



(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)



1-0029101

(51)⁷ C07K 7/08; C12N 15/63; C12N 15/13; (13) B
A61K 47/42

(21) 1-2015-04940

(22) 29/05/2014

(86) PCT/KR2014/004799 29/05/2014

(87) WO2014/193173 04/12/2014

(30) 10-2013-0063029 31/05/2013 KR

(45) 25/08/2021 401

(43) 25/04/2016 337A

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

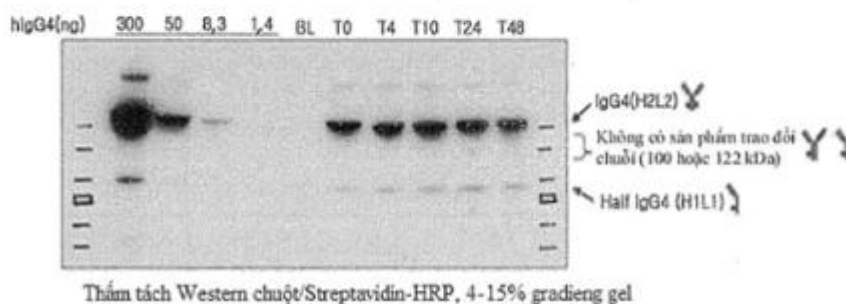
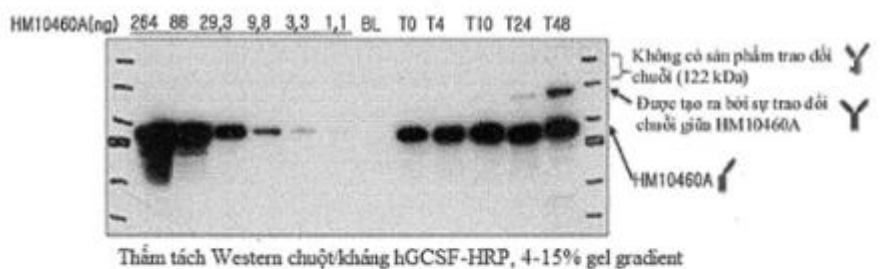
214, Muha-ro, Paltan-myeon, Hwaseong-si, Gyeonggi-do 445-958, Republic of Korea

(72) JUNG, Sung Youb (KR); HUH, Yong Ho (KR); PARK, Sung Hee (KR); LEE, Jong Soo (KR); CHOI, In Young (KR).

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

(54) MẢNH IGG4 FC CHỨA VÙNG BẢN LỀ CẢI BIẾN VÀ THỂ TIẾP HỢP ĐƯỢC CHẤT CỦA MẢNH NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến mảnh IgG4 Fc cải biến hữu ích làm chất mang dược chất. Khi mảnh IgG4 Fc cải biến theo sáng chế được kết hợp với dược chất tùy ý thì thể tiếp hợp dược chất thu được có thể làm giảm đến mức tối thiểu chức năng hiệu ứng của IgG4 Fc và sự trao đổi chuỗi với IgG *in vivo* đồng thời duy trì hoạt tính *in vivo* và cải thiện thời gian lưu *in vivo* của thể tiếp hợp dược chất này.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến mảnh IgG4 Fc hữu ích dùng làm chất mang dược chất, và cụ thể hơn, mảnh IgG4 Fc có thể làm giảm đến mức tối thiểu chức năng hiệu ứng bởi Fc nhưng không gây ra sự trao đổi chuỗi với IgG *in vivo*, và có thể cải thiện thời gian bán thải *in vivo* của dược chất được liên hợp.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Sự cải tiến trong kỹ thuật xử lý di truyền đã dẫn đến việc sản xuất và sử dụng các loại dược chất protein khác nhau. Tuy nhiên, các dược chất protein có vấn đề nguy hiểm vì chúng dễ bị biến tính hoặc dễ bị phân hủy bởi các proteaza *in vivo* và do đó, không thể duy trì nồng độ hoặc hàm lượng *in vivo* của chúng trong một khoảng thời gian dài. Do đó, điều rất quan trọng là phải duy trì nồng độ trong máu và nồng độ *in vivo* của các dược chất protein ở mức thích hợp bằng cách làm tăng độ ổn định của protein để tạo ra tác dụng điều trị bệnh có hiệu quả cho bệnh nhân đồng thời làm giảm gánh nặng của bệnh nhân khi phải dùng dược chất protein thường xuyên bằng cách tiêm, v.v., và chi phí của họ.

Do đó, để cải thiện độ ổn định *in vivo* của dược chất protein, các nỗ lực khác nhau đã được thực hiện trong thời gian dài, bằng cách thay đổi loại chế phẩm chứa protein, dung hợp với các protein khác, hoặc gắn polyme thích hợp với bề mặt protein bằng các phương pháp hóa học hoặc sinh học.

Một trong số các nỗ lực để cải thiện độ ổn định của protein bằng cách dung hợp với các protein khác là tiến hành dung hợp Fc globulin miễn dịch với protein.

Vùng Fc đảm nhiệm chức năng hiệu ứng, như tính độc tế bào phụ thuộc bổ thể (complement-dependent cytotoxicity - CDC) và tính độc tế bào phụ thuộc kháng thể (antibody-dependent cell cytotoxicity - ADCC), ngoài khả năng gắn kết kháng nguyên, là chức năng chính của globulin miễn dịch. Ngoài ra, trình tự FcRn có mặt trong vùng Fc đóng vai trò điều hòa lượng IgG trong huyết thanh bằng cách làm tăng thời gian bán thải *in vivo* nhờ tiếp hợp với thụ thể FcRn *in*

vivo. Về vấn đề này, các nghiên cứu về hoạt tính đã được thực hiện để cải thiện các protein trị liệu thông qua sự dung hợp của vùng Fc với các protein trị liệu.

Tuy nhiên, protein dung hợp Fc được tạo ra bằng cách tái tổ hợp di truyền có các nhược điểm ở chỗ thể dung hợp protein chỉ có thể ở trong vùng cụ thể của vùng Fc, tức là, đầu tận cùng amino hoặc đầu tận cùng carboxy, và chỉ giữa các protein glycosyl hóa hoặc giữa các protein không glycosyl hóa, nhưng nó không thể giữa protein glycosyl hóa và protein không glycosyl hóa. Ngoài ra, protein dung hợp Fc được tạo ra bằng cách tái tổ hợp di truyền có vấn đề vì đáp ứng miễn dịch có thể xảy ra do trình tự axit amin được tạo mới bởi dung hợp và tính miễn cảm của proteinaza trên vùng cầu nối có thể tăng lên.

Ngoài ra, protein dung hợp với Fc có thời gian bán thải protein đích trong huyết thanh tăng, nhưng đồng thời chúng cũng có vấn đề vì chức năng hiệu ứng của vùng Fc này được thể hiện (Patent Mỹ số 5,349,053). Nhờ chức năng hiệu ứng của vùng Fc, protein dung hợp có thể cố định bổ thể hoặc gắn kết với các tế bào biểu hiện FcRs để phá hủy các tế bào cụ thể, và gây ra sự sản sinh và tiết các xytokin khác nhau là chất gây viêm, từ đó gây ra chứng viêm. Ngoài ra, các trình tự protein trong vùng được dung hợp là các trình tự protein mới không có mặt trong cơ thể người, và do đó, chúng có các nhược điểm khác nhau bao gồm điều có thể gây ra đáp ứng miễn dịch trong trường hợp dùng trong thời gian dài.

Do đó, các nghiên cứu đã tập trung vào việc sử dụng globulin miễn dịch, hoặc các mảnh globulin miễn dịch trong đó chức năng hiệu ứng được loại bỏ đồng thời thời gian bán thải trong huyết thanh được duy trì. Trước đây, Cole và các đồng tác giả đã thông báo rằng hoạt tính ADCC bị ức chế bằng cách thay thế các gốc thứ 234, 235, và 237 trong miền CH2, là các gốc đóng vai trò quan trọng trong việc gắn kết với các thụ thể Fc, bằng alanin, để tạo ra các dẫn xuất Fc có ái lực giảm với thụ thể Fc (Cole *et al.*, *J. Immunol.* 159: 3613-3621, 1997). Tuy nhiên, tất cả các dẫn xuất này có axit amin không thích hợp, khác với các axit amin trong vùng Fc nguyên thể của người và do đó, có thể có tính miễn dịch hoặc tính kháng nguyên cao hơn, và chức năng Fc ưu tiên có thể bị mất.

Một phương pháp loại bỏ hoặc làm giảm chức năng hiệu ứng không mong muốn đồng thời duy trì nồng độ globulin miễn dịch cao trong máu là phương pháp loại bỏ sacarit trong globulin miễn dịch. Trong patent Mỹ số

5,585,097, các dẫn xuất kháng thể không glycosyl hóa được tạo ra bằng cách thay thế gốc asparagin ở vị trí 297 trên miền CH2, là gốc được glycosyl hóa của các kháng thể CD3, bằng một axit amin khác khi tạo ra kháng thể CD3, và đặc biệt là, các dẫn xuất này thể hiện chức năng hiệu ứng giảm đồng thời duy trì lực gắn kết với các thụ thể FcRn mà không thay đổi thời gian bán thải trong huyết thanh của chúng. Tuy nhiên, phương pháp này cũng có vấn đề vì các dẫn xuất này có thể được nhận diện là chất lạ và bị thải loại như vậy bởi hệ miễn dịch, do sự sản xuất cấu trúc tái tổ hợp mới.

Trong phương pháp tạo thể dung hợp protein bằng cách sử dụng các trình tự IgG Fc nguyên thể, IgG4 Fc có thể được chọn để làm giảm đến mức tối thiểu chức năng hiệu ứng bởi Fc. IgG4 đã được biết là có thời gian bán thải *in vivo* tương tự như thời gian bán thải *in vivo* của IgG1 nhưng có chức năng hiệu ứng tương đối nhỏ do sự khác biệt trong trình tự axit amin. Tuy nhiên, mặc dù ưu điểm của IgG4 là có chức năng hiệu ứng giảm, sự trao đổi chuỗi *in vivo* có thể xảy ra giữa IgG4 do trình tự bản lề khác thường của nó, và do đó, đã có thông báo rằng có nhiều khó khăn khi sử dụng các thể dung hợp protein nhằm các mục đích trị liệu (van der Neut Kolfshoten, *et al.*, Science, 317:1554-1557, 2007). Tức là, có vấn đề vì khi IgG4 Fc được sử dụng làm chất mang cho thể dung hợp protein sẽ xảy ra sự trao đổi chuỗi với IgG4 có mặt *in vivo*, từ đó tạo ra thể lai với IgG4 nguyên thể, hoặc nó có thể có mặt ở dạng monome, từ đó làm thay đổi cấu trúc ban đầu và có cấu trúc với hoạt tính trị liệu thấp. Đây là vấn đề phổ biến dù sản phẩm dung hợp giữa mảnh IgG4 Fc và chất có hoạt tính sinh lý được tạo ra thông qua kỹ thuật di truyền hay *in vitro*.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề kỹ thuật cần được giải quyết

Trong bối cảnh này, sáng chế đã được tạo ra thông qua các nghiên cứu để phát triển mảnh IgG Fc có khả năng hoạt động như chất mang được chất có ít nguy cơ gây ra phản ứng trao đổi nhánh Fab với IgG *in vivo* và chức năng hiệu ứng đồng thời có khả năng khắc phục các nhược điểm trong kỹ thuật dung hợp tái tổ hợp di truyền. Các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng thể tiếp hợp của được chất có độ bền được cải thiện mà không có nguy cơ gây ra phản ứng trao đổi nhánh Fab với IgG *in vivo* và chức năng hiệu ứng có thể được tạo ra khi trình

tự bản lề của mảnh IgG4 Fc, đã được gây đột biến để chỉ có một gốc xystein, được tạo ra trong *E. coli* và được liên hợp với dược chất.

Cách thức giải quyết vấn đề

Các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng thể tiếp hợp của dược chất có độ bền được cải thiện mà không có nguy cơ gây ra phản ứng trao đổi nhánh Fab với IgG *in vivo* và chức năng hiệu ứng có thể được tạo ra khi trình tự bản lề của mảnh IgG4 Fc, đã được gây đột biến để chỉ có một gốc xystein, được tạo ra trong *E. coli* và được liên hợp với dược chất.

Mục đích của sáng chế là đề xuất mảnh IgG4 Fc, có ít nguy cơ gây ra phản ứng trao đổi chuỗi với IgG *in vivo* hoặc chức năng hiệu ứng và có thể hoạt động như chất mang dược chất. Cụ thể hơn, sáng chế đề xuất mảnh IgG4 Fc cải biến chứa vùng bản lề cải biến, trong đó một phần của trình tự bản lề được làm mất đoạn để chỉ chứa một gốc xystein.

Một mục đích của sáng chế là đề xuất axit nucleic mã hóa mảnh IgG4 Fc cải biến chứa vùng bản lề cải biến, trong đó một phần của trình tự bản lề được làm mất đoạn để chỉ chứa một gốc xystein.

Một mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất vector chứa axit nucleic mã hóa mảnh IgG4 Fc cải biến chứa vùng bản lề cải biến, trong đó một phần của trình tự bản lề được làm mất đoạn để chỉ chứa một gốc xystein.

Một mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất vi sinh vật mà vector chứa axit nucleic mã hóa mảnh IgG4 Fc cải biến chứa vùng bản lề cải biến được đưa vào, trong đó một phần của trình tự bản lề được làm mất đoạn để chỉ chứa một gốc xystein.

Một mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất phương pháp tạo ra mảnh IgG4 Fc cải biến bao gồm việc nuôi cấy vi sinh vật, mà vector chứa axit nucleic mã hóa mảnh IgG4 Fc cải biến này được đưa vào.

Một mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất thể tiếp hợp dược chất, trong đó dược chất và mảnh IgG4 Fc cải biến được tiếp hợp thông qua cầu nối.

Một mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất dược phẩm chứa thể tiếp hợp dược chất, trong đó dược chất và mảnh IgG4 Fc cải biến được tiếp hợp thông qua cầu nối.

Các ưu điểm của giải pháp theo sáng chế

Sáng chế có thể tạo ra mảnh IgG4 Fc cải biến có chức năng hiệu ứng

được giảm đến mức tối thiểu mà không có sự thay thế hoặc bổ sung axit amin hoặc bổ sung glycan và cũng không có phản ứng trao đổi chuỗi với IgG4 *in vivo*. Mảnh IgG4 Fc cải biến theo sáng chế, không phụ thuộc vào phương pháp tiếp hợp nó với dược chất, như phương pháp dùng kỹ thuật di truyền và phương pháp đồng hóa trị *in vitro*, có thể ức chế phản ứng trao đổi chuỗi *in vivo* của dược chất được tiếp hợp khi nó được tiếp hợp với dược chất, và nhờ đó có thể tạo ra tính ưu việt trị liệu đáng kể so với mảnh IgG4 Fc nguyên thể.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1 thể hiện sự có/không có sự trao đổi chuỗi IgG4 của người giữa hIgG4 được biotin hóa và thể tiếp hợp yếu tố kích thích khuẩn lạc bạch cầu hạt của người-PEG-mảnh IgG4 Fc trong máu của chuột.

Fig. 2 thể hiện sự có/không có sự trao đổi chuỗi IgG4 của người giữa hIgG4 được biotin hóa và thể tiếp hợp yếu tố kích thích khuẩn lạc bạch cầu hạt của người-PEG-mảnh IgG4 Fc trong máu của người.

Mô tả chi tiết sáng chế

Các phương án được ưu tiên theo sáng chế sẽ được mô tả một cách chi tiết hơn dưới đây có dựa vào các hình vẽ kèm theo. Tuy nhiên, sáng chế có thể được thực hiện theo các dạng khác nhau và không được hiểu là làm giới hạn ở các phương án được đưa ra trong bản mô tả này. Thay vào đó, các phương án này được mô tả để giải pháp theo sáng chế trở nên được hiểu hoàn toàn và đầy đủ, và sẽ bao trùm toàn bộ phạm vi của sáng chế đối với các người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Theo một khía cạnh, để đạt được các mục đích nêu trên, sáng chế đề xuất mảnh IgG4 Fc cải biến hữu ích làm chất mang dược chất. Cụ thể hơn, sáng chế đề xuất mảnh IgG4 Fc cải biến chứa vùng bản lề cải biến, trong đó một phần của trình tự bản lề được làm mất đoạn để chỉ chứa một gốc xystein.

Mảnh IgG4 Fc cải biến theo sáng chế chứa vùng bản lề cải biến, trong đó một phần của vùng bản lề được biểu thị bởi trình tự axit amin sau được làm mất đoạn để chỉ chứa một gốc xystein:

Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro-Ser-Cys-Pro (SEQ ID NO: 1).

Trong khi nỗ lực để giải quyết vấn đề về mảnh IgG4 Fc có tính hữu ích

thấp do phản ứng trao đổi chuỗi với IgG4 *in vivo*, mặc dù tính hữu ích của nó làm chất mang để làm tăng thời gian bán thải của dược chất, các tác giả sáng chế này đã phát hiện ra rằng không xảy ra phản ứng trao đổi chuỗi *in vivo* và tạo ra monome khi mảnh IgG4 Fc được cải biến bằng cách loại bỏ, nhờ làm mất đoạn, một gốc xystein ra khỏi hai gốc xystein có mặt trong vùng bản lề của mảnh IgG4 Fc cũng như một phần của vùng bản lề, nhờ đó xác nhận rằng mảnh IgG4 Fc cải biến có thể được sử dụng một cách có hiệu quả làm chất mang dược chất.

Theo một phương án, mảnh IgG4 Fc theo sáng chế có thể chứa vùng bản lề được cải biến bằng cách làm mất đoạn 1 đến 8 axit amin bao gồm gốc Cys ở vị trí số 8 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1.

Ngoài ra, theo một phương án, mảnh IgG4 Fc theo sáng chế có thể chứa vùng bản lề được cải biến bằng cách làm mất đoạn 1 đến 8 axit amin bao gồm gốc Cys ở vị trí số 11 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1.

Theo cách khác, theo một phương án, mảnh IgG4 Fc theo sáng chế có thể chứa vùng bản lề được cải biến bằng cách làm mất đoạn 1 đến 5 axit amin bao gồm gốc Cys ở vị trí số 8 hoặc 1 đến 5 axit amin bao gồm gốc Cys ở vị trí số 11 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1.

Theo cách khác, theo một phương án, mảnh IgG4 Fc theo sáng chế có thể chứa vùng bản lề được cải biến bằng cách làm mất đoạn 1 đến 3 axit amin bao gồm gốc Cys ở vị trí số 8 hoặc 1 đến 3 axit amin bao gồm gốc Cys ở vị trí số 11 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1.

Các gốc axit amin được làm mất đoạn nêu trên có thể liên tục hoặc không liên tục.

Vùng bản lề của mảnh IgG4 Fc theo sáng chế được đặc trưng ở chỗ nó được cải biến để chỉ chứa một gốc xystein giữa hai gốc xystein ở các vị trí số 8 và 11 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1, và ở chỗ không phải cả hai gốc xystein được loại bỏ.

Vùng bản lề đã cải biến để chỉ chứa một gốc xystein trong số hai gốc xystein trong vùng bản lề giúp tạo ra tác dụng mà không trao đổi chuỗi *in vivo*, tạo ra monome, v.v., trên mảnh IgG4 Fc cải biến.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “chất mang” được dùng để chỉ chất dùng để tiếp hợp với dược chất, và được tiếp hợp với dược chất, nó thường làm tăng hoặc làm mất hoạt tính sinh lý của dược chất. Tuy nhiên,

chất mang theo sáng chế làm tăng độ ổn định *in vivo* của dược chất đồng thời làm giảm đến mức tối thiểu sự giảm hoạt tính sinh lý của dược chất, và chất mang theo sáng chế được đặc trưng ở chỗ nó không có tác dụng dược lý bất kỳ ngăn cản hoạt tính trị liệu của dược chất được tiếp hợp với chất mang, như sự chết tế bào theo chương trình hoặc sự hoạt hóa bổ thể, và gắn kết với protein cụ thể.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “mảnh IgG4 Fc” chỉ vùng ổn định của chuỗi nặng 2 (CH2) và vùng ổn định của chuỗi nặng 3 (CH3), ngoại trừ các vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, vùng ổn định của chuỗi nặng 1 (CH1) và vùng ổn định của chuỗi nhẹ 1 (CL1) của IgG4, nhưng chứa vùng bản lề cải biến trong vùng ổn định của chuỗi nặng. Ngoài ra, mảnh IgG4 Fc theo sáng chế có thể được dùng để chỉ vùng Fc kéo dài chứa một phần hoặc toàn bộ vùng ổn định của chuỗi nặng 1 (CH1) và/hoặc vùng ổn định của chuỗi nhẹ 1 (CL1), ngoại trừ các vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch, miễn là mảnh IgG4 Fc này có tác dụng gần giống hoặc tác dụng cải thiện so với tác dụng của loại nguyên thể.

Ngoài ra, mảnh IgG4 Fc theo sáng chế bao gồm không chỉ trình tự axit amin nguyên thể của nó mà còn dẫn xuất trình tự của nó (thể đột biến protein). Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “thể đột biến protein của mảnh IgG4 Fc” chỉ mảnh IgG4 Fc có trình tự axit amin khác với loại nguyên thể của nó bằng cách làm mất đoạn, xen đoạn, thay thế bảo toàn, thay thế không bảo toàn, hoặc kết hợp của chúng, ở ít nhất một gốc axit amin trong trình tự axit amin nguyên thể trong vùng ngoại trừ vùng bản lề của nó. Ngoài ra, cũng có thể có các loại dẫn xuất khác nhau có sự loại bỏ vùng có khả năng tạo ra liên kết disulfua, sự loại bỏ một vài axit amin khỏi đầu tận cùng N của Fc nguyên thể, hoặc bổ sung gốc metionin vào đầu tận cùng N của Fc nguyên thể. Ngoài ra, vùng gắn kết bổ thể, ví dụ, vùng gắn kết C1q hoặc vùng ADCC, có thể được loại bỏ để làm mất chức năng hiệu ứng. Các phương pháp tạo ra thể đột biến protein của vùng Fc được bộc lộ trong công bố đơn quốc tế số WO 97/34631, WO 96/32478, v.v..

Sự trao đổi axit amin trong các protein hoặc peptit mà không thay đổi hoàn toàn hoạt tính của phân tử đã được bộc lộ trước đây (H. Neurath, R. L. Hill, *The Proteins*, Academic Press, New York, 1979). Sự trao đổi xảy ra phổ biến là

sự trao đổi giữa các gốc axit amin 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, và Asp/Gly. Trong một số trường hợp, sự cải biến có thể được thực hiện bằng cách phosphoryl hóa, sulfat hóa, acrylat hóa, glycosyl hóa, metyl hóa, farnesyl hóa, axetyl hóa, amit hóa, v.v.

Trong khi đó, mảnh IgG4 Fc theo sáng chế có thể là mảnh có nguồn gốc từ người, gia súc, dê, lợn, chuột nhắt, thỏ, chuột đồng, chuột cống, chuột lang, v.v., và tốt hơn là từ người.

Mảnh IgG4 Fc theo sáng chế có thể là loại mảnh IgG4 Fc tái tổ hợp trong đó vùng Fc, có nguồn gốc từ người, gia súc, dê, lợn, chuột nhắt, thỏ, chuột đồng, chuột cống, chuột lang, v.v., thu được từ vi sinh vật.

Ngoài ra, mảnh IgG4 Fc có thể ở dạng glycan nguyên thể, glycan có số lượng tăng so với glycan nguyên thể, hoặc dạng không chứa glycan. Việc làm tăng, làm giảm, hoặc loại bỏ các glycan Fc trong globulin miễn dịch có thể được thực hiện bằng phương pháp thông thường như phương pháp hóa học, phương pháp enzym, phương pháp dùng kỹ thuật di truyền bằng cách sử dụng các vi sinh vật, v.v.. Đặc biệt là, do vùng Fc globulin miễn dịch, trong đó các glycan được loại bỏ ra khỏi Fc, thể hiện sự suy giảm đáng kể khả năng gắn kết của bổ thể (C1q) và sự giảm hoặc mất tính độc tế bào phụ thuộc kháng thể hoặc tính độc tế bào phụ thuộc bổ thể, nên đáp ứng miễn dịch *in vivo* không cần thiết không được tạo ra. Về vấn đề này, loại mảnh IgG4 Fc thích hợp hơn đáp ứng tốt hơn mục đích ban đầu làm chất mang được chất có thể là mảnh IgG4 Fc không glycosyl hóa.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “sự loại glycosyl” chỉ vùng Fc, trong đó sacarit được loại bỏ bằng enzym, và “sự không glycosyl hóa” chỉ mảnh Fc không glycosyl hóa được tạo ra trong tế bào sinh vật chưa có nhân điển hình, và tốt hơn là trong *E. coli*.

Ngoài ra, mảnh IgG4 Fc theo sáng chế có thể là mảnh được cải biến bằng polyme không phải peptit. Tốt hơn là, mảnh IgG4 Fc theo sáng chế có thể là mảnh được cải biến bằng polyetylen glycol. Mảnh IgG4 Fc được cải biến bằng polyetylen glycol có thể được tạo ra bằng cách cho phản ứng với polyetylen glycol ở độ pH bằng 7 hoặc cao hơn, tốt hơn là ở độ pH nằm trong khoảng từ 7,5 đến 9, và tốt hơn nữa là ở độ pH bằng 8,0.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “vùng bản lề cải biến” chỉ vùng bản lề trong đó một gốc xystein bất kỳ trong số các gốc xystein ở các vị trí số 8 và 11 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1, là trình tự của vùng bản lề của mảnh IgG4 Fc nguyên thể, được làm mất đoạn, và ngoài ra, một phần của trình tự axit amin cũng được làm mất đoạn thêm.

Theo sáng chế, số lượng các gốc axit amin được làm mất đoạn trong vùng bản lề có thể nằm trong khoảng từ 1 đến 8, và đặc biệt là, (các) gốc axit amin có thể liên tục hoặc không liên tục. Đặc biệt, chẳng hạn, vùng bản lề cải biến theo sáng chế có thể bao gồm sự làm mất đoạn chỉ ở một gốc xystein ở vị trí số 8 hoặc ở vị trí số 11; hoặc sự làm mất đoạn của 2 đến 8 axit amin liên tục hoặc không liên tục bao gồm gốc xystein ở vị trí số 8; hoặc sự làm mất đoạn của 2 đến 8 axit amin liên tục hoặc không liên tục bao gồm gốc xystein ở vị trí số 11.

Vùng bản lề cải biến theo sáng chế có thể có, ví dụ, ít nhất một trình tự axit amin trong số các trình tự axit amin sau:

Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Ser-Cys-Pro, Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro-Ser-Pro, Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro-Pro, Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro-Ser, Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys, Glu-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys, Glu-Ser-Pro-Ser-Cys-Pro, Glu-Pro-Ser-Cys-Pro, Pro-Ser-Cys-Pro, Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Ser-Cys-Pro, Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Pro-Ser-Cys-Pro, Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Ser-Cys-Pro, Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys, Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro, Glu-Ser-Lys-Pro-Ser-Cys-Pro, Glu-Ser-Pro-Ser-Cys-Pro, Glu-Pro-Ser-Cys.

Theo một phương án được nêu làm ví dụ của sáng chế, để kiểm tra cơ chế trao đổi chuỗi giữa IgG4 có mặt trong máu chuột và máu người và thể tiếp hợp của mảnh IgG4 Fc cải biến với protein có hoạt tính sinh lý theo sáng chế, máu chuột và máu người lần lượt được trộn với thể tiếp hợp của IgG4 Fc với protein có hoạt tính sinh lý, và các mẫu được thu theo mỗi khoảng thời gian và được phân tích thẩm tách Tây bằng cách sử dụng các kháng thể đối với protein có hoạt tính sinh lý. Kết quả là, đã xác nhận được rằng các phân tử có thể được tạo ra bằng cách trao đổi chuỗi với IgG4 của chuột hoặc IgG4 của người không được tạo ra.

Do đó, khi mảnh IgG4 Fc cải biến theo sáng chế được sử dụng làm chất mang cho dược chất, nó có thể được sử dụng có hiệu quả để làm tăng thời gian

bán thải trong huyết thanh của dược chất và cải thiện hoạt tính sinh lý của dược chất mà không có sự trao đổi với globulin miễn dịch nguyên thể *in vivo*.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất axit nucleic mã hóa mảnh IgG4 Fc cải biến có vùng bản lề, được gây đột biến để chỉ chứa một gốc xystein bằng cách làm mất đoạn một phần axit amin trong vùng bản lề, và vector chứa axit nucleic này.

Axit nucleic mã hóa mảnh IgG4 Fc cải biến theo sáng chế bao gồm các axit nucleic mã hóa mảnh IgG4 Fc cải biến chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2 (Pro-Ser-Cys-Pro-Ala-Pro-Glu-Phe-Leu-Gly- Gly-Pro-Ser-Val-Phe-Leu-Phe-Pro-Pro-Lys- Pro-Lys-Asp-Thr-Leu-Met-Ile-Ser-Arg-Thr- Pro-Glu-Val-Thr-Cys-Val-Val-Val-Asp-Val- Ser-Gln-Glu-Asp-Pro-Glu-Val-Gln-Phe-Asn- Trp-Tyr-Val-Asp-Gly-Val-Glu-Val-His-Asn- Ala-Lys-Thr-Lys-Pro-Arg-Glu-Glu-Gln-Phe- Asn-Ser-Thr-Tyr-Arg-Val-Val-Ser-Val-Leu- Thr-Val-Leu-His-Gln-Asp-Trp-Leu-Asn-Gly- Lys-Glu-Tyr-Lys-Cys-Lys-Val-Ser-Asn-Lys- Gly-Leu-Pro-Ser-Ser-Ile-Glu-Lys-Thr-Ile- Ser-Lys-Ala-Lys-Gly-Gln-Pro-Arg-Glu-Pro- Gln-Val-Tyr-Thr-Leu-Pro-Pro-Ser-Gln-Glu- Glu-Met-Thr-Lys-Asn-Gln-Val-Ser-Leu-Thr- Cys-Leu-Val-Lys-Gly-Phe-Tyr-Pro-Ser-Asp- Ile-Ala-Val-Glu-Trp-Glu-Ser-Asn-Gly-Gln- Pro-Glu-Asn-Asn-Tyr-Lys-Thr-Thr-Pro-Pro- Val-Leu-Asp-Ser-Asp-Gly-Ser-Phe-Phe-Leu- Tyr-Ser-Arg-Leu-Thr-Val-Asp-Lys-Ser-Arg- Trp-Gln-Glu-Gly-Asn-Val-Phe-Ser-Cys-Ser- Val-Met-His-Glu-Ala-Leu-His-Asn-His-Tyr- Thr-Gln-Lys-Ser-Leu-Ser-Leu-Ser-Leu-Gly-Lys). Ví dụ, axit nucleic theo sáng chế có thể bao gồm trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 3

(CCATCATGCCCAGCACCTGAGTTCCTGGGGGGACCATCAGTCTTCCT GTTCCCCC AAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTG AGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGACCCTGAGGTC CAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGAC AAAGCCGCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGC GTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAA GTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCATCCTCCATCGAGAAAACCA TCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTG CCCCCATCCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTG CCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGA

GCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCT
GGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAGGCTAACCGTGGACA
AGAGCAGGTGGCAGGAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCAT
GAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCT
GGGTAAA).

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “vector” chỉ vector tái tổ hợp có khả năng biểu hiện protein đích trong tế bào chủ thích hợp, là cấu trúc gen chứa yếu tố điều hòa được liên kết có điều khiển để cho phép biểu hiện gen cài xen.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “được liên kết có điều khiển” có nghĩa là trình tự điều hòa của axit nucleic được liên kết về mặt chức năng với trình tự của axit nucleic mã hóa protein đích nhờ đó chức năng chung có thể được thực hiện. Liên kết có điều khiển bằng vector có thể được tạo ra bằng kỹ thuật tái tổ hợp di truyền đã biết trong lĩnh vực này, và sự phân cắt và liên kết ADN đặc hiệu vị trí có thể được thực hiện dễ dàng bằng enzym, v.v., là đã biết phổ biến trong lĩnh vực này. Các vector biểu hiện thích hợp có thể bao gồm trình tự đối với yếu tố điều hòa sự biểu hiện như trình tự khởi đầu, codon mở đầu, codon kết thúc, tín hiệu được polyadenyl hóa, và trình tự tăng cường. Codon mở đầu và codon kết thúc về cơ bản cần gây ra tác dụng ở đối tượng khi cấu trúc gen được cài xen vào đó và cần ở trong khung với trình tự mã hóa. Trình tự khởi đầu chung có thể là cơ định hoặc cảm ứng. Vector biểu hiện cũng có thể chứa gen đánh dấu chọn lọc để chọn lọc tế bào chủ chứa vector, và đối với vector biểu hiện có thể sao chép, nó có thể chứa trình tự khởi đầu sao chép.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất vi sinh vật, mà vector nêu trên được đưa vào, có khả năng sản sinh mảnh IgG4 Fc cải biến.

Nhằm mục đích của sáng chế, tốt hơn nếu vi sinh vật này là tế bào sinh vật có nhân điển hình. Tế bào sinh vật có nhân điển hình này có thể là *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus*, v.v., và tốt hơn là *Escherichia coli*. *Escherichia coli* có thể là *E. coli XL-1 blue*, *E. coli BL21 (DE3)*, *E. coli JM109*, *E. coli DH series*, *E. coli TOP10*, và *E. coli HB101*, và tốt hơn nữa là *E. coli BL21 (DE3)*, nhưng không chỉ giới hạn ở các loài này. Khi *E. coli* được sử dụng làm tế bào chủ, thì vùng Fc của globulin miễn dịch có thể được tạo ra ở dạng trong đó sacarit có

mặt trong miền CH2 của globulin miễn dịch nguyên thể ban đầu được làm mất đoạn, do *E. coli* không có hệ để tiếp hợp glycan với protein. Mặc dù sacarit có mặt trong miền CH2 của globulin miễn dịch không ảnh hưởng đến độ ổn định về cấu trúc của globulin miễn dịch, nhưng đã biết rằng globulin miễn dịch có thể gắn kết với tế bào biểu hiện thụ thể Fc và gây ra tính độc tế bào phụ thuộc kháng thể, cảm ứng các tế bào miễn dịch tiết xytokin, từ đó gây ra đáp ứng viêm, và gắn kết với yếu tố C1q của bổ thể và gây ra phản ứng cố định bổ thể. Do đó, nếu vùng Fc của globulin miễn dịch không glycosyl hóa được tạo ra và tiếp hợp với protein trị liệu, thì nồng độ trong huyết thanh của protein trị liệu có thể được duy trì trong một khoảng thời gian dài mà không gây ra chức năng hiệu ứng của globulin miễn dịch.

Phương pháp biến đổi đối với vectơ trên đây trong tế bào sinh vật chưa có nhân điển hình có thể bao gồm phương pháp bất kỳ có thể đưa axit nucleic vào trong tế bào, và việc biến đổi có thể được thực hiện bằng cách chọn lọc kỹ thuật chuẩn thích hợp đối với tế bào chủ đã cho đã biết trong lĩnh vực này. Ví dụ về phương pháp này có thể bao gồm điện di, dung hợp thể nguyên sinh, kết tủa canxi phosphat (CaPO_4), kết tủa canxi clorua (CaCl_2), khuấy bằng cách sử dụng sợi silic cacbua, PEG, dextran sulfat, lipofectamin, v.v., nhưng không chỉ giới hạn ở các phương pháp này.

Vi sinh vật mà vectơ biểu hiện tái tổ hợp được đưa vào có thể được nuôi cấy theo phương pháp thông thường.

Quy trình nuôi cấy có thể được sử dụng sau bước điều chỉnh dễ dàng theo vi sinh vật được chọn. Nói chung, môi trường được sử dụng để nuôi cấy cần chứa tất cả các chất dinh dưỡng thiết yếu cho sự sinh trưởng và sự sống của tế bào. Môi trường này có thể chứa các nguồn cacbon, các nguồn nitơ, và các thành phần yếu tố vi lượng khác nhau. Ví dụ về các nguồn cacbon có thể bao gồm hydrat cacbon như glucoza, sucroza, lactoza, fructoza, maltoza, tinh bột, và xenluloza; chất béo như dầu đậu nành, dầu hướng dương, dầu thầu dầu, và dầu dừa; axit béo như axit palmitic, axit stearic, và axit linoleic; rượu như glyxerol và etanol; và axit hữu cơ như axit axetic. Các nguồn cacbon này có thể được sử dụng đơn lẻ hoặc kết hợp. Ví dụ về các nguồn nitơ có thể bao gồm nguồn nitơ hữu cơ như pepton, chiết phẩm nấm men, nước thịt, chiết phẩm mạch nha, dịch ngâm cây ngô (corn steep liquor - CSL), và bột đậu tương; và các nguồn nitơ vô

cơ như ure, amoni sulfat, amoni clorua, amoni phosphat, amoni cacbonat, và amoni nitrat. Các nguồn nitơ này có thể được sử dụng đơn lẻ hoặc kết hợp. Trong môi trường nêu trên, dihydro phosphat, dikali hydro phosphat, và các muối chứa natri tương ứng có thể được chứa dưới dạng các nguồn phospho. Ngoài ra, các muối kim loại như magie sulfat hoặc sắt sulfat có thể được chứa. Hơn thế nữa, các axit amin, vitamin, và các tiền chất thích hợp cũng có thể được chứa. Trong thời gian nuôi cấy, độ pH của môi trường nuôi cấy có thể được điều chỉnh bằng cách bổ sung hợp chất như amoni hydroxit, kali hydroxit, amoniac, axit phosphoric, và axit sulfuric vào môi trường này theo cách thích hợp. Ngoài ra, trong thời gian nuôi cấy, chất chống tạo bọt, như polyglycol este của axit béo, có thể được bổ sung vào để ngăn cản sự tạo ra bọt. Ngoài ra, để duy trì trạng thái hiếu khí của môi trường nuôi cấy, oxy hoặc chất khí chứa oxy (ví dụ, không khí) có thể được bơm vào môi trường nuôi cấy này. Nhiệt độ nuôi cấy thường có thể nằm trong khoảng từ 20°C đến 45°C, và tốt hơn là nằm trong khoảng từ 25°C đến 40°C. Ngoài ra, thùng lên men có thể được sử dụng. Khi protein được tạo ra bằng cách sử dụng thùng lên men, các yếu tố khác nhau bao gồm tốc độ sinh trưởng và lượng sản phẩm biểu hiện của tế bào chủ cần được xem xét. Sự biểu hiện protein có thể được cảm ứng bằng cách bổ sung IPTG hoặc các chất tương tự trong điều kiện nuôi cấy thích hợp. mảnh IgG4 Fc cải biến theo sáng chế có thể được biểu hiện quá mức trong tế bào chủ ở dạng kết tụ hoặc có thể được biểu hiện ở dạng nước. Không phụ thuộc vào loại biểu hiện của chúng, các protein có thể được làm sạch bằng phương pháp làm sạch protein thông thường.

Do đó, theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp tạo ra mảnh IgG4 Fc cải biến, và phương pháp này bao gồm việc nuôi cấy vi sinh vật mà axit nucleic mã hóa mảnh IgG4 Fc cải biến được đưa vào.

Theo phương pháp nêu trên, ứng dụng công nghiệp của mảnh IgG4 Fc nêu trên, được tạo ra trong tế bào của sinh vật chưa có nhân điển hình như *E. coli*, không bị giới hạn đặc biệt. Ứng dụng được nêu làm ví dụ có thể là sử dụng nó làm chất mang để tạo ra thể tiếp hợp cùng với được chất tùy ý.

Do đó, theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất được chất và thể tiếp hợp được chất trong đó mảnh IgG4 Fc cải biến được tiếp hợp vào đó thông qua cầu nối.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thể tiếp hợp được chất hoặc thể

tiếp hợp có nghĩa là ít nhất một dược chất được nối với ít nhất một mảnh IgG4 Fc cải biến.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, dược chất chỉ chất có thể thể hiện hoạt tính trị liệu khi được dùng cho người hoặc động vật, và nó có thể bao gồm polypeptit, hợp chất, chiết phẩm, axit nucleic, v.v., nhưng không chỉ giới hạn ở các loại này. Tốt hơn là, dược chất là dược chất polypeptit.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, dược chất polypeptit có hoạt tính sinh lý, dược chất polypeptit, và dược chất protein được hiểu là có cùng nghĩa, và chúng được đặc trưng ở chỗ chúng là loại có hoạt tính sinh lý thể hiện tính đối kháng với các hiện tượng sinh lý học *in vivo* khác nhau.

Loại thể tiếp hợp trong đó mảnh IgG4 Fc được tiếp hợp với dược chất không bị giới hạn đặc biệt, và mảnh IgG4 Fc và dược chất có thể được tiếp hợp ở các tỷ lệ khác nhau.

Theo sáng chế, cầu nối có thể chỉ cả cầu nối peptit và cầu nối không phải peptit, tốt hơn là cầu nối không phải peptit, và tốt hơn nữa là polyme không phải peptit.

Polyme không phải peptit được dùng để chỉ polyme tương hợp sinh học mà ít nhất hai đơn vị lặp lại được tiếp hợp với nó, và các đơn vị lặp lại được nối với nhau bằng các liên kết đồng hóa trị ngẫu nhiên không phải là liên kết peptit. Polyme không phải peptit có thể được chọn từ nhóm bao gồm polyetylen glycol, polypropylen glycol, copolyme giữa etylen glycol và propylen glycol, rượu polyhydric được polyoxyetyl hóa, rượu polyvinyl, polysacarit, dextran, polyvinyl etyl ete, polyme dễ phân huỷ sinh học như axit polylactic (polylactic acid - PLA) và axit polylactic-glycolic (polylactic-glycolic acid - PLGA), polyme lipid, kitin, axit hyaluronic, và kết hợp của chúng, và tốt hơn là, polyetylen glycol. Các dẫn xuất đã biết trong lĩnh vực này và các dẫn xuất có thể được điều chế dễ dàng bằng cách sử dụng kỹ thuật trong lĩnh vực này cũng được bao gồm trong phạm vi của sáng chế.

Theo sáng chế, polyme không phải peptit có thể có hai hoặc ba đầu phản ứng, và nhóm phản ứng đầu tận cùng của polyme không phải peptit này tốt hơn là được chọn từ nhóm bao gồm nhóm aldehyt phản ứng, nhóm aldehyt propionic, nhóm aldehyt butyl, nhóm maleimit, và dẫn xuất succinimit. Ví dụ về dẫn xuất succinimit có thể bao gồm succinimidyl propionat, hydroxyl succinimidyl,

suxinimidyl carboxymetyl, và suxinimidyl cacbonat. Đặc biệt là, khi polyme không phải peptit bao gồm nhóm aldehyt phản ứng ở đầu của nó làm nhóm phản ứng, thì nó có thể làm giảm đến mức tối thiểu phản ứng không đặc hiệu và có hiệu quả trong việc gắn kết tương ứng của nó với polypeptit sinh lý và mảnh Fc globulin miễn dịch. Sản phẩm cuối được tạo ra thông qua sự alkyl hóa khử bằng cách gắn kết aldehyt là ổn định hơn so với sản phẩm được liên kết bằng cách gắn kết amit. Nhóm phản ứng aldehyt phản ứng chọn lọc ở đầu tận cùng N ở độ pH thấp, và ở độ pH cao, ví dụ, độ pH bằng 9,0, nó có thể tạo ra liên kết cộng hóa trị với gốc lysin.

Nhóm phản ứng đầu tận cùng của polyme không phải peptit có thể giống hoặc khác nhau. Ví dụ, polyme không phải peptit có thể có nhóm maleimit ở một đầu, đồng thời có nhóm aldehyt, nhóm propionaldehyt, hoặc nhóm aldehyt butyl ở đầu kia. Khi polyetylen glycol hoặc polyme không phải peptit có nhóm phản ứng hydroxyl ở cả hai đầu được sử dụng, thì thể tiếp hợp theo sáng chế có thể được tạo ra bằng cách hoạt hóa nhóm hydroxyl bằng các nhóm phản ứng khác nhau theo phản ứng hoá học đã biết, hoặc bằng cách sử dụng polyetylen glycol có nhóm phản ứng biến đổi có bán trên thị trường.

Liên quan đến polypeptit có hoạt tính sinh lý được sử dụng bằng cách gắn kết với mảnh IgG4 Fc cải biến theo sáng chế, chất bất kỳ cần làm tăng thời gian bán thải trong huyết thanh có thể được sử dụng mà không giới hạn. Ví dụ, các polypeptit có hoạt tính sinh lý khác nhau, như xytokin, interleukin, protein gắn kết với interleukin, enzym, kháng thể, yếu tố sinh trưởng, yếu tố điều hòa phiên mã, yếu tố đông máu, vacxin, protein cấu trúc, protein hoặc thụ thể của phối tử, kháng nguyên bề mặt tế bào, chất đối kháng thụ thể, các dẫn xuất của chúng, và các chất tương tự của chúng có thể được sử dụng.

Đặc biệt, các polypeptit có hoạt tính sinh lý có thể bao gồm hormon sinh trưởng của người, hormon giải phóng hormon sinh trưởng, peptit giải phóng hormon sinh trưởng, interferon và các thụ thể interferon (ví dụ, interferon- α , - β , và - γ , thụ thể interferon typ I hòa tan được, v.v.), yếu tố kích thích khuẩn lạc, các interleukin (ví dụ, interleukin-1, -2, -3, -4, -5, -6, -7, -8, -9, -10, -11, -12, -13, -14, -15, -16, -17, -18, -19, -20, -21, -22, -23, -24, -25, -26, -27, -28, -29, -30, v.v.) và các thụ thể interleukin (ví dụ, thụ thể IL-1, thụ thể IL-4, v.v.), các enzym (ví dụ, glucocerebrosidaza, iduronat-2-sulfataza, α -galactosidaza-A, agalsidaza α , β , α -

L-iduronidaza, butyrylcholinesteraza, chitinaza, glutamat decarboxylaza, imigluceraza, lipaza, uricaza, yếu tố hoạt hóa tiểu cầu axetylhydrolaza, endopeptidaza trung tính, myeloperoxidaza, v.v.), các protein gắn kết với interleukin và xytokin (ví dụ, IL-18bp, protein gắn kết TNF, v.v.), yếu tố hoạt hóa đại thực bào, peptit đại thực bào, yếu tố tế bào B, yếu tố tế bào T, protein A, yếu tố ức chế dị ứng, glycoprotein hoại tử, kháng độc tố, lymphotoxin, yếu tố hoại tử khối u, chất ức chế khối u, yếu tố sinh trưởng biến nạp, α -1 antitrypsin, albumin, α -lactalbumin, apolipoprotein-E, erythropoietin, erythropoietin được glycosyl hóa cao, angiopoietin, hemoglobin, thrombin, peptit hoạt hóa thụ thể thrombin, thrombomodulin, yếu tố đông máu VII, yếu tố đông máu VII α , yếu tố đông máu VIII, yếu tố đông máu IX, yếu tố đông máu XIII, chất hoạt hóa plasminogen, peptit gắn kết với fibrin, urokinaza, streptokinaza, hirudin, protein C, protein phản ứng C, chất ức chế renin, chất ức chế collagenaza, peroxit dismutaza, leptin, yếu tố sinh trưởng có nguồn gốc tiểu cầu, yếu tố sinh trưởng biểu mô, yếu tố sinh trưởng biểu bì, angiostatin, angiotensin, yếu tố sinh trưởng tạo hình xương, protein tạo hình thái xương, calcitonin, insulin và dẫn xuất insulin, 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 noãn, hormon tạo thể vàng, hormon giải phóng hormon tạo thể vàng, các yếu tố sinh trưởng thần kinh (ví dụ, yếu tố sinh trưởng thần kinh, yếu tố dinh dưỡng thần kinh lông mao, yếu tố tạo sợi trục-1, peptit bài niệu natri ở não, yếu tố dinh dưỡng thần kinh có nguồn gốc từ tế bào thần kinh đệm, netrin, yếu tố ức chế bạch cầu trung tính, yếu tố dinh dưỡng thần kinh, neutrin, v.v.), hormon tuyến cận giáp, relaxin, secretin, somatomedin, yếu tố sinh trưởng tương tự insulin, hormon vỏ thượng thận, glucagon, các peptit kích thích insulin bao gồm peptit-1 giống glucagon và exendin-4, incretin tiết trong ruột, các tế bào tạo mỡ bao gồm leptin và xytokin thần kinh có hiệu quả đối với hội chứng chuyển hóa, cholecystokinin, polypeptit tuyến tụy, peptit giải phóng gastrin, yếu tố giải phóng corticotropin, hormon kích thích tuyến giáp, autotaxin, lactoferrin, myostatin, các thụ thể (ví dụ, TNFR (P75), TNFR (P55), thụ thể IL-1, thụ thể VEGF, thụ thể yếu tố hoạt hóa tế bào B, v.v.), các chất đối kháng thụ thể (ví dụ, IL1-Ra, v.v.), các kháng nguyên bề mặt tế bào (ví dụ, CD 2, 3, 4, 5, 7, 11a, 11b, 18, 19, 20, 23, 25, 33, 38, 40, 45, 69, v.v.), kháng thể đơn dòng, kháng thể đa dòng, các mảnh kháng thể (ví dụ, scFv,

Fab, Fab', F(ab')₂, và Fd), kháng nguyên vacxin có nguồn gốc virus, v.v., nhưng không chỉ giới hạn ở các loại này. Polypeptit có hoạt tính sinh lý áp dụng được theo sáng chế có thể là loại nguyên thể; loại được tạo ra bằng cách tái tổ hợp di truyền trong tế bào sinh vật chưa có nhân điển hình như *E. coli*, hoặc trong tế bào sinh vật có nhân điển hình như tế bào nấm men, tế bào côn trùng, hoặc tế bào động vật; hoặc dẫn xuất có hoạt tính tương đương với loại nguyên thể và thể đột biến ở ít nhất một vị trí axit amin.

Mảnh IgG4 Fc cải biến theo sáng chế có thể được tạo ra trong tế bào sau khi liên kết nó với polypeptit có hoạt tính sinh lý dưới dạng trình tự gen đơn bằng cách sử dụng phương pháp tái tổ hợp di truyền trực tiếp, hoặc mảnh IgG4 Fc có thể được tạo ra một cách độc lập và được tiếp hợp với dược chất, như polypeptit có hoạt tính sinh lý, *in vitro*.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất dược phẩm chứa hoạt chất là thể tiếp hợp dược chất theo sáng chế nêu trên.

Dược phẩm chứa thể tiếp hợp theo sáng chế có thể chứa chất mang dược dụng. Ví dụ về chất mang dược dụng có thể bao gồm chất gắn kết, chất làm trơn chảy, chất phân rã, tá dược, chất làm hòa tan, chất phân tán, chất ổn định, chất tạo hỗn dịch, chất màu, chất tạo hương, v.v.; đối với các chế phẩm để tiêm, chất đệm, chất bảo quản, chất làm giảm đau, chất đẳng trương, chất ổn định, v.v., có thể được trộn để sử dụng; và đối với chế phẩm để dùng tại chỗ, cốt, tá dược, chất làm trơn chảy, chất bảo quản, v.v., có thể được sử dụng.

Loại chế phẩm dược phẩm theo sáng chế có thể được bào chế khác nhau bằng cách kết hợp với chất mang dược dụng. Ví dụ, để dùng qua đường miệng, dược phẩm này có thể được bào chế thành viên nén, viên ngậm dẹt, viên nang, cồn thuốc, hỗn dịch, xirô viên nhện, v.v. Để tiêm, dược phẩm này có thể được bào chế thành ống đơn liều hoặc vật chứa nhiều liều. Dược phẩm này cũng có thể được bào chế thành dạng dung dịch, hỗn dịch, viên nén, viên nang và chế phẩm giải phóng kéo dài.

Trong khi đó, ví dụ về chất mang, tá dược, và chất pha loãng thích hợp có thể bao gồm lactoza, dextroza, sucroza, sorbitol, manitol, xylitol, erythritol, maltitol, tinh bột, gôm cây keo, alginat, gelatin, canxi phosphat, canxi silicat, xenluloza, metyl xenluloza, xenluloza vi tinh thể, polyvinylpyrrolidon, nước, metyl hydroxybenzoat, propyl hydroxybenzoate, talc, magie stearat, dầu khoáng,

v.v..Ngoài ra, dược phẩm theo sáng chế có thể còn chứa chất độn, chất chống đông, chất làm trơn chảy, chất làm ẩm, chất tạo hương, chất nhũ hóa, chất bảo quản, v.v.

Theo sáng chế, liều thực tế của các dược chất trong đó mảnh IgG4 Fc được sử dụng làm chất mang sẽ được xác định dựa trên loại dược chất được sử dụng làm hoạt chất cùng với các yếu tố khác nhau như bệnh cần điều trị, đường dùng, tuổi, giới tính, và cân nặng của bệnh nhân, mức độ nghiêm trọng của bệnh, v.v.. Do dược phẩm theo sáng chế có thời gian lưu *in vivo* tuyệt vời nên số lần và tần suất dùng dược phẩm theo sáng chế có thể được giảm đáng kể.

Dược phẩm theo sáng chế có thể được dùng qua các đường khác nhau.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “việc dùng” được dùng để chỉ việc đưa chất cụ thể vào bệnh nhân bằng cách thích hợp, và được dược chất được tiếp hợp theo sáng chế có thể được dùng qua đường thông thường bất kỳ miễn là dược chất có thể đến được mô đích. Ví dụ, việc dùng trong màng bụng, trong tĩnh mạch, trong cơ, dưới da, trong da, qua đường miệng, tại chỗ, trong mũi, trong phổi và trong trực tràng có thể được thực hiện, nhưng đường dùng không chỉ giới hạn ở các đường này. Tuy nhiên, do các peptit bị phân cắt khi dùng qua đường miệng, hoạt chất trong dược phẩm để dùng qua đường miệng cần được bao hoặc được bào chế để bảo vệ chống lại sự phân hủy trong dạ dày. Tốt hơn là, dược phẩm này có thể được dùng ở dạng để tiêm. Ngoài ra, dược phẩm này có thể được dùng bằng cách sử dụng một số thiết bị có khả năng vận chuyển hoạt chất vào trong tế bào đích.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Dưới đây, sáng chế sẽ được minh họa chi tiết hơn bằng các ví dụ sau. Tuy nhiên, các ví dụ này chỉ nhằm mục đích minh họa, và sáng chế không chỉ giới hạn ở các ví dụ này.

Ví dụ 1. Tạo thể tiếp hợp yếu tố kích thích khuẩn lạc bạch cầu hạt của người-PEG-globulin miễn dịch

1.1. Cấu trúc của vectin mẫu hiện miễn IgG4 Fc

Để tách dòng vùng Fc của chuỗi nặng chứa vùng bản lề của IgG4, RT-PCR được thực hiện bằng cách sử dụng các tế bào máu thu được từ máu người làm khuôn mẫu, như được mô tả dưới đây. Đầu tiên, ARN toàn phần được tách

từ máu có độ pH bằng khoảng 6, và gen được khuếch đại dựa trên khuôn mẫu ARN bằng cách sử dụng kit ARN máu Qiamp (Qiagen). Đặc biệt là, cặp SEQ ID NO: 4 (gggcatatgc catcatgccc agcacctgag ttctgggg) và SEQ ID NO: 5 (gggggataccc tatttaccga gagacaggga ga) được sử dụng làm đoạn môi. Để tạo điều kiện thuận lợi cho quy trình sau đó, miền có khả năng nhận diện vị trí cắt giới hạn NdeI và ATG, codon mở đầu cần thiết để biểu hiện protein được cài xen vào đoạn môi, và miền có khả năng nhận diện vị trí cắt giới hạn BamHI được cài xen vào đoạn môi đầu 3 của trình tự nêu trong SEQ ID NO: 5. Sản phẩm chứa vùng Fc được khuếch đại từ đó lần lượt được phân cắt bằng NdeI và BamHI, và được tách dòng phụ vào trong pET22b (Novagen Co., Ltd.) để tạo ra plasmit. Plasmit được thiết kế sao cho mảnh IgG4 Fc có thể chứa trình tự bản lề, trong đó các gốc axit amin ở vị trí số 1 đến 8 của trình tự axit amin nguyên vẹn Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro-Ser-Cys-Pro trong bản lề IgG4 Fc được làm mất đoạn.

Plasmit được tạo ra trong ví dụ này có tên là “pmHMC001”, và kết quả của việc phân tích trình tự của nó cho thấy rằng axit nucleic mã hóa mảnh IgG4 Fc có trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 3, và mảnh IgG4 Fc có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2 tại thời điểm biểu hiện.

Vector biểu hiện được tạo ra từ đó được biến nạp vào trong *E. coli* BL21 (DE3) và nhờ đó thể biến nạp *E. coli*, *E. coli* BL21/pmHMC001 (HMC001), được tạo ra.

1.2. Biểu hiện và làm sạch vùng IgG4 Fc

Thể biến nạp vi sinh vật thu được trong ví dụ <1-1> được gây nhiễm vào thùng lên men (Marubishi Co., Ltd.) để được lên men, và mức độ biểu hiện của mảnh IgG4 Fc được kiểm tra.

Đầu tiên, thể biến nạp nêu trên được để trong 100 ml môi trường LB được nuôi cấy trong bể nước được khuấy qua đêm và sau đó, được gây nhiễm vào trong thùng lên men để tiếp tục nuôi cấy. Thùng lên men này được duy trì ở nhiệt độ 35°C hoặc 28°C, và việc nuôi cấy được bắt đầu bằng cách lắc ở tốc độ 500 vòng/phút đồng thời cấp khí vào đó ở mức độ 20 vvm để ngăn cản tình trạng trở nên kị khí trong đó. Trong quá trình lên men, các nguồn năng lượng thiếu hụt cho sự sinh trưởng của vi sinh vật được cấp thêm bằng cách sử dụng glucoza và chiết phẩm nấm men theo tình trạng lên men của vi sinh vật, và sự biểu hiện được cảm ứng bằng cách bổ sung IPTG, là một chất cảm ứng, vào đó khi OD ở

600 nm đạt tới 80. Môi trường nuôi cấy được xử lý trong 40 giờ đến 45 giờ cho đến khi OD ở 600 nm đạt tới mức độ nằm trong khoảng từ 100 đến 120 để thu được môi trường nuôi cấy nồng độ cao.

Sự biểu hiện của IgG4 Fc trong thể biến nạp *E. coli* được xác nhận bằng thử nghiệm được mô tả dưới đây.

Để xác nhận sự biểu hiện hoàn toàn của IgG4 Fc trong tế bào chất, một phần dịch lên men được trộn với một lượng tương đương của dung dịch đệm nhỏ giọt protein 2x và được điện di trong dung dịch chứa 15% SDS-PAGE (Criterion Gel, Bio-Rad). Kết quả là, đã xác nhận rằng IgG Fc được biểu hiện quá mức trong thể biến nạp đã được tạo ra. Protein được biểu hiện quá mức đã thể hiện là tạo ra chất làm đông, và protein này được làm sạch thông qua việc tái gấp cuộn và sự tạo ra cột của chất làm đông theo cách tương tự. Đầu tiên, 10 g tế bào được hòa tan trong 100 ml dung dịch đệm gây tan (10 mM Tris, độ pH 9,0, 1 mM EDTA, 0,5% Triton X-100, và 0,2 M NaCl) và sau đó, được siêu âm. Chất thu được được ly tâm ở 10.000 vòng/phút trong 20 phút để tách thành phần hòa tan và phần không tan, và 2 g chất làm đông không tan được hòa tan trong 20 ml dung dịch đệm hòa tan (6 M guanidin và 50 mM Tris) và sau đó, được để cho phản ứng trong 30 phút ở 4 kết hợp lắc nhẹ. Khi hoàn thành phản ứng, chất thu được được pha loãng bằng cách bổ sung 10 thể tích dung dịch đệm tái gấp cuộn (2 M ure, 50 mM Tris, 0,25 M arginin, và 3 mM cysteine, độ pH 9,0) và sau đó, được để cho phản ứng qua đêm kết hợp lắc nhẹ. Khi hoàn thành phản ứng, mẫu được cung cấp với 10 mM dung dịch đệm Tris-HCl mới (độ pH 8,0) bằng cách sử dụng Sephadex G25. Mẫu với dung dịch đệm thay thế được rửa giải trong gradien nồng độ của Tris-HCl (độ pH 8,0) và NaCl bằng cách sử dụng DEAE-FF (GE healthcare), và phenyl-FF (GE healthcare) được rửa giải với gradien nồng độ của amoni sulfat và 10 mM Tris-HCl (độ pH 7,5) để loại bỏ một lượng lớn các multimer và monome. Đối với quy trình cột tiếp theo, chất thu được được khử muối bằng 10 mM Tris (độ pH 7,5) bằng cách sử dụng Sephadex G25 (GE healthcare), và sau đó, để thu được IgG4 Fc có độ tinh khiết cao, 15Q (GE healthcare) được rửa giải bằng gradien nồng độ của 10 mM Tris-HCl (độ pH 7,5) và NaCl, và cuối cùng thu được IgG4 Fc.

1.3. Tạo thể tiếp hợp được chất I

1) Tạo thể tiếp hợp của yếu tố kích thích khuẩn lạc bạch cầu hạt với PEG

ALD-PEG-ALD (Shearwater Inc., USA), poly(etylen glycol) có khối lượng phân tử là 3,4 kDa với nhóm phản ứng aldehyt ở cả hai đầu, được bổ sung vào dung dịch đệm phosphat 100 mM, trong đó yếu tố kích thích khuẩn lạc bạch cầu hạt được hòa tan ở nồng độ 5 mg/ml, sao cho tỷ lệ mol giữa yếu tố kích thích khuẩn lạc bạch cầu hạt:PEG là 1:5. Natri xyanobohydrua (NaCNBH_3), một chất khử, được bổ sung vào đến nồng độ cuối là 20 mM, và được cho phản ứng trong 3 giờ ở 4 đồng thời khuấy chậm. Để thu được thể tiếp hợp trong đó PEG được tiếp hợp chọn lọc với đầu tận cùng amino của yếu tố kích thích khuẩn lạc bạch cầu hạt và PEG và yếu tố kích thích khuẩn lạc bạch cầu hạt được tiếp hợp ở tỷ lệ 1:1, hỗn hợp phản ứng được sắc ký loại cỡ Superdex (Superdex R, Pharmacia, USA). Yếu tố kích thích khuẩn lạc được làm sạch bằng cách sử dụng dung dịch đệm kali phosphat 10 mM (độ pH=6,0) làm dung dịch rửa giải, còn yếu tố kích thích khuẩn lạc bạch cầu hạt không được tiếp hợp với PEG, PEG không phản ứng, và sản phẩm phụ dime, trong đó hai yếu tố kích thích khuẩn lạc bạch cầu hạt được tiếp hợp với PEG được loại bỏ. Thể tiếp hợp yếu tố kích thích khuẩn lạc bạch cầu hạt-PEG đã làm sạch được cô đến nồng độ 5 mg/ml.

2) Tạo thể tiếp hợp của thể tiếp hợp yếu tố kích thích khuẩn lạc bạch cầu hạt-PEG với mảnh IgG4 Fc

Mảnh IgG4 Fc theo sáng chế được hòa tan trong 100 mM dung dịch đệm phosphat. Để tiếp hợp mảnh IgG4 Fc với nhóm phản ứng aldehyt của thể tiếp hợp yếu tố kích thích khuẩn lạc bạch cầu hạt-PEG đã được làm sạch trên đây, thể tiếp hợp yếu tố kích thích khuẩn lạc bạch cầu hạt-PEG được bổ sung vào dung dịch đệm chứa mảnh IgG4 Fc sao cho tỷ lệ mol giữa thể tiếp hợp yếu tố kích thích khuẩn lạc bạch cầu hạt-PEG:mảnh IgG4 Fc là 1:5. Natri xyanobohydrua (NaCNBH_3), một chất khử, được bổ sung vào đó sao cho nồng độ cuối là 20 mM, và hỗn hợp phản ứng này được cho phản ứng trong 20 giờ ở 4 đồng thời khuấy chậm. Khi hoàn thành phản ứng tiếp hợp, các chất không phản ứng và sản phẩm phụ được loại bỏ, và thể tiếp hợp protein yếu tố kích thích khuẩn lạc bạch cầu hạt-PEG-globulin miễn dịch được làm sạch bằng sắc ký trao đổi anion. Thể tiếp hợp yếu tố kích thích khuẩn lạc bạch cầu hạt-PEG-mảnh IgG4 Fc được làm sạch bằng cách bổ sung hỗn hợp phản ứng trên vào cột DEAE (Pharmacia, USA), đã được làm cân bằng bằng dung dịch đệm Tris 20 mM (độ

pH=7,5), tiếp theo cho dung dịch đệm cùng loại chứa 1 M NaCl chảy qua theo phương pháp gradien nồng độ tuyến tính (nồng độ NaCl: 0 M $\rightarrow$ 0,5 M). Để loại bỏ một lượng nhỏ globulin miễn dịch không phản ứng và hormon sinh trưởng của người được trộn dưới dạng tạp chất với phần yếu tố kích thích khuẩn lạc bạch cầu hạt-PEG-mảnh IgG4 Fc thu được từ đó, sắc ký trao đổi cation được thực hiện thêm. Phần yếu tố kích thích khuẩn lạc bạch cầu hạt-PEG-mảnh IgG4 Fc được bổ sung vào cột polyCAT (PolyLC, USA), đã được làm cân bằng bằng dung dịch chứa natri axetat 10 mM (độ pH=4,5), và được làm sạch thêm bằng cách cho dung dịch đệm natri axetat 10 mM (độ pH=4,5) chứa NaCl 1 M chảy lên đó theo phương pháp gradien nồng độ tuyến tính (nồng độ NaCl: 0 M $\rightarrow$ 0,5 M), và nhờ đó thu được thể tiếp hợp yếu tố kích thích khuẩn lạc bạch cầu hạt-PEG-mảnh IgG4 Fc (HM10460A) có độ tinh khiết.

Ví dụ 2. Xác nhận sự trao đổi chuỗi giữa thể tiếp hợp yếu tố kích thích khuẩn lạc bạch cầu hạt của người-PEG-globulin miễn dịch và IgG4 của người trong máu của chuột

IgG4 của người với lượng 2 mg được đánh dấu bằng biotin bằng cách trộn với 20 mg/ml dung dịch biotin-7-NHL ở tỷ lệ phân tử bằng 1:10 và được làm sạch bằng Biotin Protein Labeling Kit (Roche). Máu thu được từ chuột bình thường được xử lý bằng heparin nhằm mục đích chống đông và được bổ sung penixilin-streptomycin (1% thể tích/thể tích). 1,5 mg IgG4 được đánh dấu bằng biotin và 1,32 mg HM10460A được bổ sung vào 3 ml máu, được trộn cùng nhau, và hỗn hợp này được chia vào 6 ống (0,5 ml/ống) và ủ trong tủ ủ ở nhiệt độ 37°C. Lần lượt mỗi ống được lấy ra tại các thời điểm 0 giờ, 4 giờ, 10 giờ, 24 giờ, và 48 giờ, và huyết tương được tách ra khỏi đó và được bảo quản ở nhiệt độ -20°C. Mỗi mẫu huyết tương và các chất chuẩn được trộn với dung dịch đệm mẫu protein không khử, và chất thu được được SDS-PAGE bằng cách sử dụng gel polyacrylamit gradien nồng độ 4% đến 15%. IgG4 được đánh dấu biotin và HM10460A được sử dụng làm chất chuẩn. Gel, khi hoàn thành điện di, được thấm lên trên màng PVDF (Immobilon-P, MILLIPORE) và phân tích bằng cách sử dụng các kháng thể GCSF kháng người và streptavidin-HRP. Đối với các điều kiện gắn kết kháng thể, lần lượt các kháng thể IgG Fc kháng người (Sigma) được sử dụng trong điều kiện phong bế 5% sữa gầy sau khi pha loãng ở tỷ lệ 1:150000, các kháng thể GCSF kháng người (Human G-CSF Assay Kit. IBL)

trong điều kiện phong bế 1% sữa gầy sau khi pha loãng ở tỷ lệ 1:2000, và streptavidin-HRP trong điều kiện phong bế 5% sữa gầy sau khi pha loãng ở tỷ lệ 1:5000. HM10460A được xác nhận là tạo ra các dime (94 kDa), có hai G-CSF trên mỗi mảnh IgG4 Fc, và mảnh IgG4 Fc (50 kDa), bằng cơ chế trao đổi chuỗi giữa chính các HM10460A.

Trái lại, khi HM10460A được gây ra phản ứng trao đổi chuỗi tương hỗ giữa HM10460A và IgG4 của người, thì các phân tử có kích thước 100 kDa và 122 kDa được mong đợi tạo ra. Tuy nhiên, các phân tử này không được quan sát thấy bằng phân tích thẩm tách Tây. Trái lại, khi được phân tích thông qua streptavidin-HRP, dải 75 kDa xuất hiện trên làn IgG4 của người, và điều này xác nhận sự tạo ra monome từ IgG4 của người, mà chính là dime của IgG4 của người theo tự nhiên (Fig. 1).

Ví dụ 3. Xác nhận sự trao đổi chuỗi giữa thể tiếp hợp yếu tố kích thích khuẩn lạc bạch cầu hạt của người-PEG-globulin miễn dịch và IgG4 của người trong máu của người

Bổ sung penixilin-streptomycin (1% thể tích/thể tích) vào máu người thu được từ người cho. 1,32 mg HM10460A được tạo ra trong ví dụ 1 được trộn với 3 ml máu, và hỗn hợp này được chia vào 6 ống (0,5 ml/ống) và được ủ trong tủ ở nhiệt độ 37°C. Lần lượt mỗi ống được lấy ra ở các thời điểm 0 giờ, 4 giờ, 10 giờ, 24 giờ, và 48 giờ, và huyết tương được tách từ đó và được bảo quản ở nhiệt độ -20°C trước khi phân tích. Mỗi mẫu huyết tương và HM10460A và mảnh IgG4 Fc ở các nồng độ thay đổi làm chất đối chứng được trộn với dung dịch đệm mẫu protein không khử, và chất thu được được SDS-PAGE bằng cách sử dụng gel polyacrylamit gradient nồng độ 4% đến 15%. Gel, khi hoàn thành điện di, được thấm lên trên màng PVDF (Immobilon-P, MILLIPORE) và phân tích bằng cách sử dụng các kháng thể G-CSF kháng người. Các kháng thể G-CSF kháng người (Human G-CSF Assay Kit. IBL) được sử dụng trong điều kiện phong bế 1% sữa gầy sau khi pha loãng ở tỷ lệ 1:2000. Như trong máu của chuột, các phân tử có kích thước 100 kDa và 122 kD, có thể được tạo ra bởi sự trao đổi chuỗi với IgG4 của người, không được tạo ra (Fig. 2).

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này cần phải nhận thấy rằng sáng chế có thể được thực hiện ở các dạng cụ thể khác mà không vượt quá ý tưởng hoặc các đặc tính cơ bản của nó. Các phương án được mô tả cần

phải được xem xét theo tất cả các khía cạnh như minh họa và không giới hạn phạm vi của sáng chế. Do đó, phạm vi của sáng chế được biểu thị bởi yêu cầu bảo hộ kèm theo chứ không phải bởi phần mô tả trên đây. Tất cả các thay đổi nằm trong ý tưởng và phạm vi của các phương án tương đương của yêu cầu bảo hộ đều nằm trong phạm vi của sáng chế.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Mảnh IgG4 Fc cải biến chứa vùng bản lề cải biến, trong đó một phần của vùng bản lề được biểu thị bởi trình tự axit amin sau được làm mất đoạn để chỉ chứa một gốc xystein:

Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro-Ser-Cys-Pro.

2. Mảnh IgG4 Fc cải biến theo điểm 1, trong đó không xảy ra sự trao đổi chuỗi *in vivo* và tạo ra monome.

3. Mảnh IgG4 Fc cải biến theo điểm 1, trong đó vùng bản lề được gây đột biến bằng cách làm mất đoạn 1 đến 8 axit amin liên tục hoặc không liên tục chứa gốc Cys ở vị trí số 8.

4. Mảnh IgG4 Fc cải biến theo điểm 1, trong đó vùng bản lề được gây đột biến bằng cách làm mất đoạn 1 đến 8 axit amin liên tục hoặc không liên tục chứa gốc Cys ở vị trí số 11.

5. Mảnh IgG4 Fc cải biến theo điểm 1, trong đó vùng bản lề được gây đột biến bằng cách làm mất đoạn 1 đến 5 axit amin liên tục hoặc không liên tục chứa gốc Cys ở vị trí số 8.

6. Mảnh IgG4 Fc cải biến theo điểm 1, trong đó vùng bản lề được gây đột biến bằng cách làm mất đoạn 1 đến 5 axit amin liên tục hoặc không liên tục chứa gốc Cys ở vị trí số 11.

7. Mảnh IgG4 Fc cải biến theo điểm 1, trong đó vùng bản lề được gây đột biến bằng cách làm mất đoạn 1 đến 3 axit amin liên tục hoặc không liên tục chứa gốc Cys ở vị trí số 8.

8. Mảnh IgG4 Fc cải biến theo điểm 1, trong đó vùng bản lề được cải biến bằng cách làm mất đoạn 1 đến 3 axit amin liên tục hoặc không liên tục chứa gốc Cys ở vị trí số 11.

9. Mảnh IgG4 Fc cải biến theo điểm 1, trong đó mảnh này không được glycosyl hóa.

10. Mảnh IgG4 Fc cải biến theo điểm 1, trong đó mảnh này được cải biến bằng polyme không phải peptit.

11. Axit nucleic mã hóa mảnh IgG4 Fc theo điểm 1.

12. Vector chứa axit nucleic theo điểm 11.

13. Vi sinh vật, trong đó vector theo điểm 12 được đưa vào.

14. Phương pháp tạo ra mảnh IgG4 Fc theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1

đến 10 bao gồm việc nuôi cấy vi sinh vật theo điểm 13.

15. Thẻ tiếp hợp được chất, trong đó mảnh IgG4 Fc theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 10 được tiếp hợp với được chất bằng cầu nối.

16. Thẻ tiếp hợp được chất theo điểm 15, trong đó được chất này được chọn từ nhóm bao gồm hormon sinh trưởng của người, hormon giải phóng hormon sinh trưởng, peptit giải phóng hormon sinh trưởng, interferon và thụ thể interferon, yếu tố kích thích khuẩn lạc, interleukin và thụ thể interleukin, enzym, protein gắn kết với interleukin và xytokin, yếu tố hoạt hóa đại thực bào, peptit đại thực bào, yếu tố tế bào B, yếu tố tế bào T, protein A, yếu tố ức chế dị ứng, glycoprotein hoại tử, kháng độc tố, lymphotoxin, yếu tố hoại tử khối u, chất ức chế khối u, yếu tố sinh trưởng biến nạp, α -1 antitrypsin, albumin, α -lactalbumin, apolipoprotein-E, erythropoietin, erythropoietin được glycosyl hóa cao, angiopoietin, hemoglobin, thrombin, peptit hoạt hóa thụ thể thrombin, thrombomodulin, yếu tố đông máu VII, yếu tố đông máu VII α , yếu tố đông máu VIII, yếu tố đông máu IX, yếu tố đông máu XIII, chất hoạt hóa plasminogen, peptit gắn kết với fibrin, urokinaza, streptokinaza, hirudin, protein C, protein phản ứng C, chất ức chế renin, chất ức chế collagenaza, peroxit dismutaza, leptin, yếu tố sinh trưởng có nguồn gốc tiểu cầu, yếu tố sinh trưởng biểu mô, yếu tố sinh trưởng biểu bì, angiostatin, angiotensin, yếu tố sinh trưởng tạo hình xương, protein tạo hình thái xương, calcitonin, insulin và dẫn xuất insulin, 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 noãn, hormon tạo thể vàng, hormon giải phóng hormon tạo thể vàng, các yếu tố sinh trưởng thần kinh (bao gồm yếu tố sinh trưởng thần kinh, yếu tố dinh dưỡng thần kinh lông mao, yếu tố tạo sợi trục-1, peptit bài niệu natri ở não, yếu tố dinh dưỡng thần kinh có nguồn gốc từ tế bào thần kinh đệm, netrin, yếu tố ức chế bạch cầu trung tính, yếu tố dinh dưỡng thần kinh, và neutrin), hormon tuyến cận giáp, relaxin, secretin, somatomedin, yếu tố sinh trưởng tương tự insulin, hormon vỏ thượng thận, glucagon, các peptit kích thích insulin bao gồm peptit-1 giống glucagon và exendin-4, incretin tiết trong ruột, các tế bào tạo mỡ bao gồm leptin và xytokin thần kinh có hiệu quả đối với hội chứng chuyển hóa, cholecystokinin, polypeptit tuyến tụy, peptit giải phóng gastrin, yếu tố giải phóng corticotropin, hormon kích thích tuyến giáp, autotaxin, lactoferrin, myostatin, thụ thể, chất đối kháng thụ thể, kháng nguyên bề mặt tế

bào, kháng thể đơn dòng, kháng thể đa dòng, mảnh kháng thể, và kháng nguyên vacxin có nguồn gốc virut.

17. Thể tiếp hợp được chất theo điểm 15, trong đó được chất là yếu tố kích thích khuẩn lạc bạch cầu hạt.

18. Thể tiếp hợp được chất theo điểm 15, trong đó cầu nối là polyme không phải peptit.

19. Thể tiếp hợp được chất theo điểm 18, trong đó polyme không phải peptit này có hai hoặc ba đầu phản ứng.

20. Được phẩm chứa thể tiếp hợp theo điểm 15.

21. Chất mang được chất chứa mảnh IgG4 Fc cải biến chứa vùng bản lề cải biến, trong đó một phần của vùng bản lề được biểu thị bởi trình tự axit amin sau được làm mất đoạn để chỉ chứa một gốc xystein:

Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro-Ser-Cys-Pro, và

trong đó không xảy ra sự trao đổi chuỗi *in vivo* và tạo ra monome.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> HANMI PHARM. CO., LTD.

<120> Mảnh IgG4 Fc chứa vùng bản lề cải biến và thể tiếp hợp được chất của mảnh này

<130> OPA14085

<140> 10-2013-0063029

<141> 2013-05-31

<160> 21

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 12

<212> PRT

<213> HOMO SAPIENS

<400> 1

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro
1 5 10

<210> 2

<211> 221

<212> PRT

<213> HOMO SAPIENS

<400> 2

Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
1 5 10 15

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
20 25 30

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln
35 40 45

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
50 55 60

Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
65 70 75 80

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
85 90 95

Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
100 105 110

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
115 120 125

Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
130 135 140

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
145 150 155 160

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly

29101

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

<210> 3
 <211> 663
 <212> ADN
 <213> HOMO SAPIENS

<400> 3
 ccacatgcc cagcacctga gttcctgggg ggaccatcag tcttcctgtt cccccaaaa 60
 cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc cctgagggtca catgcgtggg ggtggacgtg 120
 agccaggaag accctgaggt ccagttcaac tggtagctgg acggcgtgga ggtgcataat 180
 gccaaagaaa agccgcggga ggagcagttc aacagcacgt accgtgtggg cagcgtcctc 240
 accgtcctgc accaggactg gctgaatggc aaggagtaca agtgcaaggc ctccaacaaa 300
 ggctcccat cctccatcga gaaaaccatc tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca 360
 caggtgtaca ccctgcccc atcccaggag gagatgacca agaaccaggc cagcctgacc 420
 tgcctgggtca aaggcttcta tcccagcgac atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag 480
 ccggagaaca actacaagac cagcctccc gtgctggact ccgacggctc cttcttcctc 540
 tacagcaggc taaccgtgga caagagcagg tggcaggagg ggaacgtctt ctcatgctcc 600
 gtgatgcatg aggctctgca caaccactac acacagaaga gcctctccct gtctctgggt 660
 aaa 663

<210> 4
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Biến thể của vùng bản lề

<400> 4
 Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Pro Ser Cys Pro
 1 5 10

<210> 5
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Biến thể của vùng bản lề

<400> 5

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Pro
 1 5 10

<210> 6

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Biến thể của vùng bản lề

<400> 6

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser
 1 5 10

<210> 7

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Biến thể của vùng bản lề

<400> 7

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro
 1 5 10

<210> 8

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Biến thể của vùng bản lề

<400> 8

Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser
 1 5

<210> 9

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Biến thể của vùng bản lề

<400> 9

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys

1	5
<210>	10
<211>	7
<212>	PRT
<213>	Trình tự nhân tạo
<220>	
<223>	Biến thể của vùng bản lề
<400>	10
Glu Lys Tyr Gly Pro Pro Cys	
1	5
<210>	11
<211>	6
<212>	PRT
<213>	Trình tự nhân tạo
<220>	
<223>	Biến thể của vùng bản lề
<400>	11
Glu Ser Pro Ser Cys Pro	
1	5
<210>	12
<211>	5
<212>	PRT
<213>	Trình tự nhân tạo
<220>	
<223>	Biến thể của vùng bản lề
<400>	12
Glu Pro Ser Cys Pro	
1	5
<210>	13
<211>	4
<212>	PRT
<213>	Trình tự nhân tạo
<220>	
<223>	Biến thể của vùng bản lề
<400>	13
Pro Ser Cys Pro	
1	
<210>	14
<211>	10
<212>	PRT
<213>	Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Biến thể của vùng bản lề

<400> 14

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Ser Cys Pro
 1 5 10

<210> 15

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Biến thể của vùng bản lề

<400> 15

Lys Tyr Gly Pro Pro Pro Ser Cys Pro
 1 5

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Biến thể của vùng bản lề

<400> 16

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Ser Cys Pro
 1 5

<210> 17

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Biến thể của vùng bản lề

<400> 17

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys
 1 5

<210> 18

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Biến thể của vùng bản lề

<400> 18

Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro

1

5

<210> 19
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Biến thể của vùng bản lề

<400> 19
 Glu Ser Lys Pro Ser Cys Pro
 1 5

<210> 20
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Biến thể của vùng bản lề

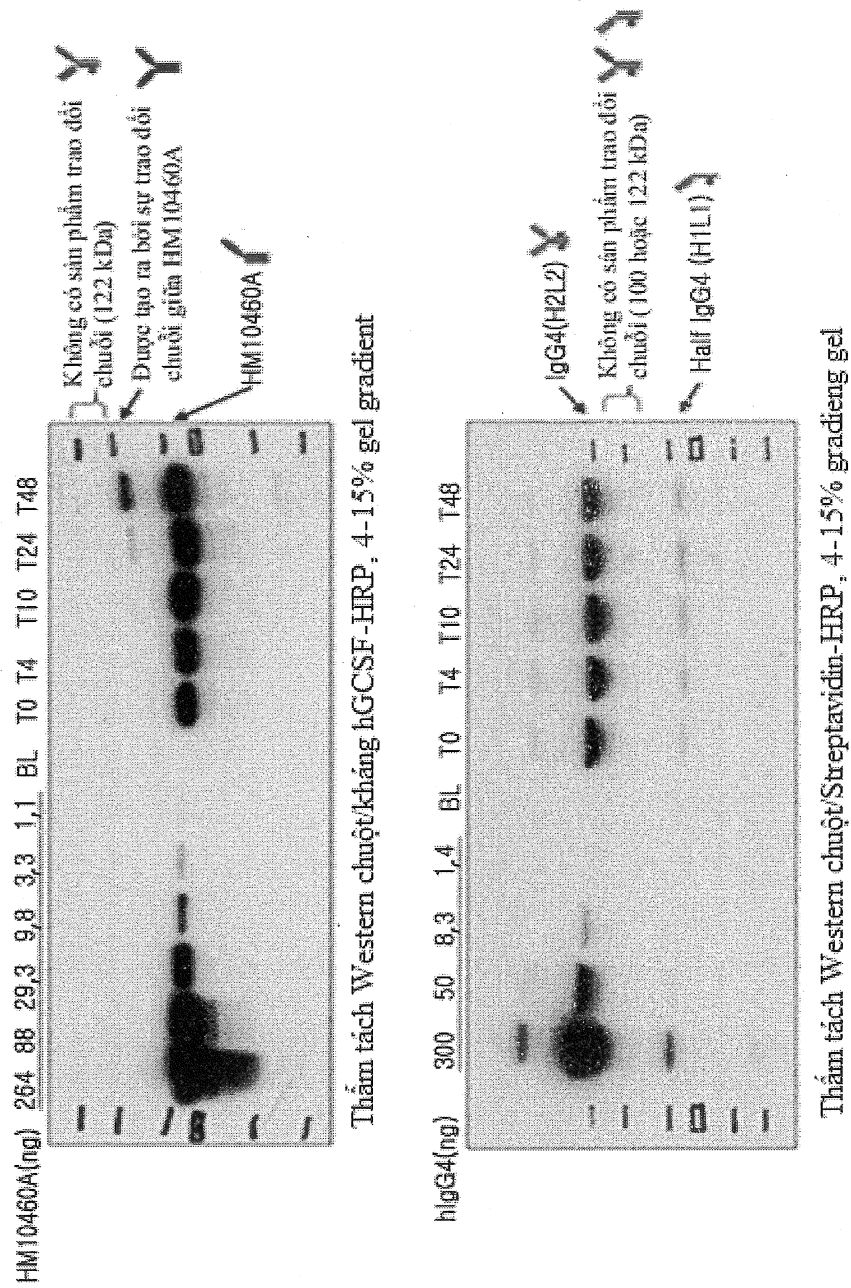
<400> 20
 Glu Ser Pro Ser Cys Pro
 1 5

<210> 21
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Biến thể của vùng bản lề

<400> 21
 Glu Pro Ser Cys
 1

[FIG. 1]



[FIG. 2]

