



(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) 
1-0020998

(51)⁷ **C07K 14/55, A61K 38/20, 38/00**

(13) **B**

-
- | | | | | | |
|------|---|------------|------------|---------------|------------|
| (21) | 1-2012-01435 | (22) | 26.11.2010 | | |
| (86) | PCT/CU2010/000005 | 26.11.2010 | (87) | WO2011/063770 | 03.06.2011 |
| (30) | 2009-0203 | 27.11.2009 | CU | | |
| (45) | 27.05.2019 | 374 | (43) | 27.08.2012 | 293 |
| (73) | CENTRO DE INMUNOLOGIA MOLECULAR (CIM) (CU)
Calle 216 sq. 15, Atabey, Playa, Habana, 11600 Ciudad de la Habana, Cuba | | | | |
| (72) | LEON MONZON, Kalet (CU), CARMENATE PORTILLA, Tania (CU), GARCIA
MATINEZ, Karina (CU), LAGE DAVILA, Agustín Bienvenido (CU), PEREZ
RODRIGUEZ, Saumel (CU), GONZALEZ ROCHE, Diamile (CU), MARQUEZ
PERERA, Gabriel (CU) | | | | |
| (74) | Văn phòng luật sư Phạm và Liên danh (PHAM & ASSOCIATES) | | | | |
-

(54) **POLYPEPTIT ĐIỀU HÒA MIỄN DỊCH CÓ NGUỒN GỐC TỪ INTERLEUKIN-2 (IL-2) VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA POLYPEPTIT NÀY**

(57) Sáng chế đề cập chung đến các polypeptit trong đó trình tự bậc một của chúng có độ tương đồng trình tự cao so với interleukin 2 (IL-2) của người với một số đột biến điểm trên trình tự của IL-2 nguyên thể. Các polypeptit theo sáng chế có tác dụng điều hòa miễn dịch trên hệ miễn dịch, có hoạt tính chọn lọc/ưu tiên trên tế bào T điều hòa. Sáng chế cũng đề cập đến các polypeptit cụ thể trong đó trình tự axit amin của chúng được bộc lộ trong bản mô tả này. Sáng chế còn đề cập đến dược phẩm chứa hoạt chất là các polypeptit này. Dược phẩm này có tác dụng điều hòa miễn dịch các bệnh như bệnh ung thư và các bệnh nhiễm trùng mạn tính.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế liên quan đến lĩnh vực công nghệ sinh học và cụ thể là miễn dịch học. Sáng chế đề cập đến các giải pháp kỹ thuật có ứng dụng trị liệu nâng cao sức khỏe con người. Đặc biệt, sáng chế đề cập đến việc điều hòa hệ miễn dịch để trị liệu bằng cách sử dụng các chất tương tự với các chất có trong tự nhiên.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Interleukin 2 (IL-2) là yếu tố sinh trưởng đầu tiên được mô tả đối với tế bào T. Từ khi được phát hiện, nó đã thể hiện khả năng thúc đẩy mạnh mẽ sự tăng sinh và sống sót của tế bào T *in vitro* (Smith, KA (1988) Science. 240, 1169-76) và làm tăng đáp ứng miễn dịch của tế bào T *in vivo*, trong trường hợp nhiễm virus (Blattman, JN, et al. (2003) Nat Med 9, 540-7) hoặc dùng vaccin (Fishman, M., et al. (2008) J Immunother. 31, 72-80, Kudo-Saito, C., et al. (2007) Cancer Immunol Immunother. 56, 1897-910; Lin, CT, et al. (2007) Immunol Lett. 114, 86-93). Tuy nhiên, vai trò kinh điển này của IL-2 như gen khởi đầu của đáp ứng miễn dịch T gần đây đã bị nghi ngờ bởi nhiều số liệu thử nghiệm (Almeida, A.R., et al. (2002) J Immunol. 169, 4850-60; de la Rosa, M., et al. (2004) Eur J Immunol. 34, 2480-8; Malek, T.R., et al. (2004) Nat Rev Immunol. 4, 665-74) cho thấy rằng xytokin này là yếu tố sinh trưởng nội môi đối với tế bào T điều hòa tự nhiên T CD4 + CD25 + FoxP3 + (Tregs).

Interleukin-2 là chất tham gia chủ yếu trong cơ chế theo đó tế bào T điều hòa ngăn chặn hoạt tính và sự khuếch đại của các tế bào hiệu ứng khác như tế bào T trợ giúp CD4, tế bào T độc CD8 và tế bào giết tự nhiên NK. Đặc biệt, gần đây đã có đề xuất rằng tế bào T điều hòa ngăn chặn các tế bào T khác, gây ra sự giảm cục bộ mức IL-2 (Pandiyani, P., et al. (2007) Nat Immunol. 8, 1353-62). Tác dụng ngăn chặn này dựa trên: a) khả năng của chúng ức chế trực tiếp sự sản xuất IL-2 bởi tế bào T hiệu ứng mà chúng ngăn cản: (Almeida, A.R., et al. (2002) J Immunol. 169, 4850-60; Takahashi, T., et al. (1998) Int Immunol. 10, 1969-80; Thornton, A.M., et al. (1998) J Exp Med. 188, 287-96; Wolf, M., et al. (2001) Eur J Immunol. 31, 1637-45); b) khả năng tiêu thụ nhanh và hiệu quả IL-2 trong vi môi trường của chúng (Pandiyani, P., et al. (2007) Nat Immunol. 8, 1353-62); và c) khả năng biểu hiện quá mức thụ thể chuỗi

alpha IL-2 (Kuniyasu, Y., et al. (2000) *Int Immunol.* 12, 1145-55), cho phép chúng sử dụng IL-2 hiệu quả hơn khi nó ở nồng độ thấp.

Tóm lại, IL-2 là xytokin đa tác động cao rất có ý nghĩa đối với hoạt tính sinh học của các quần thể tế bào khác nhau. Đặc tính này làm cho IL-2 là nút quan trọng trong việc điều hòa đáp ứng miễn dịch, làm cho nó là đích hấp dẫn và phức hợp đối với các phép trị liệu điều hòa miễn dịch. Đặc biệt, bản chất đa tác động của hoạt tính này của xytokin làm cho nó rất có ý nghĩa đối với việc thiết kế các phương pháp trị liệu điều hòa theo con đường chọn lọc/ưu tiên hoạt tính của xytokin này trong các quần thể tế bào khác nhau.

IL-2 đã được sử dụng vài năm trong điều trị bệnh ung thư. Đặc biệt, việc sử dụng nó với liều cao là phép trị liệu đã được phê chuẩn ở một số quốc gia để điều trị u melanin và bệnh caxinom tế bào thận. Tuy nhiên, việc sử dụng trực tiếp IL-2 ở bệnh nhân bị hạn chế khắt khe do tác dụng gây độc của nó. Đến mức chỉ 20% bệnh nhân thích hợp được tiếp tục trị liệu và chỉ 17% bệnh nhân thể hiện đáp ứng khách quan thích hợp. Một cách có thể giải thích sự thất bại bất ngờ này trong giai đoạn lâm sàng là việc trị liệu bằng IL-2 nguyên thể cũng kích thích các quần thể tế bào T điều hòa (Ahmadzadeh, M., et al. (2006) *Blood.* 107, 2409-14) cản trở sự kích thích miễn dịch đi theo nó.

Một số phương pháp đã được nghiên cứu để làm giảm tác dụng gây độc của việc trị liệu bằng IL-2. Một số trong các phương pháp này dựa trên việc sử dụng các biến thể đột biến của IL-2, được dự định để làm tăng khả năng tạo tín hiệu của phân tử này chủ yếu bằng thụ thể có ái lực cao (chuỗi alpha, beta và gama) và không phải bằng thụ thể ái lực trung bình (chuỗi beta và gama). Ý tưởng cơ bản là thúc đẩy việc tạo tín hiệu ưu tiên trên tế bào T so với tạo tín hiệu ở tế bào NK là các tế bào được cho là chịu trách nhiệm về các tác dụng gây độc quan sát được. Các sáng chế sau có cùng cơ chế: US 7,186,804, US 7,105,653, US 6,955,807, US 5,229,109, US 20050142106. Cần lưu ý rằng không có sáng chế nào trên đây liên quan đến các thể đột biến IL-2 có khả năng điều hòa một cách khác biệt hoạt tính của tế bào T điều hòa. Hơn nữa, các thể đột biến trong các sáng chế trên là chất chủ vận của IL-2 và không phải là chất đối kháng/chất ức chế như các chất được mô tả theo sáng chế.

Các biến thể đột biến khác của IL-2 đã được tạo ra với mục đích là làm tăng tác dụng dược lý của chúng. Ví dụ, cải thiện việc nhân lên hoặc làm tăng thời gian tồn tại của chúng trong máu. Trong các sáng chế khác, các sáng chế sau liên quan đến cơ chế này: US 4,959,314, US 5,116,943, US 4,853,332. Ngoài ra, không có thể đột biến nào thể hiện khả năng điều hòa một cách khác biệt hoạt tính của tế bào T điều hòa.

Các sáng chế khác đề cập đến chất ức chế hoạt tính của IL-2, chủ yếu để điều trị các bệnh tự miễn hoặc để ngăn ngừa việc thải loại cấy ghép cơ quan. Các sáng chế này gồm có: US 5,876,717, US 5,635,597, US 6,906,170, US 6,168,785.

Cuối cùng, cần chỉ ra rằng trong các tài liệu có nhiều đề xuất về các chất trị liệu có thể điều hòa hoặc làm giảm hoạt tính của tế bào T điều hòa *in vivo* (Kreitman, R.J. (2009) *Curr Pharm Des.* 15, 2652-64; Litzinger, M.T., Fernando, R., Curiel, T.J., Grosenbach, D.W., Schlom, J. và Palena, C. (2007) *Blood.* 110, 3192-201; Morse, M.A., Hobeika, A.C., Osada, T., Serra, D., Niedzwiecki, D., Lyster, H.K. và Clay, T.M. (2008) *Blood.* 112, 610-8; Onizuka, S., Tawara, I., Shimizu, J., Sakaguchi, S., Fujita, T. và Nakayama, E. (1999) *Cancer Res.* 59, 312833; Quezada, S.A., Peggs, K.S., Curran, M.A. và Allison, J.P. (2006) *J Clin Invest.* 116, 1935-45). Các chất trị liệu này đã được thử nghiệm trong các mô hình động vật và ngay cả trên bệnh nhân để trị liệu trực tiếp bệnh ung thư hoặc làm tăng tác dụng của vacxin. Cũng có một số báo cáo đề xuất việc điều hòa hoạt tính của IL-2, đặc biệt là bằng các kháng thể đơn dòng (Boyman, O., Kovar, M., Rubinstein, M.P., Surh, C.D. và Sprent, J. (2006) *Science.* 311, 1924-1927; Boyman, O., et al. (2006) *Expert Opin Biol Ther.* 6, 1323-31; Kamimura, D., et al. (2006) *J Immunol.* 177, 306-14; Murakami, M., Sakamoto, A., Bender, J., Kappler, J. và Marrack, P. (2002) *Proc Natl Acad Sci USA.* 99, 8832-7; Tomala, J., Chmelova, H., Mrkvan, T., Rihova, B. và Kovar, M. (2009) *J Immunol.* 183, 4904-4912), để thúc đẩy tốt hơn hoặc hiệu quả hơn các đáp ứng miễn dịch. Tuy nhiên, theo hiểu biết tốt nhất của các tác giả sáng chế, không có báo cáo nào trong các tài liệu nêu trên đề cập đến các biến thể đột biến của IL-2, hỗ trợ khả năng sử dụng chúng để điều hòa, một cách chọn lọc hoặc ưu tiên, hoạt tính của tế bào T điều hòa. Đặc biệt, các thể đột biến protein IL2 có khả năng đổi kháng chọn lọc/ưu tiên hoạt tính của IL2 trên tế bào T điều hòa, do đó ảnh hưởng đến chức năng của nó và do đó thúc đẩy tiềm năng đáp ứng miễn dịch trị liệu.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế dựa trên các phát hiện khoa học chứng minh rằng các thể đột biến của IL-2 có thể gây ra sự ức chế ưu tiên trên tế bào T điều hòa. Lần đầu tiên các tác giả sáng chế đã phát hiện ra trong các thử nghiệm *in vitro* rằng các biến thể đột biến của IL-2 có thể ức chế đáng kể hoạt tính của các tế bào T điều hòa (T CD4 + CD25 + FoxP3+), trong khi hầu như không ảnh hưởng đến sự hoạt hóa và/hoặc sự tăng sinh của các tế bào limphô khác có chức năng hiệu ứng. Phát hiện này tạo cơ sở cho phương pháp mới để điều hòa miễn dịch tế bào T điều hòa ở các bệnh như bệnh ung thư hoặc bệnh nhiễm trùng mạn tính có liên quan đến các tế bào này.

Sáng chế đề cập đến các polypeptit có chung trình tự bậc một với IL-2 của người, ngoại trừ việc một số axit amin được gây đột biến bằng cách loại bỏ hoặc làm giảm cơ bản khả năng tạo tín hiệu qua các dạng thụ thể IL-2 khác nhau.

Các thể đột biến này của IL-2 duy trì được khả năng gắn kết với một hoặc nhiều hợp phần của thụ thể IL-2, và có hoạt tính ức chế ưu tiên thấy được ở quần thể tế bào T điều hòa, nơi chúng điều hòa âm tính chức năng của chúng. Một số biến thể cụ thể của thể đột biến IL-2 có đặc tính ức chế ưu tiên trên tế bào T điều hòa được bảo hộ. Sáng chế cũng mô tả việc sử dụng các biến thể đột biến này, đơn độc hoặc kết hợp với vacxin, để điều trị các bệnh như bệnh ung thư hoặc bệnh nhiễm trùng mạn tính có liên quan đến hoạt tính của tế bào T điều hòa (Tregs).

Sáng chế đề xuất phương pháp để điều hòa hoạt tính của tế bào T điều hòa ở các bệnh trong đó tác dụng ngăn chặn tạo ra bởi các tế bào này làm giảm đáp ứng miễn dịch bảo vệ, được sinh ra tự nhiên hoặc bằng cách chủng ngừa. Phương pháp trị liệu mới này có nhiều ưu điểm hơn so với các phương pháp khác để điều hòa hoạt tính của Tregs. Ví dụ:

- Thể đột biến IL-2 là protein gần như tự thân (ngoại trừ một số ít các đột biến). Điều này làm giảm nguy cơ độc tính không mong muốn (phổ biến trong các phương pháp dựa trên chất ức chế có kích thước nhỏ) hoặc nguy cơ tăng đáp ứng miễn dịch kháng lại thuốc được tiêm (như thường xảy ra ở các phương pháp như Ontak, trong đó IL-2 được phối cặp với phân tử ngoại lai và gây độc như độc tố bạch hầu).
- Các biến thể đột biến này của IL-2 sẽ duy trì ái lực gắn kết với thụ thể của IL-2 ít nhất ở mức ái lực của IL-2 nguyên thể (10 pM đối với thụ thể có ái lực cao). Ái lực

này khó đạt được bằng các phương pháp ức chế thụ thể hoặc phối tử, bằng kháng thể đơn dòng hoặc các thuốc khác.

- Kích thước nhỏ của các thể đột biến này (15 kD) có thể làm cho chúng có độ linh động cao và dễ xuyên thấm vào vi môi trường khối u, điều rất khó thực hiện với các phân tử lớn hơn như kháng thể và các phân tử khác.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1. Minh họa việc tạo ra và tinh chế các biến thể đột biến của IL-2 của người. a: Phân tích thẩm tách Western thể hiện sự biểu hiện của một số biến thể đột biến và IL-2 nguyên thể đối chứng trong chủng *E. coli* được chuyển nhiễm bằng cách tiến hành xây dựng cấu trúc gen; b: Ví dụ về profin tinh chế điển hình thu được bằng cách tinh chế pha đảo.

Fig. 2. Thể hiện việc đánh giá bằng thử nghiệm ELISA để nhận diện các chuỗi alpha (a) và beta (b) của thụ thể IL-2 bởi một số thể đột biến protein được nêu trong bảng 1. IL-2 nguyên thể được sử dụng làm đối chứng dương tính. Như có thể thấy, tất cả các thể đột biến protein được thử nghiệm giữ được mức độ nhận diện so với IL-2 nguyên thể.

Fig. 3. Thể hiện việc đánh giá bằng miễn dịch dòng tế bào về khả năng của một số thể đột biến protein được nêu trong bảng 1 gắn kết với thụ thể IL-2 trên bề mặt của tế bào. Đặc biệt là đối với dòng tế bào CTLL2 của chuột. Cả các thể đột biến protein và đối chứng IL-2 nguyên thể trên bề mặt của các tế bào được phát hiện bằng kháng thể kháng-6-His-PE nhận diện đầu histidin được bao gồm trong cấu trúc di truyền của các phân tử này. a): Biểu đồ này thể hiện các mức gắn kết trực tiếp phát hiện được. b) Thể hiện mức giảm gắn kết của thể đột biến protein với các tế bào, được đo bởi mức giảm ở cường độ huỳnh quang trung bình phát hiện được, gây ra do việc bổ sung các lượng IL-2 nguyên thể tăng dần (biến thể của phân tử này không có đầu histidin và không làm cản trở việc nhuộm).

Fig. 4. Thể hiện việc đánh giá khả năng tạo tín hiệu của một số thể đột biến protein được nêu trong bảng 1. a): Thể hiện hoạt tính của thể đột biến protein được đánh giá trong thử nghiệm tăng sinh của dòng tế bào CTLL2 được đo bằng thử nghiệm đo màu bằng cách sử dụng MTT. b): Các thể đột biến protein này cũng được đánh giá trong thử nghiệm biệt hóa của các tế bào NK1.1+ từ toàn bộ tế bào lách của chuột.

Trong cả hai trường hợp, khả năng kích thích của thể đột biến protein được so với đối chứng nguyên thể IL-2 tạo ra trong cùng một hệ thử nghiệm (cùng cấu trúc di truyền, chủng tạo ra *E.coli*, hệ tinh chế). Các kết quả tương tự với kết quả được thể hiện trên Fig. 3a cũng thu được bằng dòng tế bào Kitt225, trong đó hệ thụ thể là của người.

Fig. 5. Thể hiện việc đánh giá khả năng của một số thể đột biến protein được nêu trong bảng 1 trong việc ức chế hoạt tính *in vitro* của IL-2 nguyên thể. a: Mức ức chế toàn bộ sự tăng sinh tế bào limphô hạch được kích thích bằng kháng thể đơn dòng kháng CD3 (dòng vô tính 2C11 ở nồng độ 10 µg/mL) ở các nồng độ thể đột biến protein tăng dần. b. Mức ức chế sự biệt hóa của tế bào NK1.1+ từ tổng tế bào lách của chuột được kích thích bằng 500 IU/mL IL-2 nguyên thể, bằng cách bổ sung thể đột biến protein với lượng tăng dần vào môi trường nuôi cấy.

Fig. 6. Thể hiện việc đánh giá khả năng của thể đột biến protein trong việc ức chế ưu tiên tế bào limphô CD4+Foxp3+. Tế bào limphô hạch bạch huyết của chuột được kích thích *in vitro* bằng kháng thể đơn dòng kháng CD3 (dòng vô tính 2C11 ở nồng độ 10 µg/mL) với sự có mặt của lượng thể đột biến protein M1 đã định (như được nêu trong bảng 1). Sau 72 giờ nuôi cấy, xác định bằng miễn dịch dòng tế bào, bằng cách sử dụng các hạt tham chiếu, số lượng tế bào limphô điều hòa CD4+Foxp3+ và hiệu ứng CD4+ Foxp3 còn sống. Đồ thị a thể hiện việc nhuộm bazơ trong phép đo miễn dịch dòng tế bào được sử dụng để phân biệt quần thể tế bào điều hòa và cảm ứng. Đồ thị b thể hiện mức ức chế sự tăng sinh được gây ra bởi thể đột biến protein được bổ sung với các lượng khác nhau. Mức ức chế này được tính dựa trên số lượng tế bào sống thu được khi không có mặt thể đột biến protein. Như được thể hiện trong đồ thị b, tồn tại khoảng nồng độ thể đột biến protein M1 trung bình trong đó mức ức chế quần thể tế bào điều hòa CD4+FoxP3+ là lớn hơn nhiều so với các tế bào T hỗ trợ hoặc hiệu ứng CD4+FoxP3-.

Fig. 7. Thể hiện việc đánh giá khả năng của tế bào T điều hòa tạo phức ưu tiên với thể đột biến protein IL-2 đã định, giải phóng tế bào T hiệu ứng có tác dụng ức chế trên chúng. Tế bào T hiệu ứng CD4+ CD25-FoxP3- được tinh chế bằng cách sử dụng các hạt từ tính được đánh dấu bằng CFSE và đưa vào môi trường nuôi cấy được phối cặp một số với sự có mặt và một số với sự vắng mặt thể đột biến protein (đồ thị thể đột biến protein M1, hai nồng độ khác nhau 10 µg/mL và 5 µg/mL) và được kích thích

bằng kháng thể kháng CD3 (dòng vô tính 2C11, 10 $\mu\text{g/mL}$) và kháng-CD28 (dòng vô tính 37.51, 10 $\mu\text{g/mL}$). Các lượng khác nhau của tế bào T điều hòa tinh chế được (CD4+CD25+FoxP3+), được bổ sung vào môi trường nuôi cấy này. Đồ thị 6a thể hiện mức độ tinh khiết cao (92% đối với Tregs và 97% đối với tế bào T hiệu ứng) thu được bằng việc tách các hạt từ tính. Fig. 6b thể hiện mức độ tăng sinh ở tế bào hiệu ứng được đo bằng cách pha loãng bằng CFSE, đối với các lượng tế bào điều hòa khác nhau trong môi trường nuôi cấy. Như có thể thấy với sự vắng mặt Tregs, sự có mặt của thể đột biến protein ảnh hưởng đáng kể đến sự tăng sinh của tế bào hiệu ứng (tác dụng ức chế), nhưng khi bổ sung Tregs, sự tăng sinh của tế bào T hiệu ứng đạt được, do Tregs tạo phức ưu tiên với thể đột biến protein, giải phóng tế bào hiệu ứng có tác dụng ức chế nó.

Fig. 8. Thể hiện việc đánh giá tác dụng kháng khối u trực tiếp của thể đột biến protein IL-2 bằng cách sử dụng mô hình khối u nguyên phát với dòng tế bào khối u MB16F10 của u melanin. Chuột 12 C57BL6 được sử dụng, được chia thành ba nhóm, mỗi nhóm gồm bốn con chuột. Tất cả việc điều trị được thực hiện dưới da từ ngày -5 đến ngày 0. Nhóm 1 được nhận 200 μL PBS, nhóm 2 được nhận 100 μg Mab kháng CD25 và nhóm 3 được nhận 200 μg thể đột biến protein IL-2. Vào ngày 0, tất cả chuột được nhận 250.000 tế bào vào hông bên phải. Thể tích khối u được đo mỗi hai ngày cho đến ngày 30. Số liệu được phân tích bằng cách sử dụng thử nghiệm ANOVA và thử nghiệm Bonferroni so sánh nhiều nhóm. Thể đột biến protein IL-2 cũng như Mab kháng CD25 làm chậm đáng kể mức tăng trưởng khối u ($p < 0,001$).

Mô tả chi tiết sáng chế

Tạo ra các polypeptit tương tự IL-2

Sáng chế đề cập đến các polypeptit chứa từ 100 đến 500 axit amin, tốt hơn nếu chúng có kích thước bằng 140 axit amin và trọng lượng phân tử biểu kiến bằng ít nhất 15 kD. Các polypeptit này giữ được mức độ đồng nhất trình tự cao so với IL2 nguyên thể, độ đồng nhất lớn hơn 90%, trong vùng trình tự của chúng, chúng gồm có từ 2 đến 6 đột biến so với IL-2 nguyên thể.

Trong các vị trí này, các polypeptit này được gây đột biến bằng cách chèn các gốc axit amin khác so với các axit amin nằm ở cùng vị trí trong IL-2 nguyên thể. Các gốc thay thế các gốc ban đầu được chọn do chúng có các đặc tính hóa lý rất khác so

với đặc tính hóa lý của axit amin ban đầu, các gốc được thay đổi từ phân cực thành không phân cực, từ mang điện thành không mang điện, từ lớn thành nhỏ, từ axit thành bazơ, trong số các đặc tính khác.

Các polypeptit theo sáng chế cũng có thể được gọi là các polypeptit điều hòa miễn dịch không rõ rệt, chất tương tự IL-2 hoặc thể đột biến protein của IL-2, trong số các cách gọi khác. Các polypeptit này được thiết kế từ cấu trúc 3D của IL-2 (được lưu trong cơ sở dữ liệu PDB), chỉ đưa đột biến vào các vị trí của IL2 tương ứng với các axit amin được tiếp xúc đáng kể với dung môi, được nhận diện bằng chương trình tin sinh học công cộng như RASMOL, SwissPDBviewer và các chương trình khác.

Các polypeptit theo sáng chế có thể được điều chế theo một số cách, trong số các cách khác, bằng cách tổng hợp protein. Chúng cũng có thể được điều chế bằng các kỹ thuật di truyền, như biểu hiện chúng trong các thể vùi ở vi khuẩn như E. coli. Đột biến điểm ở các vị trí cụ thể cũng có thể thu được bằng các kỹ thuật gây đột biến định hướng bằng cách sử dụng phản ứng chuỗi polymeraza.

Chọn lọc polypeptit tương tự IL-2 nhờ hoạt tính sinh học

Các polypeptit theo sáng chế được chọn bằng cách tiến hành các thử nghiệm *in vitro* hoặc *in vivo* để có đồng thời các đặc tính sau:

1) Các biến thể đột biến này của IL-2 không còn hoặc bị giảm đáng kể khả năng tạo tín hiệu so với các dạng khác nhau của thụ thể IL-2. Đặc tính này có thể được đánh giá trực tiếp trong thử nghiệm về sự tăng sinh *in-vitro* bằng các dòng tế bào, phụ thuộc IL-2 như CTLL2 hoặc Kitt225, hoặc bằng tế bào limphô T hoặc tế bào NK có nguồn gốc của chuột và/hoặc người. Các thể đột biến này có hoạt tính kích thích trong các thử nghiệm thấp hơn ít nhất 100 lần so với hoạt tính của IL-2 nguyên thể.

2) Các biến thể đột biến này của IL-2 (thể đột biến protein) duy trì khả năng gắn kết của chúng với một hoặc nhiều hợp phần phân tử của thụ thể IL-2. Khả năng gắn kết này có thể được đánh giá trực tiếp bằng ELISA kháng lại các chuỗi thụ thể có trên thị trường như chuỗi alpha và beta của thụ thể hoặc gián tiếp trên quần thể tế bào dương tính với thụ thể này. Tốc độ nhận diện thể đột biến protein IL-2 có thể sánh với tốc độ nhận diện IL-2 nguyên thể trong các thử nghiệm này.

3) Các biến thể đột biến của IL-2 có hoạt tính ức chế hoạt tính IL-2 nguyên thể trên tế bào limphô, ưu tiên trên quần thể tế bào T điều hòa (ít nhất ở các tế bào T CD4

+ CD25 + FoxP3 +). Các thể đột biến protein của IL-2 được bao gồm trong sáng chế ở một số khoảng nồng độ có thể ức chế ưu tiên hoặc chọn lọc hoạt tính hoặc sự khuếch đại của các tế bào T điều hòa, mà không ảnh hưởng hoặc chỉ ảnh hưởng tối thiểu đến hoạt tính và/hoặc sự khuếch đại của các tế bào lymphô khác có chức năng hiệu ứng như tế bào hỗ trợ T, tế bào T độc hoặc tế bào NK. Hoạt tính ức chế ưu tiên hoặc chọn lọc của các thể đột biến protein này có thể được chứng minh trong một số thử nghiệm *in vitro*, đánh giá đáp ứng kích thích của hỗn hợp quần thể tế bào hiệu ứng và điều hòa với sự có mặt của lượng thể đột biến protein tăng dần. Trong khoảng nồng độ thích hợp, thể đột biến protein có thể ức chế ít nhất là hơn ba lần mức tăng trưởng hoặc hoạt tính của tế bào T điều hòa so với khi chúng ức chế hoạt tính hoặc khuếch đại của quần thể tế bào hiệu ứng được sử dụng trong thử nghiệm này, ví dụ tế bào hỗ trợ T, tế bào T độc hoặc tế bào NK.

Sáng chế còn bao gồm một số biến thể cụ thể của thể đột biến protein IL-2 (các đột biến cụ thể được chỉ ra trong bảng 1), được chọn lọc để có các đặc tính nêu trên. Các thể đột biến protein này có nhiều đoạn thay thế axit amin làm giảm đáng kể khả năng của chúng trong việc kích thích tế bào lymphô của chuột và người. Tuy nhiên, khả năng gắn kết của chúng với các chuỗi alpha và beta của thụ thể vẫn giữ được nguyên vẹn, và chúng đạt được khả năng ứng chế (đối kháng) hoạt tính của nguyên thể IL-2. Khía cạnh có ý nghĩa nhất của các thể đột biến protein này là chúng thể hiện khả năng rõ rệt, ở một số khoảng nồng độ, trong việc ức chế ưu tiên tế bào T điều hòa (CD4 + CD25 + FoxP3+), trong môi trường nuôi cấy tế bào lymphô chứa các tế bào này và các tế bào T hiệu ứng khác.

Bảng 1: Các thể đột biến cấu trúc, tức đột biến theo việc đánh số IL2 của người.

Các đột biến	Tên tham chiếu
Q22V, Q126A, I129D, S130G	M1
L18N, Q126Y, S130R	M2
Q13Y, Q126Y, I129D, S130R	M3
L18N, Q22V, T123A, I129D, S130R	M4

Sáng chế còn bao gồm các cải biến khác của kiểu thể đột biến IL-2 nêu trên và đặc biệt là các cải biến được nêu trong bảng 1. Để làm tăng ái lực của chúng với các

hợp phần cụ thể của IL-2, mà không ảnh hưởng hoặc thậm chí làm tăng đặc tính ức chế ưu tiên của chúng, hoặc để cải thiện dược lực học *in-vivo* của chúng: làm tăng thời gian sống hoặc làm giảm nhập nội chúng bởi tế bào T. Các đột biến khác này có thể được tạo ra bằng thiết kế hợp lý nhờ công cụ tin sinh học, hoặc bằng cách sử dụng thư viện phân tử tổ hợp có bản chất khác nhau (thư viện hiển thị thể thực khuẩn, thư viện biểu hiện gen ở nấm men hoặc vi khuẩn).

Ứng dụng trị liệu của polypeptit tương tự IL-2

Sáng chế còn bao gồm dược phẩm chứa hoạt chất là thể đột biến protein IL-2 và các chất tương tự của nó, được bộc lộ trong sáng chế, cũng như ứng dụng trị liệu tiềm năng của nó nhằm mục đích điều hòa chọn lọc hoạt tính của IL-2 trên tế bào T điều hòa. Đặc biệt, sáng chế mô tả việc sử dụng các thể đột biến protein này để thúc đẩy đáp ứng miễn dịch được tạo ra tự nhiên hoặc bằng vacxin ở các bệnh như bệnh ung thư hoặc bệnh nhiễm trùng mạn tính liên quan đặc biệt đến tế bào T điều hòa.

Nhằm mục đích trị liệu, polypeptit theo sáng chế cần được dùng cho đối tượng bị bệnh một cách độc lập hoặc kết hợp với các polypeptit khác hoặc các chất khác tạo thuận lợi hoặc làm tăng hoạt tính trị liệu của nó. Đường dùng này có thể là đường dùng bất kỳ được mô tả trong tình trạng kỹ thuật đã biết để dùng thuốc ngoài đường tiêu hóa. Tốt hơn là có thể được dùng theo đường tĩnh mạch, trong cơ, dưới da hoặc trong khối u.

Polypeptit hoặc protein dung hợp được mô tả theo sáng chế cũng có thể được dùng như một phần của dược phẩm hữu ích trong việc điều trị bệnh ung thư và các bệnh nhiễm trùng mạn tính.

Để thu được tác dụng trị liệu mong muốn, polypeptit theo sáng chế cần được dùng ở liều đủ cao để bảo đảm đủ nồng độ trong hạch bạch huyết hoặc ở vị trí ngoại biên liên quan đối với bệnh đang nghiên cứu, nó cần ở khoảng nồng độ đủ đối với thể đột biến protein để thể hiện tác dụng ức chế ưu tiên trên tế bào T điều hòa. Do đó, liều nêu trên phải được điều chỉnh theo loại bệnh và đường dùng trong nghiên cứu. Ví dụ, trong trường hợp trị liệu khối u, liều này cần được điều chỉnh cho đến khi nồng độ của thể đột biến trong khối u và/hoặc hạch bạch huyết tại chỗ-vùng là đủ để bảo đảm tác dụng ức chế ưu tiên trên tế bào T điều hòa. Khoảng liều cần nghiên cứu có thể nằm trong khoảng từ hàng tá microgam đến vài miligam mỗi liều.

Số lần dùng cần sử dụng cũng được điều chỉnh theo sự phân bố sinh học của thể đột biến protein đang nghiên cứu. Nói chung, nồng độ hữu hiệu nêu trên cần duy trì trong khoảng thời gian từ 2 ngày đến 30 ngày liên tục. Lưu ý rằng, ví dụ, nếu thể đột biến protein được phối cặp với protein mang, thì tần suất dùng cần được điều chỉnh theo đó. Hoạt tính trị liệu được chứng minh bằng mức độ thuyên giảm triệu chứng bệnh toàn bộ hoặc một phần. Đối với bệnh ung thư, mức giảm thể tích khối u hoặc tăng thời gian tái phát sẽ được xem xét, trong số các yếu tố khác, làm tiêu chuẩn đánh giá mức thuyên giảm. Cuối cùng, cần lưu ý rằng phương pháp trị liệu mới này có nhiều lợi ích so với các phương pháp khác để điều hòa hoạt tính của Tregs. Ví dụ:

- Thể đột biến IL-2 là protein gần như tự thân (ngoại trừ một số ít các đột biến). Điều này làm giảm nguy cơ độc tính không mong muốn (phổ biến trong các phương pháp dựa trên chất ức chế có kích thước nhỏ) hoặc nguy cơ tăng đáp ứng miễn dịch kháng lại thuốc được tiêm (như thường xảy ra ở các phương pháp như Ontak, trong đó IL-2 được phối cặp với phân tử ngoại lai và gây độc như độc tố bạch hầu).
- Các biến thể đột biến này của IL-2 sẽ duy trì ái lực gắn kết với thụ thể của IL-2 ít nhất ở mức ái lực của IL-2 nguyên thể (10 pM đối với thụ thể có ái lực cao). Ái lực này khó đạt được bằng các phương pháp ức chế thụ thể hoặc phối tử, bằng kháng thể đơn dòng hoặc các thuốc khác.
- Kích thước nhỏ của các thể đột biến này (15 kD) có thể làm cho chúng có độ linh động cao và dễ xuyên thấm vào vi môi trường khối u, điều rất khó thực hiện với các phân tử lớn hơn như kháng thể và các phân tử khác.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1

Các thể đột biến được thiết kế bằng cách tính toán, từ kỹ thuật tin sinh học, bằng cách sử dụng cấu trúc đã biết của phức hợp bậc bốn của IL-2 của người phối cặp với thụ thể theo cách mà Wang, X., Rickert, M. và Garcia, K.C. báo cáo trong *Structure of the quaternary complex of interleukin-2 with its alpha, beta, and gamma receptors*. Science, 2005. 310(5751): trang 1159-63 và các thuật toán tính năng lượng của tương tác protein-phối tử trong miền công cộng. Các biến thể khác nhau của thể đột biến

protein ban đầu được dự đoán là không ảnh hưởng đến khả năng gắn kết của các chuỗi alpha và beta của thụ thể. Các thể đột biến protein này được biểu hiện ở *E.coli* từ cấu trúc di truyền trong vật truyền pET28a gồm có trình tự nhận diện của 6 histidin ở đầu amino. Các thể đột biến protein này được tinh chế bằng cách sử dụng pha đảo (Fig. 1) để thu được độ tinh khiết cao (> 95%). Các thể đột biến protein thu được được chọn theo các đặc tính của chúng trong các thử nghiệm *in-vitro*. Trong các thể đột biến protein được nêu trong bảng 1, tập hợp các đột biến cụ thể được mô tả có đặc tính ức chế ưu tiên hoạt tính của Tregs.

Ví dụ 2

Thể đột biến protein được chọn giữ được khả năng gắn kết với các hợp phần khác nhau của thụ thể IL2, đặc biệt là với chuỗi alpha và beta của thụ thể này. Fig. 2 thể hiện rằng bằng cách sử dụng thử nghiệm ELISA một số thể đột biến được nêu trong bảng 1 duy trì được gần như nguyên vẹn khả năng gắn kết của nó với chuỗi alpha (Fig. 2) và chuỗi beta (Fig. 2b) của thụ thể IL-2 của người. Fig. 3 xác nhận thêm rằng các thể đột biến này gắn với thụ thể trên bề mặt tế bào (Fig. 3a) và sự kết hợp này có thể được thay thế từ từ bằng cách bổ sung IL-2 nguyên thể (Fig. 3b).

Ví dụ 3

Các thể đột biến protein được chọn làm giảm đáng kể khả năng tạo tín hiệu của chúng bởi thụ thể IL-2. Fig. 3 minh họa điều này bằng cách đo khả năng của chúng trong việc kích thích sự tăng trưởng dòng tế bào CTLL2 (Fig. 4a) hoặc kích thích sự biệt hóa của tế bào NK từ toàn bộ tế bào limphô ở lách (Fig. 4b). Ở nồng độ cao các thể đột biến protein này ức chế được hoạt tính của IL-2 nguyên thể, cả trên tế bào limphô T (Fig. 5a) và trên tế bào NK (Fig. 5b).

Ví dụ 4

Các thể đột biến protein được chọn ức chế ưu tiên sự khuếch đại *in vitro* của các tế bào T điều hòa (CD4+CD25+FoxP3+). Fig. 6 minh họa đặc tính này của một trong các thể đột biến ở bảng 1, đặc biệt nó cho thấy rằng trong môi trường nuôi cấy tế bào limphô có chứa hỗn hợp các tế bào T hiệu ứng và điều hòa được kích thích bằng kháng thể kháng CD3, việc bổ sung thể đột biến protein với liều trung bình đã ức chế đáng kể

sự tăng sinh CD4+FoxP3+ mà không ảnh hưởng đáng kể đến sự khuếch đại của quần thể tế bào hiệu ứng CD4+FoxP3-.

Ví dụ 5

Các thể đột biến protein được chọn được tạo phức ưu tiên với tế bào T điều hòa trong môi trường nuôi cấy, làm giảm khả năng ảnh hưởng đến hoạt tính của tế bào T hiệu ứng. Các thể đột biến protein này ức chế tín hiệu (sự kích thích) qua trung gian IL-2 được tạo ra nội sinh bởi quần thể tế bào T hỗ trợ CD4+CD25-FoxP3- được tinh chế và kích thích bằng kháng thể kháng CD3. Tuy nhiên, việc bổ sung tế bào T điều hòa CD4+CD25+FoxP3+ với lượng tăng dần vào môi trường nuôi cấy này làm giảm ngược tác dụng ức chế qua trung gian thể đột biến trên quần thể tế bào hiệu ứng T (Fig. 7). Tác dụng này được giải thích bởi khả năng của các thể đột biến protein này trong việc ức chế ưu tiên hoạt tính của IL-2 trên quần thể tế bào điều hòa T. Sự có mặt của tế bào T điều hòa ngay cả với lượng nhỏ cũng hướng hoạt tính của thể đột biến đến các tế bào này, do đó làm giảm hoạt tính ngăn chặn của thể đột biến protein trong quần thể tế bào hiệu ứng.

Ví dụ 6

Các thể đột biến protein được chọn thể hiện hoạt tính kháng khối u trên mô hình chuột có khối u có thể cấy được. Fig. 8 thể hiện đặc tính này của một trong các thể đột biến protein ở bảng 1. Thể đột biến protein này được đánh giá trên mô hình khối u nguyên phát với dòng tế bào MB16F10 của u melanin, được cấy dưới da vào hông bên phải. Fig. 8 thể hiện mức giảm thể tích khối u trên chuột được điều trị bằng thể đột biến protein so với nhóm đối chứng được điều trị bằng PBS. Ngoài ra, thử nghiệm với nhóm đối chứng được điều trị bằng kháng thể đơn dòng (MAb) kháng CD25 cho thấy rằng hệ thử nghiệm này là nhạy với việc làm suy kiệt tế bào Tregs.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Polypeptit điều hòa miễn dịch được phân lập có nguồn gốc từ interleukin 2 (IL-2), chứa một số đột biến điểm trên trình tự IL-2 của người và có đặc tính ức chế hoạt tính của IL-2 trên tế bào T điều hòa *in vitro*, trong đó polypeptit này được chọn từ nhóm bao gồm: (i) polypeptit đã nêu chứa các đột biến Q22V, Q126A, I129D và S130G; (ii) polypeptit đã nêu chứa các đột biến L18N, Q126Y và S130R; (iii) polypeptit đã nêu chứa các đột biến Q13Y, Q126Y, I129D và S130R; (iv) polypeptit đã nêu chứa các đột biến L18N, Q22V, T123A, I129D và S130R.
2. Polypeptit theo điểm 1, trong đó polypeptit này có khả năng ức chế ưu tiên tế bào T điều hòa *in vivo*.
3. Protein dung hợp, trong đó protein này chứa polypeptit điều hòa miễn dịch theo điểm 1 được phối cặp với protein mang.
4. Protein dung hợp theo điểm 3, trong đó protein mang này là albumin.
5. Protein dung hợp theo điểm 3, trong đó protein mang này là vùng Fc của globulin miễn dịch của người.
6. Dược phẩm dùng để điều trị u melanin, trong đó dược phẩm này chứa hoạt chất là polypeptit theo điểm 1.
7. Dược phẩm dùng để điều trị u melanin, trong đó dược phẩm này chứa hoạt chất là protein dung hợp theo điểm 3.
8. Dược phẩm dùng để điều trị u melanin, trong đó dược phẩm này chứa hoạt chất là protein dung hợp theo điểm 4.
9. Dược phẩm dùng để điều trị u melanin, trong đó dược phẩm này chứa hoạt chất là protein dung hợp theo điểm 5.

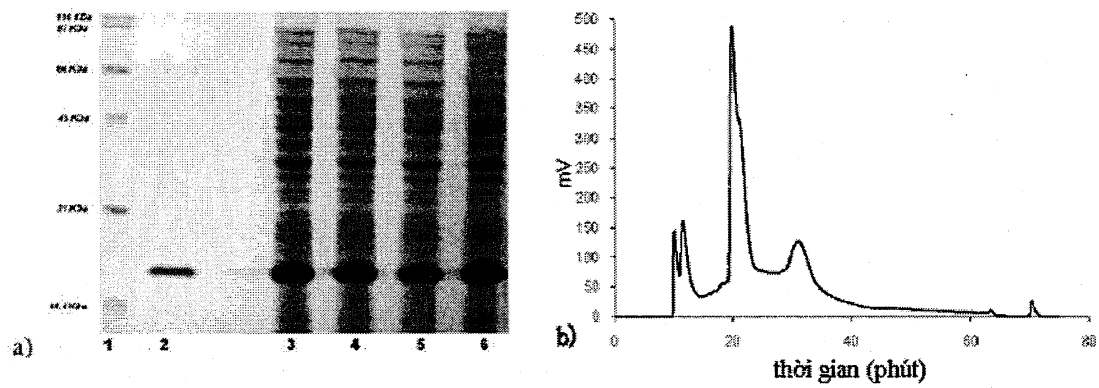
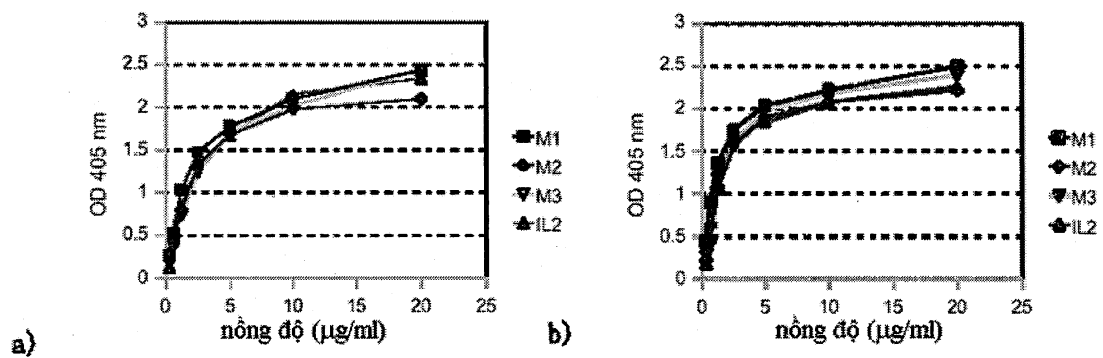
Fig. 1**Fig. 2**

Fig. 3

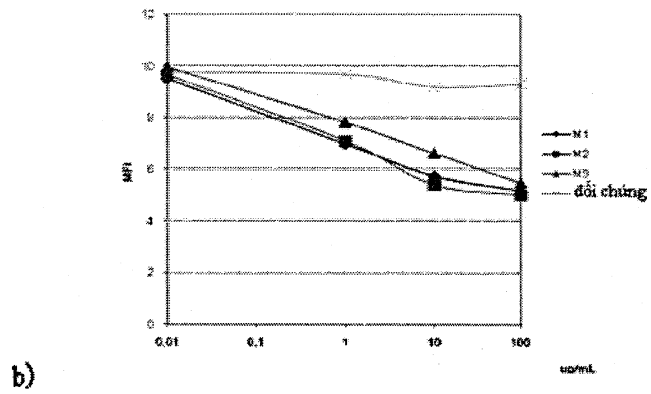
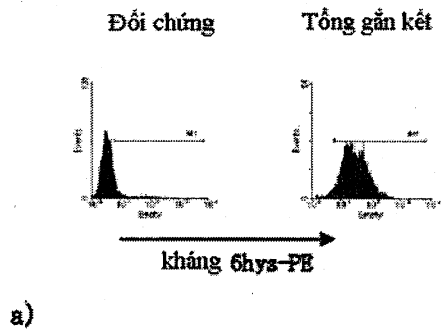


Fig. 4

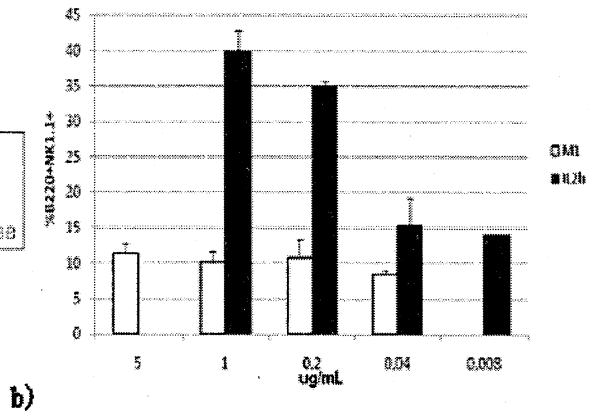
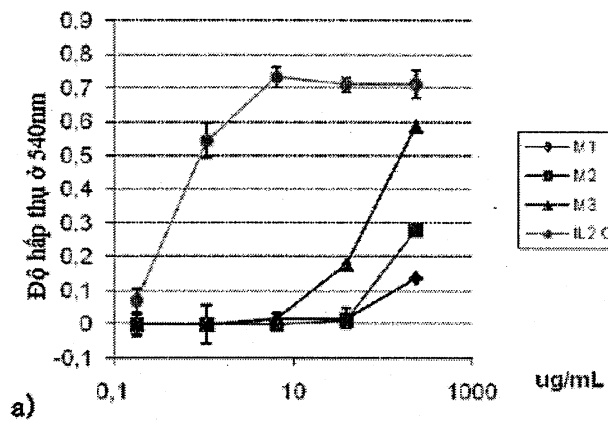


Fig. 5

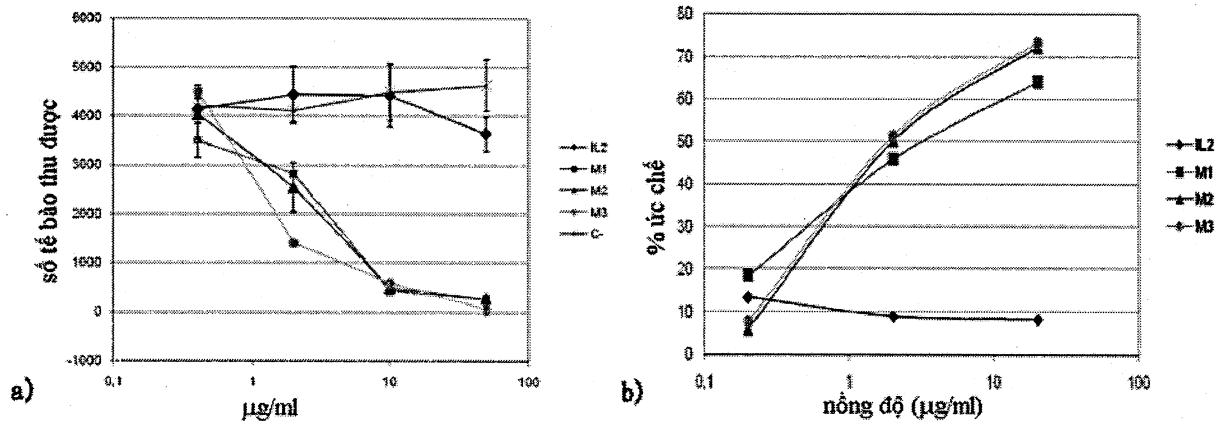


Fig. 6

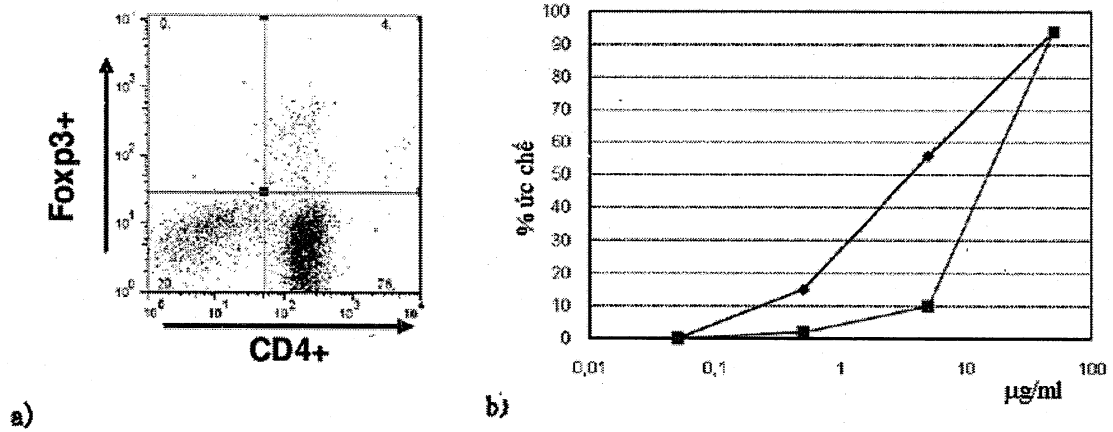


Fig. 7

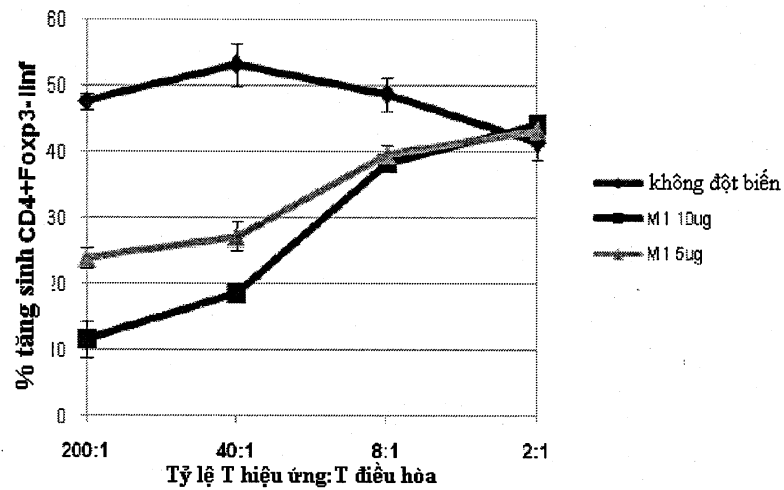
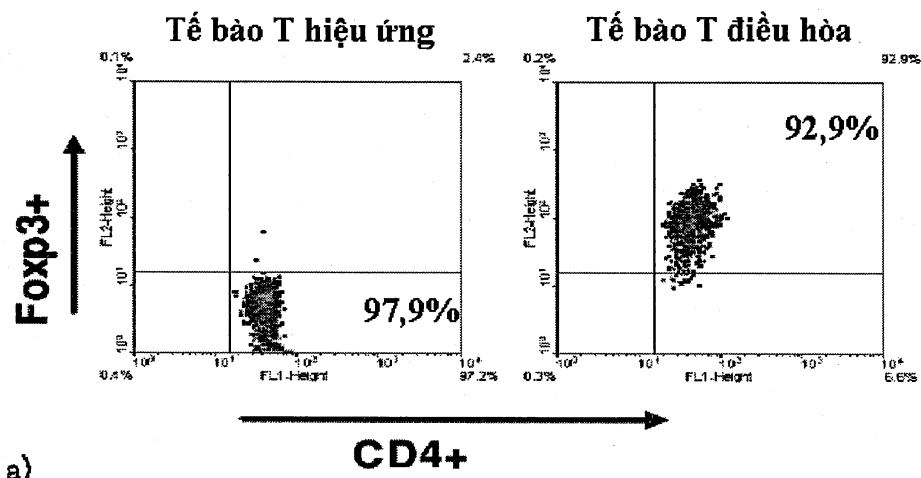


Fig. 8

