



(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)



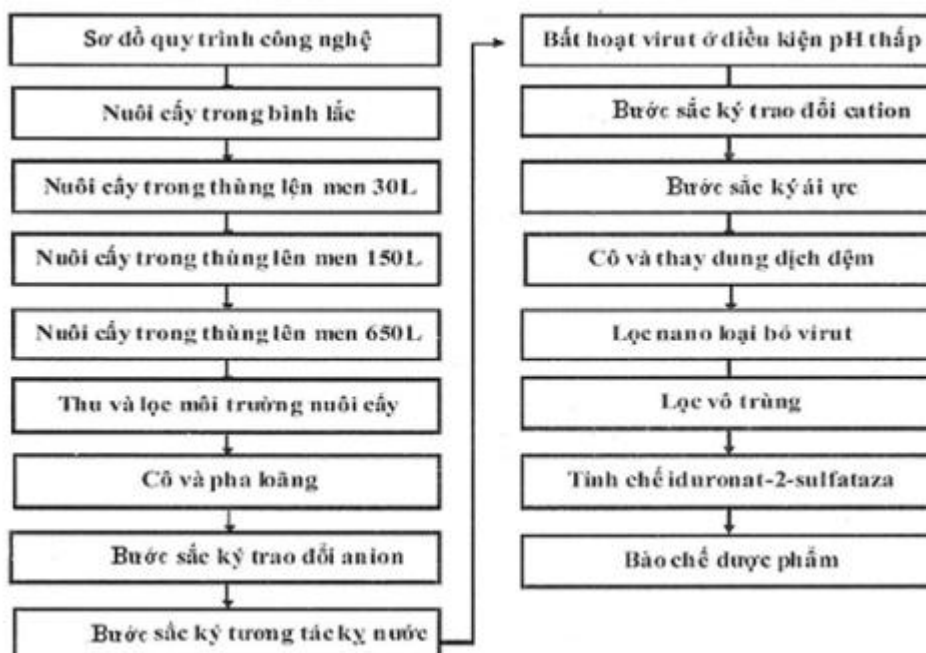
1-0031566

(51)⁷ A61K 38/46; A61P 31/12; A61K 38/17 (13) B

- (21) 1-2014-00266 (22) 15/06/2012
(86) PCT/KR2012/004734 15/06/2012 (87) WO2012/177020 27/12/2012
(30) 61/500,994 24/06/2011 US; 10-2012-0012718 08/02/2012 KR
(45) 25/04/2022 409 (43) 25/03/2014 312A
(73) 1. GREEN CROSS CORPORATION (KR)
107, Ihyeon-ro 30beon-gil, Giheung-gu, Yongin-si, Gyeonggi-do 446-855, Republic of Korea
2. MEDIGENEBIO CORPORATION (KR)
107, Ihyeon-ro 30beon-gil, Giheung-gu, Yongin-si, Gyeonggi-do 446-855, Republic of Korea
(72) JIN, Thong-Gyu (KR); CHUNG, Yo Kyung (KR); PAIK, Sang Hoon (KR); PARK, Yoo Chang (KR); SEO, Jinwook (KR); CHOI, Yong Woon (KR); SON, Jong Mun (KR); KIM, Yong-Chul (KR).
(74) Công ty Luật TNHH Phạm và Liên danh (PHAM & ASSOCIATES)

(54) CHẾ PHẨM IDURONAT-2-SULFATAZA TÁI TỔ HỢP CỦA NGƯỜI, DƯỢC PHẨM CHỨA CHẾ PHẨM NÀY VÀ PHƯƠNG PHÁP BẢO CHẾ CHÚNG

(57) Sáng chế đề cập đến chế phẩm chứa iduronat-2-sulfataza tái tổ hợp của người. Kiểu glycosyl hóa và hàm lượng formylglycin của chế phẩm chứa iduronat-2-sulfataza theo sáng chế khác biệt so với dược phẩm Elaprase có bán trên thị trường nên chế phẩm này có hiệu quả điều trị bệnh vượt trội, độ an toàn cao hơn Elaprase, và có thể được sử dụng để điều trị hiệu quả hội chứng Hunter. Sáng chế cũng đề cập đến dược phẩm chứa chế phẩm theo sáng chế và phương pháp bảo chế chúng.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến chế phẩm để điều trị hội chứng Hunter chứa iduronat-2-sulfataza tái tổ hợp của người, được phẩm chứa chế phẩm này, và phương pháp bào chế chúng.

Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến chế phẩm chứa hoạt chất là iduronat-2-sulfataza có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1 để điều trị hội chứng Hunter, trong đó gốc xystein ở vị trí số 59 trên trình tự SEQ ID NO:1 này đã được biến đổi thành formylglyxin (tức là axit 2-amino-3-oxopropionic) ở tỷ lệ mol bằng 65% hoặc cao hơn, tốt hơn nếu ở tỷ lệ mol bằng 75% hoặc cao hơn, và tốt hơn nữa nếu ở tỷ lệ mol bằng 80% hoặc cao hơn. Ngoài ra, iduronat-2-sulfataza chứa trong chế phẩm theo sáng chế còn chứa manozơ-6-phosphat với hàm lượng nằm trong khoảng từ 2 đến 4mol/mol iduronat-2-sulfataza, tốt hơn nếu với hàm lượng nằm trong khoảng từ 2,3 đến 3,5mol/mol iduronat-2-sulfataza, và tốt hơn nữa nếu với hàm lượng nằm trong khoảng từ 2,5 đến 3mol/mol iduronat-2-sulfataza.

Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp bào chế chế phẩm để điều trị hội chứng Hunter chứa iduronat-2-sulfataza bao gồm các bước:

(1) nuôi cấy dòng tế bào tái tổ hợp đã được biến nạp gen mã hóa iduronat-2-sulfataza có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO:1 và thu nhận dòng tế bào đã được nuôi cấy này; và

(2) tinh chế dòng tế bào đã được nuôi cấy ở bước (1) bằng các bước sắc ký trao đổi anion, sắc ký tương tác kỵ nước, sắc ký trao đổi cation, và sắc ký ái lực;

khác biệt ở chỗ, dòng tế bào tái tổ hợp này được nuôi cấy với sự có mặt của chất thủy phân và bước sắc ký trao đổi anion được thực hiện bằng cách sử dụng dung dịch đệm rửa giải có độ pH nằm trong khoảng từ 4,0 đến 6,0.

Do có độ an toàn và hiệu quả điều trị cao hơn so với các sản phẩm hiện có

trên thị trường, nên chế phẩm chứa iduronat-2-sulfataza và được phẩm chứa chế phẩm này theo sáng chế có thể được sử dụng để điều trị hiệu quả hội chứng Hunter.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Hội chứng Hunter hay bệnh mucosaccharidosis typ II là bệnh di truyền tích tụ mucopolysacarit trong lysosom. Trong hội chứng này, mucopolysacarit, còn được gọi là glycosaminoglycan, không được chuyển hóa một cách thích hợp và tích tụ trong cơ thể do sự thiếu hụt iduronat-2-sulfataza. Khi glycosaminoglycan tích tụ ngày càng nhiều trong tất cả các tế bào cơ thể, sẽ xuất hiện các triệu chứng của bệnh Hunter. Các biểu hiện về mặt thể chất ở người mắc hội chứng Hunter bao gồm những dấu hiệu khác thường trên gương mặt và đầu to. Một trong số các triệu chứng rõ rệt nhất của hội chứng Hunter là bụng phình to do gan và lá lách to, điếc, bệnh van tim, bệnh tắc nghẽn đường hô hấp và ngưng thở khi ngủ. Ngoài ra, hội chứng Hunter còn gây ảnh hưởng đến các khớp động làm cứng khớp và hạn chế vận động. Ở một số trường hợp, hội chứng Hunter gây ảnh hưởng rối loạn hệ thần kinh trung ương dẫn đến trí não chậm phát triển và các vấn đề về hệ thần kinh. Tỷ lệ mắc hội chứng Hunter là 1:162.000 và rối loạn di truyền liên quan đến sự biểu hiện tính trạng lặn của nhiễm sắc thể X vì vậy gây ra nhiều đau khổ cho gia đình cũng như người bệnh.

Nhiều thử nghiệm khác nhau như ghép tủy xương, thay thế enzym, và trị liệu gen đã được thực hiện để điều trị hội chứng Hunter. Mặc dù phương pháp ghép tủy xương có thể ngăn ngừa được hầu hết các triệu chứng của bệnh nhưng việc tìm ra kháng nguyên bạch cầu của người (HLA- human leukocyte antigen) phù hợp cho tất cả các người bệnh là hết sức khó khăn. Hơn nữa, phương pháp ghép tủy xương có thể gây ra nhiều tác dụng không mong muốn, bao gồm đe dọa tính mạng của người bệnh nếu kháng nguyên bạch cầu của người không phù hợp. Liệu pháp gen để điều trị hội chứng Hunter được thực hiện bằng cách đưa gen mã hóa iduronat-2-sulfataza bình thường vào cơ thể người bệnh với vật truyền là vectơ virus như adenovirus hoặc retrovirus hoặc vectơ không có bản chất virus. Tuy nhiên, liệu pháp gen vẫn chỉ đang trong quá trình thử nghiệm, và chưa được áp dụng trên lâm sàng. Phương pháp thay thế enzym để điều trị hội chứng Hunter sử dụng iduronat-2-sulfataza ngoại sinh và có ưu điểm là đơn giản. Tuy nhiên, phương pháp thay thế enzym cần được thực hiện

liên tục và có chi phí điều trị cao. Elaprase® (do Shire Pharmaceuticals Group sản xuất) được bào chế bằng công nghệ tái tổ hợp ADN đã được FDA phê chuẩn và sử dụng để điều trị hội chứng Hunter. Tuy nhiên, dược phẩm này có giá thành rất cao và nhược điểm là độ an toàn và hiệu quả thấp.

Như đã nêu trên, mặc dù đã có nhiều phương pháp điều trị hội chứng Hunter, nhưng vẫn cần nghiên cứu phát triển liệu pháp và hoạt chất có hiệu quả điều trị và độ an toàn cao.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Theo mục đích chính, sáng chế đề cập đến chế phẩm để điều trị hội chứng Hunter chứa iduronat-2-sulfataza tái tổ hợp của người, có hiệu quả điều trị và độ an toàn cao được bào chế bằng phương pháp nuôi cấy và tinh chế đã được cải tiến, và được phẩm chứa chế phẩm này.

Theo mục đích khác, sáng chế đề cập đến phương pháp bào chế chế phẩm nêu trên và phương pháp bào chế được phẩm chứa chế phẩm này.

Để đạt được mục đích nêu trên, sáng chế đề cập đến chế phẩm để điều trị hội chứng Hunter, chứa iduronat-2-sulfataza tái tổ hợp có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1, trong đó gốc cystein ở vị trí số 59 được biến đổi thành formylglyxin ở tỷ lệ mol bằng 65% hoặc cao hơn, tốt hơn nếu ở tỷ lệ mol bằng 75% hoặc cao hơn, và tốt hơn nữa nếu ở tỷ lệ mol bằng 80% hoặc cao hơn.

Mô tả vắn tắt hình vẽ

Fig.1 thể hiện sơ đồ thiết kế vector pJK-dhfr-IDS-S1 được sử dụng để tạo ra vector biểu hiện iduronat-2-sulfataza.

Fig.2 thể hiện sơ đồ thiết kế vector pJK-dhfr-Or2-IDS biểu hiện iduronat-2-sulfataza từ vector pJK-dhfr-IDS-S1 thu được trên Fig.1.

Fig.3 là sơ đồ thể hiện bước phân lập và tinh chế iduronat-2-sulfataza từ dòng tế bào CHO-DG44 đã được biến nạp.

Fig.4 là ảnh thể hiện kết quả phân tích trình tự đầu N của iduronat-2-sulfataza

theo phương pháp SDS-PAGE, trong đó gen chỉ thị điện di cho kết quả trên băng M, iduronat-2-sulfataza đã được glycosyl hóa điện di cho kết quả trên băng 1, iduronat-2-sulfataza được phân cắt bằng PNGaza F điện di cho kết quả trên băng 2, và iduronat-2-sulfataza đã được khử glycosyl hóa điện di cho kết quả trên băng 3.

Fig.5 thể hiện sơ đồ quá trình phân tích trình tự axit amin của iduronat-2-sulfataza.

Fig.6 là hình vẽ thể hiện trình tự axit amin của iduronat-2-sulfataza theo sáng chế khi được phân tích bằng phương pháp MALDI-MS/MS và LC-ESI-MS/MS.

Fig.7 là sắc ký đồ RP-HPLC của iduronat-2-sulfataza dạng khử và iduronat-2-sulfataza dạng không khử thể hiện vị trí của các liên kết disulfua trong iduronat-2-sulfataza.

Fig.8 là hình thể hiện vị trí của các liên kết disulfua trong iduronat-2-sulfataza theo sáng chế khi được phân tích bằng phương pháp MALDI-MS.

Fig.9 là hình thể hiện vị trí của các liên kết disulfua trong iduronat-2-sulfataza theo sáng chế khi được phân tích bằng phương pháp MALDI-MS /MS.

Fig.10 là hình thể hiện vị trí của các liên kết disulfua trong iduronat-2-sulfataza theo sáng chế khi được phân tích bằng phương pháp MALDI-MS/MS.

Fig.11 là hình thể hiện iduronat-2-sulfataza điện di trên gel SDS-PAGE sau khi xử lý bằng các enzym glycosit hydrolaza khác nhau để xác định kiểu glycosyl hóa của iduronat-2-sulfataza theo sáng chế.

Fig.12 là sắc ký đồ HPAEC-PAD thể hiện hàm lượng mannoza-6-phosphat trong iduronat-2-sulfataza theo sáng chế.

Fig.13 là sắc ký đồ thể hiện độ tinh khiết của iduronat-2-sulfataza theo sáng chế.

Fig.14 là sắc ký đồ thể hiện hoạt tính xúc tác của iduronat-2-sulfataza theo sáng chế trên cơ chất tự nhiên.

Fig.15 là đồ thị Lineweaver-Burk thể hiện tỷ lệ hàm lượng iduronat-2-sulfataza đã được hấp thu vào trong tế bào so với hàm lượng iduronat-2-sulfataza được bổ sung vào nguyên bào sợi bình thường.

Fig.16 là biểu đồ thể hiện hàm lượng iduronat-2-sulfataza theo sáng chế đã được hấp thu vào trong nguyên bào sợi thông thường của người và nguyên bào sợi của người bệnh mắc hội chứng Hunter.

Fig.17 là hình vẽ thể hiện các thông số đo hàm lượng formylglyxin trong iduronat-2-sulfataza theo sáng chế.

Fig.18 là hình vẽ thể hiện các điểm đẳng điện của iduronat-2-sulfataza theo sáng chế trước và sau khi thực hiện bước sắc ký trao đổi cation, trong đó gen chỉ thị điện di cho kết quả trên băng M, mẫu được nạp vào hệ thống sắc ký trao đổi cation điện di cho kết quả trên băng 1, dịch rửa giải của bước sắc ký trao đổi cation điện di cho kết quả trên băng 2, và dịch tái thu hồi sau bước sắc ký trao đổi cation điện di cho kết quả trên băng 3.

Mô tả chi tiết sáng chế

Iduronat-2-sulfataza, còn được gọi là IDS hoặc I2S, có trọng lượng phân tử bằng 56kDa khi được phân lập và tinh chế từ gan, thận hoặc nhau thai người (Bielicki, J. et al. (1990) *Biochem, J.*, 271: 75~86). Iduronat-2-sulfataza là protein monome chứa 550 axit amin và được tiết vào môi trường nuôi cấy dưới dạng protein có hoạt tính đầy đủ chứa 525 axit amin sau khi đã phân cắt peptit tín hiệu chứa 25 axit amin. Trọng lượng phân tử của iduronat-2-sulfataza thay đổi phụ thuộc vào quá trình glycosyl hóa và thường nằm trong khoảng từ 60kDa đến 90kDa khi xử lý bằng endoglycosidaza F và định lượng theo phương pháp SDS-PAGE.

Iduronat-2-sulfataza chứa hai liên kết disulfua và tám vị trí glycosyl hóa ở đầu N được tạo ra dưới dạng glycoprotein khi đột biến sau dịch mã, trong đó các vị trí glycosyl hóa ở đầu N được liên kết với chuỗi oligosacarit phức hợp kiểu lai hóa và chứa nhiều manozơ ở eukaryot. Khi được tiết vào môi trường nuôi cấy, iduronat-2-sulfataza có thể được sử dụng làm thuốc sau khi đã qua các quá trình phân lập và tinh chế thông thường. Iduronat-2-sulfataza có thể ở dạng glycoprotein với nhiều

kiểu glycosyl hóa khác nhau phụ thuộc vào nhiều yếu tố, bao gồm, quá trình tái tổ hợp, biến nạp gen mã hóa iduronat sulfataza (ví dụ, dòng tế bào được sử dụng), kỹ thuật nuôi cấy và tinh chế.

Theo sáng chế, hàm lượng manosa-6-phosphat và tỷ lệ biến đổi Cys-59 thành formylglyxin có tác động rất lớn đến hiệu quả điều trị và độ an toàn của iduronat-2-sulfataza. Sự có mặt của gốc manosa-6-phosphat giúp cho iduronat-2-sulfataza gắn kết đặc hiệu với thụ thể của M6P trên bề mặt tế bào, hấp thu vào bên trong tế bào, phân bố đến lysosom, và phân hủy glycosaminoglycan tích tụ trong đó. Hoạt tính sinh học của iduronat-2-sulfataza cũng phụ thuộc vào quá trình đột biến sau dịch mã gốc xystein bảo thủ ở vị trí số 59 thành formylglyxin.

Trừ khi có quy định khác, thuật ngữ “iduronat-2-sulfataza” được sử dụng trong sáng chế để chỉ protein iduronat-2-sulfataza đã được gắn thêm gốc cacbohyđrat, tức là iduronat-2-sulfataza đã được glycosyl hóa. Tốt hơn nếu, iduronat-2-sulfataza chứa trong chế phẩm để điều trị hội chứng Hunter theo sáng chế có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1, nhưng không giới hạn ở trình tự axit amin này. Chuyên gia trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rằng trình tự axit amin bất kỳ chứa các đột biến như chèn thêm, loại bỏ hoặc thay thế một số gốc axit amin trên trình tự axit amin SEQ ID NO.1 đều nằm trong phạm vi của sáng chế miễn là vẫn giữ lại được hoạt tính mong muốn của iduronat-2-sulfataza.

Thuật ngữ “kiểu glycosyl hóa của iduronat-2-sulfataza” được sử dụng trong sáng chế để chỉ mô hình liên kết của các oligosacarit với tám vị trí glycosyl hóa của iduronat-2-sulfataza thu được theo sáng chế (ví dụ, các vị trí glycosyl hóa và loại oligosacarit).

Theo một phương án, iduronat-2-sulfataza chứa trong chế phẩm để điều trị hội chứng Hunter theo sáng chế có trình tự axit amin giống như SEQ ID NO.1, nhưng có sự khác biệt về kiểu glycosyl hóa và tỷ lệ biến đổi gốc xystein ở vị trí số 59 thành formylglyxin, như đã nêu trên (ví dụ 1-5 và ví dụ 1-6).

Cụ thể, iduronat-2-sulfataza chứa trong chế phẩm để điều trị hội chứng Hunter theo sáng chế có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1, trong đó gốc

xystein ở vị trí số 59 được biến đổi thành formylglyxin ở tỷ lệ mol bằng 65% hoặc cao hơn, tốt hơn nếu ở tỷ lệ mol bằng 75% hoặc hơn, và tốt hơn nữa nếu ở tỷ lệ mol bằng 80% hoặc cao hơn, trong khi đó tỷ lệ biến đổi này ở Elaprasedraxim xấp xỉ bằng 50% (Genet Med 2006;8(8):465-473). Formylglyxin được biết là có tác động rất lớn đối với khả năng phân hủy cơ chất của iduronat-2-sulfataza, tức là hoạt tính của iduronat-2-sulfataza. Vì vậy, do sự khác biệt giữa chế phẩm theo sáng chế và dược phẩm Elaprasedraxim có bán trên thị trường, nên chế phẩm và dược phẩm chứa chế phẩm này theo sáng chế sẽ có hiệu quả điều trị hội chứng Hunter cao hơn so với Elaprasedraxim do có tỷ lệ biến đổi gốc xystein ở vị trí số 59 thành formylglyxin trên trình tự axit amin IDS cao hơn.

Hơn nữa, iduronat-2-sulfataza chứa trong chế phẩm để điều trị hội chứng Hunter theo sáng chế còn chứa mannoza-6-phosphat với hàm lượng nằm trong khoảng từ 2 đến 4mol/mol iduronat-2-sulfataza, tốt hơn nếu với hàm lượng nằm trong khoảng từ 2,3 đến 3,5mol/mol iduronat-2-sulfataza, và tốt hơn nữa nếu với hàm lượng nằm trong khoảng từ 2,5 đến 3mol/mol iduronat-2-sulfataza. Mannoza-6-phosphat đóng vai trò quan trọng trong việc hấp thu iduronat-2-sulfataza vào bên trong tế bào và sau đó phân bố đến lysosom nội bào mục đích. Do đó, dược phẩm theo sáng chế chứa iduronat-2-sulfataza với hàm lượng mannoza-6-phosphat cao sẽ tạo ra cơ chế hấp thu mạnh hơn iduronat-2-sulfataza qua trung gian thụ thể và phân bố nhiều hơn đến lysosom đích và phân hủy hiệu quả glycosaminoglycan tích tụ.

Dược phẩm dùng để điều trị hội chứng Hunter chứa iduronat-2-sulfataza theo sáng chế có thể được tạo ra bằng cách bào chế chế phẩm theo sáng chế cùng với chất mang được dụng thành dạng thích hợp.

Thuật ngữ “chất mang được dụng” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ chất dẫn thuốc không độc, tương thích về mặt sinh lý với iduronat-2-sulfataza chứa trong chế phẩm để điều trị hội chứng Hunter theo sáng chế, thích hợp cho động vật, không có độc tính quá mức, tương thích, ổn định, không gây kích ứng, không gây dị ứng và các tính chất tương tự.

Chế phẩm theo sáng chế có thể được bào chế với chất dẫn thuốc thích hợp phụ thuộc vào đường đưa thuốc. Dược phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng qua

đường miệng hoặc đường ngoài tiêu hóa nhưng không giới hạn ở các đường đưa thuốc này. Để sử dụng theo đường ngoài tiêu hóa, dược phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng qua da, qua mũi, tiêm màng bụng, tiêm bắp, tiêm dưới da hoặc tiêm tĩnh mạch

Để sử dụng qua đường miệng, dược phẩm theo sáng chế có thể được bào chế kết hợp với chất dẫn thuốc thích hợp thành dạng thuốc bột, thuốc cốm, viên nén, viên tròn, viên ngậm, viên nang, dung dịch thuốc, gel thuốc, xi-rô, hỗn dịch thuốc và viên nhện bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này. Ví dụ về các chất dẫn thuốc thích hợp bao gồm đường như lactoza, đextroza, sucroza, sorbitol, manitol, xylitol, erythritol và maltitol, tinh bột như tinh bột ngô, tinh bột lúa mì, tinh bột gạo, và tinh bột khoai tây, dẫn xuất xenluloza như xenluloza, methyl xenluloza, natri carboxymetyl xenluloza, và hydroxypropyl methyl xenluloza, và tá dược độn như là gelatin và polyvinylpyrrolidon. Ngoài ra, dược phẩm theo sáng chế có thể còn chứa tá dược rã như là polyvinylpyrrolidon dạng liên kết chéo, aga, axit alginic hoặc natri alginat. Ngoài ra, dược phẩm theo sáng chế có thể còn chứa tá dược chống kết tụ, tá dược trơn, tá dược làm ẩm, chất thơm, chất nhũ hóa, và chất bảo quản.

Ngoài ra, chế phẩm theo sáng chế có thể được bào chế kết hợp với chất dẫn thuốc thích hợp thành dạng thuốc dùng qua đường ngoài tiêu hóa như chế phẩm thuốc tiêm, chế phẩm dùng qua da hoặc thuốc xông hít bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này. Để sử dụng qua đường tiêm, dược phẩm theo sáng chế phải được vô trùng và được bảo vệ chống lây nhiễm vi sinh vật như vi khuẩn và nấm. Ví dụ về các chất dẫn thuốc thích hợp để dùng qua đường tiêm có thể bao gồm nước, etanol, polyol (ví dụ glyxerol, propylen glycol, glycol polyetylen lỏng, v.v.), hỗn hợp của chúng, và/hoặc dung môi hoặc môi trường phân tán chứa dầu thực vật, nhưng không giới hạn ở các chất dẫn thuốc này. Tốt hơn nếu, chất dẫn thuốc thích hợp để dùng qua đường tiêm là dung dịch đẳng trương như dung dịch Hank, dung dịch Ringer, dung dịch đệm phosphat chứa trietanolamin, nước cất pha tiêm vô trùng, etanol 10%, propylen glycol 40% và đextroza 5%. Để bảo vệ chế phẩm thuốc tiêm khỏi nhiễm khuẩn, chế phẩm thuốc tiêm có thể còn chứa chất sát khuẩn và nấm như paraben, clobutanol, phenol, axit sorbic, thimerosal, v.v.. Ngoài ra, trong hầu hết các trường hợp, chế phẩm thuốc tiêm theo sáng chế có thể còn chứa chất làm đẳng trương như

đường hoặc natri clorua. Các chế phẩm này đã được liệt kê trong tài liệu: Remington's Pharmaceutical Science, 15th Edition, 1975, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania. Để sử dụng theo đường xông hít, dược phẩm theo sáng chế có thể được bào chế ở dạng thuốc khí dung chứa trong bình nén hoặc bình phun bằng cách sử dụng chất đẩy thích hợp như dicloflometan, tricloflometan, diclotetrafloetan, carbon đioxit hoặc khí đẩy thích hợp. Đối với trường hợp bình nén, liều lượng có thể được xác định bằng van định liều. Ví dụ, nang và túi nang gelatin sử dụng trong bình khí dung hoặc bình xịt có thể được bào chế để chứa hỗn hợp bột hoạt chất và chất dẫn thuốc thích hợp như lactoza hoặc tinh bột.

Các chất dẫn thuốc thích hợp khác đã được mô tả trong tài liệu: Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA, 1995.

Ngoài ra, dược phẩm theo sáng chế còn có thể chứa một hoặc nhiều dung dịch đệm (ví dụ, nước muối hoặc PBS), carbohydrat (ví dụ, glucoza, mannoza, sucroza hoặc dextran), chất ổn định (natri hydro sulfite, natri sulfite hoặc axit ascorbic), chất chống oxy hóa, chất chống khuẩn, chất tạo phức chelat (ví dụ, EDTA hoặc glutathion), chất bổ trợ (ví dụ, nhôm hydroxit), chất gây thấm ổn định, chất làm đặc và/hoặc chất bảo quản (benzalkonium clorua, metylparaben hoặc propylparaben và clobutanol).

Ngoài ra, chế phẩm theo sáng chế có thể được bào chế thành dạng thuốc giải phóng nhanh, giải phóng duy trì hoặc giải phóng chậm sau khi sử dụng cho động vật có vú. Do đó, lượng hữu hiệu của iduronat-2-sulfataza chứa trong chế phẩm để điều trị hội chứng Hunter theo sáng chế có thể được bào chế để sử dụng qua đường miệng, qua da, tiêm dưới da, tiêm tĩnh mạch và tiêm bắp. Thuật ngữ "lượng hữu hiệu" được sử dụng trong bản mô tả để chỉ lượng iduronat-2-sulfataza tạo ra tác dụng chuẩn đoán hoặc điều trị khi cho người bệnh sử dụng. Liều lượng của dược phẩm theo sáng chế có thể thay đổi phụ thuộc vào nhiều yếu tố, bao gồm, đường đưa thuốc, đối tượng cần điều trị, bệnh cần điều trị, các đưa thuốc, mức độ nghiêm trọng của bệnh và tình trạng sức khỏe, cân nặng, giới tính, và độ tuổi của người bệnh. Dược phẩm chứa iduronat-2-sulfataza theo sáng chế có thể được sử dụng với liều lượng nằm trong khoảng từ 0,1mg/kg đến 10 mg/kg và tốt hơn nếu với liều lượng

nằm trong khoảng từ 0,5mg/kg đến 1,0mg/kg dạng bào chế.

Phương pháp bào chế chế phẩm theo sáng chế bao gồm các bước:

(1) nuôi cấy dòng tế bào tái tổ hợp đã được biến nạp gen mã hóa iduronat-2-sulfataza có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO:1 và thu nhận dòng tế bào đã được nuôi cấy này; và

(2) tinh chế dòng tế bào đã được nuôi cấy ở bước (1) bằng các bước sắc ký trao đổi anion, sắc ký tương tác kỵ nước, sắc ký trao đổi cation, và sắc ký ái lực,

khác biệt ở chỗ, dòng tế bào tái tổ hợp này được nuôi cấy với sự có mặt của chất thủy phân và bước sắc ký trao đổi anion được thực hiện bằng cách sử dụng dung dịch đệm rửa giải có độ pH nằm trong khoảng từ 4,0 đến 6,0.

Cụ thể hơn, phương pháp bào chế chế phẩm theo sáng chế bao gồm các bước:

(1) biến nạp vector biểu hiện chứa gen mã hóa iduronat-2-sulfataza vào tế bào vật chủ để thu được dòng tế bào tái tổ hợp;

(2) nuôi cấy dòng tế bào tái tổ hợp thu được ở bước (1) với sự có mặt của chất thủy phân trong môi trường không chứa huyết thanh và thu nhận dòng tế bào đã được nuôi cấy này;

(3) tinh chế iduronat-2-sulfataza từ dòng tế bào đã được nuôi cấy ở bước (2) bằng các bước sắc ký trao đổi anion, sắc ký tương tác kỵ nước, sắc ký trao đổi cation, và sắc ký ái lực, khác biệt ở chỗ, bước sắc ký trao đổi cation được thực hiện bằng cách sử dụng dung dịch đệm rửa giải có độ pH nằm trong khoảng từ 4,0 đến 6,0.

(4) trộn iduronat-2-sulfataza đã được tinh chế với chất mang được dụng.

Theo phương pháp của sáng chế, bước (1) tạo ra dòng tế bào tái tổ hợp bằng cách biến nạp vector biểu hiện chứa gen mã hóa iduronat-2-sulfataza vào tế bào vật chủ. Trình tự axit amin của iduronat-2-sulfataza và gen mã hóa iduronat-2-sulfataza đã được biết đến trong lĩnh vực này. Gen mã hóa iduronat-2-sulfataza có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO:1 được ưu tiên, nhưng không chỉ giới hạn ở gen

này. Nếu trình tự axit amin bất kỳ vẫn duy trì được hoạt tính mong muốn của iduronat-2-sulfataza, mặc dù trình tự axit amin này đã được đột biến bằng cách chèn thêm, loại bỏ và/hoặc thay thế một số gốc axit amin trên trình tự SEQ ID NO:1, thì gen mã hóa trình tự axit amin bất kỳ này cũng nằm trong phạm vi của sáng chế. Vector biểu hiện chứa gen này có thể được thiết kế bằng cách sử dụng phương pháp đã biết trong lĩnh vực này. Ngoài ra, vector biểu hiện này có thể còn chứa gen chỉ thị cho phép xác định được sự có mặt của gen đã được biến nạp vào. Ví dụ về các gen chỉ thị bao gồm gen mã hóa dihydrofolat reductaza (gen dhfr), nhưng không giới hạn ở gen này. Vector pJK-dhfr-Or2-IDS được ưu tiên sử dụng (Fig.2)

Tế bào vật chủ được sử dụng ở bước (1) có thể là tế bào động vật. Ví dụ về các tế bào vật chủ này bao gồm tế bào trứng chuột đồng Trung Quốc (CHO), tế bào thận của phôi người (HEK), tế bào thận của chuột đất vàng mới sinh (BHK), tế bào thận của khỉ (COS7), và tế bào NSO, nhưng không giới hạn ở các tế bào này, trong đó tế bào CHO được ưu tiên sử dụng. Dòng tế bào CHO là một trong số các dòng tế bào được sử dụng phổ biến nhất trong lĩnh vực sinh hóa do có tốc độ tăng trưởng tế bào và hiệu suất cao, dễ thao tác di truyền, tăng sinh nhanh trên môi trường nuôi cấy dạng hỗn dịch quy mô lớn và có khả năng thích ứng cao với môi trường không chứa protein. Quá trình biến nạp vector biểu hiện chứa gen mã hóa iduronat-2-sulfataza vào tế bào vật chủ có thể được thực hiện theo phương pháp đã biết trong lĩnh vực này.

Theo phương pháp của sáng chế, bước (2) là bước nuôi cấy dòng tế bào tái tổ hợp chứa vector biểu hiện chứa gen mã hóa iduronat-2-sulfataza thu được ở bước (1) trên môi trường không chứa huyết thanh. Quá trình nuôi cấy này có thể được thực hiện trên môi trường và ở điều kiện đã được tối ưu hóa cho tế bào vật chủ. Tốt hơn nữa, môi trường nuôi cấy này không chứa huyết thanh. Quá trình nuôi cấy trên môi trường không chứa huyết thanh (ví dụ, huyết thanh bò) sẽ tránh được các tác dụng không mong muốn hay nguy cơ rủi ro liên quan đến huyết thanh.

Theo một phương án của sáng chế, quá trình nuôi cấy dòng tế bào tái tổ hợp đã được biến nạp vector biểu hiện chứa gen mã hóa iduronat-2-sulfataza có thể tiếp tục được nhân sinh khối. Ví dụ, dòng tế bào tái tổ hợp theo sáng chế có thể được

nuôi cấy trong bình lắc và sau đó được nhân sinh khối lên hàng trăm đến hàng nghìn lít trong thùng lên men. Bước nuôi cấy này được thực hiện trong môi trường chứa chất thủy phân có ảnh hưởng rất lớn đến việc định lượng hàm lượng formylglyxin. Tốt hơn nếu, chất thủy phân được bổ sung với lượng để thu được nồng độ cuối cùng nằm trong khoảng từ 0,1g/L đến 10,0 g/L. Theo sáng chế, chất thủy phân hữu dụng này có thể thu được bằng cách thủy phân nguyên liệu động thực vật. Cụ thể là, chất thủy phân theo sáng chế có thể thu được bằng cách thủy phân ít nhất một nguyên liệu được chọn từ nhóm bao gồm đậu tương, khoai tây, mầm lúa mì, và nấm men, nhưng không giới hạn ở các nguyên liệu này.

Theo phương pháp của sáng chế, bước (3) là bước tinh chế iduronat-2-sulfataza từ chủng tế bào đã được nuôi cấy ở bước (2) bằng cách sử dụng các bước sắc ký trao đổi anion, sắc ký tương tác kỵ nước, sắc ký trao đổi cation, và sắc ký ái lực.

Tốt hơn nếu, bốn bước sắc ký này được thực hiện theo thứ tự nêu trên. Tuy nhiên, chuyên gia trung bình trong lĩnh vực này hiểu rằng thứ tự nêu trên có thể được thay đổi nếu cần. Cùng với thứ tự thực hiện các bước sắc ký nêu trên thì nhựa dùng để sắc ký và độ pH của dung dịch đệm rửa giải là các yếu tố quan trọng để xác định kiểu glycosyl hóa và hàm lượng formylglyxin của iduronat-2-sulfataza.

Bước sắc ký trao đổi anion được sử dụng để loại bỏ các chất màu và tạp chất khác nhau ra khỏi môi trường nuôi cấy dòng tế bào theo sáng chế và được thực hiện trên cột chứa nhựa Q Sepharose[®] bằng cách sử dụng dung dịch đệm rửa giải có độ pH nằm trong khoảng từ 5,5 đến 7,5.

Bước sắc ký tương tác kỵ nước được sử dụng để loại bỏ các chất màu và tạp chất còn sót lại sau khi thực hiện bước sắc ký trao đổi anion. Bước này được thực hiện trên cột chứa nhựa phenyl Sepharose[®] bằng cách sử dụng dung dịch đệm rửa giải có độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 7,0.

Bước sắc ký trao đổi cation được sử dụng để chọn phân đoạn chứa hàm lượng formylglyxin cao và loại bỏ các tạp chất còn sót lại. Bước này được thực hiện trên cột chứa nhựa trao đổi ion bằng cách sử dụng dung dịch đệm rửa giải có độ pH nằm

trong khoảng từ 4,0 đến 6,0. Ví dụ về nhựa trao đổi ion hữu ích theo sáng chế bao gồm CM Sepharose Fast Flow, SP Sepharose Fast Flow, S Sepharose Fast Flow và Capto MMC, do GE Healthcare sản xuất, nhưng không chỉ giới hạn ở các loại nhựa này. Tốt hơn nếu, dung dịch đệm rửa giải được sử dụng trong bước này có độ pH nằm trong khoảng từ 4,0 đến 6,0.

Bước sắc ký ái lực được sử dụng để loại bỏ glyxerol được sử dụng ở bước sắc ký trao đổi cation và cô thể tích dịch rửa giải. Bước này được thực hiện trên cột chứa nhựa Blue SepharoseTM, bằng cách sử dụng dung dịch đệm rửa giải có độ pH nằm trong khoảng từ 6,0 đến 8,0.

Các điều kiện của mỗi bước sắc ký có thể tùy ý được điều chỉnh bởi chuyên gia trung bình trong lĩnh vực này. Liên quan đến các điều kiện sắc ký, xem ví dụ 1-5 được mô tả dưới đây.

Phương pháp bào chế chế phẩm chứa iduronat-2-sulfataza theo sáng chế có thể còn bao gồm bước bất hoạt virus có thể chứa trong chế phẩm này. Bước bất hoạt virus có thể được thực hiện theo các phương pháp khác nhau, và tốt hơn nếu bước này được thực hiện bằng cách giữ dòng tế bào đã được nuôi cấy theo sáng chế ở độ pH nằm trong khoảng từ 3 đến 4 hoặc ở điều kiện pH cao trong khoảng thời gian định trước. Bước bất hoạt có thể được thực hiện trong quá trình tinh chế, tốt hơn nếu bước này được thực hiện trong giai đoạn sắc ký, và tốt hơn nữa nếu bước này được thực hiện ở giữa bước sắc ký tương tác kỵ nước và bước sắc ký trao đổi cation.

Sau khi kết thúc các bước sắc ký, phân đoạn có hoạt tính thu được có thể được cô và lọc để thu được hợp chất iduronat-2-sulfataza có thể được sử dụng làm hoạt chất thuốc theo sáng chế.

Iduronat-2-sulfataza thu được này có thể được trộn với chất mang dược dụng và bào chế thành dạng thuốc thích hợp.

Iduronat-2-sulfataza được bào chế bằng phương pháp theo sáng chế có ưu điểm vượt trội hơn so với iduronat-2-sulfataza thông thường ở chỗ, 1) có hiệu quả điều trị cao hơn do chứa hàm lượng formylglyxin cao hơn, 2) khả năng phân hủy glycosaminoglycan tích tụ trong lysosom cao hơn, 3) không chứa huyết thanh động

vật nên an toàn hơn, và 4) độ an toàn và hiệu quả điều trị cao hơn do độ tinh khiết của iduronat-2-sulfataza theo sáng chế bằng 99,99% hoặc cao hơn.

Iduronat-2-sulfataza tái tổ hợp theo sáng chế và dược phẩm chứa nó có hiệu quả điều trị vượt trội và an toàn hơn so với Elaprased, do đó được sử dụng hiệu quả để điều trị hội chứng Hunter.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế được mô tả chi tiết hơn thông qua các ví dụ sau đây với mục đích chỉ nhằm minh họa mà không giới hạn phạm vi của sáng chế.

Ví dụ 1

Quy trình bào chế iduronat-2-sulfataza theo sáng chế

1-1 Quy trình thu nhận nguồn gen

Phân lập các tế bào máu đơn nhân thuộc vùng ngoại vi từ máu người theo quy trình như được mô tả trong tài liệu: S. Beckebaum et al., *Immunology*, 2003, 109:487-495. Chiết ARN tổng số từ các tế bào máu đơn nhân này theo quy trình như được mô tả trong tài liệu: M. J. Holland et al., *Clin. Exp. Immunol.*, 1996, 105:429-435. Để thiết kế được thư viện ADN bổ sung từ ARN tổng số thu được, sợi ADN bổ sung mạch đơn được tổng hợp bằng cách sử dụng mỗi oligo-(dT) và kit tổng hợp ADN mạch đơn (Boehringer mannheim). Trước hết, bổ sung nước cất đã được xử lý bằng DEPC vào ống eppendorf chứa 1µg ARN nêu trên cho đến khi thể tích cuối cùng bằng 12,5µL. Sau đó, bổ sung 1µL chứa 20pmol mỗi oligo(dT) vào ống này, tiếp theo ủ ở nhiệt độ 70°C trong 2 phút và làm lạnh. Bổ sung 4µL dung dịch đệm phản ứng, 1µL dNTP, 1µL chất ức chế RNase, và 1µL enzym phiên mã ngược đã được gia nhiệt ở nhiệt độ 42°C trong một giờ vào hỗn hợp phản ứng thu được để tổng hợp sợi ADN bổ sung mạch đơn. Thực hiện phản ứng PCR trên khuôn ADN bổ sung mạch đơn này và các mẫu có trình tự từ SEQ ID NO.2 đến SEQ ID NO.4 để khuếch đại gen mã hóa iduronat sulfataza của người. Trong trường hợp này, mỗi mẫu được thiết kế để chứa trình tự nhận diện enzym giới hạn để sử dụng trong quá trình tách dòng gen.

1-2 Thiết kế vector biểu hiện

A. Thiết kế vector pJK-dhfr-IDS-S1

Trình tự tín hiệu chuỗi nhẹ của kháng thể thu được từ vùng chuỗi nhẹ của IgG ở người (đóng vai trò là đoạn không mang mã di truyền) được chèn vào đầu 5' của gen mã hóa iduronat sulfataza thu được theo phần Ví dụ 1-1 trước khi thực hiện phản ứng PCR. Sau đó, sản phẩm PCR được chạy điện di trên gel, gen mã hóa iduronat sulfataza của người được phân lập bằng cách sử dụng kit chiết tách gel. Phân cắt gen mã hóa iduronat sulfataza đã được phân lập và vector pJK-dhfr-Or2 (Aprogen) bằng EcoRV và ApaI và cho gắn với nhau ở nhiệt độ 16°C trong 20 giờ. Sau đó, biến nạp vector tái tổ hợp đã thiết kế được này vào *E. coli* (DH5α); cấy chuyển lên đĩa LB chứa 50μg/mL ampicilin và ủ qua đêm. Chọn các khuẩn lạc sinh trưởng trên các đĩa LB này và nuôi cấy để phân lập được vector plasmid pJK-dhfr-IDS-S1 (Fig.1).

B. Thiết kế plasmit tái tổ hợp biểu hiện gen mã hóa iduronat-2-sulfataza của người

Để thay thế đoạn không mang mã di truyền của plasmid pJK-dhfr-IDS-S1 nêu trên bằng trình tự tín hiệu, iduronat-2-sulfataza tái tổ hợp của người được tách dòng cấp hai vào vector pJK-dhfr-or2. Cuối cùng, phân cắt vector pJK-dhfr-IDS-S1 thu được bằng EcoRV và ApaI để thu được đoạn gen mã hóa iduronat sulfataza (1233 bp), sau đó chèn đoạn gen này vào vector pJK-dhfr-Or2 đã được xử lý trước bằng các enzym giới hạn tương tự để thu được vector pJK-dhfr-IDS-S2. Để chèn đoạn không mang mã di truyền và trình tự tín hiệu vào đầu 5' của vector này, mỗi xuôi IDS N1 (SEQ ID NO: 5) và mỗi ngược (SEQ ID NO: 7) được sử dụng cho phản ứng PCR với khuôn là vector pJK-dhfr-IDS-S1. Sau khi được biến tính ở nhiệt độ 94°C trong 5 phút, thực hiện phản ứng PCR theo 30 chu kỳ ở nhiệt độ 94°C trong 1 phút, ở nhiệt độ 55°C trong 30 giây và ở nhiệt độ 72°C trong 40 giây và cuối cùng khuếch đại ở nhiệt độ 72°C trong 10 phút.

Quá trình khuếch đại PCR đã thu được đoạn gen mã hóa iduronat-2-sulfataza có kích thước bằng 448 bp. Đoạn gen này được sử dụng làm khuôn để thực hiện tiếp phản ứng PCR với mỗi xuôi IDS N2 (SEQ ID NO: 6) và mỗi ngược IDS 4 (SEQ ID

NO: 7) được sử dụng theo cùng điều kiện được mô tả nêu trên. Kết quả thu được đoạn ADN có kích thước bằng 476bp.

Sau đó, phân cắt riêng vector pJK-dhfr-IDS-S2 và đoạn gen mã hóa iduronat sulfataza tái tổ hợp của người (476bp) này bằng EcoRV. Phân tách riêng các đoạn cắt bằng cách điện di trên gel để thu được vector pJK-dhfr-IDS-S2 và đoạn gen mã hóa iduronat-2-sulfataza có kích thước bằng 476bp này. Gắn vector pJK-dhfr-IDS-S2 và đoạn gen này ở nhiệt độ 16°C trong 12 giờ với sự có mặt của T4 ADN ligaza để thu được plasmid pJK-dhfr-Or2-IDS. Các quy trình này được thể hiện trên Fig.2.

Để kiểm chứng sự hình thành của plasmid biểu hiện iduronat-2-sulfataza nêu trên, biến nạp vector pJK-dhfr-Or2-IDS vào DH5 α và nuôi cấy trong 24 giờ trên đĩa LB chứa 50 μ g/mL ampicilin. Sau đó, thu lấy các khuẩn lạc hình thành, phân lập plasmid và phân cắt để xác định kích thước của đoạn gen mã hóa iduronat-2-sulfataza đã được chèn. Tiếp theo, thực hiện quá trình giải trình tự bazơ nucleotit bằng cách sử dụng môi T7 (SEQ ID NO: 8).

1-3 Phân lập dòng tế bào biểu hiện iduronat-2-sulfataza tái tổ hợp của người

A. Biến nạp vào tế bào CHO-DG44

Tế bào CHO-DG44 được sử dụng làm vật chủ để biểu hiện iduronat-2-sulfataza của sán chể. Tế bào trứng chuột đồng Trung Quốc CHO-DG44 mang đột biến loại bỏ kép để biểu hiện gen *dhfr* nội sinh mã hóa enzym dihydrofolat reductaza (DHFR- dihydrofolate reductase). Enzym DHFR tham gia vào quá trình biến đổi folat thành tetrahydrofolat (FH4) thông qua dihydrofolat (FH2), trong đó tetrahydrofolat tham gia vào quá trình tổng hợp các axit nucleic mới. Mức độ biểu hiện của gen *dhfr* trong tế bào phụ thuộc vào hàm lượng metotrexat (MTX). MTX có cấu trúc tương tự như cơ chất axit folic của DHFR, MTX cạnh tranh với axit folic để liên kết với dihydrofolat reductaza, dẫn đến làm mất hoạt tính của hầu hết dihydrofolat reductaza khi có mặt MTX. Do đó, nếu các tế bào không khuếch đại đủ lượng gen *dhfr*, chúng sẽ chết do không thể tổng hợp được các axit nucleic cần thiết cho quá trình sinh trưởng tế bào. Ngược lại, nếu tế bào khuếch đại đủ lượng gen *dhfr*, tế bào có thể sống được ở điều kiện hàm lượng MTX cao do chứa tương đối nhiều

gen *dhfr*. Phương pháp này có thể được áp dụng cho tế bào động vật để lựa chọn dòng tế bào đã được biến nạp có thể khuếch đại gen *dhfr* và tạo ra gen cấu trúc theo mong muốn.

Cuối cùng, chèn gen *dhfr* vào vector pJK-dhfr-Or2-IDS biểu hiện iduronat-2-sulfatase nêu trên làm gen chỉ thị có khả năng khuếch đại, và thực hiện quá trình khuếch đại gen bằng cách sử dụng MTX và gen *dhfr* này.

Tạo hỗn dịch dòng tế bào DG44 (do Dr. Chaisin, Columbia University phân lập) trong 10mL DMEM/F12 (đã được bổ sung các nucleotit và nucleosit, và 10% huyết thanh bào thai bò (FBS- fetal bovine serum) và ly tâm ở tốc độ 1000 vòng/phút trong 5 phút để thu lấy các tế bào. Cấy chuyển các tế bào này vào bình T-175 chứa 50 mL môi trường nuôi cấy và ủ ở nhiệt độ $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ trong tủ chứa $5\pm 1\%$ CO_2 . Một ngày trước khi biến nạp, môi trường nuôi cấy được loại bỏ và các tế bào thu được được rửa hai lần bằng PBS và tách ra bằng trypsin. Sau đó, các tế bào này được cấy ở mật độ bằng 5×10^5 tế bào trong bình T-25 và nuôi cấy ở nhiệt độ $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ trong 24 giờ trong tủ chứa $5\pm 1\%$ CO_2 . Kiểm tra sự lây nhiễm của vi khuẩn hoặc nấm bằng kính hiển vi quang học, sau đó thực hiện phản ứng PCR-ELISA để kiểm tra xem tế bào có bị lây nhiễm *mycoplasma* hay không.

Biến nạp vector pJK-dhfr-Or2-IDS biểu hiện iduronat sulfatase được thiết kế ở Ví dụ 1-2 vào tế bào DG-44 không chứa mầm bệnh nêu trên bằng cách sử dụng kit Lipofectamin. Cụ thể, pha loãng riêng 5 μg vector biểu hiện này và 50 μL Lipofectamin bằng 800 μL môi trường Opti-MEM I, và trộn từ từ để tránh tạo bọt, và để ở nhiệt độ phòng trong 15 phút. Đồng thời, rửa các tế bào DG44 nêu trên một lần bằng PBS vô trùng và ba lần bằng môi trường Opti-MEM I. Tiếp theo, bổ sung hỗn hợp AND lipofectamin nêu trên vào tế bào DG44 này và sau đó bổ sung 6,4mL môi trường Opti-MEM trước khi ủ ở nhiệt độ $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ trong 5 giờ trong tủ chứa $5\pm 1\%$ CO_2 . Hỗn hợp này được ủ thêm 48 giờ trong môi trường có bổ sung 8 mL DMEM/F12 và 1,6 mL FBS để thúc đẩy sự phục hồi của màng tế bào và sự phát triển của các tế bào.

B. Phân lập dòng tế bào kháng geneticin (G418)

Phân tách các tế bào đã được nuôi cấy nêu trên bằng trypsin 0,25%, đếm và

cấy ở mật độ bằng 5×10^3 tế bào/giếng trong đĩa 96 giếng chứa 100 μ L môi trường MEM-alpha (có bổ sung 10% FBS đã được thẩm tách và 550 μ g/mL G418) trên mỗi giếng. Ngày tiếp theo, bổ sung môi trường tương tự với lượng 100 μ L/giếng và nuôi cấy các tế bào này từ 2 đến 3 tuần để tạo thành khuẩn lạc. Khi các tế bào phát triển đạt 50% hợp dòng, sẽ thay thế môi trường nuôi cấy bằng môi trường mới. Sau khi lưu giữ trong 3 ngày, thu lấy môi trường nuôi cấy để phân tích enzym.

Thay môi trường nuôi cấy bằng 200 μ L môi trường mới liên tục trong ba ngày. Sau khi nuôi cấy từ 3 đến 4 ngày, các tế bào không được biến nạp, tức là các tế bào không có khả năng kháng geneticin, bắt đầu tách ra từ đáy đĩa 96 giếng theo quan sát bằng kính hiển vi quang học. Nuôi cấy khuẩn lạc đã được chọn đồng thời cấy chuyển liên tiếp theo thứ tự từ đĩa 96 giếng sang đĩa 24 giếng, đĩa 6 giếng và đĩa có đường kính 100mm. Khi các tế bào phát triển đạt 80~90% hợp dòng trên đĩa có đường kính 100mm này, mức độ biểu hiện được đánh giá lần nữa. Phân tách các tế bào này bằng trypsin 0,25%, đếm, cấy trải lên đĩa 6 giếng ở mật độ bằng 5×10^5 tế bào/giếng/3 mL, nuôi cấy trong 3 ngày và đếm. Mức độ biểu hiện protein được phân tích định lượng. Theo kết quả phân tích, đã phân lập được 15 khuẩn lạc.

C. Phân lập dòng tế bào có khả năng biểu hiện iduronat-2-sulfatase mạnh

Nuôi cấy 15 khuẩn lạc đã được chọn trên môi trường chứa MTX với nồng độ cao để chọn các dòng tế bào chứa iduronat-2-sulfatase đã được khuếch đại.

Cấy chuyển các tế bào khuẩn lạc này vào 10 mL môi trường chứa MTX với nồng độ tăng dần ở mật độ bằng 1×10^6 tế bào/đĩa đường kính 100mm và nuôi cấy để đạt 80~90% hợp dòng. Cấy chuyển một phần mười thể tích môi trường nuôi cấy tế bào một lần nữa lên đĩa có đường kính 10mm chứa 10mL môi trường nuôi cấy mới. Quá trình nuôi cấy cấp hai này được lặp lại hai lần. Các tế bào được trải qua ít nhất ba lần cấy chuyển để đáp ứng được với nồng độ MTX tăng dần. Nồng độ MTX đã tăng từ 5nM trong các khuẩn lạc đã được chọn đến 20nM sau khi thực hiện phân tích trong ba ngày đầu. Ở mỗi bước, nuôi cấy các khuẩn lạc đã đáp ứng với nồng độ MTX tăng trong 3 ngày để xác định tốc độ tăng trưởng của tế bào. Mức độ biểu hiện iduronat-2-sulfatase được định lượng để chọn các dòng tế bào có sự khuếch đại gen mã hóa iduronat sulfatase, tức là các dòng tế bào trong đó iduronat-2-sulfatase tái tổ

hợp được biểu hiện mạnh. Trong số các dòng tế bào đã được chọn, NI4 được sử dụng cho các thử nghiệm tiếp theo do dòng tế bào này có mức độ biểu hiện mạnh nhất.

D. Phân lập dòng tế bào đơn lẻ NI4 bằng phương pháp pha loãng tới hạn

Do dòng tế bào NI4 có thể lẫn với các dòng tế bào khác, nên dòng tế bào này đã được phân tách riêng thành dòng tế bào đơn lẻ. Các khuẩn lạc NI4 sống qua được trong môi trường chứa 20nM MTX được tách dòng cấp hai bằng phương pháp pha loãng tới hạn để chọn được dòng tế bào mong muốn.

Trước tiên, cấy chuyển các khuẩn lạc NI4 ở mật độ bằng 0,5 tế bào/giếng vào môi trường IMDM (Gibco BRL, Cat#12200) trên các đĩa 96 giếng và cứ sau ba ngày lại thay thế bằng môi trường IMDM mới. Vào ngày thứ ba, quan sát các đĩa nuôi cấy bằng kính hiển vi quang học để loại bỏ các giếng có hai hoặc nhiều khuẩn lạc hình thành. Các giếng chỉ có một khuẩn lạc hình thành được chọn riêng và tiếp tục nuôi cấy. Sau khi nuôi cấy trong 15 ngày, các tế bào được cấy chuyển cấp hai lên các đĩa 96 giếng và khi các tế bào phát triển đạt 90% hợp dòng, môi trường nuôi cấy được thay mới.

Tổng cộng có 263 dòng tế bào đơn lẻ phân lập được từ dòng tế bào NI4. Trong số các dòng tế bào, dòng S46 có hoạt tính iduronat-2-sulfatase mạnh nhất và được đặt tên là NI4-S46.

1-4 Nuôi cấy dòng tế bào NI4-S46

A. Nuôi cấy trong bình lắc

Nuôi cấy dòng tế bào NI4-S46 trên quy mô lớn để sản xuất iduronat-2-sulfatase theo sáng chế. Cấy chuyển dòng tế bào NI4-S46 lên môi trường EX-cell 302 không chứa huyết thanh (chứa glutamin, dextran sulfat, và pluronic F-68) trong các bình nuôi cấy dung tích 125 mL và nuôi cấy ở nhiệt độ $37 \pm 1^\circ\text{C}$ trong tủ chứa $5 \pm 1\% \text{CO}_2$. Tiếp theo, cấy chuyển các tế bào này ở tỷ lệ 1:5~1:8 hai đến ba ngày một lần bằng cách sử dụng các bình lắc. Khi cấy chuyển, thể tích nuôi cấy đã tăng từ từ đến xấp xỉ 2.400 mL. Trong nhiều bình lắc, nuôi cấy các tế bào đến mật độ đủ để có thể cấy chuyển sang thùng lên men.

B. Nuôi cấy trong thùng lên men dung tích 30L (thể tích làm việc bằng 20L)

Khi mật độ tế bào trong các bình lắc đạt $1,3 \times 10^6$ tế bào/mL, cấy chuyển các tế bào này vào thùng lên men dung tích 30L. Điều kiện nuôi cấy được thiết lập với hàm lượng oxy hòa tan bằng 10% hoặc cao hơn, nhiệt độ nuôi cấy bằng $37 \pm 1^\circ\text{C}$ và độ pH bằng $7,0 \pm 0,2$. Nếu cần, các mẫu tế bào được lấy ra và quan sát dưới kính hiển vi quang học. Tế bào nuôi cấy được đánh giá về các chỉ tiêu số lượng, khả năng sống sót, độ pH, nồng độ glucoza và glutamin. Trên cơ sở kết quả phân tích, khi xác định được tế bào đã phát triển đến số lượng thích hợp, cấy chuyển các tế bào này sang thùng lên men dung tích 150L.

C. Nuôi cấy trong thùng lên men dung tích 150L (thể tích làm việc bằng 100L)

Khi mật độ tế bào trong thùng lên men dung tích 30L đạt $0,9 \times 10^6$ tế bào/mL hoặc cao hơn, cấy chuyển các tế bào này vào thùng lên men dung tích 150L. Điều kiện nuôi cấy được thiết lập với hàm lượng oxy hòa tan bằng 10% hoặc cao hơn, nhiệt độ nuôi cấy bằng $37 \pm 1^\circ\text{C}$ và độ pH bằng $7,0 \pm 0,2$. Nếu cần, các mẫu tế bào được lấy ra và quan sát dưới kính hiển vi quang học. Tế bào nuôi cấy được đánh giá về các chỉ tiêu số lượng, khả năng sống sót, độ pH, nồng độ glucoza và glutamin. Trên cơ sở kết quả phân tích, khi xác định được tế bào đã phát triển đến số lượng thích hợp, cấy chuyển các tế bào này sang thùng lên men dung tích 650L.

D. Nuôi cấy trong thùng lên men dung tích 650L (thể tích làm việc bằng 500L)

Khi mật độ tế bào trong thùng lên men dung tích 150L đạt $0,9 \times 10^6$ tế bào/mL hoặc cao hơn, cấy chuyển các tế bào này vào thùng lên men dung tích 650L. Điều kiện nuôi cấy được thiết lập với hàm lượng oxy hòa tan bằng 10% hoặc cao hơn, nhiệt độ nuôi cấy bằng $37 \pm 1^\circ\text{C}$ và độ pH bằng $6,9 \pm 0,2$ trong ba ngày và sau đó thiết lập điều kiện nuôi cấy ở nhiệt độ bằng $32 \pm 1^\circ\text{C}$ và độ pH bằng $6,9 \pm 0,2$. Nếu cần, các mẫu tế bào được lấy ra và quan sát dưới kính hiển vi quang học. Tế bào nuôi cấy được đánh giá về các chỉ tiêu số lượng, khả năng sống sót, độ pH, nồng độ glucoza và glutamin. Trên cơ sở kết quả phân tích, nồng độ glucoza và glutamin được điều

chính để tế bào tiếp tục phát triển. Trong quá trình lên men, bổ sung thêm chất thủy phân để tăng cường quá trình biến đổi thành formylglyxin.

1-5 Tinh chế iduronat-2-sulfataza

Phân lập iduronat-2-sulfataza từ môi trường nuôi cấy tế bào ở bước nêu trên bằng cách sử dụng bốn bước sắc ký sau:

A. Thu và lọc môi trường nuôi cấy

Khi khả năng sống sót của tế bào sống đạt được từ 80% đến 85% trong 10 ngày sau khi cấy chuyển sang thùng lên men dung tích 650L, thì ngừng quá trình nuôi cấy. Thu lấy các tế bào từ canh trường lên men bằng cách sử dụng các hệ thống lọc Millipore POD và D0HC (Millipore) ở áp suất bằng 0,9 bar hoặc thấp hơn. Sau khi các tế bào đã được lọc ra, lọc phần dịch nổi qua thiết bị lọc thô (Millipore, 0,5 + 0,2 μ m) và màng lọc 0,45+0,2 μ m và nạp vào túi nhựa vinyl vô trùng dùng một lần. Bảo quản dịch lọc nuôi cấy thu được ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2 đến 8°C.

B. Cô và lọc có pha loãng

Cô dịch lọc thu được ở bước A đến nồng độ gấp 10 lần nồng độ ban đầu bằng cách sử dụng hệ thống siêu lọc (Tangential Flow Filtration Membrane System). Rửa màng lọc (cutoff: 30K, Pall) được đặt bên trong hệ thống siêu lọc bằng nước cất pha tiệt ở tốc độ dòng nằm trong khoảng từ 20L/phút đến 25L/phút và sau đó làm cân bằng bằng dung dịch đệm (có độ pH nằm trong khoảng từ 7 đến 8) chứa 20mM natri phosphat (natri dihydro phosphat monohydrat và natri hydro phosphat heptahydrat). Sau khi cân bằng, dịch lọc được nạp qua màng lọc đồng thời thu lấy các phân đoạn không qua được màng lọc. Khi thể tích thu hồi bằng khoảng 1/10 thể tích dịch lọc ban đầu, dừng quá trình cô. Dung dịch đệm tiếp tục được bổ sung với thể tích gấp ba đến bốn lần thể tích của dịch cô. Nếu độ dẫn điện và độ pH của dịch cô đạt tiêu chuẩn, thì dừng quá trình pha loãng (độ dẫn điện tiêu chuẩn: $\leq 5,0$ mS/cm, pH tiêu chuẩn: nằm trong khoảng từ 7,0 đến 8,0).

C. Bước sắc ký trao đổi anion

Để loại các chất màu và tạp chất ra khỏi dịch cô thu được ở bước B, thực hiện

sắc ký trao đổi anion trên cột GE Healthcare chứa nhựa Q Sepharose (GE Healthcare). Làm cân bằng cột này bằng dung dịch đệm (pH nằm trong khoảng từ 7,0 đến 8,0) chứa 20mM natri phosphat (natri dihydro phosphat monohydrat và natri hydro phosphat heptahydrat). Lọc dịch cô thu được ở bước B qua màng lọc 0,45+0,2 μ m (Sartorius) và bơm vào cột đã được làm cân bằng nêu trên ở tốc độ dòng nằm trong khoảng từ 100cm/giờ đến 120cm/giờ. Sau khi quá trình bơm mẫu kết thúc, rửa sơ bộ cột này bằng dung dịch đệm cân bằng, sau đó rửa bằng dung dịch đệm rửa (pH nằm trong khoảng từ 5,5 đến 7,5) chứa natri clorua. Sau đó, rửa giải protein mong muốn bằng dung dịch đệm rửa giải (pH nằm trong khoảng từ 5,5 đến 7,5) chứa natri clorua.

D. Bước sắc ký tương tác kỵ nước

Để loại các chất màu và tạp chất còn sót lại sau khi thực hiện bước sắc ký trao đổi anion, thực hiện sắc ký tương tác kỵ nước trên cột GE Healthcare chứa nhựa Q Sepharose (GE Healthcare). Làm cân bằng cột này bằng dung dịch đệm (pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 7,0) chứa natri clorua. Lọc dịch rửa giải thu được ở bước C qua màng lọc 0,45+0,2 μ m (Sartorius) và bơm vào cột đã được làm cân bằng nêu trên ở tốc độ dòng nằm trong khoảng từ 70cm/giờ đến 100cm/giờ. Sau khi quá trình bơm mẫu kết thúc, rửa cột này bằng dung dịch đệm cân bằng. Sau đó, rửa giải protein mong muốn bằng dung dịch đệm rửa giải (pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 7,0) chứa glyxerol.

E. Bước bất hoạt virus ở điều kiện pH thấp

Làm bất hoạt các virus có nguồn gốc từ tế bào vật chủ hoặc nguyên liệu bất kỳ được sử dụng trong các quy trình nêu trên ở điều kiện pH thấp. Cụ thể, lưu giữ dịch rửa giải thu được ở bước D trong hai giờ ở độ pH nằm trong khoảng từ 3,0 đến 4,0, trong đó độ axit đã được điều chỉnh bằng axit axetic 25%. Sau đó, điều chỉnh độ pH của dịch rửa giải đến từ 4,0 đến 5,0 bằng cách sử dụng natri hydroxit 0,5M để sử dụng cho bước tiếp theo. Quá trình bất hoạt virus ở điều kiện pH thấp được thực hiện ở nhiệt độ $12 \pm 2^\circ\text{C}$.

F. Bước sắc ký trao đổi cation

Iduronat-2-sulfataza là glycoprotein chứa các oligosacarit, và tồn tại dưới dạng chất đồng phân có điểm đẳng điện khác nhau phụ thuộc vào hàm lượng axit sialic ở đầu tận cùng của chuỗi glycan. Do các oligosacarit tích điện âm, nên axit sialic có mức độ gắn kết khác nhau với nhựa trao đổi cation phụ thuộc vào hàm lượng của axit sialic. Dựa vào sự khác biệt này, bước sắc ký trao đổi cation được thực hiện để thu được iduronat-2-sulfataza có hoạt tính mạnh (chứa hàm lượng formylglyxin cao) với hàm lượng axit sialic cao và để loại bỏ các tạp chất khác (Tạp chất của sản phẩm (iduronat-2-sulfataza kết tụ, iduronat-2-sulfataza đã xử lý), tạp chất quy trình (protein của tế bào vật chủ)). Cụ thể, làm cân bằng cột chứa nhựa trao đổi cation CaptoTM MMC (GE Healthcare) bằng dung dịch đệm có bổ sung glyxerol (pH nằm trong khoảng từ 4 đến 5). Lọc dịch rửa giải đã được bất hoạt virus thu được ở bước E qua màng lọc 0,45+0,2 μ m (Sartorius) và bơm vào cột đã được làm cân bằng nêu trên ở tốc độ dòng nằm trong khoảng từ 100cm/giờ đến 120cm/giờ. Sau đó, rửa cột này bằng dung dịch đệm cân bằng, tiếp theo rửa giải bằng dung dịch đệm có bổ sung glyxerol (pH nằm trong khoảng từ 4,0 đến 6,0) để thu được iduronat-2-sulfataza có hàm lượng axit sialic cao (điểm đẳng điện bằng 3,5 hoặc thấp hơn), hoạt tính mạnh (hàm lượng formylglyxin: 80 $\pm$ 15%) và độ tinh khiết cao (SE-HPLC, 98% hoặc cao hơn).

G. Bước sắc ký ái lực

Thực hiện bước sắc ký ái lực (Blue Sepharose, GE Healthcare) để loại bỏ glyxerol được sử dụng ở bước sắc ký trao đổi cation và giảm thể tích của dịch rửa giải. Lọc dịch rửa giải thu được ở bước F qua màng lọc 0,45+0,2 μ m (Sartorius) và bơm vào cột chứa nhựa Blue Sepharose (GE Healthcare) ở tốc độ dòng nằm trong khoảng từ 100cm/giờ đến 120cm/giờ đã được làm cân bằng trước bằng dung dịch đệm có bổ sung glyxerol (pH nằm trong khoảng từ 4,5 đến 5,5). Sau khi quá trình bơm mẫu kết thúc, rửa cột này bằng dung dịch đệm (pH nằm trong khoảng từ 4,5 đến 5,5) và rửa protein mong muốn bằng dung dịch đệm (pH nằm trong khoảng từ 6,0 đến 8,0).

H. Cô và thay dung dịch đệm

Hệ thống siêu lọc (Tangential Flow Filtration Membrane System) được sử dụng để điều chỉnh nồng độ protein của dịch rửa giải thu được ở bước G và thay dung dịch đệm của protein đã tinh chế bằng dung dịch đệm công thức. Rửa màng lọc

(cutoff: 10K, Pall) được đặt bên trong hệ thống siêu lọc bằng nước cất pha tiêm ở tốc độ dòng nằm trong khoảng từ 450mL/phút đến 650mL/phút, sau đó làm cân bằng bằng dung dịch đệm công thức (chứa 2,25g/L natri dihydro phosphat monohydrat, 0,99g/L natri hydro phosphat heptahydrat, 8g/L natri clorua, độ pH nằm trong khoảng từ 6,0 đến 7,0) mà không chứa polysorbat 20, tiếp theo cô để thu được protein mong muốn. Tiếp theo, thay dung dịch đệm công thức với thể tích gấp từ ba đến bốn lần thể tích của dịch cô thu được. Nếu độ dẫn điện và độ pH của dịch cô đạt tiêu chuẩn, thì dừng quá trình pha loãng (độ dẫn điện tiêu chuẩn: $15,0 \pm 3,0$ mS/cm, pH tiêu chuẩn nằm trong khoảng từ 6,0 đến 7,0). Điều chỉnh nồng độ của dịch cô thu được đến $4,0 \pm 0,5$ mg/mL.

I. Bước lọc nano

Thực hiện bước lọc nano để loại bỏ các virus có nguồn gốc từ tế bào vật chủ hoặc nguyên liệu bất kỳ bằng cách sử dụng hệ thống lọc nano (NFP, Millipore). Thực hiện việc kiểm tra tính nguyên vẹn của hệ thống lọc sau khi rửa hệ thống này bằng nước cất pha tiêm. Khi quá trình kiểm tra kết thúc, làm cân bằng hệ thống lọc nano bằng 1L dung dịch đệm công thức (chứa 2,25g/L natri dihydro phosphat monohydrat, 0,99g/L natri hydro phosphat, 8g/L natri clorua, độ pH 6,0~7,0) không chứa polysorbat 20. Sau khi cân bằng, nạp dịch cô thu được ở bước H vào hệ thống lọc ở áp suất khoảng 2 bar để thu được dịch lọc nano. Sau khi quá trình lọc kết thúc, rửa hệ thống lọc bằng dung dịch đệm công thức (dịch lọc sau rửa). Sau khi trộn dịch lọc nano với dịch lọc sau rửa, định lượng nồng độ protein.

J. Tinh chế hợp chất iduronat-2-sulfataza

Điều chỉnh nồng độ protein của dịch lọc thu được ở bước I bằng dung dịch đệm công thức không chứa polysorbat 20. Sau khi bổ sung polysorbat, lọc dung dịch thu được qua màng lọc $0,2\mu\text{m}$ để thu được hoạt chất iduronat-2-sulfataza mong muốn. Hoạt chất iduronat-2-sulfataza này được chia nhỏ và bảo quản ở tủ lạnh sâu ($-70 \pm 10^\circ\text{C}$) để sử dụng trong các bước tiếp theo.

K. Bào chế dược phẩm theo sáng chế (bào chế, dán nhãn, và đóng gói)

Nguyên liệu lưu trữ trong tủ lạnh sâu được rã đông trong khay nước ở nhiệt độ

28±1°C và pha loãng tới nồng độ protein bằng 2,05±0,2mg/mL bằng dung dịch đệm công thức (chứa 2,25g/L natri dihydro phosphat monohydrat, 0,99 g/L natri hydro phosphat heptahydrat, 8g/L natri clorua, 0,23g/L polysorbat 20, độ pH nằm trong khoảng từ 6,0 đến 7,0). Sau đó, lọc dịch pha loãng này qua màng lọc 0,2 µm để thu được dung dịch bán thành phẩm sau cùng. Nạp dung dịch bán thành phẩm này vào lọ dung tích 6 mL với trọng lượng xấp xỉ 3,3 g bằng cách sử dụng thiết bị nạp tự động. Khi đạt tiêu chuẩn kiểm nghiệm, các lọ này sẽ được đóng gói để sản xuất được phẩm theo sáng chế.

Quy trình từ nuôi cấy dòng tế bào đến thu được được phẩm sau cùng được thể hiện trên Fig.3.

Ví dụ so sánh 1

Chế phẩm Elaprase®

Iduronat-2-sulfataza tái tổ hợp Elaprase® có bán trên thị trường được sử dụng làm ví dụ so sánh.

Ví dụ thử nghiệm 1

Phân tích cấu trúc và đặc điểm khác biệt của iduronat-2-sulfataza theo sáng chế

1-1 Giải trình tự axit amin

Phân tách iduronat-2-sulfataza đã được khử glycosyl hóa bằng phương pháp SDS-PAGE, sau đó bằng phương pháp tách gel. Tiếp theo, phân tích các đoạn cắt thu được sau khi xử lý bằng các endoproteinaza khác nhau (trypsin, chymotrypsin, AspN, chymotrypsin/trypsin, AspN/trypsin, GluC và GluC/trypsin) bằng cách sử dụng hệ thống MALDI-MS/MS và LC-ESI-MS/MS (Fig. 5). Kết quả, tổng số 525 trình tự axit amin được xác định. Các trình tự axit amin này giống với trình tự lý thuyết của iduronat-2-sulfataza của người (Fig. 6).

1-2 Phân tích liên kết disulfua

Trong polypeptit, disulfua là liên kết đồng hóa trị thường được tạo ra bằng

cách ghép cặp hai nhóm SH của các gốc xystein, đóng vai trò quan trọng trong việc làm ổn định cấu trúc bậc cao của các protein. Về mặt lý thuyết, 525 axit amin của iduronat-2-sulfataza chứa sáu gốc xystein, bốn trong số các gốc này tạo thành liên kết disulfua. Trong ví dụ này, vị trí của các gốc xystein tham gia vào quá trình tạo liên kết disulfua của iduronat-2-sulfataza đã được xác định. Trước tiên, iduronat-2-sulfataza được khử glycosyl hóa bằng cách xử lý với PNGaza F để loại bỏ sự cản trở về mặt không gian của các gốc đường. Để ngăn các gốc xystein không tham gia vào quá trình tạo liên kết disulfua do các gốc này đóng vai trò là yếu tố gây cản trở về mặt không gian, 4-vinylpyridin được sử dụng để biến đổi iduronat-2-sulfataza thành dạng không khử để ngăn cho các nhóm SH của các gốc xystein này không tạo ra các liên kết S-S ngẫu nhiên. Trong khi đó, các liên kết disulfua được phân cắt bằng DTT, sau đó phong bế bằng 4-vinylpyridin để thu được dạng khử. Trypsin và AspN được chọn theo kết quả của ví dụ thử nghiệm 1-3, được sử dụng cho dạng iduronat-2-sulfataza khử và dạng iduronat-2-sulfataza không khử nêu. Sau đó, phân tách các đoạn peptit thu được bằng phương pháp RP-HPLC. So sánh sắc ký đồ RP-HPLC của dạng iduronat-2-sulfataza khử và dạng iduronat-2-sulfataza không khử để phân biệt các pic được tìm thấy ở dạng iduronat-2-sulfataza không khử, nhưng không tìm thấy được ở iduronat-2-sulfataza khử (Fig. 7).

Để phân tích chính xác hơn, làm giảm kích thước của các phân đoạn tại các pic phân biệt bằng cách xử lý tiếp với endoproteinaza, và các pic chứa liên kết disulfua được phân tích bằng cách sử dụng phương pháp MALDI-MS (Fig. 8).

Các pic chứa liên kết disulfua được giải trình tự một lần nữa bằng cách sử dụng phương pháp MALDI-MS/MS (Fig.9) để xác định vị trí các gốc xystein tham gia tạo liên kết disulfua trong số 525 gốc axit amin của iduronat-2-sulfataza. Như được thể hiện trên Fig.10, các liên kết disulfua được tạo ra ở giữa các gốc xystein C146-C159 và C397-C407.

1-3 Phân tích hàm lượng formylglyxin

Iduronat-2-sulfataza có khả năng phân hủy hai glycosaminoglycan - heparan sulfat và dermatan sulfat. Hoạt tính phân hủy này của iduronat-2-sulfataza không được thể hiện cho tới khi gốc xystein ở vị trí số 59 trong trung tâm hoạt động

(Cys59) chưa được biến đổi thành formylglyxin thông qua quá trình đột biến sau dịch mã. Do đó, hoạt tính này của iduronat-2-sulfataza đã được phân tích bằng cách đánh giá quá trình đột biến sau dịch mã Cys59 thành formylglyxin. Để thực hiện phân tích này, phương pháp định lượng tuyệt đối AQUA và phương pháp phân tích định lượng khối phổ MS được sử dụng, trong đó cơ chất tổng hợp đã được đánh dấu đồng vị phóng xạ (peptit AQUA) được bổ sung vào mẫu phân tích. Để phân tích định lượng formylglyxin ở vị trí Cys59, pha loãng liên tiếp peptit AQUA và bổ sung vào mẫu phân tích, sau đó dựng đường chuẩn. Tỷ lệ giữa peptit chứa formylglyxin và peptit chứa Cys59 được đo bằng phân tích LC-ESI-MS, và sử dụng đường chuẩn AQUA để tính toán hàm lượng formylglyxin.

Tỷ lệ biến đổi Cys59 thành formylglyxin xác định được theo phân tích này là bằng $80 \pm 15\%$. Do tỷ lệ biến đổi Cys50 thành formylglyxin của Elaprase (Elaprase Science Discussion, EMEA, 2007; *Genet Med* 2006;8(8):465-473) chỉ bằng khoảng 50%, nên iduronat-2-sulfataza chứa trong chế phẩm để điều trị hội chứng Hunter theo sáng chế và được phẩm chứa chế phẩm này sẽ có hoạt lực điều trị mạnh hơn rất nhiều so với Elaprase.

1-4 Xác định kiểu glycosy hóa

Thử nghiệm sau được thực hiện để kiểm chứng xem iduronat-2-sulfataza theo sáng chế có được glycosyl hóa hay không và xác định kiểu glycosyl hóa nếu có. Cụ thể, iduronat-2-sulfataza được xử lý bằng các emzym glycosit hydrolaza khác nhau, phân tách các đoạn cắt thu được bằng phương pháp SDS-PAGE và phân tích độ di động của các đoạn cắt này.

Cụ thể, phân cắt các mẫu iduronat-2-sulfataza bằng hỗn hợp của bốn glycosit hydrolaza sau và phân tách bằng phương pháp SDS-PAGE .

Bảng 1: Đặc tính của các enzym phân cắt gốc đường

	Chức năng/Đặc tính
PNGaza F	- Phân cắt gốc đường (N-glycan) khỏi protein - Asn ở vị trí phân cắt được biến đổi thành Asp
Endo H	- Phân cắt gốc đường (N-glycan) khỏi protein - Không giống như PNGaza F, Endo H phản ứng với cơ chất là các oligosacarit chứa nhiều gốc manosa và ở dạng lai hóa
O-Glycosidaza	- Phân cắt gốc đường (O-glycan) khỏi protein
Sialidaza	- Phân cắt gốc axit sialic ở đầu tận cùng của N-glycan hoặc O-glycan

Như được thể hiện trên Fig.11, khi phân cắt iduronat-2-sulfataza theo sáng chế bằng PNGaza F và Endo H, nhưng không phân cắt bằng O-Glycosidaza, đã kiểm chứng được rằng iduronat-2-sulfataza theo sáng chế là protein được N-glycosyl hóa. Ngoài ra, iduronat-2-sulfataza này được phân cắt hoàn toàn bởi PNGaza F, nhưng kích thước của nó giảm không đáng kể so với khi phân cắt bằng Endo H. PNGaza F tác động tại các vị trí glycosyl hóa của cả ba mẫu thử nghiệm, trái lại Endo H tác động tại các vị trí glycosyl hóa chứa nhiều gốc manosa và ở dạng lai hóa. Tóm lại, các kết quả thử nghiệm cho thấy rằng iduronat-2-sulfataza theo sáng chế chứa ba kiểu glycosyl hóa là cấu trúc glycosy hóa chứa nhiều gốc manosa và ở dạng lai hóa.

1-5 Phân tích hàm lượng manosa-6-phosphat

Bằng cách liên kết với thụ thể của M6P trên tế bào, manosa-6-phosphat giúp cho iduronat-2-sulfataza được hấp thu vào trong tế bào và phân hủy heparan sulfat hoặc dermatan sulfat trong lysosom. Trong ví dụ này, iduronat-2-sulfataza theo sáng chế được thủy phân bằng axit trifloaxetic và phân tích bằng phương pháp HPAEC-PAD (Bio-LC) để định lượng hàm lượng manosa-6-phosphat.

Thủy phân iduronat-2-sulfataza theo sáng chế bằng axit trifloaxetic 6,75M và phân tích sản phẩm thủy phân bằng phương pháp HPAEC-PAD (sắc ký lỏng trao đổi anion hiệu năng cao có bộ phận phát hiện dạng Pulsed Amperometric). Hàm lượng M6P đã biết được phân tích ở cùng điều kiện, và xác định được tỷ lệ mol của M6P so với glycoprotein iduronat-2-sulfataza bằng cách so sánh diện tích của các pic sắc ký. Phân tích được lặp lại ba lần. Sắc ký đồ của chất chuẩn M6P và thành phần M6P của iduronat-2-sulfataza theo sáng chế được thể hiện trên Fig.12 và tỷ lệ mol của M6P được thể hiện trong Bảng 2 dưới đây.

Bảng 2: Kết quả phân tích hàm lượng manosa-6-phosphat

Mẫu phân tích	M-6-P Thời gian lưu (phút)	Hàm lượng pmol/25µl M-6-P	Hàm lượng pmol/25µl Protein	Tỷ lệ M-6-P/Protein (mol/mol)
13	11,25	1320,59	428	3,09
14	11,23	1241,31	428	2,90
15	11,23	1245,83	428	2,91
Trung bình	11,24	1269.25	428	2,97
Sai số chuẩn	0,09%	3,51%		0,11

Như được thể hiện trên Bảng 2, tỷ lệ mol giữa manosa-6-phosphat và

iduronat-2-sulfataza theo sáng chế xấp xỉ bằng 3mol/mol. Từ kết quả này cho thấy hợp chất iduronat-2-sulfataza theo sáng chế và được phẩm chứa nó có khả năng phân hủy mạnh glycosaminoglycan tích tụ trong lysosom.

1-6 Phân tích khối lượng phân tử

Khối lượng phân tử của iduronat-2-sulfataza đã được glycosyl hóa và iduronat-2-sulfataza đã được khử glycosyl hóa được xác định bằng cách sử dụng phương pháp MALDI-TOF-MS. Xử lý iduronat-2-sulfataza đã được glycosyl hóa bằng PNGaza F để thu được iduronat-2-sulfataza đã được khử glycosyl hóa. Thực hiện phân tích MALDI-TOF-MS bằng cách sử dụng phương pháp đo phổ Voyager-DE PRO (Applied Biosystems, USA) bằng thiết bị khối phổ giải hấp thụ laze. Chuẩn hóa thiết bị này bằng albumin huyết thanh bò và IgG1. Kết quả phân tích được thể hiện trong Bảng 3.

Bảng 3: Kết quả phân tích trọng lượng phân tử của iduronat-2-sulfataza bằng phương pháp MALDI-TOF-MS

Iduronat-2-sulfataza đã được glycosyl hóa			
m/z	Điện tích (z)	Khối lượng protein (Da)	Ghi chú
25646	3	76935	
38708	2	77414	
77360	1	77359	
154533	1	77266	Đime
Trung bình		77244 ± 210	
Iduronat-2-sulfataza đã được khử glycosyl hóa			
m/z	Điện tích (z)	Khối lượng protein (Da)	Ghi chú
29767	2	59532	
34655			PNGaza F
59313	1	59312	
118706	1	59353	Đime
Trung bình		59399 ± 120	
Mẫu		Trọng lượng phân tử	
Lý thuyết		59298 Da	
Iduronat-2-sulfataza đã được glycosyl hóa		77244 ± 210 Da	
Iduronat-2-sulfataza đã được khử glycosyl hóa		59399 ± 120 Da	

Như được thể hiện trên Bảng 3, trọng lượng phân tử của iduronat-2-sulfataza

đã được glycosyl hóa bằng 77244 Da và trọng lượng phân tử của iduronat-2-sulfataza đã được khử glycosyl bằng 59399 Da gần bằng với trọng lượng phân tử tính theo lý thuyết (59298 Da).

1-7 Định lượng độ tinh khiết của iduronat-2-sulfataza của sáng chế

Định lượng độ tinh khiết của iduronat-2-sulfataza theo sáng chế bằng phương pháp sắc ký loại cỡ. Sắc ký loại cỡ là phương pháp trong đó các hợp chất trong dung dịch được phân tách theo trọng lượng phân tử tương đối và hình dạng của chúng. Trong sắc ký loại cỡ, protein có kích thước lớn hơn kích thước lỗ của cột không thể xâm nhập vào hệ thống lỗ và đi qua cột cùng một lúc. Tiếp theo, các protein có kích thước hoặc trọng lượng phân tử nhỏ hơn sẽ được rửa giải sau. Để thực hiện phương pháp sắc ký này, hệ thống HPLC Alliance 2695 Waters, WI, USA) được trang bị detector 2487 UV/VIS (Waters, WI, USA) được sử dụng. Các protein được phát hiện ở bước sóng 214nm, và phân tích bằng phần mềm Empower 2. Bơm các protein cần phân tích vào cột TSK G3000SWXL được kết nối với cột bảo vệ TSK SWXL (Tosoh, Japan). Sau khi được pha loãng tới nồng độ bằng 1,0mg/mL trong dung dịch đệm công thức, bơm iduronat-2-sulfataza vào cột này ở thể tích bằng 10 μ L. Dung dịch đệm chứa 20mM natri phosphat và 200mM NaCl, pH = 7,0 được sử dụng làm pha động và các chất phân tích được bơm vào cột ở tốc độ dòng bằng 0,5 mL/phút trong 60 phút.

Theo kết quả phân tích được thể hiện trên Fig.13, các monome iduronat-2-sulfataza có thời gian lưu xấp xỉ bằng 16,4 phút, và rửa giải với độ tinh khiết bằng 100%.

1-8 Định lượng hoạt tính của iduronat-2-sulfataza của sáng chế bằng cách sử dụng cơ chất tổng hợp

Phản ứng của iduronat-2-sulfataza theo sáng chế với cơ chất tổng hợp (4-methylumbelliferyl-L-iduronit-2-sulfat Na₂ (MU-IdoA-2S) trong 4 giờ đã giải phóng gốc sulfat (phản ứng sơ cấp). Sau phản ứng sơ cấp, bổ sung LEBT (enzym lysosom thu được từ tinh hoàn bò), enzym này sẽ phản ứng enzyme thứ cấp với cơ chất 4-methylumbelliferyl-L-iduronit (chất phản ứng còn lại sau khi giải phóng gốc sulfat

trong phản ứng sơ cấp) để phân tách gốc 4-methylumbelliferyl khỏi gốc L-iduronit. Do gốc 4-methylumbelliferyl còn lại là chất có khả năng sinh huỳnh quang, nên hoạt tính của iduronat-2-sulfataza theo sáng chế được đánh giá bằng cách đo mật độ huỳnh quang của gốc 4-methylumbelliferyl này (Ex.355nm/Em.460nm). Theo kết quả phân tích, iduronat-2-sulfataza theo sáng chế có hoạt tính riêng nằm trong khoảng từ 1955nmol/phút/ μ g đến 55nmol/phút/ μ g. Hoạt tính này chỉ ra rằng gốc formylglyxin đã có mặt ở trung tâm hoạt động của iduronat-2-sulfataza theo sáng chế do kết quả của quá trình đột biến sau dịch mã gốc xystein ở vị trí số 59 của iduronat-2-sulfataza.

1-9 Định lượng hoạt tính của iduronat-2-sulfataza của sáng chế bằng cách sử dụng cơ chất tự nhiên

Để kiểm chứng xem iduronat-2-sulfataza theo sáng chế có phản ứng với cơ chất tự nhiên hay không, thì ion sulfat được giải phóng từ phản ứng của cơ chất heparin disacarit với iduronat-2-sulfataza theo sáng chế đã được định lượng. Bơm hỗn hợp phản ứng này vào cột ion (Vydac 302IC) ở tốc độ dòng bằng 2 ml/phút với pha động là dung dịch chứa 0,49 g/L axit phtalic, trong quá trình phân tích, các ion sulfat tự do được phát hiện ở bước sóng 290 nm dưới dạng tích điện âm.

Như được thể hiện trên Fig.14, do iduronat-2-sulfataza theo sáng chế đã được kiểm chứng là có khả năng thủy phân heparin disacarit và giải phóng ion sulfat, nên iduronat-2-sulfataza theo sáng chế cũng có khả năng phân hủy gốc sulfat được liên kết ở đầu O của dermatan sulfat và heparan sulfat trong điều kiện *in vivo*.

1-10 Định lượng hoạt tính hấp thu nội bào trong điều kiện *in vivo* của iduronat-2-sulfataza theo sáng chế

Định lượng hoạt tính hấp thu nội bào của iduronat-2-sulfataza bằng cách sử dụng nguyên bào sợi bình thường và nguyên bào sợi của người bệnh mắc hội chứng Hunter. Cụ thể, nuôi cấy các nguyên bào sợi bình thường và nguyên bào sợi của người bệnh mắc hội chứng Hunter (do Samsung Medical Center, Seoul, Korea phân lập) với iduronat-2-sulfataza theo sáng chế ở nồng độ khác nhau ở nhiệt độ 37°C trong 20 giờ trong tủ CO₂ 5%, để iduronat-2-sulfataza có thể được hấp thu vào bên trong các tế bào này. Sau khi kết quá trình nuôi cấy, thu lấy các tế bào, ly giải, và

định lượng nồng độ iduronat-2-sulfataza đã được hấp thu vào bên trong tế bào bằng cách định lượng nồng độ iduronat-2-sulfataza trong dịch ly giải.

Dựa theo tỷ lệ nồng độ của iduronat-2-sulfataza đã được hấp thu vào bên trong tế bào so với nồng độ của iduronat-2-sulfataza được bổ sung vào nguyên bào sợi bình thường, thiết kế các mô hình Michaelis-Menten và Lineweaver-Burk để định lượng hệ số $K_{\text{hấp thu}}$ (tức là nồng độ iduronat-2-sulfataza mà tại đó tốc độ phản ứng bằng 50% tốc độ phản ứng tối đa đạt được ở nồng độ cơ chất bão hòa). Theo kết quả thử nghiệm này, $K_{\text{hấp thu}}$ bằng 18,0nM hoặc thấp hơn, điều này chứng tỏ rằng iduronat-2-sulfataza theo sáng chế đã được hấp thu vào bên trong tế bào bằng liên kết của thành phần manosa-6-phosphat của iduronat-2-sulfataza với thụ thể của M6P trên bề mặt tế bào (Fig.15).

Tiếp theo, mức độ hấp thu tế bào và hoạt tính của iduronat-2-sulfataza theo sáng chế đối với nguyên bào sợi của người bệnh mắc hội chứng Hunter cũng được đánh giá tương tự như đối với nguyên bào sợi bình thường. Mức độ hấp thu tế bào và hoạt tính của iduronat-2-sulfataza theo sáng chế đã gia tăng ở cả hai loại tế bào này, điều đó chứng tỏ rằng iduronat-2-sulfataza theo sáng chế được hấp thu vào bên trong tế bào rất hiệu quả (Fig.16).

Ví dụ thử nghiệm 2

Đánh giá hiệu quả lâm sàng của iduronat-2-sulfataza theo sáng chế

Ba mươi một người bệnh mắc hội chứng Hunter được chia thành ba nhóm và điều trị bằng iduronat-2-sulfataza theo sáng chế và phân tích các thông số liên quan đến hội chứng Hunter. Dược phẩm Elaprase® có bán trên thị trường được sử dụng làm mẫu đối chứng dương.

2-1 Sự thay đổi nồng độ glycosaminoglycan trong nước tiểu (thông số kiểm tra thứ nhất đối với phép thử độ hữu hiệu)

Ba nhóm người bệnh mắc hội chứng Hunter nêu trên được điều trị trong 24 tuần bằng Elaprase (0,5mg/kg) và iduronat-2-sulfataza theo sáng chế (0,5mg/kg và 1,0mg/kg), và định lượng nồng độ glycosaminoglycan trong nước tiểu theo phương

pháp được mô tả trong tài liệu: Conn. Tissue Res. Vol.28, pp317-324, 1990.; Ann. Clin. Biochem. Vol.31, pp147-152, 1994. Kết quả định lượng được thể hiện trong Bảng 4.

Bảng 4: Sự thay đổi nồng độ glycosaminoglycan trong nước tiểu khi sử dụng iduronat-2-sulfataza

Nhóm	Elapraxe (0,5 mg/kg)	Iduronat-2-sulfataza theo sáng chế (0,5 mg/kg)	Iduronat-2-sulfataza theo sáng chế (1,0 mg/kg)
Thay đổi nồng độ glycosaminoglycan trong nước tiểu (%)	- 18,7	- 29,5	- 41,1

Theo kết quả thử nghiệm được thể hiện trên Bảng 4, ở những người bệnh mắc hội chứng Hunter, nồng độ glycosaminoglycan trong nước tiểu chỉ giảm 18,7% khi được tiêm Elapraxe với liều 0,5mg/kg, nhưng ngược lại giảm tới 29,5% khi được tiêm iduronat-2-sulfataza theo sáng chế cũng với liều 0,5mg/kg. Ngoài ra, khi được tiêm iduronat-2-sulfataza theo sáng chế với liều 1,0mg/kg, nồng độ glycosaminoglycan trong nước tiểu đã giảm 41,1%. Kết quả này chứng tỏ rằng iduronat-2-sulfataza theo sáng chế rất có hiệu quả trong việc điều trị hiệu quả hội chứng Hunter do sự tích tụ glycosaminoglycan.

2-2 Đo khoảng cách có thể đi được trong thời gian 6 phút của người bệnh (thông số kiểm tra thứ hai đối với phép thử độ hữu hiệu)

Sau khi những người bệnh mắc hội chứng Hunter được điều trị bằng Elapraxe và iduronat-2-sulfataza theo sáng chế trong 24 tuần, khoảng cách mà người bệnh có thể đi được trong 6 phút đã được đo theo phương pháp được mô tả trong tài liệu: AM. J. Respir. Crit. Care. Med., Vol 166, pp 111-117, 2002. Kết quả định lượng được thể hiện trong Bảng 5.

Bảng 5: Kết quả thử nghiệm đo khoảng cách có thể đi được trong thời gian 6 phút của người bệnh

Nhóm	Elapraxe (0,5mg/kg)	Iduronat-2-sulfataza theo sáng chế (0,5mg/kg)	Iduronat-2-sulfataza theo sáng chế (1,0mg/kg)
Khoảng cách đi được trong thời gian 6 phút (m)	5,9	67,6	52,8

Tỷ lệ thay đổi khoảng cách đi được trong thời gian 6 phút (%)	1,3	18,2	13,4
---	-----	------	------

Theo kết quả thử nghiệm được thể hiện trên Bảng 5, tỷ lệ thay đổi khoảng cách đi được trong thời gian 6 phút chỉ bằng 1,3% đối với người bệnh được điều trị bằng Elaprase, nhưng tỷ lệ này đã tăng lên tới 18,2% đối với người bệnh được điều trị bằng iduronat-2-sulfataza theo sáng chế ở cùng liều lượng. Người bệnh mắc hội chứng Hunter thường gặp khó khăn khi di chuyển do sự co cứng cơ. Tuy nhiên, iduronat-2-sulfataza theo sáng chế đã khắc phục được các triệu chứng này, do đó có thể điều trị hiệu quả hội chứng Hunter.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chế phẩm iduronat-2-sulfataza có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1, trong đó gốc xystein ở vị trí số 59 trong trình tự axit amin của iduronat-2-sulfataza này được biến đổi thành formylglyxin ở tỷ lệ mol bằng 65% hoặc cao hơn, tốt hơn nếu ở tỷ lệ mol bằng 75% hoặc cao hơn.
2. Chế phẩm iduronat-2-sulfataza theo điểm 1, trong đó iduronat-2-sulfataza có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1 chứa manosa-6-phosphat với hàm lượng nằm trong khoảng từ 2,0 đến 4,0mol/mol iduronat-2-sulfataza, tốt hơn nếu với hàm lượng nằm trong khoảng từ 2,5 đến 3,0mol/mol iduronat-2-sulfataza.
3. Dược phẩm chứa chế phẩm iduronat-2-sulfataza theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 2.
4. Dược phẩm theo điểm 3, trong đó dược phẩm này còn chứa chất mang dược dụng; và tùy ý một hoặc nhiều chất bổ trợ được chọn từ nhóm bao gồm dung dịch đệm, cacbohydrat, chất ổn định, chất chống oxy hóa, chất diệt khuẩn, chất tạo phức chelat, tá dược, chất gây thấm ổn định, chất làm dày, và chất bảo quản.
5. Phương pháp bào chế chế phẩm iduronat-2-sulfataza theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 2, phương pháp này bao gồm các bước:
 - (1) nuôi cấy dòng tế bào tái tổ hợp đã được biến nạp gen mã hóa iduronat-2-sulfataza có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1 và thu nhận dòng tế bào đã được nuôi cấy này; và
 - (2) tinh chế dòng tế bào đã được nuôi cấy ở bước (1) bằng các bước sắc ký trao đổi anion, sắc ký tương tác kỵ nước, sắc ký trao đổi cation, và sắc ký ái lực, trong đó bước sắc ký trao đổi cation được thực hiện bằng cách sử dụng dung dịch đệm rửa giải có độ pH nằm trong khoảng từ 4,0 đến 6,0.
6. Phương pháp theo điểm 5, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:
 - (1) biến nạp vector biểu hiện chứa gen mã hóa iduronat-2-sulfataza vào tế bào vật chủ để thu được dòng tế bào tái tổ hợp;

(2) nuôi cấy dòng tế bào tái tổ hợp thu được ở bước (1) với sự có mặt của chất thủy phân trong môi trường không chứa huyết thanh và thu nhận dòng tế bào đã được nuôi cấy này;

(3) tinh chế iduronat-2-sulfataza từ dòng tế bào đã được nuôi cấy ở bước (2) bằng các bước sắc ký trao đổi anion, sắc ký tương tác kỵ nước, sắc ký trao đổi cation, và sắc ký ái lực; và

(4) trộn iduronat-2-sulfataza đã được tinh chế với chất mang được dụng.

7. Phương pháp theo điểm 5 và 6, trong đó tế bào vật chủ là tế bào trứng chuột đồng Trung Quốc.

8. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 5 đến 7, trong đó bước sắc ký tương tác kỵ nước được thực hiện bằng cách sử dụng dung dịch đệm rửa giải có độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 7,0.

9. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 5 đến 7, trong đó bước sắc ký ái lực được thực hiện bằng cách sử dụng dung dịch đệm rửa giải có độ pH nằm trong khoảng từ 6,0 đến 8,0.

10. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 5 đến 7, trong đó bước sắc ký trao đổi anion được thực hiện bằng cách sử dụng dung dịch đệm rửa giải có độ pH nằm trong khoảng từ 5,5 đến 7,5.

11. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 5 đến 10, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước bất hoạt virus ở độ pH nằm trong khoảng từ 3,0 đến 4,0.

12. Chế phẩm iduronat-2-sulfataza được bào chế bằng phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 5 đến 11.

13. Phương pháp bào chế được phẩm bao gồm bước phối chế chế phẩm iduronat-2-sulfataza theo điểm 1 hoặc 2 với chất mang được dụng; và tùy ý với một hoặc nhiều chất bổ trợ được chọn từ nhóm bao gồm dung dịch đệm, cacbohydrat, chất ổn định, chất chống oxy hóa, chất diệt khuẩn, chất tạo phức chelat, tá dược, chất gây thẩm ổn định, chất làm dày, và chất bảo quản.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> GREEN CROSS CORPORATION
 MEDIGENEBIO CORPORATION
 <120> CHẾ PHẨM CHỨA IDURONAT-2-SULFATAZA TÁI TỔ HỢP CỦA NGƯỜI, DƯỢC
 PHẨM CHỨA CHẾ PHẨM NÀY VÀ PHƯƠNG PHÁP BẢO CHẾ CHÚNG
 <130> PCB311060GCC
 <150> 61/500,994
 <151> 2011-06-24
 <150> 10-2012-0012718
 <151> 2012-02-08
 <160> 8
 <170> KopatentIn 2.0
 <210> 1
 <211> 525
 <212> PRT
 <213> Trình tự chưa biết
 <220>
 <223> Protein iduronat-2-sulfataza
 <400> 1
 Ser Glu Thr Gln Ala Asn Ser Thr Thr Asp Ala Leu Asn Val Leu Leu
 1 5 10 15
 Ile Ile Val Asp Asp Leu Arg Pro Ser Leu Gly Cys Tyr Gly Asp Lys
 20 25 30
 Leu Val Arg Ser Pro Asn Ile Asp Gln Leu Ala Ser His Ser Leu Leu
 35 40 45
 Phe Gln Asn Ala Phe Ala Gln Gln Ala Val Cys Ala Pro Ser Arg Val
 50 55 60
 Ser Phe Leu Thr Gly Arg Arg Pro Asp Thr Thr Arg Leu Tyr Asp Phe
 65 70 75 80
 Asn Ser Tyr Trp Arg Val His Ala Gly Asn Phe Ser Thr Ile Pro Gln
 85 90 95
 Tyr Phe Lys Glu Asn Gly Tyr Val Thr Met Ser Val Gly Lys Val Phe
 100 105 110
 His Pro Gly Ile Ser Ser Asn His Thr Asp Asp Ser Pro Tyr Ser Trp
 115 120 125
 Ser Phe Pro Pro Tyr His Pro Ser Ser Glu Lys Tyr Glu Asn Thr Lys
 130 135 140
 Thr Cys Arg Gly Pro Asp Gly Glu Leu His Ala Asn Leu Leu Cys Pro
 145 150 155 160
 Val Asp Val Leu Asp Val Pro Glu Gly Thr Leu Pro Asp Lys Gln Ser
 165 170 175
 Thr Glu Gln Ala Ile Gln Leu Leu Glu Lys Met Lys Thr Ser Ala Ser
 180 185 190
 Pro Phe Phe Leu Ala Val Gly Tyr His Lys Pro His Ile Pro Phe Arg
 195 200 205
 Tyr Pro Lys Glu Phe Gln Lys Leu Tyr Pro Leu Glu Asn Ile Thr Leu
 210 215 220
 Ala Pro Asp Pro Glu Val Pro Asp Gly Leu Pro Pro Val Ala Tyr Asn
 225 230 235 240
 Pro Trp Met Asp Ile Arg Gln Arg Glu Asp Val Gln Ala Leu Asn Ile
 245 250 255
 Ser Val Pro Tyr Gly Pro Ile Pro Val Asp Phe Gln Arg Lys Ile Arg
 260 265 270
 Gln Ser Tyr Phe Ala Ser Val Ser Tyr Leu Asp Thr Gln Val Gly Arg
 275 280 285
 Leu Leu Ser Ala Leu Asp Asp Leu Gln Leu Ala Asn Ser Thr Ile Ile
 290 295 300
 Ala Phe Thr Ser Asp His Gly Trp Ala Leu Gly Glu His Gly Glu Trp
 305 310 315 320
 Ala Lys Tyr Ser Asn Phe Asp Val Ala Thr His Val Pro Leu Ile Phe
 325 330 335
 Tyr Val Pro Gly Arg Thr Ala Ser Leu Pro Glu Ala Gly Glu Lys Leu

340 345 350
 Phe Pro Tyr Leu Asp Pro Phe Asp Ser Ala Ser Gln Leu Met Glu Pro
 355 360 365
 Gly Arg Gln Ser Met Asp Leu Val Glu Leu Val Ser Leu Phe Pro Thr
 370 375 380
 Leu Ala Gly Leu Ala Gly Leu Gln Val Pro Pro Arg Cys Pro Val Pro
 385 390 395 400
 Ser Phe His Val Glu Leu Cys Arg Glu Gly Lys Asn Leu Leu Lys His
 405 410 415
 Phe Arg Phe Arg Asp Leu Glu Glu Asp Pro Tyr Leu Pro Gly Asn Pro
 420 425 430
 Arg Glu Leu Ile Ala Tyr Ser Gln Tyr Pro Arg Pro Ser Asp Ile Pro
 435 440 445
 Gln Trp Asn Ser Asp Lys Pro Ser Leu Lys Asp Ile Lys Ile Met Gly
 450 455 460
 Tyr Ser Ile Arg Thr Ile Asp Tyr Arg Tyr Thr Val Trp Val Gly Phe
 465 470 475 480
 Asn Pro Asp Glu Phe Leu Ala Asn Phe Ser Asp Ile His Ala Gly Glu
 485 490 495
 Leu Tyr Phe Val Asp Ser Asp Pro Leu Gln Asp His Asn Met Tyr Asn
 500 505 510
 Asp Ser Gln Gly Gly Asp Leu Phe Gln Leu Leu Met Pro
 515 520 525

<210> 2

<211> 48

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mỗi xuôi IDS 1

<400> 2

ctatgggtat ctggtacctg tgggatgccg ccaccccgga ccggccga

48

<210> 3

<211> 73

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mỗi xuôi IDS 2

<400> 3

tgcagatatc cggagcaaga tggattcaca ggcccaggtt cttatgttac tgctgctatg

60

ggtatctggt acc

73

<210> 4

<211> 28

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mỗi ngược IDS 3

<400> 4

gggccctcaa ggcataca actggaaa

28

<210> 5

<211> 48

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mỗi xuôi IDS N1

<400> 5

cagcaagcag gtcattgttc caacatgccg ccaaccccgga ccggccga

48

<210> 6

<211> 49

<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Mỗi xuôi IDS N2
<400> 6
tgcagatatc ccagctacag tcggaaacca tcagcaagca ggtcattgt
49
<210> 7
<211> 24
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Mỗi ngược IDS 4
<400> 7
gaagatatcc caggggtgaaa gact
24
<210> 8
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Mỗi xuôi T7
<400> 8
aatacgactc actatagggga
20

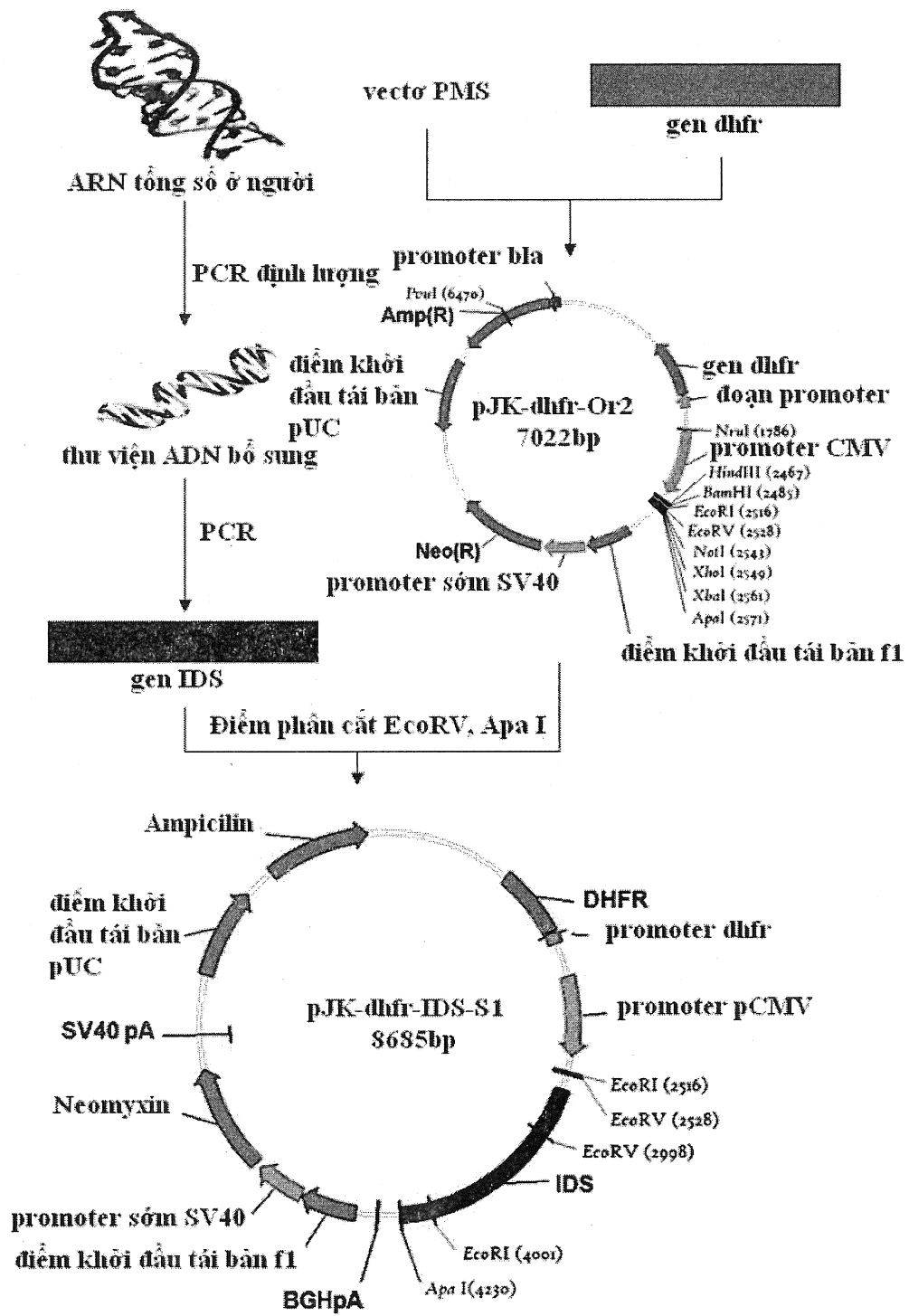


Fig.1

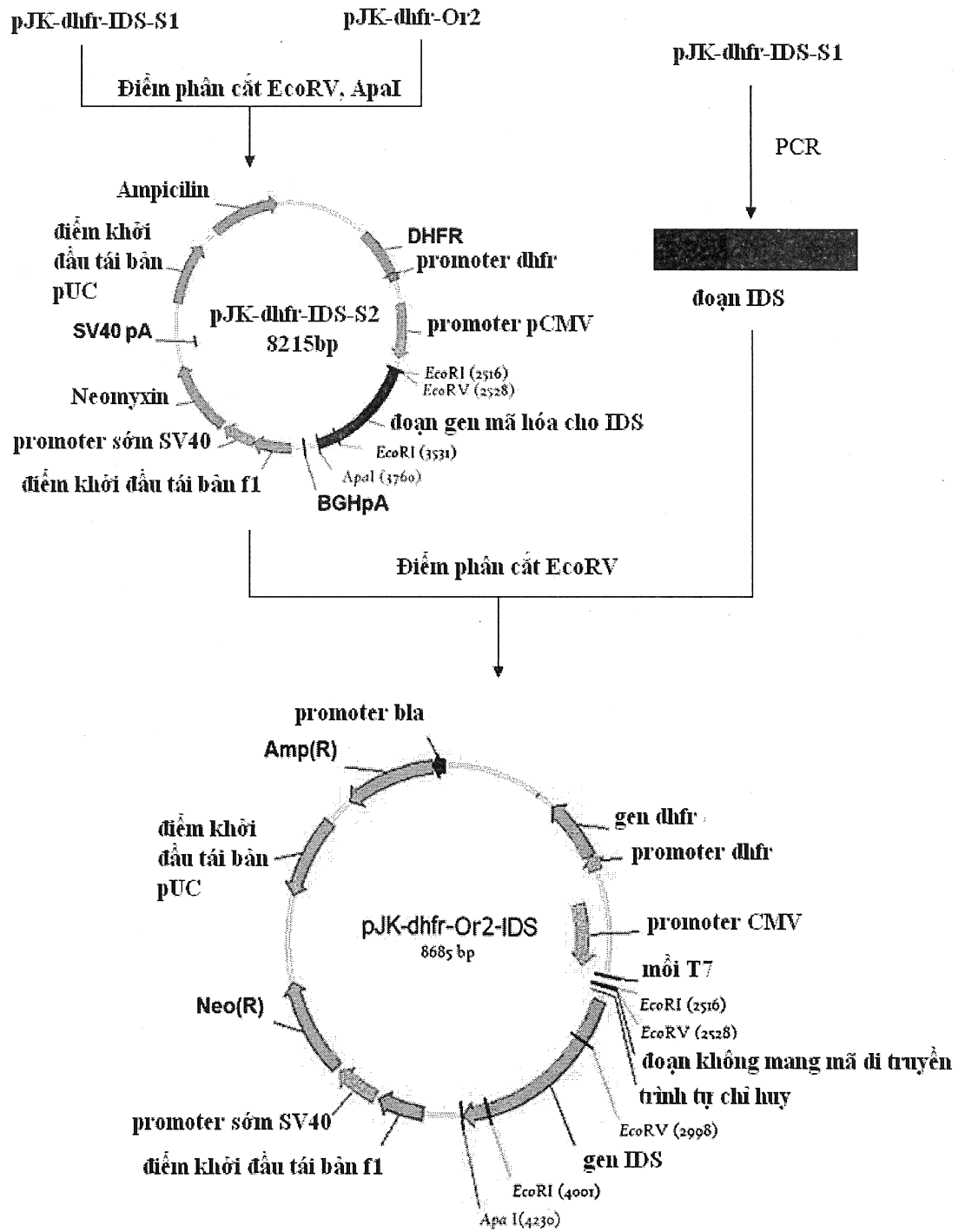


Fig.2

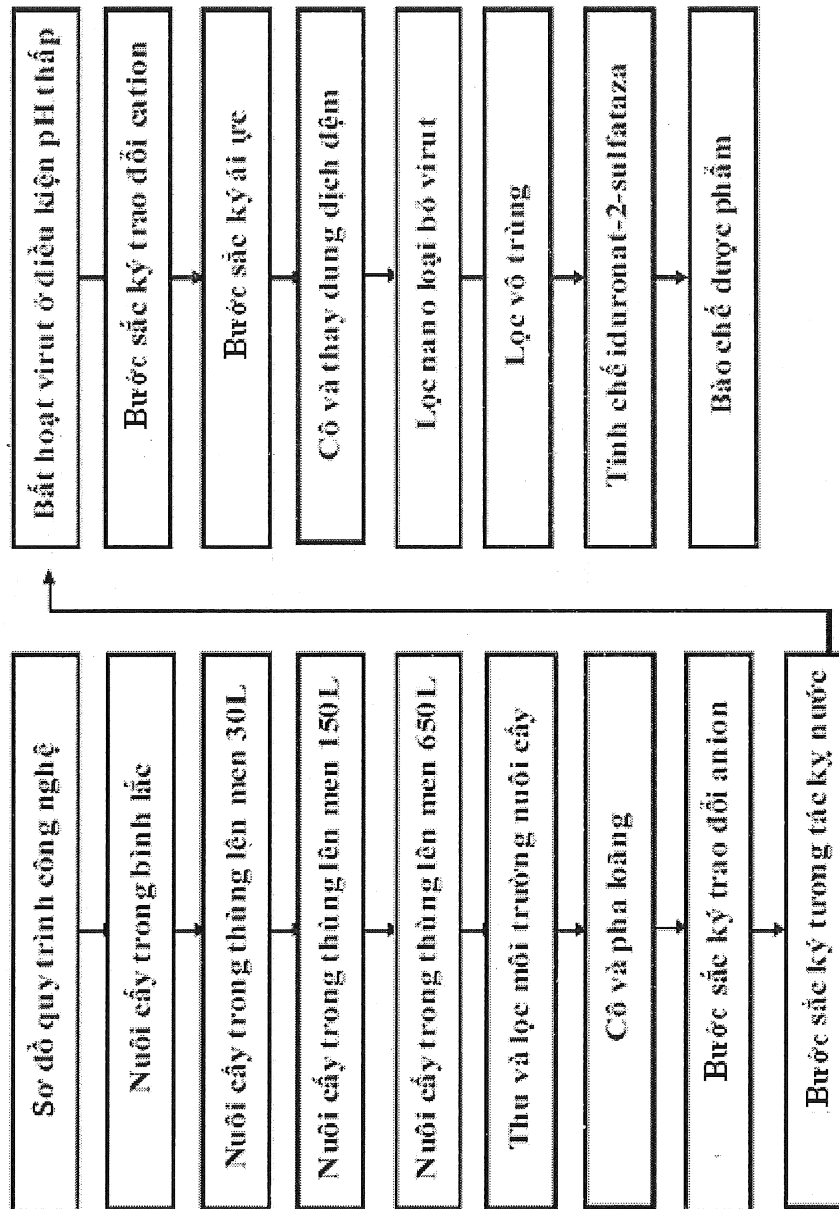
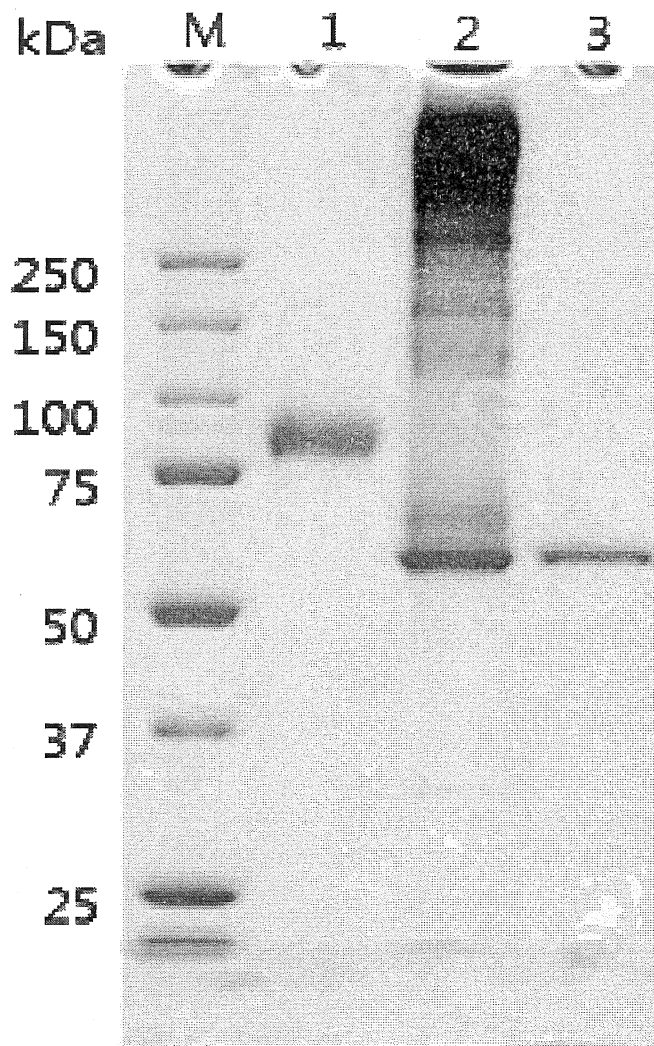


Fig.3



Băng M: Gen chỉ thị kích thước protein

Băng 1: Iduronat-2-sulfataza đã được glycosyl hóa

Băng 2: Iduronat-2-sulfataza được xử lý bằng PNGaza F

Băng 3: Iduronat-2-sulfataza đã được khử glycosyl hóa

Fig.4

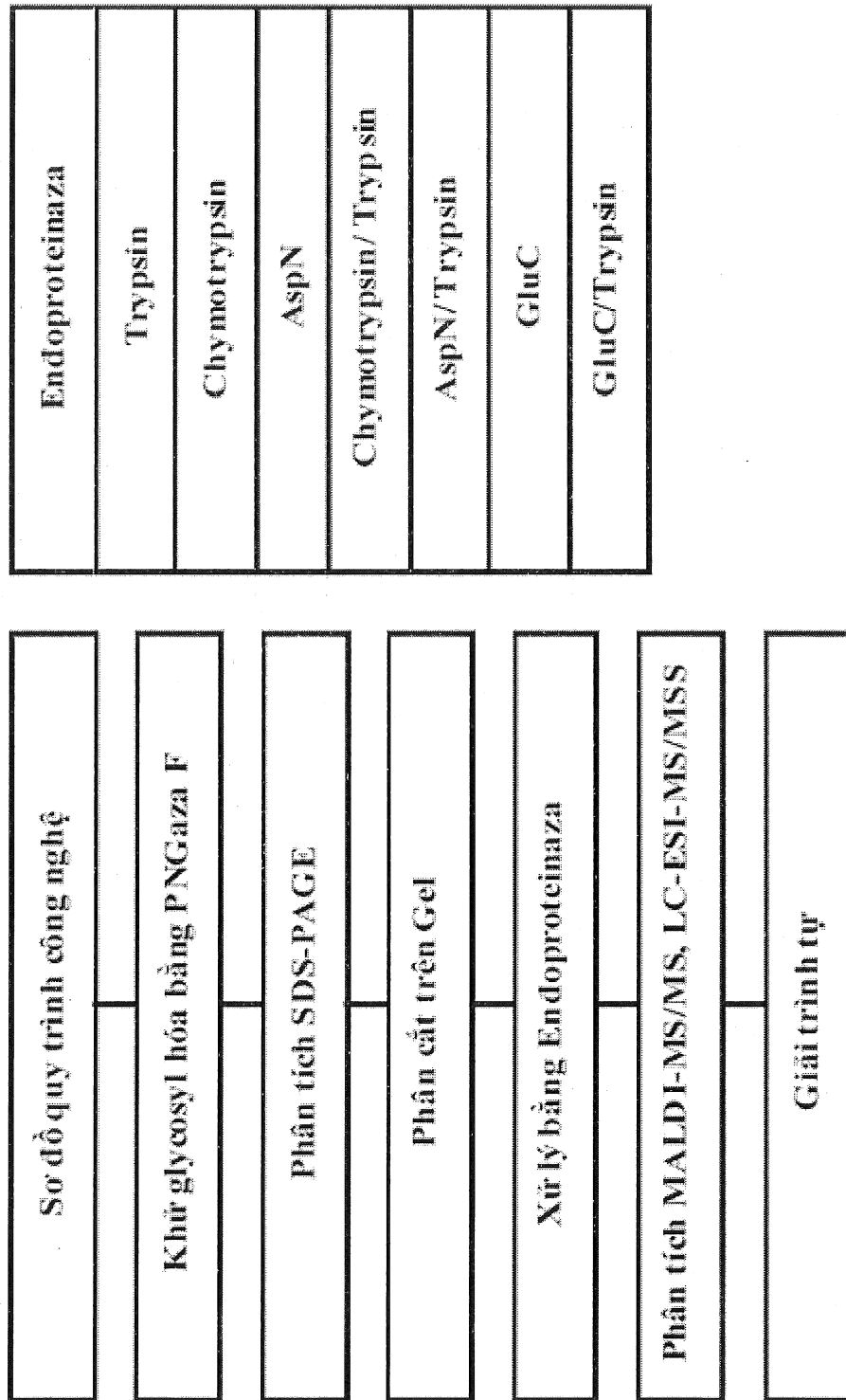


Fig.5

10	20	30	40	50
SETQANSTTD	ALNVLLIIVD	DLRPSLGCYG	DKLVRSPNID	QLASHSLILFQ
60	70	80	90	100
NAFAQQAVCA	PSRVSFLTGR	RPDTTRLYDF	NSYWRVHAGN	FSTIPQYFKE
110	120	130	140	150
NGYVTMSVGK	VFHPGISSNH	TDDSPYSWSF	PPYHPSSEKY	ENTKTCRGPD
160	170	180	190	200
GELHANLLCP	VDVLDVPEGT	LPDRQSTEQA	IQLLEKMKTS	ASPFFLAVGY
210	220	230	240	250
HKPHIPFRYP	KEFQKLYPLE	NITLAPDPEV	PDGLPPVAYN	PWMDIRQRED
260	270	280	290	300
VQALNISVPY	GPIPVDFQRK	IRQSYFASVS	YLDTQVGRLL	SALDDLQLAN
310	320	330	340	350
STIIAFTSDH	GWALGEHGEW	AKYSNFDVAT	HVPLIFYVPG	RTASLPEAGE
360	370	380	390	400
KLFPYLDPFQ	SASQIMEPGR	QSMDLVELVS	LEPTLAGLAG	LQVPPRCVPV
410	420	430	440	450
SFHVELCREG	KNLLKHFRFR	DLEEDPYLPG	NPRELIAYSQ	YPRPSDIPQW
460	470	480	490	500
NSDKPSLKDI	KIMGYSIRTI	DYRYTVWVGF	NPDEFLANFS	DIHAGELYFV
510	520	530		
DSDPLQDHNH	YNDSQGGDLF	QLIMP		

Fig.6

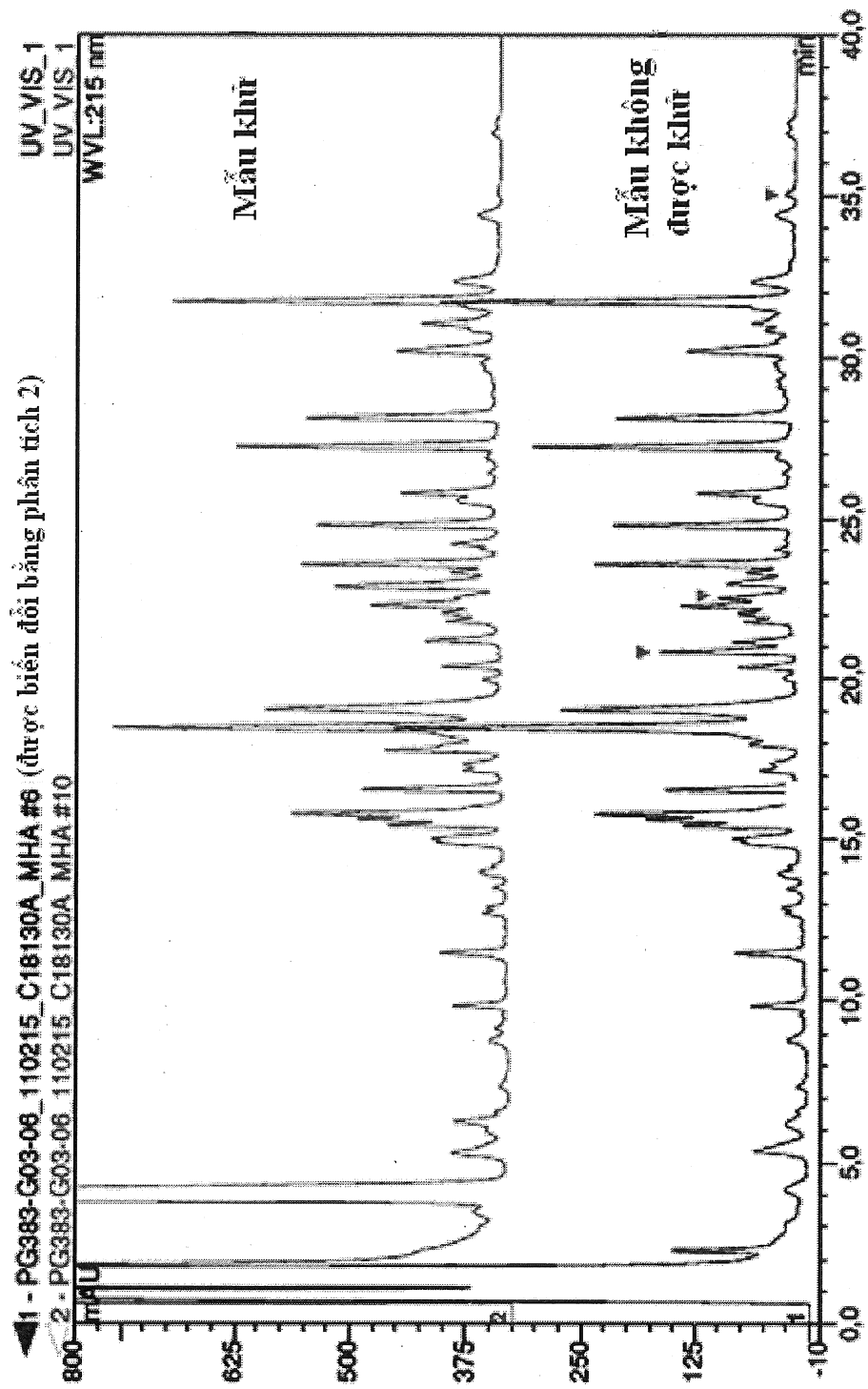


Fig. 7

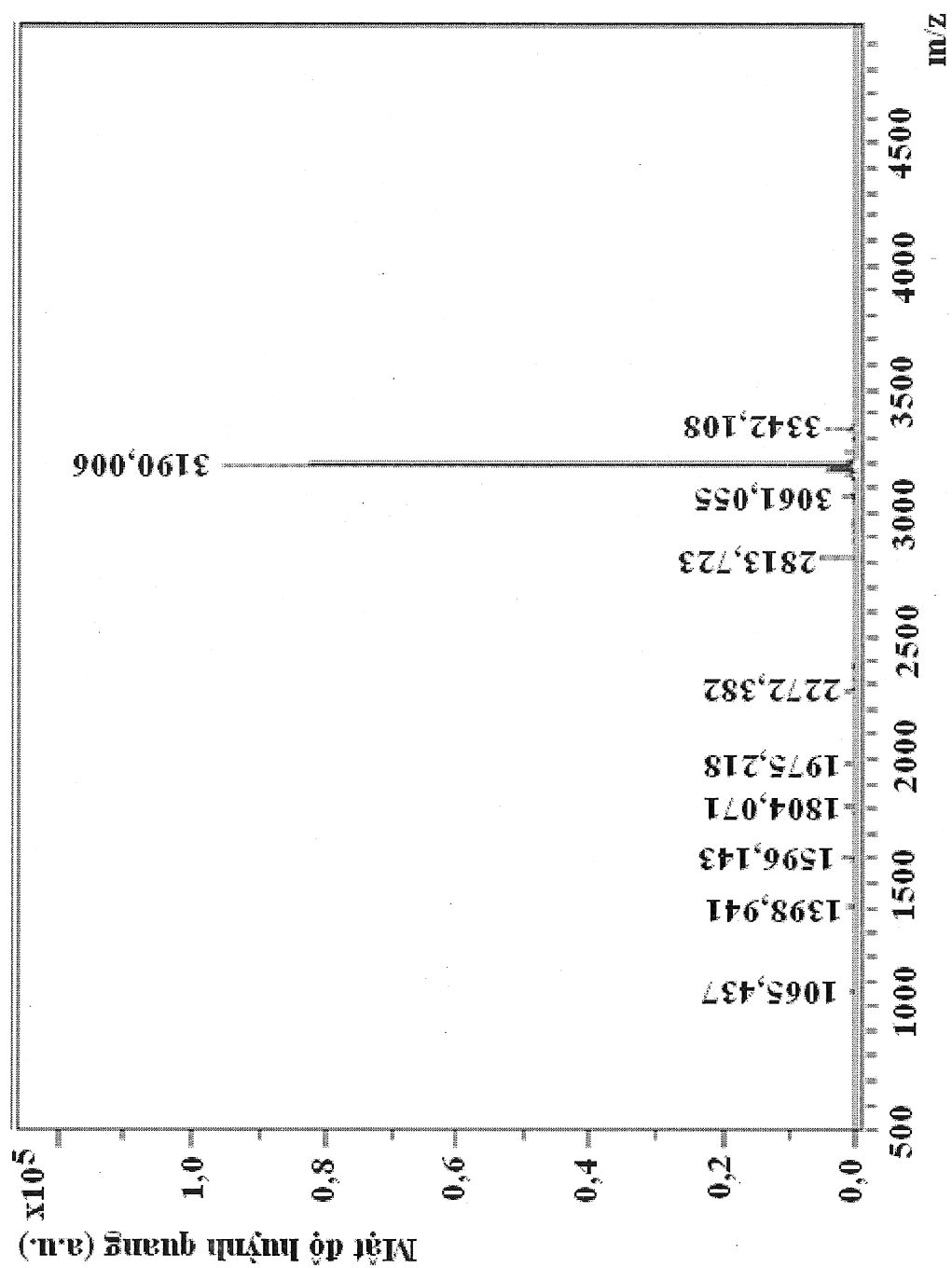


Fig.8

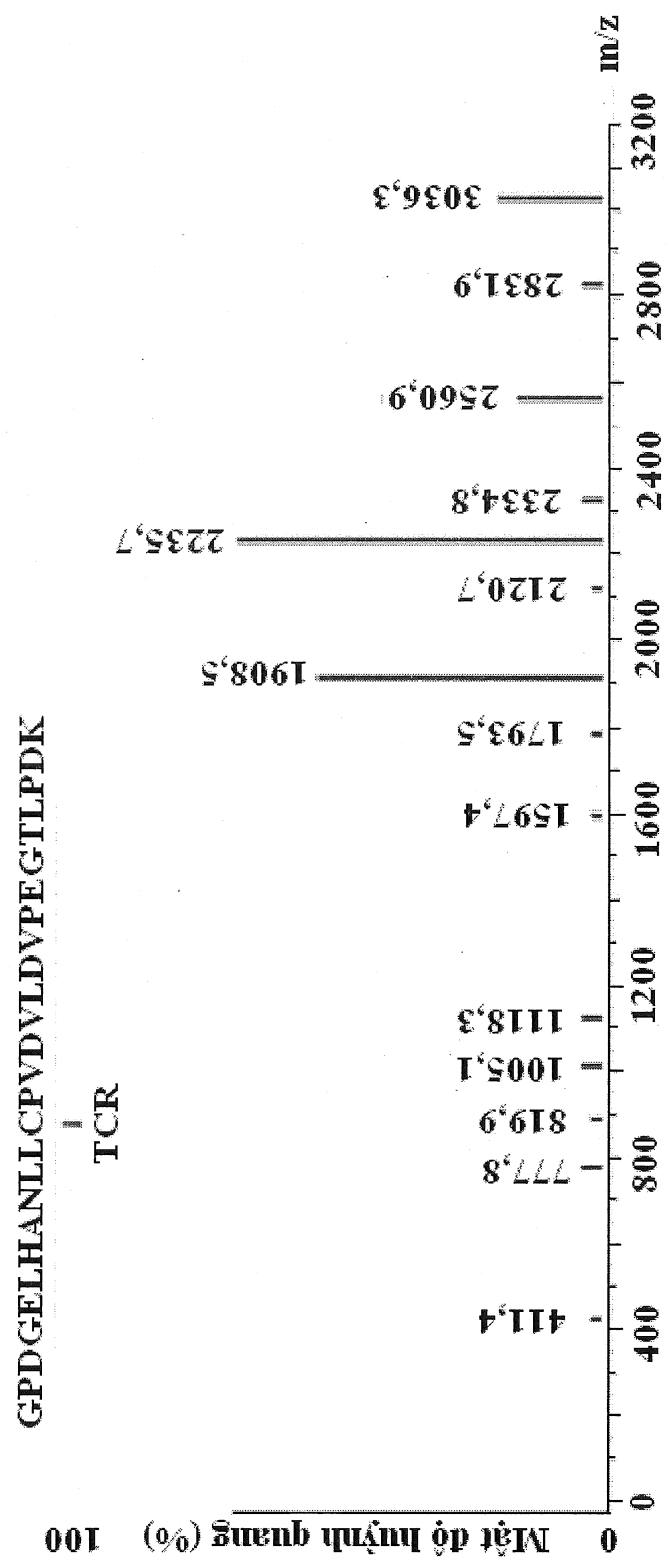
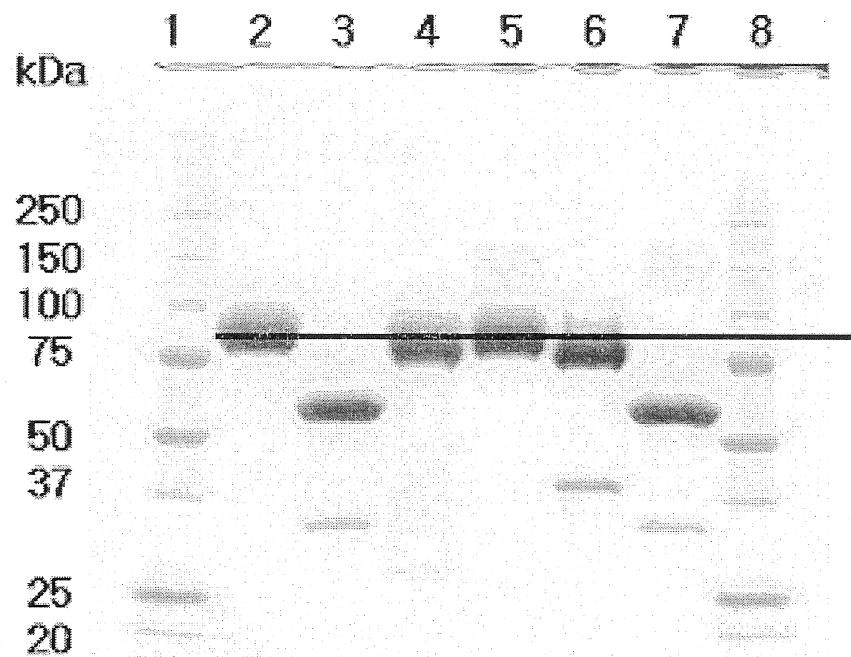


Fig.9

Fig. 10



Băng 1, 8: Gen chỉ thị kích thước phân tử

Băng 2: Iduronat-2-sulfataza

Băng 3: Iduronat-2-sulfataza được xử lý bằng PNGaza F

Băng 4: Iduronat-2-sulfataza được xử lý bằng Endo H

Băng 5: Iduronat-2-sulfataza được xử lý bằng O-glycosidaza

Băng 6: Iduronat-2-sulfataza được xử lý bằng Sialidaza

Băng 7: Iduronat-2-sulfataza được xử lý bằng PNGaza F và O-glycosidaza

Fig.11

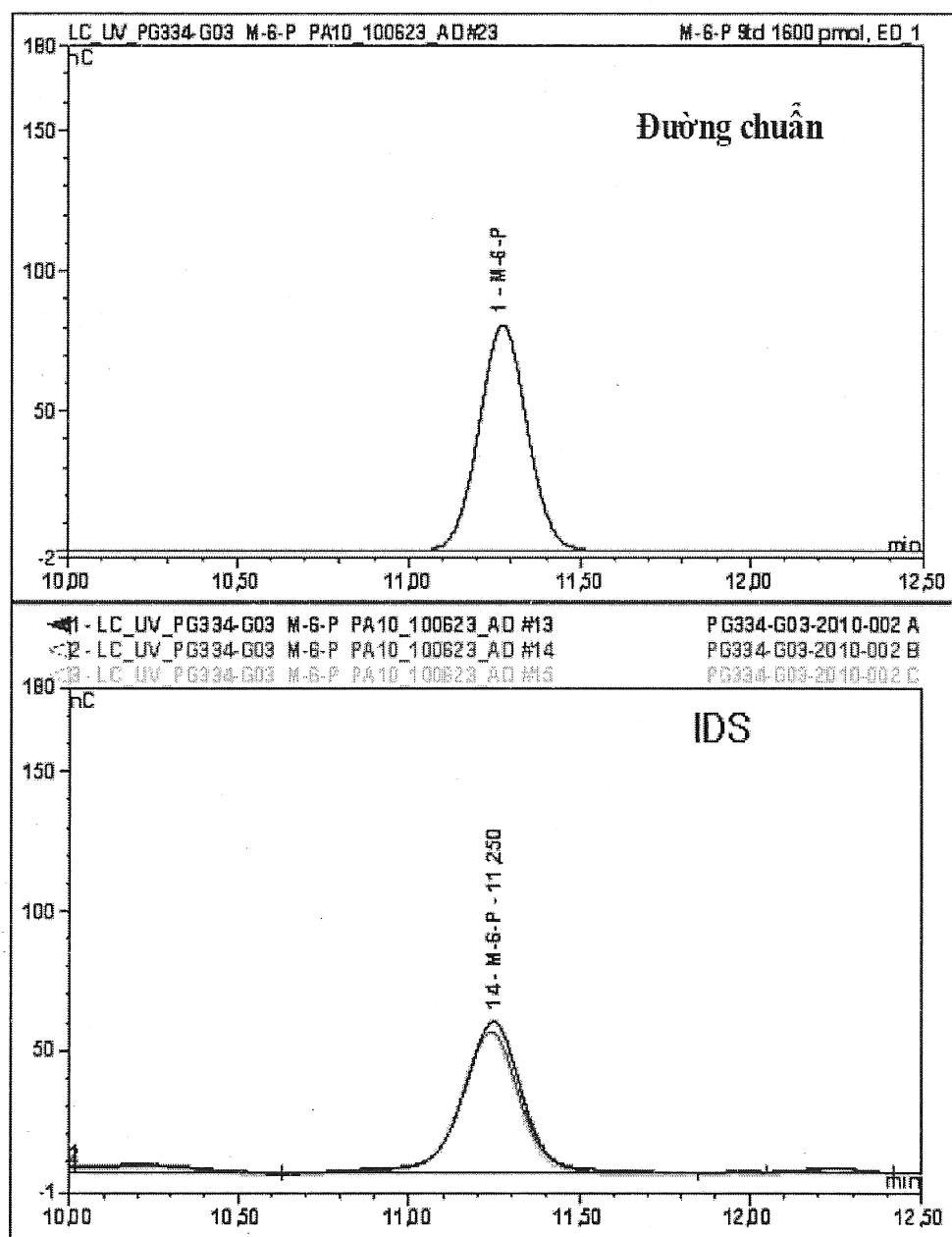
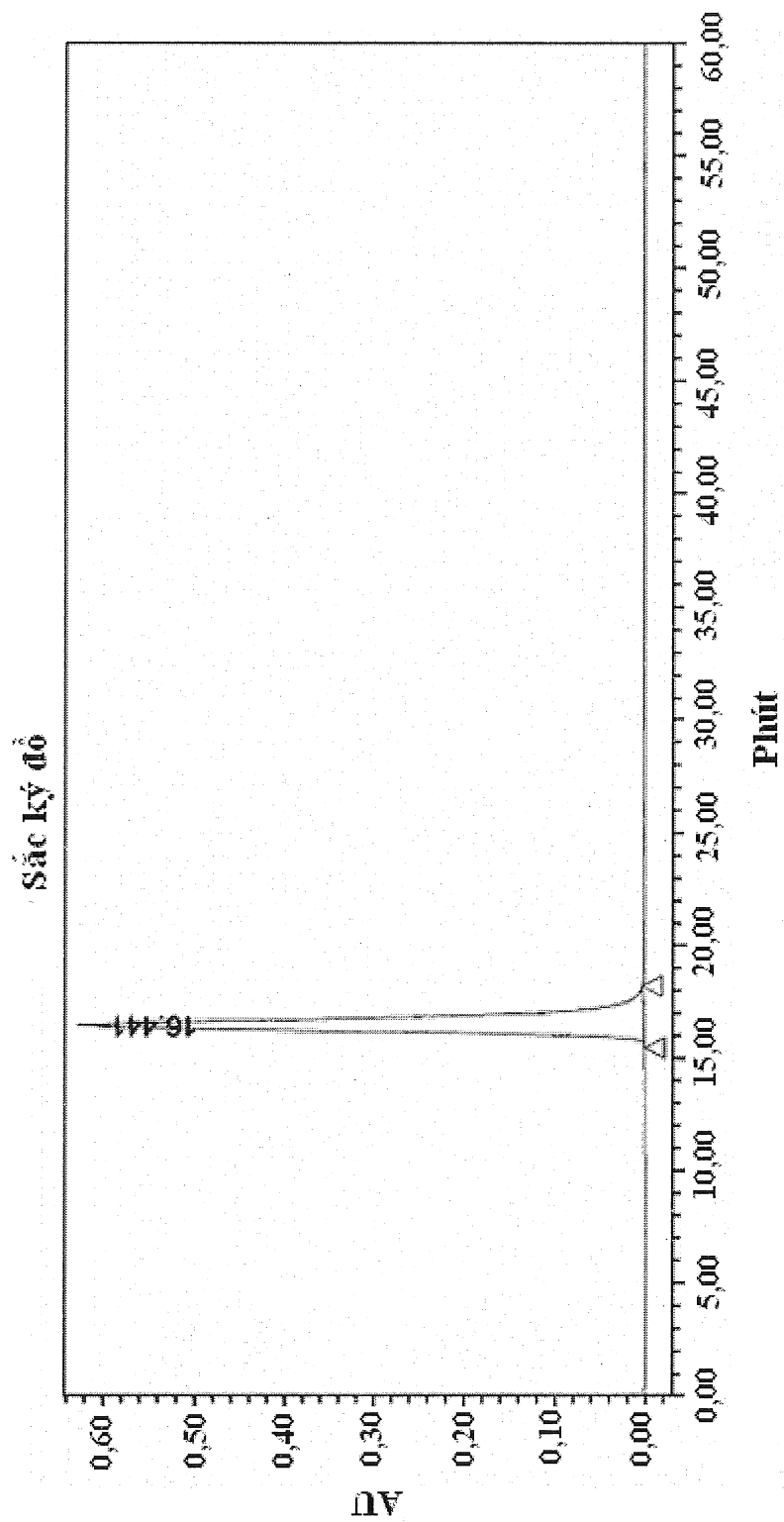


Fig.12



Kết quả phân tích pic sắc ký

Tên	Thời gian lưu	Diện tích	Chiều cao	Số lượng	Đơn vị	% Diện tích
1	16,441	24773954	609564			100%

Fig.13

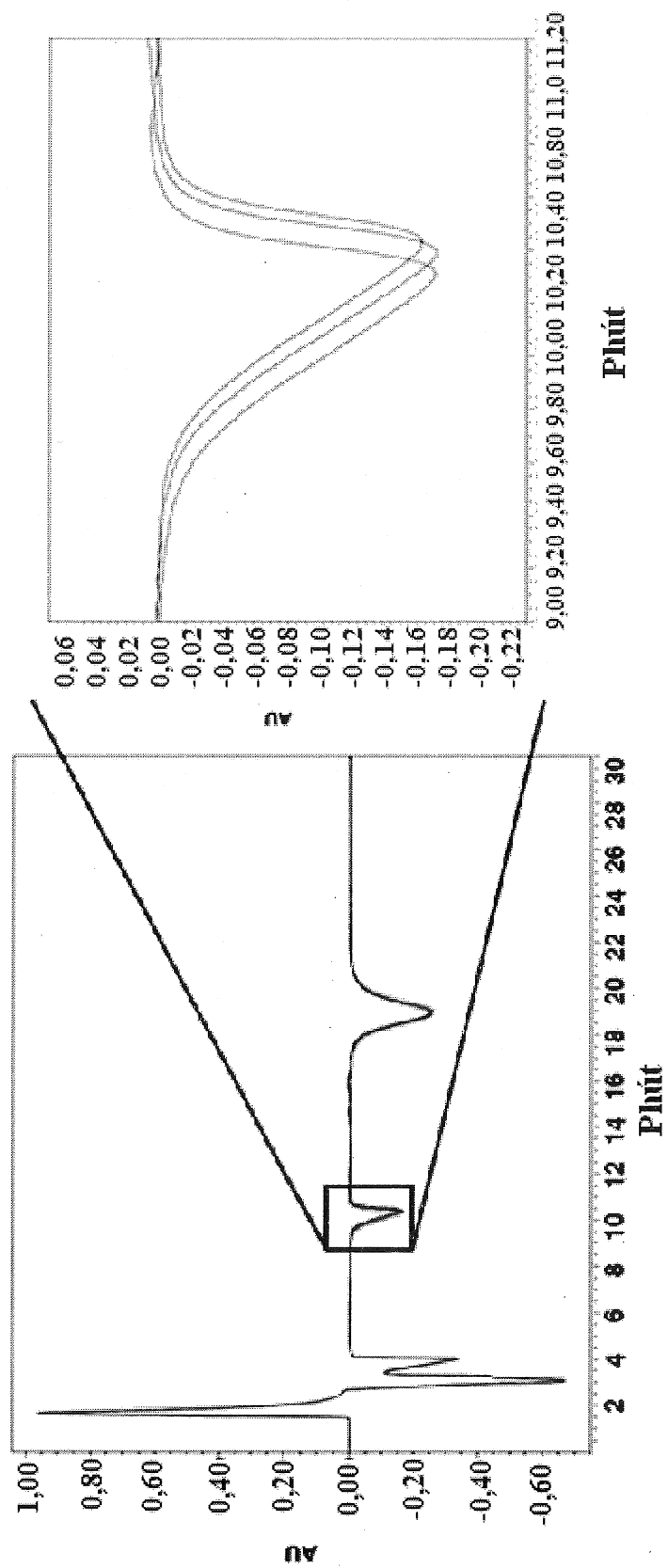


Fig.14

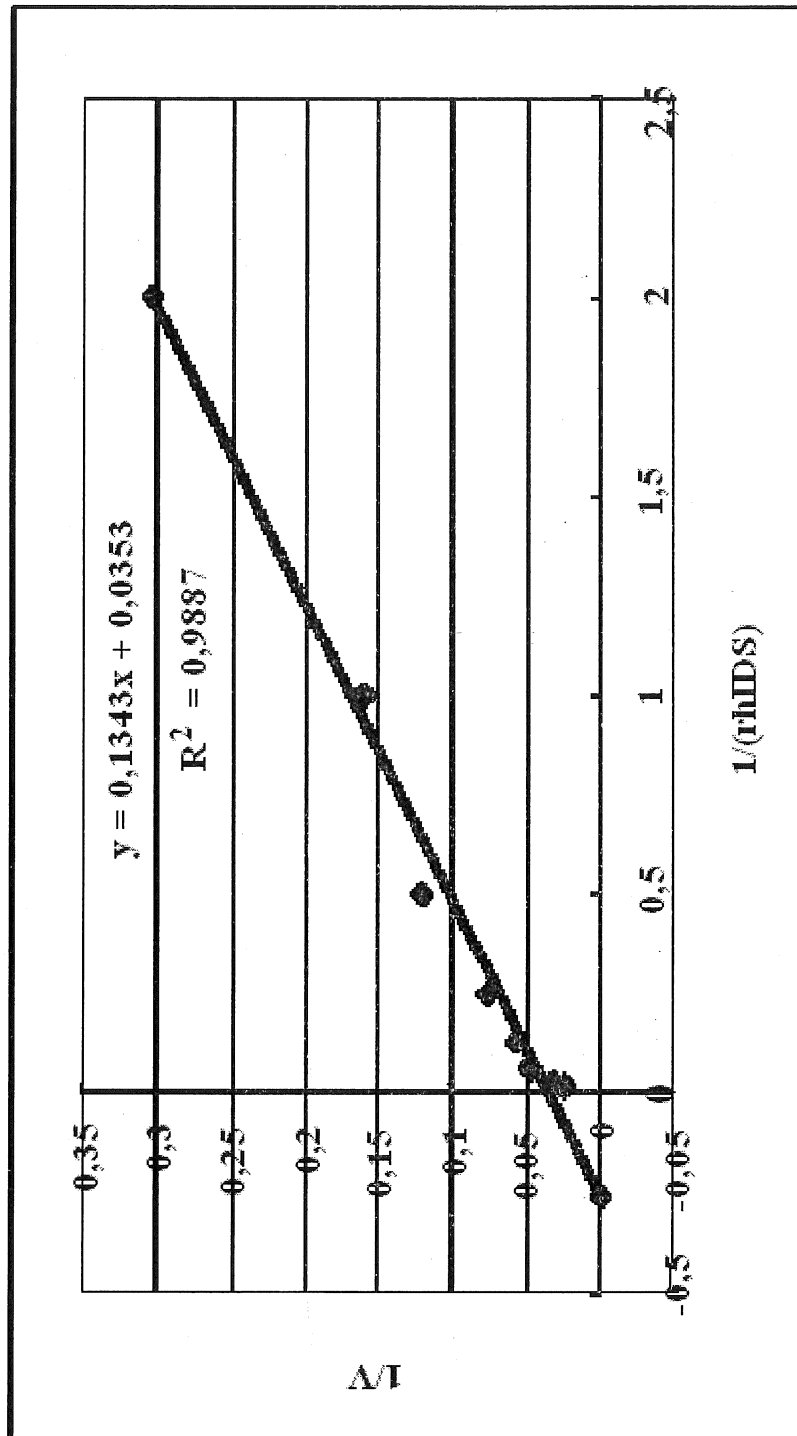


Fig.15

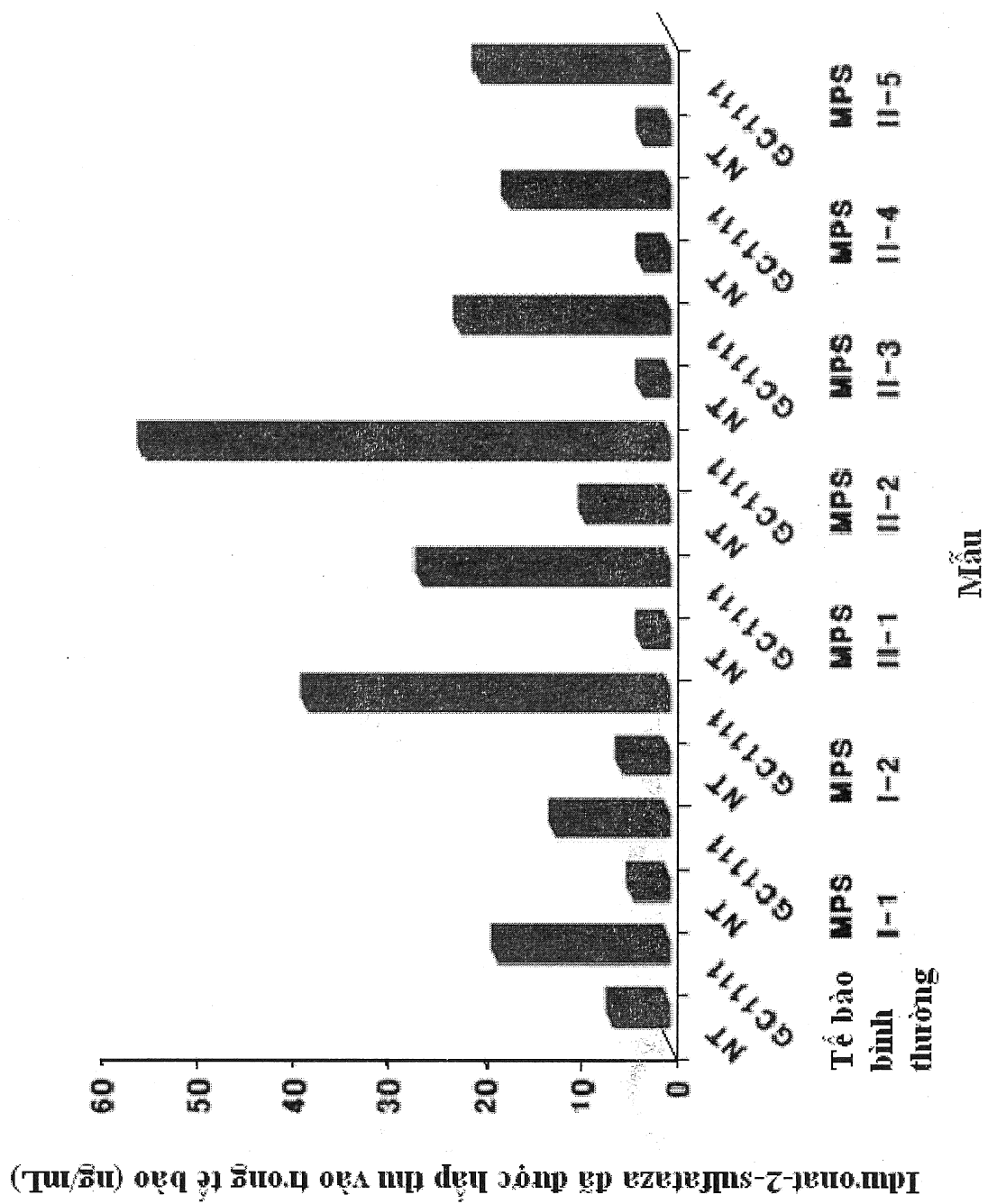


Fig.16

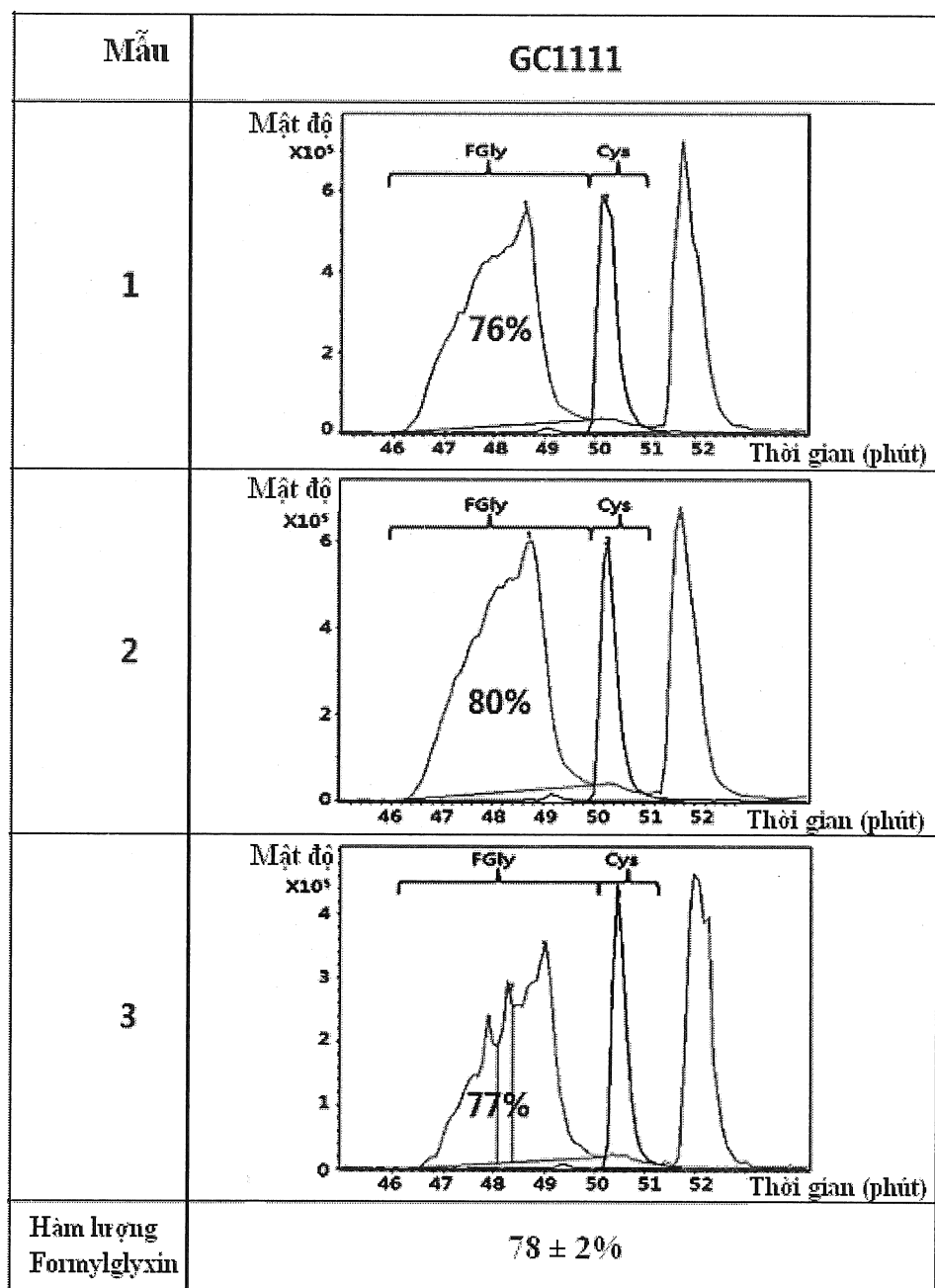
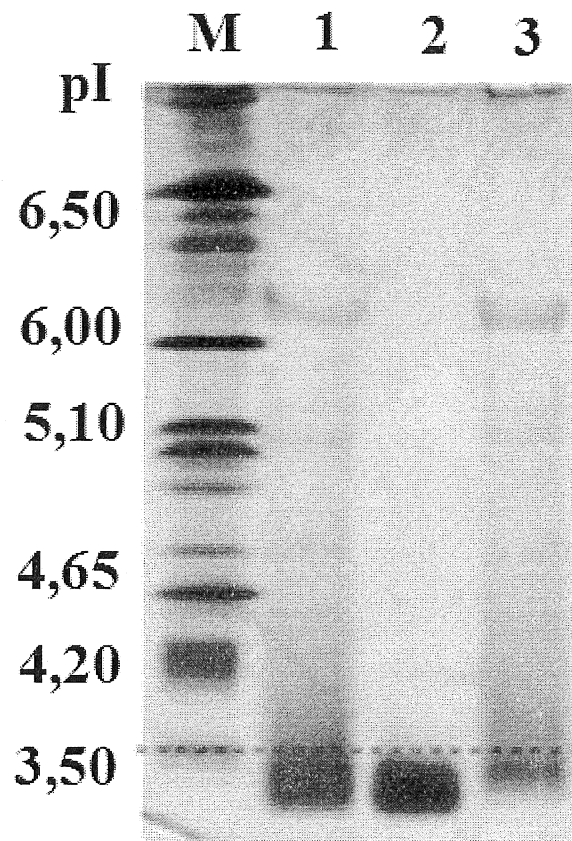


Fig17



Băng M: Gen chỉ thị kích thước

Băng 1: Mẫu được tiêm vào hệ thống sắc ký trao đổi cation

Băng 2: Dịch rửa giải của công đoạn sắc ký trao đổi cation

Băng 3: Dịch tái thu hồi sau công đoạn sắc ký trao đổi cation

Fig.18