



(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)



1-0026171

(51)

(13) B

(21) 1-2015-02918

(22) 05/03/2004

(62) 1-2010-00297

(86) PCT/US2004/006656 05/03/2004

(87) WO 2004/078140 A2 16/09/2004

(30) 60/452,360 05/03/2003 US

(45) 25/11/2020 392

(43) 27/12/2010 273A

(73) HALOZYME, INC. (US)

11388 Sorrento Valley Road San Diego, CA 92121, United States of America

(72) BOOKBINDER, Luis, H. (US).

(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) PHÂN TỬ AXIT NUCLEIC MÃ HÓA POLYPEPTIT HYALURONIDAZA ĐƯỢC CẮT CỤT Ở ĐẦU TẬN CÙNG C, PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT, VECTƠ VÀ TẾ BÀO PHÂN LẬP ĐƯỢC CHỨA PHÂN TỬ AXIT NUCLEIC NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến polypeptit hyaluronidaza (sHASEGP) gần như tinh khiết, hoà tan, có hoạt tính trung hoà. Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp sản xuất hợp chất này để sử dụng làm giảm các tình trạng bệnh lý liên quan đến glycosaminoglycan. Sáng chế cũng đề cập đến các dược phẩm thích hợp chứa polypeptit sHASEGP tái tổ hợp gần như tinh khiết thu được từ các tế bào nhân chuẩn có khả năng tạo ra quá trình glycosyl hoá thích hợp cần thiết cho hoạt tính tối ưu của nó. Sáng chế còn đề cập đến phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit hyaluronidaza được cắt cụt ở đầu tận cùng C, trong đó polypeptit được mã hóa này chứa trình tự axit amin có tỷ lệ tương đồng trình tự ít nhất 98% với trình tự axit amin được chỉ ra là các axit amin 1-448 của SEQ ID NO:4. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến vectơ và tế bào được phân lập chứa phân tử axit nucleic này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập chung đến glycoprotein hyaluronidaza (sHASEGP) hoà tan, có hoạt tính trung hoà, các phần của chúng, cụ thể là các vùng hyaluronidaza. Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến các cải biến hoá học, được phẩm, plasmit biểu hiện, phương pháp sản xuất và phương pháp chữa bệnh bằng cách sử dụng glycoprotein hyaluronidaza (sHASEGP) và các vùng của nó và các phân tử axit nucleic mã hoá glycosaminoglycan cải biến có tác dụng chữa bệnh nhằm để điều trị bệnh và việc sử dụng nó để làm gia tăng khả năng khuếch tán của các phân tử có đường kính nhỏ hơn 200 nanomet khi được tiêm vào cơ thể động vật.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Glycosaminoglycan (GAG) là các polysacarit mạch thẳng dạng phức của phần chất nền ngoại bào (extracellular matrix-ECM). GAG được đặc trưng bởi các cấu trúc disacarit lặp của hexosamin được thế ở vị trí N và axit uronic, [hyaluronan (HA), chondroitin sulfat (CS), chondroitin (C), dermatan sulfat (DS), heparan sulfat (HS), heparin (H)], hoặc galactosa, [keratan sulfat (KS)]. Ngoại trừ HA, còn lại tất cả đều có liên kết đồng hoá trị với protein nhân. Các GAG với các protein nhân của chúng về mặt cấu trúc được gọi là các proteoglycan (PG).

Hyaluronan (HA) được phát hiện ở cơ thể động vật có vú chủ yếu trong các mô liên kết, da, sụn, và trong hoạt dịch. Hyaluronan cũng là thành phần chủ yếu của thủy tinh thể trong mắt. Trong mô liên kết, sự hydrat hoá nước kết hợp với hyaluronan tạo ra khoảng không giữa các mô, vì vậy tạo ra một môi trường dẫn truyền sự chuyển động tế bào và tăng sinh tế bào. Hyaluronan đóng vai trò quan trọng trong hiện tượng sinh học liên quan đến sự chuyển động tế bào, bao gồm sự phát triển nhanh, tái sinh, sửa chữa, phát sinh phôi, phát triển phôi sinh học, làm lành vết thương, hình thành mạch máu và tạo u (Toole 1991 Cell Biol. Extracell. Matrix, Hay (ed), Plenum Press, New York, 1384-1386; Bertrand et al. 1992 Int. J. Cancer 52:1-6; Knudson et al, 1993 FASEB J. 7: 1233-1241). Ngoài ra, các mức hyaluronan cũng liên quan đến sự tấn

công của khối u (Ozello et al. 1960 Cancer Res. 20: 600-604; Takeuchi et al. 1976, Cancer Res. 36: 2133-2139; Kimata et al. 1983 Cancer Res. 43: 1347-1354).

HA được phát hiện trong chất nền ngoại bào của nhiều tế bào, đặc biệt là trong các mô liên kết mềm. HA được chỉ định thực hiện nhiều chức năng sinh lý khác nhau như nội cân bằng giữa protein sinh chất và nước (Laurent TC et al (1992) FASEB J 6: 2397-2404). Việc sản xuất HA gia tăng trong các tế bào tăng sinh và có thể đóng vai trò trong sự gián phân. HA cũng được ngụ ý liên quan đến sự di bào và di chuyển tế bào. HA dường như đóng vai trò quan trọng trong sự điều tiết, phát triển và biệt hoá tế bào (Laurent et al., nêu trên).

HA đã và đang được sử dụng trong điều trị lâm sàng. Các tính chất bảo vệ mô và lưu biến học của HA được chứng tỏ là hữu hiệu trong điều trị phẫu thuật mắt để bảo vệ màng trong giác mạc. HA trong huyết thanh được dùng để chẩn đoán bệnh gan và các tình trạng viêm khác nhau, như bệnh viêm khớp dạng thấp. Chứng phù thũng mô kẽ do tích lũy HA có thể gây ra rối loạn chức năng ở nhiều cơ quan khác nhau (Laurent et al., nêu trên).

Sự tương tác của protein hyaluronan cũng liên quan đến cấu trúc của cơ chất ngoại bào hoặc “chất nền”.

Hyaluronidaza là nhóm bao gồm các enzym có hoạt tính axit hoặc hoạt tính trung hoà được phát hiện trong nhiều loài động vật. Hyaluronidaza khác nhau về tính đặc hiệu cơ chất và cơ chế tác động.

Có ba loại hyaluronidaza thông thường:

1. Hyaluronidaza của loại động vật có vú, (EC 3.2.1.35) mà là endo-beta-N-acetylhexosaminidaza với các tetrasacarit và hexasacarit là các sản phẩm chính cuối cùng. Chúng có hoạt tính thủy phân và hoạt tính transglycosidaza và có thể làm thoái biến hyaluronan và chondroitin sulfat (CS), cụ thể là C4-S và C6-S.

2. Hyaluronidaza của vi khuẩn (EC 4.2.99.1) làm thoái biến hyaluronan và làm thoái biến CS và DS với mức độ khác nhau. Chúng là endo-beta-N-acetylhexosaminidaza hoạt động bằng phản ứng loại bỏ beta để thu được sản phẩm cuối cùng chủ yếu là disacarit.

3. Hyaluronidaza (EC 3.2.1.36) thu được từ đĩa, động vật ký sinh và động vật giáp xác là các endo-beta-glucuronidaza mà tạo ra các sản phẩm cuối cùng là tetrasacarit và hexasacarit thông qua quá trình thủy phân qua liên kết 1-3 beta.

Hyaluronidaza của động vật có vú còn được chia tiếp thành hai nhóm bao gồm các enzym có hoạt tính axit và các enzym có hoạt tính trung hoà. Có sáu gen tương tự hyaluronidaza trong hệ gen của người là HYAL1, HYAL2, HYAL3, HYAL4, HYALP1 và PH20/SPAM1. HYALP1 là gen giả và HYAL3 không được thể hiện có hoạt tính enzym đối với cơ chất bất kỳ đã biết. HYAL4 là chondroitinaza và không có hoạt tính enzym đối với hyaluronan. HYAL1 là enzym có hoạt tính axit kiểu nguyên thủy và PH20 là enzym có hoạt tính trung hoà kiểu nguyên thủy. Hyaluronidaza có hoạt tính axit như HYAL1 và HYAL2 không có hoạt tính xúc tác ở độ pH trung tính. Ví dụ, HYAL1 không có hoạt tính xúc tác *in vitro* ở trên độ pH=4,5 (Frost et al *Anal Biochemistry*, 1997). HYAL2 là enzym có hoạt tính axit với hoạt tính đặc hiệu rất thấp *in vitro*.

Các enzym tương tự hyaluronidaza cũng được đặc trưng bởi các enzym này bị gắn với màng sinh chất thông qua móc bám glycosylphosphatidyl inositol như HYAL2 của người và PH20 của người (Danilkovitch-Miagkova, et al. Proc Natl Acad Sci USA. 2003 Apr15; 100 (8): 4580-5, Phelps et al., Science 1988) và các enzym này hoà tan được như HYAL1 của người (Frost et al, *Biochem Biophys Res Commun*. 1997 Jul 9; 236(1): 10-5). Tuy nhiên, có các biến thể giữa loài này so với loài khác, ví dụ, PH20 của bò được gắn rất lỏng lẻo với màng sinh chất và không có móc bám thông qua móc bám nhạy cảm phospholipaza (Lalancette et al, Biol Reprod. 2001 Aug; 65(2):628-36). Đặc điểm duy nhất của hyaluronidaza của bò là cho phép sử dụng enzym hyaluronidaza hoà tan của bò làm dịch chiết để sử dụng trong lâm sàng (Wydase®, Hyalase®). Các loại PH20 khác là các enzym dạng lỏng không có khả năng hoà tan khi không sử dụng các chất tẩy rửa hoặc các lipaza. Ví dụ, PH20 của người được bám với màng sinh chất thông qua móc bám GPI. Những cố gắng tạo cấu trúc ADN của PH20 của người mà không cần móc bám lipid vào trong polypeptit này làm cho các enzym không có hoạt tính xúc tác, hoặc enzym không hoà tan (Arming et al *Eur J Biochem*. 1997 Aug 1;247(3):810-4). Hyaluronidaza trong tinh dịch của khỉ Camara trong tự nhiên được phát hiện ở hai dạng là dạng liên kết với màng và dạng hoà tan. Trong khi dạng liên kết với màng có kích thước 64KDa có hoạt tính enzym ở độ

pH=7,0, dạng có kích thước 54kDa chỉ có hoạt tính ở độ pH=4,0 (Cherr et al, Dev Biol. 1996 Apr 10; 175(1):142-53). Vì vậy, dạng hoà tan của PH20 thường không có hoạt tính enzym trong các điều kiện trung tính.

Chondroitinaza là enzym được phát hiện trong nhiều loài động vật. Các enzym này làm thoái biến glycosaminoglycan thông qua phản ứng endoglycosidaza. Các ví dụ cụ thể về chondroitinaza đã biết bao gồm Chondroitinaza ABC (thu được từ *Proteus vulgaris*; Công bố đơn yêu cầu cấp patent Nhật số 6-153947, T. Yamagata, H. Saito, O. Habuchi, and S. Suzuki, J. Biol. Chem., 243, 1523 (1968), S. Suzuki, H. Saito, T. Yamagata, K. Anno, N. Seno, Y. Kawai, and T. Furuhashi, J. Biol. Chem., 243, 1543 (1968)), Chondroitinaza AC (thu được từ *Flavobacterium heparinum*; T. Yamagata, H. Saito, O. Habuchi, and S. Suzuki, J. Biol. Chem., 243, 1523 (1968)), Chondroitinaza AC II (thu được từ *Arthrobacter aurescens*; K. Hiyama, and S. Okada, J. Biol. Chem., 250, 1824 (1975), K. Hiyama and S. Okada, J. Biochem. (Tokyo), 80, 1201 (1976)), Hyaluronidaza AC III (thu được từ *Flavobacterium* sp. Hp102; Hirofumi Miyazono, Hiroshi Kikuchi, Keiichi Yoshida, Kiyoshi Morikawa, and Kiyochika Tokuyasu, Seikagaku, 61, 1023 (1989)), Chondroitinaza B (thu được từ *Flavobacterium heparinum*; Y. M. Michelacci and C. P. Dietrich, Biochem. Biophys. Res. Commun., 56, 973 (1974), Y. M. Michelacci and C. P. Dietrich, Biochem. J., 151, 121 (1975), Kenichi Maeyama, Akira Tawada, Akido Ueno, and Keiichi Yoshida, Seikagaku, 57, 1189 (1985)), Chondroitinaza C (thu được từ *Flavobacterium* sp. Hp102; Hirofumi Miyazono, Hiroshi Kikuchi, Keiichi Yoshida, Kiyoshi Morikawa, and Kiyochika Tokuyasu, Seikagaku, 61, 1023 (1989)), và các enzym tương tự.

Các glycoprotein bao gồm chuỗi polypeptit được liên kết đồng hoá trị với một hoặc nhiều gốc hydrat cacbon. Nói chung, có hai loại glycoprotein có hydrat cacbon được kết hợp với protein cấu trúc của chúng thông qua mỗi liên kết N-glycosidic hoặc O-glycosidic. Các glycan liên kết ở vị trí N và O được gắn với các polypeptit lần lượt thông qua mỗi liên kết asparin-N-acetyl-D-glucosamin và serin (treonin)-N-acetyl-D-galactosamin. Các oligosacarit phức liên kết ở vị trí N không chứa gốc manosa ở đầu tận cùng. Chúng chỉ chứa các gốc N-acetylglucosamin, galactosa, và/hoặc axit sialic ở đầu tận cùng. Các oligosacarit lai chứa các gốc manosa ở đầu tận cùng cũng như các gốc N-acetylglucosamin, galactosa, và/hoặc axit sialic ở đầu tận cùng.

Cùng với các glycoprotein liên kết ở vị trí N, tiền chất oligosacarit được liên kết với nhóm amino của asparin trong quá trình tổng hợp peptit trong thể lưới nội chất. Sau đó, gốc oligosacarit được xử lý liên tiếp bằng một loạt enzym đặc hiệu nhằm loại bỏ và thêm vào các gốc đường. Quá trình này xảy ra trong thể lưới nội chất và sau đó tiếp tục đi qua vùng cis, vùng giữa và vùng trans của thể Golgi.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất các thành viên của họ glycoprotein hyaluronidaza hoà tan có hoạt tính trung hoà, cụ thể là glycoprotein hyaluronidaza PH-20 hoà tan của người (cũng được gọi ở đây là sHASEGP). sHASEGP được bộc lộ ở đây được gọi là thành viên của họ sHASEGP, ở đây được gọi là sHASEGP. Sáng chế cũng đề xuất vùng hyaluronidaza hoà tan và việc sử dụng chúng.

Sáng chế dựa trên sự phát hiện ra rằng hoạt tính hyaluronidaza hoà tan, có hoạt tính trung hoà có thể được tạo ra với hiệu suất cao trong hệ thống biểu hiện của động vật có vú bằng cách đưa các axit nucleic không có vùng kẹp mã hoá các axit amin vào đầu tận cùng carboxy của cADN của PH-20 của người. Các cải biến bổ sung của sHASEGP để tăng cường quá trình tiết bằng cách sử dụng các peptit dẫn đầu không tự nhiên cũng được đề xuất. Sáng chế cũng đề xuất phương pháp cải biến sHASEGP để kéo dài thời gian bán thải của nó bằng cách che khuất protein này bằng polyetylen glycol và các cải biến sau dịch mã đối với sự glycosyl hoá tự nhiên. Những nỗ lực trước đây nhằm tạo ra sHASEGP của người có hoạt tính trung hoà được tiết ra đã không thành công. Kết luận là việc cắt đứt polypeptit sHASEGP của người dẫn đến làm mất hoạt tính của enzym trung hoà và làm cho tế bào không có khả năng tiết protein tái tổ hợp trong hệ thống biểu hiện của động vật có vú (Arming, et al Eur J Biochem 1997 Aug 1;247 (3):810-4). Điều quan trọng là tạo ra sHASEGP được tiết có hoạt tính trung hoà để sản xuất thương mại và hữu hiệu để chữa bệnh dưới dạng hyaluronidaza. Sáng chế được bộc lộ ở đây khắc phục được các vấn đề nêu trên.

Sáng chế còn đề xuất đến glycoprotein sHASEGP của người có hoạt tính xúc tác, trong đó sHASEGP này có ít nhất một gốc đường liên kết ở vị trí N. Các nghiên cứu ở đây chứng tỏ rằng PH20 của người đòi hỏi glycan liên kết ở vị trí N để có hoạt tính xúc tác, trong khi đó hyaluronidaza của bò và nọc ong vẫn có hoạt tính mà không cần glycan liên kết ở vị trí N. Vùng hyaluronidaza của người không có gốc liên kết ở

vị trí N không có hoạt tính xúc tác. Vì vậy, kỹ thuật ADN tái tổ hợp kinh điển không cho phép sản xuất sHASEGP của người có hoạt tính xúc tác, không giống với HASEGP của nọc ong có thể được tạo ra trong vi khuẩn *E. coli*.

Sáng chế đề xuất phương pháp và tế bào để tạo ra polypeptit của glycoprotein sHASEGP liên kết ở vị trí N bằng cách sử dụng tế bào có khả năng đưa các gốc đường liên kết ở vị trí N hoặc bằng cách đưa các gốc liên kết ở vị trí N vào polypeptit sHASEGP. Sáng chế cũng đề xuất phương pháp nhận biết sHASEGP được glycosyl hoá thích hợp.

Các glycoprotein sHASEGP được siêu sialat hóa có hoạt tính xúc tác cũng được đề xuất. sHASEGP được siêu sialat hoá có thời gian bán thải trong huyết thanh lớn hơn so với sHASEGP tinh hoàn của bò và cừu không được sialat hoá xuất hiện tự nhiên, và vì vậy là tốt hơn cho sự ổn định enzym và việc sử dụng làm dược chất dùng qua đường tĩnh mạch. Sáng chế cũng đề xuất phương pháp điều chế sHASEGP được siêu sialat hoá, dược phẩm và việc sử dụng chúng.

Các protein được mã hoá bởi các biến thể ghép của sHASEGP không có móc bám GPI tự nhiên cũng được đề xuất.

Sáng chế còn đề xuất đến các chế phẩm chứa sHASEGP chứa glycoprotein sHASEGP hoà tan và ion kim loại, trong đó ion kim loại này là canxi, magie hoặc natri. sHASEGP có hoạt tính tối ưu khi có mặt kim loại này. Chế phẩm chứa sHASEGP với sự có mặt của ion kim loại này cũng được đề xuất.

Các cải biến của sHASEGP để kéo dài hơn thời gian bán thải cũng được đề xuất. Các cải biến hoá học của sHASEGP với các polyme như polyetylen glycol và dextran được đề xuất. Các cải biến này ngăn không cho sHASEGP bị loại bỏ khỏi hệ tuần hoàn và hệ miễn dịch cũng như glycosyl hoá các thụ thể đối với mannoza và asialoglycoprotein. Sáng chế cũng đề xuất phương pháp liên kết các nhóm chức đặc hiệu như các vị trí glycosyl hoá, các cystein và các axit amin có điện tích dương.

Các thử nghiệm để nhận biết các chất tác động như các hợp chất, bao gồm các phân tử nhỏ và các điều kiện như độ pH, nhiệt độ và cường độ ion để điều biến sự hoạt hoá, biểu hiện hoặc hoạt tính của sHASEGP cũng được đề xuất ở đây. Trong các thử nghiệm làm ví dụ, tác dụng của các hợp chất thử nghiệm lên khả năng của vùng hyaluronidaza của sHASEGP trong việc phân cắt cơ chất đã biết, thường là

glycosaminoglycan hoặc proteoglycan được đánh giá. Các tác nhân, thường là các hợp chất, cụ thể là các phân tử nhỏ mà điều biến hoạt tính của vùng hyaluronidaza là các hợp chất ứng viên để điều biến hoạt tính của sHASEGP. Các vùng hyaluronidaza cũng có thể được sử dụng để tạo ra các kháng thể đặc hiệu hyaluronidaza có hoạt tính làm rối loạn chức năng. Các vùng hyaluronidaza được đề xuất ở đây bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, vùng glycosyl-hydrolaza ở đầu tận cùng N với các phần ở đầu tận cùng C bị cắt cụt của nó biểu hiện hoạt tính xúc tác in vitro.

Các phân tử axit nucleic mã hoá các protein và các vùng hyaluronidaza cũng được đề xuất. Các phân tử axit nucleic mã hoá vùng hyaluronidaza hoà tan hoặc các phần có hoạt tính xúc tác của nó và cả các phân tử axit nucleic mã hoá sHASEGP có độ dài đầy đủ được đề xuất. Axit nucleic mã hoá vùng hyaluronidaza và axit nucleic xuôi dòng được thể hiện trong SEQ ID NO: 6; và vùng hyaluronidaza này của sHASEGP được thể hiện trong SEQ ID NO: 1 (axit amin từ 35-464). Trình tự protein và trình tự axit nucleic mã hoá sHASEGP có độ dài đầy đủ được thể hiện trong SEQ ID NO: 1 và 6.

Sáng chế cũng đề xuất các phân tử axit nucleic mà lai với axit nucleic mã hoá sHASEGP này dọc theo độ dài đầy đủ của nó hoặc dọc theo ít nhất là 70%, 80% hoặc 90% độ dài đầy đủ và mã hoá vùng hyaluronidaza này hoặc một phần của nó. Quá trình lai nói chung có tác dụng trong các điều kiện nghiêm ngặt ở mức độ ít nhất là thấp, nói chung ở mức độ ít nhất là vừa phải, thường là ở điều kiện nghiêm ngặt cao.

Các đoạn axit nucleic được phân lập này là ADN, bao gồm ADN hệ gen hoặc cADN, hoặc là ARN, hoặc có thể bao gồm các thành phần khác như axit nucleic của protein hoặc các chất tương tự nucleotit khác. Axit nucleic được phân lập này có thể bao gồm các thành phần bổ sung, như các trình tự khởi động tự nhiên hoặc khác loại và các trình tự điều hòa dịch mã và phiên mã khác. Các gen này có thể được liên kết với các gen khác, như các gen chỉ thị hoặc các gen đánh dấu hoặc các gen mã hoá chất đánh dấu.

Sáng chế cũng đề xuất phân tử axit nucleic phân lập được bao gồm trình tự của phân tử mà bổ sung với trình tự nucleotit mã hoá sHASEGP hoặc một phần của nó.

Sáng chế cũng đề xuất các đoạn của nó hoặc các oligonucleotit có thể được sử dụng làm đoạn dò hoặc đoạn mồi và chứa ít nhất 10, 14, 16 nucleotit, thông thường ít

hơn 1000 hoặc ít hơn hoặc bằng 100 nucleotit, được thể hiện trong SEQ ID NO: 6 (hoặc phần bổ sung của nó); hoặc chứa ít nhất 30 nucleotit (hoặc phần bổ sung của nó) hoặc chứa các oligonucleotit mà lai với các đoạn hoặc các oligonucleotit bất kỳ này dọc theo độ dài đầy đủ của chúng (hoặc ít nhất 70, 80 hoặc 90% độ dài đầy đủ của chúng). Độ dài của các đoạn phụ thuộc vào mục đích mà chúng được sử dụng và/hoặc là độ phức tạp của hệ gen cần quan tâm. Nói chung, các đoạn môi và các mẫu dò chứa ít hơn khoảng 50, 150 hoặc 500 nucleotit.

Sáng chế cũng đề xuất các plasmit chứa các phân tử axit nucleic bất kỳ được đề xuất ở đây. Các tế bào chứa các plasmit này cũng được đề xuất. Các tế bào này bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, tế bào vi khuẩn, tế bào nấm men, tế bào nấm, tế bào thực vật, tế bào côn trùng và tế bào động vật.

Sáng chế cũng đề xuất các hệ thống biểu hiện của động vật có vú được tăng cường bằng cách sử dụng các trình tự dẫn đầu tín hiệu có khả năng tiết hiệu quả sHASEGP. Ví dụ về trình tự axit amin của peptit dẫn đầu cho sự tiết hiệu quả và protein dung hợp với sHASEGP được tìm thấy trong SEQ ID NO: 43 và 46.

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp sản xuất sHASEGP bằng cho các tế bào được mô tả nêu trên sinh trưởng trong các điều kiện mà nhờ đó sHASEGP được biểu hiện trong các tế bào này, và thu hồi polypeptit hoặc glycoprotein sHASEGP được biểu hiện. Phương pháp phân lập axit nucleic mã hoá các sHASEGP cũng được đề xuất.

Sáng chế cũng đề xuất các tế bào thường là các tế bào nhân chuẩn, như tế bào của động vật có vú và tế bào nấm men, trong đó polypeptit sHASEGP được biểu hiện trên bề mặt của các tế bào này. Các tế bào này được sử dụng trong các thử nghiệm sàng lọc được chất để nhận biết các hợp chất điều biến hoạt tính của polypeptit sHASEGP. Các thử nghiệm này, bao gồm các thử nghiệm liên kết *in vitro*, và các thử nghiệm dựa trên quá trình phiên mã trong đó sự truyền tín hiệu được gây ra trực tiếp hoặc gián tiếp như qua quá trình hoạt hoá yếu tố tiền sinh trưởng, bởi sHASEGP được đánh giá.

Sáng chế cũng đề xuất các peptit được mã hoá bằng các phân tử axit nucleic này. Cũng được bao gồm trong các polypeptit này là vùng sHASEGP hyaluronidaza hoặc polypeptit có các thay đổi về axit amin sao cho tính đặc hiệu và/hoặc hoạt tính

của hyaluronidaza vẫn hầu như không bị thay đổi. Cụ thể, sáng chế đề xuất glycoprotein sHASEGP của động vật có vú gần như tinh khiết có hoạt tính xúc tác trung hoà được tiết ra.

Sáng chế cũng bao gồm vùng có hoạt tính xúc tác của hyaluronidaza và có thể còn bao gồm các vùng khác nữa. sHASEGP có thể tạo thành các homodime và cũng có thể tạo thành các heterodime với một số protein khác như protein liên kết với màng. Sáng chế cũng đề xuất glycoprotein gần như tinh khiết bao gồm trình tự axit amin có tỷ lệ tương đồng với sHASEGP ít nhất là 60%, 70%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, trong đó tỷ lệ phần trăm tương đồng được xác định bằng cách sử dụng các thuật toán tiêu chuẩn và các điểm phạt lỗi trống nhằm tăng tối đa tỷ lệ phần trăm tương đồng.

Các biến thể ghép của sHASEGP, cụ thể là các biến thể ghép có vùng hyaluronidaza có hoạt tính xúc tác được dự tính ở đây.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất các polypeptit gần như tinh khiết bao gồm vùng hyaluronidaza của polypeptit sHASEGP hoặc phần có hoạt tính xúc tác của nó, nhưng không bao gồm toàn bộ trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No.1. Trong số các polypeptit này là các polypeptit mà bao gồm trình tự axit amin có độ tương đồng trình tự ít nhất là 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, hoặc 100% với SEQ ID No. 1 hoặc 3.

Sáng chế đề xuất axit nucleic mã hoá glycoprotein hyaluronidaza của sinh vật có nhân chuẩn được ký hiệu là sHASEGP. Cụ thể là, axit nucleic này bao gồm trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID No.6, cụ thể là các nucleotit từ 106 đến 1446 nêu trong SEQ ID No.6, hoặc một phần của nó mà mã hoá polypeptit có hoạt tính xúc tác.

Sáng chế cũng đề xuất các phân tử axit nucleic mà lai với SEQ ID No.6 trong các điều kiện ở mức độ ít nhất là nghiêm ngặt thấp, thường là ở mức độ nghiêm ngặt vừa phải, tốt hơn là ở mức độ nghiêm ngặt cao, hoặc làm thoái biến SEQ ID No.6.

Theo một phương án, đoạn axit nucleic được phân lập này lai với phân tử axit nucleic chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID No.6 (hoặc làm thoái biến SEQ ID No.6) trong các điều kiện nghiêm ngặt cao. sHASEGP có độ dài đầy đủ nêu trong SEQ ID No.1 và được mã hoá bằng SEQ ID N.6 hoặc làm thoái biến chúng.

Sáng chế cũng đề xuất các mutein của vùng hyaluronidaza của sHASEGP, cụ thể là các mutein trong đó gốc Xys trong vùng hyaluronidaza mà là tự do (tức là không tạo thành liên kết disulfua với gốc Xys bất kỳ khác trong vùng hyaluronidaza) được thế bằng đột biến thế axit amin khác, thường là, mặc dù không nhất thiết, bằng đột biến thế axit amin bảo toàn hoặc đột biến thế mà không làm mất hoạt tính và sáng chế cũng đề xuất các mutein trong đó (các) vị trí glycosyl hoá đặc hiệu được loại bỏ.

Sáng chế cũng đề xuất các polypeptit sHASEGP, bao gồm nhưng không bị giới hạn ở, các biến thể ghép của nó và các axit nucleic mã hoá sHASEGP, và các vùng, các dẫn xuất và các chất tương tự của chúng. Các glycoprotein hyaluronidaza được tiết ra ở dạng chuỗi đơn có đầu tận cùng N có chức năng tương đương với chức năng được tạo ra bằng cách hoạt hoá peptidaza tín hiệu để tạo thành sHASEGP cũng được đề xuất. Có bảy vị trí có glycosyl hoá được liên kết ở vị trí N tiềm năng là N82, N166, N235, N254, N368, N393, N490 của sHASEGP được minh hoạ bằng ví dụ trong SEQ ID No.1. Các liên kết disulfua tạo thành giữa các gốc Xys C60-C351 và các gốc Xys C224-C238 để tạo thành vùng hyaluronidaza nhân. Tuy nhiên, vẫn cần có các gốc xystein bổ sung ở đầu tận cùng carboxy để có hoạt tính xúc tác enzym trung hoà sao cho sHASEGP từ axit amin 36 đến Xys 464 trong SEQ ID No.1 chứa vùng sHASEGP hyaluronidaza của người có hoạt tính tối thiểu. Vì vậy, vị trí glycosyl hoá được liên kết ở vị trí N N-490 là không cần thiết đối với hoạt tính sHASEGP thích hợp.

Việc glycosyl hoá được liên kết ở vị trí N của sHASEGP là rất quan trọng đối với hoạt tính xúc tác và độ ổn định của chúng. Trong khi việc thay đổi loại glycan gây cải biến glycoprotein có thể có những ảnh hưởng nghiêm trọng đến tính kháng nguyên của protein, gấp nếp cấu trúc, độ hoà tan và độ ổn định, hầu hết các enzym được cho là không cần quá trình glycosyl hoá để có hoạt tính enzym tối ưu. Do đó sHASEGP là duy nhất về điểm này, mà việc loại bỏ quá trình glycosyl hoá được liên kết ở vị trí N có thể dẫn đến làm mất gần như hoàn toàn hoạt tính của hyaluronidaza. Sự có mặt của glycan được liên kết ở vị trí N là rất quan trọng để tạo ra sHASEGP có hoạt tính. Các hệ thống biểu hiện protein thích hợp để đưa các gốc glycosyl hoá được liên kết ở vị trí N quan trọng vào sHASEGP nằm trong phạm vi của sáng chế. Ngoài ra, việc đưa vào polypeptit sHASEGP được loại glycosyl hoá khi có mặt các dịch chiết có khả năng đưa vào các glycan được liên kết ở vị trí N cũng nằm trong phạm vi của sáng chế. Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất sự glycosyl hoá phức tạp có đỉnh là sự sialat

hoá, trong khi đó các quá trình glycosyl hoá phức tạp khác có đỉnh là các gốc mannoza tự do cũng được dự tính. Tốt hơn là, các gốc axit sialic được phát hiện ở gốc cuối cùng của vùng glycosyl hoá được liên kết ở vị trí N trên sHASEGP.

Các oligosacarit được liên kết ở vị trí N nằm trong một số loại chính (oligomannoza, phức, thể lai, được sulfat hoá), tất cả chúng đều có nhân (Man)-3-GlcNAc-GlcNAc được liên kết thông qua nguyên tử nitơ amit của các gốc Asn nằm trong trình tự -Asn-Xaa-Thr/Ser (trong đó Xaa không phải là Pro). Quá trình glycosyl hoá ở vị trí -Asn-Xaa-Xys được báo cáo để làm kết tụ protein C. Các vị trí được liên kết ở nguyên tử N thường được chỉ định gián tiếp bằng sự xuất hiện vòng “trống” khi giải trình tự. Việc xác định dương tính có thể được tiến hành sau khi giải phóng oligosacarit bằng PNGase F, mà chuyển hoá Asn được glycosyl hoá thành Asp. Sau khi giải phóng PNGase F, các oligosacarit được liên kết ở vị trí N có thể được tinh chế bằng cách sử dụng sắc ký Bio-Gel P-6, với nguồn oligosacarit được sắc ký trao đổi anion điều chế có độ pH cao (high pH anion exchange chromatography-HPAEC) (Townsend et al., (1989) *anal. Biochem.* 182, 1-8). Các chất đồng phân oligosacarit nhất định có thể được tách bằng cách sử dụng HPAEC. Các gốc fucoza sẽ chuyển rời các vị trí rửa giải sớm hơn trong phổ sắc ký HPAEC, trong khi các gốc axit sialic bổ sung sẽ làm gia tăng thời gian lưu. Việc xử lý đồng thời các glycoprotein có cấu trúc oligosacarit đã biết (ví dụ, fetuin bò, glycoprotein của axit α -1, lòng trắng trứng, ARNase B, transferrin) có thể tạo thuận lợi cho việc gán các đỉnh oligosacarit. Các oligosacarit được thu gom có thể được mô tả bằng cách kết hợp các phân tích thành phần và các phân tích liên kết metyl hoá (Waeghe et al., (1983) *Carbohydr Res.* 123, 281-304), với các cấu hình anome được gán bằng quang phổ NMR (Van Halbeek (1993) trong *Methods Enzymol* 230).

Các chế phẩm chứa sHASEGP cũng được đề xuất. Các sHASEGP có thể được bào chế ở dạng đông khô và dung dịch ổn định. Các chế phẩm chứa các ion kim loại đặc hiệu, như canxi, magie, hoặc natri, là hữu hiệu để có hoạt tính tối ưu ở độ pH trung hoà. Ngoài các chế phẩm là dung dịch ổn định, các chế phẩm giải phóng chậm được đề xuất ở đây để giải phóng kéo dài glycosaminoglycan. Cũng được đề xuất ở đây là các kit cung cấp bơm tiêm đóng gói sẵn sHASEGP để sử dụng sHASEGP với thể tích nhỏ trong phẫu thuật mắt và các phương pháp sử dụng các sHASEGP với thể tích nhỏ

khác. Các chế phẩm muối được làm cân bằng để sử dụng *ex vivo* trong kỹ thuật sinh sản nhân tạo cũng được đề xuất.

Phương pháp sử dụng sHASEGP để loại bỏ glycosaminoglycan cũng được đề xuất. sHASEGP mở ra các kênh nằm trong khoảng trống giữa các kẽ mô thông qua sự thoái biến của glycosaminoglycan cho phép khuếch tán các phân tử có kích thước nhỏ hơn 500nm. Các kênh này được duy trì trong khoảng thời gian từ 24 đến 48 giờ phụ thuộc vào liều và chế phẩm. Các kênh này có thể được sử dụng để tạo thuận lợi cho sự khuếch tán các phân tử được bổ sung ngoại sinh như dịch lỏng, phân tử nhỏ, protein, axit nucleic và vectơ liệu pháp gen và các phân tử khác có kích thước nhỏ hơn 500nm.

sHASEGP có thể được sử dụng để loại bỏ glycosaminoglycan dư như các glycosaminoglycan xuất hiện sau tình trạng tái đầy máu do thiếu máu cục bộ, viêm, xơ vữa động mạch, phù, ung thư, tổn thương tuỷ sống và các dạng tạo sẹo khác. Trong một số trường hợp, sHASEGP có thể được sử dụng toàn thân bằng cách truyền tĩnh mạch. Điều này có thể có ích khi không có khả năng sử dụng tại chỗ như ở tim hoặc não, hoặc trong trường hợp khối u bị phát tán khi bệnh này phát triển khắp cơ thể. sHASEGP được siêu sialat hóa tốt hơn là làm gia tăng thời gian bán thải trong huyết thanh và sự phân bố so với enzym hyaluronidaza tự nhiên thiếu axit sialic ở đầu tận cùng.

Trong một số trường hợp như điều trị tổn thương tuỷ sống, tăng nhãn áp hay các liệu pháp thẩm mỹ, việc phân phối được chất theo cách kéo dài thường được ưu tiên hơn.

Trong các chỉ định khác, liều đơn có tác dụng ngắn được ưu tiên. Việc tạm thời loại bỏ glycosaminoglycan có thể được sử dụng để tăng cường sự phân phối được chất và dung dịch vào trong khoảng trống giữa các kẽ mô. Điều này có thể là hữu hiệu để khuếch tán sự gây tê và để sử dụng dịch lỏng, phân tử và protein để chữa bệnh. Việc sử dụng các phân tử qua đường dưới da và trong cơ với sự có mặt của sHASEGP cũng tạo điều kiện thuận lợi để phân phối toàn thân các phân tử này nhanh hơn. Phương pháp này là rất hữu hiệu khi không thể tiêm tĩnh mạch được hoặc khi cần phân phối toàn thân các phân tử này nhanh hơn. Việc phân bố các phân tử lớn khác như yếu tố VIII, mà có sinh khả dụng kém khi sử dụng dưới da, có thể được tiêm bằng sHASEGP để làm tăng tính khả dụng của chúng.

Việc sử dụng sHASEGP để loại bỏ bằng enzym chất nền mầu bao quanh noãn cũng được đề xuất. Việc loại bỏ chất nền mầu bằng cách sử dụng sHASEGP tinh khiết mà không có các tạp chất gây độc của hyaluronidaza thu được từ dịch chiết cho phép thu được tế bào trứng một cách nhẹ nhàng hơn với khả năng sống cao hơn. Hơn nữa, sHASEGP có thể được tạo ra mà không cần sử dụng dịch chiết từ gia súc hoặc các sinh vật khác mang virus và các mầm bệnh khác như bệnh lý não xốp truyền nhiễm.

Cũng có thể sử dụng một thể tích nhỏ sHASEGP để tiêm vào những khoảng trống nhỏ trong mắt. sHASEGP cũng có thể được tiêm vào tiền phòng của mắt để loại bỏ các cơ chất nhớt đàn hồi dư, được sử dụng trong phẫu thuật. Cũng có thể sử dụng sHASEGP để tiêm vào trong mắt nhằm làm giảm nhãn áp trong bệnh tăng nhãn áp, để hoà tan những khối kết tụ trong thủy tinh thể, hoặc “các thể nổi”, để làm sạch xuất huyết của thủy tinh thể, để điều trị bệnh thoái hóa điểm vàng, để làm thuyên giảm tình trạng bong võng mạc thủy tinh thể trong bệnh võng mạc do đái tháo đường và để phối hợp với các enzym khác để thúc đẩy quá trình tạo hình lại giác mạc cùng với thủy tinh thể được hiệu chỉnh. Nhận thấy rằng trong một số trường hợp việc sử dụng sHASEGP kéo dài như sHASEGP được peg hoá là được mong muốn.

Các chế phẩm phối hợp giữa sHASEGP với các chất khác cũng có thể được dự định sử dụng trong các bơm tiêm thể tích nhỏ hoặc sử dụng để tiêm nhanh dưới da. Ví dụ, Epipen®, insulin, và các dịch lỏng khác có thể được bào chế. Phương pháp theo sáng chế bao gồm việc sử dụng polypeptit sHASEGP hoặc được phẩm chứa sHASEGP trước, đồng thời hoặc sau khi sử dụng các phân tử chữa bệnh khác. sHASEGP có thể được sử dụng ở vị trí khác với vị trí sử dụng phân tử chữa bệnh hoặc sHASEGP có thể được sử dụng ở cùng vị trí với vị trí sử dụng phân tử chữa bệnh này.

Vì vậy được đề xuất ở đây là một họ glycoprotein hyaluronidaza trung hoà được tiết trong sinh vật nhân chuẩn được gọi là sHASEGP, và các vùng chức năng, cụ thể là các vùng hyaluronidaza (hoặc có hoạt tính xúc tác) của chúng, các mutein và các dẫn xuất khác và các chất tương tự của chúng. Cũng được đề xuất ở đây là các axit nucleic mã hoá sHASEGP này. Ngoài ra, được đề xuất ở đây là các chế phẩm và việc sử dụng sHASEGP này để điều trị bệnh và để sử dụng làm các enzym cải biến mô.

Mô tả vắn tắt hình vẽ

Fig.1 thể hiện bản đồ vector của vector sHASEGP HZ 24.

Mô tả chi tiết sáng chế

A. Các định nghĩa: Trừ khi có quy định khác, tất cả các thuật ngữ kỹ thuật và khoa học được sử dụng ở đây có nghĩa tương tự như thường được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật mà sáng chế có liên quan. Tất cả các patent, các đơn yêu cầu cấp patent, các công bố đơn, các đơn đã công bố, các trình tự Ngân hàng gen, các địa chỉ trang web và các tài liệu đã công bố khác được đề cập đến trong suốt phần mô tả này, trừ khi có quy định khác, được bao gồm bằng cách viện dẫn nguyên vẹn ở đây. Trong trường hợp, có nhiều định nghĩa cho các thuật ngữ ở đây, các định nghĩa được sử dụng trong phần này được ưu tiên.

Khi việc viện dẫn được thực hiện cho URL hoặc các địa chỉ hoặc các ký hiệu nhận biết khác, cần phải hiểu rằng ký hiệu nhận biết này có thể thay đổi và thông tin cụ thể trên internet có thể thay đổi, nhưng thông tin tương đương có thể được tìm thấy bằng cách tra cứu trên internet. Ngoài ra, việc viện dẫn này chứng tỏ giá trị và việc phổ biến công khai thông tin này.

Như được sử dụng ở đây, việc viết tắt đối với các nhóm bảo vệ bất kỳ, các axit amin và các hợp chất khác là theo cách sử dụng viết tắt thông thường của chúng, được nhận biết theo cách viết tắt hoặc theo hệ IUPAC-IUB commission on Biochemical Nomenclature (xem (1972) Biochem. 11: 942-944), trừ khi có quy định khác.

Như được sử dụng ở đây, hyaluronidaza của sinh vật nhân chuẩn để chỉ họ đa dạng của các glycosaminoglycan endoglucosaminidaza, trong đó gốc glutamat trong hyaluronidaza thủy phân mỗi liên kết 1, 4 beta của hyaluronan và chondroitin sulfat thông qua cơ chế xúc tác axit-bazơ.

Được quan tâm đặc biệt là sHASEGP của động vật có vú, kể cả người. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật cần phải hiểu rằng, thông thường, việc thế một axit amin trong các vùng không cần thiết của polypeptit không làm thay đổi đáng kể hoạt tính sinh học (ví dụ, xem ấn phẩm: Watson et al., (1987) Molecular Biology of the Gene, 4th Edition, The Benjamin/Cummings Pub. co., p. 224).

Như được sử dụng ở đây, sHASEGP được neo bám vào màng để chỉ họ hyaluronidaza được neo bám vào màng có các đặc điểm về cấu trúc chung như được mô tả ở đây.

Như được sử dụng ở đây, hyaluronidaza hoà tan để chỉ polypeptit được đặc trưng bởi độ hoà tan của nó trong các điều kiện sinh lý. HASEGP hoà tan có thể được phân biệt, ví dụ, bằng cách phân bố nó trong pha nước của dung dịch Trion X-114 được làm ấm đến nhiệt độ 37°C (Bordier et al J Biol Chem. 1981 Feb 25; 256(4): 1604-7). Mặt khác, HASEGP được neo bám vào lipit sẽ phân bố trong pha giàu chất tẩy, nhưng sẽ phân bố trong pha nghèo chất tẩy hoặc pha nước sau khi xử lý bằng phospholipaza-C.

Vì vậy, việc viện dẫn, ví dụ, tới “sHASEGP” bao gồm tất cả các glycoprotein được mã hoá bởi họ gen sHASEGP, bao gồm nhưng không bị giới hạn ở, sHASEGP của người, sHASEGP của chuột, hoặc bao gồm phân tử tương đương thu được từ nguồn bất kỳ khác hoặc phân tử điều chế được theo cách tổng hợp hoặc phân tử biểu hiện hoạt tính tương tự. Các trình tự mã hoá phân tử axit nucleic và các trình tự axit amin được mã hoá của sHASEGP lấy làm ví dụ và/hoặc các vùng của nó chẳng hạn được nêu trong SEQ ID NO:4. Thuật ngữ này cũng bao gồm sHASEGP có các axit amin được thay thế mà hầu như không làm thay đổi hoạt tính của chúng và cũng bao gồm cả các biến thể ghép của chúng. Việc thay thế thích hợp bao gồm việc thay thế bảo toàn các axit amin, mặc dù không nhất thiết, là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật và có thể được tiến hành mà không làm mất hoạt tính sinh học của phân tử thu được, như hoạt tính xúc tác.

Như được sử dụng ở đây, sHASEGP, khi được viện dẫn ở đây, bao gồm ít nhất một hoặc tất cả tổ hợp bất kỳ hoặc tổ hợp bất kỳ của: polypeptit được mã hoá bởi trình tự nucleotit được nêu trong SEQ ID NO:6 hoặc được mã hoá bởi trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit mã hoá các axit amin từ 1 đến 509 của SEQ ID NO:1; polypeptit được mã hoá bởi trình tự nucleotit mà lai với trình tự nucleotit được nêu trong SEQ ID NO:6 trong các điều kiện ở mức độ nghiêm ngặt thấp, vừa phải hoặc cao; polypeptit bao gồm trình tự axit amin được thể hiện là các axit amin từ 1 đến 509 của SEQ ID NO:1; polypeptit bao gồm trình tự axit amin có độ tương đồng trình tự ít nhất 60%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% với trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:1 hoặc các axit amin từ 1 đến 448 của SEQ ID NO:4;

Cụ thể, sáng chế đề cập đến polypeptit sHASEGP với các vùng hyaluronidaza như được nêu trong SEQ ID NO.4. Polypeptit này là polypeptit chuỗi đơn hoặc chuỗi

kép. Các phần nhỏ hơn của nó mà vẫn có hoạt tính hyaluronidaza cũng được đề cập đến. Các vùng hyaluronidaza từ sHASEGP khác nhau về kích thước và cấu trúc, bao gồm các đoạn xen vào và các đoạn loại bỏ trong các vòng bề mặt. Vì vậy, cho mục đích của sáng chế, vùng có hoạt tính xúc tác này là một phần của sHASEGP, như được xác định ở đây, và tương đồng với vùng của các trình tự giống hyaluronidaza khác, như HYAL1, HYAL2, HYAL3 mà đã được xác định trước. Tuy nhiên, dạng chuỗi đơn của vùng hyaluronidaza của người được phân lập không được nhận biết có thể có chức năng trong các thử nghiệm *in vitro*. Các gốc aspartat và glutamat cần thiết để có hoạt tính có mặt ở dạng được bảo toàn.

Như được sử dụng ở đây, “vùng hyaluronidaza trung hoà của sHASEGP hoà tan” để chỉ vùng 1,4 beta endoglucosaminidaza của sHASEGP biểu hiện hoạt tính hyaluronidaza ở độ pH trung hoà, hoà tan được trong các điều kiện như được mô tả và chia sẻ các đặc điểm về cấu trúc và độ tương đồng với các vùng của họ hyaluronidaza glycosyl-hydrolaza nhưng chứa các trình tự bổ sung ở đầu tận cùng carboxy cần thiết đối với hoạt tính trung hoà. Vì vậy, vùng này ít nhất là phần tối thiểu của vùng biểu hiện hoạt tính hyaluronidaza như được đánh giá bằng các thử nghiệm *in vitro* tiêu chuẩn và vẫn hoà tan được. Được dự tính ở đây là các vùng hyaluronidaza và các phần có hoạt tính xúc tác của nó. Cũng được đề cập đến ở đây là các dạng đã được cắt cụt của vùng hyaluronidaza bao gồm các đoạn nhỏ nhất của nó đóng vai trò xúc tác ở dạng chuỗi đơn.

Vùng hyaluronidaza của sHASEGP, khi được viện dẫn ở đây, bao gồm ít nhất một hoặc tất cả tổ hợp bất kỳ hoặc tổ hợp bất kỳ của phần có hoạt tính xúc tác của: polypeptit glycoprotein được liên kết ở vị trí N bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:1; polypeptit được mã hoá bằng trình tự nucleotit lai với trình tự nucleotit được nêu trong SEQ ID NO:6 trong các điều kiện ở mức độ nghiêm ngặt thấp, vừa phải hoặc cao; polypeptit bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:1; polypeptit bao gồm trình tự axit amin có độ tương đồng trình tự ít nhất 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% với trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:1; và/hoặc vùng hyaluronidaza của polypeptit được mã hoá bằng một biến thể ghép của sHASEGP này.

Vì vậy, cho mục đích của sáng chế, vùng hyaluronidaza là một phần của sHASEGP, như được xác định ở đây, và tương đồng với vùng sHASEGP khác. Với nhóm lớn các enzyme của họ hyaluronidaza, các vùng có hoạt tính xúc tác của sHASEGP có mức độ tương đồng trình tự axit amin cao. Các gốc Asp và Glu cần thiết để có hoạt tính xúc tác có mặt ở dạng được bảo toàn.

Dạng có hoạt tính có nghĩa là dạng có hoạt tính *in vivo* và *in vitro*. Như được mô tả ở đây, vùng hyaluronidaza cũng có thể tồn tại ở dạng glycoprotein hoà tan được tiết. Được thể hiện ở đây là các dạng sHASEGP chuỗi đơn và các vùng có hoạt tính xúc tác hoặc các phần có hoạt tính enzyme của nó (thường là các đoạn cắt cụt ở đầu tận cùng C) biểu hiện hoạt tính hyaluronidaza, ít nhất là trong thử nghiệm *in vitro*. Vì vậy, được đề cập đến ở đây là các dạng được phân lập của các vùng hyaluronidaza của sHASEGP và việc sử dụng chúng trong thử nghiệm sàng lọc được chất *in vitro* để nhận biết các tác nhân điều biến hoạt tính của chúng.

Như được sử dụng ở đây, vùng có hoạt tính xúc tác của sHASEGP để chỉ vùng endoglucosaminidaza có hoạt tính trung hoà như được xác định bằng hoạt tính *in vitro* cho cơ chất glycosaminoglycan.

sHASEGP được quan tâm bao gồm sHASEGP có hoạt tính đối với chondroitin sulfat và chondroitin sulfat proteoglycan (CSPG) *in vivo* và *in vitro*; và sHASEGP có hoạt tính đối với hyaluronan. Như được sử dụng ở đây, sHASEGP của người là sHASEGP được mã hoá bằng axit nucleic, như ADN, có mặt trong hệ gen của người bao gồm tất cả các biến thể alen và các biến thể kiểu bảo toàn miễn là chúng không phải là các biến thể được tìm thấy trong các động vật khác.

Như được sử dụng ở đây, axit nucleic mã hoá vùng hyaluronidaza hoặc phần có hoạt tính xúc tác của sHASEGP sẽ được tạo cấu trúc để chỉ axit nucleic mã hoá duy nhất vùng hyaluronidaza chuỗi đơn đã nêu hoặc phần có hoạt tính của nó và không phải là các phần liền kề của sHASEGP dưới dạng trình tự liên tục.

Như được sử dụng ở đây, “bệnh” hoặc “rối loạn” để chỉ một tình trạng bệnh lý trong cơ thể, hậu quả do nhiễm trùng hoặc khiếm khuyết về mặt di truyền, và được đặc trưng bởi các triệu chứng có thể nhận biết được.

Như được sử dụng ở đây, biến thể ghép để chỉ biến thể được tạo ra bằng quá trình biệt hoá sự sao chép sơ cấp axit nucleic của hệ gen, như ADN, dẫn đến có nhiều hơn một ARN thông tin. Các biến thể ghép của sHASEGP được đề cập ở đây.

Như được sử dụng ở đây, vùng hyaluronidaza của protein sHASEGP để chỉ vùng hyaluronidaza của sHASEGP biểu hiện hoạt tính endoglucosaminidaza trung hoà. Vì vậy, vùng này ít nhất là phần tối thiểu của protein biểu hiện hoạt tính endoglucosaminidaza như được đánh giá bằng các thử nghiệm tiêu chuẩn *in vitro*. Các vùng hyaluronidaza của người theo sáng chế bao gồm ít nhất một phần đầy đủ trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID No.4 có khả năng biểu hiện hoạt tính endoglucosaminidaza.

Cũng được tính đến ở đây là các phân tử axit nucleic mã hoá polypeptit có hoạt tính endoglucosaminidaza trong thử nghiệm hyaluronidaza *in vitro* và có độ tương đồng trình tự ít nhất 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% với vùng hyaluronidaza có độ dài đầy đủ của polypeptit sHASEGP, hoặc các phân tử axit nucleic lai với các axit nucleic mã hoá vùng hyaluronidaza, cụ thể là trong các điều kiện lai ở mức độ nghiêm ngặt vừa phải, thường là cao, dọc theo độ dài đầy đủ của chúng hoặc dọc theo ít nhất 70%, 80% hoặc 90% độ dài đầy đủ của chúng.

Đối với các vùng hyaluronidaza, các gốc ở đầu tận cùng N có thể là quan trọng nhưng chưa đủ để có hoạt tính. Được thể hiện ở đây là vùng hyaluronidaza của sHASEGP có hoạt tính xúc tác. Vì vậy, vùng hyaluronidaza này thường đòi hỏi các axit amin ở đầu tận cùng N của nó có hoạt tính; Các phần ở đầu tận cùng C có thể được cắt cụt cho đến khi gốc Xystein cuối cùng còn cần đến các axit amin bổ sung để có được hoạt tính tối đa. Lượng có thể loại bỏ có thể được xác định theo kinh nghiệm bằng cách thử nghiệm polypeptit này về hoạt tính hyaluronidaza trong thử nghiệm *in vitro* đánh giá khả năng phân cắt xúc tác.

Vì vậy, các phần nhỏ hơn của các vùng hyaluronidaza, cụ thể là các vùng chuỗi đơn của nó vẫn có hoạt tính hyaluronidaza là được dự định. Các kiểu nhỏ hơn này thường là các kiểu được cắt ngắn ở đầu tận cùng C của các vùng hyaluronidaza. Các vùng hyaluronidaza thường khác nhau về kích thước và cấu trúc, bao gồm các đoạn xen vào và các đoạn loại bỏ trong quai bề mặt. Các vùng này biểu hiện cấu trúc kiểu

bảo toàn, bao gồm ít nhất một đặc điểm về cấu trúc như thể cho proton, và/hoặc các đặc điểm khác của các vùng hyaluronidaza của endoglucosaminidaza. Vì vậy, nhằm mục đích ở đây, vùng hyaluronidaza là một phần chuỗi đơn của sHASEGP, như được xác định ở đây, nhưng tương đồng về đặc điểm cấu trúc của nó và duy trì tính chất tương tự hoặc tương đồng về trình tự với vùng hyaluronidaza của các trình tự giống hyaluronidaza khác. Các glycoprotein này biểu hiện hoạt tính hyaluronidaza ở dạng chuỗi đơn.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ tương đồng có nghĩa là có độ tương đồng trình tự axit nucleic lớn hơn 25%, như 25%, 40%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%. Nếu cần, tỉ lệ tương đồng sẽ được xác định. Thuật ngữ “tương đồng” và “đồng nhất” thường được sử dụng thay thế cho nhau. Thông thường, các trình tự được căn trình tự sao cho sự bắt cặp theo trật tự cao nhất thu được (Ví dụ xem ấn phẩm: Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, New York, 1998; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A.M., and Griffin, H.P., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; and Sequence Analysis Primer, Gribskov, M and Devereux, J., eds., Cold Spring Harbor Press, New York, 1991; Carillo et al. (1998) et al. (1998) *SIAM J Applied Math* 48]: 1073)

Bằng độ tương đồng trình tự, số lượng axit amin được bảo toàn được xác định bằng các chương trình thuật toán so sánh tiêu chuẩn và được sử dụng với các điểm phạt khoảng trống do mỗi chương trình ứng dụng tạo nên. Các phân tử axit nucleic tương đồng đáng kể sẽ tương lai trong các điều kiện lai ở mức độ nghiêm ngặt vừa phải hoặc cao, tất cả đều dọc theo độ dài của axit nucleic này hoặc dọc theo ít nhất khoảng 70%, 80%, hoặc 90% độ dài đầy đủ của phân tử axit nucleic quan tâm. Cũng được dự tính ở đây là các phân tử axit amin có chứa các codon suy biến thay thế cho các codon trong các phân tử axit nucleic lai.

Hai phân tử axit nucleic bất kỳ có trình tự nucleotit có độ “tương đồng”, chẳng hạn ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, có thể được xác định bằng cách sử dụng các thuật toán trên máy tính đã biết như chương trình “FASTA”, chẳng hạn sử dụng các thông số điểm phạt như trong ấn phẩm của Pearson et al (1998) [*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85]: 2444 (các chương trình khác bao gồm chương trình GCG

trộn gói (Devereux, J., et al., *Nucleic Acids Research* 12: 387 (1984)), BLASTP, BLASTN, FASTA (Atschul, [S.] [F.,] [ET AL, *J MOLEC BIOL* 215]: 403 (1990); *Guide to Huge Computers*, Martin J. Bishop, [ED.,] Academic Press, San Diego, 1994, và [CARILLO ET AL.] (1988) *SIAM J Applied Math* 48: 1073). Ví dụ, chức năng BLAST trong cơ sở dữ liệu của Trung tâm Quốc gia về Thông tin Công nghệ Sinh học (National Center for Biotechnology Information) có thể được sử dụng để xác định độ tương đồng. Các chương trình thương mại hoặc các chương trình đã công bố bao gồm DNASTAR “MEGALIGN” PROGRAM (Madison, WI) và chương trình “Gap” của nhóm máy tính của Trường đại học tổng hợp di truyền Wisconsin (UWG-University of Wisconsin Genetics Computer group) (Madison WI)). Tỷ lệ phần trăm đồng nhất hoặc tương đồng của các protein và/hoặc các phân tử axit nucleic có thể được xác định, chẳng hạn bằng cách so sánh thông tin về trình tự bằng cách sử dụng chương trình máy tính GAP, ví dụ xem ấn phẩm của Needleman et al (1970), *J Mol Biol.* 48: 443, được tái bản bởi Smith và Waterman *Adv. Math* (1981) 2: 482). Tóm tắt là, chương trình GAP xác định sự tương đồng dưới dạng số các ký hiệu được so sánh thẳng hàng (tức là, các nucleotit hoặc các axit amin) tương tự nhau, được chia cho tổng số các ký hiệu trong hai trình tự ngắn hơn. Những thông số điểm phạt đối với chương trình GAP có thể bao gồm: (1) cơ chất so sánh đơn phân (có chứa giá trị 1 khi nhận biết và giá trị 0 khi không nhận biết) và cơ chất so sánh theo khối lượng theo Gribsskov et al (1986) *Nucl. Acids Res.* 14: 6745, như được mô tả trong Schawrts and Dayhoff, eds., *Atlas of Protein Sequence and Structure*, National Biomedical Research Foudation, pp. 353-358 (1979); (2) điểm phạt là 3,0 đối với mỗi khoảng trống và bổ sung thêm 0,10 điểm phạt đối với mỗi ký hiệu trong mỗi khoảng trống và (3) không có điểm phạt nào đối với các khoảng trống cuối cùng. Vì vậy như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “đồng nhất” thể hiện việc so sánh giữa polypeptit hoặc polynucleotit thử nghiệm và polypeptit hoặc polynucleotit tham khảo.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ ít nhất “tương đồng 90% với” để chỉ tỷ lệ phần trăm tương đồng từ 90 đến 99,99 so với các polypeptit tham khảo. Độ tương đồng ở mức độ 90% hoặc cao hơn biểu thị thực tế là việc giả định nhằm mục đích minh họa việc so sánh polynucleotit thử nghiệm và polynucleotit tham khảo có độ dài 100 axit amin. Số axit amin trong polypeptit thử nghiệm khác biệt không lớn hơn 10% (tức là 10 trong số 100) so với axit amin của các polypeptit tham khảo. Việc so sánh

tính tương tự có thể được tiến hành giữa các polynucleotit thử nghiệm và tham khảo. Sự khác biệt này có thể được thể hiện dưới dạng các đột biến điểm được phân bố ngẫu nhiên trong suốt toàn bộ chiều dài của trình tự axit amin hoặc chúng có thể được tập hợp tại một hay nhiều vị trí khi độ dài thay đổi đến mức tối đa có thể, ví dụ, khác biệt 10/100 axit amin (tương đồng khoảng 90%). Sự khác biệt được xác định dưới dạng thay thế hoặc loại bỏ axit nucleic hoặc axit amin. Ở mức tương đồng hoặc đồng nhất trên 85-90%, các kết quả này không phụ thuộc vào bộ thông số khoảng trống và chương trình này; các mức đồng nhất cao này có thể được đánh giá dễ dàng, thường không dựa vào phần mềm.

Như được sử dụng ở đây, đoạn môi để chỉ oligonucleotit chứa hai hoặc nhiều deoxyribonucleotit hoặc ribonucleotit, cụ thể là lớn hơn ba, mà từ đó việc tổng hợp sản phẩm bằng cách kéo dài đoạn môi có thể được bắt đầu. Các điều kiện thử nghiệm cần thiết để tổng hợp bao gồm sự có mặt của nucleosit triphosphat và tác nhân để polyme hoá và để kéo dài như polymeraza ADN, và dung dịch đệm, nhiệt độ và độ pH thích hợp.

Như được sử dụng ở đây, động vật bao gồm động vật bất kỳ, như, nhưng không bị giới hạn ở, dê, bò cái, hươu, cừu, thỏ, lợn và người. Trừ người, các động vật không phải là người là các động vật được tính đến. sHASEGP được đề cập đến ở đây thu được từ nguồn bất kỳ, động vật, thực vật, sinh vật nhân sơ và nấm. Hầu hết sHASEGP có nguồn gốc từ động vật, bao gồm có nguồn gốc từ động vật có vú.

Như được sử dụng ở đây, liệu pháp gen bao gồm việc chuyển axit nucleic khác kiểu như ADN, vào trong các tế bào nhất định, các tế bào đích của động vật, cụ thể là người có bệnh hoặc tình trạng bệnh lý cần đến liệu pháp này. Axit nucleic, như ADN, được đưa vào các tế bào đích chọn lọc theo cách sao cho axit nucleic khác kiểu này, như ADN, được biểu hiện và sản phẩm được mã hoá theo cách này được tạo ra để chữa bệnh.

Theo cách khác, axit nucleic khác kiểu, như ADN, có thể gián tiếp biểu hiện ADN theo một số cách để mã hoá sản phẩm chữa bệnh, hoặc nó có thể mã hoá một sản phẩm, như peptit hoặc ARN mà theo một số cách sẽ biểu hiện sản phẩm chữa bệnh một cách trực tiếp hoặc không trực tiếp. Liệu pháp gen cũng có thể được sử dụng để phân bố axit nucleic mã hoá sản phẩm gen nhằm thay thế gen sai quy cách hoặc bỏ

sung sản phẩm gen do động vật có vú hoặc tế bào này tạo ra khi axit nucleic mã hoá sản phẩm gen được đưa vào. Axit nucleic được đưa vào này có thể mã hoá hợp chất chữa bệnh như chất ức chế yếu tố sinh trưởng của nó, chất ức chế hoặc yếu tố hoại tử khối u, như thụ thể của nó, mà thường không được tạo ra trong vật chủ là động vật có vú hoặc không được tạo ra với lượng hữu hiệu để chữa bệnh hoặc vào thời gian hữu hiệu để chữa bệnh. Axit nucleic khác kiểu này như ADN, mã hoá sản phẩm chữa bệnh có thể được cải biến trước khi đưa vào trong tế bào của vật chủ mắc bệnh để tăng cường hoặc mặt khác thay thế sản phẩm chữa bệnh hoặc biểu hiện sản phẩm này. Liệu pháp gen cũng có thể bao gồm việc phân bố chất ức chế hoặc chất kích thích hoặc chất điều biến biểu hiện gen khác.

Như được sử dụng ở đây, axit nucleic khác kiểu là axit nucleic (nếu ADN mã hoá ARN) và protein mà thường không được tạo ra *in vivo* bằng các tế bào trong đó nó được biểu hiện hoặc là axit nucleic và protein gián tiếp làm chất trung gian hoặc mã hoá chất trung gian mà thay thế sự biểu hiện của axit nucleic nội sinh như ADN, nhờ đó tác động đến các quá trình sao chép, dịch mã hoặc quá trình điều hòa sinh hoá khác. Axit nucleic khác kiểu, như ADN, cũng có thể được dùng để chỉ là axit nucleic lạ, như ADN. Axit nucleic bất kỳ, như ADN, mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật sẽ nhận biết hoặc xem xét là khác kiểu hoặc lạ đối với tế bào mà trong đó nó được biểu hiện, sẽ bao gồm ở đây là axit nucleic khác kiểu. Axit nucleic khác kiểu bao gồm axit nucleic được bổ sung theo cách ngoại sinh mà axit này cũng được biểu hiện theo cách nội sinh. Ví dụ về axit nucleic khác kiểu bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, axit nucleic mã hoá protein chỉ thị theo dõi được, như protein có khả năng kháng được chất, axit nucleic mã hoá các chất hữu hiệu để chữa bệnh như chất chống ung thư, enzym và hormon, và axit nucleic như ADN, mã hoá các loại protein khác, như kháng thể. Các kháng thể được mã hoá bởi axit nucleic khác kiểu có thể được tiết hoặc được biểu hiện trên bề mặt tế bào mà axit nucleic khác kiểu này được đưa vào.

Axit nucleic khác kiểu thường không phải là nội sinh đối với tế bào mà nó được đưa vào, nhưng nó thu được từ tế bào khác hoặc điều chế được bằng cách tổng hợp.

Thông thường, mặc dù không cần thiết, axit nucleic mã hoá ARN và các protein thường không được tạo ra trong tế bào mà axit nucleic này được biểu hiện.

Như được sử dụng ở đây, sản phẩm hữu hiệu để chữa bệnh là sản phẩm được mã hoá bởi axit nucleic khác kiểu, điển hình là ADN, mà sau khi đưa axit nucleic vào trong vật chủ, sản phẩm này sẽ được biểu hiện nhằm cải thiện hoặc loại bỏ các triệu chứng, các biểu hiện của bệnh di truyền hoặc tập nhiễm hoặc điều trị các bệnh này.

Như được sử dụng ở đây, nên nhớ rằng glycoprotein bao gồm chủ yếu vùng hyaluronidaza có nghĩa là chỉ có phần sHASEGP của polypeptit là vùng hyaluronidaza hoặc phần có hoạt tính xúc tác của nó. Polynucleotit này có thể tùy ý, và thường sẽ bao gồm thêm các trình tự axit amin thu được không phải từ sHASEGP.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “vùng” dùng để chỉ một phần của phân tử, ví dụ glycoprotein hoặc các axit nucleic mã hoá có cấu trúc và/hoặc chức năng khác biệt so với các phần khác của phân tử.

Như được sử dụng ở đây, hyaluronidaza dùng để chỉ enzym xúc tác quá trình thủy phân của glycosaminoglycan.

Việc viện dẫn rõ ràng tới hyaluronidaza dùng để chỉ tất cả các dạng, và các dạng cụ thể sẽ được chỉ định đặc hiệu. Với mục đích của sáng chế, vùng hyaluronidaza bao gồm các dạng protein sHASEGP hoà tan và liên gắn với màng.

Như được sử dụng ở đây, axit nucleic bao gồm ADN, ARN và các chất tương tự của nó, bao gồm axit nucleic protein (PNA) và hỗn hợp của nó. Các axit nucleic có thể là mạch đơn hoặc mạch kép. Khi đề cập đến các đoạn môi hoặc các đoạn dò, các phân tử mạch đơn tùy ý được đánh dấu bằng nguyên tử đánh dấu có thể phát hiện được, như nguyên tử đánh dấu phát huỳnh quang hoặc nguyên tử đánh dấu bằng đồng vị phóng xạ, được dự tính. Các phân tử này thường có độ dài sao cho đích của chúng là giá trị duy nhất về mặt thống kê và có số bản sao thấp (thường là nhỏ hơn 5, thông thường là nhỏ hơn 3) để phát hiện hoặc dò thư viện. Nói chung đoạn dò hoặc đoạn môi chứa ít nhất một trình tự gồm 14, 16 hoặc 30 axit nucleic liên kề, bổ sung hoặc tương đồng với gen quan tâm. Các đoạn môi hoặc các đoạn dò có thể có chiều dài gồm 10, 20, 30, 50, 100 axit amin, hoặc nhiều hơn.

Như được sử dụng ở đây, axit nucleic mã hoá một phần hoặc một đoạn của sHASEGP để chỉ axit nucleic mã hoá duy nhất một phần hoặc một đoạn của sHASEGP đã nêu và không mã hoá các phần liên kề khác của sHASEGP này.

Như được sử dụng ở đây, mỗi liên kết chức năng của axit nucleic khác kiểu với các trình tự nucleotit điều chỉnh và các trình tự nucleotit tác động như trình tự khởi động, trình tự tăng cường, các vị trí kết thúc phiên mã và dịch mã, và các trình tự tín hiệu khác dùng để chỉ mối quan hệ giữa axit nucleic này như ADN với các trình tự nucleotit nêu trên. Ví dụ, mỗi liên kết chức năng giữa ADN khác kiểu với trình tự khởi động để chỉ mối quan hệ tự nhiên giữa ADN với trình tự khởi động sao cho quá trình phiên mã của ADN này được bắt đầu từ trình tự khởi động bằng polymeraza ARN nhận biết đặc hiệu, liên kết và sao chép ADN trong khung đọc mở. Vì vậy, được liên kết chức năng hoặc có mỗi liên kết chức năng để chỉ mối quan hệ về mặt chức năng của axit nucleic như ADN với các trình tự nucleotit điều hòa và các trình tự nucleotit tác động như trình tự khởi động, trình tự tăng cường các vị trí kết thúc phiên mã và dịch mã và các trình tự tín hiệu khác. Ví dụ mỗi liên kết chức năng của ADN với trình tự khởi động dùng để chỉ mối quan hệ về mặt chức năng và tự nhiên giữa ADN và trình tự khởi động sao cho quá trình sao chép của ADN được bắt đầu từ trình tự khởi động bằng polymeraza ARN nhận biết đặc hiệu, liên kết và sao chép ADN này. Để làm tối ưu hoá việc biểu hiện và/hoặc sao chép *in vitro*, có thể cần thiết phải loại bỏ, bổ sung hoặc thay thế các phần không được dịch mã ở đầu 5' để loại bỏ các codon phụ có khả năng không thích hợp (bắt đầu dịch mã luân phiên, tức là bắt đầu) hoặc các trình tự khác có thể cản trở hoặc làm giảm sự biểu hiện ở mức độ phiên mã hoặc dịch mã. Theo cách khác, các vị trí liên kết ribosom liên ứng (ví dụ xem ấn phẩm Kozak J. Biol. Chem. 266: 19867-19870 (1991)) có thể được xen trực tiếp vào đầu 5' của codon bắt đầu và có thể tăng cường sự biểu hiện. Việc mong muốn (hoặc cần thiết) cải biến này có thể được xác định theo kinh nghiệm.

Như được sử dụng ở đây, trình tự bổ sung với ít nhất một phần của ARN liên quan đến các oligonucleotit đối nghĩa, có nghĩa là trình tự có sự bổ sung đủ để có thể lai với ARN, thường là trong các điều kiện ở mức độ nghiêm ngặt vừa hoặc cao để tạo thành bộ hai gen trội ổn định; trong trường hợp axit nucleic đối nghĩa của sHASEGP mạch kép, mạch đơn của ADN của bộ hai gen trội (hoặc dsARN) có thể được thử nghiệm, hoặc việc tạo thành bộ ba gen trội có thể được thử nghiệm. Khả năng lai phụ thuộc vào mức độ bổ sung và độ dài của axit nucleic đối nghĩa. Thông thường càng nhiều axit nucleic lai thì càng nhiều bazơ không khớp với ARN mã hoá sHASEGP, nó có thể chứa và thậm chí tạo thành bộ hai gen trội ổn định (hoặc bộ ba gen trội, trong

trường hợp có thể). Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật có thể xác định được mức độ không khớp chấp nhận được bằng cách sử dụng các phương pháp tiêu chuẩn để xác định điểm nóng chảy của phức đã lai.

Với mục đích của sáng chế, việc thay thế axit amin có thể được tiến hành trong sHASEGP bất kỳ và các vùng hyaluronidaza của nó miễn là protein thu được biểu hiện hoạt tính hyaluronidaza. Việc thế axit amin được dự tính bao gồm việc thế bảo toàn, như được thể hiện trong bảng 1, mà không làm mất hoạt tính phân giải protein. Như được mô tả ở đây, việc thế nhằm để thay thế các tính chất của protein như loại bỏ các vị trí phân cắt và các vị trí khác cũng được tính đến; việc thế này thường là thế không bảo toàn nhưng có thể dễ dàng được thực hiện bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật.

Sự thế bảo toàn các axit amin thích hợp là đã biết đối với các người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật và thường có thể được tiến hành mà không làm thay đổi hoạt tính sinh học, ví dụ hoạt tính enzym của phân tử thu được. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật nhận ra rằng, thông thường việc thế axit amin trong vùng không thiết yếu của polypeptit không làm thay đổi đáng kể hoạt tính sinh học (ví dụ, xem ấn phẩm Watson et al. *Molecular Biology of the Gene*, 4th Edition, 1987, The Benjamin/Cummings Pub. co., p.224). Cũng được bao gồm trong định nghĩa này là phần có hoạt tính xúc tác của sHASEGP, cụ thể là phần hyaluronidaza mạch đơn. Sự thế bảo toàn axit amin được tiến hành, ví dụ phù hợp với sự thế được thể hiện trong bảng 1 như sau:

Bảng 1: Sự thế bảo toàn gốc ban đầu Ala (A) Gly; Ser, Abu Arg (R) Lys, orn Asn (N) Gln; His Cys (C) Ser Gin (Q) Asn Glu (E) ASP Gly (G) Ala; Pro His (H) Asn; Gin Ile (I) Leu; Val; Met; Nle; Nva Leu (L); Val; Met; Nle; Nv Lys (K) Arg; Gin; Glu Met (M) Leu; Tyr; Ile; NLe Val Ornitin Lys; Arg Phe (F) Met; Leu; Tyr Ser (S) Thr Thr (T) Ser Trp (W) Tyr Tyr (Y) Trp; Phe Val (V) ILE; Leu; Met; Nle; Nv. Các sự thế khác cũng có thể được phép và có thể được xác định theo kinh nghiệm hoặc theo các phương pháp thế bảo toàn đã biết.

Như được sử dụng ở đây, Abu là axit 2-aminobutyric; Orn là ornithin. Như được sử dụng ở đây, axit amin này, khi xuất hiện trong các trình tự axit amin khác có mặt ở đây, sẽ được xác định theo các chữ viết tắt một từ hoặc ba từ đã biết của chúng.

Các nucleotit này, khi xuất hiện trong các đoạn ADN khác nhau, sẽ được ký hiệu bằng các ký hiệu gồm một từ tiêu chuẩn được sử dụng thông thường trong lĩnh vực này.

Như được sử dụng ở đây, đoạn môi hoặc đoạn dò dựa trên trình tự nucleotit được mô tả ở đây, bao gồm trình tự chứa ít nhất 10, 14, điển hình là 16 nucleotit liền kề trong SEQ ID NO.6, và các đoạn dò bao gồm trình tự chứa ít nhất 30, 50 hoặc 100 nucleotit liền kề trong SEQ ID NO. 6. Độ dài của đoạn môi hoặc đoạn dò để lại duy nhất là chức năng của phức hệ gen quan tâm.

Như được sử dụng ở đây, việc làm thuyên giảm các triệu chứng của các rối loạn cụ thể bằng cách sử dụng được phẩm cụ thể để chỉ việc làm giảm bớt lâu dài hoặc tạm thời, kéo dài hoặc nhất thời mà có thể được quy cho là do hoặc liên quan đến việc sử dụng được phẩm này.

Như được sử dụng ở đây, các polynucleotit đối nghĩa để chỉ các trình tự bazơ nucleotit tổng hợp bổ sung với ARN thông tin hoặc sợi có nghĩa của ADN sợi kép. Hỗn hợp của các polynucleotit có nghĩa và đối nghĩa trong các điều kiện thích hợp sẽ dẫn đến việc liên kết của hai phân tử này, hoặc lại. Khi các polynucleotit này liên kết với (lại với) ARN thông tin, sẽ xảy ra sự ức chế tổng hợp (dịch mã) protein. Khi các polynucleotit liên kết với ADN mạch kép, sẽ xảy ra việc ức chế tổng hợp (phiên mã) ARN này.

Khi quá trình dịch mã và/hoặc phiên mã bị ức chế sẽ dẫn đến việc ức chế tổng hợp protein được mã hoá bởi sợi có nghĩa này. Phân tử axit nucleic đối nghĩa điển hình chứa số nucleotit đủ để liên kết đặc hiệu với axit nucleic đích, thường ít nhất là 5 nucleotit liền kề, thường là 14 hoặc 16 hoặc 30 nucleotit liền kề hoặc các nucleotit được cải biến bổ sung với phần mã hoá này của phân tử axit nucleic mà mã hoá gen quan tâm, ví dụ axit nucleic mã hoá vùng hyaluronidaza mạch đơn của SHASEGP.

Như được sử dụng ở đây, một ma trận chỉ một tập hợp các yếu tố như các kháng thể, chứa ba thành phần hoặc nhiều hơn. Ma trận đích là ma trận trong đó các thành phần của ma trận có thể nhận biết được, thường bằng vị trí trên chất mang pha rắn. Vì vậy, thông thường các thành phần của ma trận này được cố định trên các vị trí nhận biết riêng rẽ trên bề mặt của pha rắn.

Như được sử dụng ở đây, kháng thể để chỉ globulin miễn dịch được tạo ra tự nhiên, hoặc tổng hợp một phần hoặc tổng hợp toàn bộ, bao gồm dẫn xuất bất kỳ của nó

mà vẫn duy trì khả năng liên kết đặc hiệu của kháng thể. Vì vậy kháng thể bao gồm protein bất kỳ có một vùng liên kết mà tương đồng hoặc gần như tương đồng với vùng liên kết với globulin miễn dịch. Các kháng thể bao gồm các dạng globulin miễn dịch bất kỳ cần thiết, bao gồm IgG, IgM, IgA, IgD, IgE.

Như được sử dụng ở đây, đoạn kháng thể để chỉ dẫn xuất bất kỳ của một kháng thể có độ dài ít đầy đủ hơn, mà vẫn có ít nhất một phần có khả năng liên kết đặc hiệu của kháng thể có độ dài đầy đủ. Ví dụ về đoạn kháng thể này bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, Fab, Fab', F(AB)₂, Fvs chuỗi đơn (scFvs), FV, đoạn kháng thể có cấu trúc dime (diabody) dsFV và các đoạn Fd. Đoạn này có thể bao gồm nhiều chuỗi được liên kết với nhau, như bằng các cầu disulfua. Một đoạn kháng thể thường chứa ít nhất khoảng 50 axit amin và thường ít nhất là 200 axit amin.

Như được sử dụng ở đây, đoạn kháng thể Fv bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) và vùng biến đổi chuỗi nhẹ được liên kết bằng các tương tác không cộng hoá trị.

Như được sử dụng ở đây, dsFV để chỉ đoạn kháng thể Fv với liên kết disulfua giữa các phân tử đã xử lý.

Như được sử dụng ở đây, đoạn F(AB)₂ là đoạn kháng thể thu được từ việc phân cắt globulin miễn dịch bằng pepsin ở độ pH bằng 4,0-4,5; nó có thể được biểu hiện tái tổ hợp để tạo ra các đoạn tương đương.

Như được sử dụng ở đây, các đoạn Fab là các đoạn kháng thể thu được từ việc phân cắt globulin miễn dịch bằng papain; chúng có thể biểu hiện tái tổ hợp để tạo ra đoạn tương đương.

Như được sử dụng ở đây, scFVs để chỉ các đoạn kháng thể chứa chuỗi nhẹ biến đổi V, và chuỗi nặng biến đổi (VH) được liên kết cộng hoá trị bằng đoạn liên kết polypeptit theo trật tự bất kỳ. Đoạn liên kết này có độ dài sao cho hai vùng biến đổi được nối với nhau mà gần như không có sự can thiệp nào khác. Các đoạn liên kết bao gồm các gốc (Gly-Ser)_n với một số gốc Glu hoặc Lys được phân bố khắp nơi để gia tăng độ hoà tan.

Như được sử dụng ở đây, các kháng thể được nhân hóa để chỉ các kháng thể được cải biến để bao gồm các trình tự axit amin của người sao cho khi sử dụng cho người không gây ra phản ứng miễn dịch. Phương pháp điều chế các kháng thể này là

đã biết. Ví dụ, để tạo ra các kháng thể này, tế bào lai hoặc tế bào nhân chuẩn hoặc tế bào nhân sơ khác như tế bào E. coli hoặc CHO mà biểu hiện kháng thể đơn dòng này được thay thế bằng kỹ thuật ADN tái tổ hợp để biểu hiện kháng thể, trong đó thành phần axit amin của vùng không biến đổi được dựa trên các kháng thể của người. Các chương trình máy tính đã được thiết kế để nhận biết các vùng này.

Như được sử dụng ở đây, các kháng thể kép (diabodies) là scFV dime; các kháng thể này thường có đoạn liên kết peptit ngắn hơn ScFV, và chúng thường dime hoá.

Như được sử dụng ở đây, việc sản xuất tái tổ hợp có nghĩa là sử dụng phương pháp ADN tái tổ hợp bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết về sinh học phân tử để biểu hiện protein được mã hoá bằng ADN được tách dòng.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “đánh giá” nhằm bao gồm việc xác định định tính và định lượng theo nghĩa thu được giá trị tuyệt đối về hoạt tính của sHASEGP, hoặc một vùng của nó có mặt trong mẫu thử nghiệm, và cũng thu được chỉ số so sánh, tỷ lệ giá trị phần trăm, giá trị quan sát bằng mắt thường hoặc giá trị khác chỉ ra được mức độ hoạt tính. Việc đánh giá có thể là trực tiếp hoặc gián tiếp và các loại hoá chất trên thực tế được phát hiện không chỉ đương nhiên là chính sản phẩm phân giải protein mà còn có thể ví dụ là dẫn xuất của nó hoặc một số các chất khác nữa.

Như được sử dụng ở đây, hoạt tính sinh học để chỉ hoạt tính *in vivo* của hợp chất hoặc các đáp ứng sinh lý thu được sau khi sử dụng *in vivo* hợp chất, chế phẩm hoặc hỗn hợp khác. Vì vậy, hoạt tính sinh học bao gồm tác dụng chữa bệnh và hoạt tính dược học của các hợp chất, chế phẩm và hỗn hợp này. Hoạt tính sinh học có thể được theo dõi trong các hệ thống *in vitro* được thiết kế để thử nghiệm hoặc sử dụng các hoạt tính này. Vì vậy, với mục đích ở đây, hoạt tính sinh học của một luxiferaza là hoạt tính oxygenaza của nó, nhờ đó sau khi oxy hoá cơ chất, sẽ tạo ra ánh sáng.

Như được sử dụng ở đây, hoạt tính chức năng để chỉ polypeptit hoặc một phần của nó thể hiện một hoặc nhiều hoạt tính liên quan đến protein có độ dài đầy đủ.

Hoạt tính chức năng bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, hoạt tính sinh học, hoạt tính xúc tác hoặc hoạt tính enzym, tính kháng nguyên (khả năng liên kết hoặc cạnh tranh với polypeptit để liên kết với kháng thể kháng polypeptit), khả năng sinh

miễn dịch, khả năng tạo thành các multimer, khả năng liên kết đặc hiệu của thụ thể hoặc phối tử đối với polypeptit này.

Như được sử dụng ở đây, thể tiếp hợp để chỉ các hợp chất được đề cập đến ở đây bao gồm một hoặc nhiều sHASEGP, bao gồm sHASEGP, cụ thể là các vùng hyaluronidaza chuỗi đơn của nó, và một hoặc nhiều tác nhân đích. Các thể tiếp hợp này bao gồm các thể tiếp hợp được tạo ra bằng phương pháp tái tổ hợp ở dạng protein dung hợp, các thể tiếp hợp được tạo ra bằng phương pháp hoá học như kết hợp hoá học, ví dụ thông qua đó kết hợp với nhóm sulfhydryl và các thể tiếp hợp được tạo ra bằng phương pháp bất kỳ khác, nhờ đó ít nhất một sHASEGP hoặc một vùng của nó được liên kết trực tiếp hoặc gián tiếp với tác nhân đích thông qua một (các) đoạn liên kết.

Như được sử dụng ở đây, tác nhân đích là phân tử bất kỳ, như protein hoặc một phần hữu hiệu của nó, mà tạo ra khả năng liên kết đặc hiệu của thể tiếp hợp này với thụ thể trên bề mặt tế bào, phân tử này có thể thu nhận được thể tiếp hợp này hoặc một phần sHASEGP của nó. Tác nhân đích cũng có thể là tác nhân thúc đẩy hoặc tạo điều kiện cho việc tách ái lực hoặc tinh chế thể tiếp hợp này; gắn thể tiếp hợp này với bề mặt; hoặc phát hiện thể tiếp hợp này hoặc các phức chứa thể tiếp hợp này.

Như được sử dụng ở đây, thể tiếp hợp kháng thể dùng để chỉ thể tiếp hợp trong đó tác nhân đích là kháng thể.

Như được sử dụng ở đây, dẫn xuất hoặc chất tương tự của phân tử dùng để chỉ một phân tử được từ kiểu phân tử được cải biến.

Như được sử dụng ở đây, hợp chất với lượng hữu hiệu để chỉ điều trị bệnh cụ thể là một lượng đủ để cải thiện được hoặc trong một số trường hợp làm thuyên giảm được triệu chứng liên quan đến bệnh. Lượng này có thể được sử dụng ở dạng liều đơn hoặc có thể được sử dụng theo chế độ điều trị, do đó có hiệu quả chữa bệnh. Lượng này có thể điều trị được bệnh, nhưng thông thường, được sử dụng để cải thiện triệu chứng bệnh. Việc sử dụng lặp lại có thể được yêu cầu để đạt được hiệu quả cải thiện các triệu chứng mong muốn.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “tương đương” khi được sử dụng cho hai trình tự axit nucleic có nghĩa là hai trình tự đang nói đến này mã hoá cùng một trình tự axit amin hoặc protein tương đương. Khi thuật ngữ “tương đương” được sử dụng cho

hai protein hoặc peptit, điều này có nghĩa là hai protein hoặc peptit có trình tự axit amin hầu như tương tự nhau với một axit amin được thay thế duy nhất (như, nhưng không bị giới hạn ở, các thay thế bảo toàn được thể hiện trong Bảng 1, ở trên) nhưng hầu như không làm thay đổi hoạt tính hoặc chức năng của protein hoặc peptit này. Khi thuật ngữ “tương đương” dùng để chỉ đặc tính, đặc tính này không cần thiết phải có mặt ở cùng một mức độ (ví dụ, hai peptit có thể biểu hiện cùng loại hoạt tính enzym ở mức độ khác nhau), nhưng thường là hoạt tính này biểu hiện hầu như tương tự nhau. Thuật ngữ “bổ trợ” khi được sử dụng cho hai trình tự nucleotit, có nghĩa là hai trình tự nucleotit này có khả năng lai, thường là với sự bắt cặp nhầm ít hơn 25%, 15%, 5% hoặc 0% giữa hai nucleotit đối nhau. Nếu cần, phần trăm độ tương đồng sẽ là đặc hiệu. Thường là, hai phân tử được chọn lọc sao cho chúng sẽ lai trong các điều kiện ở mức độ nghiêm ngặt cao.

Như được sử dụng ở đây, tác nhân điều biến hoạt tính của protein hoặc biểu hiện của gen hoặc axit nucleic sẽ làm giảm hoặc làm tăng hoặc theo cách khác làm thay đổi hoạt tính của protein này hoặc theo một số cách sẽ điều chỉnh lên hoặc xuống hoặc theo cách khác làm thay đổi biểu hiện của axit nucleic trong tế bào.

Như được sử dụng ở đây, chất ức chế hoạt tính của sHASEGP bao gồm chất bất kỳ ức chế hoặc làm giảm việc sản xuất, (các) cải biến sau dịch mã, giảm phân, hoặc định vị màng của sHASEGP hoặc chất bất kỳ ngăn cản hoặc làm giảm hiệu quả phân giải protein của sHASEGP, cụ thể là ở dạng chuỗi đơn trong thử nghiệm sàng lọc *in vitro*.

Như được sử dụng ở đây, phương pháp điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh về khối u có nghĩa là, bất kỳ triệu chứng nào như khối u này, dạng di căn của nó, dạng phân bố mạch của khối u hoặc các thông số khác đặc trưng cho bệnh được giảm, được cải thiện, được ngăn ngừa, ở trạng thái thuyên giảm, hoặc được duy trì ở trạng thái thuyên giảm. Cũng có nghĩa là các dấu hiệu phân biệt của bệnh về khối u và dạng di căn có thể được loại bỏ, được làm giảm hoặc ngăn ngừa bằng việc điều trị này. Các ví dụ không giới hạn về các dấu hiệu phân biệt bao gồm việc thoái hoá không kiểm soát được của màng cơ bản và chất nền ngoại bào gần tâm, di gen, phân chia và tạo hình của các tế bào nội bì thành các mao quản có chức năng mới, và duy trì các mao quản có chức năng này.

Như được sử dụng ở đây, muối dược dụng, este hoặc các dẫn xuất khác của thể tiếp hợp này bao gồm các muối, este hoặc các dẫn xuất bất kỳ có thể được dễ dàng điều chế được bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết để tạo ra các dẫn xuất này và để tạo ra các hợp chất có thể được sử dụng cho người và động vật mà gần như không có các tác dụng gây độc và có hoạt tính dược học hoặc hoạt tính của dược chất.

Như được sử dụng ở đây, tiền dược chất là hợp chất mà sau khi được sử dụng *in vivo*, sẽ được chuyển hoá hoặc theo cách khác được biến đổi thành dạng hợp chất có hoạt tính dược học hoặc chữa bệnh. Để tạo ra tiền dược chất, hợp chất có hoạt tính dược học được cải biến sao cho hoạt chất này được tái tạo bằng các quá trình chuyển hoá. Tiền dược chất này có thể được thiết kế để làm thay đổi độ ổn định trao đổi chất hoặc đặc tính vận chuyển của dược chất để hạn chế các tác dụng phụ hoặc khả năng gây độc, để cải thiện hương vị của dược chất hoặc để thay thế các đặc tính hoặc các tính chất khác của dược chất. Do hiểu biết về các quá trình dược động học và quá trình chuyển hoá dược chất *in vivo*, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật có thể tạo ra các tiền dược chất của hợp chất này một khi hợp chất có hoạt tính dược học này đã được biết đến. (ví dụ xem ấn phẩm: Nogrady, (1985) Medicinal Chemistry A Biochemical Approach, Oxford University Press, New York, pages 388-392).

Như được sử dụng ở đây, một dược chất được nhận biết bằng các phương pháp sàng lọc được đề cập đến ở đây để chỉ hợp chất bất kỳ là ứng viên để sử dụng làm dược chất chữa bệnh hoặc làm dược chất dẫn cho một phác đồ điều trị. Các hợp chất này có thể là các phân tử nhỏ bao gồm các phân tử hữu cơ nhỏ, các peptit, các giả peptit, các phân tử đối nghĩa hoặc ARN sợi đôi (dsRNA-double strand RNA), như ARN nhiễu (RNAi-RNA interference), các kháng thể, các đoạn kháng thể, các kháng thể tái tổ hợp và các hợp chất khác có thể đóng vai trò làm các chất ứng viên dược chất hoặc các hợp chất dẫn.

Như được sử dụng ở đây, giả peptit là một hợp chất bất chước cấu hình và các đặc điểm hoá học lập thể nhất định của một dạng peptit cụ thể có hoạt tính sinh học. Thông thường các giả peptit được tạo ra để bắt chước các tính chất mong muốn nhất định của một hợp chất, nhưng không phải là các tính chất không mong muốn như độ mềm dẻo, dẫn đến làm mất cấu hình có hoạt tính sinh học và phá vỡ liên kết. Các giả peptit có thể điều chế được từ các hợp chất có hoạt tính sinh học bằng cách thay thế

các nhóm nhất định hoặc các liên kết tạo ra các tính chất không mong muốn với các hiện tượng đẳng cấu điện tử sinh học. Hiện tượng đẳng cấu điện tử sinh học là đã biết đối với các người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật. Ví dụ, hiện tượng đẳng cấu điện tử sinh học của metylen CH_2S được sử dụng để thay thế amit trong chất tương tự enkephalin (ví dụ xem ấn phẩm: Spatola (1983) pp. 267-357 in Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides, and Proteins, Weinstein, Ed. volume 7, Marcel Dekker, New York). Morphin, mà có thể được sử dụng qua đường miệng là hợp chất dạng giả peptit của peptit endorphin. Với mục đích ở đây, các peptit dạng vòng cũng được bao gồm trong các giả peptit.

Như được sử dụng ở đây, vùng trình tự khởi động hoặc yếu tố khởi động để chỉ đoạn ADN hoặc ARN điều khiển phiên mã của ADN hoặc ARN mà được liên kết chức năng với nó. Vùng trình tự khởi động bao gồm các trình tự đặc hiệu đủ để nhận biết, liên kết và bắt đầu phiên mã ARN polymeraza.

Phần này của vùng trình tự khởi động được dùng để chỉ trình tự khởi động. Ngoài ra, vùng trình tự khởi động này bao gồm các trình tự điều biến hoạt tính của ARN polymeraza bắt đầu nhận biết, liên kết và phiên mã. Trình tự này có thể đóng vai trò là cis hoặc có thể đáp ứng với các yếu tố đóng vai trò là trans. Trình tự khởi động, phụ thuộc vào bản chất của sự điều chỉnh có thể là cơ định hoặc được điều chỉnh. Các trình tự khởi động điển hình được tính đến để sử dụng trong các sinh vật chưa nhân chuẩn bao gồm các trình tự khởi động của thực khuẩn thể T7 và T3.

Như được sử dụng ở đây, thụ thể để chỉ phân tử mà có ái lực đối với phối tử đã nêu. Các thụ thể có thể là các phân tử có trong tự nhiên hoặc là phân tử tổng hợp. Các thụ thể cũng để chỉ các kháng phối tử trong lĩnh vực này. Như được sử dụng ở đây, thụ thể và kháng phối tử này có thể dùng thay thế cho nhau được. Các thụ thể có thể được sử dụng ở tình trạng không được thay thế hoặc ở dạng kết cụm với các loại khác. Các thụ thể có thể được liên kết cộng hoá trị hoặc không cộng hoá trị, hoặc tiếp xúc tự nhiên với các chất liên kết theo cách trực tiếp hoặc gián tiếp thông qua chất liên kết đặc hiệu hoặc gen liên kết. Ví dụ về các thụ thể bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở: kháng thể, thụ thể màng tế bào, thụ thể bề mặt và thụ thể bên trong (internalizing receptor), kháng thể đơn dòng và phản ứng kháng huyết thanh với các thể xác định kháng nguyên đặc hiệu như trên virus, tế bào hoặc các vật liệu khác, dược chất,

polynucleotit, axit nucleic, peptit, các nhân tố, lectin, đường, polysacarit, tế bào, các màng tế bào, nội bào quan.

Ví dụ về các thụ thể và các ứng dụng để sử dụng các thụ thể này bao gồm nhưng không bị giới hạn ở: a) enzym: các protein hoặc các enzym vận chuyển đặc hiệu chủ yếu đối với các vi sinh vật sống sót, có thể đóng vai trò làm đích để chọn lọc kháng sinh [phối tử]; b) kháng thể: nhận biết vị trí liên kết phối tử trên phân tử kháng thể này mà kết hợp với epitop của kháng nguyên cần quan tâm có thể được nghiên cứu; xác định một trình tự mà bất chức epitop của kháng nguyên có thể dẫn đến tạo ra vacxin chứa chất sinh miễn dịch được dựa trên một hay nhiều trình tự này hoặc dẫn đến tạo ra các tác nhân chẩn đoán có liên quan hoặc các hợp chất hữu hiệu trong điều trị bệnh như đối với các bệnh tự miễn dịch; c) axit nucleic: nhận biết phối tử như protein hoặc ARN, các vị trí liên kết; d) polypeptit xúc tác: các polyme, bao gồm các polypeptit có khả năng thúc đẩy phản ứng hoá học liên quan đến việc chuyển hoá của một hay nhiều chất phản ứng thành một hay nhiều sản phẩm; các polypeptit này thường bao gồm vị trí liên kết đặc hiệu cho ít nhất một chất phản ứng hoặc chất phản ứng trực tiếp và một nhóm chức hoạt động gần nhất với vị trí liên kết này, trong đó nhóm chức này có khả năng cải biến hoá học chất phản ứng liên kết (ví dụ xem: patent Mỹ số 5,215,899); e) thụ thể hormon: xác định các phối tử mà liên kết với các thụ thể bằng ái lực cao, là hữu hiệu trong việc tạo ra các liệu pháp thay thế hormon; ví dụ, việc xác định các phối tử mà liên kết được với các thụ thể này có thể dẫn đến tạo ra các dược chất để kiểm soát huyết áp; và f) thụ thể opiat: xác định các phối tử mà liên kết với các thụ thể opiat trong não là hữu hiệu để tạo ra hợp chất ít gây nghiện thay thế cho morphin và các dược chất liên quan.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “mẫu” để chỉ mẫu bất kỳ có thể chứa chất phân tích mà thử nghiệm chất phân tích cần đến. Mẫu này có thể là mẫu sinh học như dịch lỏng sinh học hoặc mô sinh học. Ví dụ về các dịch lỏng sinh học bao gồm nước tiểu, máu, huyết tương, huyết thanh, nước bọt, tinh dịch, phân, đờm, nước dãi, dịch não tủy, nước mắt, dịch nhầy, tinh trùng, nước ối hoặc các dịch tương tự. Các mô sinh học là tập hợp các tế bào, thường là loại tế bào cụ thể cùng với chất gian bào của chúng tạo thành một trong các vật liệu cấu trúc của người, động vật, thực vật, vi khuẩn, nấm hoặc cấu trúc virus, bao gồm các mô liên kết, biểu mô, mô cơ và mô thần

kinh. Ví dụ về các mô sinh học cũng bao gồm các cơ quan, các khối u, hạch bạch huyết, các động mạch và các tế bào riêng biệt.

Như được sử dụng ở đây: điều kiện lai nghiêm ngặt để xác định tỷ lệ phần trăm bắt cặp nhằm là như sau: 1) mức độ nghiêm ngặt cao: 0,1xSSPE, 0,1% SDS, 65°C, 2) mức độ nghiêm ngặt trung bình: 0,2xSspE, 0,1% SDS, 50°C, 3) mức độ nghiêm ngặt thấp: 1,0xSspE, 0,1% SDS, 50°C. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật biết rằng bước rửa này là để chọn lọc các thể lai ổn định và cũng biết được thành phần của SspE (ví dụ, xem ấn phẩm: Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis, in: *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold spring Harbor Laboratory Press 1989 Vol 3, p. B. 13, cũng xem các bản liệt kê danh mục mô tả các dung dịch được sử dụng thông thường trong phòng thí nghiệm). SspE là NaCl 0,18 được tạo đệm phosphat ở độ pH=7,4. Ngoài ra, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này nhận thấy rằng độ ổn định của thể lai được xác định bằng T_m là hàm số của nồng độ ion natri và nhiệt độ ($T_m=81,5^{\circ}\text{C}-16,6+0,41 (\%G+C)-600/L$) sao cho các thông số duy nhất trong các điều kiện rửa quan trọng cho độ ổn định của thể lai là nồng độ ion natri trong SspE (hoặc SSC) và nhiệt độ.

Được hiểu rằng các điều kiện nghiêm ngặt tương đương có thể đạt được bằng cách sử dụng các dung dịch đệm, muối và nhiệt độ thay thế. Bằng các ví dụ và không nhằm giới hạn, các phương pháp sử dụng các điều kiện ở mức độ nghiêm ngặt thấp là như sau (cũng xem Shilo and Weinberg, *Proc. Natl. Acad Sci USA* 78: 6789-6792 (1981)): Các dịch lọc chứa ADN được xử lý sơ bộ trong 6 giờ ở nhiệt độ 40°C trong dung dịch chứa 35% formamit, 5X SSC, 50mM Tris-HCl (pH=7,5), 5mM EDTA, 0,1% PVP, 0,1% Ficoll 1% BSA, và 500ug/ml ADN của tinh trùng cá hồi được làm biến tính (10x), SSC là 1,5M natri clorua, và 0,15M natri xitrat, được điều chỉnh đến độ pH bằng 7.

Quá trình lai được thực hiện trong dung dịch tương tự với sự cải biến sau: 0,02% PVP, 0,02% Ficoll 0,2% BSA, 100VG/M ADN của tinh trùng, 10% (khối lượng/thể tích) dextran sulfat, và 5-20 X 10⁶ cpm đoạn dò được đánh dấu 32P được sử dụng. Bộ lọc được ủ trong hỗn hợp lai trong thời gian từ 18-20 giờ ở nhiệt độ 40°C và sau đó được rửa trong thời gian 1,5 giờ ở nhiệt độ 55°C trong dung dịch chứa 2X SSC, 25mM Tris-HCL (độ pH=7,4), 5mM EDTA, và 0,1% SDS. Dung dịch rửa này được thay thế bằng dung dịch mới và ủ thêm 1,5 giờ ở nhiệt độ 60°C. Bộ lọc được thấm khô

và đem chụp ảnh phóng xạ tự ghi. Nếu cần, bộ lọc được rửa 3 lần ở nhiệt độ 65-68°C và lại được đem chụp phim. Các điều kiện khác của lai ở mức độ nghiêm ngặt thấp mà có thể được sử dụng là đã biết trong lĩnh vực, ví dụ được sử dụng đối với các quá trình lai chéo.

Bằng các ví dụ và không nhằm giới hạn, các phương pháp sử dụng các điều kiện lai ở mức độ nghiêm ngặt vừa phải bao gồm ví dụ, nhưng không bị giới hạn ở, các phương pháp sử dụng các điều kiện ở mức độ nghiêm ngặt vừa phải như sau: các bộ lọc ADN được xử lý sơ bộ trong 6 giờ ở nhiệt độ 55°C trong dung dịch chứa 6X SSC, 5X dung dịch Denhart, 0,5% SDS và 100ug/ml ADN tinh trùng của cá hồi được làm biến tính. Quá trình lai được thực hiện trong dung dịch tương tự và 5-20 X 10⁶ cpm đoạn dò được đánh dấu 32P được sử dụng. Các bộ lọc được ủ trong hỗn hợp lai trong thời gian từ 18-20 giờ ở nhiệt độ 55°C và rồi rửa sạch hai lần trong 30 phút ở nhiệt độ 60°C trong dung dịch chứa 1X SSC và 0,1% SDS. Các bộ lọc được thấm khô và đem chụp ảnh phóng xạ tự ghi. Các điều kiện nghiêm ngặt vừa phải khác mà có thể được sử dụng là đã biết trong lĩnh vực này. Tiến hành rửa bộ lọc ở 37°C trong 1 giờ trong dung dịch chứa 2X SSC, 0,1% SDS.

Bằng các ví dụ và không nhằm giới hạn, các phương pháp sử dụng các điều kiện nghiêm ngặt cao là như sau: lai sơ bộ bộ lọc chứa ADN được tiến hành trong 8 giờ tới qua đêm ở nhiệt độ 65°C trong dung dịch đệm bao gồm 6X SSC, 50mM Tris-HCl (độ pH = 7,5), 1mM EDTA, 0,02 % PVP, 0,02% Ficoll, 0,02% BSA, và 500ug/ml ADN tinh trùng của cá hồi được làm biến tính. Các bộ lọc được lai trong 48 giờ ở nhiệt độ 65°C trong hỗn hợp lai sơ bộ chứa 100ug/ml ADN tinh trùng của cá hồi được làm biến tính và 5-20 X 10⁶ cpm đoạn dò được đánh dấu 32P được sử dụng. Tiến hành rửa bộ lọc ở 37°C trong 1 giờ trong dung dịch chứa 2X SSC, 0,01% PVP, 0,01% Ficoll, 0,01% BSA. Tiếp theo là rửa trong 0,1X SSC ở nhiệt độ 50°C trong 45 phút trước khi chụp ảnh phóng xạ tự ghi. Các điều kiện lai ở mức độ nghiêm ngặt cao khác mà có thể được sử dụng là đã biết trong lĩnh vực này.

Thuật ngữ tương tự, gần như đồng nhất hoặc gần như tương đồng khác nhau với phạm vi như được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này và thường có nghĩa tương đồng ít nhất 60%, 70%, tốt hơn là có nghĩa tương đồng ít nhất 80%, 85% hoặc tốt hơn nữa là tương đồng ít nhất 90% và tốt nhất là tương đồng ít nhất 95%.

Như được sử dụng ở đây, gần như tương đồng với một sản phẩm có nghĩa là tương tự đủ sao cho tính chất cần thiết không bị thay đổi đủ để sản phẩm gần như tương đồng có thể được sử dụng thay thế sản phẩm này.

Như được sử dụng ở đây, gần như tinh khiết có nghĩa là tương đồng đủ để dường như không có tạp chất mà dễ dàng phát hiện được khi được xác định bằng phương pháp phân tích chuẩn, như sắc ký lớp mỏng (TLC), điện di trên gel và sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC), được sử dụng bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật để đánh giá độ tinh khiết, hoặc độ tinh khiết đủ để khi tinh chế tiếp sẽ không làm thay đổi theo cách nhận biết được về tính chất vật lý và hoá học, như các hoạt tính enzym và sinh học của các chất này. Các phương pháp tinh chế các hợp chất để tạo ra được các hợp chất gần như tinh khiết về mặt hoá học là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật. Hợp chất gần như tinh khiết về mặt hoá học có thể, tuy nhiên là, hỗn hợp của các chất đồng phân lập thể hoặc các chất đồng phân. Trong trường hợp này, việc tinh chế tiếp có thể làm gia tăng hoạt tính đặc hiệu của hợp chất này.

Như được sử dụng ở đây, tế bào đích để chỉ tế bào biểu hiện sHASEGP *in vivo*.

Như được sử dụng ở đây, chất thử nghiệm (hoặc hợp chất thử nghiệm) để chỉ hợp chất được xác định về mặt hoá học (ví dụ, các phân tử hữu cơ, các phân tử vô cơ, các phân tử vô cơ/hữu cơ, các protein, các peptit, các axit nucleic, các oligonucleotit, các lipid, các polysaccharit, các saccharit, hoặc các thể lai trong số các phân tử này như các glycoprotein, v.v.) hoặc hỗn hợp của các hợp chất (ví dụ, thư viện của các hợp chất thử nghiệm, các dịch chiết tự nhiên hoặc các phần dịch nuôi cấy, v.v.) có tác dụng lên sHASEGP, cụ thể là dạng chuỗi đơn bao gồm vùng hyaluronidaza hoặc một phần đủ để có hoạt tính, như được xác định bằng phương pháp *in vitro*, như các thử nghiệm được đề cập đến ở đây.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ tác nhân điều trị, chế độ điều trị, chất bảo vệ phóng xạ hoặc tác nhân hoá liệu pháp có nghĩa là các dược chất thông thường và các liệu pháp điều trị bằng dược chất, bao gồm vacxin, mà đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các tác nhân liệu pháp phóng xạ là đã biết trong lĩnh vực này.

Như được sử dụng ở đây, điều trị có nghĩa là theo cách bất kỳ trong đó các triệu chứng của tình trạng bệnh, rối loạn hoặc bệnh được thuyên giảm hoặc theo cách khác được thay đổi một cách hữu hiệu.

Điều trị cũng có nghĩa là bao gồm việc sử dụng các dược phẩm ở đây để chữa bệnh.

Như được sử dụng ở đây, vector (hoặc plasmit) để chỉ các yếu tố riêng biệt được sử dụng để đưa axit nucleic khác loại vào trong các tế bào để biểu hiện hoặc sao chép axit nucleic này. Các vector điển hình vẫn có episom, nhưng có thể được thiết kế để đính gắn hiệu quả một gen hoặc một phần của nó vào trong nhiễm sắc thể của hệ gen. Cũng được dự tính là các vector là các nhiễm sắc thể khuếch đại, như nhiễm sắc thể khuếch đại của nấm men và các nhiễm sắc thể khuếch đại của người. Việc lựa chọn và sử dụng các chất dẫn này là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật. Một vector biểu hiện bao gồm vector có khả năng biểu hiện ADN được liên kết chức năng với các trình tự điều chỉnh, như các vùng trình tự khởi động, mà có khả năng biểu hiện hữu hiệu các đoạn ADN này. Vì vậy, vector biểu hiện dùng để chỉ cấu trúc ADN, hoặc ARN tái tổ hợp, như plasmit, thể thực khuẩn hoặc virus tái tổ hợp hoặc vector khác mà sau khi đưa vào trong tế bào chủ thích hợp, dẫn đến biểu hiện ADN được tách dòng. Các vector biểu hiện thích hợp là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này và bao gồm các vector có thể sao chép được trong các tế bào nhân chuẩn và/hoặc các tế bào nhân sơ và các vector vẫn có episom hoặc các vector đính gắn vào trong hệ gen của tế bào chủ.

Như được sử dụng ở đây, trình tự liên kết protein để chỉ trình tự protein hoặc peptit có khả năng liên kết đặc hiệu với các trình tự protein hoặc peptit khác nói chung, với một loạt các trình tự protein hoặc peptit hoặc với trình tự protein hoặc peptit cụ thể.

Như được sử dụng ở đây, nhãn đánh dấu epitop để chỉ đoạn ngắn gồm các gốc axit amin tương ứng với epitop tạo điều kiện cho việc phân tích sinh hóa và miễn dịch tiếp theo của protein hoặc peptit được đánh dấu epitop. Việc đánh dấu epitop đạt được bằng cách đưa trình tự đánh dấu epitop với trình tự mã hoá protein này vào trong vector biểu hiện thích hợp. Các protein được đánh dấu epitop có thể được tinh chế ái lực bằng cách sử dụng các kháng thể đặc hiệu cao đối với các nhãn đánh dấu này.

Như được sử dụng ở đây, trình tự liên kết với kim loại để chỉ trình tự protein hoặc peptit có khả năng liên kết đặc hiệu với các kim loại nói chung, với một loạt các ion kim loại hoặc với một ion kim loại cụ thể.

Như được sử dụng ở đây, tổ hợp để chỉ mối liên quan bất kỳ giữa hai chất hoặc nhiều hơn.

Như được sử dụng ở đây, chế phẩm để chỉ hỗn hợp bất kỳ. Nó có thể là dung dịch, dạng huyền phù, dịch lỏng, bột nhão, dạng nước, dạng không nước hoặc tổ hợp bất kỳ của nó.

Như được sử dụng ở đây, dịch lỏng để chỉ hỗn hợp bất kỳ có thể chảy được. Vì vậy, dịch lỏng bao gồm các thành phần ở dạng bán rắn, dạng bột nhão, dạng dung dịch, hỗn hợp nước, gel, nước thơm, kem và các thành phần khác.

Như được sử dụng ở đây, dịch chiết tế bào để chỉ chế phẩm hoặc phần thu được từ tế bào bị phá vỡ hoặc làm tan.

Như được sử dụng ở đây, tác nhân được nói đến là được lựa chọn ngẫu nhiên khi tác nhân này được lựa chọn một cách ngẫu nhiên mà không xem xét đến các trình tự đặc hiệu bao gồm liên quan đến một protein duy nhất hoặc với các cơ chất có liên quan của nó, phần đi cùng liên kết, v.v.. Ví dụ về các tác nhân được lựa chọn ngẫu nhiên là sử dụng thư viện hoá học hoặc thư viện tổ hợp peptit, hoặc canh sinh trưởng của sinh vật hoặc môi trường nuôi cấy có điều kiện.

Như được sử dụng ở đây, một tác nhân được nói đến là được lựa chọn hoặc được tạo ra hợp lý khi tác nhân này được lựa chọn trên cơ sở không ngẫu nhiên tính đến trình tự của vị trí đích và/hoặc cấu hình của nó liên quan đến tác dụng của tác nhân này. Như được mô tả trong các Ví dụ, các vị trí liên kết được đưa ra đối với các vị trí hyaluronidaza và các vị trí (xúc tác) trong glycoprotein có SEQ ID NO: 1 hoặc SEQ ID NO: 4. Các tác nhân có thể được lựa chọn hợp lý hoặc được tạo ra hợp lý bằng cách sử dụng các trình tự peptit tạo ra các vị trí này. Ví dụ, tác nhân peptit được lựa chọn hợp lý có thể là một peptit có trình tự axit amin đồng nhất với ATP hoặc các vị trí hoặc vùng liên kết calmodulin.

Các oligosacarit được xem xét có một đầu khử và một đầu không khử, dù bất kỳ thể nào sacarit này ở đầu khử trong thực tế là đường khử. Theo danh pháp được chấp

nhận, các oligosacarit được mô tả ở đây với đầu không khử ở bên trái và đầu khử ở bên phải. Tất cả các oligosacarit được mô tả ở đây được mô tả với tên hoặc chữ viết tắt đối với sacarit không khử (ví dụ, Gal), tiếp theo là cấu hình của liên kết glycosidic (.alpha. hoặc beta.), liên kết trong vòng này, vị trí vòng của sacarit khử liên quan đến liên kết này, và sau đó là tên hoặc chữ viết tắt của sacarit khử (ví dụ, GlcNAc). Mỗi liên kết giữa hai đường có thể được biểu hiện, ví dụ, như 2,3 2.fw darw.3, hoặc (2,3). Mỗi sacarit là một pyranoza.

Như được sử dụng ở đây, gốc đường được liên kết ở vị trí N để chỉ oligosacarit được gắn với sHASEGP thông qua nitơ amit của các gốc Asn. các oligosacarit được liên kết ở vị trí N nằm trong một số loại chính (oligomanoza, phức chất, thể lai được sulfat hoá), tất cả chúng có nhân (Man)₃-GlcNAc-GlcNAc được gắn thông qua nitơ amit của các gốc Asn mà nằm trong các trình tự Asn-Xaa-Thr/Ser (trong đó Xaa không phải là Pro). Các vị trí được liên kết ở vị trí N thường được nhận biết gián tiếp bằng sự xuất hiện các vòng “trống” trong khi xác định trình tự. Việc nhận biết dương tính có thể được thực hiện sau khi giải phóng oligosacarit này bằng PNGaza F, chuyển hoá Asn được glycosylat thành Asp. Sau khi giải phóng PNGaza F, các oligosacarit được liên kết ở vị trí N có thể được tinh chế bằng cách sử dụng sắc ký Bio-Gel P-6, với nhóm oligosacarit thu gom này được đem sắc ký trao đổi anion điều chế có độ pH cao (high pH anion exchange chromatography-HPAEC) (Townsend et al., (1989) Anal. Biochem. 182, 1-8). Các chất đồng phân oligosacarit nhất định có thể được phân giải bằng cách sử dụng HPAEC. Các gốc Fucoza sẽ chuyển dời các vị trí rửa giải sớm hơn trong sắc ký HPEAC, trong khi đó các gốc axit sialic bổ sung sẽ làm gia tăng thời gian duy trì. Việc xử lý đồng thời các glycoprotein này có các cấu trúc oligosacarit đã biết (ví dụ, fetuin của bò, glycoprotein axit a-1, lòng trắng trứng, ARNaza B, transferin) có thể tạo điều kiện nhận biết các đỉnh oligosacarit. Các oligosacarit được thu gom có thể được mô tả đặc tính bằng tổ hợp các phân tích mỗi liên kết trong quá trình metyl hoá và các phân tích về thành phần (Waegheet et al., (1983) Carbohydr Res. 123, 281-304.), với các cấu hình anome được nhận biết bằng phép nghiên cứu phổ NMR (Van Halbeek (1993) in Methods Enzymol 230).

Theo cách khác, các oligosacarit có thể được nhận biết bằng cách điện di các hydrat cacbon có phát huỳnh quang (fluorescence assisted carbohydrate electrophoresis-FACE) Callewaert et al. (2001) Glycobiology 11, 275-281.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “axit sialic” dùng để chỉ thành viên bất kỳ trong họ đường có 9 nguyên tử cacbon được carboxyl hoá. Thành viên thông thường nhất trong họ axit sialic này là axit N-axetylneuraminic(2-keto-5-axetamindo-3,5-dideoxy-D-glyxero-D-galactononulopyranos-1-onic (thường được viết tắt là Neu5Ac, NeuAc, hoặc NANA). Thành viên thứ hai của họ này là axit N-glycolyl-neuraminic (Neu5Gc hoặc NeuGc), trong đó nhóm N-axetyl của NeuAc được hydroxyl hoá. Thành viên thứ ba của họ axit sialic này là axit 2-keto-3-deoxy-nonulosonic (KDN) (Nadano et al. (1986) J. Biol. Chem. 261: 11550-11557; Kanamori et al. (1990) J. Biol. Chem. 265: 21811-21819). Cũng được bao gồm là axit sialic được thế ở vị trí 9 như 9-O-C.sub.1-C.sub.6 axyl-Neu5Ac giống như 9-O-lactyl-Neu5Ac hoặc 9-O-axetyl-Neu5Ac, 9-deoxy-9-flo-NeuAc và 9-azido-9-deoxy-NeuAc. Đối với họ axit sialic này, xem, ví dụ ấn phẩm Varki (1992) Glycobiology 2: 25-40; Sialic Acids: Chemistry, Metabolism and Function, R. Schauer, Ed. (springer-Verlag, N.Y. (1992)). Việc tổng hợp và sử dụng các hợp chất axit sialic trong quá trình sialat hoá được bộc lộ trong WO 92/16640, công bố ngày 1.10.1992.

Như được sử dụng ở đây, PNGaza để chỉ N-glycosidaza F đặc hiệu peptit Asparagin, như peptit-N-glycosidaza F của vi khuẩn *Flavobacterium maningoseptum*. Enzym PNGASB được đặc trưng bởi tính đặc hiệu của chúng với các oligosacarit được liên kết ở vị trí N hơn là được liên kết tại vị trí O. Việc mô tả đặc tính hiệu quả của PNGASE có thể được xác định bằng cách điện di trên gel SDS PAGE hoặc điện di hydrat cacbon có phát huỳnh quang.

Như được sử dụng ở đây, quá trình sialat hoá hầu như được kết thúc để chỉ các oligosacarit được liên kết ở vị trí N có đầu tận cùng là gốc axit sialic ở dạng gốc đường. Các axit sialic ở đầu tận cùng có thể được nhận biết bằng phân tích FACE các hydrat cacbon được giải phóng sau khi xử lý bằng neurominidaza.

Tuổi thọ của các glycoprotein tuần hoàn trong máu là cao phụ thuộc thành phần và cấu trúc của các nhóm hydrat cacbon được liên kết ở vị trí N của nó. Thực tế là việc sử dụng thích hợp trực tiếp glycoprotein để chữa bệnh là dùng ngoài đường tiêu hoá. Nói chung, thời gian bán thải tuần hoàn tối đa của glycoprotein đòi hỏi các nhóm hydrat cacbon được liên kết ở vị trí N ở đầu tận cùng của trình tự NeuAc-Gal-GlcNAc. Khi không có axit sialic (NeuAc) ở đầu tận cùng, glycoprotein này nhanh chóng bị thanh thải từ máu bằng cơ chế bao gồm nhận biết các gốc N-axetyl-galactosamin

(GalNAc) hoặc galactoza (Gal) nằm bên trong (Goochee et al. (1991) Biol/Technology 9: 1347-1355). Với lý do này, việc đảm bảo sự có mặt của axit sialic ở đầu tận cùng trên nhóm hydrat cacbon được liên kết ở vị trí N của các glycoprotein để chữa bệnh là vấn đề rất quan trọng khi phát triển thương mại.

Các glycoprotein tuần hoàn được tiếp xúc với sialidaza (hoặc neuraminidaza) mà có thể loại bỏ các gốc axit sialic ở đầu tận cùng. Điển hình là việc loại bỏ axit sialic này sẽ làm bộc lộ ra các gốc galactoza, các gốc này được nhận biết và được liên kết bằng các thụ thể đặc hiệu galactoza trong các tế bào gan (xem ấn phẩm Ashwel and Harford (1982) Ann. Rev. Biochem. 51: 531). Gan cũng chứa các thụ thể đặc hiệu với đường khác mà gián tiếp loại bỏ các glycoprotein từ hệ tuần hoàn. Các thụ thể có tính đặc hiệu này cũng bao gồm N-axetylglucosamin, manosa, fucoza, phosphomanoza. Các glycoprotein được thanh thải bởi các thụ thể galactoza của tế bào gan trải qua quá trình thoái hoá đáng kể mà sau đó đi vào mật; các glycoprotein được thanh thải bằng thụ thể manosa của các tế bào Kupffer đi vào hệ thống lưới nội mô (xem ấn phẩm Ashwel and Harford (1982) Ann. Rev. Biochem. 51: 53).

Như được sử dụng ở đây, hoạt tính trung hoà dùng để chỉ glycoprotein sHASEGP có hoạt tính xúc tác đối với cơ chất glycosaminoglycan *in vitro* ở độ pH nằm trong khoảng từ 5-8 trong điều kiện lượng muối nhỏ hơn 150mM và chất đệm nhỏ hơn 50mM.

Như được sử dụng ở đây, dung dịch được làm ổn định để chỉ sHASEGP vẫn duy trì được trên 60% hoạt tính ban đầu của nó sau khi được bảo quản ở điều kiện nhiệt độ phòng, thời gian 30 ngày.

Như được sử dụng ở đây, trừ khi có quy định khác, đơn vị được biểu hiện ở dạng các đơn vị giảm độ đục (turbidity reducing units-TRU). Một TRU được xác định là lượng hoạt tính enzym hyaluronidaza cần để làm giảm độ đục của dung dịch axit hyaluronic được axit hoá và là tương đương với U.S.P./ các đơn vị công thức quốc gia (NF XIII) (NFU). Thử nghiệm enzym giống ELISA được mô tả ở đây có thể liên quan đến đơn vị TRU, NFU và U.S.P. thông qua đường cong tiêu chuẩn của mẫu hyaluronidaza (ví dụ, tiêu chuẩn USP và WHO) được tiêu chuẩn hoá thông qua đơn vị U.S.P. Vì vậy, các hoạt tính enzym được xác định bằng thử nghiệm enzym giống

ELISA là TRU tương đối trên thực tế, vì hoạt tính enzym này trên thực tế không được đánh giá bằng thử nghiệm độ đục (Dorfman et al., 1948, J. Biol. Chem. 172: 367).

Như được sử dụng ở đây, hiệu quả được xác định bằng lượng protein sHASEGP cần để làm thoái hoá cơ chất *in vitro* dựa trên đơn vị làm giảm độ đục hoặc đơn vị làm giảm độ đục tương đối.

Như được sử dụng ở đây, hoạt tính đặc hiệu để chỉ các đơn vị hoạt tính trên 1mg protein. Hàm lượng protein sHASEGP được xác định bằng độ hấp thụ của dung dịch sHASEGP ở bước sóng 280nm khi cho hệ số tắt là khoảng 1,70 theo đơn vị $M^{-1} cm^{-1}$.

Polyetylen glycol (PEG) được sử dụng rộng rãi trong các vật liệu sinh học, công nghệ sinh học và dược phẩm chủ yếu do PEG là polyme tan trong nước, tương hợp về mặt sinh học, không độc và không gây miễn dịch (Zhao and Harris, ACS Symposium Series 680: 458-72, 1997). Trong phạm vi phân bố dược chất, dẫn xuất PEG được sử dụng rộng rãi trong môi liên kết cộng hoá trị (tức là “PEG hoá”) với protein để làm giảm khả năng sinh miễn dịch phân giải protein và thanh thải được qua thận và làm tăng độ hoà tan (Zalipsky, Adv. Drug Del. Rev. 16: 157-82, 1995). Tương tự, PEG được gắn với các dược chất có khối lượng phân tử thấp, tương đối kỵ nước để làm tăng độ hoà tan, làm giảm độc tính và biến đổi khả năng phân bố sinh học. Điển hình là, các dược chất được PEG hoá được tiêm ở dạng dung dịch.

Ứng dụng có liên quan gần nhất là việc tổng hợp mạng lưới PEG liên kết chéo có thể thoái hoá được hoặc các chế phẩm để sử dụng phân bố dược chất do có rất nhiều các chất hoá học tương tự được sử dụng để tạo ra mạng lưới có thể thoái hoá được, các chất mang dược chất hoà tan cũng có thể được sử dụng để tạo ra các gen có thể thoái hoá được (Sawhney et al., Macromolecules 26: 581-87, 1993). Cũng biết rằng các phức chất giữa các đại phân tử có thể được tạo thành bằng cách trộn các dung dịch của 2 polyme hỗ trợ. Các phức chất này thường được làm ổn định bằng phương pháp tĩnh điện (polyanion-polycation) và/hoặc liên kết hydro (poly axit-poly bazơ) giữa các polyme có liên quan và/hoặc các tương tác kỵ nước giữa các polyme trong môi trường nước xung quanh (Krupers et al., Eur. Polym J. 32: 785-790, 1996). Ví dụ, dung dịch hỗn hợp của axit polyacrylic (PAAc) và polyetylen oxit (PEO) trong các điều kiện thích hợp dẫn đến việc tạo thành các phức chất chủ yếu dựa trên liên kết

hydro. Sự phân ly của các phức chất này trong các điều kiện sinh lý được sử dụng để phân bố các dược chất tự do (tức là, không được PEG hoá). Ngoài ra các phức chất của các polyme hỗ trợ được tạo thành từ các polyme đồng nhất và các copolyme.

Theo một khía cạnh, polyetylen glycol có khối lượng phân tử nằm trong khoảng từ 3kD đến 50kD, và tốt hơn là nằm trong khoảng từ 5kD đến 30kD. Mỗi liên kết cộng hoá trị của PEG với dược chất này (được biết là “PEG hoá”) có thể được thực hiện bằng các phương pháp tổng hợp hoá học đã biết. Ví dụ, theo một khía cạnh của sáng chế quá trình PEG hoá protein có thể được tiến hành bằng cách cho PEG được hoạt hoá bằng NHS phản ứng với protein này trong các điều kiện phản ứng thích hợp.

Trong khi có nhiều phản ứng được mô tả cho quá trình PEG hoá các phản ứng thường hay được sử dụng nhất có xu hướng sử dụng các điều kiện phản ứng nhẹ và không đòi hỏi quá trình xử lý tiếp để loại bỏ các sản phẩm kép hoặc các chất xúc tác gây độc. Ví dụ, monometoxyPEG (mPEG) để chỉ có một nhóm hydroxyl ở đầu tận cùng có phản ứng, và vì vậy nó chỉ sử dụng một số đặc tính không đồng nhất của hỗn hợp sản phẩm PEG-protein thu được. Hoạt tính của nhóm hydroxyl ở cuối polyme này đối diện với nhóm metoxy ở đầu tận cùng thường là cần thiết để thực hiện quá trình PEG hoá protein hữu hiệu với mục đích để tạo ra dẫn xuất PEG dễ bị tác dụng ưa nhân hơn. Tác dụng ưa nhân này thường là đối với nhóm epsilon-amino của gốc lysyl, nhưng các amin khác cũng có thể phản ứng (ví dụ, alpha-amin ở đầu tận cùng N hoặc amin trong vòng của histidin) nếu các điều kiện cục bộ là thích hợp. Khả năng liên kết trực tiếp hơn có thể xảy ra trong các protein chứa lysin hoặc cystein. Gốc này có thể là đích đối với sự cải biến đặc hiệu thiol bởi PEG-maleimide. Theo cách khác, PEG hydrazit có thể được phản ứng với sHASEGP được oxy hoá bằng periodat và được khử với sự có mặt của NaCNBH_3 . Cụ thể hơn, các đường CMP được PEG hoá có thể được phản ứng với sHASEGP với sự có mặt của glycosyl-transferaza thích hợp. Một kỹ thuật là kỹ thuật “PEG hoá”, trong đó một số phân tử polyme được kết hợp với polypeptit đang nói đến này. Khi sử dụng kỹ thuật này, hệ miễn dịch có khó khăn trong việc nhận biết các epitop trên bề mặt của polypeptit chịu trách nhiệm để tạo thành kháng thể, do đó làm giảm đáp ứng miễn dịch. Đối với các polypeptit được đưa trực tiếp vào trong hệ tuần hoàn của cơ thể người để thu được tác dụng sinh lý cụ thể (tức là, tác dụng dược học), đáp ứng miễn dịch điển hình có khả năng là đáp ứng IgG và/hoặc IgM, trong khi đó các polypeptit được hít qua hệ hô hấp (tức là, polypeptit

công nghiệp) có thể có khả năng gây ra đáp ứng IgE (tức là, đáp ứng dị nguyên). Một trong các lý thuyết giải thích về việc đáp ứng miễn dịch bị giảm là một (các) phân tử polyme bảo vệ một (các) epitop trên bề mặt của polypeptit chịu trách nhiệm đối với đáp ứng miễn dịch dẫn đến tạo thành kháng thể. Một lý thuyết khác hoặc ít nhất có một phần yếu tố cho là thể tiếp hợp này càng lớn, thì đáp ứng miễn dịch thu được càng bị giảm.

Các phân tử polyme được kết hợp với polypeptit này có thể là phân tử polyme thích hợp bất kỳ, với khối lượng phân tử được xác định theo sáng chế, bao gồm các polyme đồng nhất tổng hợp hoặc tự nhiên, như rượu polyhydric (tức là, poly-OH), các polyamin (tức là, poly-NH. sub.2) và các axit polycarboxylic (tức là, poly-COOH), và các heteropolyme tức là các polyme bao gồm một hoặc nhiều nhóm kết hợp khác nhau, ví dụ nhóm hydroxyl và nhóm amin.

Ví dụ về các phân tử polyme thích hợp bao gồm các phân tử polyme được chọn từ nhóm bao gồm các polyalkylen oxit (PAO), như các polyalkylen glycol (PAG), bao gồm các polypropylen glycol (PEG), các metoxypolyetylen glycol (mPEG) và các polypropylen glycol, các PEG-glycidyl ete (Epoxy-PEG), PEG-oxycarbonylimidazol (CDI-PEG) các polyetelen glycol được tạo nhánh (PEGs), rượu polyvinyllic (PVA), các polycarboxylat, polyvinylpyrrolidon, các axit poly-D,L-amin, anhydrit của axit polyetylen-co-maleic, anhydrit của axit polystyren-co-malic, các dextran bao gồm carboxymetyl-dextran, heparin, các albumin tương đồng, các xenluloza, bao gồm methylxenluloza, carboxymethylxenluloza, etylxenluloza, hydroxyethylxenluloza, carboxyethylxenluloza và hydroxypropylxenluloza, các hydrolysat của chitosan, các tinh bột như các hydroxyetyl-tinh bột và các hydroxy propyl-tinh bột, glycogen, agaroza và các dẫn xuất của nó, gồm guar, pululan, inulin, gồm xantan, caragenan, pectin, các sản phẩm thủy phân axit alginic và các polyme sinh học.

Các phân tử polyme được ưu tiên là các phân tử polyme không gây độc, như (m)polyetylen glycol (mPEG) đòi hỏi một cấu trúc hoá học tương đối đơn giản để liên kết cộng hoá trị với các nhóm liên kết trên bề mặt của enzym này.

Các polyalkylen oxit (PAO) thường được xem xét, như polyetylen oxit, như PEG và cụ thể là mPEG, là các phân tử polyme được ưu tiên, các phân tử polyme này

so với các polysacarit như dextran, pululan và các chất tương tự, có một ít nhóm phản ứng có khả năng liên kết chéo không được mong muốn.

B. Profin biểu hiện trong mô của sHASEGP

Trong khi trước đây được cho là sHASEGP đặc hiệu trong tinh hoàn, sHASEGP của người được biểu hiện trong rất nhiều mô của người khi sử dụng các kỹ thuật gây miễn cảm như RT-PCR. Việc sao chép sHASEGP được phát hiện trong não tuỷ, nội mô vi mạch, tuyến tiền liệt, vú, võng mạc, tập hợp tế bào melanin của người, tim thai, và tử cung phụ nữ mang thai. sHASEGP cũng được biểu hiện trong các khối u tế bào gốc. Việc phát hiện quá trình sao chép sHASEGP dựa trên RT-PCR thường được yêu cầu để phát hiện các mức sHASEGP trong mô hơn là trong tinh hoàn.

C. Các phân tích đối với hoạt tính enzym sHASEGP

Thử nghiệm vi chuẩn độ qua độ đục đối với hoạt tính hyaluronidaza

Hoạt tính của hyaluronidaza có thể được phát hiện bằng thử nghiệm độ đục được cải biến trong dung dịch huyết thanh được axit hoá. Các chất phản ứng sau đây được sử dụng:

Nước đã ion hoá 2 lần được khử trùng bằng tia UV hoặc nước khử trùng để rửa	Braun	R5000-01
Natri hyaluronat (hylumed medical), HA có khối lượng phân tử cao	các vật liệu sinh học tiên tiến Genzym	4876
Hyaluronidaza tiêu chuẩn tham chiếu	USP	31200
Kali axetat, dạng hạt, USP, ACS	JTBaker	2914-01
Axit axetic, dạng băng, 99+%	Sigma	A-6283
Natri phosphat, monobazơ monohydrat, dạng hạt, USP	Mallinkrodt	7774
Natri phosphat diazơ, khan, USP	Mallinkrodt	7771

Natri clorua, tinh thể, GR, ACS	EMScience	SX0420-5
Enzym của các sản phẩm thủy phân gelatin	Sigma	G-0262
Huyết thanh ngựa, giống cho, thử nghiệm nuôi cấy tế bào, thử nghiệm nuôi cấy tế bào lai, nguồn gốc USA	Sigma	H-1270
Albumin huyết thanh người 20%	Griffols	
Axit clohydric, chất phản ứng ACS	Sigma	H-7020
Canxi clorua, dihydrat, dạng hạt, USP,-FCC	JTBaker	1336-01

Các chất phản ứng sau đây điều chế được dung dịch đệm axetat bao gồm 14,0 gam kali axetat và 25,0mL axit axetic băng trong nước để thu được 1000mL. Dung dịch đệm phosphat bao gồm 2,5 gam natri phosphat monobazơ, 1,0 gam natri phosphat diaxit khan, và 8,2 gam natri clorua trong nước để thu được 1000mL. Dung dịch gốc để pha loãng enzym bao gồm 500mL dung dịch đệm phosphat và 500mL nước. Dung dịch làm việc để pha loãng enzym bao gồm 33 gam gelatin được thủy phân trong 50mL dung dịch gốc để pha loãng enzym điều chế được trong 2 giờ để sử dụng. Dung dịch đệm làm ổn định mẫu (dung dịch “SSB”) bao gồm dung dịch albumin huyết thanh người 20% và 50uL dung dịch canxi clorua 1M trong 50mL dung dịch làm việc để pha loãng enzym, và trộn kỹ. Dung dịch huyết thanh gốc bao gồm 1 thể tích huyết thanh ngựa pha loãng với 9 thể tích dung dịch đệm axetat. Điều chỉnh độ pH đến 3,1 bằng axit clohydric và để dung dịch ở nhiệt độ phòng trong thời gian từ 18-24 giờ. Bảo quản dung dịch ở nhiệt độ 14°C và sử dụng trong 30 ngày. Dung dịch huyết thanh làm việc bao gồm 10mL dung dịch huyết thanh gốc trong 30mL dung dịch đệm axetat, điều chỉnh đến nhiệt độ phòng. Dung dịch axit hyaluronic gốc bao gồm axit natri hyaluronic với nồng độ 5,0mg/mL trong nước. Dung dịch axit hyaluronic làm việc bao gồm 0,75mL dung dịch axit hyaluronic gốc trong 4,25mL dung dịch đệm phosphat. Dung dịch gốc chuẩn bao gồm một bình chứa hyaluronidaza tiêu chuẩn tham chiếu theo USP với nồng độ 1000 đơn vị/mL trong nước, được phân đều thành các phần gồm 50uL và được bảo quản ở -20°C. Dung dịch làm việc chuẩn bao gồm 40uL dung dịch gốc chuẩn trong 960uL dung dịch làm việc để pha loãng enzym lạnh để thu được dung

dịch có nồng độ đã biết là 40 đơn vị/mL điều chế được trực tiếp trước khi sử dụng trong thử nghiệm này.

Tất cả các mẫu enzyme được pha loãng trong đĩa 96 giếng “liên kết protein thấp” theo hướng dẫn sau đây:

a) Phạm vi gây miễn cảm tối đa trong thử nghiệm này nằm trong khoảng 10-30 đơn vị/mL. Để giảm thiểu số lần, một thử nghiệm phải được lặp lại để thu được kết quả nằm trong phạm vi, đầu tiên là xác định tổng số đơn vị/mL đối với mẫu, và sau đó là lựa chọn mức pha loãng (tổng số) sao cho nồng độ cuối là khoảng 20 đơn vị/mL.

b) Thể tích mẫu tối thiểu cần để tiến hành thử nghiệm là như sau: các phân đoạn FPLC = 50uL, phần dịch nuôi cấy mô = 1mL, các vật liệu trong bước cuối cùng/được tinh chế/được cô đặc = 10uL.

c) Với các mẫu được pha loãng nhiều bậc, việc pha loãng theo tỷ lệ 1:10 trong đĩa có 96 lỗ “liên kết protein thấp” được tiến hành lặp ba bằng cách sử dụng pipet đưa 360uL dung dịch “SSB” và 40uL mẫu vào trong mỗi lỗ.

Đối với chế phẩm chuẩn USP, chuẩn bị đường cong chuẩn USP trong đĩa 96 giếng “liên kết protein thấp” là như sau:

Lỗ:	Chuẩn:	Đường cong chuẩn USP		
		Dung dịch pha loãng enzyme (uL)	Dung dịch làm việc chuẩn (uL)	Nồng độ cuối (đơn vị/mL)
A1-A3	St01	0	100	40
B1-B3	St02	20	80	32
C1-C3	St03	40	60	24
D1-D3	St04	60	40	16
E1-E3	St05	80	20	8
F1-F3	St06	90	10	4
G1-G3	St07	100	0	0

Đối với chế phẩm đối chứng axit hyaluronic trong các cột từ 1 đến 3, chuẩn bị đối chứng H.A. trong đĩa 96 giếng có đáy phẳng là như sau:

Lỗ	Đối chứng	Đối chứng H.A.	
		Dung dịch làm việc axit Hyaluronic (uL)	Dung dịch làm việc pha loãng enzyme (uL)
H1-H3	Co01	0	60

Đĩa phản ứng: 30uL trong mỗi giếng chứa dung dịch làm việc axit hyaluronic được hút bằng loại pipet chuyển 8 kênh cỡ 50 uL vào đĩa vi chuẩn độ 96 giếng có “đáy

phẳng” để lại các giếng H1-H3 trống rỗng. 60uL/giếng dung dịch làm việc để pha loãng enzym được hút bằng pipet vào các lỗ H1-H3 của đĩa tương tự làm đối chứng H.A.

Dung dịch làm việc huyết thanh: 40mL dung dịch huyết thanh làm việc được pha chế trong bể chuyển và sau đó chuyển sang khuôn điều nhiệt.

Giai đoạn làm ấm sơ bộ: Một khi các đĩa đã được chuẩn bị, đĩa 96 giếng liên kết protein thấp chứa các mẫu được pha loãng, mẫu chuẩn, mẫu đối chứng và đĩa 96 giếng đáy phẳng chứa dung dịch làm việc axit hyaluronic được đặt vào trong khuôn điều nhiệt để giữ ấm các đĩa này trong 5 phút ở nhiệt độ 37°C.

Phản ứng này được bắt đầu bằng cách bổ sung enzym vào cơ chất: 30uL từ đĩa enzym được cho vào tất cả các lỗ trong cột #1 của đĩa 96 giếng có đáy phẳng (chứa cơ chất) bằng cách sử dụng pipet 8 kênh cỡ từ 5 đến 50ul. Hỗn hợp phản ứng enzym/cơ chất được hút 5 lần (làm cho dung dịch chảy lên và chảy xuống bằng dụng cụ pipet di chuyển trong 15 giây đầu) để đảm bảo hoàn thành việc trộn mẫu. Sau khi trộn enzym và cơ chất, đầu pipet được rút ra và bộ pipet mới được đặt vào đầu dụng cụ pipet sử dụng cho cột tiếp theo. Đồng hồ bấm giờ lại bắt đầu, và tại thời điểm (t)=0:30, quá trình được lặp lại đối với cột 2. Vào thời điểm 30 giây sau đó (t)=1:00, quá trình này được lặp lại đối với cột 3. Quá trình này được lặp lại từ bên trái sang bên phải của đĩa, mỗi cột là 30 giây cho đến khi tất cả các giếng chứa cả enzym và cơ chất.

Kết thúc phản ứng: Khi đồng hồ bấm giờ đạt đến 6 phút (t)=6:00, 240uL dung dịch làm việc huyết thanh được đưa vào mỗi lỗ trong cột 1 của đĩa 96 giếng có đáy phẳng từ đồ chứa chất phản ứng cỡ 50mL liền kề, bằng cách sử dụng pipet 8 kênh cỡ từ 50 đến 300uL. Hỗn hợp này được hút 3 lần (làm cho dung dịch chảy lên và chảy xuống bằng dụng cụ pipet di chuyển) trong 10 giây đầu để đảm bảo hoàn thành việc trộn. Quá trình này được lặp lại mỗi lần 30 giây, tiến hành từ cột 1 đến cột 12. Sau khi hoàn thành cột cuối cùng (cột 12), đĩa phản ứng được loại bỏ khỏi khuôn điều nhiệt và đặt đĩa này vào khay đọc của thiết bị đọc đĩa ở bước sóng 640nm. Đường cong thích hợp được tạo ra từ đường cong chuẩn cho phép ngoại suy các hợp chất thử nghiệm này.

Các thử nghiệm khác đối với hyaluronidaza

Thử nghiệm vi chuẩn độ hyaluronan được biotin hóa

Các nhóm carboxyl tự do trên các gốc axit glucuronic của hyaluronan được biotin hoá trong phản ứng một bước bằng cách sử dụng biotin-hydrazit (Pierce), Sulfo NHS (Pierce) và 1-ethyl dimethylaminopropyl-carbodiimide (Sigma). Cơ chất HA được biotin hoá được kết hợp theo cách cộng hoá trị với đĩa vi chuẩn độ 96 giếng trong phản ứng thứ hai. Sau khi hoàn thành phản ứng enzym này, phần cơ chất dư được phát hiện bằng phản ứng avidin-peroxidaza có thể được đọc bằng thiết bị đọc đĩa ELISA chuẩn. Đối với cơ chất được kết hợp theo cách liên kết cộng hoá trị với đĩa vi chuẩn độ, các hiện tượng giả như chuyển chỗ phụ thuộc vào độ pH của cơ chất được biotin hoá không xảy ra. Khả năng miễn cảm cho phép đánh giá nhanh hoạt tính hyaluronidaza từ các tế bào nuôi cấy và các mẫu sinh học với sự khác nhau giữa các thử nghiệm là nhỏ hơn 10%.

Hoạt tính đặc hiệu của hyaluronidaza được biểu hiện trong đơn vị làm giảm độ đục (TRU). Một TRU được xác định là lượng hoạt tính hyaluronidaza cần để làm giảm độ đục của dung dịch được axit hoá chứa axit hyaluronic và là tương đương với U.S.P./ các đơn vị công thức quốc gia (NF XIII) (NFU). Thử nghiệm enzym giống ELISA được sử dụng để tính chế liên quan đến đơn vị TRU, NFU và U.S.P. thông qua đường cong tiêu chuẩn của mẫu hyaluronidaza (ví dụ, USP) được tiêu chuẩn hoá thông qua đơn vị U.S.P. Vì vậy, các hoạt tính enzym được xác định bằng thử nghiệm enzym giống ELISA là TRU tương đối trên thực tế, vì hoạt tính enzym này trên thực tế không được đánh giá bằng thử nghiệm độ đục (Dorfman et al., 1948, *J. Biol. Chem.* 172: 367).

Nhiều thử nghiệm hyaluronidaza được dựa trên việc đánh giá tạo thành các nhóm N-acetylamino khử mới (Bonner and Cantey, *Clin. Chim. Acta* 13: 746-752, 1966) hoặc làm mất độ nhớt (De Salegui et al., *Arch. Biochem. Biophys.* 121: 548-554, 1967) hoặc làm mất độ đục (Dorfman and Ott, *J. Biol. Chem.* 172: 367, 1948). Với các cơ chất đã tinh chế, tất cả các phương pháp này là đủ để xác định sự có mặt hoặc không có mặt của hoạt tính endoglucosamidic.

Các cơ chất glycosaminoglycan ggaanf như tinh khiết cũng có thể được sử dụng trong thử nghiệm chuyển dời gel. Các glycosaminoglycan được trộn với sHASEGP tái tổ hợp để thử nghiệm hoạt tính endoglucosidaza dẫn đến sự chuyển dời trong gel này do độ linh động của cơ chất. Chondroitin-4 và 6 sulfat, dermatan sulfat, heparan-sulfat có thể thu được từ Sigma Chemical. Hyaluronan trong dây rốn của người thu được từ

INC. Mỗi cơ chất thử nghiệm được pha loãng đến 0,1 mg/ml trong dung dịch đệm có độ pH nằm trong khoảng từ 3,5 đến 7,5. 10 μ L mẫu chứa sHASEGP đã tinh chế hoặc môi trường có điều kiện chứa các tế bào biểu hiện sHASEGP được trộn với 90 μ L cơ chất thử nghiệm trong dung dịch đệm mong muốn và được ủ trong 3 giờ ở nhiệt độ 37°C. Các mẫu ủ sau đó được trung hoà bằng dung dịch đệm mẫu (Tris EDTA, độ PH=8,0, Bromophenol Blue và glyxerol), tiếp theo là điện di. Các glycosaminoglycan được phát hiện bằng cách nhuộm gel này trong 0,5% Alcian Blue trong dung dịch axit axetic bằng 3% qua đêm, tiếp theo là khử nhuộm trong dung dịch axit axetic bằng 7%. Sự thoái hoá được xác định bằng cách so sánh độ linh động của cơ chất khi có mặt hoặc không có mặt của enzym.

Hoạt tính hyaluronidaza cũng có thể được phát hiện bằng enzym đồ trong chất nền gel (Guentenhoner et al., 1992, Matrix 388-396). Trong thử nghiệm này, mẫu thử nghiệm được cho vào gel SDS-PAGE chứa axit hyaluronic và protein trong mẫu này được tách riêng bằng cách điện di. Sau đó, gel này được ủ trong dung dịch đệm thử nghiệm enzym và sau đó được nhuộm để phát hiện axit hyaluronic. Hoạt tính hyaluronidaza được quan sát bằng mắt thường là vùng sáng trên chất nền gel này.

D. Nhận biết và phân lập gen polypeptit sHASEGP

Gen polypeptit sHASEGP và/hoặc các vùng của nó, có thể thu được bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này để phân lập ADN. Phương pháp bất kỳ đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này để nhận biết các axit nucleic mã hoá các gen mong muốn có thể được sử dụng. Phương pháp bất kỳ sẵn có trong lĩnh vực này có thể được sử dụng để thu được dòng vô tính cADN hoặc ADN hệ gen có độ dài đầy đủ (tức là, bao gồm toàn bộ vùng mã hoá) mã hoá polypeptit sHASEGP. Ví dụ, phản ứng chuỗi polymeraza (PCR) có thể được sử dụng để khuếch đại trình tự mà được biểu hiện trong các mô thông thường, ví dụ các axit nucleic mã hoá polypeptit sHASEGP (SEQ ID NO:1 và 2), trong thư viện cADN hoặc ADN hệ gen. Các đoạn môi oligonucleotit lai với các trình tự ở đầu tận cùng 3' và 5' của các trình tự đã xác định có thể được sử dụng làm đoạn môi để khuếch đại các trình tự PCR từ các mẫu axit nucleic (ARN hoặc ADN) thường là thư viện cADN, từ nguồn thích hợp (tức là, tinh hoàn, tuyến tiền liệt, v.v.).

Phản ứng PCR có thể được thực hiện, ví dụ bằng cách sử dụng thiết bị chu kỳ nhiệt Perkin-Elmer Cetus và Taq polymeraza (Gen Amp). ADN cần được khuếch đại có thể bao gồm ARN thông tin hoặc cADN hoặc ADN hệ gen từ các loài sinh vật nhân chuẩn. Có thể lựa chọn để tổng hợp một số đoạn môi suy biến khác nhau để sử dụng trong các phản ứng PCR.

Cũng có thể thay đổi các điều kiện lai nghiêm ngặt được sử dụng trong việc môi các phản ứng PCR, để khuếch đại các thể tương đồng axit nucleic (ví dụ, để thu được các trình tự polypeptit từ các loài khác người hoặc để thu được các trình tự của người tương đồng với polypeptit của sHASEGP) bằng cách cho phép mức tương tự về trình tự nucleoit lớn hơn hoặc nhỏ hơn giữa trình tự nucleotit đã biết này và thể tương đồng axit nucleic được phân lập. Để lai chéo loài, các điều kiện lai ở mức độ nghiêm ngặt từ thấp đến vừa phải được sử dụng. Để lai cùng loài, các điều kiện lai ở mức độ nghiêm ngặt từ vừa phải đến cao được sử dụng. Các điều kiện này có thể được xác định bằng thực nghiệm.

Sau khi khuếch đại thành công axit nucleic chứa tất cả hoặc một phần của trình tự polypeptit sHASEGP đã xác định hoặc chứa tất cả hoặc một phần của axit nucleic mã hoá tất cả hoặc một phần của thể tương đồng axit nucleic, đoạn này có thể được tách dòng phân tử và được xác định trình tự và được sử dụng làm đoạn dò để phân lập dòng vô tính cADN hoặc ADN hệ gen hoàn chỉnh. Điều này, ngược lại cho phép xác định trình tự nucleotit hoàn chỉnh của gen, phân tích biểu hiện của nó, và cho phép sản xuất sản phẩm protein của nó để phân tích chức năng. Một khi trình tự nucleotit này được xác định, khung đọc mở mã hoá sản phẩm protein gen polypeptit SHASEGP có thể được xác định bằng phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này để xác định các khung đọc mở, ví dụ, bằng cách sử dụng chương trình máy tính thông dụng để phân tích trình tự nucleotit. Một khi khung đọc mở được xác định thông thường, nó sẽ xác định trình tự axit amin của protein được mã hoá bằng khung đọc mở này. Theo cách này, các trình tự nucleotit của toàn bộ gen polypeptit sHASEGP cũng như là trình tự axit amin của protein polypeptit sHASEGP và các thể tương tự có thể được xác định.

Tế bào nhân chuẩn bất kỳ có thể đóng vai trò có khả năng làm nguồn axit nucleic để tách dòng phân tử gen polypeptit sHASEGP. Các axit nucleic có thể được phân lập từ các động vật có xương sống, động vật có vú, người, lợn, bò, mèo, chim, ngựa, chó, cũng như là các nguồn linh trưởng bổ sung, côn trùng và các sinh vật khác.

ADN này có thể thu được bằng các phương pháp chuẩn đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật từ ADN được tách dòng (ví dụ, “thư viện” ADN) bằng phương pháp tổng hợp hoá học, bằng cách tách dòng cADN, hoặc bằng cách tách dòng ADN hệ gen, hoặc các đoạn của nó, được tinh chế từ tế bào mong muốn này (ví dụ xem, Sambrook et al. 1989, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2d Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York; Glover, D.M. Ed., 1985, *DNA Cloning: A Practical Approach*, MRL Press, Ltd., Oxford, U.K. Vol. 1, 11.). Các dòng vô tính thu được từ ADN hệ gen có thể chứa các vùng ADN điều hòa và intron ngoài các vùng mã hoá; các dòng vô tính thu được từ cADN sẽ chỉ chứa các trình tự exon. Đối với nguồn bất kỳ, gen này được tách dòng trong vectơ thích hợp để nhân giống chúng.

Trong quá trình tách dòng phân tử gen này từ ADN hệ gen, các đoạn ADN được tạo ra và một số đoạn sẽ mã hoá gen mong muốn này.

ADN này có thể được phân cắt tại các vị trí đặc hiệu bằng cách sử dụng các enzym giới hạn khác nhau.

Theo cách khác, có thể sử dụng ADNaza với sự có mặt của manganaza để phân cắt ADN y, hoặc ADN này có thể được cắt theo cách vật lý, ví dụ bằng cách siêu âm. Các đoạn ADN thẳng sau đó có thể được tách ra theo kích thước bằng các kỹ thuật tiêu chuẩn, bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, điện di gel polyacrylamit và agarosa và sắc ký cột.

Một khi các đoạn ADN được tạo ra việc nhận biết đoạn ADN đặc hiệu chứa gen mong muốn có thể được thực hiện theo nhiều cách khác nhau.

Ví dụ, một phần của gen polypeptit sHASEGP (của loài bất kỳ) (ví dụ, sản phẩm khuếch đại PCR thu được như được mô tả ở trên hoặc oligonucleotit có trình tự gồm một phần của trình tự nucleotit đã biết) hoặc ARN đặc hiệu của nó, hoặc đoạn của nó được tinh chế và được đánh dấu, và các đoạn ADN được tạo ra này có thể được sàng lọc bằng cách lai axit nucleic với đoạn dò được đánh dấu (Benton and Davis, *Science* 196: 180 (1977); Grunstein and Hogness, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 72: 3961 (1975)). Các đoạn ADN này sẽ lai khi có sự tương đồng đáng kể với đoạn dò này. Cũng có thể nhận biết được các đoạn thích hợp này bằng cách phân cắt bằng enzym giới hạn và so sánh kích thước của các đoạn này với các kích thước mong muốn theo bản đồ giới hạn đã biết nếu có thể, hoặc bằng cách phân tích trình tự ADN

và so sánh với trình tự nucleotit của polypeptit sHASEGP. Việc chọn lọc thêm có thể được tiến hành dựa trên các tính chất của gen này. Theo cách khác, sự có mặt của gen này có thể được phát hiện bằng các thử nghiệm dựa trên các tính chất vật lý, hoá học, hoặc miễn dịch của sản phẩm biểu hiện của nó. Ví dụ, các dòng vô tính cADN, hoặc các dòng vô tính ADN mà lai-chọn lọc với mARN thích hợp có thể được chọn để tạo ra protein mà chẳng hạn có sự di gen khi điện di, tập tính điều tiêu đẳng điện, bản đồ phân cắt phân giải protein, các tính chất kháng nguyên, hoạt tính hyaluronidaza tương tự hoặc đồng nhất với nhau. Nếu kháng thể kháng polypeptit sHASEGP có hiệu lực thì protein này có thể được xác định bằng cách liên kết kháng thể đã đánh dấu với các dòng vô tính tổng hợp polypeptit sHASEGP giả định này, theo phương pháp kiểu ELISA (thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết enzym).

Theo cách khác, để phân lập ADN của hệ gen polypeptit sHASEGP bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, tổng hợp hoá học trình tự gen này từ trình tự đã biết hoặc chuyển cADN thành mARN mã hoá polypeptit sHASEGP.

Ví dụ, ARN cho sự tách dòng cADN của gen polypeptit sHASEGP có thể được phân lập từ các tế bào biểu hiện protein này. Các axit nucleic đã phân lập và nhận biết sau đó có thể được xen vào vector tách dòng thích hợp. Một lượng lớn hệ thống vật chủ-vector đã biết trong lĩnh vực này có thể được sử dụng. Các vector có khả năng bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, plasmit, virus được cải biến, nhưng hệ thống vector này phải tương hợp với tế bào chủ được sử dụng. Các vector này bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, các thể thực khuẩn như các dẫn xuất lamda, hoặc các plasmit như các dẫn xuất plasmit pBR322 hoặc pUC hoặc vector Bluescript (Stratagene, La Jolla, CA). Việc xen vào trong vector tách dòng có thể được thực hiện bằng cách gắn đoạn ADN này vào trong vector tách dòng có các đầu tận cùng kết dính bổ sung.

Nếu các vị trí giới hạn bổ sung được sử dụng để cắt ADN không có mặt trong vector tách dòng này, đầu cuối của các phân tử ADN có thể được cải biến về mặt enzym. Theo cách khác, vị trí mong muốn bất kỳ có thể được tạo ra bằng cách gắn các trình tự nucleotit (gen liên kết) vào các đầu tận cùng ADN; các gen liên kết đã liên kết này có thể bao gồm các oligonucleotit đã được tổng hợp hoá học đặc hiệu mã hoá các trình tự nhận biết endonucleaza giới hạn. Trong một phương pháp thay thế, Vector đã phân cắt và gen polypeptit sHASEGP này có thể được cải biến bằng đuôi homopolyme.

Các phân tử tái tổ hợp có thể được đưa vào trong các tế bào vật chủ bằng cách biến nạp, chuyển nhiễm, gây nhiễm trùng, phương pháp xung điện, kết tủa canxi và các phương pháp khác, sao cho nhiều bản sao trình tự gen được tạo ra.

Theo các phương án cụ thể, quá trình biến nạp các tế bào vật chủ bằng các phân tử ADN tái tổ hợp bao gồm gen polypeptit sHASEGP đã phân lập, cADN, hoặc trình tự ADN đã tổng hợp có thể tạo ra nhiều bản sao gen.

Vì vậy, gen này có thể thu được với số lượng lớn bằng cách nuôi cấy sinh trưởng các thể tái tổ hợp, phân lập các phân tử ADN tái tổ hợp từ thể tái tổ hợp này, và khi cần thiết thu hồi lại gen đã xen vào này từ ADN tái tổ hợp đã phân lập.

E. Các vector, các plasmit và các tế bào chứa axit nucleic mã hoá polypeptit sHASEGP hoặc vùng hyaluronidaza của nó và biểu hiện của các vector polypeptit sHASEGP và các tế bào này.

Để biểu hiện tái tổ hợp một hoặc nhiều polypeptit sHASEGP, axit nucleic này chứa tất cả hoặc một phần của trình tự nucleotit mã hoá polypeptit sHASEGP này có thể được xen vào trong vector biểu hiện thích hợp, tức là, vector chứa các thành phần cần thiết cho quá trình phiên mã và dịch mã của trình tự mã hoá protein được xen vào. Các tín hiệu cần thiết cho quá trình phiên mã và dịch mã cũng có thể được cung cấp bằng trình tự khởi động nguyên thể đối với các gen sHASEGP và /hoặc các vùng sườn của chúng.

Cũng được đề cập đến ở đây là các vector chứa axit nucleic mã hoá các sHASEGP có thể được đưa vào trong một hệ thống biểu hiện có khả năng tạo ra sHASEGP có hoạt tính trung hoà, hoà tan được.

Các tế bào chứa các vector này cũng được đề cập đến. Các tế bào này bao gồm các tế bào có nhân chuẩn và các tế bào chưa nhân chuẩn, và các vector này thích hợp để sử dụng ở đây.

Các tế bào có nhân chuẩn, bao gồm các tế bào trứng chuột đồng Trung quốc thiếu hụt dihydroflavin reductaza (DG44), chứa các vector này cũng được đề cập đến. Các tế bào thích hợp bao gồm các tế bào nấm men, các tế bào nấm, các tế bào thực vật, các tế bào côn trùng và các tế bào động vật. Các tế bào này được sử dụng để tạo ra polypeptit sHASEGP hoặc vùng hyaluronidaza của chúng bằng cách (a) nuôi cấy sinh

trường các tế bào được mô tả ở trên trong các điều kiện nhờ đó polypeptit sHASEGP đã được mã hoá hoặc vùng hyaluronidaza của polypeptit sHASEGP được biểu hiện bởi tế bào này, và sau đó (b) thu hồi lại protein vùng hyaluronidaza đã biểu hiện. Theo các phương án điển hình này, vùng hyaluronidaza này được tiết vào trong môi trường.

Theo một phương án, các vectơ này bao gồm một trình tự nucleotit mã hoá polypeptit có hoạt tính hyaluronidaza và chứa tất cả hoặc một phần của duy nhất vùng hyaluronidaza này hoặc nhiều bản sao của nó, hoặc chứa tất cả hoặc một phần của protein sHASEGP là cũng được đề cập. Cũng được đề cập đến là các vectơ mà bao gồm một trình tự nucleotit mã hoá vùng hyaluronidaza và các phần bổ sung của protein sHASEGP lên đến và bao gồm protein có độ dài đầy đủ, cũng như nhiều bản sao của chúng là cũng được đề cập đến. Các vectơ này có thể được lựa chọn để biểu hiện protein sHASEGP hoặc vùng hyaluronidaza của nó trong tế bào này hoặc sao cho protein sHASEGP được biểu hiện ở dạng protein được tiết ra. Theo cách khác, các vectơ này có thể bao gồm các tín hiệu cần thiết để tiết các protein đã mã hoá. Khi vùng hyaluronidaza được biểu hiện, axit nucleic này được liên kết với axit nucleic mã hoá tín hiệu tiết, như trình tự tín hiệu của nhân tố kết cặp của *Saccharomyces cerevisiae* hoặc một phần của nó, hoặc trình tự tín hiệu nguyên thể này.

Để tạo ra sHASEGP có hoạt tính trung hoà, hoà tan được, phải cần đến các tế bào có khả năng glycosyl hoá được liên kết ở vị trí N. Theo phương án được ưu tiên này, các tế bào trứng chuột đồng Trung quốc thuộc loài động vật có vú thiếu hụt enzym dihydrofolat reductaza, như DG44, được gây xung điện với plasmit mã hoá trình tự khởi động mạnh của loài động vật có vú, như CMV, axit nucleic mã hoá sHASEGP tiếp theo ở vị trí gần ribosom bên trong, gen dihydrofolat reductaza của chuột này và trình tự bổ sung chuỗi poly (A) SV40 được thể hiện trong SEQ ID NO: 51. Các tế bào này sau đó được nuôi cấy trong môi trường được xác định về mặt hoá học khi không có mặt hypoxanthin và thymidin, tiếp theo là khuếch đại gen hơn nữa với việc gia tăng nồng độ metotrexat.

Nhiều hệ thống vật chủ-vectơ có thể được sử dụng để biểu hiện trình tự mã hoá protein. Các hệ thống này bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, các hệ thống tế bào động vật có vú bị nhiễm virus (ví dụ, virus vaccinia, adenovirus, v.v.); các hệ thống tế bào côn trùng bị nhiễm virus (ví dụ, baculovirus); các vi sinh vật như nấm men chứa các vectơ nấm men; các vi khuẩn được biến nạp bằng thể thực khuẩn, ADN, ADN

plasmid hoặc ADN cosmid. Các yếu tố biểu hiện của vector sẽ khác nhau phụ thuộc vào mật độ và tính đặc hiệu của chúng. Phụ thuộc vào hệ thống vật chủ-vector được sử dụng này, bất kỳ một trong số các yếu tố sao chép và dịch mã thích hợp có thể được sử dụng. Lưu ý rằng, việc biểu hiện ADN sHASEGP trong vi khuẩn sẽ không dẫn đến bản thân sHASEGP có hoạt tính xúc tác nhưng khi được kết hợp với bộ máy glycosyl hoá thích hợp nó có thể được glycosyl hoá nhân tạo theo đúng nghĩa của nó.

Các phương pháp bất kỳ đã biết đối với các người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này để xen các đoạn axit nucleic vào trong vector có thể được sử dụng để tạo cấu trúc vector biểu hiện chứa gen dạng khảm có các tín hiệu điều khiển quá trình phiên mã/dịch mã thích hợp và các trình tự mã hoá protein. Các phương pháp này có thể bao gồm các kỹ thuật tổng hợp và ADN tái tổ hợp và các kỹ thuật tái tổ hợp *in vivo* (tái tổ hợp gen). Việc biểu hiện các trình tự axit nucleic mã hoá polypeptit sHASEGP, hoặc các vùng, các dẫn xuất, các đoạn hoặc các thể tương đồng của chúng, có thể được điều chỉnh bằng một trình tự axit nucleic thứ hai sao cho các gen này hoặc các đoạn của nó được biểu hiện trong vật chủ được biến nạp bằng (các) phân tử ADN tái tổ hợp. Ví dụ, việc biểu hiện các protein này có thể được điều khiển bằng trình tự khởi động/trình tự tăng cường bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này. Theo một phương án ưu tiên trình tự khởi động này không phải là nguyên thể đối với các gen mã hoá polypeptit sHASEGP. Các trình tự khởi động có thể được sử dụng bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, trình tự khởi động sớm SV40 (Bernoist and Chambon, Nature 290: 304-310 (1981)), trình tự khởi động này được chứa trong đoạn lặp lại ở đầu tận cùng 3' của virus Rous Sarcoma (Yamamoto et al., Ce//22: 787-797 (1980)), trình tự khởi động Thymidin kinase của virus ecpet (Wagner et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 1441-1445 (1981)), các trình tự điều hoà của gen metallothionein (Brinster et al., Nature 296: 39-42 (1982)); các vector biểu hiện của sinh vật chưa nhân chuẩn như trình tự khởi động β -Lactamase (Villa-Komaroff et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 3727-3731 (1978)) hoặc trình tự khởi động TAC (Deboer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 21-25 (1983)); cũng xem ấn phẩm "Các protein hữu hiệu từ nguồn vi khuẩn tái tổ hợp" (trong ấn phẩm Scientific American 242: 79-94 (1980)); các vector biểu hiện thực vật chứa trình tự khởi động opalin synthetase (Herrar-Estrella et al., Nature 303: 209-213 (1984)); hoặc trình tự khởi động ARN 35S của virus dạng khảm cải hoa lơ (Gardner et al., Nucleic Acids REC. 9: 2871 (1981)), và trình tự khởi động của

enzym quang tổng hợp ribuloza biphosphat carboxylaza (Herrera-Estrella et al., Nature 310: 115-120 (1984)); trình tự khởi động có thành phần từ nấm men và các nấm khác như trình tự khởi động Gal4, trình tự khởi động rượu dehydrogenaza, trình tự khởi động phosphoglyxerol kinaza, trình tự khởi động alkaline phosphatase, và các vùng điều khiển phiên mã của động vật sau đây biểu hiện tính đặc hiệu mô và được sử dụng trong các động vật chuyển gen: vùng điều khiển gen elastase I có hoạt tính trong các tế bào nang tụy (Swift et al., Cell 38: 639-646 (1984); Ornitz et al., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 50: 399-409 (1986); Macdonald, Hepatology 7: 425-515 (1987)); vùng điều khiển gen insulin có hoạt tính trong các tế bào tuyến tụy β (Hanahan et al., Nature 315: 115-122 (1985)), vùng điều khiển gen globulin miễn dịch có hoạt tính trong các tế bào bạch huyết (Grosschedl et al., Cell 38: 647-658 (1984); Adams et al., Nature 318:533-538 (1985); Alexander et al., Mol. Cell Biol. 7:1436-1444 (1987)), vùng điều khiển của virus trong khối u vú của chuột có hoạt tính trong tinh hoàn, vú, tế bào bạch huyết và các dưỡng bào (Leder et al., Cell 45:485-495 (1986)), vùng điều khiển gen albumin có hoạt tính trong gan (PINCKERT et al., Genes and Devel. 1: 268-276 (1987)), vùng điều khiển gen alpha-fetoprotein có hoạt tính trong gan (Krumlauf et al., Mol. Cell. Biol. 5:1639-1648 (1985); Hammer et al., Science 235:53-58 1987)), vùng điều khiển gen kháng trypsin alpha-1 có hoạt tính trong gan (Kelsey et al., Genes And Devel. 1:161-171 (1987)), vùng điều khiển gen beta globin có hoạt tính trong các tế bào tủy (Morgam et al., Nature 315:338-340 (1985); Kollias et al., CE//46:89-94 (1986)), vùng điều khiển gen protein trên cơ sở myelin có hoạt tính trong các tế bào ít nhánh của não (Readhead et al., Cell 48:703-712 (1987)), vùng điều khiển gen chuỗi nhẹ 2 myosin có hoạt tính trong cơ vân (Sani, Nature 314: 283-286 (1985)), vùng điều khiển gen hormon giải phóng hướng sinh dục có hoạt tính trong chất hướng sinh dục của vùng dưới đồi (Mason et al., Science 234:172-1378 (1986)).

Theo một phương án được ưu tiên, vector được sử dụng chứa trình tự khởi động được liên kết chức năng với các axit nucleic mã hoá polypeptit sHASEGP, hoặc vùng, đoạn, hoặc dẫn xuất hoặc thể tương đồng của nó, một hoặc nhiều điểm khởi đầu sao chép, và tùy ý một hoặc nhiều chất đánh dấu chọn lọc được (ví dụ, chất chịu kháng sinh).

Các tín hiệu bắt đầu đặc hiệu có thể là cần thiết để dịch mã hữu hiệu trình tự sHASEGP. Các tín hiệu này bao gồm codon bắt đầu ATG và các trình tự liền kề.

Trong trường hợp với sHASEGP, codon bắt đầu của nó và các trình tự phía sau được xen vào vector biểu hiện thích hợp này, do đó có thể không cần đến các tín hiệu điều khiển dịch mã bổ sung. Tuy nhiên, trong trường hợp chỉ có trình tự mã hoá hoặc một phần của nó được xen vào, thì cần phải cung cấp các tín hiệu điều khiển phiên mã ngoại sinh bao gồm codon bắt đầu ATG. Hơn nữa, codon bắt đầu này phải nằm trong vùng khung đọc mở chính xác để đảm bảo quá trình phiên mã toàn bộ phần xen vào. Các yếu tố sao chép ngoại sinh và các codon bắt đầu có thể có các nguồn gốc khác nhau, tự nhiên hoặc tổng hợp. Hiệu quả của việc biểu hiện có thể được tăng cường bằng cách bao gồm các chất tăng cường thích hợp để sử dụng đối với hệ thống tế bào (Scharf D et al (1994) *Results Probl Cell Differ* 20:125-62; Bittner et al (1987) *Methods in Enzymol* 153:516-544).

Ngoài ra, chủng tế bào vật chủ có thể được lựa chọn theo khả năng của nó để điều biến việc biểu hiện của các trình tự được xen vào hoặc để xử lý protein được biểu hiện theo kiểu mong muốn. Các cải biến đối với polypeptit này bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, quá trình axetyl hoá, carboxyl hoá, glycosyl hoá, phosphoryl hoá, lipid hoá và axyl hoá. Quá trình sau dịch mã nhằm phân cắt dạng “prepro” của protein này cũng có thể là quan trọng để xen, cuộn và /hoặc tạo chức năng chính xác. Các tế bào khác biệt như CHO (DG44, DXB11, CHO-K1), Hela, MDCK, 293, WI38, v.v. có cơ quan tế bào đặc hiệu và các cơ chế riêng biệt đối với các hoạt tính sau dịch mã và có thể được lựa chọn để đảm bảo việc cải biến chính xác và xử lý protein lạ được đưa vào.

Về lâu dài, để đảm bảo sản xuất các protein tái tổ hợp với hiệu suất cao, việc biểu hiện ổn định là được ưu tiên. Ví dụ, các dòng tế bào biểu hiện ổn định sHASEGP có thể được biến nạp bằng cách sử dụng các vector biểu hiện chứa điểm khởi đầu sao chép của virus hoặc các yếu tố biểu hiện nội sinh và một chỉ thị chọn lọc. Sau khi đưa vector này vào, các tế bào có thể được nuôi cấy sinh trưởng trong thời gian từ 1 đến 2 ngày trong môi trường giàu trước khi chúng được chuyển sang môi trường chọn lọc. Mục đích của chỉ thị chọn lọc là mang lại khả năng kháng khi chọn lọc, và sự có mặt của chỉ thị này cho phép sinh trưởng và thu hồi các tế bào biểu hiện thành công các trình tự được đưa vào. Các cụm tế bào được biến nạp ổn định có khả năng kháng có thể được tăng sinh bằng cách sử dụng các kỹ thuật nuôi cấy mô thích hợp với từng loại tế bào.

Các hệ thống chọn lọc bất kỳ có thể được sử dụng để thu hồi các dòng tế bào được biến nạp. Các hệ thống này bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở các gen thymidin kinaza của virus herpes simplex (Wigler M et al (1977) Cell 11:223-32) và gen adenin phosphoribosyltransferaza (Lowy I et al (1980) Cell 22:817-23) mà có thể được sử dụng tương ứng trong các tế bào TK, hoặc APRT. Ngoài ra, khả năng kháng chất chống chuyển hoá, tính chịu kháng sinh hoặc khả năng kháng chất diệt cỏ có thể được sử dụng làm cơ sở chọn lọc; ví dụ, DHFR có khả năng kháng với metotrexan (Wigler M et al (1980) Proc Natl Acad Sci 77:3567-70); npt, có khả năng kháng với aminoglycosit neomycin và G-418 (Colbere-Garapin F et al (1981) J Mol Biol 150:1-14) và als hoặc pat có khả năng kháng lần lượt với clorsulfurin và phosphinotrixin axetyltransferaza (Mury, nêu trên). Các gen có thể chọn lọc được bổ sung đã được mô tả, ví dụ trpB, cho phép các tế bào sử dụng indol thay thế tryptophan, hoặc hisD cho phép các tế bào sử dụng histinol thay thế histidin (Hartman S C and R C Mulligan (1988) Proc Natl Acad Sci 85:8047-51). Gần đây, phổ biến là sử dụng các chỉ thị nhìn thấy được, với các chỉ thị này là anthoxyanin, beta glucuronidaza và cơ chất của nó, GUS và luxiferaza và cơ chất của nó, luxiferin, được sử dụng rộng rãi không chỉ để xác định các thể biến nạp, mà còn định lượng những biểu hiện nhất thời hoặc ổn định của protein có thể quy cho là hệ thống vector đặc hiệu (Rhodes C A et al (1995) Methods Mol Biol 55:121-131).

Nhận biết các thể biến nạp chứa trình tự polynucleotit

Dù có mặt hay không có mặt của sự biểu hiện gen chỉ thị gợi ý rằng gen cần quan tâm này cũng có mặt, thì sự xuất hiện và biểu hiện của sHASEGP hoạt hoá sẽ được khẳng định. Ví dụ, nếu sHASEGP được xen vào trong trình tự gen chỉ thị, thì các tế bào tái tổ hợp chứa sHASEGP có thể được xác định bởi sự không có mặt của chức năng gen chỉ thị. Theo cách khác, một chỉ thị có thể được đặt vào trong thể nối tiếp với một trình tự sHASEGP dưới sự kiểm soát của một trình tự khởi động đơn. Việc biểu hiện của gen chỉ thị đáp ứng với việc kích thích hoặc chọn lọc cũng thường chỉ ra sự biểu hiện của sHASEGP của thể nối tiếp. Việc phát hiện sHASEGP có hoạt tính trung hoà được glycosyl hoá thích hợp có thể được xác định bằng cách thử nghiệm môi trường có điều kiện đối với hoạt tính enzym sHASEGP trong các điều kiện thích hợp.

Tinh chế sHASEGP

Các tế bào chủ được biến nạp bằng trình tự nucleotit sHASEGP có thể được nuôi cấy trong các điều kiện thích hợp để biểu hiện và thu hồi protein đã mã hoá từ môi trường nuôi cấy tế bào. Protein này được tạo ra bằng một tế bào tái tổ hợp, tốt hơn là được tiết nhưng có thể được chứa trong tế bào phụ thuộc vào trình tự và/hoặc vector được sử dụng. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật cũng hiểu là các vector biểu hiện chứa sHASEGP có thể được thiết kế với các trình tự tín hiệu tạo điều kiện thuận lợi tiết trực tiếp sHASEGP qua màng tế bào nhân sơ hoặc tế bào nhân chuẩn. Các cấu trúc tái tổ hợp khác có thể nối sHASEGP với trình tự nucleotit mã hoá vùng polypeptit sẽ tạo điều kiện thuận lợi cho việc tinh chế các protein hoà tan (Kroll D J et al. (1993) DNA Cell Biol 12: 441-53; cf discussion of vector infra containing fusion proteins).

sHASEGP cũng có thể được biểu hiện dưới dạng protein tái tổ hợp với một hoặc nhiều vùng polypeptit bổ sung được thêm vào để tạo điều kiện thuận lợi cho việc tinh chế protein. các vùng tạo điều kiện cho việc tinh chế protein bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, các peptit tạo chelat với kim loại như các phân tử histidin-tryptophan cho phép tinh chế trên các kim loại được giữ cố định, các vùng protein A cho phép tinh chế trên globulin giữ cố định, và vùng này được sử dụng trong hệ thống tinh chế ái lực/kéo giãn FLAGS (Immunex Corp, Seattle Wash). Việc bao gồm các trình tự liên kết có thể phân cắt được như nhân tố XA hoặc enterokinaza (Invitrogen, San Diego Calif) giữa vùng cần tinh chế và sHASEGP là hữu hiệu để tạo điều kiện thuận lợi cho việc tinh chế. Một vector biểu hiện được cung cấp nhằm để biểu hiện protein dung hợp sửa đổi sHASEGP và chứa axit nucleic mã hoá 6 gốc histidin sau vị trí phân cắt thioredoxin và enterokinaza. Các gốc histidin tạo điều kiện thuận lợi cho việc tinh chế trên IMIAC (sắc ký ái lực ion kim loại được giữ cố định như được mô tả trong ấn phẩm Porath et al (1992) protein Expression and Purification 3: 263-281), trong khi đó vị trí phân cắt enterokinaza dùng để tinh chế chemokin từ protein dung hợp này.

Ngoài việc sản xuất tái tổ hợp, các đoạn sHASEGP có thể được tạo ra bằng cách tổng hợp peptit trực tiếp bằng các kỹ thuật pha rắn (xem ấn phẩm: Stewart et al (1969) Solid-Phase peptide Synthesis, W H Freeman Co, San Francisco; Merrifield J (1963) J Am Chem Soc 85:2149-2153). Việc tổng hợp protein *in vitro* có thể được tiến hành bằng cách sử dụng các kỹ thuật thao tác hoặc bằng cách tự động hoá. Có thể đạt

được việc tổng hợp theo cách tự động hoá, ví dụ, bằng cách sử dụng thiết bị tổng hợp Peptit Applied Biosystems 431 (Perkin Elmer, Foster City Calif.) theo hướng dẫn sử dụng của nhà sản xuất. Các đoạn sHASEGP khác nhau có thể được tổng hợp hoá học một cách riêng biệt và được kết hợp bằng các phương pháp hoá học để tạo ra phân tử có độ dài đầy đủ.

Các vector biểu hiện chứa các trình tự mã hoá, hoặc một phần của nó, của polypeptit sHASEGP, được tạo ra, chẳng hạn bằng cách tách dòng phụ các phân mã hoá trong vị trí giới hạn EcoR1 của mỗi trong số ba vector PGEX (Smith and Johnson, Gen 7:31-40 (1988)). Điều này cho phép biểu hiện sản phẩm trong khung đọc mở chính xác. Các vector và các hệ thống điển hình để biểu hiện các vùng hyaluronidaza của polypeptit sHASEGP bao gồm các vector Pichia đã biết (có bán trên thị trường, chẳng hạn từ Invitrogen, San Diego, CA), cụ thể là các vector được thiết kế để tiết các protein đã được mã hoá. Protein này cũng có thể được biểu hiện trong các bào chất như các thể vùi. Một vector điển hình sẽ được mô tả trong các phần ví dụ này.

Các plasmit để biến nạp vào các tế bào E. coli bao gồm, ví dụ vector biểu hiện pET (xem, U.S 4.952.496; do Novagen, Madison WI cung cấp; cũng xem ấn phẩm do Novagen công bố mô tả các vector này).

Các plasmit này bao gồm pET 11a, chứa trình tự khởi động T7lac, trình tự kết thúc T7, trình tự điều khiển E. coli lac cảm ứng được, và gen ức chế lac; pET 12A-C, chứa trình tự khởi động T7, trình tự kết thúc T7, và tín hiệu tiết E.COLI OMPT; và pET 15B và PET 19B (Novagen, Madison, Wi), chứa trình tự dẫn đầu His-Tag để sử dụng trong việc tinh chế với cột His và một vị trí phân cắt trombin cho phép phân cắt sau khi tinh chế qua cột này; vùng trình tự khởi động T7 lac và trình tự kết thúc T7.

Các vector này được đưa vào các tế bào chủ như các tế bào Pichia và các tế bào vi khuẩn như E. coli, và các protein được biểu hiện trong đó. Các chủng Pichia điển hình bao gồm, ví dụ GS115. Các tế bào chủ vi khuẩn điển hình có chứa các bản sao ADN nhiễm sắc thể mã hoá polymeraza ARN T7 được liên kết chức năng với trình tự khởi động cảm ứng được, như trình tự khởi động LACUV (xem, U.S. 4.952.496). Các tế bào chủ này bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, chủng E. coli BL21 gây tiềm tan (DE3).

Các vùng sHASEGP, các dẫn xuất và các chất tương tự có thể được tạo ra bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này. Ví dụ, một khi các tế bào tái tổ hợp biểu hiện polypeptit sHASEGP, hoặc một vùng, đoạn hoặc dẫn xuất của nó được xác định, sản phẩm gen riêng biệt này có thể phân lập được và phân tích. Sản phẩm này có thể thu được bằng các thử nghiệm dựa trên các tính chất vật lý và/hoặc các tính chất chức năng của protein này, bao gồm nhưng không bị giới hạn ở, đánh dấu phóng xạ sản phẩm này, tiếp theo là phân tích bằng cách điện di gel, thử nghiệm miễn dịch, liên kết chéo với sản phẩm được đánh dấu bằng chất đánh dấu, và các thử nghiệm hoạt tính phân giải protein.

Các polypeptit sHASEGP có thể phân lập được và tinh chế bằng các phương pháp tiêu chuẩn đã biết trong lĩnh vực này (từ các nguồn tự nhiên hoặc các tế bào vật chủ tái tổ hợp biểu hiện các phức hoặc các protein này), bao gồm nhưng không bị giới hạn ở, sắc ký cột (ví dụ, sắc ký ái lực, trao đổi ion, sắc ký loại trừ gel, sắc ký áp suất cao pha đảo, sắc ký lỏng phân tích protein nhanh), ly tâm vi phân, hoà tan riêng phần, hoặc bằng các kỹ thuật tiêu chuẩn khác được sử dụng để tinh chế protein.

Theo một phương án, sHASEGP có thể được tinh chế đến mức đồng nhất từ môi trường có điều kiện được xác định về mặt hoá học chứa các tế bào DG44 được khuếch đại bằng metotrexat và được chuyển nhiễm bằng HZ24 theo cách 1) lọc thẩm tách theo đường tuyến tính, 2) liên kết và rửa giải từ sắc ký trao đổi ion, 3) cho chảy qua sắc ký phenyl sepharosa, 4) liên kết và rửa giải từ sắc ký phenylboronat và 5) liên kết và rửa giải bằng hydroxyapatit.

Các tính chất về mặt chức năng có thể được đánh giá bằng cách sử dụng thử nghiệm thích hợp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này.

Theo cách khác, một khi polypeptit sHASEGP hoặc vùng hoặc dẫn xuất của nó được xác định, trình tự axit amin của protein này có thể được suy luận từ trình tự nucleic của gen mã hoá nó. Kết quả là protein này hoặc vùng của nó hoặc dẫn xuất có thể được tổng hợp bằng các phương pháp hoá học tiêu chuẩn đã biết trong lĩnh vực này (ví dụ xem, Hunkapiller et al., Nature 310: 105-111 (1984)), tiếp theo là glycosyl hoá *in vitro*.

Các thao tác đối với các trình tự polypeptit sHASEGP có thể được tiến hành ở mức độ protein. Cũng được tính đến ở đây là các protein polypeptit sHASEGP, các

vùng của nó, các dẫn xuất hoặc các chất tương tự hoặc các đoạn của nó được cải biến khác biệt trong hoặc sau khi dịch mã, ví dụ bằng cách glycosyl hoá, axetyl hoá, phosphoryl hoá, amit hoá, peg hoá, được tạo dẫn xuất bằng các nhóm bảo vệ/chắn đã biết, phân cắt, phân giải protein, liên kết với một phân tử kháng thể hoặc phối tử tế bào khác.

Các cải biến hoá học bất kỳ có thể được tiến hành bằng các kỹ thuật đã biết, bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, việc phân cắt hoá học đặc hiệu bằng xyanogen bromua, trypsin, chymotrypsin, papain, V8, NABH₄, axetyl hoá, formyl hoá, oxy hoá, khử, tổng hợp chuyển hoá với sự có mặt của tunicamycin và các tác nhân khác.

Ngoài ra, các vùng, các chất tương tự và các dẫn xuất của polypeptit sHASEGP có thể được tổng hợp hoá học. Ví dụ, peptit tương ứng với một phần của polypeptit sHASEGP mà bao gồm vùng mong muốn hoặc gián tiếp tạo hoạt tính mong muốn *in vitro* có thể được tổng hợp bằng cách sử dụng thiết bị tổng hợp peptit.

Hơn nữa, nếu cần các axit amin không điển hình hoặc các chất tương tự axit amin về mặt hoá học có thể được đưa vào dưới dạng thay thế hoặc bổ sung vào trình tự polypeptit sHASEGP này.

Các axit amin không điển hình bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, các chất đồng phân D của các axit amin thông thường, axit α -amino isobutyric, axit 4-amino butyric, Abu, axit 2-aminobutyric, E-ABU, e-Ahx, axit 6-amino hexanoic, Aib, axit 2-amino isobutyric, axit 3-amino propionicoic, ornitin, norleuxin, norvalin, hydroxyprolin, sarcosin, citrulin, axit cysteic, t-butylglyxin, t-butylalanin, phenylglyxin, cyclohexylalanin, β -alanin, axit flo-amin, các axit amin thiết kế như axit β -metyl amin, axit ca-metyl amin, axit na-metyl amin, và các chất tương tự axit amin nói chung. Ngoài ra axit amin này có thể là d (quay phải) hoặc l (quay trái).

Trong trường hợp khi các sản phẩm tự nhiên được nghi là có đột biến hoặc phân lập được từ các loài mới, trình tự axit amin của polypeptit sHASEGP này phân lập được từ nguồn tự nhiên cũng như là chúng được biểu hiện *in vitro*, hoặc từ các vector biểu hiện được tổng hợp *in vivo* hoặc *in vitro*, có thể được xác định từ việc phân tích trình tự ADN, hoặc theo cách khác, bằng cách xác định trình tự trực tiếp protein phân lập được này. Phân tích này có thể được tiến hành bằng cách xác định trình tự axit amin theo cách thủ công hoặc bằng thiết bị xác định trình tự tự động.

Các cải biến - Hàng loạt cải biến của polypeptit sHASEGP và các vùng được tính đến ở đây. Phân tử axit nucleic mã hoá sHASEGP có thể được cải biến bằng các phương pháp khác nhau đã biết trong lĩnh vực này (Sambrook et al., (1990), *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York). Các trình tự này có thể được phân cắt tại các vị trí thích hợp bằng (các) endonucleaza giới hạn, tiếp theo là cải biến enzym hơn nữa nếu cần, phân lập và gắn *in vitro*. Trong quá trình tạo ra gen mã hoá một vùng, dẫn xuất hoặc chất tương tự của sHASEGP, cần phải quan tâm để đảm bảo rằng gen được cải biến này vẫn có khung đọc mở dịch mã gốc, không bị đứt gãy bằng các tính hiệu kết thúc dịch mã ở vùng gen này, trong đó hoạt tính mong muốn được mã hoá.

Ngoài ra, các phân tử axit nucleic mã hoá sHASEGP có thể được đột biến *in vivo* hoặc *in vitro*, để tạo ra và/hoặc phá huỷ sự dịch mã, sự khởi đầu và/hoặc sự kết thúc các trình tự, hoặc để tạo ra các biến thể trong các vùng mã hoá và/hoặc tạo ra các vị trí endonucleaza giới hạn mới hoặc phá huỷ các trình tự tồn tại trước, để tạo điều kiện thuận lợi cho việc cải biến *in vitro* tiếp theo. Ngoài ra, như được mô tả ở đây các mutein với các sửa đổi trình tự ban đầu, như thay thế các gốc Xys và loại bỏ hoặc bổ sung các vị trí glycosyl hoá được tính đến. sHASEGP của SEQ ID NO: 1 có bảy vị trí có khả năng glycosyl hoá. Các đột biến này có thể được thực hiện bằng kỹ thuật bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này để gây đột biến bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở gây đột biến hoá học hoặc gây đột biến định hướng vị trí (hutchinson et al., *J. Biol. Chem.* 253: 6551-6558 (1978)), sử dụng chỉ thị TABE (Pharmacia). Theo một phương án, ví dụ, một polypeptit sHASEGP hoặc vùng của nó được cải biến để có chất đánh dấu phát huỳnh quang. Theo một phương án cụ thể, polypeptit sHASEGP được cải biến để có một chất phản ứng khác loại hai chức năng. Chất phản ứng khác loại hai chức năng này có thể được sử dụng để liên kết chéo các thành phần của phức này.

Ngoài ra, các vùng, các chất tương tự và các dẫn xuất của polypeptit sHASEGP có thể được tổng hợp hoá học. Ví dụ, một peptit tương ứng với một phần của sHASEGP mà bao gồm vùng mong muốn hoặc gián tiếp tạo hoạt tính mong muốn *in vitro* có thể được tổng hợp bằng cách sử dụng thiết bị tổng hợp peptit. Hơn nữa, nếu cần các axit amin không điển hình hoặc các chất tương tự axit amin về mặt hoá học có thể được đưa vào dưới dạng thay thế hoặc bổ sung vào trình tự polypeptit sHASEGP này. Các axit amin không điển hình bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở các chất đồng

phân-D của các axit amin thông thường, axit α -amino isobutyric, axit 4-amino butyric, Abu, axit 2-aminobutyric, S-ABU, e-Ahx, axit 6-amino hexanoic, Aib, axit 2-amino isobutyric, axit 3-amino propionico, ornitin, norleuxin, norvalin, hydroxyprolin, sarcosin, xitruilin, axit xysteic, t-butylglyxin, t-butylalanin, phenylglyxin, xyclohexylalanin, β -alanin, axit flo-amin, các axit amin thiết kế như axit t-metyl amin, axit ca-metyl amin, axit na-metyl amin, và các chất tương tự axit amin nói chung. Ngoài ra axit amin này có thể là d (quay phải-dextrorotary) hoặc l (quay trái-levorotary).

F. Tạo ra sHASEGP được glycosyl hoá có hoạt tính chức năng với các gốc đường được liên kết ở vị trí N.

sHASEGP của người được glycosyl hoá ở vị trí N thích hợp là cần thiết để tạo ra protein ổn định về mặt xúc tác. Quá trình glycosyl hoá được liên kết ở vị trí N của sHASEGP có thể đạt được thông qua các kỹ thuật khác nhau. Quá trình glycosyl hoá của sHASEGP có thể đạt được bằng cách đưa các axit nucleic mã hoá sHASEGP vào trong các tế bào có nguồn gốc là các tế bào nhân chuẩn có khả năng glycosyl hoá được liên kết ở vị trí N thích hợp hoặc theo cách khác, cho polypeptit sHASEGP tiếp xúc với phần dịch chiết không có tế bào hoặc các enzym được tinh chế có khả năng đưa vào các gốc đường được liên kết ở vị trí N mong muốn vào.

Lựa chọn hệ thống biểu hiện

Các hệ thống biểu hiện tế bào nhân chuẩn khác nhau về mức độ và loại glycosyl hoá được đưa vào trong polypeptit được biểu hiện lạc vị trí. Các tế bào CHO ví dụ có mức hữu hiệu cao trong việc đưa quá trình glycosyl hoá được liên kết ở vị trí N vào polypeptit sHASEGP có hoạt tính.

Các hệ thống biểu hiện tế bào nhân chuẩn bổ sung mà đưa quá trình glycosyl hoá được liên kết ở vị trí N vào để tạo ra sản phẩm sHASEGP chức năng có thể được thử nghiệm bằng cách đưa một plasmit biểu hiện sHASEGP của người vào trong các tế bào này và thử nghiệm về hoạt tính trung hoà. Quá trình glycosyl hoá được liên kết ở vị trí N thích hợp có thể được xác định bằng cách phân tích FACE các oligosacarit giải phóng PNGAZA. Các profin glycosyl hoá của sHASEGP có hoạt tính xúc tác cũng được đề cập đến ở đây. Việc kiểm tra quá trình glycosyl hoá cũng có thể được tiến hành bằng cách xử lý sHASEGP từ các tế bào này bằng PNGAZA-F hoặc bằng

cách nuôi cấy sinh trưởng các tế bào này trong tunicamycin sau khi đưa các axit nucleic mã hoá sHASEGP vào.

Quá trình glycosyl hoá ở vị trí N của polypeptit sHASEGP *in vitro*. Polypeptit sHASEGP này có thể được glycosyl hoá ở vị trí N bằng cách cho polypeptit sHASEGP tiếp xúc với phần dịch chiết không có tế bào chứa hoạt tính có khả năng chuyển các đường được liên kết ở vị trí N vào polypeptit sHASEGP như các màng vi thể của chó hoặc thông qua việc sao chép kết hợp và dịch mã như có bán trên thị trường (Promega Madison WI).

Các oligosacarit được xem xét có một đầu cuối không khử và đầu cuối khử, dù có hay không sacarit này ở đầu cuối khử thực tế là một đường khử. Theo danh pháp chấp nhận được, các oligosacarit được mô tả ở đây với đầu không khử ở bên trái và đầu khử ở bên phải. Tất cả các oligosacarit được mô tả ở đây được mô tả bằng tên hoặc chữ viết tắt đối với sacarit không khử (ví dụ, Gal), tiếp theo là cấu hình của liên kết glycosit (.alpha. hoặc.beta.), liên kết của vòng này, vị trí vòng của sacarit khử liên quan đến liên kết này và sau đó là tên hoặc chữ viết tắt của sacarit khử (ví dụ, GlcNAc). Mỗi liên kết giữa hai đường có thể được biểu hiện, ví dụ như 2,3,2.fw darw.3, hoặc (2,3). Mỗi sacarit là một pyranosa.

Như được sử dụng ở đây, gốc đường được liên kết ở vị trí N để chỉ một oligosacarit được gắn với sHASEGP thông qua nitơ amit của các gốc Asn. Các oligosacarit được liên kết ở vị trí N có một số loại chính (oligomanoza, phức, thể lai, được sulfat hoá), tất cả chúng đều có nhân (Man)-3-GlcNAc-GlcNAc thông qua nitơ amit của các gốc Asn nằm trong trình tự -Asn-Xaa-Thr/Ser (trong đó Xaa không phải là Pro). Các vị trí được liên kết tại N thường được chỉ định gián tiếp bằng sự xuất hiện vòng “trống” trong khi xác định trình tự. Việc xác định dương tính có thể được tiến hành sau khi giải phóng oligosacarit bằng PNGaza F, mà chuyển hoá Asn được glycosyl hoá thành Asp. Sau khi giải phóng PNGaza F, các oligosacarit có thể được tinh chế bằng cách sử dụng sắc ký Bio-Gel P-6, với nhóm oligosacarit được đem sắc ký trao đổi anion điều chế có độ pH cao (HPAEC) (Townsend et al., (1989) anal. Biochem. 182, 1-8). Các chất đồng phân oligosacarit nhất định có thể được hoà tan bằng cách sử dụng HPAEC. Các gốc fucoza sẽ chuyển dời các vị trí rửa giải sớm trong phổ sắc ký, trong khi các gốc axit sialic bổ sung sẽ làm gia tăng thời gian duy trì. Việc xử lý đồng thời các glycoprotein có cấu trúc đã biết (ví dụ, fetuin của bò, glycoprotein

của axit α -1, lòng trắng trứng, ARNaza B, transferin) có thể tạo điều kiện phân chia các đỉnh oligosacarit. Các oligosacarit thu thập được có thể được đặc trưng bởi tổ hợp các phân tích thành phần và các liên kết metyl hoá (Waegheet et al., (1983) Carbohydr Res. 123, 281-304), với các cấu hình anome được nhận biết bằng phổ NMR (Van Halbeek (1993) in Methods Enzymol 230).

Theo cách khác, các oligosacarit có thể được nhận biết bằng cách điện di hydrat cacbon có phát huỳnh quang (fluorescence assisted carbohydrate electrophoresis-FACE) (Callewaert et al., (2001) Glycobiology 11, 275-281).

G. Phát hiện và mô tả đặc tính của các gốc đường được liên kết ở vị trí N trên sHASEGP

Việc xác định một protein trong thực tế có được glycosyl hoá hay không là bước đầu tiên trong phương pháp phân tích glycoprotein glycan. Phương pháp điện di gel polyacrylamit với sự có mặt của natri dodecyl sulphat (SDS-PAGE) là phương pháp lựa chọn trong bước cuối cùng trước khi xác định trình tự protein. Các protein được glycosyl hoá thường xuyên di trú ở dạng các dải khuếch tán theo SDS-PAGE. Việc giảm đáng kể độ rộng của dải và thay đổi vị trí di trú sau khi xử lý bằng peptit-N4-(N-acetyl-D-glucosaminyl) asparagin amidaza (PNGase F) được coi như chẩn đoán là có glycosyl hoá được liên kết ở vị trí N. Nếu các loại glycosyl hoá được liên kết ở vị trí N khác chiếm ưu thế thì các phải sử dụng đến các phương pháp khác. Các phương pháp thẩm tách lectin cung cấp một giải pháp độc lập với loại glycosyl hoá này (N đối với O). Các lectin, các protein liên kết hydrat cacbon từ các mô thực vật khác nhau có ái lực cao và tính đặc hiệu hẹp đối với phạm vi rộng các epitop đường đã xác định, được phát hiện trên các glycoprotein glycan (Cummings, R. D. (1994) Methods in Enzymol. 230, 66-86). Khi được tiếp hợp với biotin hoặc digoxigenin, chúng dễ dàng được nhận biết trên màng thẩm tách thông qua phản ứng so màu bằng cách sử dụng các kháng thể avidin hoặc các kháng thể kháng digoxigenin tiếp hợp với kiềm phosphatase (Haselbeck, et al. (1993) Methods in Mol. Biol. 14, 161-173.), tương tự với các phản ứng kháng thể thứ cấp – kiềm phosphatase được sử dụng trong phép thẩm Western blotting. Phương pháp sàng lọc bằng tấm lectin với tính đặc hiệu được xác định rõ có thể cung cấp thông tin đáng kể về các nhóm hydrat cacbon của glycoprotein. Quan trọng là, khả năng khuếch đại phát triển màu là đủ cao để từ 10 đến 50ng glycoprotein có thể dễ dàng được nhìn thấy trên màng thẩm tách

của SDS-PAGE. Mặc dù các lectin biểu hiện ái lực rất cao đối với các phối tử cùng nguồn gốc của chúng, một số chúng cũng bộc lộ ái lực đáng kể đối với các epitop có liên quan về mặt cấu trúc. Vì vậy, quan trọng là cần lưu ý cẩn thận khả năng của phản ứng chéo khi lựa chọn các tấm lectin, và sử dụng chúng với khả năng cao nhất có thể của các phức phân biệt từng phối tử, thể lai và các manosa glycan được liên kết ở vị trí N từ các cấu trúc được liên kết ở vị trí O.

Việc phân tích monosaccharit cũng có thể được sử dụng để xác định sHASEGP có được glycosyl hoá hay không và như trong trường hợp của phân tích lectin cũng cung cấp được thông tin bổ sung về các đặc điểm cấu trúc. Việc phân tích định lượng hợp phần monosaccharit nhằm i) nhận biết các protein được glycosyl hoá, ii) đưa ra tỷ số mol giữa các đường riêng biệt với protein, iii) gợi ý trong một số trường hợp về sự có mặt của các loại oligosaccharit, iv) là bước đầu tiên trong phương pháp làm sáng tỏ cấu trúc và v) cung cấp việc đánh giá mức độ phù hợp của sản phẩm đối với liệu pháp chữa bệnh bằng glycoprotein tái tổ hợp. Trong những năm gần đây, sắc ký trao đổi anion có độ pH cao với việc phát hiện bằng phép phân tích ampe tạo xung (high-pH anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection - HPAEC-PAD) được sử dụng rộng rãi để xác định hợp phần monosaccharit (Townsend, et al. (1995) in *Carbohydrate Analysis: High-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis* (Z. El Rassi ed.). pp. 181-209). Gần đây hơn, các phương pháp đánh dấu dựa trên nhóm huỳnh quang đã được giới thiệu và nhiều loại kit đã được bán trên thị trường. Ưu điểm dễ nhận thấy của phương pháp phát huỳnh quang là việc tăng khả năng gây mất cảm (50 lần). Một bất lợi tiềm tàng là các monosaccharit khác nhau có thể chứng tỏ độ chọn lọc khác nhau đối với nhóm huỳnh quang này trong phản ứng ghép cặp, trong sản phẩm thuỷ phân hoặc trong hỗn hợp ngoại chuẩn. Tuy nhiên, việc tăng khả năng gây mất cảm và khả năng nhận biết các monosaccharit có mặt từ một phần nhỏ trong tổng hàm lượng glycoprotein có sẵn, cũng như khả năng gây mất cảm lớn hơn bằng cách sử dụng phát huỳnh quang do tia laze làm cho phương pháp này trở nên rất hiệu quả.

Việc phân tích chế phẩm monosaccharit với một lượng sHASEGP nhỏ được thực hiện tốt nhất trên các màng PVDF (PSQ), sau khi điện thẩm tách (Weitzhandler et al., (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 5121-5130) hoặc sau khi các phần phân ước nhỏ hơn được phân tích trên các phép thẩm tách điểm. PVDF là một cơ chất lý tưởng đối với việc

phân tích hydrat cacbon vì không có mono hoặc oligosacarit liên kết với màng này một khi được giải phóng bằng cách thuỷ phân bằng axit hoặc bằng enzym.

Phân tích FACE là phương pháp hữu hiệu để phát hiện profin glycosyl hoá của sHASEGP. Profin của oligosacarit được liên kết ở vị trí N FACE® (Prozym) với 30% gel oligosacarit là một cơ chế. Các oligosacarit được phân cắt từ 100µg glycoprotein bằng cách phân cắt bằng enzym bằng N-Glycanaza (a.k.a PNGaza) được đánh dấu bằng nhóm huỳnh quang ANTS, được tách riêng bằng cách điện di có thể được sử dụng để phát hiện các profin glycosyl hoá của sHASEGP. Các vị trí tương đối của các dải oligosacarit được xác định bằng cách cho chạy mẫu này và việc pha loãng mẫu dọc theo với một thang oligosacarit chuẩn chỉ rõ được khoảng cách di trú theo đơn vị mức polyme hoá (Degree of Polymerization-DP).

I. Phương pháp điều trị bệnh

Các sHASEGP được nhận biết bằng các phương pháp ở đây được sử dụng để điều trị hoặc ngăn ngừa các cơ chất sHASEGP tích tụ bất thường trong cơ thể động vật, cụ thể là động vật có vú, kể cả người. Theo một phương án, phương pháp này bao gồm việc sử dụng glycoprotein sHASEGP với lượng hữu hiệu cho động vật có vú, nhờ đó điều trị hoặc ngăn ngừa được bệnh hoặc rối loạn.

Liệu pháp gen là một ví dụ điển hình, axit nucleic mà bao gồm trình tự nucleotit mã hóa polypeptit sHASEGP hoặc vùng chức năng hoặc dẫn xuất của chúng, được sử dụng để thúc đẩy chức năng polypeptit sHASEGP của chúng bằng liệu pháp gen. Liệu pháp gen đề cập đến liệu pháp được thực hiện bằng cách sử dụng axit nucleic cho đối tượng. Theo phương án này, axit nucleic tạo ra protein được mã hóa của nó mà gián tiếp có tác dụng điều trị bệnh bằng cách làm thúc đẩy chức năng của polypeptit sHASEGP. Phương pháp bất kỳ cho liệu pháp gen đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể được sử dụng (xem, Goldspiel et al., Clinical Pharmacy 12:488-505(1993); Wu and Wu, Biotherapy 3: 87-95 (1991); Tolstoshev, An. Rev. Pharmacol. Toxicol, 32: 573-596 (1993); Mulligan, Science 260: 926-932 (1993); and Morgan and Anderson, An. Rev. Biochem. 62: 191-217 (1993); TIBTECH 11 5: 155-215 (1993). Ví dụ một chế phẩm điều trị đối với liệu pháp gen bao gồm axit nucleic mã hóa polypeptit sHASEGP mà là một phần của vector biểu hiện polypeptit sHASEGP hoặc đoạn hoặc vùng hoặc protein khảm của nó trong tế bào chủ thích hợp. Cụ thể, axit nucleic này có

trình tự khởi động được liên kết chức năng với vùng mã hóa polypeptit sHASEGP, trình tự khởi động này là cảm ứng hoặc cơ định, và tùy ý đặc hiệu mô. Theo phương án cụ thể khác, phân tử axit nucleic được sử dụng, trong đó trình tự mã hóa polypeptit sHASEGP và trình tự mong muốn bất kỳ khác được sắp xếp liền kề với vùng thúc đẩy sự tái tổ hợp tương đồng ở vị trí mong muốn trong hệ gen, vì vậy tạo ra sự biểu hiện của axit nucleic protein sHASEGP trong nội nhiễm sắc thể (Koller and Smithies, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8932-8935 (1989); Zijlstra et al., Nature 342: 435-438 (1989)).

Việc phân phối axit nucleic cho bệnh nhân có thể là trực tiếp, trong đó bệnh nhân được tiếp xúc trực tiếp với axit nucleic hoặc vector mang axit nucleic này, hoặc gián tiếp, trong đó đầu tiên các tế bào được biến nạp bằng axit nucleic *in vitro*, sau đó được cấy ghép vào cơ thể bệnh nhân. Hai phương pháp này đều là đã biết, lần lượt được gọi là liệu pháp gen *in vivo* hoặc *ex vivo*.

Theo một phương án đặc biệt, axit nucleic được sử dụng trực tiếp *in vivo*, trong đó nó được biểu hiện để tạo ra sản phẩm mã hoá. Quá trình này được thực hiện bằng các phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này, ví dụ bằng cách tạo cấu trúc axit nucleic ở dạng một phần của vector biểu hiện axit nucleic thích hợp và sử dụng nó sao cho nó được sử dụng trong nội bào, ví dụ bằng cách gây nhiễm bằng retrovirus khuyết hoặc giảm hoạt lực hoặc vector của virus khác (xem US 4.980.286) hoặc bằng cách tiêm trực tiếp ADN trần, hoặc bằng cách sử dụng sự bắn phá của các vi hạt (ví dụ, súng bắn gen Biolistic, Dupont), hoặc bọc bằng lipid hoặc các thụ thể trên bề mặt tế bào hoặc các tác nhân chuyển nhiễm, bao nang trong các liposom, các vi hạt hoặc các vi nang hoặc bằng cách sử dụng nó trong mối liên kết với một peptit đã biết để di chuyển vào trong nhân hoặc sử dụng nó trong mối liên kết với một phối tử để nhập nội bào gián tiếp qua thụ thể (ví dụ xem, Wu and Wu, J. Biol. Chem, 262: 4429-4432 (1987)) (có thể được sử dụng với các loại tế bào đích đặc hiệu biểu hiện các thụ thể này), v.v.. Theo phương án khác, phức phối tử - axit nucleic có thể được tạo thành trong đó phối tử này là peptit của virus gây dung hợp để làm phá vỡ thể nhân, cho phép axit nucleic tránh được sự thoái hoá lysosom. Theo một phương án khác nữa, axit nucleic này có thể là đích *in vivo* đối với sự hấp thu đặc hiệu và biểu hiện của tế bào bằng cách tạo đích đối với thụ thể đặc hiệu (ví dụ xem, công bố đơn quốc tế PCT số WO92/06180, ngày 16.04.1992 (Wu et al.); WO 92/22635, ngày 23.12.1992 (Wilson

et al.); WO92/20316 ngày 26.11.1992 (Findeis et al.); WO 93/14188 ngày 22.07.1993 (Clarke et al.), WO 93/20221 ngày 14.10.1993 (Young)). Theo cách khác, axit nucleic này có thể được đưa vào trong nội bào và được kết hợp vào trong ADN của tế bào vật chủ để biểu hiện bằng cách tái tổ hợp tương đồng (Koller and Smithies, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8932-8935 (1989); Zijistra et al., Nature 342:435-438 (1989)).

Theo một phương án cụ thể, sẽ sử dụng vector virus mà chứa axit nucleic của polypeptit sHASEGP. Ví dụ, vector retrovirus có thể được sử dụng (xem, Miller et al., Meth. Enzymol. 217:581-599 (1993)). Các vector retrovirus này đã được cải biến để loại bỏ các trình tự của retrovirus không cần thiết cho việc kết hợp của hệ gen virus và dính gắn vào ADN tế bào chủ. Axit nucleic của polypeptit sHASEGP được sử dụng trong liệu pháp gen được tách dòng trong vector này, tạo điều kiện thuận lợi cho việc phân bố gen vào trong cơ thể bệnh nhân. Việc mô tả chi tiết hơn nữa về các vector retrovirus có thể được tìm thấy trong ấn phẩm của Boesen et al., Biotherapy 6:291-302 (1994), mô tả việc sử dụng vector retrovirus để phân bố gen *mdr1* vào các tế bào gốc để làm cho các tế bào gốc tạo máu kháng tốt hơn với hoá liệu pháp.

Các ấn phẩm tham chiếu khác mô tả việc sử dụng các vector retrovirus trong liệu pháp gen là Clowes et al., J. Clin. Invest. 93:644-651 (1994); Kiem et al., Blood 83:1467-1473 (1994); Salmons and Gunzberg, Human Gene Therapy 4:129-141 (1993); and Grossman and Wilson, Curr. Opin. In Genetics And Devel. 3:110-114 (1993).

Adenovirus là các vector virus khác mà có thể được sử dụng trong liệu pháp gen. Các adenovirus này là các chất dẫn có sức hấp dẫn đặc biệt để phân bố các gen đến biểu mô đường hô hấp. Các adenovirus vốn gây nhiễm trùng biểu mô đường hô hấp để gây bệnh nhẹ. Các đích khác đối với hệ thống phân bố trên cơ sở adenovirus là gan, hệ thần kinh trung ương, tế bào nội mô và cơ. Các adenovirus có ưu điểm là có khả năng gây nhiễm trùng các tế bào không phân chia. Tác giả Kozarsky và Wilson trong ấn phẩm Current Opinion in Genetics and Development 3:499-503 (1993) đưa ra việc xem xét lại liệu pháp gen trên cơ sở adenovirus. Bout et al., Human Gene Therapy 5:3-10 (1994) đã chứng tỏ việc sử dụng vector adenovirus để chuyển các gen vào biểu mô đường hô hấp của khỉ *rhesus*. Các ví dụ khác về việc sử dụng adenovirus trong liệu pháp gen có thể được tìm thấy trong các ấn phẩm Rosenfeld et al., Science 252:431-

434 (1991); Rosenfeld et al., Cell 68:143-155; and Mastrangeli et al., J. Clin. Invest. 91:225-234 (1993).

Các virus liên quan đến nhóm Adeno (AAV) cũng được đề xuất để sử dụng trong liệu pháp gen (Walsh et al., Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 204:289-300 (1993)).

Các giải pháp khác cho liệu pháp gen bao gồm việc chuyển gen tới các tế bào trong quá trình nuôi cấy mô bằng các phương pháp như xung điện, chuyển nhiễm thể mỡ, chuyển nhiễm gián tiếp bằng canxi phosphat, hoặc gây nhiễm trùng bằng virus. Thông thường, phương pháp chuyển bao gồm chuyển chất đánh dấu chọn lọc được tới các tế bào này. Các tế bào này sau đó được chọn lọc để phân lập được các tế bào hấp thụ được và biểu hiện được các gen được chuyển nhiễm này. Các tế bào này sau đó được cung cấp cho cơ thể bệnh nhân.

Theo phương án này, axit nucleic được đưa vào trong tế bào trước khi sử dụng *in vivo* để thu được tế bào tái tổ hợp. Các phương pháp thực hiện để đưa axit nucleic vào trong tế bào là các phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, sự chuyển nhiễm, xung điện, tiêm tế bào, gây nhiễm trùng bằng vector thể thực khuẩn hoặc virus chứa các trình tự axit nucleic, dung hợp tế bào, chuyển gen gián tiếp bằng nhiễm sắc thể, chuyển gen gián tiếp qua vi bào, dung hợp thể cầu, v.v.. Các kỹ thuật khác nhau là đã biết trong lĩnh vực này để đưa các gen lạ vào trong các tế bào (ví dụ xem, Ioffler and Behr, Meth. Enzymol. 217: 599-618 (1993); Cohen et al., Meth. Enzymol. 217:618-644 (1993); Cline, Pharmac. Ther. 29: 69-92 (1985)) và có thể được sử dụng, miễn là các chức năng sinh lý và phát triển cần thiết của các tế bào nhận không bị phá vỡ. Phương pháp này sẽ cung cấp kỹ thuật chuyển ổn định axit nucleic này vào các tế bào, sao cho axit nucleic này có thể biểu hiện được bằng tế bào này và thường có khả năng di truyền được và biểu hiện được bằng thế hệ con của tế bào này.

Các tế bào tái tổ hợp thu được có thể được cung cấp cho bệnh nhân bằng nhiều phương pháp khác nhau đã biết trong lĩnh vực này. Theo một phương án, các tế bào biểu mô được tiêm, ví dụ dưới da. Theo một phương án khác, các tế bào da tái tổ hợp được sử dụng ở dạng cấy ghép trong da cho bệnh nhân. Các tế bào máu tái tổ hợp (ví dụ, các tế bào gốc tạo máu hoặc các tế bào phát sinh sớm) có thể được sử dụng bằng cách tiêm tĩnh mạch. Lượng tế bào dự định được sử dụng sẽ phụ thuộc vào tác dụng

mong muốn, tình trạng của bệnh nhân, v.v., và có thể được xác định bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Các tế bào, trong đó axit nucleic có thể được đưa vào với mục đích liệu pháp gen, bao gồm các loại tế bào được mong muốn bất kỳ, sẵn có, và bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, các tế bào biểu mô, các tế bào nội mô, các tế bào sừng, nguyên bào sợi, các tế bào cơ, các tế bào gan; các tế bào máu như các tế bào lympho T, các tế bào lympho B, bạch cầu đơn nhân to, đại thực bào, tế bào bạch cầu trung tính, tế bào bạch cầu ưa eosin, tế bào nhân khổng lồ và các tế bào bạch cầu hạt; các tế bào gốc khác nhau hoặc các tế bào phát sinh sớm, cụ thể là các tế bào gốc tạo máu hoặc các tế bào phát sinh sớm, ví dụ như các tế bào gốc thu được từ tủy xương, máu dây rốn, máu ngoại vi, gan thai nhi, và các nguồn khác của nó.

Ví dụ, tế bào được sử dụng cho liệu pháp gen là cùng nguồn với cơ thể bệnh nhân. Theo một phương án trong đó các tế bào tái tổ hợp được sử dụng trong liệu pháp gen, axit nucleic của polypeptit sHASEGP được đưa vào trong các tế bào này sao cho axit nucleic có thể biểu hiện được bằng các tế bào này hoặc thế hệ con của tế bào này, và sau đó các tế bào tái tổ hợp được sử dụng *in vivo* với tác dụng chữa bệnh. Theo một phương án cụ thể, các tế bào gốc hoặc tế bào phát sinh sớm được sử dụng. Các tế bào gốc và/hoặc phát sinh sớm bất kỳ mà có thể phân lập được và được duy trì *in vitro* có thể có khả năng được sử dụng theo phương án này.

Các tế bào gốc này bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, các tế bào gốc tạo máu (hematopoietic stem cells - HSC), các tế bào gốc của các mô biểu mô như da và dòng biểu mô ruột, các tế bào cơ tim của phôi (công bố đơn quốc tế PCT số WO 94/08559, ngày 28.04.1994), và các tế bào gốc của dây thần kinh (Stemple and Anderson, Cell 71:973-985 (1992)).

Các tế bào gốc biểu mô (Epithelia stem cells - ESC) hoặc các tế bào sừng có thể thu được từ các mô như da, dòng biểu mô ruột bằng các phương pháp đã biết (Rheinwald, Meth. Cell Bio. 21A: 229 (1980)). Trong mô biểu mô được phân tầng như da, sự tái sinh da thường xảy ra bằng cách gián phân các tế bào gốc trong lớp tế bào gốc là lớp gần nhất với màng nền. Các tế bào gốc trong biểu mô ruột có tốc độ tái sinh biểu mô này nhanh. ESC hoặc các tế bào sừng thu được từ da hoặc dòng biểu mô ruột của bệnh nhân hoặc thể cho có thể được sinh trưởng trong mô nuôi cấy (Rheinwald,

Meth. Cell Bio. 21A:229 (1980); Pittelkow and Scott, Cano. Clinic Proc. 61:771 (1986)). Nếu ESC được thể cho cung cấp, phương pháp để ức chế hoạt tính phản ứng thể ghép chống lại vật chủ (tức là, sử dụng được chất hoặc kháng thể để tăng cường ức chế miễn dịch vừa phải) cũng có thể được sử dụng.

Đối với các tế bào gốc tạo máu (hematopoietic stem cells - HSC), phương pháp bất kỳ được sử dụng nhằm để phân lập, nhân giống và duy trì *in vitro* HSC có thể được sử dụng theo phương án này. Các phương pháp này có thể được thực hiện bao gồm các bước (a) phân lập và làm ổn định các tế bào nuôi cấy HSC từ các tế bào tủy xương phân lập được từ thai nhi, hoặc thể cho, hoặc (b) sử dụng các tế bào nuôi cấy HSC lâu dài đã được làm ổn định từ trước mà có thể là dị nguyên hoặc ngoại lai.

HSC không cùng nguồn thường được sử dụng với phương pháp ức chế phản ứng miễn dịch cấy ghép của thai nhi/bệnh nhân. Theo một phương án cụ thể, các tế bào tủy xương của người có thể thu được từ vùng gai chậu sau bằng kim hút tủy (xem ví dụ, Kodo et al., J. Clin. Invest. 73: 1377-1384 (1984)). Ví dụ, HSC có thể được làm giàu cao độ hoặc ở dạng hầu như tinh khiết. Việc làm giàu này có thể được thực hiện trước, trong hoặc sau khi nuôi cấy trong thời gian dài, và có thể được tiến hành bằng các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực này, Việc nuôi cấy các tế bào tủy xương trong thời gian dài có thể được làm ổn định và duy trì bằng cách sử dụng các kỹ thuật nuôi cấy tế bào Dexter cải biến (Dexter et al., J. Cell Physiol. 91:335 (1977)) hoặc các kỹ thuật nuôi cấy Witlock-Witte (Witlock and Witte, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:3608-3612 (1982)), chẳng hạn.

Theo một phương án cụ thể, axit nucleic này được sử dụng với mục đích liệu pháp gen bao gồm một trình tự khởi động chịu cảm ứng được liên kết chức năng với vùng mã hoá này sao cho việc biểu hiện của axit nucleic này là có thể khống chế được bằng cách khống chế sự có mặt hoặc không có mặt của tác nhân gây cảm ứng quá trình sao chép thích hợp.

Tiền dược chất - Phương pháp được đề xuất để điều trị khối u. Phương pháp này được tiến hành bằng cách sử dụng tiền dược chất được phân cắt tại vị trí đặc hiệu bằng sHASEGP để giải phóng dược chất có hoạt tính hoặc tiền chất mà có thể được chuyển hoá thành dược chất có hoạt tính *in vivo*. Sau khi tiếp xúc với tế bào biểu hiện hoạt tính sHASEGP, tiền dược chất này được chuyển hoá thành dược chất có hoạt

tính. Dược chất này có thể là thể tiếp hợp chứa tác nhân có hoạt tính, như dược chất chống ung thư, như tác nhân gây độc tế bào, hoặc tác nhân chữa bệnh khác (TA), được liên kết với cơ chất đối với sHASEGP đích, sao cho dược chất hoặc tác nhân này trong thể tiếp hợp không có hoạt tính hoặc không thể đi vào được tế bào, nhưng lại được hoạt hoá sau khi phân cắt. Dược chất này, ví dụ có thể chứa một phân tử chondroitin sulfat, cụ thể là các đơn vị tương đối ngắn, nhỏ hơn khoảng 20 disacarit, được phân cắt theo cách xúc tác bằng sHASEGP đích. Các tác nhân gây độc tế bào, bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, các tác nhân alkyl hoá, tác nhân chống tăng sinh và tác nhân liên kết tubulin. Các tác nhân khác bao gồm dược chất vinca, mitomycin, bleomycin và taxan.

J. Dược phẩm và cách sử dụng

1. Các thành phần của dược phẩm.

Dược phẩm chứa sHASEGP được đề cập ở đây. Cũng được đề cập đến ở đây là chế phẩm chứa các hợp chất mà điều biến hoạt tính của polypeptit sHASEGP và để điều trị bệnh khác hoặc hợp chất để điều trị rối loạn do hyaluronidaza gây ra, như hợp chất kháng thể.

Polypeptit sHASEGP này và tác nhân thứ hai có thể được đóng gói ở dạng các hỗn hợp riêng biệt để sử dụng cùng nhau hoặc sử dụng lần lượt hoặc sử dụng gián đoạn. Theo cách khác, chúng có thể được cung cấp ở dạng hỗn hợp duy nhất để sử dụng hoặc ở dạng hai hỗn hợp để sử dụng trong hỗn hợp duy nhất. Các chế phẩm này có thể được đóng gói ở dạng kit.

2. Chế phẩm và cách sử dụng.

Polypeptit sHASEGP và vùng hyaluronidaza của người hoà tan được của nó được đề cập đến ở đây có thể được bào chế ở dạng dược phẩm, cụ thể là để sử dụng liều đơn. Nồng độ của các polypeptit trong chế phẩm là hữu hiệu để phân bố một lượng mà là hữu hiệu đối với mục đích điều trị, sau khi sử dụng. Điển hình là, các dược phẩm này được bào chế để sử dụng liều đơn. Để bào chế dược phẩm, đoạn có khối lượng của polypeptit sHASEGP, vùng hyaluronidaza của người hoà tan được của nó hoặc hỗn hợp của nó được hoà tan, được tạo huyền phù, được phân tán hoặc theo cách khác được trộn trong chất dẫn được chọn lọc ở nồng độ hữu hiệu sao cho làm giảm nhẹ hoặc làm thuyên giảm tình trạng bệnh lý.

Các chất mang hoặc chất dẫn được dụng thích hợp để sử dụng với sHASEGP hoặc các vùng hyaluronidaza của người hoà tan được của nó được đề cập đến ở đây bao gồm các chất mang bất kỳ đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này thích hợp đối với cách thức sử dụng cụ thể.

Ngoài ra, các polypeptit này có thể được bào chế ở dạng thành phần có hoạt tính được lý duy nhất trong dược phẩm này hoặc có thể được bào chế kết hợp với các hoạt chất khác. Các huyền phù liposom, bao gồm các liposom nhằm vào mô cũng có thể thích hợp làm các chất mang được dụng. Chúng có thể điều chế được theo các phương pháp đã biết đối với các người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, chế phẩm liposom có thể điều chế được như được mô tả trong patent Mỹ số US 4.522.811.

sHASEGP có hoạt tính hoặc vùng hyaluronidaza của người hoà tan được của nó được bao gồm trong chất mang được dụng với lượng đủ để có tác dụng hữu hiệu chữa bệnh mà không có các tác dụng phụ không mong muốn trong cơ thể bệnh nhân được điều trị. Nồng độ hữu hiệu để chữa bệnh có thể được xác định theo kinh nghiệm bằng cách thử nghiệm polypeptit trong các hệ thống *in vitro* và *in vivo* đã biết như bằng cách sử dụng các thử nghiệm được đề cập đến ở đây hoặc ví dụ xem ấn phẩm: Taliani et al. (1996) Anal. Biochem. 240: 60-67, Filocamo et al. (1997) J. Virology 71: 1417-1427, Sudo et al. (1996) Antiviral Res. 32: 9-18, Buffard et al. (1995) Virology 209: 52-59, Bianchi et al. (1996) Anal. Biochem. 237: 239-244, Hamatake et al. (1996) Intervirology 39: 249-258, Steinkuhler et al. (1998) Biochem. 37: 8899-8905, D'Souza et al. (1995) J. Gen. Virol. 76: 1729-1736, Takeshita et al (1997) Anal. Biochem. 247: 242-246; ví dụ xem: Shimizu et al. (1994) J. Virol. 68: 8406-8408; Mizutani et al. (1996) J. Virol. 70: 7219-7223, Mizutani et al. (1996) Biochem. Biophys. Res. Commun. 227: 822-826, Lu et al. (1996) Pro. Natl. Acad. Sci. (USA) 93: 1412-1417, Hahm et al. (1996) Virology 226: 318-326, Ito et al. (1996) J. Gen. Virol. 77: 1043-1054, Mizutani et al. (1995) Biochem. Biophys. Res. Commun. 212: 906-911, Cho et al. (1997) J. Virol. Meth. 65: 201-207 và sau đó được ngoại suy đối với liều dùng cho người.

Diễn hình là, một liều hữu hiệu để chữa bệnh được tính đến. Lượng này được sử dụng nằm trong khoảng từ 0,001 đến 1mg/mL, bao gồm nằm trong khoảng từ 0,005 đến 0,05mg/mL và khoảng 0,01mg/mL theo thể tích máu. Dạng đơn vị liều lượng

được lý điều chế được để cung cấp khoảng từ 1mg đến 1000mg, bao gồm khoảng từ 10-500mg và bao gồm khoảng từ 25-75mg hoạt chất chủ yếu hoặc hỗn hợp chứa các thành phần chủ yếu trên dạng đơn vị liều lượng chính xác có thể được xác định theo kinh nghiệm.

Trong một số ví dụ, liều đơn vị cao sHASEGP của người được ưu tiên. Ví dụ, để sử dụng qua đường tĩnh mạch, nồng độ của sHASEGP nằm trong khoảng 500-100.000 đơn vị/ml là được ưu tiên. Chế phẩm sHASEGP được đông khô nhanh cũng là lý tưởng để bảo quản liều đơn vị cao sHASEGP. Các lọ nhỏ được đông khô nhanh chứa 200.000 đơn vị sHASEGP được tính đến để cung cấp qua đường tĩnh mạch.

Các liều ở nồng độ cao cũng được tính đến để cung cấp sHASEGP với các thể tích nhỏ. Việc sử dụng từ 10-100ul trong 5000 đơn vị/ml sHASEGP được tính đến để tiêm vào tiền phòng để hoà tan các chất nhót đàn hồi được sử dụng trước trong quá trình phẫu thuật cấy ghép đục thủy tinh thể và cấy ghép thấu kính vào trong mắt ở bệnh viêm thể thủy tinh. Cũng tính đến các liều nhỏ để tiêm với lượng nằm trong khoảng từ 50 đến 200U/ml để tiêm vào trong mắt như trong điều trị xuất huyết thể thủy tinh hoặc tách rời võng mạc – *in vitro* trong thoái hoá võng mạc gây đái tháo đường.

Hoạt chất này có thể được sử dụng một lần hoặc được chia nhỏ thành các liều nhỏ hơn để sử dụng làm nhiều lần. Được hiểu là liều chính xác và thời gian điều trị là một hàm số của bệnh được điều trị và có thể được xác định theo kinh nghiệm bằng các phương pháp thử nghiệm đã biết hoặc bằng phép ngoại suy từ dữ liệu thử nghiệm *in vivo* hoặc *in vitro*. Lưu ý rằng, các nồng độ và các giá trị liều cũng có thể thay đổi để làm giảm mức độ trầm trọng của bệnh. Cũng được hiểu hơn nữa là đối với đối tượng cụ thể bất kỳ, các chế độ liều đặc hiệu sẽ được điều chỉnh theo thời gian phụ thuộc vào đối tượng cần điều trị và quyết định của thầy thuốc cho phép sử dụng thuốc hoặc giám sát việc sử dụng thuốc này, và phạm vi nồng độ nêu ở đây chỉ là ví dụ điển hình và không nhằm giới hạn phạm vi hoặc khả năng sử dụng các dược phẩm và tổ hợp chứa chúng.

Các dẫn xuất được dụng bao gồm các axit, este, hydrat, solvat và các dạng tiền dược chất. Dẫn xuất này điển hình được lựa chọn sao cho các tính chất dược động học

đối với sHASEGP trung hoà hoặc vùng hyaluronidaza của người hoà tan được của nó tương ứng là tốt.

Vì vậy, một hoặc nhiều polypeptit ở đây hoặc dẫn xuất được dụng của chúng, với nồng độ hoặc lượng hữu hiệu, được trộn với chất mang hoặc chất dẫn được dụng thích hợp để sử dụng cục bộ, khu trú hoặc nội hấp, để tạo thành được phẩm. Các polypeptit sHASEGP hoặc các vùng hyaluronidaza của người hoà tan được của chúng được sử dụng với lượng hữu hiệu để cải thiện hoặc điều trị được rối loạn mà liệu pháp điều trị đề cập đến. Nồng độ của polypeptit có hoạt tính trong được phẩm phụ thuộc vào sự hấp thụ, khả năng khử hoạt tính, tốc độ tiết polypeptit có hoạt tính, chế độ sử dụng liều, lượng được sử dụng, các chế phẩm cụ thể cũng như các yếu tố khác đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Các tác nhân chữa bệnh sử dụng trong các phương pháp này có thể được sử dụng theo cách bất kỳ đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, như, nhưng không bị giới hạn ở, sử dụng tại chỗ, trong khớp, trong nang hoạt dịch, trong mắt, trong não thất, trong phiến vách, trong tĩnh mạch, trong cơ, trong phúc mạc, trong da, trong khí quản, cũng như tổ hợp bất kỳ của hai hoặc nhiều hơn trong số các cách sử dụng trên. Các chế phẩm dạng bột khô để hít vào phổi cũng có thể được sử dụng.

Cách sử dụng thích hợp nhất sẽ thay đổi phụ thuộc vào mục đích sử dụng, chẳng hạn như, ví dụ, sử dụng làm tác nhân phân bố để tạo điều kiện phân bố các dịch lỏng dưới da, sử dụng để làm giảm nhãn áp trong mắt của bệnh nhân mắc bệnh tăng nhãn áp nhận các chất nhớt đàn hồi, hoặc sử dụng như là một “tác nhân phân tán” để tăng cường hoạt tính của các hoá liệu pháp, và vị trí cần quan tâm, như một nội quan cụ thể, một khối u đang phát triển, hốc mắt, và các phần biểu bì. Các cách thức sử dụng bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, sử dụng tại chỗ, theo cách cục bộ, sử dụng trong khớp, trong nang hoạt dịch, trong mắt, trong não thất, trong phiến vách, trong tĩnh mạch, trong cơ, trong phúc mạc, trong da, trong khí quản, cũng như tổ hợp bất kỳ của hai hoặc nhiều hơn trong số các cách sử dụng trên. Ví dụ, để điều trị các bệnh ung thư như ung thư tế bào biểu mô vảy, ung thư vú, ung thư bàng quang và ung thư dạ dày-ruột, có thể sử dụng cục bộ, bao gồm sử dụng nhằm vào vị trí phát triển khối u (ví dụ, trong phiến vách, trong não thất hoặc trong nang dịch) nhằm đưa ra ưu điểm là tác

nhân chữa bệnh này có thể được sử dụng ở nồng độ cao mà không có nguy cơ sinh ra các biến chứng nào khi sử dụng theo cách nội hấp.

Các chất mang hoặc chất dẫn được dùng hoặc làm mỹ phẩm thích hợp để sử dụng với các polypeptit sHASEGP hoặc vùng hyaluronidaza của người hoà tan được của chúng được đề cập đến ở đây bao gồm các chất mang bất kỳ đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này mà là thích hợp theo các cách thức sử dụng cụ thể. Ngoài ra, các polypeptit này có thể được bào chế ở dạng hoạt chất có tác dụng được lý duy nhất trong được phẩm hoặc có thể được kết hợp với các hoạt chất khác mà không làm mất tác dụng mong muốn, hoặc được kết hợp với các chất khác hỗ trợ thêm cho tác dụng mong muốn đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, các polypeptit sHASEGP được đề cập đến ở đây có thể được sử dụng làm tác nhân phân bố hoặc “phát tán” kết hợp với hoạt chất thứ hai, như một tác nhân hữu hiệu để chữa bệnh bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, được chất hoặc tiền được chất, để tạo điều kiện thuận lợi cho việc phân bố hoạt chất thứ hai hoặc để tăng cường hoạt tính của hoạt chất thứ hai này. Theo một phương án cụ thể, polypeptit sHASEGP hoặc vùng hyaluronidaza của người hoà tan được của chúng có thể được cùng bào chế với một tác nhân gây tê như Lignocain, Bupivacain hoặc hỗn hợp của hai tác nhân này và tùy ý, một tác nhân hormon như hormon tuyến thượng thận, để làm giảm hoặc dừng quá trình hấp thụ máu trong phẫu thuật mắt. Polypeptit sHASEGP hoặc vùng hyaluronidaza của người hoà tan được của chúng cũng có thể được cùng bào chế với các hoá liệu pháp khác nhau, như độc tố và nhân tố gây hoại tử khối u, để tăng cường hoạt tính của hoá liệu pháp này và/hoặc làm tăng cường khả năng đáp ứng của các khối u đích đối với hoá liệu pháp. Hoạt chất này được bao gồm trong chất mang với lượng đủ để tạo ra tác dụng chữa bệnh khi không có mặt các ảnh hưởng độc tố nghiêm trọng trên cơ thể được điều trị. Nồng độ hữu hiệu này có thể được xác định theo kinh nghiệm bằng cách thử nghiệm các hợp chất này trong các hệ thống *in vivo* và *in vitro* bao gồm các mô hình động vật được mô tả ở đây.

Các dung dịch hoặc huyền phù được sử dụng ngoài đường tiêu hoá, qua da, dưới da hoặc được sử dụng khu trú có thể bao gồm các thành phần sau: chất pha loãng vô trùng như nước để tiêm, dung dịch nước muối, dầu không bay hơi, polyetylen glycol, glyxerin, propylen glycol hoặc các dung môi tổng hợp khác; các tác nhân chống vi khuẩn như rượu benzylic và metyl paraben; các chất chống oxy hoá như axit

ascorbic và natri bisulfit; các tác nhân tạo chelat như axit etylen diaminete traaxetic (ethylene diaminete traacetic acid-EDTA). Các dung dịch đệm như axetat xitrat và phosphat; và các tác nhân điều chỉnh đẳng trương bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, natri clorua, canxi clorua, magie clorua, dextroza, glyxerol hoặc axit boric. Các chế phẩm dùng ngoài đường tiêu hoá có thể được chứa trong các ống tiêm, các bơm tiêm dùng một lần hoặc các lọ nhỏ làm bằng nhựa, thủy tinh hoặc các vật liệu thích hợp khác để chứa liều đơn hoặc liều đa.

Các polypeptit sHASEGP hoặc vùng hyaluronidaza của người hoà tan được của chúng có thể được tạo huyền phù dưới dạng được micron hoá hoặc dạng thích hợp khác hoặc có thể được tạo dẫn xuất để tạo thành sản phẩm có hoạt tính hoà tan được nhiều hơn hoặc tạo thành dạng tiền dược chất. Dạng hỗn hợp thu được này phụ thuộc vào nhiều yếu tố, bao gồm cách thức sử dụng định dùng và độ hoà tan của polypeptit này trong chất mang hoặc chất dẫn được lựa chọn. Nồng độ hữu hiệu là đủ để cải thiện được tình trạng bệnh cần điều trị và có thể được xác định theo kinh nghiệm bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Để bào chế dược phẩm, đoạn có khối lượng của polypeptit được hoà tan, tạo huyền phù, được phân tán hoặc theo cách khác được trộn trong chất dẫn được lựa chọn ở nồng độ hữu hiệu sao cho làm giảm được hoặc cải thiện được tình trạng bệnh cần điều trị.

Trong trường hợp, trong đó các polypeptit sHASEGP hoặc vùng hyaluronidaza của người hoà tan được của chúng biểu hiện độ hoà tan không hoàn toàn, các phương pháp hoà tan các polypeptit này có thể được sử dụng. Các phương pháp này là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, và bao gồm nhưng không bị giới hạn ở, bằng cách sử dụng các đồng dung môi như dimetylsulfoxit (dimethylsulfoxide-DMSO), bằng cách sử dụng chất hoạt động bề mặt như TWEEN® và Pluronic®F68; hoặc hoà tan trong dung dịch nước natri bicacbonat. Các dẫn xuất của polypeptit như các tiền dược chất của polypeptit này cũng có thể được sử dụng để bào chế các dược phẩm hữu hiệu. Khi được chỉ định dùng cho mắt, các dược phẩm sẽ được bào chế trong chất mang chấp nhận được cho mắt. Để sử dụng cho mắt, có thể tính đến việc sử dụng cục bộ bằng cách sử dụng khu trú hoặc bằng cách tiêm. Các chế phẩm giải phóng theo thời gian cũng là được mong muốn. Điển hình là, các dược

phẩm này được bào chế để sử dụng theo liều đơn sao cho một liều đơn cung cấp một lượng hữu hiệu.

Sau khi trộn hoặc bổ sung polypeptit này với chất mang, hỗn hợp thu được có thể ở dạng dung dịch, huyền phù, nhũ tương hoặc các dạng khác và có thể được bào chế ở dạng hỗn hợp nước, dạng kem, dạng gel, thuốc mỡ, nhũ tương dung dịch, dạng cón ngọt, dạng nước thơm, dạng huyền phù, cón thuốc, bột nhào, dạng bột, dạng sol khí, dạng để rửa (vết thương), dạng phun, dạng thuốc đạn, dạng băng cuộn hoặc các dạng chế phẩm bất kỳ khác thích hợp để sử dụng theo cách nội hấp, khu trú hoặc sử dụng cục bộ.

Dạng hỗn hợp thu được phụ thuộc vào nhiều yếu tố, bao gồm cách thức sử dụng định dùng và khả năng hoà tan của hợp chất này trong chất dẫn hoặc chất mang được lựa chọn. Nếu cần, các muối được dùng hoặc các dẫn xuất khác của hợp chất này được điều chế. Để sử dụng cục bộ bên trong, như trong cơ, ngoài đường tiêu hoá hoặc sử dụng trong khớp, các hợp chất này tốt hơn là được bào chế ở dạng huyền phù dung dịch trong môi trường trên cơ sở nước như dung dịch đệm đẳng trương hoặc được kết hợp với chất mang tương hợp về mặt sinh học hoặc chất dính bám sinh học dự định để sử dụng bên trong.

Polypeptit sHASEGP này hoặc vùng hyaluronidaza của người hoà tan được của chúng được bao gồm trong chất mang được dùng với lượng đủ để gây ra tác dụng hữu hiệu chữa bệnh trong cơ thể bệnh nhân cần điều trị, khi không có mặt các tác dụng phụ không mong muốn. Được hiểu là số lượng và mức độ tác dụng phụ phụ thuộc vào điều kiện mà các hợp chất này được sử dụng. Ví dụ, các tác dụng phụ không mong muốn và gây độc nhất định sẽ được chấp nhận trong quá trình điều trị các bệnh lý đe dọa tử vong nhưng sẽ không được chấp nhận khi điều trị các rối loạn ở mức độ nhẹ hơn. Tất nhiên, lượng hữu hiệu sử dụng để chữa bệnh sẽ phụ thuộc vào mức độ trầm trọng của bệnh và thể trọng và tình trạng chung của bệnh nhân, cũng như là cách thức sử dụng. Việc sử dụng cục bộ tác nhân chữa bệnh này thường cần đến liều nhỏ hơn so với cách thức sử dụng nội hấp bất kỳ, mặc dù trong một số trường hợp, nồng độ cục bộ của tác nhân chữa bệnh này có thể cao hơn sau khi sử dụng cục bộ so với nồng độ đạt được ở mức độ an toàn của tác nhân chữa bệnh này khi sử dụng nội hấp.

Vì các đối tượng có thể biểu hiện các triệu chứng với mức độ trầm trọng khác nhau và mỗi tác nhân chữa bệnh có các đặc tính chữa bệnh duy nhất của nó, nên thầy thuốc có nhiệm vụ phải xác định đáp ứng của cá thể để điều trị và điều chỉnh các liều phù hợp. Các liều được sử dụng *in vitro* có thể đưa ra chỉ dẫn hữu hiệu về các lượng hữu hiệu để sử dụng tại chỗ được phẩm này, và trong một số trường hợp, các mô hình động vật có thể được sử dụng để xác định liều hữu hiệu để điều trị các rối loạn cụ thể. Nói chung, tuy nhiên khi sử dụng cục bộ, được dự định là lượng hữu hiệu của tác nhân chữa bệnh sẽ nằm trong khoảng từ 0,1picogram (pg) đến 1ng/kg thể trọng. Các cân nhắc khác nhau để đi đến được một lượng hữu hiệu là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này và đã được mô tả (ví dụ, xem ấn phẩm, Goodman And Gilman's The Pharmacological Bases of Therapeutics, 8th ed., Pergamon Press, 1990; Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1990; and Mantyh et al., (Science, 278:275-79, 1997) liên quan đến việc tiêm độc tố-phối tử đặc hiệu thần kinh vào trong phiên vách).

Các chế phẩm chứa polypeptit sHASEGP hoặc vùng hyaluronidaza của người hoà tan được của chúng để sử dụng ở đây bao gồm các chất thích hợp để sử dụng qua đường miệng, qua trực tràng, sử dụng khu trú, để hít, để ngậm (ví dụ, đặt dưới lưỡi), dùng ngoài đường tiêu hoá (ví dụ, dưới da, trong cơ, trong da, hoặc trong tĩnh mạch), sử dụng qua chân bì hoặc theo cách sử dụng bất kỳ. Cách sử dụng thích hợp nhất trong từng trường hợp bất kỳ sẽ phụ thuộc vào bản chất và mức độ trầm trọng của tình trạng bệnh cần điều trị và phụ thuộc vào bản chất của hoạt chất cụ thể được sử dụng. Các chế phẩm này được cung cấp để sử dụng cho người và động vật ở các dạng liều đơn vị như dạng viên nén, viên nang, viên tròn, dạng bột, dạng hạt, dung dịch hoặc huyền phù vô trùng để tiêm ngoài đường tiêu hoá và dung dịch hoặc huyền phù dùng qua đường miệng, và các nhũ tương dầu-nước chứa lượng thích hợp polypeptit và/hoặc các tác nhân khác hoặc các dẫn xuất được dụng của chúng. Các polypeptit được dụng và/hoặc các tác nhân khác và các dẫn xuất của chúng được bào chế cụ thể và được sử dụng ở các dạng liều đơn vị hoặc các dạng đa liều. Dạng liều đơn vị như được sử dụng ở đây dùng để chỉ các đơn vị riêng biệt về mặt vật lý thích hợp cho đối tượng người và động vật và được đóng gói riêng biệt như đã biết trong lĩnh vực này.

Các dược phẩm này được cung cấp để sử dụng cho người và động vật ở các dạng liều đơn vị như dạng viên nén, viên nang, viên tròn, dạng bột, dạng hạt, dung

dịch hoặc huyền phù vô trùng để tiêm ngoài đường tiêu hoá và dung dịch hoặc huyền phù dùng qua đường miệng, và các nhũ tương dầu-nước chứa một lượng thích hợp polypeptit sHASEGP hoặc vùng hyaluronidaza của người hoà tan được của chúng và tùy ý, tác nhân khác hoặc các dẫn xuất được dùng của chúng. Các hoạt chất có hoạt tính được lý để chữa bệnh và các dẫn xuất của chúng được bào chế cụ thể và được sử dụng ở các dạng liều đơn vị hoặc các dạng đa liều. Dạng liều đơn vị như được sử dụng ở đây dùng để chỉ các đơn vị riêng biệt về mặt vật lý thích hợp cho đối tượng người và động vật và được đóng gói riêng biệt như đã biết trong lĩnh vực này. Mỗi liều đơn vị chứa một lượng hoạt chất chữa bệnh đã xác định trước đủ để tạo ra tác dụng chữa bệnh mong muốn, kết hợp với chất mang, chất dẫn hoặc chất pha loãng được lý cần đến. Ví dụ về các dạng liều đơn vị bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, các dạng ống tiêm hoặc bơm tiêm và các dạng viên nén hoặc viên nang được đóng gói. Ví dụ, chế phẩm với thể tích nhỏ chứa dung dịch ổn định với lượng sHASEGP nằm trong khoảng từ 1 đến 5000 đơn vị trong thể tích nhỏ như từ 5 đến 50 μ l, có thể được đóng gói trước trong bơm tiêm để sử dụng như sau khi tiêm các chất nhót đàn hồi. Các dạng liều đơn vị có thể được sử dụng với các phần hoặc nhiều phần của nó. Dạng đa liều là nhiều dạng liều đơn vị giống nhau được đóng gói trong một vật chứa duy nhất để được sử dụng ở dạng liều đơn vị tách riêng. Ví dụ về các dạng đa liều bao gồm các lọ nhỏ, các chai chứa viên nén hoặc viên nang hoặc các chai chứa chất lỏng có thể tích tính theo pint hoặc gallon. Vì vậy, dạng đa liều là nhiều liều đơn vị không được tách riêng khi đóng gói.

Dược phẩm này có thể chứa hoạt chất như polypeptit sHASEGP cùng với một chất pha loãng như lactoza, sucroza, dicanxi phosphat hoặc carboxymethylxenluloza; chất bôi trơn như magie stearat, canxi stearat và đá talc; và chất gắn kết như tinh bột, gôm tự nhiên như gôm acaciagelatin, glucoza, ri đường, polvinylpyrolidin, xenluloza và các dẫn xuất của chúng, povidon, crospovidon và các chất gắn kết khác thuộc loại này là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Dược phẩm được sử dụng ở dạng lỏng, có thể được bào chế, chẳng hạn bằng cách hoà tan, phân tán hoặc theo cách khác, trộn hoạt chất như được xác định ở trên với các chất phụ trợ được lý tùy ý, ví dụ như nước, nước muối, dung dịch nước dextroza, glyxerol, glycol, etanol, và các chất tương tự để nhờ đó tạo thành dung dịch hoặc huyền phù. Nếu cần, dược phẩm này để được sử dụng cũng có thể chứa một lượng nhỏ các chất

phù trợ không độc như tác nhân làm ẩm, tác nhân nhũ hoá hoặc tác nhân hoà tan, tác nhân tạo đệm pH và các tác nhân tương tự, ví dụ axetat, natri xitrat, dẫn xuất cyclodextrin, sorbitan monolaurat, trietanolamin natri axetat, trietanolamin oleat, và các tác nhân khác thuộc loại này. Các phương pháp bào chế dạng liều này là đã biết, hoặc là rõ ràng đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này (ví dụ xem ấn phẩm, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pa., 15th Edition, 1975). Dược phẩm hoặc chế phẩm này để được sử dụng cần chứa một lượng hoạt chất với lượng đủ để làm giảm các triệu chứng bệnh của đối tượng cần điều trị. Ví dụ, một chế phẩm ổn định theo tiêu chuẩn chứa polypeptit sHASEGP hoặc vùng hyaluronidaza của người hoà tan được của chúng được đề cập ở đây bao gồm 150 đơn vị/ml glycoprotein hoà tan được bào chế trong EDTA, NaCl và CaCl_2 . Ngoài ra, tác nhân chống vi khuẩn hoặc chống nấm bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, thiomersal, có thể có mặt trong chế phẩm này. Chế phẩm này được đề cập ở đây là một dung dịch ổn định hoặc ở dạng đông khô nhanh chứa sHASEGP hoặc vùng hyaluronidaza của người hoà tan được của chúng trong EDTA, NaCl và CaCl_2 , chứa glycoprotein hoà tan với lượng có hoạt tính hữu hiệu, như 150 đơn vị/ml, cùng với lactoza, như 13mg/ml. Cũng được đề cập ở đây là chế phẩm chứa dung dịch ổn định hoặc dạng đông khô nhanh chứa sHASEGP hoặc vùng hyaluronidaza của người hoà tan được của chúng trong EDTA, NaCl và CaCl_2 chứa glycoprotein hoà tan với lượng có hoạt tính hữu hiệu, như 150 đơn vị/ml, cùng với lactoza, như 13mg/ml, và Albumin, Pluronic®F68, TWEEN® và/hoặc chất tẩy rửa khác. Chế phẩm khác được đề cập ở đây ở dạng dung dịch ổn định hoặc dạng đông khô nhanh chứa sHASEGP với lượng hữu hiệu hoặc vùng hyaluronidaza của người hoà tan được của chúng, như nằm trong khoảng từ 1 đến 300 đơn vị/ml, trong EDTA, NaCl và CaCl_2 .

Các dạng liều dùng hoặc các dược phẩm chứa hoạt chất nằm trong khoảng từ 0,005% đến 100% có thể điều chế được cùng với chất mang không độc để tạo sự cân bằng. Để sử dụng qua đường miệng, dược phẩm này có thể ở dạng viên nén, hoặc viên nang được bào chế bằng các phương pháp thông thường cùng với các tá dược được dụng như các chất liên kết (ví dụ, tinh bột ngô được gelatin hoá sơ bộ, polyvinyl pyrrolidon hoặc hydroxypropyl metylxenluloza); các chất độn (ví dụ, lactoza, xenluloza vi tinh thể hoặc canxi hydro phosphat); các chất bôi trơn (ví dụ, magie stearat, đá talc hoặc silic oxit); các chất gây phân rã (ví dụ, tinh bột khoai tây hoặc natri tinh bột

glycol hoá); các chất làm ẩm (ví dụ, natri lauryl sulfat). Các viên nén này có thể được bọc bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này.

Các sHASEGP hoặc vùng hyaluronidaza của người hoà tan được của chúng hoặc các dẫn xuất được dụng có thể được bào chế với chất mang để bảo vệ glycoprotein hoà tan này chống lại sự đào thải nhanh từ cơ thể, như các chế phẩm giải phóng theo thời gian hoặc các chế phẩm có vỏ bọc. Các chế phẩm này có thể chứa các tác nhân hữu hiệu về mặt dược lý khác đã biết trong lĩnh vực chuyên ngành chung này có giá trị để điều trị một hoặc nhiều bệnh hoặc các tình trạng cần điều trị bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, tác nhân hoá liệu pháp, tác nhân giảm đau, tác nhân chống viêm, tác nhân diệt vi khuẩn, tác nhân diệt amip, tác nhân diệt trichomonat, tác nhân chống hội chứng parkinson, tác nhân điều trị bệnh sốt rét, tác nhân chống co giật, tác nhân chống trầm cảm, tác nhân chống viêm khớp, tác nhân điều trị nấm, tác nhân điều trị bệnh cao huyết áp, tác nhân chống gây sốt, tác nhân chống ký sinh trùng, tác nhân kháng histamin, chất chủ vận gây tiết kiểu alpha-adrenalin, tác nhân phong bế kiểu alpha, tác nhân gây tê, tác nhân làm giãn phế quản, tác nhân diệt sinh vật, tác nhân diệt vi khuẩn, tác nhân kìm hãm vi khuẩn, tác nhân phong bế gây tiết kiểu beta-adrenalin, tác nhân phong bế kênh canxi, dược chất điều trị bệnh tim mạch, chất chống thụ thai, chất làm tan máu, chất lợi tiểu, chất chống trầm cảm, chất dùng để chẩn đoán bệnh, chất điện phân, chất gây ngủ, tác nhân hormon, tác nhân tăng đường huyết, tác nhân giãn cơ, tác nhân co cơ, tác nhân điều trị bệnh mắt, tác nhân giống thần kinh đối giao cảm, tác nhân hướng thần, chất giảm đau, chất tiết adrenalin, tác nhân an thần, chất lợi tiểu, tác nhân đặt âm đạo, tác nhân diệt virus, chất vitamin, chất chống viêm không steroid, chất ức chế enzym chuyển hoá angiotensin, polypeptit, protein, axit nucleic, dược chất, phân tử hữu cơ hoặc chất kích thích gây ngủ, để thu được tổ hợp chứa các tính chất mong muốn. Được hiểu là tổ hợp chữa bệnh này tạo nên một khía cạnh khác của dược phẩm và phương pháp điều trị được đề cập ở đây.

1. Dược phẩm dùng qua đường miệng

Các dạng liều sử dụng qua đường miệng là ở dạng rắn, dạng gel hoặc dạng lỏng. Các dạng liều rắn là các viên nén, viên nang, dạng hạt và dạng bột. Loại viên nén dùng qua đường miệng bao gồm dạng viên được nén, viên thuốc hình thoi nhai được và các viên nén có thể được bao màng hoặc bao đường hoặc viên bọc tan trong ruột. Các viên nang có thể là viên nang gelatin cứng hoặc mềm, trong khi đó dạng hạt và

dạng bột có thể được cung cấp ở dạng sỏi bột hoặc không sỏi bột kết hợp với các thành phần khác đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Dược phẩm chứa sHASEGP hoặc vùng hyaluronidaza của người hoà tan được của chúng có thể ở dạng lỏng, ví dụ dạng dung dịch, xiro, hoặc dạng huyền phù hoặc có thể ở dạng một sản phẩm được chất để hoàn nguyên với nước hoặc chất dẫn thích hợp khác trước khi sử dụng. Các chế phẩm dạng lỏng này có thể điều chế được bằng các phương pháp thông thường cùng với các chất phụ gia được dùng như chất tạo huyền phù (ví dụ, xiro sorbitol, dẫn xuất xenluloza hoặc các chất béo ăn được được hydro hoá); tác nhân nhũ hoá (ví dụ, lexitin hoặc acacia); các chất dẫn không nước (ví dụ, dầu hạch hạnh, este dầu, dầu thực vật được cắt phân đoạn); và các chất bảo quản (ví dụ, metyl hoặc propyl-p-hydroxybenzoat hoặc axit sorbic).

Theo các phương án nhất định, các chế phẩm này ở dạng liều rắn tốt hơn là ở dạng viên nang hoặc viên nén. Các viên nén, viên tròn, viên nang, viên dẹt và các viên tương tự có thể chứa các thành phần bất kỳ sau đây hoặc các hợp chất có bản chất tương tự: chất gắn kết; chất pha loãng; chất gây phân rã; chất bôi trơn; chất gây trượt; chất làm ẩm và chất tạo hương vị.

Ví dụ với các chất gắn kết bao gồm xenluloza vi tinh thể, gồm tragacan, dung dịch glucoza, dịch nhầy acacia, dung dịch gelatin, sucroza, tinh bột nhão. Các chất bôi trơn bao gồm đá talc, tinh bột, magie hoặc canxi stearat, licopodium, và axit stearic. Các chất pha loãng bao gồm ví dụ lactoza, sucroza, tinh bột, cao lanh, muối, manitol, và dicanxi phosphat. Các chất gây trượt bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, keo silicon dioxit. Các chất gây phân rã bao gồm natri carmelozơ liên kết chéo, natri tinh bột glycol hoá, axit alginic, tinh bột ngô, tinh bột khoai tây, bentonit, metylxenluloza, aga và carboxymetylxenluloza. Các chất tạo màu bao gồm, ví dụ bất kỳ thuốc nhuộm C hoặc FD hoà tan được trong nước đã được đăng ký chứng nhận, hỗn hợp của nó; thuốc nhuộm C hoặc FD không hoà tan được trong nước được tạo huyền phù trên nhôm oxit hydrat. Các chất làm ngọt bao gồm sucroza, lactoza, manitol và các chất làm ngọt nhân tạo như sacarin và các hương vị được sấy phun bất kỳ. Các chất tạo hương vị bao gồm các hương vị tự nhiên được chiết tách từ thực vật như các loại quả và hỗn hợp tổng hợp của các hợp chất tạo ra cảm giác dễ chịu như, nhưng không bị giới hạn ở, mùi bạc hà và metyl salixylat. Các chất làm ẩm bao gồm propylen glycol monostearat, sorbitan monooleat, dietylen glycol monolaurat và polyoxyetylen laural

ete. Viên bọc để tan trong ruột bao gồm các axit béo, các chất béo, sáp, senlac, senlac được amoni hoá và xenluloza axetat phtalat. Lớp bao màng bao gồm hydroxyetyl xenluloza, natri carboxymetyl xenluloza, polyetylen glycol 4000 và xenluloza axetat phtalat.

Nếu cần sử dụng qua đường miệng, sHASEGP hoặc vùng hyaluronidaza của người hoà tan được của chúng có thể được cung cấp ở dạng dược phẩm để bảo vệ các hoạt chất này từ môi trường axit của dạ dày. Ví dụ, dược phẩm này có thể được bào chế ở dạng viên bọc tan trong ruột, dạng này duy trì được nguyên vẹn hoạt chất trong dạ dày và giải phóng hoạt chất này trong ruột. Dược phẩm này cũng có thể được bào chế kết hợp với chất chống axit hoặc tác nhân khác thuộc loại này.

Khi dạng đơn vị liều là dạng viên nang, dạng này có thể chứa một chất mang lỏng như dầu béo ngoài các các hợp chất nêu trên. Ngoài ra, các dạng đơn vị liều có thể chứa các hợp chất khác nhau để cải biến dạng vật lý của đơn vị liều, ví dụ, bọc đường hoặc các tác nhân để tan trong ruột khác. Các hợp chất này cũng có thể được sử dụng là một thành phần của cốm ngọt, huyền phù, xiro, bánh xốp, dạng phun, gôm nhai được hoặc các dạng tương tự. Ngoài các hoạt chất này, xiro có thể chứa sucroza làm chất làm ngọt và các chất bảo quản nhất định, thuốc nhuộm và các chất tạo màu và tạo hương vị.

sHASEGP hoặc vùng hyaluronidaza của người hoà tan được của chúng cũng có thể được trộn với các hợp chất có hoạt tính khác mà không làm thay đổi tác dụng mong muốn, hoặc được trộn với các hợp chất có hoạt tính khác để hỗ trợ cho tác dụng mong muốn, như các chất chống axit, các chất chẹn H₂, và các chất lợi tiểu. Hoạt chất này là một hợp chất hoặc dẫn xuất được dụng của nó như được mô tả ở trên. Có thể bao gồm hoạt chất với các nồng độ cao hơn, đến 98% khối lượng hoạt chất.

Các chất mang dược dụng được bao gồm trong viên nén là các chất gắn kết, các chất bôi trơn, các chất gây phân rã, các chất tạo màu, các chất tạo hương vị và các chất làm ẩm. Do lớp bọc tan trong ruột, các viên nén được bọc để tan trong ruột kháng được với tác dụng của axit trong dạ dày và hoà tan hoặc phân rã trong ruột có môi trường axit hoặc kiềm. Các viên nén bọc đường là các viên nén được nén có sử dụng các lớp chất dược dụng khác nhau. Các viên nén bọc màng là các viên nén được nén mà được bọc bằng polyme hoặc lớp bọc thích hợp khác. Các viên nén được nén nhiều

lần là các viên nén được nén bằng nhiều hơn một chu kỳ nén có sử dụng các chất được dụng nêu trên. Các chất tạo màu cũng có thể được sử dụng trong dạng liều nêu trên. Các chất tạo màu và các chất làm ngọt được sử dụng trong viên nén được nén, viên nén bọc đường, được nén nhiều lần và nhai được. Các chất tạo hương vị và các chất làm ngọt đặc biệt được sử dụng trong việc bào chế các viên nén nhai được và các viên thuốc hình thoi.

Dạng liều lỏng dùng qua đường miệng bao gồm các dung dịch nước, nhũ tương, huyền phù, dung dịch và/hoặc các huyền phù được hoàn nguyên từ các hạt không sỏi và các chế phẩm được hoàn nguyên từ các hạt sỏi. Các dung dịch nước bao gồm cồn ngọt và xiro, chẳng hạn. các dạng nhũ tương là nước trong dầu hoặc dầu trong nước.

Dạng cồn ngọt là dạng chế phẩm rượu hydro hoá, trong, được làm ngọt. Các chất mang được dụng được sử dụng trong cồn ngọt bao gồm các dung môi. Dạng xiro là dạng dung dịch nước đậm đặc chứa đường, ví dụ, sucroza, và có thể chứa một chất bảo quản dạng nhũ tương là một hệ có hai pha trong đó một chất lỏng được phân tán ở dạng các tiểu cầu nhỏ vào một chất lỏng khác. Các chất mang được dụng được sử dụng trong nhũ tương là các chất lỏng không phải là nước, các chất nhũ hoá và các chất bảo quản. Các huyền phù sử dụng các chất tạo huyền phù được dụng và các chất bảo quản. Các chất được dụng được sử dụng trong các hạt không sỏi được hoàn nguyên thành dạng lỏng dùng qua đường miệng, bao gồm các chất pha loãng, các chất làm ngọt và các chất làm ẩm. Các chất được dụng được sử dụng trong các hạt sỏi được hoàn nguyên thành dạng liều lỏng dùng qua đường miệng bao gồm các axit hữu cơ và một nguồn cacbon dioxit. Các chất tạo màu và các chất tạo hương vị được sử dụng trong tất cả các dạng liều nêu trên.

Các dung môi bao gồm glycerin, sorbitol, rượu etylic và xiro. Ví dụ về các chất bảo quản bao gồm glycerin, metyl và propyl paraben, axit benzoic, natribenzoat và rượu. Ví dụ về các chất lỏng không chứa nước được sử dụng trong nhũ tương bao gồm dầu khoáng và dầu hạt bông. Ví dụ về các chất nhũ hoá bao gồm gelatin, acacia, tragacan, bentonit, và các chất hoạt động bề mặt như polyoxyetylen sorbitan monooleat. Các chất tạo huyền phù bao gồm natri carboxymetylxenluloza, pectin, tragacan, Veegum và acacia. Các chất pha loãng bao gồm lactoza và sucroza. Các chất làm ngọt bao gồm sucroza, xiro, glyxeryl và các chất làm ngọt nhân tạo như sacarin. Các chất làm ẩm bao gồm propylen glycol monostearat, sorbitan monooleat, dietylen

glycol monolaurat và polyoxyetylen lauryl ete. Các chất phụ gia hữu cơ bao gồm axit xitric và axit tartaric. Nguồn cacbon dioxit bao gồm natri bicacbonat và natri cacbonat. Các chất tạo màu bao gồm các thuốc nhuộm C hoặc FD hoà tan được trong nước đã được đăng ký chứng nhận và hỗn hợp của nó. Các chất tạo hương vị bao gồm các hương vị tự nhiên được chiết từ thực vật như các loại quả, và các hỗn hợp tổng hợp của các hợp chất này để tạo ra một cảm giác mùi vị dễ chịu.

Đối với dạng liều rắn, dung dịch hoặc huyền phù này, ví dụ propylen cacbonat, dầu thực vật hoặc triglyxerit, được bao nang trong nang gelatin. Các dung dịch này, chế phẩm và dạng bao nang của nó, được bộc lộ trong các US 4.328.245; 4.409.239; và 4.410.545. Đối với dạng liều lỏng, ví dụ trong polyetylen glycol, dung dịch này có thể được pha loãng với một lượng chất mang lỏng được dụng đủ, ví dụ nước, để được xác định dễ dàng khi sử dụng.

Theo cách khác, chế phẩm dạng lỏng hoặc dạng bán rắn dùng qua đường miệng có thể điều chế được bằng cách hoà tan hoặc phân tán sHASEGP hoặc vùng hyaluronidaza của người hoà tan được của chúng trong dầu thực vật, glycol, triglyxerit, polyetylen glycol este (ví dụ, propylen cacbonat) và các chất mang khác thuộc loại này, và bao nang các dung dịch hoặc huyền phù này trong vỏ nang gelatin cứng hoặc mềm. Các chế phẩm hữu hiệu khác được bộc lộ các US Re 28.219 và 4.358.603.

Các chế phẩm thích hợp để ngậm (dùng dưới lưỡi) bao gồm, ví dụ các viên thuốc hình thoi chứa sHASEGP hoặc vùng hyaluronidaza của người hoà tan được của chúng trong chất nền có hương vị, thường là sucroza và acacia hoặc tragacan; và các viên ngậm chứa hợp chất này trong chất nền trơn như gelatin và glyxerin hoặc sucroza và acacia.

Trong tất cả các phương án, các chế phẩm dạng viên nén và viên nang có thể được bọc như đã biết bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này để cải biến hoặc duy trì độ hoà tan của hoạt chất này. Vì vậy, ví dụ, chúng có thể được bọc bằng lớp bọc thông thương dễ tiêu hoá trong ruột như phenylsalixylat, sáp và xenluloza axetat phtalat.

2. Dung dịch và nhũ tương có thể tiêm được

Việc sử dụng ngoài đường tiêu hoá sHASEGP hoặc vùng hyaluronidaza của người hoà tan được của chúng thường được đặc trưng bằng cách sử dụng dưới da, trong cơ hoặc trong tĩnh mạch là cũng được tính đến. Dạng có thể tiêm được có thể điều chế được theo các cách thông thường, ở dạng dung dịch lỏng hoặc huyền phù; ở dạng rắn thích hợp cho dung dịch hoặc huyền phù trong chất lỏng trước khi để tiêm hoặc ở dạng nhũ tương. Các chất mang thích hợp là, ví dụ nước, nước muối, dextroza, glyxerol hoặc etanol. Ngoài ra, nếu cần được phẩm này để được sử dụng cũng có thể chứa các chất phụ trợ không gây độc với lượng nhỏ như các chất làm ẩm hoặc các chất nhũ hoá, các chất tạo đệm pH, các chất làm ổn định, các chất tăng cường độ hoà tan, và các chất khác thuộc loại này, ví dụ natri axetat, sorbitan monolaurat, trietanolamin oleat và xyclodextrin. Việc cấy ghép một hệ thống giải phóng chậm hoặc giải phóng kéo dài sao cho duy trì được mức độ ổn định của liều này (ví dụ xem patent Mỹ số 3.710.795) là cũng được tính đến ở đây. Hàm lượng phần trăm của sHASEGP hoặc vùng hyaluronidaza của người hoà tan được của chúng chứa trong các dược phẩm dùng ngoài đường tiêu hoá này phụ thuộc vào bản chất đặc hiệu cũng như hoạt tính của hợp chất này và nhu cầu cần thiết của đối tượng điều trị.

Các hợp chất này được sử dụng ngoài đường tiêu hoá bao gồm trong tĩnh mạch, sử dụng dưới da hoặc trong cơ. Các chế phẩm dùng ngoài đường tiêu hoá bao gồm các dung dịch vô trùng dễ dàng để tiêm, các sản phẩm khô hoà tan được vô trùng như dạng bột được đông khô nhanh, dễ dàng được kết hợp với một dung môi hoặc dung dịch vô trùng ngay trước khi sử dụng, kể cả dạng viên nén dùng dưới da, các huyền phù vô trùng dễ dàng để tiêm, các sản phẩm khô hoà tan được vô trùng dễ dàng được kết hợp với một chất mang ngay trước khi sử dụng và các nhũ tương vô trùng. Các dung dịch này có thể là nước hoặc không phải là nước.

Nếu được sử dụng để tiêm tĩnh mạch, các chất mang thích hợp bao gồm nước muối sinh lý hoặc dung dịch muối đệm phosphat (phosphat buffered saline-PBS), và các dung dịch chứa các chất làm đặc và các chất hoà tan như glucoza, polyetylen glycol và polypropylen glycol và hỗn hợp của chúng.

Các chất mang được dùng được sử dụng trong các chế phẩm dùng ngoài đường tiêu hoá bao gồm các chất dẫn chứa nước, các chất dẫn không chứa nước, các chất chống vi khuẩn, các chất đẳng trương, dung dịch đệm, các chất chống oxy hoá, các

chất gây tê cục bộ, các chất tạo huyền phù và các chất gây phân tán, các chất nhũ hoá, các chất tạo chelat hoặc tác nhân cang hoá và các chất được dụng khác.

Ví dụ về các chất dẫn chứa nước bao gồm natri clorua để tiêm, dung dịch Ringer để tiêm, dextroza đẳng trương để tiêm, nước vô trùng để tiêm, dung dịch Ringer dextroza và lactat để tiêm. Các chất dẫn không chứa nước dùng ngoài đường tiêu hoá bao gồm dầu không bay hơi có nguồn gốc thực vật, dầu hạt bông, dầu ngô, dầu vừng và dầu lạc. Các tác nhân chống vi khuẩn ở nồng độ kìm hãm vi khuẩn hoặc kìm hãm nấm cần phải được thêm vào chế phẩm dùng ngoài đường tiêu hoá được đóng gói trong các vật chứa liều đa bao gồm phenol hoặc cresol, thuỷ ngân, rượu benzylic, clobutanol, este của axit metyl và propyl-p-hydroxybenzylic, thiomersal, benzalkoni clorua và benzethoni clorua. Các chất đẳng trương bao gồm natri clorua và dextroza. Các dung dịch đệm bao gồm phosphat và xitrat. Các chất chống oxy hoá bao gồm natri bisulfat. Các chất gây tê cục bộ bao gồm procain hydroclorua. Các chất tạo huyền phù và các chất gây phân tán bao gồm natri carboxymetylxenlululoza, hydroxypropyl metylxenlululoza và polyvinylpyrrolidon. Các tác nhân nhũ hoá bao gồm Polysorbat 80 (TWEEN®80). Tác nhân cang hoá hoặc chất tạo chelat chứa các ion kim loại bao gồm EDTA. Các chất mang được dụng cũng bao gồm rượu etylic, propylen glycol và propylen glycol đối với các chất dẫn trộn lẫn được với nước và natri hydroxit, axit clohydric, axit xitric hoặc axit lactic để điều chỉnh độ pH.

Nồng độ của hoạt chất được lý được điều chỉnh sao cho khi tiêm cung cấp được một lượng hữu hiệu để tạo ra tác dụng được lý mong muốn. Liều chính xác này phụ thuộc vào độ tuổi, thể trọng và tình trạng của bệnh nhân hoặc động vật như đã biết trong lĩnh vực này.

Các chế phẩm dùng ngoài đường tiêu hoá ở dạng liều đơn vị được đóng gói trong ống thuốc tiêm, trong lọ hoặc trong bơm tiêm có sẵn kim tiêm. Tất cả các chế phẩm sử dụng ngoài đường tiêu hoá phải vô trùng như đã biết và được áp dụng trong lĩnh vực này.

Để minh hoạ, việc tiêm truyền dung dịch nước vô trùng chứa hoạt chất vào trong tĩnh mạch hoặc động mạch là cách thức sử dụng hữu hiệu. Phương án khác là dung dịch hoặc huyền phù nước hoặc dầu vô trùng chứa hoạt chất để tiêm là cần thiết để tạo ra tác dụng được lý mong muốn.

Các dạng có thể tiêm được được thiết kế để sử dụng cục bộ và nội hấp. Điển hình là, một liều hữu hiệu để chữa bệnh được bào chế để chứa hoạt chất với nồng độ ít nhất là nằm trong khoảng từ 0,1% đến 90% hoặc cao hơn tính theo khối lượng, tốt hơn là lớn hơn 1% tính theo khối lượng với (các) mô cần điều trị. Hoạt chất này, như sHASEGP hoặc vùng hyaluronidaza của người hoà tan được của chúng, có thể được sử dụng một lần hoặc có thể được chia thành các liều nhỏ hơn để được sử dụng nhiều lần. Được hiểu là liều chính xác và thời gian điều trị là một hàm số của bệnh được điều trị và có thể được xác định theo kinh nghiệm bằng các phương pháp thử nghiệm đã biết hoặc bằng phép ngoại suy từ dữ liệu thử nghiệm *in vivo* hoặc *in vitro*. Lưu ý rằng các nồng độ và các giá trị liều cũng có thể thay đổi theo độ tuổi của đối tượng cần điều trị. Cũng được rõ hiểu hơn là đối với đối tượng cụ thể bất kỳ, các chế độ liều đặc hiệu sẽ được điều chỉnh theo thời gian phụ thuộc vào đối tượng cần điều trị và quyết định của thầy thuốc cho phép sử dụng thuốc hoặc giám sát việc sử dụng thuốc này, và phạm vi nồng độ nêu ở đây chỉ là ví dụ điển hình và không nhằm giới hạn phạm vi này hoặc khả năng sử dụng các dược phẩm này.

Các hợp chất được đề cập đến ở đây có thể được bào chế để sử dụng qua đường tiêu hoá bằng cách tiêm, ví dụ bằng cách tiêm truyền nhỏ giọt hoặc tiêm truyền liên tục. Các chế phẩm để tiêm có thể có mặt ở dạng liều đơn vị, ví dụ trong các ống thuốc tiêm hoặc các vật chứa liều đa, có bổ sung chất bảo quản. Các dược phẩm này có thể ở dạng huyền phù, dung dịch hoặc nhũ tương trong các chất dẫn chứa nước hoặc chứa dầu, và có thể chứa các tác nhân bào chế như các chất tạo huyền phù, các chất làm ổn định và/hoặc các chất phân tán. Theo cách khác, hoạt chất này có thể ở dạng bột để hoàn nguyên với chất dẫn thích hợp, ví dụ nước không chứa chất sinh nhiệt vô trùng hoặc các dung môi khác, trước khi sử dụng. Ví dụ, được đề cập đến ở đây là các chế phẩm dùng ngoài đường tiêu hoá chứa sHASEGP hoặc vùng hyaluronidaza của người hoà tan được của chúng với lượng hữu hiệu như nằm trong khoảng từ 500 đến 500.000 đơn vị, trong dung dịch ổn định hoặc dạng đông khô nhanh.

Hợp chất này có thể được tạo huyền phù ở dạng được micron hoá hoặc các dạng thích hợp khác hoặc có thể được tạo dẫn xuất để tạo ra sản phẩm có hoạt tính hoà tan được dễ hơn hoặc tạo ra dạng tiền dược chất. Dạng hỗn hợp thu được này phụ thuộc vào nhiều yếu tố bao gồm cách thức định sử dụng, và độ hoà tan của hợp chất

trong chất mang hoặc chất dẫn lựa chọn. Nồng độ hữu hiệu này là đủ để cải thiện được triệu chứng của bệnh lý và có thể được xác định bằng kinh nghiệm.

3. Dạng bột đông khô nhanh

Cũng được đề cập đến ở đây là dạng bột đông khô nhanh chứa sHASEGP hoặc vùng hyaluronidaza của người hoà tan được của chúng có thể được hoàn nguyên khi sử dụng ở dạng dung dịch, nhũ tương hoặc các dạng hỗn hợp khác. Các chế phẩm này cũng có thể được hoàn nguyên và được bảo chế ở dạng rắn hoặc gel.

Dạng bột đông khô nhanh, vô trùng điều chế được bằng cách hoà tan một phần rắn hoặc trộn một phần phân ước của dung dịch chứa sHASEGP hoặc vùng hyaluronidaza của người hoà tan được của chúng trong dung môi thích hợp. Dung môi này có thể chứa một tá dược làm tăng độ ổn định hoặc thành phần dược lý khác của bột này hoặc dung dịch đã hoàn nguyên điều chế được từ bột này. Các tá dược có thể được sử dụng bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, dextroza, sorbitol, fructoza, xiro ngô, xylitol, glyxerin, glucoza, sucroza hoặc chất thích hợp khác. Dung môi này cũng có thể chứa một chất đệm như xitrat, natri hoặc kali phosphat hoặc chất đệm khác thuộc loại này đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, điển hình là ở độ pH trung hoà. Tiếp theo, quá trình lọc vô trùng dung dịch này là đông khô nhanh trong các điều kiện tiêu chuẩn đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này để tạo ra chế phẩm đông khô nhanh. Thông thường, dung dịch sau khi lọc vô trùng được chia vào các lọ để đông khô nhanh. Mỗi lọ chứa một liều đơn, như nằm trong khoảng từ 10 đến 1000mg hoặc nằm trong khoảng từ 100 đến 500mg, hoặc các liều đa của hợp chất này.

Tóm lại, dạng bột được đông khô nhanh điều chế được bằng cách hoà tan dextroza, sorbitol, fructoza, xiro ngô, xylitol, glyxerin, glucoza, lactoza, hoặc chất thích hợp khác, nằm trong khoảng từ 10 đến 20%, trong chất đệm thích hợp như xitrat, natri hoặc kali phosphat hoặc chất đệm khác thuộc loại này đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, ở độ pH trung hoà. Sau đó, muối được lựa chọn, như ví dụ muối natri của sHASEGP (khoảng 1g muối/10-100g dung dịch đệm, điển hình là 1g/30g), được bổ sung vào hỗn hợp thu được ở trên ở nhiệt độ phòng, như ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 30°C đến 35°C và được khuấy cho đến khi hoà tan. Hỗn hợp thu được pha loãng bằng cách thêm nhiều chất đệm để làm giảm

nồng độ muối thu được là khoảng từ 10 đến 50%, điển hình là khoảng từ 15 đến 25%. Hỗn hợp thu được được lọc vô trùng và được xử lý để loại bỏ các hạt và để đảm bảo được độ vô trùng, và chia vào các lọ nhỏ để đông khô nhanh. Bột đã đông khô nhanh này có thể được bảo quản trong các điều kiện thích hợp như ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 4°C đến nhiệt độ phòng.

Dạng bột đã đông khô nhanh này được hoàn nguyên bằng nước để tiêm, để tạo ra chế phẩm để sử dụng ngoài đường tiêu hoá. Để hoàn nguyên, bột đã đông khô nhanh chứa sHASEGP hoặc vùng hyaluronidaza của người hoà tan được của chúng với lượng hữu hiệu chữa bệnh được bổ sung nước vô trùng hoặc chất mang thích hợp khác tính theo mililit. Lượng chính xác sẽ phụ thuộc vào hợp chất được lựa chọn và có thể được xác định theo kinh nghiệm bằng các phương pháp đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này.

4. Sử dụng khu trú

Các hỗn hợp để sử dụng khu trú điều chế được như được mô tả đối với các hỗn hợp sử dụng cục bộ và nội hấp. Hỗn hợp thu được này có thể là dung dịch huyền phù, nhũ tương hoặc dung dịch tương tự và được bào chế ở dạng kem, gel, thuốc mỡ, nhũ tương, dung dịch, cồn ngọt, nước thơm, huyền phù, cồn thuốc, bột nhào, dạng bột, dạng sol khí, dạng để rửa (vết thương), dạng phun, viên đạn, băng, cao dán, hoặc các chế phẩm khác bất kỳ thích hợp để sử dụng khu trú.

Dược phẩm chứa sHASEGP hoặc vùng hyaluronidaza của người hoà tan được của chúng hoặc dẫn xuất được dụng của nó có thể được bào chế ở dạng sol khí để sử dụng khu trú như bằng cách hít (ví dụ xem ấn phẩm, US 4.044.126, 4.414.209, và 4.364.923. Các patent này mô tả dạng sol khí để cung cấp hợp chất steroid hữu hiệu để điều trị các bệnh viêm, cụ thể là bệnh hen). Các chế phẩm này để sử dụng qua đường hô hấp có thể ở dạng sol khí hoặc dung dịch trong máy khí dung, hoặc ở dạng bột cực mịn để bơm vào, một mình hoặc kết hợp với chất mang trợ như lactoza. Trong trường hợp này, các hạt trong chế phẩm này sẽ có đường kính nhỏ hơn 50micron, như nhỏ hơn 10micron.

Để sử dụng bằng cách hít, các dược phẩm sử dụng ở đây có thể được trình bày ở dạng phun sol khí từ lọ nén áp lực hoặc máy khí dung, có sử dụng chất đẩy thích hợp bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, diclodiometan, tricloflometan,

diclotetrafloetan, dioxit cacbon và các khí thích hợp khác. Trong trường hợp dạng sol khí được nén áp lực, đơn vị liều có thể được xác định bằng cách cung cấp một van để định liều. Các viên nang và các ống chứa thuốc, ví dụ làm bằng gelatin, sử dụng trong dụng cụ hít, hoặc khí cụ bơm có thể được bào chế chứa hỗn hợp dạng bột của hợp chất này và một chất bột nền thích hợp như là tinh bột hoặc lactoza.

Các dược phẩm này có thể được bào chế để sử dụng cục bộ hoặc khu trú, như để sử dụng khu trú với da và niêm mạc như trong mắt, ở dạng gel, kem và nước thơm và để sử dụng cho mắt hoặc trong nang chứa dịch hoặc trong tuỷ sống. Việc sử dụng khu trú được tính đến để cung cấp qua da và cũng để sử dụng cho mắt hoặc niêm mạc hoặc để sử dụng cho liệu pháp hít. Dung dịch sử dụng qua đường mũi chứa hoạt chất này một mình hoặc kết hợp với các tá dược được dùng cũng có thể được sử dụng.

Ví dụ, các chế phẩm thích hợp để sử dụng khu trú cho da hoặc cho mắt thường được bào chế ở dạng thuốc mỡ, kem, nước thơm, bột nhão, dạng gel, dạng phun, dạng dầu và dạng sol khí. Các chất mang có thể được sử dụng bao gồm vazolin, lalolin, polyetylen glycol, rượu và hỗn hợp của một hoặc nhiều trong số chúng. Việc sử dụng khu trú có thể có lợi hơn chứa từ 0,05 đến 15% khối lượng chất làm đặc bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, hydroxypropylmetylxenluloza, metyloxenluloza, polyvinylpyrrolidon, rượu polyvinyllic, poly(alkylen glycol), poly/hydroxyalkyl, (met) acrylat hoặc poly (met) acrylamit. Chế phẩm dùng khu trú thường được dùng nhỏ giọt hoặc ở dạng thuốc mỡ trong nang liên kết. Nó cũng có thể được sử dụng để kích thích mắt hoặc làm trong mắt, dùng dụng cụ khu trú cho xoang mặt và ống tai ngoài. Các chế phẩm dùng khu trú ở trạng thái lỏng cũng có thể được trình bày trong chất nền polyme ba chiều ưa nước ở dạng dải, thấu kính tiếp xúc và các dạng tương tự mà các thành phần có hoạt tính sẽ được giải phóng ra từ đó. Các chế phẩm dùng khu trú cũng có thể được tiêm vào tiền phòng của mắt và các vị trí khác. Ví dụ, được đề cập đến ở đây là chế phẩm để sử dụng trong mắt sau khi tiêm chất nhót đàn hồi chứa dung dịch ổn định gồm sHASEGP hoặc vùng hyaluronidaza của người hoà tan được của chúng với lượng hữu hiệu, như glycoprotein với lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 5000 đơn vị có hoạt tính đặc hiệu nằm trong khoảng từ 30 đến 150000 đơn vị/mg, trong một thể tích nhỏ, như từ 5 đến 50 μ l.

Các dung dịch này, cụ thể là các dung dịch nhằm để sử dụng cho mắt có thể được bào chế ở dạng dung dịch đẳng trương từ 0,01% đến 10%, với độ pH nằm trong khoảng từ 5 đến 7, và các muối thích hợp.

5. Dược phẩm sử dụng theo các cách khác

Các cách sử dụng khác như sử dụng khu trú, sử dụng cao dán và sử dụng qua đường trực tràng là cũng được dự tính.

Ví dụ, các dạng liều dược lý để sử dụng qua đường trực tràng là dạng viên đạn, viên nang và viên nén có tác dụng nội hấp để sử dụng qua đường trực tràng. Các viên đạn dùng qua đường trực tràng được sử dụng ở đây có thể ở thể rắn dễ nhét vào trong trực tràng. Thể rắn này được chảy ra hoặc làm mềm ở nhiệt độ phòng để giải phóng một hoặc nhiều hoạt chất chữa bệnh hoặc có tác dụng dược lý. Các chất được dùng sử dụng trong viên đạn là các chất nền hoặc các chất dẫn để làm gia tăng điểm nóng chảy. Ví dụ về các chất nền bao gồm bơ cacao (dầu theobroma), glycerin-gelatin, carbovac (polyoxyetylen glycol) và hỗn hợp thích hợp chứa mono, di, và triglycerit của axit béo. Hỗn hợp của các bazơ có thể được sử dụng. Các tác nhân làm gia tăng điểm nóng chảy của viên đạn bao gồm sáp cá voi và sáp. Các viên đạn dùng qua đường trực tràng có thể được bào chế bằng phương pháp nén hoặc phương pháp đúc. Viên đạn dùng qua đường trực tràng có khối lượng điển hình nằm trong khoảng từ 2 đến 3gm.

Các viên nén và viên nang dùng qua đường trực tràng được sản xuất có sử dụng cùng một chất được dùng và bằng các phương pháp tương tự như đối với chế phẩm dùng qua đường miệng.

Các chế phẩm thích hợp dùng qua da có thể được trình bày ở dạng cao dán riêng biệt thích hợp để duy trì khả năng tiếp xúc chặt chẽ với lớp biểu bì của bệnh nhân để kéo dài thời gian sử dụng thuốc. Các cao dán này thích hợp chứa hoạt chất ở dạng dung dịch nước đệm tùy ý có nồng độ hoạt chất, ví dụ từ 0,1 đến 0,2M. Các chế phẩm thích hợp để sử dụng qua da cũng có thể được cung cấp bằng cách điện di ion (ví dụ xem ấn phẩm, *Pharmaceutical Research* 3 (6):318 (1986)) và điển hình là tạo thành dạng dung dịch nước đệm chứa hoạt chất này.

Các dược phẩm này cũng có thể được sử dụng bằng các phương tiện giải phóng chậm và/hoặc bằng các dụng cụ cung cấp (ví dụ xem, US 3.536.809; 3.598.123; 3.630.200; 3.845.770; 3.847.770; 3.916.899; 4.008.719; 4.687.610; 4.769.027;

5.059.595; 5.073.543; 5.120.548; 5.354.566; 5.591.767; 5.639.476; 5.674.533; và 5.733.566). Các hoạt chất hoặc dẫn xuất được dụng có thể điều chế được với các chất mang bảo vệ hợp chất chống lại sự đào thải nhanh từ cơ thể, như các chế phẩm giải phóng theo thời gian hoặc chế phẩm có lớp bọc.

Theo một phương án liên quan đến các chế phẩm và các phương pháp được đề cập ở đây, tác nhân chữa bệnh này được sử dụng khu trú trong chất dẫn cung cấp hoạt chất giải phóng chậm, ví dụ được bao nang trong hệ phân tán keo hoặc trong các tinh thể polyme ổn định. Các hệ phân tán keo bao gồm các nang nano, các vi cầu, các hạt và các hệ trên cơ sở các lipit bao gồm nhũ tương nước trong dầu, các mixen, mixen hỗn hợp, và các liposom. Ví dụ, các hệ phân tán keo này có thể là liposom hoặc vi cầu. Các liposom là các nang có màng khuếch đại hữu hiệu để làm chất dẫn cung cấp hoạt chất giải phóng chậm khi tiêm hoặc khi cấy ghép. Một số ví dụ về các thể tiếp hợp lipit-polyme và các liposom đã được bộc lộ trong US 5.631.018. Các ví dụ khác về các chất dẫn cung cấp được chất giải phóng chậm là các chất nền hydrogel dễ bị vi sinh vật phân huỷ (US 5.041.292), các thể tiếp hợp polyme dạng cây (US 5.714.166) và các liposom đa nang (Depofoam®, Depotech, San Diego, CA) (US 5.723.147 và 5.766.627). Một loại vi cầu thích hợp để bao nang các tác nhân chữa bệnh dùng để tiêm cục bộ (ví dụ tiêm vào trong mô dưới da) là các vi cầu poly(D,L)lactit, như được mô tả trong ấn phẩm D. Fletcher, *Anesth. analg.* 84:90-94, (1997). Ví dụ, một chế phẩm giải phóng chậm chứa sHASEGP hoặc vùng hyaluronidaza của người hoà tan được của chúng với lượng hữu hiệu như từ 1 đến 5000 đơn vị/ml, có thể được sử dụng cho nhiều mục đích sử dụng hoặc để điều trị các bệnh lý khác nhau, bao gồm nhưng không bị giới hạn ở, các mỹ phẩm và để điều trị cho các tổn thương tủy sống.

Mức máu mong muốn có thể được duy trì bằng cách tiêm truyền liên tục hoạt chất như được xác định bằng các mức huyết tương. Lưu ý rằng thầy thuốc chăm sóc sẽ biết được cần tiến hành như thế nào và khi nào kết thúc quá trình tiêm truyền, làm gián đoạn hoặc điều chỉnh liều pháp để làm giảm liều dùng do độc tính hoặc các rối loạn chức năng thận, gan, tủy xương. Ngược lại, thầy thuốc chăm sóc cũng sẽ biết cần tiến hành như thế nào và khi nào thì điều chỉnh việc điều trị tới các mức cao hơn nếu đáp ứng lâm sàng không thích hợp (ngăn ngừa các tác dụng phụ gây độc).

Hiệu quả và/hoặc độc tính của polypeptit sHASEGP và/hoặc (các) chất ức chế của nó, một mình hoặc kết hợp với các tác nhân khác như các tác nhân hữu hiệu để chữa bệnh, cũng được đánh giá bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này (ví dụ xem, O'Ap'os; Reilly, *Investigational New Drugs* 15:5-13(1997)).

6. Vật liệu sản xuất

Các polypeptit sHASEGP hoặc vùng hyaluronidaza của người hoà tan được của chúng hoặc được phẩm chứa các tác nhân bất kỳ kể trên có thể được đóng gói ở dạng các vật liệu sản xuất bao gồm vật liệu đóng gói, một hợp chất hoặc dẫn xuất thích hợp của chúng được đề cập ở đây trong vật liệu đóng gói này hữu hiệu để điều trị bệnh hoặc các rối loạn được dự tính ở đây, và một nhãn để chỉ dẫn hợp chất này hoặc dẫn xuất thích hợp của nó là để điều trị các bệnh hoặc các rối loạn được tính đến ở đây. Nhãn này có thể tùy ý nêu ra các rối loạn mà liệu pháp này có thể điều trị được.

Các vật liệu sản xuất được đề cập đến ở đây có chứa các vật liệu đóng gói. Các vật liệu đóng gói để đóng gói các sản phẩm được lý là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này (ví dụ xem, US 5.323.907, 5.052.558 và 5.033.352). Ví dụ về các vật liệu đóng gói bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, vỉ bấm, gói, chai, ống, dụng cụ hút, bơm, túi, lọ nhỏ, vật chứa, bơm tiêm, chai và vật liệu đóng gói bất kỳ thích hợp với chế phẩm được lựa chọn và cách thức định sử dụng và điều trị. Một danh sách các chế phẩm chứa các hợp chất và các dược phẩm được đề cập đến ở đây để điều trị các rối loạn bất kỳ liên quan đến khả năng nhiễm HCV trong đó việc nhiễm HCV sẽ làm chất trung gian hoặc chất góp phần vào các triệu chứng hoặc gây ra các triệu chứng.

Kit chứa dược phẩm và/hoặc các chế phẩm kèm theo chỉ dẫn để sử dụng nó cũng được đề cập đến ở đây. Kit này cũng có thể chứa thêm bơm tiêm hoặc kim tiêm, điển hình là được đóng gói ở dạng vô trùng, để tiêm phức này và/hoặc một tấm đệm rọu được đóng gói vào. Các chỉ dẫn được tùy ý bao gồm để hướng dẫn bác sĩ hoặc bệnh nhân sử dụng tác nhân hoạt tính. Ví dụ, được đề cập đến ở đây là kit chứa một bơm tiêm có dung tích nhỏ chứa sHASEGP hoặc vùng hyaluronidaza của người hoà tan được của chúng với lượng hữu hiệu, như nằm trong khoảng từ 1 đến 5000 đơn vị glycoprotein hoà tan, trong thể tích từ 5 đến 50µl, tùy ý chứa một bơm tiêm thứ hai chứa chất nhót đàn hồi. Cũng được đề cập đến ở đây là kit chứa một bơm tiêm có dung

tích nhỏ chứa sHASEGP hoặc vùng hyaluronidaza của người hoà tan được của chúng với lượng hữu hiệu, như nằm trong khoảng từ 1 đến 500 đơn vị glycoprotein hoà tan, và một lượng hoạt chất thứ hai với lượng để chữa bệnh, như dược chất, một phân tử nhỏ, một protein hoặc một axit nucleic.

K. Mô hình động vật

Các mô hình động vật chuyển gen và các động vật như thỏ, bao gồm chuột nhắt và chuột, bò cái, gà, lợn, dê, cừu, khỉ, kể cả vượn gorin và các động vật linh trưởng khác được đề cập đến ở đây. Cụ thể là, các động vật không phải là người chuyển gen chứa axit nucleic khác kiểu mã hoá polypeptit sHASEGP hoặc động vật chuyển gen trong đó việc biểu hiện polypeptit này được thay đổi, như thay thế hoặc cải biến vùng trình tự khởi động hoặc vùng điều chỉnh của gen nội sinh được đề cập đến. Động vật này có thể được tạo ra bằng cách kích thích tái tổ hợp giữa axit nucleic nội sinh và gen sHASEGP ngoại sinh mà có thể được biểu hiện nhằm nghĩa hoặc biểu hiện quá mức, như bằng cách biểu hiện với trình tự khởi động mạnh, thông qua hiện tượng tương đồng hoặc tái tổ hợp khác.

Các động vật chuyển gen có thể được tạo ra bằng cách đưa axit nucleic vào trong các tế bào soma hoặc tế bào dòng mầm, như tế bào phôi gốc, bằng phương pháp chuyển gen bất kỳ đã biết bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, tiêm tế bào, nhiễm mỡ và các cách thức chuyển gen khác. Điển hình là, axit nucleic này được đưa vào trong một tế bào như tế bào phôi gốc (embryonic stem - ES), tiếp theo là tiêm các tế bào ES vào trong túi phôi, và cấy túi phôi này vào trong một cơ thể nuôi dưỡng sẽ sinh ra động vật chuyển gen. Thông thường, việc đưa phân tử axit nucleic khác kiểu vào nhiễm sắc thể của động vật sẽ xảy ra sự tái tổ hợp giữa axit nucleic mã hoá sHASEGP khác kiểu và một axit nucleic nội sinh. Axit nucleic khác kiểu này có thể là đích đối với nhiễm sắc thể đặc hiệu. Trong một số trường hợp, các động vật bị bất hoạt gen “knockout” có thể được tạo ra. Động vật này đầu tiên được tạo ra bằng cách kích thích tái tổ hợp tương đồng giữa gen polypeptit sHASEGP trong nhiễm sắc thể của nó và một polypeptit sHASEGP ngoại sinh được làm cho bất hoạt sinh học (điển hình là bằng cách xen vào trình tự khác kiểu, ví dụ, một gen chịu kháng sinh). Theo một phương án, sự tái tổ hợp tương đồng này được thực hiện bằng cách biến nạp các tế bào gốc thu được từ phôi (embryo-derived stem-ES) bằng một vector có chứa gen polypeptit sHASEGP bất hoạt có thể xen vào được sao cho quá trình tái tổ hợp tương

đồng xảy ra. Tiếp theo là tiêm các tế bào ES vào trong túi phôi, và cấy túi phôi này vào trong cơ thể nuôi dưỡng sẽ sinh ra động vật dạng khảm (“động vật bị bất hoạt gen - knockout animal”) trong đó polypeptit sHASEGP được làm bất hoạt (xem Capecchi, Science 244:1288-1292 (1989)). Động vật dạng khảm này có thể được thụ tinh để tạo ra các động vật bị bất hoạt gen đồng hợp tử, mà sau đó có thể được sử dụng để tạo ra thêm các động vật bị bất hoạt gen. Các động vật bị bất hoạt gen bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, chuột, chuột đồng, cừu, lợn, gia súc, và các động vật không phải là người. Ví dụ, chuột bị bất hoạt gen được tạo ra. Loài chuột thu được này có thể đóng vai trò làm mô hình mang bệnh đặc hiệu như bệnh ung thư biểu hiện dưới mức biểu hiện của polypeptit sHASEGP. Loài chuột bị bất hoạt gen này có thể được sử dụng làm mô hình động vật, ví dụ để sàng lọc các phân tử hoặc để thử nghiệm các phân tử về khả năng điều trị hoặc ngăn ngừa các bệnh hoặc các rối loạn.

Các loại động vật chuyển gen khác cũng có thể được tạo ra, bao gồm các động vật biểu hiện quá mức polypeptit sHASEGP. Các động vật này bao gồm các động vật nhập gen “knock-in” là các động vật trong đó gen thông thường này được thay thế bằng một biến thể như một gen đột biến, một dạng được biểu hiện quá mức, hoặc một dạng khác. Ví dụ, một gen của loài, như gen nội sinh của thỏ có thể được thay thế bằng gen từ loài khác như từ người. Các động vật có thể được tạo ra bằng cách tái tổ hợp không tương đồng tại các vị trí khác trong nhiễm sắc thể; bao gồm các động vật có nhiều hiện tượng đính gấn.

Sau khi tạo ra động vật chuyển gen thế hệ thứ nhất, một động vật dạng khảm có thể được thụ tinh để tạo ra thêm các động vật có polypeptit sHASEGP biểu hiện quá mức hoặc biểu hiện nhằm nghĩa. Các động vật này bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, chuột, chuột đồng, cừu, lợn, gia súc, và các động vật không phải là người. Các động vật thu được này có thể đóng vai trò làm mô hình mang bệnh đặc hiệu như bệnh ung thư biểu hiện quá mức hoặc biểu hiện nhằm nghĩa polypeptit sHASEGP. Các động vật này có thể được sử dụng làm mô hình động vật mang bệnh, ví dụ để sàng lọc các phân tử hoặc để thử nghiệm các phân tử về khả năng điều trị hoặc ngăn ngừa các bệnh hoặc các rối loạn. Theo một phương án, chuột có polypeptit sHASEGP biểu hiện quá mức hoặc biểu hiện nhằm nghĩa được tạo ra.

Các ví sau đây được bao gồm chỉ có mục đích minh họa mà không nhằm làm giới hạn phạm vi của sáng chế.

L. Sử dụng liệu pháp sHASEGP

Các enzym hyaluronidaza có trong tự nhiên từ các gia súc lò mổ là nguồn chủ yếu của các chế phẩm enzym lâm sàng trong hơn bốn mươi năm qua. Tinh hoàn bò và cừu là nguồn chủ yếu cho các chế phẩm enzym này. Tuy nhiên, các chế phẩm enzym này ở dạng rất thô, được bán ở dạng chế phẩm có độ tinh khiết nằm trong khoảng từ 0,5 đến 5% dựa trên hoạt tính đặc hiệu đã biết nằm trong khoảng từ 30 đến 10000 đơn vị/mg. Do thiếu độ tinh khiết kết hợp với nguồn gốc trong gia súc lò mổ làm cho các chế phẩm enzym này không có khả năng gây miễn dịch với người và là nguồn chủ yếu gây bệnh Jacob Creutzfeld và mồm bệnh cho bò và cừu. Các phản ứng quá mẫn với các chế phẩm của bò và cừu được biết có thể xảy ra.

Hyaluronidaza có nguồn gốc từ gia súc hoặc vi khuẩn được sử dụng để điều trị các bệnh liên quan đến lượng dư axit hyaluronic và để tăng cường sự tuần hoàn của các dịch lỏng sinh lý và/hoặc các tác nhân chữa bệnh. Ví dụ, hyaluronidaza của bò có thể được tiêm cùng với chất gây tê quanh cầu mắt, sau cầu mắt và chẹn dưới Tenon khi tiến hành phẫu thuật mắt. Hơn nữa, các biến chứng khi phẫu thuật sẽ gia tăng khi không có mặt enzym này (Brown SM et al. *J Cataract Refract Surg.* 1999 Sep; 25(9): 1245-9). Hyaluronidaza của bò cũng được sử dụng là chất tiêu độc đối với bệnh hoại tử khi tiêm cận tĩnh mạch chất gây hoại tử như vinka alkaloit (Few, B.J. (1987) *Amer. J. Matern. Child Nurs.* 12, 23-26). Hyaluronidaza thử nghiệm của bò cũng hữu hiệu để điều trị các tế bào hạch (Paul et al. *J Hand Surg* 1997 Apr; 22 (2): 219-21). Hyaluronidaza cũng có thể được sử dụng để tạo điều kiện phân bố dễ dàng các dịch lỏng dưới da khi truyền dịch dưới da (Berger EY, *Am Geriatr Soc* 1984 Mar; 32(3):199-203). Hyaluronidaza cũng được sử dụng để làm giảm áp lực trong mắt ở bệnh nhân mắc bệnh tăng nhãn áp và bị đục thể thủy tinh nhận được chất nhót đàn hồi (US 4.820.516 công bố ngày 11.04.1989).

Hyaluronidaza có nguồn gốc từ gia súc hoặc vi khuẩn cũng được sử dụng làm “tác nhân phát tán” để tăng cường hoạt tính của các hoá liệu pháp và/hoặc tăng cường khả năng tiếp cận của khối u với hoá liệu pháp (Schuller et al., 1991, Proc. Amer. Assoc. Cancer Res. 32:173, abstract no. 1034; Czejka et al., 1990, Pharmazie 45:H.9). Hoá liệu pháp kết hợp với hyaluronidaza là hữu hiệu trong việc điều trị nhiều bệnh ung thư bao gồm ung thư bàng quang (Horn et al., 1985, J. Surg. Oncol. 28:304-307), caxinom tế bào vảy (Kohn et al., 94, J. Cancer Res. Oncol. 120:293-297), ung thư vú

(Beckenlehner et al., 1992, J. Cancer Res. Oncol. 118:591-596), và ung thư dạ dày-ruột (Scheithauer et al., 1988, Anticancer Res. 8:391-396). Hyaluronidaza là tác nhân chữa bệnh hữu hiệu duy nhất trong điều trị bệnh ung thư não (u thần kinh đệm) (WO88/02261, công bố ngày 07.04.1988). Việc sử dụng hyaluronidaza cũng gây kích thích khả năng đáp ứng của các khối u tụy, dạ dày, ruột kết, buồng trứng và vú kháng hoá liệu pháp trước (Baumgartner et al., 1988, Reg. Cancer Treat. 1:55-58; Zanker et al., 1986, Proc. Amer. Assoc. Cancer Res. 27:390). Đáng tiếc là, do sự tạp nhiễm và bản chất hyaluronidaza này không phải là của người nên thường dẫn đến các phản ứng quá mẫn.

Ngoài các tác dụng chống ung thư gián tiếp, hyaluronidaza có nguồn gốc từ gia súc còn có các tác dụng chống gây ung thư trực tiếp. Hyaluronidaza ngăn ngừa được sự phát triển của khối u được cấy vào trong chuột (De Maeyer et al., 1992, Int. J. Cancer 51:657-660) và ức chế được sự tạo thành các khối u sau khi tiếp xúc với các tác nhân gây ung thư (Pawlowski et al., 1979, Int. J. Cancer 23:105-109; Haberman et al., 1981, Proceedings of the 17th Annual Meeting of the American Society of Clinical Oncology, Washington, D.C., 22:105, abstract no. 415).

Việc đưa ra giá trị của hyaluronidaza có nguồn gốc từ gia súc làm tác nhân chữa bệnh, cụ thể là trong hoá liệu pháp kết hợp với các hoá liệu pháp thông thường hoặc bản thân tác nhân này làm hoá liệu pháp, cho thấy cần thiết phải có các chế phẩm chứa hyaluronidaza hầu như tinh khiết có nguồn gốc là người trong lĩnh vực này. Cũng cần thiết phải có các phương pháp tạo ra hyaluronidaza hiệu quả, mang lại lợi nhuận để cung cấp một lượng đáng kể enzym thương phẩm. Sáng chế nhằm giải quyết vấn đề này.

Axit hyaluronic là thành phần chủ yếu của chất nền ngoại bào. Axit hyaluronic được phát hiện trong mô liên kết của động vật có vú và là thành phần chính của thể thuỷ tinh trong mắt. Trong mô liên kết, việc hydrat hoá nước liên quan đến axit hyaluronic tạo ra các khoang giữa các mô, vì vậy tạo ra môi trường dẫn truyền cho sự chuyển động và tăng sinh của tế bào. Axit hyaluronic đóng vai trò chính trong các hiện tượng sinh học liên quan đến sự chuyển động của tế bào bao gồm phát triển nhanh, tái sinh, sửa chữa, phát sinh phôi, phát triển phôi sinh học, hàn gắn vết thương, hình thành mạch và phát sinh khối u (Toole, 1991, Cell Biol. Extracell. Matrix, Hay (ed), Plenum Press, New York, 1384-1386; Bertand et al., 1992, Int. J. Cancer 52:1-6; Knudson et

al., 1993, FASEB J. 7:1233-1241). Ngoài ra, mức axit hyaluronic cũng tương quan với khả năng xâm chiếm khối u (Ozello et al., 1960, Cancer Res. 20:600-604; Takeuchi et al., 1976, cancer Res. 36:2133-2139; Kimata et al., 1983, cancer Res. 43:1347-1354).

Sau tổn thương tuỷ sống, sẹo thần kinh đệm được tạo ra bằng các tế bào thần kinh đệm dạng sao và có chứa chondroitin sulfat proteoglycan (chondroitin sulfate proteoglycans-CSPGs). các CSPG đóng vai trò quyết định trong việc ức chế sự phát triển axon (Levine, 1994; Powell et al., 1997). Ví dụ, trong quá trình phát triển thai nhi, CSPG xua đuổi axon và ức chế sự liên kết tế bào thần kinh trung ương. CSPG cũng đóng vai trò quan trọng trong việc tạo thành màng bao (Snow et al., 1990, 1992; Powell and Geller, 1999). Ngoài ra, việc biểu hiện của CSPG làm gia tăng tổn thương sau đó của hệ thống thần kinh trung ương (CNS) (McKeon et al., 1991; Davies et al., 1997).

Các nghiên cứu chỉ ra rằng tác dụng ức chế của CSPG chủ yếu là do chuỗi đường chondroitin sulfat (chondroitin sulfate-CS), glycosaminoglycan (glycosaminoglycan-GAG) (Snow et al., 1990; Cole and McCable, 1991; Geisert and Bidanset, 1993). Điều này được minh hoạ bằng phát hiện ra rằng việc sử dụng chondroitinaza của vi khuẩn trong thực tế kích thích được sự tái sinh axon khi sử dụng qua phiên vách. Hơn nữa, các thử nghiệm điện sinh lý xác định rằng các axon CST đã tái sinh tạo nên các liên kết chức năng (Bradbury, et al 2002). Ngoài các tác dụng ức chế trực tiếp của chúng, CSPG cũng có thể tương tác với các phân tử dính bám tế bào hoặc các nhân tố hướng thần kinh để gây ảnh hưởng đến mẫu lỗi của axon (Roberts et al., 1988; Rouslahti and Yamaguchi, 1991; Milev et al., 1994). Vì vậy, các hyaluronidaza tái tổ hợp của động vật có vú hữu hiệu làm thay đổi hoàn toàn khả năng ức chế của CSPG trong sẹo thần kinh đệm và kích thích sự tái sinh axon sau tổn thương.

Lượng sHASEGP cần để làm thoái hoá đầy đủ CSPG trong sẹo thần kinh đệm sẽ thay đổi. Trong một số trường hợp, cần sử dụng lặp lại từ 10 đến 5000 đơn vị sHASEGP để loại bỏ được CSPG trong sẹo này khi cung cấp qua phiên vách. Trong các trường hợp khác, sHASEGP được giải phóng kéo dài thông qua việc sử dụng chế phẩm giải phóng chậm có thể được ưu tiên. Theo cách khác, việc sử dụng các vector liệu pháp gen mã hoá sHASEGP có thể là hữu hiệu để tăng cường thanh thải CSPG.

sHASEGP cũng có thể hữu hiệu để điều trị thoát vị các đĩa đệm trong phương pháp đã biết là hoà tan nhân bằng hoá chất. Chondroitinaza ABC, và enzym phân cắt các cơ chất tương tự ở dạng sHASEGP có thể gây giảm áp lực trong đĩa đệm trong bệnh cột sống thắt lưng (Sasaki et al., 2001, Ishikawa et al., 1999). Có ba loại tổn thương đĩa đệm. Loại đĩa đệm bị nhô ra là loại đĩa đệm còn nguyên vẹn nhưng bị phồng ra ngoài. Trong loại đĩa đệm bị thoát ra ngoài, mảnh sợi chằng bị rách và NP bị rỉ ra, nhưng mảnh sợi chằng vẫn được liên kết với đĩa đệm này. Trong trường hợp đĩa đệm bị tách riêng hẳn, mảnh NP bị vỡ long ra khỏi đĩa và không còn trong ống tủy sống. Hoà tan nhân bằng hoá chất là biện pháp hữu hiệu đối với các tổn thương đĩa đệm bị nhô ra và bị thoát ra ngoài, nhưng không hữu hiệu đối với các tổn thương đĩa đệm bị tách riêng hẳn. Ở Mỹ, phương pháp hoà tan nhân bằng hoá chất chỉ được chấp thuận sử dụng đối với bệnh cột sống thắt lưng (vùng thấp). Ở các nước khác, phương pháp này cũng được sử dụng thành công để điều trị thoát vị đĩa đệm đốt sống cổ (cột sống vùng cao). Vì vậy, phương pháp hoà tan nhân bằng hoá chất là sự lựa chọn bảo toàn đối với tổn thương đĩa đệm vì nó ưu tiên làm giảm áp lực trong đĩa đệm.

Thành phần chính xác và cấu trúc của (các) chuỗi hydrat cacbon trên glycoprotein có thể ảnh hưởng trực tiếp đến tuổi thọ của huyết thanh, vì các tế bào trong gan và trong hệ thống lưới nội mô có thể liên kết và hoà nhập vào với các glycoprotein tuần hoàn bằng các hydrat cacbon đặc hiệu. Các tế bào gan có các thụ thể trên bề mặt của chúng nhận biết các chuỗi oligosacarit có gốc Gal ở đầu tận cùng (tức là, ở (các) đầu cuối phía ngoài cùng của glycan liên quan đến polypeptit này), các đại thực bào chứa các thụ thể nhận biết các gốc Man hoặc GlcNAc ở đầu tận cùng và các tế bào gan và các tế bào lympho có các thụ thể nhận biết các gốc fucoza bọc lộ. Tuy nhiên, không có các thụ thể đặc hiệu axit sialic được phát hiện thấy. Mặc dù phụ thuộc vào sự sắp xếp không gian các oligosacarit này, theo quy luật thông thường, càng nhiều gốc đường bọc lộ được nhận biết bằng các thụ thể trên bề mặt tế bào trong gan và trong hệ thống lưới nội mô, thì glycoprotein càng được thanh thải nhanh ra khỏi huyết thanh. Tuy nhiên, do không có mặt các thụ thể đặc hiệu axit sialic, các oligosacarit có tất cả các nhánh ở đầu tận cùng bằng hoặc “mang mũ” bằng axit sialic sẽ không kích thích thanh thải được protein này mà chúng gắn với.

Sự có mặt và bản chất của (các) chuỗi oligosacarit trên một glycoprotein cũng có thể ảnh hưởng đến các tính chất sinh hoá quan trọng ngoài khả năng nhận biết

chúng bằng các thụ thể đặc hiệu gốc đường trên tế bào gan và các tế bào lưới nội mô. Việc loại bỏ hydrat cacbon này từ một glycoprotein thường sẽ làm giảm độ hoà tan của chúng, và cũng có thể làm gia tăng tính miễn cảm của glycoprotein này để gây thoái hoá phân giải protein bằng cách làm mất sự ổn định của khuôn mẫu gấp cuộn đúng của polypeptit và/hoặc không che khuất các vị trí miễn cảm proteaza. Với các lý do tương tự, trạng thái glycosyl hoá của một protein có thể ảnh hưởng đến khả năng của hệ miễn dịch nhận biết chúng.

sHASEGP có thể được sử dụng để loại bỏ các tế bào máu mang trứng xung quanh một trứng trước khi đem bảo quản ở nhiệt độ thấp và các kỹ thuật thụ tinh *In vitro* khác như tiêm tinh trùng vào trong bào chất (intracytoplasmic sperm injection-ICSI). Hyaluronidaza có thể được thêm vào các noãn bào đã thu hoạch với lượng nằm trong khoảng từ 10 đến 200U/ml trong dung dịch muối đệm. Các noãn bào được tách riêng từ các tế bào máu mang trứng đã giải phóng bằng cách hút và rửa một vài lần bằng môi trường không có hyaluronidaza. Các trứng này sau đó có thể được xử lý để bảo quản ở nhiệt độ thấp hoặc để tiến hành kỹ thuật IVF.

sHASEGP cũng có thể là hữu hiệu để các tác nhân hoá liệu pháp thâm nhập hiệu quả hơn vào trong các khối u rắn. sHASEGP có thể được tiêm cùng với các tác nhân chống ung thư vào trong khối u hoặc được tiêm vào tĩnh mạch đối với các khối u di căn hoặc khi khó chạm được đến các khối u. Tác nhân chống ung thư có thể là một hoá liệu pháp, một kháng thể, một peptit hoặc một vector liệu pháp gen, virus hoặc ADN. Ngoài ra, sHASEGP có thể được sử dụng để lôi kéo các tế bào khối u vào trong nhóm quay vòng để gây miễn cảm các khối u trở về mặt hoá học trước đó mà có khả năng kháng được chất khi nuôi cấy nhiều lần (St Croix et al. Cancer Lett 1998 Sep. 11; 131 (1): 35-44). sHASEGP cũng hữu hiệu tăng cường phân bố các chất sinh học như các kháng thể đơn dòng, xytokin và các dược chất khác đến các khối u tích lũy glycosaminoglycan. Rất nhiều khối u bị mất các gen liên quan đến việc chuyển hoá glycosaminoglycan sao cho việc tích lũy cục bộ có thể ngăn cản được các tác nhân chống ung thư và hệ miễn dịch khi khối u đạt một kích thước nhất định.

sHASEGP cũng có thể được sử dụng để gia tăng khả năng miễn cảm của khối u kháng với các hoá liệu pháp thông thường. Theo một phương án, sHASEGP được sử dụng cho bệnh nhân có khối u liên quan đến LuCa-1 bị khuyết với lượng hữu hiệu để gia tăng sự khuếch tán xung quanh vị trí khối u (ví dụ, để gia tăng lưu thông các nhân

tổ hoá liệu pháp) (ví dụ, để tạo điều kiện thuận lợi cho việc lưu thông và/hoặc nồng độ của các tác nhân hoá liệu pháp trong và xung quanh vị trí khối u), ức chế di chuyển tế bào khối u (ví dụ, bằng cách thoái hoá HA) và/hoặc để làm giảm (các) tế bào khối u đến ngưỡng gây chết tế bào (tức là làm cho (các) tế bào khối u chết), đây là trạng thái làm cho (các) tế bào khối u dễ bị tác động của các tác nhân hoá liệu pháp hoặc các tác nhân khác có thể gây chết tế bào, tốt hơn là tạo điều kiện đặc biệt gây chết tế bào theo chương trình. Các tác nhân hoá liệu pháp được sử dụng ở đây có nghĩa là bao gồm tất cả các phân tử, các tác nhân tổng hợp (ví dụ, xiplatin cũng như là các tác nhân có nguồn gốc tự nhiên (ví dụ, nhân tố gây hoại tử khối u IF), tạo điều kiện thuận lợi cho việc ức chế phát triển tế bào khối u, và tốt hơn là tạo điều kiện thuận lợi, tốt hơn nữa là tạo điều kiện đặc biệt thuận lợi để gây chết tế bào khối u.

Đặc biệt quan tâm là việc sử dụng sHASEGP để điều trị các ung thư di căn và không di căn, cụ thể là các ung thư di căn, có hoạt tính hyaluronidaza giảm đến mức không phát hiện được so với các tế bào không ung thư (tế bào bình thường). sHASEGP có thể được sử dụng làm tác nhân hoá liệu pháp (một mình hoặc kết hợp với các hoá liệu pháp khác) để điều trị các bệnh ung thư khác nhau, đặc biệt các khối u có xu hướng lan rộng. Ví dụ, sHASEGP có thể được sử dụng để điều trị bệnh caxinom tế bào phổi nhỏ, caxinom tế bào phổi có vảy, cũng như là các bệnh ung thư vú, ung thư buồng trứng, ung thư cổ tử cung, ung thư não hoặc các bệnh ung thư bất kỳ khác liên quan đến mức suy giảm hyaluronidaza hoặc gen Luca-1 (hpHAza) bị khuyết (ví dụ, gen Luca-1 không quy định biểu hiện các mức hpHAza đầy đủ hoặc mã hoá hpHAza khuyết không quy định mức đầy đủ hoạt tính hyaluronidaza) hoặc các hiện tượng khuyết khác liên quan đến giảm hiện tượng dị hoá hyaluronan. sHASEGP được ưu tiên để điều trị các khối u ác tính liên quan đến sự thiếu hụt quá trình dị hoá HA vì nó không cần đến sự tham gia của tế bào để gây thoái hoá.

Liều đặc hiệu thích hợp để sử dụng có thể dễ dàng được xác định bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này dựa theo các yếu tố được bàn luận ở trên (ví dụ xem ấn phẩm, Harrison's Principle of Internal Medicine, 11th Ed., 1987). Ngoài ra việc ước tính liều thích hợp cho người có thể được ngoại suy từ việc xác định mức hoạt tính enzym của sHASEGP *in vitro* và/hoặc liều hữu hiệu trong các nghiên cứu động vật. Ví dụ, hyaluronidaza với lượng nằm trong khoảng từ 70-300 TRU là hữu hiệu để làm giảm tải lượng khối u ở chuột scid (severe combined immunodeficiency).

Căn cứ vào thông tin này, liều thích hợp đối với người có thể trọng 70kg, thì hyaluronidaza sẽ được sử dụng nằm trong khoảng từ 250.000-1.200.000 TRU. Lượng sHASEGP được sử dụng cho người thường nằm trong khoảng từ 1 TRU đến 5.000.000 TRU hoạt tính enzym, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 1.000 TRU đến 2.500.000 TRU, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 100.000 TRU đến 1.500.000 TRU, thường là nằm trong khoảng từ 250.000 TRU đến 1.200.000 TRU, với liều được chỉ dẫn trung bình là 725.000 TRU.

Theo một phương án sHASEGP được bào chế trong dung dịch muối 0,15M chứa sHASEGP ở nồng độ khoảng 150.000 TRU/cc. Sau đó chế phẩm này được tiêm vào tĩnh mạch bệnh nhân với lượng 15.000 TRU/kg thể trọng. Theo cách khác, chế phẩm enzym này cũng có thể được tiêm dưới da để làm cho hyaluronidaza phân tán được xung quanh vị trí khối u. Theo một phương án được ưu tiên sHASEGP được tiêm quanh khối u hoặc vào trong khối u. Theo một phương án được ưu tiên khác, sHASEGP được bào chế ở dạng thể mỡ và được phân bố bằng cách tiêm vào trong tĩnh mạch tại hoặc gần vị trí tế bào khối u liên quan đến sự thiếu hụt trong gen LuCa-1 (hpHAza). Hơn nữa, sHASEGP được siêu sialat là được ưu tiên để sử dụng ngoài đường tiêu hoá, trong đó axit sialic ở đầu tận cùng trên sHASEGP ngăn ngừa sự thanh thải của enzym này từ sự tuần hoàn của hệ thống lưới nội mô. Việc so sánh giữa sHASEGP được siêu sialat với hyaluronidaza của bò và cừu không được sialat cho thấy rằng hầu như đạt được quá trình được động học thuận lợi hơn.

Điều kiện thuận lợi của liệu pháp gen

Hiệu quả của đa số các chất dẫn để phân bố hầu hết các gen *in vivo* không phù hợp với hiệu quả được phát hiện *in vivo*. Glycosaminoglycan có thể cản trở sự khuếch tán của ADN và các vectơ virus vào trong nhiều loại tế bào. Các mức glycosaminoglycan chất nền ngoại bào có thể cản trở đáng kể quá trình này. Dubensky và các đồng tác giả (Proc Natl Acad Sci USA 1984 Dec; 81 (23): 7529-33) đã chứng tỏ rằng hyaluronidaza khi được kết hợp với collagenaza có thể tạo điều kiện thuận lợi cho việc tải nạp ADN *in vivo*. Favre và các đồng tác giả cũng chứng tỏ là virus kèm adeno cũng có thể phù hợp cho theo liệu pháp gen qua trung gian hyaluronidaza (Gene Ther 2000 Aug; 7(16): 1417-20).

Các tác giả đã xác định ở đây là các kênh có kích thước xác định trong chất nền ngoại bào được mở bằng sHASEGP. Các lỗ này không tăng cường khuếch tán các cơ chất có đường kính lớn hơn từ 200-500nm. Tuy nhiên các phân tử nhỏ hơn như retro virut, adeno virut, virut kèm adeno và các phức ADN có thể phù hợp cho sự khuếch tán qua trung gian sHASEGP.

Theo cách khác, các virut có thể được kèm theo gen sHASEGP để tạo điều kiện thuận lợi cho việc sao chép của chúng và phát tán vào trong mô đích, chẳng hạn. Mô đích này có thể là mô ung thư, nhờ đó virut này có khả năng sao chép chọn lọc trong khối u này. Virut này cũng có thể là virut không gây tan, trong đó virut này sao chép chọn lọc với trình tự khởi động đặc hiệu mô. Khi virut này sao chép, sHASEGP cùng việc đồng biểu hiện với các gen của virut sẽ tạo điều kiện thuận lợi cho việc phát tán virut *in vivo*.

Theo cách khác, axit nucleic cần quan tâm và sHASEGP, có thể được sử dụng đồng thời hoặc liên tiếp hoặc được sử dụng xen kẽ sau một khoảng thời gian. Sử dụng đồng thời dùng để chỉ việc cùng sử dụng. Trong trường hợp này, hai thành phần chủ yếu có thể được trộn để tạo thành chế phẩm trước khi sử dụng, hoặc có thể được sử dụng đồng thời cho tế bào hoặc sinh vật chủ. Cũng có thể sử dụng chúng theo cách liên tục, tức là một chất được sử dụng sau một chất khác, không quan tâm đến thành phần nào trong sản phẩm hỗn hợp được sử dụng đầu tiên. Cuối cùng, có thể sử dụng theo cách xen kẽ sau một khoảng thời gian hoặc sử dụng gián đoạn, ngưng dùng rồi lại dùng lại sau một khoảng thời gian có thể là đều hoặc không đều nhau. Được chỉ ra rằng các cách sử dụng và vị trí sử dụng hai thành phần có thể khác nhau. Theo một phương án cụ thể, sHASEGP được sử dụng trước axit nucleic, tốt hơn là với cách sử dụng hai thành phần tương tự nhau. Khoảng thời gian giữa các lần tiêm không quan trọng và có thể được xác định bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Có thể gợi ý khoảng thời gian này là từ 10 phút đến 72 giờ, thuận lợi là nằm trong khoảng từ 30 phút đến 48 giờ, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 1 đến 24 giờ, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 1 đến 6 giờ.

Ngoài ra sản phẩm hỗn hợp theo sáng chế cũng có thể được kết hợp với một hoặc nhiều phân tử mà được nhằm để tăng cường việc sử dụng axit nucleic này. Các phân tử này có thể là các phân tử có tác dụng bảo vệ axit nucleic (bảo vệ liên quan đến sự thoái hoá trong tế bào), làm tăng cường sự thâm nhập của nó hoặc sự biểu hiện của

nó trong tế bào chủ (peptit dung hợp, tín hiệu định vị nhân, v.v.), mà có thể làm cho một loại tế bào cụ thể trở thành đích (phối tử hoặc kháng thể nhận biết protein trên bề mặt tế bào, v.v.), hoặc kéo dài tác dụng chữa bệnh (tác nhân ức chế miễn dịch, v.v.). Sản phẩm hỗn hợp này cũng có thể được kết hợp với các tác nhân để tạo điều kiện thuận lợi cho việc chuyển nhiễm (protein, v.v.).

Sản phẩm hỗn hợp này theo sáng chế có thể điều chế được để sử dụng cục bộ hoặc ngoài đường tiêu hoá hoặc để sử dụng qua đường tiêu hoá. Các cách sử dụng có thể được đề cập đến cụ thể là trong dạ dày, dưới da, vùng tim, trong tĩnh mạch, trong phúc mạc, trong bao hoạt dịch, trong khối u, trong phổi, trong mũi và trong khí quản, và rất cụ thể là được sử dụng trong cơ. Việc sử dụng này có thể là hữu hiệu bằng cách sử dụng các kỹ thuật bất kỳ trong lĩnh vực này (tiêm dùng qua đường miệng, dạng sol khí, dùng nhỏ giọt, v.v.), ở dạng liều đơn hoặc ở dạng liều được lặp lại một hoặc một vài lần sau khoảng thời gian cụ thể. Cách sử dụng này có thể được điều chỉnh để làm cho gen cần quan tâm được vận chuyển và điều trị được bệnh. Chế phẩm này có thể bao gồm các chất dẫn dược dụng (các tá dược, các chất phụ trợ, v.v.). Các chất này dẫn đến làm rối loạn chất nền ngoại bào và axit nucleic cần quan tâm tốt hơn là được hoà tan trong một dung dịch đệm thích hợp để sử dụng dược lý và có thể là dung dịch đệm đẳng trương, ưu trương hoặc nhược trương. Các dung dịch đệm khác có thể được tính đến. Các dung dịch này có thể được đề cập đến nhằm minh họa là dung dịch muối sinh lý (0,9% NaCl), dung dịch muối không sinh lý (1,8% NaCl), dung dịch Hepes-Ringer, dung dịch Ringer Lactate, dung dịch dựa trên Tris-HCl (10mM Tris-HCl, độ pH = từ 7,5 đến 8, 1mM EDTA; 10mM Tris-HCl, độ pH = từ 7,5 đến 8, 1mM MgCl₂), dung dịch đệm phosphat (dung dịch đệm Krebs phosphat H₂O), dung dịch đường (glucoza, sucroza, trehaloza, v.v.), nước đơn giản.

Truyền dịch dưới da

Truyền dịch dưới da hay phương pháp tiêm truyền dịch lỏng dưới da là một kỹ thuật bù nước hữu hiệu và dễ dàng thích hợp đối với bệnh nhân trưởng thành bị mất nước vừa phải, đặc biệt là bệnh nhân lớn tuổi. Phương pháp này được xem là an toàn và không tạo ra các biến chứng nghiêm trọng. Đa số tác dụng ngược lại hay xảy ra là phù thũng dưới da nhẹ có thể được điều trị bằng mát xa hoặc dùng thuốc lợi tiểu theo cách nội hấp. Khoảng 3L có thể được dùng trong thời gian 24 giờ tại hai vị trí riêng biệt. Các vị trí tiêm truyền thông thường là ngực, bụng, đùi và các chi trên. Dung dịch

được ưu tiên là nước muối thông thường, nhưng các dung dịch khác như nước muối bán thông thường, glucoza với nước muối hoặc glucoza 5% cũng có thể được sử dụng. Kali clorua cũng có thể được bổ sung vào túi dung dịch, nếu cần. Ngoài ra, các dược chất khác có thể được phân bố theo các cách sử dụng tương tự. sHASEGP của người có thể được bổ sung để tăng cường sự hấp thụ của dịch lỏng và gia tăng tốc độ sử dụng toàn diện. sHASEGP của người là thích hợp hơn để truyền dịch dưới da lặp lại so với các enzym có nguồn gốc từ lò mổ gia súc không thích hợp để gây miễn dịch như enzym của bò đã được biết đến. Các thành viên trong gia đình hoặc một y tá có thể sử dụng enzym này tại nhà; kỹ thuật này là thông thường đối với các thầy thuốc gia đình.

Đối với các bệnh nhân cấp cứu, các vị trí truyền dưới da bao gồm bụng, ngực trên, trên vú, qua khoang gian sườn và vùng xương bả. Đối với các bệnh nhân nằm liệt giường, các vị trí được ưu tiên là đùi, bụng và mặt ngoài chi trên. Sau thời gian từ 1 đến 4 ngày, kim và các ống có thể được thay đổi, mặc dù các bộ tiêm truyền có thể được đặt tại một vị trí trong thời gian dài hơn mà không gây các biến chứng. Việc truyền lượng lớn 500ml trong thời gian một hoặc hai giờ, ba lần trong một ngày cũng có thể được sử dụng, với 150 đơn vị sHASEGP được đưa vào ở vị trí dưới da này trước khi tiêm truyền vào buổi sáng đầu tiên.

Điều kiện thuận lợi của việc tiêm để chữa bệnh

Nhiều phân tử được tiêm qua da tuần hoàn chậm hoặc đạt hiệu quả rất thấp. Một số nhân tố điều chỉnh quá trình được động học và dược lực học của các phân tử được tiêm dưới da (subcutaneously-SC) hoặc tiêm vào trong cơ (intramuscularly-IM). Thông thường, các phân tử lớn tuần hoàn rất chậm và có hiệu quả thấp mà không có hoạt tính trong quá trình tuần hoàn. Độ sinh khả dụng dưới da được xác định bằng cách tính toán tỷ lệ của diện tích dưới đường cong đối với tiêm dưới da so với tiêm vào trong tĩnh mạch ($AUC_{\text{dưới da}}/AUC_{\text{tĩnh mạch}}$). Nhân tố thứ hai được tích điện và có ái lực đối với phân tử chất nền mà có thể đóng vai trò để cang hoá với phân tử này khi sử dụng dưới da. Nếu các tác nhân này bị thoái hoá cục bộ, chúng có thể không bao giờ tới được các đích mong muốn của chúng, và vì vậy chúng tỏ độ sinh khả dụng nội hấp toàn diện bị giảm đối với các cơ quan đích này.

Các protein lớn thường được sử dụng qua đường tĩnh mạch để chúng trực tiếp có hiệu lực trong dòng máu. Tuy nhiên, có lợi nếu dược phẩm này được sử dụng qua

đường dưới da, trong cơ, hoặc trong da vì các cách sử dụng này dễ được thực hiện đối với bệnh nhân. Đặc biệt, nếu dược phẩm này được sử dụng thường xuyên trong suốt cuộc đời và việc điều trị cần được bắt đầu sớm, thì sẽ dễ dàng khi bệnh nhân còn là trẻ con. Tuy nhiên, dược phẩm với một phân tử rất lớn và không bền, như yếu tố đông máu VIII, có kích thước nằm trong khoảng từ 170 đến 300kDa, thường có độ sinh khả dụng rất thấp nếu được sử dụng qua đường dưới da, trong cơ, hoặc trong da, do sự hấp thu không đầy đủ và có sự thoái hoá trầm trọng.

Ngoài việc cần thiết phải gia tăng độ sinh khả dụng của các chất sinh học sử dụng qua đường dưới da, tính dược động học nhanh hơn cũng rất quan trọng trong trường hợp thuốc sử dụng cấp cứu. Ở nhiều bệnh nhân, thời gian cần để đặt được kim vào tĩnh mạch có thể ngăn cản một dược chất có tác dụng nhanh khi sử dụng nội hấp. Trong trường hợp không đặt được kim vào tĩnh mạch sau đó, sau khi được tiêm qua đường dưới da sẽ dẫn đến làm chậm thêm quá trình tiếp cận các cơ quan đích. Vì vậy, khả năng sớm sử dụng dược chất dưới da trong lần đầu tiên điều trị sẽ hữu hiệu thay vì nguy cơ mất một khoảng thời gian cần để đặt được kim vào tĩnh mạch. Ví dụ về các phân tử có khả năng được phân bố qua đường dưới da cũng như tĩnh mạch bao gồm epinephrin, atropin, narkan, lignocain và dextroza.

Nhiều phân tử được tiêm qua da tuân hoàn chậm hoặc đạt hiệu quả rất thấp. Một số nhân tố điều chỉnh quá trình dược động học và dược lực học của các phân tử được tiêm dưới da (SC) hoặc tiêm vào trong cơ (IM). Thông thường các phân tử lớn tuân hoàn rất chậm và có hiệu quả thấp mà không vận chuyển hoạt tính vào trong quá trình tuân hoàn. Độ sinh khả dụng dưới da được xác định bằng cách tính toán tỷ lệ của vùng dưới đường cong đối với tiêm dưới da so với tiêm vào trong tĩnh mạch ($AUC_{\text{dưới da}}/AUC_{\text{tĩnh mạch}}$). Nhân tố thứ hai được tích điện và có ái lực đối với phân tử chất nền có thể đóng vai trò để càng hoá với phân tử này khi sử dụng dưới da. Nếu các tác nhân này bị thoái hoá cục bộ, chúng có thể không bao giờ tới được các đích mong muốn của chúng, và vì vậy chứng tỏ độ sinh khả dụng nội hấp toàn diện bị giảm đối với các cơ quan đích này.

Các protein lớn thường được sử dụng qua đường tĩnh mạch để chúng trực tiếp có hiệu lực trong dòng máu. Tuy nhiên, có lợi nếu dược phẩm này được sử dụng qua đường dưới da, trong cơ, hoặc trong da vì các cách sử dụng này dễ được thực hiện đối với bệnh nhân. Đặc biệt, nếu dược phẩm này được sử dụng thường xuyên trong suốt

cuộc đời và việc điều trị cần được bắt đầu sớm, thì sẽ dễ dàng khi bệnh nhân còn là trẻ con. Tuy nhiên, được phẩm với phân tử rất lớn và không bền, như yếu tố đông máu VIII, có kích thước nằm trong khoảng từ 170 đến 300kDa, thường có độ sinh khả dụng rất thấp nếu được sử dụng qua đường dưới da, trong cơ, hoặc trong da, do sự hấp thu không đầy đủ và có sự thoái hoá trầm trọng.

Ngoài việc cần thiết phải gia tăng độ sinh khả dụng của các chất sinh học sử dụng qua đường dưới da, tính được động học nhanh hơn cũng rất quan trọng trong trường hợp thuốc sử dụng cấp cứu. Ở nhiều bệnh nhân, thời gian cần để đặt được kim vào tĩnh mạch có thể ngăn cản một dược chất có tác dụng nhanh khi sử dụng nội hấp. Trong trường hợp không đặt được kim vào tĩnh mạch sau đó, sau khi được tiêm qua đường dưới da sẽ dẫn đến làm chậm thêm quá trình tiếp cận các cơ quan đích. Vì vậy, khả năng sớm sử dụng dược chất dưới da trong lần đầu tiên điều trị sẽ hữu hiệu thay vì nguy cơ mất một khoảng thời gian cần để đặt được kim vào tĩnh mạch. Ví dụ về các phân tử có khả năng được phân bố qua đường dưới da cũng như tĩnh mạch bao gồm epinephrin, atropin, narcain, lignocain và dextroza.

Lợi ích khác của sáng chế nằm ở khả năng cung cấp dung dịch qua đường dưới da hoặc trong cơ với một thể tích lớn hơn hoặc tương đương mà không gây đau và tình trạng bất thường do áp lực và thể tích của dung dịch ở vị trí tiêm.

Xuất huyết thủy tinh thể

Trong một nỗ lực để giảm thiểu khả năng gây bong hoặc xé rách võng mạc hơn nữa trong quá trình phẫu thuật thủy tinh thể, đã được đề cập đến trong US 5.292.509 (Hageman), người ta tiêm các enzym glycosaminoglycanaza không có proteaza vào trong thể thủy tinh nhằm làm cho thủy tinh thể không kết hợp hoặc “không được dính vào” võng mạc, trước khi loại bỏ thủy tinh thể này. Việc thủy tinh thể này không được kết hợp hoặc không được dính vào võng mạc là có mục đích nhằm giảm thiểu khả năng võng mạc bị xé rách hoặc gây bong hơn nữa sẽ xảy ra khi loại bỏ thủy tinh thể. Ví dụ về các enzym glycosaminoglycanaza không có proteaza đặc hiệu có thể được sử dụng để làm cho thủy tinh thể không bị dính vào với mục đích này bao gồm chondroitinaza ABC, chondroitinaza AC, chondroitinaza B, chondroitin 4-sulfataza, chondroitin 6-sulfataza, hyaluronidaza và beta-glucuronidaza.

Mặc dù các enzym hyaluronidaza được biết là hữu hiệu cho các ứng dụng về mắt, bao gồm sử dụng thêm vào trong phẫu thuật mắt như được bộc lộ trong US 5.292.509 (Hageman), các nghiên cứu đã công bố chỉ ra rằng bản thân enzym hyaluronidaza có thể gây độc đối với võng mạc và/hoặc đối với các cấu trúc giải phẫu học khác của mắt. Xem ấn phẩm, *The Safety of Intravitreal Hyaluronidase*; Gottlieb, J.L. Antoszyk, A.N., Hatchell, D.L. and Soloups, P., *Invest Ophthalmol Vis Sci* 31: 11, 2345-52 (1990). Hơn nữa, việc sử dụng các chế phẩm chứa hyaluronidaza thu được từ gia súc lò mổ có độ tinh khiết gây ra bệnh viêm màng mạch nhỏ hoặc bệnh viêm mắt. Vì vậy, việc sử dụng sHASEGP của người là thích hợp hơn do hiệu quả tăng cường của nó, độ tinh khiết và không có nguồn gốc động vật mà có thể làm gia tăng các phản ứng gây miễn dịch và làm trung hoà qua trung gian kháng thể sau khi sử dụng lặp lại. Theo phương án khác, dạng sHASEGP được peg hoá có thể được tiêm vào mắt. Dạng sHASEGP được peg hoá này không được thanh thải khỏi thủy tinh thể một cách nhanh chóng mà duy trì hoạt tính của nó ở thủy tinh thể này trong thời gian dài.

Độc tính của một số chế phẩm hyaluronidaza dùng cho mắt đã được khẳng định bởi các nhà nghiên cứu khác. Họ đã đề xuất rằng các chế phẩm hyaluronidaza này được sử dụng làm chất kích thích gây độc để tạo ra sự tạo mạch mới của mắt bằng thực nghiệm, trong mô hình gây độc cho động vật (xem ấn phẩm, *An Experimental Model of Preretinal Neovascularization in the Rabbit*; Antoszyk, A.N., Gottlieb, J.L., Casey, R.C., Hatchell, D.L. and Machemer, R., *Invest Ophthalmol Vis Sci* 32: 1, 46-51 (1991). Việc sử dụng sHASEGP có độ tinh khiết cao, không có thủy ngân và các chất gây bẩn có nguồn gốc từ vi khuẩn và gia súc, là thích hợp hơn đối với các phương pháp dùng trong mắt. Hơn nữa, sHASEGP của người tái tổ hợp là thích hợp hơn so với các chế phẩm có nguồn gốc từ gia súc lò mổ về độ tinh khiết, không có mầm bệnh của bò và giảm nguy cơ sinh miễn dịch. Tốt nhất là sử dụng sHASEGP được peg hoá.

Vì vậy, phương pháp enzym sử dụng sHASEGP của người được đề cập đến để điều trị các rối loạn về mắt của động vật có vú. Theo một phương án của sáng chế, sHASEGP được peg hoá để kéo dài thời gian tồn lưu của nó ở trong thủy tinh thể và ngăn ngừa sự hấp thu định khu. Việc ngăn ngừa tạo mạch mới và gia tăng tốc độ thanh thải từ thủy tinh thể của các hợp chất gây độc đối với võng mạc, được thực hiện bằng cách sử dụng một lượng hữu hiệu hyaluronidaza để hoá lỏng thủy tinh dịch của mắt

cần điều trị mà không gây ra tổn thương độc cho mắt. Quá trình hoá lỏng của thủy tinh dịch làm gia tăng tốc độ trao đổi dịch lỏng từ ngăn thủy tinh thể. Việc gia tăng tốc độ trao đổi dịch lỏng loại bỏ được các hợp chất này và các tình trạng có thể gây ra các tổn thương cho võng mạc và mắt.

Sử dụng sHASEGP làm mỹ phẩm

Đã biết là hyaluronidaza có tác dụng khử trùng hợp các chuỗi dài mucopolysacarit của chất cơ bản, chịu trách nhiệm để duy trì nước liên kết và duy trì việc làm chậm quá trình khuếch tán các chất lỏng hữu cơ bằng cách nén mao dẫn, để loại bỏ các chất cặn bã của quá trình trao đổi chất. Việc duy trì nước và các chất cặn bã kết hợp với sự quá tải chất béo của các tế bào mỡ tạo nên chứng phù thũng “da lợn-pigskin” hoặc chứng phù thũng “vỏ cam-orange peel”. Vì vậy, quá trình khử trùng hợp này sẽ cắt các chuỗi dài mucopolysacarit thành các chuỗi ngắn hơn, nhờ đó loại bỏ được nước liên kết, các chất cặn bã, phục hồi lại tĩnh mạch và tuần hoàn bạch huyết và làm biến mất chứng phù thũng cục bộ.

Vì vậy, việc sử dụng sHASEGP qua đường dưới da được ưu tiên để loại bỏ các glycosaminoglycan liên quan đến sự tích tụ được gọi là viêm mô tế bào và tăng cường lưu thông bạch huyết. sHASEGP của người được ưu tiên để điều trị viêm mô tế bào, trong đó nó có khả năng loại bỏ các glycosaminoglycan mà không phải là các thành phần gây viêm của protein có nguồn gốc từ gia súc lò mổ và có độ tinh khiết cao và không có khả năng gây miễn dịch. sHASEGP có thể được sử dụng bằng cách tiêm lặp lại dưới da, bằng cách cung cấp qua da ở dạng thuốc mỡ hoặc dạng kem hoặc bằng cách tiêm chế phẩm giải phóng chậm, để thúc đẩy quá trình thoái hoá liên tục các glycosaminoglycan và ngăn ngừa sự trở lại của chúng.

Cấy ghép cơ quan

Hyaluronan có một số tác dụng sinh học, một phần là do kích thước phân tử phân tử của nó (West, D.C., Kumar, S. Exp.Cell.Res. 183, 179-196, 1989). Hàm lượng của hyaluronan trong một cơ quan gia tăng theo mức độ viêm của cơ quan này. Vì vậy, nồng độ hyaluronan gia tăng được thể hiện trong mô ở các cơ quan khác nhau được đặc trưng bởi sự tổn thương miễn dịch học-gây viêm như viêm ổ răng (Nettelbladt et al., Am Rev Resp Dis 1989; 139:759-762) và nhồi máu cơ tim (Waldenstrom et al., J Clin Invest 1991; 88(5): 1622-1628). Các ví dụ khác là thải bỏ dị ghép sau cấy ghép

thận (Hallgren et al., J Exp Med 1990a; 171: 2063-2076; Wells et al, transplantation 1990; 50:240-243), cấy ghép ruột nhỏ (Wallander et al, Transplant Int 1993; 6:133-137) hoặc cấy ghép tim (Hallgren et al., J Clin Invest 1990b; 668-673); hoặc viêm cơ tim có nguồn gốc do virus (Waldenstrom et al., Eur J Clin Invest 1993; 23: 277-282).

Việc xuất hiện chứng phù thũng mô kẽ liên quan với việc cấy ghép cơ quan tạo nên một vấn đề nghiêm trọng trong lĩnh vực phẫu thuật cấy ghép. 25% số đoạn ghép này sẽ trương phồng đến mức độ làm giảm nhất thời chức năng của nó. Hơn nữa từ 2 đến 3% trong số này, sự trương phồng sẽ gây phá huỷ thận, dẫn đến xuất huyết nhiều.

sHASEGP có thể được sử dụng để gây thoái hoá glycosaminoglycan được tích tụ trong cơ quan cấy ghép. Việc loại bỏ glycosaminoglycan này kích thích loại bỏ nước từ đoạn ghép và tạo chức năng của một cơ quan. Có thể sử dụng liều nằm trong khoảng từ 500 đến 10000 đơn vị/kg để làm giảm áp lực mô kẽ như vậy.

Sự tích tụ glycosaminoglycan bệnh lý trong não

Các mức hyaluronan được gia tăng trong một số tình trạng bệnh lý não tuỷ. Các mức hyaluronan trong não tuỷ thường nhỏ hơn 200ug/L ở người trưởng thành (Laurent et al, Acta Neurol Scand 1996 Sep;94(3):194-206). Các mức này có thể gia tăng đến trên 8000ug/L ở các bệnh như viêm màng não tuỷ, hẹp cột sống, tổn thương ở đầu và nhồi máu não. Vì vậy, việc sử dụng sHASEGP bằng cách phân bố qua đường trong phiên vách hoặc tiêm vào cơ thể sHASEGP được siêu sialat có thể là hữu hiệu để làm thoái hoá các mức cơ chất gia tăng trầm trọng này.

Lượng bạch huyết hữu hiệu bị thiếu trong não cũng có thể dẫn đến chứng phù thũng đe dọa cuộc sống sau khi gây chấn thương ở đầu. Việc tích tụ hyaluronan dẫn đến gia tăng tổng hợp HA syntaza, và làm giảm thoái hoá. Việc tích tụ hyaluronan đáp ứng mục đích gia tăng lượng nước trong mô bị tổn thương để tạo điều kiện cho tràn dịch bạch cầu, nhưng có thể gây chết. Vì vậy, việc sử dụng sHASEGP của người đối với bệnh nhân bị chấn thương ở đầu có thể loại bỏ được hyaluronan bị tích tụ trong mô và nước kết hợp với chúng. sHASEGP của người có thể được sử dụng qua đường trong phiên vách thông qua sun hoặc theo cách khác, sHASEGP được siêu sialat có thể được sử dụng qua đường trong tĩnh mạch để đến được mô não.

Sau khi gây thiếu máu cục bộ ở não xảy ra đột quy, lượng hyaluronan gia tăng đột ngột do gia tăng biểu hiện của HA syntaza và giảm quá trình chuyển hoá. Do thiếu

các bơm ion và sinh chất bị rò vào trong các mô kẽ dẫn đến phân dịch lỏng bị giữ lại mà nếu không được các bạch huyết làm sạch thích hợp sẽ dẫn đến hoại tử mô. Một số nhóm nghiên cứu đã cố gắng ngăn ngừa sự tích tụ dịch lỏng trong mô kẽ sau khi tái tưới máu cục bộ bằng cách phong bế khả năng thấm qua mạch. Tuy nhiên, một khi dịch lỏng này đã tràn ra, việc ngăn ngừa khả năng thấm qua mạch có thể ngăn cản giảm chứng phù thũng và các tình trạng trầm trọng.

sHASEGP của người cũng có thể hữu hiệu để điều trị chứng phù thũng liên quan đến các khối u não, cụ thể là liên quan đến các dạng u nguyên bào xốp. Chứng phù thũng liên quan đến các khối u não dẫn đến sự tích tụ hyaluronan trong các phần não không bị ung thư liên kết với khối u. Việc sử dụng hyaluronidaza tới các vị trí tích tụ hyaluronidaza (ví dụ, bằng cách tiêm qua đường tĩnh mạch hoặc qua sun) có thể làm giảm chứng phù thũng liên quan đến ung thư ác tính bằng cách làm thoái hoá hyaluronan dư tại các vị trí này. Vì vậy, hyaluronidaza là hữu hiệu trong việc điều trị các khối u não bằng cách không chỉ làm giảm kích thước khối u và ức chế sự phát triển khối u và/hoặc di căn, mà còn hữu hiệu trong việc làm giảm chứng phù thũng liên quan đến ung thư ác tính. sHASEGP của người có thể được sử dụng để điều trị chứng phù thũng theo cách tương tự với việc sử dụng hyaluronidaza từ tinh hoàn bò để điều trị chứng phù thũng (ví dụ, xem Sa Earp Arq. Braz. Med. 44: 217-20).

Xử lý tích tụ glycosaminoglycan trong bệnh tim mạch

Đã biết là việc sử dụng hyaluronidaza trong mô hình động vật sau khi bị nhồi máu cơ tim thực nghiệm có thể làm giảm được kích thước vùng nhồi máu (maclean, et al Science 1976 Oct 8; 194 (4261): 199-200). Cơ chế được đưa ra cho hyaluronidaza của bò làm giảm được kích thước vùng nhồi máu ở các động vật là làm giảm hyaluronidaza tích tụ xảy ra sau khi tái tưới máu cục bộ. Tin tưởng là kích thước vùng nhồi máu sẽ giảm dựa vào sự gia tăng dẫn lưu bạch huyết và gia tăng oxy hoá mô và giảm hàm lượng nước trong cơ tim. Trong khi có thể thu được kích thước vùng nhồi máu giảm ở mô hình động vật, lại không nhận biết được hiệu quả này từ các nghiên cứu lâm sàng diện rộng trên người. Hyaluronidaza thử nghiệm của bò có thời gian bán thải trong huyết thanh ngắn rõ rệt vào khoảng 3 phút ở động vật và người, Wolf và các đồng tác giả., J Pharmacol Exp Ther 1982 Aug; 222(2):331-7. Thời gian bán thải ngắn là do các gốc mannoza ở đầu tận cùng được nhận biết dễ dàng bằng các thụ thể ăn xác thối của hệ thống lưới nội mô. Trong khi các động vật nhỏ có thể có lợi từ

hyaluronidaza do có lòng mạch nhỏ hơn, một enzym lại cần có thời gian bán thải gia tăng. sHASEGP được sialat hoá quá mức có tính được động học có lợi hơn do không có thụ thể ăn xác thối cho quá trình sialat hoá. sHASEGP được siêu sialat với liều nằm trong khoảng từ 100 đến 200000 đơn vị/kg có thể là hữu hiệu để tạo điều kiện phân giải hyaluronan dư sau tái tưới máu cục bộ và để làm giảm kích thước vùng nhồi máu.

sHASEGP được sialat hoá quá mức cũng có thể được sử dụng để làm hạn chế các mảng vữa xơ động mạch ở động mạch vành. Các mảng này tích tụ glycosaminoglycan và gián tiếp gây bám dính đại thực bào và tế bào sợi, xem ấn phẩm Kolodgie et al, *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002 Oct 1;22(10):1642-8. sHASEGP được sialat hoá quá mức có thể được sử dụng để làm giảm sự tạo mảng. Với việc sử dụng hyaluronidaza lặp lại được tính đến ở liều nằm trong khoảng từ 100 đến 100000U/kg, sự cần thiết sử dụng protein tái tổ hợp của người với mức rủi ro sinh miễn dịch thấp và gia tăng thời gian bán thải sẽ dẫn đến làm giảm khá lớn các mảng.

Điều trị các mô ngoại vi bị hoại tử

Hoại tử mô xuất hiện ở nhiều bệnh do bị suy tĩnh mạch. Việc oxy hoá không đầy đủ là một trong những trở ngại chính đối với quá trình tái tạo mô. Đã được chứng minh rằng việc điều trị bằng hyaluronidaza trong động mạch làm cải thiện đáng kể hình ảnh lâm sàng ở bệnh nhân mắc bệnh tắc động mạch ngoại vi (Elder et al., *Lancet* (1980) 648-649). sHASEGP có thể được tiêm vào trong động mạch từ 3 đến 5 lần trong một tuần với liều nằm trong khoảng từ 10 đến 200.000 đơn vị.

Tăng cường gây tê

Hyaluronidaza thu được từ gia súc lò mổ thường được sử dụng để phong bế quanh cầu mắt khi gây tê cục bộ trước khi phẫu thuật mắt. Sự có mặt của enzym này ngăn ngừa nhu cầu phong bế bổ sung và rút ngắn thời gian khởi phát của chứng mất khả năng vận động (mất khả năng vận nhãn). Phong bế quanh cầu mắt và cận ống Tenon là ứng dụng thông thường nhất của hyaluronidaza đối với các thủ thuật liên quan đến mắt. Vì tính không liên tục của Wydase®, các thông báo về việc gia tăng bệnh song thị và sụp mi đã được thông báo khi phong bế quanh cầu mắt (Brown et al., *J. Cataract Refract Surg.*, 1999; 25: 1245-9).

Do tính không liên tục của Wydase® của tác giả Wyeth, hyaluronidaza thu được từ bò thử nghiệm hiện nay được các cơ sở bào chế hỗn hợp cung cấp. Tuy nhiên,

có một số vấn đề khi sử dụng sản phẩm hỗn hợp vô trùng dùng tức thì này. <http://www.ashp.org/shortage/hyaluronidase.cfm?cfid=11944667&CFToken=9426953-re#ref> . Các chế phẩm hỗn hợp không phải là các sản phẩm do FDA chấp thuận. Vì vậy, FDA không kiểm soát được chất lượng và tính ổn định của quy trình sản xuất này.

sHASEGP với lượng nằm trong khoảng từ 10 đến 500 đơn vị có thể được trộn trực tiếp với 5ml lidocain (Xyclocaine) 2%, 5ml bupivacain (Marcaine) 0,5% và tùy ý với epinephrin theo tỷ lệ 1:200.000. sHASEGP có thể được sử dụng để kéo dài thời gian khởi phát chứng mất khả năng vận động và loại bỏ nhu cầu phong bế bổ sung. sHASEGP cũng là lý tưởng đối với chứng mất khả năng vận động và đối với phẫu thuật thẩm mỹ căng da mặt và tạo mi. sHASEGP cũng có thể được sử dụng sau phẫu thuật để khuếch tán các chất chống viêm và giảm phù nề tổ chức.

sHASEGP cũng có thể được trộn với dung dịch đệm như bicarbonat để ngăn ngừa bất lợi khi tiến hành tiêm. sHASEGP cũng có thể được trộn với chất gây tê khi mổ để làm giảm tổng thể tích hoạt chất cần để tiêm và làm giảm cơn đau do phù nề tổ chức.

Giảm áp lực trong mắt

Một tác dụng phụ thông thường xảy ra ở bệnh nhân sau phẫu thuật bệnh đục thủy tinh thể là bị gia tăng áp lực trong mắt ở mức độ sớm đáng kể và đôi khi kéo dài. Tình trạng này đôi khi rất nghiêm trọng, đặc biệt là ở các bệnh nhân có sự thay đổi đĩa thị giác khi tăng nhãn áp. Mặc dù việc gia tăng áp lực này theo khuynh hướng trầm trọng hơn khi các tác nhân nhót đàn hồi như axit hyaluronic được tiêm vào trong mắt trong khi phẫu thuật, thì áp lực trong mắt vẫn có thể bị gia tăng sau phẫu thuật thậm chí khi không sử dụng các tác nhân này. Hơn nữa, gia tăng áp lực trong mắt có thể xảy ra thậm chí khi không sử dụng các dược phẩm bổ sung trong khi tiến hành phẫu thuật. Trong một số trường hợp, sẽ có lợi khi đưa chất nhót đàn hồi vào trong mắt nhằm cung cấp cho bệnh nhân một lượng lớn chất ức chế carbonic anhydrase bắt buộc phải có. Các chất ức chế này làm giảm áp lực trong mắt bằng cách làm giảm sự tạo thành dịch nước, là dịch lỏng thường được thể mi tiết ra trong mắt. Các phương pháp thông thường làm giảm áp lực bị gia tăng trong mắt sau phẫu thuật bao gồm sử dụng các loại tác nhân nhỏ vào mắt như tác nhân làm phong bế tác động kiểu beta-adrenalin, tác

nhân kiểu giao cảm, chất co đồng tử, tác nhân chọn lọc alpha II, chất ức chế carbonic anhydrase và tác nhân prostaglandin.

Một phương pháp được ưu tiên để loại bỏ chất nhót đàn hồi như axit hyaluronic là bằng cách tiêm sHASEGP trong khi hoặc ngay sau khi tiến hành phẫu thuật thì trước hoặc thì sau, mặc dù các phương pháp khác đã biết trong lĩnh vực này cũng có thể được sử dụng. Được ưu tiên nếu axit hyaluronic và sHASEGP được sử dụng bằng cách tiêm vào trong tiền phòng trong khi tiến hành phẫu thuật mắt thì trước để axit hyaluronic này đóng vai trò làm khoảng đệm trong khi bắt đầu tiến hành phẫu thuật. Trong một số trường hợp cấy ghép giác mạc, hỗn hợp axit hyaluronic và sHASEGP có thể được đặt lên bề mặt cấu trúc nhãn áp trước khi khâu đoạn ghép giác mạc vào đúng chỗ. Hỗn hợp này cũng có thể được sử dụng trong phẫu thuật thì sau, như phẫu thuật võng mạc hoặc thủy tinh thể.

Trong một số trường hợp, có thể nên để lại tác nhân nhót đàn hồi như Healon.TM., Viscoat.TM., hoặc các chất chiếm giữ khoảng không khác trong tiền phòng của mắt sau khi kết thúc phẫu thuật. Điều này đặc biệt quan trọng với áp lực dương gia tăng khi các thành phần trong mắt có khuynh hướng cung cấp và nén áp lực lên bề mặt sau của giác mạc. Nếu điều này xảy ra trong mắt có thủy tinh thể nhân tạo, áp lực lên nội mô giác mạc có thể gây ra tổn thương đáng kể cho các tế bào và sau đó làm trương giác mạc và có thể xảy ra sự vỡ giác mạc kết hợp với giảm thị lực. Diễn hình là, nếu áp lực trong mắt của bệnh nhân bị gia tăng đáng kể khi kết thúc tiến hành phẫu thuật, thì cần thiết phải cung cấp cho bệnh nhân một liều lớn chất ức chế carbonic anhydrase, cũng như là các loại tác nhân sử dụng khu trú nhỏ vào mắt như chất phong bế beta và chất chủ vận alpha II để làm giảm tạo thành dịch nước và/hoặc gia tăng sự thoát dịch nước. Tất cả các tác nhân này đều có các tác dụng phụ đáng kể và ở một số trường hợp có chống chỉ định đối với các bệnh nhân có các loại trạng thái bệnh lý như các vấn đề về hô hấp, bệnh tim hoặc huyết áp cao. Tuy nhiên, việc sử dụng sHASEGP trong các trường hợp này sẽ loại bỏ được việc cần thiết phải cung cấp cho các bệnh nhân này một liều lớn dược chất.

Hơn nữa, có một lượng đáng kể axit hyaluronic trong lớp đỉnh của bề cơ. sHASEGP sẽ làm giảm nhanh axit hyaluronic này và vì vậy làm tăng cường thoát dịch nước thông qua lớp đỉnh của bề cơ. Vì vậy, áp lực trong mắt của bệnh nhân sẽ giảm xuống. Hỗn hợp của sHASEGP với các tác nhân tiền phòng khác như methylxenuloza

(Ocucoat.RTM. ví dụ do Storz Instrument Co. cung cấp), được sử dụng làm khoảng đệm và/hoặc các tác nhân bảo vệ trong phẫu thuật thủy tinh thể cũng sẽ là hữu hiệu để ngăn ngừa gia tăng áp lực đáng kể do nó có tác dụng mở lớp đỉnh của bè cơ và cho phép thoát dịch nước nhiều hơn bằng cách làm giảm nhanh một lượng đáng kể axit hyaluronic có mặt trong lớp đỉnh của bè cơ.

Việc loại bỏ glycosaminoglycan từ lớp đỉnh của bè cơ cũng là hữu hiệu để làm giảm áp lực trong mắt ở các bệnh nhân mắc bệnh tăng nhãn áp góc mở. sHASEGP của người có thể được sử dụng bằng cách tiêm dưới kết mạc hoặc tiêm trực tiếp vào trong tiền phòng.

Các nang hạch

Nang hạch này (cũng được biết đến như là nang cổ tay, nang Bible, hoặc nang gân mu tay) là những khối mô mềm thông thường nhất của tay. Nó là một túi chứa đầy dịch lỏng có thể được sờ thấy dưới da. Nó thường được gắn với một bao mu tay (lớp lót làm trơn mu tay) ở trong da hoặc cổ tay hoặc liên kết với một khớp nằm ở dưới; tuy nhiên, đôi khi không có sự liên kết rõ ràng với các cấu trúc bất kỳ. Các hạch này cũng thường xuất hiện ở chân. Nó thường xuất hiện khi có một vết rách ở các dây chằng nằm ở trên lớp lót mu chân hoặc các khớp và lớp lót này thoát ra qua vị trí khuyết dây chằng gây ra sung nề dưới da. Do có liên quan đến viêm, mô bị viêm tạo ra dịch lỏng giống như thạch làm đầy túi sung nề. Nó có thể nghiêm trọng do áp lực cao của dịch lỏng giống dịch nhầy chứa trong nang này và thường xuyên đâm lấn với những mấu lồi xương.

sHASEGP có thể được sử dụng để cải thiện các nang hạch. Tiêm sHASEGP vào vị trí tổn thương với liều nằm trong khoảng từ 5 đến 1000 đơn vị, tiếp theo là hút bằng kim đầu nhỏ sẽ loại bỏ được nang này mà không cần đến phẫu thuật. Corticosteroid có thể được tiêm tùy ý cùng với sHASEGP. Đối với một số bệnh nhân có thể cần phải tiêm bổ sung.

Chứng phù niêm

Sự ngưng đọng glycosaminoglycan (GAG) ở da là dấu hiệu của bệnh ưu năng tuyến giáp, nhược năng tuyến giáp, phù niêm mắt trước xương chày, bệnh phù niêm cứng và phù cứng bì. Axit hyaluronic là GAG chủ yếu trong tất cả các tình trạng bệnh lý này và trong da bình thường. Có sự biến đổi mô học tối thiểu của GAG phân bố

dưới da. Bệnh tích muxin ở da thu được biểu hiện sự phân bố GAG và chế phẩm hoá sinh dưới da tương tự nhau. Sự khác biệt về hình thái ở nguyên bào sợi hoạt hoá gợi ý là bệnh tích muxin của chứng phù cứng bì và phù niêm cứng là một quá trình cục bộ, trong khi đó sự ngưng đọng GAG của bệnh tuyến giáp có thể có nguồn gốc nội hấp. Các rối loạn này có thể được cải thiện bằng sHASEGP theo cách sử dụng cục bộ hoặc nội hấp. Đối với liệu pháp mạn tính, có thể sử dụng sHASEGP được peg hoá.

Sử dụng sHASEGP cho phổi

Mức hyaluronan trong dịch rửa phế quản-phế nang (brochoalveolar lavages-BAL) ở các đối tượng bình thường thường nằm dưới 15ng/ml. Tuy nhiên, mức BAL gia tăng đột ngột trong các tình trạng suy kiệt hô hấp (Bjermer *Br Med J* (Clin Res Ed) 1987 Oct 3; 295(6602):803-6). Ví dụ, trong ARDS mức hyaluronan có thể gia tăng đến 500ng/ml, trong khi đó trong phổi của người nông dân mức BAL có thể vượt quá 100ng/ml (Hallgren et al *Am Rev Respir Dis*. 1989 Mar; 139(3):682-7), (Larrson et al *Chest*. 1992 Jan; (1):109-14). Mức hyaluronan gia tăng trong phổi này có thể ngăn ngừa được khuếch tán oxy và trao đổi khí cũng như hoạt hoá các đáp ứng của đại thực bào và bạch cầu trung tính.

Các chế phẩm chứa hyaluronidaza của bò không thích hợp để điều trị các bệnh lý này với nhiều lý do khác nhau. Đầu tiên, các chế phẩm chứa hyaluronidaza thu được từ gia súc lò mổ thử nghiệm được biết là bị nhiễm bản các serin proteaza như acrosin. Thứ hai, bản chất thể lạ của enzym bò làm gia tăng khả năng phản ứng quá mẫn có thể gây chết bệnh nhân. Vì vậy, chế phẩm sHASEGP của người tái tổ hợp với độ tinh khiết cao có thể được phân bố qua đường trong tĩnh mạch hoặc vào trong phổi. sHASEGP của người cũng có thể được sử dụng cho bệnh nhân bị các biến chứng về phổi kết hợp với glycosaminoglycan gia tăng hoặc để tăng cường việc phân bố các phân tử khác cùng được cung cấp tới phổi.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn bằng cách tham khảo các ví dụ không nhằm giới hạn phạm vi của sáng chế.

Ví dụ 1

Các thử nghiệm hyaluronidaza dựa trên phương pháp vi chuẩn độ

Ví dụ sau đây đề cập đến một thử nghiệm nhanh để đánh giá hoạt tính hyaluronidaza của sHASEGP. Thử nghiệm này có thể liên quan đến TRU, IU hoặc NFU thông qua việc sử dụng chế phẩm hyaluronidaza theo tiêu chuẩn của WHO.

Thử nghiệm vi chuẩn độ hyaluronan được biotin hóa

Các nhóm carboxyl tự do trên gốc axit glucuronic của hyaluronan được biotin hoá trong phản ứng một bước bằng cách sử dụng biotin-hydrazit (Pierce), Sulfo NHS (Pierce) và 1-Etyl dimethylaminopropyl-carbodiimit (Sigma). Cơ chất HA được biotin hoá được liên kết cộng hoá trị với đĩa vi chuẩn độ có 96 giếng trong phản ứng thứ hai. Khi hoàn thành phản ứng enzym này, cơ chất còn lại được xác định bằng phản ứng avidin-peroxidaza mà có thể đọc được trên thiết bị đọc đĩa ELISA chuẩn. Khi cơ chất này được liên kết cộng hoá trị với đĩa vi chuẩn độ, các hiện tượng giả như sự di chuyển phụ thuộc vào độ pH của cơ chất được biotin hoá này sẽ không xảy ra. Khả năng nhạy cảm này cho phép đánh giá nhanh hoạt tính hyaluronidaza từ các mẫu nuôi cấy tế bào và các mẫu sinh học với sai số trong thử nghiệm nhỏ hơn 10%.

a. Phương pháp

Điều chế cơ chất HA được biotin hoá

100mg HA (Sigma Chemicals) được hoà tan trong 0,1M MES, độ pH= 5,0, đến nồng độ cuối cùng là 1mg/mL và để hoà tan trong ít nhất 24 giờ ở nhiệt độ 4°C trước khi kết hợp với biotin. Sulfo NHS (Pierce; Rockford IL) được bổ sung vào dung dịch CS04 MES đến nồng độ cuối cùng là 0,184mg/mL. Biotin-hydrazit (Pierce) được hoà tan trong DMSO là dung dịch gốc 100mM và được bổ sung vào dung dịch CS04 đến nồng độ cuối cùng là 1mM. Dung dịch gốc chứa 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimit (EDAC) được điều chế ở dạng dung dịch gốc 100mM trong nước cất và được bổ sung vào dung dịch biotin HA ở nồng độ cuối cùng là 30mM. Dung dịch này được khuấy qua đêm ở nhiệt độ 4°C. Biotin không được liên kết và EDAC được loại bỏ bằng cách thẩm tách bằng nước với 3 lần thay nước với lượng là 1000x thể tích. HA được biotin hoá (bHA), được thẩm tách được chia đều thành các phần nhỏ và được bảo quản ở nhiệt độ -20°C đến tận vài tháng.

Sulfo-NHS được pha loãng tới 1,84mg/ml trong nước với bHA ở nồng độ 0,2mg/ml và được hút bằng pipet để cho vào các đĩa 96 giếng COVALINK-NH (NUNC; Placerville NJ) ở nồng độ 50µg/giếng. EDAC được pha loãng tới 0,123mg/ml

trong nước và được hút bằng pipet để cho vào các đĩa COVALINK-NH với dung dịch bHA thu được bHA ở nồng độ cuối là 10 μ g/giếng và 6,15 μ g/giếng EDAC. Các đĩa này được ủ qua đêm ở nhiệt độ 4°C hoặc trong 2 giờ ở nhiệt độ 23°C để thu được các kết quả so sánh. Sau khi cố định bCS04 trên các đĩa vi chuẩn độ bằng liên kết cộng hoá trị, dung dịch kết hợp này được loại bỏ bằng cách lắc và các đĩa này được rửa ba lần trong PBS chứa 2M NaCl và 50mM MgSO₄ (dung dịch đệm A). Các đĩa này có thể được bảo quản ở nhiệt độ 4°C trong tối đa một tuần.

Các đĩa COVALINK-NH với bHA được cố định được làm cân bằng bằng dung dịch đệm thử nghiệm với lượng 10 μ l/giếng là: 0,1M format, độ pH=3,7, 0,1M NaCl, 1% chất tẩy rửa TRITON X-100, 5mM sacarolacton cho lyposom hyaluronidaza; hoặc 10mM Hepes, độ pH=7,4 với 1mM CaCl₂ và 1mg/ml albumin huyết thanh người (ICN) đối với enzym có hoạt tính trung hoà. Một loạt các tiêu chuẩn để tính toán hoạt tính enzym đối với “đơn vị làm giảm độ đục tương đối” (relative Turbidity Reducing Units-rTRU’s) được tạo ra bằng cách pha loãng hyaluronidaza của tinh hoàn bò (Sigma Type VI-S) trong dung dịch đệm trung hoà với lượng từ 1,0 đến 1x10⁻⁶ rTRU/giếng và thử nghiệm 100 μ l/giếng lặp lại ba lần. Các mẫu hyaluronidaza có hoạt tính axit được pha loãng trong dung dịch đệm thử nghiệm lyposom với tỷ lệ từ 1:10 đến 1:130.000, được hút bằng pipet lặp lại ba lần với lượng 100 μ l/giếng/ Đối với đa số thử nghiệm về dịch chiết mô và huyết tương của người, chỉ cần 30 phút ủ ở nhiệt độ 37°C là đủ. Các giếng đối chứng âm tính và dương tính (lần lượt không có enzym hoặc không có ABC (xem dưới đây)) được bao gồm, thử nghiệm lặp lại ba lần.

Phản ứng này được kết thúc bằng cách bổ sung 200 μ l/giếng 6M Guanidin HCl, tiếp theo là rửa ba lần bằng PBS, 2M NaCl, 50mM MgSO₄, 0,05% chất tẩy rửa TWEEN 20 (dung dịch đệm B) với lượng 300 μ l/giếng. Kit chứa phức avidin biotin (ABC) (Vector Labs; Burlingame CA) điều chế được trong 10ml PBS chứa 0,1% chất tẩy rửa TWEEN 20, được ủ trước trong 30 phút ở nhiệt độ phòng. Dung dịch ABC được bổ sung (100 μ l/giếng) và được ủ trong 30 phút ở nhiệt độ phòng. Đĩa này được rửa 5 lần bằng dung dịch đệm B, sau đó cơ chất o-phenylendiamin (OPD) được bổ sung với lượng 100 μ l/giếng bằng cách hoà tan một viên OPD 10mg trong 10ml dung dịch đệm 0,1M xitrat-PO₄, độ pH=5,3 và bổ sung 7,5 μ l chứa 30% H₂O₂. Đĩa này được ủ trong bóng tối trong thời gian từ 10 đến 15 phút, sau đó đọc bằng bộ lọc ở bước

sóng 492nm trong thiết bị đọc đĩa ELISA (Titerek Multiskan PLUS; ICN) được theo dõi bằng máy tính có sử dụng phần mềm đọc đĩa Delta Soft II do Biometallics cung cấp (Princeton NJ). Đường cong chuẩn sử dụng hyaluronidaza của tinh hoàn bò được tạo ra bằng đường cong có bốn thông số thích hợp với chế phẩm hyaluronidaza thương mại và các mẫu chưa biết được nội suy qua phổ hấp thụ ở bước sóng 492nm.

Để phân tích sự phụ thuộc vào độ pH của hyaluronidaza, sHASEGP tái tổ hợp được tinh chế và hyaluronidaza của tinh hoàn bò được sử dụng. Hoạt tính enzym phụ thuộc vào độ pH được đánh giá bằng cách pha loãng sHASEGP đã tinh chế hoặc hyaluronidaza của tinh hoàn bò đã tinh chế một phần tới 0,1rTRU trong dung dịch đệm sau: 50mM format, độ pH=3-4,5; 50mM axetat, độ pH=5-6; 50mM MES, độ pH=6-7; hoặc 50mM HEPES, độ pH=7-8. Các mẫu được thử nghiệm trong thời gian 30 phút ở nhiệt độ 37°C và hoạt tính được biểu hiện ở dạng phần trăm hoạt tính tối đa. NaCl không được sử dụng trong dung dịch đệm, vì nó có thể làm thay đổi độ pH tối ưu của chế phẩm hyaluronidaza của tinh hoàn (Gold, *Biochem. J.* 205:69-74, 1982; Gacesa et al. *Biochem. Soc. Trans.* 7:1287-1289, 1979); các nồng độ muối sinh lý (0,15M) làm giảm độ pH tối ưu rõ ràng, một tác dụng được thấy rõ ở các chế phẩm enzym của tinh hoàn đã tinh chế hơn là trong chế phẩm thô ban đầu.

b. Kết quả

Hyaluronan được biotin hoá trong phản ứng một bước bằng cách sử dụng biotin-hydrazit và EDAC. Bằng cách hạn chế EDAC, mà kết hợp các nhóm carboxyl tự do trên HA với biotin hydrazit, chỉ một phần nhỏ của toàn bộ gốc của axit glucuronic trên HA được đánh dấu. Một lượng EDAC (3×10^{-5} M) được bổ sung vào HA ($2,8 \times 10^{-3}$ M) dẫn đến tối đa một phân tử biotin hydrazit được kết hợp trong 93 đơn vị disacarit của HA.

Một đường cong thích hợp có bốn thông số chứa các phản ứng tiêu chuẩn hyaluronidaza của tinh hoàn bò được đánh giá ở độ pH = 3,7, và được pha loãng từ 1,0 đến 1×10^6 TRU/giếng được chuẩn bị. Bốn thông số của đường cong được tạo ra từ phương trình $y = ((A-D)/(1+(Conc./C)^B)) + D$ trong đó $\log_{it} y = \ln(y'/1-y')$, $y' = (y-D)/(A-D)$, $B = -b/\ln 10$ và $C = \text{EXP}(a/B)$. Bốn thông số (A,B,C,D) được tính toán bằng chương trình phần mềm sử dụng thuật toán 2+2 với phép hồi quy tuyến tính (Rodbard et al., *Clin. Chem.* 22: 350, 1976). Đường cong thích hợp này sẽ bao gồm dạng xích ma của

đường cong chuẩn. Độ chính xác tối ưu cho việc định lượng một mẫu thường nằm trong khoảng từ 0,001 đến 0,01 TRU/giếng trong 30 phút ủ. 1/1000 TRU được phát hiện trong 60 phút ủ. Một đường cong thuật toán chuẩn cũng có thể được sử dụng trên một phạm vi giá trị ngắn hơn để tạo ra đường cong thích hợp chuẩn. Mặc dù sáng chế được mô tả kết hợp với các phương án được ưu tiên cụ thể, được hiểu rằng sáng chế được yêu cầu bảo hộ sẽ không chỉ được giới hạn chặt chẽ bằng các phương án cụ thể này.

Ví dụ 2

Tách dòng cADN sHASEGP

Axit nucleic mã hoá sHASEGP của người có thể thu được bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này thông qua một số phương pháp bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, tổng hợp gen nhân tạo, RT-PCR, và lai bằng thư viện cADN (ví dụ, xem ấn phẩm Gmachl et al FEBS 336(3) 1993, Kimmel et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 1993 10071-10075). Theo cách khác, các dòng vô tính mã hoá sHASEGP của người có thể thu được từ IMAGE, hoặc các hãng cung cấp các trình tự gen của người (Invitrogen Clone ID IOH10647).

cADN PH20 của người có độ dài đầy đủ được tính toán là 2009 nucleotit trong chiều dài và chứa một vùng khung đọc mở có 1530 nucleotit. UTR ở đầu 5' thường không lớn, có thể chỉ ra intron được duy trì và có thể ức chế dịch mã bằng cách ngăn ngừa ribosom này từ việc liên kết với codon methionin khởi đầu chính xác do các codon bắt đầu mã hoá 9 nucleotit trong 5'UTR. Protein này (Đăng ký tại ngân hàng gen số NP-003108) được dự tính bao gồm 509 axit amin trong SEQ ID No.1 với khối lượng phân tử được tính toán là 58KDa.

Để xác định trình tự dòng vô tính, các dải được khuếch đại bằng phương pháp PCR được cắt bỏ, và rửa giải bằng Kit chiết tách gel (Qiagen) và được tách dòng trong các vectơ thích hợp bằng các đầu cuối tương hợp sau khi phân cắt giới hạn. Tất cả các phản ứng xác định trình tự được thực hiện trên ADN sợi kép bằng kit xác định trình tự chu kỳ gen kết thúc deoxy nhuộm *Tag* (Applied Biosystems) theo hướng dẫn của nhà sản xuất, và chạy trên thiết bị xác định trình tự tự động ABI Prism™ (Applied Biosystems).

Khung đọc mở PH-20 của người thu được bằng cách khuếch đại thư viện cADN từ tinh hoàn của người (Clontech, Palo Alto CA) bằng phản ứng chuỗi Polymeraza (Polymerase Chain Reaction) có sử dụng đoạn mồi có trình tự nêu trong SEQ ID NO 14 và SEQ ID NO 47. Sản phẩm PCR được phân cắt bằng NheI và BamHI và được tách dòng trong các vị trí NheI và BamHI của vector IRESSpuro2 (Clontech).

Ví dụ 4

Phân lập sHASEGP từ cADN PH20 của người

Vector biểu hiện sHASEGP của người tái tổ hợp có hoạt tính xúc tác được tiết có khả năng glycosyl hoá hữu hiệu được tạo ra như được mô tả dưới đây. Các cấu trúc biểu hiện khác với các trình tự khởi động và các gen chọn lọc của các loài khác nhau như nấm men và tế bào côn trùng mà cũng có khả năng tạo ra sHASEGP là được tính đến. Các gen chọn lọc dương tính như Glutamin Syntaza hoặc Dihydrofolat Reductaza (DHFR) cũng có thể được sử dụng. Các ví dụ nêu dưới đây không nhằm làm giới hạn mà chỉ được đưa ra làm ví dụ về một vài hệ thống biểu hiện plasmid có thể được sử dụng.

Để cấu trúc nên các dạng được tiết của sHASEGP, các thể đột biến cắt cụt thiếu đầu tận cùng C kỵ nước được tạo cấu trúc. Bằng cách sử dụng chương trình dự đoán việc phân cắt GPI, vị trí phân cắt được móc bám vào GPI được xác định vị trí xung quanh vị trí axit amin N 483 trong protein được móc bám vào GPI có độ dài đầy đủ. Bộ gồm bảy đoạn mồi 3' xếp lồng vào nhau được sử dụng để tạo cấu trúc bộ gồm bảy thể đột biến mất đoạn theo kiểu cắt cụt thiếu móc bám vào GPI được dự đoán bắt đầu ở vị trí Y 482 và loại bỏ lũy tiến bằng một axit amin. Các đoạn mồi này được thiết kế để có các vị trí NheI (5') và BamHI (3') tương hợp để tách dòng các thể đột biến cắt cụt trong vector Irespuro2 không được đánh dấu ở codon kết thúc trong đoạn mồi 3', hoặc protein được đánh dấu His ở đầu tận cùng C để dễ dàng tinh chế và phát hiện. Ví dụ về các đoạn mồi ngược có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 được sử dụng để tạo ra các thể đột biến mất đoạn kết thúc ở vị trí Y 482, F 481 và I 480 mà không đánh dấu 6 His. Các đoạn mồi đột biến khác được tạo ra với kiểu thiết kế bazơ tương tự với các cải biến thích hợp để bao gồm và loại trừ các axit amin cụ thể này. Để tạo ra các biến thể được đánh dấu His, bộ đoạn mồi tương tự được

sử dụng làm biến thể không được đánh dấu ngoại trừ là các đoạn môi này không có codon kết thúc trong các đoạn môi đảo ngược tương ứng, đoạn môi xuôi này duy trì cấu trúc tương tự (cấu trúc được đánh dấu His dùng để chỉ các đoạn môi với SEQ ID NO: 19, 20, 21, 22, 23, 24 và 25 là các đoạn môi ngược không có codon kết thúc phù hợp với các đoạn môi ngược không được đánh dấu đối với cấu trúc tương ứng của chúng). Các đoạn môi chồng lên nhau được sử dụng để cấu trúc một đoạn đệm có 6 axit amin sau hexahistidin trong các vị trí BanH1 và Not1 trong vector Irespuro2 sao cho các thể đột biến được đánh dấu His được tạo ra bằng cách gắn các sản phẩm được phân cắt giới hạn và khuếch đại bằng PCR trong các vị trí Nhe1 và BanH1 trong vector Irespuro2 chứa nhãn đánh dấu His.

Để nhận biết liệu sHASEGP của người có thể được cải biến tại đầu tận cùng carboxy để tạo ra enzym được tiết và có hoạt tính trung hoà hay không, một loạt quá trình cắt cụt được tiến hành từ vị trí gắn có móc bám vào GPI với “vùng xúc tác” được dự đoán dựa trên sự tương đồng với enzym nọc độc của ong.

ADN mã hoá dòng vô tính được móc bám vào GPI có độ dài đầy đủ chứa sHASEGP của người trong IRESPuro2 được sử dụng làm khuôn mẫu để tạo ra các thể đột biến mất đoạn bị cắt cụt khác nhau. Chương trình phần mềm đưa ra một số vị trí phân cắt được dự đoán cho polypeptit có độ dài đầy đủ. Một vị trí được dự đoán này là vị trí axit amin N 483 (SEQ ID NO: 1). Các đoạn môi PCR được thiết kế để cắt cụt liên tục protein này từ N 483 để tạo ra sáu thể đột biến mất đoạn bắt đầu từ Y 482 (thiếu N) và kết thúc ở E 477 (thiếu P).

a. Phương pháp

Tạo thể đột biến cắt cụt thiếu N 483:

Vị trí giữa NheI và BanHI của dòng vô tính sHASEGP được móc bám vào GPI có độ dài đầy đủ trong pIRESPuro2 được sử dụng làm khuôn mẫu. Khuôn mẫu này được khuếch đại bằng đoạn môi 5' chứa vị trí NheI bắt đầu tại metionin khởi đầu của peptit tín hiệu tự nhiên tại M1 (SEQ ID NO: 14) và đoạn môi 3' chứa vị trí BamHI kết thúc tại Y 482 (SEQ ID NO: 8). Sản phẩm PCR được chạy trên gel agarosa 1% để hoà tan và khẳng định bằng đã khuếch đại có kích thước chính xác, được tinh chế gel, được phân cắt giới hạn bằng NheI và BamHI và được tách dòng trong vector pIRESPuro2 (Clontech) giữa các vị trí NheI và BamHI tạo ra vector biểu hiện để biểu

hiện thể đột biến cắt cụt này có đầu cuối của sHASEGP tại axit amin ở vị trí N 482 và thiếu móc bám vào GPI với trình tự axit amin (SEQ ID NO: 5 cho trình tự của polypeptit thu được của sHASEGP tới Y 482) và trình tự nucleotit (SEQ ID NO: 48 là các nucleotit mã hoá polypeptit nêu trong SEQ ID NO: 5) như được chỉ ra.

Lần lượt tạo thành các thể đột biến cắt cụt khác thiếu Y482, F481, I 480, Q 479 và P487.

Phương pháp tương tự được sử dụng với sự khác biệt duy nhất là sử dụng đoạn mồi thích hợp cho mỗi đột biến. Các đoạn mồi 3' tương ứng là như sau:

Đoạn mồi 3' cho thể đột biến sHASEGP thiếu Y 482-SEQ ID No.9.

Đoạn mồi 3' cho thể đột biến thiếu F 481-SEQ ID No.10.

Đoạn mồi 3' cho thể đột biến thiếu I 480-SEQ ID No.11.

Đoạn mồi 3' cho thể đột biến thiếu Q 479-SEQ ID No.12.

Đoạn mồi 3' cho thể đột biến thiếu P 478-SEQ ID No.13.

Tạo thành các thể đột biến mất đoạn tiếp để xác định vùng sHASEGP có hoạt tính tối thiểu:

Để loại bỏ tiếp trong khối axit amin gồm từ 10 đến 20 axit amin được tiến hành từ đầu cuối 3' ở hầu hết bên trong của thể đột biến cắt cụt của sHASEGP có hoạt tính pH trung hoà, là sHASEGP tới E 477. Đoạn mồi xuôi NheI (SEQ ID No.14) được sử dụng với đoạn mồi 3' được xác định vị trí thích hợp để khuếch đại PCR thể đột biến mất đoạn sHASEGP có độ dài mong muốn từ đầu tận cùng carboxy. Ví dụ, phương pháp PCR với đoạn mồi được mô tả trong SEQ ID No.14 và SEQ ID NO.26 là các đoạn mồi 5' và 3' lần lượt được sử dụng để tạo thành peptit trong SEQ ID No.49 khi được biểu hiện từ cấu trúc biểu hiện trong vector IesPuro2. Tương tự, phương pháp PCR với các đoạn mồi 3' được mô tả trong SEQ ID No 27, 28, 29, 30, 31 và 32 được sử dụng để tạo thành các thể đột biến mất đoạn kết thúc lần lượt ở vị trí axit amin A 447, S 430, G413, S394, A 372 và S 347 của sHASEGP trưởng thành. Các sản phẩm PCR trong mỗi trường hợp được phân cắt bằng các enzym NheI và BamHI và sản phẩm đã phân cắt này được tách dòng trong vector pIresPuro2 giữa các vị trí NheI và BamHI. Một số dòng vô tính độc lập trong cấu trúc biểu hiện cuối cùng từ mỗi nhóm được thử nghiệm về hoạt tính sHASEGP có hoạt tính trung hoà được tiết ra bằng cách

chuyển nhiễm tạm thời trong các tế bào CHO trong môi trường không có huyết thanh CD-CHO (Invitrogen, CA) và các mẫu được sử dụng tại các thời điểm yêu cầu để thử nghiệm. ADN với lượng tối thiểu (Miniprep) điều chế được từ các chủng nuôi cấy qua đêm được chuyển nhiễm bằng thuốc thử chuyển nhiễm Genejuice (Novagen, CA) theo phương pháp được chỉ ra bởi nhà sản xuất. Hoạt tính hyaluronidaza được đánh giá bằng thử nghiệm vi chuẩn độ như được mô tả ở trên.

b. Kết quả

Hoạt tính hyaluronidaza được đánh giá trong các thể đột biến cắt cụt sHASEGP để nhận biết vùng có hoạt tính tối thiểu đối với hoạt tính hyaluronidaza có tác dụng trung hoà được tiết ra.

Các axit amin từ 1 đến	U/ML/24 giờ, độ pH=7,4
347	0,000
372	0,000
394	0,000
413	0,000
430	0,000
447	0,000
467	0,089
477	0,567
478	0,692
479	0,750
480	0,575
481	0,740
482	0,329
483	0,800
509	0,044

Các kết quả thể hiện rằng tất cả sáu thể đột biến mất đoạn một axit amin kết thúc tại axit amin đã chỉ ra từ Y 482 đến E 477 có hoạt tính tiết ra cao hơn sHASEGP có móc bám vào GPI.

Các kết quả cũng thể hiện rằng các mất đoạn ngoài A 467 loại bỏ được hoạt tính tiết bất kỳ. Hoạt tính trung hoà được tiết ra từ các dòng vô tính A 467 giảm tới khoảng 10% so với hoạt tính trung hoà được tiết ra được phát hiện trong các dòng P 478 hoặc N 483. Vì vậy, kết luận được rằng cần đến nhiều vùng ở đầu tận cùng carboxy của sHASEGP của người để tạo ra vùng hyaluronidaza có hoạt tính trung hoà hơn so với kết luận được đưa ra trước khi thử nghiệm trên enzym của nọc độc ong. Vì vậy, các xystein trong vùng đầu tận cùng carboxy là cần thiết đối với hoạt tính trung hoà. Một vùng rất hẹp có chiều dài khoảng 10 axit amin trước vị trí phân cắt GPI tại N 483 vì vậy xác định được vùng có hoạt tính tối thiểu.

Ví dụ 5

Tác dụng của việc cải biến peptit tín hiệu đối với hoạt tính tiết sHASEGP

sHASEGP của người có một peptit dẫn đầu nguyên thể được dự đoán dài bất thường. Ngoài ra, sự tồn tại của hai gốc xystein liên kế này có thể dẫn đến sự kết tụ các polypeptit multime trong thể lưới nội chất trong khi biểu hiện ở mức độ cao và vì vậy, ngăn ngừa được sự biểu hiện ở mức độ cao của sHASEGP. Vì vậy, một loạt peptit dẫn đầu tiết hữu hiệu hơn được thử nghiệm để kiểm tra khả năng của chúng trong việc tăng cường gắn đích sHASEGP cho sự tiết.

a. Phương pháp

Peptit dẫn đầu kapa được tạo cấu trúc bằng cách che phủ đoạn môi, ủ, và kéo dài bằng phương pháp PCR với các đoạn môi tương ứng với các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 37, 38, 39 và 40. Trình tự kapa được khuếch đại bằng phương pháp PCR thu được được khuếch đại bằng đoạn môi kèm theo chứa vị trí NheI ở đầu 5' (như được mô tả trong SEQ ID NO: 41) và vị trí EcoRI ở đầu 3' (như được mô tả trong SEQ ID NO: 42). Điều này cho phép tách dòng được peptit dẫn đầu kapa (trình tự polypeptit này là như được mô tả trong SEQ ID NO: 43) trong vector Litmus 39 (NEB) giữa các vị trí NheI và EcoRI. sHASEGP có vị trí EcoRI ở bên trong; vì vậy cấu trúc kapa giữa vị trí NheI và EcoRI được khuếch đại tiếp bằng đoạn môi SpeI ở đầu 5' (như được mô tả trong SEQ ID NO: 44) và đoạn môi MluI ở đầu 3' (như được mô tả

trong SEQ ID NO: 45). sHASEGP không được móc bám vào GPI kết thúc ở P 478 được cắt ra từ pIresPuro2 với NheI và BamHI và được tách dòng trong vector Litmus 39(NEB) trong vị trí NheI và BamHI của vector Litmus39. Vector Litmus chứa sHASEGP thu được được phân cắt bằng enzym giới hạn SpeI và MluI và cấu trúc dẫn kapa được khuếch đại bằng SpeI và MluI và được tách dòng trong nó. Việc gây đột biến định hướng vị trí được tiến hành trên vector Litmus 39 chứa cả hai trình tự kapa và sHASEGP để tạo ra sự dung hợp trong vùng khung của trình tự dẫn kapa với polypeptit trưởng thành của sHASEGP. Các cặp đoạn nối tương ứng với SEQ ID No.34 và 35 được sử dụng để tạo thành trình tự dẫn kapa với Asp nguyên thể làm axit amin ở đầu tận cùng được dung hợp với F 38 của sHASEGP (cho đến P 478) (như được mô tả trong SEQ ID No.46 đối với trình tự polypeptit của protein dung hợp). Tổ hợp của các cặp đoạn nối khác như được biểu hiện bởi SEQ ID No.33 và SEQ ID No.35 được sử dụng để tạo ra đoạn dẫn Kapa kết thúc tại Asp (D) ở đầu tận cùng được dung hợp với L 36 của sHASEGP, SEQ ID No.33 và SEQ ID No.36 được sử dụng để tạo thành đoạn dẫn Kapa kết thúc tại Gly (G) (trước Asp (D) ở đầu tận cùng) được dung hợp với L 36 của sHASEGP, và SEQ ID No.34 và SEQ ID No.36 được sử dụng để tạo thành Kapa kết thúc tại Gly (G) (trước Asp (D) ở đầu tận cùng) được dung hợp với F 38 của sHASEGP. Thể dung hợp Kapa-sHASEGP thu được bằng cách gây đột biến định hướng vị trí được tinh chế gel, được phân cắt bằng enzym DpnI để phân cắt ADN gốc mang bất kỳ, và sau đó được phân cắt bằng NheI và BamHI và được tách dòng trong khung HisIresPuro2 được phân cắt bằng NheI/BamHI có nhãn đánh dấu his (sáu histidin được tiếp theo sau sáu đoạn đệm axit amin) được tách dòng trong các vị trí giữa bamHI và Not1 trong vector HisIresPuro2. Vì vậy, sau khi gắn, các tác giả thu được một cấu trúc là NheI-kapa-sHASEGP-BamHI-His trong HisIresPuro2. Bốn bộ cấu trúc này thu được phù hợp với các tổ hợp của G hoặc D tại đầu cuối dẫn Kappa và L 36 hoặc F 38 ở đầu của sHASEGP trưởng thành. Một số dòng vô tính độc lập từ mỗi loại cấu trúc được chuyển nhiễm vào các tế bào CHO trong môi trường CD-CHO (Invitrogen, CA) để thử nghiệm về việc sự có mặt của đoạn dẫn tiết kapa có kích thích được protein tiết ra ở mức gia tăng hay không khi so với đoạn dẫn tiết ra nguyên thể. ADN Miniprep được tạo ra từ việc nuôi cấy qua đêm được chuyển nhiễm bằng chất phản ứng chuyển nhiễm Genejuice (Novagen, CA) theo phương pháp được chỉ ra của nhà sản xuất và mẫu này được sử dụng để thử nghiệm bằng thử nghiệm vi chuẩn độ

với các thời điểm được chỉ định. Hoạt tính hyaluronidaza được đánh giá bằng thử nghiệm vi chuẩn độ như được mô tả ở trên.

Các cấu trúc dung hợp của sHASEGP và peptit dẫn đầu của mạch kapa của IgG của chuột được thử nghiệm về hoạt tính sHASEGP có tác dụng trung hoà được tiết ra ở mức cao hơn.

b. Kết quả

Cấu trúc gen sHASEGP của người	U/ML/24giờ, độ pH = 7,4
AA 38-478 HIS6 của sHASEGP dẫn Kapa của IgG	3,0257
AA 1-478 HIS6 của sHASEGP dẫn nguyên thể	0,4857

Các kết quả thử nghiệm enzym này chỉ ra rằng đoạn dẫn kapa của IgG có khả năng tăng cường tiết sHASEGP cao hơn từ 7 đến 8 lần so với đoạn dẫn tiết nguyên thể khi được so với các dòng vô tính P 478, Y 482 hoặc N 483 bị thiếu đoạn dẫn này. Các cấu trúc dẫn kapa khác với các cải biến về vị trí dung hợp dẫn này từ Asp hoặc Gly của đoạn dẫn kapa tới L 36 hoặc F 38 của sHASEGP cũng thu được hoạt tính hyaluronidaza có tác dụng trung hoà được tiết ra ở mức gia tăng. Các ví dụ này nhằm mở rộng hơn là làm giới hạn phạm vi của sáng chế do các trình tự dẫn tiết hữu hiệu khác cũng có thể được sử dụng trong kỹ thuật tương tự này.

Ví dụ 6

Tạo ra vector biểu hiện của sHASEGP của người

sHASEGP không có đánh dấu epitop được tạo ra bằng cách tách dòng trong cát xét biểu hiện bixistronic, HZ24 (SEQ ID NO: 47). Vector plasmit HZ24 để biểu hiện sHASEGP bao gồm khung vector pCI (promega), trình tự ADN mã hoá axit amin từ 1 đến 482 của hyaluronidaza PH20 của người, vị trí tiếp nhận bên trong ribosom (internal ribosomal entry site-IRES) từ virus ECMV (Clontech) và một gen dihydrofolat reductaza (dihydrofolate reductase-DHFR) của chuột. Khung vector pCI cũng bao gồm ADN mã hoá gen kháng Beta-lactamaza (AmpR), và một vị trí khởi đầu

sao chép f1, một vùng trình tự khởi động/trình tự tăng cường xytomegalovirut trực tiếp sớm (CMV), một intron dạng khảm và một tín hiệu bổ sung chuỗi poly (A) muộn của SV40 (SV40). ADN mã hoá cấu trúc sHASEGP chứa trình tự liên ứng Kozak trong Methionin của trình tự dẫn tín hiệu nguyên thể và một codon kết thúc tại Tyrosin 482. Cấu trúc pCI-PH20-IRES-DHFR-SV40pa (HZ-24) thu được dẫn đến loại ARN thông tin đơn được điều khiển bằng trình tự khởi động CMV mã hoá axit amin từ 1 đến 482 của PH20 và các axit amin từ 1 đến 187 của dihydrofolat reductaza được tách ra bằng vị trí tiếp nhận bên trong ribosom.

Khung đọc mở của PH20 của người được khuếch đại từ dòng vô tính ORF Invitrogen (IOH10647, Invitrogen, Carlsbad CA) với đoạn môi ở đầu 5' đưa vào vị trí *NheI* và trình tự liên ứng Kozack trước methionin của PH20 và một đoạn môi ngược mà đưa codon kết thúc sau Tyrosin 482 và đưa vào vị trí giới hạn *BamHI*. Sản phẩm PCR thu được được gắn vào trong plasmit pIRESpuro2 (Clontech, palo Alto, CA) sau khi phân cắt đoạn PH20 PCR bằng *NheI* và *BamHI*.

Ví dụ 7

Tạo thành dòng tế bào biểu hiện sHASEGP

Các tế bào CHO DG44 không được chuyển nhiễm sinh trưởng trong môi trường CD-CHO được cải biến GIBCO đối với các tế bào DHFR(-), có bổ sung Glutamin 4mM và 18 ml Plurionic F68/L (Gibco), được nhân giống với mật độ tế bào là $0,5 \times 10^6$ tế bào/ml trong bình lắc chuẩn bị cho sự chuyển nhiễm. Các tế bào được sinh trưởng ở nhiệt độ 37°C trong thiết bị ủ được làm ẩm bằng 5% CO₂ có lắc ở tốc độ 120 vòng/phút. Các tế bào CHO DG44 không được chuyển nhiễm sinh trưởng theo hàm số mũ được thử nghiệm về khả năng sống sót trước khi chuyển nhiễm.

60000000 tế bào sống sót được khi nuôi cấy tế bào CHO DG44 không được chuyển nhiễm được tạo viên và được tái huyền phù tới mật độ 20000000 tế bào trong 0,7 mL dung dịch đệm 2 lần chuyển nhiễm (2X HeBS=40mM Hepes, pH=7,0, 274 mM NaCl, 10mM KCl, 1,4mM Na₂HPO₄, 12mM dextroza). Đối với mỗi phần phân ước của các tế bào được tái huyền phù, 0,09 mL plasmit HZ24 tuyến tính (250ug) được bổ sung, và các dung dịch tế bào/ADN này được chuyển nhiễm trong các cuvet để tiến hành gây xung điện BTX có kích thước lỗ là 0,4cm (Gentronics) ở nhiệt độ phòng. Tiến hành gây xung điện đối chứng âm bằng các tế bào được trộn với ADN

không phải plasmit. Các hỗn hợp tế bào/plasmit được gây xung điện bằng điện dung phóng ra là 330V và 960uf hoặc 350V và 960uF.

Các tế bào được loại bỏ từ các cuvet sau khi gây xung điện và được chuyển nhiễm vào trong 5mL môi trường CD-CHO được cải biến GIBCO đối với các tế bào DHFR(-), có bổ sung Glutamin 4mM và 18 ml Plurionic F68/L (Gibco), và để các tế bào này sinh trưởng trong một đĩa nuôi cấy mô có 6 giếng mà không cần chọn lọc trong 2 ngày ở nhiệt độ 37°C trong thiết bị ủ được làm ẩm bằng 5% CO₂.

Hai ngày sau khi gây xung điện, 0,5 mL môi trường nuôi cấy mô được loại bỏ từ mỗi giếng và được thử nghiệm về sự có mặt của hoạt tính hyaluronidaza.

Hoạt tính hyaluronidaza ban đầu của các tế bào CHO được chuyển nhiễm HZ24 tại 40 giờ sau khi chuyển nhiễm:

	Pha loãng	Hoạt tính Đơn vị/mL
Chuyển nhiễm lần 1: 330V	1 đến 10	0,25
Chuyển nhiễm lần 2: 350V	1 đến 10	0,52
Đối chứng âm	1 đến 10	0,015

Các tế bào từ lần chuyển nhiễm hai (350V), được thu gom từ giếng nuôi cấy mô được đếm và pha loãng tới từ 10000 đến 20000 tế bào sống sót/mL. Phần phân ước gồm 0,1mL huyền phù tế bào được chuyển nhiễm vào trong mỗi giếng của năm đĩa nuôi cấy mô đáy tròn có 96 giếng. 0,1mL môi trường CD-CHO (GIBCO) chứa 4mM Glutamax-1 và không bổ sung hypoxanthin và thymidin, được bổ sung vào các giếng chứa các tế bào (thể tích cuối là 0,2mL).

Mười dòng vô tính được xác định từ 5 đĩa sinh trưởng không có metotrexat.

Ký hiệu đĩa/giếng	Hoạt tính hyaluronidaza tương đối
1C3	261
2C2	261
3D3	261
3E5	243
3C6	174
2G8	103

1B9	304
2D9	273
4D10	302
1E11	242
Đối chứng A1 (+)	333
Đối chứng H12(-)	0

Sáu dòng vô tính HZ24 được sinh trưởng khi nuôi cấy và được chuyển vào trong các bình lắc ở dạng huyền phù tế bào đơn. Các dòng vô tính 3D3, 3E5, 2G8, 2D9, 1E11, và 4D10 được cho vào các đĩa nuôi cấy mô đáy tròn có 96 giếng bằng cách sử dụng phương pháp pha loãng hai chiều không xác định. Các dòng vô tính đã pha loãng được sinh trưởng trong một nền cơ bản gồm 500 tế bào CHO DG44 không được chuyển nhiễm/mỗi giếng để cung cấp các nhân tố sinh trưởng cần thiết cho những ngày đầu khi nuôi cấy. Mười đĩa được tiến hành cho mỗi dòng vô tính phụ.

Dòng vô tính 3D3 tạo ra được 24 dòng vô tính phụ nhìn thấy được. Hoạt tính hyaluronidaza đáng kể được đánh giá trong các phân dịch nổi từ 8 trong số 24 dòng vô tính phụ (>50 đơn vị/mL), và 8 dòng vô tính phụ này được sinh trưởng trong các đĩa nuôi cấy mô T-25 với sự có mặt của 50nM metotrexat. 50nM dòng vô tính 3D3 được sinh trưởng tiếp trong 500nM metotrexat để tách dòng để tạo ra một lượng dư 1000 đơn vị/ml trong các bình lắc (dòng vô tính 3D3 5M).

Ví dụ 8

Sản xuất sHASEGP

Lọ nhỏ chứa 3D3 5M được làm tan băng và được nhân giống từ các bình T sang bình xoay tròn trong CHO CDM (Invitrogen, Carlsbad CA) có bổ sung 100nM metotrexat và glutamax (Invitrogen). Các tế bào được chuyển từ các bình xoay tròn sang bình phản ứng sinh học có dung tích 5L (Braun) ở mật độ cấy là $4,0 \times 10^5$ tế bào sống/ml. Các thông số là điểm đóng rắn theo nhiệt độ 37°C , độ pH = 7,2 (bắt đầu điểm đóng rắn), với điểm đóng rắn có oxy hoà tan là 25% và lượng không khí bao phủ là nằm trong khoảng từ 0 đến 100cc/phút. Vào thời điểm 168 giờ, 250ml môi trường Feed#1 (CD CHO + 50g/L Glucoza) được thêm vào. Vào thời điểm 216 giờ, 250ml môi trường Feed#2 (CD CHO + 50g/L Glucoza + 10mM Natri Butyrat) được thêm vào, và vào thời điểm 264 giờ, 250ml môi trường Feed#2 được thêm vào. Quy trình này dẫn đến hiệu suất cuối cùng là 1600 đơn vị/ml với mật độ tế bào tối đa là 6 triệu tế

bào/ml. Việc bổ sung natri butyrat được phát hiện là để làm tăng cường mạnh mẽ việc tạo ra sHASEGP trong giai đoạn cuối cùng của quy trình này.

Sự sinh trưởng dòng 3D3-5M và sản xuất sHASEGP, bình phản ứng 5L

Thời gian chạy	Số tế bào sống x 10E5	% sống	Đơn vị/ml	Thể tích (mL)	[Glucose]	Môi trường Feed
0	4,4	100	0	4500	547	
24	5,7	100	0	4500	536	
48	10,1	100	37	4500	501	
72	17,1	99	62	4500	421	
96	28,6	99	118	4500	325	
120	28,8	99	240	4500	274	
144	60,2	100	423	4500	161	
168	55	100	478	4500	92	250ml môi trường Feed #1
192	66,6	98	512	4750	370	
216	55,2	92	610	4750	573	250ml môi trường Feed #2
240	53	88	710	5000	573	
264	49,8	84	852	5000	474	250ml môi trường Feed #2
288	40	70	985	5250	770	
312	31	61	1467	5250	773	
336	25,4	52	1676	5250	690	

Ví dụ 9

Tinh chế sHASEGP

Môi trường có điều kiện từ dòng vô tính 3D3 được lọc gạn bằng cách lọc kỹ và thẩm tích chảy tiếp tuyến trong 10mM Hepes, độ pH = 7,0. HASEGP hoà tan sau đó được tinh chế bằng sắc ký trao đổi ion liên tục trên Q Sepharosa (Pharmacia), sắc ký cột tương tác kỵ nước Phenyl Sepharosa (Pharmacia), sắc ký phenyl boronat (Prometic) và sắc ký Hydroxapatit (Biorat, Richmond, CA).

sHASEGP được liên kết với Q Sepharosa và rửa giải ở 400mM NaCl trong dung dịch đệm tương tự. Nước giải hấp được pha loãng bằng 2M amoni sulphat tới nồng độ cuối là 500mM ASO₄ và cho đi qua cột Phenyl Sepharosa (cận thấp-low sub), tiếp theo là liên kết với nhựa Phenyl Boronat trong các điều kiện tương tự. sHASEGP

được rửa giải từ nhựa Phenyl Boronat trong Hepes, độ pH = 6,9 sau khi rửa ở độ pH=9,0 trong 50mM bixin không có ASO₄. Nước giải hấp được đổ lên nhựa xeramic hydroxyapatit ở độ pH=6,9 trong 5mM PO₄, 1mM CaCl₂ và được rửa giải bằng 80mM PO₄ ở độ pH=7,4 với 0,1mM CaCl₂.

sHASEGP được tinh chế thu được có hoạt tính đặc hiệu với lượng dư là 65000 đơn vị USP/mg protein theo thử nghiệm độ đục tế vi sử dụng tiêu chuẩn USP tham khảo. sHASEGP đã tinh chế được rửa giải ở dạng đỉnh duy nhất từ 24 đến 26 phút từ cột Pharmacia 5RPC styren divinylbenzen với gradien nằm giữa 0,1% TFA/H₂O và 0,1% TFA/90% axetonitril/10%H₂O và được phân giải ở dạng dải đơn rộng 61KDa bằng cách điện di SDS để làm giảm tới dải 51kDa rõ rệt sau khi xử lý bằng PNGaza-F. Việc xác định trình tự axit amin ở đầu tận cùng N bộc lộ rằng peptit dẫn đầu này đã được loại bỏ một cách hữu hiệu.

sHASEGP được tinh chế hoá sinh có trình tự axit amin ở đầu tận cùng N.

Vị trí	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Theo lý thuyết	Leu	Asn	Phe	Arg	Ala	Pro	Pro	Val	Ile	Pro	Asn
Theo thực nghiệm	-	Asn	Phe	Arg	Ala	Pro	Pro	Val	Ile	Pro	Asn

Ví dụ 10

Phân tích quá trình glycosyl hoá sHASEGP dẫn xuất từ DG4 CHO

Dữ liệu đối lập tồn tại để xem xét sHASEGP từ các loài khác nhau có cần đến quá trình glycosyl hoá cho hoạt tính xúc tác của chúng hay không. Ví dụ được thông báo là hyaluronidaza của nọc độc ong có hoạt tính enzym có thể được tổng hợp trong các tế bào không có bộ máy glycosyl hoá, tức là như E. coli. Hơn nữa, việc xử lý hyaluronidaza của tinh hoàn bò đã tinh chế với PNGaza không làm bất hoạt hoạt tính enzym (Yamagata et al., 1997). Các nghiên cứu khác thông báo việc mất hoạt tính sau khi deglycosyl và các liên kết disulfua cần được thêm vào.

Tất cả các thử nghiệm trước được tiến hành bằng cách sử dụng các chế phẩm thô hoặc đã tinh chế một phần, tuy nhiên, không rõ ràng là việc mất hoạt tính này là do enzym được loại nhóm glycosyl tiếp xúc với các proteaza tạp nhiễm trong các chế

phẩm thô này hay do mối liên quan trực tiếp về mặt chức năng giữa quá trình glycosyl hoá và hoạt tính xúc tác.

a. Phương pháp

Để xác định liệu quá trình glycosyl hoá chức năng được liên kết ở vị trí N có thể được đưa vào trong sHASEGP của người bằng cách sử dụng hệ biểu hiện dựa trên CHO trong các điều kiện không có protein hay không, cADN mã hoá sHASEGP-HIS6 của người được biểu hiện trong các tế bào CHO sử dụng cat xét bixistronic IRESpuro trong môi trường được xác định về mặt hoá học. Các tế bào được sinh trưởng trong 72 giờ trong CHO CDM (Invitrogen/Gibco), tiếp theo là cô đặc và lọc thẩm tích chảy tiếp tuyến trên một đơn vị Pellicon TFF (Millipore) với màng có kích thước 30kDa. Sản phẩm cô đặc được trao đổi bằng 10mM Hepes có độ pH = 7,4, 50mM NaCl. Phần lọc thẩm tích sau đó được đổ lên nhựa sepharosa có dòng DEAE và được rửa giải bằng gradien NaCl từ 0 đến 1M NaCl trên nhựa Pharmacia FPLC. sHASEGP của người được rửa giải bằng NaCl nằm trong khoảng từ 10 đến 30%. Mức sHASEGP trong các phân đoạn cột xác định được rằng phần lớn enzym được thu hồi trong gradien NaCl nằm trong khoảng từ 10 đến 30%. Các enzym từ gradien NaCl nằm trong khoảng từ 10 đến 30% sau đó được tinh chế tiếp bằng sắc ký ái lực trên nhựa IMAC nạp Niken. sHASEGP của người được rửa giải từ nhựa IMAC sau khi rửa bằng 10mM Imidizol và 50mM axetat, độ pH = 5,0. Protein này được cô và thẩm tích bằng 10mM Hepes độ pH = 7,4. Enzym đã tinh chế ở mức độ cao được xác định có hoạt tính đặc hiệu là 97.000 đơn vị/mg protein với sự có mặt của 1mM canxi và 1mg/ml HAS trong thử nghiệm vi chuẩn độ cơ chất được biotin hoá trên cơ sở phương pháp ELISA.

Để phát hiện sự thay đổi về khối lượng phân tử tương đối của protein, sHASEGP của người đã tinh chế được xử lý bằng PNGaza hoặc Neuraminidaza qua đêm, tiếp theo là điện di trên gel, truyền điện và phân tích thẩm tách tây với kháng thể đơn dòng kháng HIS6 liên kết với HRP (Qiagen).

b. Kết quả

Phân tích thẩm tách tây xác định được rằng sHASEGP của người được tạo ra trong các tế bào CHO miễn cảm với việc xử lý bằng PNGaza. Khối lượng phân tử tương đối của sHASEGP của người bộc lộ rằng protein này được glycosyl hoá ở mức độ cao. Sau khi hoàn thành việc phân cắt qua đêm bằng PNGaza, sHASEGP của người

được giảm tới các loại đơn kháng định rằng tính không đồng nhất kiểu đại của dải không được phân cắt có thể được quy cho là các gốc đường được liên kết ở vị trí N. Việc phân cắt một phần bằng PNGaza cho thấy một loạt các hợp chất trung gian được chuyển dời từ việc chuyển dời lũy tiến và không được xử lý khi xử lý lâu dài. Mặc dù các dải phân tán một chút trên gel 7%, ít nhất có thể nhìn thấy 6 đồng dạng trực tiếp khác nhau.

Việc xử lý sHASEGP bằng Neuraminidaza bộc lộ rằng các tế bào CHO trong thực tế có khả năng tổng hợp sHASEGP của người được sialat hoá. Sau khi xử lý bằng Neuraminidaza và phân tích bằng thẩm tách tây sHASEGP trên Gel 7%, sHASEGP tái tổ hợp của người thu được từ CHO bộc lộ một sự chuyển dời linh động nằm trong khoảng từ 1 đến 3 kDa so với sHASEGP không được xử lý. Vì vậy, đây là thông báo đầu tiên về việc tạo thành sHASEGP của người hầu như được sialat hoá. Điều này là rất có giá trị để ổn định và tăng cường thời gian bán thải trong huyết thanh của sHASEGP của người khi sHASEGP tinh dịch nguyên thể từ nhiều loài không có quá trình sialat và không phản ứng với lectin đặc hiệu axit sialic.

Phân tích FACE đối với sHASEGP

Phân tích oligosacarit của sHASEGP có hoạt tính bằng phân tích FACE cho phép xác định nhanh profin của sHASEGP có hoạt tính xúc tác.

Phương pháp

Hyaluronidaza đã tinh chế từ dòng 3D3 5M được đánh giá bằng cách sử dụng profin oligosacarit được liên kết ở vị trí N FACE® (Prozyme). Các oligosacarit được phân cắt từ 128,7µg glycoprotein bằng cách phân cắt bằng enzym N-Glycanaza (a.k.a PNGaza), được đánh dấu bằng floropho ANTS, và được tách riêng bằng cách điện di. Các vị trí tương đối của dải oligosacarit được xác định bằng cách chạy các mẫu này và pha loãng các mẫu dọc theo thang chuẩn oligosacarit để thiết kế khoảng cách di gen trong mức đơn vị polyme hoá (Degree of Polymerization-DP).

Kết quả

Profin ở vị trí N đối với mẫu hyaluronidaza bao gồm 10 dải trong đó 6 dải có cường độ lớn hơn 9% (chạy kèm theo với các dải chuẩn oligosacarit G5-G12). Hơn

nữa, dải này chạy dọc theo dải chuẩn G9 có cường độ mạnh nhất là nằm trong khoảng từ 35 đến 46%.

Phân tích oligosacarit EGP

Oligosacarit của sHASEGP	Mức polyme hóa	% tổng số
1	15,64	1,2
2	13,68	3,4
3	11,61	10,0
4	10,04	10,4
5	8,37	35,4
6	7,32	9,7
7	6,14	9,0
8	5,57	12,4
9	3,84	2,3
10	3,26	0,5

Ví dụ 11

Sự phụ thuộc của quá trình glycosyl hoá được liên kết ở vị trí N của sHASEGP đối với hoạt tính enzym

a. Phương pháp

Các mẫu sHASEGP HIS6 đã tinh chế được trộn với dung dịch đệm chứa Neuraminidaza và PNGaza có hoặc không có 50mM Octylglucosid qua đêm ở nhiệt độ 37°C. Các oligosacarit được kiểm tra về việc được loại bỏ bằng cách chuyển dời trên gel từ phân tích thẩm tách tây.

b. Kết quả

Mẫu	U/ml
Không Rx	22,01
Neuraminidaza O/N 50mM OG	23,57
PNGazaF có 50mM OG	0,0
PNGazaF không có 50mM OG o/n	10,74

Ví dụ 12

Hoạt tính của sHASEGP đối với glycosaminoglycan được sulfat hoá và không được sulfat hoá

Ngoài thử nghiệm dựa trên vi chuẩn độ bằng cách sử dụng HA, tính đặc hiệu cơ chất của sHASEGP đối với các glycosaminoglycan hoặc các proteoglycan khác có thể được thử nghiệm bằng cách sử dụng thử nghiệm chuyển dời gel với các cơ chất đã tinh chế để xác định hoạt tính của sHASEGP đối với các glycosaminoglycan. Nhiều thử nghiệm hyaluronidaza được dựa trên việc đánh giá sự tạo thành của các nhóm N-axetylamino khử mới (Bonner and Cantey, Clin. Chim. Acta 13: 746-752, 1966), hoặc bị mất độ nhớt (De Salegui et al., Arch. Biochem. Biophys. 121: 548-554, 1967) hoặc mất độ đục (Dorfman and Ott, J. Biol. Chem. 172:367, 1948). Với các cơ chất đã tinh chế, tất cả các phương pháp này là đủ để xác định sự có mặt hoặc không có mặt của hoạt tính endoglucosamidic.

a. Phương pháp

Thử nghiệm chuyển dời gel - Các cơ chất đã tinh chế được trộn với sHASEGP tái tổ hợp để thử nghiệm về hoạt tính endoglycosidaza gây ra độ linh động gia tăng của cơ chất trong gel này. Chondroitin Sulfat A, Aggrecan và D do Calbiochem cung cấp. Hyaluronan (dây rốn người) Chondroitin Sulfat C, Dermatan Sulfat và Heparan Sulfat do Calbiochem cung cấp. Hyaluronan của dây rốn người thu do ICN cung cấp. Mỗi cơ chất thử nghiệm được pha loãng tới 0,1mg/ml. 10u/l mẫu sHASEGP đã tinh chế hoặc môi trường có điều kiện từ các tế bào biểu hiện sHASEGP đều được trộn với 90ul cơ chất thử nghiệm trong dung dịch đệm mong muốn và ủ trong 3 giờ ở nhiệt độ 37°C. Các mẫu ủ sau đó được trung hoà bằng dung dịch đệm mẫu (Tris EDTA, độ pH = 8,0, xanh Bromophenol và Glyxerol), sau đó là điện di trên gel 15% polyacrylamit. Các Glycosaminoglycan được phát hiện bằng thử nghiệm bằng cách nhuộm các gel này trong 0,5% xanh Alcian trong 3% axit axetic băng qua đêm, tiếp theo là làm mất màu nhuộm trong 7% axit axetic băng. Quá trình thoái biến được xác định bằng cách so sánh độ linh động của cơ chất với sự có mặt và không có mặt của enzym.

b. Kết quả

100 đơn vị sHASEGP_{HIS6} trong 10ul được ủ với 90ul 10mM dung dịch đệm Hepes, với 50ug/ml albumin huyết thanh người trong 2giờ ở nhiệt độ 37°C chứa 10ug của các glycosaminoglycan và proteoglycan khác nhau. Phân tích bằng điện di sau khi nhuộm xanh Alcian bộc lộ tốc độ chuyển dời linh động gia tăng với một loại trong Chondroitin Sulfat A, C và D, Aggrecan và Hyaluronan nhưng không phải là Heparan

Sulfat hoặc Chondroitin Sulfat B. Trong khi các glycosaminoglycan không được phân cắt chạy như một vết bơi ở giữa của gel này, các sản phẩm được phân cắt thể hiện chủ yếu tiêu bản nhuộm xanh alcian khi chạy thuốc nhuộm với một lượng nhỏ hợp chất chạy ở dạng một thanh tăng dần.

Ví dụ 13

Tác dụng của ion kim loại lên sự hoạt hoá sHASEGP

Ngoài yêu cầu về quá trình glycosyl hoá để có hoạt tính enzym, sHASEGP của người được phát hiện là bị bất hoạt bằng các cation để có hoạt tính enzym tối ưu. Trong quá trình tinh chế, sHASEGP được phát hiện có hoạt tính đặc hiệu thấp sau các bước sắc ký liên tục. sHASEGP được đánh dấu HIS6 được phát hiện có hoạt tính đặc hiệu rất thấp khi được tinh chế đến độ đồng nhất từ DEAE, tiếp theo là tinh chế liên tục trên Ni-IMAC. Vì nhựa IMAC có thể tạo chelat các ion kim loại, các kim loại khác nhau có thể được bổ sung ngược trở lại với sHASEGP để xác định hoạt tính enzym tương đối này.

a. Phương pháp

sHASEGP đã tinh chế được thử nghiệm sau khi ủ bằng 0,1mM Niken (Ni), Coban (Co), Kẽm (Zn), Canxi (Ca) và Magie (Mg) trong 2 giờ ở nhiệt độ phòng, tiếp theo là xác định hoạt tính hyaluronidaza trong thử nghiệm vi chuẩn độ.

b. Kết quả

Chất phụ gia muối kim loại	Hoạt tính thần kinh U/l
Không có chất phụ gia	11,909
100uM Ni	6,0306
100uM Co	8,972
100uM Zn	3,7476
100uM Ca	101,9892

Việc gia tăng đáng kể trong hoạt tính hyaluronidaza được phát hiện sau khi ủ sHASEGP với 0,1mM canxi hoặc 0,1mM magie. Không có quá trình hoạt hoá nào được phát hiện sau khi ủ với các kim loại khác. Việc bổ sung canxi với sHASEGP làm gia tăng hoạt tính đặc hiệu của enzym này với khoảng 97.000 đơn vị/mg protein dựa trên phương pháp đánh giá A280. Đường cong đáp ứng liều của kim loại canxi và magie sau đó được thử nghiệm để xác định nồng độ tối ưu của ion kim loại với enzym.

mM	Kim loại hoá trị 2	[Ca ⁺⁺]	[Mg ⁺⁺]
----	--------------------	---------------------	---------------------

100	1	1,3
10	108	104
1	169	164
0,1	123	78
0,01	59	18
0,001	47	13
0,0001	39	13
0,00001	55	15

Sự hoạt hoá sHASEGP được phát hiện xảy ra trong phạm vi micromol. Các nồng độ trên 10mM ức chế được cả canxi và magie. Để loại bỏ khả năng hoạt hoá không đặc hiệu của cơ chất ngoài enzym, canxi clorua trong 10mM dung dịch đệm Hepes được ủ với cơ chất được biotin hoá được giữ cố định trên đĩa vi chuẩn độ sau khi rửa. Không có sự hoạt hoá được phát hiện khi enzym này được bổ sung vào đĩa được ủ trước với canxi đã được rửa. Sự hoạt hoá này cũng được thử nghiệm trên sHASEGP nguyên thể do phospholipaza C giải phóng đã bộc lộ sự hoạt hoá tương tự với canxi loại bỏ được sự hiện tượng giả của nhãn đánh dấu epitop HIS6 ở đầu tận cùng carboxy.

Ví dụ 14

Tác dụng của albumin lên hoạt tính của sHASEGP

Đã phát hiện ra rằng việc pha loãng rHUPH20 tái tổ hợp và các chế phẩm chứa hyaluronidaza thu được từ tinh hoàn của gia súc lò mổ cần đến albumin ngoài canxi để có hoạt tính tối ưu.

a. Phương pháp

Albumin huyết thanh người (ICN) được pha loãng trong 10mM dung dịch đệm Hepes với canxi để xác định tác dụng của protein albumin lên hoạt tính enzym. Các thử nghiệm enzym với sHASEGP và các chế phẩm thương mại được kiểm tra bằng cách sử dụng cả 1mM CaCl_2 và 1mg/ml albumin huyết thanh người.

b. Kết quả

Sự hoạt hoá hoạt tính hyaluronidaza được phát hiện ở mức pha loãng cao với sự có mặt của albumin. Không rõ ràng, sự hoạt hoá này là do việc ngăn ngừa biến tính hay do albumin ảnh hưởng đến khả năng của cơ chất này. Chế phẩm được ưu tiên chứa sHASEGP của người vì vậy có thể bao gồm albumin và một muối kim loại bao gồm canxi hoặc magie.

Ví dụ 15

Hoạt tính lan truyền của sHASEGP đã tinh chế *in vivo*

a. Phương pháp

sHASEGP đã tinh chế trong 10mM Hepes, độ pH = 7,4, 150mM NaCl, 0,1% Pluronic được pha loãng tới 0,5U/ul trong nước không chứa pyrogen với 0,15M NaCl. Pha loãng nhiều bậc với nồng độ cuối của nước muối là 20ul được tiến hành để thu được tổng số là 0,01, 0,05, 0,1 đơn vị cho mỗi lần tiêm. 20ul dung dịch xanh Trypan được bổ sung vào thể tích cuối 40ml và tiêm qua đường dưới da vào trong da mỗi bên của chuột balb^{Nu/Nu} đã được gây tê trước vào trong màng bụng (intraperitoneal-i.p.) bằng cách sử dụng ketamin/xylazin. Các vùng nhuộm được xác định hai chiều bằng một thước kẹp tế vi với thời gian từ t=0 đến t=45 phút. Vùng này được thể hiện ở dạng mm². Cũng bao gồm cả HYAL1 của người tái tổ hợp để làm đối chứng bị thiếu hoạt tính trung hoà nhưng được tiết ra.

b. Kết quả

Thành phần thử nghiệm	Vùng nhuộm @ 45 phút
A. Nước muối làm đối chứng	51,5 mm ²
B. sHASEGP 0,01U	76,8 mm ²
C. sHASEGP 0,05U	98,22 mm ²
D. sHASEGP 0,10U	180,4 mm ²
E. HYAL1 100U	67,48 mm ²

Ví dụ 16

Động học của hoạt tính phân tán sHASEGP

a. Phương pháp

sHASEGP_{HIS6} được tinh chế tái tổ hợp được tách riêng thành hai phần phân ước. Một phần được gia nhiệt đến 95°C trong 15 phút trong thiết bị chu kỳ nhiệt có nắp gia nhiệt. Phần khác được duy trì ở nhiệt độ phòng. Sự bất hoạt hoạt tính enzym do nhiệt được kiểm tra trong thử nghiệm enzym dựa trên vi chuẩn độ. Để phân tích động học, vật liệu ban đầu không bị bất hoạt do nhiệt được thử nghiệm. 4 đơn vị của sHASEGP

được tinh chế hoặc vật liệu bị bất hoạt do nhiệt tương đương được tiêm qua đường dưới da với thuốc nhuộm xanh trypan. Các vùng được thử nghiệm tại các thời điểm khác nhau tới 15 phút.

b. Kết quả.

4 đơn vị $t_{\text{phút}}$ sau khi tiêm	4 đơn vị bị bất hoạt do nhiệt $t_{\text{phút}}$ sau khi tiêm
$T_0 = 52,38$	$T_0 = 50,58$
$T_3 = 116,51$	$T_3 = 65,48$
$T_{6,5} = 181,93$	$T_{6,5} = 63,87$
$T_{10} = 216,96$	$T_{10} = 65,80$
$T_{16} = 279,99$	$T_{16} = 74,3$

Ví dụ 17

Khôi phục hàng rào ngăn cản của da bị phá vỡ do sHASEGP

a. Phương pháp

Để thiết lập thời gian tái tạo của các lỗ được mở bằng sHASEGP sau khi tiêm qua đường dưới da, 2 đơn vị sHASEGP đã tinh chế hoặc đối chứng là nước muối được tiêm qua đường dưới da vào hai vị trí bên đối diện nhau ở các động vật vào thời điểm $t=0$, sau đó tiêm bằng xanh trypan vào các vị trí tương tự tại các thời điểm 30 phút, 60 phút và 24 giờ. Vùng có phân tán thuốc nhuộm tại thời điểm $t=15$ phút sau khi tiêm được ghi lại đối với mỗi thời điểm so với mẫu đối chứng.

b. Kết quả

2 đơn vị $T_{\text{giờ}}$ sau khi tiêm sHASEGP	Đối chứng nước muối $t_{\text{giờ}}$ sau khi tiêm sHASEGP
$t_{0,5 \text{ giờ}} = 183$	$t_{0,5 \text{ giờ}} = 54$
$t_1 \text{ giờ} = 167$	$t_1 \text{ giờ} = 50$
$t_{22 \text{ giờ}} = 61$	$t_{22 \text{ giờ}} = 48$

Kết quả chứng tỏ rằng lớp hàng rào bảo vệ da sẽ tái tạo trong vòng 24 giờ sau khi sử dụng 2 đơn vị enzym.

Ví dụ 18

Xác định kích thước của các kênh được mở bởi sHASEGP

Được thể hiện rằng các kênh được mở bởi sHASEGP của người trong khoang kẽ đủ để cho phép khuếch tán một phân tử nhỏ, tức là thuốc nhuộm xanh trypan. Tuy nhiên, không biết được giới hạn trên cho kích thước của các hạt có thể khuếch tán được khi có mặt sHASEGP.

a. Phương pháp

Các phân tử huỳnh quang có các kích thước khác nhau được sử dụng để xác định kích thước của các kênh được mở bởi sHASEGP của người, Dextran phát huỳnh quang có khối lượng phân tử trung bình là 4.400 và 2 triệu Da (Sigma) cũng như các hạt được đánh dấu huỳnh quang có đường kính xác định từ 20 nanomet đến 500 nanomet (Đoạn dò phân tử-Molecular Probes), được sử dụng dưới da với thể tích 40uL sau khi tiêm sHASEGP hoặc nước muối làm đối chứng tại các vị trí tương tự. Diện tích của vùng nhuộm sau đó được đo về hai đường kính tại 15 phút sau khi tiêm.

b. Kết quả

Chất khuếch tán	Kích thước hạt thử nghiệm khuếch tán	Diện tích đo ở thời điểm 15 phút	Độ lệch chuẩn (SD)
sHASEGP	4400Da	84,2	25,7
Đối chứng	4400Da	38,0	5,8
sHASEGP	2x10E6Da	141,2	4,5
Đối chứng	2x10E6Da	51,7	8,1
sHASEGP	Đường kính 20nm	92,3	20,6
Đối chứng	Đường kính 20nm	51,6	3,0
sHASEGP	Đường kính 100nm	61,0	5,7
Đối chứng	Đường kính 100nm	40,0	7,0
sHASEGP	Đường kính 200nm	35,5	1,6
Đối chứng	Đường kính 200nm	27,9	8,2
sHASEGP	Đường kính 500nm	44,8	13,6

Đối chứng	Đường kính 500nm	41,2	9,8
-----------	------------------	------	-----

Các kết quả chứng tỏ rằng các phân tử có đường kính khoảng từ 1kDa (Xanh Trypan) đến 50nm (các hạt latex) thể hiện khả năng khuếch đại được tăng cường sau khi sử dụng sHASEGP. Trong khi albumin huyết thanh bò (66kDa) thể hiện động học khuếch tán tương tự với xanh trypan, các hạt latex có đường kính 50nm cần nhiều thời gian hơn để khuếch tán. Các hạt có kích thước 500nm thể hiện không khuếch tán được sau 480 phút.

Ví dụ 19

Profin được động học trong huyết thanh của các kháng thể được biotin hoá sau khi cùng tiêm sHASEGP của người dưới da

a. Phương pháp

Chuột cái Balb/c được gây mê bằng hỗn hợp ketamin/xylazin. Sau đó con chuột này được tiêm dưới da bằng 20ul dung dịch chứa 0,5mg/ml IgG của chuột được biotin hoá được trộn với 20ul nước muối hoặc 20ul sHASEGP chứa 4 đơn vị hoạt tính.

b. Kết quả

Thời gian sau khi tiêm	Đối chứng	sHASEGP (4U)
IgG huyết thanh t=0 giờ	0ng/ml	0ng/ml
IgG huyết thanh t=2 giờ	0ng/ml	360ng/ml
IgG huyết thanh t=51 giờ	4152ng/ml	4176ng/ml

Các kết quả chứng tỏ rằng sHASEGP làm gia tăng động học phân bố của các phân tử lớn trong huyết thanh khi tuần hoàn. Trong khi không phát hiện được IgG được biotin hoá trong nhóm đối chứng vào thời gian hai giờ, thì lại phát hiện được rõ ràng 360ng/ml IgG được biotin hoá trong nhóm sHASEGP vào thời gian hai giờ.

Ví dụ 20

Hoạt tính phân tán của các phân tử được tiêm dưới da sau khi tiêm vào trong tĩnh mạch sHASEGP của người

a. Phương pháp

Bốn vị trí để tiêm thuốc nhuộm được sử dụng cho mỗi liều thử nghiệm (Test Article) và đối chứng chất mang. Tiêm thuốc nhuộm 45 phút sau khi tiêm vào trong tĩnh mạch (intravenous-i.v). Mỗi liều thử nghiệm hoặc đối chứng được tiêm vào trong tĩnh mạch của hai con chuột. Việc đo diện tích vùng nhuộm sau 45 phút khi sử dụng enzym được thực hiện vào thời điểm 2,5, 5, 10 và 15 phút đối với mỗi liều hoặc đối chứng chất mang.

b. kết quả

Các kết quả chứng tỏ rằng sHASEGP có độ tinh khiết cao có khả năng nội hấp tới các mô xa sau khi sử dụng qua đường tĩnh mạch. Hoạt tính phân tán của sHASEGP khi sử dụng nội hấp là theo kiểu phụ thuộc liều, với trường hợp khi tiêm 10 đơn vị thì không thể phân biệt được với đối chứng chất mang.

Loại	Liều IV	Thời gian phút	Diện tích trung bình (mm ²)	SD
PH20	1000	2,5	86,417	2,834193
PH20	1000	5	102,17	2,221146
PH20	1000	10	124,53	6,304944
PH20	1000	15	129,81	1,434319
PH20	300	2,5	59,137	7,218615
PH20	300	5	73,638	7,51197
PH20	300	10	87,092	8,686008
PH20	300	15	92,337	10,66466
PH20	100	2,5	56,308	7,741934
PH20	100	5	63,156	11,42052
PH20	100	10	76,519	16,18449
PH20	100	15	77,432	17,32264
PH20	30	2,5	50,534	10,64287
PH20	30	5	59,493	5,163971
PH20	30	10	68,102	11,00071
PH20	30	15	71,118	9,934212
PH20	10	2,5	36,4	3,807072
PH20	10	5	39,859	6,680932

PH20	10	10	45,649	4,44936
PH20	10	15	48,41	6,546835
Đối chứng	0	2,5	34,652	5,935037
Đối chứng	0	5	36,279	3,614544
Đối chứng	0	10	44,687	5,812216
Đối chứng	0	15	53,002	2,812439

Bản mô tả bao gồm các nội dung sau:

1. Glycoprotein gần như tinh khiết bao gồm polypeptit hyaluronidaza có hoạt tính trung hoà, hoà tan được và ít nhất một gốc đường được liên kết ở vị trí N, trong đó gốc đường được liên kết ở vị trí N này được liên kết cộng hoá trị với gốc asparagin của polypeptit này.

2. Polypeptit theo mục 1, trong đó polypeptit này được chọn từ:

(a) polypeptit bao gồm trình tự axit amin được mã hoá bằng một trình tự bao gồm ít nhất khoảng 74% trình tự axit amin đồng nhất với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO.1;

(b) polypeptit bao gồm trình tự axit amin được mã hoá bằng trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO.6;

(c) polypeptit bao gồm trình tự axit amin được mã hoá bằng trình tự nucleotit lai dọc theo ít nhất 85% độ dài đầy đủ của nó trong điều kiện nghiêm ngặt cao với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO.6; hoặc

(d) Polypeptit được mã hoá bằng trình tự nucleotit là biến thể ghép của trình tự nucleotit này bao gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO.50.

3. Polypeptit theo mục 1, trong đó gốc đường này được liên kết cộng hoá trị với gốc asparagin được chọn từ các axit amin 82, 166, 235, 254, 368, 393 hoặc 490 như nêu trong SEQ ID NO.1.

4. Polypeptit theo mục 1, trong đó gốc đường này được liên kết cộng hoá trị với polypeptit này thông qua mối liên kết mẫn cảm PNGaza.

5. Polypeptit theo mục 1, trong đó gốc đường này là loại manozơ hạng tốt.

6. Polypeptit theo mục 1, trong đó gốc đường này là loại phức.

7. Polypeptit theo mục 1, trong đó gốc đường này là loại lai.
8. Polypeptit theo mục 1, trong đó gốc đường này còn bao gồm ít nhất một đầu tận cùng có axit sialic.
9. Polypeptit theo mục 1, trong đó polypeptit này bao gồm chủ yếu vùng hyaluronidaza của glycoprotein hyaluronidaza của người (sHASEGP) hoặc phần có hoạt tính xúc tác của nó.
10. Polypeptit theo mục 1, trong đó phần hyaluronidaza của polypeptit bao gồm vùng hyaluronidaza của sHASEGP hoặc phần có hoạt tính xúc tác của nó.
11. Polypeptit theo mục 1, trong đó polypeptit này được cải biến bằng polyme.
12. Polypeptit theo mục 1, trong đó polyme này là PEG hoặc dextran.
13. Polypeptit bao gồm chủ yếu vùng hyaluronidaza hoặc phần có hoạt tính xúc tác của nó của protein hyaluronidaza của người.
14. Polypeptit theo mục 13, trong đó hyaluronidaza này được siêu sialat.
15. Polypeptit theo mục 13, trong đó vùng hyaluronidaza này bao gồm trình tự axit amin từ 1 đến 450 nêu trong SEQ ID NO.3.
16. Polypeptit theo mục 13, trong đó vùng hyaluronidaza này bao gồm trình tự axit amin từ 1 đến 438 nêu trong SEQ ID NO.3.
17. Polypeptit theo mục 13, trong đó vùng hyaluronidaza này bao gồm trình tự axit amin từ 1 đến 459 nêu trong SEQ ID NO.3.
18. Polypeptit theo mục 13, trong đó polypeptit này được cải biến bằng polyme.
19. Polypeptit theo mục 18, trong đó polyme này là PEG hoặc dextran.
20. Polypeptit theo mục 1, trong đó polypeptit này bao gồm trình tự tương đồng lớn hơn 80% với polypeptit bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO.3, trong đó polypeptit này là hyaluronidaza.
21. Polypeptit theo mục 9, trong đó phần vùng hyaluronidaza này được mã hoá bằng polynucleotit lai được trong các điều kiện nghiêm ngặt cao dọc theo ít nhất 70% độ dài đầy đủ của nó với một phân tử axit nucleic bao gồm trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO.6 hoặc ít nhất một vùng của nó hoặc phần có hoạt tính xúc tác của vùng này.

22. Polypeptit theo mục 1, trong đó sHASEGP là polypeptit của người.
23. Polypeptit theo mục 1, trong đó polypeptit này là polypeptit hoà tan được như nêu trong SEQ ID NO.4.
24. Polypeptit theo mục 1, trong đó với điều kiện là polypeptit này không bao gồm trình tự hoàn chỉnh nêu trong SEQ ID NO.1 và bao gồm ít nhất các axit amin từ 1 đến 429 của SEQ ID NO.4.
25. Polypeptit theo mục 1, trong đó polypeptit là một mutein có tối đa 50% axit amin được thay thế bằng axit amin khác; và polypeptit thu được có hoạt tính xúc tác ít nhất là 10% của polypeptit không được đột biến.
26. Polypeptit theo mục 25, trong đó có tối đa khoảng 10% axit amin được thay thế bằng axit amin khác.
27. Polypeptit theo mục 25, trong đó polypeptit thu được này có hoạt tính xúc tác ít nhất là 50% so với polypeptit không được thay thế.
28. Polypeptit theo mục 25, trong đó gốc xystein tự do trong vùng hyaluronidaza được thay thế bằng axit amin khác.
29. Polypeptit đã phân lập hầu như được tinh chế bao gồm chủ yếu vùng hyaluronidaza của sHASEGP.
30. Polypeptit theo mục 1, trong đó trình tự tín hiệu có khả năng định hướng polypeptit ngoài tế bào này được liên kết chức năng với polypeptit sHASEGP.
31. Glycoprotein hyaluronidaza của người đã phân lập hoà tan được (sHASEGP), trong đó tiềm năng của sHASEGP là lớn hơn 40000 USP đơn vị/mg protein.
32. sHASEGP theo mục 31, trong đó hyaluronidaza này được sialat hoá.
33. sHASEGP theo mục 31, trong đó tiềm năng này là lớn hơn khoảng 45000, 55000, 60000, 80000, 90000, 95000 hoặc 100000 đơn vị/mg.
34. sHASEGP theo mục 31, trong đó tiềm năng này là khoảng từ 60.000 đến 80.000 đơn vị/mg.
35. sHASEGP theo mục 31, trong đó polypeptit này được cải biến bằng một polyme.

36. sHASEGP theo mục 35, trong đó polyme này là PEG hoặc dextran.
37. Chế phẩm bao gồm chủ yếu glycoprotein theo điểm 31.
38. Phân tử axit nucleic mã hoá polypeptit theo điểm 1.
39. Phân tử axit nucleic bao gồm trình tự được chọn từ:
 - (a) trình tự như nêu trong SEQ ID NO: 6;
 - (b) trình tự mà lai ít nhất khoảng 70% độ dài đầy đủ với trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 6 trong điều kiện nghiêm ngặt cao;
 - (c) trình tự nucleotit mã hoá polypeptit nêu trong SEQ ID NO. 1, 3, 4, 5 và 50;
 - (d) trình tự là biến thể ghép của (a), (b), hoặc (c);
 - (e) trình tự mã hoá vùng hyaluronidaza hoặc phần có hoạt tính xúc tác của nó bao gồm trình tự nucleotit có tỷ lệ tương đồng trình tự ít nhất khoảng 60% với trình tự nêu trong SEQ ID NO. 6 hoặc 50; và
 - (f) trình tự bao gồm các codon suy biến của trình tự nêu trong mục (a), (b), (c), (d), (e).
40. Vector có trình tự như nêu trong SEQ ID NO: 51.
41. Vector bao gồm phân tử axit nucleic theo mục 38.
42. Vector theo mục 41, trong đó vector này là vector biểu hiện.
43. Vector theo mục 41, trong đó vector này là vector của tế bào có nhân chuẩn.
44. Vector theo mục 41, trong đó vector này bao gồm trình tự nucleotit định hướng tiết polypeptit bất kỳ được mã hoá bởi trình tự nucleotit liên kết chức năng với nó.
45. Vector theo mục 33, trong đó vector này là vector *Pichia* hoặc vector *E. coli*.
46. Vector theo mục 33, trong đó vector này là vector virus.
47. Tế bào được phân lập bao gồm vector theo mục 41.
48. Tế bào theo mục 47, trong đó tế bào này là tế bào nhân sơ.
49. Tế bào theo mục 47, trong đó tế bào này là tế bào nhân chuẩn.

50. Tế bào theo mục 47, trong đó tế bào này được chọn từ tế bào vi khuẩn, tế bào nấm men, tế bào thực vật, tế bào côn trùng hoặc tế bào động vật.

51. Tế bào theo mục 47, trong đó tế bào này là tế bào động vật có vú.

52. Kháng thể liên kết với sHASEGP nêu trong mục 1, trong đó kháng thể này không có phản ứng với hyaluronidaza của bò, cừu hoặc vi khuẩn.

53. Động vật chuyển gen không phải người, trong đó gen nội sinh mã hoá polypeptit nêu trong mục 1 bị đứt gãy bằng cách tái tổ hợp tương đồng hoặc bằng cách gây đột biến xen của động vật hoặc tổ tiên của nó.

54. Phương pháp tạo ra polypeptit hoà tan chứa sHASEGP bao gồm bước:

đưa axit nucleic như nêu trong SEQ ID NO: 6 liên kết chức năng với một trình tự khởi động vào trong tế bào mà có khả năng đưa các gốc đường được liên kết ở vị trí N vào trong sHASEGP;

nuôi cấy tế bào này trong các điều kiện để polypeptit được mã hoá được biểu hiện bởi tế bào này; và

thu hồi polypeptit được biểu hiện.

55. Phương pháp tạo ra polypeptit hoà tan chứa sHASEGP bao gồm bước:

đưa axit nucleic mã hoá polypeptit nêu trong mục 1 liên kết chức năng với trình tự khởi động thích hợp vào trong tế bào mà có khả năng đưa các gốc đường được liên kết ở vị trí N vào trong sHASEGP; nuôi cấy tế bào này trong các điều kiện để polypeptit được mã hoá được biểu hiện bởi tế bào này; và thu hồi polypeptit được biểu hiện.

56. Phương pháp theo mục 54, trong đó tế bào này là tế bào nhân chuẩn.

57. Phương pháp theo mục 55, trong đó tế bào nhân chuẩn này được chọn từ tế bào động vật có vú, tế bào côn trùng, tế bào nấm men hoặc tế bào thực vật.

58. Phương pháp theo mục 57, trong đó tế bào này là tế bào CHO.

59. Phương pháp tạo ra polypeptit hoà tan chứa sHASEGP bao gồm bước:

nuôi cấy tế bào theo mục 47 trong các điều kiện để polypeptit được mã hoá được biểu hiện bởi tế bào này; và

thu hồi polypeptit được biểu hiện.

60. Phương pháp liệu pháp gen *ex vivo*, bao gồm bước:

đưa, *in vitro*, axit nucleic mã hoá polypeptit nêu trong mục 1 và liên kết chức năng với một trình tự khởi động thích hợp vào trong tế bào mà có khả năng đưa các gốc đường được liên kết ở vị trí N vào trong sHASEGP; nhờ đó tạo ra tế bào được cải biến về mặt di truyền chứa axit nucleic này; và sử dụng tế bào bao gồm axit nucleic này cho đối tượng, nhờ đó axit nucleic mã hoá sHASEGP được chuyển đến đối tượng.

61. Phương pháp theo mục 60, trong đó tế bào này là cùng nguồn với đối tượng.

62. Phương pháp theo mục 60, trong đó tế bào này là kiểu gen đơn bội được làm phù hợp với đối tượng.

63. Phương pháp điều chế tế bào trứng của động vật có vú để thực hiện phương pháp thụ tinh *in vitro* bao gồm bước:

cho tế bào trứng tiếp xúc với sHASEGP nêu trong mục 1 với lượng hữu hiệu để loại bỏ chất nền mẫu nang trứng.

64. Phương pháp theo mục 62, trong đó mẫu nang trứng này được loại bỏ một cách hữu hiệu mà không cần xử lý tế bào trứng bằng pipet có lỗ rất hẹp.

65. Phương pháp tạo ra polypeptit sHASEGP bao gồm:

cho polypeptit theo mục 1 tiếp xúc với các enzym glycosyltransferaza có khả năng đưa các gốc đường được liên kết ở vị trí N vào trong polypeptit, nhờ đó tạo ra sHASEGP.

66. Phương pháp theo mục 65, trong đó các enzym glycosyltransferaza dẫn xuất từ màng vi thể của chó.

67. Dược phẩm chứa glycoprotein polypeptit sHASEGP gần như tinh khiết và chất mang dược dụng thích hợp.

68. Dược phẩm chứa polypeptit theo mục 1 và chất mang dược dụng thích hợp.

69. Phương pháp điều trị cho đối tượng có lượng dư cơ chất sHASEGP bao gồm bước:

sử dụng polypeptit sHASEGP theo mục 1 với lượng hữu hiệu để loại bỏ cơ chất sHASEGP này.

70. Phương pháp theo mục 69, trong đó lượng dư cơ chất này được tạo ra từ mô sẹo.

71. Phương pháp theo mục 70, trong đó mô sẹo này là sẹo tế bào thần kinh đệm thu được khi bị tổn thương tuỷ sống.

72. Phương pháp theo mục 70, trong đó mô sẹo này là kết quả của phẫu thuật.

73. Phương pháp theo mục 70, trong đó mô sẹo này là sẹo lồi.

74. Phương pháp theo mục 69, trong đó cơ chất này được kết hợp với đĩa thoát vị.

75. Phương pháp làm gia tăng việc khuếch tán cơ chất điều trị có đường kính nhỏ hơn 0,5 micron trong đối tượng, bao gồm bước:

cho đối tượng sử dụng polypeptit sHASEGP với lượng đủ để mở hoặc để tạo thành kênh có đường kính nhỏ hơn 0,5 micron và một chất điều trị, nhờ đó gia tăng được việc khuếch tán hợp chất điều trị.

76. Phương pháp theo mục 75, trong đó polypeptit sHASEGP này được tiêm với liều nằm trong khoảng từ 0,1 đến 1500 đơn vị.

77. Phương pháp theo mục 75, trong đó polypeptit sHASEGP này được trộn với một hợp chất điều trị trước khi tiêm.

78. Kit bao gồm:

(a) polypeptit sHASEGP với liều nằm trong khoảng từ 0,1 đến 1500 đơn vị/ml trong chất mang chấp nhận được;

(b) ít nhất một hợp chất điều trị trong chất mang chấp nhận được; và

(c) tùy ý, các hướng dẫn để cung cấp các hợp chất điều trị.

79. Kit theo mục 78, trong đó polypeptit sHASEGP này và hợp chất điều trị được cung cấp dưới dạng hỗn hợp.

80. Phương pháp điều trị rối loạn tim mạch bao gồm:

cho đối tượng sử dụng polypeptit sHASEGP theo mục 1 với lượng đủ để loại bỏ các glycosaminoglycan dư.

81. Phương pháp theo mục 80, trong đó rối loạn tim mạch này được chọn từ chứng nhồi máu cơ tim, suy tim xung huyết hoặc vữa xơ động mạch.

82. Phương pháp điều trị khối u bao gồm:

cho đối tượng sử dụng polypeptit sHASEGP theo mục 1 với lượng đủ để loại bỏ các glycosaminoglycan dư.

83. Phương pháp cung cấp phân tử tới mô chứa lượng dư glycosaminoglycan bao gồm bước: sử dụng polypeptit sHASEGP theo điểm 1 cho mô với lượng đủ để làm suy biến glycosaminoglycan theo cách đủ để mở được các kênh có đường kính nhỏ hơn 500nm; và sử dụng phân tử cho mô này có chứa glycosaminoglycan đã suy biến.

84. Phương pháp theo mục 83, trong đó polypeptit này được cải biến bằng polyme.

85. Phương pháp theo mục 84, trong đó polyme này là PEG hoặc dextran.

86. Phương pháp theo mục 83, trong đó polypeptit sHASEGP được sử dụng trước, đồng thời hoặc sau khi sử dụng phân tử này.

87. Phương pháp theo mục 83, trong đó sHASEGP được sử dụng ở vị trí khác so với vị trí sử dụng phân tử này.

88. Phương pháp theo mục 83, trong đó sHASEGP được sử dụng ở vị trí tương tự vị trí sử dụng phân tử này.

89. Dược phẩm bao gồm polypeptit glycoprotein hyaluronidaza (sHASEGP) gần như tinh khiết theo mục 1 và một chất mang dược lý.

90. Dược phẩm bao gồm polypeptit sHASEGP gần như tinh khiết theo mục 1.

91. Dược phẩm theo mục 89, trong đó dược phẩm này còn bao gồm tác nhân có hoạt tính dược lý.

92. Dược phẩm theo mục 91, trong đó tác nhân có hoạt tính dược lý được chọn từ nhóm bao gồm tác nhân hoá liệu pháp, tác nhân giảm đau, tác nhân chống viêm, tác nhân chống vi khuẩn, tác nhân diệt amip, tác nhân diệt trichomonat, tác nhân chống parkinson, tác nhân chống sốt rét, tác nhân chống co giật, tác nhân chống trầm cảm, tác nhân chống viêm khớp, tác nhân chống nấm, tác nhân chống cao huyết áp, tác nhân chống gây sốt, tác nhân chống ký sinh trùng, tác nhân kháng histamin, tác nhân chủ

vận tác động kiểu alpha-adrenalin, tác nhân chẹn alpha, tác nhân gây tê, tác nhân làm giãn phế quản, tác nhân diệt sinh vật, tác nhân kìm hãm vi khuẩn, tác nhân chẹn tác động kiểu beta-adrenalin, tác nhân chẹn kênh canxi, tác nhân được chất điều trị tim mạch, tác nhân chống thụ thai, tác nhân làm tan máu, tác nhân lợi niệu, tác nhân chống trầm cảm, tác nhân dùng để chẩn đoán bệnh, tác nhân điện phân, tác nhân gây ngủ, tác nhân hormon, tác nhân tăng đường huyết, tác nhân giãn cơ, tác nhân co cơ, tác nhân chữa mắt, tác nhân giống thần kinh đối giao cảm, tác nhân hướng thần, tác nhân chống viêm mắt, tác nhân giống thần kinh đối giao cảm, tác nhân hướng tâm thần, tác nhân giảm đau, tác nhân giao cảm, tác nhân an thần, tác nhân lợi niệu, tác nhân đặt âm đạo, tác nhân diệt virus, tác nhân vitamin, tác nhân chống viêm không phải steroid, tác nhân ức chế enzym chuyển hoá angiotensin, polypeptit, protein, axit nucleic, được chất, phân tử hữu cơ hoặc chất kích thích gây ngủ.

93. Dược phẩm theo mục 92, trong đó tác nhân hoá liệu pháp này là độc tố hoặc tác nhân hoạt tử khối u.

94. Dược phẩm theo mục 92, trong đó tác nhân giảm đau là lignocain hoặc bupivacain.

95. Dược phẩm theo mục 92, trong đó dược phẩm này còn bao gồm một tác nhân hormon.

96. Dược phẩm theo mục 95, trong đó tác nhân hormon này là epinephrin.

97. Dược phẩm theo mục 89, trong đó chất mang dược lý bao gồm dung dịch làm ổn định.

98. Dược phẩm theo mục 97, trong đó dung dịch ổn định bao gồm NaCl và kim loại được chọn từ CaCl_2 và MgCl_2 .

99. Dược phẩm theo mục 97, trong đó dung dịch ổn định này còn bao gồm axit etylendiamin tetra-axetic (EDTA).

100. Dược phẩm theo mục 97, trong đó dung dịch ổn định này còn bao gồm chất mang được chọn từ nhóm bao gồm albumin, chất tẩy rửa hoặc chất hoạt động bề mặt.

101. Dược phẩm theo mục 97, trong đó dung dịch ổn định này bao gồm phenol đỏ, albumin huyết thanh người, HEPES, NaCl và kim loại được chọn từ CaCl_2 và MgCl_2 .

102. Dược phẩm theo mục 101, trong đó nồng độ của glycoprotein là khoảng 80 đơn vị/ml.

103. Dược phẩm theo mục 89, trong đó dược phẩm này còn bao gồm chất hoạt động bề mặt.

104. Dược phẩm theo mục 103, trong đó chất hoạt động bề mặt này được chọn từ sorbitan monolaurat; sorbitan monooleat; sorbitan palmitat; sorbitan monostearat; sorbitan sesquitolat; sorbitan trioleat; dẫn xuất este của axit polyoxyetylen oleic; dẫn xuất polyoxyetylen lauryl amin; dẫn xuất polyoxyetylen stearyl amin; dẫn xuất polyoxyetylen oley amin; dẫn xuất dầu thầu dầu polyoxyetylen; dẫn xuất dầu thầu dầu polyoxyetylen hydro hoá; dẫn xuất polyoxyetylen bis phenol ete; polyoxyetylen glycol; dẫn xuất este của axit béo sorbitan; dẫn xuất este của axit béo polyoxyetylen sorbitan; dẫn xuất polyoxyetylen-polyoxypropylen; polyetylen glycol hexadexyl (Brij®56); polyetylen glycol octadexyl ete (Brij®72); polyoxyetylen glycol sorbitan monolaurat (TWEEN®20); polyoxyetylensorbitan monopalmitat (TWEEN®40); polyetylen glycol sorbitan monostearat (TWEEN®60); polyoxyetylensorbitan Tristearat (TWEEN®65); polyetylen glycol sorbitan monooleat (TWEEN®80); polyoxyetylensorbitan Trioleat (TWEEN®85); tri(hydroxymetyl) aminometan lauryl sulfat (TRIZMA®dodexyl sulfat); copolyme khối của polyetylen và polypropylen glycol (Pluronic®F68); hoặc albumin.

105. Dược phẩm theo mục 89, trong đó nồng độ của glycoprotein nằm trong khoảng từ 1 đơn vị/mg đến 5000 đơn vị/mg.

106. Dược phẩm theo điểm mục 103, trong đó nồng độ của glycoprotein nằm trong khoảng từ 1 đơn vị/mg đến 300 đơn vị/mg.

107. Dược phẩm theo mục 103, trong đó nồng độ của glycoprotein nằm trong khoảng từ 1 đơn vị/mg đến 150 đơn vị/mg.

108. Dược phẩm theo mục 89, trong đó dược phẩm này còn bao gồm ion kim loại được chọn từ canxi và magie.

109. Dược phẩm theo mục 89, trong đó dược phẩm này được bào chế để được giải phóng theo thời gian hoặc để được giải phóng sau khi tiếp xúc với vị trí sử dụng hoặc với mô đích.

110. Dược phẩm theo mục 89, trong đó dược phẩm này được bào chế để sử dụng theo cách cục bộ, khu trú, qua ruột, ngoài đường tiêu hoá, trong nang, trong da, trong mắt, dưới da, trong cơ, hoặc sử dụng qua đường tĩnh mạch.

111. Dược phẩm theo mục 89, trong đó dược phẩm này được bào chế dưới dạng phun, dạng bột hoặc dạng sol khí.

112. Dược phẩm theo mục 89, trong đó dược phẩm này được bào chế dưới dạng viên nén hoặc viên nang.

113. Dược phẩm theo mục 108, trong đó dược phẩm này còn bao gồm lớp bọc hấp thụ qua đường ruột.

114. Dược phẩm theo mục 108, trong đó lớp bọc này được chọn từ xenluloza axetat phthalat, polyetylen glycol, polyoxyetylen sorbitan, dầu thầu dầu, etyl xenluloza pseudolatex, phenyl salixylat, n-butyl stearat, axit stearic và sáp carnauba.

115. Dược phẩm theo mục 81, trong đó dược phẩm này ở dạng bột được đông khô nhanh.

116. Dược phẩm theo mục 110, trong đó dạng bột được đông khô nhanh được bào chế theo quy trình, bao gồm các bước:

(a) chuyển dược phẩm này vào trong dung dịch đậm;

(b) lọc vô trùng dung dịch thu được này; và

(c) đông khô nhanh dung dịch đã lọc trong các điều kiện tiêu chuẩn để tạo ra dạng bột vô trùng.

117. Dược phẩm theo mục 116, trong đó dung dịch đậm này được chọn từ HEPES, Phosphat, Xitrat và Bicacbonat.

118. Dược phẩm theo mục 117, trong đó dung dịch đậm này còn bao gồm đường hoặc hydrat cacbon.

119. Dược phẩm theo điểm mục 118, trong đó đường hoặc hydrat cacbon là dextroza hoặc lactoza.

120. Dược phẩm theo mục 119, trong đó lactoza có mặt ở nồng độ nằm trong khoảng từ 1 mg/ml đến 15 mg/ml.

121. Dược phẩm theo mục 116, trong đó dung dịch đậm còn bao gồm chất hoạt động bề mặt.

122. Dược phẩm theo mục 116, trong đó chất hoạt động bề mặt được chọn từ sorbitan monolaurat; sorbitan monooleat; sorbitan palmitat; sorbitan monostearat; sorbitan sesquitolat; sorbitan trioleat; dẫn xuất este của axit polyoxyetylen oleic; dẫn xuất polyoxyetylen lauryl amin; dẫn xuất polyoxyetylen stearyl amin; dẫn xuất polyoxyetylen oley amin; dẫn xuất dầu thầu dầu polyoxyetylen; dẫn xuất dầu thầu dầu polyoxyetylen hydro hoá; dẫn xuất polyoxyetylen bis phenol ete; polyoxyetylen glycol; dẫn xuất este của axit béo sorbitan; dẫn xuất este của axit béo polyoxyetylen sorbitan; dẫn xuất polyoxyetylen-polyoxypropylen; polyetylen glycol hexadexyl (Brij®56); polyetylen glycol octadexyl ete (Brij®72); polyoxyetylen 10 oley ete (Brij®97); t-Oxtylphenoxypolyetoxyetanol (TRITON®X100); polyoxyetylen glycol sorbitan monolaurat (TWEEN®20); polyoxyetylensorbitan monopalmitat (TWEEN®40); polyetylen glycol sorbitan monostearat (TWEEN®60); polyoxyetylensorbitan Tristearat (TWEEN®65); polyetylen glycol sorbitan monooleat (TWEEN®80); polyoxyetylensorbitan Trioleat (TWEEN®85); tri(hydroxymetyl) aminometan lauryl sulfat (TRIZMA®dodexyl sulfat); copolyme khối của polyetylen và polypropylen glycol (Pluronic®F68); hoặc albumin.

123. Tổ hợp bao gồm

lọ nhỏ vô trùng và dược phẩm theo mục 89, trong đó dược phẩm được chứa trong lọ nhỏ này.

124. Tổ hợp theo mục 123, trong đó lọ nhỏ vô trùng này chứa dược phẩm với lượng để sử dụng theo liều đơn.

125. Tổ hợp bao gồm

lọ nhỏ vô trùng chứa dược phẩm theo mục 110.

126. Tổ hợp theo mục 123, trong đó lọ nhỏ vô trùng này còn chứa nước vô trùng với lượng để tiêm; và nồng độ cuối của glycoprotein nằm trong khoảng từ 1 đến 5000 đơn vị/ml.

127. Kit bao gồm tổ hợp theo mục 123 và ít nhất một trong số

(a) vật liệu đóng gói; hoặc

(b) các hướng dẫn sử dụng kit này để sử dụng dược phẩm.

128. Kit theo mục 127, trong đó vật liệu đóng gói bao gồm băng, băng khô, styrofoam, bột, chất dẻo, xenlophan, gói co, gói bong bóng, giấy, bìa cứng, tinh bột lạc, nút xoắn, kẹp bằng kim loại, bi đông bằng kim loại, drierite, cốc và cao su.

129. Tổ hợp bao gồm

bơm tiêm vô trùng chứa dược phẩm theo điểm 89.

130. Tổ hợp theo mục 129, trong đó bơm tiêm vô trùng này có thể tích nằm trong khoảng từ 5 đến 50 μ l.

131. Tổ hợp theo mục 129, trong đó nồng độ cuối của glycoprotein nằm trong khoảng từ 1 đến 5000 đơn vị/ml.

132. Tổ hợp bao gồm

bơm tiêm vô trùng chứa dược phẩm theo mục 110.

133. Tổ hợp theo mục 132, trong đó nồng độ cuối của glycoprotein nằm trong khoảng từ 1 đến 5000 đơn vị/ml.

134. Tổ hợp theo mục 132, trong đó dược phẩm này được pha loãng trong nước vô trùng với lượng từ 5 μ l đến 50 μ l.

135. Tổ hợp theo mục 132, trong đó chế phẩm này còn bao gồm bơm tiêm thứ hai chứa tác nhân có hoạt tính dược lý.

136. Tổ hợp theo mục 132, trong đó tác nhân có hoạt tính dược lý được chọn từ tác nhân hoá liệu pháp, tác nhân giảm đau, tác nhân chống viêm, tác nhân chống vi khuẩn, tác nhân diệt amip, tác nhân diệt trichomonat, tác nhân chống parkinson, tác nhân chống sốt rét, tác nhân chống co giật, tác nhân chống trầm cảm, tác nhân chống viêm khớp, tác nhân chống nấm, tác nhân chống cao huyết áp, tác nhân chống gây sốt, tác nhân chống ký sinh trùng, tác nhân kháng histamin, tác nhân chủ vận tác động kiểu alpha-adrenalin, tác nhân chẹn alpha, tác nhân gây tê, tác nhân làm giãn phế quản, tác nhân diệt sinh vật, tác nhân kìm hãm vi khuẩn, tác nhân chẹn tác động kiểu beta-adrenalin, tác nhân chẹn kênh canxi, tác nhân dược chất điều trị tim mạch, tác nhân

chống thụ thai, tác nhân làm tan máu, tác nhân lợi niệu, tác nhân chống trầm cảm, tác nhân dùng để chẩn đoán bệnh, tác nhân điện phân, tác nhân gây ngủ, tác nhân hormon, tác nhân tăng đường huyết, tác nhân giãn cơ, tác nhân co cơ, tác nhân chữa mắt, tác nhân giống thần kinh đối giao cảm, tác nhân hướng thần, tác nhân chống viêm mắt, tác nhân giống thần kinh đối giao cảm, tác nhân hướng tâm thần, tác nhân giảm đau, tác nhân giao cảm, tác nhân an thần, tác nhân lợi niệu, tác nhân đặt âm đạo, tác nhân diệt virus, tác nhân vitamin, tác nhân chống viêm không phải steroid, tác nhân ức chế enzym chuyển hoá angiotensin, polypeptit, protein, axit nucleic, dược chất, phân tử hữu cơ hoặc chất kích thích gây ngủ.

137. Tổ hợp theo mục 136, trong đó tác nhân có hoạt tính dược lý là chất nhót đàn hồi.

138. Kit bao gồm tổ hợp theo mục 132 và một hoặc nhiều

(a) vật liệu đóng gói; và

(b) các hướng dẫn sử dụng kit này để sử dụng dược phẩm.

139. Kit theo mục 138, trong đó vật liệu đóng gói bao gồm băng, băng khô, styrofoam, bột, chất dẻo, xenlophan, gói co, gói bong bóng, giấy, bìa cứng, tinh bột lạc, nút xoắn, kẹp bằng kim loại, bi đồng bằng kim loại, drierite, cốc và cao su.

140. Phương pháp điều trị sự tích lũy glycosaminoglycan bệnh lý, bao gồm:

sử dụng sHASEGP tái tổ hợp, trong đó sHASEGP này không phải là enzym của bò, cừu, hoặc vi khuẩn, với lượng hữu hiệu để cải thiện hoặc làm giảm glycosaminoglycan được tích lũy.

141. Phương pháp theo mục 140, trong đó việc tích lũy này được chọn từ chứng tim-mạch, não, nghẹt quy đầu, phù niêm, phù niêm cứng và phù bạch huyết.

142. Phương pháp tạo điều kiện để tái tạo mạch mới của mô hoại tử bao gồm sử dụng sHASEGP tái tổ hợp với lượng đủ để kích thích sự phát triển của hệ mạch mới trong mô hoại tử này.

143. Phương pháp loại bỏ glycosaminoglycan từ dịch thủy tinh thể bao gồm sử dụng sHASEGP.

144. Glycoprotein theo mục 1, trong đó glycan được liên kết ở vị trí N chúng tỏ mức độ polyme hoá là khoảng 15,6.

145. Glycoprotein theo mục 1, trong đó glycan được liên kết ở vị trí N chúng tỏ mức độ polyme hoá là khoảng 13,7.

146. Glycoprotein theo mục 1, trong đó glycan được liên kết ở vị trí N chúng tỏ mức độ polyme hoá là khoảng 11,6.

147. Glycoprotein theo mục 1, trong đó glycan được liên kết ở vị trí N chúng tỏ mức độ polyme hoá là khoảng 10,0.

148. Glycoprotein theo mục 1, trong đó glycan được liên kết ở vị trí N chúng tỏ mức độ polyme hoá là khoảng 8,37.

149. Glycoprotein theo mục 1, trong đó glycan được liên kết ở vị trí N chúng tỏ mức độ polyme hoá là khoảng 7,32.

150. Glycoprotein theo mục 1, trong đó glycan được liên kết ở vị trí N chúng tỏ mức độ polyme hoá là khoảng 6,1.

151. Glycoprotein theo mục 1, trong đó glycan được liên kết ở vị trí N chúng tỏ mức độ polyme hoá là khoảng 5,6.

152. Glycoprotein theo mục 1, trong đó glycan được liên kết ở vị trí N chúng tỏ mức độ polyme hoá là khoảng 3,8.

153. Glycoprotein theo mục 1, trong đó glycan được liên kết ở vị trí N chúng tỏ mức độ polyme hoá là khoảng 3,2.

154. Phương pháp sản xuất polypeptit hyaluronidaza hoà tan có hoạt tính trung hoà gần như tinh khiết và ít nhất một gốc đường được liên kết ở vị trí N, trong đó gốc đường được liên kết ở vị trí N được liên kết cộng hoá trị với gốc asparagin của polypeptit này, bao gồm nuôi cấy sinh trưởng các tế bào trứng chuột đồng Trung quốc trong môi trường sinh trưởng thích hợp và với sự có mặt của natri butyrat với lượng nằm trong khoảng từ 0,1 đến 1mM trong các điều kiện thích hợp để tạo ra polypeptit.

155. Phương pháp tinh chế sHASEGP, trong đó phương pháp này bao gồm bước cho môi trường chứa sHASEGP với cường độ ion thấp tiếp xúc với nhựa trao đổi anion ở độ pH trung hoà và rửa giải sHASEGP này bằng khoảng 400mM muối; cho

sHASEGP tiếp xúc với nhựa sắc ký tương tác kỵ nước với sự có mặt của amoni sulfat 0,5M; cho sHASEGP trong amoni sulfat tiếp xúc với nhựa phenyl boronat; rửa giải sHASEGP này trong muối hàm lượng thấp ở độ pH trung hoà; cho sHASEGP này tiếp xúc với nhựa Hydroxapatit, và rửa giải sHASEGP này bằng khoảng 100mM Na Phosphat, thu được sHASEGP trong đó sHASEGP này gần như tinh khiết.

156. Phương pháp kích thích sự hoá lỏng dịch thủy tinh thể để điều trị rối loạn về mắt của động vật có vú bao gồm cho dịch thủy tinh thể tiếp xúc với protein nêu trong mục 1 với lượng hữu hiệu để hoá lỏng dịch thủy tinh thể này, nhờ đó rối loạn được điều trị.

157. Polypeptit nêu trong mục 156, trong đó polypeptit này được cải biến bằng polyme.

158. Polypeptit nêu trong mục 157, trong đó polyme này là PEG hoặc dextran.

159. Phương pháp làm giảm áp lực trong mắt của đối tượng bao gồm cho đối tượng cần điều trị sử dụng sHASEGP của người được đặc trưng bởi

gần như không có enzym của bò, cừu hoặc vi khuẩn;

lớn hơn khoảng 40000 USP đơn vị/mg protein; và

nhờ đó làm giảm áp lực trong mắt của đối tượng.

160. Phương pháp theo mục 159, trong đó phương pháp này không có IgG.

161. Phương pháp theo mục 159, trong đó sHASEGP được sử dụng cho tiền phòng của mắt.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit hyaluronidaza được cắt cụt ở đầu tận cùng C, trong đó polypeptit được mã hóa này chứa trình tự axit amin có tỷ lệ tương đồng trình tự ít nhất 98% với trình tự axit amin được chỉ ra là các axit amin 1-448 của SEQ ID NO:4.
2. Phân tử axit nucleic theo điểm 1, trong đó polypeptit này được sản xuất nhờ sự biểu hiện của phân tử axit nucleic trong hệ biểu hiện của động vật có vú.
3. Phân tử axit nucleic theo điểm 1 hoặc 2, trong đó polypeptit này được sản xuất nhờ sự biểu hiện của phân tử axit nucleic từ tế bào CHO.
4. Phân tử axit nucleic theo điểm 1, trong đó phân tử axit nucleic này có trình tự nucleotit được nêu trong SEQ ID NO:48.
5. Phân tử axit nucleic theo điểm 1, trong đó phân tử axit nucleic này có trình tự nucleotit được chỉ ra là các nucleotit 106-1446 của SEQ ID NO:6.
6. Phân tử axit nucleic theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong đó phân tử axit nucleic này bao gồm trình tự nucleotit mã hóa trình tự tín hiệu cho quá trình tiết polypeptit được mã hóa này.
7. Phân tử axit nucleic theo điểm 6, trong đó trình tự tín hiệu này là peptit dẫn đầu của chuỗi kapa IgG.
8. Phân tử axit nucleic theo điểm 7, trong đó peptit dẫn đầu của chuỗi kapa IgG này có trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO:43.
9. Vector chứa phân tử axit nucleic theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8, trong đó vector này mã hóa polypeptit được cắt cụt.
10. Vector theo điểm 9, trong đó vector này chứa trình tự nucleotit được nêu trong SEQ ID NO: 51.
11. Vector theo điểm 9 hoặc 10, trong đó vector này là vector biểu hiện.
12. Vector theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 9 đến 11, trong đó vector này là vector thuộc sinh vật nhân chuẩn.
13. Vector theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 9 đến 11, trong đó vector này là vector *Pichia*, vector *E. coli* hoặc vector virus.

14. Tế bào được phân lập chứa vector theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 9 đến 13.

15. Tế bào theo điểm 14, trong đó tế bào này là tế bào nhân sơ hoặc tế bào nhân chuẩn.

16. Tế bào theo điểm 14, trong đó tế bào này được chọn từ tế bào vi khuẩn, tế bào nấm men, tế bào thực vật, tế bào côn trùng và tế bào động vật có vú.

17. Tế bào theo điểm 14, trong đó tế bào này là tế bào trứng chuột đồng Trung Quốc (CHO).

18. Phương pháp sản xuất polypeptit hyaluronidaza hòa tan gần như tinh khiết bao gồm các bước:

đưa phân tử axit nucleic theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8 được liên kết chức năng với trình tự khởi động hoặc vector theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 9 đến 13 vào trong tế bào mà kết hợp các gốc đường được liên kết ở vị trí N vào polypeptit này; nuôi cấy tế bào này trong các điều kiện mà nhờ đó polypeptit được mã hóa được biểu hiện và được tiết bởi tế bào này; và thu hồi (các) polypeptit được biểu hiện này.

19. Phương pháp theo điểm 18, trong đó tế bào này được chọn từ tế bào động vật có vú, tế bào côn trùng, tế bào nấm men và tế bào thực vật.

20. Phương pháp theo điểm 18, trong đó tế bào này là tế bào trứng chuột đồng Trung Quốc (CHO).

21. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 18 đến 20, trong đó tế bào này được nuôi cấy với sự có mặt của natri butyrat 0,1-1mM trong các điều kiện thích hợp để sản xuất polypeptit này.

22. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 18 đến 21, trong đó bước thu hồi polypeptit được biểu hiện bao gồm:

cho môi trường chứa polypeptit được biểu hiện ở cường độ ion thấp tiếp xúc với nhựa trao đổi anion ở độ pH trung tính;

rửa giải polypeptit này bằng khoảng 400mM muối;

cho polypeptit này tiếp xúc với nhựa sắc ký tương tác kỵ nước với sự có mặt của khoảng 0,5M amoni sulfat;

cho polypeptit trong amoni sulfat tiếp xúc với nhựa phenyl boronat;

rửa giải polypeptit này trong muối hàm lượng thấp ở độ pH trung tính;

cho polypeptit này tiếp xúc với nhựa hydroxapatit; và

rửa giải polypeptit này bằng khoảng 100mM natri phosphat, nhờ đó thu được polypeptit gần như tinh khiết.

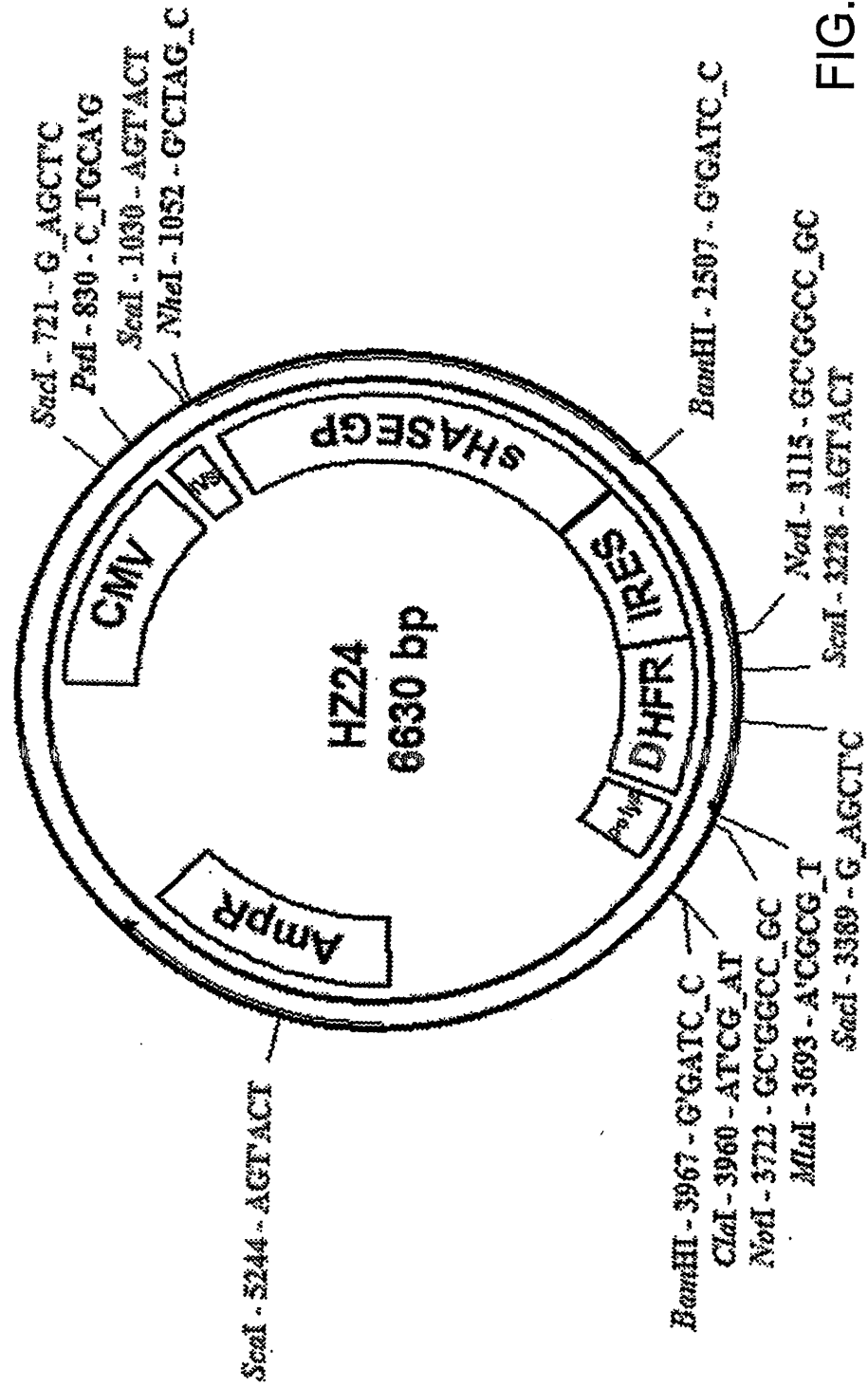


FIG. 1

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Halozyme, Inc.
Frost, Gregory
Kundu, Anirban
Bookbinder, Louis

<120> PHÂN TỬ AXIT NUCLEIC MÃ HÓA POLYPEPTIT HYALURONIDAZA ĐƯỢC CẮT CỤT Ở ĐẦU TẬN CÙNG C
PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT, VECTƠ VÀ TẾ BÀO PHÂN LẬP ĐƯỢC CHỨA PHÂN TỬ AXIT NUCLEIC NÀY

<130> 3051GEP

<140> US60/452,360

<141> 2003-03-05

<160> 53

<170> FastSEQ cho Windows Phiên bản 4.0

<210> 1

<211> 509

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<220>

<221> CARBOHYD

<222> 82, 166, 235, 254, 368, 393, 490

<400> 1

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

130	135	140
Ile Asp Trp Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro		
145	150	155
Lys Asp Val Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn		160
	165	170
Val Gln Leu Ser Leu Thr Glu Ala Thr Glu Lys Ala Lys Gln Glu Phe		175
	180	185
Glu Lys Ala Gly Lys Asp Phe Leu Val Glu Thr Ile Lys Leu Gly Lys		190
	195	200
Leu Leu Arg Pro Asn His Leu Trp Gly Tyr Tyr Leu Phe Pro Asp Cys		205
	210	215
Tyr Asn His His Tyr Lys Lys Pro Gly Tyr Asn Gly Ser Cys Phe Asn		220
225	230	235
Val Glu Ile Lys Arg Asn Asp Asp Leu Ser Trp Leu Trp Asn Glu Ser		240
	245	250
Thr Ala Leu Tyr Pro Ser Ile Tyr Leu Asn Thr Gln Gln Ser Pro Val		255
	260	265
Ala Ala Thr Leu Tyr Val Arg Asn Arg Val Arg Glu Ala Ile Arg Val		270
	275	280
Ser Lys Ile Pro Asp Ala Lys Ser Pro Leu Pro Val Phe Ala Tyr Thr		285
	290	295
Arg Ile Val Phe Thr Asp Gln Val Leu Lys Phe Leu Ser Gln Asp Glu		300
305	310	315
Leu Val Tyr Thr Phe Gly Glu Thr Val Ala Leu Gly Ala Ser Gly Ile		320
	325	330
Val Ile Trp Gly Thr Leu Ser Ile Met Arg Ser Met Lys Ser Cys Leu		335
	340	345
Leu Leu Asp Asn Tyr Met Glu Thr Ile Leu Asn Pro Tyr Ile Ile Asn		350
	355	360
Val Thr Leu Ala Ala Lys Met Cys Ser Gln Val Leu Cys Gln Glu Gln		365
	370	375
Gly Val Cys Ile Arg Lys Asn Trp Asn Ser Ser Asp Tyr Leu His Leu		380
385	390	395
Asn Pro Asp Asn Phe Ala Ile Gln Leu Glu Lys Gly Gly Lys Phe Thr		400
	405	410
Val Arg Gly Lys Pro Thr Leu Glu Asp Leu Glu Gln Phe Ser Glu Lys		415
	420	425
Phe Tyr Cys Ser Cys Tyr Ser Thr Leu Ser Cys Lys Glu Lys Ala Asp		430
	435	440
Val Lys Asp Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala Asp Gly Val Cys		445
	450	455
Ile Asp Ala Phe Leu Lys Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro Gln Ile		460
465	470	475
Phe Tyr Asn Ala Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Thr Met Phe Ile Val		480
	485	490
Ser Ile Leu Phe Leu Ile Ile Ser Ser Val Ala Ser Leu		495
	500	505

<210> 2
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 2
 Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
 1 5 10 15
 Ser Ser Gly Val Ser Gln Ile Val Phe Thr Phe Leu Leu Ile Pro Cys
 20 25 30
 Cys Leu Thr
 35

<210> 3
 <211> 474
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

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

```

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

```

<210> 4
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

```

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

```

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

<210> 5

<211> 482

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 5

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

Leu Leu Asp Asn Tyr Met Glu Thr Ile Leu Asn Pro Tyr Ile Ile Asn
 355 360 365
 Val Thr Leu Ala Ala Lys Met Cys Ser Gln Val Leu Cys Gln Glu Gln
 370 375 380
 Gly Val Cys Ile Arg Lys Asn Trp Asn Ser Ser Asp Tyr Leu His Leu
 385 390 395 400
 Asn Pro Asp Asn Phe Ala Ile Gln Leu Glu Lys Gly Gly Lys Phe Thr
 405 410 415
 Val Arg Gly Lys Pro Thr Leu Glu Asp Leu Glu Gln Phe Ser Glu Lys
 420 425 430
 Phe Tyr Cys Ser Cys Tyr Ser Thr Leu Ser Cys Lys Glu Lys Ala Asp
 435 440 445
 Val Lys Asp Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala Asp Gly Val Cys
 450 455 460
 Ile Asp Ala Phe Leu Lys Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro Gln Ile
 465 470 475 480
 Phe Tyr

<210> 6

<211> 1530

<212> ADN

<213> Người hiện đại

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(1530)

<223> Hyaluronidaza Glycoprotein được neo bám PH-20 GPI

<400> 6

atg gga gtg cta aaa ttc aag cac atc ttt ttc aga agc ttt gtt aaa 48
 Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
 1 5 10 15

tca agt gga gta tcc cag ata gtt ttc acc ttc ctt ctg att cca tgt 96
 Ser Ser Gly Val Ser Gln Ile Val Phe Thr Phe Leu Leu Ile Pro Cys
 20 25 30

tgc ttg act ctg aat ttc aga gca cct cct gtt att cca aat gtg cct 144
 Cys Leu Thr Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro
 35 40 45

ttc ctc tgg gcc tgg aat gcc cca agt gaa ttt tgt ctt gga aaa ttt 192
 Phe Leu Trp Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe
 50 55 60

gat gag cca cta gat atg agc ctc ttc tct ttc ata gga agc ccc cga 240
 Asp Glu Pro Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg

65	70	75	80	
ata aac gcc acc ggg caa ggt gtt aca ata ttt tat gtt gat aga ctt	288			
Ile Asn Ala Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu				
85	90	95		
ggc tac tat cct tac ata gat tca atc aca gga gta act gtg aat gga	336			
Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly				
100	105	110		
gga atc ccc cag aag att tcc tta caa gac cat ctg gac aaa gct aag	384			
Gly Ile Pro Gln Lys Ile Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ala Lys				
115	120	125		
aaa gac att aca ttt tat atg cca gta gac aat ttg gga atg gct gtt	432			
Lys Asp Ile Thr Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val				
130	135	140		
att gac tgg gaa gaa tgg aga ccc act tgg gca aga aac tgg aaa cct	480			
Ile Asp Trp Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro				
145	150	155	160	
aaa gat gtt tac aag aat agg tct att gaa ttg gtt cag caa caa aat	528			
Lys Asp Val Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn				
165	170	175		
gta caa ctt agt ctc aca gag gcc act gag aaa gca aaa caa gaa ttt	576			
Val Gln Leu Ser Leu Thr Glu Ala Thr Glu Lys Ala Lys Gln Glu Phe				
180	185	190		
gaa aag gca ggg aag gat ttc ctg gta gag act ata aaa ttg gga aaa	624			
Glu Lys Ala Gly Lys Asp Phe Leu Val Glu Thr Ile Lys Leu Gly Lys				
195	200	205		
tta ctt cgg cca aat cac ttg tgg ggt tat tat ctt ttt ccg gat tgt	672			
Leu Leu Arg Pro Asn His Leu Trp Gly Tyr Tyr Leu Phe Pro Asp Cys				
210	215	220		
tac aac cat cac tat aag aaa ccc ggt tac aat gga agt tgc ttc aat	720			
Tyr Asn His His Tyr Lys Lys Pro Gly Tyr Asn Gly Ser Cys Phe Asn				
225	230	235	240	
gta gaa ata aaa aga aat gat gat ctc agc tgg ttg tgg aat gaa agc	768			
Val Glu Ile Lys Arg Asn Asp Asp Leu Ser Trp Leu Trp Asn Glu Ser				
245	250	255		
act gct ctt tac cca tcc att tat ttg aac act cag cag tct cct gta	816			
Thr Ala Leu Tyr Pro Ser Ile Tyr Leu Asn Thr Gln Gln Ser Pro Val				
260	265	270		

gct gct aca ctc tat gtg cgc aat cga gtt cgg gaa gcc atc aga gtt	864
Ala Ala Thr Leu Tyr Val Arg Asn Arg Val Arg Glu Ala Ile Arg Val	
275 280 285	
tcc aaa ata cct gat gca aaa agt cca ctt ccg gtt ttt gca tat acc	912
Ser Lys Ile Pro Asp Ala Lys Ser Pro Leu Pro Val Phe Ala Tyr Thr	
290 295 300	
cgc ata gtt ttt act gat caa gtt ttg aaa ttc ctt tct caa gat gaa	960
Arg Ile Val Phe Thr Asp Gln Val Leu Lys Phe Leu Ser Gln Asp Glu	
305 310 315 320	
ctt gtg tat aca ttt ggc gaa act gtt gct ctg ggt gct tct gga att	1008
Leu Val Tyr Thr Phe Gly Glu Thr Val Ala Leu Gly Ala Ser Gly Ile	
325 330 335	
gta ata tgg gga acc ctc agt ata atg cga agt atg aaa tct tgc ttg	1056
Val Ile Trp Gly Thr Leu Ser Ile Met Arg Ser Met Lys Ser Cys Leu	
340 345 350	
ctc cta gac aat tac atg gag act ata ctg aat cct tac ata atc aac	1104
Leu Leu Asp Asn Tyr Met Glu Thr Ile Leu Asn Pro Tyr Ile Ile Asn	
355 360 365	
gtc aca cta gca gcc aaa atg tgt agc caa gtg ctt tgc cag gag caa	1152
Val Thr Leu Ala Ala Lys Met Cys Ser Gln Val Leu Cys Gln Glu Gln	
370 375 380	
gga gtg tgt ata agg aaa aac tgg aat tca agt gac tat ctt cac ctc	1200
Gly Val Cys Ile Arg Lys Asn Trp Asn Ser Ser Asp Tyr Leu His Leu	
385 390 395 400	
aac cca gat aat ttt gct att caa ctt gag aaa ggt gga aag ttc aca	1248
Asn Pro Asp Asn Phe Ala Ile Gln Leu Glu Lys Gly Gly Lys Phe Thr	
405 410 415	
gta cgt gga aaa ccg aca ctt gaa gac ctg gag caa ttt tct gaa aaa	1296
Val Arg Gly Lys Pro Thr Leu Glu Asp Leu Glu Gln Phe Ser Glu Lys	
420 425 430	
ttt tat tgc agc tgt tat agc acc ttg agt tgt aag gag aaa gct gat	1344
Phe Tyr Cys Ser Cys Tyr Ser Thr Leu Ser Cys Lys Glu Lys Ala Asp	
435 440 445	
gta aaa gac act gat gct gtt gat gtg tgt att gct gat ggt gtc tgt	1392
Val Lys Asp Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala Asp Gly Val Cys	
450 455 460	

ata gat gct ttt cta aaa cct ccc atg gag aca gaa gaa cct caa att 1440
 Ile Asp Ala Phe Leu Lys Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro Gln Ile
 465 470 475 480

ttc tac aat gct tca ccc tcc aca cta tct gcc aca atg ttc att gtt 1488
 Phe Tyr Asn Ala Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Thr Met Phe Ile Val
 485 490 495

agt att ttg ttt ctt atc att tct tct gta gcg agt ttg taa 1530
 Ser Ile Leu Phe Leu Ile Ile Ser Ser Val Ala Ser Leu *
 500 505

<210> 7

<211> 509

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<220>

<221> CARBOHYD

<222> 82, 166, 235, 254, 368, 393, 490

<400> 7

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

195	200	205
Leu Leu Arg Pro Asn His	Leu Trp Gly Tyr Tyr	Leu Phe Pro Asp Cys
210	215	220
Tyr Asn His His Tyr Lys	Lys Pro Gly Tyr Asn	Gly Ser Cys Phe Asn
225	230	235
Val Glu Ile Lys Arg Asn	Asp Asp Leu Ser Trp	Leu Trp Asn Glu Ser
245	250	255
Thr Ala Leu Tyr Pro Ser	Ile Tyr Leu Asn Thr	Gln Gln Ser Pro Val
260	265	270
Ala Ala Thr Leu Tyr Val	Arg Asn Arg Val Arg	Glu Ala Ile Arg Val
275	280	285
Ser Lys Ile Pro Asp Ala	Lys Ser Pro Leu Pro	Val Phe Ala Tyr Thr
290	295	300
Arg Ile Val Phe Thr Asp	Gln Val Leu Lys Phe	Leu Ser Gln Asp Glu
305	310	315
Leu Val Tyr Thr Phe Gly	Glu Thr Val Ala Leu	Gly Ala Ser Gly Ile
325	330	335
Val Ile Trp Gly Thr Leu	Ser Ile Met Arg Ser	Met Lys Ser Cys Leu
340	345	350
Leu Leu Asp Asn Tyr Met	Glu Thr Ile Leu Asn	Pro Tyr Ile Ile Asn
355	360	365
Val Thr Leu Ala Ala Lys	Met Cys Ser Gln Val	Leu Cys Gln Glu Gln
370	375	380
Gly Val Cys Ile Arg Lys	Asn Trp Asn Ser Ser	Asp Tyr Leu His Leu
385	390	395
Asn Pro Asp Asn Phe Ala	Ile Gln Leu Glu Lys	Gly Gly Lys Phe Thr
405	410	415
Val Arg Gly Lys Pro Thr	Leu Glu Asp Leu Glu	Gln Phe Ser Glu Lys
420	425	430
Phe Tyr Cys Ser Cys Tyr	Ser Thr Leu Ser Cys	Lys Glu Lys Ala Asp
435	440	445
Val Lys Asp Thr Asp Ala	Val Asp Val Cys Ile	Ala Asp Gly Val Cys
450	455	460
Ile Asp Ala Phe Leu Lys	Pro Pro Met Glu Thr	Glu Glu Pro Gln Ile
465	470	475
Phe Tyr Asn Ala Ser Pro	Ser Thr Leu Ser Ala	Thr Met Phe Ile Val
485	490	495
Ser Ile Leu Phe Leu Ile	Ile Ser Ser Val Ala	Ser Leu
500	505	

<210> 8

<211> 34

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi ngược để sinh ra neo bám GPI thiếu N483
và kết thúc tại Y482 với vị trí BamHI tại đầu 5'

<400> 8
 aattggatcc tcagtagaaa atttgaggtt cttc 34

<210> 9
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi ngược để sinh ra neo bám GPI thiếu Y482
 và kết thúc tại F481 với vị trí BamHI tại đầu 5'

<400> 9
 aattggatcc tcagaaaatt tgaggttctt ctg 33

<210> 10
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi ngược để sinh ra neo bám GPI thiếu F481
 và kết thúc tại I480 với vị trí BamHI tại đầu 5'

<400> 10
 aattggatcc tcaaatttga ggttcttctg tctc 34

<210> 11
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi ngược để sinh ra neo bám GPI thiếu I480
 và kết thúc tại Q479 với vị trí BamHI tại đầu 5'

<400> 11
 aattggatcc tcattgaggt tcttctgtct cc 32

<210> 12
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi ngược để sinh ra neo bám GPI thiếu Q479
 và kết thúc tại P478 với vị trí BamHI tại đầu 5'

<400> 12
 aattggatcc tcaaggttct tctgtctcca tg 32

<210> 13
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mồi ngược để sinh ra neo bám GPI thiếu P478
 và kết thúc tại E477 với vị trí BamHI tại đầu 5'

<400> 13
 aattggatcc tcattcttct gtctccatgg g 31

<210> 14
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mồi xuôi với vị trí giới hạn NheI tại đầu 5'

<400> 14
 aattgctagc atgggagtg c taaaattcaa gc 32

<210> 15
 <211> 1473
 <212> ADN
 <213> Người hiện đại

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)...(1473)
 <223> sHASEGP lên đến P478 và được gắn thẻ His

<400> 15
 atg gga gtg cta aaa ttc aag cac atc ttt ttc aga agc ttt gtt aaa 48
 Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
 1 5 10 15

tca agt gga gta tcc cag ata gtt ttc acc ttc ctt ctg att cca tgt 96
 Ser Ser Gly Val Ser Gln Ile Val Phe Thr Phe Leu Leu Ile Pro Cys
 20 25 30

tgc ttg act ctg aat ttc aga gca cct cct gtt att cca aat gtg cct 144
 Cys Leu Thr Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro
 35 40 45

ttc ctc tgg gcc tgg aat gcc cca agt gaa ttt tgt ctt gga aaa ttt 192

Phe	Leu	Trp	Ala	Trp	Asn	Ala	Pro	Ser	Glu	Phe	Cys	Leu	Gly	Lys	Phe		
50						55					60						
gat	gag	cca	cta	gat	atg	agc	ctc	ttc	tct	ttc	ata	gga	agc	ccc	cga	240	
Asp	Glu	Pro	Leu	Asp	Met	Ser	Leu	Phe	Ser	Phe	Ile	Gly	Ser	Pro	Arg		
65					70				75						80		
ata	aac	gcc	acc	ggg	caa	ggg	gtt	aca	ata	ttt	tat	gtt	gat	aga	ctt	288	
Ile	Asn	Ala	Thr	Gly	Gln	Gly	Val	Thr	Ile	Phe	Tyr	Val	Asp	Arg	Leu		
				85				90						95			
ggc	tac	tat	cct	tac	ata	gat	tca	atc	aca	gga	gta	act	gtg	aat	gga	336	
Gly	Tyr	Tyr	Pro	Tyr	Ile	Asp	Ser	Ile	Thr	Gly	Val	Thr	Val	Asn	Gly		
			100				105					110					
gga	atc	ccc	cag	aag	att	tcc	tta	caa	gac	cat	ctg	gac	aaa	gct	aag	384	
Gly	Ile	Pro	Gln	Lys	Ile	Ser	Leu	Gln	Asp	His	Leu	Asp	Lys	Ala	Lys		
		115					120				125						
aaa	gac	att	aca	ttt	tat	atg	cca	gta	gac	aat	ttg	gga	atg	gct	gtt	432	
Lys	Asp	Ile	Thr	Phe	Tyr	Met	Pro	Val	Asp	Asn	Leu	Gly	Met	Ala	Val		
	130					135				140							
att	gac	tgg	gaa	gaa	tgg	aga	ccc	act	tgg	gca	aga	aac	tgg	aaa	cct	480	
Ile	Asp	Trp	Glu	Glu	Trp	Arg	Pro	Thr	Trp	Ala	Arg	Asn	Trp	Lys	Pro		
145					150				155						160		
aaa	gat	gtt	tac	aag	aat	agg	tct	att	gaa	ttg	gtt	cag	caa	caa	aat	528	
Lys	Asp	Val	Tyr	Lys	Asn	Arg	Ser	Ile	Glu	Leu	Val	Gln	Gln	Gln	Asn		
				165					170					175			
gta	caa	ctt	agt	ctc	aca	gag	gcc	act	gag	aaa	gca	aaa	caa	gaa	ttt	576	
Val	Gln	Leu	Ser	Leu	Thr	Glu	Ala	Thr	Glu	Lys	Ala	Lys	Gln	Glu	Phe		
			180					185					190				
gaa	aag	gca	ggg	aag	gat	ttc	ctg	gta	gag	act	ata	aaa	ttg	gga	aaa	624	
Glu	Lys	Ala	Gly	Lys	Asp	Phe	Leu	Val	Glu	Thr	Ile	Lys	Leu	Gly	Lys		
		195					200				205						
tta	ctt	cgg	cca	aat	cac	ttg	tgg	ggg	tat	tat	ctt	ttt	ccg	gat	tgt	672	
Leu	Leu	Arg	Pro	Asn	His	Leu	Trp	Gly	Tyr	Tyr	Leu	Phe	Pro	Asp	Cys		
	210					215					220						
tac	aac	cat	cac	tat	aag	aaa	ccc	ggg	tac	aat	gga	agt	tgc	ttc	aat	720	
Tyr	Asn	His	His	Tyr	Lys	Lys	Pro	Gly	Tyr	Asn	Gly	Ser	Cys	Phe	Asn		
225					230				235					240			
gta	gaa	ata	aaa	aga	aat	gat	gat	ctc	agc	tgg	ttg	tgg	aat	gaa	agc	768	
Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Asn	Asp	Asp	Leu	Ser	Trp	Leu	Trp	Asn	Glu	Ser		

245	250	255	
act gct ctt tac cca tcc att tat ttg aac act cag cag tct cct gta	816		
Thr Ala Leu Tyr Pro Ser Ile Tyr Leu Asn Thr Gln Gln Ser Pro Val			
260 265 270			
gct gct aca ctc tat gtg cgc aat cga gtt cgg gaa gcc atc aga gtt	864		
Ala Ala Thr Leu Tyr Val Arg Asn Arg Val Arg Glu Ala Ile Arg Val			
275 280 285			
tcc aaa ata cct gat gca aaa agt cca ctt ccg gtt ttt gca tat acc	912		
Ser Lys Ile Pro Asp Ala Lys Ser Pro Leu Pro Val Phe Ala Tyr Thr			
290 295 300			
cgc ata gtt ttt act gat caa gtt ttg aaa ttc ctt tct caa gat gaa	960		
Arg Ile Val Phe Thr Asp Gln Val Leu Lys Phe Leu Ser Gln Asp Glu			
305 310 315 320			
ctt gtg tat aca ttt ggc gaa act gtt gct ctg ggt gct tct gga att	1008		
Leu Val Tyr Thr Phe Gly Glu Thr Val Ala Leu Gly Ala Ser Gly Ile			
325 330 335			
gta ata tgg gga acc ctc agt ata atg cga agt atg aaa tct tgc ttg	1056		
Val Ile Trp Gly Thr Leu Ser Ile Met Arg Ser Met Lys Ser Cys Leu			
340 345 350			
ctc cta gac aat tac atg gag act ata ctg aat cct tac ata atc aac	1104		
Leu Leu Asp Asn Tyr Met Glu Thr Ile Leu Asn Pro Tyr Ile Ile Asn			
355 360 365			
gtc aca cta gca gcc aaa atg tgt agc caa gtg ctt tgc cag gag caa	1152		
Val Thr Leu Ala Ala Lys Met Cys Ser Gln Val Leu Cys Gln Glu Gln			
370 375 380			
gga gtg tgt ata agg aaa aac tgg aat tca agt gac tat ctt cac ctc	1200		
Gly Val Cys Ile Arg Lys Asn Trp Asn Ser Ser Asp Tyr Leu His Leu			
385 390 395 400			
aac cca gat aat ttt gct att caa ctt gag aaa ggt gga aag ttc aca	1248		
Asn Pro Asp Asn Phe Ala Ile Gln Leu Glu Lys Gly Gly Lys Phe Thr			
405 410 415			
gta cgt gga aaa ccg aca ctt gaa gac ctg gag caa ttt tct gaa aaa	1296		
Val Arg Gly Lys Pro Thr Leu Glu Asp Leu Glu Gln Phe Ser Glu Lys			
420 425 430			
ttt tat tgc agc tgt tat agc acc ttg agt tgt aag gag aaa gct gat	1344		
Phe Tyr Cys Ser Cys Tyr Ser Thr Leu Ser Cys Lys Glu Lys Ala Asp			
435 440 445			

gta aaa gac act gat gct gtt gat gtg tgt att gct gat ggt gtc tgt 1392
 Val Lys Asp Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala Asp Gly Val Cys
 450 455 460

ata gat gct ttt cta aaa cct ccc atg gag aca gaa gaa cct gga tcc 1440
 Ile Asp Ala Phe Leu Lys Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro Gly Ser
 465 470 475 480

ggc tct ggt gct cac cat cac cat cac cat taa 1473
 Gly Ser Gly Ala His His His His His His *

<210> 16

<211> 490

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 16

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

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

<210> 17

<211> 39

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mối SpacerHisFor

<400> 17

ataattggat ccggttcttg tgctcaccat caccatcac

39

<210> 18

<211> 38

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mối SpacerHisRev

<400> 18

tataattgcg gccgcctaata ggtgatggatg atggatgag

38

<210> 19

<211> 30

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mối ngược đầu 3' không có codon kết thúc để sinh ra sản phẩm cắt cụt HIS-sHASEGP

thiếu neo bám GPI và kết thúc tại N 483

<400> 19

aatggatcca ttgtagaaaa ttgaggttc

30

<210> 20

<211> 30

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mối ngược đầu 3' không có codon kết thúc để sinh ra sản phẩm cắt cụt HIS-sHASEGP

thiếu neo bám GPI và kết thúc tại Y 482

<400> 20

aatggatccg tagaaaattt gaggttcttc

30

<210> 21

<211> 30

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mối ngược đầu 3' không có codon kết thúc để sinh ra sản phẩm cắt cụt HIS-sHASEGP

thiếu neo bám GPI và kết thúc tại F 481

<400> 21

aattggatcc gaaaatttga ggttcttctg

30

<210> 22

<211> 30

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mồi ngược đầu 3' không có codon kết thúc để sinh ra sản phẩm cắt cụt HIS-sHASEGP

thiếu neo bám GPI và kết thúc tại I 480

<400> 22

atttgatcca atttgaggtt cttctgtctc

30

<210> 23

<211> 29

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mồi ngược đầu 3' không có codon kết thúc để sinh ra sản phẩm cắt cụt HIS-sHASEGP

thiếu neo bám GPI và kết thúc tại Q 479

<400> 23

aattggatcc ttgaggttct tctgtctcc

29

<210> 24

<211> 29

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mồi ngược đầu 3' không có codon kết thúc để sinh ra sản phẩm cắt cụt HIS-sHASEGP

thiếu neo bám GPI và kết thúc tại P 478

<400> 24

aattggatcc aggttcttct gtctccatg

29

<210> 25

<211> 28

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mồi ngược đầu 3' không có codon kết thúc để sinh ra sản phẩm cắt cụt HIS-sHASEGP

thiếu neo bám GPI và kết thúc tại E 477

<400> 25

aattggatcc ttcttctgtc tccatggg	28
<210> 26	
<211> 36	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> Mời ngược để khuếch đại đột biến khuyết SHASEGP kết thúc tại A 467	
<400> 26	
aattggatcc ctaagcatct atacagacac catcag	36
<210> 27	
<211> 35	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> Mời ngược để khuếch đại đột biến khuyết SHASEGP kết thúc tại A 447	
<400> 27	
aattggatcc ctaagctttc tccttacaac tcaag	35
<210> 28	
<211> 34	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> Mời ngược để khuếch đại đột biến khuyết SHASEGP kết thúc tại S 430	
<400> 28	
aattggatcc ctaagaaaat tgctccaggt cttc	34
<210> 29	
<211> 36	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> Mời ngược để khuếch đại đột biến khuyết SHASEGP kết thúc tại G 413	
<400> 29	
aattggatcc ctatccacct ttctcaagtt gaatag	36

<210> 30

<211> 36

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mời ngược để khuếch đại đột biến khuyết SHASEGP
kết thúc tại S 394

<400> 30

aattggatcc ctatgaattc cagtttttcc ttatac

36

<210> 31

<211> 35

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mời ngược để khuếch đại đột biến khuyết SHASEGP
kết thúc tại A 372

<400> 31

aattggatcc ctatgctagt gtgacgttga ttatg

35

<210> 32

<211> 33

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mời ngược để khuếch đại đột biến khuyết SHASEGP
kết thúc tại S 347

<400> 32

aattggatcc ctaacttcgc attatactga ggg

33

<210> 33

<211> 29

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mời xuôi LN cho sự gây đột biến nhầm vị trí để
sinh ra sự dung hợp SHASEGP với trình tự dẫn đầu kappa có L 36
là axit amin SHASEGP thứ nhất sau trình tự dẫn đầu kappa

<400> 33
ctgaatttca gagcacctcc tgttattcc

29

<210> 34
<211> 28
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Mời xuôi FR cho sự gây đột biến nhằm vị trí để
sinh ra sự dung hợp SHASEGP với trình tự dẫn đầu kappa có F 38
à axit amin SHASEGP thứ nhất sau trình tự dẫn đầu kappa

<400> 34
ttcagagcac ctctgttat tccaaatg

28

<210> 35
<211> 23
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Mời ngược Asp cho sự gây đột biến nhằm vị trí để
sinh ra sự dung hợp SHASEGP với trình tự dẫn đầu kappa có
Asp là axit amin trình tự dẫn đầu Kappa cuối cùng trước L
36 hoặc F 38 của PH-20

<400> 35
gtcaccagtg gaacctggaa ccc

23

<210> 36
<211> 24
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Mời ngược Gly cho sự gây đột biến nhằm vị trí để
sinh ra sự dung hợp SHASEGP với trình tự dẫn đầu kappa có
Gly là axit amin trình tự dẫn đầu Kappa cuối cùng trước L
36 hoặc F 38 của PH-20

<400> 36
accagtggaa cctggaaccc agag

24

<210> 37
<211> 30
<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mời xuôi cho đoạn thứ nhất của trình tự dẫn đầu kappa

<400> 37

gagacagaca cactcctgct atgggtactg

30

<210> 38

<211> 30

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mời ngược cho đoạn thứ nhất của trình tự dẫn đầu kappa

<400> 38

cccagagcag cagtacccat agcaggagtg

30

<210> 39

<211> 30

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mời xuôi cho đoạn thứ hai của trình tự dẫn đầu kappa

<400> 39

ggtactgctg ctctgggttc caggttcac

30

<210> 40

<211> 27

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mời ngược cho đoạn thứ hai của trình tự dẫn đầu kappa

<400> 40

gcgtcaccag tggaacctgg aacccag

27

<210> 41

<211> 30

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mời xuôi Nhe cho trình tự dẫn đầu kappa

<400> 41
 attgctagca tggagacaga cacactcctg 30

<210> 42
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mời ngược EcoR1 cho trình tự dẫn đầu kappa

<400> 42
 aattgaattc gtcaccagtg gaacctgg 28

<210> 43
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự dẫn đầu chuỗi IgK của chuột

<400> 43
 Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
 1 5 10 15
 Gly Ser Thr Gly Asp
 20

<210> 44
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mời xuôi K-leader SPE 1 FORWARD

<400> 44
 actcactagt gctagcatgg agacagacac 30

<210> 45
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mời K-leader MLU1 REV

<400> 45

aattacgct gaattcgtca ccagtggaaac

30

<210> 46

<211> 462

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Protein dung hợp trình tự dẫn đầu Kappa với sHASEGP có F 38
là axit amin đầu tiên của sHASEGP được tiết giả định là thành thực
(lên đến P478)

<400> 46

```

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

```

```

      275      280      285
Arg Ile Val Phe Thr Asp Gln Val Leu Lys Phe Leu Ser Gln Asp Glu
 290      295      300
Leu Val Tyr Thr Phe Gly Glu Thr Val Ala Leu Gly Ala Ser Gly Ile
 305      310      315      320
Val Ile Trp Gly Thr Leu Ser Ile Met Arg Ser Met Lys Ser Cys Leu
      325      330      335
Leu Leu Asp Asn Tyr Met Glu Thr Ile Leu Asn Pro Tyr Ile Ile Asn
      340      345      350
Val Thr Leu Ala Ala Lys Met Cys Ser Gln Val Leu Cys Gln Glu Gln
      355      360      365
Gly Val Cys Ile Arg Lys Asn Trp Asn Ser Ser Asp Tyr Leu His Leu
      370      375      380
Asn Pro Asp Asn Phe Ala Ile Gln Leu Glu Lys Gly Gly Lys Phe Thr
 385      390      395      400
Val Arg Gly Lys Pro Thr Leu Glu Asp Leu Glu Gln Phe Ser Glu Lys
      405      410      415
Phe Tyr Cys Ser Cys Tyr Ser Thr Leu Ser Cys Lys Glu Lys Ala Asp
      420      425      430
Val Lys Asp Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala Asp Gly Val Cys
      435      440      445
Ile Asp Ala Phe Leu Lys Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro
      450      455      460

```

<210> 47

<211> 40

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mỗi 3' BAM REV SHASEGP có neo bám GPI len đến L
509 bao gồm mã kết thúc

<400> 47

aattggatcc ctacagaaga aatgataaga aacaaaatac

40

<210> 48

<211> 1449

<212> ADN

<213> Người hiện đại

<400> 48

```

atgggagtg taaaattcaa gcacatcttt ttcagaagct ttgttaaadc aagtggagta 60
tcccagatag ttttcacctt ctttctgatt ccatgttgct tgactctgaa tttcagagca 120
cctcctgtta ttccaaatgt gcctttcctc tgggcctgga atgcccgaag tgaattttgt 180
cttggaatgt ttgatgagcc actagatatg agcctcttct ctttcatagg aagccccga 240
ataaacgcca cgggcaagg tggtacaata ttttatgttg atagacttgg ctactatcct 300
tacatagatt caatcacagg agtaactgtg aatggaggaa tccccagaa gatttcctta 360

```

```

caagaccatc tggacaaagc taagaaagac attacatttt atatgccagt agacaatttg 420
ggaatggctg ttattgactg ggaagaatgg agaccactt gggcaagaaa ctggaaacct 480
aaagatgttt acaagaatag gtctattgaa ttggttcagc aacaaaatgt acaacttagt 540
ctcacagagg ccactgagaa agcaaaacaa gaatttgaaa aggcagggaa ggatttcctg 600
gtagagacta taaaattggg aaaattactt cggccaaatc acttgtaggg ttattatctt 660
tttccggatt gttacaacca tcactataag aaaccgggtt acaatggaag ttgcttcaat 720
gtagaaataa aaagaaatga tgatctcagc tgggttgtag atgaaagcac tgctctttac 780
ccatccattt atttgaacac tcagcagtct cctgtagctg ctacactcta tgtgcgcaat 840
cgagttcggg aagccatcag agtttccaaa atacctgatg caaaaagtcc acttccgggtt 900
tttgcatata cccgcatagt ttttactgat caagttttga aattcctttc tcaagatgaa 960
cttgtgtata catttggcga aactgttgct ctgggtgctt ctggaattgt aatatgggga 1020
accctcagta taatgcgaag tatgaaatct tgcttgctcc tagacaatta catggagact 1080
atactgaatc cttacataat caacgtcaca ctagcagcca aaatgtgtag ccaagtgcctt 1140
tgccaggagc aaggagtgtg tataaggaaa aactggaatt caagtgacta tcttcacctc 1200
aaccagata attttgctat tcaacttgag aaaggtggaa agttcacagt acgtggaaaa 1260
ccgacattg aagacctgga gcaattttct gaaaaatttt attgcagctg ttatagcacc 1320
ttgagttgta aggagaaagc tgatgtaaaa gacactgatg ctgttgatgt gtgtattgct 1380
gatgggtgtc gtatagatgc ttttctaaaa cctcccatgg agacagaaga acctcaaatt 1440
ttctactaa 1449

```

<210> 49

<211> 467

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 49

```

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

```

```

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

```

<210> 50

<211> 1536

<212> ADN

<213> Người hiện đại

<400> 50

```

atgggagtg taaaattcaa gcacatcttt ttcagaagct ttgttaaadc aagtggagta 60
tcccagatag ttttcacctt cttctgatt ccatgttgct tgactctgaa tttcagagca 120
cctcctgtta ttccaaatgt gcctttcctc tgggcctgga atgccccaaag tgaattttgt 180
cttggaataa ttgatgagcc actagatatg agcctcttct ctttcatagg aagccccga 240

```

```

ataaacgccca ccgggcaagg tgttacaata ttttatgttg atagacttgg ctactatcct 300
tacatagatt caatcacagg agtaactgtg aatggaggaa tccccagaa gatttcctta 360
caagaccatc tggacaaagc taagaaagac attacatfff atatgccagt agacaatttg 420
ggaatggctg ttattgactg ggaagaatgg agaccactt gggcaagaaa ctggaaacct 480
aaagatgttt acaagaatag gtctattgaa ttggttcagc aaaaaaatgt acaacttagt 540
ctcacagagg ccactgagaa agcaaaacaa gaatttgaaa aggcagggaa ggatttcctg 600
gtagagacta taaaattggg aaaattactt cggccaaatc acttgtgggg ttattatcct 660
tttccggatt gttacaacca tcactataag aaacccggtt acaatggaag ttgcttcaat 720
gtagaaataa aaagaaatga tgatctcagc tggttgtgga atgaaagcac tgcctcttac 780
ccatccatff atttgaacac tcagcagtct cctgtagctg ctacactcta tgtgcgcaat 840
cgagttcggg aagccatcag agtttccaaa atacctgatg caaaaagtcc acttccggtt 900
tttgcataata cccgcatagt ttttactgat caagttttga aattcctttc tcaagatgaa 960
cttgtgtata catttggcga aactgttgct ctgggtgctt ctggaattgt aatatgggga 1020
accctcagta taatgcgaag tatgaaatct tgcttgctcc tagacaatta catggagact 1080
atactgaatc cttacataat caacgtcaca ctagcagcca aaatgtgtag ccaagtgcct 1140
tgccaggagc aaggagtgtg tataaggaaa aactggaatt caagtgacta tcttcacctc 1200
aaccagata attttgctat tcaacttgag aaaggtggaa agttcacagt acgtggaaaa 1260
ccgacacttg aagacctgga gcaattttct gaaaaatttt attgcagctg ttatagcacc 1320
ttgagttgta aggagaaagc tgatgtaaaa gacactgatg ctgttgatgt gtgtattgct 1380
gatgggtgct gtatagatgc ttttctaaaa cctcccatgg agacagaaga acctcaaatt 1440
ttctacaatg cttcacctc cacactatct gccacaatgt tcatttggag gctggaagtc 1500
tgggatcaag gtattagcag aattggtttc ttctga 1536

```

<210> 51

<211> 6630

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Vector plasmit HZ24

<400> 51

```

tcaatattgg ccattagcca tattattcat tggttatata gcataaatca atattggcta 60
ttggccattg catacgttgt atctatatca taatatgtac atttatattg gctcatgtcc 120
aatatgaccg ccattgttggc attgattatt gactagttat taatagtaat caattacggg 180
gtcattagtt catagcccat atatggagtt ccgcgttaca taacttacgg taaatggccc 240
gcctggctga ccgccaacg accccgccc attgacgtca ataatgacgt atgttcccat 300
agtaacgccca atagggactt tccattgacg tcaatgggtg gagtatttac ggtaaactgc 360
ccacttggca gtacatcaag tgtatcatat gccaaagtcc cccctattg acgtcaatga 420
cggtaaatgg cccgcctggc attatgcccc gtacatgacc ttacgggact ttcctacttg 480
gcagtacatc tacgtattag tcatcgctat taccatgggt atgcggtttt ggcagtacac 540
caatgggcgt ggatagcggg ttgactcacg gggatttcca agtctccacc ccattgacgt 600
caatggggagt ttgttttggc accaaaatca acgggacttt caaaatgtc gtaataaccc 660
cgccccgttg acgcaaatgg gcggtaggcg tgtacgggtg gaggtctata taagcagagc 720
tcgttttagtg aaccgtcaga tcactagaag ctttatttgc gtagttttat acagttaaat 780
tgctaacgca gtcagtgcct ctgacacaac agtctcgaac ttaagctgca gaagttggct 840
gtgaggcact gggcaggtaa gtatcaaggt tacaagacag gtttaaggag accaatagaa 900
actgggcttg tcgagacaga gaagactctt gcgtttctga taggcaccta ttggtcttac 960

```

tgacatccac	tttgcctttc	tctccacagg	tgtccactcc	cagttcaatt	acagctctta	1020
aggctagagt	acttaatacg	actcactata	ggctagcatg	ggagtgctaa	aattcaagca	1080
catctttttc	agaagccttg	ttaaatacaag	tggagtatcc	cagatagttt	tcaccttcct	1140
tctgattcca	tgttgcttga	ctctgaatth	cagagcacct	cctgttattc	caaagtgtcc	1200
tttcctctgg	gcctggaatg	ccccaaagtga	attttgtctt	ggaaaatttg	atgagccact	1260
agatatgagc	ctcttctctt	tcataggaag	ccccgaata	aacgccaccg	ggcaagggtg	1320
tacaataatt	tatgttgata	gacttgggcta	ctatccttac	atagattcaa	tcacaggagt	1380
aactgtgaat	ggaggaatcc	cccagaagat	ttccttacaa	gaccatctgg	acaaagctaa	1440
gaaagacatt	acattttata	tgccagtaga	caatttggga	atggctgtta	ttgactggga	1500
agaatggaga	cccacttggg	caagaaactg	gaaacctaaa	gatgtttaca	agaataggct	1560
tattgaattg	gttcagcaac	aaaatgtaca	acttagtctc	acagaggcca	ctgagaaagc	1620
aaaacaagaa	tttgaagagg	cagggaagga	tttcctggta	gagactataa	aattgggaaa	1680
attacttcgg	ccaaatcact	tgtgggggta	ttatcttttt	ccggattgtt	acaaccatca	1740
ctataagaaa	cccggttaca	atggaagtgt	cttcaatgta	gaaataaaaa	gaaatgatga	1800
tctcagctgg	ttgtggaatg	aaagcactgc	tctttaccca	tccattttatt	tgaacactca	1860
gcagtctcct	gtagctgcta	cactctatgt	gcgcaatcga	gttcgggaag	ccatcagagt	1920
ttccaaaata	cctgatgcaa	aaagtccact	tccggttttt	gcataatccc	gcatagtttt	1980
tactgatcaa	gttttgaaat	tcctttctca	agatgaactt	gtgtatacat	ttggcgaaac	2040
tgttgctctg	gggtctcttg	gaattgtaat	atgggggaacc	ctcagtataa	tgcgaagtat	2100
gaaatcttgc	ttgtctctag	acaattacat	ggagactata	ctgaatcctt	acataatcaa	2160
cgtcacacta	gcagccaaaa	tgtgtagcca	agtgttttgc	caggagcaag	gagtgtgtat	2220
aaggaaaaac	tgggaattcaa	gtgactatct	tcacctcaac	ccagataatt	ttgtatttca	2280
acttgagaaa	gggtggaaagt	tcacagtagc	tggaaaaccg	acacttgaag	acctggagca	2340
atthttctgaa	aaatthttatt	gcagctgtta	tagcaccttg	agttgttaagg	agaaagctga	2400
tgtaaaagac	actgatgctg	ttgatgtgtg	tattgtctgat	gggtgtctgta	tagatgcttt	2460
tctaaaacct	cccatggaga	cagaagaacc	tcaaatthttc	tactagggat	ccatagctaa	2520
cgcccccttc	cctccccccc	ccctaactgt	actggccgaa	gccgcttgga	ataaggccgg	2580
tgtgcgtttg	tctatatgtt	atthttccacc	atattgcccgt	ctthttggcaa	tgtgaggggc	2640
cggaaacctg	gccctgtctt	cttgacgagc	attcctagggt	gtctthttccc	tctcgccaaa	2700
ggaatgcaag	gtctgttgaa	tgtcgtgaag	gaagcagttc	ctctggaagc	ttcttgaaga	2760
caaacaacct	ctgtagcgac	cctthtgagg	cagcggaacc	ccccacctgg	cgacagggtg	2820
ctctgcccgc	aaaagccacg	tgtataagat	acacctgcaa	aggcggcaca	accccgatgc	2880
cacgttgtga	gttggaatgt	tgtggaaaaga	gtcaaatggc	tctcctcaag	cgtattcaac	2940
aaggggctga	aggatgccca	gaaggtagcc	cattgtatgg	gatctgatct	ggggcctcgg	3000
tgcacatgct	ttacatgtgt	ttagtcgagg	ttaaaaaaac	gtctaggccc	cccgaaccac	3060
ggggacgtgg	ttthccttht	aaaaacacga	tgataagctt	gccacaaccc	acagcgcccg	3120
ctgccatcat	ggttcgacca	ttgaactgca	tcgtcgccgt	gtcccaaaat	atggggattg	3180
gcaagaacgg	agacctaccc	tggcctccgc	tcaggaacga	gttcaagtac	ttccaaagaa	3240
tgaccacaac	ctcttcagtg	gaaggtaaac	agaatctggg	gattatgggt	aggaaaacct	3300
ggttctccat	tcctgagaag	aatcgacctt	taaaggacag	aattaatata	gttctcagta	3360
gagaactcaa	agaaccacca	cgaggagctc	atthttcttgc	caaaagttht	gatgatgcct	3420
taagacttat	tgaacaacgg	gaattggcaa	gtaaaagtaga	catggthttg	atagtcggag	3480
gcagttctgt	ttaccaggaa	gccatgaatc	aaccaggcca	cctcagactc	tttgtgacaa	3540
ggatcatgca	ggaatttgaa	agtgcacagt	ttthcccaga	aattgatttg	gggaaatata	3600
aactthctcc	agaataccca	ggcgtcctct	ctgagggtcca	ggaggaaaaa	ggcatcaagt	3660
ataagthttga	agthctacgag	aagaaagact	aaacgcgtgg	tacctctaga	gtcgacccgg	3720
gcggccgctt	cgagcagaca	tgataagata	cattgatgag	thttggacaaa	ccacaactag	3780
aatgcagtga	aaaaaatgct	ttatthgtga	aattthgtgat	gctattgctt	tatthgtaac	3840
cattataagc	tgaataaac	aagthtaacaa	caacaattgc	attcattthta	tgtthtcagg	3900

tcagggggag	atgtgggagg	ttttttaag	caagtaaac	ctctacaaat	gtggtaaaat	3960
cgataaggat	ccgggctggc	gtaatagcga	agaggcccgc	accgatcgcc	cttcccaaca	4020
gttgcgagc	ctgaatggcg	aatggacgcg	ccctgtagcg	gcgcattaag	cgcggggggt	4080
gtgggtggtta	cgcgacgcgt	gaccgctaca	cttgccagcg	ccctagcgcc	cgctcctttc	4140
gctttcttcc	cttcctttct	cgccacgttc	gccggctttc	cccgtcaagc	tctaaatcgg	4200
gggctccctt	tagggttccg	athtagtgct	ttacggcacc	tcgaccccaa	aaaacttgat	4260
tagggatgatg	gttcacgtag	tgggccatcg	ccctgataga	cggtttttcg	ccctttgacg	4320
ttggagtcca	cgttctttaa	tagtggactc	ttgttccaaa	ctggaacaac	actcaaccct	4380
atctcggctct	attcctttga	tttataaggg	atthttgccga	tttcggccta	ttggttaaaa	4440
aatgagctga	tttaacaaaa	atttaacgcg	aattttaaca	aaatattaac	gcttacaatt	4500
tcctgatgcg	gtattttctc	cttacgcac	tgtgcgggtat	ttcacaccgc	atatgggtgca	4560
ctctcagtac	aatctgctct	gatgccgat	agttaagcca	gccccgacac	ccgccaacac	4620
ccgctgacgc	gccctgacgg	gcttgtctgc	tcccggcatc	cgcttacaga	caagctgtga	4680
ccgtctccgg	gagctgcatg	tgtcagaggt	tttcaccgtc	atcaccgaaa	cgcgcgagac	4740
gaaagggcct	cgtgatacgc	ctatttttat	aggttaatgt	catgataata	atggtttctt	4800
agacgtcagg	tggcactttt	cggggaaatg	tgcgcggaac	ccctatttgt	ttatttttct	4860
aaatacattc	aaatatgtat	ccgctcatga	gacaataacc	ctgataaatg	cttcaataat	4920
attgaaaaag	gaagagtatg	agtattcaac	atthccgtgt	cgcccttatt	cccttttttg	4980
cggcattttg	ccttcctgtt	tttgctcacc	cagaaaacgt	ggtgaaagta	aaagatgctg	5040
aagatcagtt	gggtgcacga	gtgggttaca	tcgaactgga	tctcaacagc	ggtaagatcc	5100
ttgagagttt	tcgccccgaa	gaacgttttc	caatgatgag	cactttttaa	gttctgctat	5160
gtggcgcggt	attatcccgt	attgacgccg	ggcaagagca	actcggtcgc	cgcatacact	5220
attctcagaa	tgacttggtt	gagtactcac	cagtcacaga	aaagcatctt	acggatggca	5280
tgacagtaag	agaattatgc	agtgtgcca	taaccatgag	tgataaact	gcgccaact	5340
tacttctgac	aacgatcgga	ggaccgaagg	agctaaccgc	ttttttgcac	aacatggggg	5400
atcatgtaac	tcgccttgat	cgthgggaac	cggagctgaa	tgaagccata	ccaaacgacg	5460
agcgtgacac	cacgatgcct	gtagcaatgg	caacaacgtt	gcgcaaaacta	ttaactggcg	5520
aactacttac	tctagcttcc	cggcaacaat	taatagactg	gatggaggcg	gataaagtgt	5580
caggaccact	tctgcgctcg	gcccttcggg	ctggctggtt	tattgctgat	aaatctggag	5640
ccggtgagcg	tgggtctcgc	ggtatcattg	cagcactggg	gccagatggt	aagccctccc	5700
gtatcgtagt	tatctacacg	acggggagtc	aggcaactat	ggatgaacga	aatagacaga	5760
tcgctgagat	aggtgcctca	ctgattaagc	attggtaact	gtcagaccaa	gtttactcat	5820
atatacttta	gattgattta	aaacttcatt	tttaatttaa	aaggatctag	gtgaagatcc	5880
tttttgataa	tctcatgacc	aaaatccctt	aacgtgagtt	ttcgttccac	tgagcgtcag	5940
accccgtaga	aaagatcaaa	ggatcttctt	gagatccttt	ttttctgcgc	gtaatctgct	6000
gcttgcaaac	aaaaaaacca	ccgctaccag	cgggtggtttg	tttgccggat	caagagctac	6060
caactctttt	tccgaaggta	actggcttca	gcagagcgca	gataccaaat	actgttcttc	6120
tagtgtagcc	gtagttaggc	caccacttca	agaactctgt	agcaccgcct	acatacctcg	6180
ctctgctaatt	cctgttacca	gtggctgctg	ccagtggcga	taagtcgtgt	cttaccgggt	6240
tggactcaag	acgatagtta	ccggataagg	cgagcggtc	gggctgaacg	gggggttcgt	6300
gcacacagcc	cagcttgag	cgaacgacct	acaccgaact	gagataccta	cagcgtgagc	6360
tatgagaaaag	cgccacgctt	cccgaaggga	gaaaggcgga	caggatatccg	gtaagcggca	6420
gggtcggaac	aggagagcgc	acgaggagc	ttccaggggg	aaacgcctgg	tatctttata	6480
gtcctgtcgg	gtttcgccac	ctctgacttg	agcgtcgatt	tttgtgatgc	tcgtcagggg	6540
ggcggagcct	atggaaaaac	gccagcaacg	cggccttttt	acggttcctg	gccttttgct	6600
ggccttttgc	tcacatggct	cgacagatct				6630

<211> 2009
 <212> ADN
 <213> Người hiện đại

<400> 52

atgtggctca	cataaattca	gaaagtatga	tagcagtgtg	ggtgggtagc	agcacctcat	60
aaggtccttc	ctagcaaggc	aaagggatgc	taatgactag	ccaatgctct	aggaagacat	120
tgagaccagc	caacttcttg	ccttgataac	tactgaagag	acattgggtg	gctggatttt	180
gaaagcagac	ttctggttat	aggtgatgca	acttgaaaaa	caatcctgaa	acatgaaaca	240

agaataataa	tattttaaag	taacttaatc	attatacctc	tttatccatc	aaagtgaatt	300
cattccattc	cctttcatct	gtgctcatac	tttgcatacag	atattgggta	aaccaaagtg	360
tgtaggaaga	aataaatgtt	ttcatagtca	ttactcttta	caatgggagt	gctaaaattc	420
aagcacatct	ttttcagaag	ccttggttaa	tcaagtggag	tatcccagat	agttttcacc	480
ttccttctga	ttccatgttg	cttgactctg	aatttcagag	cacctcctgt	tattccaaat	540
gtgcctttcc	tctgggcctg	gaatgcccc	agtgaatttt	gtcttgga	atttgatgag	600
ccactagata	tgagcctctt	ctctttcata	ggaagcccc	gaataaacgc	caccgggcaa	660
ggtgttacaa	tattttatgt	tgatagactt	ggctactatc	cttacaataga	ttcaatcaca	720
ggagtaactg	tgaatggagg	aatccccag	aagatttcct	tacaagacca	tctggacaaa	780
gctaagaaag	acattacatt	ttatatgcca	gtagacaatt	tgggaatggc	tggtattgac	840
tgggaagaat	ggagaccac	ttgggcaaga	aactggaaac	ctaaagatgt	ttacaagaat	900
aggtctattg	aattgggtca	gcaacaaaat	gtacaactta	gtctcacaga	ggccactgag	960
aaagcaaac	aagaatttga	aaaggcaggg	aaggatttcc	tggtagagac	tataaaattg	1020
ggaaaattac	ttcgccaaa	tcacttgtgg	ggttattatc	ttttccgga	ttgttacaa	1080
catcactata	agaaaccggg	ttacaatgga	agttgcttca	atgtagaaat	aaaaagaaat	1140
gatgatctca	gctggttgtg	gaatgaaagc	actgctcttt	acccatccat	ttatttgaac	1200
actcagcagt	ctcctgtagc	tgctacactc	tatgtgcgca	atcgagttcg	ggaagccatc	1260
agagtttcca	aaatacctga	tgcaaaaagt	ccacttccgg	tttttgcata	taccgcata	1320
gtttttactg	atcaagtttt	gaaattcctt	tctcaagatg	aacttggtga	tacatttggc	1380
gaaactgttg	ctctgggtgc	ttctggaatt	gtaatatggg	gaaccctcag	tataatgcga	1440
agtatgaaat	cttgcttgct	cctagacaat	tacatggaga	ctatactgaa	tccttacata	1500
atcaacgtca	cactagcagc	caaaatgtgt	agccaagtgc	tttgccagga	gcaaggagtg	1560
tgtataagga	aaaactggaa	ttcaagtgc	tatcttcacc	tcaaccaga	taattttgct	1620
attcaacttg	agaaaggtgg	aaagttcaca	gtacgtggaa	aaccgacact	tgaagacctg	1680
gagcaatttt	ctgaaaaatt	ttattgcagc	tggtatagca	ccttgagttg	taaggagaaa	1740
gctgatgtaa	aagacactga	tgctgttgat	gtgtgtattg	ctgatgggtg	ctgtatagat	1800
gcttttctaa	aacctcccat	ggagacagaa	gaacctcaaa	ttttctacaa	tgcttcaccc	1860
tccacactat	ctgccacaat	gttcattgtt	agtattttgt	ttcttatcat	ttcttctgta	1920
gcgagtttgt	aattgcgcag	gttagctgaa	atgaacaata	tgtccatctt	aaagtgtgct	1980
ttttcgacta	attaaatctt	tgaaaagaa				2009

<210> 53
 <211> 2395
 <212> ADN
 <213> Người hiện đại

<400> 53

atgtggctca	cataaattca	gaaagtatga	tagcagtgtg	ggtgggtagc	agcacctcat	60
------------	------------	------------	------------	------------	------------	----

aaggtccttc	ctagcaaggg	atgctaata	ctagccaatg	ctctaggaag	acattgagac	120
cagccaactt	cttgccctga	taactactga	agagacattg	ggtggctgga	ttttgaaagc	180
agacttctgg	ttataggtga	tgcaacttga	aaaacaatcc	tgaacatga	aacaagaata	240
ataatattta	aatgtaactt	aatcattata	cctctttatc	catcaaagtg	aattcattcc	300
attccctttc	atctgtgctc	atactttgca	tcagatattg	ggtaaaccaa	agtgtgtagg	360
aagaaataaa	tgttttcata	gtcattactc	tttacaatgg	gagtgctaaa	attcaagcac	420
atctttttca	gaagctttgt	taaatcaagt	ggagtatccc	agatagtttt	caccttcctt	480
ctgattccat	gttgcttgac	tctgaatttc	agagcacctc	ctgttattcc	aaatgtgcct	540
ttctcttggg	cctggaatgc	cccaagtga	ttttgtcttg	gaaaatttga	tgagccacta	600
gatatgagcc	tcttctcttt	cataggaagc	ccccgaataa	acgccaccgg	gcaagggtgtt	660
acaatatattt	atgttgatag	acttggctac	tatccttaca	tagattcaat	cacaggagta	720
actgtgaatg	gaggaatccc	ccagaagatt	tccttacaag	accatctgga	caaagctaag	780
aaagacatta	cattttatat	gccagtagac	aatttgggaa	tggctgttat	tgactgggaa	840
gaatggagac	ccacttgggc	aagaaactgg	aaacctaag	atgtttacaa	gaataggctt	900
attgaattgg	ttcagcaaca	aaatgtacaa	cttagtctca	cagaggccac	tgagaagca	960
aaacaagaat	ttgaaaaggc	aggggaaggat	ttcctggtag	agactataaa	attgggaaaa	1020
ttacttcggc	caaatcactt	gtggggttat	tatctttttc	cggattgtta	caaccatcac	1080
tataagaaac	ccggttacaa	tgggaagttgc	ttcaatgtag	aaataaaaag	aaatgatgat	1140
ctcagctggg	tgtggaatga	aagcactgct	ctttaccat	ccatttat	gaacactcag	1200
cagtctcctg	tagctgctac	actctatgtg	cgcaatcgag	ttcgggaagc	catcagagtt	1260
tccaaaatac	ctgatgcaaa	aagtccactt	ccggtttttg	catatacccg	catagttttt	1320
actgatcaag	ttttgaaatt	cctttctcaa	gatgaacttg	tgtatacatt	tggcgaaact	1380
gttgctctgg	gtgcttctgg	aattgtaata	tggggaaccc	tcagtataat	gcgaagtatg	1440
aaatcttgct	tgctcctaga	caattacatg	gagactatac	tgaatcctta	cataatcaac	1500
gtcacactag	cagccaaaat	gtgtagccaa	gtgctttgcc	aggagcaagg	agtgtgtata	1560
aggaaaaact	ggaattcaag	tgactatctt	cacctcaacc	cagataat	tgctattcaa	1620
cttgagaaag	gtggaaagtt	cacagtacgt	ggaaaaccga	cacttgaaga	cctggagcaa	1680
ttttctgaaa	aattttattg	cagctgttat	agcaccttga	gttgtaagga	gaaagctgat	1740
gtaaaaagaca	ctgatgctgt	tgatgtgtgt	attgctgatg	gtgtctgtat	agatgctttt	1800
ctaaaacctc	ccatggagac	agaagaacct	caaattttct	acaatgcttc	accctccaca	1860
ctatctgcca	caatgttcat	ttggaggctg	gaagtctggg	atcaaggat	tagcagaatt	1920
ggtttcttct	gagagtcag	agggaataat	gtgtttcagg	cctcttcctt	tggcttacag	1980
gaaatgaaaa	aaccatgact	atcatcacca	acatccttgg	gtattaagtg	cagtcactct	2040
cctagatgct	gtggggagaa	ggcaagttac	aaagatagac	cttccctcaa	gataatcaga	2100
ttttcatggg	attatcctta	acctttttga	catcatggag	gctttgggaa	tctgatgaag	2160
cctatcaatt	ttcttcaga	agatatttat	ataagattat	aagaaaaatt	atgtacacag	2220
cttattttat	tgcattggat	caaatgccca	tttataaaga	attatgcctt	ttccatcaat	2280
tttagcatgg	aaaaataatt	tcaggcaata	tgcttaaaaa	ttgggggaag	acaaaagaaa	2340
tccatatcgt	gtaaaaaaaa	ataaat	gttttgctca	aaaaaaaaaa	aaaaa	2395