



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

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

(11)



1-0026139

(51)⁷ C07K 14/62; C07K 19/00; C07K 16/00 (13) B

(21) 1-2015-03590

(22) 05/03/2014

(86) PCT/KR2014/001818 05/03/2014

(87) WO2014/137161 12/09/2014

(30) 10-2013-0023602 05/03/2013 KR

(45) 25/11/2020 392

(43) 25/12/2015 333A

(73) HANMI PHARM. CO., LTD. (KR)

214, Muha-ro, Paltan-myeon, Hwaseong-si, Gyeonggi-do 445-958, Republic of Korea

(72) JANG Myung Hyun (KR); KIM Min Young (KR); KIM Dae Jin (KR); JUNG Sung Youb (KR); KWON Se Chang (KR).

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

(54) PHƯƠNG PHÁP ĐIỀU CHẾ THỂ TIẾP HỢP POLYPEPTIT CÓ HOẠT TÍNH SINH LÝ

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp điều chế thể tiếp hợp bằng cách liên kết polypeptit có hoạt tính sinh lý, cầu nối polyme không phải peptit, và vùng hằng định globulin miễn dịch bằng liên kết cộng hóa trị. Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến phương pháp điều chế một cách hiệu quả thể tiếp hợp polypeptit có hoạt tính sinh lý, trong đó muối được sử dụng trong phản ứng ngẫu hợp để cải thiện hiệu suất thấp của quá trình điều chế thể tiếp hợp polypeptit có hoạt tính sinh lý. Thể tiếp hợp chứa polypeptit có hoạt tính sinh lý - polyme không phải peptit - vùng hằng định globulin miễn dịch có thể được điều chế với độ tinh khiết và hiệu suất cao bằng phương pháp điều chế theo sáng chế. Phương pháp điều chế thể tiếp hợp polypeptit có hoạt tính sinh lý theo sáng chế có thể làm giảm chi phí. Vì vậy, phương pháp này có thể được sử dụng để phát triển chế phẩm có tác dụng kéo dài chứa polypeptit có hoạt tính sinh lý, có khả năng áp dụng công nghiệp và cải thiện được sự tuân thủ dùng thuốc.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp điều chế thể tiếp hợp bằng cách liên kết polypeptit có hoạt tính sinh lý, cầu nối polyme không phải peptit, và vùng hằng định globulin miễn dịch bằng liên kết cộng hóa trị. Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến phương pháp điều chế thể tiếp hợp polypeptit có hoạt tính sinh lý một cách hiệu quả, trong đó muối được sử dụng trong phản ứng ngẫu hợp để cải thiện hiệu suất thấp của quá trình điều chế thể tiếp hợp polypeptit có hoạt tính sinh lý.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Nói chung, polypeptit có hoạt tính sinh lý dễ bị biến tính do chúng có độ ổn định thấp và dễ bị phân hủy bởi protein hydrolaza trong máu để được đào thải một cách dễ dàng qua thận hoặc gan. Vì vậy, để duy trì nồng độ trong máu và hoạt lực của thuốc protein chứa polypeptit có hoạt tính sinh lý dưới dạng dược chất, cần phải cho bệnh nhân dùng thuốc trên cơ sở protein thường xuyên. Tuy nhiên, trong trường hợp thuốc protein được dùng cho bệnh nhân chủ yếu là ở dạng chế phẩm tiêm, thì việc tiêm thường xuyên polypeptit có hoạt tính sinh

lý để duy trì nồng độ trong máu có thể gây đau đớn quá mức cho bệnh nhân và chi phí điều trị cao. Để khắc phục các vấn đề này, người ta liên tục tìm cách làm tăng tối đa hiệu quả dược lý bằng cách làm tăng độ ổn định của các thuốc protein trong máu và duy trì nồng độ thuốc trong máu trong khoảng thời gian dài hơn. Cần phát triển các chế phẩm giải phóng kéo dài như vậy để làm tăng độ ổn định của thuốc protein và đồng thời duy trì hoạt lực của chính các thuốc này ở mức đủ cao, cũng như không gây ra phản ứng miễn dịch cho bệnh nhân.

Trong tình trạng kỹ thuật, để làm ổn định protein và hạn chế nó tiếp xúc với protein hydrolaza và bị đào thải qua thận, đã biết phương pháp liên kết hóa học các polyme có độ hòa tan cao như polyetylen glycol (dưới đây được gọi là PEG) vào bề mặt của các thuốc protein. Đã biết rằng PEG có tác dụng làm ổn định protein và ngăn ngừa sự thủy phân của protein bằng cách liên kết không đặc hiệu với vị trí đặc hiệu hoặc các vị trí khác của protein đích để làm tăng độ hòa tan của protein, và không gây ra phản ứng phụ bất lợi bất kỳ (Sada et al., J. Fermentation Bioengineering 71: 137-139, 1991).

Tuy nhiên, mặc dù phương pháp sử dụng PEG như vậy có khả năng làm tăng thời gian tuần hoàn của thuốc peptit nhờ việc làm tăng khối lượng phân tử của PEG, hoạt lực của thuốc peptit vẫn bị giảm một cách đáng kể và tính phản

ứng của PEG với peptit cũng bị giảm đồng thời với mức tăng khối lượng phân tử, dẫn đến việc làm giảm hiệu suất.

Ngoài ra, phương pháp điều chế protein dung hợp chứa mảnh globulin miễn dịch và polypeptit có hoạt tính sinh lý có thể khắc phục được các vấn đề liên quan đến hiệu suất peg hóa thấp và tính không đặc hiệu, nhưng có nhược điểm là mức tăng chu kỳ bán rã trong máu cao không đáng kể, trái với kỳ vọng, và trong một số trường hợp, nó có hiệu giá thấp. Để làm tăng tối đa tác dụng tăng chu kỳ bán rã trong máu, nhiều loại phân tử liên kết peptit cũng có thể được sử dụng, nhưng nó lại có thể gây ra phản ứng miễn dịch. Ngoài ra, cũng còn có các nhược điểm khác, như trong trường hợp sử dụng peptit có các liên kết disulfua như BNP, thì việc dùng gấp khó khăn do khả năng cuộn xoắn sai lệch cao, và trong trường hợp có mặt các gốc axit amin không nguyên thể, thì không thể tạo ra được dạng tái tổ hợp di truyền.

Insulin là peptit được tiết từ các tế bào beta của tụy của người, đóng vai trò rất quan trọng trong việc kiểm soát mức glucoza huyết trong cơ thể. Trong trường hợp insulin không được tiết hợp lý hoặc insulin đã tiết không hoạt động hợp lý trong cơ thể, thì mức glucoza huyết trong cơ thể không thể kiểm soát được và tăng, từ đó gây ra tình trạng bệnh được gọi là bệnh tiểu đường. Trường

hợp bệnh tiểu đường này được gọi là bệnh tiểu đường typ 2, còn trường hợp insulin không được tiết từ tụy gây tăng glucoza huyết thì được gọi là bệnh tiểu đường typ 1. Bệnh tiểu đường typ 2 được điều trị bằng thuốc làm hạ đường huyết dùng qua đường miệng chứa thành phần chính là hóa chất, và ở một số bệnh nhân cũng được điều trị bằng insulin. Mặt khác, việc điều trị bệnh tiểu đường typ 1 nhất thiết đòi hỏi phải dùng insulin.

Phương pháp trị liệu bằng insulin hiện được sử dụng rộng rãi là phương pháp tiêm insulin vào thời điểm trước khi ăn và sau khi ăn. Tuy nhiên, phương pháp trị liệu bằng insulin như vậy đòi hỏi phải dùng nó liên tục ba lần hằng ngày, và vì vậy gây ra rất nhiều đau đớn và bất tiện cho bệnh nhân. Đã có nhiều nỗ lực để khắc phục vấn đề này. Một trong các nỗ lực đó là tăng cường phân phối thuốc peptit vào cơ thể theo đường hít qua khoang miệng hoặc khoang mũi bằng cách làm tăng độ thấm của thuốc peptit qua màng sinh học. Tuy nhiên, phương pháp này lại làm giảm một cách đáng kể hiệu quả phân phối thuốc vào cơ thể so với phương pháp tiêm, và vì vậy hiện vẫn có rất nhiều khó khăn trong việc duy trì hoạt tính *in vivo* của thuốc peptit trong điều kiện cần thiết.

Ngoài ra, cũng đã thử nghiệm phương pháp làm chậm quá trình hấp thu thuốc sau khi đưa lượng lớn thuốc vào dưới da. Theo đó, phương pháp duy trì nồng độ thuốc trong máu bằng cách chỉ dùng thuốc một lần hằng ngày đã được giới thiệu. Một sản phẩm thuốc (ví dụ, Lantus, Sanofi-aventis) đã được phê chuẩn và hiện đang được dùng cho bệnh nhân. Nghiên cứu để cải biến insulin bằng axit béo nhằm tăng cường sự liên kết của polyme insulin và kéo dài thời gian lưu trú nhờ liên kết với albumin có mặt ở vị trí dùng và trong máu đã được tiến hành, và thuốc được bào chế bằng cách sử dụng phương pháp này đã được phê chuẩn (Levemir, NovoNordisk). Tuy nhiên, các phương pháp như vậy có tác dụng phụ là gây đau ở vị trí dùng, và ngoài ra việc tiêm một lần cách quãng hằng ngày vẫn gây phiền phức đáng kể cho bệnh nhân.

Để khắc phục các vấn đề này, các tác giả sáng chế đã điều chế được thể tiếp hợp chứa polypeptit có hoạt tính sinh lý và vùng hằng định globulin miễn dịch bằng cách sử dụng polyme không phải peptit làm cầu nối, như một phương thức để đồng thời làm tăng tối đa chu kỳ bán rã trong máu và duy trì hoạt tính *in vivo* của polypeptit có hoạt tính sinh lý bao gồm insulin. Tuy nhiên, vẫn cần có phương pháp điều chế thể tiếp hợp với hiệu suất và độ tinh khiết cao, vì các nguyên liệu thô cấu thành thể tiếp hợp đều rất đắt tiền. Trong bối cảnh

này, các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng khi dạng và nồng độ muối thích hợp được bổ sung vào dung dịch phản ứng dùng trong bước phản ứng ngẫu hợp của quá trình điều chế thể tiếp hợp, thì có thể điều chế được thể tiếp hợp chứa polypeptit có hoạt tính sinh lý với hiệu suất và độ tinh khiết cao và chi phí giảm, nhờ đó hoàn thành được sáng chế này.

Bản chất kỹ thuật theo sáng chế

Mục đích của sáng chế là nhằm cải thiện một cách hiệu quả hiệu suất thấp của quá trình điều chế thể tiếp hợp bằng cách liên kết polypeptit có hoạt tính sinh lý, cầu nối polyme không phải peptit, và vùng hằng định globulin miễn dịch bằng liên kết cộng hóa trị.

Theo một khía cạnh, để đạt được mục đích nêu trên, sáng chế đề xuất phương pháp điều chế thể tiếp hợp chứa polypeptit có hoạt tính sinh lý - polyme không phải peptit - vùng hằng định globulin miễn dịch, bao gồm các bước: (1) cho polyme không phải peptit phản ứng với một trong số polypeptit có hoạt tính sinh lý hoặc vùng hằng định globulin miễn dịch; và (2) cho hỗn hợp phản ứng thu được ở bước (1) phản ứng với polypeptit có hoạt tính sinh lý hoặc vùng hằng định globulin miễn dịch còn lại với sự có mặt của muối.

Tốt hơn là, polyme không phải peptit có thể có mỗi nhóm chức độc lập được chọn từ nhóm bao gồm dẫn xuất aldehyt, dẫn xuất maleimit và dẫn xuất succinimit ở cả hai đầu của nó.

Tốt hơn nữa là, polyme không phải peptit có thể được liên kết với polypeptit có hoạt tính sinh lý và vùng hằng định globulin miễn dịch bằng các nhóm chức ở cả hai đầu của nó để tạo ra liên kết cộng hóa trị.

Tốt hơn là, phương pháp này có thể còn bao gồm bước tách phức hợp của polypeptit có hoạt tính sinh lý - polyme không phải peptit hoặc phức hợp của vùng hằng định globulin miễn dịch - polyme không phải peptit ra khỏi hỗn hợp phản ứng sau bước (1).

Tốt hơn là, muối có thể được chọn từ nhóm bao gồm natri clorua, natri axetat, natri sulfat, natri phosphat, natri cacbonat, natri xyanua, natri xitrat, natri nitrat, kali clorua, kali axetat, kali sulfat, kali phosphat, kali cacbonat, kali xyanua, kali xitrat, kali nitrat, magie clorua, magie axetat, magie sulfat, magie phosphat, magie cacbonat, magie xyanua, magie xitrat, magie nitrat, amoni clorua, amoni axetat, amoni sulfat, amoni phosphat, amoni cacbonat, amoni xyanua, amoni xitrat, amoni nitrat, canxi clorua, canxi axetat, canxi sulfat, canxi phosphat, canxi cacbonat, canxi xyanua, canxi xitrat, và canxi nitrat.

Tốt hơn nữa là, muối có thể được chọn từ nhóm bao gồm natri clorua, natri axetat, natri sulfat, natri phosphat, và kali clorua.

Tốt hơn là, muối có thể được bổ sung ở nồng độ cuối nằm trong khoảng từ 0,1 đến 3,0 M.

Tốt hơn nữa là, muối có thể được bổ sung ở nồng độ cuối nằm trong khoảng từ 0,3 đến 2,5M.

Tốt hơn, nếu muối được chọn là natri clorua, thì muối này có thể được bổ sung ở nồng độ cuối thấp hơn 3,0M, nếu muối được chọn là natri axetat, thì muối này có thể được bổ sung ở nồng độ cuối thấp hơn 2,5M, nếu muối được chọn là natri sulfat, thì muối này có thể được bổ sung ở nồng độ cuối thấp hơn 0,7M, nếu muối được chọn là natri phosphat, thì muối này có thể được bổ sung ở nồng độ cuối thấp hơn 0,8M, hoặc nếu muối là kali clorua, thì muối này có thể được bổ sung ở nồng độ cuối là 1,0M hoặc thấp hơn.

Tốt hơn, nếu thời gian phản ứng của bước (2) có thể nằm trong khoảng từ 4 đến 18 giờ.

Tốt hơn, nếu nhiệt độ phản ứng của bước (2) có thể nằm trong khoảng từ 0°C đến 25°C.

Tốt hơn, nếu polyme không phải peptit có nhóm chức là một hoặc nhiều dẫn xuất aldehyt, thì hỗn hợp phản ứng còn chứa tác nhân khử ở nồng độ cuối nằm trong khoảng từ 1 đến 100mM.

Tốt hơn là, bước (1) có thể được thực hiện ở độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 6,5, và bước (2) có thể được thực hiện ở độ pH nằm trong khoảng từ 6,0 đến 8,5.

Tốt hơn là, ở bước (1), polyme không phải peptit có thể phản ứng với polypeptit có hoạt tính sinh lý, và ở bước (2), hỗn hợp phản ứng của bước (1) có thể phản ứng với vùng hằng định globulin miễn dịch.

Tốt hơn là, ở bước (1), polypeptit có hoạt tính sinh lý và polyme không phải peptit có thể phản ứng với nhau với tỷ lệ mol nằm trong khoảng từ 1:1 đến 1:20, và ở bước (2), sản phẩm của bước (1) và vùng hằng định globulin miễn dịch có thể phản ứng với nhau với tỷ lệ mol nằm trong khoảng từ 1:0,5 đến 1:10.

Tốt hơn nữa là, bước (2) có thể được thực hiện với sự có mặt của natri clorua được bổ sung ở nồng độ cuối thấp hơn 3,0M, natri axetat được bổ sung ở nồng độ cuối thấp hơn 2,5M, natri sulfat được bổ sung ở nồng độ cuối thấp hơn

0,7M, natri phosphat được bổ sung ở nồng độ cuối thấp hơn 0,8M, hoặc kali clorua được bổ sung ở nồng độ cuối là 1,0M hoặc thấp hơn.

Tốt hơn là, các nhóm chức của polyme không phải peptit có thể được liên kết với nhóm amin có mặt ở đầu tận cùng N hoặc trên mạch bên của gốc Lys của polypeptit có hoạt tính sinh lý và vùng hằng định globulin miễn dịch.

Tốt hơn là, polyme không phải peptit có thể được chọn từ nhóm bao gồm polyetylen glycol, polypropylen glycol, copolyme của etylen glycol và propylen glycol, rượu polyhydric được polyoxyetyl hóa, rượu polyvinyl, polysacarit, dextran, polyvinyl etyl ete, axit polylactic (PLA), axit polylactic-glycolic (PLGA), polyme lipid, chitin, axit hyaluronic, và hỗn hợp của chúng.

Tốt hơn nữa, nếu polyme không phải peptit có thể là polyetylen glycol.

Tốt hơn là, polyme không phải peptit có thể có khối lượng phân tử nằm trong khoảng từ 1 đến 100 kDa.

Tốt hơn là, vùng hằng định globulin miễn dịch có thể là vùng không được glycosyl hóa.

Tốt hơn là, vùng hằng định globulin miễn dịch có thể bao gồm từ một đến bốn miền được chọn từ nhóm bao gồm miền CH1, CH2, CH3 và CH4.

Tốt hơn là, vùng hằng định globulin miễn dịch có thể còn bao gồm vùng bản lề.

Tốt hơn là, vùng hằng định globulin miễn dịch có thể được chọn từ nhóm bao gồm các vùng hằng định có nguồn gốc từ IgG, IgA, IgD, IgE, IgM, tổ hợp của chúng, và thể lai của chúng.

Tốt hơn là, vùng hằng định globulin miễn dịch có thể được chọn từ nhóm bao gồm các vùng hằng định của IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, tổ hợp của chúng, và thể lai của chúng.

Tốt hơn nữa là, vùng hằng định globulin miễn dịch có thể là vùng Fc IgG4.

Còn tốt hơn nữa là, vùng hằng định globulin miễn dịch có thể là vùng Fc IgG4 của người không được glycosyl hóa.

Tốt hơn là, polypeptit có hoạt tính sinh lý có thể được chọn từ nhóm bao gồm hormon sinh trưởng của người, hormon giải phóng hormon sinh trưởng, peptit giải phóng hormon sinh trưởng, interferon, thụ thể interferon, yếu tố kích thích tạo cụm, peptit giống glucagon (GLP-1, v.v.), oxyntomodulin, thụ thể được ngẫu hợp protein G, interleukin, thụ thể interleukin, enzym, protein liên kết interleukin, protein liên kết xytokin, yếu tố hoạt hóa đại thực bào, peptit đại

thực bào, các yếu tố tế bào B, các yếu tố tế bào T, protein A, chất ức chế dị ứng, glycoprotein gây hoại tử tế bào, độc tố miễn dịch, độc tố lympho bào, yếu tố gây hoại tử khối u, chất ức chế khối u, yếu tố sinh trưởng chuyển hóa, kháng trypsin alpha-1, albumin, α -lactalbumin, apolipoprotein-E, erythropoietin, erythropoietin được glycosyl hóa, angiopoietin, hemoglobin, thrombin, peptit hoạt hóa thụ thể thrombin, thrombomodulin, yếu tố máu VII, VIIa, VIII, IX và XIII, chất hoạt hóa plasminogen, peptit gắn kết fibrin, urokinaza, streptokinaza, hirudin, protein C, protein phản ứng C, chất ức chế thận tố, chất ức chế collagenaza, peoxit dismutaza, leptin, yếu tố sinh trưởng có nguồn gốc tiểu cầu, yếu tố sinh trưởng biểu mô, yếu tố sinh trưởng biểu bì, angiostatin, kích thích tố tăng huyết áp, yếu tố sinh trưởng xương, protein kích thích xương, canxitonin, insulin, hormon kiểm soát thể tích máu, yếu tố tạo sụn, elcatonin, yếu tố hoạt hóa mô liên kết, chất ức chế con đường của yếu tố mô, hormon kích thích nang, hormon hoàng thể hóa, hormon giải phóng hormon hoàng thể hóa, yếu tố sinh trưởng thần kinh, hormon tuyến cận giáp, relaxin, secretin, hormon kích thích sự phát triển của xương và cơ bắp, yếu tố sinh trưởng giống insulin, hormon vỏ tuyến thượng thận, glucagon, colexystokinin, polypeptit tụy, peptit giải phóng gastrin, yếu tố giải phóng hormon tuyến yên, hormon kích thích

tuyến giáp, autotaxin, lactoferrin, myostatin, kháng nguyên bề mặt tế bào, kháng nguyên vắc-xin có nguồn gốc virus, kháng thể đơn dòng, kháng thể đa dòng, và các mảnh kháng thể.

Tốt hơn nữa, nếu polypeptit có hoạt tính sinh lý có thể là insulin.

Tốt hơn là, ở bước (1), polypeptit có hoạt tính sinh lý và polyme không phải peptit có thể được phản ứng với nhau với tỷ lệ mol nằm trong khoảng từ 1:1 đến 1:20 trong điều kiện pH từ 5,0 đến 6,5, và ở bước (2), hỗn hợp phản ứng thu được ở bước (1) và vùng hằng định globulin miễn dịch có thể được phản ứng với nhau với tỷ lệ mol nằm trong khoảng từ 1:0,5 đến 1:10 trong điều kiện pH từ 6,0 đến 8,5 với sự có mặt của muối, trong đó nếu muối được chọn là natri clorua, thì muối này có thể được bổ sung ở nồng độ cuối thấp hơn 3,0M, nếu muối được chọn là natri axetat, thì muối này có thể được bổ sung ở nồng độ cuối thấp hơn 2,5M, nếu muối được chọn là natri sulfat, thì muối này có thể được bổ sung ở nồng độ cuối thấp hơn 0,7M, nếu muối được chọn là natri phosphat, thì muối này có thể được bổ sung ở nồng độ cuối thấp hơn 0,8M, hoặc nếu muối là kali clorua, thì muối này có thể được bổ sung ở nồng độ cuối là 1,0M hoặc thấp hơn.

Hiệu quả theo sáng chế

Thể tiếp hợp chứa polypeptit có hoạt tính sinh lý - polyme không phải peptit - vùng hằng định globulin miễn dịch có thể được điều chế với độ tinh khiết và hiệu suất cao bằng phương pháp điều chế theo sáng chế. Do phương pháp này được sử dụng để điều chế thể tiếp hợp chứa polypeptit có hoạt tính sinh lý, nên chi phí có thể giảm, nhờ đó làm tăng khả năng áp dụng công nghiệp và sự tuân thủ dùng thuốc. Vì vậy, phương pháp này có thể được sử dụng để phát triển chế phẩm có tác dụng kéo dài chứa polypeptit có hoạt tính sinh lý.

Mô tả vắn tắt hình vẽ

Fig. 1 là profin thể hiện kết quả của quá trình tinh chế dung dịch của phản ứng ngẫu hợp của Ví dụ 2 và 3 bằng cột Source 15Q, trong đó so sánh lượng Fc globulin miễn dịch chưa phản ứng, thể tiếp hợp insulin có tác dụng kéo dài (insulin-PEG-mảnh Fc globulin miễn dịch thể tiếp hợp) và các tạp chất.

Mô tả chi tiết sáng chế

Theo một khía cạnh, để đạt được các mục đích nêu trên, sáng chế đề xuất phương pháp điều chế thể tiếp hợp chứa polypeptit có hoạt tính sinh lý - polyme không phải peptit - vùng hằng định globulin miễn dịch, bao gồm các bước: (1) cho polyme không phải peptit phản ứng với một trong số polypeptit

có hoạt tính sinh lý hoặc vùng hằng định globulin miễn dịch; và (2) cho hỗn hợp phản ứng thu được ở bước (1) phản ứng với polypeptit có hoạt tính sinh lý hoặc vùng hằng định globulin miễn dịch còn lại với sự có mặt của muối.

Bước (1) là bước liên kết polypeptit có hoạt tính sinh lý hoặc vùng hằng định globulin miễn dịch với polyme không phải peptit, và phương pháp liên kết polyme không phải peptit với polypeptit có hoạt tính sinh lý hoặc vùng hằng định globulin miễn dịch đã biết có thể được sử dụng. Ví dụ, việc liên kết này có thể đạt được bằng cách cho chúng phản ứng ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 0°C đến 25°C trong khoảng thời gian từ 1 đến 16 giờ. Tốt hơn là, một polyme không phải peptit có thể được liên kết cộng hóa trị với polypeptit có hoạt tính sinh lý hoặc vùng hằng định globulin miễn dịch thông qua nhóm chức bằng phản ứng tạo ra liên kết cộng hóa trị. Tại thời điểm này, theo loại nhóm chức tham gia trong phản ứng, có thể chứa tác nhân khử ở nồng độ nằm trong khoảng từ 1 đến 20mM để thực hiện phản ứng.

Polyme không phải peptit có thể được liên kết với polypeptit có hoạt tính sinh lý và vùng hằng định globulin miễn dịch bằng các nhóm chức chứa trong đó tạo ra các liên kết cộng hóa trị. Tốt hơn là, các nhóm chức của polyme không phải peptit có thể được liên kết với nhóm amin có mặt ở đầu tận cùng N

hoặc trên mạch bên của gốc Lys của polypeptit có hoạt tính sinh lý và vùng hằng định globulin miễn dịch. Về mặt này, vị trí của gốc Lys trên polypeptit có hoạt tính sinh lý và vùng hằng định globulin miễn dịch không bị giới hạn cụ thể về vị trí đặc hiệu. Gốc Lys cũng bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, Lys tự nhiên, và các axit amin không tự nhiên và các dẫn xuất của Lys, chừng nào chúng chứa các nhóm amin được liên kết với các nhóm chức của polyme không phải peptit.

Hỗn hợp phản ứng có thể bao gồm sản phẩm phản ứng, như phức hợp của polyme không phải peptit và polypeptit có hoạt tính sinh lý hoặc phức hợp của polyme không phải peptit và vùng hằng định globulin miễn dịch, và hỗn hợp phản ứng chưa phản ứng. Vì vậy, có thể còn có bước tách phức hợp của polypeptit có hoạt tính sinh lý - polyme không phải peptit hoặc phức hợp của vùng hằng định globulin miễn dịch - polyme không phải peptit ra khỏi hỗn hợp phản ứng sau bước (1).

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “polyme không phải peptit” dùng để chỉ polyme tương hợp sinh học bao gồm hai hoặc nhiều đơn vị lặp lại được giữ cùng nhau bằng liên kết cộng hóa trị ngẫu nhiên ngoài liên kết peptit. Ví dụ về polyme không phải peptit hữu ích theo sáng chế bao gồm polyetylen glycol,

polypropylen glycol, copolyme của etylen glycol và propylen glycol, rượu polyhydric được polyoxyetyl hóa, rượu polyvinyllic, polysacarit, dextran, polyvinyl etyl ete, polyme dễ phân hủy sinh học như axit polylactic (PLA) và axit polylactic-glycolic (PLGA), polyme lipit, chitin, axit hyaluronic và hỗn hợp của chúng, tốt hơn nếu là polyetylen glycol (PEG). Dẫn xuất của chúng là đã biết trong lĩnh vực này và các dẫn xuất này có thể được điều chế một cách dễ dàng bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này cũng nằm trong phạm vi của sáng chế.

Phân tử liên kết peptit được sử dụng trong protein dung hợp được điều chế theo phương pháp dung hợp trong khung theo tình trạng kỹ thuật có nhược điểm là chúng bị phân giải *in vivo* một cách dễ dàng bằng enzym phân giải protein, và vì vậy việc tăng chu kỳ bán rã của hoạt động trong máu do bởi việc sử dụng chất mang tương ứng làm giảm kỳ vọng. Tuy nhiên, theo sáng chế, đã phát hiện ra rằng chu kỳ bán rã của peptit trong máu là tương tự với chu kỳ bán rã của chất mang trong máu, do bởi việc sử dụng polyme có tính chống chịu enzym phân giải protein. Vì vậy, theo sáng chế, polyme bất kỳ có chức năng trên, tức là có tính chống chịu enzym phân giải protein *in vivo*, có thể được sử dụng làm polyme không phải peptit mà không giới hạn phạm vi của sáng chế.

Polyme không phải peptit có khối lượng phân tử nằm trong khoảng từ 1 đến 100 kDa, và tốt hơn là nằm trong khoảng từ 1 đến 20 kDa. Ngoài ra, polyme không phải peptit theo sáng chế, để được tiếp hợp với polypeptit có hoạt tính sinh lý, không những là một polyme mà có thể còn là hỗn hợp của nhiều loại polyme khác nhau.

Polyme không phải peptit được sử dụng trong sáng chế có các nhóm chức có thể được tiếp hợp với vùng Fc globulin miễn dịch và thuốc protein.

Tốt hơn là, polyme không phải peptit có thể được liên kết với nhóm amin hoặc nhóm thiol trên mạch bên của gốc axit amin chứa polypeptit có hoạt tính sinh lý để tạo ra liên kết peptit, hemithioaxetal, imin, hoặc thiodioxopyrrolidinyl.

Ví dụ không giới hạn phạm vi của sáng chế về các nhóm chức đầu tận của polyme không phải peptit có thể bao gồm dẫn xuất aldehyt như nhóm propionaldehyt và nhóm butyraldehyt, dẫn xuất maleimit và dẫn xuất succinimit. Dẫn xuất succinimit có thể bao gồm succinimidyl carboxymetyl, succinimidyl valerat, succinimidyl metylbutanoat, succinimidyl metylpropionat, succinimidyl butanoat, succinimidyl propionat, N-hydroxysuccinimit, hoặc succinimidyl cacbonat, nhưng không chỉ giới hạn ở

đó. Các nhóm chức có thể được liên kết một cách chọn lọc với nhóm amin hoặc nhóm thiol của gốc axit amin của vùng Fc globulin miễn dịch và polypeptit có hoạt tính sinh lý để tạo ra liên kết cộng hóa trị có thể được sử dụng mà không giới hạn phạm vi của sáng chế.

Các nhóm chức ở cả hai đầu của polyme không phải peptit có thể là giống nhau hoặc khác nhau. Ví dụ, polyme không phải peptit có thể có nhóm succinimit ở một đầu và dẫn xuất aldehyt như nhóm propionaldehyt hoặc nhóm butyraldehyt ở đầu kia. Khi polyetylen glycol có nhóm hydroxy phản ứng ở cả hai đầu của nó được dùng làm polyme không phải peptit, nhóm hydroxy có thể được hoạt hóa thành các nhóm chức khác nhau bằng các phản ứng hóa học đã biết, hoặc polyetylen glycol đang có trên thị trường có nhóm chức cải biến có thể được sử dụng để điều chế được thể tiếp hợp protein của sáng chế.

Tốt hơn là, polyme không phải peptit có thể có nhóm propionaldehyt như các nhóm chức ở cả hai đầu.

Việc tiếp hợp với PEG, thường được sử dụng để điều chế chế phẩm protein có tác dụng kéo dài, làm tăng độ ổn định của protein, trong khi khối lượng phân tử của PEG càng lớn thì tính phản ứng với protein càng giảm và do đó làm giảm hiệu suất. Do hiệu suất có mối tương quan mật thiết với chi phí và

khả năng áp dụng công nghiệp tương ứng, nên việc làm tăng hiệu suất là điều rất quan trọng. PEG với nhóm chức aldehyt có thể được ngẫu hợp với nhóm amin, có mặt ở đầu tận cùng N hoặc trên nhóm R của gốc Lys của polypeptit. Hiệu suất của quá trình peg hóa có thể thay đổi tùy thuộc vào tỷ lệ mol giữa PEG và các protein, nồng độ của dung dịch phản ứng, thời gian phản ứng, pH, nhiệt độ, v.v.

Tuy nhiên, khi polyme không phải peptit bao gồm PEG với hai hoặc nhiều nhóm chức được dùng làm cầu nối giữa hai polypeptit khác nhau, thì cần có hai hoặc nhiều bước trong phản ứng, do đó làm giảm hiệu suất tổng. Đặc biệt là, đã quan sát được bước phản ứng thứ hai (trong đó polypeptit có hoạt tính sinh lý hoặc vùng hằng định globulin miễn dịch được tiếp hợp với polyme không phải peptit có hai hoặc nhiều nhóm chức phản ứng lần lượt với vùng hằng định globulin miễn dịch hoặc polypeptit có hoạt tính sinh lý, dưới đây được dùng để chỉ “phản ứng ngẫu hợp”) được thực hiện với hiệu suất thấp hơn đáng kể so với bước phản ứng thứ nhất trong đó polypeptit có hoạt tính sinh lý hoặc vùng hằng định globulin phản ứng miễn dịch với polyme không phải peptit có hai hoặc nhiều nhóm chức.

Các tác giả sáng chế đã phát hiện ra mối tương quan giữa việc bổ sung muối trong quá trình phản ứng ngẫu hợp và hiệu suất phản ứng, và khẳng định được rằng hiệu suất của phản ứng ngẫu hợp được cải thiện bằng cách sử dụng muối.

Muối theo sáng chế là hợp chất ion có điện tích toàn phần trung tính thu được từ quá trình tạo ra điện liên kết giữa số lượng bằng nhau của anion và cation (có tính đến hóa trị ion), và phân ly thành cation và anion trong dung dịch nước. Theo mục đích của sáng chế, muối có thể được bổ sung vào dung dịch phản ứng sao cho phức hợp của polyme không phải peptit và polypeptit có hoạt tính sinh lý hoặc phức hợp của polyme không phải peptit và vùng hằng định globulin miễn dịch được liên kết với vùng hằng định globulin miễn dịch hoặc polypeptit có hoạt tính sinh lý để tạo ra liên kết cộng hóa trị. Cation tạo ra muối thông thường bao gồm amoni (NH_4^+), canxi (Ca^{2+}), sắt (Fe^{2+} hoặc Fe^{3+}), magie (Mg^{2+}), kali (K^+), pyridin ($\text{C}_5\text{H}_5\text{NH}^+$), amoni bậc bốn (NR_4^+) hoặc natri (Na^+), và anion có thể bao gồm axetat (CH_3COO^-), cacbonat (CO_3^{2-}), clorua (Cl^-), xitrat ($\text{HOC}(\text{COO}^-)(\text{CH}_2\text{COO}^-)_2$), xyanua (CN^-), nitrat (NO_3^-), nitrit (NO_2^-), phosphat (PO_4^{3-}) hoặc sulfat (SO_4^{2-}). Muối có thể được tạo ra ở dạng hỗn hợp của các cation và anion nêu trên. Muối này có thể là muối thông thường được

sử dụng trong lĩnh vực kỹ thuật, nhưng không chỉ giới hạn ở, tốt hơn là natri clorua, natri axetat, natri sulfat, natri phosphat, natri cacbonat, natri xyanua, natri xitrat, natri nitrat, kali clorua, kali axetat, kali sulfat, kali phosphat, kali cacbonat, kali xyanua, kali xitrat, kali nitrat, magie clorua, magie axetat, magie sulfat, magie phosphat, magie cacbonat, magie xyanua, magie xitrat, magie nitrat, amoni clorua, amoni axetat, amoni sulfat, amoni phosphat, amoni cacbonat, amoni xyanua, amoni xitrat, amoni nitrat, canxi clorua, canxi axetat, canxi sulfat, canxi phosphat, canxi cacbonat, canxi xyanua, canxi xitrat, hoặc canxi nitrat. Tốt hơn nữa, nếu muối có thể là natri clorua, natri axetat, natri sulfat, natri phosphat, hoặc kali clorua. Đối với muối, dạng thích hợp có thể là dạng tự do được chọn tùy thuộc vào dạng polypeptit có hoạt tính sinh lý và dung môi phản ứng.

Muối có thể chứa trong dung dịch phản ứng sao cho polyme không phải peptit được liên kết với polypeptit có hoạt tính sinh lý hoặc vùng hằng định globulin miễn dịch nhờ một nhóm chức được liên kết một cách hiệu quả với vùng hằng định globulin miễn dịch hoặc polypeptit có hoạt tính sinh lý nhờ nhóm chức khác. Để làm tăng hiệu suất của phản ứng ngẫu hợp của polyme không phải peptit, nồng độ cuối của muối có thể tương đối cao, ví dụ, thấp hơn

3,0 M. Ngưỡng nồng độ thấp của muối có thể được xác định bằng cách lặp lại các thử nghiệm, và với nồng độ muối thích hợp, ví dụ, có thể đề xuất nồng độ cuối của muối nằm trong khoảng từ 0,1 đến 3 M, và tốt hơn là ở nồng độ cuối nằm trong khoảng từ 0,3 đến 2,5M trong quá trình phản ứng ngẫu hợp.

Tốt hơn, nếu muối được chọn là natri clorua, thì muối này có thể được bổ sung ở nồng độ cuối thấp hơn 3,0M, nếu muối được chọn là natri axetat, thì muối này có thể được bổ sung ở nồng độ cuối thấp hơn 2,5M, nếu muối được chọn là natri sulfat, thì muối này có thể được bổ sung ở nồng độ cuối thấp hơn 0,7M, nếu muối được chọn là natri phosphat, thì muối này có thể được bổ sung ở nồng độ cuối thấp hơn 0,8M, hoặc nếu muối là kali clorua, thì muối này có thể được bổ sung ở nồng độ cuối là 1,0M hoặc thấp hơn. Nếu nồng độ muối vượt quá khoảng nêu trên theo loại muối được chọn, thì hiệu suất tăng, nhưng có thể xảy ra hiện tượng kết tụ ngoài ý muốn. Mặc dù xảy ra hiện tượng kết tụ nhưng vẫn có thể điều chế được thể tiếp hợp, tuy nhiên sẽ phát sinh những khó khăn trong quá trình điều chế. Vì vậy, để thuận tiện cho quá trình, tốt hơn là muối được bổ sung ở nồng độ không gây ra hiện tượng kết tụ quá mức, tức là không tạo ra kết tụ hoặc chỉ tạo ra kết tụ nhỏ. Ví dụ, nếu việc bổ sung muối trong quá trình phản ứng ngẫu hợp làm tăng hiệu suất tổng so với trước khi bổ

sung muối mặc dù có hiện tượng kết tụ, thì hiện tượng kết tụ như vậy có thể chấp nhận được chừng nào nó không gây ra các vấn đề nghiêm trọng trong quá trình tách và/hoặc tinh chế.

Theo phương án cụ thể của sáng chế, khi thể tiếp hợp được điều chế bằng cách liên kết insulin, cầu nối PEG chứa nhóm chức là hai nhóm aldehyt, và vùng hằng định globulin miễn dịch, phản ứng được thực hiện bằng cách sử dụng muối trong các điều kiện khác nhau để làm tăng hiệu suất. Đã thấy rằng việc sử dụng muối trong quá trình phản ứng ngẫu hợp làm tăng hiệu suất (Bảng 1). Ngoài ra, các tác giả sáng chế đã thấy rằng việc tăng hiệu suất của phản ứng ngẫu hợp nhờ bổ sung muối có thể đạt được bằng cách ngăn ngừa tạo ra tạp chất do phản ứng phụ, ví dụ, ngăn ngừa tạo ra multimer có thể tạo ra từ việc gắn kết của hai phức hợp insulin-PEG khác nhau với hai đầu N của một vùng hằng định globulin miễn dịch (Fig. 1).

Theo sáng chế, tốt hơn là phản ứng ngẫu hợp, tức là phản ứng của bước (2) có thể được thực hiện trong khoảng thời gian từ 4 đến 18 giờ. Ngoài ra, phản ứng ngẫu hợp có thể được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 0°C đến 25°C. Tuy nhiên, điều kiện phản ứng không giới hạn ở đó.

Theo sáng chế, nếu polyme không phải peptit có nhóm chức là một hoặc nhiều dẫn xuất aldehyt, thì hỗn hợp phản ứng có thể còn chứa tác nhân khử ở nồng độ cuối nằm trong khoảng từ 1 đến 100mM.

Theo sáng chế, tác nhân khử nghĩa là hợp chất có tác dụng làm giảm liên kết imin thuận nghịch được tạo ra từ phản ứng giữa nhóm aldehyt của polyme không phải peptit và nhóm amin của polypeptit (polypeptit có hoạt tính sinh lý, vùng hằng định globulin miễn dịch), nhờ đó tạo ra liên kết cộng hóa trị, và được dự định bao hàm toàn bộ các tác nhân khử đã biết trong lĩnh vực này. Đối với mục đích của sáng chế, tác nhân khử có thể được bổ sung vào dung dịch phản ứng trong đó polyme không phải peptit tạo ra liên kết cộng hóa trị với polypeptit có hoạt tính sinh lý hoặc vùng hằng định globulin miễn dịch. Chừng nào nó được sử dụng thông thường trong lĩnh vực kỹ thuật này, thì tác nhân khử bất kỳ có thể được sử dụng theo sáng chế. Tốt hơn là, ví dụ về tác nhân khử có thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, natri xyanoborohyđrit, phức hợp boran pyridin, natri borohyđrit, phức hợp boran dimetylamin, phức hợp boran trimetylamin hoặc natri triacetoxyborohyđrit. Tác nhân khử thích hợp có thể là dạng tự do được chọn tùy thuộc vào loại polypeptit có hoạt tính sinh lý hoặc vùng hằng định globulin miễn dịch và dung môi phản ứng.

Tác nhân khử chứa trong dung dịch phản ứng để tiếp hợp polypeptit có hoạt tính sinh lý hoặc vùng hằng định globulin miễn dịch với polyme không phải peptit. Tác nhân khử có thể được chứa ở nồng độ nằm trong khoảng từ 1 đến 20mM đối với phản ứng giữa polypeptit có hoạt tính sinh lý và polyme không phải peptit hoặc vùng hằng định globulin miễn dịch và polyme không phải peptit (phản ứng của bước (1)), và ở nồng độ nằm trong khoảng từ 1 đến 100mM đối với phản ứng ngẫu hợp (phản ứng của bước (2)).

Tốt hơn là, bước (1) có thể được thực hiện ở độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 6,5 và bước (2) có thể được thực hiện ở độ pH nằm trong khoảng từ 6,0 đến 8,5. Ngoài ra, phản ứng có thể được thực hiện trong các điều kiện có độ bền ion được kiểm soát trong khoảng từ 20 đến 500mM bằng cách sử dụng natri xitrat và kali phosphat hoặc HEPES, nhưng không chỉ giới hạn ở đó.

Theo phương án cụ thể của sáng chế, PEG có nhóm chức là propionaldehyt ở cả hai đầu của nó được sử dụng làm polyme không phải peptit và được phản ứng với insulin dưới dạng polypeptit có hoạt tính sinh lý để điều chế phức hợp của PEG-insulin, và tiếp theo phản ứng ngẫu hợp với vùng hằng định globulin miễn dịch được thực hiện với sự có mặt của muối để điều chế thể tiếp hợp của insulin-PEG-vùng hằng định globulin miễn dịch.

Như được mô tả trên đây, sự liên kết với polyme không phải peptit xảy ra giữa các nhóm chức của polyme không phải peptit và nhóm amin có mặt ở đầu tận cùng N của polypeptit có hoạt tính sinh lý hoặc vùng hằng định globulin miễn dịch hoặc nhóm amin hoặc nhóm thiol trên mạch bên của gốc axit amin cấu thành chúng. Trong khi đó, do vùng hằng định globulin miễn dịch có hai đầu N, một vùng hằng định globulin miễn dịch được gắn qua hai nhóm chức trên cùng của phân tử polyme không phải peptit, hoặc qua nhóm chức trên hai phân tử polyme không phải peptit khác nhau. Tuy nhiên, tốt hơn là thể tiếp hợp được tạo ra bằng phương pháp điều chế theo sáng chế dưới dạng mà mỗi một phân tử của polypeptit có hoạt tính sinh lý, polyme không phải peptit và vùng hằng định globulin miễn dịch được liên kết với nhau, tức là một phân tử của polypeptit có hoạt tính sinh lý và một phân tử của vùng hằng định globulin miễn dịch được liên kết với cả hai đầu của một polyme không phải peptit. Ngược lại, khi một vùng hằng định globulin miễn dịch được liên kết với hai nhóm chức của cùng phân tử polyme không phải peptit, thì toàn bộ nhóm chức ở cả hai đầu của polyme không phải peptit được liên kết với vùng hằng định globulin miễn dịch, và do đó chúng không thể liên kết được với polypeptit có hoạt tính sinh lý bằng phản ứng ngẫu hợp. Khi một vùng hằng định globulin

miễn dịch được liên kết với từng nhóm chức của hai phân tử polyme không phải peptit khác nhau, thì có thể tạo ra multime ở dạng đime giả.

Vì vậy, theo một phương án thực hiện của sáng chế, ở bước (1), polyme không phải peptit phản ứng với polypeptit có hoạt tính sinh lý, và ở bước (2), hỗn hợp phản ứng thu được ở bước (1) phản ứng với vùng hằng định globulin miễn dịch. Nếu polyme không phải peptit phản ứng trước tiên với polypeptit có hoạt tính sinh lý để tạo ra phức hợp của polypeptit có hoạt tính sinh lý - polyme không phải peptit, và phức hợp này phản ứng với vùng hằng định globulin miễn dịch bằng phản ứng ngẫu hợp, thì nó có thể ngăn ngừa việc tạo ra phức hợp bằng cách liên kết một vùng hằng định globulin miễn dịch với cả hai đầu của một polyme không phải peptit, điều này có thể xảy ra khi vùng hằng định globulin miễn dịch và polyme không phải peptit được phản ứng trước tiên.

Theo ví dụ cụ thể về phương án nêu trên, tốt hơn là ở bước (1), polypeptit có hoạt tính sinh lý và polyme không phải peptit được phản ứng với tỷ lệ mol nằm trong khoảng từ 1:1 đến 1:20, và ở bước (2), phức hợp của polypeptit có hoạt tính sinh lý và polyme không phải peptit dưới dạng sản phẩm của bước (1) và vùng hằng định globulin miễn dịch được phản ứng với tỷ lệ mol nằm trong khoảng từ 1:0,5 đến 1:10, nhưng không chỉ giới hạn ở đó.

Đặc biệt hơn, bước (2) có thể được thực hiện bằng cách bổ sung natri clorua ở nồng độ cuối thấp hơn 3,0M, natri axetat ở nồng độ cuối thấp hơn 2,5M, natri sulfat ở nồng độ cuối thấp hơn 0,7M, natri phosphat ở nồng độ cuối thấp hơn 0,8M, hoặc kali clorua ở nồng độ cuối là 1,0M hoặc thấp hơn, nhưng không chỉ giới hạn ở dạng và nồng độ muối. Chừng nào hiện tượng kết tụ quá mức đủ để gây ảnh hưởng cho quy trình trong đó hỗn hợp phản ứng không được tạo ra, thì các dạng muối khác nhau có thể được bổ sung ở các nồng độ khác nhau. Muối có thể được sử dụng ở nồng độ gây ra hiện tượng kết tụ tương ứng với mức kết tụ mà được coi như là có thể chấp nhận được khi không được bổ sung muối.

Đặc biệt hơn, bước (1) là bước phản ứng polypeptit có hoạt tính sinh lý với polyme không phải peptit với tỷ lệ mol nằm trong khoảng từ 1:1 đến 1:20 trong điều kiện pH từ 5,0 đến 6,5, và bước (2) là bước cho hỗn hợp phản ứng thu được ở bước (1) phản ứng với vùng hằng định globulin miễn dịch với tỷ lệ mol nằm trong khoảng từ 1:0,5 đến 1:10 trong điều kiện pH từ 6,0 đến 8,5 với sự có mặt của muối, và nếu muối được chọn là natri clorua, thì muối này có thể được bổ sung ở nồng độ cuối thấp hơn 3,0M, nếu muối được chọn là natri axetat, thì muối này có thể được bổ sung ở nồng độ cuối thấp hơn 2,5M, nếu

muối được chọn là natri sulfat, thì muối này có thể được bổ sung ở nồng độ cuối thấp hơn 0,7M, nếu muối được chọn là natri phosphat, thì muối này có thể được bổ sung ở nồng độ cuối thấp hơn 0,8M, hoặc nếu muối là kali clorua, thì muối này có thể được bổ sung ở nồng độ cuối là 1,0M hoặc thấp hơn.

Bước (1) là phản ứng để điều chế phức hợp của polypeptit có hoạt tính sinh lý - polyme không phải peptit, và sau đó có thể thực hiện tiếp bước tinh chế sản phẩm. Bước (2) là phản ứng để điều chế thể tiếp hợp chứa polypeptit có hoạt tính sinh lý - polyme không phải peptit - vùng hằng định globulin miễn dịch bằng cách cho phức hợp của polypeptit có hoạt tính sinh lý - polyme không phải peptit dưới dạng sản phẩm của bước (1) phản ứng với vùng hằng định globulin miễn dịch. Thể tiếp hợp có thể được điều chế với hiệu suất cao bằng cách kiểm soát các điều kiện phản ứng và tỷ lệ mol của các chất phản ứng như được mô tả trên đây.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “polypeptit có hoạt tính sinh lý” dùng để chỉ polypeptit có chức năng sinh lý học *in vivo* nhất định theo khái niệm chung. Nó có cấu trúc polypeptit thông thường và có các hoạt tính sinh lý khác nhau. Khi cơ thể bất thường về mặt sinh lý do việc tiết thiếu hụt hoặc dư thừa các chất liên quan đến chức năng nhất định, thì polypeptit có hoạt tính sinh lý có

thể điều hòa sự biểu hiện gen hoặc chức năng sinh lý học, nhờ đó điều chỉnh được sự bất thường. Polypeptit có hoạt tính sinh lý có thể là thuốc protein thông thường.

Polypeptit có hoạt tính sinh lý có thể được chọn từ nhóm bao gồm hormon sinh trưởng của người, hormon giải phóng hormon sinh trưởng, peptit giải phóng hormon sinh trưởng, interferon, thụ thể interferon, yếu tố kích thích tạo cụm, peptit giống glucagon (GLP-1, v.v.), oxyntomodulin, thụ thể được ngẫu hợp protein G, interleukin, thụ thể interleukin, enzym, protein liên kết interleukin, protein liên kết xytokin, yếu tố hoạt hóa đại thực bào, peptit đại thực bào, các yếu tố tế bào B, các yếu tố tế bào T, protein A, chất ức chế dị ứng, glycoprotein gây hoại tử tế bào, độc tố miễn dịch, độc tố lympho bào, yếu tố gây hoại tử khối u, chất ức chế khối u, yếu tố sinh trưởng chuyển hóa, kháng trypsin alpha-1, albumin, α -lactalbumin, apolipoprotein-E, erythropoietin, erythropoietin được glycosyl hóa, angiopoietin, hemoglobin, thrombin, peptit hoạt hóa thụ thể thrombin, thrombomodulin, yếu tố máu VII, VIIa, VIII, IX và XIII, chất hoạt hóa plasminogen, peptit gắn kết fibrin, urokinaza, streptokinaza, hirudin, protein C, protein phản ứng C, chất ức chế thận tố, chất ức chế collagenaza, peoxit dismutaza, leptin, yếu tố sinh trưởng có nguồn gốc tiểu cầu,

yếu tố sinh trưởng biểu mô, yếu tố sinh trưởng biểu bì, angiostatin, kích thích tố tăng huyết áp, yếu tố sinh trưởng xương, protein kích thích xương, canxitonin, insulin, hormon kiểm soát thể tích máu, yếu tố tạo sụn, elcatonin, yếu tố hoạt hóa mô liên kết, chất ức chế con đường của yếu tố mô, hormon kích thích nang, hormon hoàng thể hóa, hormon giải phóng hormon hoàng thể hóa, yếu tố sinh trưởng thần kinh, hormon tuyến cận giáp, relaxin, secretin, hormon kích thích sự phát triển của xương và cơ bắp, yếu tố sinh trưởng giống insulin, hormon vỏ tuyến thượng thận, glucagon, colexystokinin, polypeptit tụy, peptit giải phóng gastrin, yếu tố giải phóng hormon tuyến yên, hormon kích thích tuyến giáp, autotaxin, lactoferrin, myostatin, kháng nguyên bề mặt tế bào, kháng nguyên vắc-xin có nguồn gốc virus, kháng thể đơn dòng, kháng thể đa dòng, và các mảnh kháng thể. Tốt hơn, nếu polypeptit có hoạt tính sinh lý có thể là insulin, nhưng không chỉ giới hạn ở đó.

Insulin được sử dụng trong phương án của sáng chế là loại peptit có hoạt tính sinh lý được tiết ra từ tụy khi mức glucoza huyết trở nên cao, có tác dụng kiểm soát mức glucoza huyết bằng cách gây hấp thụ glucoza vào gan, cơ xương và các mô chứa mỡ từ máu và cất giữ dưới dạng glycogen, và ngăn chặn được quá trình phân hủy chất béo, trao đổi chất bằng cách sử dụng chất béo làm

nguồn năng lượng. Về mặt cấu trúc, insulin bao gồm chuỗi alpha và chuỗi beta.

Các thuật ngữ chuỗi insulin alpha và chuỗi insulin beta có thể được sử dụng

hoán đổi lẫn lộn tương ứng với chuỗi insulin A và chuỗi insulin B. Các peptit

này bao gồm chất chủ vận insulin, tiền chất, dẫn xuất, mảnh và các biến thể.

Insulin tự nhiên, insulin có tác dụng nhanh, và insulin có tác dụng kéo dài được ưu tiên.

Insulin tự nhiên là hormon được tiết từ tụy và có tác dụng kiểm soát mức đường huyết trong cơ thể bằng cách thúc đẩy quá trình hấp thu glucoza trong tế bào và ức chế quá trình phân giải lipit. Insulin có chức năng điều hòa mức glucoza huyết được tạo ra từ tiền chất tiền insulin chứ không có chức năng điều hòa mức glucoza huyết, nhờ một loạt quy trình. Trình tự axit amin của insulin là như sau:

- Chuỗi alpha:

Gly-Ile-Val-Glu-Gln-Cys-Cys-Thr-Ser-Ile-Cys-Ser-Leu-Tyr-Gln-Leu-

Glu-Asn-Tyr-Cys-Asn (SEQ ID NO. 1)

- Chuỗi beta:

Phe-Val-Asn-Gln-His-Leu-Cys-Gly-Ser-His-Leu-Val-Glu-Ala-Leu-Tyr-
 Leu-Val-Cys-Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Pro-Lys-Thr (SEQ ID NO.
 2)

Chất chủ vận insulin nghĩa là chất gắn kết với thụ thể insulin *in vivo* và có hoạt tính sinh học giống như insulin bất kể cấu trúc của insulin.

Dẫn xuất insulin dùng để chỉ peptit có có mức tương đồng về trình tự axit amin là ít nhất 80% so với insulin tự nhiên, có một số nhóm gốc axit amin đã sửa đổi ở dạng thay thế bằng hóa học (ví dụ, alpha-metyl hóa, alpha-hydroxyl hóa), loại bỏ (ví dụ, khử amin hóa) hoặc cải biến (ví dụ, N-metyl hóa, glycosyl hoá, axit béo), và có tác dụng kiểm soát mức đường huyết trong cơ thể.

Mảnh insulin dùng để chỉ dạng insulin có một hoặc nhiều axit amin được bổ sung, hoặc được khuyết đoạn, nhóm đầu tận amino hoặc carboxy của insulin, và axit amin khi được bổ sung cũng có thể là axit amin không tự nhiên (ví dụ, axit amin dạng D). Các mảnh insulin như vậy vẫn có tác dụng kiểm soát mức đường huyết trong cơ thể.

Biến thể insulin dùng để chỉ peptit khác với insulin ở một hoặc nhiều trình tự axit amin, và vẫn có tác dụng kiểm soát mức đường huyết trong cơ thể.

Các phương pháp điều chế chất chủ vận insulin, dẫn xuất, mảnh và các

biến thể tương ứng có thể được sử dụng một cách độc lập hoặc kết hợp. Ví dụ, peptit insulin có thể là peptit có một hoặc nhiều trình tự axit amin khác với trình tự axit amin của insulin và đã được khử amin hóa ở gốc axit amin đầu N, có tác dụng kiểm soát mức đường huyết trong cơ thể.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “vùng hằng định globulin miễn dịch” dùng để chỉ mảnh globulin miễn dịch không có vùng biến đổi của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng, vùng hằng định 1 của chuỗi nặng (CH1), và vùng hằng định của chuỗi nhẹ (CL), tức là vùng Fc bao gồm các vùng hằng định 2 và 3 của chuỗi nặng (CH2 và CH3) (hoặc kể cả vùng hằng định của chuỗi nặng (CH4)). Tuy ý, vùng Fc globulin miễn dịch có thể còn chứa vùng bản lề. Ngoài ra, vùng hằng định globulin miễn dịch theo sáng chế có thể là vùng Fc globulin miễn dịch mở rộng bao gồm một phần hoặc toàn bộ vùng hằng định 1 của chuỗi nặng (CH1) và/hoặc vùng hằng định của chuỗi nhẹ (CL) chỉ ngoại trừ vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch chừng nào nó có tác dụng gần giống hoặc vượt trội so với vùng biến đổi của vùng hằng định globulin miễn dịch tự nhiên. Ngoài ra, vùng hằng định globulin miễn dịch theo sáng chế có thể thiếu phần trình tự axit amin quan trọng tương ứng với CH2 và/hoặc CH3. Do đó, vùng hằng định globulin miễn dịch theo sáng chế có thể chứa (1) miền

CH1, miền CH2, miền CH3 và miền CH4, (2) miền CH1 và miền CH2, (3) miền CH1 và miền CH3, (4) miền CH2 và miền CH3, (5) tổ hợp của một hoặc nhiều miền cố định và vùng bản lề globulin miễn dịch (hoặc một phần vùng bản lề), hoặc (6) đime của từng miền cố định của chuỗi nặng và vùng hằng định của chuỗi nhẹ.

Vùng hằng định globulin miễn dịch bao gồm vùng Fc là polypeptit dễ phân hủy sinh học có thể được chuyển hoá *in vivo*, sao cho nó có thể được sử dụng một cách an toàn dưới dạng chất mang thuốc. Ngoài ra, vùng Fc globulin miễn dịch có lợi hơn trong sản xuất, tinh chế và hiệu suất sản xuất thể tiếp hợp so với toàn bộ phân tử globulin miễn dịch do bởi khối lượng phân tử thấp hơn tương đối của nó. Ngoài ra, do nó không có Fab là vùng có tính không đồng nhất cao do sự khác nhau về trình tự axit amin giữa một kháng thể với kháng thể khác, nên Fc globulin miễn dịch riêng rẽ tạo ra thể tiếp hợp có tính đồng nhất cao hơn đáng kể, và làm giảm khả năng gây ra tính kháng nguyên trong máu.

Mặt khác, vùng hằng định globulin miễn dịch có thể có nguồn gốc từ người hoặc động vật như bò, dê, lợn, chuột nhắt, thỏ, chuột hamster, chuột đồng, chuột lang, v.v., và tốt hơn là nó có nguồn gốc từ người. Ngoài ra, vùng

hằng định globulin miễn dịch có thể được chọn từ mảnh Fc có nguồn gốc từ IgG, IgA, IgD, IgE, IgM, hoặc tổ hợp hoặc thể lai của chúng. Tốt hơn là, vùng hằng định có nguồn gốc từ IgG hoặc IgM, là những kháng thể có nhiều nhất trong máu, và tốt nhất là từ IgG là kháng thể đã biết làm tăng chu kỳ bán rã liên kết phối tử-protein trong huyết thanh.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “kết hợp” có nghĩa là polypeptit mã hoá vùng hằng định globulin miễn dịch sợi đơn (tốt hơn nếu là vùng Fc) của gốc giống nhau được liên kết với polypeptit sợi đơn của gốc khác nhau để tạo ra đime hoặc multime. Tức là đime hoặc multime có thể được điều chế bằng cách kết hợp hai hoặc nhiều mảnh được chọn từ nhóm bao gồm mảnh IgG Fc, IgA Fc, IgM Fc, IgD Fc và IgE.

Khi sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "thể lai" nghĩa là trình tự mã hóa hai hoặc nhiều vùng hằng định globulin miễn dịch có nguồn gốc khác nhau có mặt trong sợi đơn của vùng hằng định globulin miễn dịch (tốt hơn, nếu là vùng Fc). Theo sáng chế, các dạng thể lai khác nhau là sẵn có. Ví dụ, miền thể lai có thể bao gồm từ một đến bốn miền được chọn từ nhóm bao gồm CH1, CH2, CH3 và CH4 of IgG Fc, IgM Fc, IgA Fc, IgE Fc và IgD Fc, và có thể bao gồm vùng bản lề.

IgG được chia thành các phân lớp IgG1, IgG2, IgG3 và IgG4, và theo sáng chế, tổ hợp hoặc hydrua của chúng cũng có thể được sử dụng. Được ưu tiên là các phân lớp IgG2 và IgG4, và được ưu tiên nhất là vùng Fc của IgG4 không có chức năng hiệu ứng như độc tính tế bào phụ thuộc bổ thể (CDC).

Vùng hằng định globulin miễn dịch có thể là vùng có chuỗi đường nguyên thể, chuỗi đường tăng hoặc chuỗi đường giảm so với dạng nguyên thể, hoặc có thể ở dạng được khử glycosyl hóa. Việc tăng, giảm hoặc loại bỏ chuỗi đường của vùng hằng định globulin miễn dịch có thể đạt được bằng các phương pháp thông thường trong lĩnh vực kỹ thuật này như phương pháp hóa học, phương pháp enzym và phương pháp di truyền bằng cách sử dụng vi sinh vật. Theo sáng chế, vùng hằng định globulin miễn dịch được khử glycosyl hóa có mức ái lực gắn kết với bổ thể (C1q) giảm rõ rệt và tính gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể hoặc tính gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể được giảm hoặc mất đi, nhờ đó không gây ra đáp ứng miễn dịch *in-vivo* không cần thiết. Về mặt này, vùng hằng định globulin miễn dịch ở dạng khử glycosyl hóa hoặc dạng không được glycosyl hóa có thể thích hợp hơn dưới dạng chất mang thuốc theo mục đích theo sáng chế. Do đó, tốt hơn nữa là vùng Fc không được glycosyl hóa có thể có nguồn gốc từ IgG4 của người được sử dụng. Vùng Fc có nguồn gốc từ

người được ưu tiên hơn so với vùng Fc có nguồn gốc không phải từ người, có thể có tác dụng làm kháng nguyên ở người và gây ra các đáp ứng miễn dịch không mong muốn như tạo ra kháng thể mới chống lại kháng nguyên.

Ngoài ra, không những vùng hằng định globulin miễn dịch với trình tự axit amin nguyên thể mà cả thể đột biến trình tự axit amin của nó có thể cũng nằm trong phạm vi của vùng hằng định globulin miễn dịch theo sáng chế. Trình tự axit amin của dẫn xuất có trình tự khác về một hoặc nhiều gốc axit amin so với trình tự axit amin nguyên thể do bởi khuyến đoạn, cài xen, thay thế bảo toàn hoặc không bảo toàn hoặc kết hợp của chúng. Ví dụ, các gốc axit amin ở các vị trí 214 đến 238, 297 đến 299, 318 đến 322, hoặc 327 đến 331 trong IgG Fc, đã biết là quan trọng cho việc liên kết, có thể được sử dụng làm vị trí thích hợp để cải biến. Các dẫn xuất khác nhau như dẫn xuất được điều chế bằng cách loại bỏ các vị trí có khả năng tạo ra liên kết disulfua, loại bỏ một vài axit amin đầu N ra khỏi Fc nguyên thể, hoặc thêm đoạn metionin vào đầu N của Fc nguyên thể, có thể được sử dụng theo sáng chế. Ngoài ra, vị trí cố định bổ thể, ví dụ, vị trí cố định C1q hoặc vị trí ADCC, có thể được khử bỏ ra khỏi vùng Fc nguyên thể để loại bỏ chức năng hiệu ứng. Phương pháp điều chế thể đột biến của trình tự axit amin của vùng hằng định globulin miễn dịch được đề cập

trong các Công bố đơn quốc tế số WO 97/34631 và WO 96/32478.

Việc thay thế axit amin trong các protein và peptit, thường không làm thay đổi hoạt tính của phân tử, là đã biết trong lĩnh vực này (H.Neurath, R.L.Hill, The Proteins, Academic Press, New York, 1979). Việc thay thế phổ biến nhất xảy ra giữa các gốc axit amin Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Thr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu, Asp/Gly. Tùy ý, axit amin có thể được cải biến bằng cách phosphoryl hoá, sulfat hóa, acrylat hóa, glycosyl hoá, metyl hóa, farnesyl hóa, axetyl hóa và amit hóa.

Dẫn xuất của vùng hằng định globulin miễn dịch nêu trên có thể là dẫn xuất có hoạt tính giống như hoạt tính của vùng hằng định globulin miễn dịch theo sáng chế đồng thời có độ ổn định cấu trúc tốt hơn với nhiệt, pH hoặc các yếu tố tương tự. Ngoài ra, các vùng Fc này có thể thu được từ các dạng nguyên thể được tách ra từ người và động vật khác bao gồm bò, dê, lợn, chuột nhắt, thỏ, chuột hamster, chuột đồng và chuột lang, hoặc có thể là dạng tái tổ hợp hoặc dẫn xuất của chúng, thu được từ các tế bào động vật hoặc vi sinh vật biến nạp. Theo sáng chế, chúng có thể thu được từ globulin miễn dịch nguyên thể bằng cách phân lập toàn bộ globulin miễn dịch từ cơ thể người hoặc động vật và xử

lý chúng bằng enzym phân giải protein. Globulin miễn dịch được phân giải thành các vùng Fab và Fc nhờ xử lý bằng papain, và phân giải thành pF'c và F(ab)₂ nhờ xử lý bằng pepsin. Các mảnh này có thể được sắc ký loại trừ kích cỡ để tách Fc hoặc pF'c.

Tốt hơn, nếu vùng hằng định globulin miễn dịch có nguồn gốc từ người có thể là vùng hằng định globulin miễn dịch tái tổ hợp thu được từ vi sinh vật.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn dưới đây có tham khảo đến các Ví dụ sau. Tuy nhiên, các Ví dụ này chỉ nhằm mục đích minh họa, và sáng chế không chỉ giới hạn ở các Ví dụ này.

Ví dụ 1: Phản ứng peg hóa insulin và tinh chế insulin được peg hóa một lần

Bột insulin được hoà tan trong 10 mM HCl, và tiếp theo được phản ứng với 3,4K propion-ALD2 PEG (PEG có hai nhóm propionaldehyde ở cả hai đầu, IDB, Hàn Quốc) ở 4°C trong khoảng 2 giờ với tỷ lệ mol insulin:PEG là 1:4 và nồng độ insulin là 5mg/ml để peg hóa đầu N của chuỗi insulin beta. Phản ứng này được thực hiện trong điều kiện 50mM natri xitrat, độ pH 6,0, trong isopropanol 45% kết hợp bổ sung 3,0mM natri xyanoborohydrit dưới dạng tác nhân khử. Dung dịch phản ứng được tinh chế bằng cột SP-HP (GE Healthcare)

bằng cách sử dụng dung dịch đệm chứa natri xitrat (pH 3,0) và EtOH 45%, và gradien nồng độ KCl.

Ví dụ 2: Điều chế thể tiếp hợp bằng phản ứng ngẫu hợp mà không cần bổ sung muối

Để điều chế thể tiếp hợp của insulin-PEG-mảnh Fc globulin miễn dịch, insulin được peg hóa một lần được điều chế bằng phương pháp của Ví dụ 1 và mảnh Fc globulin miễn dịch được phản ứng với tỷ lệ mol 1:1,2 với tổng mức protein là 20mg/ml ở 25°C trong 13 giờ. Tại thời điểm này, dung dịch phản ứng chứa 100mM HEPES, 22mM kali phosphat, và etanol 10% ở độ pH 8,2, và còn chứa 20mM natri xyanoborohydrit dưới dạng tác nhân khử.

Sau khi hoàn thành phản ứng, dung dịch phản ứng được cho đi qua cột Source 15Q (GE Healthcare) để tách và tinh chế insulin chưa phản ứng, mảnh Fc globulin miễn dịch chưa phản ứng, thể tiếp hợp của insulin-PEG-mảnh Fc globulin miễn dịch, và thể tiếp hợp của mảnh Fc globulin miễn dịch được ngẫu hợp với hai hoặc nhiều insulin được peg hóa một lần (insulin-PEG) bằng cách sử dụng dung dịch đệm Tris-HCl (pH 7,5) và gradien nồng độ NaCl. Về mặt này, lượng tạp chất được nhận diện trên profin (Fig. 1).

Sau đó, Source 15ISO (GE Healthcare) được sử dụng làm cột thứ hai để loại bỏ Fc globulin miễn dịch còn lại bất kỳ và thể tiếp hợp insulin được ngẫu hợp nhiều lần, nhờ đó thu được thể tiếp hợp của insulin-PEG-Fc globulin miễn dịch. Trong trường hợp này, việc rửa giải được thực hiện bằng cách sử dụng gradien nồng độ của amoni sulfat chứa Tris-HCl (pH 7,5). Thể tiếp hợp đã rửa giải của insulin-PEG-Fc globulin miễn dịch được phân tích bằng RP-HPLC và IE-HPLC.

Ví dụ 3: Tăng hiệu suất của phản ứng ngẫu hợp bằng cách bổ sung natri clorua

Để kiểm tra tác dụng của natri clorua đối với hiệu suất của phản ứng ngẫu hợp, insulin được peg hóa một lần được điều chế bằng phương pháp của Ví dụ 1 và mảnh Fc globulin miễn dịch được phản ứng với tỷ lệ mol là 1:1,2 và tổng mức protein là 20mg/ml ở 25°C trong 13 giờ. Tại thời điểm này, dung dịch phản ứng chứa 100mM HEPES, 22mM kali phosphat, và etanol 10% ở độ pH 8,2 kết hợp bổ sung natri clorua đến nồng độ cuối nằm trong khoảng từ 0,5 đến 3,0M, và còn chứa 20mM natri xyanoborohydrit dưới dạng tác nhân khử.

Dung dịch phản ứng được tinh chế và phân tích giống như trong Ví dụ 2. Việc bổ sung natri clorua vào dung dịch ngẫu hợp làm tăng hiệu suất của phản ứng ngẫu hợp so với trường hợp không được bổ sung. Mức tăng này đạt tối đa

khi bổ sung natri clorua với nồng độ cuối là 2,0M (Bảng 1). Kết quả của profin Source 15Q cho thấy rằng tạp chất do bởi phản ứng phụ giảm khi hiệu suất tăng (Fig. 1). Cũng khẳng định được rằng khi phản ứng ngẫu hợp được thực hiện bằng cách bổ sung 2,0M natri clorua, có thể điều chế được thể tiếp hợp của insulin - PEG - Fc globulin miễn dịch có độ tinh khiết cao bằng 95% hoặc cao hơn (Bảng 2). Ngược lại, khi natri clorua được bổ sung ở nồng độ cuối là 3,0M, thì bắt đầu quan sát được hiện tượng kết tụ.

Ví dụ 4: Tăng hiệu suất của phản ứng ngẫu hợp bằng cách bổ sung natri axetat

Để kiểm tra tác dụng của natri axetat đối với hiệu suất của phản ứng ngẫu hợp, insulin được peg hóa một lần được điều chế bằng phương pháp của Ví dụ 1 và mảnh Fc globulin miễn dịch được phản ứng với tỷ lệ mol là 1:1,2 và tổng mức protein là 20mg/ml ở 25°C trong 13 giờ. Tại thời điểm này, dung dịch phản ứng chứa 100mM HEPES, 22mM kali phosphat, và etanol 10% ở độ pH 8,2 kết hợp bổ sung natri axetat đến nồng độ cuối nằm trong khoảng từ 1,5 đến 3,0M, và còn chứa 20mM natri xyanoborohyđrit dưới dạng tác nhân khử.

Dung dịch phản ứng được tinh chế và phân tích giống như trong Ví dụ 2.

Việc bổ sung natri axetat vào dung dịch ngẫu hợp làm tăng hiệu suất của phản ứng ngẫu hợp so với trường hợp không được bổ sung. Mức tăng này đạt tối đa

khi bổ sung natri axetat với nồng độ cuối là 1,5M (Bảng 1). Cũng khẳng định được rằng khi phản ứng ngẫu hợp được thực hiện bằng cách bổ sung 1,5M natri axetat, có thể điều chế được thể tiếp hợp của insulin - PEG - Fc globulin miễn dịch có độ tinh khiết cao bằng 95% hoặc cao hơn (Bảng 2). Ngược lại, khi natri axetat được bổ sung ở nồng độ cuối là 2,5M hoặc cao hơn, thì khó tính toán được hiệu suất do bởi hiện tượng kết tụ.

Ví dụ 5: Tăng hiệu suất của phản ứng ngẫu hợp bằng cách bổ sung natri sulfat

Để kiểm tra tác dụng của natri sulfat đối với hiệu suất của phản ứng ngẫu hợp, insulin được peg hóa một lần được điều chế bằng phương pháp của Ví dụ 1 và mảnh Fc globulin miễn dịch được phản ứng với tỷ lệ mol là 1:1,2 và tổng mức protein là 20mg/ml ở 25°C trong 13 giờ. Tại thời điểm này, dung dịch phản ứng chứa 100mM HEPES, 22mM kali phosphat, và etanol 10% ở độ pH 8,2 kết hợp bổ sung natri sulfat đến nồng độ cuối nằm trong khoảng từ 0,4 đến 0,7M, và còn chứa 20mM natri xyanoborohydrit dưới dạng tác nhân khử.

Dung dịch phản ứng được tinh chế và phân tích giống như trong Ví dụ 2.

Việc bổ sung natri sulfat vào dung dịch ngẫu hợp làm tăng hiệu suất của phản ứng ngẫu hợp so với trường hợp không được bổ sung. Mức tăng này đạt tối đa khi bổ sung natri sulfat với nồng độ cuối là 0,4M (Bảng 1). Khi natri sulfat

được bổ sung ở nồng độ cuối là 0,5M, thì bắt đầu quan sát được hiện tượng kết tụ. Khi natri sulfat được bổ sung ở nồng độ cuối là 0,7M hoặc cao hơn, thì khó tính toán được hiệu suất do bởi hiện tượng kết tụ.

Ví dụ 6: Tăng hiệu suất của phản ứng ngẫu hợp bằng cách bổ sung natri phosphat

Để kiểm tra tác dụng của natri phosphat đối với hiệu suất của phản ứng ngẫu hợp, insulin được peg hóa một lần được điều chế bằng phương pháp của Ví dụ 1 và mảnh Fc globulin miễn dịch được phản ứng với tỷ lệ mol là 1:1,2 và tổng mức protein là 20mg/ml ở 25°C trong 13 giờ. Tại thời điểm này, dung dịch phản ứng chứa 100mM HEPES, 22mM kali phosphat, và etanol 10% ở độ pH 8,2 kết hợp bổ sung natri phosphat đến nồng độ cuối nằm trong khoảng từ 0,4 đến 0,8M, và còn chứa 20mM natri xyanoborohydrit dưới dạng tác nhân khử.

Dung dịch phản ứng được tinh chế và phân tích giống như trong Ví dụ 2. Việc bổ sung natri phosphat vào dung dịch ngẫu hợp làm tăng hiệu suất của phản ứng ngẫu hợp so với trường hợp không được bổ sung. Mức tăng này đạt tối đa khi bổ sung natri phosphat với nồng độ cuối là 0,4 M (Bảng 1). Ngược lại, khi natri phosphat được bổ sung ở nồng độ cuối là 0,6 M, thì bắt đầu quan

sát được hiện tượng kết tụ. Khi natri sulfat được bổ sung ở nồng độ cuối là 0,8M, thì khó tính toán được hiệu suất do bởi hiện tượng kết tụ.

Ví dụ 7: Tăng hiệu suất của phản ứng ngẫu hợp bằng cách bổ sung kali clorua

Để kiểm tra tác dụng của kali clorua đối với hiệu suất của phản ứng ngẫu hợp, insulin được peg hóa một lần được điều chế bằng phương pháp của Ví dụ 1 và mảnh Fc globulin miễn dịch được phản ứng với tỷ lệ mol là 1:1,2 và tổng mức protein là 20mg/ml ở 25°C trong 13 giờ. Tại thời điểm này, dung dịch phản ứng chứa 100mM HEPES, 22mM kali phosphat, và etanol 10% ở độ pH 8,2 kết hợp bổ sung kali clorua đến nồng độ cuối nằm trong khoảng từ 0,5 đến 1,0M, và còn chứa 20mM natri xyanoborohydrit dưới dạng tác nhân khử.

Dung dịch phản ứng được tinh chế và phân tích giống như trong Ví dụ 2.

Việc bổ sung kali clorua vào dung dịch ngẫu hợp làm tăng hiệu suất của phản ứng ngẫu hợp so với trường hợp không được bổ sung. Mức tăng này đạt tối đa khi bổ sung kali clorua với nồng độ cuối là 1,0M (Bảng 1).

Bảng 1 dưới đây thể hiện hiệu suất của phản ứng ngẫu hợp và tổng hiệu suất theo dạng muối và nồng độ của muối trong phản ứng ngẫu hợp trong quá trình điều chế thể tiếp hợp bao gồm insulin và mảnh Fc globulin miễn dịch.

[Bảng 1]

Dạng muối	Nồng độ (M)	Mức độ kết tụ được kiểm tra bằng trực quan	Hiệu suất của phản ứng ngẫu hợp (%)	Tổng hiệu suất (%)
Trường hợp không được bổ sung (nhóm đối chứng)	-	-	32,3	16,2
Natri clorua	0,5	-	35,7	17,9
	1,0	-	39,2	19,7
	1,5	-	41,2	20,6
	2,0	-	42,2	21,2
	2,5	-	39,8	20,0
	3,0	+	37,0	18,9
Natri axetat	1,5	-	43,4	21,7
	2,0	-	39,2	19,7
	2,5	+++	-	
	3,0	++++	-	
Natri sulfat	0,4	-	36,3	18,2
	0,5	+	43,5	21,8
	0,6	+	42,1	21,1
	0,7	+++	-	
Natri phosphat	0,4	-	40,7	20,4
	0,6	++	39,2	19,7
	0,8	+++	-	
Kali clorua	0,5	-	35,2	17,6
	1,0	-	35,8	17,9

-: không có hiện tượng kết tụ, +: lượng rất nhỏ, ++; lượng nhỏ, +++; lượng rất

lớn, ++++; kết tụ hoàn toàn

Như được thể hiện trong Bảng 1, các nhóm được bổ sung muối có hiệu suất của phản ứng ngẫu hợp tăng từ 32,3% đến trong khoảng từ 35,2% đến 43,5% và tổng hiệu suất tăng từ 16,2% đến trong khoảng từ 17,6% đến 21,8%, so với nhóm đối chứng không được bổ sung muối, mặc dù tỷ lệ tăng này là khác nhau tùy thuộc vào dạng muối và nồng độ muối. Tỷ lệ thay đổi của chúng theo hiệu suất của nhóm đối chứng không được bổ sung muối được chuyển đổi, và tỷ lệ thay đổi của hiệu suất của phản ứng ngẫu hợp và tổng hiệu suất cao bằng từ 9 đến 35%.

Bảng 2 dưới đây thể hiện độ tinh khiết của thể tiếp hợp cuối được điều chế bằng cách bổ sung 2,0M natri clorua hoặc 1,5M natri axetat vào dung dịch phản ứng ngẫu hợp trong quá trình điều chế thể tiếp hợp bao gồm insulin và mảnh Fc globulin miễn dịch. Độ tinh khiết được kiểm tra hai lần bằng cách phân tích HPLC bao gồm sắc ký loại trừ kích cỡ (dưới đây được dùng để chỉ SE) và sắc ký trao đổi ion (dưới đây được dùng để chỉ IE).

[Bảng 2]

Muối	Kết quả phân tích HPLC về độ tinh khiết của thể tiếp hợp
2,0M natri phosphat	SE 98,1%, IE 98,5%
1,5M natri axetat	SE 96,2%, IE 96,9%

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp điều chế thể tiếp hợp chứa polypeptit có hoạt tính sinh lý - polyme không phải peptit - vùng hằng định globulin miễn dịch, bao gồm các bước:

(1) cho polyme không phải peptit phản ứng với một trong số polypeptit có hoạt tính sinh lý hoặc vùng hằng định globulin miễn dịch để tạo ra phức hợp của polypeptit có hoạt tính sinh lý - polyme không phải peptit hoặc phức hợp của vùng hằng định globulin miễn dịch - polyme không phải peptit; và

(2) cho phức hợp của polypeptit có hoạt tính sinh lý - polyme không phải peptit hoặc phức hợp của vùng hằng định globulin miễn dịch - polyme không phải peptit thu được ở bước (1) phản ứng với polypeptit có hoạt tính sinh lý hoặc vùng hằng định globulin miễn dịch còn lại với sự có mặt của muối để tạo ra thể tiếp hợp chứa polypeptit có hoạt tính sinh lý - polyme không phải peptit - vùng hằng định globulin miễn dịch;

trong đó:

polyme không phải peptit được chọn từ nhóm bao gồm polyetylen glycol, polypropylen glycol, copolyme của etylen glycol và propylen glycol, rượu polyhydric được polyoxyetyl hóa, rượu polyvinyllic, polysacarit, dextran,

polyvinyl etyl ete, axit polylactic (PLA), axit polylactic-glycolic (PLGA), polyme lipit, chitin, axit hyaluronic, và hỗn hợp của chúng;

muối được chọn từ nhóm bao gồm natri clorua, natri axetat, natri sulfat, natri phosphat, natri cacbonat, natri xyanua, natri xitrat, natri nitrat, kali clorua, kali axetat, kali sulfat, kali phosphat, kali cacbonat, kali xyanua, kali xitrat, kali nitrat, magie clorua, magie axetat, magie sulfat, magie phosphat, magie cacbonat, magie xyanua, magie xitrat, magie nitrat, amoni clorua, amoni axetat, amoni sulfat, amoni phosphat, amoni cacbonat, amoni xyanua, amoni xitrat, amoni nitrat, canxi clorua, canxi axetat, canxi sulfat, canxi phosphat, canxi cacbonat, canxi xyanua, canxi xitrat, và canxi nitrat; và

muối được bổ sung ở nồng độ cuối nằm trong khoảng từ 0,1 đến 3,0 M.

2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó polyme không phải peptit có mỗi nhóm chức độc lập được chọn từ nhóm bao gồm dẫn xuất aldehyt, dẫn xuất maleimit và dẫn xuất succinimit ở cả hai đầu của nó, tùy ý trong đó polyme không phải peptit được liên kết với polypeptit có hoạt tính sinh lý và vùng hằng định globulin miễn dịch bằng các nhóm chức ở cả hai đầu của nó để tạo ra liên kết cộng hóa trị.

3. Phương pháp theo điểm 1, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước tách phức hợp của polypeptit có hoạt tính sinh lý - polyme không phải peptit hoặc phức hợp của vùng hằng định globulin miễn dịch - polyme không phải peptit ra khỏi hỗn hợp phản ứng sau bước (1).

4. Phương pháp theo điểm 1, trong đó muối được chọn từ nhóm bao gồm natri clorua, natri axetat, natri sulfat, natri phosphat và kali clorua, tùy ý trong đó nếu muối là natri clorua, thì muối này được bổ sung ở nồng độ cuối thấp hơn 3,0M, nếu muối là natri axetat, thì muối này được bổ sung ở nồng độ cuối thấp hơn 2,5M, nếu muối là natri sulfat, thì muối này được bổ sung ở nồng độ cuối thấp hơn 0,7M, nếu muối là natri phosphat, thì muối này được bổ sung ở nồng độ cuối thấp hơn 0,8M, hoặc nếu muối là kali clorua, thì muối này được bổ sung ở nồng độ cuối là 1,0M hoặc thấp hơn.

5. Phương pháp theo điểm 1, trong đó muối này được bổ sung ở nồng độ cuối nằm trong khoảng từ 0,3M đến 2,5M.

6. Phương pháp theo điểm 1, trong đó thời gian phản ứng của bước (2) nằm trong khoảng từ 4 đến 18 giờ, tùy ý trong đó nhiệt độ phản ứng của bước (2) nằm trong khoảng từ 0°C đến 25°C.

7. Phương pháp theo điểm 2, trong đó nếu polyme không phải peptit có nhóm chức là một hoặc nhiều dẫn xuất aldehyt, thì hỗn hợp phản ứng còn chứa tác nhân khử ở nồng độ cuối nằm trong khoảng từ 1 đến 100mM.

8. Phương pháp theo điểm 1, trong đó bước (1) được thực hiện ở độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 6,5 và bước (2) được thực hiện ở độ pH nằm trong khoảng từ 6,0 đến 8,5.

9. Phương pháp theo điểm 1, trong đó polyme không phải peptit phản ứng với polypeptit có hoạt tính sinh lý ở bước (1), và phức hợp của polypeptit có hoạt tính sinh lý - polyme không phải peptit thu được từ bước (1) phản ứng với vùng hằng định globulin miễn dịch ở bước (2).

10. Phương pháp theo điểm 9, trong đó polypeptit có hoạt tính sinh lý và polyme không phải peptit phản ứng với nhau với tỷ lệ mol nằm trong khoảng từ 1:1 đến 1:20 ở bước (1), và sản phẩm của bước (1) và vùng hằng định globulin miễn dịch phản ứng với nhau với tỷ lệ mol nằm trong khoảng từ 1:0,5 đến 1:10 ở bước (2),

tùy ý trong đó bước (2) được thực hiện với sự có mặt của natri clorua được bổ sung ở nồng độ cuối thấp hơn 3,0M, natri axetat được bổ sung ở nồng độ cuối thấp hơn 2,5M, natri sulfat được bổ sung ở nồng độ cuối thấp hơn 0,7M, natri

phosphat được bổ sung ở nồng độ cuối thấp hơn 0,8M, hoặc kali clorua được bổ sung ở nồng độ cuối là 1,0M hoặc thấp hơn.

11. Phương pháp theo điểm 1, trong đó các nhóm chức của polyme không phải peptit được liên kết với nhóm amin có mặt ở đầu tận cùng N hoặc trên mạch bên của gốc Lys của polypeptit có hoạt tính sinh lý và vùng hằng định globulin miễn dịch.

12. Phương pháp theo điểm 1, trong đó polyme không phải peptit là polyetylen glycol, tùy ý trong đó polyme không phải peptit có khối lượng phân tử nằm trong khoảng từ 1 đến 100 kDa.

13. Phương pháp theo điểm 1, trong đó vùng hằng định globulin miễn dịch là vùng không được glycosyl hóa.

14. Phương pháp theo điểm 1, trong đó vùng hằng định globulin miễn dịch bao gồm từ một đến bốn miền được chọn từ nhóm bao gồm miền CH1, CH2, CH3 và CH4, tùy ý trong đó vùng hằng định globulin miễn dịch còn bao gồm vùng bản lề.

15. Phương pháp theo điểm 1, trong đó vùng hằng định globulin miễn dịch được chọn từ nhóm bao gồm các vùng hằng định có nguồn gốc từ IgG, IgA, IgD, IgE, IgM, tổ hợp của chúng, và thể lai của chúng.

16. Phương pháp theo điểm 1, trong đó vùng hằng định globulin miễn dịch được chọn từ nhóm bao gồm các vùng hằng định của IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, tổ hợp của chúng, và thể lai của chúng,

tùy ý trong đó vùng hằng định globulin miễn dịch là vùng Fc IgG4, và

tùy ý trong đó vùng hằng định globulin miễn dịch là vùng Fc IgG4 của người không được glycosyl hóa.

17. Phương pháp theo điểm 1, trong đó polypeptit có hoạt tính sinh lý được chọn từ nhóm bao gồm hormon sinh trưởng của người, hormon giải phóng hormon sinh trưởng, peptit giải phóng hormon sinh trưởng, interferon, thụ thể interferon, yếu tố kích thích tạo cụm, peptit giống glucagon (GLP-1, v.v.), oxyntomodulin, thụ thể được ngẫu hợp protein G, interleukin, thụ thể interleukin, enzym, protein liên kết interleukin, protein liên kết xytokin, yếu tố hoạt hóa đại thực bào, peptit đại thực bào, các yếu tố tế bào B, các yếu tố tế bào T, protein A, chất ức chế dị ứng, glycoprotein gây hoại tử tế bào, độc tố miễn dịch, độc tố lympho bào, yếu tố gây hoại tử khối u, chất ức chế khối u, yếu tố sinh trưởng chuyển hóa, kháng trypsin alpha-1, albumin, α -lactalbumin, apolipoprotein-E, erythropoietin, erythropoietin được glycosyl hóa, angiopoietin, hemoglobin, thrombin, peptit hoạt hóa thụ thể thrombin,

thrombomodulin, yếu tố máu VII, VIIa, VIII, IX và XIII, chất hoạt hóa plasminogen, peptit gắn kết fibrin, urokinaza, streptokinaza, hirudin, protein C, protein phản ứng C, chất ức chế thận tố, chất ức chế collagenaza, peoxit dismutaza, leptin, yếu tố sinh trưởng có nguồn gốc tiểu cầu, yếu tố sinh trưởng biểu mô, yếu tố sinh trưởng biểu bì, angiostatin, kích thích tố tăng huyết áp, yếu tố sinh trưởng xương, protein kích thích xương, canxitonin, insulin, hormon kiểm soát thể tích máu, yếu tố tạo sụn, elcatonin, yếu tố hoạt hóa mô liên kết, chất ức chế con đường của yếu tố mô, hormon kích thích nang, hormon hoàng thể hóa, hormon giải phóng hormon hoàng thể hóa, yếu tố sinh trưởng thần kinh, hormon tuyến cận giáp, relaxin, secretin, hormon kích thích sự phát triển của xương và cơ bắp, yếu tố sinh trưởng giống insulin, hormon vỏ tuyến thượng thận, glucagon, colexystokinin, polypeptit tụy, peptit giải phóng gastrin, yếu tố giải phóng hormon tuyến yên, hormon kích thích tuyến giáp, autotaxin, lactoferrin, myostatin, kháng nguyên bề mặt tế bào, kháng nguyên vắc-xin có nguồn gốc virus, kháng thể đơn dòng, kháng thể đa dòng, và các mảnh kháng thể,

tùy ý trong đó polypeptit có hoạt tính sinh lý là insulin.

18. Phương pháp theo điểm 1, trong đó ở bước (1), polypeptit có hoạt tính sinh lý và polyme không phải peptit phản ứng với nhau với tỷ lệ mol nằm trong khoảng từ 1:1 đến 1:20 trong điều kiện pH từ 5,0 đến 6,5, và ở bước (2), hỗn hợp phản ứng thu được từ bước (1) và vùng hằng định globulin miễn dịch phản ứng với nhau với tỷ lệ mol nằm trong khoảng từ 1:0,5 đến 1:10 trong điều kiện pH từ 6,0 đến 8,5 với sự có mặt của muối, và nếu muối là natri clorua, thì muối này có thể được bổ sung ở nồng độ cuối thấp hơn 3,0M, nếu muối là natri axetat, thì muối này có thể được bổ sung ở nồng độ cuối thấp hơn 2,5M, nếu muối là natri sulfat, thì muối này có thể được bổ sung ở nồng độ cuối thấp hơn 0,7M, nếu muối là natri phosphat, thì muối này có thể được bổ sung ở nồng độ cuối thấp hơn 0,8M, hoặc nếu muối là kali clorua, thì muối này có thể được bổ sung ở nồng độ cuối là 1,0M hoặc thấp hơn.

19. Phương pháp theo điểm 1, trong đó polypeptit có hoạt tính sinh lý là insulin và polyme không phải peptit là polyetylen glycol.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> HANMI PHARM. CO., LTD.

<120> Phương pháp điều chế thể tiếp hợp polypeptit có hoạt tính
sinh lý

<130> OPA14034-TW

<150> KR 10-2013-0023602

<151> 2013-03-05

<160> 2

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 21

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu

1 5 10 15

Glu Asn Tyr Cys Asn

20

<210> 2

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr

1

5

10

15

Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr

20

25

30

Fig. 1

Fc globulin miễn dịch chưa phản ứng

