEADYYCQVWDSSTAVFGTGTKLTVLQRTVAA
PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS
KDYSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO 8).

Theo một số phương án, xytokin miễn dịch chứa:

a) phức hợp protein heterodime trên cơ sở IL-15/IL-15R α bao gồm:

IL-15R α được liên kết với miền ổn định chuỗi nhẹ của kháng thể có trình tự axit
amin được thể hiện bằng

DTCPPPMMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHW
TTPSLKCIRDPALVHQRPAAPPSTVTTAGVTPQPESLSPSGKEPAASSGAEGGGRTVA
APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD
SKDYSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEA (SEQ ID
NO:19), và

IL-15 được liên kết với các miền ổn định chuỗi nặng của kháng thể có trình tự axit
amin được thể hiện bằng

DNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLLELQVISLESGD
ASIHDTVENLIILANDSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTSA
GGKPGGSAGGASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL
TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSA
DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP
IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SP (SEQ ID NO:23);

b) kháng thể điều biến miễn dịch bao gồm:

chuỗi nặng chứa trình tự axit amin được thể hiện bằng
QVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMYWRQVPGKGLEWVSAIDTG
GGRTYYADSVKGRFAISR VNAKNTMYLQMNSLRAEDTAVYYCARDEGGGTGWG

VLKDWPYGLDAWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF
PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS
NTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVTV
DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE
ALHNHYTQKSLSLSP (SEQ ID NO 7);

chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin được thể hiện bằng
QPVLTLQPLSVSVALGQTARITCGGNNIGSKNVHWYQQKPGQAPVLVIYRDSNRPSG
IPERFSGSNSGNTATLTISRAQAGDEADYYCQVWDSSTAVFGTGTKLTVLQRTVAA
PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPPREAAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS
KDSYSTLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO 8).

Theo một số phương án, xytokin miễn dịch chứa:

a) IL-15 α được liên kết với các miền ổn định chuỗi nặng của kháng thể có trình tự axit amin được thể hiện bằng

DTCPPPMSEVHADIWVKSYSLSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHW
TTPSLKCIRDPAVLHQRPAAPPSTVTTAGVTPQPESLSPSGKEPAASSGAEGGGASTKG
PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVTVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR
EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF
FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP (SEQ ID NO:6), và

IL-15 được liên kết với miền ổn định chuỗi nhẹ của kháng thể có trình tự axit amin được thể hiện bằng

DNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLESGD
ASIHDTVENLIILANDSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTSA
GGKPGGSAGGRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPPREAAKVQWKVDN
ALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS
FNRGEC (SEQ ID NO:3);

b) kháng thể điều biến miễn dịch bao gồm:

chuỗi nặng chứa trình tự axit amin được thể hiện bằng

QVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMYWVRQVPGKGLEWVSAIDTG
GGRTYYADSVKGRFAISRVNAKNTMYLQMNSLRAEDTAVYYCARDEGGGTGWG
VLKDWPYGLDAWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF
PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS
NTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVTV
DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE
ALHNHYTQKSLSLSP (SEQ ID NO 7);

chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin được thể hiện bằng
QPVLTQPLSVSVALGQTARITCGGNNIGSKNVHWYQQKPGQAPVLVIYRDSNRPSG
IPERFSGSNSGNTATLTISRAGQAGDEADYYCQVWDSSTAVFGTGTCLTVLQRTVAA
PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS
KDYSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO 8).

Theo một số phương án, xytokin miễn dịch chứa:

a) IL-15 α được liên kết với các miền ổn định chuỗi nặng của kháng thể có trình tự axit amin được thể hiện bằng

DTCPPPMSEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHW
TTPSLKCIRDPALVHQRPAAPPSTVTTAGVTPQPESLSPSGKEPAASSGAEGGGASTKG
PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSADKTHTCPPCPAPEAAAG
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVTVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR
EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF
FLYSLKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP (SEQ ID NO:24), và

IL-15 được liên kết với miền ổn định chuỗi nhẹ của kháng thể có trình tự axit amin được thể hiện bằng

DNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLLELQVISLESGD
ASIHDTVENLILANDSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTSA
GGKPGGSAGGRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN
ALQSGNSQESVTEQDSKDYSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS
FNRGEA (SEQ ID NO:21);

b) kháng thể điều biến miễn dịch bao gồm:

chuỗi nặng chứa trình tự axit amin được thể hiện bằng

QVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMYWVRQVPGKGLEWVSAIDTG
GGRTYYADSVKGRFAISRVNAKNTMYLQMNSLRAEDTAVYYCARDEGGGTGWG
VLKDWPYGLDAWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF
PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS
NTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVTV
DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE
ALHNHYTQKSLSLSP (SEQ ID NO 7);

chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin được thể hiện bằng

QPVLTQPLSVSVALGQTARITCGGNNIGSKNVHWYQQKPGQAPVLVIYRDSNRPSG
IPERFSGSNSGNTATLTISRAQAGDEADYYCQVWDSSTAVFGTGTCLTVLQRTVAA
PSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNFPYQFVSRPDLGLSSEDTKYYVDQVWVNDLQ
KDSYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:
8).

Theo một số phương án, xytokin miễn dịch có sự đột biến trong các miền ổn định của kháng thể, tạo ra sự heterodime hóa của hai phần khác nhau, một phần trong đó chứa IL-15R α đã liên kết cộng hóa trị hoặc không cộng hóa trị được liên kết với các miền ổn định của kháng thể và IL-15 được liên kết với miền ổn định của kháng thể, và phần còn lại chứa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được liên kết cộng hóa trị hoặc không cộng hóa trị của kháng thể.

Theo một số phương án, xytokin miễn dịch chứa:

monome Fc thứ nhất và monome Fc thứ hai, được chọn từ nhóm sau đây: monome Fc thứ nhất Fc được cải biến bằng chỗ phình, và monome Fc thứ hai Fc được cải biến bằng chỗ lõm, hoặc khi monome Fc thứ hai Fc được cải biến bằng chỗ phình, và monome Fc thứ nhất Fc được cải biến bằng chỗ lõm.

Cụm từ "chỗ phình vào chỗ lõm" (sự tương tác của kiểu "chỗ phình vào chỗ lõm") là phương pháp cho phép giải quyết vấn đề liên quan đến các sản phẩm phụ bị ghép cặp sai. Phương pháp này nhằm mục đích ép buộc sự ghép đôi của hai chuỗi nặng của kháng thể khác nhau bằng cách đưa sự đột biến vào các miền CH3 để cải biến mặt phân cách tiếp xúc. Trên một chuỗi, các axit amin công kênh được thay thế bằng các axit amin có mạch bên

ngắn để tạo ra "chỗ lõm". Ngược lại, các axit amin có mạch bên lớn được đưa vào miền CH3 khác để tạo ra "chỗ phình". Bằng cách đồng biểu hiện hai chuỗi nặng này, quan sát được hiệu suất tạo ra heterodime ("chỗ phình-chỗ lõm") cao so với sự tạo ra homodime ("chỗ lõm-chỗ lõm" hoặc "chỗ phình-chỗ phình") (Ridgway, J. B., Presta L G, Carter P; và Công bố đơn quốc tế số WO 1996/027011). Tỷ lệ % của heterodime có thể được tăng thêm bằng cách tái cấu trúc mặt phân cách của hai miền CH3 bằng cách sử dụng kỹ thuật biểu hiện thể thực khuẩn và đưa liên kết cầu disulfua vào để làm ổn định heterodime (Merchant, A. M., et al, Nature Biotech 16 (1998) 677-681; Atwell, S., Ridgway, J. B., Wells, J. A., Carter, P., J Mol Biol 270 (1997) 26-35).

Theo một số phương án, xytokin miễn dịch chứa monome Fc thứ nhất có sự thay thế axit amin S354C/T366W, và monome Fc thứ hai có sự thay thế axit amin Y349C/T366S/L368A/Y407V.

Theo một số phương án, xytokin miễn dịch chứa monome Fc thứ nhất có sự thay thế axit amin Y349C/T366S/L368A/Y407, và monome Fc thứ hai có sự thay thế axit amin S354C/T366W.

Theo một số phương án, xytokin miễn dịch chứa mảnh Fc thuộc về IgG.

Theo một số phương án, xytokin miễn dịch chứa mảnh Fc, trong đó isotyp của mảnh Fc được chọn từ nhóm bao gồm: IgG1, IgG2, hoặc IgG4 của người.

Theo một số phương án, xytokin miễn dịch chứa sự đột biến trong monome của mảnh Fc, gây ra sự thiếu hụt của các đặc tính ADCC, CDC, và/hoặc ADCP trong xytokin miễn dịch nêu trên.

Ngoài ra, chất siêu chủ vận IL15 đặc hiệu kép hoặc xytokin miễn dịch IL15 đặc hiệu kép hoặc xytokin miễn dịch kháng PD1/IL15SA (kháng thể đơn dòng đặc hiệu kép chứa IL-15SA và mảnh Fab kháng PD-1) cần được hiểu có nghĩa là:

Fab-CK_IL15R α _Hc_IL15CH1Fcchỗ phìnhLALA kháng PD-1,

Fab- CK_IL15_Hc_IL15R α CH1Fcchỗ phìnhLALA kháng PD-1.

Ngoài ra, xytokin miễn dịch IL15SA/kháng PD-L1 cần được hiểu có nghĩa là:

Fab-CK_IL15R α _Hc_IL15CH1Fcchỗ phìnhLALA kháng PD-L1,

Fab- CK_IL15_Hc_IL15R α CH1Fcchỗ phìnhLALA kháng PD-L1.

Ý nghĩa của các ký hiệu Fab kháng PD-1, Fab kháng PD-L1, CK, IL15R α , IL15, CH1Fcchỗ phìnhLALA được đưa ra trong toàn bộ nội dung của đơn sáng chế này.

Fab-CK_IL15R α _Hc_IL15CH1Fcchỗ phìnhLALA kháng PD-1 là xytokin miễn dịch

nêu trên chứa mảnh Fab gắn kết kháng nguyên của kháng thể kháng PD1, IL15R α , được liên kết với miền ổn định chuỗi nhẹ của kháng thể CK, và IL15 được liên kết với các miền ổn định chuỗi nặng của kháng thể chứa miền ổn định chuỗi nặng thứ nhất (CH1) và monome của mảnh Fc chứa các miền ổn định chuỗi nặng thứ hai (CH2) và thứ ba (CH3), trong đó Fc chứa sự đột biến để tạo thành sự heterodime hóa (ví dụ, chỗ phình) và LALA.

Fab-CK_IL15_Hc_IL15R α CH1Fcchỗ phìnhLALA kháng PD-1 là xytokin miễn dịch nêu trên chứa mảnh Fab gắn kết kháng nguyên của kháng thể kháng PD1, IL15, được liên kết với miền ổn định chuỗi nhẹ của kháng thể CK, và IL15R α được liên kết với các miền ổn định chuỗi nặng của kháng thể chứa miền ổn định chuỗi nặng thứ nhất (CH1) và monome của mảnh Fc chứa các miền ổn định chuỗi nặng thứ hai (CH2) và thứ ba (CH3), trong đó Fc chứa sự đột biến để tạo ra sự heterodime hóa (ví dụ, chỗ phình) và LALA.

Fab-CK_IL15R α _Hc_IL15CH1Fcchỗ phìnhLALA kháng PD-L1 là xytokin miễn dịch trên đây chứa mảnh Fab gắn kết kháng nguyên của kháng thể kháng PD-L1, IL15R α , được liên kết với miền ổn định chuỗi nhẹ của kháng thể CK, và IL15 được liên kết với các miền ổn định chuỗi nặng của kháng thể chứa miền ổn định chuỗi nặng thứ nhất (CH1) và monome của mảnh Fc chứa các miền ổn định chuỗi nặng thứ hai (CH2) và thứ ba (CH3), trong đó Fc chứa sự đột biến để tạo ra sự heterodime hóa (ví dụ, chỗ phình) và LALA.

Fab- CK_IL15_Hc_IL15R α CH1Fcchỗ phìnhLALA kháng PD-L1 là xytokin miễn dịch trên đây chứa mảnh Fab gắn kết kháng nguyên của kháng thể kháng PD-L1, IL15, được liên kết với miền ổn định chuỗi nhẹ của kháng thể CK, và IL15R α được liên kết với các miền ổn định chuỗi nặng của kháng thể chứa miền ổn định chuỗi nặng thứ nhất (CH1) và monome của mảnh Fc chứa các miền ổn định chuỗi nặng thứ hai (CH2) và thứ ba (CH3), trong đó Fc chứa sự đột biến để tạo ra sự heterodime hóa (ví dụ, chỗ phình) và LALA.

Các xytokin miễn dịch trên đây có thể được tạo ra ở cả định dạng mà trong đó miền ổn định chuỗi nặng của kháng thể thứ nhất và miền ổn định chuỗi nhẹ của kháng thể trong phức hợp heterodime có sự liên kết cộng hóa trị bằng liên kết cầu S-S tự nhiên, và ở định dạng mà trong đó miền ổn định chuỗi nặng của kháng thể thứ nhất và miền ổn định chuỗi nhẹ của kháng thể trong phức hợp heterodime không có sự liên kết cộng hóa trị bằng liên kết cầu S-S tự nhiên; nhằm mục đích này, trong trường hợp cụ thể, cả hai xystein được thay thế bằng alanin.

Các nghiên cứu thực nghiệm về các xytokin miễn dịch trên đây ở cả định dạng mà trong đó miền ổn định chuỗi nặng của kháng thể thứ nhất và miền ổn định chuỗi nhẹ của

kháng thể trong phức hợp heterodime có sự liên kết cộng hóa trị bằng liên kết cầu S-S tự nhiên, và ở định dạng mà trong đó miền ổn định chuỗi nặng của kháng thể thứ nhất và miền ổn định chuỗi nhẹ của kháng thể trong phức hợp heterodime không có sự liên kết cộng hóa trị bằng liên kết cầu S-S tự nhiên, đã chứng minh không có sự khác biệt đáng kể về hoạt tính của các xytokin trên đây.

Như đã mô tả trên đây, thuật ngữ "chỗ phình" cần được hiểu với nghĩa là các đột biến tạo ra "chỗ phình vào chỗ lõm": cấu trúc giữa biến thể Fc thứ nhất và biến thể Fc thứ hai trong miền CH3.

Định dạng của xytokin miễn dịch trên đây được thể hiện trên Fig.3 và Fig.4.

Theo một số phương án, xytokin miễn dịch được sử dụng để điều trị bệnh ung thư hoặc bệnh tự miễn.

Theo một số phương án, xytokin miễn dịch được sử dụng để điều trị bệnh ung thư.

Axit nucleic

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến axit nucleic được phân lập mã hóa xytokin bất kỳ trong số các xytokin miễn dịch trên đây.

Các thuật ngữ "axit nucleic", "trình tự nucleic", "trình tự axit nucleic", "polynucleotit", "oligonucleotit", "trình tự polynucleotit" và "trình tự nucleotit", được sử dụng thay thế lẫn nhau trong bản mô tả này, để chỉ trình tự chính xác của các nucleotit, được cải biến hoặc không được cải biến, xác định mảnh hoặc vùng của axit nucleic, chứa hoặc không chứa các nucleotit không tự nhiên, và là ADN hoặc ARN sợi kép, ADN hoặc ARN sợi đơn, hoặc sản phẩm phiên mã của các ADN nêu trên.

Cũng cần lưu ý ở đây rằng sáng chế không đề cập đến các trình tự nucleotit trong môi trường nhiễm sắc thể tự nhiên của chúng, nghĩa là ở trạng thái tự nhiên. Các trình tự theo sáng chế đã được phân lập và/hoặc tinh chế, nghĩa là chúng được lấy mẫu theo cách trực tiếp hoặc gián tiếp, ví dụ, bằng cách sao chép, môi trường của chúng đã được cải biến ít nhất một phần. Do đó, thu được các axit nucleic đã phân lập bằng phương pháp di truyền tái tổ hợp, ví dụ, của các tế bào chủ, hoặc thu được bằng cách tổng hợp hóa học cũng cần được đề cập ở đây.

Phân tử axit nucleic "được phân lập" là phân tử được xác định và tách ra từ ít nhất một phân tử axit nucleic-tập chất mà phân tử này thường được gắn kết với nguồn tự nhiên. Phân tử axit nucleic được phân lập khác với hình dạng hoặc tập hợp mà trong đó nó được phát hiện trong điều kiện tự nhiên. Do đó, phân tử axit nucleic được phân lập khác với phân

tử axit nucleic tồn tại trong tế bào trong các điều kiện tự nhiên. Tuy nhiên, phân tử axit nucleic được phân lập bao gồm phân tử axit nucleic nằm trong tế bào mà trong đó xytokin miễn dịch thường được biểu hiện, ví dụ, nếu phân tử axit nucleic có sự định vị nhiễm sắc thể khác với sự định vị của nó trong các tế bào trong điều kiện bình thường.

Theo một số phương án, axit nucleic là ADN.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến phân tử axit nucleic chứa trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin được chọn từ các trình tự SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, hoặc 24. Phân tử axit nucleic cũng có thể chứa sự kết hợp bất kỳ của các trình tự nucleotit trên đây.

Như người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này đã biết, do sự dư thừa của mã di truyền, nhiều trình tự ADN khác nhau có thể mã hóa peptit bằng trình tự axit amin được chọn từ các trình tự SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, hoặc 24. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này cũng sẽ biết rõ cách tạo ra các trình tự ADN thay thế này để mã hóa chính các trình tự axit amin. Các trình tự ADN biến thể này vẫn nằm trong phạm vi của sáng chế.

Vector biểu hiện

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến vector biểu hiện chứa axit nucleic trên đây.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "vector" có nghĩa là phân tử axit nucleic có khả năng vận chuyển axit nucleic khác mà nó đã được liên kết với. Theo một số phương án, vector là plasmit, nghĩa là mảnh ADN sợi kép mạch vòng mà các đoạn ADN bổ sung có thể được gắn với. Theo một số phương án, vector là vector của virus, trong đó các đoạn ADN bổ sung có thể được gắn với hệ gen của virus. Theo một số phương án, các vector có khả năng tự sao chép trong tế bào chủ mà chúng được đưa vào (ví dụ, vector của virus có vị trí sao chép có nguồn gốc từ virus và các vector của động vật có vú thể bổ sung). Theo các phương án khác, các vector (ví dụ, các vector không phải của động vật có vú thể bổ sung) có thể được đính gắn vào hệ gen của tế bào chủ khi đưa vào tế bào chủ, và nhờ đó được sao chép cùng với gen của vật chủ. Ngoài ra, một số vector có khả năng định hướng sự biểu hiện của các gen mà chúng được liên kết với khi hoạt động. Các vector này được gọi ở đây là "vector biểu hiện tái tổ hợp" (hoặc đơn giản là "vector biểu hiện").

Sáng chế đề cập đến các vector chứa phân tử axit nucleic trên đây mã hóa trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin của xytokin miễn dịch trên đây hoặc các phần cấu trúc của nó như được mô tả ở đây.

Theo một số phương án, xytokin miễn dịch của sáng chế được biểu hiện bằng cách chèn ADN mã hóa một phần hoặc toàn bộ trình tự của các miền xytokin miễn dịch thứ nhất và thứ hai (ví dụ, miền chứa IL15 hoặc IL15R α được liên kết với (các) miền ổn định của kháng thể, và/hoặc chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể), được tạo ra như đã mô tả trên đây trong các vector biểu hiện sao cho các gen được liên kết khi hoạt động với các trình tự kiểm soát sự biểu hiện mong muốn, như các trình tự kiểm soát sự phiên mã và sự dịch mã. Các vector biểu hiện bao gồm các plasmid, retrovirus, adenovirus, virus liên quan đến adeno (adeno-kết hợp virus: AAV), các virus ở thực vật như virus bệnh đốm ở cây súp lơ, virus bệnh đốm ở cây thuốc lá, cosmid, YAC, episom có nguồn gốc từ EBV, và dạng tương tự. Các phân tử ADN có thể được gắn vào vector sao cho các trình tự kiểm soát sự phiên mã và sự dịch mã trong vector này thực hiện chức năng dự định của chúng là điều hòa sự phiên mã và sự dịch mã của ADN. Vector biểu hiện và các trình tự kiểm soát sự biểu hiện có thể được chọn để tương hợp được với tế bào chủ biểu hiện được sử dụng. Các phân tử ADN mã hóa một phần hoặc hoàn toàn các trình tự của miền gắn kết thứ nhất và thứ hai (ví dụ, các trình tự chuỗi nặng và chuỗi nhẹ trong đó miền gắn kết chứa trình tự chuỗi nặng và chuỗi nhẹ) có thể được đưa vào các vector riêng biệt. Theo một phương án, sự kết hợp bất kỳ của các phân tử ADN nêu trên được đưa vào cùng vector biểu hiện. Các phân tử ADN có thể được đưa vào vector biểu hiện bằng các phương pháp tiêu chuẩn (ví dụ, phương pháp gắn các vị trí giới hạn bổ trợ trên mảnh gen kháng thể và vector, hoặc gắn các đầu bằng nếu không có mặt các vị trí giới hạn).

Vector thích hợp là vector mã hóa các trình tự globulin miễn dịch hoàn toàn về mặt chức năng của vùng CH hoặc CL/CK của người, với thao tác ở vị trí giới hạn thích hợp sao cho trình tự vùng VH hoặc VL hoặc IL15 hoặc IL15R α bất kỳ có thể được chèn vào và biểu hiện một cách dễ dàng, như đã mô tả trên đây. Các gen mã hóa vùng HC và LC trong vector này có thể chứa các trình tự intron dẫn đến làm tăng tổng hiệu suất protein của kháng thể bằng cách làm ổn định mRNA tương ứng. Các trình tự intron nằm ở vùng rìa của các vị trí cho ghép nối và nhận ghép nối, để xác định xem sự ghép nối ARN sẽ xảy ra hay không. Vị trí của các trình tự intron có thể ở trong vùng biến đổi hoặc vùng ổn định của các chuỗi kháng thể, hoặc ở cả vùng biến đổi và vùng ổn định khi có nhiều intron được sử dụng. Sự kết thúc quá trình polyadenyl hóa và phiên mã có thể xuất hiện ở vị trí nhiễm sắc thể tự nhiên phía sau vùng mã hóa. Vector biểu hiện tái tổ hợp có thể mã hóa peptit tín hiệu để tạo điều kiện thuận lợi cho sự tiết ra chuỗi kháng thể từ tế bào chủ. Gen của chuỗi kháng thể

hoặc gen của chuỗi chứa IL15 hoặc IL15R α có thể được tách dòng vào vector theo cách sao cho peptit tín hiệu được liên kết khung đọc của đầu tận cùng amino của chuỗi globulin miễn dịch. Peptit tín hiệu có thể là peptit tín hiệu của globulin miễn dịch hoặc peptit tín hiệu khác loại (nghĩa là peptit tín hiệu từ protein không phải của globulin miễn dịch).

Ngoài các gen của chuỗi kháng thể hoặc gen của chuỗi chứa IL15 hoặc IL15R α , sự biểu hiện của vector tái tổ hợp theo sáng chế có thể chứa các trình tự điều hòa để kiểm soát sự biểu hiện của gen trong tế bào chủ. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rằng việc thiết kế vector biểu hiện, bao gồm cả sự chọn lọc các trình tự điều hòa, có thể phụ thuộc vào các yếu tố như sự lựa chọn tế bào chủ được biến nạp, mức độ biểu hiện protein mong muốn, v.v.. Các trình tự kiểm soát được ưu tiên để biểu hiện tế bào chủ ở các động vật có vú bao gồm các thành phần của virus để đảm bảo sự biểu hiện ở mức cao của protein trong tế bào của động vật có vú, như các gen khởi đầu và/hoặc gen tăng cường có nguồn gốc từ LTR của retrovirus, virus cự bào (cytomegalovirus: CMV) (như gen khởi đầu/gen tăng cường của CMV), virus SV40 ở khỉ (simian virus 40: SV40) (như gen khởi đầu/gen tăng cường của SV40), adenovirus, (ví dụ, adenovirus của gen khởi đầu muộn chính (AdMLP)), polyomavirus và các gen khởi đầu của động vật có vú mạnh như gen khởi đầu của globulin miễn dịch tự nhiên hoặc gen khởi đầu actin. Phần mô tả thêm các thành phần kiểm soát của virus và các trình tự của chúng, ví dụ, xem tài liệu: các Bằng độc quyền sáng chế Mỹ số US 5.168.062, 4.510.245 và 4.968.615. Các phương pháp biểu hiện polypeptit trong tế bào vi khuẩn hoặc tế bào nấm, ví dụ, các tế bào nấm men, cũng đã được biết rõ trong lĩnh vực này.

Ngoài các gen và trình tự điều hòa trên đây, các vector biểu hiện tái tổ hợp của sáng chế có thể mang các trình tự bổ sung, như các trình tự điều hòa sự sao chép của vector trong các tế bào chủ (ví dụ, các vị trí bắt đầu sao chép) và các gen đánh dấu có thể chọn lọc. Các gen đánh dấu có thể chọn lọc tạo điều kiện thuận lợi cho sự chọn lọc tế bào chủ mà vector đã được đưa vào đó (ví dụ, xem các Bằng độc quyền sáng chế Mỹ số US 4.399.216, 4.634.665 và 5.179.017). Ví dụ, gen đánh dấu có thể chọn lọc thường tạo ra sự kháng lại các chất dùng làm thuốc, như G418, hygromycin hoặc methotrexat, trên tế bào chủ mà vector đã được đưa vào. Ví dụ, các gen đánh dấu có thể chọn lọc bao gồm gen dihydrofolat reductaza (dihydrofolate reductase: DHFR) (để sử dụng trong các tế bào chủ-DHFR trong khi chọn lọc/khuếch đại bằng methotrexat), gen neo (đối với sự chọn lọc G418), và gen glutamat synthetaza.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "trình tự kiểm soát sự biểu hiện" để chỉ các trình tự polynucleotit cần thiết để tác động đến sự biểu hiện và xử lý trình tự mã hóa mà chúng được gắn vào. Các trình tự kiểm soát sự biểu hiện bao gồm sự khởi mào, sự kết thúc quá trình phiên mã thích hợp, các trình tự của gen khởi đầu và gen tăng cường; các tín hiệu xử lý ARN hiệu quả như tín hiệu ghép và tín hiệu polyadenyl hóa; các trình tự làm ổn định mRNA trong bào chất; các trình tự làm gia tăng hiệu quả dịch mã (nghĩa là trình tự liên ứng Kozak); các trình tự làm gia tăng tính ổn định của protein; và nếu muốn, các trình tự làm gia tăng sự tiết protein. Tính chất của các trình tự kiểm soát này khác nhau tùy thuộc vào sinh vật chủ; ở các sinh vật có nhân nguyên thủy, các trình tự kiểm soát này thường bao gồm gen khởi đầu của vị trí gắn kết ribosom, và các trình tự kết thúc phiên mã; ở các sinh vật có nhân chuẩn, các trình tự kiểm soát này thường bao gồm gen khởi đầu và trình tự kết thúc phiên mã. Thuật ngữ "trình tự kiểm soát" được dự định bao gồm ít nhất là tất cả các thành phần mà sự có mặt của chúng là thiết yếu cho sự biểu hiện và xử lý, và cũng có thể bao gồm các thành phần bổ sung mà sự có mặt của chúng là có lợi, ví dụ, các trình tự đoạn dẫn đầu và trình tự của đối tác dung hợp.

Thuật ngữ "trình tự kiểm soát" để chỉ các trình tự ADN cần thiết cho sự biểu hiện của trình tự mã hóa được liên kết khi hoạt động trong sinh vật chủ cụ thể. Các trình tự kiểm soát là thích hợp đối với các sinh vật có nhân nguyên thủy, ví dụ, bao gồm gen khởi đầu, tùy ý là trình tự gen điều khiển, và vị trí gắn kết ribosom. Các tế bào có nhân điển hình đã được biết là sử dụng các gen khởi đầu, tín hiệu polyadenyl hóa, và gen tăng cường.

Axit nucleic được "liên kết khi hoạt động" khi nó được đưa vào mối quan hệ về mặt chức năng với trình tự axit nucleic khác. Ví dụ, ADN của tiền trình tự hoặc trình tự dẫn đầu tiết được liên kết khi hoạt động với ADN của polypeptit nếu nó được biểu hiện dưới dạng tiền protein tham gia vào sự tiết polypeptit; gen khởi đầu hoặc gen tăng cường được liên kết khi hoạt động với trình tự mã hóa nếu nó ảnh hưởng đến sự phiên mã trình tự; vị trí gắn kết ribosom được liên kết khi hoạt động với trình tự mã hóa nếu nó nằm ở vị trí sao cho tạo điều kiện thuận lợi cho sự dịch mã. Nói chung, thuật ngữ "được liên kết khi hoạt động" có nghĩa là các trình tự ADN được liên kết ở gần nhau, và trong trường hợp trình tự dẫn đầu tiết, ở gần nhau và trong pha đọc. Tuy nhiên, gen tăng cường không nhất thiết phải ở gần nhau.

Tế bào chủ và phương pháp tạo ra

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến phương pháp tạo ra tế bào chủ để tạo ra xytokin miễn dịch trên đây, phương pháp này bao gồm bước biến nạp tế bào này với vectơ

trên đây.

Các phân tử axit nucleic mã hóa các xytokin miễn dịch của sáng chế và vectơ chứa các phân tử axit nucleic này có thể được sử dụng để chuyển nhiễm động vật có vú thích hợp hoặc tế bào của nó, thực vật hoặc tế bào của nó, tế bào chủ của vi khuẩn hoặc nấm men. Quá trình biến nạp có thể được thực hiện bằng kỹ thuật đã biết bất kỳ để đưa các polynucleotit vào tế bào chủ. Các phương pháp để đưa polynucleotit khác loài vào tế bào của động vật có vú là đã được biết rõ trong lĩnh vực này và bao gồm phương pháp chuyển nhiễm qua trung gian dextran, phương pháp chuyển nhiễm bằng phức chất polyme cation-axit nucleic, phương pháp kết tủa bằng canxi phosphat, phương pháp chuyển nhiễm qua trung gian polybren, phương pháp dung hợp tế bào trần, phương pháp bao nang (các) polynucleotit trong liposom, và phương pháp vi tiêm trực tiếp ADN vào nhân. Ngoài ra, các phân tử axit nucleic có thể được đưa vào tế bào động vật có vú bằng vectơ của virus. Các phương pháp chuyển nhiễm tế bào là đã được biết rõ trong lĩnh vực này. Ví dụ, xem các Bằng độc quyền sáng chế Mỹ số US 4.399.216, 4.912.040, 4.740.461 và 4.959.455. Các phương pháp biến nạp tế bào thực vật là đã được biết rõ trong lĩnh vực này bao gồm, ví dụ, phương pháp biến nạp qua trung gian vi khuẩn *Agrobacterium*, phương pháp biến nạp bằng cách bắn gen, phương pháp tiêm trực tiếp, phương pháp gây xung điện và phương pháp biến nạp bằng virus. Các phương pháp biến nạp tế bào vi khuẩn và nấm men cũng đã được biết rõ trong lĩnh vực này.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến tế bào chủ để tạo ra xytokin miễn dịch trên đây, xytokin này chứa axit nucleic trên đây.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến phương pháp tạo ra dược chất chứa xytokin miễn dịch trên đây, phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ trên đây trong môi trường nuôi cấy trong các điều kiện đủ để tạo ra xytokin miễn dịch trên đây, nếu cần, sau đó phân lập và tinh chế xytokin miễn dịch tạo thành.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "tế bào chủ tái tổ hợp" (hoặc đơn giản là "tế bào chủ") để chỉ tế bào mà vectơ biểu hiện tái tổ hợp đã được đưa vào đó. Sáng chế đề cập đến tế bào chủ, có thể bao gồm, ví dụ, vectơ theo sáng chế được mô tả trên đây. Sáng chế còn đề cập đến tế bào chủ chứa, ví dụ, trình tự nucleotit mã hóa xytokin miễn dịch hoặc các phần trên đây của nó theo sáng chế. Cần hiểu rằng "tế bào chủ tái tổ hợp" và "tế bào chủ" để chỉ không chỉ tế bào của đối tượng cụ thể mà còn để chỉ thế hệ con của tế bào này. Do các cải biến này có thể xuất hiện trong các thế hệ tiếp theo do sự đột biến hoặc sự

ảnh hưởng của môi trường, trên thực tế, thể hệ con này có thể không giống hệt với tế bào bố-mẹ, tuy nhiên, các tế bào này vẫn được bao gồm trong phạm vi của thuật ngữ "tế bào chủ" khi được sử dụng trong bản mô tả này.

Các dòng tế bào động vật có vú được sử dụng làm vật chủ để biến nạp là đã được biết rõ trong lĩnh vực này và bao gồm nhiều dòng tế bào bất tử có sẵn. Các dòng tế bào này bao gồm, ví dụ, tế bào buồng trứng chuột đồng Trung Quốc (Chinese hamster ovary: CHO), tế bào NS0, tế bào SP2, tế bào HEK-293T, tế bào FreeStyle 293 (Invitrogen), tế bào NIH-3T3, tế bào HeLa, tế bào thận chuột đồng sơ sinh (baby hamster kidney: BHK), tế bào thận khí xanh châu Phi (COS), tế bào caxinom tế bào gan của người (ví dụ, Hep G2), tế bào A549, và nhiều dòng tế bào khác. Các dòng tế bào được chọn lọc bằng cách xác định xem các dòng tế bào này có mức độ biểu hiện cao và tạo ra các đặc tính cần thiết của protein được tạo ra hay không. Các dòng tế bào khác có thể được sử dụng là dòng tế bào côn trùng, như các tế bào Sf9 hoặc Sf21. Khi các vector biểu hiện tái tổ hợp mã hóa xytokin miễn dịch của sáng chế hoặc phần của nó được đưa vào tế bào chủ của động vật có vú, các xytokin miễn dịch được tạo ra bằng cách nuôi cấy các tế bào chủ trong khoảng thời gian đủ để cho phép sự biểu hiện của xytokin miễn dịch hoặc phần của nó theo sáng chế trong các tế bào chủ, hoặc, tốt hơn nữa là sự tiết ra xytokin miễn dịch vào môi trường nuôi cấy mà trong đó các tế bào chủ được nuôi cấy. Các xytokin miễn dịch có thể được phân lập từ môi trường nuôi cấy này bằng cách sử dụng các kỹ thuật tinh chế protein tiêu chuẩn. Các tế bào chủ của thực vật bao gồm, ví dụ, giống *Nicotiana*, *Arabidopsis*, bèo tấm, ngô, lúa mì, khoai tây, v.v.. Các tế bào chủ của vi khuẩn bao gồm các loài *Escherichia* và *Streptomyces*. Các tế bào chủ của nấm men bao gồm *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae* và *Pichia pastoris*.

Ngoài ra, mức độ tạo ra xytokin miễn dịch của sáng chế từ dòng tế bào có thể được tăng lên bằng cách sử dụng nhiều kỹ thuật đã biết. Ví dụ, hệ thống biểu hiện gen glutamin synthetaza (hệ thống GS) là phương pháp chung để làm gia tăng mức độ biểu hiện trong một số điều kiện. Hệ thống GS được bàn luận trong toàn bộ hoặc một phần nội dung của các Bằng độc quyền sáng chế châu Âu số EP 0216846, 0256055, 0323997 và 0338841.

Xytokin miễn dịch hoặc phần của nó theo sáng chế trong các dòng tế bào hoặc tế bào chủ khác nhau sẽ có kiểu glycosyl hóa khác nhau. Tuy nhiên, xytokin miễn dịch như được bộc lộ ở đây hoặc phần (miền) của nó chứa các trình tự axit amin được đề xuất ở đây là một phần của sáng chế, bất kể mức độ glycosyl hóa phân tử gắn kết, và nói chung là bất kể sự có

mặt hoặc không có mặt của các cải biến sau dịch mã.

Dược phẩm

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến dược phẩm để kích thích sự hoạt hóa và/hoặc tăng sinh của các tế bào dương tính với IL-15Rbeta/gama, dược phẩm này chứa xytokin miễn dịch trên đây với lượng có hiệu quả điều trị, kết hợp với một hoặc nhiều tá dược được dụng.

"Dược phẩm" để chỉ chế phẩm chứa xytokin miễn dịch của sáng chế và ít nhất một trong số các thành phần được chọn từ nhóm bao gồm các tá dược được dụng và tương hợp được về mặt dược lý, như chất độn, dung môi, chất pha loãng, chất mang, chất phụ trợ, chất phân bố, chất giải phóng, chất bảo quản, chất làm ổn định, chất nhũ hóa, chất tạo hỗn dịch, chất làm đặc, chất kiểm soát sự giải phóng kéo dài, sự lựa chọn và tỷ lệ của chúng phụ thuộc vào loại và đường sử dụng và liều lượng. Các dược phẩm của sáng chế và phương pháp bào chế chúng chắc chắn sẽ trở nên rõ ràng với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Tốt hơn là các dược phẩm này cần được sản xuất theo các yêu cầu của Hướng dẫn thực hành sản xuất tốt (Good Manufacturing Practice: GMP). Dược phẩm có thể chứa hỗn hợp chất đệm, chất đẳng trương, chất làm ổn định và chất hòa tan. Tác dụng kéo dài của dược phẩm có thể đạt được bằng các chất làm chậm hấp thu thành phần có hoạt tính dược, ví dụ, nhôm monostearat và gelatin. Ví dụ về các chất mang, dung môi, chất pha loãng và chất giải phóng thích hợp bao gồm nước, etanol, ury đa chức và các hỗn hợp của chúng, dầu, và các este hữu cơ dùng để tiêm.

Thuật ngữ "lượng có hiệu quả điều trị" để chỉ lượng chất điều trị được sử dụng để sẽ làm giảm một hoặc nhiều triệu chứng của rối loạn được điều trị đến mức độ nhất định.

Thuật ngữ "thuốc (dược chất)" là hợp chất hoặc hỗn hợp của các hợp chất dưới dạng dược phẩm ở dạng viên nén, viên nang, bột, sản phẩm đông khô nhanh, thuốc tiêm, tiêm truyền, thuốc mỡ và các dạng sử dụng được ngay khác được dùng để phục hồi, cải thiện hoặc cải biến các chức năng sinh lý ở người và động vật, và để điều trị và phòng ngừa bệnh, để chẩn đoán, gây mê, tránh thai, mỹ phẩm và các mục đích khác. Phương pháp bất kỳ để sử dụng các peptit, protein hoặc các kháng thể đã được chấp nhận trong lĩnh vực này có thể được sử dụng theo cách thích hợp đối với xytokin miễn dịch của sáng chế.

Thuật ngữ "dược dụng" để chỉ một hoặc nhiều thành phần dạng rắn hoặc lỏng tương hợp được, các thành phần này thích hợp để sử dụng ở động vật có vú, tốt hơn là ở người.

Thuật ngữ "tá dược" được sử dụng trong bản mô tả này để mô tả thành phần bất kỳ

không phải các thành phần nêu trên của sáng chế. Các thành phần này là chất hữu cơ hoặc vô cơ được sử dụng trong khi sản xuất dược phẩm để tạo ra các sản phẩm dược chất có các đặc tính lý hóa cần thiết.

Thuật ngữ "chất đệm", "hỗn hợp chất đệm", "tác nhân đệm" để chỉ dung dịch có khả năng chống lại sự thay đổi độ pH nhờ tác dụng của các thành phần liên hợp axit-bazơ của nó, và cho phép sản phẩm xytokin miễn dịch của sáng chế chống lại sự thay đổi độ pH. Nói chung, tốt hơn là được phẩm có độ pH nằm trong khoảng từ 4,0 đến 8,0. Ví dụ về các chất đệm được sử dụng bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các dung dịch đệm axetat, phosphat, xitrat, histidin, succinat, v.v..

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, các thuật ngữ "chất đẳng trương", "chất điều hòa áp lực thẩm thấu" hoặc "chất thẩm thấu", để chỉ tá dược có thể làm tăng áp suất thẩm thấu của dạng bào chế kháng thể dạng lỏng. Dược chất "đẳng trương" là dược chất có áp suất thẩm thấu tương đương với áp suất thẩm thấu trong máu của người. Các dược chất đẳng trương thường có áp suất thẩm thấu nằm trong khoảng từ khoảng 250 đến 350 mOsm/kg. Các chất đẳng trương được sử dụng bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, polyol, sacarit và sucroza, axit amin, các muối kim loại, ví dụ, natri clorua, v.v..

Thuật ngữ "chất ổn định" để chỉ tá dược hoặc hỗn hợp của hai hoặc nhiều tá dược để tạo ra tính ổn định lý học và/hoặc hóa học của chất có hoạt tính. Các chất làm ổn định bao gồm các axit amin, ví dụ, nhưng không chỉ giới hạn ở, arginin, histidin, glyxin, lysin, glutamin, prolin; các chất hoạt động bề mặt, ví dụ, nhưng không chỉ giới hạn ở, polysorbat 20 (tên thương mại: Tween 20), polysorbat 80 (tên thương mại: Tween 80), polyetylen-polypropylen glycol và các copolyme của chúng (tên thương mại: Poloxamer, Pluronic, natri dodexyl sulfat (SDS); các chất chống oxy hóa, ví dụ, nhưng không chỉ giới hạn ở, methionin, axetylxytein, axit ascorbic, monothioglycerol, các muối của axit sulfuro, v.v.; các chất chelat hóa, ví dụ, nhưng không chỉ giới hạn ở, axit etylenđiamintetraaxetic (EDTA), axit dietylenetriaminpentaaxetic (DTPA), natri xitrat, v.v..

Dược phẩm có tính "ổn định" nếu chất có hoạt tính vẫn giữ được tính ổn định lý học và/hoặc tính ổn định hóa học và/hoặc hoạt tính sinh học của nó trong khoảng thời hạn sử dụng cụ thể ở nhiệt độ bảo quản, ví dụ, nằm trong khoảng từ 2 đến 8°C. Tốt hơn là chất có hoạt tính vẫn giữ được cả tính ổn định lý học và hóa học, cũng như hoạt tính sinh học. Khoảng thời gian bảo quản được điều chỉnh dựa trên kết quả thử nghiệm tính ổn định trong điều kiện gia tốc hoặc lão hóa tự nhiên.

Dược phẩm của sáng chế có thể được sản xuất, bao gói, hoặc bán rộng rãi ở dạng một liều dùng đơn vị đơn lẻ hoặc nhiều liều dùng đơn vị đơn lẻ ở dạng bào chế dùng được ngay. Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "liều dùng đơn vị đơn lẻ" để chỉ lượng riêng biệt của dược phẩm chứa lượng định trước của thành phần hoạt tính. Lượng thành phần hoạt tính thường bằng liều dùng của thành phần hoạt tính cần được sử dụng ở đối tượng, hoặc một phần thuận tiện của liều dùng này, ví dụ, một nửa hoặc một phần ba của liều dùng này.

Các dược phẩm theo sáng chế thường thích hợp để sử dụng ngoài đường tiêu hóa dưới dạng bào chế vô khuẩn để sử dụng trong cơ thể người qua lỗ thủng trong da hoặc hàng rào niêm mạc, đi qua đường dạ dày-ruột bằng cách tiêm, tiêm truyền và cấy. Ví dụ, việc sử dụng ngoài đường tiêu hóa được dự định bao gồm, ngoài các cách khác, tiêm hoặc tiêm truyền dưới da, trong màng bụng, trong cơ, trong xương ức, trong tĩnh mạch, trong động mạch, trong vỏ, trong tâm thất, trong niệu đạo, trong sọ, trong bao hoạt dịch, qua chân bì; và các kỹ thuật tiêm truyền-thẩm tách ở thận. Phương pháp giải phóng trong khối u, ví dụ, tiêm trong khối u, cũng có thể được sử dụng. Phương pháp tiêm truyền theo vùng cũng được đề xuất. Các phương án được ưu tiên bao gồm đường trong tĩnh mạch và dưới da. Phương pháp bất kỳ để sử dụng peptit hoặc protein đã được chấp nhận trong lĩnh vực này có thể được sử dụng theo cách thích hợp đối với xytokin miễn dịch của sáng chế.

Dạng bào chế dùng để tiêm có thể được tạo ra, bao gói, hoặc bán, mà không chỉ giới hạn ở, dạng liều dùng đơn vị, như trong ampun, lọ nhỏ, trong đồ chứa bằng chất dẻo, bơm tiêm được nạp sẵn, dụng cụ tiêm tự động. Các dạng bào chế để sử dụng ngoài đường tiêu hóa bao gồm, ngoài các dạng khác, hỗn dịch, dung dịch, nhũ tương trong dầu hoặc bazơ trong nước, thuốc mỡ, và dạng tương tự.

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất chế phẩm để sử dụng ngoài đường tiêu hóa chứa dược phẩm được tạo ra ở dạng khô (nghĩa là bột hoặc hạt) để hoàn nguyên bằng bazơ thích hợp (ví dụ, nước không chứa chất gây sốt vô khuẩn) trước khi sử dụng. Dạng bào chế này có thể được tạo ra bằng, ví dụ, quy trình đông khô nhanh, đã biết trong lĩnh vực này dưới dạng sấy khô ở nhiệt độ thấp, và quy trình này bao gồm bước đông lạnh sản phẩm, sau đó loại bỏ dung môi ra khỏi chất đã đông lạnh.

Xytokin miễn dịch của sáng chế cũng có thể được sử dụng qua đường trong mũi hoặc bằng cách hít, một mình, dưới dạng hỗn hợp với tá dược được dụng thích hợp từ dụng cụ hít, như đồ chứa khí dung được gia áp, bơm, dụng cụ phun, dụng cụ phun mù, hoặc máy khí

dung, trong đó chất đẩy thích hợp được sử dụng hoặc không được sử dụng, hoặc hoặc dưới dạng thuốc nhỏ mũi dạng giọt hoặc phun.

Các dạng liều dùng để sử dụng ngoài đường tiêu hóa có thể bào chế để giải phóng tức thì hoặc được cải biến. Các dạng bào chế có sự giải phóng được cải biến bao gồm sự giải phóng được làm chậm, duy trì, theo chu kỳ, có kiểm soát, hướng đích và theo chương trình.

Theo một số phương án, dược phẩm được sử dụng để điều trị bệnh ung thư hoặc bệnh tự miễn.

Theo một số phương án, dược phẩm được sử dụng để điều trị bệnh tự miễn.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "bệnh tự miễn" để chỉ bệnh hoặc rối loạn không phải ác tính do và kháng lại các kháng nguyên và/hoặc mô (nội tại) của chính đối tượng.

Sự định nghĩa của "bệnh tự miễn" bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, bệnh viêm đa khớp dạng thấp, bệnh viêm xương khớp, bệnh viêm khớp mạn tính tuổi thiếu niên, bệnh viêm khớp nhiễm khuẩn, bệnh viêm xương khớp Lyme, bệnh viêm khớp vảy nến, bệnh viêm khớp phản ứng, bệnh lý khớp cột sống, bệnh lupút ban đỏ toàn thân, bệnh Crohn, bệnh viêm ruột kết mạn loét, bệnh viêm ruột, bệnh đái tháo đường, bệnh viêm tuyến giáp, bệnh hen, bệnh dị ứng, bệnh vảy nến, bệnh viêm da dị ứng, bệnh cứng bì, phản ứng “mô ghép chống túc chủ”, tình trạng thải ghép cơ quan, các bệnh miễn dịch cấp tính hoặc mạn tính liên quan đến sự ghép cơ quan, bệnh sarcoit, bệnh Kawasaki, bệnh Graves, hội chứng thận hư, hội chứng mệt mỏi mãn tính, bệnh u hạt Wegener, bệnh ban xuất huyết Henoch-Schonlein, bệnh viêm mạch thận vi mô, bệnh viêm gan hoạt động mãn tính, bệnh viêm màng bồ đào, bệnh sốc nhiễm khuẩn, hội chứng sốc do độc tố, hội chứng nhiễm trùng huyết, bệnh suy nhược, hội chứng suy giảm miễn dịch mắc phải, bệnh viêm tủy ngang cấp tính, chứng múa giật Huntington, bệnh Parkinson, bệnh Alzheimer, bệnh đột quỵ, bệnh xơ gan mật nguyên phát, bệnh thiếu máu tan huyết, hội chứng suy hô hấp (cấp tính) ở người trưởng thành, bệnh rụng tóc, bệnh rụng tóc từng vùng, bệnh khớp huyết thanh âm tính, bệnh khớp, bệnh Reiter, bệnh khớp vảy nến liên quan đến bệnh khớp do viêm ruột kết mạn loét, các bệnh dị ứng, bệnh bong nước tự miễn, bệnh pemphigut thông thường, bệnh pemphigut dạng mảng lớn, bệnh pemphigoit, bệnh IgA dạng dài, bệnh thiếu máu tan huyết tự miễn, bệnh thiếu máu tan huyết dương tính Coombs, bệnh thiếu máu ác tính, bệnh thiếu máu ác tính tuổi thiếu niên, bệnh viêm khớp, bệnh viêm gan A xơ hóa nguyên phát, bệnh viêm gan tự

miễn nguồn gốc ẩn, bệnh phổi xơ hóa, bệnh viêm phế nang xơ hóa nguồn gốc ẩn, các bệnh phổi kẽ sau khi viêm, bệnh viêm phổi kẽ, bệnh viêm phổi ưa eosin mạn tính, bệnh phổi kẽ sau khi nhiễm khuẩn, bệnh viêm khớp do gút, bệnh viêm gan tự miễn, bệnh viêm gan tự miễn typ I (bệnh viêm gan tự miễn dạng cổ điển hoặc lupoit), bệnh viêm gan tự miễn typ II, bệnh viêm xương khớp, bệnh viêm đường mật xơ hóa nguyên phát, bệnh vẩy nến typ I, bệnh vẩy nến typ II, bệnh giảm bạch cầu vô căn, bệnh giảm bạch cầu trung tính tự miễn, các bệnh NOS thận, bệnh viêm cầu thận, bệnh viêm mạch thận vi mô, bệnh lupút ban đỏ dạng đĩa, bệnh vô sinh ở nam giới vô căn hoặc do NOS, tính tự miễn với tinh trùng, bệnh xơ cứng rải rác (tất cả các kiểu phụ), bệnh viêm mắt đồng cảm, bệnh tăng huyết áp động mạch phổi thứ phát do bệnh mô liên kết, hội chứng Goodpasture, biểu hiện ở phổi của bệnh viêm đa khớp dạng nốt, bệnh thấp khớp cấp, bệnh viêm đốt sống dạng thấp, bệnh viêm đốt sống cứng khớp, bệnh Still, bệnh xơ cứng toàn thân, hội chứng Sjögren, bệnh Takayasu, bệnh giảm lượng tiểu cầu tự miễn, bệnh giảm lượng tiểu cầu vô căn, bệnh tuyến giáp tự miễn, bệnh cường giáp, bệnh Hashimoto, bệnh suy giáp thể teo tự miễn, bệnh phù niêm nguyên phát, viêm màng bồ đào do thủy tinh thể, bệnh viêm mạch nguyên phát, bệnh bạch biến, các bệnh gan cấp tính, các bệnh gan mạn tính, các bệnh dị ứng, bệnh hen, các rối loạn tâm thần (bao gồm cả bệnh trầm cảm và bệnh tâm thần phân liệt), các bệnh qua trung gian typ Th2/typ Th1, bệnh viêm kết mạc, bệnh viêm da tiếp xúc dị ứng, bệnh viêm mũi dị ứng, bệnh suy giảm alpha-1-kháng trypsin, bệnh xơ cứng cột bên teo cơ, bệnh thiếu máu, bệnh xơ hóa nang, các rối loạn liên quan đến liệu pháp xytokin, bệnh mất myelin, bệnh viêm da, bệnh viêm dây thần kinh thị giác/viêm móng mắt-thể mi/viêm màng mạch nhỏ, tổn thương do thiếu máu cục bộ-tái tưới máu, chứng đột quỵ do thiếu máu cục bộ, bệnh viêm đa khớp dạng thấp tuổi thiếu niên, bệnh ruột non tự miễn, bệnh mất thính lực tự miễn, hội chứng tăng sinh mô bạch huyết tự miễn, bệnh viêm cơ tim tự miễn, vùng suy buồng trứng sớm tự miễn, và bệnh viêm mí mắt.

Theo một số phương án, được phẩm được sử dụng để điều trị bệnh lý ung thư.

Các thuật ngữ "bệnh lý ung thư", "bệnh ung thư" và "có ung thư" để chỉ tình trạng sinh lý hoặc mô tả tình trạng sinh lý ở các động vật có vú thường được đặc trưng bởi sự phát triển/tăng sinh của các tế bào không được kiểm soát. Ví dụ về các bệnh ung thư bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, bệnh caxinom, u lymphô, u nguyên bào, bệnh sacôm, và bệnh bạch cầu. Các ví dụ cụ thể hơn về các bệnh ung thư này bao gồm bệnh ung thư tế bào có vảy, bệnh ung thư phổi tế bào nhỏ, bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ, caxinom tuyến phổi

và caxinom dạng vảy của phổi, bệnh ung thư màng bụng, bệnh ung thư tế bào gan, bệnh ung thư dạ dày bao gồm cả bệnh ung thư đường dạ dày-ruột, bệnh ung thư tụy, u nguyên bào xóp, u thần kinh đệm, bệnh ung thư cổ tử cung, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư gan, bệnh ung thư bàng quang, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư ruột kết, bệnh ung thư kết-trực tràng, caxinom màng trong tử cung hoặc tử cung, caxinom tuyến nước bọt, bệnh ung thư vùng thận hoặc thận, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh ung thư âm hộ, bệnh ung thư tuyến giáp, bệnh caxinom gan, bệnh caxinom hậu môn, bệnh caxinom dương vật, u melanin, và các bệnh ung thư vùng đầu và cổ khác nhau.

Theo một số phương án, dược phẩm được sử dụng để điều trị bệnh lý ung thư là bệnh được chọn từ nhóm bao gồm: HNSCC (bệnh caxinom tế bào có vảy vùng đầu và cổ), bệnh ung thư cổ tử cung, bệnh ung thư nguyên phát chưa rõ nguyên nhân, u nguyên bào xóp, bệnh ung thư thực quản, bệnh ung thư bàng quang, TNBC (bệnh ung thư vú bộ ba âm tính), CRC (bệnh ung thư kết-trực tràng), bệnh caxinom tế bào gan, u melanin, NSCLC (bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ), bệnh ung thư thận, bệnh ung thư buồng trứng, MSI CRC (bệnh ung thư kết-trực tràng có tính không ổn định vi vệ tinh), bệnh bạch cầu (bệnh bạch cầu cấp tính hoặc bệnh bạch cầu nguyên thủy bào), u lymphô, bệnh đa u tủy, u melanin, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư kết-trực tràng, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh ung thư bàng quang, bệnh sacôm, bệnh caxinom tế bào gan, u nguyên bào xóp, u lymphô Hodgkin, bệnh bạch cầu nguyên bào lymphô cấp tính tế bào T và B, bệnh ung thư phổi tế bào nhỏ, bệnh bạch cầu nguyên thủy bào cấp tính, u lymphô tế bào B không Hodgkin dai dẳng, u lymphô thể nang, u lymphô tế bào B vùng rìa, u lymphô tế bào B lớn lan tỏa, bệnh caxinom tế bào có vảy vùng đầu và cổ, bệnh ung thư tụy, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh bạch cầu nguyên thủy bào cấp tính và hội chứng loạn sản tủy nguy cơ cao.

Thuật ngữ "hoạt tính chống tăng sinh" được dự định để chỉ việc làm ngừng hoặc ức chế sự phát triển của các tế bào, như các tế bào ung thư.

Thuật ngữ " IC_{50} " (nồng độ ức chế 50%) để chỉ nồng độ dược chất mà khi đó hoạt tính hoặc mức độ đáp ứng có thể xác định được, ví dụ, sự phát triển/tăng sinh của các tế bào như các tế bào khối u, được ức chế 50%. Giá trị IC_{50} có thể được tính toán bằng cách sử dụng đường cong mức độ đáp ứng-liều thích hợp, sử dụng phần mềm thống kê đặc biệt để làm khớp đường cong.

Thuật ngữ GI50 (ức chế sự phát triển 50%) để chỉ nồng độ của dược chất mà khi đó sự tăng sinh của các tế bào, như các tế bào khối u, được ức chế 50%.

Thuật ngữ "ED50" (EC50) (liều dùng/nồng độ có hiệu quả 50%) để chỉ nồng độ của dược chất tạo ra hiệu quả sinh học 50% (hiệu quả này có thể bao gồm tính gây độc tế bào).

Phương pháp điều trị/sử dụng để điều trị

Theo một khía cạnh, sáng chế mô tả phương pháp điều trị bệnh lý ung thư, phương pháp này bao gồm bước cho đối tượng cần điều trị sử dụng xytokin miễn dịch nêu trên hoặc dược phẩm nêu trên, với lượng có hiệu quả điều trị.

Các thuật ngữ "điều trị", "sự điều trị" và "liệu pháp" để chỉ phương pháp làm giảm bớt hoặc làm mất rối loạn sinh học và/hoặc ít nhất một trong số các triệu chứng đi kèm của nó. Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "làm giảm bớt" bệnh, rối loạn hoặc tình trạng bệnh có nghĩa là làm giảm mức độ nặng và/hoặc tần suất xuất hiện các triệu chứng của bệnh, rối loạn, hoặc tình trạng bệnh. Ngoài ra, sự đề cập ở đây đến "sự điều trị" bao gồm sự đề cập đến việc điều trị chữa khỏi, làm giảm tạm thời và phòng bệnh.

Theo một khía cạnh, đối tượng của việc điều trị, hoặc bệnh nhân là động vật có vú, tốt hơn nếu đối tượng là người. Đối tượng này có thể là nam hoặc nữ ở độ tuổi bất kỳ.

Thuật ngữ "bệnh" có nghĩa là tình trạng bệnh bất kỳ mà sẽ có lợi từ việc điều trị theo sáng chế. Sự định nghĩa của thuật ngữ này bao gồm các bệnh hoặc rối loạn cấp tính và mạn tính.

Theo một số phương án của phương pháp điều trị, bệnh lý ung thư được chọn từ nhóm bao gồm: HNSCC (bệnh caxinom tế bào có vảy vùng đầu và cổ), bệnh ung thư cổ tử cung, bệnh ung thư nguyên phát chưa rõ nguyên nhân, u nguyên bào xộp, bệnh ung thư thực quản, bệnh ung thư bàng quang, TNBC (bệnh ung thư vú bộ ba âm tính), CRC (bệnh ung thư kết-trực tràng), bệnh caxinom tế bào gan, u melanin, NSCLC (bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ), bệnh ung thư thận, bệnh ung thư buồng trứng, MSI CRC (bệnh ung thư kết-trực tràng có tính không ổn định vi vệ tinh), bệnh bạch cầu (bệnh bạch cầu cấp tính hoặc bệnh bạch cầu nguyên thủy bào), u lymphô, bệnh đa u tủy, u melanin, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư kết-trực tràng, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh ung thư bàng quang, bệnh sacôm, bệnh caxinom tế bào gan, u nguyên bào xộp, u lymphô Hodgkin, bệnh bạch cầu nguyên bào lymphô cấp tính tế bào T và B, bệnh ung thư phổi tế bào nhỏ, bệnh bạch cầu nguyên thủy bào cấp tính, u lymphô tế bào B không Hodgkin dai dẳng, u lymphô thể nang, u lymphô tế bào B vùng rìa, u lymphô tế bào B lớn lan tỏa, bệnh caxinom tế bào có vảy vùng đầu và cổ, bệnh ung thư tụy, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh bạch cầu nguyên thủy bào cấp tính và hội chứng loạn sản tủy nguy cơ cao.

Theo một khía cạnh, sáng chế mô tả phương pháp hoạt hóa hoạt tính sinh học của quần thể tế bào T hoặc quần thể tế bào NK ở đối tượng cần có sự hoạt hóa này, phương pháp này bao gồm bước cho đối tượng sử dụng lượng hữu hiệu của xytokin miễn dịch trên đây hoặc được phẩm trên đây.

Theo một khía cạnh, sáng chế mô tả việc sử dụng xytokin miễn dịch nêu trên hoặc được phẩm nêu trên để điều trị ở đối tượng cần điều trị bệnh lý ung thư.

Trong một số ứng dụng, bệnh lý ung thư được chọn từ nhóm bao gồm: HNSCC (bệnh caxinom tế bào có vảy vùng đầu và cổ), bệnh ung thư cổ tử cung, bệnh ung thư nguyên phát chưa rõ nguyên nhân, u nguyên bào xộp, bệnh ung thư thực quản, bệnh ung thư bàng quang, TNBC (bệnh ung thư vú bộ ba âm tính), CRC (bệnh ung thư kết-trực tràng), bệnh caxinom tế bào gan, u melanin, NSCLC (bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ), bệnh ung thư thận, bệnh ung thư buồng trứng, MSI CRC (bệnh ung thư kết-trực tràng có tính không ổn định vi vệ tinh), bệnh bạch cầu (bệnh bạch cầu cấp tính hoặc bệnh bạch cầu nguyên tủy bào), u lymphô, bệnh đa u tủy, u melanin, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư kết-trực tràng, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh ung thư bàng quang, bệnh sacôm, bệnh caxinom tế bào gan, u nguyên bào xộp, u lymphô Hodgkin, bệnh bạch cầu nguyên bào lymphô cấp tính tế bào T và B, bệnh ung thư phổi tế bào nhỏ, bệnh bạch cầu nguyên tủy bào cấp tính, u lymphô tế bào B không Hodgkin dai dẳng, u lymphô thể nang, u lymphô tế bào B vùng rìa, u lymphô tế bào B lớn lan tỏa, bệnh caxinom tế bào có vảy vùng đầu và cổ, bệnh ung thư tụy, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh bạch cầu nguyên tủy bào cấp tính và hội chứng loạn sản tủy nguy cơ cao.

Trong trường hợp khối u (ví dụ, bệnh ung thư), lượng có hiệu quả điều trị của xytokin miễn dịch của sáng chế có thể làm giảm số lượng tế bào ung thư; làm giảm kích thước khối u ban đầu; ức chế (nghĩa là làm chậm đến mức độ nhất định và tốt hơn là làm ngừng) sự thâm nhiễm của tế bào ung thư vào các cơ quan ngoại vi; ức chế (nghĩa là làm chậm đến mức độ nhất định và tốt hơn là làm ngừng) sự di căn của khối u; ức chế sự phát triển của khối u đến mức độ nhất định; và/hoặc làm giảm đến mức độ nhất định một hoặc nhiều triệu chứng liên quan đến rối loạn. Xytokin miễn dịch của sáng chế có thể ngăn ngừa sự phát triển và/hoặc tiêu diệt các tế bào ung thư có mặt đến mức độ nhất định, tác dụng này có thể là kìm tế bào và/hoặc gây độc tế bào. Trong việc điều trị bệnh ung thư, hiệu quả *in vivo* có thể được xác định, ví dụ, bằng cách đánh giá sự sống, thời gian để khối u tiến triển (TTP), tỷ lệ đáp ứng của khối u với việc điều trị (RR), khoảng thời gian đáp ứng và/hoặc

chất lượng cuộc sống.

Các xytokin miễn dịch của sáng chế có thể được sử dụng mà không cần sự điều trị khác, nghĩa là dưới dạng liệu pháp độc lập. Ngoài ra, việc điều trị bằng xytokin miễn dịch của sáng chế có thể bao gồm ít nhất một chế độ điều trị bổ sung (liệu pháp kết hợp). Theo một số phương án, xytokin miễn dịch có thể được sử dụng cùng với hoặc được bào chế với thuốc/chế phẩm khác để điều trị bệnh ung thư.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, các thuật ngữ "sử dụng đồng thời", "được sử dụng đồng thời" và "kết hợp với", để chỉ xytokin miễn dịch của sáng chế và một hoặc nhiều chất điều trị khác, được dự định có nghĩa là, để chỉ hoặc bao gồm các định nghĩa sau:

1) việc sử dụng đồng thời tổ hợp của xytokin miễn dịch theo sáng chế và chất điều trị cho bệnh nhân cần điều trị, khi các thành phần này được bào chế cùng nhau thành dạng liều dùng đơn lẻ mà dạng này sẽ giải phóng các thành phần nêu trên ở thời điểm gần như đồng thời vào bệnh nhân nêu trên,

2) việc sử dụng gần như đồng thời tổ hợp của xytokin miễn dịch theo sáng chế và chất điều trị cho bệnh nhân cần điều trị, khi các thành phần này được bào chế riêng biệt với nhau thành các dạng liều dùng riêng rẽ, các dạng liều này được sử dụng gần như đồng thời bởi bệnh nhân nêu trên, sau đó các thành phần nêu trên được giải phóng gần như đồng thời vào bệnh nhân này,

3) việc sử dụng lần lượt tổ hợp của xytokin miễn dịch theo sáng chế và chất điều trị cho bệnh nhân cần điều trị, khi các thành phần này được bào chế riêng biệt với nhau thành các dạng liều dùng riêng rẽ, các dạng liều này được sử dụng ở các thời điểm liên nhau bởi bệnh nhân nêu trên với khoảng thời gian cách nhau đáng kể giữa mỗi lần sử dụng, sau đó các thành phần nêu trên được giải phóng ở các thời điểm khác nhau đáng kể vào bệnh nhân nêu trên; và

4) việc sử dụng lần lượt tổ hợp của xytokin miễn dịch theo sáng chế và chất điều trị cho bệnh nhân cần điều trị, khi các thành phần này được bào chế cùng nhau thành dạng liều dùng đơn lẻ, dạng liều dùng này giải phóng các thành phần nêu trên theo cách có kiểm soát, sau đó chúng được giải phóng đồng thời, liên tiếp, hoặc cùng nhau ở các thời điểm giống nhau và/hoặc khác nhau vào bệnh nhân nêu trên, trong đó mỗi phần có thể được sử dụng qua đường sử dụng giống nhau hoặc khác nhau.

Xytokin miễn dịch của sáng chế có thể được kết hợp với chất điều trị được chọn từ nhóm bao gồm: chất gây độc tế bào, chất hóa trị liệu, chất kháng hormon, hoặc kháng thể

điều trị khác.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "chất gây độc tế bào" để chỉ chất ức chế hoặc ngăn ngừa chức năng của các tế bào và/hoặc gây ra sự phá hủy các tế bào. Thuật ngữ này được dự định bao gồm radioactive isotopes (ví dụ, At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} và các đồng vị có hoạt tính phóng xạ của Lu), các chất hóa trị liệu, và các độc tố như các độc tố phân tử nhỏ hoặc các độc tố có hoạt tính enzym có nguồn gốc từ vi khuẩn, nấm, thực vật hoặc động vật, bao gồm cả các mảnh và/hoặc biến thể của chúng.

Thuật ngữ "chất hóa trị liệu" là hợp chất hóa học hữu ích trong việc điều trị bệnh ung thư. Ví dụ về các chất hóa trị liệu bao gồm các chất alkyl hóa như thiotepa và xyclophosphamid (CYTOXAN[®]); các hợp chất alkyl sulfonat như busulfan, improsulfan và piposulfan; các hợp chất aziridin như benzodopa, carboquone, meturedopa, và uredopa; các hợp chất etylenimin và metylamelamin bao gồm altretamin, trietylenmelamin, trietylenphosphoramit, trietylenphosphoramin và trimetylmelamin; các hợp chất axetogenin (ví dụ, bulataxin và bulataxinon); delta-9- tetrahydrocannabinol (dronabinol, MARINOL[®]); beta-lapachon; lapachol; các hợp chất colchixin; axit betulonic; camptothecin (bao gồm cả chất tương tự topotecan tổng hợp (HYCAMTIN[®]), CPT-11 (irinotecan, CAMPTOSAR[®]), axetylcamptothecin, scoplectin, và 9-aminocamptothecin); bryostatin; calystatin; CC-1065 (bao gồm cả các chất tương tự adozelesin, carzelesin và bizelesin tổng hợp của nó); podophylotoxin; axit podophylinic; teniposet; các hợp chất cryptophycin (ví dụ, cryptophycin 1 và cryptophycin 8); dolastatin; duocarmyxin (bao gồm cả các chất tương tự tổng hợp KW-2189 và CB1-TM1); eleutherobin; pancratistatin; sarcodictyin; spongistatin; hơi cay nitơ như chlorambucil, chlornaphazin, cholophosphamid, estramustin, ifosfamid, mechlorethamin, mechlorethamin oxit hydroclorua, melphalan, novembichin, phenesterin, prednimustin, trofosfamid, hơi cay uraxil; các hợp chất nitrosure như carmustin, chlorozotoxin, fotemustin, lomustin, nimustin, và ranimnustin; các chất kháng sinh như chất kháng sinh enediyn (ví dụ, calicheamixin như calicheamixin gama II và calicheamixin omega II (ví dụ, xem tài liệu: Agnew, Chem. Intl. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994))); dynemixin, bao gồm cả dynemixin A; esperamixin; cũng như nhóm mang màu neocarzinostatin và nhóm mang màu kháng sinh chromoprotein liên quan), aclacinomycin, actinomycin, anthramycin, azaserin, bleomycin, cactinomycin, carabixin, carminomycin, carzinophilin, chromomycinis, dactinomycin, daunorubicin, detorubicin, 6-diazo-5-oxo-L-norleuxin, doxorubicin (bao gồm cả ADRIAMYCIN[®], morpholino-doxorubicin,

xyanomorpholino-doxorubixin, 2-pyrolino-doxorubixin, thuốc tiêm doxorubixin HCl dạng liposom (DOXOL[®]), doxorubixin TLC D-99 dạng liposom (MYOCET[®]), doxorubixin dạng liposom được peglyl hóa (CAELYX[®]), và deoxydoxorubixin), epirubixin, esorubixin, idarubixin, marcellomyxin, mitomyxin như mitomyxin C, axit mycophenolic, nogalamyxin, olivomyxin, peplomyxin, potfiromyxin, puromyxin, quelamyxin, rodorubixin, streptonigrin, streptozoxin, tubexidin, ubenimex, zinostatin, zorubixin; các chất chống chuyển hóa như methotrexat, gemxitabin (GEMZAR[®]), tegafur (UFTORAL[®]), capecitabin (XELODA[®]), epothilon, và 5-flouraxil (5-FU); chất tương tự axit folic như denopterin, methotrexat, pteropterin, trimetrexat; các chất tương tự purin như fludarabin, 6-mercaptopurin, thiamiprin, thioguanin; các chất tương tự pyrimidin như anxitabin, azaxitidin, 6-azauridin, carmofur, xytarabin, dideoxyuridin, doxifluridin, enoxitabin, floxuridin; các chất kháng adrenalin như aminoglutethimit, mitotan, trilostan; chất bổ sung axit folic như axit frolinic; axeglaton; aldophosphamitglycosit; axit aminolevulinic; eniluraxil; amsacrin; bestrabuxil; bisantren; edatraxat; defofamin; demecolcin; diaziquone; elfornithin; eliptini axetat; etoglucid; gali nitrat; hydroxyure; lentinan; lonidainin; các hợp chất maytansinoit như maytansin và ansamitoxin; mitoguazon; mitoxantron; mopidanmol; nitraerin; pentostatin; phenamet; pirarubixin; losoxantron; 2-etylhydrazit; procarbazin; các phức chất polysacarit PSK[®] (các sản phẩm tự nhiên JHS, Eugen, hoặc); razoxan; rhizoxin; sizofiran; spirogermani; axit tenuazonic; triaziquon; 2,2',2"-triclotrietylamin; các hợp chất trichothexen (ví dụ, độc tố T-2, verracurin A, roridin A và anguidin); urethan; dacarbazin; mannomustin; mitobronitol; mitolactol; pipobroman; gaxytosin; arabinosit ("Ara-C"); thiotepa; taxoit, ví dụ, paclitaxel (TAXOL[®]), dạng bào chế nano hạt được thiết kế với albumin của paclitaxel (ABRAXANETM), và docetaxel (TAXOTERE[®]); clorambuxil; 6-thioguanin; mercaptopurin; methotrexat; các chất platin như cisplatin, oxaliplatin, và carboplatin; các hợp chất vinca, ngăn ngừa sự polyme hóa tubulin khỏi sự tạo ra vi ống, bao gồm cả vinblastin (VELBAN[®]), vincristin (ONCOVIN[®]), vindesin (ELDISINE[®]), FILDESIN[®]), và vinorelbin (NAVELBINE[®]); etoposit (VP-16); ifosfamid; mitoxantron; leucovorin; novantron; edatrexat; daunomyxin; aminopterin; ibandronat; chất ức chế topoisomeraza RFS 2000; diflometylornithin (DMFO); các hợp chất retinoit như axit retinoic, bao gồm cả bexaroten (TARGRETIN[®]); các hợp chất bisphosphonat như clodronat (ví dụ, BONEFOS[®] hoặc OSTAC[®]), etidronat (DIDROCAL[®]), NE- 58095, axit zoledronic/zoledronat (ZOMETA[®]), alendronat (FOSAMAJX[®]), pamidronat (AREDIA[®]),

tiludronat (SKELID[®]), hoặc risedronat (ACTONEL[®]); troxaxitabin (chất tương tự 1,3-dioxolan nucleosit xytosin); các hợp chất oligonucleotit đối nghĩa, ví dụ, các hợp chất ức chế sự biểu hiện của các gen trong còn đường truyền tín hiệu liên quan đến sự tăng sinh tế bào bất thường, ví dụ như PKC-alpha, Raf, H-Ras, và thụ thể yếu tố sinh trưởng biểu bì (epidermal growth factor receptor: EGF-R); các vaccin như vaccin THERATOPE[®] và các vaccin liệu pháp gen, ví dụ, vaccin ALLOVECTIN[®], vaccin LEUVECTIN[®], và vaccin VAXID[®]; chất ức chế topoisomeraza 1 (ví dụ, LURTOTECAN[®]); rmRH (ví dụ, ABARELIX[®]); BAY439006 (sorafenib; Bayer); SU-11248 (Pfizer); perifosin, chất ức chế COX-2 (ví dụ, celecoxib hoặc etoricoxib), chất ức chế proteosom (ví dụ, PS341); bortezomib (VELCADE[®]); CCI-779; tipifarnib (811577); orafenib, ABT510; chất ức chế Bcl-2 như oblimersen natri (GENA SENSE[®]); pixantron; các chất ức chế EGFR (xem định nghĩa dưới đây); các chất ức chế tyrosin kinaza (xem định nghĩa dưới đây); và các muối, axit hoặc dẫn xuất dược dụng của hợp chất bất kỳ trong số các hợp chất trên đây; cũng như tổ hợp của hai hoặc nhiều chất trên đây như CHOP, chữ viết tắt của liệu pháp kết hợp của xyclophosphamit, doxorubixin, vincristin, và prednisolon, và FOLFOX, chữ viết tắt của chế độ điều trị bằng oxaliplatin (ELOXATINTM) được kết hợp với 5-FU và leucovorin.

Cũng được bao gồm trong định nghĩa này là các chất kháng hormon có tác dụng điều hòa hoặc ức chế tác dụng đối với các khối u, như các chất kháng estrogen có profin chủ vận/đối kháng hỗn hợp bao gồm tamoxifen (NOLVADEX[®]), 4-hydroxytamoxifen, trioxifen, toremifen (FARESTON[®]), idoxifen, droloxifen, raloxifen (EVTSTA[®]), trioxifen, keoxifen, và các chất điều biến estrogen chọn lọc (selective estrogen receptor modulator: SERM), như SERM3; các chất kháng estrogen tinh khiết mà không có đặc tính chủ vận, như fulvestrant (FASLODEX[®]), và EM800 (các chất này có thể phong bế sự dime hóa thụ thể estrogen (estrogen receptor: ER), ức chế sự gắn kết ADN, làm gia tăng sự chu chuyển ER, và/hoặc ức chế nồng độ ER); các chất ức chế aromataza, bao gồm cả các chất ức chế aromataza steroid, như formestan và exemestan (AROMASIN[®]), và các chất ức chế aromataza không steroid, như anastrozol (AREVIIDEX[®]), letrozol (FEMARA[®]) và aminoglutethimit, và các chất ức chế aromataza khác bao gồm cả vorozol (RIVISOR[®]), megestrol axetat (MEGASE[®]), fadrozol, imidazol; chất chủ vận hormon giải phóng hormon tạo thể vàng, bao gồm cả leuprolit (LUPRON[®] và ELIGARD[®]), goserelin, buserelin, và triptorelin; các hợp chất steroid giới tính, bao gồm cả progestin, như megestrol axetat và medroxyprogesteron axetat, các hợp chất estrogen, như diethylstilbestrol và premarin, và các

hợp chất androgen/retinoit như fluoxymesteron, axit all-trans retionic và fenretinit; onapriston; các chất kháng progesteron; các chất điều hòa giảm thụ thể estrogen (estrogen receptor down-regulator: ERD); các chất kháng androgen, như flutamit, nilutamit và bicalutamit; testolacton; và các muối, axit hoặc dẫn xuất dược dụng của hợp chất bất kỳ trong số các chất trên đây; cũng như dạng kết hợp của hai hoặc nhiều chất trên đây.

Chất điều trị khác có thể được sử dụng kết hợp với xytokin miễn dịch của sáng chế có thể là kháng thể điều trị được chọn từ nhóm bao gồm các kháng thể với PD1 (ví dụ, prolgolimab, pembrolizumab hoặc nivolumab), các kháng thể với PD-L1, các kháng thể với CTLA4, các kháng thể với 4-1BB, các kháng thể với OX40, các kháng thể với GITR, các kháng thể với CD20 (ví dụ, rituximab), các kháng thể với HER2 (ví dụ, trastuzumab hoặc pertuzumab), các kháng thể với VEGF (ví dụ, bevacizumab), hoặc các dạng kết hợp của chúng.

Chất điều trị khác có thể được sử dụng kết hợp với xytokin miễn dịch theo sáng chế có thể là hợp chất kháng u có hoạt tính điều trị được chọn từ nhóm các chất hoạt hóa tính tính miễn dịch bẩm sinh hoặc tính miễn dịch thích ứng.

Cần hiểu rằng xytokin miễn dịch của sáng chế có thể được sử dụng trong các phương pháp điều trị, như đã mô tả trên đây, trong việc điều trị như đã mô tả trên đây, và/hoặc trong quá trình sản xuất thuốc dùng để điều trị đã mô tả trên đây.

Liều dùng và đường sử dụng

Xytokin miễn dịch của sáng chế sẽ được sử dụng với lượng có hiệu quả trong việc điều trị tình trạng bệnh cần điều trị, nghĩa là với liều và trong khoảng thời gian cần thiết để đạt được kết quả mong muốn. Lượng có hiệu quả điều trị có thể thay đổi theo các yếu tố như tình trạng bệnh cụ thể cần được điều trị, độ tuổi, giới tính, và trọng lượng cơ thể của bệnh nhân, và việc xytokin miễn dịch được sử dụng một mình hoặc kết hợp với một hoặc nhiều dược chất hoặc kỹ thuật điều trị bổ sung hay không.

Chế độ dùng liều có thể được điều chỉnh để tạo ra mức độ đáp ứng mong muốn tối ưu. Ví dụ, một liều lớn có thể được sử dụng, vài liều chia nhỏ có thể được sử dụng theo thời gian hoặc liều dùng này có thể được giảm đi hoặc tăng lên tương ứng như được chỉ định theo các tình huống điều trị. Đặc biệt có lợi nếu bào chế được phẩm dùng ngoài đường tiêu hóa theo dạng liều dùng đơn vị để dễ sử dụng và tính đồng đều của liều lượng. Khi được sử dụng trong bản mô tả này, dạng liều dùng đơn vị được dùng để chỉ các đơn vị riêng rẽ về mặt vật lý thích hợp làm liều dùng đơn vị cho các bệnh nhân/đối tượng cần được điều trị;

mỗi đơn vị chứa lượng định trước của hợp chất có hoạt tính được tính toán để tạo ra hiệu quả điều trị mong muốn kết hợp với chất mang được dụng mong muốn. Tiêu chuẩn kỹ thuật của các dạng liều dùng đơn vị theo sáng chế thường được quyết định theo và phụ thuộc trực tiếp vào (a) các đặc tính đặc biệt của chất hóa trị liệu và tác dụng phòng bệnh hoặc điều trị cụ thể cần đạt được, và (b) các hạn chế vốn có trong lĩnh vực bào chế hợp chất có hoạt tính dùng để điều trị có tính miễn cảm ở các đối tượng.

Do đó, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, dựa vào phần mô tả được đưa ra ở đây, sẽ hiểu rằng các liều dùng và chế độ dùng liều được điều chỉnh theo các phương pháp đã được biết rõ trong lĩnh vực điều trị. Điều này có nghĩa là liều được dung nạp tối đa có thể được thiết lập dễ dàng, và lượng hữu hiệu tạo ra hiệu quả điều trị mong muốn cho bệnh nhân cũng có thể được xác định, do các yêu cầu tạm thời đối với việc sử dụng mỗi chất có thể tạo ra hiệu quả điều trị có thể nhận thấy cho bệnh nhân. Do đó, trong khi liều dùng và chế độ sử dụng nhất định được ví dụ ở đây, các ví dụ này không làm giới hạn các liều dùng và chế độ sử dụng có thể được cung cấp cho bệnh nhân trong khi thực hành các phương án của sáng chế.

Cần lưu ý rằng các giá trị liều dùng có thể thay đổi theo loại và mức độ nặng của tình trạng cần được làm thuyên giảm, và có thể bao gồm một hoặc nhiều liều. Ngoài ra, cần hiểu rằng đối với đối tượng cụ thể bất kỳ, chế độ dùng liều cụ thể cần được điều chỉnh theo thời gian tùy theo nhu cầu của đối tượng và sự đánh giá của chuyên gia y tế về việc sử dụng hoặc theo dõi việc sử dụng được phẩm, và các khoảng liều dùng được đưa ra trong bản mô tả này chỉ là ví dụ và không dự định làm giới hạn phạm vi hoặc sự thực hành được phẩm theo sáng chế. Ngoài ra, chế độ dùng liều với các dược phẩm theo sáng chế này có thể dựa trên nhiều yếu tố khác nhau bao gồm loại bệnh, độ tuổi, trọng lượng, giới tính, tình trạng sức khỏe bệnh nhân, mức độ nặng của tình trạng bệnh, đường sử dụng, và xytokin miễn dịch cụ thể của sáng chế được sử dụng. Do đó, chế độ dùng liều này có thể thay đổi trong khoảng rộng, nhưng có thể được xác định theo cách thông thường bằng cách sử dụng các phương pháp tiêu chuẩn. Ví dụ, các liều dùng có thể được điều chỉnh dựa trên các thông số dược động học hoặc dược lực học, các thông số này có thể bao gồm các hiệu quả lâm sàng như tác dụng gây độc và/hoặc giá trị trong phòng thí nghiệm. Do đó, sáng chế bao gồm cả sự tăng liều dùng ở bệnh nhân như được xác định bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Các phương pháp xác định liều dùng và chế độ thích hợp là đã được biết rõ trong lĩnh vực này và sẽ được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này hiểu rõ dựa vào các ý

tương được bộc lộ ở đây.

Ví dụ về các phương pháp sử dụng thích hợp đã đề xuất trên đây.

Chắc chắn là liều dùng thích hợp của xytokin miễn dịch theo sáng chế sẽ nằm trong khoảng từ 0,1 đến 200 mg/kg, tốt hơn là từ 0,1 đến 100 mg/kg, bao gồm cả khoảng từ 0,5 đến 50 mg/kg, ví dụ khoảng từ 1 đến 20 mg/kg. Xytokin miễn dịch có thể được sử dụng, ví dụ, với liều ít nhất bằng 0,25 mg/kg, như ít nhất bằng 0,5 mg/kg, bao gồm cả liều dùng ít nhất bằng 1 mg/kg, ví dụ, ít nhất bằng 1,5 mg/kg, như ít nhất bằng 2 mg/kg, ví dụ, ít nhất bằng 3 mg/kg, bao gồm cả ít nhất bằng 4 mg/kg, ví dụ, ít nhất bằng 5 mg/kg; và ví dụ, đến mức tối đa bằng 50 mg/kg, bao gồm cả đến mức tối đa bằng 30 mg/kg, ví dụ, đến mức tối đa bằng 20 mg/kg, bao gồm cả đến mức tối đa bằng 15 mg/kg. Việc sử dụng này sẽ thường được lặp lại trong các khoảng thời gian thích hợp, như mỗi tuần một lần, hai tuần một lần, ba tuần một lần hoặc bốn tuần một lần, và miễn là trong khoảng thời gian được cho là thích hợp bởi bác sĩ điều trị mà trong một số trường hợp, có thể tăng hoặc giảm liều dùng, nếu cần.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ sau đây được đưa ra để hiểu rõ hơn sáng chế. Các ví dụ này được đưa ra chỉ nhằm mục đích minh họa và không được hiểu là làm giới hạn phạm vi của sáng chế theo cách bất kỳ.

Tất cả các tài liệu công bố, bằng độc quyền sáng chế, và đơn đăng ký sáng chế đã viện dẫn trong bản mô tả này được kết hợp vào đây để tham khảo. Mặc dù sáng chế nêu trên đã được mô tả trong một số chi tiết để minh họa và ví dụ nhằm mục đích hiểu rõ ràng, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ dễ dàng hiểu rõ sáng chế dựa vào phần bộc lộ của nó, và có thể tiến hành một số thay đổi và cải biến mà vẫn nằm trong phạm vi của các phương án kèm theo.

Vật liệu và phương pháp chung

Kỹ thuật ADN tái tổ hợp

Các thao tác ADN được tiến hành theo các kỹ thuật tiêu chuẩn như được mô tả trong tài liệu: Sambrook J. et al, Molecular cloning: A laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989. Các chất phản ứng sinh học phân tử được sử dụng theo các hướng dẫn của nhà sản xuất.

Tổng hợp gen

Tiến hành tạo ra các đoạn gen mong muốn từ oligonucleotit bằng phương pháp tổng hợp hóa học. Các đoạn gen có chiều dài 300-4000 bp, nằm ở vùng rìa của các vị trí giới hạn đơn lẻ, được lắp ráp bằng cách ghép và gắn các oligonucleotit bao gồm cả khuếch đại bằng phản ứng PCR và sau đó được tách dòng bằng các vị trí giới hạn được chỉ định. Các trình tự ADN và các mảnh gen đã tách dòng phụ được khẳng định bằng cách giải trình tự ADN.

Xác định trình tự ADN

Các trình tự ADN được xác định bằng phương pháp giải trình tự Sanger.

Phân tích trình tự ADN và protein và quản lý số liệu trình tự

Phần mềm Vector NT1 Advance suite phiên bản 8.0 và SnapGene Viewer của Infomax được sử dụng để tạo ra, vẽ bản đồ, phân tích, giải thích và minh họa trình tự.

Ví dụ 1

Tạo ra các protein tái tổ hợp trong môi trường nuôi cấy dạng hỗn dịch của các tế bào động vật có vú

Để tạo ra các protein chất siêu chủ vận IL15 tái tổ hợp được thể hiện bằng sơ đồ trên Fig.1, Fig.2, Fig.3 và Fig.4, các tác giả sáng chế đã tổng hợp các cấu trúc chứa các mảnh của trình tự của phối tử IL15 của người (<https://www.uniprot.org/uniprot/P40933>) và IL15R α (<https://www.uniprot.org/uniprot/Q13261>). Các trình tự của cả hai gen được tổng hợp từ các oligonucleotit bằng cách sử dụng phương pháp PCR.

Để tạo ra các biến thể của chất siêu chủ vận IL15 như được thể hiện bằng CK_IL15R α _Hc_IL15CH1FcLALA trên Fig.1 và CK_IL15_Hc_IL15R α CH1FcLALA trên Fig.2 (sau đây được gọi là IL15SA hoặc BCD225), các gen nêu trên được tách dòng vào plasmit dưới dạng dung hợp ở đầu tận cùng N (protein fusion) với miền ổn định thứ nhất của chuỗi nhẹ kapa kháng thể vào vector pEE-IL15R α -CK (hoặc pEE-IL15-CK) ở các vị trí giới hạn Sall/BsiWI (Fig.5) và với miền ổn định thứ nhất của kháng thể chuỗi nặng vào vector pEE-IL15-CH1-Fc-LALA (hoặc pEE-IL15R α -CH1-Fc-LALA) IgG1 ở các vị trí giới hạn Sall/NheI (Fig.6), và cả hai vector được kết hợp ở bước chuyển nhiễm.

Để tạo ra các biến thể của chất siêu chủ vận IL15 đặc hiệu kép như được thể hiện bằng Fab-CK_IL15R α _Hc_IL15CH1Fcchỗ phìnhLALA (sau đây được gọi là IL15SA/PD1 hoặc kháng PD1/IL15SA hoặc IL15SA/PDL1 hoặc kháng PDL1/IL15SA) in Fig.4 và Fab-

CK_IL15_Hc_IL15R α CH1Fcchỗ phìnhLALA trên Fig.3, phối tử IL15 và các gen của thụ thể được tách dòng vào các plasmit dưới dạng dung hợp ở đầu tận cùng N có miền ổn định thứ nhất của chuỗi nhẹ kappa của kháng thể vào vector pEE-IL15R α -CK (hoặc pEE-IL15-CK) ở các vị trí giới hạn Sall/BsiWI (Fig.5) và với miền ổn định thứ nhất của kháng thể chuỗi nặng vào vector pEE-IL15-CH1-Fc-chỗ phình-LALA (hoặc pEE-IL15R α -CH1-Fc-chỗ phình-LALA) IgG1 ở các vị trí giới hạn Sall/NheI (Fig.9). Ngoài ra, để tạo ra phần Fab của kháng thể không đối xứng như được thể hiện trên Fig.3 và Fig.4, các gen của miền biến đổi của kháng thể kháng PD1 (prolgolimab) (sau đây được gọi là IL15SA/PD1 hoặc kháng thể kháng PD1/IL15SA) hoặc kháng thể kháng PDL1 (BCD-135) (sau đây được gọi là IL15SA/PDL1 hoặc kháng thể kháng PDL1/IL15SA) được tách dòng vào các plasmit dưới dạng dung hợp ở đầu tận cùng N với miền ổn định thứ nhất của chuỗi nhẹ kappa của kháng thể vào vector pEE-BCD100-02-VL-CK ở các vị trí giới hạn Sall/BsiWI (Fig.7) và với miền ổn định thứ nhất của kháng thể chuỗi nặng vào vector pEE-BCD100-02-VH-CH1-Fc-chỗ lõm-LALA IgG1 ở các vị trí giới hạn Sall/NheI (Fig.8). Do đó, bốn vector trên đây được kết hợp ở bước chuyển nhiễm để tổng hợp 4 polypeptit khác biệt trong một tế bào và tạo thành xytokin miễn dịch đặc hiệu kép.

Số lượng cần thiết của tất cả các plasmit trên đây được tạo ra trong các tế bào *E.Coli* và được tinh chế bằng cách sử dụng kit Maxiprep Qiagen.

Các protein tái tổ hợp chứa IL15SA được nuôi cấy tạm thời trong dòng tế bào buồng trứng chuột đồng Trung Quốc (CHO-K1) được tạo ra theo quy trình đã công bố [Biotechnol Bioeng. 2005 Sep 20; 91(6):670-677, Liao Metal., 2004; Biotechnol Lett. 2006 Jun;28(11):843-848; Biotechnol Bioeng. 2003 Nov 5;84(3):332-342]. Các tế bào được biểu hiện cơ định gen protein EBNA1 (kháng nguyên nhân của Epstein-Barrvirus 1). Việc nuôi cấy hỗn dịch được tiến hành trong các bình trên máy rung theo quỹ đạo bằng cách sử dụng môi trường không chứa huyết thanh từ Life Technologies Corporation và theo các hướng dẫn của nhà sản xuất. Để biểu hiện tạm thời, các tế bào ở nồng độ 2×10^6 /ml được chuyển nhiễm bằng polyetylenimin mạch thẳng (PEI MAX, Polysciences). Tỷ lệ của ADN/PEI là 1:3-1:10. Trong từ 5 đến 7 ngày sau khi chuyển nhiễm, môi trường nuôi cấy tế bào được ly tâm ở tốc độ 2000 g trong 20 phút và được lọc qua bộ lọc cỡ 0,22 μ m. Các protein đích được phân lập từ dịch nuôi cấy bằng phương pháp HPLC ái lực.

Các protein tái tổ hợp được phân lập và tinh chế từ dịch nuôi cấy bằng cách sử dụng cột sắc ký ái lực protein A. Dịch nuôi cấy đã làm trong được cho đi qua cột HiTrap rProtein

A Sepharosa FF 5ml (GE Healthcare) được làm cân bằng bằng nước muối đệm phosphat (PBS, độ pH = 7,4). Sau đó, cột này được rửa bằng 5 lần thể tích cột PBS để loại bỏ các thành phần gắn kết không đặc hiệu. Kháng nguyên đã gắn kết được rửa giải bằng cách sử dụng chất đệm glyxin 0,1M (độ pH = 3). Đỉnh rửa giải protein chính được thu gom và điều chỉnh đến độ pH trung tính bằng chất đệm Tris 1M (độ pH = 8). Tất cả các công đoạn được tiến hành với tốc độ dòng 110 cm/giờ. Sau đó, protein được thẩm tách vào PBS (độ pH = 7,4) bằng cách sử dụng kỹ thuật ống thẩm tích SnakeSkin, được lọc (0,22 μ m), được chuyển vào các ống và bảo quản ở nhiệt độ -70°C.

Độ tinh khiết của dung dịch protein tạo thành được đánh giá bằng phép điện di trên gel SDS (xem ví dụ trên Fig.10).

Ví dụ 2

Thử nghiệm động học sự tương tác của (IL15SA)2-Fc và thụ thể IL2 β của người

Thu được hằng số ái lực gắn kết của (IL15SA)2-Fc (sau đây được gọi là CK_IL15R α _Hc_IL15CH1FcLALA trên Fig.1 và CK_IL15_Hc_IL15R α CH1FcLALA trên Fig.2) và IL2 β của người bằng cách sử dụng thiết bị OctetRedBio theo hướng dẫn của ForteBio. Các bộ cảm biến sinh học AR2G đã được tái hydrat hóa từ trước trong một giờ tính theo mQ. Sau khi hoạt hóa các bộ cảm biến sinh học, các sản phẩm (IL15SA)2-Fc ở nồng độ 25 μ g/ml trong chất đệm axetat có độ pH = 4 được cố định không đặc hiệu (bằng các nhóm NH₂) lên bộ cảm biến sinh học. Sau đó, các bộ cảm biến được nhúng vào các lỗ chứa các dung dịch protein CD122/IL-2RB (đuôi Fc) của người (1 và 0,5 μ g/ml) ở nhiệt độ 30°C trong chất đệm PBS được bổ sung Tween-20 0,1% và BSA 0,1%. Phức hợp IL15SA/IL2 β được liên kết trong dung dịch này. Sau đó, các bộ cảm biến được nhúng trong dung dịch đệm dùng cho bước phân ly tiếp theo. Thử nghiệm được tiến hành ở nhiệt độ 30°C bằng cách sử dụng PBS được bổ sung Tween-20 0,1% và BSA 0,1% làm chất đệm xử lý.

Các biểu đồ cảm biến tạo thành được thể hiện trong Bảng 1 đối với CK_IL15R α _Hc_IL15CH1FcLALA và đối với CK_IL15_Hc_IL15R α CH1FcLALA, được phân tích sau khi trừ đi tín hiệu tham chiếu bằng cách sử dụng phần mềm phân tích số liệu Octet (phiên bản 8.0) theo quy trình tiêu chuẩn và bằng cách sử dụng mô hình tương tác 1:1. Hằng số ái lực tạo thành được thể hiện trong Bảng 1. Cả hai biến thể được nghiên cứu đều có ái lực và độ đặc hiệu cao đối với IL2 β của người.

Bảng 1. Hằng số ái lực đối với xytokin miễn dịch (IL15SA)2-Fc tương tác với IL2 β -Fc của người

ID của mẫu tải	Nồng độ (nM)	Mức độ đáp ứng	KD (M)	kon (1/Ms)	kdis (1/s)
CK_IL15R α _Hc_IL15CH1FcLALA	19,4	0,3774	2.47E-10	3,69E +05	9.11E-05
CK_IL15R α _Hc_IL15CH1FcLALA	9,69	0,3301	3.80E-10	3.02E+05	1.15E-04
CK_IL15_Hc_IL15R α CH1FcLALA	19,4	0,325	2.13E-10	3.58E+05	7.63E+05
CK_IL15_Hc_IL15R α CH1FcLALA	9,69	0,2832	2.12E-10	3.57E+05	7.55E-05

Ví dụ 3

Thử nghiệm động học về sự tương tác giữa chất siêu chủ vận IL15 đặc hiệu kép và thụ thể IL2 β của người và các thụ thể tế bào khác của các tế bào miễn dịch

Hằng số ái lực gắn kết của các xytokin miễn dịch đặc hiệu kép IL15SA (sau đây được gọi là kháng thể Fab-CK_IL15R α _Hc_IL15CH1Fcchỗ phìnhLALA kháng PD1 và kháng thể Fab-CK_IL15R α _Hc_IL15CH1Fcchỗ phìnhLALA kháng PD-L1) với thụ thể IL2 β và thụ thể PD-1/PD-L1 của người được xác định bằng cách sử dụng thiết bị OctetRed 96 theo các hướng dẫn của ForteBio. Các bộ cảm biến sinh học AR2G đã được tái hydrat hóa từ trước trong một giờ tính theo mQ. Sau khi hoạt hóa các bộ cảm biến sinh học, các xytokin miễn dịch đặc hiệu kép ở nồng độ 25 μ g/ml trong chất đệm axetat có độ pH =4 được cố định không đặc hiệu (bằng các nhóm NH₂) lên bộ cảm biến sinh học. Sau đó, các bộ cảm biến được nhúng vào các lỗ chứa protein CD122/IL-2RB của người (đuôi Fc) hoặc thụ thể PD-1-Fc hoặc thụ thể PD-L1-Fc (1 và 0,5 μ g/ml) trong chất đệm PBS được bổ sung Tween-20 0,1% và BSA 0,1% để kết hợp chất siêu chủ vận đặc hiệu kép và thụ thể thử nghiệm. Sau đó, các bộ cảm biến được nhúng trong dung dịch đệm dùng cho bước phân lý tiếp theo.

Số liệu thu được từ thiết bị, sau khi trừ đi tín hiệu tham chiếu, được phân tích bằng cách sử dụng phần mềm phân tích số liệu Octet (phiên bản 8.0) theo quy trình tiêu chuẩn và

sử dụng mô hình tương tác theo tỷ lệ 1:1.

Các hằng số ái lực tạo thành được thể hiện trong Bảng 2. Cả hai biến thể được nghiên cứu đều có ái lực và độ đặc hiệu cao đối với IL2 β của người và đối với các thụ thể được ghép cặp, và không có đủ hoạt tính không đặc hiệu với thụ thể khác.

Bảng 2. Hằng số ái lực đối với các kháng thể siêu chủ vận đặc hiệu kép IL15 tương tác với IL2 β -Fc của người và thụ thể thứ hai.

ID của mẫu tải	PD1		IL2Rb		PDL1	
	Mức độ đáp ứng	KD (M)	Mức độ đáp ứng	KD (M)	Mức độ đáp ứng	KD (M)
Fab- CK_IL15R α _Hc_IL15 CH1Fcchỗ phìnhLALA kháng PD1	0,7606	8.718E- 10	0,4540	1.25E -10	0	0
Fab- CK_IL15R α _Hc_IL15 CH1Fcchỗ phìnhLALA kháng PD1	0	0	0,3251	2.39E-11	0,3084	2.38E- 11
Prolgolimab kháng PD1	0,92164	1.86E- 10	0	0	0	0
BCD-135 kháng PD1	0	0	0	0	0,8183	<1.0E- 12

Ví dụ 4

Thử nghiệm tế bào để xác định hoạt tính tăng sinh các chất siêu chủ vận IL15 đối với dòng NK92

Dòng tế bào NK-92 được sử dụng trong thử nghiệm này. Thử nghiệm được tiến hành trong đĩa nuôi cấy có 96 lỗ. Hỗn dịch chứa các tế bào NK-92, kháng thể thử nghiệm ở nồng độ như được thể hiện trên đồ thị. Tất cả các thành phần của hỗn dịch được điều chế trong môi trường RPMI-1640 được bổ sung huyết thanh bào thai bò và glutamin. Sau khi tất cả

các thành phần được thêm vào, các đĩa được ủ ở nhiệt độ 37°C, CO₂ 5%. Sau đó, thuốc nhuộm xanh Alamar được cho thêm vào các lỗ. Sau khi ủ, cường độ phát huỳnh quang trong các lỗ được xác định. Các sản phẩm IL15SA (CK_IL15R α _Hc_IL15CH1FcLALA), IL15SA/PD1 (Fab-CK_IL15R α _Hc_IL15CH1FcLALA kháng PD-1) và IL15SA/PDL1 (Fab-CK_IL15R α _Hc_IL15CH1FcLALA kháng PDL-1) được nghiên cứu theo cách so sánh.

Các kết quả của việc xác định hoạt tính đặc hiệu của các xytokin miễn dịch trên đây cho thấy hoạt tính tăng sinh cao so với dòng NK92. Các giá trị EC50 được ước tính đối với tất cả các sản phẩm thử nghiệm là giống nhau, và mức độ hoạt hóa khi được xác định bằng đoạn bằng phía trên cũng hoàn toàn giống nhau (Fig.11). Cần lưu ý rằng hóa trị của phần IL15SA, và, theo đó, ái lực khác nhau, không làm ảnh hưởng đáng kể đến hoạt tính này.

Ví dụ 5

Thử nghiệm tế bào để xác định hoạt tính tăng sinh của các chất siêu chủ vận IL15 đối với dòng tế bào giết tự nhiên

Thử nghiệm này sử dụng các tế bào giết tự nhiên được phân lập từ PBMC của người cho khỏe mạnh bằng cách chọn lọc âm tính. Thử nghiệm được tiến hành trong đĩa nuôi cấy có 96 lỗ. Hỗn dịch chứa các tế bào giết tự nhiên, kháng thể thử nghiệm ở nồng độ như được thể hiện trên đồ thị. Tất cả các thành phần của hỗn dịch được điều chế trong môi trường nuôi cấy được bổ sung huyết thanh của người tự thân. Sau khi tất cả các thành phần được thêm vào, các đĩa được ủ ở nhiệt độ 37°C, CO₂ 5%. Sau đó, thuốc nhuộm xanh Alamar được cho thêm vào các lỗ. Sau khi ủ, cường độ phát huỳnh quang trong các lỗ được xác định. Hiệu quả của các sản phẩm IL15SA (CK_IL15R α _Hc_IL15CH1FcLALA), IL15SA/PD1 (Fab-CK_IL15R α _Hc_IL15CH1Fcchỗ phìnhLALA kháng PD-1) và intolokin-2 (IL2) của người (Ronleukin, PCI Biotech) đối với khả năng tăng sinh của các tế bào giết tự nhiên được nghiên cứu theo cách so sánh.

Các kết quả của việc xác định hoạt tính đặc hiệu của các xytokin miễn dịch trên đây cho thấy hoạt tính tăng sinh cao so với các tế bào giết tự nhiên (Fig.12). Các giá trị EC50 được ước tính đối với tất cả các sản phẩm thử nghiệm là giống nhau trong khoảng sai số, và thấp hơn một chút so với giá trị này của xytokin IL2. Ngoài ra, mức độ hoạt hóa khi được xác định theo đường bằng phía trên cũng hoàn toàn giống nhau. Cần lưu ý rằng hóa trị của phần IL15SA, và theo đó là ái lực khác nhau, không làm ảnh hưởng đáng kể đến hoạt tính này.

Ví dụ 6

Thử nghiệm tế bào để xác định hoạt tính đối kháng kháng PD1 của chất siêu chủ vận IL15 đối với dòng tế bào thông báo

Đối với thử nghiệm này, các tác giả sáng chế sử dụng dòng tế bào Jurkat NFAT-FLuc PD-1 được tạo ra trên cơ sở dòng tế bào Jurkat và biểu hiện ổn định PD-1 trên bề mặt của nó và chứa gen mã hóa luxiferaza của đom đóm dưới sự kiểm soát của gen khởi đầu NFAT; và dòng tế bào Raji PDL1 được tạo ra trên cơ sở dòng tế bào Raji và biểu hiện ổn định PDL1 trên bề mặt của nó. Hiệu quả của các sản phẩm IL15SA (CK_IL15R α _Hc_IL15CH1FcLALA), kháng PD1/IL15SA (Fab-CK_IL15R α _Hc_IL15CH1Fcchỗ phìnhLALA kháng PD-1) và chất đối kháng kháng PD1 (prolgolimab) đối với khả năng hoạt hóa trong hệ tế bào thông báo được nghiên cứu theo cách so sánh.

Thử nghiệm này được tiến hành trong đĩa nuôi cấy có 96 lỗ. Hỗn dịch trong mỗi lỗ chứa các tế bào Jurkat NFAT-FLuc PD-1, các tế bào Raji PDL1, các tế bào aCD3/aTAA1 ở nồng độ 1 ng/ml, và kháng thể thử nghiệm ở nồng độ như được thể hiện trên đồ thị. Sau khi cho thêm tất cả các thành phần, các đĩa được ủ ở nhiệt độ 37°C, CO₂ 5% và sau đó, bằng cách sử dụng kit thử nghiệm sự phát sáng, cường độ luxiferaza trong các lỗ được xác định.

Các kết quả của việc xác định hoạt tính đặc hiệu của các xytokin miễn dịch trên đây cho thấy khoảng độ lớn của giá trị EC₅₀ của kháng thể kháng PD1/IL15SA có hoạt tính đặc hiệu thấp hơn so với kháng thể đơn dòng kháng PD1 prolgolimab có hiệu quả điều trị (Fig.13). Ngoài ra, mức độ hoạt tính tối đa (đường bằng phía trên) giảm đi 30%. Hoạt tính đặc hiệu của kháng thể kháng PD1/IL15SA thấp hơn so với prolgolimab chỉ có thể được giải thích bởi Fab hóa trị một gắn kết với PD1 trong phân tử kháng PD1/IL15SA so với kháng thể cổ điển. Điều này cũng được chứng minh bởi khoảng độ lớn gần như khác biệt về ái lực đối với thụ thể PD-1 theo các số liệu trong Ví dụ 3 (Bảng 2) và giá trị như được chỉ rõ đối với prolgolimab. Cần lưu ý rằng hoạt tính đối kháng của IL15SA được quan sát dưới dạng mức nền, nghĩa là nó gần như không có mặt.

Ví dụ 7

Thử nghiệm tế bào để xác định hoạt tính đối kháng kháng PDL1 của các chất siêu chủ vận IL15 đối với dòng tế bào thông báo

Đối với thử nghiệm này, các tác giả sáng chế sử dụng dòng tế bào Jurkat NFAT-FLuc PD-1 được tạo ra trên cơ sở dòng tế bào Jurkat và biểu hiện ổn định PD-1 trên bề mặt

của nó và chứa gen mã hóa luxiferaza của đom đóm dưới sự kiểm soát của gen khởi đầu NFAT; và dòng tế bào Raji PDL1 được tạo ra trên cơ sở dòng tế bào Raji và biểu hiện ổn định PDL1 trên bề mặt của nó. Hiệu quả của các sản phẩm IL15SA (CK_IL15R α _Hc_IL15CH1FcLALA), kháng thể kháng PDL1/IL15SA (Fab-CK_IL15R α _Hc_IL15CH1Fcchỗ phìnhLALA kháng PD-L1) và chất đối kháng kháng PDL1 (atezolizumab) đối với khả năng hoạt hóa trong hệ tế bào thông báo được nghiên cứu theo cách so sánh.

Thử nghiệm được tiến hành trong đĩa nuôi cấy có 96 lỗ. Hỗn dịch trong mỗi lỗ chứa các tế bào Jurkat NFAT-FLuc PD-1, các tế bào Raji PDL1, các tế bào aCD3/aTAA1 ở nồng độ 1 ng/ml, và kháng thể thử nghiệm ở nồng độ như được thể hiện trên đồ thị. Sau khi cho thêm tất cả các thành phần, các đĩa được ủ ở nhiệt độ 37°C, CO₂ 5% và sau đó, bằng cách sử dụng kit thử nghiệm sự phát sáng, cường độ luxiferaza trong các lỗ được xác định.

Các kết quả của việc xác định hoạt tính đặc hiệu của các cytokin miễn dịch trên đây cho thấy giá trị EC₅₀ của sản phẩm kháng PDL1/IL15SA có hoạt tính đặc hiệu thấp hơn 30 lần so với giá trị này của kháng thể đơn dòng atezolizumab kháng PDL1 có hiệu quả điều trị (Fig.14). Tuy nhiên, mức độ hoạt tính tối đa (đường bằng phía trên) giảm đi chỉ 10%. Hoạt tính đặc hiệu của sản phẩm kháng PDL1/IL15SA thấp hơn so với hoạt tính này của atezolizumab chỉ có thể được giải thích bởi Fab hóa trị một gắn kết với PD-L1 trong phân tử kháng PDL1/IL15SA so với kháng thể cổ điển. Nhờ đó, quan sát được hoạt tính đối kháng không đáng kể của IL15SA.

Ví dụ 8

Thử nghiệm tế bào để xác định hiệu quả của các chất siêu chủ vận IL15 với sự có mặt của kháng thể đặc hiệu đối với kháng nguyên liên quan đến khối u (tumor-associated antigen: TAA) về tính gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC) của các tế bào giết tự nhiên đối với dòng tế bào thông báo TAA

Thử nghiệm này sử dụng các tế bào giết tự nhiên được phân lập từ PBMC của người cho khỏe mạnh bằng cách chọn lọc âm tính. Thử nghiệm được tiến hành trong đĩa nuôi cấy có 96 lỗ. Hỗn dịch chứa các tế bào giết tự nhiên và các tế bào Raji, kháng thể tác động Rituximab, và kháng thể thử nghiệm ở nồng độ như được thể hiện trên đồ thị. Tất cả các thành phần của hỗn dịch được điều chế trong môi trường nuôi cấy được bổ sung huyết thanh bào thai bò và glutamin. Sau khi tất cả các thành phần được thêm vào, các đĩa được ủ ở nhiệt độ 37°C, CO₂ 5%. Sau đó, dịch nuôi cấy được thu gom, và hàm lượng lactat

dehydrogenaza được xác định bằng cách sử dụng kit thử nghiệm LDH. Hiệu quả của các sản phẩm IL15SA (CK_IL15R α _Hc_IL15CH1FcLALA), kháng PD1/IL15SA (Fab-CK_IL15R α _Hc_IL15CH1Fcchỗ phìnhLALA kháng PD-1) về khả năng ADCC của rituximab trong hệ tế bào thông báo được nghiên cứu theo cách so sánh.

Các kết quả của việc xác định hoạt tính đặc hiệu của các xytokin miễn dịch trên đây cho thấy hoạt tính cao liên quan đến việc làm gia tăng khả năng ADCC của rituximab đối với dòng tế bào thông báo TAA (Fig.15 và Fig.16). Hiệu quả của ADCC phụ thuộc rituximab, như được xác định theo tỷ lệ % tế bào Raji được làm tan với thụ thể CD20 được biểu hiện quá mức trên bề mặt của nó, tăng lên 30% với sự có mặt của mỗi sản phẩm thử nghiệm được nghiên cứu so với rituximab một mình. Hiệu quả này dường như được giải thích bởi sự tăng sinh của các tế bào giết tự nhiên có hoạt động dưới sự ảnh hưởng của IL15SA và kháng thể kháng PD1/IL15SA trong thử nghiệm này, theo các kết quả được thể hiện trong các Ví dụ 4 và 5. Các giá trị EC50 được ước tính đối với tất cả các sản phẩm thử nghiệm là giống nhau trong khoảng sai số. Cần lưu ý rằng hóa trị của phần IL15SA, và, do đó là ái lực khác nhau, không làm ảnh hưởng đáng kể đến hoạt tính này, điều này được chứng minh thêm bằng các Ví dụ 4 và 5.

Ví dụ 9

Thử nghiệm tế bào để xác định tính gây độc tế bào của các chất siêu chủ vận IL15 đối với PBMC từ máu toàn phần của người cho khỏe mạnh

PBMC được phân lập từ máu toàn phần của người cho khỏe mạnh bằng thiết bị ly tâm theo gradien tỷ trọng Ficoll.

Thử nghiệm này được tiến hành trong đĩa nuôi cấy có 96 lỗ. Hỗn dịch chứa (trong mỗi lỗ) PBMC mới được phân lập và kháng thể như được thể hiện trên đồ thị ở nồng độ 0,1 μ g/ml. Sau khi trộn lẫn PBMC và các kháng thể, đĩa này được ủ trong 16 giờ ở nhiệt độ 37°C, CO2 5%. Sau đó, tỷ lệ của các tiểu quần thể CD56+, CD19+, CD3+, CD4+ và CD8+ của PBMC trong hỗn dịch được xác định bằng cách nhuộm trực tiếp các hỗn dịch bằng các kháng thể được đánh dấu bằng thuốc nhuộm huỳnh quang đối với các CD tương ứng và phân thêm các tế bào bằng cách sử dụng máy đếm tế bào theo dòng. Đối với các tế bào CD56+, CD19+, CD3+, các đồ thị thể hiện tỷ lệ của chúng so với tất cả các tế bào cyar hỗn dịch thử nghiệm, trong khi đối với các tế bào CD4+, CD8+, các đồ thị thể hiện tỷ lệ của chúng so với các tế bào CD3+. Hiệu quả gây độc tế bào của các sản phẩm IL15SA (CK_IL15R α _Hc_IL15CH1FcLALA), kháng thể kháng PD1/IL15SA (Fab-

CK_IL15R α _Hc _IL15CH1Fcchỗ phìnhLALA kháng PD-1), kháng thể kháng PD1 (prolgolimab), hỗn hợp của kháng thể kháng PD1 (prolgolimab) + IL15SA, kháng thể kháng CD20 GA101 đối với các tế bào PBMC của người được nghiên cứu theo cách so sánh.

Các kết quả được thể hiện trên các hình vẽ từ Fig.17 đến Fig.21 chứng minh hiệu quả gây độc tế bào không đáng kể của các sản phẩm thử nghiệm, nghĩa là làm giảm không quá 10% về số lượng tế bào có khả năng phản ứng miễn dịch so với đối chứng âm tính AB (nghĩa là không có mặt kháng thể ngoại sinh bất kỳ). Theo đó, kháng thể đối chứng kháng CD20 có sự cạn kiệt hoàn toàn ổn định của quần thể tế bào B CD20+. Do đó, tất cả các sản phẩm thử nghiệm quan tâm đều không có tính gây độc tế bào *in vitro* không đặc hiệu đáng kể bất kỳ đối với các tế bào máu của người.

Ví dụ 10

Xác định tính ổn định kết tụ của chất siêu chủ vận IL15 trong các điều kiện chịu stress do nhiệt

Sản phẩm siêu chủ vận IL15 ở nồng độ 9 mg/ml trong chất đệm PBS được gia nhiệt trong 12 giờ ở nhiệt độ 50°C. Sự kết tụ sau khi chịu stress do nhiệt được xác định bằng phương pháp sắc ký thẩm gel hiệu năng cao. Phương pháp sắc ký thẩm gel được thực hiện trên hệ thống HPLC (Agilent) đối với cột Tosoh TSK-Gel G3000SWXL, 7,8mm x 30cm, mã số 08541 với cột sơ bộ Tosoh TSKgel Guard SWXL, 6,0mm x 4,0cm, có đường kính hạt bằng 7 μ m, mã số 08543. Việc rửa giải được thực hiện theo chế độ hỗn hợp đẳng dòng, pha động: NaFb 50mM, NaCl 0,3M, độ pH = 7,0 với tốc độ dòng 0,5 ml/phút. Việc phát hiện được thực hiện ở bước sóng 214 và 280nm. Các mẫu kháng thể được pha loãng bằng chất đệm PBS, độ pH = 7,5, đến nồng độ ~1 mg/ml. Thể tích bơm mẫu là 10 microlit. Hỗn hợp hiệu chỉnh tiêu chuẩn thẩm gel (Bio-Rad), mã số 151- 1901, được sắc ký sơ bộ. Fig.22 thể hiện kết quả phổ sắc ký, trong đó chất siêu chủ vận IL15 có độ đồng nhất cao (hàm lượng chất kết tụ trong dung dịch không quá 5%).

Ví dụ 11

Đánh giá hoạt tính kháng u của các sản phẩm siêu chủ vận IL15 trong mô hình u melanin B16F10 cùng gen

Hiệu quả được đánh giá bằng cách sử dụng chuột C57BL/6 có khả năng miễn dịch được cấy dòng tế bào khối u B16F10. $1,5 \times 10^5$ tế bào khối u được tiêm dưới da vào sườn phải của mỗi con chuột trong nhóm. Vào ngày thứ 7 sau khi cấy tế bào (ngày 1 của thử

nghiệm), các con chuột được chia thành các nhóm như được thể hiện trong Bảng 3. Hiệu quả được đánh giá bằng cách sử dụng một liều dùng của các sản phẩm sau: BCD-225, IL15SA/a-mPD-1 (kháng thể đơn dòng đặc hiệu kép chứa IL-15SA và mảnh Fab với PD-1 của chuột, dẫn xuất của kháng thể RMP1-14 của chuột). Trình tự miền biến đổi của kháng thể RMP1-14 được cung cấp bởi Hideo Yagita, PhD, Juntendo University School of Medicine. Các miền biến đổi của gen và sản phẩm kháng thể RMP1-14 được tổng hợp theo Ví dụ 1. Ngoài ra, các tác giả sáng chế đã tổng hợp sản phẩm tham chiếu ALT-803 [[Han KP et al, Cytokine, 2011 Dec;56\(3\):804-10.](#)] (đối chứng dương) và plaxebo (đối chứng âm). Hoạt tính kháng u của các sản phẩm kết hợp với kháng thể kháng PD-1 của chuột (a-mPD-1) cũng được đánh giá.

Bảng 3. Các nhóm động vật trong nghiên cứu về hoạt tính kháng u của các chất siêu chủ vận IL15

Nhóm	Số lượng động vật	Liều dùng
BCD-225(IL15SA)	9	0,2 mg/kg
IL15SA/a-mPD-1	9	0,2 mg/kg
ALT-803	9	0,2 mg/kg
kháng mPD-1	10	10 mg/kg
BCD-225(IL15SA)+ kháng mPD-1	9	0,2 mg/kg + 10 mg/kg
IL15SA/a-mPD-1+ kháng mPD-1	9	0,2 mg/kg + 10 mg/kg
ALT-803 + kháng mPD-1	9	0,2 mg/kg + 10 mg/kg
Đối chứng âm	10	-

Các sản phẩm BCD-225 (IL15SA), IL15SA/a-mPD-1 và ALT-803 được tiêm qua đường trong màng bụng với thể tích 0,2ml vào các ngày 1, 4, 8, và 11 của thử nghiệm. Sản phẩm kháng mPD-1 được tiêm qua đường trong màng bụng với thể tích 0,2ml vào các ngày 2, 5, 9, và 12 của thử nghiệm. Nhóm đối chứng âm tính được tiêm chất đệm natri axetat vào các ngày 1, 2, 4, 5, 8, 9, 11 và 12 của thử nghiệm với thể tích 0,2ml (Fig.23).

Trọng lượng cơ thể của chuột và kích thước tuyến tính của khối u được xác định trong suốt quá trình thử nghiệm. Thể tích khối u được tính toán bằng cách sử dụng công thức sau: $V=L \times W \times W \times \pi/6$. Hiệu quả của sản phẩm thử nghiệm được đánh giá bằng chỉ số ức chế sự phát triển của khối u (tumor growth inhibition: TGI) được tính toán có tính đến

thể tích khối u trung bình trong nhóm đối chứng âm (V_c) và nhóm sử dụng sản phẩm (V_t) bằng cách sử dụng công thức sau:

$$\text{TGI (\%)} = \frac{V_c - V_t}{V_c} * 100$$

Các kết quả của thử nghiệm được thể hiện trên Fig.24 và Fig.25. Số liệu được thể hiện vào ngày 11 của thử nghiệm khi các con chuột trong phần lớn tất cả các nhóm thử nghiệm đều bị chết do gánh nặng khối u làm cho không thể đánh giá theo cách tin cậy đối với hoạt tính kháng u của các sản phẩm vào ngày 15.

Theo các kết quả của nghiên cứu, các sản phẩm BCD-225 và sản phẩm ALT-803 tham chieeys có hoạt tính kháng u tương đương với TGI bằng 52% ở nhóm sử dụng BCD-225, và 53% ở nhóm sử dụng ALT-803. Các tác giả sáng chế đã quan sát được xu hướng tăng lên của giá trị TGI ở nhóm sử dụng IL15SA/kháng thể đặc hiệu kép kháng mPD-1 so với các giá trị TGI ở nhóm sử dụng BCD-225 và ALT-803. Giá trị TGI ở nhóm sử dụng IL15SA/kháng thể kháng mPD-1 bằng 58% vào ngày 11 của thử nghiệm.

Các giá trị TGI của các nhóm sử dụng dạng kết hợp của sản phẩm BCD-225 + kháng thể kháng mPD-1 và ALT-803 + kháng thể kháng mPD-1 bằng 72% vào ngày 11 của thử nghiệm, và đối với nhóm sử dụng dạng kết hợp của sản phẩm IL15SA/a-mPD-1 và kháng thể kháng -mPD-1, giá trị TGI bằng 69%. Các giá trị TGI tạo thành cho thấy hoạt tính kháng u rõ rệt hơn khi kết hợp các sản phẩm thử nghiệm và kháng thể kháng mPD-1, so với hoạt tính của các sản phẩm này trong liệu pháp đơn.

Ví dụ 12

Đánh giá và phân tích tỷ lệ chết so sánh ở chuột với sản phẩm siêu chủ vận IL15 và sản phẩm ALT803 trong mô hình u melanin B16F10 cùng gen.

Việc đánh giá so sánh tỷ lệ chuột ở chuột sau khi sử dụng các sản phẩm siêu chủ vận IL15 được thực hiện bằng cách sử dụng mô hình và các con chuột được mô tả trong Ví dụ 11. Tỷ lệ sống được đánh giá bằng cách đếm số chuột đã chết hoặc được gây chết êm ái khi ở trạng thái đau đớn.

Các kết quả được thể hiện trong Bảng 4. Theo các kết quả thu được, tỷ lệ chết ở nhóm sử dụng sản phẩm IL15SA/a-mPD-1 và IL15SA/a-mPD-1 + kháng mPD-1, tính trung bình, là nhỏ hơn về số lượng chuột và khoảng thời gian sống, so với tỷ lệ này của nhóm sử dụng IL15SA (BCD225), IL15SA + kháng mPD-1, ALT-803, ALT-803 + kháng mPD-1.

Các giá trị tỷ lệ chết thu được cho thấy độc tính của xytokin miễn dịch đặc hiệu kép IL15SA/a-mPD-1 có thể thấp hơn rõ ràng so với các kháng thể hóa trị hai đặc hiệu đơn IL15SA và ALT-803. Sự có mặt hoặc không có mặt của kháng thể kháng PD1 không có hiệu quả có ý nghĩa về mặt thống kê đối với tỷ lệ chết. Ngoài ra, việc khám nghiệm các cơ quan của chuột bị chết từ nhóm sử dụng IL15SA và ALT-803 cho thấy sự có mặt trong gan của sự loạn dưỡng tích dịch cùng với sự hoại tử tế bào gan, sự ép mao mạch hình sin; sự thâm nhiễm tế bào mô lymphô trong mô mềm, và sự tích tụ các tế bào lymphô trong mao mạch hình sin. Các phát hiện này phù hợp với số liệu của các tài liệu chuyên ngành đã thông báo trước đây về khả năng gây tổn thương gan ở chuột của các chất siêu chủ vận trên cơ sở IL15.

Bảng 4. Các nhóm động vật trong nghiên cứu về tỷ lệ tử vong sau khi sử dụng sản phẩm siêu chủ vận IL15 và sản phẩm siêu chủ vận ALT803 và các dạng kết hợp của chúng với kháng thể kháng PD1

Nhóm số	Điều trị bằng	Số lượng chuột đã chết	Ngày thử nghiệm	Tổng số
1	IL15SA (BCD-225)	2	10	4
		2	14	
2	IL15SA/a-mPD-1	2	15	2
3	ALT-803	2	7	2
4	kháng mPD-1	3	14	3
5	IL15SA(BCD-225)+kháng mPD-1	1	14	1
6	IL15SA/a-mPD-1+kháng mPD-1	1	11	2
		1	14	
7	ALT-803 + kháng mPD-1	3	7	3
8	Plaxebo	1	14	1

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Xytokin miễn dịch để kích thích sự hoạt hóa và/hoặc sự tăng sinh của các tế bào dương tính với IL-15R β /gama, chứa phức hợp protein heterodime trên cơ sở IL-15/IL-15R α bao gồm:

1) IL-15R α được liên kết với

a) miền ổn định chuỗi nhẹ của kháng thể, hoặc

b) các miền ổn định chuỗi nặng của kháng thể chứa miền ổn định chuỗi nặng thứ nhất (CH1) và monome của mảnh Fc chứa các miền ổn định chuỗi nặng thứ hai (CH2) và thứ ba (CH3);

2) IL-15 được liên kết với

a) các miền ổn định chuỗi nặng của kháng thể chứa miền ổn định chuỗi nặng thứ nhất (CH1) và monome của mảnh Fc chứa các miền ổn định chuỗi nặng thứ hai (CH2) và thứ ba (CH3), hoặc

b) miền ổn định chuỗi nhẹ của kháng thể ;

trong đó miền ổn định chuỗi nặng của kháng thể thứ nhất và miền ổn định chuỗi nhẹ của kháng thể trong phức hợp heterodime có hoặc không có sự liên kết cộng hóa trị bằng liên kết cầu S-S tự nhiên, và

trong đó, nếu IL-15 hoặc IL-15R α được liên kết với miền ổn định chuỗi nhẹ của kháng thể, thì phần khác của phức hợp protein heterodime được chọn từ IL-15R α hoặc IL-15 được liên kết với các miền ổn định chuỗi nặng của kháng thể.

2. Xytokin miễn dịch theo điểm 1, trong đó miền ổn định chuỗi nhẹ của kháng thể được chọn từ CK hoặc CL.

3. Xytokin miễn dịch theo điểm 1, trong đó IL-15R α có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:9, hoặc biến thể IL-15R α của thể đột biến đã biết bất kỳ có hoạt tính sinh học tương tự.

4. Xytokin miễn dịch theo điểm 1, trong đó IL-15 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:10, hoặc biến thể IL-15 của thể đột biến đã biết bất kỳ có hoạt tính sinh học tương tự.

5. Xytokin miễn dịch theo điểm 1, trong đó IL-15R α được liên kết với miền ổn định chuỗi

nhẹ của kháng thể.

6. Xytokin miễn dịch theo điểm 5, trong đó IL-15R α được liên kết với miền ổn định chuỗi nhẹ của kháng thể có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:1 hoặc SEQ ID NO:19.

7. Xytokin miễn dịch theo điểm 1, trong đó IL-15 được liên kết với miền ổn định chuỗi nhẹ của kháng thể.

8. Xytokin miễn dịch theo điểm 7, trong đó IL-15 được liên kết với miền ổn định chuỗi nhẹ của kháng thể có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:3 hoặc SEQ ID NO:21.

9. Xytokin miễn dịch theo điểm 1, trong đó miền ổn định chuỗi nặng thứ nhất (CH1) và monome của mảnh Fc chứa các miền ổn định chuỗi nặng thứ hai (CH2) và thứ ba (CH3) được liên kết bằng miền bản lề.

10. Xytokin miễn dịch theo điểm 1, trong đó IL-15 hoặc IL-15R α được liên kết với các miền ổn định chuỗi nặng của kháng thể được sắp xếp theo thứ tự sau: CH1-miền bản lề-CH2-CH3.

11. Xytokin miễn dịch theo điểm 10, trong đó IL-15R α được liên kết với các miền ổn định chuỗi nặng của kháng thể.

12. Xytokin miễn dịch theo điểm 11, trong đó IL-15R α được liên kết với các miền ổn định chuỗi nặng của kháng thể có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:4 hoặc SEQ ID NO:22.

13. Xytokin miễn dịch theo điểm 10, trong đó IL-15 được liên kết với các miền ổn định chuỗi nặng của kháng thể.

14. Xytokin miễn dịch theo điểm 13, trong đó IL-15 được liên kết với các miền ổn định chuỗi nặng của kháng thể có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:2 hoặc SEQ ID NO:20.

15. Xytokin miễn dịch theo điểm 1, trong đó

IL-15R α được liên kết với miền ổn định chuỗi nhẹ của kháng thể có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:1 hoặc SEQ ID NO:19, và

IL-15 được liên kết với các miền ổn định chuỗi nặng của kháng thể có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:2 hoặc SEQ ID NO:20.

16. Xytokin miễn dịch theo điểm 1, trong đó

IL-15R α được liên kết với các miền ổn định chuỗi nặng của kháng thể có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:4 hoặc SEQ ID NO:22, và

IL-15 được liên kết với miền ổn định chuỗi nhẹ của kháng thể có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:3 hoặc SEQ ID NO:21.

17. Xytokin miễn dịch theo điểm 1 chứa sự đột biến trong monome của mảnh Fc, gây ra sự thiếu hụt các đặc tính của ADCC, CDC, và/hoặc ADCP trong xytokin miễn dịch này.

18. Xytokin miễn dịch theo điểm 1, trong đó mảnh Fc thuộc về IgG.

19. Xytokin miễn dịch theo điểm 18, trong đó isotyp của mảnh Fc được chọn từ nhóm bao gồm: IgG1, IgG2, hoặc IgG4 của người.

20. Xytokin miễn dịch theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 19 chứa hai phức hợp protein heterodime trên cơ sở IL-15/IL-15R α trên đây.

21. Xytokin miễn dịch để kích thích sự hoạt hóa và/hoặc sự tăng sinh của các tế bào dương tính với IL-15R β /gama, chứa phức hợp protein heterodime trên cơ sở IL-15/IL-15R α và kháng thể điều biến miễn dịch hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, ức chế đặc hiệu con đường PD-1,

trong đó phức hợp protein heterodime trên cơ sở IL-15/IL-15R α bao gồm:

1) IL-15R α được liên kết với

a) miền ổn định chuỗi nhẹ của kháng thể, hoặc

b) các miền ổn định chuỗi nặng của kháng thể chứa miền ổn định chuỗi nặng thứ

nhất (CH1) và monome của mảnh Fc chứa các miền ổn định chuỗi nặng thứ hai (CH2) và thứ ba (CH3);

2) IL-15 được liên kết với

a) các miền ổn định chuỗi nặng của kháng thể chứa miền ổn định chuỗi nặng thứ nhất (CH1) và monome của mảnh Fc chứa các miền ổn định chuỗi nặng thứ hai (CH2) và thứ ba (CH3), hoặc

b) miền ổn định chuỗi nhẹ của kháng thể ;

trong đó miền ổn định chuỗi nặng của kháng thể thứ nhất và miền ổn định chuỗi nhẹ của kháng thể trong phức hợp heterodime có hoặc không có sự liên kết cộng hóa trị bằng liên kết cầu S-S tự nhiên, và

trong đó, nếu IL-15 hoặc IL-15R α được liên kết với miền ổn định chuỗi nhẹ của kháng thể thì phần còn lại của phức hợp protein heterodime, được chọn từ IL-15R α hoặc IL-15, được liên kết với các miền ổn định chuỗi nặng của kháng thể.

22. Xytokin miễn dịch theo điểm 21, trong đó miền ổn định chuỗi nhẹ của kháng thể được chọn từ CK hoặc CL.

23. Xytokin miễn dịch theo điểm 21, trong đó IL-15R α có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:9, hoặc biến thể IL-15R α của thể đột biến đã biết bất kỳ có hoạt tính sinh học tương tự.

24. Xytokin miễn dịch theo điểm 21, trong đó IL-15 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:10, hoặc biến thể IL-15 của thể đột biến đã biết bất kỳ có hoạt tính sinh học tương tự.

25. Xytokin miễn dịch theo điểm 21, trong đó IL-15R α được liên kết với miền ổn định chuỗi nhẹ của kháng thể.

26. Xytokin miễn dịch theo điểm 25, trong đó IL-15R α được liên kết với miền ổn định chuỗi nhẹ của kháng thể có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:1 hoặc SEQ ID NO:19.

27. Xytokin miễn dịch theo điểm 21, trong đó IL-15 được liên kết với miền ổn định chuỗi nhẹ của kháng thể.

28. Xytokin miễn dịch theo điểm 27, trong đó IL-15 được liên kết với miền ổn định chuỗi nhẹ của kháng thể có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:3 hoặc SEQ ID NO:21.

29. Xytokin miễn dịch theo điểm 21, trong đó miền ổn định chuỗi nặng thứ nhất (CH1) và monome của mảnh Fc chứa các miền ổn định chuỗi nặng thứ hai (CH2) và thứ ba (CH3) được liên kết bằng miền bản lề.

30. Xytokin miễn dịch theo điểm 21, trong đó IL-15 hoặc IL-15R α được liên kết với các miền ổn định chuỗi nặng của kháng thể được sắp xếp theo thứ tự sau: CH1-miền bản lề-CH2-CH3.

31. Xytokin miễn dịch theo điểm 30, trong đó IL-15R α được liên kết với các miền ổn định chuỗi nặng của kháng thể.

32. Xytokin miễn dịch theo điểm 31, trong đó IL-15R α được liên kết với các miền ổn định chuỗi nặng của kháng thể có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:6 hoặc SEQ ID NO:24.

33. Xytokin miễn dịch theo điểm 30, trong đó IL-15 được liên kết với các miền ổn định chuỗi nặng của kháng thể.

34. Xytokin miễn dịch theo điểm 33, trong đó IL-15 được liên kết với các miền ổn định chuỗi nặng của kháng thể có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:5 hoặc SEQ ID NO:23.

35. Xytokin miễn dịch theo điểm 21, trong đó kháng thể điều biến miễn dịch hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, ức chế đặc hiệu con đường PD-1, là kháng thể gắn kết đặc hiệu với PD-1.

36. Xytokin miễn dịch theo điểm 21, trong đó kháng thể điều biến miễn dịch chứa:

- a) chuỗi nhẹ bao gồm miền biến đổi chuỗi nhẹ và miền ổn định chuỗi nhẹ;

b) chuỗi nặng chứa miền biến đổi chuỗi nặng và các miền ổn định chuỗi nặng của kháng thể chứa miền ổn định chuỗi nặng thứ nhất (CH1) và monome của mảnh Fc chứa các miền ổn định chuỗi nặng thứ hai (CH2) và thứ ba (CH3).

37. Xytokin miễn dịch theo điểm 36, trong đó miền biến đổi chuỗi nhẹ chứa các vùng LCDR 1, 2, và 3 (các vùng siêu biến 1, 2, và 3), được thể hiện bằng các trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, và SEQ ID NO:16, tương ứng.

38. Xytokin miễn dịch theo điểm 37, trong đó miền biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:18.

39. Xytokin miễn dịch theo điểm 36, trong đó miền biến đổi chuỗi nặng chứa các vùng HCDR 1, 2, và 3 (các vùng siêu biến 1, 2, và 3), được thể hiện bằng các trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, và SEQ ID NO:13, tương ứng.

40. Xytokin miễn dịch theo điểm 39, trong đó miền biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:17.

41. Xytokin miễn dịch theo điểm 36, trong đó

1) miền biến đổi chuỗi nhẹ chứa các vùng LCDR 1, 2, và 3 (các vùng siêu biến 1, 2, và 3), được thể hiện bằng các trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, và SEQ ID NO:16, tương ứng.

2) miền biến đổi chuỗi nặng chứa các vùng HCDR 1, 2, và 3 (các vùng siêu biến 1, 2, và 3), được thể hiện bằng các trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, và SEQ ID NO:13, tương ứng.

42. Xytokin miễn dịch theo điểm 41, trong đó

1) miền biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:18;

2) miền biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:17.

43. Xytokin miễn dịch theo điểm 36, trong đó kháng thể điều biến miễn dịch chứa chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:8.

44. Xytokin miễn dịch theo điểm 36, trong đó kháng thể điều biến miễn dịch chứa chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:7.

45. Xytokin miễn dịch theo điểm 36, trong đó kháng thể điều biến miễn dịch chứa:
chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:7;
chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:8.

46. Xytokin miễn dịch theo điểm 21, trong đó kháng thể điều biến miễn dịch hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, ức chế đặc hiệu con đường PD-1, là kháng thể gắn kết đặc hiệu với PD-L1.

47. Xytokin miễn dịch theo điểm 21, trong đó

a) phức hợp protein heterodime trên cơ sở IL-15/IL-15R α :

IL-15R α được liên kết với miền ổn định chuỗi nhẹ của kháng thể có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:1 hoặc SEQ ID NO:19, và

IL-15 được liên kết với các miền ổn định chuỗi nặng của kháng thể có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:5 hoặc SEQ ID NO:23;

b) kháng thể điều biến miễn dịch chứa:

chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:7;

chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:8.

48. Xytokin miễn dịch theo điểm 21, trong đó

a) IL-15R α được liên kết với các miền ổn định chuỗi nặng của kháng thể có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:6 hoặc SEQ ID NO:24, và

IL-15 được liên kết với miền ổn định chuỗi nhẹ của kháng thể có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:3 hoặc SEQ ID NO:21;

b) kháng thể điều biến miễn dịch chứa:

chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:7;

chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:8.

49. Xytokin miễn dịch theo điểm 21 hoặc 36 có sự đột biến trong miền ổn định của kháng

thể, tạo ra sự heterodime hóa của hai phần khác nhau, một phần trong đó chứa IL-15R α đã liên kết cộng hóa trị hoặc không cộng hóa trị được liên kết với miền ổn định của kháng thể và IL-15 được liên kết với miền ổn định của kháng thể, và phần còn lại chứa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được liên kết cộng hóa trị hoặc không cộng hóa trị của kháng thể.

50. Xytokin miễn dịch theo điểm 21 hoặc 36, trong đó monome Fc thứ nhất và monome Fc thứ hai được chọn từ nhóm sau đây: monome Fc thứ nhất là Fc được cải biến bằng chỗ phình, và monome Fc thứ hai là Fc được cải biến bằng chỗ lõm, hoặc khi monome Fc thứ hai là Fc được cải biến bằng chỗ phình, và monome Fc thứ nhất là Fc được cải biến bằng chỗ lõm.

51. Xytokin miễn dịch theo điểm 50, trong đó

- a) monome Fc thứ nhất có sự thay thế axit amin S354C/T366W, và monome Fc thứ hai có sự thay thế axit amin Y349C/T366S/L368A/Y407V.
- b) monome Fc thứ nhất có sự thay thế axit amin Y349C/T366S/L368A/Y407, và monome Fc thứ hai có sự thay thế axit amin S354C/T366W.

52. Xytokin miễn dịch theo điểm 21 hoặc 36, trong đó mảnh Fc thuộc về IgG.

53. Xytokin miễn dịch theo điểm 52, trong đó isotyp của mảnh Fc được chọn từ nhóm bao gồm: IgG1, IgG2, hoặc IgG4 của người.

54. Xytokin miễn dịch theo điểm 21 hoặc 36 có sự đột biến trong monome của mảnh Fc, gây ra sự thiếu hụt các đặc tính của ADCC, CDC, và/hoặc ADCP trong xytokin miễn dịch này.

55. Axit nucleic được phân lập mã hóa xytokin miễn dịch theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 20 hoặc từ 21 đến 54.

56. Axit nucleic theo điểm 55, trong đó axit nucleic là ADN.

57. Vectơ biểu hiện chứa axit nucleic theo điểm 55 hoặc 56.

58. Phương pháp tạo ra tế bào chủ để tạo ra xytokin miễn dịch theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 20 hoặc từ 21 đến 54 bao gồm bước biến nạp tế bào này với vector theo điểm 59.

59. Tế bào chủ để tạo ra xytokin miễn dịch theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 20 hoặc từ 21 đến 54 chứa axit nucleic theo điểm 57 hoặc 58.

60. Phương pháp tạo ra sản phẩm chứa xytokin miễn dịch theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 20 hoặc từ 21 đến 54 bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ theo điểm 61 trong môi trường nuôi cấy trong các điều kiện đủ để tạo ra xytokin miễn dịch nêu trên, nếu cần, sau đó phân lập và tinh chế xytokin miễn dịch tạo thành.

61. Dược phẩm để kích thích sự hoạt hóa và/hoặc sự tăng sinh của các tế bào dương tính với IL-15Rbeta/gama, chứa xytokin miễn dịch theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 20 hoặc từ 21 đến 54 với lượng có hiệu quả điều trị, kết hợp với một hoặc nhiều tá dược được dụng.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> JOINT STOCK COMPANY "BIOCAD"

<120> XYTOKIN MIỄN DỊCH CHỨA PHỨC HỢP PROTEIN HETERODIME
TRÊN CƠ SỞ IL-15/IL-15R α VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA XYTOKIN NÀY

<150> RU2019129569

<151> 2019-09-19

<160> 24

<170> BiSSAP 1.3.6

<210> 1

<211> 216

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo IL15R α -CK

<400> 1

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

<210> 2

<211> 454

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo IL15-CH1CH2CH3

<400> 2

```

Asp Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile Glu Asp Leu
1      5      10      15
Ile Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu Ser Asp Val
20      25      30
His Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu Glu Leu
35      40      45
Gln Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His Asp Thr Val
50      55      60
Glu Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asp Ser Leu Ser Ser Asn Gly Asn
65      70      75      80
Val Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu Lys Asn
85      90      95
Ile Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln Met Phe Ile
100     105     110
Asn Thr Ser Ala Gly Gly Lys Pro Gly Gly Ser Ala Gly Gly Ala Ser
115     120     125
Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
130     135     140
Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
145     150     155     160
Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
165     170     175
His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
180     185     190
Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile
195     200     205
Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val
210     215     220
Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
225     230     235     240
Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
245     250     255
Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
260     265     270
Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
275     280     285
Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
290     295     300
Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
305     310     315     320
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
325     330     335
Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
340     345     350
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
355     360     365
Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
370     375     380
Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
385     390     395     400
Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
405     410     415
Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
420     425     430
Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
435     440     445
Ser Leu Ser Leu Ser Pro
450

```

<210> 3
 <211> 233
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nhân tạo IL15-CK

<400> 3
 Asp Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile Glu Asp Leu
 1 5 10 15
 Ile Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu Ser Asp Val
 20 25 30
 His Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Glu Leu
 35 40 45
 Gln Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His Asp Thr Val
 50 55 60
 Glu Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asp Ser Leu Ser Ser Asn Gly Asn
 65 70 75 80
 Val Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu Lys Asn
 85 90 95
 Ile Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln Met Phe Ile
 100 105 110
 Asn Thr Ser Ala Gly Gly Lys Pro Gly Gly Ser Ala Gly Gly Arg Thr
 115 120 125
 Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
 130 135 140
 Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
 145 150 155 160
 Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
 165 170 175
 Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
 180 185 190
 Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
 195 200 205
 Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
 210 215 220
 Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230

<210> 4
 <211> 436
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nhân tạo IL15R α -CH1CH2CH3

<400> 4
 Asp Thr Cys Pro Pro Pro Met Ser Val Glu His Ala Asp Ile Trp Val
 1 5 10 15
 Lys Ser Tyr Ser Leu Tyr Ser Arg Glu Arg Tyr Ile Cys Asn Ser Gly
 20 25 30
 Phe Lys Arg Lys Ala Gly Thr Ser Ser Leu Thr Glu Cys Val Leu Asn
 35 40 45
 Lys Ala Thr Asn Val Ala His Trp Thr Thr Pro Ser Leu Lys Cys Ile
 50 55 60
 Arg Asp Pro Ala Leu Val His Gln Arg Pro Ala Pro Pro Ser Thr Val
 65 70 75 80

Thr Thr Ala Gly Val Thr Pro Gln Pro Glu Ser Leu Ser Pro Ser Gly
 85 90 95
 Lys Glu Pro Ala Ala Ser Ser Gly Ala Glu Gly Gly Ala Ser Thr
 100 105 110
 Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
 115 120 125
 Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
 130 135 140
 Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
 145 150 155 160
 Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
 165 170 175
 Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
 180 185 190
 Asn Val Asn His Lys Pro Ser Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu
 195 200 205
 Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 210 215 220
 Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 225 230 235 240
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 245 250 255
 Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 260 265 270
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 275 280 285
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 290 295 300
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 305 310 315 320
 Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 325 330 335
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Asn
 340 345 350
 Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 355 360 365
 Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 370 375 380
 Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 385 390 395 400
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 405 410 415
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 420 425 430
 Ser Leu Ser Pro
 435

<210> 5

<211> 453

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo IL15-CH1CH2CH3 chỗ phình-Fc

<400> 5

Asp Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile Glu Asp Leu
 1 5 10 15
 Ile Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu Ser Asp Val
 20 25 30

```

His Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu Glu Leu
      35      40      45
Gln Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His Asp Thr Val
      50      55      60
Glu Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asp Ser Leu Ser Ser Asn Gly Asn
      65      70      75      80
Val Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu Lys Asn
      85      90      95
Ile Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln Met Phe Ile
      100      105      110
Asn Thr Ser Ala Gly Gly Lys Pro Gly Gly Ser Ala Gly Gly Ala Ser
      115      120      125
Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
      130      135      140
Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
      145      150      155      160
Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
      165      170      175
His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
      180      185      190
Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile
      195      200      205
Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val
      210      215      220
Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
      225      230      235      240
Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
      245      250      255
Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
      260      265      270
Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
      275      280      285
Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
      290      295      300
Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
      305      310      315      320
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
      325      330      335
Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
      340      345      350
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Arg Asp Glu Leu Thr Lys
      355      360      365
Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
      370      375      380
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
      385      390      395      400
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
      405      410      415
Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
      420      425      430
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
      435      440      445
Leu Ser Leu Ser Pro
      450

```

<210> 6

<211> 436

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo IL15R α -CH1CH2CH3 chỗ phình-Fc

<400> 6

```

Asp Thr Cys Pro Pro Pro Met Ser Val Glu His Ala Asp Ile Trp Val
1          5          10          15
Lys Ser Tyr Ser Leu Tyr Ser Arg Glu Arg Tyr Ile Cys Asn Ser Gly
          20          25          30
Phe Lys Arg Lys Ala Gly Thr Ser Ser Leu Thr Glu Cys Val Leu Asn
          35          40          45
Lys Ala Thr Asn Val Ala His Trp Thr Thr Pro Ser Leu Lys Cys Ile
          50          55          60
Arg Asp Pro Ala Leu Val His Gln Arg Pro Ala Pro Pro Ser Thr Val
65          70          75          80
Thr Thr Ala Gly Val Thr Pro Gln Pro Glu Ser Leu Ser Pro Ser Gly
          85          90          95
Lys Glu Pro Ala Ala Ser Ser Gly Ala Glu Gly Gly Gly Ala Ser Thr
          100          105          110
Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
          115          120          125
Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
130          135          140
Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
145          150          155          160
Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
          165          170          175
Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
180          185          190
Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu
195          200          205
Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
210          215          220
Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
225          230          235          240
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
          245          250          255
Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
260          265          270
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
275          280          285
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
290          295          300
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
305          310          315          320
Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
          325          330          335
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
          340          345          350
Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
          355          360          365
Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
          370          375          380
Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
385          390          395          400
Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
          405          410          415
Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
          420          425          430
Ser Leu Ser Pro
          435

```

<210> 7
 <211> 457
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nhân tạo VH-CH1CH2CH3 chỗ lõm-Fc kháng PD1

<400> 7
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Val Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Asp Thr Gly Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Ala Ile Ser Arg Val Asn Ala Lys Asn Thr Met Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Glu Gly Gly Gly Thr Gly Trp Gly Val Leu Lys Asp Trp
 100 105 110
 Pro Tyr Gly Leu Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 115 120 125
 Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser
 130 135 140
 Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
 145 150 155 160
 Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
 165 170 175
 Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
 180 185 190
 Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln
 195 200 205
 Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
 210 215 220
 Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
 225 230 235 240
 Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
 245 250 255
 Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
 260 265 270
 Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
 275 280 285
 Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
 290 295 300
 Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
 305 310 315 320
 Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
 325 330 335
 Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 340 345 350
 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
 355 360 365
 Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe
 370 375 380
 Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 385 390 395 400

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 405 410 415
 Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 420 425 430
 Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 435 440 445
 Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 450 455

<210> 8
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nhân tạo VK-CK kháng PD1

<400> 8
 Gln Pro Val Leu Thr Gln Pro Leu Ser Val Ser Val Ala Leu Gly Gln
 1 5 10 15
 Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Asn Val
 20 25 30
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
 35 40 45
 Arg Asp Ser Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Ala Gln Ala Gly
 65 70 75 80
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Thr Ala Val
 85 90 95
 Phe Gly Thr Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gln Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 9
 <211> 103
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nhân tạo IL15R α

<400> 9
 Asp Thr Cys Pro Pro Pro Met Ser Val Glu His Ala Asp Ile Trp Val
 1 5 10 15
 Lys Ser Tyr Ser Leu Tyr Ser Arg Glu Arg Tyr Ile Cys Asn Ser Gly
 20 25 30

```

Phe Lys Arg Lys Ala Gly Thr Ser Ser Leu Thr Glu Cys Val Leu Asn
      35      40      45
Lys Ala Thr Asn Val Ala His Trp Thr Thr Pro Ser Leu Lys Cys Ile
      50      55      60
Arg Asp Pro Ala Leu Val His Gln Arg Pro Ala Pro Pro Ser Thr Val
65      70      75      80
Thr Thr Ala Gly Val Thr Pro Gln Pro Glu Ser Leu Ser Pro Ser Gly
      85      90      95
Lys Glu Pro Ala Ala Ser Ser
      100

```

<210> 10
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Trình tự tự nhiên

<220>
 <223> Trình tự tự nhiên IL15

```

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

```

<210> 11
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nhân tạo HCDR1 prolgolimab

```

<400> 11
Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Trp Met Tyr
1      5

```

<210> 12
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nhân tạo HCDR2 prolgolimab

```

<400> 12
Ala Ile Asp Thr Gly Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1      5      10      15

```

Gly

<210> 13

<211> 23

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo HCDR3 prolgolimab

<400> 13

Cys Ala Arg Asp Glu Gly Gly Gly Thr Gly Trp Gly Val Leu Lys Asp

1

5

10

15

Trp Pro Tyr Gly Leu Asp Ala

20

<210> 14

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo LCDR1 prolgolimab

<400> 14

Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Asn Val His

1

5

10

<210> 15

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo LCDR2 prolgolimab

<400> 15

Arg Asp Ser Asn Arg Pro Ser

1

5

<210> 16

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo LCDR3 prolgolimab

<400> 16

Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Thr Ala Val

1

5

10

<210> 17

<211> 129

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo VH prolgolimab

<400> 17

```

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

```

<210> 18

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo VL prolgolimab

<400> 18

```

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

```

<210> 19

<211> 216

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo IL15Rα-CK-CiA

<400> 19

```

Asp Thr Cys Pro Pro Pro Met Ser Val Glu His Ala Asp Ile Trp Val
1      5      10      15
Lys Ser Tyr Ser Leu Tyr Ser Arg Glu Arg Tyr Ile Cys Asn Ser Gly
20    25    30
Phe Lys Arg Lys Ala Gly Thr Ser Ser Leu Thr Glu Cys Val Leu Asn
35    40    45

```

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

<210> 20

<211> 454

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo IL15-CH1CH2CH3-CiA

<400> 20

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

Glu Pro Lys Ser Ala Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 225 230 235 240
 Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 245 250 255
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 260 265 270
 Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 275 280 285
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 290 295 300
 Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 305 310 315 320
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 325 330 335
 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 340 345 350
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
 355 360 365
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 370 375 380
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 385 390 395 400
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 405 410 415
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 420 425 430
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 435 440 445
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 450

<210> 21

<211> 233

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo IL15-CK- CiA

<400> 21

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

Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
 165 170 175
 Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
 180 185 190
 Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
 195 200 205
 Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
 210 215 220
 Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Ala
 225 230

<210> 22

<211> 436

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo IL15R α -CH1CH2CH3-CiA

<400> 22

Asp Thr Cys Pro Pro Pro Met Ser Val Glu His Ala Asp Ile Trp Val
 1 5 10 15
 Lys Ser Tyr Ser Leu Tyr Ser Arg Glu Arg Tyr Ile Cys Asn Ser Gly
 20 25 30
 Phe Lys Arg Lys Ala Gly Thr Ser Ser Leu Thr Glu Cys Val Leu Asn
 35 40 45
 Lys Ala Thr Asn Val Ala His Trp Thr Thr Pro Ser Leu Lys Cys Ile
 50 55 60
 Arg Asp Pro Ala Leu Val His Gln Arg Pro Ala Pro Pro Ser Thr Val
 65 70 75 80
 Thr Thr Ala Gly Val Thr Pro Gln Pro Glu Ser Leu Ser Pro Ser Gly
 85 90 95
 Lys Glu Pro Ala Ala Ser Ser Gly Ala Glu Gly Gly Gly Ala Ser Thr
 100 105 110
 Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
 115 120 125
 Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
 130 135 140
 Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
 145 150 155 160
 Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
 165 170 175
 Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
 180 185 190
 Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu
 195 200 205
 Pro Lys Ser Ala Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 210 215 220
 Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 225 230 235 240
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 245 250 255
 Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 260 265 270
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 275 280 285
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 290 295 300
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 305 310 315 320

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 325 330 335
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Asn
 340 345 350
 Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 355 360 365
 Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 370 375 380
 Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 385 390 395 400
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 405 410 415
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 420 425 430
 Ser Leu Ser Pro
 435

<210> 23

<211> 453

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo IL15-CH1CH2CH3 chỗ phình-Fc

<400> 23

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

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 275 280 285
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 290 295 300
 Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 305 310 315 320
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 325 330 335
 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 340 345 350
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Arg Asp Glu Leu Thr Lys
 355 360 365
 Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 370 375 380
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 385 390 395 400
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 405 410 415
 Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 420 425 430
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 435 440 445
 Leu Ser Leu Ser Pro
 450

<210> 24

<211> 436

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo IL15R α -CH1CH2CH3 chỗ phình-Fc

<400> 24

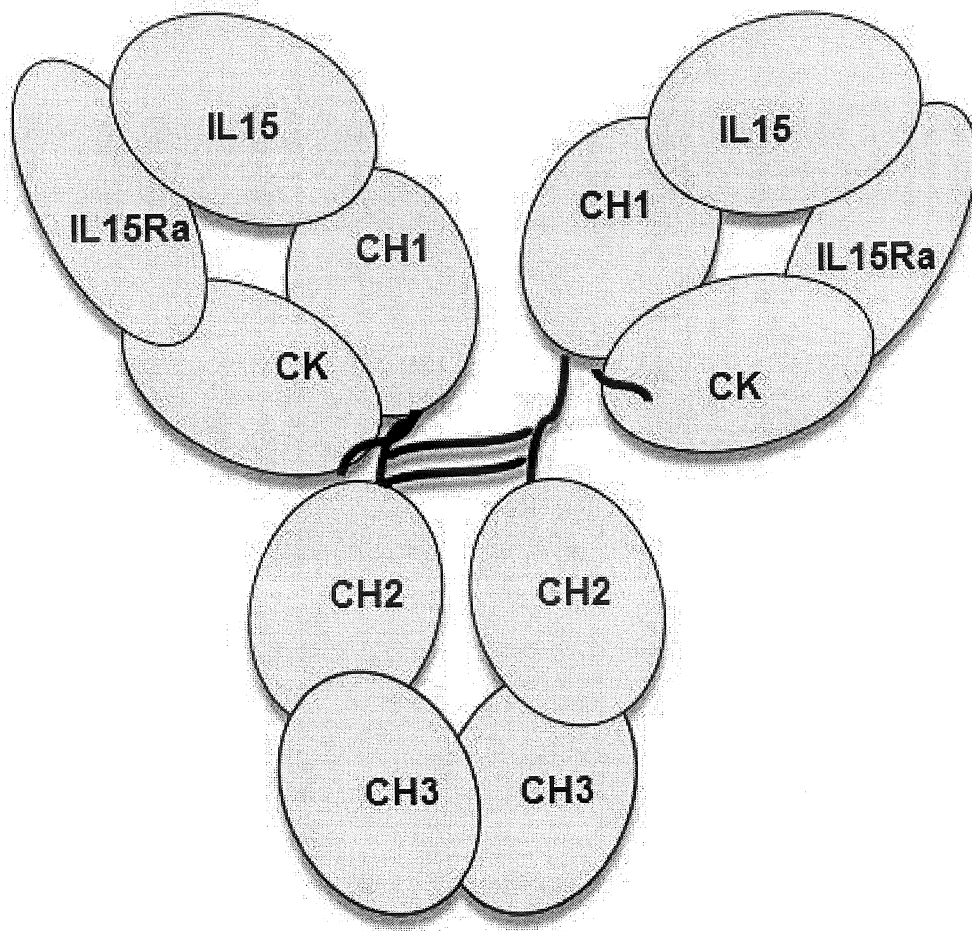
Asp Thr Cys Pro Pro Pro Met Ser Val Glu His Ala Asp Ile Trp Val
 1 5 10 15
 Lys Ser Tyr Ser Leu Tyr Ser Arg Glu Arg Tyr Ile Cys Asn Ser Gly
 20 25 30
 Phe Lys Arg Lys Ala Gly Thr Ser Leu Thr Glu Cys Val Leu Asn
 35 40 45
 Lys Ala Thr Asn Val Ala His Trp Thr Thr Pro Ser Leu Lys Cys Ile
 50 55 60
 Arg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

```

Pro Lys Ser Ala Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 210                215                220
Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
225                230                235                240
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
                245                250                255
Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
                260                265                270
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
                275                280                285
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
290                295                300
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
305                310                315                320
Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
                325                330                335
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
                340                345                350
Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
                355                360                365
Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
                370                375                380
Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
385                390                395                400
Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
                405                410                415
Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
                420                425                430
Ser Leu Ser Pro
                435

```

1/23

**Fig.1**

2/23

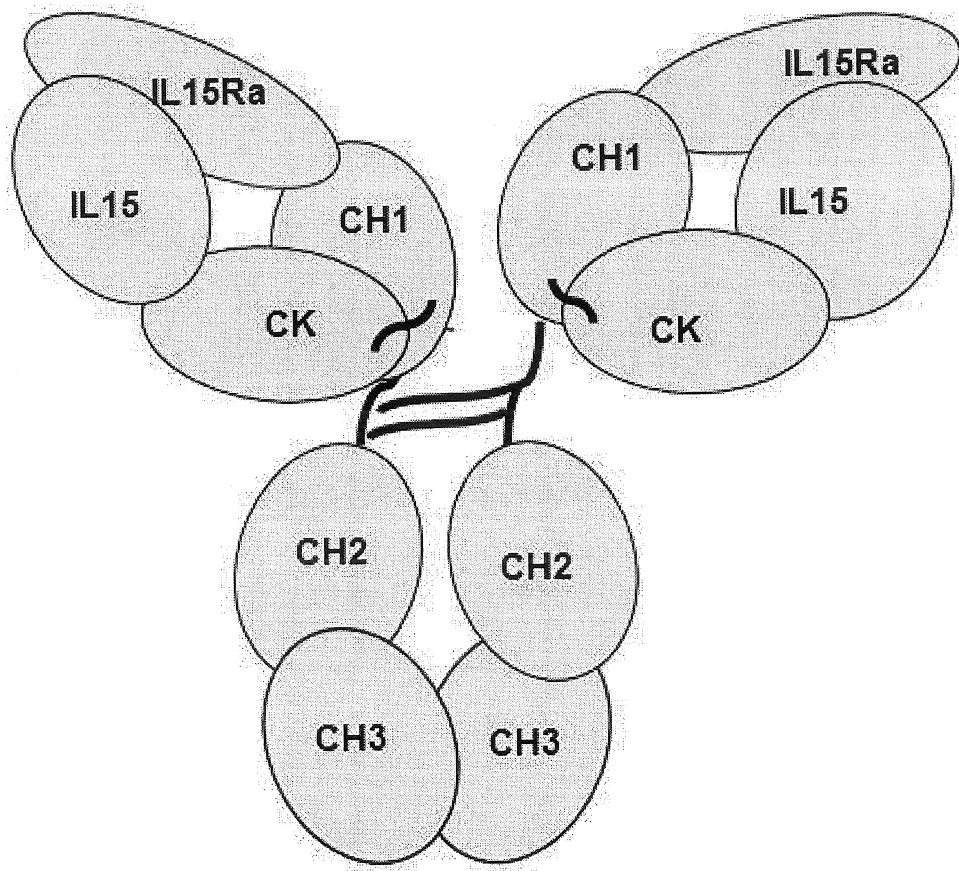


Fig.2

3/23

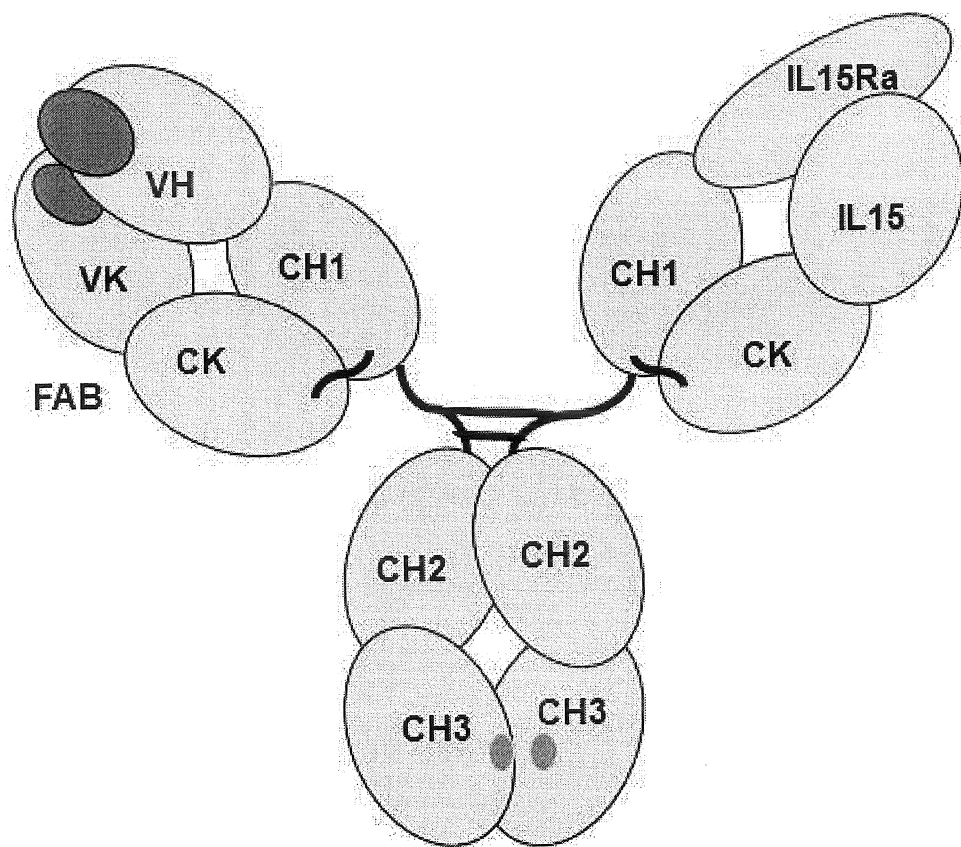
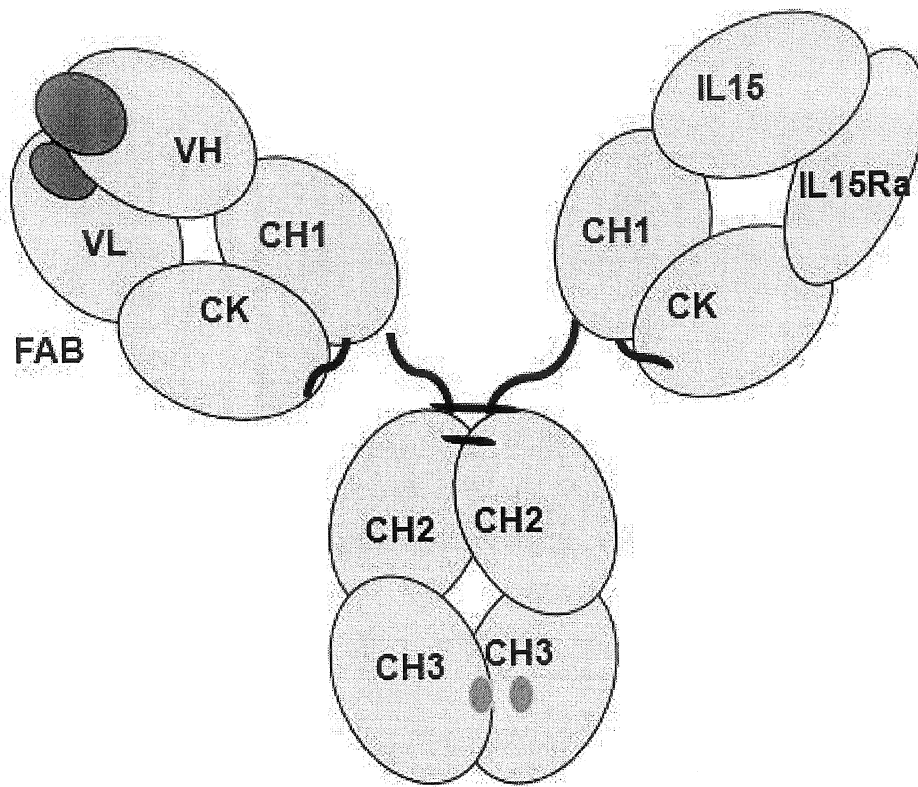


Fig.3

4/23

**Fig.4**

5/23

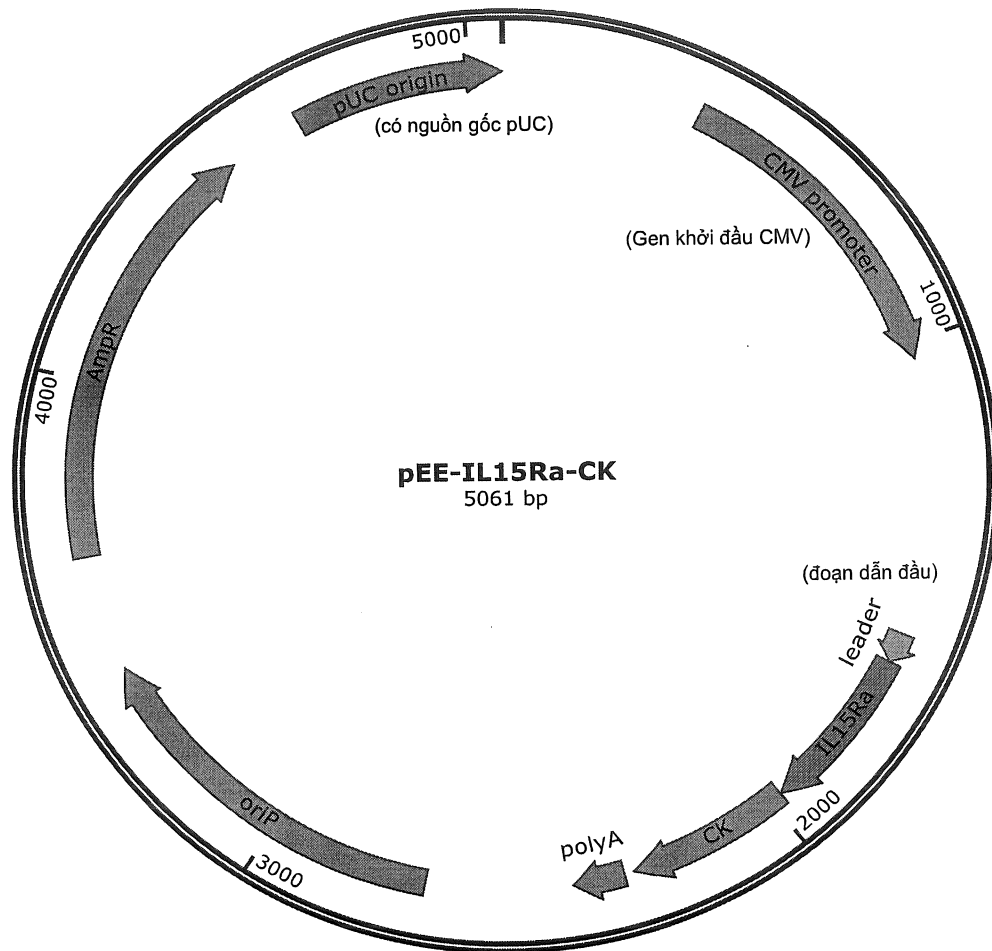
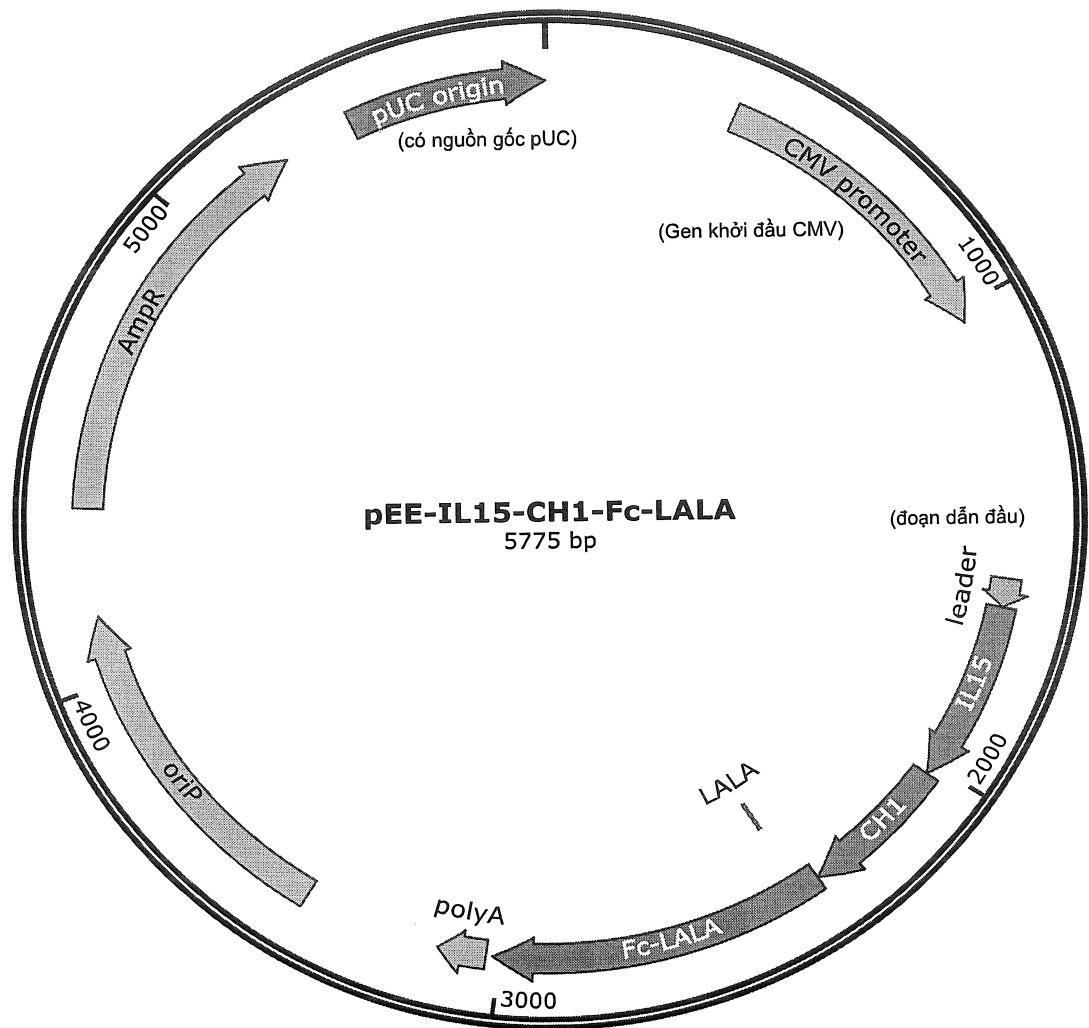
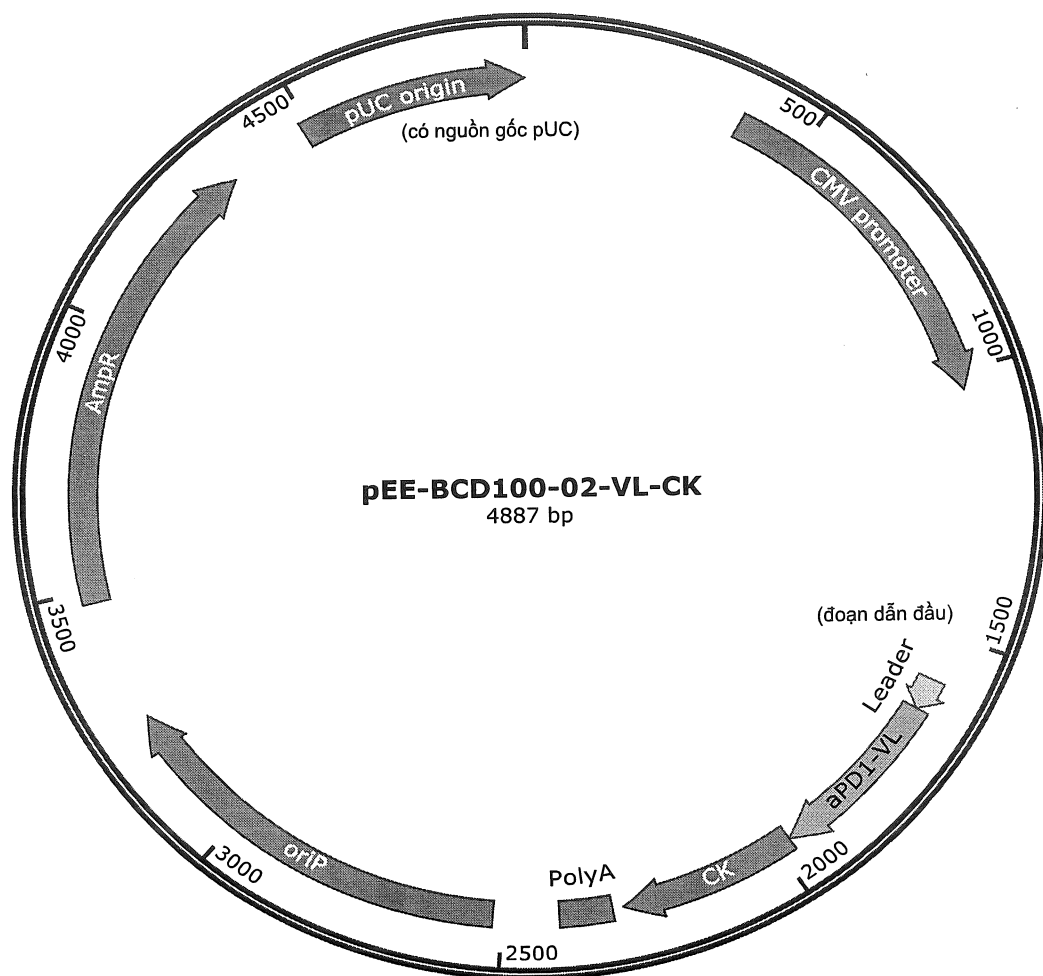


Fig.5

6/23

**Fig.6**

7/23

**Fig.7**

8/23

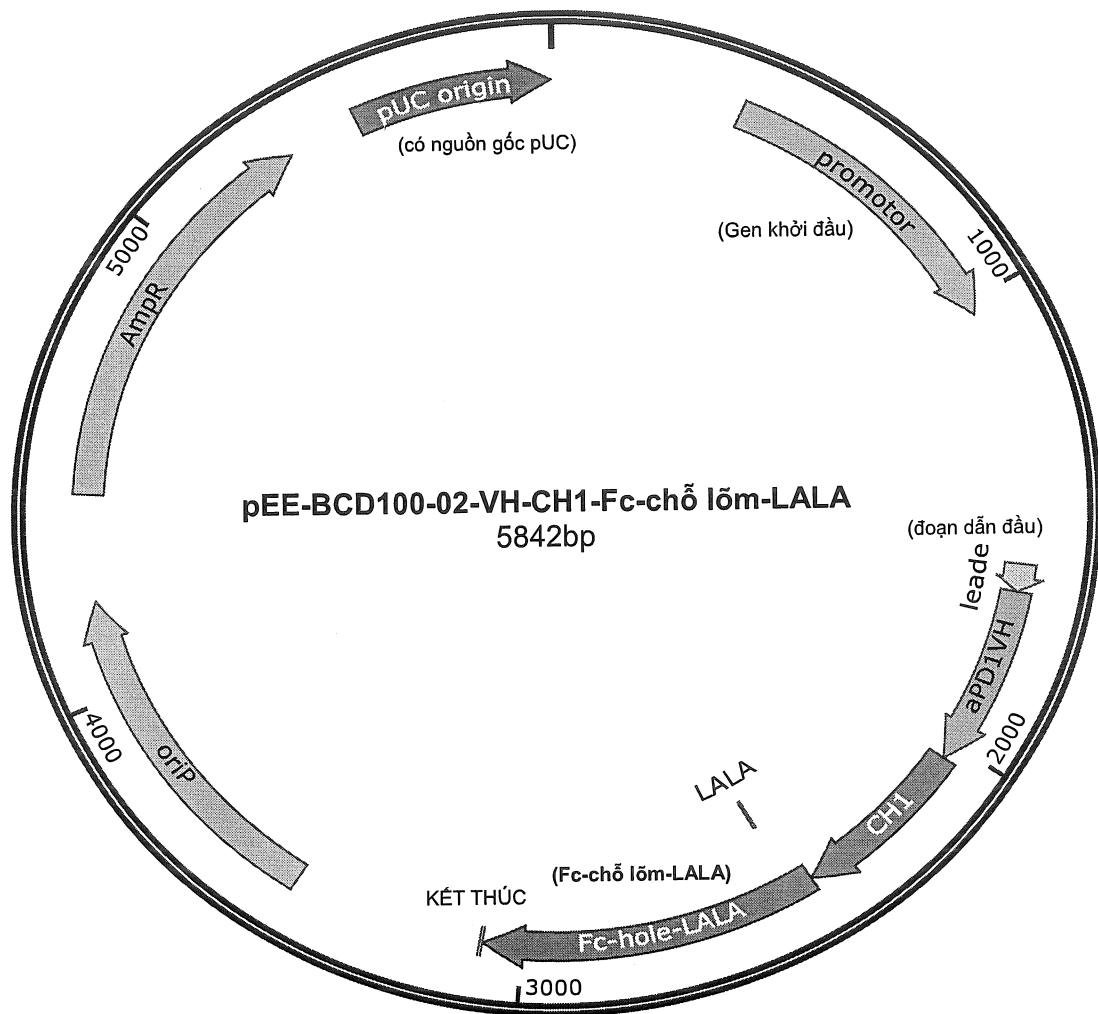


Fig.8

9/23

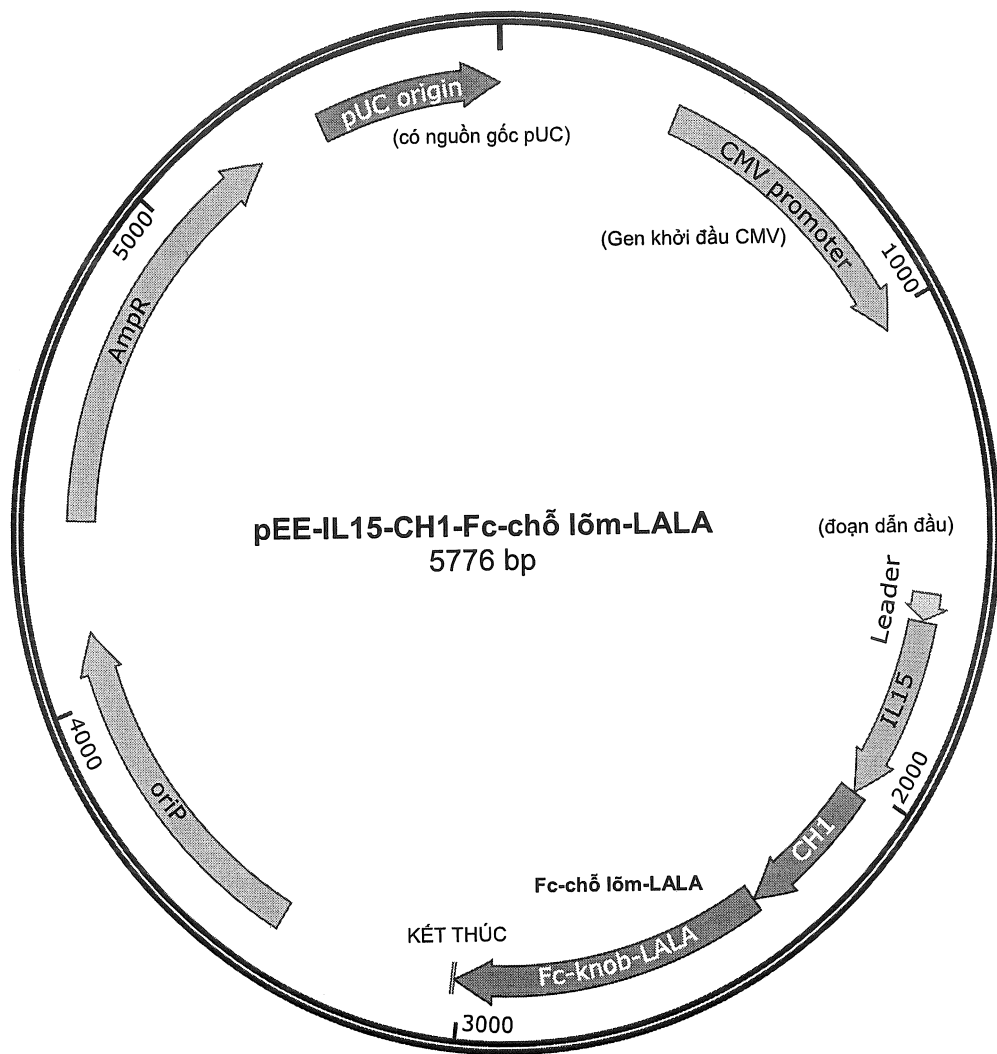


Fig.9

10/23

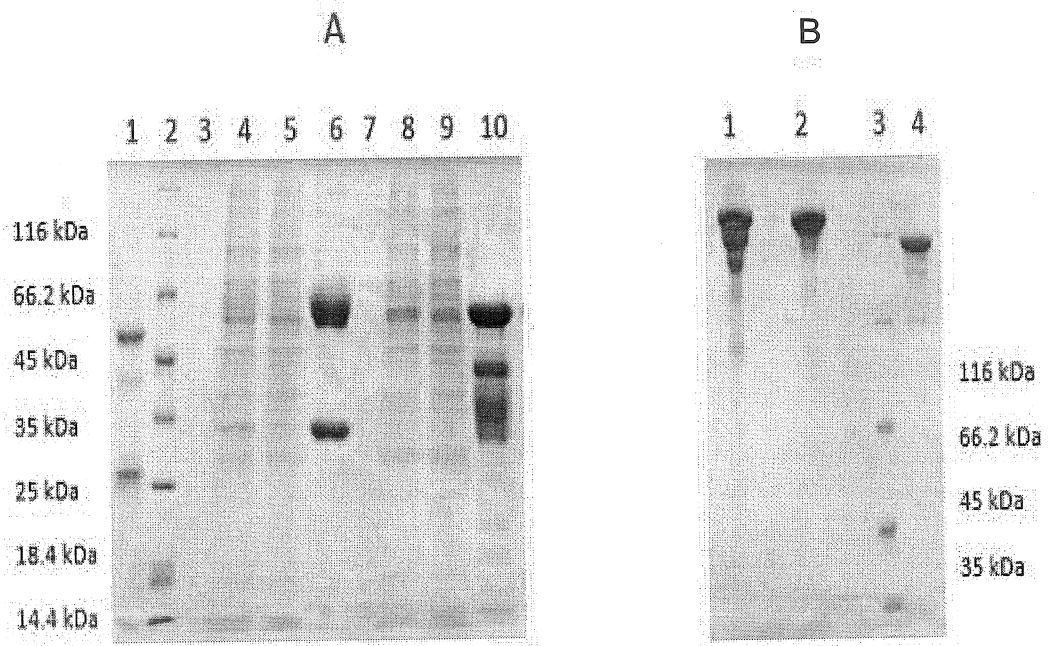


Fig.10

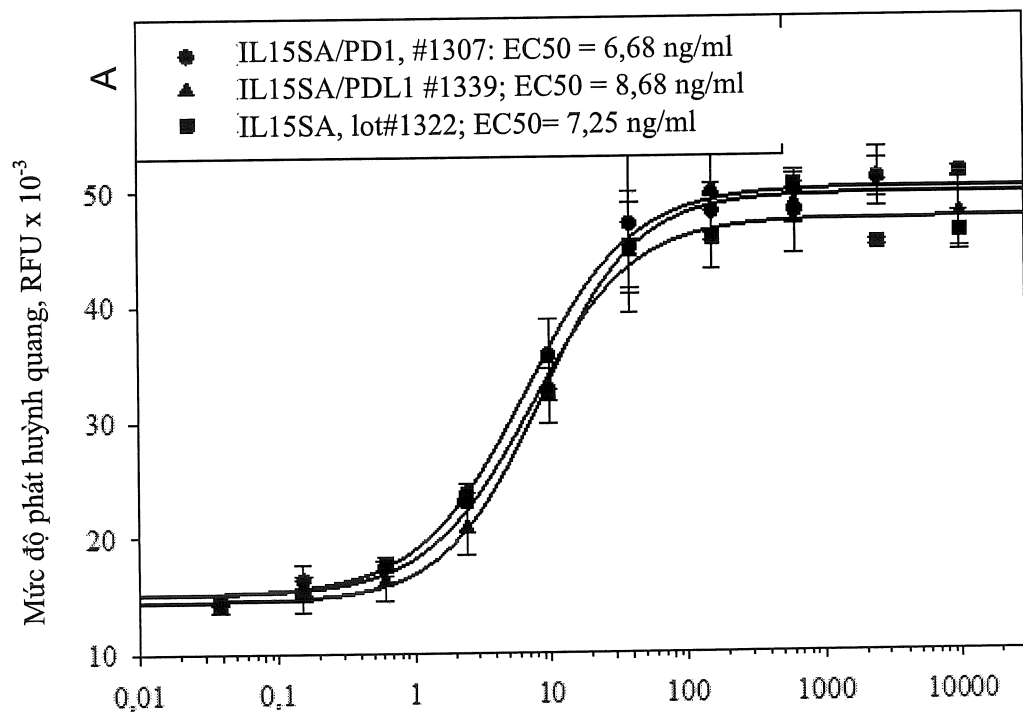


Fig.11

11/23

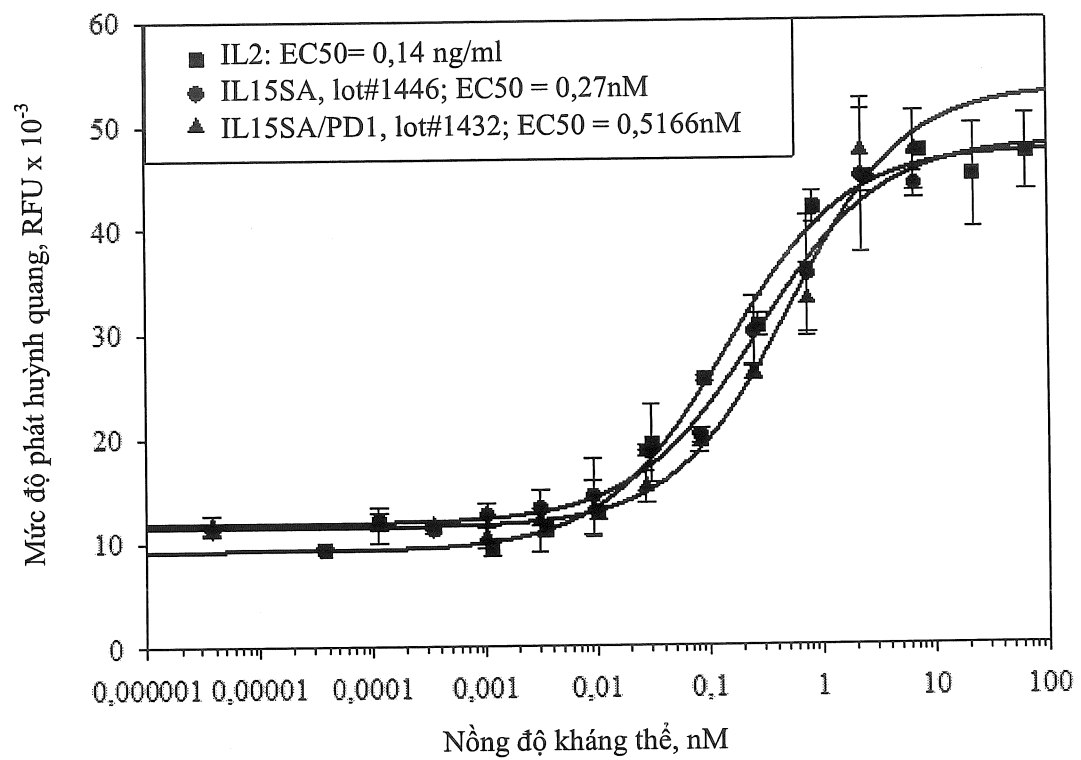


Fig.12

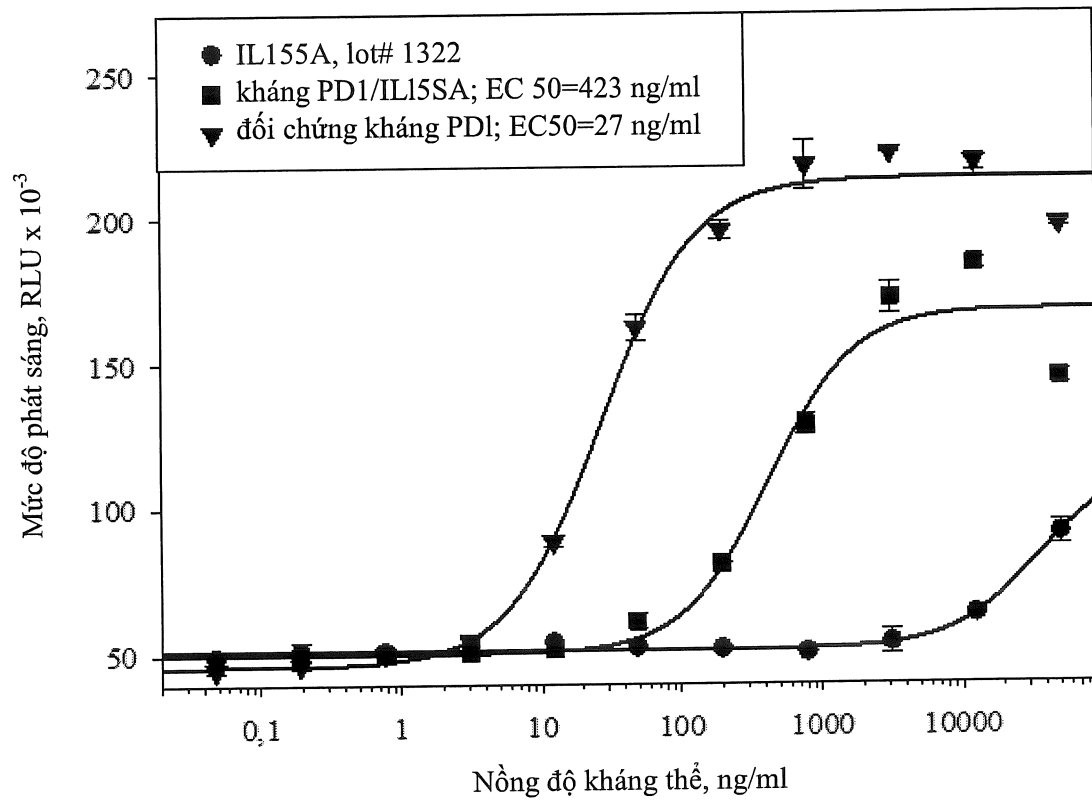


Fig.13

12/23

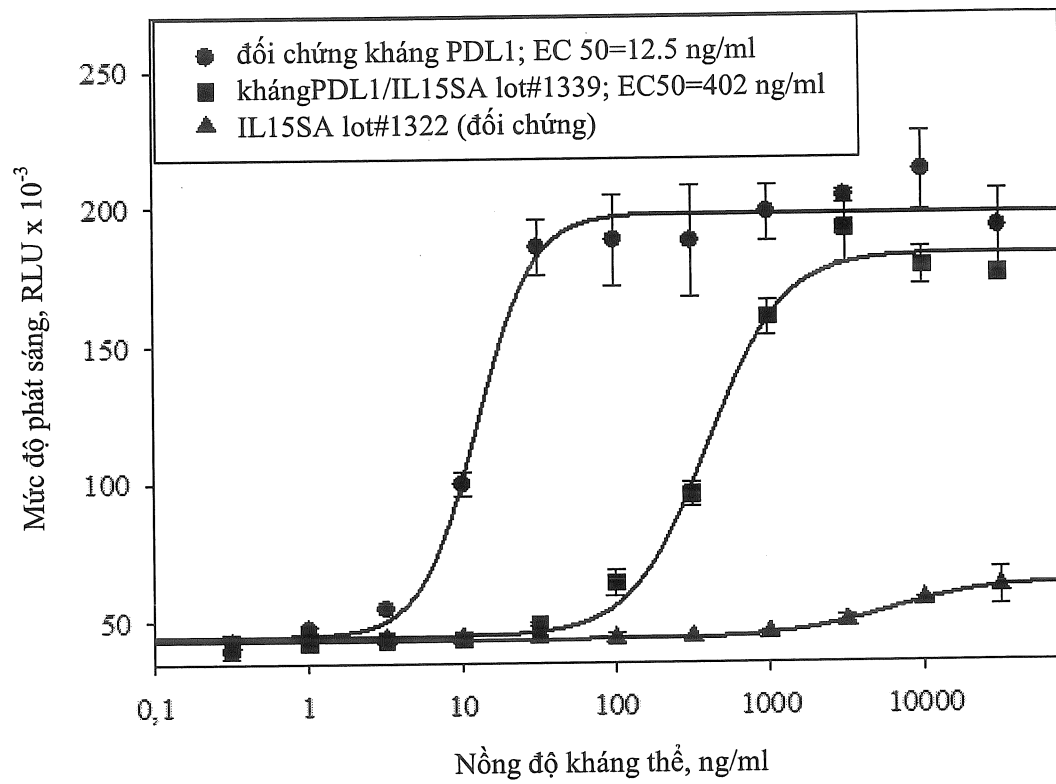
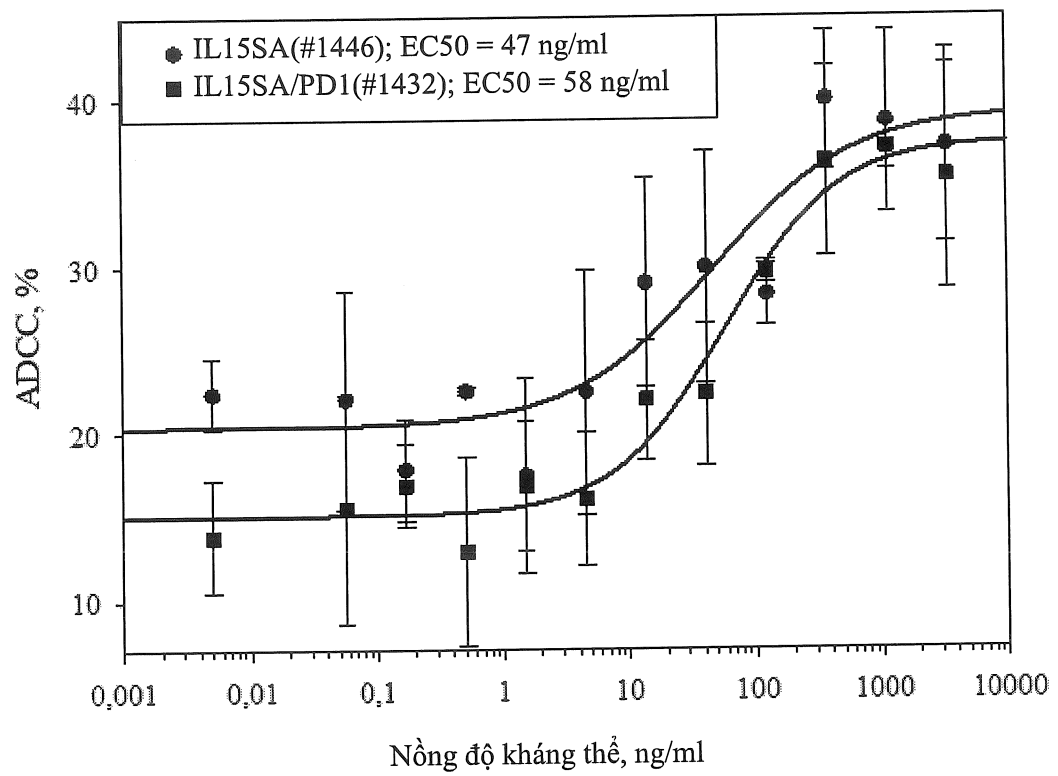


Fig.14

13/23

**Fig.15**

14/23

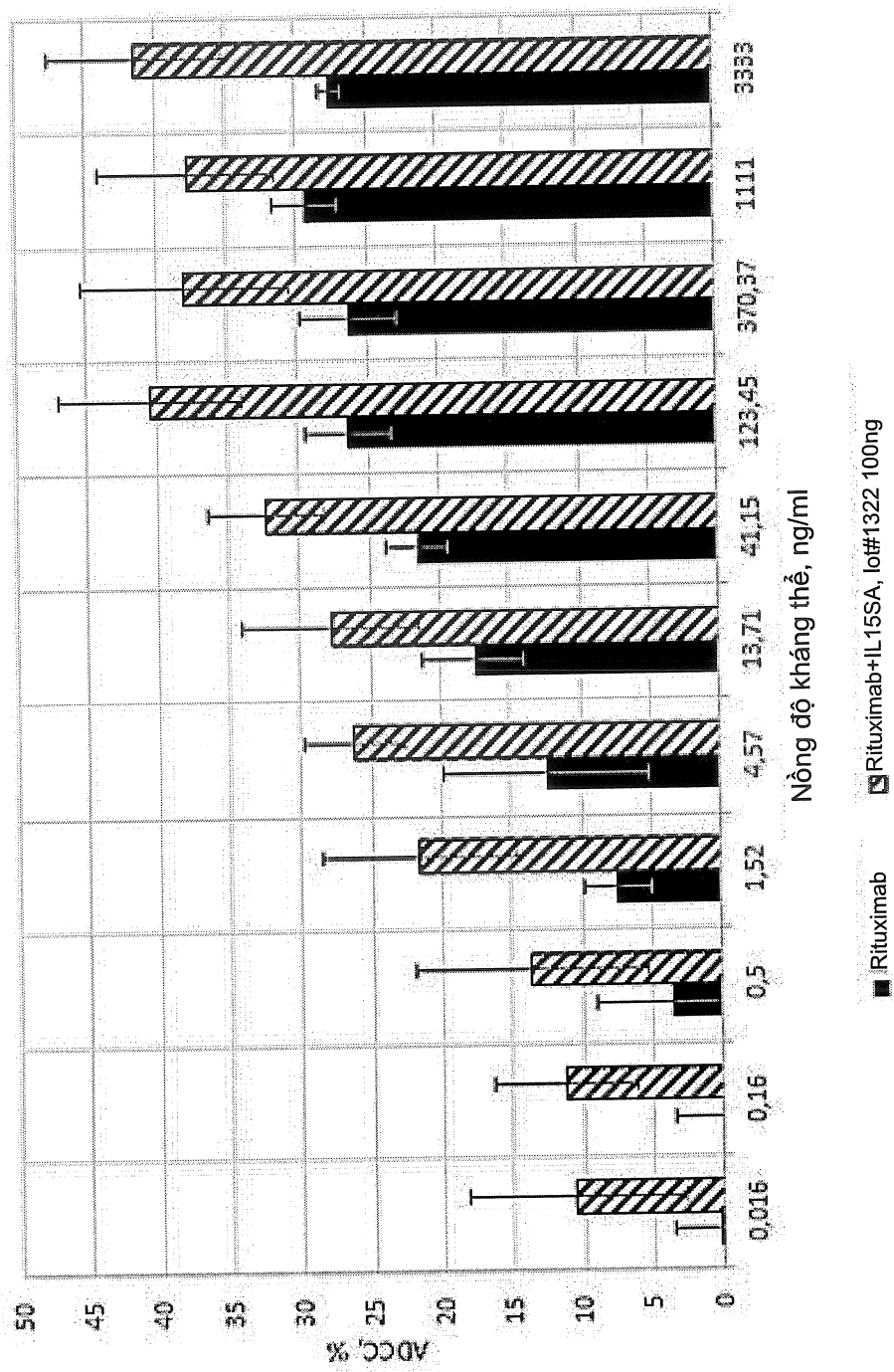
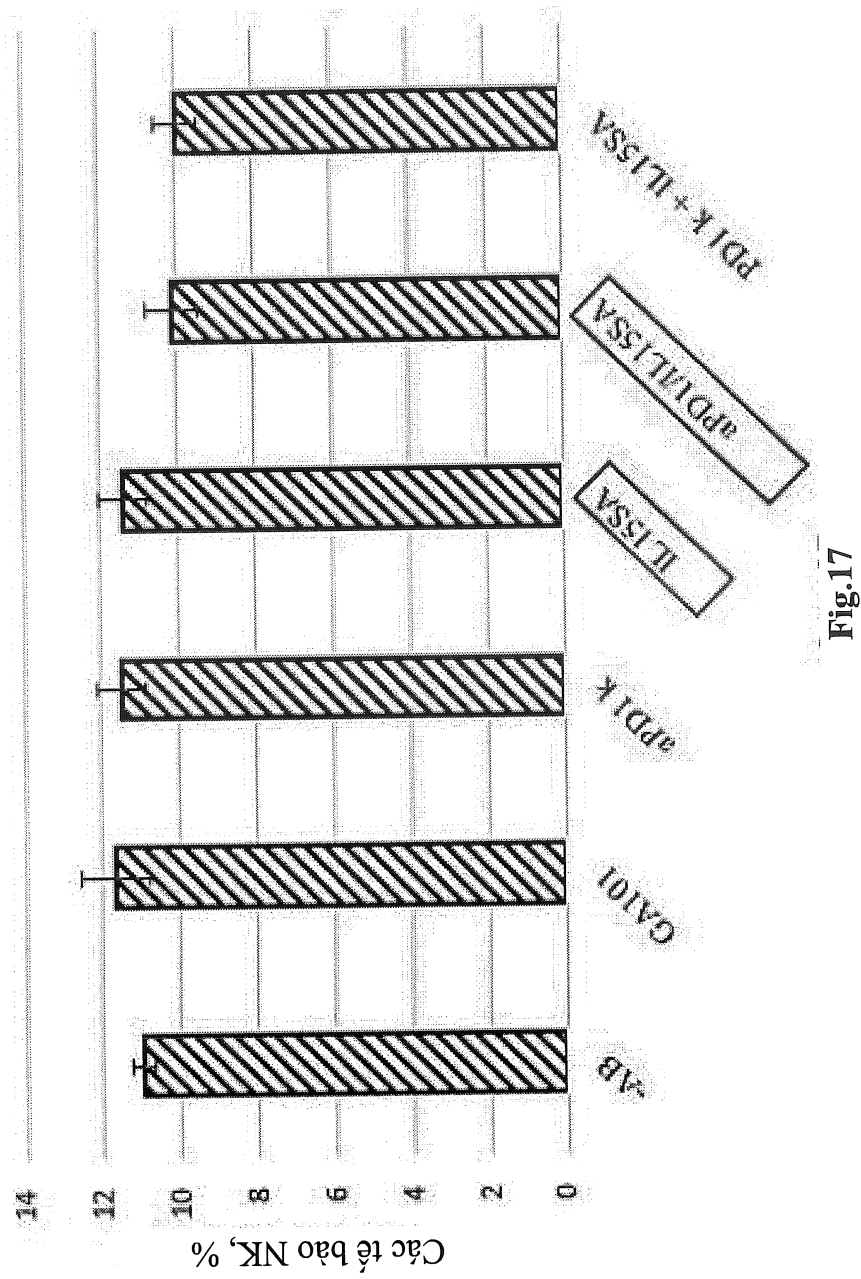


Fig. 16

15/23



16/23

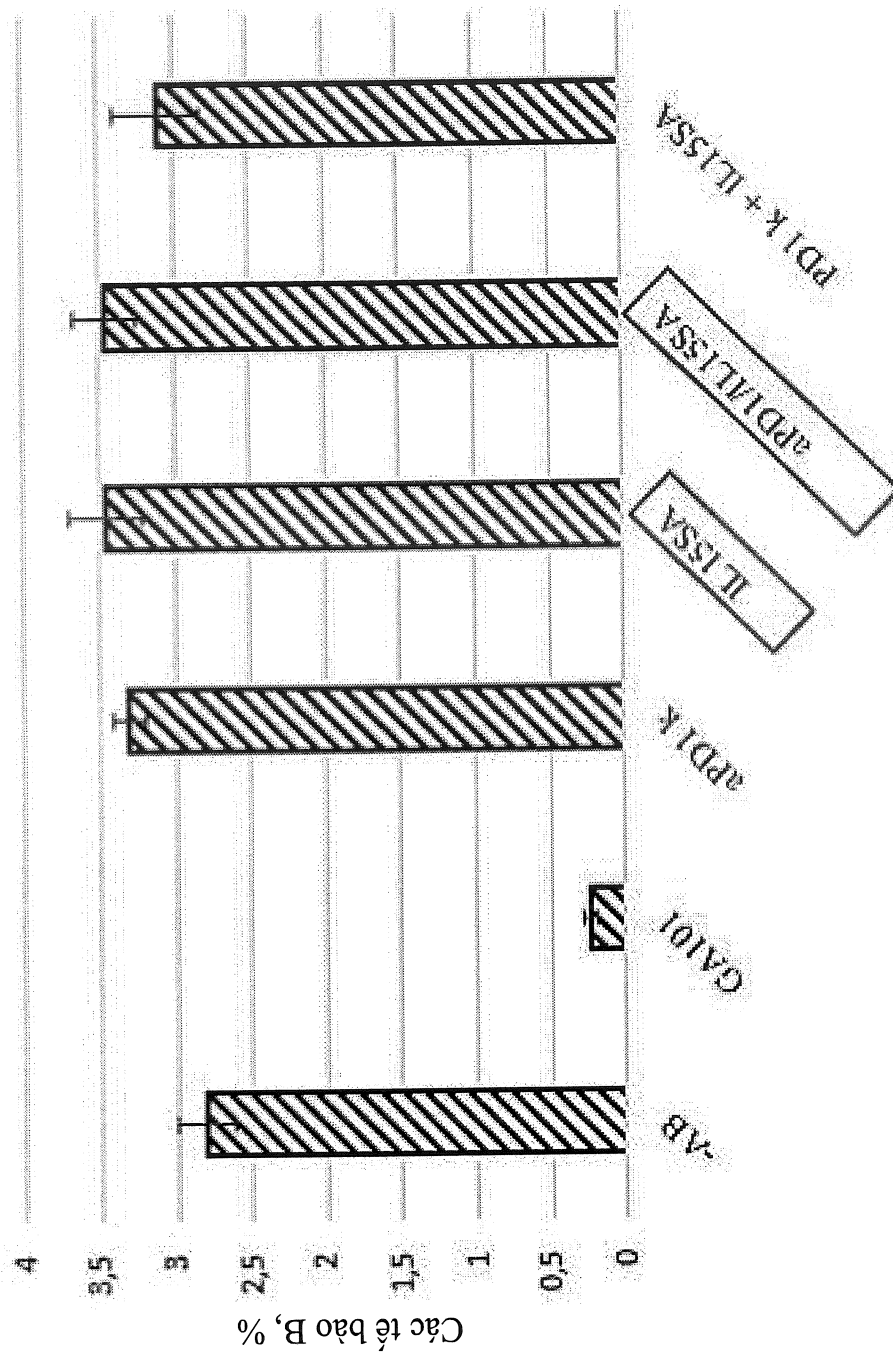


Fig.18

17/23

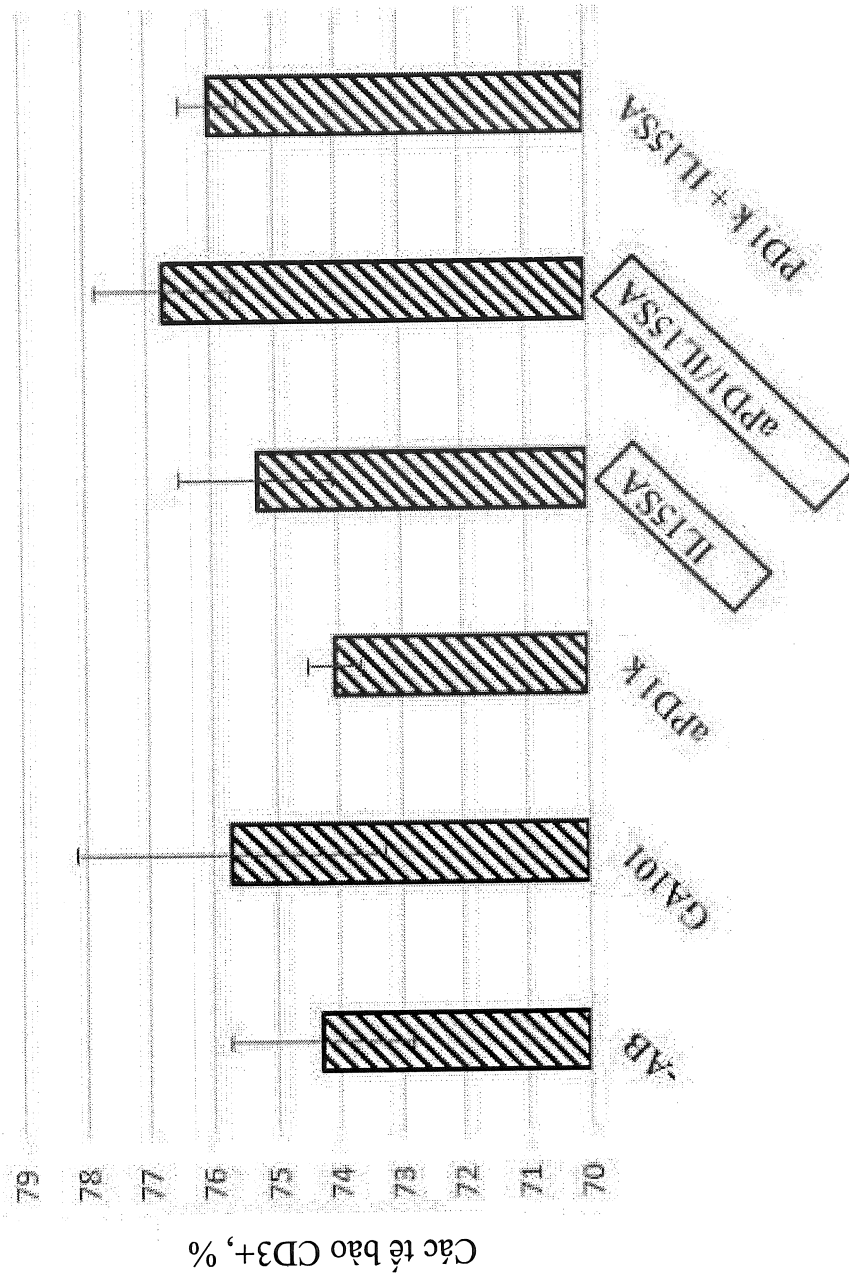


Fig. 19

18/23

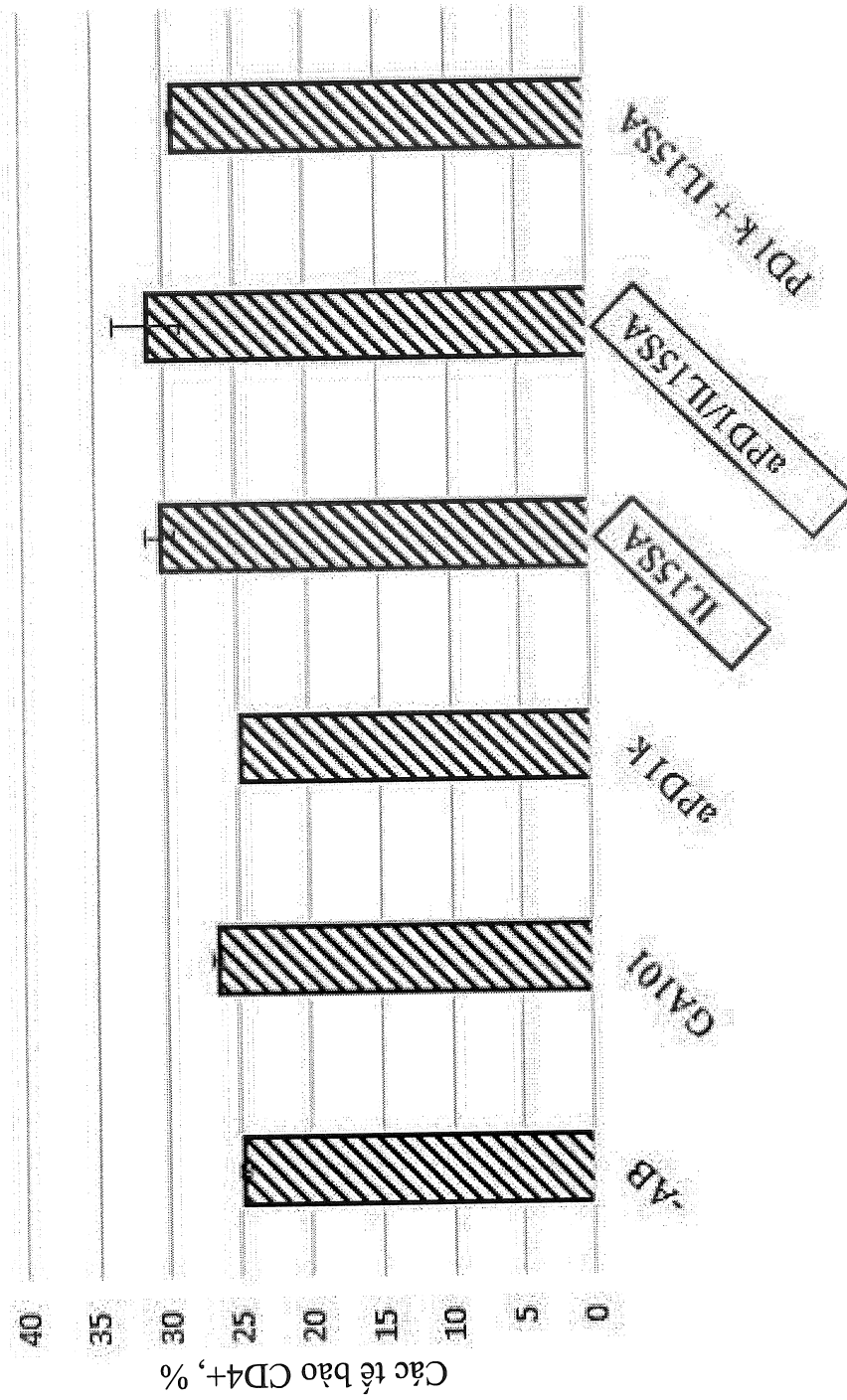


Fig.20

19/23

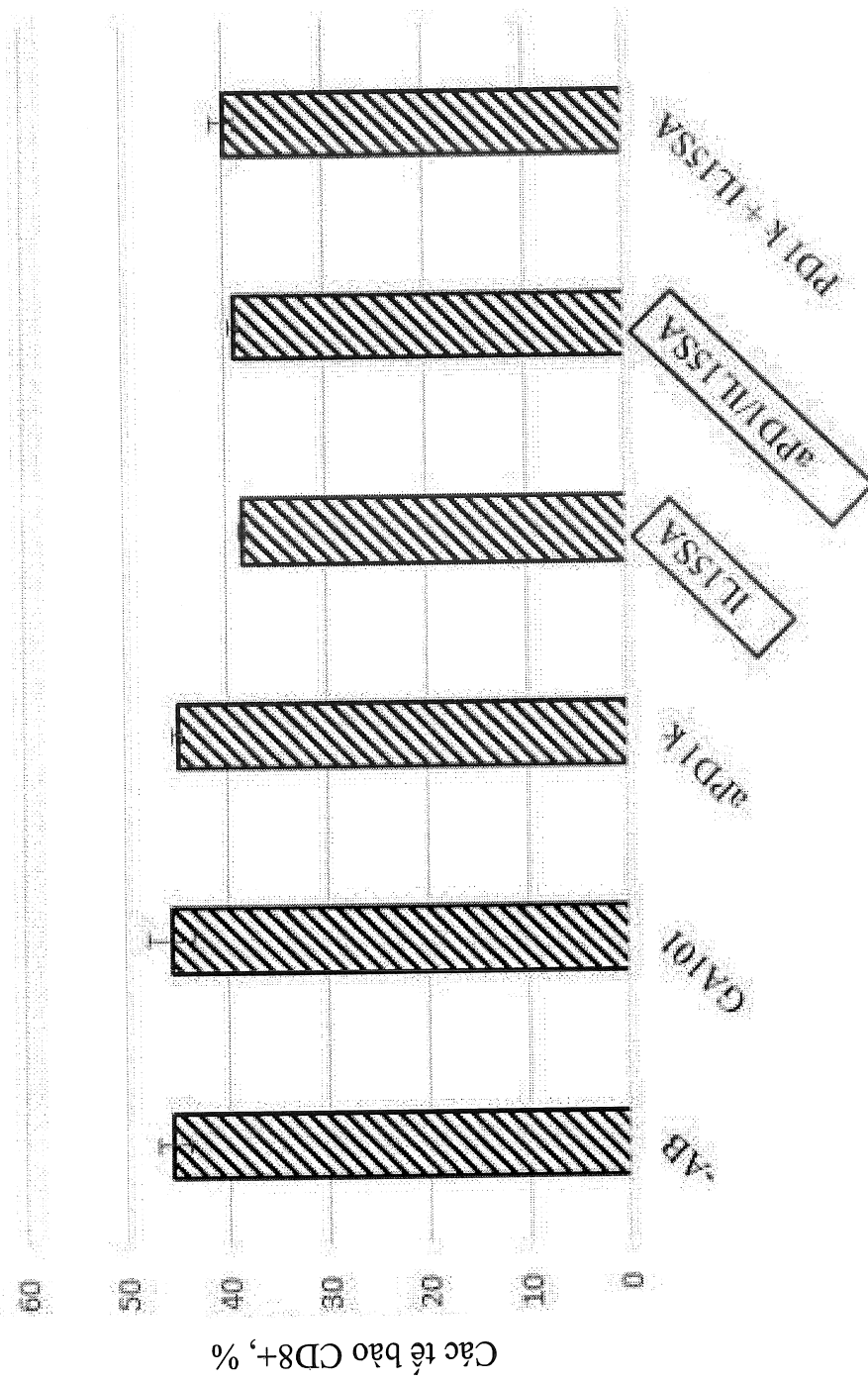
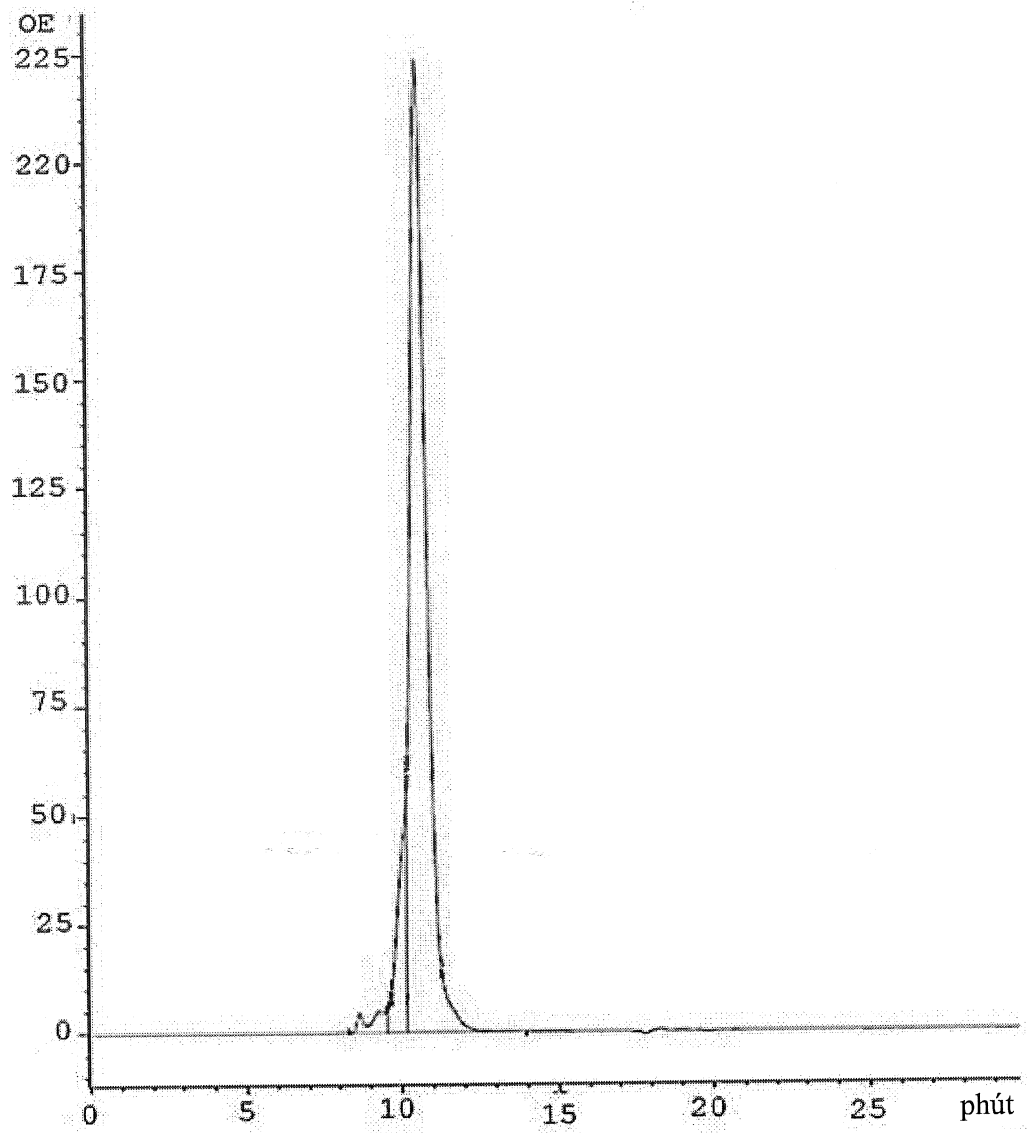


Fig.21

20/23

**Fig.22**

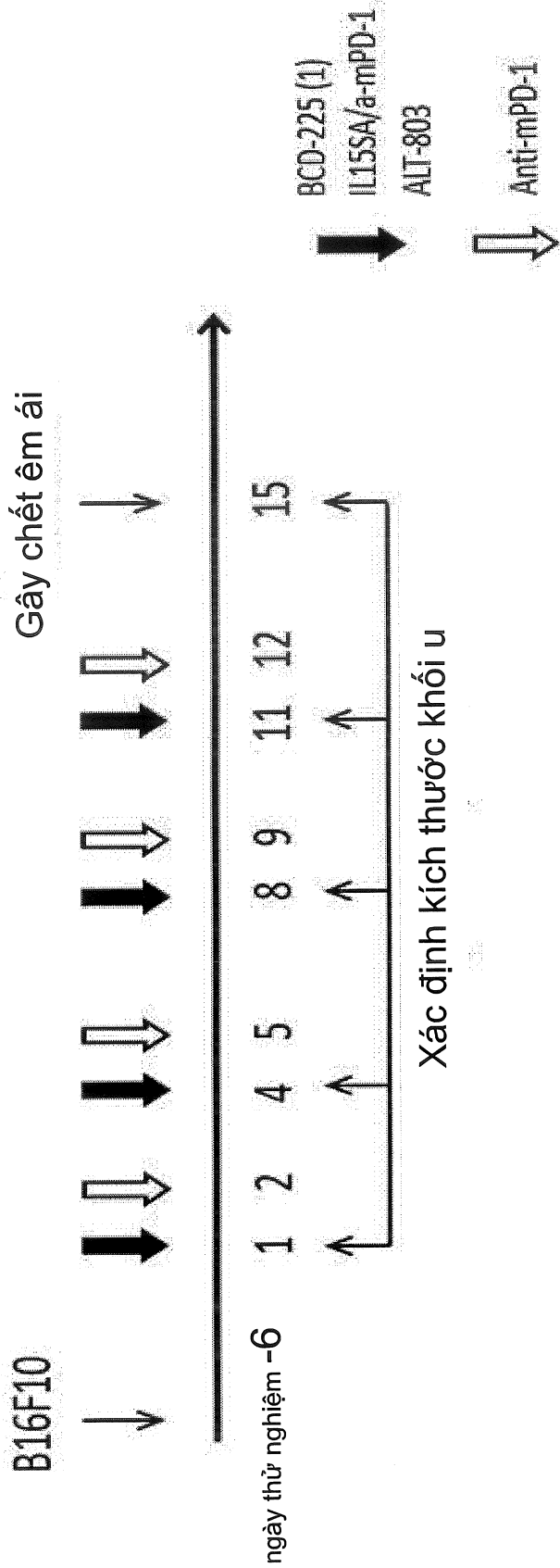


Fig. 23

22/23

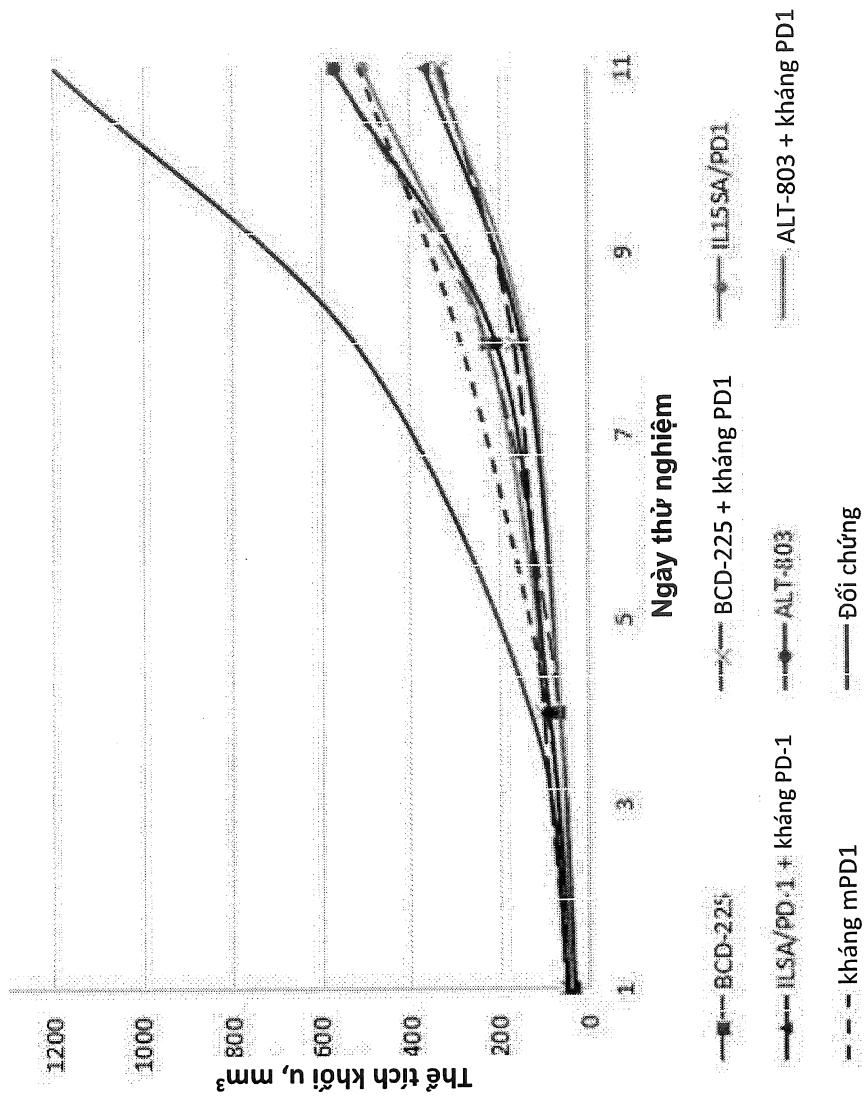


Fig.24

23/23

TGI, %

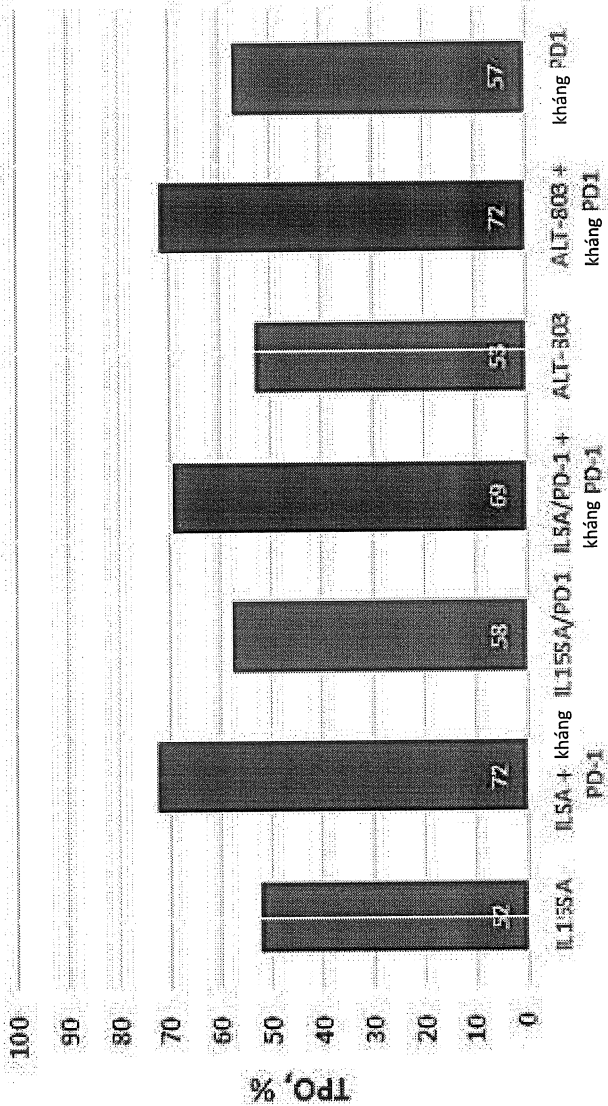


Fig.25