



(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)



1-0027414

(51)⁷ C07K 19/00; C07K 16/46

(13) B

(21) 1-2016-00210

(22) 14/07/2014

(86) PCT/KR2014/006328 14/07/2014

(87) WO2015/005747 15/01/2015

(30) 10-2013-0082509 12/07/2013 KR

(45) 25/02/2021 395

(43) 27/06/2016 339A

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

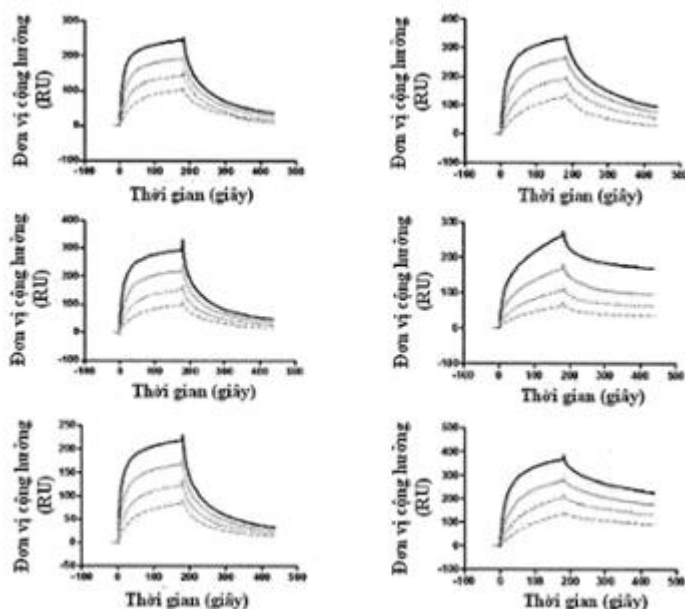
214, Muha-ro, Paltan-myeon, Hwaseong-si, Gyeonggi-do 445-858, Republic of Korea

(72) HWANG, Sang Youn (KR); LEE, Jong Soo (KR); HONG, Sung Hee (KR); CHOI, In Young (KR); JUNG, Sung Youb (KR); KWON, Se Chang (KR).

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

(54) THẺ TIẾP HỢP VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT THẺ TIẾP HỢP NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến thẻ tiếp hợp của mảnh Fc globulin miễn dịch và polypeptit có hoạt tính sinh lý, trong đó polypeptit có hoạt tính sinh lý liên kết với mảnh Fc globulin miễn dịch có vùng gắn kết FcRn thông qua góc liên kết không peptidyl và duy trì được ái lực gắn kết nội tại của mảnh Fc globulin miễn dịch, và phương pháp sản xuất thẻ tiếp hợp này.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến thể tiếp hợp của mảnh Fc globulin miễn dịch và polypeptit có hoạt tính sinh lý bao gồm polypeptit có hoạt tính sinh lý được liên kết thông qua gốc liên kết không peptidyl với mảnh Fc globulin miễn dịch có vùng gắn kết FcRn có khả năng duy trì ái lực gắn kết nội tại của mảnh Fc globulin miễn dịch này, và phương pháp sản xuất thể tiếp hợp này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các nghiên cứu khác nhau đã được thực hiện trên các thể tiếp hợp hoặc phức hợp protein bao gồm chất mang, như polyme polyetylen glycol, albumin, axit béo hoặc Fc của kháng thể (vùng hằng định), được liên kết với protein để làm tăng thời gian bán thải trong huyết thanh của protein. Cho đến nay, các nghiên cứu đã biết về các thể tiếp hợp protein hoặc phức hợp như vậy chủ yếu nhằm mục đích làm tăng thời gian bán thải trong huyết thanh của dược chất sao cho rút ngắn được số lần dùng dược chất, nhờ đó tạo điều kiện thuận lợi cho bệnh nhân. Tuy nhiên, nhiều kỹ thuật thông thường vẫn gặp phải các vấn đề như sự giảm hoạt tính của protein trị liệu do, ví dụ cản trở không gian gây ra bởi quá trình gắn kết không đặc hiệu giữa protein trị liệu và protein mang. Ngoài ra, trong trường hợp thể tiếp hợp axit béo gắn kết thuận nghịch với albumin huyết thanh để làm tăng thời gian bán thải trong huyết thanh của chúng, thì có nhược điểm là làm tăng đáng kể thời gian bán thải trong huyết thanh của dược chất protein, do khả năng thanh thải ở thận làm giảm tối đa nồng độ dược chất protein, điều này không thể tránh khỏi do quá trình gắn kết thuận nghịch giữa protein và axit béo.

Hơn nữa, đã có nhiều nỗ lực trong việc sử dụng các mảnh globulin miễn dịch để làm tăng thời gian bán thải của các chất có hoạt tính sinh lý kể cả các protein. Vùng CH2-CH3 của mảnh Fc globulin miễn dịch có vị trí gắn kết FcRn (thụ thể bảo vệ) kéo dài thời gian bán thải của kháng thể. FcRn là protein có liên quan đến MHC nhóm I biểu hiện trong các tế bào nội mô mạch máu và gắn kết với IgG và albumin. Điều đặc trưng là, IgG và FcRn gắn kết chặt chẽ với nhau ở độ pH axit yếu và tách ra khỏi nhau ở độ pH trung tính. Do đó, khi IgG đi vào các tế bào nội mô mạch từ các mạch máu bằng cách ẩm bào

hoặc nhập bào và đi vào các tiêu thể (độ pH bằng 6,0), thì nó được bảo vệ bởi FcRn mà không bị phân hủy. Nếu IgG được dung hợp với màng tế bào bằng quá trình tuần hoàn, thì nó sẽ tách ra khỏi FcRn ở độ pH bằng 7,4 và được giải phóng vào mạch máu. Do quá trình này, nên thời gian bán thải *in vivo* của IgG1, IgG2 và IgG4, chứa vị trí gắn kết FcRn, trung bình là 3 tuần, dài hơn so với thời gian bán thải của các protein khác.

Do đó, khi mảnh Fc globulin miễn dịch được liên kết với chất có hoạt tính sinh lý, thì thời gian bán thải của chất có hoạt tính sinh lý có thể được tăng lên bằng cách tuần hoàn thông qua FcRn. Liên quan tới vấn đề này, cần có nhu cầu phát triển phương pháp có khả năng duy trì ái lực gắn kết của mảnh Fc globulin miễn dịch với FcRn mà không làm giảm hoạt tính của chất có hoạt tính sinh lý khi chất có hoạt tính sinh lý này và mảnh Fc globulin miễn dịch được liên kết với nhau.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Các tác giả sáng chế đã có nhiều nỗ lực để phát triển thể tiếp hợp có thể duy trì được ái lực gắn kết nội tại của chính mảnh Fc globulin miễn dịch với FcRn mà không làm giảm hoạt tính của polypeptit có hoạt tính sinh lý và có thể tách một cách dễ dàng ra khỏi FcRn trong môi trường có độ pH trung tính. Do đó, các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng thể tiếp hợp chứa polypeptit có hoạt tính sinh lý liên kết với mảnh Fc globulin miễn dịch có vùng gắn kết FcRn thông qua gốc liên kết không peptidyl có thể duy trì được ái lực gắn kết nội tại của mảnh Fc globulin miễn dịch với FcRn và, đồng thời, có thể tách một cách dễ dàng ra khỏi FcRn ở độ pH trung tính = 7,4.

Mục đích của sáng chế là đề cập đến thể tiếp hợp của mảnh Fc globulin miễn dịch và polypeptit có hoạt tính sinh lý, trong đó polypeptit có hoạt tính sinh lý này được liên kết với mảnh Fc globulin miễn dịch có vùng gắn kết FcRn thông qua gốc liên kết không peptidyl, trong đó tỷ lệ gắn kết của lượng thể tiếp hợp gắn kết với FcRn ở độ pH bằng 6,0 và lượng thể tiếp hợp gắn kết với FcRn ở độ pH bằng 7,4 nằm trong khoảng $\pm 6\%$ tỷ lệ được xác định bằng cách đo lượng gắn kết của mảnh Fc globulin miễn dịch với FcRn trong cùng một điều kiện như đã được sử dụng đối với thể tiếp hợp này.

Sáng chế cũng đề cập đến thể tiếp hợp của mảnh Fc globulin miễn dịch và polypeptit có hoạt tính sinh lý, trong đó polypeptit có hoạt tính sinh lý này liên kết với mảnh Fc globulin miễn dịch có vùng gắn kết FcRn thông qua gốc liên kết không peptidyl,

trong đó tỷ lệ gắn kết được xác định bằng cách thể tiếp hợp gắn kết với FcRn ở độ pH bằng 6,0 và lượng thể tiếp hợp gắn kết với FcRn ở độ pH bằng 7,4 vào phương trình 1 nằm trong khoảng $\pm 6\%$ tỷ lệ gắn kết xác định được bằng cách đo lượng mảnh Fc globulin miễn dịch gắn kết với FcRn trong cùng điều kiện như đã được sử dụng đối với thể tiếp hợp này:

Phương trình 1

Tỷ lệ gắn kết (%) = (lượng gắn kết ở độ pH bằng 7,4/ lượng gắn kết ở độ pH bằng 6,0) X 100.

Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp sản xuất thể tiếp hợp của mảnh Fc globulin miễn dịch và polypeptit có hoạt tính sinh lý duy trì được ái lực gắn kết nội tại của mảnh Fc globulin miễn dịch với FcRn, phương pháp này bao gồm các bước: (a) cho polypeptit có hoạt tính sinh lý liên kết với mảnh Fc globulin miễn dịch có vùng gắn kết FcRn thông qua gốc liên kết không peptidyl để tạo ra hỗn hợp các thể tiếp hợp chứa mảnh Fc globulin miễn dịch và polypeptit có hoạt tính sinh lý; và (b) phân tách ra khỏi hỗn hợp này thể tiếp hợp chứa mảnh Fc globulin miễn dịch và polypeptit có hoạt tính sinh lý này, có tỷ lệ gắn kết nằm trong khoảng $\pm 6\%$ tỷ lệ gắn kết của mảnh Fc globulin miễn dịch, như được xác định bằng cách thể lượng gắn kết với FcRn ở độ pH bằng 6,0 và lượng gắn kết với FcRn ở độ pH bằng 7,4 vào phương trình 1.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp duy trì ái lực gắn kết nội tại của thể tiếp hợp của mảnh Fc globulin miễn dịch và polypeptit có hoạt tính sinh lý với FcRn, phương pháp này bao gồm bước cho polypeptit có hoạt tính sinh lý liên kết với mảnh Fc globulin miễn dịch chứa vùng gắn kết FcRn thông qua gốc liên kết không peptidyl.

Sáng chế cũng đề cập đến chế phẩm chứa thể tiếp hợp của mảnh Fc globulin miễn dịch và polypeptit có hoạt tính sinh lý có khả năng duy trì được ái lực gắn kết nội tại của mảnh Fc globulin miễn dịch với FcRn.

Như được mô tả nêu trên, thể tiếp hợp theo sáng chế có thể duy trì được ái lực gắn kết nội tại của mảnh Fc globulin miễn dịch với FcRn và, đồng thời, tách ra khỏi FcRn một cách dễ dàng ở độ pH trung tính như độ pH bằng 7,4. Do đó, có thể có lợi nếu nó

được sử dụng để làm tăng thời gian bán thải trong huyết thanh của polypeptit có hoạt tính sinh lý.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 là hình vẽ thể hiện quá trình tuần hoàn của protein gắn kết với FcRn.

Fig.2 là đồ thị cảm biến thể hiện khả năng gắn kết của thể tiếp hợp globulin miễn dịch-protein với FcRn ở độ pH axit.

Fig.3 là đồ thị cảm biến thể hiện khả năng gắn kết của thể tiếp hợp globulin miễn dịch-protein với FcRn ở độ pH trung tính.

Fig.4 là kết quả thử nghiệm so sánh được động học *in vivo* của thể tiếp hợp chứa mảnh globulin miễn dịch đối kháng GLP-1R.

Mô tả chi tiết sáng chế

Để đạt được các mục đích nêu trên, theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến thể tiếp hợp của mảnh Fc globulin miễn dịch và polypeptit có hoạt tính sinh lý chứa polypeptit có hoạt tính sinh lý liên kết với mảnh Fc globulin miễn dịch chứa vùng gắn kết FcRn thông qua gốc liên kết không peptidyl, trong đó tỷ lệ gắn kết của lượng thể tiếp hợp gắn kết với FcRn ở độ pH bằng 6,0 và lượng thể tiếp hợp gắn kết với FcRn ở độ pH bằng 7,4 nằm trong khoảng $\pm 6\%$ tỷ lệ được xác định bằng cách đo lượng mảnh Fc globulin miễn dịch gắn kết với FcRn trong cùng điều kiện như đã được sử dụng đối với thể tiếp hợp.

Theo một phương án, thể tiếp hợp theo sáng chế có tỷ lệ gắn kết nằm trong khoảng $\pm 6\%$ tỷ lệ gắn kết của mảnh Fc globulin miễn dịch được xác định bằng cách sử dụng phương trình:

Phương trình 1

Tỷ lệ gắn kết (%) = (lượng gắn kết ở độ pH bằng 7,4/ lượng gắn kết ở độ pH bằng 6,0) X 100.

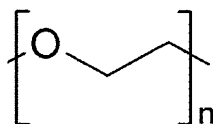
Theo phương án khác, thể tiếp hợp theo sáng chế có thể thu được bằng cách cho polypeptit có hoạt tính sinh lý có gốc liên kết không peptidyl đã được liên kết vào đó

phản ứng với mảnh Fc globulin miễn dịch ở độ pH nằm trong khoảng từ 4,0 đến 9,0, nhờ đó tạo liên kết polypeptit có hoạt tính sinh lý thông qua gốc liên kết không peptidyl với phần không chứa vùng gắn kết FcRn của mảnh Fc globulin miễn dịch.

Theo một phương án khác, gốc liên kết không peptidyl nằm trong thể tiếp hợp theo sáng chế có thể được chọn từ nhóm bao gồm polyetylen glycol, polypropylen glycol, copolyme etylen glycol-propylen glycol, rượu đa chức đã được polyoxyetyl hóa, rượu polyvinyllic, polysacarit, dextran, polyvinyl etyl ete, polyme có thể phân hủy sinh học, polyme lipid, kitin, axit hyaluronic và hỗn hợp của chúng.

Theo một phương án khác, gốc liên kết không peptidyl nằm trong thể tiếp hợp theo sáng chế có thể là polyme polyetylen glycol có công thức 1:

Công thức 1



trong đó n nằm trong khoảng từ 10 đến 2400.

Theo một phương án khác, gốc liên kết không peptidyl nằm trong thể tiếp hợp theo sáng chế có thể có nhóm phản ứng được chọn từ nhóm bao gồm nhóm aldehyt, nhóm propionaldehyt, nhóm butyraldehyt, nhóm maleimit và dẫn xuất succinimit.

Theo một phương án khác, polypeptit có hoạt tính sinh lý nằm trong thể tiếp hợp theo sáng chế có thể được chọn từ nhóm bao gồm peptit tương tự glucagon-1 (GLP-1), yếu tố kích thích tạo máu bạch cầu hạt (G-CSF), hormon sinh trưởng của người (hGH), erythropoietin (EPO), glucagon, oxyntomodulin, insulin, hormon giải phóng hormon sinh trưởng, peptit giải phóng hormon sinh trưởng, interferon, thụ thể interferon, thụ thể ghép cặp protein G, interleukin, thụ thể interleukin, enzym, protein gắn kết interleukin, protein gắn kết xytokin, yếu tố hoạt hóa đại thực bào, peptit đại thực bào, yếu tố tế bào B, yếu tố tế bào T, protein A, chất ức chế dị ứng, glycoprotein gây hoại tử tế bào, độc tố miễn dịch, lymphotoxin, yếu tố gây hoại tử khối u, chất kìm hãm khối u, yếu tố phát triển sự di căn, antitrypsin alpha-1, albumin, α -lactalbumin, apolipoprotein-E, erythropoietin đã được

glycosyl hóa ở mức cao, angiopoietin, hemoglobin, trombin, peptit hoạt hóa thụ thể trombin, trombomodulin, yếu tố đông máu VII, yếu tố đông máu VIIa, yếu tố đông máu VIII, yếu tố đông máu IX và yếu tố đông máu XIII, yếu tố hoạt hóa plasminogen, peptit gắn kết fibrin, urokinaza, streptokinaza, hirudin, protein C, protein phản ứng C, chất ức chế renin, chất ức chế collagenaza, superoxit dismutaza, leptin, yếu tố sinh trưởng có nguồn gốc từ tiểu cầu, yếu tố sinh trưởng biểu mô, yếu tố sinh trưởng biểu bì, angiostatin, angiotensin, yếu tố sinh trưởng xương, protein kích thích tạo xương, canxitonin, atriopeptin, yếu tố tạo sụn, elcatonin, yếu tố hoạt hóa mô liên kết, chất ức chế quá trình của yếu tố mô, hormon kích thích nang, hormon tạo hoàng thể, hormon giải phóng hormon tạo hoàng thể, yếu tố sinh trưởng dây thần kinh, hormon tuyến cận giáp, relaxin, secretin, somatomeđin, yếu tố sinh trưởng tương tự insulin, hormon vỏ tuyến thượng thận, cholexystokinin, polypeptit tuyến tụy, peptit giải phóng gaxtrin, yếu tố giải phóng corticotropin, hormon kích thích tuyến giáp, autotaxin, lactoferrin, myostatin, kháng nguyên bề mặt tế bào, kháng nguyên vacxin có nguồn gốc từ virus, kháng thể đơn dòng, kháng thể đa dòng và mảnh kháng thể.

Theo một phương án khác, mảnh Fc globulin miễn dịch chứa vùng gắn kết FcRn, nằm trong thể tiếp hợp theo sáng chế, có thể chứa miền CH2, miền CH3 hoặc cả hai miền này.

Theo một phương án khác, mảnh Fc globulin miễn dịch nằm trong thể tiếp hợp theo sáng chế có thể ở dạng không được glycosyl hóa.

Theo một phương án khác, mảnh Fc globulin miễn dịch nằm trong thể tiếp hợp theo sáng chế có thể chứa vùng bản lề.

Theo một phương án khác, mảnh Fc globulin miễn dịch nằm trong thể tiếp hợp theo sáng chế có thể được chọn từ nhóm bao gồm IgG, IgA, IgD, IgE, IgM, hỗn hợp của chúng và các thể lai của chúng.

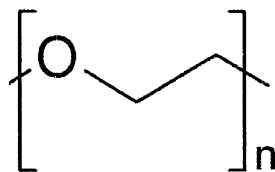
Theo một phương án khác, mảnh Fc globulin miễn dịch nằm trong thể tiếp hợp theo sáng chế có thể là mảnh Fc IgG4.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất thể tiếp hợp của mảnh Fc globulin miễn dịch và polypeptit có hoạt tính sinh lý duy trì được ái lực gắn

kết nối tại của mảnh Fc globulin miễn dịch với FcRn, phương pháp này bao gồm các bước: (a) liên kết polypeptit có hoạt tính sinh lý với mảnh Fc globulin miễn dịch chứa vùng gắn kết FcRn thông qua gốc liên kết không peptidyl với polypeptit có hoạt tính sinh lý thông qua gốc liên kết không peptidyl để tạo ra hỗn hợp các thể tiếp hợp chứa mảnh Fc globulin miễn dịch và polypeptit có hoạt tính sinh lý; và (b) phân tách ra khỏi hỗn hợp này thể tiếp hợp chứa mảnh Fc globulin miễn dịch và polypeptit có hoạt tính sinh lý có tỷ lệ gắn kết nằm trong khoảng $\pm 6\%$ tỷ lệ gắn kết của mảnh Fc globulin miễn dịch, như được xác định bằng cách thể lượng gắn kết với FcRn ở độ pH bằng 6,0 và lượng gắn kết với FcRn ở độ pH bằng 7,4 vào phương trình 1.

Theo một phương án, gốc liên kết không peptidyl mà được sử dụng trong phương pháp sản xuất theo sáng chế có thể là polyme polyetylen glycol có công thức 1:

Công thức 1



trong đó n nằm trong khoảng từ 10 đến 2400.

Theo một phương án khác, thể tiếp hợp đã được phân tách ở bước (b) của phương pháp sản xuất theo sáng chế có thể có cấu trúc, trong đó gốc liên kết không peptidyl được gắn kết với đầu tận cùng N của mảnh Fc globulin miễn dịch.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp duy trì ái lực gắn kết nội tại của thể tiếp hợp chứa mảnh Fc globulin miễn dịch và polypeptit có hoạt tính sinh lý đối với FcRn, phương pháp này bao gồm bước liên kết polypeptit có hoạt tính sinh lý với mảnh Fc globulin miễn dịch chứa vùng gắn kết FcRn thông qua gốc liên kết không peptidyl.

Theo một phương án, phương pháp duy trì ái lực gắn kết nội tại có thể được thực hiện *in vivo*.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến chế phẩm chứa thể tiếp hợp của mảnh Fc globulin miễn dịch và polypeptit có hoạt tính sinh lý, có thể duy trì được ái lực gắn kết nội tại của mảnh Fc globulin miễn dịch với FcRn.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến thể tiếp hợp của mảnh Fc globulin miễn dịch và polypeptit có hoạt tính sinh lý chứa polypeptit có hoạt tính sinh lý liên kết với mảnh Fc globulin miễn dịch chứa vùng gắn kết FcRn thông qua gốc liên kết không peptidyl, trong đó tỷ lệ của lượng thể tiếp hợp gắn kết với FcRn ở độ pH bằng 6,0 và lượng thể tiếp hợp gắn kết với FcRn ở độ pH bằng 7,4 nằm trong khoảng $\pm 6\%$ tỷ lệ được xác định bằng cách đo lượng mảnh Fc globulin miễn dịch gắn kết với FcRn trong cùng điều kiện như đã được sử dụng đối với thể tiếp hợp này.

Thuật ngữ “lượng gắn kết của thể tiếp hợp chứa mảnh Fc globulin miễn dịch và polypeptit có hoạt tính sinh lý” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ tỷ lệ nồng độ của thể tiếp hợp protein gắn kết với FcRn với tổng nồng độ của thể tiếp hợp protein đã được gắn kết hoặc không được gắn kết với FcRn ở độ pH có liên quan. Theo sáng chế, do lượng gắn kết này được sử dụng để tính toán tỷ lệ giữa lượng gắn kết ở hai trị số độ pH, nên tỷ lệ giữa lượng gắn kết có thể được tính toán từ lượng gắn kết hoàn toàn được xác định ở một trị số độ pH và cũng có thể được xác định bằng cách xác định các lượng vật lý khác, là tương xứng với lượng thể tiếp hợp đã được gắn kết và dễ xác định. Ví dụ, tỷ lệ giữa lượng gắn kết có thể được xác định bằng cách xác định tín hiệu cộng hưởng plasmon bề mặt (surface plasmon resonance -SPR) và tính toán tỷ lệ giữa các tín hiệu này ở độ pH bằng 6,0 và độ pH bằng 7,4. Ngoài ra, các phương pháp khác cũng có thể được sử dụng để xác định tỷ lệ giữa các lượng gắn kết.

Đặc biệt, sáng chế đề cập đến thể tiếp hợp chứa mảnh Fc globulin miễn dịch và polypeptit có hoạt tính sinh lý chứa polypeptit có hoạt tính sinh lý liên kết với mảnh Fc globulin miễn dịch chứa vùng gắn kết FcRn thông qua gốc liên kết không peptidyl, trong đó tỷ lệ gắn kết được xác định bằng cách thể lượng thể tiếp hợp gắn kết với FcRn ở độ pH bằng 6,0 và lượng thể tiếp hợp gắn kết với FcRn ở độ pH bằng 7,4 vào phương trình 1 là nhỏ hơn khoảng $\pm 6\%$ tỷ lệ gắn kết được xác định bằng cách đo lượng mảnh Fc globulin miễn dịch gắn kết với FcRn trong cùng điều kiện như đã được sử dụng đối với thể tiếp hợp:

Phương trình 1

Tỷ lệ gắn kết (%) = (lượng gắn kết ở độ pH bằng 7,4/lượng gắn kết ở độ pH bằng 6,0) X 100

Tỷ lệ gắn kết có thể thu được ở trị số phần trăm (%) bằng cách chia lượng thể tiếp hợp (hoặc mảnh Fc globulin miễn dịch) gắn kết với FcRn ở độ pH bằng 7,4 cho lượng thể tiếp hợp (hoặc mảnh Fc globulin miễn dịch) gắn kết với FcRn ở độ pH bằng 6,0 và nhân thương số này với 100.

Tỷ lệ gắn kết có thể được tính toán bằng cách sử dụng phương pháp được mô tả trong bài báo Weirong Wang et al. (DRUG METABOLISM AND DISPOSITION 39:1469-1477, 2011) để dự đoán thời gian bán thải của kháng thể đơn dòng, nhưng không chỉ giới hạn cụ thể ở phương pháp này. Theo phương pháp được mô tả trong bài báo nêu trên, kháng thể đơn dòng có tỷ lệ gắn kết cao thì thời gian bán thải *in vivo* lại ngắn.

Phương pháp xác định tỷ lệ gắn kết có thể được thực hiện, đặc biệt là bằng cách sử dụng phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt, nhưng không chỉ giới hạn cụ thể ở phương pháp này.

Ví dụ, phương pháp xác định tỷ lệ gắn kết có thể được thực hiện bằng cách cố định FcRn trên chip cảm biến sinh học (ví dụ, chip cảm biến sinh học Biacore CM5) bằng cách sử dụng kit ghép cặp amin hoặc dụng cụ tương tự, tiêm dung dịch đệm axit (ví dụ, dung dịch đệm có độ pH bằng 6,0) chứa hợp chất thử nghiệm (ví dụ, thể tiếp hợp hoặc mảnh Fc globulin miễn dịch) cần xác định mức độ gắn kết với FcRn vào chip cảm biến sinh học cố định FcRn, và sau đó tiêm dung dịch đệm trung tính (ví dụ, dung dịch đệm có độ pH bằng 7,4) vào chip cảm biến sinh học này. Trong trường hợp này, tỷ lệ gắn kết có thể được xác định bằng cách xác định đơn vị cộng hưởng (resonance unit - RU) ở trạng thái cân bằng trước khi kết thúc quá trình tiêm mẫu trong dung dịch đệm có độ pH bằng 6,0 vào chip để xác định lượng gắn kết ở độ pH bằng 6,0, xác định đơn vị cộng hưởng sau khi tiêm dung dịch đệm có độ pH bằng 7,4 để xác định lượng gắn kết ở độ pH bằng 7,4, và sau đó chia lượng gắn kết ở độ pH bằng 7,4 cho lượng gắn kết ở độ pH bằng 6,0. Khi tỷ lệ gắn kết được biểu thị bằng tỷ lệ phần trăm, thì thương số này có thể được nhân với 100.

Trong phương pháp đã nêu trên, chế phẩm chứa dung dịch đệm có độ pH bằng 6,0 không bị giới hạn một cách cụ thể, với điều kiện nó có khả năng gắn kết giữa hợp chất thử nghiệm cần xác định mức độ gắn kết với FcRn với FcRn. Ví dụ, dung dịch đệm có độ pH bằng 6,0 có thể là dung dịch đệm chứa muối như phosphat. Nồng độ của muối trong dung dịch đệm này có thể nằm trong khoảng từ 50mM đến 200mM, nhưng không chỉ giới hạn ở nồng độ này. Ngoài ra, dung dịch đệm có thể được tiêm vào chip cảm biến sinh học cố định FcRn ở nhiệt độ khoảng 25°C, nhưng nhiệt độ xác định này có thể thay đổi trong khoảng nhiệt độ trong đó không thay đổi độ pH của dung dịch đệm.

Ngoài ra, dung dịch đệm có độ pH bằng 6,0 có thể chứa hợp chất thử nghiệm cần xác định mức độ gắn kết với FcRn. Nồng độ của hợp chất thử nghiệm cần xác định mức độ gắn kết với FcRn trong dung dịch đệm có độ pH bằng 6,0 là không bị giới hạn một cách cụ thể, với điều kiện mức độ gắn kết với FcRn có thể được xác định. Ví dụ, nồng độ của hợp chất thử nghiệm cần xác định gắn kết với FcRn trong dung dịch đệm có độ pH bằng 6,0 có thể nằm trong khoảng từ 100nM đến 12,5nM.

Trong phương pháp nêu trên, chế phẩm chứa dung dịch đệm có độ pH bằng 7,4 là không bị giới hạn một cách cụ thể, với điều kiện nó có thể xảy ra quá trình tách giữa hợp chất thử nghiệm cần xác định mức độ gắn kết với FcRn và FcRn. Ví dụ, dung dịch đệm có độ pH bằng 7,4 có thể là dung dịch đệm chứa phosphat. Nồng độ của muối trong dung dịch đệm có thể nằm trong khoảng từ 50mM đến 200mM, nhưng không chỉ giới hạn ở nồng độ này. Ngoài ra, dung dịch đệm có độ pH bằng 7,4 có thể được tiêm vào chip cảm biến sinh học cố định FcRn ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 25°C đến 37°C, nhưng không chỉ giới hạn ở nhiệt độ này. Theo phương án cụ thể, tỷ lệ giữa các lượng gắn kết được xác định ở nhiệt độ 25°C.

Ngoài ra, lượng gắn kết giữa FcRn và hợp chất thử nghiệm cần xác định phạm vi gắn kết với FcRn ở độ pH bằng 6,0 có thể là đơn vị cộng hưởng xác định được ở 2-60 giây trước khi kết thúc quá trình tiêm mẫu ở độ pH bằng 6,0. Tốt hơn nếu quá trình gắn kết giữa FcRn và hợp chất thử nghiệm cần xác định phạm vi gắn kết với FcRn diễn ra ở trạng thái cân bằng ở thời điểm xác định.

Ngoài ra, lượng gắn kết giữa FcRn và hợp chất thử nghiệm cần xác định mức độ gắn kết với FcRn ở độ pH bằng 7,4 có thể là đơn vị cộng hưởng xác định được ở 10-20

giây sau khi tiêm dung dịch đệm có độ pH bằng 7,4. Tốt hơn nếu thời điểm xác định là thời điểm nằm trong khoảng từ thời điểm mà tại đó trị số RU thay đổi một cách nhanh chóng cho tới trước khi trị số RU đạt mức 0.

Khi so sánh tỷ lệ gắn kết giữa mảnh Fc globulin miễn dịch và thể tiếp hợp theo sáng chế, tốt hơn nếu tỷ lệ gắn kết này là các trị số xác định được bằng cùng một phương pháp thử nghiệm trong cùng một điều kiện thử nghiệm, nhưng chế phẩm và nhiệt độ của các dung dịch đệm có thể thay đổi phụ thuộc vào loại thể tiếp hợp.

Phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt như được mô tả nêu trên là một trong số các phương pháp xác định tỷ lệ gắn kết. Ngoài phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt, các phương pháp bất kỳ có thể được sử dụng trong sáng chế, với điều kiện phương pháp này là phương pháp như thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết enzyme (ELISA), có thể xác định được lượng thể tiếp hợp gắn kết với FcRn. Ngoài ra, đơn vị của lượng gắn kết có thể thay đổi phụ thuộc vào phương pháp sử dụng.

Khi tỷ lệ gắn kết của thể tiếp hợp chứa mảnh Fc globulin miễn dịch và polypeptit có hoạt tính sinh lý bao gồm polypeptit có hoạt tính sinh lý liên kết với mảnh Fc globulin miễn dịch có vùng gắn kết FcRn thông qua gốc liên kết không peptidyl nằm trong khoảng $\pm 6,0\%$ tỷ lệ gắn kết của chính mảnh Fc globulin miễn dịch xác định được bằng phương pháp đã nêu trên, thì thể tiếp hợp chứa mảnh Fc globulin miễn dịch và polypeptit có hoạt tính sinh lý có thời gian bán thải *in vivo* dài.

Theo sáng chế, nhận thấy rằng ngay cả khi polypeptit có hoạt tính sinh lý được liên kết cộng hóa trị với mảnh Fc globulin miễn dịch có vùng gắn kết FcRn thông qua gốc liên kết không peptidyl để điều chế thể tiếp hợp, thì ái lực gắn kết nội tại của mảnh Fc globulin miễn dịch với FcRn cũng có thể được duy trì, từ đó gợi ý rằng quá trình tuần hoàn nội bào của mảnh Fc globulin miễn dịch có thể xảy ra một cách dễ dàng để làm tăng thời gian bán thải *in vivo*. Đặc biệt là, khi gốc liên kết không peptidyl gắn kết với phần không chứa vùng gắn kết FcRn của mảnh Fc globulin miễn dịch, thì nó không làm giảm ái lực gắn kết của mảnh Fc globulin miễn dịch với FcRn. Khi gốc liên kết không peptidyl là polyetylen glycol ($-[O-CH_2-CH_2]_n-$), thì n trong $-[O-CH_2-CH_2]_n-$ bằng 10 hoặc lớn hơn, tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 10 đến 2400, tốt hơn nữa nếu nằm trong khoảng từ

10 đến 480, và tốt nhất nếu nằm trong khoảng từ 50 đến 250, nhưng không chỉ giới hạn ở các trị số này.

Nhận thấy rằng khi n trong $-\text{[O-CH}_2\text{-CH}_2\text{]}_n-$ nằm trong khoảng từ 10 đến 2400, và tốt hơn nữa nếu nằm trong khoảng từ 50 đến 2400, thì polyetylen glycol không làm ảnh hưởng đến hoạt tính sinh lý và hoạt tính gắn kết với FcRn của mỗi polypeptit có hoạt tính sinh lý và mảnh Fc globulin miễn dịch. Sáng chế dựa trên cơ sở dấu hiệu đặc trưng này.

Thuật ngữ “thể tiếp hợp chứa mảnh Fc globulin miễn dịch và polypeptit có hoạt tính sinh lý” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ thể tiếp hợp bao gồm polypeptit có hoạt tính sinh lý liên kết cộng hóa trị với mảnh Fc globulin miễn dịch có vùng gắn kết FcRn thông qua gốc liên kết không peptidyl và có tỷ lệ gắn kết nằm trong khoảng $\pm 6,0\%$ tỷ lệ gắn kết của mảnh Fc globulin miễn dịch, như được xác định bằng cách thể lượng gắn kết với FcRn ở độ pH bằng 6,0 và lượng gắn kết với FcRn ở độ pH bằng 7,4 vào phương trình 1.

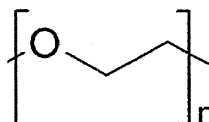
Gốc liên kết không peptidyl trong thể tiếp hợp có thể được liên kết với các gốc axit amin nằm xa vùng gắn kết FcRn của mảnh Fc globulin miễn dịch, ví dụ vùng tương ứng với các vị trí 252-257 và 307-311 của CH2 và các vị trí 433-436 của CH2, được đánh số theo hệ thống đánh số thứ tự Kabat. Tốt hơn nếu gốc liên kết không peptidyl có thể được liên kết với đầu tận cùng N hoặc đầu tận cùng C của mảnh Fc globulin miễn dịch, và tốt hơn nữa nếu được liên kết với đầu tận cùng N, nhưng không chỉ giới hạn ở các đầu tận cùng này.

Khi gốc liên kết không peptidyl được liên kết với đầu tận cùng N hoặc đầu tận cùng C của mảnh Fc globulin miễn dịch, thì về cơ bản là nó làm giảm ái lực gắn kết của mảnh Fc globulin miễn dịch với FcRn, do đó ái lực gắn kết nội tại của mảnh Fc globulin miễn dịch của thể tiếp hợp với FcRn có thể được duy trì.

Thuật ngữ “gốc liên kết không peptidyl” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ polyme tương hợp sinh học bao gồm hai hoặc nhiều đơn vị lặp lại được liên kết với nhau, trong đó đơn vị lặp lại này được liên kết với nhau bằng liên kết cộng hoá trị không phải peptit bất kỳ. Gốc liên kết không peptidyl này có thể có hai hoặc ba đầu.

Gốc liên kết không peptidyl được sử dụng trong sáng chế có thể được chọn từ nhóm bao gồm polyme có thể phân hủy sinh học như polyetylen glycol, polypropylen glycol, copolyme của etylen glycol với propylen glycol, rượu đa chức đã được polyoxyetyl hóa, rượu polyvinyl, polysacarit, đextran, polyvinyl etyl ete, polyme có thể phân hủy sinh học như axit polylactic và axit polylactic-glycolic, polyme lipid, kitin, axit hyaluronic và hỗn hợp của chúng, nhưng không chỉ giới hạn ở các loại này. Tốt hơn nếu gốc liên kết không peptidyl là polyetylen glycol, ví dụ polyme polyetylen glycol có công thức 1, nhưng không chỉ giới hạn ở gốc liên kết này:

Công thức 1



trong đó n nằm trong khoảng từ 10 đến 2400, tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 10 đến 480, và tốt hơn nữa nếu nằm trong khoảng từ 50 đến 250, nhưng không chỉ giới hạn ở các trị số này.

Đồng thời, các gốc liên kết không peptidyl khác có khối lượng phân tử tương ứng với khối lượng phân tử của polyetylen glycol có công thức 1 là cũng nằm trong phạm vi của sáng chế.

Ngoài ra, các dẫn xuất của chúng đã biết trong lĩnh vực này và các dẫn xuất gốc liên kết không peptidyl có thể được tạo ra một cách dễ dàng trong lĩnh vực kỹ thuật này là cũng nằm trong phạm vi của sáng chế.

Polyetylen glycol được sử dụng làm gốc liên kết không peptidyl theo sáng chế có lợi ở chỗ nó không làm cản trở không gian giữa polypeptit có hoạt tính sinh lý và mảnh Fc globulin miễn dịch gắn kết với cả hai đầu tận cùng của chúng sao cho cả hoạt tính sinh lý của polypeptit có hoạt tính sinh lý lẫn ái lực gắn kết của mảnh Fc globulin miễn dịch với FcRn có thể được duy trì.

Gốc liên kết peptidyl được sử dụng trong protein dung hợp đã được tạo ra bằng phương pháp dung hợp trong khung thông thường có nhược điểm ở chỗ nó được phân

giải một cách dễ dàng bởi proteaza *in vivo*, do đó không thể thu được thời gian bán thải trong huyết thanh của dược chất bởi chất mang tăng lên như mong muốn. Tuy nhiên, thể tiếp hợp bao gồm gốc liên kết không peptidyl theo sáng chế có thể khắc phục được hoàn toàn nhược điểm này. Gốc liên kết không peptidyl có thể là polyme có tính kháng với proteaza để duy trì thời gian bán thải trong huyết thanh của peptit, tương tự với đặc tính của chất mang. Do đó, gốc liên kết không peptidyl bất kỳ có thể được sử dụng theo sáng chế mà không bị giới hạn theo cách bất kỳ, với điều kiện nó là polyme có chức năng nêu trên, tức là polyme có tính kháng với proteaza *in vivo*.

Ngoài ra, gốc liên kết không peptidyl được liên kết với mảnh Fc globulin miễn dịch theo sáng chế có thể được tạo ra không chỉ từ một loại polyme, mà còn là dạng kết hợp của các loại polyme khác nhau.

Gốc liên kết không peptidyl được sử dụng trong sáng chế có các nhóm phản ứng có khả năng gắn kết với mảnh Fc globulin miễn dịch và polypeptit có hoạt tính sinh lý.

Tốt hơn nếu các nhóm phản ứng ở cả hai đầu polyme không chứa gốc liên kết peptidyl được chọn từ nhóm bao gồm nhóm aldehyt phản ứng, nhóm propionaldehyt, nhóm butyraldehyt, nhóm maleimit và dẫn xuất succinimit. Trong bản mô tả này, dẫn xuất succinimit có thể là succinimidyl propionat, hydroxy succinimidyl, succinimidyl carboxymetyl, hoặc succinimidyl cacbonat. Cụ thể, khi polyme không chứa gốc liên kết peptidyl có nhóm aldehyt phản ứng ở cả hai đầu tận cùng của nó, thì polypeptit có hoạt tính sinh lý và globulin miễn dịch sẽ lần lượt gắn kết một cách hiệu quả với cả hai đầu tận cùng của gốc liên kết không peptidyl, đồng thời làm giảm đến mức tối thiểu các phản ứng không đặc hiệu. Thành phẩm tạo ra bởi quá trình alkyl hóa khử thông qua liên kết aldehyt có độ ổn định hơn rất nhiều so với thành phẩm được liên kết thông qua liên kết amit. Nhóm aldehyt phản ứng có thể gắn kết một cách chọn lọc với đầu tận cùng N ở độ pH thấp và có thể tạo ra liên kết cộng hoá trị với gốc lysin ở độ pH cao, ví dụ ở độ pH bằng 9,0. Trong bản mô tả này, gốc liên kết không peptidyl có thể chứa hai hoặc nhiều nhóm aldehyt hoặc có hai hoặc nhiều nhóm rượu được thế bằng các nhóm chức kể cả aldehyt.

Các nhóm phản ứng ở cả hai đầu tận cùng của gốc liên kết không peptidyl có thể là giống hoặc khác nhau. Ví dụ, một đầu tận cùng của gốc liên kết không peptidyl có thể có nhóm maleimit, và đầu tận cùng còn lại có thể có nhóm aldehyt, nhóm propionaldehyt,

hoặc nhóm alkyl aldehyt như butyl aldehyt. Khi polyetylen glycol có nhóm hydroxyl phản ứng ở cả hai đầu được sử dụng làm gốc liên kết không peptidyl, thì các nhóm hydroxy có thể được hoạt hóa thành các nhóm phản ứng khác nhau bằng phản ứng hóa học đã biết. Theo cách khác, polyetylen glycol đang có trên thị trường có nhóm phản ứng cải biến có thể được sử dụng để điều chế thể tiếp hợp theo sáng chế.

Thuật ngữ “polypeptit có hoạt tính sinh lý” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ các polypeptit có hoạt tính sinh lý bất kỳ *in vivo*, thường có cấu trúc polypeptit và có các hoạt tính sinh lý khác nhau. Polypeptit có hoạt tính sinh lý bao gồm các polypeptit có chức năng điều hòa sự biểu hiện gen và chức năng sinh lý và để sửa chữa tình trạng bất thường gây ra bởi sự thiếu hụt hoặc tiết quá mức một chất nằm trong quá trình điều hòa chức năng *in vivo*. Polypeptit có hoạt tính sinh lý cũng có thể bao gồm các tác nhân trị liệu protein thông thường. Ngoài ra, thuật ngữ “polypeptit có hoạt tính sinh lý” có nghĩa còn bao gồm không chỉ các polypeptit nguyên thể, mà còn là các dẫn xuất của chúng.

Loại và kích thước của polypeptit có hoạt tính sinh lý trong thể tiếp hợp theo sáng chế là không bị giới hạn một cách cụ thể, với điều kiện nó là polypeptit có hoạt tính sinh lý có thể làm tăng thời gian bán thải trong huyết thanh bởi cấu trúc của thể tiếp hợp theo sáng chế. Theo một phương án của sáng chế, thể tiếp hợp được tạo ra bằng cách sử dụng các polypeptit có hoạt tính sinh lý khác nhau, bao gồm insulin, interferon, hormon sinh trưởng của người và chất chủ vận GLP-1, là các polypeptit có hoạt tính sinh lý đại diện, và nhận thấy rằng ái lực gắn kết nội tại của chính mảnh Fc globulin miễn dịch đối với FcRn có thể được duy trì mà không liên quan đến loại và kích thước của polypeptit có hoạt tính sinh lý.

Polypeptit có hoạt tính sinh lý nằm trong thể tiếp hợp theo sáng chế có thể được chọn từ nhóm bao gồm peptit tương tự glucagon-1, yếu tố kích thích tạo máu bạch cầu hạt, hormon sinh trưởng của người, erythropoietin, glucagon, oxyntomodulin, insulin, hormon giải phóng hormon sinh trưởng, peptit giải phóng hormon sinh trưởng, interferon, thụ thể interferon, thụ thể ghép cặp protein G, interleukin, thụ thể interleukin, enzym, protein gắn kết interleukin, protein gắn kết xytokin, yếu tố hoạt hóa đại thực bào, peptit đại thực bào, yếu tố tế bào B, yếu tố tế bào T, protein A, chất ức chế dị ứng, glycoprotein gây hoại tử tế bào, độc tố miễn dịch, lymphotoxin, yếu tố gây hoại tử khối u, chất kìm hãm khối u, yếu tố phát triển sự di căn, antitrypsin alpha-1, albumin, α -

lactalbumin, apolipoprotein-E, erythropoietin đã được glycosyl hóa ở mức cao, angiopoietin, hemoglobin, trombin, peptit hoạt hóa thụ thể trombin, trombomodulin, yếu tố đông máu VII, yếu tố đông máu VIIa, yếu tố đông máu VIII, yếu tố đông máu IX và yếu tố đông máu XIII, yếu tố hoạt hóa plasminogen, peptit gắn kết fibrin, urokinaza, streptokinaza, hirudin, protein C, protein phản ứng C, chất ức chế renin, chất ức chế collagenaza, superoxit dismutaza, leptin, yếu tố sinh trưởng có nguồn gốc từ tiểu cầu, yếu tố sinh trưởng biểu mô, yếu tố sinh trưởng biểu bì, angiostatin, angiotensin, yếu tố sinh trưởng xương, protein kích thích tạo xương, canxitonin, atriopeptin, yếu tố tạo sụn, elcatonin, yếu tố hoạt hóa mô liên kết, chất ức chế quá trình của yếu tố mô, hormon kích thích nang, hormon tạo hoàng thể, hormon giải phóng hormon tạo hoàng thể, yếu tố sinh trưởng dây thần kinh, hormon tuyến cận giáp, relaxin, secretin, somatomeđin, yếu tố sinh trưởng tương tự insulin, hormon vỏ tuyến thượng thận, cholexystokinin, polypeptit tuyến tụy, peptit giải phóng gaxtrin, yếu tố giải phóng corticotropin, hormon kích thích tuyến giáp, autotaxin, lactoferrin, myostatin, kháng nguyên bề mặt tế bào, kháng nguyên vaccin có nguồn gốc từ virus, kháng thể đơn dòng, kháng thể đa dòng, và mảnh kháng thể, nhưng không chỉ giới hạn ở. Ngoài ra, thuật ngữ “polypeptit có hoạt tính sinh lý”, như được sử dụng trong bản mô tả này, không những bao gồm polypeptit có hoạt tính sinh lý tự nhiên, mà còn bao gồm chất chủ vận, tiền chất, dẫn xuất, mảnh hoặc các biến thể của mỗi polypeptit này. Trong bản mô tả này, ví dụ về các dẫn xuất oxyntomodulin bao gồm toàn bộ các dẫn xuất được mô tả trong Công bố đơn sáng chế Hàn quốc số 10-2012-0137271, và ví dụ về các dẫn xuất peptit giải phóng insulin bao gồm các dẫn xuất đã được mô tả trong Công bố đơn sáng chế Hàn quốc số 10-2009-0008151, nhưng không chỉ giới hạn ở các dẫn xuất này.

Thuật ngữ “mảnh Fc globulin miễn dịch” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ protein chứa vùng hằng định chuỗi nặng của globulin miễn dịch, không bao gồm vùng hằng định chuỗi nặng 1 (CH1) và vùng hằng định chuỗi nhẹ 1 (CL1) của globulin miễn dịch này. Mảnh Fc có thể chứa vùng bản lề trong vùng hằng định chuỗi nặng. Theo sáng chế, tốt hơn nếu mảnh Fc globulin miễn dịch bao gồm miền CH2, miền CH3, hoặc cả hai miền này, do ái lực gắn kết của mảnh Fc globulin miễn dịch với FcRn cần được duy trì.

Ngoài ra, mảnh Fc globulin miễn dịch theo sáng chế có thể là mảnh Fc kéo dài bao gồm một phần hoặc toàn bộ vùng hằng định chuỗi nặng 1 (CH1) và/hoặc vùng hằng định

chuỗi nhẹ 1 (CL1), ngoại trừ vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch này, với điều kiện nó duy trì được ái lực gắn kết nội tại của nó với FcRn, ngay cả khi nó được liên kết với polypeptit có hoạt tính sinh lý và gốc liên kết không peptidyl.

Do mảnh Fc globulin miễn dịch là polypeptit có thể phân hủy sinh học chuyển hoá *in vivo*, nên nó là an toàn để dùng làm dược chất mang. Ngoài ra, do mảnh Fc globulin miễn dịch có khối lượng phân tử thấp hơn so với toàn bộ phân tử globulin miễn dịch, nên có lợi trong việc tạo ra, tinh chế và hiệu suất thu được thể tiếp hợp. Ngoài ra, do vùng Fab có không có tính đồng nhất cao do sự khác nhau về trình tự axit amin giữa các kháng thể, được loại bỏ, nên mảnh Fc có tính đồng nhất tăng lên một cách đáng kể và khả năng tạo ra tính kháng nguyên trong huyết thanh là thấp.

Theo sáng chế, mảnh Fc globulin miễn dịch không những bao gồm trình tự axit amin nguyên thể, mà còn bao gồm đột biến trình tự của nó. Thuật ngữ “đột biến trình tự axit amin” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ trình tự khác với trình tự axit amin nguyên thể do khuyết, cài xen, thể không bảo toàn hoặc bảo toàn hoặc dạng kết hợp của chúng của một hoặc nhiều các gốc axit amin gây ra. Ví dụ, trong trường hợp IgG Fc, đã biết rằng các gốc axit amin ở các vị trí 214 đến 238, 297 đến 299, 318 đến 322 hoặc 327 đến 331, là quan trọng trong quá trình gắn kết, có thể được sử dụng làm đích cải biến thích hợp.

Ngoài ra, các đột biến khác nhau cũng có thể có mặt, bao gồm các đột biến có đoạn khuyết của vùng có khả năng tạo liên kết disulfua, đoạn khuyết của một vài gốc axit amin ở đầu tận cùng N của Fc nguyên thể, hoặc đoạn bổ sung của gốc methionin vào đầu tận cùng N của Fc nguyên thể. Ngoài ra, để loại bỏ các chức năng cảm ứng, vị trí gắn kết bổ thể, ví dụ vị trí gắn kết C1q, có thể được loại bỏ, và vị trí gây độc tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể (antibody dependent cell mediated cytotoxicity - ADCC) cũng có thể được loại bỏ. Phương pháp sản xuất các dẫn xuất trình tự như vậy của mảnh Fc globulin miễn dịch được mô tả trong WO97/34631 và WO96/32478.

Việc trao đổi axit amin trong các protein và peptit, thường không làm thay đổi hoạt tính của các phân tử, là đã biết trong lĩnh vực này (H. Neurath, R. L. Hill, The Proteins, Academic Press, New York, 1979). Các cặp trao đổi axit amin hay gặp nhất là Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly,

Thy/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu, Asp/Gly, theo cả hai hướng.

Trong một số trường hợp, mảnh Fc globulin miễn dịch cũng có thể được cải biến bằng cách, ví dụ phosphoryl hoá, sulfat hóa, acryl hóa, glycosyl hoá, metyl hóa, farnesyl hóa, axetyl hóa hoặc amit hóa.

Các đột biến Fc nêu trên là các đột biến có hoạt tính sinh học tương đương như hoạt tính của mảnh Fc theo sáng chế, nhưng có độ ổn định cấu trúc đối với nhiệt, độ pH, hoặc các yếu tố tương tự cải thiện hơn.

Ngoài ra, các mảnh Fc này có thể thu được từ các dạng nguyên thể được phân lập từ người và động vật bao gồm bò, dê, lợn, chuột nhắt, thỏ, chuột đồng, chuột và chuột lang, hoặc có thể là dạng tái tổ hợp hoặc các dẫn xuất của chúng, thu được từ các tế bào động vật hoặc vi sinh vật chuyển gen. Trong bản mô tả này, chúng có thể thu được từ globulin miễn dịch nguyên thể bằng cách phân lập toàn bộ globulin miễn dịch ra khỏi cơ thể sống của người hoặc động vật và xử lý nó bằng proteaza. Khi được xử lý bằng papain, thì toàn bộ globulin miễn dịch được phân giải thành Fab và Fc. Đồng thời, khi nó được xử lý bằng pepsin, thì nó được phân giải thành pF'c và F(ab)₂. Các mảnh này có thể được sử dụng, ví dụ trong phương pháp sắc ký loại cỡ để phân lập Fc hoặc pF'c.

Tốt hơn nếu mảnh Fc là mảnh Fc globulin miễn dịch tái tổ hợp thu được từ vi sinh vật bằng cách sử dụng mảnh Fc của người.

Ngoài ra, mảnh Fc globulin miễn dịch có thể ở dạng chuỗi đường nguyên thể, chuỗi đường dài hơn so với dạng nguyên thể hoặc chuỗi đường ngắn hơn so với dạng nguyên thể, hoặc có thể ở dạng được khử glycosyl hóa. Quá trình kéo dài, rút ngắn hoặc loại bỏ chuỗi đường của mảnh Fc globulin miễn dịch có thể được thực hiện bằng cách sử dụng các phương pháp thông thường, như phương pháp hóa học, phương pháp enzym và phương pháp di truyền bằng cách sử dụng vi sinh vật. Mảnh Fc globulin miễn dịch thu được bằng cách loại bỏ chuỗi đường ra khỏi Fc có mức giảm rõ rệt về ái lực gắn kết với bề mặt (c1q) và làm giảm hoặc mất hoạt tính gây độc tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể hoặc hoạt tính gây độc tế bào phụ thuộc bề mặt, do đó không tạo ra các đáp ứng miễn dịch *in vivo* không cần thiết. Liên quan tới vấn đề này, mảnh Fc globulin

miễn dịch ở dạng được khử glycosyl hóa hoặc chưa được glycosyl hóa có thể là thích hợp hơn để dùng làm dược chất mang.

Thuật ngữ “khử glycosyl hóa” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ quá trình loại enzym của các gốc đường ra khỏi mảnh Fc, và thuật ngữ “chưa được glycosyl hóa” có nghĩa là mảnh Fc chưa được glycosyl hóa tạo ra trong các sinh vật nhân sơ, tốt hơn nếu trong *E. coli*.

Đồng thời, mảnh Fc globulin miễn dịch có thể có nguồn gốc từ người hoặc động vật như gia súc, dê, lợn, chuột nhắt, thỏ, chuột đồng, chuột hoặc chuột lang. Tốt hơn nếu mảnh này có nguồn gốc từ người. Ngoài ra, mảnh Fc globulin miễn dịch có thể là mảnh Fc có nguồn gốc từ IgG, IgA, IgD, IgE và IgM, dạng kết hợp của chúng, hoặc các thể lai của chúng. Tốt hơn nếu mảnh Fc có nguồn gốc từ IgG hoặc IgM, là các protein phổ biến nhất trong máu người, và tốt nhất nếu mảnh Fc có nguồn gốc từ IgG đã biết để làm tăng thời gian bán thải của các protein gắn kết phối tử.

Thuật ngữ “kết hợp” trong bản mô tả này được sử dụng trong bản mô tả để chỉ sự tạo ra liên kết giữa polypeptit mã hóa mảnh Fc globulin miễn dịch chuỗi đơn có cùng nguồn gốc và polypeptit chuỗi đơn có nguồn gốc khác nhau để tạo ra dime hoặc multime. Mặt khác, dime hoặc multime có thể được tạo ra từ hai hoặc nhiều mảnh được chọn từ nhóm bao gồm các mảnh IgG Fc, IgA Fc, IgM Fc, IgD Fc, và IgE Fc.

Thuật ngữ “thể lai” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ sự có mặt của hai hoặc nhiều trình tự tương ứng với mảnh Fc globulin miễn dịch có nguồn gốc khác nhau trong mảnh Fc globulin miễn dịch chuỗi đơn. Theo sáng chế, các thể lai khác nhau có thể có mặt. Mặt khác, các miền lai có thể bao gồm một đến bốn miền được chọn từ nhóm bao gồm CH1, CH2, CH3 và CH4 của IgG Fc, IgM Fc, IgA Fc, IgE Fc và IgD Fc, và có thể chứa vùng bản lề.

Mặt khác, IgG có thể được chia thành các phân nhóm IgG1, IgG2, IgG3 và IgG4, và các dạng kết hợp hoặc các thể lai của chúng có thể được sử dụng theo sáng chế, tốt hơn nếu các phân nhóm IgG2 và IgG4, và tốt nhất nếu mảnh Fc của IgG4 hiếm có các chức năng cảm ứng như CDC (hoạt tính gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể). Mặt khác, mảnh Fc globulin miễn dịch được ưu tiên nhất để dùng làm dược chất mang theo sáng chế là mảnh Fc không được glycosyl hóa có nguồn gốc từ IgG4 của người. Mảnh Fc của

người được ưu tiên hơn so với mảnh Fc không phải của người, có thể có tác dụng làm kháng nguyên trong cơ thể người và gây ra các đáp ứng miễn dịch không mong muốn như sản sinh kháng thể mới kháng lại kháng nguyên.

Theo phương án của sáng chế, mỗi insulin, interferon, hormon sinh trưởng của người và chất chủ vận GLP-1 được liên kết với mảnh Fc globulin miễn dịch có khả năng gắn kết với FcRn thông qua gốc liên kết không peptidyl, nhờ đó điều chế thể tiếp hợp có khả năng tăng cường ái lực gắn kết nội tại của mảnh Fc globulin miễn dịch với FcRn và có thể tách ra khỏi FcRn một cách dễ dàng ở độ pH trung tính và cũng có thể tạo ra mức độ phân ly tương tự như mức độ phân ly của mảnh Fc globulin miễn dịch (Ví dụ và Fig.2 và Fig.3). Ngoài ra, nhận thấy rằng thể tiếp hợp theo sáng chế có thời gian tác dụng *in vivo* dài hơn so với thể tiếp hợp trong khung (Fig.4).

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất thể tiếp hợp của mảnh Fc globulin miễn dịch và polypeptit có hoạt tính sinh lý duy trì ái lực gắn kết nội tại của mảnh Fc globulin miễn dịch với FcRn, phương pháp này bao gồm các bước: (a) cho polypeptit có hoạt tính sinh lý liên kết với mảnh Fc globulin miễn dịch có vùng gắn kết FcRn thông qua gốc liên kết không peptidyl để tạo ra hỗn hợp các thể tiếp hợp chứa mảnh Fc globulin miễn dịch và polypeptit có hoạt tính sinh lý; và (b) phân tách ra khỏi hỗn hợp này thể tiếp hợp chứa mảnh Fc globulin miễn dịch và polypeptit có hoạt tính sinh lý, có tỷ lệ gắn kết nằm trong khoảng $\pm 6\%$ tỷ lệ gắn kết của mảnh Fc globulin miễn dịch, như được xác định bằng cách thể lượng gắn kết với FcRn ở độ pH bằng 6,0 và lượng gắn kết với FcRn ở độ pH bằng 7,4 vào phương trình 1..

Phương trình 1

$$\text{Tỷ lệ gắn kết (\%)} = (\text{lượng gắn kết ở độ pH bằng 7,4} / \text{lượng gắn kết ở độ pH bằng 6,0}) \times 100$$

Trong bản mô tả này, polypeptit có hoạt tính sinh lý, mảnh Fc globulin miễn dịch, gốc liên kết không peptidyl, thể tiếp hợp và việc xác định tỷ lệ gắn kết là như được mô tả nêu trên.

Bước (a) trong phương pháp theo sáng chế là bước liên kết cộng hóa trị của polypeptit có hoạt tính sinh lý với mảnh Fc globulin miễn dịch thông qua gốc liên kết

không peptidyl. Bước (a) có thể chứa các bước: (i) cho một chất bất kỳ trong số polypeptit có hoạt tính sinh lý và mảnh Fc globulin miễn dịch liên kết với nhóm phản ứng ở một đầu tận cùng của gốc liên kết không peptidyl; và (ii) cho chất còn lại liên kết với nhóm phản ứng ở đầu tận cùng còn lại của gốc liên kết không peptidyl. Bước (a) có thể còn bao gồm, nằm giữa bước (i) và (ii), bước phân tách polypeptit có hoạt tính sinh lý hoặc mảnh Fc globulin miễn dịch được liên kết với một đầu tận cùng của gốc liên kết không peptidyl. Để điều chế thể tiếp hợp này, nội dung của đơn Hàn Quốc số 10-0725315 có thể được kết hợp vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn.

Để liên kết polypeptit có hoạt tính sinh lý với phần không chứa vùng gắn kết FcRn của mảnh Fc globulin miễn dịch thông qua gốc liên kết không peptidyl, polypeptit có hoạt tính sinh lý có gốc liên kết không peptidyl đã được liên kết vào đó có thể được phản ứng với mảnh Fc globulin miễn dịch ở độ pH nằm trong khoảng từ 4,0 đến 9,0.

Khi thể tiếp hợp được tạo ra bằng quy trình này, các sản phẩm phụ như thể tiếp hợp có khả năng làm giảm ái lực gắn kết của mảnh Fc globulin miễn dịch với FcRn có thể được tạo ra ngoài thể tiếp hợp duy trì ái lực gắn kết nội tại của mảnh Fc globulin miễn dịch với FcRn. Với lý do này, sau phản ứng cho polypeptit có hoạt tính sinh lý liên kết với mảnh Fc globulin miễn dịch thông qua peptit không peptidyl, quy trình này cần thực hiện thêm bước phân tách mảnh Fc globulin miễn dịch-polypeptit có hoạt tính sinh lý có khả năng duy trì ái lực gắn kết nội tại của mảnh Fc globulin miễn dịch với FcRn ra khỏi hỗn hợp thể tiếp hợp này.

Do đó, phương pháp theo sáng chế bao gồm bước (b) phân tách thể tiếp hợp chứa mảnh Fc globulin miễn dịch và polypeptit có hoạt tính sinh lý ra khỏi hỗn hợp thể tiếp hợp có tỷ lệ gắn kết nằm trong khoảng $\pm 6\%$ tỷ lệ gắn kết của mảnh Fc globulin miễn dịch, như được xác định bằng cách thể lượng gắn kết với FcRn ở độ pH bằng 6,0 và lượng gắn kết với FcRn ở độ pH bằng 7,4 vào phương trình 1.

Tốt hơn nếu bước (b) là bước phân tách thể tiếp hợp trong đó gốc liên kết không peptidyl được liên kết với các gốc axit amin ra khỏi vùng gắn kết FcRn của mảnh Fc globulin miễn dịch, ví dụ vùng tương ứng với các vị trí 252-257 và 307-311 của CH2 và các vị trí 433-436 của CH2, được đánh số theo hệ thống đánh số thứ tự cobat. Đặc biệt, bước (b) là bước chỉ tách một cách chọn lọc thể tiếp hợp trong đó gốc liên kết không

peptidyl được liên kết với đầu tận cùng N của mảnh Fc globulin miễn dịch sao cho ái lực gắn kết nội tại của mảnh Fc đối với FcRn được duy trì.

Các điều kiện phân tách và tinh chế ở bước (b) có thể thay đổi phụ thuộc vào loại gốc liên kết không peptidyl, polypeptit có hoạt tính sinh lý và loại tương tự đã sử dụng.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp duy trì ái lực gắn kết nội tại của thể tiếp hợp chứa mảnh Fc globulin miễn dịch và polypeptit có hoạt tính sinh lý đối với FcRn, phương pháp này bao gồm bước cho polypeptit có hoạt tính sinh lý liên kết với mảnh Fc globulin miễn dịch chứa vùng gắn kết FcRn thông qua gốc liên kết không peptidyl.

Trong bản mô tả này, polypeptit có hoạt tính sinh lý, mảnh Fc globulin miễn dịch, gốc liên kết không peptidyl và thể tiếp hợp là như được nêu trên.

Sáng chế có ưu điểm ở chỗ, do polypeptit có hoạt tính sinh lý được liên kết với mảnh Fc globulin miễn dịch chứa vùng gắn kết FcRn thông qua gốc liên kết không peptidyl, nên ái lực gắn kết nội tại của mảnh Fc globulin miễn dịch với FcRn được duy trì đồng thời mảnh Fc globulin miễn dịch có thể tách một cách dễ dàng ra khỏi FcRn ở độ pH trung tính và có thể được tuần hoàn một cách dễ dàng, gợi ý rằng thời gian bán thải *in vivo* của mảnh Fc globulin miễn dịch có thể được tăng lên một cách hiệu quả.

Trong bản mô tả này, phương pháp duy trì ái lực gắn kết nội tại có thể được thực hiện *in vivo*.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến chế phẩm chứa thể tiếp hợp chứa mảnh Fc globulin miễn dịch và polypeptit có hoạt tính sinh lý, có thể duy trì được ái lực gắn kết nội tại của mảnh Fc globulin miễn dịch với FcRn.

Trong bản mô tả này, polypeptit có hoạt tính sinh lý, mảnh Fc globulin miễn dịch và thể tiếp hợp là như được nêu trên.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn trong phần ví dụ sau. Tuy nhiên, cần hiểu rằng các ví dụ này chỉ nhằm mục đích minh họa chứ không giới hạn phạm vi của sáng chế.

Ví dụ: Phương pháp sản xuất thể tiếp hợp của protein có hoạt tính sinh lý và mảnh Fc chứa vị trí gắn kết FcRn

(1) Điều chế mảnh Fc globulin miễn dịch

Mảnh Fc globulin miễn dịch được tạo ra theo phương pháp đã được mô tả trong Đơn sáng chế Hàn quốc số 10-2006-0077377 (“Method for mass production of methionin residue-free globulin miễn dịch Fc region”) được nộp dưới tên các tác giả sáng chế.

(2) Điều chế thể tiếp hợp chứa mảnh Fc globulin miễn dịch-insulin

Phản ứng được thực hiện để gắn PEG có phân ALD2 3,4 kDa (IDB, Hàn Quốc) đặc hiệu ở đầu tận cùng N của chuỗi beta của insulin. Dung dịch phản ứng được tinh chế bằng cột trao đổi cation. Để điều chế thể tiếp hợp chứa mảnh Fc globulin miễn dịch-insulin, insulin-mono-PEG đã tinh chế được cho phản ứng với mảnh Fc globulin miễn dịch. Tại thời điểm này, phản ứng được thực hiện ở độ pH nằm trong khoảng từ 6,0 đến 8,2 để định hướng insulin đặc hiệu tới đầu tận cùng N của mảnh Fc globulin miễn dịch. Sau khi phản ứng xảy ra hoàn toàn, dung dịch phản ứng trước tiên được tinh chế bằng cột trao đổi anion, và sau đó tinh chế bằng cột kỵ nước, để thu được thể tiếp hợp chứa insulin được liên kết đặc hiệu vị trí với mảnh Fc globulin miễn dịch.

(3) Điều chế thể tiếp hợp chứa mảnh Fc globulin miễn dịch-interferon

PEG có phân ALD2 3,4 kDa (IDB, Hàn Quốc) được bổ sung vào và cho phản ứng với dung dịch đậm chứa interferon alpha-2b của người (hIFN α -2b; khối lượng phân tử: 19 kDa) được hòa tan vào đó. Để thu được thể tiếp hợp trong đó PEG được liên kết đặc hiệu với đầu tận cùng amino của interferon-alpha và PEG và interferon-alpha được liên kết với nhau theo tỷ lệ bằng 1:1, hỗn hợp phản ứng được đưa vào cột sắc ký trao đổi ion để tinh chế IFN α -2b-mono-PEG. Để định hướng interferon-mono-PEG đã tinh chế đặc hiệu tới đầu tận cùng N của mảnh Fc globulin miễn dịch, phản ứng được thực hiện ở độ pH nằm trong khoảng từ 5,5 đến 6,5. Sau phản ứng liên kết, để tinh chế thể tiếp hợp chứa mảnh Fc globulin miễn dịch-interferon thu được, hỗn hợp phản ứng được cho đi qua cột trao đổi anion để thu được phân đoạn thể tiếp hợp chứa mảnh Fc globulin miễn dịch-interferon. Phân đoạn thể tiếp hợp được tiếp tục tinh chế bằng cột kỵ nước, để thu được thể tiếp hợp chứa interferon được liên kết đặc hiệu vị trí với mảnh Fc globulin miễn dịch.

(4) Điều chế thể tiếp hợp chứa mảnh Fc globulin miễn dịch-hormon sinh trưởng của người

PEG có phần ALD2 3,4 kDa (IDB, Hàn Quốc) được bổ sung vào và cho phản ứng với dung dịch đệm chứa hormon sinh trưởng của người (hGH; khối lượng phân tử: 22 kDa) được hòa tan vào đó. Để thu được thể tiếp hợp trong đó PEG được liên kết đặc hiệu với đầu tận cùng amino của hormon sinh trưởng của người và PEG và hormon sinh trưởng của người được liên kết với nhau theo tỷ lệ bằng 1:1, hỗn hợp phản ứng được đưa vào cột sắc ký trao đổi ion để tinh chế hormon sinh trưởng của người-mono-PEG. Để định hướng và liên kết hormon sinh trưởng của người-mono-PEG đã tinh chế đặc hiệu với đầu tận cùng N của mảnh Fc globulin miễn dịch, phản ứng được thực hiện ở độ pH nằm trong khoảng từ 5,5 đến 6,5. Sau phản ứng liên kết, hỗn hợp phản ứng được tinh chế bằng cột trao đổi anion, để thu được phân đoạn thể tiếp hợp chứa hormon sinh trưởng của người được liên kết đặc hiệu vị trí với mảnh Fc globulin miễn dịch.

(5) Điều chế thể tiếp hợp chứa mảnh Fc globulin miễn dịch đối kháng GLP-1R

PEG có phần ALD2 3,4 kDa (IDB, Hàn Quốc) được cho phản ứng đặc hiệu vị trí với gốc lysin của imidazo-axetyl-exendin-4 (CA exendin-4, Bachem, Thụy Sĩ). Để thu được thể tiếp hợp trong đó PEG và chất chủ vận GLP-1R được liên kết với nhau theo tỷ lệ bằng 1:1, hỗn hợp phản ứng được phân tích bằng phương pháp sắc ký cột trao đổi cation để tinh chế exendin-4-mono-PEG. Để điều chế thể tiếp hợp chứa mảnh Fc globulin miễn dịch đối kháng GLP-1R chứa exendin-4-mono-PEG liên kết đặc hiệu với đầu tận cùng N của mảnh Fc globulin miễn dịch, phản ứng được thực hiện ở độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 8,2. Sau phản ứng ghép cặp, quy trình tinh chế hai bước được thực hiện bằng cột kỵ nước và cột trao đổi anion, để thu được thể tiếp hợp chứa mảnh Fc globulin miễn dịch đối kháng GLP-1R chứa chất chủ vận GLP-1R được liên kết đặc hiệu vị trí với mảnh Fc globulin miễn dịch.

Ví dụ đối chứng: Điều chế thể tiếp hợp chứa chất chủ vận GLP-1R được liên kết trong khung với mảnh globulin miễn dịch

Để so sánh với thể tiếp hợp theo sáng chế, protein dung hợp chứa chất chủ vận GLP-1R với mảnh Fc globulin miễn dịch chứa vị trí FcRn có khối lượng phân tử khoảng 50 kDa được điều chế bằng phương pháp tái tổ hợp gen mà không cần sử dụng gốc liên

kết. Thử tiếp hợp chứa chất chủ vận GLP-1R được liên kết trong khung với mảnh Fc globulin miễn dịch (sau đây được gọi tắt là “thử tiếp hợp trong khung chứa mảnh Fc globulin miễn dịch đối kháng GLP-1R”) được tinh chế từ môi trường nuôi cấy bằng cột ái lực.

Ví dụ thử nghiệm 1: Đánh giá ái lực gắn kết với FcRn

Trong số các protein được đưa vào các tế bào bằng cách nhập bào, protein có vị trí gắn kết FcRn gắn kết với FcRn ở độ pH axit, trong khi đó protein không được gắn kết với FcRn được loại bỏ bằng cách phân hủy lysosom. Khi được phân tách ra khỏi FcRn ở độ pH trung tính, thì protein gắn kết với FcRn được giải phóng vào bề mặt tế bào, trong khi đó protein gắn kết với FcRn không được phân tách ra khỏi FcRn sẽ phân hủy lysosom. Cơ chế này được thể hiện trên Fig.1.

Do đó, để kiểm tra xem thử tiếp hợp trong ví dụ này thu được bằng cách liên kết protein có hoạt tính sinh lý với mảnh Fc globulin miễn dịch có vị trí gắn kết FcRn thông qua gốc liên kết không peptidyl hay không, có thể duy trì ái lực gắn kết của mảnh Fc globulin miễn dịch riêng lẻ với FcRn hoặc thử tiếp hợp này có thể được phân tách một cách dễ dàng ra khỏi FcRn ở độ pH trung tính và có thể được giải phóng vào máu hay không, thì thử nghiệm sau được thực hiện.

Đặc biệt, để kiểm tra xem ái lực gắn kết của mảnh globulin miễn dịch với FcRn không thay đổi ngay cả khi thử tiếp hợp theo sáng chế được tạo ra, thì ái lực gắn kết giữa FcRn và thử tiếp hợp của ví dụ theo sáng chế hoặc ví dụ đối chứng được xác định bằng phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt (BIAcore 3000). Thụ thể dime FCGRT & B2M (Sino Biological Inc.) được sử dụng làm FcRn. FcRn được cố định trên chip CM5 bằng phương pháp ghép cặp amin, và sau đó thử tiếp hợp này được bổ sung vào ở nồng độ nằm trong khoảng từ 100 nM đến 12,5 nM để xác định ái lực gắn kết giữa chúng. Tuy nhiên, do cơ chế làm tăng thời gian bán thải qua trung gian FcRn là phụ thuộc vào độ pH, nên thử nghiệm được thực hiện ở từng độ pH axit và độ pH trung tính.

(1) Đo ái lực gắn kết của thử tiếp hợp chứa globulin miễn dịch-protein với FcRn ở độ pH axit

Do quá trình gắn kết của protein đã nhập bào với FcRn xảy ra ở độ pH axit, nên dung dịch đệm phosphat (độ pH bằng 6,0) được sử dụng làm dung dịch đệm chạy 1 để tạo lại quá trình gắn kết này. Toàn bộ thể tiếp hợp chứa mảnh globulin miễn dịch-protein này được pha loãng vào dung dịch đệm chạy 1 để tạo ra quá trình gắn kết, và quá trình tách thể tiếp hợp cũng được thực hiện bằng cách sử dụng dung dịch đệm chạy 1. Mỗi thể tiếp hợp chứa mảnh globulin miễn dịch-protein này được cho tiếp xúc với chip đã cố định FcRn trong 4 phút để tạo ra quá trình gắn kết của nó, và sau đó thực hiện bước phân tách trong 6 phút. Tiếp theo, để đo các trị số của thể tiếp hợp chứa mảnh globulin miễn dịch-protein ở các nồng độ khác nhau, tức là gắn kết thể tiếp hợp chứa mảnh globulin miễn dịch-protein ở các nồng độ khác nhau với chip này, dung dịch đệm Hepes ở độ pH bằng 7,4 được cho tiếp xúc với thể tiếp hợp chứa mảnh globulin miễn dịch-protein gắn kết với FcRn trong khoảng 30 giây. Ái lực gắn kết của mỗi thể tiếp hợp chứa mảnh globulin miễn dịch-protein với FcRn ở độ pH axit được phân tích bằng cách sử dụng hỗn hợp gắn kết Langmuir theo tỷ lệ 1:1 với mô hình trôi đường nền trong phần mềm đánh giá BIA, và các kết quả phân tích được thể hiện trong Fig.2.

(2) Đo ái lực gắn kết của thể tiếp hợp globulin miễn dịch-protein với FcRn ở độ pH trung tính

Do quá trình giải phóng thể tiếp hợp ra khỏi các tế bào sau khi gắn kết với FcRn xảy ra khi độ pH thay đổi từ độ pH axit sang độ pH trung tính, nên dung dịch đệm Hepes (độ pH bằng 7,4) được sử dụng làm dung dịch đệm chạy 2. Tuy nhiên, quá trình gắn kết của giữa FcRn và mỗi thể tiếp hợp chứa mảnh globulin miễn dịch-protein được tạo ra trong 4 phút bằng cách sử dụng mẫu bao gồm mỗi thể tiếp hợp chứa mảnh globulin miễn dịch-protein, được pha loãng trong dung dịch đệm chạy 1, và sau đó quá trình tách mỗi thể tiếp hợp chứa mảnh globulin miễn dịch-protein ra khỏi FcRn được diễn ra trong 1 phút bằng cách sử dụng dung dịch đệm chạy 2. Đồ thị cảm biến của thể tiếp hợp chứa mảnh globulin miễn dịch-protein được thể hiện trong Fig.3. Mức độ phân ly thể tiếp hợp chứa mảnh globulin miễn dịch-protein ra khỏi FcRn được biểu thị bằng tỷ lệ gắn kết (%) theo phương trình 2 sau. Trong bản mô tả này, đơn vị cộng hưởng được xác định ở 2 giây trước khi kết thúc quá trình tiêm mẫu ở độ pH bằng 6,0 được chọn làm lượng vật lý, là tỷ lệ với lượng gắn kết ở độ pH bằng 6,0, và đơn vị cộng hưởng được xác định ở 10 giây sau khi bắt đầu quá trình tách ở độ pH bằng 7,4 được chọn làm lượng vật lý, là tỷ lệ với

lượng gắn kết ở độ pH bằng 7,4. Bằng cách sử dụng đơn vị cộng hưởng đã chọn, tỷ lệ gắn kết được tính toán theo phương trình 2:

Phương trình 2

$$\text{Tỷ lệ gắn kết (\%)} = (\text{lượng gắn kết ở độ pH bằng 7,4} / \text{lượng gắn kết ở độ pH bằng 6,0}) \times 100$$

Thuật ngữ “tỷ lệ gắn kết” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ mức độ mà thể tiếp hợp chứa mảnh globulin miễn dịch-protein tách được ra khỏi FcRn một cách dễ dàng. Có thể nhận thấy rằng nếu trị số của tỷ lệ gắn kết càng nhỏ, thì khả năng tách thể tiếp hợp ở độ pH trung tính càng tốt và quá trình tuần hoàn qua trung gian FcRn của thể tiếp hợp sẽ diễn ra một cách dễ dàng, ngược lại nếu trị số của tỷ lệ gắn kết càng lớn, thì khả năng tách thể tiếp hợp ở độ pH trung tính càng khó, để thể tiếp hợp có thể loại bỏ được bằng cách phân hủy lysosom ngay cả khi nó được nhập bào bằng cách gắn kết với FcRn.

Do đó, như được thể hiện trên Fig.2 và Fig.3, các thể tiếp hợp chứa mảnh globulin miễn dịch-protein khác nhau của ví dụ theo sáng chế đã được gắn kết với FcRn theo cách phụ thuộc nồng độ. Các kết quả cũng được thể hiện trong Bảng 1, và mức độ phân ly thể tiếp hợp, được tính toán bằng phương trình 2, được thể hiện trong Bảng 2.

Bảng 1: So sánh ái lực gắn kết của thể tiếp hợp chứa mảnh globulin miễn dịch-protein đối với FcRn ở độ pH bằng 6,0

Hợp chất thử nghiệm	Độ pH bằng 6,0		
	ka (1/Ms, X10 ⁵)	kd (1/giây, X10 ⁻³)	K _D (nM)
Mảnh globulin miễn dịch	4,8	10,5	22,0 ± 3,0
Thể tiếp hợp chứa insulin-mảnh globulin miễn dịch	3,1	7,1	22,6 ± 3,9
Thể tiếp hợp chứa interferon-mảnh globulin miễn dịch	3,0	9,3	30,0 ± 4,8
Thể tiếp hợp chứa hormon sinh trưởng của người- mảnh globulin miễn dịch	1,2	3,6	26,8 ± 9,0

Thẻ tiếp hợp chứa chất chủ vận GLP-1R-mảnh globulin miễn dịch	3,8	9,5	24,7 ± 5,5
Thẻ tiếp hợp chất chủ vận GLP-1R- mảnh globulin miễn dịch trong khung	3,2	5,3	17,0 ± 3,7

*ka: hằng số tốc độ liên kết, kd: hằng số tốc độ phân ly, K_D : hằng số ái lực, tỷ lệ gắn kết: trị số thu được bằng cách chia lượng gắn kết ở độ pH bằng 7,4 cho lượng gắn kết ở độ pH bằng 6,0 và nhân thương số này với 100.

Bảng 2: So sánh mức độ phân ly của thẻ tiếp hợp chứa mảnh globulin miễn dịch-protein ra khỏi FcRn

Hợp chất thử nghiệm	Nồng độ (nM)	Lượng gắn kết (RU) ở độ pH bằng 6,0	Lượng gắn kết (RU) ở độ pH bằng 7,4	Tỷ lệ gắn kết (%)	Tỷ lệ gắn kết trung bình (%)
Mảnh globulin miễn dịch	100	163,7	4,8	2,9	5,4 ± 2,0
	50	137,4	6,5	4,7	
	25	110,9	7,4	6,6	
	12,5	88,0	6,5	7,3	
Thẻ tiếp hợp chứa mảnh globulin miễn dịch-insulin	100	214,1	4,8	2,2	5,0 ± 2,2
	50	174,3	8,0	4,6	
	25	143,9	8,4	5,9	
	12,5	106,6	7,9	7,4	
Thẻ tiếp hợp chứa mảnh globulin miễn dịch-interferon	100	196,9	6,4	3,2	5,0 ± 1,6
	50	157,2	6,7	4,3	
	25	120,3	6,7	5,6	
	12,5	91,3	6,4	7,0	
Thẻ tiếp hợp chứa hormon sinh trưởng của người-mảnh globulin miễn dịch	100	205,7	8,2	4,0	6,6 ± 2,6
	50	153,0	7,7	5,1	
	25	111,9	8,3	7,4	
	12,5	82,9	8,1	9,8	
Thẻ tiếp hợp chứa chất chủ vận GLP-1R-mảnh globulin miễn dịch	100	163,5	6,2	3,8	6,6 ± 2,6
	50	135,5	8,1	5,9	
	25	107,7	7,2	6,7	
	12,5	86,2	8,6	10,0	
Thẻ tiếp hợp	100	301,7	38,2	12,7	12,7 ± 0,3

chứa chất chủ vận GLP-1R-mảnh globulin miễn dịch trong khung	50	249,5	31,2	12,5	
	25	197,6	25,9	13,1	
	12,5	148,7	18,6	12,5	

Kết quả trong bảng 1 và bảng 2 cho thấy rằng ái lực gắn kết ở độ pH axit hoặc độ pH trung tính không khác nhau đáng kể giữa mảnh globulin miễn dịch đơn lẻ (Fc độc lập không có protein trị liệu liên kết vào đó) và thể tiếp hợp theo sáng chế. Mặt khác, nhận thấy rằng, trong trường hợp thể tiếp hợp globulin miễn dịch-protein đã tạo ra theo sáng chế, ái lực gắn kết của mảnh globulin miễn dịch đối với FcRn không bị thay đổi ngay cả khi globulin miễn dịch gắn kết với protein có hoạt tính sinh lý, và đặc biệt là, thể tiếp hợp này bao gồm các protein có hoạt tính sinh lý khác nhau có kích thước khác nhau sẽ cho kết quả tương tự. Tuy nhiên, thể tiếp hợp chứa mảnh Fc globulin miễn dịch đối kháng GLP-1R trong khung của ví dụ đối chứng có tỷ lệ gắn kết cao, do đó không thể phân tách ra khỏi FcRn ở độ pH trung tính một cách thích hợp, và thể tiếp hợp này có tác dụng kéo dài thời gian bán thải của protein có hoạt tính sinh lý kém hơn so với thể tiếp hợp theo sáng chế.

Ví dụ thử nghiệm 2: Thử nghiệm so sánh dược động học *in vivo* giữa các thể tiếp hợp chứa mảnh Fc globulin miễn dịch đối kháng GLP-1R

Để so sánh dược động học *in vivo* giữa thể tiếp hợp chứa mảnh Fc globulin miễn dịch đối kháng GLP-1R trong ví dụ (5) với thể tiếp hợp chứa mảnh Fc globulin miễn dịch đối kháng GLP-1R trong khung, mức thay đổi nồng độ của thể tiếp hợp trong huyết thanh được phân tích bằng cách sử dụng chuột SD khỏe mạnh.

Cụ thể, mỗi thể tiếp hợp chứa mảnh Fc globulin miễn dịch đối kháng GLP-1R (400µg/kg) và thể tiếp hợp chứa mảnh Fc globulin miễn dịch đối kháng GLP-1R trong khung (400µg/kg) được pha loãng trong nước muối sinh lý và tiêm dưới da vào các chuột thử nghiệm ở liều bằng 2mL/kg. Sau 4 giờ, 8 giờ, 24 giờ, 48 giờ, 72 giờ, 96 giờ, 120 giờ, 144 giờ, 168 giờ, 192 giờ, 216 giờ, 240 giờ, 288 giờ, 312 giờ và 336 giờ tiêm các hợp chất thử nghiệm, máu được lấy từ tĩnh mạch cổ của các chuột thử nghiệm, và huyết thanh được phân tách ra khỏi máu. Tiếp theo, nồng độ của dược chất trong mỗi mẫu huyết thanh được định lượng bằng thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết enzym, và kết quả định lượng được thể hiện trên Fig.4.

Do đó, thời gian bán thải trong huyết thanh của thể tiếp hợp chứa mảnh Fc globulin miễn dịch đối kháng GLP-1R và thể tiếp hợp chứa mảnh Fc globulin miễn dịch đối kháng GLP-1R trong khung tương ứng là 40,9 giờ và 28 giờ, và nồng độ tối đa trong huyết thanh của các thể tiếp hợp này tương ứng là 1758,6ng/mL và 742,7ng/mL. Mặt khác, khi được chất được tiêm dưới da vào chuột khỏe mạnh ở liều lượng tương đương, thì đã phát hiện ra rằng thể tiếp hợp chứa mảnh globulin miễn dịch đối kháng GLP-1R theo sáng chế có mức độ hấp thu và thời gian bán thải *in vivo* vượt trội hơn so với thể tiếp hợp chứa mảnh Fc globulin miễn dịch đối kháng GLP-1R trong khung (Fig.4).

Trong khi sáng chế đã được mô tả bởi các phương án minh họa cụ thể, thì cần phải hiểu rằng người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực mà sáng chế có liên quan tới có thể được thể hiện ở các dạng cụ thể khác mà không làm sai lệch bản chất hoặc các dấu hiệu cơ bản của sáng chế. Do đó, các phương án nêu trên chỉ nhằm mục đích minh họa cho tất cả các khía cạnh chứ không chỉ giới hạn ở các khía cạnh này. Ngoài ra, phạm vi của sáng chế được xác định bởi bộ yêu cầu bảo hộ kèm theo chứ không phải là phần mô tả chi tiết sáng chế, và cần phải hiểu rằng tất cả các cải biến hoặc biến đổi được tạo ra từ phạm vi của sáng chế đều nằm trong phạm vi của bộ yêu cầu bảo hộ kèm theo.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Thở tiếp hợp của mảnh Fc globulin miễn dịch và polypeptit có hoạt tính sinh lý, trong đó một phân tử polypeptit có hoạt tính sinh lý này được liên kết với mảnh Fc globulin miễn dịch chứa vùng gắn kết FcRn thông qua gốc liên kết không peptidyl, trong đó mảnh Fc globulin miễn dịch này không còn được cải biến bằng polyme không peptidyl, trong đó tỷ lệ gắn kết của lượng thở tiếp hợp gắn kết với FcRn ở độ pH bằng 6,0 và lượng thở tiếp hợp gắn kết với FcRn ở độ pH bằng 7,4 nằm trong khoảng $\pm 6\%$ tỷ lệ được xác định bằng cách đo lượng mảnh Fc globulin miễn dịch, là cùng loại được sử dụng trong thở tiếp hợp này, gắn kết với FcRn trong cùng điều kiện như đã được sử dụng đối với thở tiếp hợp này, và trong đó mảnh Fc globulin miễn dịch này chứa vùng bản lề, miền CH2 và miền CH3.

2. Thở tiếp hợp theo điểm 1, trong đó tỷ lệ gắn kết của thở tiếp hợp chứa mảnh Fc globulin miễn dịch và polypeptit có hoạt tính sinh lý nằm trong khoảng $\pm 6\%$ tỷ lệ gắn kết của mảnh Fc globulin miễn dịch, là cùng loại được sử dụng trong thở tiếp hợp này, như được xác định bằng cách sử dụng phương trình:

phương trình 1

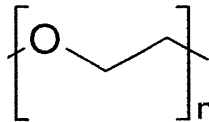
$\text{tỷ lệ gắn kết (\%)} = (\text{lượng gắn kết ở độ pH bằng 7,4} / \text{lượng gắn kết ở độ pH bằng 6,0}) \times 100.$

3. Thở tiếp hợp theo điểm 1 hoặc 2, trong đó thở tiếp hợp này được điều chế bằng cách cho polypeptit có hoạt tính sinh lý có gốc liên kết không peptidyl đã được liên kết vào đó phản ứng với mảnh Fc globulin miễn dịch ở độ pH nằm trong khoảng từ 4,0 đến 9,0, nhờ đó tạo ra liên kết của polypeptit có hoạt tính sinh lý với phần không chứa vùng gắn kết FcRn của mảnh Fc globulin miễn dịch thông qua gốc liên kết không peptidyl.

4. Thở tiếp hợp theo điểm 1 hoặc 2, trong đó gốc liên kết không peptidyl được chọn từ nhóm bao gồm polyetylen glycol, polypropylen glycol, copolyme etylen glycol-propylen glycol, rượu đa chức đã được polyoxyetyl hóa, rượu polyvinyllic, polysacarit, dextran, polyvinyl etyl ete, polyme có thể phân hủy sinh học, polyme lipid, kitin, axit hyaluronit và hỗn hợp của chúng.

5. Thẻ tiếp hợp theo điểm 1 hoặc 2, trong đó gốc liên kết không peptidyl là polyetylen glycol có công thức 1:

công thức 1



trong đó n nằm trong khoảng từ 10 đến 2400.

6. Thẻ tiếp hợp theo điểm 1 hoặc 2, trong đó gốc liên kết không peptidyl có nhóm phản ứng được chọn từ nhóm bao gồm nhóm aldehyt, nhóm propionaldehyt, nhóm butyraldehyt, nhóm maleimit và dẫn xuất succinimit.

7. Thẻ tiếp hợp theo điểm 1 hoặc 2, trong đó polypeptit có hoạt tính sinh lý được chọn từ nhóm bao gồm peptit tương tự glucagon-1 (GLP-1), yếu tố kích thích tạo máu bạch cầu hạt (G-CSF), erythropoietin (EPO), glucagon, oxyntomodulin, hormon giải phóng hormon sinh trưởng, peptit giải phóng hormon sinh trưởng, thụ thể interferon, thụ thể ghép cặp protein G, interleukin, thụ thể interleukin, enzym, protein gắn kết interleukin, protein gắn kết xytokin, yếu tố hoạt hóa đại thực bào, peptit đại thực bào, yếu tố tế bào B, yếu tố tế bào T, protein A, chất ức chế dị ứng, glycoprotein gây hoại tử tế bào, độc tố miễn dịch, lymphotoxin, yếu tố gây hoại tử khối u, chất kìm hãm khối u, yếu tố phát triển sự di căn, antitrypsin alpha-1, albumin, α -lactalbumin, apolipoprotein-E, erythropoietin đã được glycosyl hóa ở mức cao, angiopoietin, hemoglobin, trombin, peptit hoạt hóa thụ thể trombin, trombomodulin, yếu tố đông máu VII, yếu tố đông máu VIIa, yếu tố đông máu VIII, yếu tố đông máu IX và yếu tố đông máu XIII, yếu tố hoạt hóa plasminogen, peptit gắn kết fibrin, urokinaza, streptokinaza, hirudin, protein C, protein phản ứng C, chất ức chế renin, chất ức chế collagenaza, superoxit dismutaza, leptin, yếu tố sinh trưởng có nguồn gốc từ tiểu cầu, yếu tố sinh trưởng biểu mô, yếu tố sinh trưởng biểu bì, angiostatin, angiotensin, yếu tố sinh trưởng xương, protein kích thích tạo xương, canxitonin, atriopeptin, yếu tố tạo sụn, elcatonin, yếu tố hoạt hóa mô liên kết, chất ức chế quá trình của yếu tố mô, hormon kích thích nang, hormon tạo hoàng thể, hormon giải phóng hormon tạo hoàng thể, yếu tố sinh trưởng dây thần kinh, hormon tuyến cận giáp, relaxin, secretin, somatomedin, yếu tố sinh trưởng tương tự insulin, hormon vỏ tuyến

thượng thận, cholexystokinin, polypeptit tuyến tụy, peptit giải phóng gaxtrin, yếu tố giải phóng corticotropin, hormon kích thích tuyến giáp, autotaxin, lactoferrin, myostatin, kháng nguyên bề mặt tế bào, kháng nguyên vacxin có nguồn gốc từ virus, kháng thể đơn dòng, kháng thể đa dòng và mảnh kháng thể.

8. Thể tiếp hợp theo điểm 1 hoặc 2, trong đó mảnh Fc globulin miễn dịch ở dạng không được glycosyl hóa.

9. Thể tiếp hợp theo điểm 1 hoặc 2, trong đó mảnh Fc globulin miễn dịch có nguồn gốc từ globulin miễn dịch được chọn từ nhóm bao gồm IgG, IgA, IgD, IgE, IgM, hỗn hợp của chúng và các thể lai của chúng.

10. Thể tiếp hợp theo điểm 1 hoặc 2, trong đó mảnh Fc globulin miễn dịch là mảnh Fc IgG4.

11. Thể tiếp hợp theo điểm 1, trong đó tỷ lệ gắn kết của lượng thể tiếp hợp gắn kết với FcRn ở độ pH bằng 6,0 và lượng thể tiếp hợp gắn kết với FcRn ở độ pH bằng 7,4 nằm trong khoảng $\pm 4\%$ tỷ lệ được xác định bằng cách đo lượng mảnh Fc globulin miễn dịch, là cùng loại được sử dụng trong thể tiếp hợp này, gắn kết với FcRn trong cùng điều kiện như đã được sử dụng đối với thể tiếp hợp này.

12. Phương pháp sản xuất thể tiếp hợp của mảnh Fc globulin miễn dịch và polypeptit có hoạt tính sinh lý theo điểm 1 hoặc 2, trong đó mảnh Fc globulin miễn dịch này chứa vùng bản lề, miền CH2 và miền CH3, và không còn được cải biến bằng polyme không peptidyl, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

(a) cho polypeptit có hoạt tính sinh lý liên kết với mảnh Fc globulin miễn dịch chứa vùng gắn kết FcRn thông qua gốc liên kết không peptidyl để tạo ra hỗn hợp các thể tiếp hợp chứa mảnh Fc globulin miễn dịch và polypeptit có hoạt tính sinh lý; và

(b) phân tách ra khỏi hỗn hợp này thể tiếp hợp chứa mảnh Fc globulin miễn dịch và polypeptit có hoạt tính sinh lý, có tỷ lệ gắn kết nằm trong khoảng $\pm 6\%$ tỷ lệ gắn kết của mảnh Fc globulin miễn dịch, như được xác định bằng cách thể lượng gắn kết với FcRn ở độ pH bằng 6,0 và lượng gắn kết với FcRn ở độ pH bằng 7,4 vào phương trình 1:

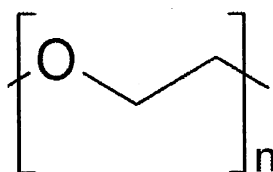
phương trình 1

tỷ lệ gắn kết (%) = (lượng gắn kết ở độ pH bằng 7,4/ lượng gắn kết ở độ pH bằng 6,0) X 100.

13. Phương pháp theo điểm 12, trong đó bước (b) bao gồm công đoạn xác định tỷ lệ gắn kết của thể tiếp hợp và tỷ lệ gắn kết của mảnh Fc globulin miễn dịch bằng cách sử dụng phương trình 1 trước khi phân tách thể tiếp hợp

14. Phương pháp theo điểm 12, trong đó gốc liên kết không peptidyl là polyetylen glycol có công thức 1:

công thức 1



trong đó n nằm trong khoảng từ 10 đến 2400.

15. Phương pháp theo điểm 12, trong đó thể tiếp hợp đã được phân tách ở bước (b) có cấu trúc trong đó gốc liên kết không peptidyl được gắn kết với đầu tận cùng N của mảnh Fc globulin miễn dịch.

16. Phương pháp theo điểm 12, trong đó polypeptit có hoạt tính sinh lý được chọn từ nhóm bao gồm peptit tương tự glucagon-1 (GLP-1), yếu tố kích thích tạo máu bạch cầu hạt (G-CSF), erythropoietin (EPO), glucagon, oxyntomodulin, hormon giải phóng hormon sinh trưởng, peptit giải phóng hormon sinh trưởng, thụ thể interferon, thụ thể ghép cặp protein G, interleukin, thụ thể interleukin, enzym, protein gắn kết interleukin, protein gắn kết xytokin, yếu tố hoạt hóa đại thực bào, peptit đại thực bào, yếu tố tế bào B, yếu tố tế bào T, protein A, chất ức chế dị ứng, glycoprotein gây hoại tử tế bào, độc tố miễn dịch, lymphotoxin, yếu tố gây hoại tử khối u, chất kìm hãm khối u, yếu tố phát triển sự di căn, antitrypsin alpha-1, albumin, α -lactalbumin, apolipoprotein-E, erythropoietin đã được glycosyl hóa ở mức cao, angiopoietin, hemoglobin, trombin, peptit hoạt hóa thụ thể trombin, trombomodulin, yếu tố đông máu VII, yếu tố đông máu VIIa, yếu tố đông máu VIII, yếu tố đông máu IX và yếu tố đông máu XIII, yếu tố hoạt hóa plasminogen,

peptit gắn kết fibrin, urokinaza, streptokinaza, hirudin, protein C, protein phản ứng C, chất ức chế renin, chất ức chế collagenaza, superoxit dismutaza, leptin, yếu tố sinh trưởng có nguồn gốc từ tiểu cầu, yếu tố sinh trưởng biểu mô, yếu tố sinh trưởng biểu bì, angiostatin, angiotensin, yếu tố sinh trưởng xương, protein kích thích tạo xương, canxitonin, atriopeptin, yếu tố tạo sụn, elcatonin, yếu tố hoạt hóa mô liên kết, chất ức chế quá trình của yếu tố mô, hormon kích thích nang, hormon tạo hoàng thể, hormon giải phóng hormon tạo hoàng thể, yếu tố sinh trưởng dây thần kinh, hormon tuyến cận giáp, relaxin, secretin, somatomeđin, yếu tố sinh trưởng tương tự insulin, hormon vỏ tuyến thượng thận, cholexystokinin, polypeptit tuyến tụy, peptit giải phóng gaxtrin, yếu tố giải phóng corticotropin, hormon kích thích tuyến giáp, autotaxin, lactoferrin, myostatin, kháng nguyên bề mặt tế bào, kháng nguyên vacxin có nguồn gốc từ virus, kháng thể đơn dòng, kháng thể đa dòng và mảnh kháng thể.

17. Phương pháp theo điểm 12, trong đó mảnh Fc globulin miễn dịch ở dạng không được glycosyl hóa.

18. Phương pháp theo điểm 12, trong đó mảnh Fc globulin miễn dịch có nguồn gốc từ globulin miễn dịch được chọn từ nhóm bao gồm IgG, IgA, IgD, IgE, IgM, hỗn hợp của chúng và các thể lai của chúng.

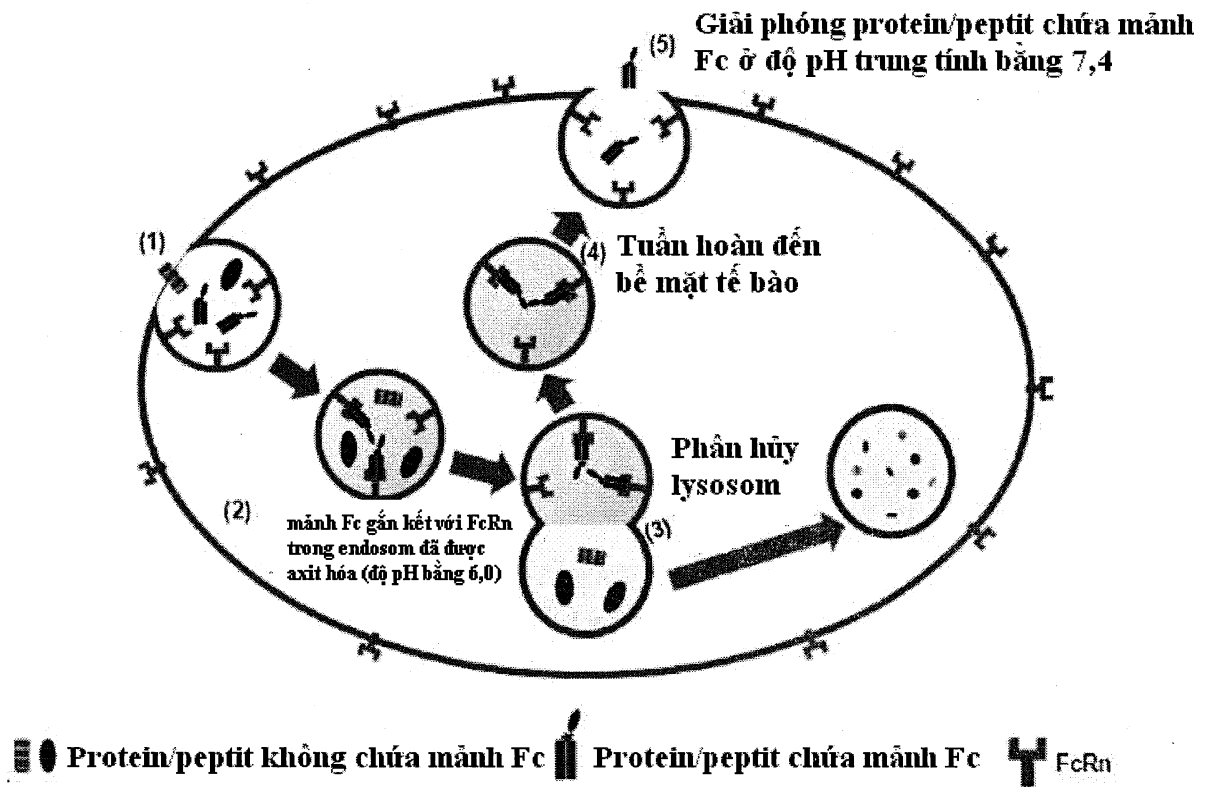
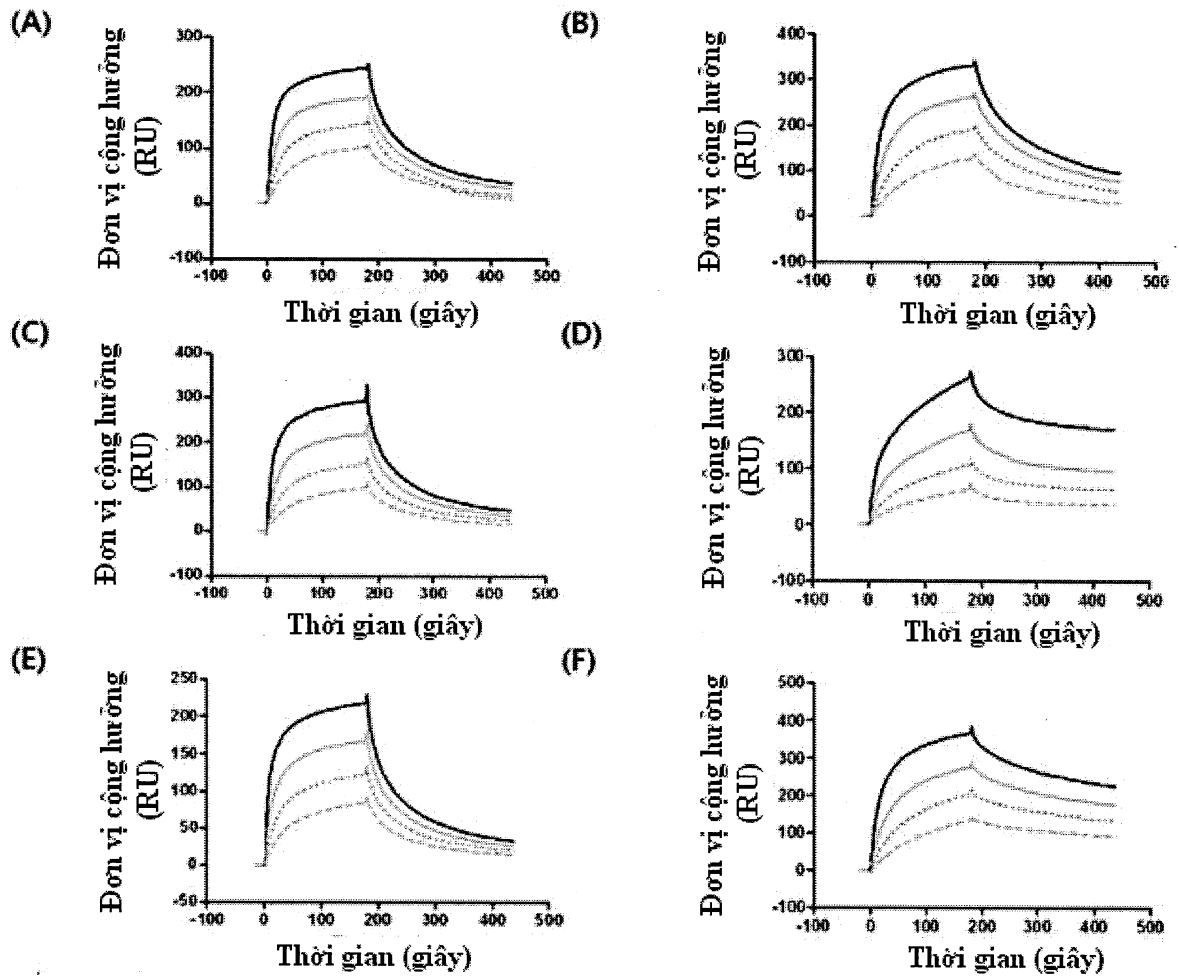


Fig.1

**Fig.2**

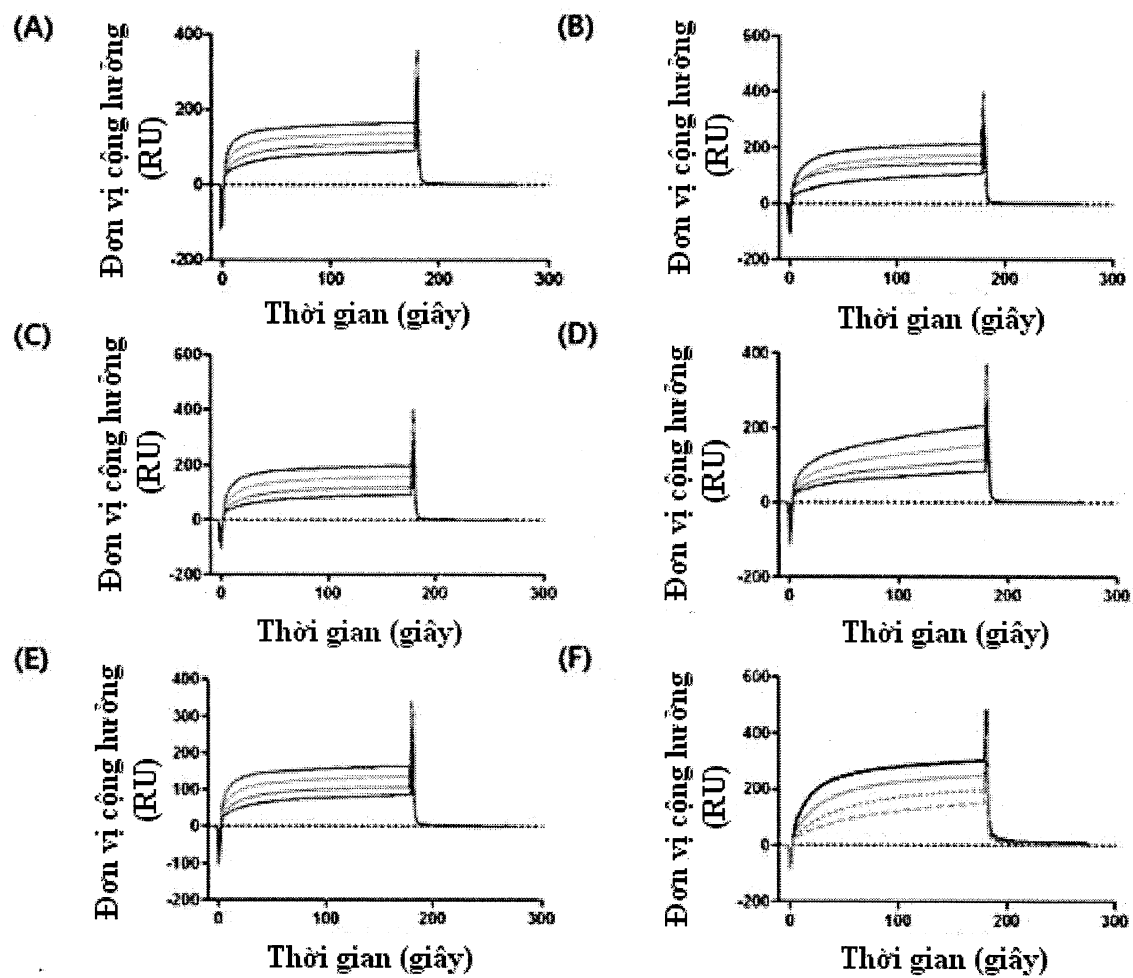


Fig.3

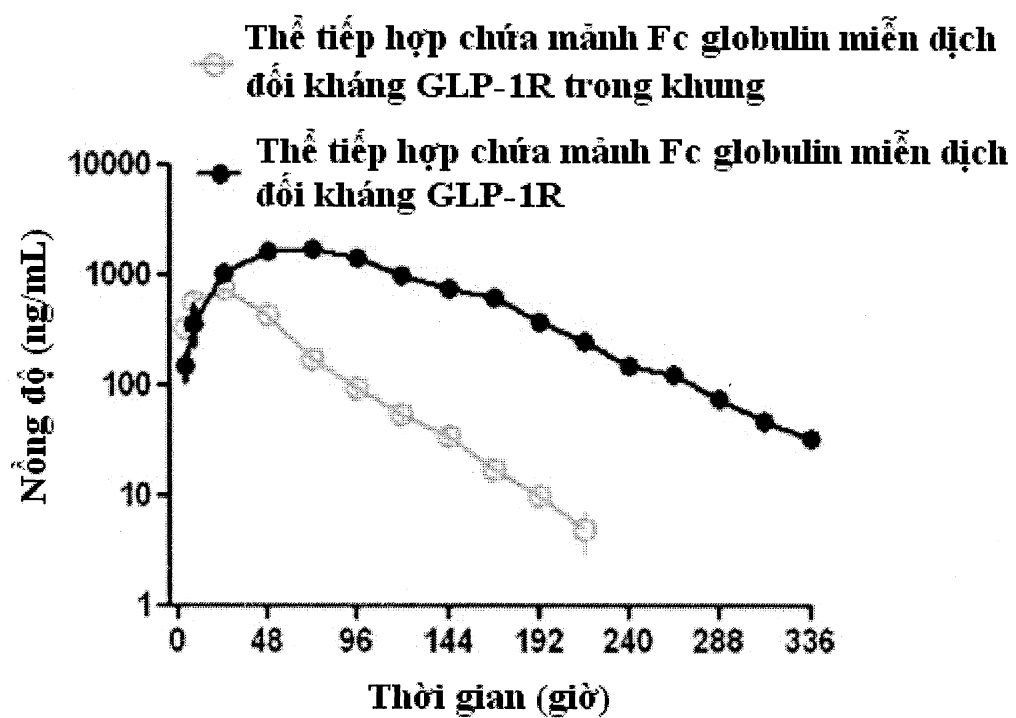


Fig.4