(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) **1-0032908**

(51)[7] **C07K 14/64**; A61K 38/22

(13) **B**

(21) 1-2013-00828
(22) 17/08/2011
(86) PCT/US2011/048157 17/08/2011
(87) WO2012/024452 23/02/2012
(30) 61/374,582 17/08/2010 US
(45) 25/08/2022 413
(43) 25/09/2013 306A
(73) AMBRX, INC. (US)
10975 North Torrey Pines Road, Suite 100, La Jolla, CA 92037, United States of America
(72) KRAYNOV, Vadim (US); KNUDSEN, Nick (US); HEWET, Amha (US); DE DIOS, Kristine (US); PINKSTAFF, Jason (US); SULLIVAN, Lorraine (US).
(74) Công ty Luật TNHH Phạm và Liên danh (PHAM & ASSOCIATES)

(54) POLYPEPTIT RELAXIN ĐƯỢC CẢI BIẾN VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT POLYPEPTIT RELAXIN ĐƯỢC CẢI BIẾN NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến polypeptit relaxin được cải biến; tế bào vật chủ; phương pháp sản xuất polypeptit relaxin được cải biến; axit nucleic phân lập được mã hóa chuỗi polypeptit relaxin được cải biến; tế bào vật chủ chứa axit nucleic phân lập được; và hệ dịch mã *in vitro*.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến polypeptit relaxin được cải biến bằng ít nhất một axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên, phương pháp sản xuất polypeptit này và chế phẩm chứa chúng.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Relaxin ở người trưởng thành là peptit hormon có khối lượng khoảng 6000 đalton đã biết là chịu trách nhiệm về việc tổ chức lại đường sinh dục trước khi đẻ, do đó tạo điều kiện thuận lợi cho quá trình sinh nở. Protein này xuất hiện để điều chỉnh sự sắp xếp lại các mô liên kết trong cơ quan đích nhằm có được những thay đổi cần thiết trong cấu trúc cơ quan trong quá trình mang thai và sinh đẻ. Xem tài liệu: Hisaw, F. L., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 23: 661-663 (1926); Schwabe, C, et al., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 75: 503-570 (1977); James, R. et al., *Nature*, 267: 544-546 (1977). Đánh giá ngắn gọn về relaxin đã được Sherwood, D. trong tài liệu: The Physiology of Reproduction, Chapter 16, "Relaxin", Knobil, E. and Neill, J., et al. (eds.), (Raven Press Ltd., New York), pp. 585-673 (1988). Lượng relaxin tuần hoàn tăng trong suốt chín tháng của thai kỳ và giảm nhanh chóng sau khi sinh.

Mặc dù chủ yếu là hormon của thai kỳ, relaxin cũng đã được phát hiện ở phụ nữ không mang thai cũng như ở nam giới. Bryant-Greenwood, G. D., *Endocrine Reviews*, 3: 62-90 (1982) và Weiss, G, *Ann. Rev. Physiol.*, 46:43-52 (1984) và gần đây nhất đã được phát hiện ra là hữu ích để điều trị suy tim.

Bệnh suy tim được định nghĩa là bơm tim không có khả năng vận chuyển máu khi cần thiết để cung cấp cho các nhu cầu trao đổi chất của mô cơ thể. Việc giảm khả năng bơm thường hay xảy ra nhất do sự mất mát hoặc sự tổn hại mô cơ tim. Kết quả là, nó ức chế sự làm rỗng tâm thất, dẫn đến hiện tượng tăng áp lực làm đầy tâm thất và sức căng thành tâm thất, và làm giảm lưu lượng máu qua tim. Để làm một đáp ứng sinh lý đối với việc giảm lưu lượng máu qua tim, nhiều phản xạ thần kinh nội tiết được hoạt hóa dẫn đến

sự co mạch toàn thân, kích thích dây thần kinh giao cảm của tim và gây ứ dịch. Mặc dù có xu hướng tăng cường lưu lượng máu qua tim ban đầu, những đáp ứng phản xạ này lại không có lợi trong thời gian dài. Mức tăng tính kháng ngoại biên tạo ra làm tăng hậu tải (lượng máu tâm thất trái bơm ra) đối với tim và thể tích máu gia tăng này lại tiếp tục làm tăng áp lực làm đầy tâm thất. Những thay đổi này, cùng với sự kích thích dây thần kinh giao cảm của tim gia tăng, dẫn đến cơ tim chức năng còn lại cần phải mất bù tiếp theo và liên tục.

Bệnh suy tim ứ huyết, là biến chứng phổ biến đối với nhiều rối loạn tim mạch, xảy ra khi tim không thể truyền máu một cách thích đáng đến các mô ngoại biên. Theo ước tính gần đây, có khoảng 4 triệu người ở Mỹ được chẩn đoán là mắc bệnh này, và nhiều hơn 50% trường hợp như vậy là tử vong trong vòng 5 năm sau khi chẩn đoán [Taylor, M. D. et al., *Annual Reports in Med. Chem.* 22, 85-94 (1987)].

Phương pháp điều trị hiện thời đối với bệnh suy tim, bao gồm bệnh suy tim ứ huyết, tập trung vào việc làm giảm lưu lượng máu qua tim mà không gây ra yêu cầu quá mức đối với cơ tim. Để đạt được các kết quả như vậy, cần sử dụng kết hợp các thuốc lợi tiểu, các chất gây giãn mạch và các tác nhân co cơ khác nhau để làm giảm thể tích máu, làm giảm tính kháng ngoại biên, và để tăng lực co bóp tim. Do đó, phương pháp điều trị hiện thời phụ thuộc vào việc cân bằng các tác động của nhiều thuốc để đạt được yêu cầu về mặt lâm sàng đối với mỗi bệnh nhân, và bị cản trở bởi các phản ứng có hại đối với các thuốc được sử dụng.

Ví dụ, các thuốc lợi tiểu làm giảm nồng độ kali và magie trong huyết tương và làm tăng tỷ lệ mắc phải chứng loạn nhịp tim ở bệnh nhân sử dụng cây địa hoàng. Thuốc lợi tiểu có thể làm tăng hiệu lực tuần hoàn của nitrat thông qua sự suy giảm thể tích và dẫn đến làm giảm áp lực làm đầy tim, lưu lượng máu qua tim và áp lực động mạch toàn thân.

Các chất đối kháng alpha tiết ađrenalin có thể dẫn đến sự giảm đáng kể áp lực động mạch toàn thân mà làm giảm sự tưới máu mạch vành.

Các chất ức chế enzym chuyển hóa angiotensin có thể có các tác động tương tự đến áp lực động mạch và ngoài ra còn làm cho nồng độ kali trong huyết tương tăng quá mức.

Các dược chất mà tạo ra lực co cơ dương tính, như dược chất từ cây địa hoàng và các chất đối kháng tiết beta adrenalin, có khả năng gây ra chứng loạn nhịp tim. Ngoài ra, dược chất từ cây địa hoàng có chỉ số điều trị hẹp và các chất tương tự catecholamin đều có xu hướng mất hiệu lực một cách nhanh chóng, do sự điều hòa giảm của thụ thể.

Do vậy, cần đến các dược phẩm điều trị bệnh mà tạo ra đáp ứng kết hợp về mặt sinh lý của sự giãn mạch động mạch và tĩnh mạch và lực co cơ tim, và không có các nhược điểm của các dược phẩm điều trị bệnh hiện đang được sử dụng,

Relaxin đã được tinh chế từ nhiều loài bao gồm lợn, chuột, ngựa, cá mập, hổ, chuột cống, cá nhám góc và người, và ít nhất có cấu trúc sơ cấp và thứ cấp tương đồng với insulin và yếu tố sinh trưởng tương tự insulin, tuy nhiên tính tương đồng giữa các loài có thể là khá thấp. Ở người, relaxin được tìm thấy nhiều nhất ở thể vàng (corpora lutea - CL) của người mang thai, tuy nhiên, nhân cụ thể trong não có các thụ thể relaxin và các nhân khác chứa ARN thông tin đối với relaxin. Vài nhân với các tế bào mang các thụ thể relaxin được tìm thấy trong vùng dưới đồi.

Hai dạng gen người đã được xác định, (HI) và (H2). Hudson, P., et al., *Nature*, 301: 628-631 (1983); Hudson, P., et al., *The EMBO Journal*, 3: 2333-2339 (1984); và các patent Mỹ số 4,758,516 và 4,871,670. Chỉ một trong số hai dạng gen này (H2) được nhận thấy là được phiên mã trong CL. Vẫn chưa rõ liệu dạng (H1) có được biểu hiện ở một vị trí mô khác, hoặc liệu nó có phải là một gen giả hay không. Khi relaxin (H2) tổng hợp ở người và các chất nhất định tương tự relaxin của người được thử nghiệm về hoạt tính sinh học, các thử nghiệm này cho thấy nhân relaxin cần thiết đối với hoạt tính sinh học cũng như sự thay thế methionin bằng các axit amin nhất định không ảnh hưởng đến hoạt tính sinh học. Johnston và đồng tác giả mô tả trong tài liệu: *Peptides: Structure and Function, Proc. Ninth American Peptide Symposium*, Deber, C. M., et al. (eds.) (Pierce Chem. Co. 1985).

Phương pháp tổng hợp relaxin cũng đã được bộc lộ trong patent Mỹ số 4,835,251 và trong hai đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 07/908,766 (PCT US90/02085) và 08/080,354 (PCT US94/0699). Các phương pháp sử dụng relaxin trong điều trị các bệnh tim mạch và trong điều trị các bệnh thoái hoá thần kinh được bộc lộ trong patent Mỹ số 5,166,191 và

trong đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 07/902,637 (PCT US92/06927). Các dược phẩm nhất định chứa relaxin của người được bộc lộ trong đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 08/050,745 đã được chấp thuận cấp bằng.

Relaxin tái tổ hợp của người (H2) hiện đang trong giai đoạn thử nghiệm lâm sàng Pha I ở bệnh nhân bị bệnh xơ cứng bì. Bệnh xơ cứng bì là bệnh liên quan đến sự mất cân bằng trong sửa chữa mô làm gia tăng sự sản sinh colagen quá mức, và cuối cùng làm sưng và cứng da (và các cơ quan bị ảnh hưởng). Phương pháp điều trị hiện nay bằng cách phân phối relaxin đòi hỏi việc truyền lặp đi lặp lại trong thời gian dài.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất các polypeptit relaxin tùy ý được cải biến bằng ít nhất một axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên. Bản mô tả này đề xuất một số phương án, tuy nhiên cần hiểu rằng các phương án này chỉ nhằm mục đích minh họa sáng chế, và không nhằm giới hạn phạm vi của sáng chế như được xác định bởi yêu cầu bảo hộ.

Sáng chế đề xuất polypeptit relaxin được cải biến chứa axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên, trong đó:

(a) polypeptit relaxin được cải biến này chứa polypeptit relaxin chuỗi A có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.4 và polypeptit relaxin chuỗi B có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.5 hoặc SEQ ID NO.6 được thế bằng axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên ở vị trí được chọn từ nhóm bao gồm gốc 1 của polypeptit relaxin chuỗi A, gốc 5 của polypeptit relaxin chuỗi A, gốc 13 của polypeptit relaxin chuỗi A, gốc 18 của polypeptit relaxin chuỗi A, và gốc 7 của polypeptit relaxin chuỗi B; và

(b) axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên là para-axetyl-phenylalanin tùy ý được liên kết với nhóm liên kết, polyme, hoặc phân tử có hoạt tính sinh học.

Sáng chế cũng đề xuất polypeptit relaxin được cải biến chứa axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên, trong đó:

(a) polypeptit relaxin được cải biến này chứa polypeptit relaxin chuỗi A và polypeptit relaxin chuỗi B, trong đó polypeptit relaxin chuỗi A có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 95% so với trình tự SEQ ID NO.4, và polypeptit relaxin chuỗi B có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 95% so với trình tự SEQ ID NO.5 hoặc SEQ ID NO.6, và axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên được thế trong polypeptit relaxin chuỗi A ở gốc 1; và

(b) axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên được liên kết với nhóm liên kết, polyme, hoặc phân tử có hoạt tính sinh học, trong đó axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên chứa nhóm chức thứ nhất và nhóm liên kết, polyme, hoặc phân tử có hoạt tính sinh học chứa nhóm chức thứ hai, trong đó nhóm chức thứ nhất và nhóm chức thứ hai không giống hệt nhau và mỗi nhóm chứa nhóm carbonyl, nhóm aminooxy, nhóm hyđrazit, nhóm hyđrazin, nhóm semicarbazit, nhóm azit, hoặc nhóm alkylen, và liên kết cộng hóa trị thu được được tạo ra bởi phản ứng của nhóm chức thứ nhất và nhóm chức thứ hai chứa liên kết oxim hoặc triazol.

Sáng chế cũng đề xuất polypeptit relaxin được cải biến chứa axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên, trong đó:

(a) polypeptit relaxin được cải biến này chứa polypeptit relaxin chuỗi A có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.4 và polypeptit relaxin chuỗi B có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.5 hoặc SEQ ID NO.6 và trình tự polypeptit relaxin chuỗi A và trình tự polypeptit relaxin chuỗi B này chứa lên đến hai gốc thay thế axit amin được chọn từ gốc thay thế bằng axit amin có trong tự nhiên hoặc axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên và polypeptit relaxin chuỗi A còn được thế bằng axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên ở gốc 1 của polypeptit relaxin chuỗi A; và

(b) axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên ở gốc 1 của polypeptit relaxin chuỗi A được liên kết với nhóm liên kết, polyme, hoặc phân tử có hoạt tính sinh học, trong đó axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên chứa nhóm chức thứ nhất và nhóm liên kết, polyme, hoặc phân tử có hoạt tính sinh học chứa nhóm chức thứ hai, trong đó nhóm chức thứ nhất và nhóm chức thứ hai không giống hệt nhau và mỗi nhóm chứa nhóm carbonyl, nhóm aminooxy, nhóm hyđrazit, nhóm hyđrazin, nhóm semicarbazit,

nhóm azit, hoặc nhóm alkylen, và liên kết cộng hóa trị thu được được tạo ra bởi phản ứng của nhóm chức thứ nhất và nhóm chức thứ hai chứa liên kết oxim hoặc triazol.

Sáng chế cũng đề xuất polypeptit relaxin được cải biến chứa axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên, trong đó:

(a) polypeptit relaxin được cải biến này chứa polypeptit relaxin chuỗi A và polypeptit relaxin chuỗi B, trong đó polypeptit relaxin chuỗi A chứa trình tự SEQ ID NO.4 chứa gốc thay thế axit amin bằng axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên ở gốc 1 và polypeptit relaxin chuỗi B chứa trình tự SEQ ID NO.6 hoặc SEQ ID NO.5;

(b) axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên là para-axetyl-L-phenylalanin; và

(c) para-axetyl-L-phenylalanin được liên kết với poly(etylen glycol) có khối lượng phân tử trung bình khoảng 20kDa.

Sáng chế cũng đề xuất tế bào vật chủ chứa axit nucleic mã hóa polypeptit relaxin chuỗi A có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.4 hoặc polypeptit relaxin chuỗi B có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.5 hoặc SEQ ID NO.6 được thế bằng axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên ở vị trí được chọn từ nhóm bao gồm: gốc 1 của polypeptit relaxin chuỗi A, gốc 5 của polypeptit relaxin chuỗi A, gốc 13 của polypeptit relaxin chuỗi A, gốc 18 của polypeptit relaxin chuỗi A, và gốc 7 của polypeptit relaxin chuỗi B, trong đó axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên là para-axetyl-phenylalanin, tế bào vật chủ này chứa ARN vận chuyển trực giao synthetaza và/hoặc ARN vận chuyển trực giao, và khi axit nucleic nêu trên được dịch mã, tạo ra sự kết hợp axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên trong polypeptit relaxin chuỗi A hoặc polypeptit relaxin chuỗi B, và polynucleotit này chứa ít nhất một bộ ba mã hóa chọn lọc tùy ý được chọn từ nhóm bao gồm bộ ba mã hóa amber, bộ ba mã hóa ochre, bộ ba mã hóa opal, bộ ba mã hóa duy nhất, bộ ba mã hóa hiếm gặp, và bộ ba mã hóa bốn bazơ, trong đó bộ ba mã hóa chọn lọc này mã hóa axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên.

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp sản xuất polypeptit relaxin được cải biến theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 30, bao gồm các bước: nuôi cấy tế bào chứa (1)

polynucleotit hoặc các polynucleotit mã hóa polypeptit relaxin chuỗi A và polypeptit relaxin chuỗi B chứa bộ ba mã hóa chọn lọc mã hóa axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên, (2) ARN trực giao synthetaza và (3) ARN vận chuyển trực giao tong các điều kiện để cho phép biểu hiện polypeptit relaxin chứa axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên; và tinh chế polypeptit relaxin chứa axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên.

Sáng chế cũng đề xuất axit nucleic phân lập được mã hóa chuỗi polypeptit relaxin được cải biến chứa axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên, trong đó: (a) axit nucleic phân lập được này chứa bộ ba mã hóa chọn lọc mã hóa axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên; (b) polypeptit relaxin được cải biến và mã hóa này chứa polypeptit relaxin chuỗi A có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 95% so với trình tự SEQ ID NO.4; và (c) axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên xuất hiện ở gốc 1 của polypeptit relaxin chuỗi A có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.4 hoặc vị trí tương ứng của polypeptit relaxin được cải biến này, và axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên chứa nhóm chức được chọn từ nhóm carbonyl, nhóm aminooxy, nhóm hyđrazit, nhóm hyđrazin, nhóm semicarbazit, nhóm azit, hoặc nhóm alkylen.

Sáng chế cũng đề xuất axit nucleic phân lập được mã hóa chuỗi polypeptit relaxin được cải biến chứa axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên, trong đó: (a) axit nucleic phân lập được này chứa bộ ba mã hóa chọn lọc mã hóa axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên; (b) polypeptit relaxin được cải biến và mã hóa này chứa polypeptit relaxin chuỗi A có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.4 chứa một gốc thay thế axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên; và (c) axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên xuất hiện ở gốc 1 của polypeptit relaxin chuỗi A có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.4 hoặc vị trí tương ứng của polypeptit relaxin được cải biến này, và axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên chứa para-axetyl-L-phenylalanin.

Sáng chế cũng đề xuất tế bào vật chủ chứa các axit nucleic phân lập được nêu trên.

Sáng chế cũng đề xuất hệ dịch mã *in vitro* chứa axit nucleic phân lập được nêu trên.

Theo khía cạnh khác, các polypeptit relaxin có ít nhất một axit amin được mã hóa

không có trong tự nhiên được gắn vào ít nhất một polyme hòa tan trong nước.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp phương pháp thúc đẩy sự tạo mạch ở động vật có vú cần điều trị bằng cách sử dụng relaxin với lượng hữu hiệu có tác dụng điều trị bệnh. Theo phương án khác, relaxin được sử dụng với lượng đủ để duy trì nồng độ huyết thanh ít nhất khoảng 1ng/mL. Theo một phương án, polypeptit relaxin là relaxin của người (hR2).

Sáng chế cũng mô tả phương pháp điều trị các cá thể có độ co giãn động mạch giảm bằng lượng hữu hiệu dược phẩm chứa chất chủ vận thụ thể relaxin. Theo phương án được ưu tiên, chất chủ vận thụ thể relaxin là relaxin tái tổ hợp của người, ví dụ, relaxin H2 của người.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp làm tăng độ co giãn động mạch ở đối tượng, trong đó phương pháp này bao gồm bước xác định độ co giãn động mạch tổng thể ở đối tượng này; nhằm xác định rằng độ co giãn động mạch tổng thể ở đối tượng này là giảm so với độ co giãn động mạch tổng thể ở đối tượng khỏe mạnh; và cho đối tượng đó sử dụng dược phẩm chứa relaxin để tăng độ co giãn động mạch ở đối tượng này. Độ co giãn động mạch tổng thể có thể đo được, theo một phương án, từ biểu thị phân rã của các dạng sóng áp lực động mạch chủ ở tâm trương bằng cách sử dụng phương pháp diện tích. Theo phương án khác, độ co giãn động mạch tổng thể có thể được tính bằng tỷ lệ giữa thể tích tâm thu và áp lực xung, khi thể tích tâm thu được xác định là tỷ lệ giữa lưu lượng máu qua tim và nhịp tim.

Theo một số phương án, độ co giãn động mạch cục bộ hoặc độ co giãn động mạch khu vực của đối tượng có thể được đo ngoài, hoặc để làm một phương án thay thế cho, việc đo độ co giãn động mạch và, nếu độ co giãn động mạch cục bộ hoặc hoặc khu vực giảm so với độ co giãn động mạch cục bộ hoặc khu vực dự kiến cho một cá thể khỏe mạnh trong một tình huống tương tự, relaxin có thể được sử dụng để tăng độ co giãn động mạch ở cá thể này.

Theo phương án khác, đối tượng được sử dụng relaxin mắc một hoặc nhiều rối loạn sau: chứng xơ vữa động mạch, bệnh tiểu đường typ 1, bệnh tiểu đường typ 2, bệnh động mạch vành, bệnh xơ cứng bì, chứng đột quỵ, loạn chức năng tâm trương, tăng

cholesterol do di truyền, bệnh tăng huyết áp tâm thu cách ly, bệnh tăng huyết áp nguyên phát, bệnh tăng huyết áp thứ phát, chứng phì đại tâm thất trái, cứng động mạch liên quan đến việc hút thuốc trong thời gian dài, cứng động mạch liên quan đến bệnh béo phì, cứng động mạch liên quan đến tuổi tác, bệnh ban đỏ toàn thân, tiền sản giật, và chứng tăng cholesterol huyết. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất phương pháp làm tăng độ co giãn động mạch ở phụ nữ tiền mãn kinh, mãn kinh, và sau mãn kinh và ở các cá thể có nguy cơ mắc một trong số rối loạn nêu trên.

Theo một phương án khác, việc dùng relaxin làm tăng độ co giãn động mạch lên ít nhất 10%, 15%, 20% hoặc nhiều hơn, so với độ co giãn động mạch đo được trước khi sử dụng. Theo các phương án khác nữa, sáng chế đề cập đến việc sử dụng relaxin cho các cá thể có độ co giãn động mạch giảm với tốc độ định trước để duy trì nồng độ relaxin trong huyết thanh từ 0,5 đến 80ng/mL. Theo một phương án, relaxin là relaxin tái tổ hợp của người có một axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên. Theo phương án khác, relaxin là relaxin có nhiều hơn một axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên. Theo một phương án khác nữa của sáng chế, relaxin có một axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên được liên kết với một polyme hòa tan trong nước. Theo một số phương án, relaxin có thể được sử dụng hằng ngày, trong dược phẩm dùng để tiêm, ở dạng dược phẩm giải phóng kéo dài, hoặc ở dạng dược phẩm truyền liên tục.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp điều trị bệnh nhiễm trùng hoặc tổn thương do thiếu máu cục bộ bằng cách sử dụng relaxin với lượng hữu hiệu có tác dụng điều trị bệnh. Theo phương án được đặc biệt ưu tiên, bệnh nhiễm trùng hoặc tổn thương do thiếu máu cục bộ là bệnh nhiễm trùng hoặc tổn thương do thiếu máu cục bộ, trong đó tổn thương là vì thiếu oxy do tuần hoàn kém.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp sử dụng các polypeptit relaxin theo sáng chế để bào chế thuốc dùng để điều trị bệnh nhiễm trùng hoặc tổn thương do thiếu máu cục bộ, hoặc để bào chế thuốc để thúc đẩy sự tạo mạch. Sáng chế cũng mô tả phương pháp điều trị loạn chức năng khớp do thoái hóa xương, và theo một khía cạnh khác, việc điều trị loạn chức năng khớp do thoái hóa xương bao gồm bước sử dụng hR2 ngoài một hoặc nhiều tá dược, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, glucosamin. Sáng chế cũng mô tả phương pháp điều trị bệnh Alzheimer, và theo một khía cạnh khác, phương pháp điều trị

bệnh Alzheimer bao gồm bước sử dụng hR2 ngoài một hoặc nhiều tá dược, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, estrogen. Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến phương pháp điều chỉnh sinh lý sinh sản của động vật có vú bao gồm việc cho động vật có vú sử dụng dược phẩm theo sáng chế với lượng hữu hiệu có tác dụng điều trị bệnh.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp điều trị bệnh co mạch do angiotensin-II (AngII) gây ra. Các phương pháp này thường bao gồm việc dùng dược phẩm chứa lượng relaxin hữu hiệu để đảo chiều, ức chế, hoặc làm giảm tác dụng co mạch của AngII.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp điều trị bệnh co mạch do endothelin-l (ET-1) gây ra. Các phương pháp này thường bao gồm bước sử dụng dược phẩm chứa lượng relaxin hữu hiệu để đảo chiều, ức chế, hoặc làm giảm tác dụng co mạch của ET-1. Theo một số phương án, các phương pháp bao gồm việc làm tăng sự hoạt hóa thụ thể endothelin týp B trong tế bào trong mạch máu bằng cách cho cá thể này sử dụng relaxin.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp điều trị tình trạng thiếu máu cục bộ, thường bao gồm bước sử dụng dược phẩm chứa lượng relaxin hữu hiệu để kích thích hoặc thúc đẩy sự tạo mạch và/hoặc giãn mạch, nhờ đó điều trị tình trạng thiếu máu cục bộ. Các phương pháp này có thể được sử dụng để điều trị nhiều loại tình trạng thiếu máu cục bộ. Theo một số phương án, sáng chế cũng mô tả phương pháp điều trị tình trạng thiếu máu cục bộ do chứng nhồi máu cơ tim gây ra. Theo các phương án khác, sáng chế cũng mô tả phương pháp điều trị tình trạng thiếu máu cục bộ liên quan đến vết thương. Do đó, sáng chế cũng đề cập đến các phương pháp thúc đẩy quá trình làm lành vết thương.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp kích thích sự biểu hiện xytokin tạo mạch và/hoặc giãn mạch thường bao gồm bước sử dụng chế phẩm chứa lượng relaxin hữu hiệu để làm giãn mạch máu và/hoặc kích thích hoặc thúc đẩy sự sản sinh xytokin tạo mạch. Theo một số phương án, sáng chế đề cập đến các phương pháp kích thích sự biểu hiện của yếu tố sinh trưởng nguyên bào sợi cơ bản (basic fibroblast growth factor - bFGF) và/hoặc yếu tố sinh trưởng tế bào nội mô mạch (vascular endothelial cell growth factor - VEGF). Các phương pháp này có thể được sử dụng để điều trị nhiều loại bệnh mà có thể được điều trị bằng cách tăng lưu lượng máu gần hoặc tại nơi có bệnh.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp làm gia tăng sự giãn mạch và siêu lọc tại thận,

thường bao gồm bước sử dụng dược phẩm chứa lượng relaxin. Các phương pháp này có thể được sử dụng để điều trị nhiều loại bệnh thận. Do đó, sáng chế cũng mô tả phương pháp điều trị bệnh thận liên quan đến sự co mạch.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp làm giảm bệnh tăng huyết áp phổi, thường bao gồm bước sử dụng dược phẩm chứa relaxin.

Các patent được chuyển giao cho Connetics Corporation và BAS Medical, In.c, tương ứng là Patent Mỹ số 6,211,147 và 6,780,836, được kết hợp vào sáng chế bằng cách viện dẫn, đề cập đến phương pháp thúc đẩy sự tạo chuỗi Bằng cách sử dụng relaxin đã được bộc lộ. Patent được chuyển giao cho Genentech, Inc., patent số 5,759,807, được kết hợp vào sáng chế bằng cách viện dẫn, đề cập đến quy trình sản xuất relaxin ở sinh vật nhân sơ từ prorelaxin đã được bộc lộ. Patent Mỹ số 6,251,863, được kết hợp vào sáng chế bằng cách viện dẫn đề cập đến phương pháp điều trị bệnh loạn chức năng khớp do thoái hóa xương và phương pháp điều trị bệnh Alzheimer bằng cách sử dụng dược phẩm chứa relaxin còn chứa glcosamin sulfat và estrogen, tương ứng đối với mỗi tình trạng bệnh lý.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 là mô hình cấu trúc tinh thể của relaxin, trong đó có chỉ ra một số vị trí gốc axit amin được chọn để thay thế.

Fig.2 là mô hình cấu trúc tinh thể của relaxin, trong đó có chỉ ra một số vị trí gốc axit amin được chọn để thay thế.

Fig.3 là mô hình cấu trúc tinh thể của relaxin, trong đó có chỉ ra một số vị trí gốc axit amin được chọn để thay thế.

Fig.4 là bản vẽ cấu trúc của chuỗi A và B của relaxin của người.

Fig.5 là hình ảnh điện di trên gel SDS_PAGE của prorelaxin được sản xuất bằng phương pháp này với axit amin chuỗi B1 là Ala và para-axetyl phenylalanin ở vị trí axit amin thứ 13 của chuỗi A, được thế cho valin.

Fig.6(A) là gel SDS-PAGE của relaxin V13pAF chưa được PEGyl hóa dọc theo gen đánh dấu khối lượng phân tử trên làn 1 và WT relaxin tái tổ hợp và không tái tổ hợp

trên các làn 3 và 7 (không giảm (NR) và giảm (R)). Fig.6(B) là gel SDS- PAGE của relaxin V13pAF đã được PEGyl hóa ở các làn 3 và 4 (không giảm (NR) và giảm (R)) liền kề gen đánh dấu khối lượng phân tử trong làn 1.

Fig.7 là đồ thị nồng độ relaxin trong huyết thanh chuột cống SD tính bằng ng/mL sau một khoảng thời gian đối với các polypeptit relaxin AV13 đã được PEGyl hóa và thể dại.

Fig.8A là đồ thị nồng độ trung bình trong huyết thanh của nhóm so sánh theo thời gian đối với tất cả các nhóm PEG-RLX được sử dụng dưới da với liều trong Ví dụ 40. Một liều tiêm được sử dụng cho mỗi chuột. N=5 chuột mỗi nhóm. Các ký hiệu biểu thị trị số trung bình ± SD của nồng độ huyết thanh phân nhóm theo thời gian.

Fig.8B là đồ thị thể hiện đường cong nồng độ trong huyết thanh ở mỗi chuột theo thời gian ở chuột cống SD được sử dụng dưới da với liều 0,5mg/kg 20KPEG-AQ1-RLX. Một liều dưới da được sử dụng cho mỗi chuột. N=5 chuột mỗi nhóm.

Fig.9A là đồ thị thể hiện đường cong nồng độ trong huyết thanh ở mỗi chuột theo thời gian ở chuột cống SD được sử dụng dưới da với liều 0,5mg/kg PEG20-AA5-RLX. Liều duy nhất được sử dụng qua đường dưới da cho mỗi chuột. N=5 chuột mỗi nhóm.

Fig.9B là đồ thị đường cong nồng độ trong huyết thanh ở mỗi chuột theo thời gian ở chuột cống SD được sử dụng dưới da với liều 0,5mg/kg PEG20-AR18-RLX. Liều duy nhất được sử dụng dưới da cho mỗi chuột. N=5 chuột mỗi nhóm.

Fig.10A là đồ thị đường cong nồng độ trong huyết thanh ở mỗi chuột theo thời gian ở chuột cống SD được sử dụng qua đường tĩnh mạch với liều 0,5mg/kg PEG20-BV7-RLX. Liều duy nhất được sử dụng qua đường tĩnh mạch cho mỗi chuột. N=5 chuột mỗi nhóm.

Fig.10B là đồ thị đường cong nồng độ trong huyết thanh ở mỗi chuột theo thời gian ở chuột cống SD được sử dụng qua đường tĩnh mạch với liều 0,5mg/kg PEG20-BW28-RLX. Liều duy nhất được sử dụng qua đường tĩnh mạch cho mỗi chuột. N=5 chuột mỗi nhóm.

Fig.11 là đồ thị đường cong nồng độ trong huyết thanh ở mỗi chuột theo thời gian ở chuột cống SD được sử dụng qua đường tĩnh mạch với liều 0,5mg/kg PEG20-AV13-RLX. Liều duy nhất được sử dụng qua đường tĩnh mạch cho mỗi chuột. N=5 chuột mỗi nhóm.

Fig.12A là đồ thị so sánh nồng độ trung bình nhóm trong huyết thanh theo thời gian đối với rhRelaxin loại thông thường được sử dụng dưới da. Liều duy nhất được sử dụng bằng cách tiêm mỗi chuột. N=5 chuột mỗi nhóm.

Fig.12B là đồ thị đường cong nồng độ trong huyết thanh ở mỗi chuột theo thời gian ở chuột cống SD được sử dụng qua đường tĩnh mạch với liều 0,5mg/kg rhRelaxin loại thông thường. Liều duy nhất được sử dụng qua đường tĩnh mạch cho mỗi chuột. N=5 chuột mỗi nhóm.

Fig.13A là đồ thị so sánh nồng độ trung bình nhóm trong huyết thanh theo thời gian đối với tất cả các nhóm PEG-RLX được sử dụng dưới da với liều hoặc qua đường tĩnh mạch. Liều duy nhất được sử dụng bằng cách tiêm mỗi chuột. N=3 đến 5 chuột mỗi nhóm.

Fig.13B là đồ thị đường cong nồng độ trong huyết thanh ở mỗi chuột theo thời gian ở chuột cống SD được sử dụng qua đường tĩnh mạch với liều 0,25mg/kg 20KPEG-AQ1-RLX. Liều duy nhất được sử dụng qua đường tĩnh mạch cho mỗi chuột. N=4 chuột mỗi nhóm.

Fig.14A là đồ thị đường cong nồng độ trong huyết thanh ở mỗi chuột theo thời gian ở chuột cống SD được sử dụng dưới da với liều 0,5mg/kg PEG20-AQ1-RLX. Liều duy nhất được sử dụng qua đường dưới da cho mỗi chuột. N=5 chuột mỗi nhóm.

Fig.14B là đồ thị đường cong nồng độ trong huyết thanh ở mỗi chuột theo thời gian ở chuột cống SD được sử dụng dưới da với liều 0,25mg/kg PEG20-AQ1-RLX. Liều duy nhất được sử dụng qua đường dưới da cho mỗi chuột. N=3 chuột mỗi nhóm.

Fig.15 là đồ thị đường cong nồng độ trong huyết thanh ở mỗi chuột theo thời gian ở chuột cống SD được sử dụng qua đường tĩnh mạch với liều 0,125mg/kg PEG20-AQ1-RLX. Liều duy nhất được sử dụng qua đường tĩnh mạch cho mỗi chuột. N=5 chuột mỗi

nhóm.

Fig.16A là đồ thị thời gian bán thải cuối cùng trung bình của PEG-Relaxin theo liều lượng; các vạch sai số =SD.

Fig.16B là đồ thị AUC_{inf} trung bình của PEG-Relaxin theo liều lượng; các vạch sai số =SD.

Fig.17A là đồ thị Cmax trung bình của PEG-Relaxin theo liều lượng; các vạch sai số =SD.

Fig.17B là đồ thị độ thanh thải trung bình của PEG-Relaxin theo liều lượng; các vạch sai số =SD.

Fig.18A là đồ thị phân bố trung bình theo thể tích của PEG-Relaxin theo liều lượng; các vạch sai số ¯SD.

Fig.18B là đồ thị so sánh nồng độ trong huyết thanh theo thời gian sau khi dùng trong tĩnh mạch hoặc tiêm dưới da với một liều duy nhất 0,25mg/kg 20KPEG- AQ1 Relaxin.

Fig.19A-Fig.19F là dữ liệu từ Pha I của ví dụ 43. Fig.19A thể hiện tác dụng của việc truyền relaxin thể dại IV (qua đường tĩnh mạch) đến lượng nước hấp thụ và lượng nước tiểu thải ra. Fig.19B là đường nền đối với mỗi nhóm chuột Long-Evans từ -16 giờ đến 0 giờ ở Pha I đối với lượng nước tiểu thải ra. Fig.19C là tác dụng của việc truyền relaxin thể dại qua đường tĩnh mạch đến hematocrit. Fig.19D là tác dụng của việc truyền relaxin thể dại qua đường tĩnh mạch đến BUN trong huyết tương ở chuột cống Long-Evans cái. Fig.19E là lượng nước uống vào đối với mỗi nhóm chuột Long-Evans từ 0 giờ đến 6 giờ ở Pha I. Fig.19F là lượng nước tiểu thải ra ở mỗi nhóm chuột Long-Evans trong thời gian từ 0 đến 6 giờ ở Pha I.

Fig.20A-Fig.20I thể hiện dữ liệu từ Pha II sau khi dùng chất dẫn (nhóm đối chứng) và các nhóm thử nghiệm dùng 0,1X, 0,3X và IX biến thể 20K PEG-Relaxin chứa gốc thay thế ở vị trí 1 trong chuỗi A bằng pAF liên kết với PEG từ ví dụ 43. Fig.20A thể hiện tác dụng đến lượng nước hấp thụ và lượng nước tiểu thải ra. Fig.20B thể hiện tác dụng

đến mức natri trong huyết tương đối với mỗi nhóm chuột cống Long-Evans sau khi tiêm. Fig.20C thể hiện tác dụng đến mức thay đổi natri trong huyết tương đối với mỗi nhóm chuột cống Long-Evans sau khi tiêm, Fig.20D thể hiện tác dụng của PEG-Relaxin đến nồng độ osmol/L dung dịch huyết tương. Fig.20E thể hiện tác dụng của việc truyền PEG-Relaxin IV đến sự thay đổi nồng độ osmol/L dung dịch huyết tương. Fig.20F thể hiện tác dụng của quá trình sử dụng PEG-Relaxin đến mức BUN. Fig.20G thể hiện tác dụng của quá trình sử dụng PEG-relaxin đến lượng nước hấp thụ đối với mỗi nhóm chuột Long-Evans từ 0 đến 6 giờ ở Pha II. Fig.20H là đường nền lượng nước tiểu thải ra đối với mỗi nhóm chuột Long-Evans từ -16 giờ đến 0 giờ ở Pha II. Fig.20I thể hiện tác dụng của quá trình sử dụng PEG-relaxin đến lượng nước tiểu thải ra đối với mỗi nhóm chuột Long-Evans từ 0 đến 6 giờ ở Pha II.

Mô tả chi tiết sáng chế

Theo một số phương án, polypeptit relaxin chứa một hoặc nhiều cải biến sau dịch mã. Theo một số phương án, polypeptit relaxin được liên kết với nhóm liên kết, polyme, hoặc phân tử có hoạt tính sinh học. Theo một số phương án, polypeptit relaxin được liên kết với polyme có hai nhóm chức, nhóm liên kết hai nhóm chức, hoặc ít nhất một polypeptit relaxin khác nữa.

Theo một số phương án, axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên được liên kết với polyme hòa tan trong nước. Theo một số phương án, polyme hòa tan trong nước chứa gốc poly(etylen glycol). Theo một số phương án, axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên liên kết với polyme hòa tan trong nước có nhóm liên kết hoặc được liên kết với polyme hòa tan trong nước. Theo một số phương án, phân tử poly(etylen glycol) là polyme có hai nhóm chức. Theo một số phương án, polyme có hai nhóm chức được liên kết với polypeptit thứ hai. Theo một số phương án, polypeptit thứ hai là polypeptit relaxin.

Theo một số phương án, polypeptit relaxin chứa ít nhất hai axit amin liên kết với polyme hòa tan trong nước chứa gốc poly(etylen glycol). Theo một số phương án, ít nhất một axit amin là axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên.

Theo một số phương án, polypeptit relaxin chứa ít nhất hai axit amin liên kết với

polyme hòa tan trong nước chứa gốc poly(etylen glycol). Theo một số phương án, ít nhất một axit amin là axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên.

Theo một số phương án, một hoặc nhiều axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên được kết hợp vào một hoặc nhiều vị trí bất kỳ trong số các polypeptit relaxin hoặc prorelaxin, các chất tương tự relaxin, prorelaxin, relaxin chuỗi A, relaxin chuỗi B, relaxin chuỗi AlalAsp, hoặc các polypeptit relaxin trong chuỗi A trước vị trí 1 (tức là ở đầu tận cùng N), 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 (tức là ở đầu tận cùng carboxyl của protein), và tổ hợp bất kỳ của chúng (SEQ ID NO.4) và/hoặc trong chuỗi B trước vị trí 1 (tức là ở đầu tận cùng N), 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 (SEQ ID NO.5 hoặc các axit amin tương ứng nêu trong SEQ ID NO.6). Theo một số phương án, một hoặc nhiều axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên được kết hợp vào một hoặc nhiều vị trí sau đây trong các polypeptit relaxin hoặc prorelaxin bất kỳ: trong chuỗi A trước vị trí 1 (tức là ở đầu tận cùng N), 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, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54 (tức là ở đầu tận cùng carboxyl của protein), và tổ hợp bất kỳ của chúng (SEQ ID NO.1 hoặc các axit amin tương ứng nêu trong SEQ ID NO.2 hoặc 3). Theo một số phương án, một hoặc nhiều axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên được kết hợp vào một hoặc nhiều vị trí sau trong relaxin: trước vị trí 1 (tức là ở đầu tận cùng N), 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, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89 (tức là ở đầu tận cùng carboxyl của protein có trình tự SEQ ID NO.3).

Theo một số phương án, axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên được kết hợp vào chuỗi A ở axit amin ở vị trí 1 (SEQ ID NO.4). Theo một số phương án, axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên được kết hợp vào chuỗi A ở axit amin ở vị trí 5 (SEQ ID NO.4). Theo một số phương án, axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên được kết hợp vào chuỗi B ở axit amin ở vị trí 7 (SEQ ID NO.5 hoặc SEQ ID NO.6). Theo một số phương án a axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên được kết hợp vào

chuỗi A ở axit amin ở vị trí 2 (SEQ ID NO.4). Theo một số phương án, axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên được kết hợp vào chuỗi A ở axit amin ở vị trí 13 (SEQ ID NO.4). Theo một số phương án, axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên được kết hợp vào chuỗi B ở axit amin ở vị trí 5 (SEQ ID NO.5 hoặc SEQ ID NO.6). Theo một số phương án, axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên được kết hợp vào chuỗi A ở axit amin ở vị trí 18. Theo một số phương án, axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên được kết hợp vào chuỗi B ở axit amin ở vị trí 5. Theo một số phương án, axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên được kết hợp vào chuỗi B ở axit amin ở vị trí 28. Theo một số phương án, một hoặc nhiều axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên được kết hợp vào một vị trí trong số các vị trí sau trong các polypeptit relaxin: trong chuỗi A ở axit amin ở vị trí 1, 2, 5, 13, 18 (SEQ ID NO.4 hoặc các axit amin tương ứng nêu trong SEQ ID NO.1, SEQ ID NO.2, SEQ ID NO.3, hoặc các trình tự relaxin đã biết khác). Theo một số phương án, một hoặc nhiều axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên được kết hợp vào một vị trí trong số các vị trí sau trong các polypeptit relaxin: trong chuỗi A ở axit amin ở vị trí 1, 2, 5, 13 (SEQ ID NO.4 hoặc các axit amin tương ứng nêu trong SEQ ID NO.1, SEQ ID NO.2, SEQ ID NO.3, hoặc các trình tự relaxin đã biết khác). Theo một số phương án, một hoặc nhiều axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên được kết hợp vào một vị trí trong số các vị trí sau trong các polypeptit relaxin: trong chuỗi A ở axit amin ở vị trí 1, 2, 5 (SEQ ID NO.4 hoặc các axit amin tương ứng nêu trong SEQ ID NO.1, SEQ ID NO.2, SEQ ID NO.3, hoặc các trình tự relaxin đã biết khác). Theo một số phương án, một hoặc nhiều axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên được kết hợp vào một vị trí trong số các vị trí sau trong các polypeptit relaxin: trong chuỗi A ở axit amin ở vị trí 2 hoặc 5 (SEQ ID NO.4 hoặc các axit amin tương ứng nêu trong SEQ ID NO.1, SEQ ID NO.2, SEQ ID NO.3, hoặc các trình tự relaxin đã biết khác).

Theo một số phương án, axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên được kết hợp vào một trong số vị trí sau trong các polypeptit relaxin: trong chuỗi B ở axit amin ở vị trí 5 hoặc 7 (SEQ ID NO.5 hoặc SEQ ID NO.6, hoặc axit amin ở vị trí tương ứng nêu trong SEQ ID NO.1, 2, hoặc 3). Theo một số phương án, axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên được kết hợp ở vị trí 7 trong chuỗi B (SEQ ID NO.5 hoặc SEQ ID NO.6, hoặc axit amin ở vị trí tương ứng nêu trong SEQ ID NO.1, 2, hoặc 3). Theo một số

phương án, axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên được kết hợp ở vị trí 5 trong chuỗi B (SEQ ID NO.5 hoặc SEQ ID NO.6, hoặc axit amin ở vị trí tương ứng nêu trong SEQ ID NO.1, 2, hoặc 3). Theo một số phương án, axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên được kết hợp ở vị trí 7 trong chuỗi B (SEQ ID NO.5 hoặc SEQ ID NO.6, hoặc axit amin ở vị trí tương ứng nêu trong SEQ ID NO.1, 2, hoặc 3).

Theo một phương án, axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên được kết hợp vào một vị trí trong số các vị trí sau đây trong các polypeptit relaxin: trong chuỗi A ở axit amin ở vị trí 1, 5, 2, 13, 18 (SEQ ID NO.4 hoặc axit amin ở vị trí tương ứng trong SEQ ID NO. 1, 2, 3), trong chuỗi B ở axit amin ở vị trí 7, 5 (SEQ ID NO.5 hoặc 6, hoặc axit amin ở vị trí tương ứng nêu trong SEQ ID NO.1, 2, 3). Theo một số phương án, một hoặc nhiều axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên được kết hợp vào một vị trí trong số các vị trí sau trong các polypeptit relaxin: trong chuỗi A ở axit amin ở vị trí 1, 5, 2, 13, 18 (SEQ ID NO.4 hoặc axit amin ở vị trí tương ứng trong SEQ ID NO. 1, 2, 3), trong chuỗi B ở axit amin ở vị trí 7, 5 (SEQ ID NO.5 hoặc 6, hoặc axit amin ở vị trí tương ứng nêu trong SEQ ID NO.1, 2, 3).

Theo một số phương án, axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên ở một hoặc nhiều vị trí này được liên kết với polyme hòa tan trong nước, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các vị trí: trong chuỗi A trước vị trí 1 (tức là ở đầu tận cùng N), 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 (tức là ở đầu tận cùng carboxyl của protein), và tổ hợp bất kỳ của chúng (SEQ ID NO.4 hoặc các axit amin tương ứng trong các trình tự relaxin đã biết) và/hoặc trong chuỗi B trước vị trí 1 (tức là ở đầu tận cùng N), 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 (SEQ ID NO.5 hoặc 6 hoặc các axit amin tương ứng trong các trình tự relaxin đã biết). Theo một số phương án, axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên ở một hoặc nhiều vị trí này được liên kết với polyme hòa tan trong nước, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở: trong chuỗi A ở các vị trí 1, 2, 5, 13, 18 (SEQ ID NO.1 hoặc các axit amin tương ứng trong các trình tự relaxin đã biết). Theo một số phương án, axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên ở một hoặc nhiều vị trí này được liên kết với polyme hòa tan trong nước, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở: trong chuỗi A ở các vị trí 1, 2, 5 (SEQ ID NO.1 hoặc các axit amin tương ứng trong các trình tự

relaxin đã biết). Theo một số phương án, axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên ở một hoặc nhiều vị trí này được liên kết với polyme hòa tan trong nước, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở: trong chuỗi A ở các vị trí 2, 5 (SEQ ID NO.1 hoặc các axit amin tương ứng trong các trình tự relaxin đã biết). Theo một số phương án, axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên ở một hoặc nhiều vị trí này được liên kết với polyme hòa tan trong nước, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở: trong chuỗi A ở các vị trí 2, 5, 13, 18 (SEQ ID NO.1 hoặc các axit amin tương ứng trong các trình tự relaxin đã biết). Theo một số phương án, axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên ở một hoặc nhiều vị trí này được liên kết với polyme hòa tan trong nước, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở: trong chuỗi B ở vị trí 5, 7 (SEQ ID NO.5 hoặc 6 hoặc axit amin ở vị trí tương ứng nêu trong SEQ ID NO.1, 2, 3). Theo một số phương án, axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên ở vị trí 5 trong chuỗi B (SEQ ID NO.5 hoặc 6 hoặc axit amin ở vị trí tương ứng nêu trong SEQ ID NO.1, 2, 3) được liên kết với polyme hòa tan trong nước. Theo một số phương án, axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên ở vị trí 7 trong chuỗi B (SEQ ID NO.5 hoặc 6 hoặc axit amin ở vị trí tương ứng nêu trong SEQ ID NO.1, 2, 3) được liên kết với polyme hòa tan trong nước

Theo một số phương án, một hoặc nhiều axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên được kết hợp vào một hoặc nhiều vị trí sau trong các polypeptit relaxin hoặc prorelaxin bất kỳ: chuỗi B ở vị trí 5, 7 (SEQ ID NO.5 hoặc 6 hoặc axit amin ở vị trí tương ứng nêu trong SEQ ID NO.1, 2, 3) và chuỗi A ở vị trí 1, 5, 2, 13, 18 (SEQ ID NO.4 hoặc axit amin ở vị trí tương ứng nêu trong SEQ ID NO.1, 2, 3). Theo một số phương án, một hoặc nhiều axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên được kết hợp vào một hoặc nhiều vị trí sau trong các polypeptit relaxin hoặc prorelaxin bất kỳ: chuỗi B ở vị trí 5, 7 (SEQ ID NO; 5 hoặc 6 hoặc axit amin ở vị trí tương ứng nêu trong SEQ ID NO.1, 2, 3) và chuỗi A ở vị trí 1, 5, 2, 13, 18 (SEQ ID NO.4 hoặc axit amin ở vị trí tương ứng nêu trong SEQ ID NO.1, 2, 3) và axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên được liên kết với polyme hòa tan trong nước.

Phương pháp theo sáng chế có thể được sử dụng để thúc đẩy sự tạo mạch, thúc đẩy sữ giãn mạch, thúc đẩy sự giãn mạch không giảm huyết áp, để điều trị bệnh tăng huyết áp, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, bệnh tăng huyết áp thận, bệnh tăng huyết áp phổi,

và bệnh tăng huyết áp tim (toàn bộ nội dung của các Patent Mỹ số 6,723,702; và 6,780,836 đều được kết hợp vào sáng chế bằng cách viện dẫn), bộc lộ việc điều chế và việc sử dụng tinh thể của một chất tương tự relaxin.

Dược phẩm

Sáng chế cũng đề cập đến dược phẩm có thể chứa hỗn hợp chứa hai hoặc nhiều relaxin, một relaxin dạng đime, một chất tương tự relaxin, một relaxin được axyl hóa, hoặc một chất tương tự relaxin được axyl hóa trong đó ít nhất một trong số các thành phần của hỗn hợp này chứa axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên. Theo phương án khác của sáng chế, các dược phẩm chứa hỗn hợp chứa hai hoặc nhiều relaxin, chất tương tự relaxin, relaxin được axyl hóa, hoặc chất tương tự relaxin được axyl hóa, trong đó ít nhất một trong số các thành phần của hỗn hợp này chứa axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên còn bao gồm ít nhất một polyme hòa tan trong nước gắn vào ít nhất một axit amin trong số axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên này.

Sáng chế cũng đề cập đến hỗn hợp dị thể, trong đó các polypeptit relaxin và các chất tương tự relaxin được điều chế theo các phương pháp đã được bộc lộ trong sáng chế và tiếp theo được trộn sao cho dược phẩm có thể được sử dụng cho bệnh nhân cần điều trị chứa, ví dụ, 25% polypeptit relaxin chứa một axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên ở vị trí 28 của chuỗi B đã được polyetylen glycol hóa, 25% polypeptit relaxin chứa một axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên ở vị trí 10 của chuỗi B, axit amin ược mã hóa không có trong tự nhiên này được ghép cặp với polyme hòa tan trong nước, và 50% polypeptit relaxin trong đó axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên xuất hiện ở vị trí 31 của chuỗi B của relaxin (SEQ ID NO.2; theo cách khác SEQ ID NO.4, 6, 8, 10, hoặc 12). Tất cả các hỗn hợp khác nhau với tỷ lệ phần trăm các biến thể polypeptit relaxin khác nhau trong đó các polypeptit relaxin bao gồm nhiều (1) PEG với các kích thước khác nhau, hoặc (2) các PEG được bao hàm ở các vị trí khác nhau trong trình tự này. Điều này chỉ được nêu ra nhằm mục đích ví dụ và không nhằm giới hạn các dược phẩm mà có thể được tạo ra theo sáng chế và mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này dễ biết. Theo một phương án khác, các biến thể polypeptit relaxin để được đưa vào trong hỗn hợp dược phẩm sẽ được chọn dựa vào thời gian phân ly khác nhau của chúng sao cho dược phẩm này có thể tạo ra relaxin giải phóng kéo dài cho bệnh nhân cần điều trị bệnh.

Các dược phẩm theo sáng chế có thể chứa glucagon.

Các phương án khác của sáng chế bao gồm dược phẩm dùng để xông

Theo một phương án khác, có thể áp dụng công nghệ đã được bộc lộ trong bản mô tả này để sản xuất các chất tương tự relaxin có các đặc tính dược động học và dược lực học gia tăng cho bệnh nhân sử dụng qua đường phổi, tạo ra nồng độ relaxin cao trong máu, nồng độ này được duy trì trong ít nhất 6 giờ, và thông thường hơn là trong ít nhất 8, 10, 12, 14, 18, 24 giờ hoặc nồng độ sau khi dùng là lớn hơn. Một phương án khác theo sáng chế cho phép có được hỗn hợp có lợi gồm các chất tương tự relaxin thích hợp đối với các dược phẩm sẽ được sử dụng cho bệnh nhân ở dạng thuốc xông.

Theo một số phương án, các vị trí sau trong phân tử relaxin tự nhiên có thể được thế bằng axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên và còn tùy ý được cải biến bằng liên kết cộng hóa trị với một polyme hòa tan trong nước, như PEG: 2 đầu tận cùng C của chuỗi A và chuỗi B, Arg22B, His10B, His5A, Glu4A, Glu17A, Glu13B, và Glu21B.

Ngoài relaxin có trong tự nhiên, sáng chế đề cập đến các polypeptit relaxin không có trong tự nhiên và các chất tương tự relaxin có một hoặc nhiều axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên được thế hoặc được cài xen vào trình tự tín hiệu mà còn có thể đưa vào một vị trí để kết hợp một hoặc nhiều polyme hòa tan trong nước, như PEG. Phương án này theo sáng chế là đặc biệt hữu dụng để đưa vào các vị trí pegylat hóa khác theo yêu cầu – trong phân tử relaxin, ví dụ, để tạo ra PEG-relaxin có khả năng chống lại tác dụng phân hủy của enzym gia tăng. Phương pháp này tạo ra độ linh hoạt lớn hơn trong việc thiết kế một thể tiếp hợp relaxin tối ưu có các đặc tính hoạt tính, độ ổn định, độ hòa tan, và dược lý đạt độ cân bằng mong muốn. Đột biến có thể được thực hiện, tức là bằng cách gây đột biến đặc hiệu vị trí, ở một số lượng bất kỳ các vị trí trong phân tử relaxin. PEG để sử dụng trong sáng chế có thể có nhiều loại cấu trúc: mạch thẳng, dạng chạc, mạch nhánh, quả tạ, và các cấu trúc tương tự. Thông thường, PEG được hoạt hóa bằng nhóm hoạt hóa thích hợp phù hợp đối với phản ứng ghép cặp một vị trí mong muốn hoặc các vị trí trên phân tử relaxin. PEG đã được hoạt hóa sẽ có một nhóm phản ứng ở đầu tận cùng để phản ứng với relaxin. Các dẫn xuất PEG đã được hoạt hóa đại diện và các phương pháp tiếp hợp các tác nhân này vào dược chất như relaxin là đã biết trong lĩnh

vực phương pháp này và cũng đã được bộc lộ trong tài liệu: Zalipsky, S., et al., "*Use of Functionalized Poly(Etylen Glycols) for Modification of Polypeptide*" trong *Polyetylen Glycol Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications*, J. M. Harris, Plenus Press, New York (1992), và trong *Advanced Drug Reviews*, 16:157-182 (1995).

Theo một phương án cụ thể của sáng chế, phần PEG của thể tiếp hợp không có mặt một hoặc nhiều nhóm ưa lipit hữu hiệu để thay đổi ở mức độ đáng kể độ hòa tan trong nước của polyme hoặc thể tiếp hợp polyme-relaxin. Điều đó có nghĩa là, phần polyme hoặc phần không phải relaxin của thể tiếp hợp theo sáng chế có thể chứa nhóm bao gồm các nguyên tử được cho là ưa lipit hơn ưa nước (ví dụ, mạch cacbon có 2 đến 8-12 nguyên tử cacbon), tuy nhiên, nếu sự có mặt của nhóm hoặc các nhóm này là không hữu hiệu để thay đổi ở mức độ đáng kể mức độ ưa nước của polyme hoặc của thể tiếp hợp, thì các gốc như vậy có thể được chứa trong các thể tiếp hợp theo sáng chế. Nghĩa là, thông qua sự đột biến đặc hiệu vị trí của relaxin, các polypeptit relaxin, và các chất tương tự relaxin, chính thể tiếp hợp relaxin theo sáng chế có thể thể hiện ưa nước hơn là ưa lipit hoặc ưa béo. Theo một số phương án, khi gốc ưa chất béo có thể có mặt, tốt hơn nếu gốc này không nằm ở đầu tận cùng của chuỗi PEG,

Các PEG mạch nhánh để sử dụng trong các thể tiếp hợp theo sáng chế bao gồm các PEG đã được bộc lộ trong công bố đơn quốc tế WO 96/21469, toàn bộ nội dung của chúng được kết hợp vào sáng chế bằng cách viện dẫn. Nhìn chung, PEG mạch nhánh có thể có công thức $R(PEG\text{--}OH)_n$, trong đó R là phân tử "nhân" trung tâm và chỉ số dưới n biểu thị số nhánh. PEG mạch nhánh có một nhân trung tâm từ đó mở rộng ra 2 hoặc nhiều nhánh "PEG". Trong cấu hình mạch nhánh, nhân polyme mạch nhánh có một vị trí phản ứng duy nhất để gắn với relaxin. Các PEG mạch nhánh để sử dụng trong sáng chế sẽ thường có ít hơn 4 nhánh PEG, và tốt hơn nữa sẽ có ít hơn 3 nhánh PEG. Các PEG mạch nhánh có lợi thế do có một vị trí phản ứng duy nhất, ghép cặp với một đám mây polyme lớn hơn, dày đặc hơn so với PEG mạch thẳng giống hệt của nó. Một loại PEG mạch nhánh cụ thể có thể được biểu thị dưới dạng $(MeO\text{-}PEG\text{-})_p$ R-X, trong đó p bằng 2 hoặc 3, R là cấu trúc nhân trung tâm như lysin hoặc glyxerol có 2 hoặc 3 nhánh PEG gắn vào nó, và X là nhóm chức thích hợp bất kỳ được hoạt hóa hoặc có thể được hoạt hóa để ghép cặp với relaxin. Một PEG mạch nhánh được đặc biệt ưu tiên là mPEG2-NHS (Shearwater

Corporation, Alabama) có cấu trúc mPEG2-lysin-sucxinimit.

Trong một cấu trúc mạch nhánh khác nữa, "PEG nhô ra" có các nhóm phản ứng để ghép cặp protein nằm dọc theo bộ khung PEG hơn là ở cuối mạch PEG. Các nhóm phản ứng mở rộng ra từ bộ khung PEG để ghép cặp với relaxin có thể là giống nhau hoặc khác nhau. Các cấu trúc PEG nhô ra có thể là hữu hiệu nhưng nhìn chung ít được ưu tiên, đặc biệt là đối với các dược phẩm để xông/khí dung.

Theo cách khác, phần PEG của thể tiếp hợp PEG-relaxin có thể có cấu trúc dạng chạc có phần phân nhánh ở một đầu của chuỗi polyme và hai (hoặc bội số của 2) nhóm phản ứng tự do liên kết với phần mạch nhánh để gắn với relaxin. Ví dụ về các PEG dạng chạc được bộc lộ trong công bố Đơn quốc tế số WO 99/45964, nội dung của tài liệu này được kết hợp vào sáng chế bằng cách viện dẫn. Polyetylen glycol dạng chạc tùy ý có thể có nhóm alkyl hoặc "R" ở đầu đối diện với chuỗi polyme. Cụ thể hơn, thể tiếp hợp PEG-relaxin dạng chạc theo sáng chế có công thức sau: R-PEG-L(Y-relaxin)n, trong đó R là alkyl, L là điểm phân nhánh bền với sự thủy phân và Y là nhóm liên kết tạo ra liên kết hóa học giữa polyme dạng chạc với relaxin, và n là số lớn hơn 2. L có thể là nhóm "nhân" duy nhất, như "-CH-", hoặc có thể có một mạch dài hơn chứa các nguyên tử. Ví dụ về các nhóm L bao gồm lysin, glyxerol, pentaerytritol, hoặc sorbitol. Nhìn chung, nguyên tử phân nhánh cụ thể trong phần phân nhánh là cacbon.

Theo một phương án cụ thể của sáng chế, liên kết của PEG dạng chạc với phân tử relaxin, (Y), là bền với sự thủy phân. Theo phương án được ưu tiên, n bằng 2. Các gốc Y thích hợp, trước khi tiếp hợp với một vị trí phản ứng trên relaxin, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các este hoạt hóa, các cacbonat hoạt hóa, alđehyt, isoxyanat, isothioxyanat, epoxit, rượu, maleimit, vinylsulfon, hyđrazit, đithiopyriđin, và iotaxetamit. Việc chọn nhóm hoạt hóa thích hợp sẽ phụ thuộc vào vị trí gắn kết dự định trên phân tử relaxin và có thể dễ dàng được xác định bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Nhóm Y tương ứng trong thể tiếp hợp PEG-relaxin thu được là thể tiếp hợp mà thu được từ phản ứng của polyme dạng chạc được hoạt hóa với vị trí phản ứng thích hợp trên relaxin. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ biết rõ tính đồng nhất đặc hiệu của liên kết cuối cùng này. Ví dụ, khi PEG phản ứng có cấu trúc dạng chạc chứa este đã được hoạt hóa, như este sucxinimit hoặc maleimit, tiếp hợp thông qua vị trí amin trên relaxin sẽ

dẫn đến sự tạo ra liên kết amit tương ứng. Các polyme dạng chạc cụ thể này là đặc biệt hấp dẫn do chúng tạo ra các thể tiếp hợp có tỷ lệ phân tử gam giữa relaxin và PEG là 2:1 hoặc lớn hơn. Các thể tiếp hợp như vậy có thể ít có khả năng phong bế vị trí thụ thể relaxin, đồng thời vẫn tạo ra tính linh hoạt trong cách bố trí để bảo vệ relaxin khỏi bị phân hủy bởi enzym, ví dụ, bởi enzym phân hủy relaxin.

Theo một phương án, thể tiếp hợp PEG-relaxin dạng chạc có thể được sử dụng trong sáng chế, có công thức: R-[PEG-L(Y-relaxin)2]n. Trong trường hợp này R thể hiện axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên có ít nhất một thể tiếp hợp PEG-đi-relaxin gắn vào nó. Đặc biệt, các polyme dạng chạc được ưu tiên theo khía cạnh này của sáng chế là các polyme, trong đó n được chọn từ nhóm bao gồm 1, 2, 3, 4, 5 và 6. Theo một phương án khác, liên kết hóa học giữa axit amin không có trong tự nhiên trong relaxin, polypeptit relaxin, hoặc chất tương tự relaxin và điểm phân nhánh polyme có thể phân hủy được (tức là không bền với sự thủy phân). Theo cách khác, một hoặc nhiều liên kết có thể phân hủy được có thể có trong bộ khung polyme để cho phép tạo ra thể tiếp hợp PEG-relaxin *in vivo* có chuỗi PEG nhỏ hơn trong thể tiếp hợp được sử dụng ban đầu. Ví dụ, thể tiếp hợp lớn và tương đối trơ (tức là có một hoặc nhiều chuỗi PEG khối lượng phân tử lớn gắn vào nó, ví dụ, một hoặc nhiều chuỗi PEG có khối lượng phân tử lớn hơn khoảng 10.000, trong đó thể tiếp hợp hầu như không có hoạt tính sinh học) có thể được sử dụng, mà tiếp theo trong phổi hoặc trong dòng máu, được thủy phân để tạo ra thể tiếp hợp có hoạt tính sinh học có một phần chuỗi PEG có mặt ban đầu. Bằng cách phân cắt *in vivo* liên kết có thể phân hủy khi thủy phân, relaxin tự do (tùy theo vị trí của liên kết có thể phân hủy) hoặc relaxin có đuôi polyetylen khối lượng phân tử nhỏ gắn với nó, sau đó được giải phóng và hấp thu qua phổi và/hoặc được tuần hoàn trong máu dễ dàng hơn.

Theo một dấu hiệu của phương án này của sáng chế, thể tiếp hợp polyme nguyên vẹn, trước khi thủy phân, được phân hủy tối thiểu trong khi sử dụng, sao cho việc thủy phân liên kết có thể phân cắt là hữu hiệu để khống chế tốc độ giải phóng relaxin có hoạt tính vào dòng máu là chậm, trái với sự phân hủy relaxin bởi enzym trước khi nó giải phóng vào hệ tuần hoàn của cơ thể.

Liên kết có thể phân cắt trong điều kiện sinh lý thích hợp bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, este, cacbonat este, carbamat, sulfat, phosphat, axyloxyalkyl ete, axetal, và

ketal. Các thể tiếp hợp như vậy phải có liên kết có thể phân cắt trong điều kiện sinh lý thích hợp trong khi bảo quản và trong khi sử dụng. Ví dụ, thể tiếp hợp PEG-liên kết có thể phân cắt-relaxin phải duy trì tính nguyên vẹn của nó trong khi sản xuất dược phẩm, trong khi hòa tan trong chất dẫn phân phối thuốc thích hợp, nếu được sử dụng, và trong khi sử dụng bất kể là qua đường nào.

Do đó, theo phương án khác theo sáng chế, một hoặc nhiều axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên được đưa vào một relaxin ở dạng chuỗi đơn hoặc chất tương tự relaxin ở dạng chuỗi đơn.

Theo một số phương án, polypeptit theo sáng chế chứa một hoặc nhiều sự thay thế, sự bổ sung, hoặc khuyết đoạn axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên trong trình tự tín hiệu. Theo một số phương án, polypeptit theo sáng chế chứa một hoặc nhiều sự thay thế, bổ sung hoặc khuyết đoạn axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên trong trình tự tín hiệu của relaxin hoặc các chất tương tự relaxin hoặc các polypeptit bất kỳ trong số các chất đã được bộc lộ trong bản mô tả này. Theo một số phương án, polypeptit theo sáng chế chứa một hoặc nhiều sự thay thế, bổ sung hoặc khuyết đoạn axit amin được mã hóa có trong tự nhiên trong trình tự tín hiệu cũng như một hoặc nhiều sự thay thế, bổ sung hoặc khuyết đoạn axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên trong trình tự tín hiệu của relaxin hoặc các chất tương tự relaxin hoặc các polypeptit bất kỳ trong số các chất đã được bộc lộ trong bản mô tả này. Theo một số phương án, một hoặc nhiều axit amin không có trong tự nhiên được kết hợp trong trình tự dẫn hoặc trình tự tín hiệu của relaxin hoặc các chất tương tự relaxin hoặc các polypeptit bất kỳ trong số các chất đã được bộc lộ trong bản mô tả này.

Theo một số phương án, polypeptit relaxin chứa sự thay thế, bổ sung hoặc khuyết đoạn điều biến ái lực của polypeptit relaxin đối với thụ thể polypeptit relaxin hoặc thành phần liên kết, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, protein, polypeptit, phân tử nhỏ, hoặc axit nucleic. Theo một số phương án, polypeptit relaxin chứa sự thay thế, bổ sung hoặc khuyết đoạn làm tăng độ ổn định của polypeptit relaxin so với độ ổn định của relaxin tương ứng không có sự thay thế, bổ sung hoặc khuyết đoạn. Độ ổn định và/hoặc độ hòa tan có thể được xác định bằng cách sử dụng nhiều thử nghiệm khác nhau mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này đã biết. Các thử nghiệm như vậy bao gồm, nhưng

không chỉ giới hạn ở, phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao SE-HPLC và RP-HPLC. Theo một số phương án, polypeptit relaxin chứa sự thay thế, bổ sung hoặc khuyết đoạn điều biến khả năng sinh miễn dịch của polypeptit relaxin so với khả năng sinh miễn dịch của relaxin tương ứng không có sự thay thế, bổ sung hoặc khuyết đoạn. Theo một số phương án, polypeptit relaxin chứa sự thay thế, bổ sung hoặc khuyết đoạn điều biến thời gian bán thải trong huyết thanh hoặc thời gian tuần hoàn của polypeptit relaxin so với thời gian bán thải trong huyết thanh hoặc thời gian tuần hoàn của relaxin tương ứng không có sự thay thế, bổ sung hoặc khuyết đoạn.

Theo một số phương án, polypeptit relaxin này chứa sự thay thế, bổ sung hoặc khuyết đoạn làm tăng độ hòa tan trong nước của polypeptit relaxin so với độ hòa tan trong nước của relaxin tương ứng không có sự thay thế, bổ sung hoặc khuyết đoạn. Theo một số phương án, polypeptit relaxin này chứa sự thay thế, bổ sung hoặc khuyết đoạn làm tăng độ hòa tan của polypeptit relaxin được tạo ra trong tế bào vật chủ so với độ hòa tan của relaxin tương ứng không có sự thay thế, bổ sung hoặc khuyết đoạn. Theo một số phương án, polypeptit relaxin này chứa sự thay thế, bổ sung hoặc khuyết đoạn làm tăng sự biểu hiện của polypeptit relaxin trong tế bào vật chủ hoặc làm tăng sự tổng hợp *in vitro* so với sự biểu hiện hoặc sự tổng hợp của relaxin tương ứng không có sự thay thế, bổ sung hoặc khuyết đoạn. Polypeptit relaxin chứa sự thay thế như vậy vẫn giữ được hoạt tính của chất chủ vận và vẫn giữ được hoặc làm tăng mức biểu hiện ở tế bào chủ. Theo một số phương án, polypeptit relaxin này chứa sự thay thế, bổ sung hoặc khuyết đoạn làm tăng tính kháng proteaza của polypeptit relaxin này so với tính kháng proteaza của relaxin tương ứng không có sự thay thế, bổ sung hoặc khuyết đoạn. Theo một số phương án, polypeptit relaxin này chứa sự thay thế, bổ sung hoặc khuyết đoạn điều biến hoạt tính tải nạp tín hiệu của thụ thể relaxin so với hoạt tính của thụ thể khi tương tác với polypeptit relaxin tương ứng không có sự thay thế, bổ sung hoặc khuyết đoạn. Theo một số phương án, polypeptit relaxin này chứa sự thay thế, bổ sung hoặc khuyết đoạn điều biến sự gắn kết của nó với một phân tử khác như thụ thể so với sự gắn kết của polypeptit relaxin tương ứng không có sự thay thế, bổ sung hoặc khuyết đoạn. Theo một số phương án, polypeptit relaxin này chứa sự thay thế, bổ sung hoặc khuyết đoạn điều biến hoạt tính chống virut của nó so với hoạt tính chống virut của polypeptit relaxin tương ứng không có sự thay thế, bổ sung hoặc khuyết đoạn. Theo một số phương án, polypeptit relaxin này chứa sự thay thế, bổ sung

hoặc khuyết đoạn làm gia tăng hoạt tính chuyển hóa glucoza của nó so với hoạt tính chuyển hóa glucoza của polypeptit relaxin tương ứng không có sự thay thế, bổ sung hoặc khuyết đoạn.

Theo một số phương án, polypeptit relaxin này chứa sự thay thế, bổ sung hoặc khuyết đoạn làm tăng khả năng tương thích của polypeptit relaxin này với chất bảo quản dùng trong dược phẩm (ví dụ, m-cresol, phenol, rượu benzylic) so với khả năng tương thích của relaxin tương ứng không có sự thay thế, bổ sung hoặc khuyết đoạn. Khả năng tương thích gia tăng như vậy cho phép bào chế dược phẩm được bảo quản đồng thời duy trì các đặc tính hóa lý và hoạt tính sinh học của protein trong khi bảo quản.

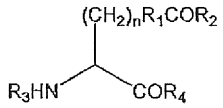
Theo một số phương án, một hoặc nhiều liên kết được thiết kế được tạo ra với một hoặc nhiều axit amin không có trong tự nhiên. Liên kết nội phân tử có thể được tạo ra theo nhiều cách, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, phản ứng giữa hai axit amin trong protein trong các điều kiện thích hợp (một hoặc cả hai axit amin có thể là axit amin không có trong tự nhiên); phản ứng của hai axit amin, mà mỗi axit amin có thể được mã hóa có trong tự nhiên hoặc được mã hóa không có trong tự nhiên, với nhóm liên kết, polyme, hoặc phân tử khác trong các điều kiện thích hợp; v.v..

Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thay thế axit amin trong polypeptit relaxin có thể là sự thay thế bằng một hoặc nhiều axit amin được mã hóa có trong tự nhiên hoặc không có trong tự nhiên. Theo một số phương án, sự thay thế các axit amin trong polypeptit relaxin có thể là sự thay thế bằng axit amin được mã hóa có trong tự nhiên hoặc không có trong tự nhiên, với điều kiện ít nhất một sự thay thế này là sự thay thế bằng axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thay thế axit amin trong polypeptit relaxin có thể là sự thay thế bằng một hoặc nhiều axit amin có trong tự nhiên, và ngoài ra ít nhất một sự thay thế là sự thay thế bằng axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên.

Theo một số phương án, axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên chứa nhóm carbonyl, nhóm axetyl, nhóm aminooxy, nhóm hyđrazin, nhóm hyđrazit, nhóm semicarbazit, nhóm azit, hoặc nhóm alkyn.

Theo một số phương án, axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên chứa

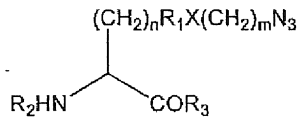
nhóm carbonyl. Theo một số phương án, axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên có công thức:



trong đó n bằng 0 đến 10; R_1 là alkyl, aryl, alkyl được thế, hoặc aryl được thế; R_2 là H, alkyl, aryl, alkyl được thế, và aryl được thế; và R_3 là H, axit amin, polypeptit, hoặc nhóm cải biến đầu tận cùng amino, và R_4 là H, axit amin, polypeptit, hoặc nhóm cải biến đầu tận cùng carboxy.

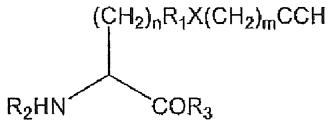
Theo một số phương án, axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên chứa nhóm aminooxy. Theo một số phương án, axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên chứa nhóm hyđrazit. Theo một số phương án, axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên chứa nhóm hyđrazin. Theo một số phương án, gốc axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên chứa nhóm semicarbazit.

Theo một số phương án, gốc axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên chứa nhóm azit. Theo một số phương án, axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên có công thức:



trong đó n bằng 0 đến 10; R_1 là alkyl, aryl, alkyl được thế, aryl được thế hoặc không có mặt; X là O, N, S hoặc không có mặt; m bằng 0 đến 10; R_2 là H, axit amin, polypeptit, hoặc nhóm cải biến đầu tận cùng amino, và R_3 là H, axit amin, polypeptit, hoặc nhóm cải biến đầu tận cùng carboxy.

Theo một số phương án, axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên chứa nhóm alkyn. Theo một số phương án, axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên có công thức:



trong đó n bằng 0 đến 10; R_1 là alkyl, aryl, alkyl được thế, hoặc aryl được thế; X là 0, N, S hoặc không có mặt; m bằng 0 đến 10, R_2 là H, axit amin, polypeptit, hoặc nhóm cải biến đầu tận cùng amino, và R_3 là H, axit amin, polypeptit, hoặc nhóm cải biến đầu tận cùng carboxy.

Theo một số phương án, polypeptit là chất chủ vận polypeptit relaxin, chất chủ vận một phần, chất đối kháng, chất đối kháng một phần, hoặc chất chủ vận ngược. Theo một số phương án, chất chủ vận polypeptit relaxin, chất chủ vận một phần, chất đối kháng, chất đối kháng một phần, hoặc chất chủ vận ngược chứa axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên liên kết với polyme hòa tan trong nước. Theo một số phương án, polyme hòa tan trong nước chứa gốc poly(etylen glycol). Theo một số phương án, chất chủ vận polypeptit relaxin, chất chủ vận một phần, chất đối kháng, chất đối kháng một phần, hoặc chất chủ vận ngược chứa axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên và một hoặc nhiều cải biến sau dịch mã, nhóm liên kết, polyme, hoặc phân tử có hoạt tính sinh học.

Sáng chế cũng đề cập đến các axit nucleic phân lập được chứa polynucleotit lai trong các điều kiện nghiêm ngặt với các axit nucleic mã hóa các polypeptit relaxin có trình tự SEQ ID NO.1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, và 12. Sáng chế cũng đề cập đến các axit nucleic phân lập được chứa polynucleotit lai trong các điều kiện nghiêm ngặt với các axit nucleic mã hóa các polypeptit relaxin có trình tự SEQ ID NO.1 và 2. Sáng chế cũng đề cập đến các axit nucleic phân lập được chứa polynucleotit hoặc polynucleotit lai trong các điều kiện nghiêm ngặt với các polynucleotit mã hóa các polypeptit có trình tự SEQ ID NO.1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, và 12, trong đó polynucleotit này chứa ít nhất một bộ ba mã hóa chọn lọc. Sáng chế cũng đề cập đến các axit nucleic phân lập được chứa polynucleotit hoặc các polynucleotit lai trong các điều kiện nghiêm ngặt với các polynucleotit mã hóa các polypeptit có trình tự SEQ ID NO.1 và 2, trong đó polynucleotit này chứa ít nhất một bộ ba mã hóa chọn lọc. Sáng chế đề xuất các axit nucleic phân lập được chứa polynucleotit mã hóa các polypeptit có trình tự SEQ ID NO.1 và 2. Sáng chế cũng đề cập đến các axit nucleic phân lập được chứa polynucleotit mã hóa các polypeptit

có trình tự SEQ ID NO.1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, và 12. Sáng chế đề xuất các axit nucleic phân lập được chứa polynucleotit mã hóa các polypeptit có trình tự SEQ ID NO.1 và 2 với một hoặc nhiều axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên. Sáng chế cũng đề cập đến các axit nucleic phân lập được chứa polynucleotit mà mã hóa các polypeptit có trình tự SEQ ID NO.1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, và 12 có một hoặc nhiều axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này dễ dàng hiểu ra rằng nhiều polynucleotit khác nhau có thể mã hóa polypeptit bất kỳ theo sáng chế.

Theo một số phương án, bộ ba mã hóa chọn lọc được chọn từ nhóm bao gồm bộ ba mã hóa amber, bộ ba mã hóa ochre, bộ ba mã hóa opal, bộ ba mã hóa duy nhất, bộ ba mã hóa hiếm gặp, bộ ba mã hóa năm bazơ, và bộ ba mã hóa bốn bazơ.

Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp sản xuất polypeptit relaxin liên kết với polyme hòa tan trong nước. Theo một số phương án, phương pháp này bao gồm bước cho polypeptit relaxin phân lập được chứa axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên tiếp xúc với polyme hòa tan trong nước chứa gốc phản ứng với axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên. Theo một số phương án, axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên được kết hợp vào polypeptit relaxin này có hoạt tính đối với polyme hòa tan trong nước mà theo cách khác không có hoạt tính đối với axit main bất kỳ trong số 20 axit amin phổ biến. Theo một số phương án, axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên được kết hợp vào polypeptit relaxin có hoạt tính đối với nhóm liên kết, polyme, hoặc phân tử có hoạt tính sinh học mà theo cách khác không có hoạt tính đối với axit amin bất kỳ trong số 20 axit amin phổ biến.

Theo một số phương án, polypeptit relaxin liên kết với polyme hòa tan trong nước được tạo ra bằng cách cho polypeptit relaxin chứa axit amin chứa carbonyl phản ứng với phân tử poly(etylen glycol) chứa nhóm aminooxy, hyđrazin, hyđrazit hoặc semicarbazit. Theo một số phương án, nhóm aminooxy, hyđrazin, hyđrazit hoặc semicarbazit được liên kết với phân tử poly(etylen glycol) thông qua liên kết amit. Theo một số phương án, aminooxy, hyđrazin, hyđrazit hoặc nhóm semicarbazit được liên kết với phân tử poly(etylen glycol) thông qua liên kết carbamat.

Theo một số phương án, polypeptit relaxin liên kết với polyme hòa tan trong nước được tạo ra bằng cách cho phân tử poly(etylen glycol) chứa nhóm carbonyl phản ứng với polypeptit chứa axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên chứa nhóm aminooxy, hyđrazin, hyđrazit hoặc semicarbazit.

Theo một số phương án, polypeptit relaxin liên kết với polyme hòa tan trong nước được tạo ra bằng cách cho polypeptit relaxin chứa axit amin chứa alkyn phản ứng với phân tử poly(etylen glycol) chứa nhóm azit. Theo một số phương án, nhóm azit hoặc alkyn được liên kết với phân tử poly (etylen glycol) thông qua liên kết amit.

Theo một số phương án, polypeptit relaxin được liên kết với polyme hòa tan trong nước được tạo ra bằng cách cho polypeptit relaxin chứa axit amin chứa azit phản ứng với phân tử poly(etylen glycol) chứa nhóm alkyn. Theo một số phương án, nhóm azit hoặc nhóm alkyn được liên kết với phân tử poly(etylen glycol) thông qua liên kết amit.

Theo một số phương án, phân tử poly(etylen glycol) có khối lượng phân tử nằm trong khoảng từ 0,1kDa đến 100kDa. Theo một số phương án, phân tử poly(etylen glycol) có khối lượng phân tử nằm trong khoảng từ 0,1kDa đến 50kDa.

Theo một số phương án, phân tử poly(etylen glycol) là polyme mạch nhánh. Theo một số phương án, mỗi nhánh của polyme mạch nhánh poly(etylen glycol) có khối lượng phân tử nằm trong khoảng từ 1kDa đến 100kDa, hoặc nằm trong khoảng từ 1kDa đến 50kDa.

Theo một số phương án, polyme hòa tan trong nước liên kết với polypeptit relaxin này chứa nhóm polyalkylen glycol. Theo một số phương án, gốc axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên được kết hợp vào polypeptit relaxin chứa nhóm carbonyl, nhóm aminooxy, nhóm hyđrazit, hyđrazin, nhóm semicarbazit, nhóm azit, hoặc nhóm alkyn. Theo một số phương án, gốc axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên được kết hợp vào polypeptit relaxin chứa nhóm carbonyl và polyme hòa tan trong nước chứa nhóm aminooxy, hyđrazit, hyđrazin, hoặc semicarbazit. Theo một số phương án, gốc axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên được kết hợp vào polypeptit relaxin này chứa nhóm alkyn và polyme hòa tan trong nước chứa nhóm azit. Theo một số phương án, gốc axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên được kết hợp vào polypeptit relaxin này chứa

nhóm azit và polyme hòa tan trong nước chứa nhóm alkyn.

Sáng chế cũng đề cập đến dược phẩm chứa polypeptit relaxin chứa axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên và chất mang dược dụng. Theo một số phương án, axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên này liên kết với polyme hòa tan trong nước.

Sáng chế cũng đề cập đến tế bào chứa polynucleotit mã hóa polypeptit relaxin chứa bộ ba mã hóa chọn lọc. Theo một số phương án, các tế bào bao gồm ARN synthetaza trực giao và/hoặc ARN vận chuyển trực giao để thay thế axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên vào polypeptit relaxin.

Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp tổng hợp polypeptit relaxin chứa axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên. Theo một số phương án, phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy tế bào chứa polynucleotit hoặc polynucleotit mã hóa polypeptit relaxin, ARN synthetaza trực giao và/hoặc ARN vận chuyển trực giao trong các điều kiện cho phép biểu hiện polypeptit relaxin; và tinh chế polypeptit relaxin từ các tế bào và/hoặc môi trường nuôi cấy.

Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp gia tăng thời gian bán thải trong điều trị, thời gian bán thải trong huyết thanh hoặc thời gian tuần hoàn của các polypeptit relaxin. Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp điều biến khả năng sinh miễn dịch của các polypeptit relaxin. Theo một số phương án, phương pháp này bao gồm bước thay thế một axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên cho một hoặc nhiều axit amin bất kỳ trong các polypeptit relaxin tự nhiên và/hoặc liên kết polypeptit relaxin với nhóm liên kết, polyme, polyme hòa tan trong nước, hoặc phân tử có hoạt tính sinh học.

Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp điều trị bệnh cho bệnh nhân cần điều trị bệnh bằng lượng hữu hiệu phân tử relaxin theo sáng chế. Theo một số phương án, phương pháp này bao gồm việc cho bệnh nhân dùng dược phẩm chứa polypeptit relaxin chứa axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên và chất mang dược dụng với lượng hữu hiệu có tác dụng điều trị bệnh. Theo một số phương án, axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên được liên kết với polyme hòa tan trong nước. Theo một số phương án, polypeptit relaxin được glycosyl hóa. Theo một số phương án, polypeptit relaxin không được glycosyl hóa.

Sáng chế cũng đề cập đến các polypeptit relaxin chứa trình tự SEQ ID NO.1 và 2, hoặc trình tự polypeptit relaxin bất kỳ khác (ví dụ không giới hạn phạm vi của sáng chế về các trình tự này là các trình tự SEQ ID NO.3 đến SEQ ID NO.12) chỉ khác là ít nhất một axit amin được thế bằng axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên. Theo một số phương án, axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên được liên kết với polyme hòa tan trong nước. Theo một số phương án, polyme hòa tan trong nước chứa gốc poly(etylen glycol). Theo một số phương án, axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên chứa nhóm carbonyl, nhóm aminooxy, nhóm hyđrazit, nhóm hyđrazin, nhóm semicarbazit, nhóm azit, hoặc nhóm alkyn.

Sáng chế cũng đề cập đến các dược phẩm chứa chất mang dược dụng và polypeptit relaxin chứa trình tự SEQ ID NO.1 đến SEQ ID NO.12, hoặc trình tự polypeptit relaxin bất kỳ khác, trong đó ít nhất một axit amin được thế bằng axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên. Sáng chế cũng đề cập đến các dược phẩm chứa chất mang dược dụng và polypeptit relaxin chứa chuỗi A và B (ví dụ, trình tự SEQ ID NO.1, 2, và 3; trình tự SEQ ID NO.4 và 5 hoặc 4 và 6 sẽ tạo ra relaxin, v.v.), hoặc trình tự polypeptit relaxin bất kỳ khác, trong đó ít nhất một axit amin được thế bằng axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên. Sáng chế cũng đề cập đến các dược phẩm chứa chất mang dược dụng và polypeptit relaxin chứa trình tự SEQ ID NO.1, 2, và/hoặc 3. Sáng chế cũng đề cập đến các dược phẩm chứa chất mang dược dụng và polypeptit relaxin chứa trình tự SEQ ID NO.1 đến 3. Theo một số phương án, axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên chứa gốc sacarit. Theo một số phương án, polyme hòa tan trong nước được liên kết với polypeptit nhờ gốc sacarit. Theo một số phương án, nhóm liên kết, polyme, hoặc phân tử có hoạt tính sinh học được liên kết với polypeptit relaxin nhờ gốc sacarit.

Sáng chế cũng đề cập đến polypeptit relaxin chứa polyme hòa tan trong nước được liên kết với polypeptit relaxin bằng liên kết cộng hóa trị ở một axit amin duy nhất. Theo một số phương án, polyme hòa tan trong nước chứa gốc poly(etylen glycol). Theo một số phương án, axit amin được liên kết đồng hóa trị với polyme hòa tan trong nước là axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên có mặt trong polypeptit.

Sáng chế đề cập đến polypeptit relaxin chứa ít nhất một nhóm liên kết, polyme, hoặc phân tử có hoạt tính sinh học, trong đó nhóm liên kết, polyme, hoặc phân tử có hoạt

tính sinh học này được gắn vào polypeptit thông qua một nhóm chức bao gồm axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên được kết hợp thông qua ribosom vào polypeptit. Theo một số phương án, polypeptit được monoPEGyl hóa. Sáng chế cũng đề cập đến polypeptit relaxin chứa nhóm liên kết, polyme, hoặc phân tử có hoạt tính sinh học được gắn vào một hoặc nhiều axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên, trong đó axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên này được kết hợp thông qua ribosom vào polypeptit ở vị trí chọn trước.

Thuộc phạm vi của sáng chế là trình tự dẫn relaxin hoặc trình tự tín hiệu, ví dụ về chúng có thể là proinulin. Trình tự dẫn khác loài hoặc trình tự tín hiệu được chọn phải là trình tự được nhận biết và xử lý, ví dụ, bởi hệ thống tiết trong tế bào vật chủ để tiết ra và có thể được phân cắt bằng peptiđaza tín hiệu, bởi tế bào chủ. Phương pháp điều trị tình trạng bệnh lý hoặc rối loạn bằng relaxin hoặc polypeptit relaxin hoặc chất tương tự theo sáng chế có nghĩa là điều trị bệnh bằng relaxin có hoặc không có peptit tín hiệu hoặc peptit dẫn.

Sáng chế cũng đề cập đến các phương pháp gây ra sự tăng chuyển hóa glucoza, phương pháp này bao gồm bước sử dụng relaxin cho tế bào đã nêu với lượng hữu hiệu để gây ra sự tăng hoạt tính trao đổi chất của glucoza.

Theo phương án khác, việc tiếp hợp giữa polypeptit relaxin chứa một hoặc nhiều axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên với một phân tử khác, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, PEG, việc tạo ra relaxin hầu như tinh khiết do sử dụng phản ứng hóa học duy nhất để tiếp hợp với axit amin không có trong tự nhiên. Việc tiếp hợp giữa relaxin chứa một hoặc nhiều axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên với một phân tử khác, như PEG, có thể được thực hiện bằng các phương pháp tinh chế khác được thực hiện trước hoặc sau bước tiếp hợp để tạo ra relaxin hầu như tinh khiết.

Thuật ngữ

Cần hiểu rằng sáng chế không chỉ giới hạn ở các phương pháp, quy trình, dòng tế bào, cấu trúc, và các chất phản ứng cụ thể được bộc lộ trong bản mô tả này và các phương pháp, quy trình, dòng tế bào, cấu trúc, và các chất phản ứng như vậy có thể thay đổi. Cũng cần hiểu rằng thuật ngữ được sử dụng trong bản mô tả này chỉ nhằm mục đích mô

tả các phương án cụ thể, và không nhằm giới hạn phạm vi của sáng chế, mà sẽ được giới hạn bởi các điểm yêu cầu bảo hộ kèm theo.

Được sử dụng trong bản mô tả này và trong các điểm yêu cầu bảo hộ kèm theo, các dạng số ít "một" bao gồm việc viện dẫn đến cả số nhiều trừ khi tình huống này được chỉ rõ theo cách khác. Do đó, ví dụ, việc viện dẫn đến "relaxin" hoặc "polypeptit relaxin" và các dạng lai và chưa lai khác là viện dẫn đến một hoặc nhiều protein như vậy và bao gồm các dạng tương đương của chúng mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này đã biết, và các dạng tương tự.

Trừ khi có quy định khác, tất cả thuật ngữ phương pháp và thuật ngữ khoa học được dùng trong bản mô tả này có cùng nghĩa như được hiểu theo cách thông thường bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực phương pháp của sáng chế. Mặc dù các phương pháp, thiết bị, và nguyên liệu bất kỳ tương tự hoặc tương đương với các phương pháp, thiết bị và nguyên liệu được bộc lộ trong bản mô tả này có thể được sử dụng trong thực hành hoặc thử nghiệm sáng chế, các phương pháp, thiết bị và nguyên liệu được ưu tiên được mô tả dưới đây.

Tất cả các công bố và patent nêu trong bản mô tả được kết hợp vào sáng chế bằng cách viện dẫn nhằm mục đích mô tả và bộc lộ, ví dụ, cấu trúc và phương pháp được bộc lộ trong các công bố này, mà có thể được sử dụng liên quan đến sáng chế hiện được mô tả. Tất cả các công bố được bàn luận trong bản mô tả này được đưa vào chỉ do chúng được bộc lộ trước ngày nộp đơn của đơn yêu cầu cấp bằng độc quyền sáng chế này. Không có gì trong bản mô tả này được hiểu như một sự thừa nhận rằng các tác giả sáng chế không được hưởng ngày ưu tiên sớm hơn ngày bộc lộ của giải pháp phương pháp đã biết hoặc vì bất cứ lý do nào khác.

Thuật ngữ "hầu như tinh khiết" được sử dụng trong bản mô tả để chỉ polypeptit relaxin có thể hầu như hoặc về cơ bản không chứa các thành phần thông thường đi kèm với hoặc tương tác với protein được tìm thấy trong môi trường tự nhiên của nó, tức là tế bào nguyên thể, hoặc tế bào vật chủ trong trường hợp các polypeptit relaxin được tạo ra theo phương pháp tái tổ hợp. Relaxtrong polypeptit có thể hầu như không chứa vật liệu tế bào bao gồm các chế phẩm chứa protein với lượng nhỏ hơn khoảng 30%, nhỏ hơn khoảng

25%, nhỏ hơn khoảng 20%, nhỏ hơn khoảng 15%, nhỏ hơn khoảng 10%, nhỏ hơn khoảng 5%, nhỏ hơn khoảng 4%, nhỏ hơn khoảng 3%, nhỏ hơn khoảng 2%, hoặc nhỏ hơn khoảng 1% (tính theo trọng lượng khô) protein tạp nhiễm. Khi polypeptit relaxin hoặc biến thể của chúng được tạo ra theo phương pháp tái tổ hợp bởi tế bào chủ, protein có thể có mặt với lượng khoảng 30%, khoảng 25%, khoảng 20%, khoảng 15%, khoảng 10%, khoảng 5%, khoảng 4%, khoảng 3%, khoảng 2%, hoặc khoảng 1% hoặc thấp hơn trọng lượng khô của các tế bào. Khi polypeptit relaxin hoặc biến thể của chúng được tạo ra theo phương pháp tái tổ hợp bởi tế bào chủ, protein có thể có trong môi trường nuôi cấy với lượng khoảng 5g/L, khoảng 4g/L, khoảng 3g/L, khoảng 2g/L, khoảng lg/L, khoảng 750mg/L, khoảng 500mg/L, khoảng 250mg/L, khoảng 100mg/L, khoảng 50mg/L, khoảng 10mg/L, hoặc khoảng lmg/L hoặc thấp hơn trọng lượng khô của các tế bào. Do đó, polypeptit relaxin "hầu như tinh khiết" như được tạo ra theo các phương pháp theo sáng chế có thể có mức độ tinh khiết ít nhất khoảng 30%, ít nhất khoảng 35%, ít nhất khoảng 40%, ít nhất khoảng 45%, ít nhất khoảng 50%, ít nhất khoảng 55%, ít nhất khoảng 60%, ít nhất khoảng 65%, ít nhất khoảng 70%, cụ thể là mức độ tinh khiết ít nhất khoảng 75%, 80%, 85%, và cụ thể hơn, mức độ tinh khiết ít nhất khoảng 90%, mức độ tinh khiết ít nhất khoảng 95%, mức độ tinh khiết ít nhất khoảng 99% hoặc lớn hơn như được xác định theo các phương pháp thích hợp như phân tích SDS/PAGE, RP-HPLC, SEC, và điện di mao dẫn.

Thuật ngữ "tế bào vật chủ tái tổ hợp" hoặc "tế bào chủ" được sử dụng trong bản mô tả để chỉ tế bào chứa polynucleotit ngoại sinh, bất kể là phương pháp được sử dụng để cài xen, ví dụ, hấp thu trực tiếp, tải nạp, ghép đôi f, hoặc các phương pháp khác đã biết trong lĩnh vực này để tạo ra các tế bào vật chủ tái tổ hợp. Polynucleotit ngoại sinh có thể được duy trì như một vectơ không hợp nhất, ví dụ, plasmit, hoặc theo cách khác, có thể được hợp nhất vào bộ gen của vật chủ.

Thuật ngữ "môi trường" hoặc "các môi trường" được sử dụng trong bản mô tả này để chỉ môi trường nuôi cấy bất kỳ, chất mang dạng dung dịch, rắn, bán rắn, hoặc cứng có thể mang hoặc chứa tế bào vật chủ bất kỳ, bao gồm các tế bào vật chủ vi khuẩn, các tế bào vật chủ nấm men, các tế bào vật chủ côn trùng, các tế bào vật chủ thực vật, các tế bào vật chủ của sinh vật nhân thật, các tế bào vật chủ của động vật có vú, tế bào CHO, các tế

bào vật chủ của sinh vật nhân sơ, các tế bào vật chủ *E. coli*, hoặc *Pseudomonas*, và thành phần tế bào. Do đó, thuật ngữ này có thể bao gồm môi trường trong đó tế bào vật chủ đã được phát triển, ví dụ, môi trường trong đó polypeptit relaxin được tiết vào, bao gồm môi trường trước hoặc sau bước tăng sinh. Thuật ngữ này cũng có thể bao gồm dung dịch đệm hoặc các chất phản ứng chứa dung dịch dung giải tế bào chủ, như trong trường hợp khi polypeptit relaxin được tạo ra trong tế bào và tế bào vật chủ được dung giải hoặc được phá vỡ để giải phóng polypeptit relaxin.

Thuật ngữ "chất khử" được sử dụng trong bản mô tả này đối với quá trình gấp nếp lại của protein, được xác định là hợp chất hoặc nguyên liệu bất kỳ duy trì các nhóm sulfhyđryl ở trạng thái khử và khử các liên kết đisulfua nội phân tử hoặc giữa các phân tử. Các chất khử thích hợp bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, đithiothreitol (DTT), 2-mercaptoetanol, đithioerytritol, xystein, xysteamin (2-aminoetanthiol), và glutathion đã được khử. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này dễ dàng thấy rõ rằng nhiều loại chất khử là thích hợp để dùng trong các phương pháp và các dược phẩm theo sáng chế.

Thuật ngữ "chất oxy hóa" được sử dụng trong bản mô tả đối với quá trình gấp nếp lại của protein được xác định là hợp chất hoặc nguyên liệu bất kỳ có khả năng loại bỏ một điện tử ra khỏi hợp chất được oxy hóa. Các chất oxy hóa thích hợp bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, glutathion được oxy hóa, xystin, xystamin, đithiothreitol được oxy hóa, erythreitol được oxy hóa, và oxy. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này dễ dàng thấy rõ rằng nhiều loại chất oxy hóa là thích hợp để dùng trong các phương pháp theo sáng chế.

Thuật ngữ "tác nhân làm biến tính " hoặc "chất làm biến tính" được sử dụng trong bản mô tả được xác định là hợp chất hoặc nguyên liệu bất kỳ gây ra sự không gấp nếp thuận nghịch của protein. Độ mạnh của tác nhân làm biến tính hoặc chất làm biến tính sẽ được xác định đồng thời bởi các tính chất và nồng độ của tác nhân làm biến tính hoặc chất làm biến tính cụ thể. Các tác nhân làm biến tính hoặc chất làm biến tính thích hợp có thể là tác nhân chaotrop (cơ chất sản sinh ra ion làm tan màng sinh học), các chất tẩy rửa, các dung môi hữu cơ, các dung môi có thể trộn lẫn với nước, phospholipit, hoặc kết hợp hai hoặc nhiều trong số các tác nhân này. Tác nhân chaotrop thích hợp bao gồm, nhưng

không chỉ giới hạn ở, ure, guaniđin, và natri thioxyanat. Các chất tẩy rửa hữu dụng có thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các chất tẩy rửa mạnh như natri đođexyl sulfat, hoặc polyoxyetylen ete (ví dụ, các chất tẩy rửa Tween hoặc Triton), Sarkosyl, các chất tẩy rửa nhẹ có bản chất không ion (ví dụ, đigitonin), các chất tẩy rửa nhẹ có bản chất cation như N-2,3-(đioleyoxy)-propyl-N,N,N-trimetylamoni, các chất tẩy rửa nhẹ có bản chất ion (ví dụ, natri cholat hoặc natri đeoxycholat) hoặc các chất tẩy rửa ion lưỡng tính bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, sulfobetain (Zwittergent), 3-(3-clolamiđopropyl)đimetylammonio-1-propan sulfat (CHAPS), và 3-(3-clolamiđopropyl)đimetylammonio-2-hyđroxy-1-propan sulfonat (CHAPSO). Các dung môi hữu cơ có thể trộn lẫn với nước như axetonitril, alkanol thấp (đặc biệt là C2 - C4 alkanol như etanol hoặc isopropanol), hoặc alkanđiol thấp (đặc biệt là C2 - C4 alkanđiol như etylen-glycol) có thể được sử dụng làm chất làm biến tính. Phospholipit hữu dụng theo sáng chế có thể là phospholipit có trong tự nhiên như phosphatiđyletanolamin, phosphatiđylcholin, phosphatiđylserin, và phosphatiđylinositol hoặc các dẫn xuất phospholipit tổng hợp hoặc các biến thể như đihexanoylphosphatiđylcholin hoặc điheptanoylphosphatiđylcholin.

Thuật ngữ "quá trình gấp nếp lại" được sử dụng trong bản mô tả này để chỉ quy trình, phản ứng hoặc phương pháp bất kỳ biến đổi liên kết đisulfua chứa các polypeptit từ trạng thái được gấp nếp không thích hợp hoặc trạng thái chưa được gấp nếp thành dạng được gấp nếp tự nhiên hoặc thích hợp đối với liên kết đisulfua.

Thuật ngữ "đồng gấp nếp" được sử dụng trong bản mô tả này để chỉ các quá trình, các phản ứng, hoặc các phương pháp gấp nếp lại sử dụng ít nhất hai polypeptit tương tác với nhau và gây ra sự biến đổi các polypeptit chưa được gấp nếp hoặc được gấp nếp không thích hợp thành các polypeptit tự nhiên, được gấp nếp thích hợp.

Thuật ngữ "proinsulin" được sử dụng trong bản mô tả là protein liên kết ngang một cách thích hợp có công thức: B-C-A,

trong đó:

A là chuỗi A của relaxin hoặc dẫn xuất chức của nó;

B là chuỗi B của relaxin hoặc dẫn xuất chức của nó có nhóm .epsilon.-amino; và

C là peptit liên kết của proinsulin. Tốt hơn, nếu proinsulin là chuỗi A của relaxin của người, chuỗi B của relaxin của người, và C là peptit liên kết có trong tự nhiên. Khi proinsulin là trình tự có trong tự nhiên, proinsulin có ba nhóm amin tự do: Phenylalanin(l) (nhóm .alpha.-amino), Lysin(29) (nhóm .epsilon.-amino) và Lysin(64) (nhóm .epsilon.-amino).

Thuật ngữ "chất tương tự relaxin " được sử dụng trong bản mô tả là protein liên kết ngang một cách thích hợp có hoạt tính relaxin có công thức:

A-B

trong đó:

A là chuỗi A của relaxin hoặc dẫn xuất chức của chuỗi A của relaxin; và B là chuỗi B của relaxin hoặc dẫn xuất chức của chuỗi B của relaxin có nhóm .epsilon.-amino và ít nhất một trong số A hoặc B chứa sự cải biến axit amin từ trình tự có trong tự nhiên.

Trong bản mô tả này, bất cứ khi nào thuật ngữ relaxin được sử dụng ở nghĩa số nhiều hoặc số ít, nó bao gồm cả insulin có trong tự nhiên và các chất tương tự relaxin và các dẫn xuất của chúng. Thuật ngữ "polypeptit relaxin" được sử dụng trong bản mô tả có nghĩa là hợp chất có cấu trúc phân tử tương tự như cấu trúc phân tử của relaxin của người có cấu nối đisulfua giữa Cys.sup.A7 và Cys,sup.B7 và giữa Cys.sup.A20 và Cys,sup.B19 và cầu nối đisulfua nội phân tử giữa Cys.sup.A6 và Cys.sup.A11, và có hoạt tính relaxin.

Thuật ngữ "relaxin" được sử dụng trong bản mô tả để chỉ relaxin của người có trình tự axit amin và cấu trúc không gian đã biết rõ. Relaxin của người bao gồm chuỗi A có hai mươi mốt axit amin và chuỗi B có ba mươi axit amin được liên kết mang bằng các liên kết đisulfua. Relaxin liên kết ngang thích hợp chứa ba cầu nối đisulfua: một cầu nối giữa vị trí 7 của chuỗi A và vị trí 7 của chuỗi B, cấu nối thứ hai giữa vị trí 20 của chuỗi A và vị trí 19 của chuỗi B, và cầu nối thứ ba giữa vị trí 6 và 11 của chuỗi A [Nicol, S. H. W. and Smith, L. F., *Nature*, 187, 483-485 (1960)].

Các peptit relaxin bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, relaxin của người; relaxin của lợn; IGF-1 của người; yếu tố sinh trưởng II tương tự relaxin (69-84); yếu tố sinh trưởng II tương tự pro-relaxin (68-102) của người; yếu tố sinh trưởng II (105-128) tương

tự pro-relaxin của người; [AspB28]-relaxin của người; [LysB28]-relaxin của người; [LeuB28]-relaxin của người; [ValB28]-relaxin của người; [AlaB28]-relaxin của người; [AspB28, ProB29]-relaxin của người; [LysB28, ProB29]-relaxin của người; [LeuB28, ProB29]-relaxin của người; [ValB28, ProB29]-relaxin của người; [AlaB28, ProB29]-relaxin của người; [GlyA21]-relaxin của người; [GlyA21 GlnB 3]-relaxin của người; [AlaA21]-relaxin của người; [AlaA21 Gln.sup.B3] relaxin của người; [GlnB3]-relaxin của người; [GlnB30]-relaxin của người; [GlyA21 GluB30]-relaxin của người; [GlyA21 GlnB3 GluB30]-relaxin của người; [GlnB3 GluB30]-relaxin của người; B22-B30 relaxin của người; B23-B30 relaxin của người; B25-B30 relaxin của người; B26-B30 relaxin của người; B27-B30 relaxin của người; B29- B30 relaxin của người; chuỗi A của relaxin của người, và chuỗi B của relaxin của người.

Thuật ngữ "chất tương tự relaxin" được sử dụng trong bản mô tả để chỉ protein có chuỗi A và chuỗi B hầu như lần lượt có cùng trình tự axit amin như chuỗi A và/hoặc chuỗi B của relaxin của người, nhưng khác với chuỗi A và chuỗi B của relaxin của người ở chỗ có một hoặc nhiều sự khuyết đoạn axit amin, một hoặc nhiều sự thay thế axit amin, và/hoặc một hoặc nhiều sự bổ sung axit amin không phá hủy hoạt tính relaxin của chất tương tự relaxin. Chất tương tự relaxin có điểm đẳng điện "lớn hơn" điểm đẳng điện của relaxin là một dạng của chất tương tự relaxin. Một dạng khác của chất tương tự relaxin là "chất tương tự relaxin monome".

Thuật ngữ "chất tương tự relaxin có bản chất là monome" là chất tương tự relaxin của người tác dụng nhanh, bao gồm, ví dụ, relaxin của người trong đó Pro ở vị trí B28 được thế bằng Asp, Lys, Leu, Val, hoặc Ala, và trong đó Lys ở vị trí B29 là Lys hoặc được thế bằng Pro. Một chất tương tự relaxin monome khác, còn được gọi là des(B27) relaxin của người, là relaxin của người trong đó Thr ở vị trí 27 của chuỗi B bị khuyết thiếu. Các chất tương tự relaxin monome được bộc lộ trong patent Mỹ số 5,514,646 cấp ngày 7 tháng 5 năm 1996 cho Chance, R. E. và các đồng tác giả; Brems, D. N, et al. *Protein Engineering*, 5, 527-533 (1992); công bố đơn yêu cầu cấp patent châu Âu số 214,826 của Brange, J. J. V. và các đồng tác giả (công bố ngày 18/03/1987); và Brange, J, J. V., et al., *Current Opinion in Structural Biology*, 1, 934-940 (1991). Các chất tương tự relaxin monome được sử dụng trong các dược phẩm theo sáng chế được liên kết ngang

thích hợp ở cùng vị trí như ở relaxin của người.

Các peptit relaxin bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, relaxin của người; relaxin của lợn; IGF-I người; yếu tố sinh trưởng II (69-84) tương tự relaxin; yếu tố sinh trưởng II (68-102) tương tự pro-relaxin của người; yếu tố sinh trưởng II (105-128)tương tự pro-relaxin của người; [AspB28]-relaxin của người; [LysB28]-relaxin của người; [LeuB28]-relaxin của người; [ValB28]-relaxin của người; [AlaB28]-relaxin của người; [AspB28, ProB29]-relaxin của người; [LysB28, ProB29]-relaxin của người; [LeuB28, ProB29]-relaxin của người; [ValB28, ProB29]-relaxin của người; [AlaB28, ProB29]-relaxin của người; [GlyA21]-relaxin của người; [GlyA21 GlnB3]-relaxin của người; [AlaA21]-relaxin của người; [AlaA21 Gln,sup,B3] relaxin của người; [GlnB3]-relaxin của người; [GlnB30]-relaxin của người; [GlyA21 GluB30]-relaxin của người; [GlyA21 GlnB3 GluB30]-relaxin của người; [GInB3 GluB30]-relaxin của người; B22-B30 relaxin của người; B23-B30 relaxin của người; B25-B30 relaxin của người; B26-B30 relaxin của người; B27-B30 relaxin của người; B29-B30 relaxin của người; chuỗi A của relaxin của người và chuỗi B của relaxin của người.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến các axit nucleic tái tổ hợp mã hóa biến thể protein, các vectơ biểu hiện chứa biến thể axit nucleic, các tế bào vật chủ chứa các biến thể axit nucleic và/hoặc vectơ biểu hiện, và các phương pháp tổng hợp các biến thể protein này. Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất việc điều trị rối loạn đáp ứng relaxin bằng cách cho bệnh nhân dùng biến thể protein, thường với chất mang dược dụng, với lượng hữu hiệu có tác dụng điều trị bệnh. Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp điều biến khả năng sinh miễn dịch (đặc biệt là làm giảm khả năng sinh miễn dịch) của các polypeptit relaxin bằng cách làm thay đổi biểu vị MHC Nhóm II.

Thuật ngữ "polypeptit relaxin" còn bao gồm các muối và các tiền dược chất dược dụng, và các tiền dược chất của muối này, chất đa hình, các hyđrat, các solvat, các đoạn có hoạt tính sinh học, các biến thể có hoạt tính sinh học và các chất đồng phân lập thể của relaxin có trong tự nhiên cũng như các biến thể của chất chủ vận, chất bắt chước, và chất đối kháng của relaxin có trong tự nhiên và thể dung hợp polypeptit của chúng. Các thể dung hợp chứa các axit amin khác nữa ở đầu tận cùng amino, đầu tận cùng carboxyl, hoặc cả hai, được bao hàm trong thuật ngữ "polypeptit relaxin". Thể dung hợp làm ví dụ bao

gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, ví dụ, methionyl relaxin trong đó methionin được liên kết với đầu tận cùng N của relaxin thu được từ sự biểu hiện tái tổ hợp của dạng trưởng thành của relaxin mà không có mặt peptit dẫn hoặc peptit tín hiệu hoặc phần của chúng (methionin được liên kết với đầu tận cùng N của relaxin thu được từ quá trình biểu hiện tái tổ hợp), thể dung hợp nhằm mục đích tinh chế (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, poly-histiđin hoặc biểu vị ái lực), thể dung hợp các peptit liên kết albumin trong huyết thanh và thể dung hợp với protein huyết thanh như albumin huyết thanh. Patent Mỹ số 5,750,373, mà được kết hợp vào sáng chế bằng cách viện dẫn, mô tả phương pháp lựa chọn các protein mới như các biến thể hormon sinh trưởng và đoạn kháng thể có các đặc tính liên kết thay đổi đối với các phân tử thụ thể tương ứng của chúng. Phương pháp này bào gồm bước dung hợp gen mã hóa protein đáng quan tâm thành miền tận cùng carboxy của protein vỏ gen III của thể thực khuẩn dạng sợi M13, các phân tử khảm chứa relaxin và một hoặc nhiều phân tử khác. Phân tử khảm có thể chứa vùng đặc hiệu hoặc các đoạn chứa một hoặc cả hai relaxin và các phân tử khác. Các đoạn bất kỳ như vậy có thể được điều chế từ các protein bằng các phương pháp sinh hóa tiêu chuẩn, hoặc bằng cách biểu hiện polynucleotit mã hóa đoạn này. Relaxin, hoặc đoạn của chúng, có thể được tạo ra dưới dạng protein dung hợp chứa albumin huyết thanh người (HSA), Fc, hoặc một phần của chúng. Các cấu trúc dung hợp như vậy là thích hợp để gia tăng sự biểu hiện của relaxin, hoặc đoạn của chúng, ở tế bào vật chủ của sinh vật nhân thật. Các phần HSA làm ví dụ bao gồm polypeptit đầu tận cùng N (các axit amin 1-369, 1-419, và chất trung gian có chiều dài bắt đầu từ axit amin 1), như đã được bộc lộ trong patent Mỹ số 5,766,883, và công bố WO 97/24445, mà được kết hợp vào sáng chế bằng cách viện dẫn. Các polypeptit thể khảm khác có thể bao gồm protein HSA với relaxin, hoặc các đoạn của chúng, được gắn vào mỗi đầu tận cùng C và đầu tận cùng N của HSA. Các cấu trúc HSA như vậy được bộc lộ trong patent Mỹ số 5,876,969 được kết hợp vào sáng chế bằng cách viện dẫn. Các thể dung hợp khác có thể được tạo ra bằng bước dung hợp relaxin với a) phần Fc của globulin miễn dịch; b) chất tương tự phần Fc của globulin miễn dịch; và c) các đoạn chứa phần Fc của globulin miễn dịch.

Các tài liệu tham khảo khác nhau mô tả sự cải biến các polypeptit bằng cách tiếp hợp hoặc glycosyl hoá polyme. Thuật ngữ "polypeptit relaxin" bao gồm các polypeptit đã được tiếp hợp với polyme như PEG và có thể bao gồm một hoặc nhiều sự tạo dẫn xuất

khác của gốc xystein, lysin, hoặc các gốc khác. Ngoài ra, polypeptit relaxin có thể chứa nhóm liên kết hoặc polyme, trong đó axit amin mà nhóm liên kết hoặc polyme này tiếp hợp với có thể là axit amin không có trong tự nhiên theo sáng chế, hoặc được tiếp hợp với axit amin được mã hóa có trong tự nhiên bằng cách áp dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này như ghép cặp với lysin hoặc xystein.

Thuật ngữ "polypeptit relaxin" còn bao gồm relaxin được glycosyl hóa, như nhưng không chỉ giới hạn ở, các polypeptit được glycosyl hóa ở vị trí axit amin bất kỳ, các dạng polypeptit được glycosyl hóa được liên kết ở N hoặc được liên kết ở O. Các biến thể chứa những thay đổi nucleotit đơn lẻ cũng được xem là các biến thể có hoạt tính sinh học của polypeptit relaxin. Ngoài ra, biến thể ghép nối cũng được kể đến. Thuật ngữ "polypeptit relaxin" còn bao gồm heterođime, homođime, heteromultime, hoặc homomultime polypeptit relaxin của một hoặc nhiều polypeptit relaxin bất kỳ hoặc các polypeptit, protein, hyđrat cacbon, polyme, phân tử nhỏ, nhóm liên kết, phối tử, hoặc phân tử có hoạt tính sinh học bất kỳ khác thuộc loại bất kỳ, được liên kết hóa học hoặc được biểu hiện ở dạng protein dung hợp, cũng như các chất tương tự polypeptit chứa, ví dụ, sự khuyết đoạn đặc hiệu hoặc các cải biến khác mà vẫn giữ được hoạt tính sinh học.

Thuật ngữ "polypeptit relaxin" hoặc "relaxin" bao hàm các polypeptit relaxin chứa một hoặc nhiều sự thay thế, bổ sung hoặc khuyết đoạn axit amin. Các polypeptit relaxin theo sáng chế có thể có một hoặc nhiều cải biến axit amin tự nhiên cùng với một hoặc nhiều cải biến axit amin không có trong tự nhiên. Ví dụ về sự thay thế ở nhiều loại vị trí axit amin trong các polypeptit relaxin có trong tự nhiên đã được mô tả, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, sự thay thế mà điều biến độ ổn định của dược phẩm, điều biến một hoặc nhiều hoạt tính sinh học của polypeptit relaxin như, nhưng không chỉ giới hạn ở, sự gia tăng hoạt tính của chất chủ vận, tăng độ hòa tan của polypeptit, làm giảm độ nhạy proteaza, chuyển hóa polypeptit thành chất đối kháng, v.v. và bao hàm trong thuật ngữ "polypeptit relaxin". Theo một số phương án, chất đối kháng relaxin chứa axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên được liên kết với polyme hòa tan trong nước có mặt trong vùng gắn kết thụ thể của phân tử relaxin.

Theo một số phương án, các polypeptit relaxin còn chứa đoạn bổ sung, đoạn thay thế hoặc khuyết đoạn giúp điều biến hoạt tính sinh học của polypeptit relaxin. Theo một

số phương án, các polypeptit relaxin còn chứa đoạn bổ sung, đoạn thay thế hoặc khuyết đoạn giúp điều biến hoạt tính chống virut của polypeptit relaxin. Theo một số phương án, các polypeptit relaxin còn chứa đoạn bổ sung, đoạn thay thế hoặc khuyết đoạn mà làm gia tăng hoạt tính kháng virut của polypeptit relaxin. Ví dụ, sự bổ sung, thay thế hoặc khuyết đoạn có thể điều biến một hoặc nhiều đặc tính hoặc hoạt tính của relaxin. Ví dụ, sự bổ sung, thay thế hoặc khuyết đoạn có thể điều biến ái lực đối với thụ thể relaxin, điều biến thời gian bán thải trong hệ tuần hoàn, điều biến thời gian bán thải trong điều trị bệnh, điều biến độ ổn định của polypeptit, điều biến sự phân cắt bởi proteaza, điều biến liều lượng, điều biến sự giải phóng hoặc độ sinh khả dụng, tạo điều kiện thuận lợi cho việc tinh chế, hoặc cải thiện hoặc làm thay đổi đường dùng cụ thể. Tương tự, các polypeptit relaxin có thể có trình tự phân cắt proteaza, nhóm phản ứng, vùng gắn kết kháng thể (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, FLAG hoặc poly-His) hoặc các trình tự dựa trên ái lực khác (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, FLAG, poly-His, GST, v.v.) hoặc các phân tử được liên kết (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, biotin) cải thiện việc phát hiện (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, GFP), việc tinh chế hoặc các đặc điểm của polypeptit.

Thuật ngữ "polypeptit relaxin" còn bao hàm cả homođime, heterođime, homomultime, và heteromultime được liên kết, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các homođime, heterođime, homomultime, và heteromultime được liên kết trực tiếp thông qua chuỗi bên axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên, chuỗi bên axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên giống hoặc khác nhau, với chuỗi bên axit amin được mã hóa có trong tự nhiên, hoặc liên kết gián tiếp thông qua nhóm liên kết. Các nhóm liên kết làm ví dụ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các hợp chất hữu cơ khối lượng phân tử nhỏ, các polyme hòa tan trong nước có chiều dài khác nhau như poly(etylen glycol) hoặc polyđextran, hoặc các polypeptit có các chiều dài khác nhau.

Thuật ngữ "axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên" được sử dụng trong bản mô tả để chỉ axit amin không là một trong số 20 axit amin thông thường hoặc pyrolysin hoặc selenoxystein. Thuật ngữ khác mà có thể được sử dụng có cùng nghĩa với thuật ngữ "axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên" là "axit amin không có trong tự nhiên", "axit amin không tự nhiên", "axit amin không có trong tự nhiên", và các kiểu có nối bằng dấu gạch ngang và không có nối bằng dấu gạch ngang khác nhau của chúng.

Thuật ngữ "axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên" còn bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các axit amin mà được tạo ra bằng cách cải biến (ví dụ, cải biến sau dịch mã) axit amin được mã hóa có trong tự nhiên (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, 20 axit amin thông thường hoặc pyrolysin và selenoxystein) nhưng chính chúng không được kết hợp tự nhiên vào mạch polypeptit đang phát triển bằng phức hợp dịch mã. Ví dụ về các axit amin không có trong tự nhiên bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, N- axetylglucosaminyl-L-serin, N-axetylglucosaminyl-L-threonin, và O-phosphotyrosin.

Thuật ngữ "nhóm cải biến đầu tận cùng amino" được sử dụng trong bản mô tả để chỉ phân tử bất kỳ có thể được gắn vào đầu tận cùng amino của polypeptit. Tương tự, thuật ngữ "nhóm cải biến đầu tận cùng carboxy" được sử dụng trong bản mô tả để chỉ phân tử bất kỳ mà có thể được gắn vào đầu tận cùng carboxy của polypeptit. Các nhóm cải biến đầu tận cùng bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các polyme, các peptit hoặc các protein hòa tan trong nước khác nhau như albumin huyết thanh, hoặc các gốc khác làm tăng thời gian bán thải của peptit trong huyết thanh.

Thuật ngữ "nhóm chức", "gốc hoạt hóa", "nhóm hoạt hóa", "nhóm rời chuyển", "vị trí phản ứng", "nhóm phản ứng hóa học" và "gốc phản ứng hóa học" được sử dụng trong lĩnh vực này và bản mô tả này để chỉ các phần hoặc đơn vị khác biệt, định nghĩa được của phân tử. Thuật ngữ này có phần đồng nghĩa trong lĩnh vực hóa học và sử dụng trong bản mô tả để chỉ các phần phân tử thực hiện một số chức năng hoặc hoạt tính và có họa tính đối với các phân tử khác.

Thuật ngữ "liên kết" hoặc "nhóm liên kết" được sử dụng trong bản mô tả để chỉ các nhóm hoặc các liên kết thường được tạo ra nhờ phản ứng hóa học và thường là các liên kết cộng hóa trị. Các liên kết bền với sự thủy phân có nghĩa là các liên kết này hầu như bền trong nước và không phản ứng với nước ở độ pH hữu dụng, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, trong các điều kiện sinh lý trong khoảng thời gian kéo dài, thậm chí vô thời hạn. Liên kết không bền với sự thủy phân hoặc liên kết phân hủy được có nghĩa là các liên kết dễ phân huỷ trong nước hoặc trong dung dịch nước, bao gồm, ví dụ, máu. Các liên kết không bền với enzym hoặc liên kết phân hủy được có nghĩa là liên kết có thể được phân hủy bằng một hoặc nhiều enzym. Như được hiểu trong lĩnh vực phương pháp này, PEG và các polyme có liên quan có thể có liên kết phân hủy được trong khung

polyme hoặc trong nhóm liên kết giữa bộ khung polyme và một hoặc nhiều nhóm chức đầu tận cùng của phân tử polyme này. Ví dụ, các liên kết este được tạo ra nhờ phản ứng giữa axit PEG carboxyclic hoặc axit PEG carboxyclic đã được hoạt hóa và các nhóm rượu trên hoạt chất sinh học thường được thủy phân trong các điều kiện sinh lý để giải phóng dược chất. Các liên kết khác phân hủy được khi thủy phân bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, liên kết cacbonat; các liên kết imin thu được từ phản ứng giữa amin và alđehyt; các liên kết phosphat este được tạo ra bằng cách cho rượu phản ứng với nhóm phosphat; các liên kết hyđrazon là sản phẩm phản ứng của hyđrazit và alđehyt; các liên kết axetal là sản phẩm phản ứng của alđehyt và rượu; hoặc các liên kết orthoeste là sản phẩm phản ứng của format và rượu; các liên kết peptit được tạo ra bởi nhóm amin, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, nhóm amin ở một đầu của polyme như PEG, và nhóm carboxyl của peptit; và các liên kết oligonucleotit được tạo ra bởi nhóm phosphoramiđit, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, nhóm phosphoramiđit ở một đầu của polyme, và nhóm 5' hyđroxyl của oligonucleotit.

Thuật ngữ "phân tử có hoạt tính sinh học", "gốc có hoạt tính sinh học" hoặc "chất có hoạt tính sinh học" được sử dụng trong bản mô tả này có nghĩa là chất bất kỳ mà có thể ảnh hưởng đến các đặc tính vật lý hoặc sinh hóa của hệ sinh học, chu trình, phân tử, hoặc tương tác liên quan đến một sinh vật, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, virut, vi khuẩn, thể thực khuẩn, gen nhảy, prion, côn trùng, nấm, thực vật, động vật, và người. Cụ thể là, được sử dụng trong bản mô tả, các phân tử có hoạt tính sinh học bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, chất bất kỳ dự định dùng để chẩn đoán, chữa trị, làm thuyên giảm, điều trị, hoặc ngăn ngừa bệnh ở người hoặc các động vật khác, hoặc theo cách khác làm tăng cường thể chất hoặc tinh thần của người hoặc động vật. Ví dụ về các phân tử có hoạt tính sinh học bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, peptit, protein, enzym, các dược chất có phân tử nhỏ, các vacxin, tác nhân gây miễn dịch, các dược chất cứng, các dược chất mềm, các hyđrat cacbon, các nguyên tử hoặc các phân tử vô cơ, chất màu, lipit, nucleosit, các đồng vị phóng xạ, oligonucleotit, toxoit, các độc tố, tế bào nhân sơ và nhân thật, virut, polysacarit, các axit nucleic và các phần của chúng thu được hoặc có nguồn gốc từ virut, vi khuẩn, côn trùng, động vật hoặc tế bào hoặc kiểu tế bào bất kỳ khác, các liposom, vi hạt và các mixen. Các polypeptit relaxin có thể được bổ sung vào chế phẩm mixen; xem patent Mỹ số 5,833,948, toàn bộ tài liệu này được kết hợp vào sáng chế bằng cách viện

dẫn. Các loại hoạt chất sinh học thích hợp để dùng theo sáng chế bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các dược chất, các tiền dược chất, các đồng vị phóng xạ, các tác nhân hiện hình, các polyme, thuốc kháng sinh, các thuốc diệt nấm, các tác nhân diệt virut, tác nhân chống viêm, các tác nhân chống khối u, các tác nhân tim mạch, các tác nhân chống lo lắng, các hormon, các yếu tố sinh trưởng, các tác nhân steroit, các độc tố có nguồn gốc từ vi khuẩn, và các chất tương tự.

Thuật ngữ "polyme hai chức" được sử dụng trong bản mô tả để chỉ polyme chứa hai nhóm chức riêng rẽ có khả năng phản ứng đặc hiệu với các gốc khác (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các nhóm bên axit amin) để tạo ra các liên kết cộng hóa trị hoặc không cộng hoá trị. Nhóm liên kết hai chức có một nhóm chức phản ứng với một nhóm trên thành phần có hoạt tính sinh học cụ thể, và nhóm khác phản ứng với nhóm trên thành phần sinh học thứ hai, có thể được sử dụng để tạo ra thể tiếp hợp chứa thành phần có hoạt tính sinh học thứ nhất, nhóm liên kết hai nhóm chức và thành phần có hoạt tính sinh học thứ hai. Đã biết nhiều quy trình và phân tử nhóm liên kết để gắn các hợp chất khác nhau vào các peptit. Ví dụ, xem: đơn yêu cầu cấp patent châu Âu số 188,256; Patent Mỹ số 4,671,958, 4,659,839, 4,414,148, 4,699,784; 4,680,338; và 4,569,789 được kết hợp vào sáng chế bằng cách viện dẫn. Thâut ngữ "polyme đa nhóm chức" dùng để chỉ polyme chứa hai hoặc nhiều nhóm chức riêng rẽ có khả năng phản ứng đặc hiệu với các gốc khác (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các nhóm bên axit amin) để tạo ra liên kết cộng hóa trị hoặc không cộng hoá trị. Polyme hai nhóm chức hoặc polyme đa nhóm chức có thể có chiều dài hoặc khối lượng phân tử mong muốn bất kỳ, và có thể được chọn để tạo ra không gian hoặc cấu hình mong muốn cụ thể giữa một hoặc nhiều phân tử liên kết với relaxin này và thụ thể hoặc relaxin của nó.

Khi các phần tử thế được chỉ rõ bởi công thức hóa học thông thường của chúng, được viết từ trái sang phải, thì chúng còn bao gồm các phần tử thế giống hệt về mặt hóa học mà sẽ được tạo ra bằng cách viết cấu trúc từ phải sang trái, ví dụ, cấu trúc CH_2O tương đương với cấu trúc $-OCH_2$.

Thuật ngữ "phần tử thế" bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, "các phần tử thế không cản trở". Thuật ngữ "phần tử thế không cản trở" là các nhóm mà tạo ra các hợp chất bền. Các phần tử thế hoặc các gốc không cản trở thích hợp bao gồm, nhưng không

chỉ giới hạn ở, halo, Cl -C10 alkyl, C2-C10 alkenyl, C2-C10 alkynyl, C1-C10 alkoxy, C1-C12 aralkyl, Cl-Cl2 alkaryl, C3-C12 xycloalkyl, C3-C12 xycloalkenyl, phenyl, phenyl được thế, toluoyl, xylenyl, biphenyl, C2-C12 alkoxyalkyl, C2-C12 alkoxyaryl, C7-C12 aryloxyalkyl, C7-C12 oxyaryl, C1-C6 alkylsulfinyl, C1-C10 alkylsulfonyl, --$(CH_2)_m$ --O--(C1-C10 alkyl) trong đó m bằng 1 đến 8, aryl, aryl được thế, alkoxy được thế, floalkyl, gốc dị vòng, gốc dị vòng được thế, nitroalkyl, --NO2, --CN, --NRC(O)--(C1-C10 alkyl), --C(O)--(C1-C10 alkyl), C2-C10 alkyl thioalkyl, --C(O)O--(C1-C10 alkyl), --OH, --SO2, =S, --COOH, --NR_2, carbonyl, --C(O)--(C1-C10 alkyl)--CF_3, --C(O)--CF3, --C(O)NR_2, --(C1-C10 aryl)--S--(C6-C10 aryl), --C(O)--(C1-C10 aryl), --$(CH_2)_m$--O--(--$(CH_2)_m$--O--(Cl-C10 alkyl), trong đó mỗi m bằng 1 đến 8, --C(O)NR_2, --C(S)NR_2, --SO2NR_2, --NRC(O)NR_2, -- NRC(S)NR_2, các muối của chúng, và các nhóm tương tự. Mỗi nhóm R được sử dụng trong bản mô tả là H, alkyl hoặc alkyl được thế, aryl hoặc aryl được thế, aralkyl, hoặc alkaryl.

Thuật ngữ "halogen" bao gồm flo, clo, iot, và brom.

Thuật ngữ "alkyl" được sử dụng trong bản mô tả để chỉ gốc hyđrocacbon mạch thẳng hoặc mạch nhánh, hoặc mạch vòng, hoặc tổ hợp của chúng, mà có thể no hoàn toàn, không no ở một hoặc nhiều vị trí và có thể có các gốc hai và đa hóa trị, có số lượng của nguyên tử cacbon được chỉ rõ (tức là C1-C10 có nghĩa là có một đến mười nguyên tử cacbon). Ví dụ về các gốc hyđrocacbon no bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các nhóm như metyl, etyl, n-propyl, isopropyl, n-butyl, t-butyl, isobutyl, butyl bậc hai, xyclohexyl, (xyclohexyl)metyl, xyclopropylmetyl, chất đồng đẳng và các chất đồng phân của n-pentyl, n-hexyl, n-heptyl, n-octyl và các nhóm tương tự chẳng hạn. Nhóm alkyl không no là nhóm alkyl có một hoặc nhiều liên kết đôi hoặc liên kết ba. Ví dụ về các nhóm alkyl không no bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, vinyl, 2-propenyl, crotyl, 2-isopentenyl, 2-(butađienyl), 2,4-pentađienyl, 3-(1,4-pentađienyl), etynyl, 1- và 3-propynyl, 3-butynyl, và chất đồng đẳng cao hơn và các chất đồng phân. Thuật ngữ "alkyl", trừ khi có quy định khác, cũng có nghĩa bao gồm các dẫn xuất của alkyl được xác định cụ thể hơn dưới đây, như "heteroalkyl". Các nhóm alkyl mà được giới hạn ở các nhóm hyđrocacbon được gọi là "homoalkyl".

Thuật ngữ "alkylen" được sử dụng trong bản mô tả để chỉ gốc hóa trị hai thu được

từ alkan, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các công thức cấu trúc -CH_2CH_2- và -$CH_2CH_2CH_2CH_2$-, và còn bao gồm các nhóm được mô tả dưới đây như "heteroalkylen". Nhìn chung, nhóm alkyl (hoặc alkylen) sẽ có 1 đến 24 nguyên tử cacbon, trong đó các nhóm có 10 nguyên tử cacbon hoặc ít hơn là một phương án đặc biệt của phương pháp và dược phẩm theo sáng chế. Thuật ngữ "alkyl mạch ngắn" hoặc "alkylen mạch ngắn" là nhóm alkyl hoặc alkylen mạch ngắn hơn, thường có tám nguyên tử cacbon hoặc ít hơn.

Thuật ngữ "alkoxy, "alkylamin" và "alkylthio" (hoặc thioalkoxy) được sử dụng trong bản mô tả để chỉ các nhóm alkyl đã được gắn vào phần cắn của phân tử thông qua nguyên tử oxy, nhóm amin, hoặc nguyên tử lưu huỳnh.

Thuật ngữ "heteroalkyl" riêng rẽ hoặc kết hợp với một thuật ngữ khác, có nghĩa là, trừ khi có quy định khác, gốc hyđrocacbon mạch thẳng hoặc mạch nhánh, hoặc mạch vòng bền, hoặc tổ hợp của chúng, có số nguyên tử cacbon được chỉ rõ và ít nhất một dị nguyên tử được chọn từ nhóm bao gồm O, N, Si và S, và trong đó các nguyên tử nitơ và lưu huỳnh có thể tùy ý được oxy hoá và dị nguyên tử nitơ có thể tùy ý được thế bốn bậc. Dị nguyên tử O, N và S và Si có thể ở vị trí bất kỳ bên trong nhóm heteroalkyl hoặc ở vị trí mà ở đó nhóm alkyl được gắn vào phần cắn của phân tử. Ví dụ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, -CH_2-CH2-O-CH3, -CH_2-CH_2-NH-CH3, -CH2-CH2-N(CH3)-CH3, -CH2-S-CH_2-CH3, -CH2-CH2,-S(O)-CH3, -CH_2-CH_2-S(O)2-CH3, -CH=CH-O-CH3, -Si(CH3)3, -CH2-CH=N-OCH3, và -CH=CH-N(CH3)-CH3. Có thể có đến hai dị nguyên tử liên tiếp, ví dụ, -CH_2-NH-OCH3 và -CH_2-O-Si(CH3)3. Tương tự, thuật ngữ "heteroalkylen" được sử dụng trong bản mô tả để chỉ gốc hóa trị hai thu được từ heteroalkyl, ví dụ, nhưng không giới hạn ở, -CH_2-CH_2-S-CH_2 CH_2- và -CH_2-S-CH_2-CH_2-NH-CH_2-. Đối với các nhóm heteroalkylen, dị nguyên tử giống nhau hoặc khác nhau còn có thể chiếm một hoặc cả hai đầu tận cùng của mạch (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, alkylenoxy, alkylenđioxy, alkylenamino, alkylenđiamino, aminooxyalkylen, và các nhóm tương tự). Hơn nữa, đối với các nhóm liên kết alkylen và heteroalkylen, sự không định hướng của nhóm liên kết được ám chỉ bởi hướng mà theo đó công thức của nhóm liên kết được viết. Ví dụ, công thức C(O)2R' biểu thị cả -C(O)2R' và -R'C(O)2 .

Thuật ngữ "xycloalkyl" và "heteroxycloalkyl" được sử dụng trong bản mô tả để chỉ kiểu mạch vòng của "alkyl" và "heteroalkyl". Do đó, xycloalkyl hoặc heteroxycloalkyl

có các liên kết vòng no, không no một phần và không no hoàn toàn. Ngoài ra, đối với heteroxycloalkyl, dị nguyên tử có thể chiếm vị trí mà ở đó gốc dị vòng này được gắn vào phần cắn của phân tử. Ví dụ về xycloalkyl bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, xyclopentyl, xyclohexyl, 1-xyclohexenyl, 3-xyclohexenyl, xycloheptyl và các nhóm tương tự. Ví dụ về heteroxycloalkyl bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, 1-(1,2,5,6-tetrahyđropyriđyl), 1-piperiđinyl, 2-piperiđinyl, 3-piperiđinyl, 4-morpholinyl, 3-morpholinyl, tetrahyđrofuran-2-yl, tetrahyđrofuran-3-yl, tetrahyđrothien-2-yl, tetrahyđrothien-3-yl, 1-piperazinyl, 2-piperazinyl, và các nhóm tương tự. Ngoài ra, thuật ngữ này bao hàm cấu trúc vòng gồm hai vòng và ba vòng. Tương tự, thuật ngữ "heteroxycloalkylen" được sử dụng trong bản mô tả để chỉ gốc hóa trị hai thu được từ heteroxycloalkyl, và thuật ngữ "xycloalkylen" được sử dụng trong bản mô tả để chỉ gốc hóa trị hai thu được từ xycloalkyl.

Thuật ngữ "polyme hòa tan trong nước" được sử dụng trong bản mô tả để chỉ polyme bất kỳ hòa tan trong các dung môi dạng nước. Sự liên kết của các polyme hòa tan trong nước với các polypeptit relaxin có thể gây ra những thay đổi bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, thời gian bán thải trong huyết thanh tăng hoặc được điều biến, hoặc thời gian bán thải trong điều trị tăng hoặc được điều biến so với dạng chưa được cải biến, khả năng sinh miễn dịch được điều biến, các đặc tính liên kết vật lý như sự kết tụ và sự hình thành multime được điều biến, sự liên kết thụ thể được thay đổi, liên kết với một hoặc nhiều thành phần liên kết được thay đổi, và sự đime hoá hoặc multime hóa thụ thể được thay đổi. Polyme hòa tan trong nước có thể có hoặc không có hoạt tính sinh học riêng của nó, và có thể được sử dụng làm nhóm liên kết để gắn relaxin vào các chất khác, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, một hoặc nhiều polypeptit relaxin, hoặc một hoặc nhiều phân tử có hoạt tính sinh học. Các polyme thích hợp bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, polyetylen glycol, polyetylen glycol propionalđehyt, mono C1-C10 alkoxy hoặc các dẫn xuất aryloxy của chúng (đã được bộc lộ trong patent Mỹ số 5,252,714 được kết hợp vào sáng chế bằng cách viện dẫn), monometoxy-polyetylen glycol, polyvinyl pyroliđon, rượu polyvinylic, polyamino axit, đivinylete anhyđrit maleic, N-(2-hyđroxypropyl)-meta-crylamit, đextran, các dẫn xuất đextran bao gồm đextran sulfat, polypropylen glycol, copolyme polypropylen oxit/etylen oxit, polyol được polyoxyetylat hóa, heparin, đoạn heparin, polysacarit, oligosacarit, glycan, xenluloza và các dẫn xuất xenluloza, bao gồm,

nhưng không chỉ giới hạn ở, metylxenluloza và carboxymetyl xenluloza, tinh bột và các dẫn xuất tinh bột, các polypeptit, polyalkylen glycol và các dẫn xuất của chúng, copolyme của polyalkylen glycol và các dẫn xuất của chúng, polyvinyl etyl ete, và alpha-beta-poly[(2-hyđroxyetyl)-DL-aspartamit, và các chất tương tự, hoặc hỗn hợp của chúng. Ví dụ về các polyme hòa tan trong nước bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, polyetylen glycol và albumin huyết thanh.

Thuật ngữ "polyalkylen glycol" hoặc "poly(alken glycol)" được sử dụng trong bản mô tả để chỉ polyetylen glycol (poly(etylen glycol)), polypropylen glycol, polybutylen glycol, và các dẫn xuất của chúng. Thuật ngữ "polyalkylen glycol" bao hàm cả polyme mạch thẳng và mạch nhánh và có khối lượng phân tử trung bình nằm trong khoảng từ 0,1kDa đến 100kDa. Các phương án khác được nêu làm ví dụ được liệt kê, ví dụ, trong danh mục sản phẩm của nhà cung cấp thương mại, như danh mục "Polyetylen Glycol and Derivatives for Biomedical Applications" (2001) của Shearwatter Corporation

Thuật ngữ "aryl" được sử dụng trong bản mô tả để chỉ, trừ khi có quy định khác, phần tử thế hyđrocacbon đa bất bão hoà, thơm, có thể có một nhân duy nhất hoặc nhiều nhân (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, 1 đến 3 nhân) ghép cặp với nhau hoặc được liên kết cộng hóa trị. Thuật ngữ "heteroaryl" được sử dụng trong bản mô tả để chỉ các nhóm aryl (hoặc các nhân) chứa một đến bốn dị nguyên tử được chọn trong số N, O, và S, trong đó các nguyên tử nitơ và lưu huỳnh tùy ý được oxy hóa, và nguyên tử nitơ tùy ý được thế bốn bậc. Nhóm heteroaryl có thể được gắn vào phần cắn của phân tử thông qua dị nguyên tử. Các ví dụ không giới hạn phạm vi của sáng chế về các nhóm aryl và heteroaryl bao gồm phenyl, 1-naphtyl, 2-naphtyl, 4-biphenyl, 1-pyrolyl, 2-pyrolyl, 3-pyrolyl, 3-pyrazolyl, 2-imiđazolyl, 4-imiđazolyl, pyrazinyl, 2-oxazolyl, 4-oxazolyl, 2-phenyl-4-oxazolyl, 5-oxazolyl, 3-isoxazolyl, 4-isoxazolyl, 5-isoxazolyl, 2-thiazolyl, 4-thiazolyl, 5-thiazolyl, 2-furyl, 3-furyl, 2-thienyl, 3-thienyl, 2-pyriđyl, 3-pyriđyl, 4-pyriđyl, 2-pyrimiđyl, 4-pyrimiđyl, 5-benzothiazolyl, purinyl, 2-benzimiđazolyl, 5-inđolyl, 1-isoquinolyl, 5-isoquinolyl, 2-quinoxalinyl, 5-quinoxalinyl, 3-quinolyl, và 6-quinolyl. Các phần tử thế đối với mỗi hệ nhân aryl và heteroaryl nêu trên được chọn từ nhóm bao gồm các phần tử thế có thể chấp nhận được được mô tả dưới đây.

Tóm lại, thuật ngữ "aryl" khi được sử dụng kết hợp với thuật ngữ khác (bao gồm,

nhưng không chỉ giới hạn ở, aryloxy, arylthioxy, arylalkyl) kể cả aryl và các nhân heteroaryl như được xác định trên đây. Do đó, thuật ngữ "arylalkyl" được dự tính bao gồm các gốc trong đó nhóm aryl được gắn vào nhóm alkyl (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, benzyl, phenetyl, pyriđylmetyl và các gốc tương tự) bao gồm các nhóm alkyl trong đó nguyên tử cacbon (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, nhóm metylen) được thế bằng, ví dụ, nguyên tử oxy (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, phenoxymetyl, 2-pyriđyloxymetyl, 3-(1-naphtyloxy)propyl, và các gốc tương tự).

Mỗi thuật ngữ trong số thuật ngữ nêu trên (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, "alkyl, "heteroalkyl, "aryl" và "heteroaryl") có nghĩa bao gồm cả dạng được thế và không được thế của gốc được chỉ ra. Các phần tử thế được nêu làm ví dụ cho mỗi loại gốc được nêu dưới đây.

Phần tử thế đối với các gốc alkyl và heteroalkyl (bao gồm các nhóm thường được gọi là alkylen, alkenyl, heteroalkylen, heteroalkenyl, alkynyl, xycloalkyl, heteroxycloallcyl, xycloalkenyl, và heteroxycloalkenyl) có thể là một hoặc nhiều nhóm khác nhau được chọn trong số, nhưng không chỉ giới hạn ở: -OR', =O, =NR', =N-OR', -NR'R", -SR', -halogen, -SiR'R"R"', OC(O)R', -C(O)R', -CO2R', -CONR'R", -OC(O)NR'R", -NR"C(O)R', NR^5 C(O)NR"R"', -NR"C(O)2R', -NR-C(NR'R-"R"')=NR"", NR C(NR'R")=NR"', -S(O)R', -S(O)2R', -S(O)2NR'R", NRSO2R', -CN và -NO2 với số lượng nằm trong khoảng từ 0 đến (2m'+l), trong đó m' là tổng số nguyên tử cacbon trong gốc này. Mỗi gốc R', R", R"' và R"" độc lập là hyđro, heteroalkyl đã được thế hoặc không được thế, aryl được thế hoặc không được thế, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, aryl được thế bằng 1 đến 3 halogen, các nhóm alkyl, alkoxy hoặc thioalkoxy được thế hoặc không được thế, hoặc các nhóm arylalkyl. Khi hợp chất theo sáng chế bao gồm nhiều hơn một nhóm R, ví dụ, mỗi nhóm R độc lập được chọn từ các nhóm R', R", R"' và R"" khi có mặt nhiều hơn một trong số các nhóm này. Khi R' và R" được gắn vào cùng nguyên tử nitơ, chúng có thể được kết hợp với nguyên tử nitơ để tạo ra vòng có 5, 6 hoặc 7 cạnh. Ví dụ, -NR'R" có nghĩa bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, 1-pyroliđinyl và 4-morpholinyl. Từ phần bàn luận trên đây về phần tử thế, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này cần phải hiểu rằng thuật ngữ "alkyl" được dự tính bao gồm các nhóm bao gồm nguyên tử cacbon liên kết với các nhóm khác ngoài các

nhóm hyđro, như haloalkyl (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, -CF3 và -CH2CF3) và axyl (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, -C(O)CH3, -C(O)CF3, -C(O)CH_2OCH3, và các nhóm tương tự).

Tương tự như các phần tử thế được mô tả cho gốc alkyl, các phần tử thế cho các nhóm aryl và heteroaryl là đa dạng và chọn từ, nhưng không chỉ giới hạn ở, halogen, OR', =O, =NR', =N-OR', -NR'R", -SR', -halogen, -SiR'R"R"', OC(O)R', -C(O)R', CO2R', -CONR'R", -OC(O)NR'R", -NR"C(O)R', NR' C(O)NR"R"', -NR"C(O)2R', NR-C(NR'R"R"')=NR"", NR C(NR'R")=NR"', -S(O)R', -S(O)2R', -S(O)2NR'R", NRSO2R', -CN và -NO2, -R', -N3, -CH(Ph)2, flo(Cl-C4)alkoxy, và flo(Cl-C4)alkyl, với số lượng nằm trong khoảng từ 0 đến tổng các hóa trị mở trên hệ nhân thơm; và trong đó R', R", R"' và R"" độc lập được chọn trong số hyđro, alkyl, heteroalkyl, aryl và heteroaryl. Khi hợp chất theo sáng chế có nhiều hơn một nhóm R, ví dụ, thì mỗi nhóm R độc lập được chọn trong số các nhóm R', R", R"' và R"" khi có mặt nhiều hơn một nhóm trong số các nhóm này.

Thuật ngữ "thời gian bán thải trong huyết thanh được điều biến" được sử dụng trong bản mô tả có nghĩa là sự thay đổi tích cực hoặc tiêu cực về thời gian bán thải trong hệ tuần hoàn của một relaxin đã được cải biến so với dạng không được cải biến của nó. Thời gian bán thải trong huyết thanh được đo bằng cách lấy các mẫu máu ở các thời điểm khác nhau sau khi dùng relaxin, và xác định nồng độ của phân tử đã nêu trong mỗi mẫu. Tương quan nồng độ huyết thanh theo thời gian cho phép tính thời gian bán thải trong huyết thanh. Muốn có thời gian bán thải trong huyết thanh gia tăng ít nhất khoảng hai lần, nhưng mức gia tăng nhỏ hơn có thể được sử dụng, ví dụ, nếu nó cho phép tạo ra phác đồ liều dùng thỏa đáng hoặc tránh tác dụng độc hại. Theo một số phương án, mức tăng này ít nhất khoảng ba lần, ít nhất khoảng năm lần, hoặc ít nhất khoảng mười lần.

Thuật ngữ "thời gian bán thải trong điều trị được điều biến" được sử dụng trong bản mô tả có nghĩa là sự thay đổi tích cực hoặc tiêu cực về thời gian bán thải của relaxin với lượng có tác dụng điều trị bệnh, so với dạng chưa được cải biến của nó. Thời gian bán thải trong điều trị được đo bằng cách xác định các đặc tính dược động học và/hoặc dược lực học của phân tử ở các thời điểm khác nhau sau khi dùng. Thời gian bán thải trong điều trị tăng đáng kể cho phép phác đồ liều dùng đặc biệt có lợi, tổng liều lượng đặc biệt

có lợi, hoặc tránh được những ảnh hưởng không mong muốn. Theo một số phương án, thời gian bán thải trong điều trị tăng là do hiệu lực tăng, mức liên kết giữa phân tử được cải biến với đích của nó tăng hoặc giảm, sự phá vỡ phân tử bởi các enzym như proteaza tăng hoặc giảm, hoặc một thông số hoặc cơ chế tác dụng khác của phân tử không được cải biến tăng hoặc giảm hoặc độ thanh thải của phân tử này nhờ thụ thể tăng hoặc giảm.

Thuật ngữ "phân lập được" khi được sử dụng cho axit nucleic hoặc protein, biểu thị rằng axit nucleic hoặc protein này không chứa ít nhất một vài trong số các thành phần tế bào mà liên kết với nó ở trạng thái tự nhiên, hoặc axit nucleic hoặc protein này được cô đến nồng độ lớn hơn nồng độ của nó khi sản sinh *in vivo* hoặc *in vitro*. Nó có thể ở trạng thái đồng nhất. Các chất phân lập được có thể ở trạng thái rắn hoặc bán rắn, hoặc dạng dung dịch, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, dung dịch nước. Các chất này có thể là thành phần của dược phẩm chứa các chất mang dược dụng và/hoặc các tá dược khác. Độ tinh khiết và mức độ đồng nhất thường được xác định bằng cách sử dụng các phương pháp hóa phân tích như điện di trên gel polyacrylamit hoặc phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao. Protein-thành phần chiếm ưu thế có mặt trong chế phẩm hầu như tinh khiết. Cụ thể là, gen phân lập được được tách ra khỏi khung đọc mở (open reading frames) mà bao hai bên gen và mã hóa protein khác không phải gen đáng quan tâm, thuật ngữ "đã được tinh chế" biểu thị rằng axit nucleic hoặc protein tạo ra hầu như một dải trên gel điện di. Đặc biệt là, nó có thể có nghĩa là axit nucleic hoặc protein có độ tinh khiết ít nhất là 85%, độ tinh khiết ít nhất là 90%, độ tinh khiết ít nhất là 95%, độ tính khiết ít nhất là 99% hoặc lớn hơn.

Thuật ngữ "axit nucleic" được sử dụng trong bản mô tả để chỉ đeoxyribonucleotit, đeoxyribonucleosit, ribonucleosit, hoặc ribonucleotit và các polyme của chúng ở dạng sợi đơn hoặc sợi kép. Trừ khi được giới hạn một cách cụ thể, thuật ngữ này bao hàm các axit nucleic chứa các chất tương tự đã biết của nucleotit có trong tự nhiên có các đặc tính gắn kết tương tự với axit nucleic đối chứng và chuyển hóa theo cách tương tự như các nucleotit có trong tự nhiên. Trừ khi được giới hạn cụ thể theo cách khác, thuật ngữ này cũng được sử dụng trong bản mô tả để chỉ chất tương tự oligonucleotit bao gồm PNA (axit peptiđonucleic), chất tương tự ADN được sử dụng trong công nghệ gen đối nghĩa (phosphorothioat, phosphoroamiđat, và các chất tương tự). Trừ khi có quy định cụ thể

khác, trình tự axit nucleic cụ thể cũng bao hàm toàn bộ các biến thể đã bảo thủ được cải biến của chúng (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, sự thoái biến của các phần tử thế bộ ba mã hóa) và các trình tự bổ trợ cũng như trình tự được chỉ rõ. Đặc biệt, sự thoái biến của các phần tử thế bộ ba mã hóa có thể có được bằng cách tạo ra các trình tự trong đó vị trí thứ ba của một hoặc nhiều bộ ba mã hóa được chọn (hoặc tất cả) được thế bằng gốc bazơ và/hoặc đeoxyinosin hỗn hợp (Batzer et al., *Axit nucleic Res.* 19:5081 (1991); Ohtsuka et al, *J. Biol. Chem.* 260:2605-2608 (1985); Rossolini et al., *Mol. Cell. Probes* 8:91-98 (1994)).

Thuật ngữ "polypeptit, "peptit" và "protein" được sử dụng thay thế nhau trong bản mô tả này để chỉ polyme cos các gốc axit amin. Tức là, được mô tả đối với polypeptit cũng được sử dụng để mô tả peptit và mô tả protein, và ngược lại. Thuật ngữ áp dụng cho các polyme của axit amin có trong tự nhiên cũng như các polyme của axit amin trong đó một hoặc nhiều gốc axit amin là axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên. Thuật ngữ này được sử dụng trong bản mô tả bao gồm chuỗi Axit amin có độ dài bất kỳ, bao gồm protein có chiều dài đầy đủ, trong đó các gốc axit amin được liên kết bằng liên kết peptit cộng hóa trị.

Thuật ngữ "axit amin" được sử dụng trong bản mô tả để chỉ axit amin có trong tự nhiên và axit amin không có trong tự nhiên, cũng như chất tương tự axit amin và chất có chức năng tương tự như axit amin có trong tự nhiên. Các axit amin được mã hóa có trong tự nhiên là 20 axit amin thông thường (alanin, arginin, asparagin, axit aspartic, xystein, glutamin, axit glutamic, glyxin, histiđin, isoleuxin, leuxin, lysin, methionin, phenylalanin, prolin, serin, threonin, tryptophan, tyrosin, và valin) và pyrolysin và selenoxystein. Chất tương tự axit amin để chỉ các hợp chất mà có cùng công thức hóa học cơ bản như axit amin có trong tự nhiên, tức là một nguyên tử cacbon liên kết với nguyên tử hyđro, nhóm carboxyl, nhóm amin, và nhóm R, như, homoserin, norleuxin, methionin sulfoxit, methionin metyl sulfoni. Các chất tương tự như vậy có các nhóm R được cải biến (như norleuxin) hoặc khung peptit được cải biến, nhưng vẫn có cùng công thức hóa học cơ bản như axit amin có trong tự nhiên. Ví dụ về axit amin bao gồm, ví dụ, axit amin L sinh protein có trong tự nhiên; axit amin D, các axit amin được cải biến về mặt hóa học như các biến thể và các dẫn xuất axit amin; các axit amin không sinh protein có trong tự nhiên

như β-alanin, ornithin, v.v.; và các hợp chất được tổng hợp hóa học có các đặc tính đã biết trong lĩnh vực phương pháp này đặc trưng cho axit amin. Ví dụ về các axit amin không có trong tự nhiên bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các axit amin α-metyl (ví dụ, α-metyl alanin), axit amin D, các axit amin tương tự histiđin (ví dụ, 2-amino-histiđin, β-hyđroxy-histiđin, homohistiđin, α-flometyl-histiđin và α-metyl-histiđin), các axit amin có thêm một metylen ở chuỗi bên (axit amin "homo"), và các axit amin trong đó nhóm chức axit carboxylic trong chuỗi bên được thế bằng nhóm axit sulfonic (ví dụ, axit xysteic). Sự kết hợp của axit amin không có trong tự nhiên, bao gồm axit amin tổng hợp không có trong tự nhiên, axit amin được thế, hoặc một hoặc nhiều axit amin D vào các protein theo sáng chế có thể có lợi theo nhiều cách khác nhau. Các peptit chứa axit amin D, v.v., có độ ổn định tăng *in vitro* hoặc *in vivo* so với các peptit tương ứng chứa axit amin L. Do đó, cấu trúc peptit, v.v., có các axit amin D có thể là đặc biệt hữu ích khi muốn hoặc cần có độ ổn định nội bào. Cụ thể hơn, D-peptit, v.v., kháng peptiđaza và proteaza nội sinh, nhờ đó tạo ra sinh khả dụng được cải thiện của phân tử, và thời gian tồn tại kéo dài *in vivo* khi muốn có được các tính chất này. Ngoài ra, D-peptit, v.v., có thể không được xử lý một cách hữu hiệu do sự biểu hiện hạn chế của phức hợp tương hợp mô chính Nhóm II đối với tế bào trợ giúp T, và do đó, ít có khả năng gây ra các loại đáp ứng miễn dịch thể dịch trong toàn bộ cơ thể.

Các axit amin nêu trong bản mô tả này có thể được gọi bằng ký hiệu gồm ba chữ cái thông thường đã biết hoặc bằng một ký hiệu chữ cái do IUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commission khuyến cáo. Tương tự, các nucleotit có thể được gọi bởi các mã gồm một chữ cái thường được chấp nhận của chúng.

Thuật ngữ "các biến thể bảo thủ được cải biến" được áp dụng cho cả trình tự axit amin và axit nucleic. Liên quan đến các trình tự axit nucleic cụ thể, thuật ngữ "các biến thể bảo thủ được cải biến" được sử dụng trong bản mô tả để chỉ các axit nucleic mã hóa trình tự axit amin giống hệt hoặc về cơ bản giống hệt, hoặc trong đó axit nucleic không mã hóa trình tự axit amin, thành trình tự về cơ bản giống hệt. Do sự suy biến của mã di truyền, một số lượng lớn các axit nucleic có chức năng giống hệt mã hóa protein bất kỳ nêu trên. Ví dụ, tất cả các bộ ba mã hóa GCA, GCC, GCG và GCU mã hóa axit amin alanin. Do đó, ở mỗi vị trí mà ở đó alanin được xác định bởi một bộ ba mã hóa, bộ ba mã

hóa này có thể được thay đổi thành các bộ ba mã hóa tương ứng bất kỳ được mô tả mà không làm thay đổi polypeptit được mã hóa. Các biến thể axit nucleic như vậy là "các biến thể câm", là loại biến thể đã bảo thủ được cải biến. Mỗi trình tự axit nucleic nêu trong bản mô tả mã hoá polypeptit còn biểu thị mỗi biến thể câm có thể có của axit nucleic. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này cần phải nhận thấy rằng mỗi bộ ba mã hóa trong axit nucleic (ngoại trừ AUG, mà thường chỉ là bộ ba mã hóa đối với methionin, và TGG, mà thường chỉ là bộ ba mã hóa đối với tryptophan) có thể được cải biến để tạo ra các phân tử có chức năng giống hệt. Do đó, mỗi biến thể câm của axit nucleic mà mã hóa polypeptit được bao hàm trong mỗi trình tự đã được mô tả.

Đối với trình tự axit amin, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này cần phải nhận thấy rằng sự thay thế, khuyết đoạn hoặc bổ sung vào trình tự axit nucleic, peptit, polypeptit, hoặc protein mà thay đổi, bổ sung hoặc xóa bỏ một axit amin duy nhất hoặc một tỷ lệ phần trăm nhỏ các axit amin trong trình tự được mã hóa này là "biến thể bảo thủ được cải biến", trong đó việc sửa đổi dẫn đến sự khuyết đoạn axit amin, bổ sung axit amin, hoặc thế axit amin bằng một axit amin tương tự về mặt hóa học. Các bảng phần tử thế bảo toàn đề xuất các axit amin có chức năng tương tự mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này đã biết. Các biến thể bảo thủ được cải biến như vậy là bổ sung cho và không loại trừ các biến thể đa hình, các chất đồng đẳng giữa các loài, và alen theo sáng chế,

Các bảng thế bảo toàn đề xuất các axit amin tương tự về mặt chức năng mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này đã biết. Tám nhóm sau, mỗi nhóm chứa các axit amin mà được thế bảo toàn cho một axit amin khác:

1	Alanin (A), Glyxin (G);
2	axit Aspartic (D), axit glutamic (E);
3	Asparagin (N), Glutamin (Q);
4	Arginin (R), Lysin (K);
5	Isoleuxin (I), Leuxin (L), Methionin (M), Valin (V);
6	Phenylalanin (F), Tyrosin (Y), Tryptophan (W);
7	Serin (S), Threonin (T); và
8	Xystein (C), Methionin (M)

(xem, ví dụ, Creighton, Proteins: *Structures and Molecular Properties* (W H Freeman & Co.; 2nd edition (December 1993).

Thuật ngữ "giống hệt" hoặc "mức độ đồng nhất" tính theo phần trăm, của hai hoặc

nhiều trình tự axit nucleic hoặc polypeptit, chỉ hai hoặc nhiều trình tự hoặc dưới trình tự giống nhau. Các trình tự "hầu như giống hệt" khi chúng có cùng tỷ lệ phần trăm các gốc axit amin hoặc nucleotit (tức là mức độ đồng nhất khoảng 60%, khoảng 65%, khoảng 70%, khoảng 75%, khoảng 80%, khoảng 85%, khoảng 90%, hoặc mức độ đồng nhất khoảng 95% trên một vùng quy định), khi được so sánh và sắp thẳng hàng để có được sự tương ứng tối đa trên một cửa sổ so sánh, hoặc vùng được chỉ rõ như được xác định bằng cách sử dụng một thuật toán trong số các thuật toán so sánh trình tự (hoặc các thuật toán khác mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này đã biết) hoặc bằng cách sắp thẳng hàng theo phương pháp thủ công và quan sát bằng mắt thường. Định nghĩa này cũng được sử dụng trong bản mô tả để chỉ trình tự bổ trợ của trình tự thử nghiệm. Sự đồng nhất có thể tồn tại trong vùng có chiều dài ít nhất khoảng 50 axit amin hoặc nucleotit, hoặc trong vùng có chiều dài 75-100 axit amin hoặc nucleotit, hoặc khi không quy định, dọc theo toàn bộ trình tự polynucleotit hoặc polypeptit, polynucleotit mã hóa polypeptit theo sáng chế, bao gồm chất đồng đẳng từ loài khác không phải người, có thể thu được từ quy trình bao gồm các bước sàng lọc thư viện trong các điều kiện lai nghiêm ngặt với đoạn dò được gắn nhãn có trình tự polynucleotit theo sáng chế hoặc đoạn của chúng, và phân lập ADN bổ sung với chiều dài đầy đủ và các dòng trình tự polynucleotit này thuộc bộ gen. Các phương pháp lai như vậy đã được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này biết rõ.

Để so sánh trình tự, thường là một trình tự đóng vai trò như trình tự tham chiếu, mà các trình tự thử nghiệm được so sánh với nó. Khi sử dụng thuật toán so sánh trình tự, các trình tự thử nghiệm và tham chiếu được nhập vào máy tính, các tọa độ của trình tự được chỉ định, nếu cần, và các thông số chương trình thuật toán trình tự được chỉ định. Các thông số mặc định của chương trình có thể được sử dụng, hoặc các thông số khác có thể được chỉ định. Tiếp theo, thuật toán so sánh trình tự tính toán phần trăm độ đồng nhất trình tự của các trình tự thử nghiệm so với trình tự tham chiếu, dựa trên các thông số của chương trình.

Thuật ngữ "cửa sổ so sánh" được sử dụng trong bản mô tả để chỉ việc viện dẫn đến phân đoạn của một vị trí bất kỳ trong số các vị trí liền kề được chọn từ nhóm bao gồm 20 đến 600, thường là khoảng 50 đến 200, thường hơn là nằm trong khoảng từ 100 đến 150,

trong đó một trình tự có thể được so với trình tự tham chiếu có cùng số vị trí liền kề sau khi hai trình tự này được sắp thẳng hàng một cách tối ưu. Các phương pháp sắp thẳng hàng các trình tự để so sánh đã được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này biết rõ. Việc sắp thẳng hàng một cách tối ưu các trình tự để so sánh có thể được thực hiện, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, bằng thuật toán tương đồng quỹ tích của Smith và Watterman (1970) *Adv. Appl. Math.* 2:482c, bằng thuật toán sắp thẳng hàng tương đồng của Needleman và Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443, bằng cách tìm kiếm phương pháp tương tự của Pearson và Lipman (1988) *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85:2444, bằng cách triển khai trên máy tính các thuật toán này (GAP, BESTFIT, FASTA, và TFASTA trong gói phần mềm di truyền Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), hoặc bằng cách sắp thẳng hàng theo phương pháp thủ công và kiểm tra bằng mắt thường (xem: ví dụ, Ausubel et al., *Current Protocols in Biology* (1995 supplement)).

Ví dụ về thuật toán thích hợp để xác định phần trăm mức độ đồng nhất trình tự và sự giống nhau về mặt trình tự là các thuật toán BLAST và BLAST 2.0, lần lượt được bộc lộ trong: Altschul et al., (1997) *Nuc. Acids Res.* 25:3389-3402, và Altschul et al., (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410. Phần mềm để thực hiện phân tích BLAST được công bố công khai thông qua Trung tâm thông tin công nghệ sinh học quốc gia có địa chỉ trang web toàn cầu ncbi.nlm.nih.gov. Các thông số W, T, và X của thuật toán BLAST xác định độ nhạy và tốc độ sắp thẳng hàng. Chương trình BLASTN (đối với trình tự nucleotit) sử dụng mặc định chiều dài từ (W) là 11, trị số kỳ vọng (E) bằng 10, M=5, N=-4 và so sánh cả hai sợi. Đối với các trình tự axit amin, chương trình BLASTP sử dụng mặc định chiều dài từ bằng 3, và trị số kỳ vọng (E) bằng 10, và ma trận ghi điểm BLOSUM62 (xem: Henilcoff và Henikoff (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915) sự sắp thẳng hàng (B) là 50, trị số kỳ vọng (E) bằng 10, M=5, N=-4, và so sánh cả hai sợi. Thuật toán BLAST thường được thực hiện với bộ lọc "độ phức tạp thấp" tắt.

Thuật toán BLAST cũng thực hiện sự phân tích thống kê về sự giống nhau giữa hai trình tự (xem: ví dụ, Karlin and Altschul (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873-5787). Một phương pháp xác định mức độ giống nhau được đề xuất bởi thuật toán BLAST là xác suất tổng hợp nhỏ nhất (P(N)), mà chỉ ra xác suấtnhờ nó sự tương xứng

giữa hai trình tự nucleotit hoặc axit amin sẽ xảy ra một cách tình cờ. Ví dụ, axit nucleic được xem là tương tự với trình tự tham chiếu nếu xác suất tổng hợp nhỏ nhất khi so sánh axit nucleic thử nghiệm với axit nucleic tham chiếu nhỏ hơn khoảng 0,2, hoặc nhỏ hơn khoảng 0,01, hoặc nhỏ hơn khoảng 0,001.

Thuật ngữ "lai chọn lọc (hoặc đặc hiệu) với" được sử dụng trong bản mô tả để chỉ việc gắn kết, ghép đôi, hoặc lai hóa của một phân tử chỉ với một trình tự nucleotit cụ thể trong các điều kiện lai nghiêm ngặt khi trình tự này có mặt trong phức hợp (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, toàn bộ tế bào hoặc thư viện ADN hoặc ARN),

Thuật ngữ "các điều kiện lai nghiêm ngặt" được sử dụng trong bản mô tả để chỉ việc lai giữa các trình tự ADN, ARN, PNA, hoặc các chất có tác dụng giống axit nucleic, hoặc hỗn hợp của chúng trong các điều kiện cường độ ion thấp và nhiệt độ cao như đã biết trong lĩnh vực phương pháp này. Nhìn chung, trong các điều kiện nghiêm ngặt đoạn dò sẽ lai với trình tự đích của nó trong hỗn hợp phức gồm các axit nucleic (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, toàn bộ tế bào hoặc thư viện ADN hoặc ARN) mà không lai với các trình tự khác trong hỗn hợp phức này. Các điều kiện nghiêm ngặt phụ thuộc vào trình tự và sẽ khác nhau trong các trường hợp khác nhau. Các trình tự dài hơn lai đặc hiệu ở các nhiệt độ cao hơn. Hướng dẫn mở rộng về việc lai giữa các axit nucleic được tìm thấy trong: Tijssen, *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology - Hybridization with Nucleic Probes*, "*Overview of principles of hybridization and the strategy of axit nucleic assays*" (1993). Nhìn chung, các điều kiện nghiêm ngặt được chọn thấp hơn nhiệt độ nóng chảy (Tm) nằm trong khoảng từ 5°C đến 10°C đối với trình tự đặc hiệu ở độ pH bền ion xác định. Tm là nhiệt độ (trong điều kiện cường độ ion, độ pH và nồng độ nucleic xác định) mà ở đó 50% đoạn dò bổ trợ cho đích lai với trình tự đích ở trạng thái cân bằng (khi các trình tự đích có mặt với lượng dư, ở Tm, 50% mẫu dò ở trạng thái cân bằng). Các điều kiện nghiêm ngặt có thể là các điều kiện trong đó nồng độ muối nhỏ hơn khoảng 1,0M ion natri, thường là nồng độ nằm trong khoảng từ 0,01M đến 1,0M ion natri (hoặc các muối khác) ở độ pH nằm trong khoảng từ 7,0 đến 8,3 và nhiệt độ ít nhất khoảng 30°C đối với mẫu dò ngắn (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, 10 đến 50 nucleotit) và ít nhất khoảng 60°C đối với mẫu dò dài (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, nhiều hơn 50 nucleotit). Các điều kiện nghiêm ngặt còn có thể đạt được bằng cách bổ

sung các tác nhân làm mất ổn định như formamit. Để lai chọn lọc hoặc đặc hiệu, một tín hiệu dương tính có thể lai với mức độ gấp ít nhất hai lần tín hiệu nền, tùy ý lai gấp 10 lần tín hiệu nền. Các điều kiện lai nghiêm ngặt làm ví dụ có thể là như sau: 50% formamit, 5X SSC, và 1% SDS, ủ ở 42°C, hoặc 5X SSC, 1% SDS, ủ ở 65°C, rửa trong dung dịch 0,2X SSC, và 0,1% SDS ở 65°C. Bước rửa như vậy có thể được thực hiện trong 5, 15, 30, 60, 120, hoặc nhiều phút.

Thuật ngữ "sinh vật nhân thật" được sử dụng trong bản mô tả để chỉ vi sinh vật thuộc miền phát sinh giống loài Eucarya như động vật (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các động vật có vú, côn trùng, loài bò sát, chim, v.v.), lớp trùng lông tơ, thực vật (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, thực vật một lá mầm, thực vật hai lá mầm, tảo, v.v.), nấm, nấm men, trùng lông roi, vi bào tử đảm, sinh vật đơn bào, v.v..

Thuật ngữ "sinh vật nhân sơ" được sử dụng trong bản mô tả để chỉ vi sinh vật vật nhân sơ. Ví dụ, sinh vật nhân sơ có thể thuộc loài Eubacteria (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, *Escherichia coli*, *Thermus thermophilus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Pseudomonas* fluorescens, *Pseudomonas* aeruginosa, *Pseudomonas* putida, v.v.), hoặc thuộc loài *Archaea* (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, *Methanococcus jannaschii*, *Methanobacterium thermoautotrophicum*, *Halobacterium* như *Haloferax volcanii* và chủng *Halobacterium* NRC-1, *Archaeoglobus fulgidus*, *Pyrococcus furiosus*, *Pyrococcus horikoshii*, *Aeuropyrum pernix*, v.v.).

Thuật ngữ "đối tượng" được sử dụng trong bản mô tả để chỉ động vật, theo một số phương án là động vật có vú, và theo các phương án khác là người, là đối tượng điều trị, quan sát hoặc thử nghiệm. Động vật có thể là động vật nuôi tại nhà (ví dụ, chó, mèo, và các động vật tương tự), động vật nuôi trong trang trại (ví dụ, bò cái, cừu, lợn, ngựa, và các động vật tương tự) hoặc động vật dùng trong phòng thí nghiệm (ví dụ, chuột cống, chuột nhắt, chuột lang, và các động vật tương tự).

Thuật ngữ "lượng hữu hiệu" được sử dụng trong bản mô tả để chỉ lượng polypeptit chứa axit amin không có trong tự nhiên đã được cải biến được sử dụng để làm thuyên giảm một hoặc nhiều triệu chứng bệnh, tình trạng bệnh lý hoặc rối loạn được điều trị đến một mức độ nào đó. Các dược phẩm chứa polypeptit chứa axit amin không có trong tự

nhiên được cải biến được bộc lộ trong bản mô tả này có thể được sử dụng để phòng ngừa, tăng cường, và/hoặc điều trị bệnh.

Thuật ngữ "tăng cường" hoặc "việc tăng cường" được sử dụng trong bản mô tả để chỉ để tăng hoặc kéo dài hiệu lực hoặc khoảng thời gian của một tác động mong muốn. Do đó, liên quan đến việc gia tăng tác động của các tác nhân điều trị bệnh, thuật ngữ "tăng cường" được sử dụng trong bản mô tả để chỉ khả năng tăng hoặc kéo dài, hiệu lực hoặc khoảng thời gian, tác động của các dược chất để điều trị bệnh khác trong một hệ. Thuật ngữ "lượng hữu hiệu có tác dụng tăng cường" sử dụng trong bản mô tả này để chỉ lượng thích hợp để gia tăng tác động của một dược chất khác để điều trị bệnh trong một hệ thống mong muốn. Khi được sử dụng cho bệnh nhân, lượng hữu hiệu đối với mục đích này sẽ phụ thuộc vào mức độ nghiêm trọng và tiến trình của bệnh, rối loạn hoặc tình trạng bệnh lý, việc điều trị trước đó, tình trạng sức khỏe của bệnh nhân và đáp ứng đối với các thuốc, và quyết định của bác sĩ điều trị.

Thuật ngữ "được cải biến" được sử dụng trong bản mô tả để chỉ sự thay đổi bất kỳ được tạo ra đối với một polypeptit nhất định, như sự thay đổi về chiều dài của polypeptit, trình tự axit amin, công thức hóa học, sự cải biến đồng dịch mã, hoặc sự cải biến sau dịch mã của polypeptit. Thuật ngữ dạng "(được cải biến)" được sử dụng trong bản mô tả để chỉ các polypeptit đang được bàn luận đến tùy ý được cải biến, tức là các polypeptit đang được bàn luận đến có thể được cải biến hoặc không được cải biến.

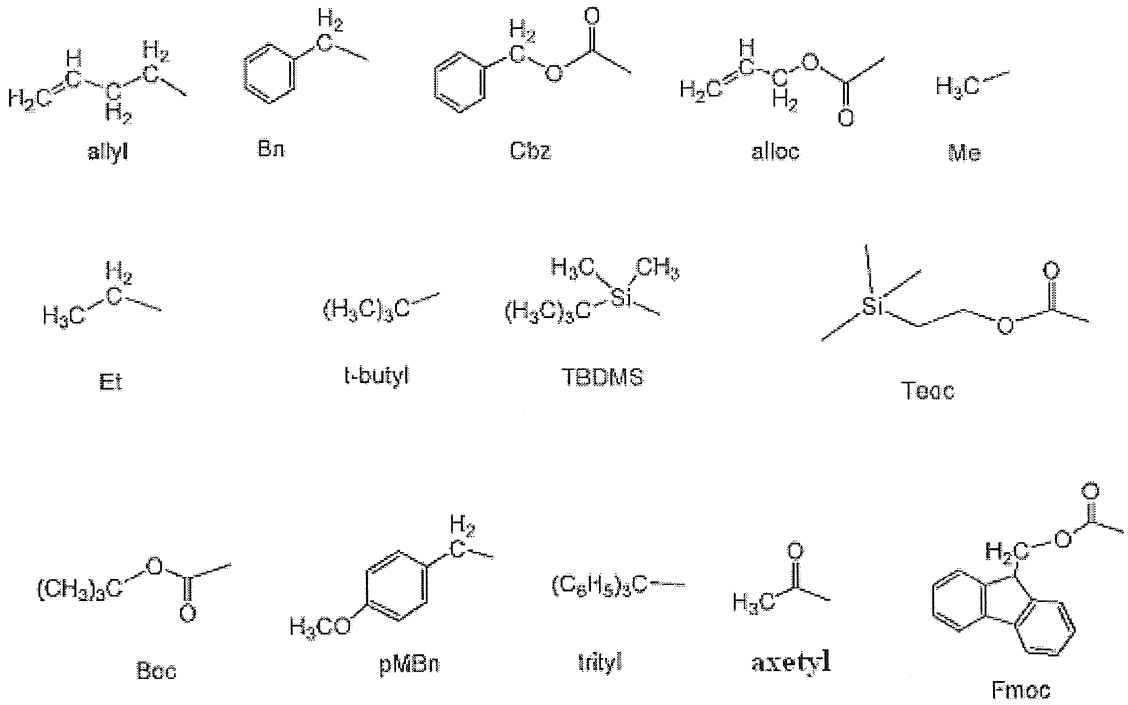
Thuật ngữ "cải biến sau dịch mã" được sử dụng trong bản mô tả để chỉ sự cải biến bất kỳ của axit amin có trong tự nhiên hoặc không có trong tự nhiên xảy ra đối với axit amin này sau khi nó đã được kết hợp vào chuỗi polypeptit. Thuật ngữ này bao hàm, chỉ để làm ví dụ, sự cải biến đồng dịch mã *in vivo*, sự cải biến đồng dịch mã *in vitro* (như trong hệ dịch mã không chứa tế bào), sự cải biến sau dịch mã *in vivo*, và sự cải biến sau dịch mã *in vitro*.

Trong các ứng dụng phòng ngừa bệnh, các dược phẩm chứa polypeptit relaxin được cho bệnh nhân dễ mắc hoặc theo cách khác có nguy cơ mắc một bệnh, rối loạn hoặc tình trạng bệnh lý cụ thể dùng. Lượng như vậy được xác định là "lượng hữu hiệu có tác dụng phòng ngừa bệnh". Trong ứng dụng này, lượng chính xác cũng phụ thuộc vào tình

trạng sức khỏe của bệnh nhân, thể trọng, và yếu tố tương tự. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực phương pháp này cũng dễ dàng xác định được lượng hữu hiệu có tác dụng phòng ngừa bệnh như vậy bằng các thử nghiệm thông thường (ví dụ, thử nghiệm lâm sàng theo thang liều lượng).

Thuật ngữ "được bảo vệ" được sử dụng trong bản mô tả để chỉ sự có mặt của "nhóm bảo vệ" hoặc gốc ngăn ngừa phản ứng của nhóm chức phản ứng hóa học trong các điều kiện phản ứng nhất định. Nhóm bảo vệ thay đổi tùy theo loại nhóm phản ứng hóa học cần được bảo vệ. Ví dụ, khi nhóm phản ứng hóa học là amin hoặc hyđrazit, nhóm bảo vệ có thể được chọn từ nhóm bao gồm tert-butyloxycarbonyl (t-Boc) và 9-floreny-lmetoxycarbonyl (Fmoc). Khi nhóm phản ứng hóa học là thiol, nhóm bảo vệ có thể là orthopyriđylđisulfua. Khi nhóm phản ứng hóa học là axit carboxylic, như axit butanoic hoặc propionic, hoặc nhóm hyđroxyl, nhóm bảo vệ có thể là nhóm benzyl hoặc alkyl như metyl, etyl, hoặc tert-butyl. Các nhóm bảo vệ khác đã biết trong lĩnh vực phương pháp này cũng có thể được sử dụng trong hoặc với các phương pháp và các dược phẩm theo sáng chế, bao gồm các nhóm nhạy với ánh sáng như Nvoc và MeNvoc. Các nhóm bảo vệ khác đã biết trong lĩnh vực phương pháp này cũng có thể được sử dụng trong hoặc với các phương pháp và các dược phẩm theo sáng chế.

Chỉ để làm ví dụ, các nhóm phong bế/bảo vệ có thể được chọn trong số các nhóm có công thức:



Các nhóm bảo vệ khác đã được bộc lộ trong: Greene and Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 3rd Ed., John Wiley & Sons, New York, NY, 1999, toàn bộ nội dung của tài liệu này được kết hợp vào sáng chế bằng cách viện dẫn.

Trong các ứng dụng điều trị beenhj, các dược phẩm chứa polypeptit axit amin không có trong tự nhiên đã được cải biến được cho bệnh nhân mắc bệnh, tình trạng bệnh lý hoặc rối loạn dùng, với lượng đủ để chữa trị hoặc ngăn chặn ít nhất một phần các triệu chứng bệnh, rối loạn hoặc tình trạng bệnh lý. Lượng như vậy được xác định là "lượng hữu hiệu có tác dụng điều trị bệnh, và sẽ phụ thuộc vào mức độ nghiêm trọng và tiến trình của bệnh, rối loạn hoặc tình trạng của bệnh, việc điều trị trước đó, tình trạng sức khỏe của bệnh nhân và đáp ứng đối với thuốc, và quyết định của bác sĩ điều trị. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này được cho là đã biết rõ cách xác định lượng có tác dụng điều trị bệnh như vậy bằng các thử nghiệm thông thường (ví dụ, thử nghiệm lâm sàng theo thang liều lượng).

Các polypeptit relaxin theo sáng chế có thể được sử dụng để điều biến sự co mạch, sự sản sinh NO, ET-1, Ang II, và sự kết tụ tiểu cầu. Theo một phương án của sáng chế, bệnh nhân cần điều trị nhận một lượng polypeptit relaxin theo sáng chế có tác dụng điều trị bệnh mà sẽ làm giảm hiện tượng co mạch ở bệnh nhân 10%, 15%, 20%, 25%, 30%,

35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, nhiều hơn 100%, 150%, nhiều hơn 150%, 200%, nhiều hơn 200% so với mức ranh giới mà chúng cần điều trị để đạt tới. Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến phương pháp điều trị bệnh cho bệnh nhân cần điều trị để tăng sự sản sinh NO ở bệnh nhân này bằng cách sử dụng polypeptit relaxin với lượng hữu hiệu có tác dụng điều trị để tăng sự sản sinh NO lên 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, nhiều hơn 100%, 150%, nhiều hơn 150%, 200%, nhiều hơn 200%.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến phương pháp điều trị bệnh cho bệnh nhân cần điều trị bằng các polypeptit relaxin theo sáng chế với lượng hữu hiệu có tác dụng điều trị để làm giảm sự kết tụ tiểu cầu ở bệnh nhân đi 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, nhiều hơn 100%, 150%, nhiều hơn 150%, 200%, nhiều hơn 200%. Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến phương pháp điều trị bệnh cho bệnh nhân cần điều trị bằng các polypeptit relaxin với lượng hữu hiệu có tác dụng điều trị để làm giảm chứng phì đại. Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến phương pháp điều trị bệnh cho bệnh nhân cần điều trị bằng các polypeptit relaxin theo sáng chế với lượng hữu hiệu có tác dụng điều trị bệnh làm giảm quá trình tổng hợp protein được kích thích bởi CF ở bệnh nhân đi 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, nhiều hơn 100%, 150%, nhiều hơn 150%, 200%, nhiều hơn 200%. Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến phương pháp điều trị bệnh cho bệnh nhân cần điều trị bệnh để tăng sự biểu hiện ANP ở bệnh nhân bằng cách sử dụng polypeptit relaxin với lượng hữu hiệu có tác dụng điều trị để tăng sự sản sinh NO lên 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, nhiều hơn 100%, 150%, nhiều hơn 150%, 200%, nhiều hơn 200%.

Các phương pháp hiện có nhờ đó peg-relaxin theo sáng chế có sự gia tăng AUC gấp 10 lần so với sự gia tăng AUC gấp 15 lần ở relaxin thể dại; gia tăng nhiều hơn 15 lần ; gia tăng 20 lần; gia tăng nhiều hơn 20 lần; gia tăng 25 lần; gia tăng nhiều hơn 25 lần; gia tăng 30 lần; gia tăng nhiều hơn 30 lần; gia tăng 35 lần; gia tăng nhiều hơn 35 lần; gia tăng 40 lần; gia tăng nhiều hơn 40 lần; gia tăng 45 lần; gia tăng nhiều hơn 45 lần; gia tăng 50

lần; gia tăng nhiều hơn 50 lần; gia tăng 55 lần; gia tăng nhiều hơn 55 lần; gia tăng 60 lần; gia tăng nhiều hơn 60 lần; gia tăng 65 lần; gia tăng nhiều hơn 65 lần; gia tăng 70 lần; gia tăng nhiều hơn 70 lần; gia tăng 75 lần; gia tăng nhiều hơn 75 lần; gia tăng 80 lần; gia tăng nhiều hơn 80 lần; gia tăng 85 lần; gia tăng nhiều hơn 85 lần; gia tăng 90 lần; gia tăng nhiều hơn 90 lần; gia tăng 95 lần; gia tăng nhiều hơn 95 lần; gia tăng 100 lần; gia tăng nhiều hơn 100 lần.

Thuật ngữ "điều trị bệnh" được sử dụng trong bản mô tả để chỉ việc điều trị nhằm phòng ngừa bệnh và/hoặc điều trị nhằm chữa bệnh.

Các polypeptit axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên nêu trong bản mô tả này có thể bao gồm các hợp chất được đánh dấu bằng đồng vị với một hoặc nhiều nguyên tử được thế bằng nguyên tử có nguyên tử lượng hoặc số khối lượng khác nguyên tử lượng hoặc số khối lượng thường được tìm thấy trong tự nhiên. Ví dụ về các đồng vị có thể được kết hợp vào các hợp chất theo sáng chế lần lượt bao gồm các đồng vị của hyđro, cacbon, nitơ, oxy, flo và clo, như 2H, 3H, 13C, 14C, 15N, 18O, 17O, 35S, 18F, 36Cl. Các hợp chất nhất định được đánh dấu bằng đồng vị được bộc lộ trong bản mô tả này, ví dụ, các hợp chất mà các đồng vị phóng xạ như 3H và 14C được kết hợp vào, có thể là hữu dụng trong việc thử nghiệm phân phối thuốc và/hoặc cơ chất ở mô. Hơn nữa, việc thế bằng các đồng vị như đơteri, tức là 2H, có thể tạo ra một số ưu điểm về mặt điều trị bệnh đạt được nhờ mức độ ổn định cao hơn trong chuyển hóa, ví dụ, thời gian bán thải *in vivo* dài hơn hoặc giảm yêu cầu về liều lượng.

Tất cả các chất đồng phân bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các chất đồng phân không đối quang, các chất đồng phân đối ảnh, và hỗn hợp của chúng được xem là một phần của chế phẩm theo sáng chế. Theo các phương án khác hoặc các phương án khác nữa, các polypeptit axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên được biến đổi bằng cách cho sinh vật cần nó dùng để tạo ra chất chuyển hoá, sau đó chất này được sử dụng để tạo ra tác dụng mong muốn, bao gồm tác dụng trị liệu mong muốn. Theo các phương án khác hoặc các phương án khác nữa, sáng chế đề cập đến các chất chuyển hóa có hoạt tính của các polypeptit axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên.

Trong một số tình huống, các polypeptit chứa axit amin được mã hóa không có

trong tự nhiên có thể tồn tại ở dạng các chất hỗ biến. Ngoài ra, các polypeptit chứa axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên được bộc lộ trong bản mô tả này có thể tồn tại ở dạng chưa được solvat hóa cũng như các dạng đã được solvat hóa với dung môi dược dụng như nước, etanol, và các dung môi tương tự. Các dạng đã được solvat hóa cũng được xem là đã được bộc lộ trong bản mô tả này. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này cần phải nhận thấy rằng một số trong số các hợp chất theo sáng chế có thể tồn tại ở vài dạng hỗ biến. Tất cả các dạng hỗ biến này được xem như là một phần của dược phẩm theo sáng chế,

Trừ khi có quy định cụ thể khác, các phương pháp phổ khối, NMR, phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao, hóa học protein, sinh hóa thông thường, các phương pháp ADN tái tổ hợp và dược lý mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này đã biết rõ được sử dụng.

Sáng chế đề cập đến các polypeptit relaxin chứa ít nhất một axit amin không có trong tự nhiên. Theo một số phương án, polypeptit relaxin với ít nhất một axit amin không có trong tự nhiên có ít nhất một cải biến sau dịch mã. Theo một phương án, ít nhất một cải biến sau dịch mã bao gồm việc gắn một phân tử bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, nhãn, chất nhuộm, polyme, polyme hòa tan trong nước, dẫn xuất của polyetylen glycol, chất liên kết ngang quang hóa, đồng vị phóng xạ, hợp chất gây độc tế bào, dược chất, nhãn ái lực, nhãn ái lực quang học, hợp chất phản ứng, nhựa, protein thứ hai hoặc polypeptit hoặc chất tương tự polypeptit, kháng thể hoặc đoạn kháng thể, chất tạo chelat kim loại, đồng yếu tố, axit béo, hyđrat cacbon, polynucleotit, ADN, ARN, polynucleotit đối nghĩa, sacarit, polyme hòa tan trong nước tổng hợp dạng cây, xyclođextrin, axit ribonucleic ức chế, vật liệu sinh học, hạt nano, dấu spin, nhóm huỳnh quang, gốc chứa kim loại, gốc phóng xạ, nhóm chức mới, nhóm tương tác cộng hóa trị hoặc không cộng hóa trị với các phân tử khác, gốc kiểu lồng quang học, gốc dễ bị kích thích bởi sự phóng xạ quang hóa, gốc có khả năng quang đồng phân hóa, biotin, dẫn xuất của biotin, chất tương tự biotin, gốc có nguyên tử nặng, nhóm có thể phân cắt hóa học, nhóm có thể phân cắt quang học, chuỗi bên kéo dài, đường liên kết với cacbon, chất hoạt hóa quá trình oxy hóa khử, axit amin thio, gốc có tính độc, gốc được gắn nhãn đồng vị, đoạn dò sinh lý, nhóm lân quang, nhóm phát quang hóa học, nhóm dày đặc điện tử, nhóm từ tính, nhóm

xen giữa, nhóm mang màu, chất vận chuyển năng lượng, chất có hoạt tính sinh học, chất đánh dấu có thể phát hiện được, phân tử nhỏ, chấm lượng tử, chất vận chuyển nano, nucleotit phóng xạ, chất vận chuyển phóng xạ, chất bắt giữ nơtron, hoặc hỗn hợp bất kỳ gồm các chất nêu trên hoặc các hợp chất hoặc chất mong muốn bất kỳ khác, chứa nhóm phản ứng thứ hai vào ít nhất một axit amin không có trong tự nhiên chứa nhóm phản ứng thứ nhất bằng cách sử dụng phương pháp hóa học mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này đã biết là thích hợp đối với các nhóm phản ứng cụ thể. Ví dụ, nhóm phản ứng thứ nhất là gốc alkynyl (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, axit amin p-propargyl-oxyphenylalanin không có trong tự nhiên, trong đó nhóm propargyl đôi khi còn được gọi là gốc axetylen) và nhóm phản ứng thứ hai là gốc aziđo, và sử dụng phương pháp hóa học cộng xyclo [3+2]. Theo ví dụ khác, nhóm phản ứng thứ nhất là gốc aziđo (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, axit amin p-aziđo-L-phenylalanin không có trong tự nhiên) và nhóm phản ứng thứ hai là gốc alkynyl. Theo một số phương án của polypeptit relaxin được cải biến theo sáng chế, ít nhất một axit amin không có trong tự nhiên (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, axit amin không có trong tự nhiên chứa nhóm chức keto) chứa ít nhất một cải biến sau dịch mã, được sử dụng, trong đó ít nhất một cải biến sau dịch mã chứa gốc sacarit. Theo một số phương án, cải biến sau dịch mã được tạo ra *in vivo* ở tế bào nhân thật hoặc ở tế bào nhân sơ. Nhóm liên kết, polyme, polyme hòa tan trong nước, hoặc phân tử khác có thể gắn phân tử này vào polypeptit. Phân tử này có thể được liên kết trực tiếp với polypeptit.

Theo một số phương án, protein có ít nhất một cải biến sau dịch mã được tạo ra *in vivo* bởi một tế bào chủ, trong đó cải biến sau dịch mã này thường không được tạo ra bởi một kiểu tế bào vật chủ khác. Theo một số phương án, protein có ít nhất một cải biến sau dịch mã được tạo ra *in vivo* bởi tế bào nhân thật, trong đó cải biến sau dịch mã này thường không được tạo ra bởi tế bào không nhân thật. Ví dụ về sự cải biến sau dịch mã bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, sự glycosyl hoá, axetyl hóa, axyl hóa, sự cải biến lipit, palmitoyl hóa, sự bổ sung palmitat, phosphoryl hóa, sự cải biến liên kết glycolipit, và các cải biến tương tự.

Theo một số phương án, polypeptit relaxin chứa một hoặc nhiều axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên để glycosyl hoá, axetyl hóa, axyl hóa, cải biến lipit,

palmitoyl hóa, bổ sung palmitat, phosphoryl hóa, hoặc cải biến liên kết glycolipit của polypeptit. Theo một số phương án, polypeptit relaxin chứa một hoặc nhiều axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên để glycosyl hoá polypeptit. Theo một số phương án, polypeptit relaxin chứa một hoặc nhiều axit amin được mã hóa có trong tự nhiên để glycosyl hoá, axetyl hóa, axyl hóa, cải biến lipit, palmitoyl hóa, bổ sung palmitat, phosphoryl hóa, hoặc cải biến liên kết glycolipit của polypeptit. Theo một số phương án, polypeptit relaxin chứa một hoặc nhiều axit amin được mã hóa có trong tự nhiên để glycosyl hoá polypeptit này.

Theo một số phương án, polypeptit relaxin chứa một hoặc nhiều sự bổ sung và/hoặc thay thế axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên làm gia tăng mức độ glycosyl hoá của polypeptit. Theo một số phương án, polypeptit relaxin chứa một hoặc nhiều khuyết đoạn làm gia tăng mức độ glycosyl hoá của polypeptit. Theo một số phương án, polypeptit relaxin chứa một hoặc nhiều sự bổ sung và/hoặc thay thế axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên làm gia tăng mức độ glycosyl hoá ở một axit amin khác trong polypeptit. Theo một số phương án, polypeptit relaxin chứa một hoặc nhiều khuyết đoạn làm gia tăng mức độ glycosyl hoá ở một axit amin khác trong polypeptit. Theo một số phương án, polypeptit relaxin chứa một hoặc nhiều sự bổ sung và/hoặc thay thế axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên làm gia tăng mức độ glycosyl hoá ở một axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên trong polypeptit. Theo một số phương án, polypeptit relaxin chứa một hoặc nhiều sự bổ sung và/hoặc thay thế axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên làm gia tăng mức độ glycosyl hoá ở axit amin được mã hóa có trong tự nhiên trong polypeptit. Theo một số phương án, polypeptit relaxin chứa một hoặc nhiều sự bổ sung và/hoặc thay thế axit amin được mã hóa có trong tự nhiên làm gia tăng mức độ glycosyl hoá ở một axit amin khác trong polypeptit. Theo một số phương án, polypeptit relaxin chứa một hoặc nhiều sự bổ sung và/hoặc thay thế axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên làm gia tăng mức độ glycosyl hoá ở axit amin được mã hóa có trong tự nhiên trong polypeptit. Theo một số phương án, polypeptit relaxin chứa một hoặc nhiều sự bổ sung và/hoặc thay thế axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên làm gia tăng mức độ glycosyl hoá ở axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên trong polypeptit.

Theo một phương án, cải biến sau dịch mã bao gồm sự gắn một oligosacarit vào một asparagin bằng một liên kết GlcNAc-asparagin (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, oligosacarit chứa (GlcNAc-Man)2-Man-GlcNAc-GlcNAc, và các nhóm tương tự). Theo phương án khác, cải biến sau dịch mã bao gồm sự gắn một oligosacarit (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, Gal-GalNAc, Gal-GlcNAc, v.v.) vào một serin hoặc threonin bằng liên kết GalNAc-serin, GalNAc-threonin, GlcNAc-serin, hoặc GlcNAc-threonin. Theo một số phương án, protein hoặc polypeptit theo sáng chế có thể chứa trình tự tiết hoặc trình tự định vị, nhãn biểu vị, nhãn FLAG, nhãn polyhistiđin, thể dung hợp GST, và/hoặc các nhóm tương tự. Ví dụ về các trình tự tín hiệu tiết bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, trình tự tín hiệu tiết ở sinh vật nhân sơ, trình tự tín hiệu tiết ở sinh vật nhân thật, trình tự tín hiệu tiết ở sinh vật nhân thật được tối ưu hóa ở vị trí 5' để biểu hiện ở vi khuẩn, trình tự tín hiệu tiết mới, trình tự tín hiệu tiết pectat lyaza, trình tự tín hiệu tiết Omp A, và trình tự tín hiệu tiết ở thể thực khuẩn. Ví dụ về trình tự tín hiệu tiết bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, STII (nhân sơ), Fd GIII và M13 (thể thực khuẩn), Bgl2 (nấm men), và trình tự tín hiệu bla thu được từ gen nhảy. Trình tự bất kỳ như vậy có thể được cải biến để tạo ra kết quả mong muốn với polypeptit bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, sự thay thế một trình tự tín hiệu bằng một trình tự tín hiệu khác, thay thế một trình tự dẫn bằng một trình tự dẫn khác, v.v..

Protein hoặc polypeptit đáng quan tâm có thể chứa ít nhất một, ít nhất hai, ít nhất ba, ít nhất bốn, ít nhất năm, ít nhất sáu, ít nhất bảy, ít nhất tám, ít nhất chín, hoặc mười hoặc nhiều axit amin không có trong tự nhiên. Các axit amin không có trong tự nhiên có thể là giống nhau hoặc khác nhau, ví dụ, có thể có 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 hoặc nhiều vị trí khác nhau trong protein chứa 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 hoặc nhiều axit amin khác nhau không có trong tự nhiên. Theo một số phương án, ít nhất một, nhưng ít hơn toàn bộ, axit amin cụ thể có mặt trong phiên bản protein có trong tự nhiên được thế bằng axit amin không có trong tự nhiên.

Sáng chế đề xuất phương pháp và dược phẩm chứa relaxin chứa ít nhất một axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên. Việc đưa ít nhất một axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên vào relaxin có thể cho phép sử dụng hóa học tiếp hợp bao gồm các phản ứng hóa học đặc hiệu bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, phản ứng với một

hoặc nhiều axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên trong khi không phản ứng với 20 axit amin thường có. Theo một số phương án, relaxin chứa axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên được liên kết với polyme hòa tan trong nước, như polyetylen glycol (PEG), nhờ chuỗi bên của axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên. Sáng chế đề xuất phương pháp đặc biệt hữu hiệu để cải biến chọn lọc các protein với các dẫn xuất PEG, mà bao gồm sự kết hợp chọn lọc axit amin được mã hóa không di truyền bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các axit amin chứa các nhóm chức hoặc các phần tử thế không được tìm thấy ở 20 axit amin được kết hợp trong tự nhiên, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, gốc keton, azit hoặc axetylen, vào các protein đáp ứng bộ ba mã hóa chọn lọc và sau đó cải biến các axit amin này bằng một dẫn xuất PEG dễ phản ứng thích hợp. Khi được kết hợp, thì các chuỗi bên của axit amin sau đó có thể được cải biến bằng cách sử dụng phương pháp hóa học mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này đã biết là thích hợp đối với các nhóm chức hoặc các phần tử thế cụ thể có mặt trong axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên. Nhiều loại phương pháp hóa học đã biết thích hợp để dùng trong sáng chế nhằm kết hợp một polyme hòa tan trong nước vào protein. Các phương pháp như vậy lần lượt bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, phản ứng cộng xyclo [3+2] của Huisgen (xem: Padwa, A. *Comprehensive Organic Synthesis*, Vol. 4, (1991) Ed. Trost, B. M., Pergamon, Oxford, p. 1069-1109 chẳng hạn; và, Huisgen, R. *1,3-dipolar Cycloaddition Chemistry*, (1984) Ed. Padwa, A., Wiley, New York, p. 1-176) với, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các dẫn xuất axetylen hoặc azit.

Do phương pháp cộng xyclo [3+2] của Huisgen bao gồm phản ứng cộng xyclo mà không thế ái nhân, các protein có thể được cải biến với tính chọn lọc rất cao. Phản ứng này có thể được thực hiện ở nhiệt độ phòng trong điều kiện có nước với tính chọn lọc vùng tuyệt vời (1,4 > 1,5) bằng cách bổ sung lượng chất xúc tác chứa các muối Cu(I) vào hỗn hợp phản ứng. Ví dụ, xem: Tornoe et al., (2002) *J. Org. Chem.* 67:3057-3064; và Rostovtsev et al., (2002) *Angew. Chem. Int. Ed.* 41:2596-2599; và WO 03/101972. Phân tử có thể được bổ sung vào protein theo sáng chế thông qua phản ứng cộng [3+2] xyclo bao gồm phân tử hầu như bất kỳ có nhóm chức hoặc phần tử thế thích hợp bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, dẫn xuất aziđo hoặc axetylen. Các phân tử này có thể được bổ sung vào axit amin không có trong tự nhiên với nhóm axetylen, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, p-propargyloxyphenylalanin, hoặc nhóm aziđo, lần lượt bao gồm,

nhưng không chỉ giới hạn ở, p-aziđo-phenylalanin.

Vòng có 5 cạnh mà thu được từ phản ứng cộng [3+2] xyclo Huisgen nhìn chung là không thuận nghịch trong môi trường khử và bền với sự thủy phân trong khoảng thời gian kéo dài trong môi trường nước. Do vậy, các tính chất vật lý và hóa học của nhiều loại chất có thể được cải biến trong các điều kiện đòi hỏi có nước với các dẫn xuất PEG có hoạt tính theo sáng chế. Điều quan trọng hơn nữa là, vì các gốc azit và axetylen đặc hiệu với nhau (và không, ví dụ, phản ứng với axit amin bất kỳ trong số 20 axit amin thông thường được mã hóa theo kỹ thuật di truyền), các protein có thể được cải biến ở một hoặc nhiều vị trí đặc hiệu với độ chọn lọc cực cao.

Sáng chế cũng đề cập đến các dẫn xuất bền với sự thủy phân và hòa tan trong nước của các dẫn xuất PEG và các polyme ưa nước có liên quan có một hoặc nhiều gốc axetylen hoặc azit. Các dẫn xuất PEG polyme chứa các gốc axetylen này có tính chọn lọc cực cao đối với phản ứng ghép cặp với các gốc azit mà được đưa theo cách chọn lọc vào các protein đáp lại bộ ba mã hóa chọn lọc. Tương tự, các dẫn xuất PEG polyme chứa các gốc azit có tính chọn lọc cực cao đối với phản ứng ghép cặp với các gốc axetylen được đưa theo cách chọn lọc vào các protein đáp lại bộ ba mã hóa chọn lọc.

Cụ thể hơn, các gốc azit bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, alkyl azit, aryl azit và các dẫn xuất của các azit này. Các dẫn xuất của alkyl và aryl azit có thể bao gồm các phần tử thế khác miễn là giữ được tính phản ứng đặc hiệu với axetylen. Các gốc axetylen bao gồm alkyl và aryl axetylen và các dẫn xuất của mỗi gốc này. Các dẫn xuất của alkyl và aryl axetylen có thể bao gồm các phần tử thế khác miễn là giữ được tính phản ứng đặc hiệu với azit.

Sáng chế đề cập đến thể tiếp hợp của các chất có nhiều loại nhóm chức, các phần tử thế hoặc các gốc, với các chất khác bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, nhãn; chất nhuộm; polyme; polyme hòa tan trong nước; dẫn xuất của polyetylen glycol; chất liên kết ngang quang hóa; đồng vị phóng xạ; hợp chất gây độc tế bào; dược chất; nhãn ái lực; nhãn ái lực quang học; hợp chất phản ứng; nhựa; protein thứ hai hoặc polypeptit hoặc chất tương tự polypeptit; kháng thể hoặc đoạn kháng thể; chất tạo chelat kim loại; đồng yếu tố; axit béo; hyđrat cacbon; polynucleotit; ADN; ARN; polynucleotit đối nghĩa;

sacarit; polyme hòa tan trong nước tổng hợp dạng cây; xyclođextrin; axit ribonucleic ức chế; vật liệu sinh học; hạt nano; dấu spin; nhóm huỳnh quang, gốc chứa kim loại; gốc phóng xạ; nhóm chức mới; nhóm tương tác cộng hóa trị hoặc không cộng hóa trị với các phân tử khác; gốc kiểu lồng quang học; gốc dễ bị kích thích bởi phóng xạ quang hóa; gốc có khả năng quang đồng phân hóa; biotin; dẫn xuất của biotin; chất tương tự biotin; gốc có nguyên tử nặng; nhóm có thể phân cắt hóa học; nhóm có thể phân cắt quang học; chuỗi bên kéo dài; đường liên kết với cacbon; chất hoạt hóa quá trình oxy hóa khử; amino thioaxit; gốc có tính độc; gốc được gắn nhãn đồng vị; đoạn dò sinh lý; nhóm lân quang; nhóm phát quang hóa học; nhóm dày đặc điện tử; nhóm từ tính; nhóm xen giữa; nhóm mang màu; chất vận chuyển năng lượng; chất có hoạt tính sinh học; chất đánh dấu có thể phát hiện được; phân tử nhỏ; chấm lượng tử; chất dẫn truyền nano; nucleotit phóng xạ; chất vận chuyển phóng xạ; chất bắt giữ nơtron; hoặc hỗn hợp bất kỳ gồm các chất này, hoặc hợp chất hoặc chất mong muốn bất kỳ khác. Sáng chế cũng đề cập đến thể tiếp hợp của các chất có gốc azit hoặc axetylen với các dẫn xuất PEG polyme có các gốc axetylen hoặc azit tương ứng. Ví dụ, PEG polyme chứa gốc azit có thể được ghép cặp với phân tử có hoạt tính sinh học ở một vị trí trên protein chứa một axit amin được mã hóa không theo kỹ thuật di truyền mang một nhóm chức axetylen. Liên kết mà nhờ đó PEG và phân tử có hoạt tính sinh học được ghép cặp bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các sản phẩm của phản ứng cộng [3+2] xyclo Huisgen.

Đã biết rõ trong lĩnh vực phương pháp này rằng PEG có thể được sử dụng để cải biến bề mặt của vật liệu sinh học (xem: ví dụ, patent Mỹ số 6,610,281; Mehvar, R., *J. Pharm Pharm Sci.*, 3(1): 125-136 (2000) mà được kết hợp vào sáng chế bằng cách viện dẫn). Sáng chế cũng đề cập đến vật liệu sinh học chứa bề mặt có một hoặc nhiều vị trí azit hoặc axetylen dễ phản ứng và một hoặc nhiều polyme chứa azit hoặc axetylen theo sáng chế được kết hợp với bề mặt này nhờ liên kết cộng [3+2] xyclo Huisgen. Vật liệu sinh học và các chất khác còn có thể được kết hợp với các dẫn xuất polyme được hoạt hóa ở azit hoặc axetylen nhờ liên kết khác không phải liên kết azit hoặc axetylen, như nhờ liên kết chứa gốc axit carboxylic, amin, rượu hoặc thiol, để lại gốc azit hoặc axetylen sẵn có cho các phản ứng tiếp theo.

Sáng chế đề cập đến phương pháp tổng hợp polyme chứa azit và axetylen theo

sáng chế. Trong trường hợp dẫn xuất PEG chứa azit, azit này có thể liên kết trực tiếp với nguyên tử cacbon của polyme. Theo cách khác, dẫn xuất PEG chứa azit có thể được điều chế bằng cách gắn một chất liên kết có gốc azit ở một đầu tận cùng vào một polyme được hoạt hóa theo cách thông thường sao cho polyme thu được có gốc azit ở đầu tận cùng của nó. Trong trường hợp dẫn xuất PEG chứa axetylen, axetylen có thể liên kết trực tiếp với nguyên tử cacbon của polyme này. Theo cách khác, dẫn xuất PEG chứa axetylen có thể được điều chế bằng cách gắn một chất liên kết có gốc axetylen ở một đầu tận cùng với polyme đã được hoạt hóa thông thường sao cho polyme thu được có gốc axetylen ở đầu tận cùng của nó.

Cụ thể hơn, trong trường hợp dẫn xuất PEG chứa azit, polyme hòa tan trong nước có ít nhất một gốc hyđroxyl có hoạt tính thực hiện phản ứng để tạo ra polyme được thế có một gốc dễ phản ứng hơn, như mesylat, tresylat, tosylat hoặc nhóm rời chuyển halogen trên đó. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này đã biết quy trình điều chế và sử dụng các dẫn xuất PEG chứa sulfonyl của halogenua axit, nguyên tử halogen và các nhóm rời chuyển khác. Sau đó, polyme đã được thế được cho tham gia phản ứng để thế gốc dễ phản ứng hơn bằng gốc azit ở đầu tận cùng của polyme. Theo cách khác, polyme hòa tan trong nước có ít nhất một gốc ái nhân hoặc ái điện tử có hoạt tính được cho tham gia phản ứng với chất liên kết có azit ở một đầu tận cùng sao cho liên kết cộng hóa trị được tạo ra giữa polyme PEG và chất liên kết và gốc azit nằm ở đầu tận cùng của polyme. Các gốc ái nhân và ái điện tử, kể cả các amin, thiol, hyđrazit, hyđrazin, rượu, carboxylat, alđehyt, keton, thioeste và các gốc tương tự là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này.

Cụ thể hơn, trong trường hợp dẫn xuất PEG chứa axetylen, polyme hòa tan trong nước có ít nhất một gốc hyđroxyl có hoạt tính được cho tham gia phản ứng để chiếm chỗ halogen hoặc nhóm rời chuyển khác đã được hoạt hóa từ tiền chất chứa gốc axetylen. Theo cách khác, polyme hòa tan trong nước có ít nhất một gốc ái nhân hoặc ái điện tử có hoạt tính được cho tham gia phản ứng với chất liên kết có axetylen ở một đầu tận cùng sao cho liên kết cộng hóa trị được tạo ra giữa polyme PEG và chất liên kết và gốc axetylen nằm ở đầu tận cùng của polyme. Việc sử dụng các gốc halogen, nhóm rời chuyển được hoạt hóa, các gốc ái nhân và ái điện tử trong phạm vi tổng hợp hữu cơ và điều chế

và sử dụng các dẫn xuất PEG là đã biết rõ trong lĩnh vực phương pháp này.

Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp cải biến chọn lọc các protein để bổ sung các chất khác vào protein đã được cải biến, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các polyme hòa tan trong nước như PEG và các dẫn xuất PEG chứa gốc azit hoặc axetylen. Các dẫn xuất PEG chứa azit và axetylen có thể được sử dụng để cải biến các đặc tính bề mặt và các phân tử mà ở đó khả năng tương thích về mặt sinh học, độ ổn định, độ hòa tan và không có khả năng sinh miễn dịch là quan trọng, đồng thời tạo ra các phương tiện gắn kết giữa các dẫn xuất PEG với các protein chọn lọc hơn so với các phương tiện đã biết trong lĩnh vực phương pháp này.

Các phương pháp chung tái tổ hợp axit nucleic để dùng theo sáng chế

Theo một số phương án, các axit nucleic mã hóa polypeptit relaxin đáng quan tâm sẽ được phân lập, được tách dòng và thường được thay đổi bằng cách áp dụng các phương pháp tái tổ hợp. Các phương án như vậy được sử dụng, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các phương pháp biểu hiện protein hoặc tạo ra các biến thể, các dẫn xuất, catset biểu hiện, hoặc các trình tự khác thu được từ polypeptit relaxin. Theo một số phương án, các trình tự mã hóa các polypeptit theo sáng chế được liên kết linh hoạt với gen khởi đầu khác loài.

Trình tự nucleotit mã hóa polypeptit relaxin chứa axit amin đã được mã hóa không có trong tự nhiên có thể được tổng hợp trên cơ sở trình tự axit amin của polypeptit ban đầu, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO.1 và SEQ ID NO.2 và sau đó thay đổi trình tự nucleotit sao cho tác động đến sự đưa vào (tức là kết hợp hoặc thay thế) hoặc loại bỏ (tức là khuyết đoạn hoặc thay thế) các gốc axit amin có liên quan. Thuận tiện, nếu rình tự nucleotit có thể được cải biến bằng cách gây đột biến định hướng điểm theo các phương pháp thông thường. Theo cách khác, trình tự nucleotit có thể được điều chế theo phương pháp tổng hợp hóa học bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, phương pháp được thực hiện bằng cách sử dụng chất tổng hợp oligonucleotit, trong đó oligonucleotit được thiết kế trên cơ sở trình tự axit amin của polypeptit mong muốn, và tốt hơn là chọn lọc các bộ ba mã hóa có lợi trong tế bào vật chủ mà trong đó polypeptit tái tổ hợp sẽ được tạo ra.

Sáng chế sử dụng các phương pháp thông thường trong lĩnh vực di truyền tái tổ hợp. Các tài liệu cơ bản bộc lộ các phương pháp chung được sử dụng trong sáng chế bao gồm: Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (3rd ed. 2001); Kriegler, *Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual* (1990); và *Current Protocols in Biology* (Ausubel et al., eds., 1994)).

Các tài liệu chung mô tả các phương pháp sinh học phân tử bao gồm: Berger and Kimrnel, *Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology* volume 152 Academic Press, Inc., San Diego, CA (Berger); Sambrook et al., *Molecular Cloning A Laboratory Manual* (2nd Ed.), Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1989 ("Sambrook") và *Current Protocols in Biology*, F.M. Ausubel et al., eds., *Current Protocols*, kết hợp giữa Greene Publishing Associates, Inc. và John Wiley & Sons, Inc., (đã được bổ sung đến 1999) ("Ausubel")). Các tài liệu này mô tả sự gây đột biến, việc sử dụng vectơ, các trình tự khởi đầu và nhiều chủ đề liên quan khác liên quan đến, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, sự tạo gen hoặc polynucleotit có các bộ ba mã hóa chọn lọc để tạo ra các protein chứa axit amin không có trong tự nhiên, các ARN vận chuyển trực giao, các synthetaza trực giao, và các cặp của chúng.

Các dạng gây đột biến khác nhau được sử dụng trong sáng chế nhằm nhiều mục đích bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, việc tạo ra synthetaza hoặc ARN vận chuyển mới, gây đột biến các phân tử ARN vận chuyển, gây đột biến polynucleotit mã hóa synthetaza, tạo ra các thư viện ARN vận chuyển, tạo ra các thư viện synthetaza, tạo ra các bộ ba mã hóa chọn lọc, để cài xen các bộ ba mã hóa chọn lọc mã hóa các axit amin không có trong tự nhiên vào protein hoặc polypeptit đáng quan tâm. Các dạng gây đột biến bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các phương pháp gây đột biến điểm ngẫu nhiên có định hướng, tái tổ hợp tương đồng, sắp xếp lại trật tự ADN hoặc gây đột biến tái diễn khác, xây dựng thể khảm, gây đột biến bằng cách sử dụng uraxil chứa khuôn mẫu, gây đột biến hướng oligonucleotit, gây đột biến ADN được cải biến phosphorothioat, gây đột biến bằng cách sử dụng ADN sợi kép được tạo khoảng trống hoặc các phương pháp tương tự, gây đột biến gián tiếp qua PCT, hoặc kết hợp chúng theo cách bất kỳ. Các phương pháp thích hợp khác bao gồm phương pháp sửa chữa điểm bắt cặp sai, gây đột biến bằng cách sử dụng chủng vật chủ khiếm khuyết sửa chữa, chọn lọc hạn chế và tinh chế hạn chế, gây

đột biến khuyết đoạn, gây đột biến bằng cách tổng hợp toàn bộ gen, sữa chữa phá vỡ sợi đôi, và các phương pháp tương tự. Phương pháp gây đột biến, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, gây đột biến liên quan đến cấu trúc thể khảm, cũng nằm trong phạm vi của sáng chế. Theo một phương án, phương pháp gây đột biến có thể được hướng dẫn bởi các thông tin đã biết về phân tử có trong tự nhiên hoặc phân tử có trong tự nhiên đã được thay đổi hoặc đã được cải biến, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, trình tự, so sánh trình tự, các đặc tính vật lý, cấu trúc bậc hai, bậc ba, hoặc bậc bốn, cấu trúc tinh thể hoặc các cấu trúc tương tự.

Các văn bản và ví dụ được tìm thấy ở đây mô tả các quy trình này. Các thông tin khác được tìm thấy ở các công bố và các tài liệu trích dẫn nêu trong: Ling et al., *Approaches to DNA mutagenesis; an overview, Anal Biochem.* 254(2): 157-178 (1997); Dale et al., *Oligonucleotide-directed random mutagenesis using the phosphorothioate method, Methods Mol. Biol.* 57:369-374 (1996); Smith, *in vitro mutagenesis*, *Ann. Rev. Genet.* 19:423-462 (1985); Botstein & Shortle, *Strategies and applications of in vitro mutagenesis, Science 2*29:1193-1201 (1985); Carter, *Site-directed mutagenesis, Biochem. J.* 237:1-7 (1986); Kunkel, *The efficiency of oligonucleotide directed mutagenesis*, trong *Axit nucleics & Molecular Biology* (Eckstein, F, và Lilley, D.M.J. eds., Springer Verlag, Berlin) (1987); Kunkel, *Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:488-492 (1985); Kunkel et al., *Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection*, *Methods in Enzymol*, 154, 367-382 (1987); Bass et al., *Mutant Trp repressors with new DNA-binding specificities, Science* 242:240-245 (1988); Zoller & Smith, *Oligonucleotide-directed mutagenesis using M13-derived vectors: an efficient and general procedure for the production of point mutations in any DNA fragment*, *Axit nucleics Res.* 10:6487-6500 (1982); Zoller & Smith, *Oligonucleotide-directed mutagenesis of DNA fragments cloned into M13 vectors*, *Methods in Enzymol*, 100:468-500 (1983); Zoller & Smith, *Oligonucleotide-directed mutagenesis: a simple method using two oligonucleotide primers and a single-stranded DNA template*, *Methods in Enzymol*. 154:329- 350 (1987); Taylor et al., *The use of phosphorothioate-modified DNA in restriction enzyme reactions to prepare nicked DNA*, *Nucl. Acids Res.* 13: 8749-8764 (1985); Taylor và đồng tác giả, The rapid generation of oligonucleotide-directed mutations at high frequency using phosphorothioate-modified

DNA, *Nucl. Acids Res.* 13: 8765-8785 (1985); Nakamaye & Eckstein, *Inhibition of restriction endonuclease Nci I cleavage by phosphorothioate groups and its application to oligonucleotide-directed mutagenesis*, *Nucl. Acids Res.* 14: 9679-9698 (1986); Sayers et al., *5'-3' Exonucleases in phosphorothioate-based oligonucleotide-directed mutagenesis*, *Nucl. Acids Res.* 16:791-802 (1988); Sayers et al., *Strand specific cleavage of phosphorothioate-chứa DNA by reaction with restriction endonucleases in the presence of ethidium bromide*, (1988) *Nucl. Acids Res.* 16: 803-814; Kramer et al., *The gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed mutation construction*, *Nucl. Acids Res.* 12: 9441 - 9456 (1984); Kramer & Fritz *Oligonucleotide-directed construction of mutations via gapped duplex DNA*, *Methods in Enzymol.* 154:350-367 (1987); Kramer et al., *Improved enzymatic in vitro reactions in the gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed construction of mutations*, *Nucl. Acids Res.* 16: 7207 (1988); Fritz et al., *Oligonucleotide-directed construction of mutations: a gapped duplex DNA procedure without enzymatic reactions in vitro*, *Nucl. Acids Res.* 16: 6987-6999 (1988); Kramer et al., *Different base/base mismatches are corrected with different efficiencies by the methyl-directed DNA mismatch-repair system of E. coli*, *Cell* 38:879-887 (1984); Carter et al., *Improved oligonucleotide site-directed mutagenesis using M13 vectors*, *Nucl. Acids Res.* 13: 4431-4443 (1985); Carter, *Improved oligonucleotide-directed mutagenesis using M13 vectors*, *Methods in Enzymol.* 154: 382-403 (1987); Eghtedarzadeh & Henikoff, *Use of oligonucleotides to generate large deletions*, *Nucl. Acids Res.* 14: 5115 (1986); Wells et al., *Importance of hydrogen-bond formation in stabilizing the transition state of subtilisin*, *Phil. Trans, R. Soc. Lond.* A 317: 415-423 (1986); Nambiar et al., *Total synthesis and cloning of a gene coding for the ribonuclease S protein, Science* 223: 1299-1301 (1984); Sakmar and Khorana, *Total synthesis and expression of a gene for the alpha-subunit of bovine rod outer segment guanine nucleotide-binding protein (transducin)*, *Nucl. Acids Res.* 14: 6361-6372 (1988); Wells et al., *Cassette mutagenesis: an efficient method for generation of multiple mutations at defined sites*, *Gene* 34:315-323 (1985); Grundstrom et al., *Oligonucleotide-directed mutagenesis by microscale 'shot-gun' gene synthesis*, *Nucl. Acids Res.* 13: 3305-3316 (1985); Mandecki, *Oligonucleotide-directed double-strand break repair in plasmids of Escherichia coli: a method for site-specific mutagenesis*, *Proc. Natl. Acad, Sci. USA*,

83:7177-7181 (1986); Arnold, *Protein Engineering for unusual environments, Current Opinion in Biotechnology* 4:450-455 (1993); Sieber et al., *Nature Biotechnology*, 19:456-460 (2001); W. P. C. Stemmer, *Nature* 370, 389-91 (1994); và I. A. Lorimer, I. Pastan, *Axit nucleics Res.* 23, 3067-8 (1995). Mô tả chi tiết hơn về nhiều phương pháp trong số các phương pháp nêu trên có thể được tìm thấy trong: *Methods in Enzymology* Volume 154, mà cũng mô tả cách kiểm soát hữu ích đối với các vấn đề rắc rối đối với các phương pháp gây đột biến khác nhau.

Oligonucleotit, ví dụ, dùng để gây đột biến theo sáng chế, ví dụ, đột biến các thư viện synthetaza, hoặc làm thay đổi ARN vận chuyển, thường được tổng hợp về mặt hóa học theo phương pháp phosphoramiđit trieste pha rắn được mô tả bởi Beaucage and Caruthers, *Tetrahedron Letts.* 22(20):1859-1862, (1981) ví dụ, bằng cách sử dụng phương pháp tổng hợp tự động, như đã được bộc lộ trong Needham-VanDevanter et al., *Axit nucleics Res.*, 12:6159-6168 (1984).

Sáng chế cũng đề cập đến tế bào vật chủ của sinh vật nhân thật, tế bào vật chủ của sinh vật nhân sơ, và vi sinh vật để kết hợp *in vivo* một axit amin không có trong tự nhiên nhờ cặp ARN vận chuyển trực giao/RS. Các tế bào vật chủ thường được cải biến gen (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, việc được biến nạp, tải nạp hoặc chuyển nhiễm) với polynucleotit theo sáng chế hoặc các cấu trúc bao gồm polynucleotit theo sáng chế, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, vectơ theo sáng chế, mà có thể là, ví dụ, vectơ tách dòng hoặc vectơ biểu hiện. Ví dụ, vùng mã hoá ARN vận chuyển (tARN) trực giao, ARN vận chuyển synthetaza trực giao, và protein được tạo dẫn xuất được liên kết linh hoạt với yếu tố kiểm soát mức độ biểu hiện gen có chức năng trong tế bào vật chủ mong muốn. Vectơ này có thể, ví dụ, ở dạng plasmit, cosmit, thể thực khuẩn, vi khuẩn, virut, polynucleotit trần, hoặc polynucleotit đã được tiếp hợp. Các vectơ được đưa vào tế bào và/hoặc vi sinh vật theo các phương pháp chuẩn bao gồm phương pháp xung điện (Fromm et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 5824 (1985)), phương pháp gây nhiễm bởi các vectơ virut, bắn phá ở tốc độ cao bằng các hạt nhỏ với axit nucleic trong chất nền chứa các hạt hoặc các phần tử nhỏ, hoặc trên bề mặt (Klein et al., *Nature* 327, 70-73 (1987)), và/hoặc các phương pháp tương tự. Các phương pháp thích hợp để chuyển axit nucleic vào tế bào *in vitro* bao gồm việc áp dụng các phương pháp thông qua liposom, vi

tiêm, dung hợp tế bào, DEAE-đextran, kết tủa bằng canxi phosphat, v.v.. Các phương pháp chuyển gen *in vivo* bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, việc chuyển nhiễm bằng các vectơ virut (thường là retrovirut) và chuyển nhiễm qua trung gian liposom protein vỏ virut [Dzau et al., *Trends in Biotechnology* 11:205-210 (1993)]. Trong một số trường hợp, có thể muốn tạo ra nguồn axit nucleic với tác nhân hướng đến tế bào đích, như kháng thể đặc hiệu với protein màng bề mặt tế bào hoặc tế bào đích, phối tử đối với một thụ thể trên tế bào đích, v.v.. Khi các liposom được sử dụng, các protein liên kết với protein màng bề mặt tế bào liên quan đến sự nhập nội bào có thể được sử dụng để hướng đích và/hoặc để tạo điều kiện thuận lợi cho việc hấp thu, ví dụ, các protein vỏ capsit hoặc các đoạn của chúng hướng đến một loại tế bào cụ thể, các kháng thể của các protein được nội tương tác trong hệ tuần hoàn, các protein hướng định vị nội bào và kéo dài thời gian bán thải nội bào.

Các tế bào vật chủ đã được tạo ra được nuôi cấy trong môi trường dinh dưỡng thông thường được cải biến nếu cần cho các hoạt động như, ví dụ, các bước sàng lọc, hoạt hóa gen khởi đầu hoặc chọn lọc các thể biến nạp. Các tế bào như vậy tùy ý có thể được nuôi cấy thành vi sinh vật chuyển gen. Các tài liệu tham khảo thông thường khác bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, tài liệu để phân lập và nuôi cấy tế bào (ví dụ, để phân lập axit nucleic sau đó) bao gồm: Freshney (1994) *Culture of Animal Cells, a Manual of Basic Technique*, third edition, Wiley-Liss, New York và các tài liệu trích dẫn trong đó; Payne et al. (1992) *Plant Cell and Tissue Culture in Liquid Systems* John Wiley & Sons, Inc. New York, NY; Gamborg and Phillips (eds.) (1995) *Plant Cell, Tissue and Organ Culture; Fundamental Methods Springer Lab Manual*, Springer-Verlag (Berlin Heidelberg New York) và Atlas and Parks (eds.) *The Handbook of Microbiological Media* (1993) CRC Press, Boca Raton, FL.

Một số phương pháp đã được biết rõ để đưa các axit nucleic đích vào tế bào là sẵn có, phương pháp bất kỳ trong số chúng có thể được sử dụng trong sáng chế. Các phương pháp này bao gồm: bước dung hợp tế bào nhận với thể nguyên sinh vi khuẩn chứa ADN, xung điện, bắn phá bằng đạn, và gây nhiễm bằng các vectơ virut (được bàn luận kỹ hơn dưới đây) v.v.. Tế bào vi khuẩn có thể được sử dụng để khuếch đại số lượng các plasmit chứa cấu trúc ADN theo sáng chế. Vi khuẩn được cho sinh trưởng đến pha log và các

plasmit trong vi khuẩn này có thể được phân lập theo nhiều phương pháp khác nhau đã biết trong lĩnh vực phương pháp này (xem: Sambrook chẳng hạn). Ngoài ra, các kit để tinh chế các plasmit từ vi khuẩn có thể mua được trên thị trường (xem: ví dụ, EasyPrep™, FlexiPrep™, đều của Pharmacia Biotech; StrataClean™ của Stratagene; và, QIAprep™ của Qiagen). Tiếp theo, phân lập và tinh chế các plasmit được thực hiện để tạo ra các plasmit khác, được sử dụng để chuyển nhiễm tế bào hoặc được kết hợp vào các vectơ có liên quan để gây nhiễm vi sinh vật. Các vectơ điển hình chứa trình tự kết thúc phiên mã và dịch mã, trình tự khởi đầu phiên mã và dịch mã, và các trình tự khởi đầu thường được dùng để điều hòa sự biểu hiện của một axit nucleic đích cụ thể. Các vectơ tùy ý chứa catxet biểu hiện loài chứa ít nhất một trình tự kết thúc độc lập, các trình tự cho phép sao chép catxet trong sinh vật nhân thật, hoặc sinh vật nhân sơ hoặc cả hai, (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, vectơ con thoi) và chọn lọc các gen đánh dấu đối với cả hệ sinh vật nhân sơ và sinh vật nhân thật. Các vectơ là thích hợp để sao chép và tổ hợp ở sinh vật nhân sơ, sinh vật nhân thật, hoặc cả hai. Xem: Gillam & Smith, *Gene* 8:81 (1979); Roberts, et al., *Nature*, 328:731 (1987); Schneider, E., et al., *Protein Expr. Purif.* 6(1): 10-14 (1995); Ausubel, Sambrook, Berger (tất cả nêu trên). Danh mục vi khuẩn và thể thực khuẩn hữu hiệu để tách dòng được đề xuất, ví dụ, bởi ATCC, ví dụ, Danh mục vi khuẩn và thể thực khuẩn của ATCC (1992), Gherna et al. (eds) được công bố bởi ATCC. Các quy trình cơ bản khác để xác định trình tự, tách dòng và các khía cạnh khác của sinh học phân tử và các xem xét cơ bản về mặt lý thuyết cũng được tìm thấy trong: Watson et al., (1992) *Recombinant DNA Second Edition Scientific American Books, NY.* Ngoài ra, về cơ bản axit nucleic bất kỳ (và hầu như axit nucleic bất kỳ được gắn nhãn, bất kể là tiêu chuẩn hoặc không tiêu chuẩn) có thể được mua hoặc đặt mua từ nguồn bất kỳ trong số các nguồn thương mại, như Midland Certified Reagent Company (Midland, TX có trên trang web toàn cầu ở mcrc.com), The Great American Gene Company (Ramona, CA có trên trang web toàn cầu ở genco.com), ExpressGen Inc. (Chicago, IL có trên trang web toàn cầu ở expressgen.com), Operon Technologies Inc. (Alameda, CA) và nhiều nguồn khác.

Bộ ba mã hóa chọn lọc

Bộ ba mã hóa chọn lọc theo sáng chế mở rộng bộ khung bộ ba mã hóa hệ gen của cơ chế sinh tổng hợp protein. Ví dụ, bộ ba mã hóa chọn lọc bao gồm, nhưng không chỉ

giới hạn ở, một bộ ba bộ ba mã hóa bazơ duy nhất, bộ ba mã hóa không đối nghĩa, như bộ ba mã hóa kết thúc, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, bộ ba mã hóa amber (UAG), bộ ba mã hóa ochre, hoặc bộ ba mã hóa opal (UGA), bộ ba mã hóa không có trong tự nhiên, bốn hoặc nhiều bộ ba mã hóa bazơ, bộ ba mã hóa hiếm gặp, hoặc bộ ba mã hóa tương tự. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này dễ dàng thấy rằng có một số lượng rất lớn các bộ ba mã hóa chọn lọc mà có thể được đưa vào gen hoặc polynucleotit mong muốn, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, một hoặc nhiều, hai hoặc nhiều, ba hoặc nhiều, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 hoặc nhiều bộ ba mã hóa trong một polynucleotit duy nhất mã hóa ít nhất một phần polypeptit relaxin này. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này cũng dễ dàng thấy rõ rằng có một số lượng lớn các bộ ba mã hóa chọn lọc mà có thể được đưa vào gen hoặc polynucleotit mong muốn, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, một hoặc nhiều, hai hoặc nhiều, ba hoặc nhiều, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 hoặc nhiều tổng số bộ ba mã hóa được tìm thấy ở chuỗi A và chuỗi B của các trình tự polynucleotit mã hóa ít nhất một phần polypeptit relaxin.

Theo một phương án, các phương pháp bao gồm bước sử dụng bộ ba mã hóa chọn lọc là bộ ba mã hóa kết thúc để kết hợp một hoặc nhiều axit amin không có trong tự nhiên *in vivo*. Ví dụ, O-ARN vận chuyển được tạo ra nhận biết bộ ba mã hóa kết thúc, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, UAG, và aminoaxyl hóa bằng O-RS với axit amin mong muốn không có trong tự nhiên. O-ARN vận chuyển này không được nhận biết bởi aminoaxyl-ARN vận chuyển synthetaza của vật chủ có trong tự nhiên. Việc gây đột biến định hướng điểm thông thường có thể được sử dụng để đưa bộ ba mã hóa kết thúc, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, TAG, ở vị trí đáng quan tâm vào polypeptit đáng quan tâm. Ví dụ, xem: Sayers, J.R., et al. (1988), *5'-3' Exonucleases in phosphorothioate-based oligonucleotide-directed mutagenesis*. *Axit nucleics Res*, 16:791-802. Khi O-RS, O-ARN vận chuyển và axit nucleic mà mã hóa polypeptit đáng quan tâm được kết hợp *in vivo*, thì axit amin không có trong tự nhiên được kết hợp đáp lại bộ ba mã hóa UAG để tạo ra polypeptit chứa axit amin không có trong tự nhiên ở vị trí được chỉ ra.

Việc kết hợp các axit amin không có trong tự nhiên *in vivo* có thể được thực hiện mà không gây ra sự xáo trộn đáng kể tế bào vật chủ của sinh vật nhân thật. Ví dụ, do hiệu quả ức chế đối với bộ ba mã hóa UAG phụ thuộc vào mức độ cạnh tranh giữa O-ARN

vận chuyển, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, chất ức chế ARN vận chuyển amber, và yếu tố giải phóng ở sinh vật nhân thật (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, eRF) (liên kết với bộ ba mã hóa kết thúc và cuối cùng giải phóng peptit đang được xây dựng từ ribosome), hiệu quả ức chế có thể được điều biến bằng cách, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, gia tăng mức độ biểu hiện của O-ARN vận chuyển, và/hoặc chất ức chế ARN vận chuyển.

Các axit amin không có trong tự nhiên còn có thể được mã hóa với các bộ ba mã hóa hiếm gặp. Ví dụ, khi nồng độ arginin trong phản ứng tổng hợp protein *in vitro* giảm, bộ ba mã hóa ít arginin, AGG, đã được chứng minh là hữu hiệu để cài xen Ala bằng ARN vận chuyển tổng hợp được axyl hóa với alanin. Ví dụ, xem: Ma et al., *Biochemistry*, 32:7939 (1993). Trong trường hợp này, ARN vận chuyển tổng hợp cạnh tranh với iRNAArg có trong tự nhiên, mà tồn tại ở dạng thứ yếu trong Escherichia coli. Một số vi sinh vật không sử dụng tất cả bộ ba bộ ba mã hóa. Bộ ba mã hóa AGA không xác định ở Micrococcus luteus đã được sử dụng để cài xen các axit amin trong phần chiết phiên mã/dịch mã *in vitro*. Ví dụ, xem: Kowal and Oliver, *Nucl. Acid. Res.s*, 25:4685 (1997). Các hợp phần theo sáng chế có thể được tạo ra để sử dụng các bộ ba mã hóa hiếm gặp này *in vivo*.

Bộ ba mã hóa chọn lọc cũng bao gồm các bộ ba mã hóa mở rộng, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các bộ ba mã hóa chứa bốn bazơ hoặc nhiều hơn, như, bộ ba mã hóa chứa bốn, năm, sáu bazơ hoặc nhiều hơn. Ví dụ về bộ ba mã hóa chứa bốn bazơ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, AGGA, CUAG, UAGA, CCCU và các bộ ba mã hóa tương tự. Ví dụ về bộ ba mã hóa chứa năm bazơ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, AGGAC, CCCCU, CCCUC, CUAGA, CUACU, UAGGC và các bộ ba mã hóa tương tự. Theo một khía cạnh khác, sáng chế bao gồm bước sử dụng bộ ba mã hóa mở rộng trên cơ sở ức chế sự dịch chuyển khung. Bộ ba mã hóa chứa bốn hoặc nhiều bazơ có thể cài xen, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, một hoặc nhiều axit amin không có trong tự nhiên vào cùng protein. Ví dụ, với sự có mặt của O-ARN vận chuyển dạng đột biến, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, chất ức chế ARN vận chuyển dịch chuyển khung đặc biệt, với vòng bộ ba mã hóa đối, ví dụ, với ít nhất 8 đến 10 vòng bộ ba mã hóa đối, bộ ba mã hóa bốn hoặc nhiều bazơ được đọc là một axit amin duy nhất. Theo các phương án khác,

vòng bộ ba mã hóa đối có thể đọc, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, ít nhất một bộ ba mã hóa chứa bốn bazơ, ít nhất một bộ ba mã hóa chứa năm bazơ, hoặc ít nhất một bộ ba mã hóa chứa sáu bazơ hoặc nhiều hơn. Do có thể có 256 bộ ba mã hóa chứa bốn bazơ, nhiều axit amin không có trong tự nhiên có thể được mã hóa trong cùng tế bào bằng cách sử dụng bộ ba mã hóa bốn hoặc nhiều bazơ. Xem: Anderson et al., (2002) *Exploring the Limits of Bộ ba mã hóa and Antibộ ba mã hóa Size*, *Chemistry and Biology*, 9:237-244; Magliery, (2001) *Expanding the Genetic Code: Selection of Efficient Suppressors of Four-base Bộ ba mã hóas and Identification of "Shifty" Four-base Bộ ba mã hóas with a Library Approach in Escherichia coli*, *J. Mol, Biol.* 307: 755-769.

Ví dụ, bộ ba mã hóa chứa bốn bazơ đã được sử dụng để kết hợp các axit amin không có trong tự nhiên vào các protein bằng cách áp dụng các phương pháp sinh tổng hợp *in vitro*. Ví dụ, xem: Ma et al., (1993) *Biochemistry*, 32:7939; và Hohsaka et al., (1999) *J. Am. Chem, Soc.*, 121:34. CGGG và AGGU được sử dụng để kết hợp đồng thời 2-naphtylalanin và dẫn xuất NBD của lysin vào streptaviđin *in vitro* với hai ARN vận chuyển ức chế sự dịch chuyển khung đã được axyl hóa hóa học, ví dụ xem: Hohsaka et al., (1999) *J. Am. Chem, Soc.*, 121:12194, In an *in vivo* study, Moore et al. đã kiểm tra khả năng của các dẫn xuất tRNALeu với các bộ ba mã hóa đối NCUA trong việc ức chế bộ ba mã hóa UAGN (N có thể là U, A, G, hoặc C), và nhận thấy rằng bộ bốn UAGA có thể được giải mã bởi tRNALeu với bộ ba mã hóa đối UCUA với hiệu quả nằm trong khoảng từ 13% đến 26% với việc giải mã không đáng kể ở khung 0 hoặc -1. Xem: Moore et al., (2000) *J. Mol. Biol.*, 298:195. Theo một phương án, bộ ba mã hóa mở rộng trên cơ sở bộ ba mã hóa hiếm gặp hoặc bộ ba mã hóa đối nghĩa có thể được sử dụng trong sáng chế, mà có thể làm giảm việc đọc sai nghĩa và ức chế dịch chuyển khung ở các vị trí không mong muốn.

Đối với một hệ thống nhất định, bộ ba mã hóa chọn lọc còn có thể chứa một bộ ba mã hóa trong số các bộ ba mã hóa chứa ba bazơ có trong tự nhiên, khi hệ nội sinh không sử dụng (hoặc hiếm khi sử dụng) bộ ba mã hóa bazơ có trong tự nhiên. Ví dụ, bộ ba mã hóa chọn lọc này có hệ không chứa ARN vận chuyển nhận biết chứa ba bộ ba mã hóa bazơ có trong tự nhiên, và/hoặc hệ ở đó bộ ba mã hóa chứa ba bazơ là bộ ba mã hóa hiếm gặp.

Bộ ba mã hóa chọn lọc tùy ý chứa các cặp bazơ không có trong tự nhiên. Các cặp bazơ không có trong tự nhiên này còn mở rộng bảng mẫu tự di truyền hiện có. Một cặp bazơ mở rộng làm tăng số lượng của bộ ba mã hóa bộ ba từ 64 đến 125. Các đặc tính của cặp bazơ thứ ba bao gồm phản ứng ghép cặp bazơ bền và chọn lọc, sự kết hợp enzym một cách hữu hiệu vào ADN với độ trung thực cao bởi polymeaza, và sự duỗi thẳng đoạn mồi liên tục đạt hiệu quả sau khi tổng hợp cặp bazơ mới sinh không có trong tự nhiên. Mô tả về các cặp bazơ không có trong tự nhiên có thể được dùng cho các phương pháp và các dược phẩm bao gồm, ví dụ, xem Hirao et al., (2002) *An unnatural base pair for incorporating axit amin analogues into protein*, *Nature Biotechnology*, 20:177-182. Xem cả: Wu, Y., et al., (2002) *J. Am. Chem. Soc.* 124:14626-14630. Các công bố có liên quan khác được liệt kê dưới đây.

Để sử dụng *in vivo*, nucleosit không có trong tự nhiên là màng có thể thấm qua được và phosphoryl hóa để tạo ra triphosphat tương ứng. Ngoài ra, thông tin di truyền tăng lên là ổn định và không bị phá hủy bởi các enzym tế bào. Những nỗ lực trước đây bởi Benner và các tác giả khác đã lợi dụng kiểu gắn kết hyđro khác với những kiểu trong các cặp Watson-Crick chuẩn tắc, ví dụ, đáng chú ý nhất về chúng là cặp iso-C:iso-G. Ví dụ, xem: Switzer et al., (1989) *J. Am. Chem. Soc.*, 111:8322; và Piccirilli et al., (1990) *Nature*, 343:33; Kool, (2000) *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 4:602. Các bazơ này nhìn chung bắt cặp sai ở một mức độ nào đó với các bazơ có trong tự nhiên và không thể sao chép được nhờ enzym, Kool và các đồng tác giả đã chứng tỏ rằng các tương tác đóng gói kỵ nước giữa các bazơ có thể thay thế liên kết hyđro để tạo ra cặp bazơ. Xem: Kool, (2000) *Curr. Opin. Chem, Biol.*, 4:602; và Guckian and Kool, (1998) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 36, 2825. Để cố gắng phát triển cặp bazơ không có trong tự nhiên đáp ứng tất cả các yêu cầu trên, Schultz, Romesberg và các đồng tác giả đã tổng hợp và nghiên cứu một cách có hệ thống một loạt các bazơ kỵ nước không có trong tự nhiên. Cặp đôi đồng loại PICS:PICS được phát hiện là bền hơn các cặp bazơ có trong tự nhiên, và có thể được kết hợp một cách có hiệu quả vào ADN bằng đoạn Klenow của ADN polymeaza I ở Escherichia coli (KF), ví dụ xem: McMinn et al., (1999) *J. Am. Chem. Soc.*, 121:11585-6; và Ogawa et al., (2000) *J. Am, Chem. Soc.*, 122:3274. Cặp tựn thân 3MN:3MN có thể được tổng hợp bằng KF với hiệu quả và độ chọn lọc đủ cho các chức năng sinh học. Ví dụ, xem: Ogawa et al., (2000) *J. Am. Chem. Soc.*, 122:8803. Tuy nhiên, cả hai bazơ đều

hoạt động như là trình tự kết thúc chuỗi để sao chép tiếp. Gần đây, đã phát triển thể đột biến ADN polymeaza có thể được sử dụng để sao chép cặp đôi đồng loại PICS. Ngoài ra, cặp đôi đồng loại 7AI có thể được sao chép, ví dụ xem: Tae et al., (2001) *J. Am. Chem. Soc.*, 123:7439. Một cặp bazơ kim loại mới, Dipic:Py, cũng đã được phát triển để tạo ra cặp bền khi liên kết với Cu(II). Xem: Meggers et al., (2000) *J. Am. Chem. Soc.*, 122:10714. Do bộ ba mã hóa mở rộng và bộ ba mã hóa không có trong tự nhiện về bản chất là trực giao với bộ ba mã hóa có trong tự nhiên, các phương pháp theo sáng chế có thể tận dụng đặc tính này để tạo ra ARN vận chuyển trực giao cho chúng.

Hệ bỏ qua việc dịch mã cũng có thể được áp dụng để kết hợp một axit amin không có trong tự nhiên vào một polypeptit mong muốn. Trong hệ bỏ qua việc dịch mã, một trình tự đầy đủ được kết hợp vào gen nhưng không được dịch mã thành protein. Trình tự này chứa một cấu trúc mà làm dấu hiệu khiến cho ribosom nhảy vào trình tự này và tiếp tục dịch mã xuống sau điểm cài xen.

Theo một số phương án, protein hoặc polypeptit đáng quan tâm (hoặc phần của chúng) trong các phương pháp và/hoặc các dược phẩm theo sáng chế được mã hóa bởi axit nucleic. Nhìn chung, axit nucleic chứa ít nhất một bộ ba mã hóa chọn lọc, ít nhất hai bộ ba mã hóa chọn lọc, ít nhất ba bộ ba mã hóa chọn lọc, ít nhất bốn bộ ba mã hóa chọn lọc, ít nhất năm bộ ba mã hóa chọn lọc, ít nhất sáu bộ ba mã hóa chọn lọc, ít nhất bảy bộ ba mã hóa chọn lọc, ít nhất tám bộ ba mã hóa chọn lọc, ít nhất chín bộ ba mã hóa chọn lọc, mười hoặc nhiều bộ ba mã hóa chọn lọc.

Các gen mã hóa các protein hoặc các polypeptit đáng quan tâm có thể được gây đột biến bằng cách áp dụng các phương pháp mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này đã biết và được bộc lộ trong bản mô tả này để chứa, ví dụ, một hoặc nhiều bộ ba mã hóa chọn lọc để kết hợp một axit amin không có trong tự nhiên. Ví dụ, axit nucleic đối với protein đáng quan tâm được gây đột biến để chứa một hoặc nhiều bộ ba mã hóa chọn lọc, tạo ra để kết hợp một hoặc nhiều axit amin không có trong tự nhiên. Sáng chế bao gồm các biến thể bất kỳ như vậy, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, thể đột biến, biến thái protein bất kỳ, ví dụ, chứa ít nhất một axit amin không có trong tự nhiên. Tương tự, sáng chế cũng đề cập đến các axit nucleic tương ứng, tức là axit nucleic bất kỳ với một hoặc nhiều bộ ba mã hóa chọn lọc mà mã hóa một hoặc nhiều axit amin không có trong tự

nhiên.

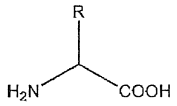
Các phân tử axit nucleic mã hóa protein đáng quan tâm như polypeptit relaxin có thể được gây đột biến một cách dễ dàng để đưa một xystein vào vị trí mong muốn bất kỳ của polypeptit. Xystein được sử dụng rộng rãi để đưa các phân tử có khả năng phản ứng, polyme hòa tan trong nước, protein hoặc nhiều loại phân tử khác, vào protein đáng quan tâm. Các phương pháp thích hợp để kết hợp xystein vào vị trí mong muốn của polypeptit đã được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này biết rõ, như các phương pháp đã được bộc lộ trong patent Mỹ số 6,608,183, mà được kết hợp vào sáng chế bằng cách viện dẫn, và các phương pháp gây đột biến tiêu chuẩn.

Axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên

Rất nhiều axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên là thích hợp để dùng trong sáng chế. Một số lượng bất kỳ các axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên có thể được đưa vào polypeptit relaxin. Nhìn chung, axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên được đưa vào hầu như là trơ về mặt hóa học đối với 20 axit amin thông thường được mã hóa theo kỹ thuật di truyền (tức là alanin, arginin, asparagin, axit aspartic, xystein, glutamin, axit glutamic, glyxin, histiđin, iso leuxin, leuxin, lysin, methionin, phenylalanin, prolin, serin, threonin, tryptophan, tyrosin, và valin). Theo một số phương án, axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên chứa các nhóm chức chuỗi bên phản ứng một cách có hiệu quả và chọn lọc với các nhóm chức không được tìm thấy ở 20 axit amin thông thường (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các nhóm aziđo, keton, alđehyt và aminooxy) để tạo ra các thể tiếp hợp bền. Ví dụ, polypeptit relaxin chứa một axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên chứa nhóm chức aziđo có thể phản ứng với polyme (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, poly(etylen glycol) hoặc, theo cách khác, một polypeptit thứ hai chứa gốc alkyn để tạo ra thể tiếp hợp bền do phản ứng chọn lọc của azit này và các nhóm chức alkyn để tạo ra sản phẩm cộng [3+2] xyclo Huisgen.

Alpha-axit amin là axit amin có công thức I:

I



Axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên thường là cấu trúc bất kỳ có công thức nêu trên, trong đó nhóm R là phần tử thế bất kỳ khác ngoài phần tử thế dùng trong hai mươi axit amin có trong tự nhiên, và có thể là thích hợp để dùng trong sáng chế. Do axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên theo sáng chế thường khác với các axit amin có trong tự nhiên chỉ ở cấu trúc chuỗi bên, axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên này tạo ra liên kết amit với axit amin khác, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, được mã hóa có trong tự nhiên hoặc được mã hóa không có trong tự nhiên, theo cách tương tự như cách mà chúng được tạo ra trong các polypeptit có trong tự nhiên.

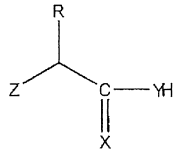
Tuy nhiên, axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên có các nhóm chuỗi bên khác biệt với các nhóm chuỗi bên từ axit amin có trong tự nhiên. Ví dụ, R tùy ý bao gồm alkyl-, aryl-, axyl-, keto-, aziđo-, hyđroxyl-, hyđrazin, xyano-, halo-, hyđrazit, alkenyl, alkynl, ete, thiol, seleno-, sulfonyl-, borat, boronat, phospho, phosphono, phosphin, dị vòng, enon, inlin, alđehyt, este, thioaxit, hyđroxylamin, nhóm amin, hoặc các nhóm tương tự hoặc tổ hợp bất kỳ của chúng. Các axit amin không có trong tự nhiên khác đáng quan tâm mà có thể là thích hợp để dùng trong sáng chế bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các axit amin chứa nhóm liên kết ngang có khả năng hoạt hóa quang học, axit amin được gắn dấu spin, các axit amin phát huỳnh quang, axit amin liên kết kim loại, axit amin chứa kim loại, các axit amin phóng xạ, các axit amin với các nhóm chức mới, các axit amin tương tác cộng hóa trị hoặc không cộng hóa trị với các phân tử khác, axit amin kiểu lồng quang học và/hoặc có khả năng quang đồng phân hóa, các axit amin chứa biotin hoặc chất tương tự biotin, các axit amin được glycosyl hóa như serin được thế bằng đường, các axit amin được cải biến bằng hyđrat cacbon khác, axit amin chứa keto, các axit amin chứa polyetylen glycol hoặc polyete, axit amin được thế bằng nhiều nguyên tử, axit amin có thể phân cắt hóa học và/hoặc có thể được phân cắt quang học, các axit amin với chuỗi bên kéo dài so với axit amin có trong tự nhiên, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, polyete hoặc hyđrocacbon mạch dài, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, axit amin có nhiều hơn khoảng 5 hoặc nhiều hơn khoảng 10 nguyên tử cacbon, axit amin chứa đường được

liên kết ở cacbon, axit amin hoạt hóa oxy hóa khử, axit amin chứa axit amin thio, và các axit amin chứa một hoặc nhiều gốc có tính độc.

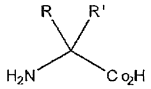
Các axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên làm ví dụ mà có thể là thích hợp để dùng trong sáng chế và hữu dụng để phản ứng với các polyme hòa tan trong nước bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các axit amin với nhóm phản ứng carbonyl, aminooxy, hyđrazin, hyđrazit, semicarbazit, azit và alkyn. Theo một số phương án, axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên chứa gốc sacarit. Ví dụ về các axit amin như vậy bao gồm N-axetyl-L-glucosaminyl-L-serin, N-axetyl-L-galactosaminyl-L-serin, N-axetyl-L-glucosaminyl-L-threonin, N-axetyl-L-glucosaminyl-L-asparaginc và O-mannosaminyl-L-serin. Ví dụ về các axit amin còn bao gồm ví dụ trong đó liên kết N- hoặc O- có trong tự nhiên giữa axit amin và sacarit được thế bằng liên kết cộng hoá trị thường không được tìm thấy trong tự nhiên - bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, alken, oxim, thioete, amit và các axit amin tương tự. Ví dụ về các axit amin như vậy còn bao gồm sacarit thường không được tìm thấy trong các protein có trong tự nhiên như 2-đeoxy-glucoza. 2-đeoxygalactoza và các axit amin tương tự.

Nhiều axit amin trong số axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên theo sáng chế hiện có trên thị trường, ví dụ, do Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) cung cấp, do Novabiochem (bộ phận của EMD Biosciences, Darmstadt, Đức) cugn cấp, hoặc Peptech do (Burlington, MA, USA) cung cấp. Các axit amin không có bán trên thị trường tùy ý được tổng hợp như theo sáng chế hoặc bằng cách áp dụng các phương pháp chuẩn mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này đã biết. Đối với các phương pháp tổng hợp hữu cơ, ví dụ xem: O*rganic Chemistry by Fessendon and Fessendon*, (1982, Second Edition, Willard Grant Press, Boston Mass.); *Advanced Organic Chemistry by March* (Third Edition, 1985, Wiley and Sons, New York); và *Advanced Organic Chemistry by Carey and Sundberg* (Third Edition, Parts A and B, 1990, Plenum Press, New York). Cũng xem các patent Mỹ số 7,045,337 và 7,083,970, được kết hợp vào sáng chế bằng cách viện dẫn. Ngoài các axit amin không có trong tự nhiên chứa chuỗi bên mới, các axit amin không có trong tự nhiên mà có thể là thích hợp để dùng trong sáng chế cũng tùy ý có cấu trúc bộ khung được cải biến, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, như được minh họa bởi cấu trúc có công thức II và III:

II



III



trong đó Z thường bao gồm OH, NH_2, SH, NH-R', hoặc S-R'; X và Y, mà có thể là giống nhau hoặc khác nhau, thường bao gồm S hoặc O, và R và R_1, mà tùy ý là giống nhau hoặc khác nhau, thường được chọn từ cùng danh mục bao gồm các thành phần đối với nhóm R nêu trên cho các axit amin không có trong tự nhiên có Công thức I cũng như hyđro. Ví dụ, các axit amin không có trong tự nhiên theo sáng chế tùy ý có sự thay thế ở nhóm amino hoặc carboxyl như được minh họa bởi các công thức II và III. Các axit amin không có trong tự nhiên thuộc loại này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các α-hyđroxy axit, α-thioaxit, α-aminothiocarboxylat, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, axit amin có chuỗi bên tương ứng với hai mươi axit amin thông thường có trong tự nhiên hoặc chuỗi bên không có trong tự nhiên. Ngoài ra, việc thế ở α-cacbon tùy ý bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, L, D, hoặc các axit amin được thế hai lần ở vị trí α như D-glutamat, D-alanin, D-metyl-O-tyrosin, axit aminobutyric, và các nhóm tương tự. Các lựa chọn về mặt cấu trúc khác bao gồm axit amin mạch vòng, như chất tươg tự prolin cũng như chất tương tự prolin dạng vòng có 3, 4 ,6, 7, 8, và 9 cạnh, các β-axit amin và γ-axit amin như β-alanin được thế và γ-axit amin butyric.

Các axit amin không có trong tự nhiên trên cơ sở axit amin có trong tự nhiên, như tyrosin, glutamin, phenylalanin, và các axit amin tương tự, là thích hợp để sử dụng trong sáng chế. Chất tương tự tyrosin bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, tyrosin được thế ở vị trí para, tyrosin được thế ở vị trí ortho, và tyrosin được thế ở vị trí meta, trong đó tyrosin được thế chứa, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, nhóm keto (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, nhóm axetyl), nhóm benzoyl, nhóm amin, nhóm hyđrazin, hyđroxyamin, thiol, nhóm carboxy, nhóm isopropyl, nhóm metyl, hyđrocacbon mạch thẳng hoặc mạch nhánh có 6 đến 20 nguyên tử cacbon, hyđrocacbon no hoặc không no, nhóm O-metyl, nhóm polyete, nhóm nitro, nhóm alkynyl hoặc các nhóm tương tự. Ngoài

ra, các nhân aryl được thế ở nhiều vị trí cũng được kể đến. Chất tương tự glutamin mà có thể là thích hợp để dùng trong sáng chế bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các dẫn xuất a-hyđroxy, các dẫn xuất được thế ở vị trí g, các dẫn xuất mạch vòng, và các dẫn xuất glutamin được thế bằng amit. Ví dụ về chất tương tự phenylalanin mà có thể là thích hợp để dùng trong sáng chế bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, -phenylalanin được thế ở vị trí para, phenyalanin được thế ở vị trí ortho, và phenylalanin được thế ở vị trí meta, trong đó phần tử thế, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, nhóm hyđroxy, nhóm metoxy, nhóm metyl, nhóm alyl, alđehyt, aziđo, iođo, bromo, nhóm keto (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, nhóm axetyl), benzoyl, nhóm alkynyl, hoặc các nhóm tương tự. Các ví dụ cụ thể về các axit amin không có trong tự nhiên mà có thể là thích hợp để dùng trong sáng chế bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, p-axetyl-L-phenylalanin, O-metyl- L-tyrosin, L-3-(2-naphtyl)alanin, 3-metyl-phenylalanin, O-4-alyl-L-tyrosin, 4-propyl-L-tyrosin, tri-O-axetyl-GlcNAc b-serin, L-Dopa, phenylalanin được flo hoá, isopropyl-L-phenylalanin, p-aziđo-L-phenylalanin, p-axyl-L-phenylalanin, p-benzoyl-L-phenylalanin, L-phosphoserin, phosphonoserin, phosphonotyrosin, p-iođo-phenylalanin, p-bromphenylalanin, p-amino-L-phenylalanin, isopropyl-L-phenylalanin, và p-propargyloxy-phenylalanin, và các nhóm tương tự. Ví dụ về cấu trúc của nhiều loại các axit amin không có trong tự nhiên mà có thể là thích hợp để dùng trong sáng chế nằm trong phạm vi của sáng chế được nêu trong, ví dụ, WO 2002/085923 có tên "Sự kết hợp *in vivo* của các axit amin không có trong tự nhiên". Xem cả: Kiick et al., (2002). Sự kết hợp của azit vào các protein tái tổ hợp để cải biến chọn lọc hóa học bởi phản ứng nối Staudinger, các PNA 99:19-24, mà được kết hợp vào sáng chế bằng cách viện dẫn, đối với các chất tương tự methionin khác. Đơn quốc tế số PCT/US06/47822 có tên gọi "Dược phẩm chứa, phương pháp bao gồm, và việc sử dụng các axit amin và các polypeptit không có trong tự nhiên" được kết hợp vào sáng chế bằng cách viện dẫn, mô tả sự allxyl hóa giản lược của các gốc amin thơm, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, p-amino-phenylalanin và amin hóa khử.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến các dược phẩm chứa polypeptit relaxin bao gồm axit amin không có trong tự nhiên (như p-(propargyloxy)-phenyalanin). Sáng chế cũng đề xuất các dược phẩm khác nhau chứa p-(propargyloxy)-phenyalanin và, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các protein và/hoặc tế bào. Theo một khía cạnh, chế

phẩm này chứa axit amin p-(propargyloxy)-phenyalanin không có trong tự nhiên còn chứa ARN vận chuyển trực giao. Axit amin không có trong tự nhiên có thể được liên kết (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, liên kết cộng hóa trị) với ARN vận chuyển trực giao, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, liên kết cộng hóa trị với ARN vận chuyển trực giao nhờ liên kết amino-axyl, liên kết cộng hóa trị với 3'OH hoặc 2'OH của đường riboza ở đầu tận cùng của ARN vận chuyển trực giao, v.v..

Các gốc hóa học mà nhờ các axit amin không có trong tự nhiên có thể được kết hợp vào các protein tạo ra một loạt ưu điểm và thao tác của protein. Ví dụ, hoạt tính phản ứng duy nhất của nhóm chức keto cho phép cải biến chọn lọc các protein với chất bất kỳ trong số các chất phản ứng chứa hyđrazin hoặc hyđroxyl amin *in vitro* và *in vivo*. Axit amin không có trong tự nhiên có nguyên tử nặng, ví dụ, có thể sử dụng để định pha dữ liệu cấu trúc tia X. Việc đưa nguyên tử nặng vào theo cách đặc hiệu vị trí bằng cách sử dụng các axit amin không có trong tự nhiên còn tạo ra tính chọn lọc và linh hoạt trong việc lựa chọn vị trí cho các nguyên tử nặng. Các axit amin không có trong tự nhiên có khả năng phản ứng quang hóa (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các axit amin với chuỗi bên benzophenon và arylazit (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, phenylazit)), ví dụ, cho phép protein liên kết ngang quang học hữu hiệu *in vivo* và *in vitro*. Ví dụ về các axit amin không có trong tự nhiên có khả năng phản ứng quang hóa bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, p-aziđo-phenylalanin và p-benzoyl-phenylalanin. Sau đó, protein với các axit amin không có trong tự nhiên có khả năng phản ứng quang hóa được liên kết ngang nếu muốn bằng cách kích thích mẫu đối chứng tạm thời tạo ra nhóm phản ứng quang hóa. Theo một ví dụ, nhóm metyl bao gồm amino không có trong tự nhiên có thể được thế bằng nhóm được gắn nhãn đồng vị, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, nhóm metyl, làm mẫu dò của cấu trúc cục bộ và động lực học, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, việc có sử dụng phổ cộng hưởng từ hạt nhân và dao động. Các nhóm chức alkynyl hoặc aziđo, ví dụ, cho phép cải biến chọn lọc các protein với các phân tử thông qua phản ứng cộng [3+2] xyclo.

Axit amin không có trong tự nhiên được kết hợp vào polypeptit ở đầu tận cùng amino có thể chứa một nhóm R là phần tử thế bất kỳ khác ngoài phần tử thế dùng trong hai mươi axit amin có trong tự nhiên và một nhóm phản ứng thứ hai khác với nhóm NH2

thường có mặt trong các α-axit amino (xem Công thức I). Một axit amin không có trong tự nhiên tương tự có thể được kết hợp vào đầu tận cùng carboxyl với một nhóm phản ứng thứ hai khác với nhóm COOH thường có mặt trong các α-axit amino (xem Công thức I).

Các axit amin không có trong tự nhiên theo sáng chế có thể được chọn hoặc thiết kế để tạo ra các đặc tính khác mà hai mươi axit amin có trong tự nhiên không có. Ví dụ, axit amin không có trong tự nhiên có thể tùy ý được thiết kế hoặc được chọn lọc để cải biến các tính chất sinh học của protein chẳng hạn, mà chúng được kết hợp vào. Ví dụ, các đặc tính sau có thể tùy ý được cải biến bằng cách đưa một axit amin không có trong tự nhiên vào một protein: độc tính, phân bố sinh học, độ hòa tan, độ ổn định, ví dụ, đối với nhiệt, đối với quá trình thủy phân, oxy hóa, chống lại tác dụng phân hủy của enzym, và các đặc tính tương tự, khả năng tinh chế và xử lý, các đặc tính cấu trúc, các đặc tính quang phổ, các đặc tính hóa học và/hoặc quang hóa, hoạt tính xúc tác, khả năng oxy hóa khử, thời gian bán thải, khả năng phản ứng với các phân tử khác, ví dụ, cộng hóa trị hoặc không cộng hóa trị, và các đặc tính tương tự.

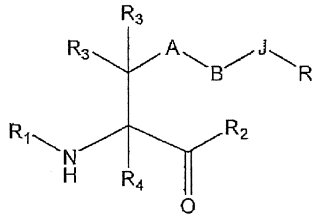
Cấu trúc và tổng hợp axit amin không có trong tự nhiên: các nhóm carbonyl, tương tự carbonyl, các nhóm carbonyl bị che, các nhóm carbonyl được bảo vệ, và các nhóm hyđroxylamin

Theo một số phương án sáng chế đề xuất relaxin liên kết với polyme hòa tan trong nước, ví dụ, PEG, bằng liên kết oxim.

Nhiều loại axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên là thích hợp để tạo ra các liên kết oxim. Các axit amin này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên chứa nhóm carbonyl, đicarbonyl, hoặc hyđroxyl amin. Các axit amin được bộc lộ trong Công bố patent Mỹ số 2006/0194256, 2006/0217532, và 2006/0217289 và WO 2006/069246 có tên "Dược phẩm chứa, các phương pháp liên quan đến, và việc sử dụng các axit amin và các polypeptit không có trong tự nhiên", toàn bộ nội dung của các tài liệu này được kết hợp vào sáng chế bằng cách viện dẫn. Các axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên cũng được bộc lộ trong patent Mỹ số 7,083,970 và patent Mỹ số 7,045,337, toàn bộ nội dung của các tài liệu này được kết hợp vào sáng chế bằng cách viện dẫn.

Một số phương án của sáng chế sử dụng các polypeptit relaxin được thế ở một hoặc nhiều vị trí bằng axit amin para-axetylphenylalanin. Quy trình tổng hợp p-axetyl-(+/-)"phenylalanin và m-axetyl-(+/-)-phenylalanin được bộc lộ trong tài liệu Zhang, Z., et al., *Biochemistry* 42: 6735-6746 (2003), được kết hợp vào sáng chế bằng cách viện dẫn. Các axit amin chứa carbonyl hoặc đicarbonyl khác có thể được điều chế tương tự bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Hơn nữa, ví dụ không giới hạn phạm vi của sáng chế về quy trình tổng hợp axit amin không có trong tự nhiên được bao hàm trong bản mô tả này được thể hiện trên các hình vẽ 4, 24-34 và 36-39 của patent Mỹ số 7,083,970, mà được đưa hoàn toàn vào đây bằng cách viện dẫn.

Các axit amin có nhóm phản ứng ái điện tử cho phép thực hiện nhiều loại phản ứng để liên kết các phân tử bằng các phản ứng cộng ái nhân giữa các phân tử khác. Các nhóm phản ứng ái điện tử như vậy bao gồm nhóm carbonyl (bao gồm nhóm keto và nhóm đicarbonyl), nhóm tương tự carbonyl (có khả năng phản ứng tương tự như nhóm carbonyl (bao gồm nhóm keto và nhóm đicarbonyl) và có cấu trúc tương tự như nhóm carbonyl), nhóm carbonyl được che (có thể dễ dàng được biến đổi thành nhóm carbonyl (bao gồm nhóm keto và nhóm đicarbonyl)), hoặc nhóm carbonyl được bảo vệ (có khả năng phản ứng tương tự như nhóm carbonyl (bao gồm nhóm keto và nhóm đicarbonyl) bằng cách loại nhóm bảo vệ). Các axit amin như vậy bao gồm các axit amin có công thức (IV):



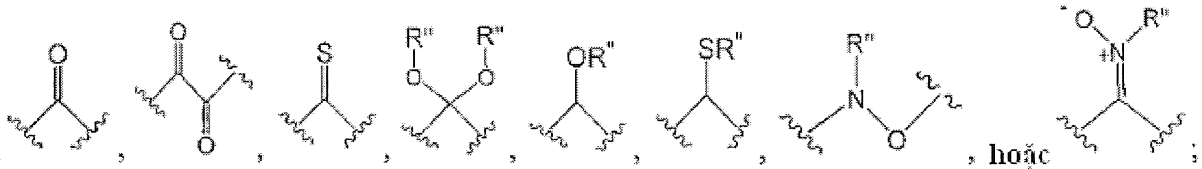
(IV)

trong đó:

A là tùy ý, và khi có mặt thì là alkylen mạch ngắn, alkylen mạch ngắn được thế, xycloalkylen mạch ngắn, xycloalkylen mạch ngắn được thế, alkenylen mạch ngắn, alkenylen mạch ngắn được thế, alkynylen, heteroalkylen mạch ngắn, heteroalkylen được thế, heteroxycloalkylen mạch ngắn, heteroxycloalkylen mạch ngắn được thế, arylen, arylen được thế, heteroarylen, hetero arylen được thế, alkarylen, alkarylen được thế, aralkylen, hoặc aralkylen được thế;

B là tùy ý, và khi có mặt thì là nhóm liên kết được chọn từ nhóm bao gồm alkylen mạch ngắn, alkylen mạch ngắn được thế, alkenylen mạch ngắn, alkenylen mạch ngắn được thế, heteroalkylen mạch ngắn, heteroalkylen mạch ngắn được thế, -O-, -O-(alkylen hoặc alkylen được thế)-, -S-, -S-(alkylen hoặc alkylen được thế)-, $-S(O)_k-$ trong đó k bằng 1, 2, hoặc 3, $-S(O)_k$(alkylen hoặc alkylen được thế)-, -C(O)-, -C(O)-(alkylen hoặc alkylen được thế)-, -C(S)-, -C(S)- (alkylen hoặc alkylen được thế)-, -N(R')-, -NR'-(alkylen hoặc alkylen được thế)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alkylen hoặc alkylen được thế)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(alkylen hoặc alkylen được thế)-, -N(R')CO-(alkylen hoặc alkylen được thế)-, -N(R')C(O)O-, $-S(O)_kN(R')-$, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, $-N(R')S(O)_kN(R')-$, -N(R')-N=, - C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, $-C(R')_2-N=N-$, và $-C(R')_2-N(R')-N(R')-$, trong đó mỗi nhóm R' độc lập là H, alkyl hoặc alkyl được thế;

J là



R là H, alkyl, alkyl được thế, xycloalkyl hoặc xycloalkyl được thế;

mỗi nhóm R" độc lập là H, alkyl, alkyl được thế, hoặc nhóm bảo vệ, hoặc khi có mặt nhiều hơn một nhóm R", hai R" tùy ý tạo ra heteroxycloalkyl;

R_1 là tùy chọn, và nếu có mặt, thì là H, nhóm bảo vệ amino, nhựa, axit amin, polypeptit, hoặc polynucleotit; và

R_2 là tùy chọn, và nếu có mặt, thì là OH, nhóm bảo vệ este, nhựa, axit amin, polypeptit, hoặc polynucleotit;

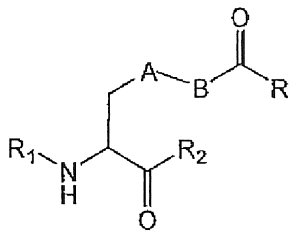
mỗi R_3 và R_4 độc lập là H, halogen, alkyl mạch ngắn hoặc alkyl mạch ngắn được thế, hoặc R_3 và R_4 hoặc hai nhóm R_3 tùy ý tạo ra xycloalkyl hoặc heteroxycloalkyl; hoặc các nhóm -A-B-J-R cùng nhau tạo ra xycloalkyl hoặc heteroxycloalkyl hai vòng hoặc ba vòng chứa ít nhất một nhóm carbonyl, bao gồm nhóm đicarbonyl, nhóm carbonyl được

bảo vệ, bao gồm nhóm đicarbonyl được bảo vệ, hoặc nhóm carbonyl bị chắn, bao gồm nhóm đicarbonyl bị chắn;

hoặc nhóm -J-R cùng nhau tạo ra xycloalkyl hoặc heteroxycloalkyl một vòng hoặc hai vòng chứa ít nhất một nhóm carbonyl, bao gồm nhóm đicarbonyl, nhóm carbonyl được bảo vệ, bao gồm nhóm đicarbonyl được bảo vệ, hoặc nhóm carbonyl bị chắn, bao gồm nhóm đicarbonyl bị chắn;

với điều kiện khi A là phenylen và mỗi nhóm R_3 là H thì B có mặt; và khi A là -(CH_2)4- và mỗi nhóm R_3 là H thì B không là -NHC(O)(CH_2CH_2)-; và khi A và B đều không có mặt và mỗi nhóm R_3 là H thì R không là metyl.

Ngoài ra, sáng chế cũng đề cập đến axit amin có công thức (V):



(V),

trong đó:

A là tùy ý, và khi có mặt thì là alkylen mạch ngắn, alkylen mạch ngắn được thế, xycloalkylen mạch ngắn, xycloalkylen mạch ngắn được thế, alkenylen mạch ngắn, alkenylen mạch ngắn được thế, alkynylen, heteroalkylen mạch ngắn, heteroalkylen được thế, heteroxycloalkylen mạch ngắn, heteroxycloalkylen mạch ngắn được thế, arylen, arylen được thế, heteroarylen, heteroarylen được thế, alkarylen, alkarylen được thế, aralkylen, hoặc aralkylen được thế;

B là tùy ý, và khi có mặt thì là nhóm liên kết được chọn từ nhóm bao gồm alkylen mạch ngắn, alkylen mạch ngắn được thế, alkenylen mạch ngắn, alkenylen mạch ngắn được thế, heteroalkylen mạch ngắn, heteroalkylen mạch ngắn được thế, -O-, -O-(alkylen hoặc alkylen được thế)-, -S-, -S-(alkylen hoặc alkylen được thế)-, -$S(O)_k$- trong đó k bằng 1, 2, hoặc 3, -$S(O)_k$(alkylen hoặc alkylen được thế)-, -C(O)-, -C(O)-(alkylen hoặc alkylen được thế)-, -C(S)-, -C(S)- (alkylen hoặc alkylen được thế)-, -N(R')-, -NR'-

(alkylen hoặc alkylen được thế)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alkylen hoặc alkylen được thế)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(alkylen hoặc alkylen được thế)-, -N(R')CO-(alkylen hoặc alkylen được thế)-, -N(R')C(O)O-, -$S(O)_k$N(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')$S(O)_k$N(R')-, -N(R')-N=, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, -C(RVN=-N-, và -$C(R')_2$-N(R')-N(R')-, trong đó mỗi nhóm R' độc lập là H, alkyl hoặc alkyl được thế;

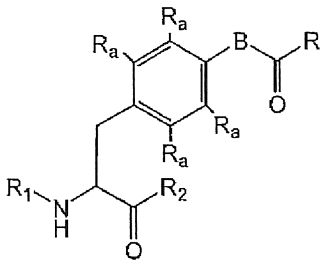
R là H, alkyl, alkyl được thế, xycloalkyl hoặc xycloalkyl được thế;

R_1 là tùy chọn, và nếu có mặt, thì là H, nhóm bảo vệ amino, nhựa, axit amin, polypeptit, hoặc polynucleotit; và

R_2 là tùy chọn, và nếu có mặt, thì là OH, nhóm bảo vệ este, nhựa, axit amin, polypeptit, hoặc polynucleotit;

với điều kiện khi A là phenylen thì B có mặt; và khi A là -$(CH_2)_4$- thì B không là -NHC(O)(CH_2CH_2)-; và khi A và B đều không có mặt thì R không là metyl.

Ngoài ra, sáng chế cũng đề cập đến axit amin có công thức (VI):



(VI),

trong đó:

B là nhóm liên kết được chọn từ nhóm bao gồm alkylen mạch ngắn, alkylen mạch ngắn được thế, alkenylen mạch ngắn, alkenylen mạch ngắn được thế, heteroalkylen mạch ngắn, heteroalkylen mạch ngắn được thế, -O-, -O-(alkylen hoặc alkylen được thế)-, -S-, -S-(alkylen hoặc alkylen được thế)-, -$S(O)_k$- trong đó k bằng 1, 2, hoặc 3, -$S(O)_k$(alkylen hoặc alkylen được thế)-, -C(O)-, -C(O)-(alkylen hoặc alkylen được thế)-, -C(S)-, -C(S)-(alkylen hoặc alkylen được thế)-, - N(R')-, -NR'-(alkylen hoặc alkylen được thế)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alkylen hoặc alkylen được thế)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(alkylen hoặc alkylen được thế)-, -N(R')CO- (alkylen hoặc alkylen được thế)-, -

N(R')C(O)O-, -S(O)$_k$N(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)$_k$N(R')-, -N(R')-N=, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, -C(R')$_2$-N=N-, và -C(R')$_2$-N(R')-N(R')-, trong đó mỗi nhóm R' độc lập là H, alkyl hoặc alkyl được thế;

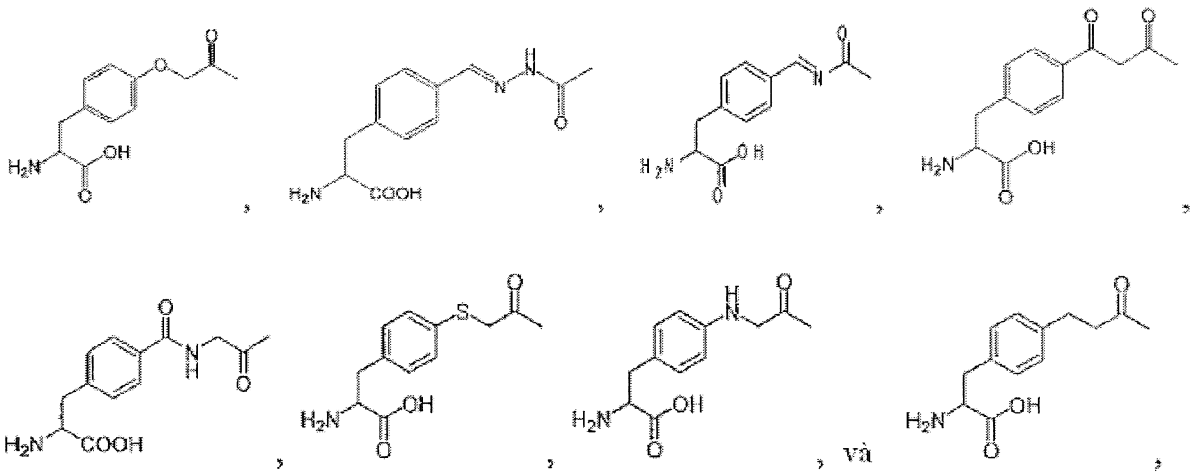
R là H, alkyl, alkyl được thế, xycloalkyl, hoặc xycloalkyl được thế;

R_1 là tùy chọn, và nếu có mặt, thì là H, nhóm bảo vệ amino, nhựa, axit amin, polypeptit, hoặc polynucleotit; và

R_2 là tùy chọn, và nếu có mặt, thì là OH, nhóm bảo vệ este, nhựa, axit amin, polypeptit, hoặc polynucleotit;

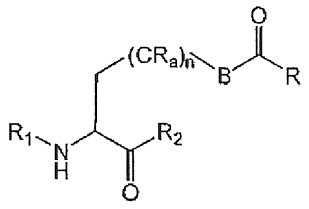
mỗi nhóm R_a độc lập được chọn từ nhóm bao gồm H, halogen, alkyl, alkyl được thế, -N(R')$_2$, -C(O)$_k$R' trong đó k bằng 1, 2, hoặc 3, -C(O)N(R')$_2$, -OR', và -S(O)$_k$R', trong đó mỗi nhóm R' độc lập là H, alkyl hoặc alkyl được thế.

Ngoài ra, sáng chế cũng đề cập đến axit amin có công thức sau:



trong đó các hợp chất này tùy ý là nhóm amino được bảo vệ, carboxyl được bảo vệ hoặc muối của nó. Ngoài ra, axit amin bất kỳ trong số các axit amin không có trong tự nhiên sau có thể được kết hợp vào polypeptit chứa axit amin không có trong tự nhiên.

Ngoài ra, sáng chế cũng đề cập đến axit amin có công thức (VII):



(VII)

trong đó

B là tùy ý, và khi có mặt thì là nhóm liên kết được chọn từ nhóm bao gồm alkylen mạch ngắn, alkylen mạch ngắn được thế, alkenylen mạch ngắn, alkenylen mạch ngắn được thế, heteroalkylen mạch ngắn, heteroalkylen mạch ngắn được thế, -O-, -O-(alkylen hoặc alkylen được thế)-, -S-, -S-(alkylen hoặc alkylen được thế)-, $-S(O)_k-$ trong đó k bằng 1, 2, hoặc 3, $-S(O)_k$(alkylen hoặc alkylen được thế)-, -C(O)-, -C(O)-(alkylen hoặc alkylen được thế)-, -C(S)-, -C(S)-(alkylen hoặc alkylen được thế)-, -N(R')-. -NR'-(alkylen hoặc alkylen được thế)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alkylen hoặc alkylen được thế)-, -CSN-(R')-, -CSN(R')-(alkylen hoặc alkylen được thế)-, -N(R')CO-(alkylen hoặc alkylen được thế)-, $-N(R')C(O)O-$, $-S(O)_kN(R')-$, $-N(R')C(O)N(R')-$, $-N(R')C(S)N(R')-$, $-N(-R')S(O)_kN(R')-$, $-N(R^!)-N=$, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, $-C(R')_2-N=N-$, và $-C(R')_2-N(R')-N(R')-$, trong đó mỗi nhóm R' độc lập là H, alkyl hoặc alkyl được thế;

R là H, alkyl, alkyl được thế, xycloalkyl hoặc xycloalkyl được thế;

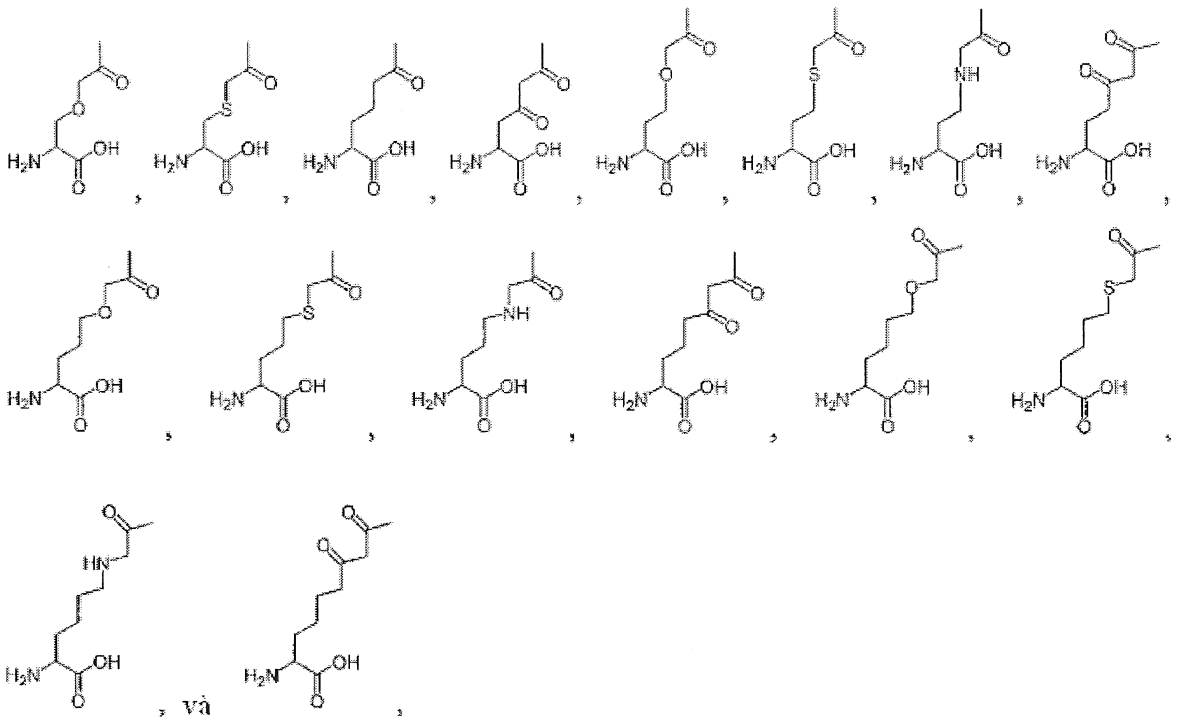
R_1 là tùy chọn, và nếu có mặt, thì là H, nhóm bảo vệ amino, nhựa, axit amin, polypeptit, hoặc polynucleotit; và

R_2 là tùy chọn, và nếu có mặt, thì là OH, nhóm bảo vệ este, nhựa, axit amin, polypeptit, hoặc polynucleotit;

mỗi nhóm R_a độc lập được chọn từ nhóm bao gồm H, halogen, alkyl, alkyl được thế, $-N(R')_2$, $-C(O)_kR'$ trong đó k bằng 1,2, hoặc 3, $-C(O)N(R')_2$, -OR', và $-S(O)_kR'$, trong đó mỗi nhóm R' độc lập là H, alkyl hoặc alkyl được thế; và n bằng 0 đến 8;

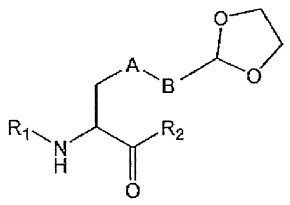
với điều kiện khi A là $-(CH_2)_4-$ thì B không là $-NHC(O)(CH_2CH_2)-$.

Ngoài ra, sáng chế cũng đề cập đến axit amin có công thức sau:



trong đó các hợp chất này tùy ý có amino được bảo vệ, tuỳ ý có carboxyl được bảo vệ, tùy ý có amino được bảo vệ và có carboxyl được bảo vệ, hoặc muối của chúng. Ngoài ra, các axit amin không có trong tự nhiên này và axit amin bất kỳ trong số các axit amin không có trong tự nhiên có công thức sau có thể được kết hợp vào polypeptit chứa axit amin không có trong tự nhiên.

Ngoài ra, sáng chế cũng đề cập đến axit amin có công thức (VIII):



(VIII),

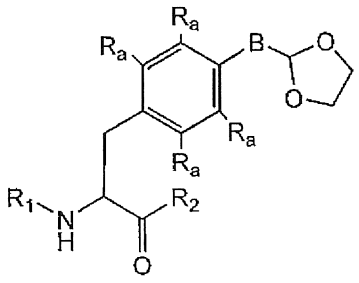
trong đó A là tùy ý, và khi có mặt thì là alkylen mạch ngắn, alkylen mạch ngắn được thế, xycloalkylen mạch ngắn, xycloalkylen mạch ngắn được thế, alkenylen mạch ngắn, alkenylen mạch ngắn được thế, alkynylen, heteroalkylen mạch ngắn, heteroalkylen được thế, heteroxycloalkylen mạch ngắn, heteroxycloalkylen mạch ngắn được thế, arylen, arylen được thế, heteroarylen, hetero arylen được thế, alkarylen, alkarylen được thế, aralkylen, hoặc aralkylen được thế;

B là tùy ý, và khi có mặt thì là nhóm liên kết được chọn từ nhóm bao gồm alkylen mạch ngắn, alkylen mạch ngắn được thế, alkenylen mạch ngắn, alkenylen mạch ngắn được thế, heteroalkylen mạch ngắn, heteroalkylen mạch ngắn được thế, -O-, -O-(alkylen hoặc alkylen được thế)-, -S-, -S-(alkylen hoặc alkylen được thế)-, $-S(O)_k-$ trong đó k bằng 1, 2, hoặc 3, $-S(O)_k$(alkylen hoặc alkylen được thế)-, -C(O)-, -C(O)-(alkylen hoặc alkylen được thế)-, -C(S)-, -C(S)-(alkylen hoặc alkylen được thế)-, -N(R')-, -NR'-(alkylen hoặc alkylen được thế)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alkylen hoặc alkylen được thế)-, -CSN-(R')-, -CSN(R')-(alkylen hoặc alkylen được thế)-, -N(R')CO-(alkylen hoặc alkylen được thế)-, -N(R')C(O)O-, $-S(O)_kN(R')-$, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(-R')$S(O)_kN(R')-$, -N(R')-N=, - C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, $-C(R')_2-N=N-$, và $-C(R')_2-N(R')-N(R')-$, trong đó mỗi nhóm R' độc lập là H, alkyl hoặc alkyl được thế;

R_1 là tùy chọn, và nếu có mặt, thì là H, nhóm bảo vệ amino, nhựa, axit amin, polypeptit, hoặc polynucleotit; và

R_2 là tùy chọn, và nếu có mặt, thì là OH, nhóm bảo vệ este, nhựa, axit amin, polypeptit, hoặc polynucleotit.

Ngoài ra, sáng chế cũng đề cập đến axit amin có công thức (IX):



(IX),

B là tùy ý, và khi có mặt thì là nhóm liên kết được chọn từ nhóm bao gồm alkylen mạch ngắn, alkylen mạch ngắn được thế, alkenylen mạch ngắn, alkenylen mạch ngắn được thế, heteroalkylen mạch ngắn, heteroalkylen mạch ngắn được thế, -O-, -O-(alkylen hoặc alkylen được thế)-, -S-, -S-(alkylen hoặc alkylen được thế)-, $-S(O)_k-$ trong đó k bằng 1, 2, hoặc 3, $-S(O)_k$(alkylen hoặc alkylen được thế)-, -C(O)-, -C(O)-(alkylen hoặc alkylen được thế)-, -C(S)-, -C(S)- (alkylen hoặc alkylen được thế)-, -N(R')-, -NR'-(alkylen hoặc alkylen được thế)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alkylen hoặc alkylen được thế)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(alkylen hoặc alkylen được thế)-, -N(R')CO-(alkylen hoặc

alkylen được thế)-, -N(R')C(O)O-, -$S(O)_k$N(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')$S(O)_k$N(R')-, -N(R')-N=, - C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, -$C(R')_2$-N=N-, và -$C(R')_2$-N(R')-N(R')-, trong đó mỗi nhóm R' độc lập là H, alkyl, hoặc alkyl được thế;

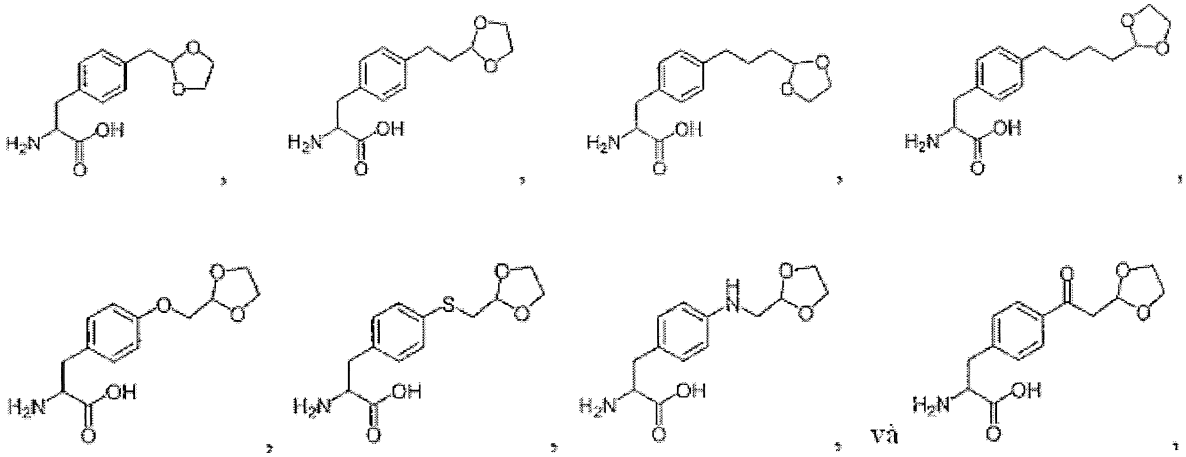
R là H, alkyl, alkyl được thế, xycloalkyl hoặc xycloalkyl được thế;

R_1 là tùy chọn, và nếu có mặt, thì là H, nhóm bảo vệ amino, nhựa, axit amin, polypeptit, hoặc polynucleotit; và

R_2 là tùy chọn, và nếu có mặt, thì là OH, nhóm bảo vệ este, nhựa, axit amin, polypeptit, hoặc polynucleotit;

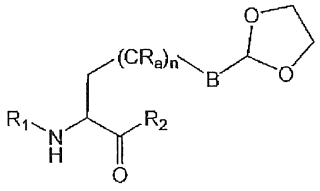
trong đó mỗi nhóm R_a độc lập được chọn từ nhóm bao gồm H, halogen, alkyl, alkyl được thế, -$N(R')_2$, -$C(O)_k$R' trong đó k bằng 1, 2, hoặc 3, -$C(O)N(R')_2$, -OR', và -$S(O)_k$R', trong đó mỗi nhóm R' độc lập là H, alkyl hoặc alkyl được thế.

Ngoài ra, sáng chế cũng đề cập đến axit amin có công thức sau:



trong đó, các hợp chất này tùy ý có amino được bảo vệ, tùy ý có carboxyl được bảo vệ, tùy ý có amino được bảo vệ và có carboxyl được bảo vệ, hoặc muối của chúng. Ngoài ra, các axit amin không có trong tự nhiên này và các axit amin bất kỳ trong số các axit amin không có trong tự nhiên có công thức sau có thể được kết hợp vào polypeptit chứa axit amin không có trong tự nhiên.

Ngoài ra, sáng chế cũng đề cập đến axit amin có công thức (X):



(X),

trong đó B là tùy ý, và khi có mặt thì là nhóm liên kết được chọn từ nhóm bao gồm alkylen mạch ngắn, alkylen mạch ngắn được thế, alkenylen mạch ngắn, alkenylen mạch ngắn được thế, heteroalkylen mạch ngắn, heteroalkylen mạch ngắn được thế, -O-, -O-(alkylen hoặc alkylen được thế)-, -S-, -S-(alkylen hoặc alkylen được thế)-, $-S(O)_k-$ trong đó k bằng 1, 2, hoặc 3, $-S(O)_k$(alkylen hoặc alkylen được thế)-, -C(O)-, -C(O)-(alkylen hoặc alkylen được thế)-, - C(S)-, -C(S)-(alkylen hoặc alkylen được thế)-, -N(R')-, -NR'-(alkylen hoặc alkylen được thế)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alkylen hoặc alkylen được thế)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(alkylen hoặc alkylen được thế)-, -N(R') CO-(alkylen hoặc alkylen được thế)-, -N(R')C(O)O-, $-S(O)_kN(R')-$, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, $-N(R')S(O)_kN(R')-$, -N(R')-N=, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, $-C(R')_2-N=N-$, và $-C(R')_2-N(R')-N(R')-$, trong đó mỗi nhóm R' độc lập là H, alkyl hoặc alkyl được thế;

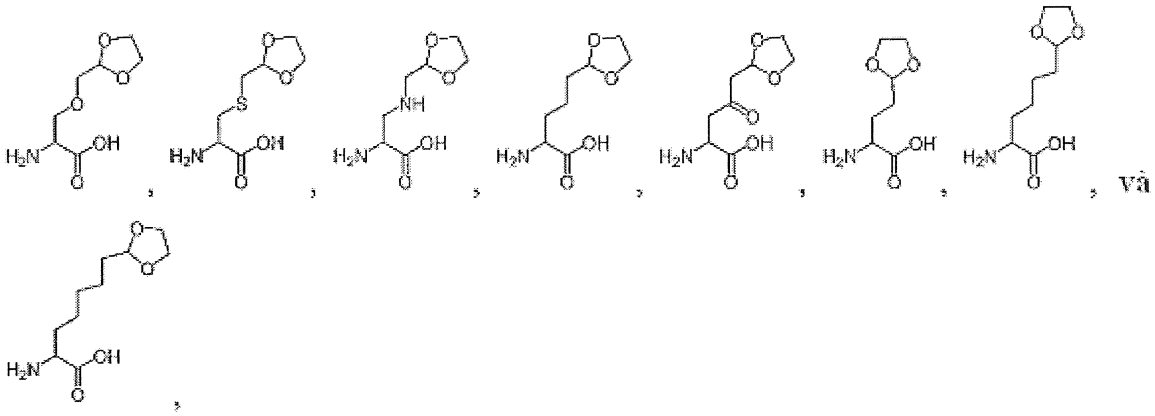
R là H, alkyl, alkyl được thế, xycloalkyl hoặc xycloalkyl được thế;

R_1 là tùy chọn, và nếu có mặt, thì là H, nhóm bảo vệ amino, nhựa, axit amin, polypeptit, hoặc polynucleotit; và

R_2 là tùy chọn, và nếu có mặt, thì là OH, nhóm bảo vệ este, nhựa, axit amin, polypeptit, hoặc polynucleotit;

mỗi nhóm Ra độc lập được chọn từ nhóm bao gồm H, halogen, alkyl, alkyl được thế, $-N(R')_2$, $-C(O)_kR'$ trong đó k bằng 1, 2, hoặc 3, $-C(O)N(R')_2$, -OR', và $-S(O)_kR'$, trong đó mỗi nhóm R' độc lập là H, alkyl hoặc alkyl được thế; và n bằng 0 đến 8.

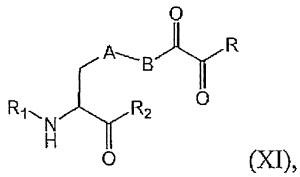
Ngoài ra, sáng chế cũng đề cập đến axit amin có công thức sau:



trong đó, các hợp chất này tùy ý có amino được bảo vệ, tùy ý có carboxyl được bảo vệ, tùy ý có amino được bảo vệ và có carboxyl được bảo vệ, hoặc muối của chúng. Ngoài ra, các axit amin không có trong tự nhiên này và các axit amin bất kỳ trong số các axit amin không có trong tự nhiên sau có thể được kết hợp vào polypeptit chứa axit amin không có trong tự nhiên.

Ngoài các cấu trúc monocarbonyl, các axit amin không có trong tự nhiên được bộc lộ trong bản mô tả này có thể chứa các nhóm như đicarbonyl, các nhóm tương tự đicarbonyl, các nhóm đicarbonyl được chắn và các nhóm đicarbonyl được bảo vệ.

Ví dụ, sáng chế đề cập đến axit amin có công thức (XI):



(XI),

trong đó A là tùy ý, và khi có mặt thì là alkylen mạch ngắn, alkylen mạch ngắn được thế, xycloalkylen mạch ngắn, xycloalkylen mạch ngắn được thế, alkenylen mạch ngắn, alkenylen mạch ngắn được thế, alkynylen, heteroalkylen mạch ngắn, heteroalkylen được thế, heteroxycloalkylen mạch ngắn, heteroxycloalkylen mạch ngắn được thế, arylen, arylen được thế, heteroarylen, heteroarylen được thế, alkarylen, alkarylen được thế, aralkylen, hoặc aralkylen được thế;

B là tùy ý, và khi có mặt thì là nhóm liên kết được chọn từ nhóm bao gồm alkylen mạch ngắn, alkylen mạch ngắn được thế, alkenylen mạch ngắn, alkenylen mạch ngắn được thế, heteroalkylen mạch ngắn, heteroalkylen mạch ngắn được thế, -O-, O-(alkylen

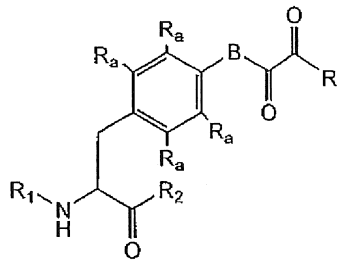
hoặc alkylen được thế)-, - S-, S-(alkylen hoặc alkylen được thế)-, -S(O)$_k$- trong đó k bằng 1, 2, hoặc 3, -S(O)$_k$(alkylen hoặc alkylen được thế)-, C(O)-, C(O)-(alkylen hoặc alkylen được thế)-, -C(S)-, C(S)- (alkylen hoặc alkylen được thế)-, -N(R')-, NR'-(alkylen hoặc alkylen được thế)-, C(O)N(R')-, CON(R')-(alkylen hoặc alkylen được thế)-, -CSN(R')-, CSN(R')-(alkylen hoặc alkylen được thế)-, N(R')CO-(alkylen hoặc alkylen được thế)-, N(R')C(O)O-, S(O)$_k$N(R')-, N(R')C(O)N(R')-, N(R')C(S)N(R')-, N(R')S(O)$_k$N(R')-, N(R')-N=, - C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, C(R')$_2$-N=N-, và C(R')$_2$ N(R') N(R')-, trong đó mỗi nhóm R' độc lập là H, alkyl hoặc alkyl được thế;

R là H, alkyl, alkyl được thế, xycloalkyl hoặc xycloalkyl được thế;

R$_1$ là tùy chọn, và nếu có mặt, thì là H, nhóm bảo vệ amino, nhựa, axit amin, polypeptit, hoặc polynucleotit; và

R$_2$ là tùy chọn, và nếu có mặt, thì là OH, nhóm bảo vệ este, nhựa, axit amin, polypeptit, hoặc polynucleotit.

Ngoài ra, sáng chế đề cập đến axit amin có công thức (XII):



(XII),

B là tùy ý, và khi có mặt thì là nhóm liên kết được chọn từ nhóm bao gồm alkylen mạch ngắn, alkylen mạch ngắn được thế, alkenylen mạch ngắn, alkenylen mạch ngắn được thế, heteroalkylen mạch ngắn, heteroalkylen mạch ngắn được thế, -O-, -O-(alkylen hoặc alkylen được thế)-, -S-, -S-(alkylen hoặc alkylen được thế)-, -S(O)$_k$-, trong đó k bằng 1, 2, hoặc 3, -S(O)$_k$(alkylen hoặc alkylen được thế)-, -C(O)-, -C(O)-(alkylen hoặc alkylen được thế)-, -C(S)-, -C(S)- (alkylen hoặc alkylen được thế)-, -N(R')-, -NR'-(alkylen hoặc alkylen được thế)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alkylen hoặc alkylen được thế)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(alkylen hoặc alkylen được thế)-, -N(R')CQ-(alkylen hoặc alkylen được thế)-, -N(R')C(O)O-, -S(O)$_k$N(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-,

-N(R')S(O)$_k$N(R')-, -N(R')-N=, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, -C(R')$_2$-N-=N-, và -C(R')$_2$-N(R')-N(R')-, trong đó mỗi nhóm R' độc lập là H, alkyl hoặc alkyl được thế;

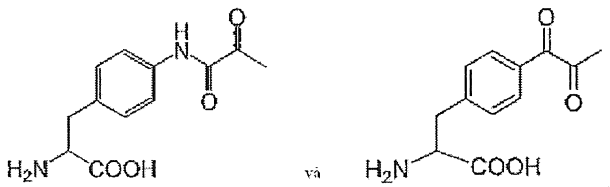
R là H, alkyl, alkyl được thế, xycloalkyl hoặc xycloalkyl được thế;

R_1 là tùy chọn, và nếu có mặt, thì là H, nhóm bảo vệ amino, nhựa, axit amin, polypeptit, hoặc polynucleotit; và

R_2 là tùy chọn, và nếu có mặt, thì là OH, nhóm bảo vệ este, nhựa, axit amin, polypeptit, hoặc polynucleotit;

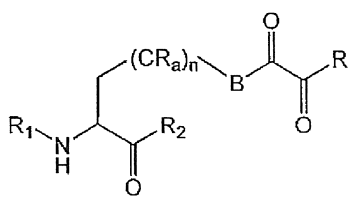
trong đó mỗi nhóm Ra độc lập được chọn từ nhóm bao gồm H, halogen, alkyl, alkyl được thế, -N(R')2, -C(O)$_k$R' trong đó k bằng 1, 2, hoặc 3, -C(O)N(R')2, -OR', và -S(O)kR', trong đó mỗi nhóm R' độc lập là H, alkyl hoặc alkyl được thế.

Ngoài ra, sáng chế cũng đề cập đến axit amin có công thức sau:



trong đó các hợp chất này tùy ý có amino được bảo vệ, tùy ý có carboxyl được bảo vệ, tùy ý có amino được bảo vệ và có carboxyl được bảo vệ, hoặc muối của chúng. Ngoài ra, các axit amin không có trong tự nhiên này và các axit amin bất kỳ trong số các axit amin không có trong tự nhiên sau có thể được kết hợp vào polypeptit chứa axit amin không có trong tự nhiên.

Ngoài ra, sáng chế cũng đề cập đến axit amin có công thức (XIII):



(XIII),

trong đó B là tùy ý, và khi có mặt thì là nhóm liên kết được chọn từ nhóm bao gồm

alkylen mạch ngắn, alkylen mạch ngắn được thế, alkenylen mạch ngắn, alkenylen mạch ngắn được thế, heteroalkylen mạch ngắn, heteroalkylen mạch ngắn được thế, -O-, -O-(alkylen hoặc alkylen được thế)-, -S-, -S-(alkylen hoặc alkylen được thế)-, -$S(O)_k$- trong đó k bằng 1, 2, hoặc 3, - $S(O)_k$(alkylen hoặc alkylen được thế)-, -C(O)-, -C(O)-(alkylen hoặc alkylen được thế)-, - C(S)-, -C(S)-(alkylen hoặc alkylen được thế)-, -N(R')-, -NR'-(alkylen hoặc alkylen được thế)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alkylen hoặc alkylen được thế)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(alkylen hoặc alkylen được thế)-, -N(R')CO-(alkylen hoặc alkylen được thế)-, -N(R')C(O)O-, -$S(O)_k$N(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')$S(O)_k$N(R')-, -N(R')-N=, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, -$C(R')_2$-N=N-, và -$C(R')_2$-N(R')-N(R')-, trong đó mỗi nhóm R' độc lập là H, alkyl hoặc alkyl được thế;

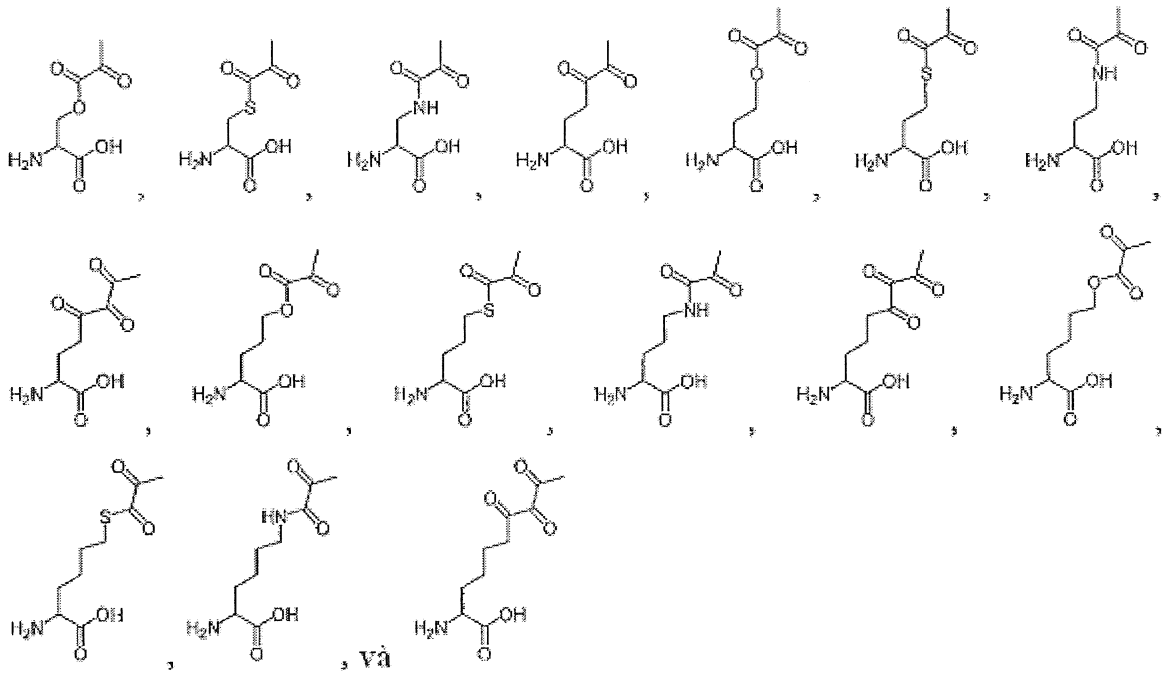
R là H, alkyl, alkyl được thế, xycloalkyl hoặc xycloalkyl được thế;

R_1 là tùy chọn, và nếu có mặt, thì là H, nhóm bảo vệ amino, nhựa, axit amin, polypeptit, hoặc polynucleotit; và

R_2 là tùy chọn, và nếu có mặt, thì là OH, nhóm bảo vệ este, nhựa, axit amin, polypeptit, hoặc polynucleotit;

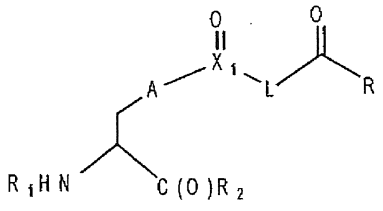
mỗi nhóm R_a độc lập được chọn từ nhóm bao gồm H, halogen, alkyl, alkyl được thế, -$N(R')_2$, -$C(O)_k$R' trong đó k bằng 1, 2, hoặc 3, -$C(O)N(R')_2$, -OR', và - $S(O)_k$R', trong đó mỗi nhóm R' độc lập là H, alkyl hoặc alkyl được thế; và n bằng 0 đến 8.

Ngoài ra, sáng chế cũng đề cập đến axit amin có công thức sau:



trong đó các hợp chất này tùy ý có amino được bảo vệ, tùy ý có carboxyl được bảo vệ, tùy ý có amino được bảo vệ và có carboxyl được bảo vệ, hoặc muối của chúng. Ngoài ra, các axit amin không có trong tự nhiên này và các axit amin bất kỳ trong số các axit amin không có trong tự nhiên sau có thể được kết hợp vào polypeptit chứa axit amin không có trong tự nhiên.

Ngoài ra, sáng chế cũng đề cập đến axit amin có công thức (XIV):

 (XIV);

trong đó:

A là tùy ý, và khi có mặt thì là alkylen mạch ngắn, alkylen mạch ngắn được thế, xycloalkylen mạch ngắn, xycloalkylen mạch ngắn được thế, alkenylen mạch ngắn, alkenylen mạch ngắn được thế, alkynylen, heteroalkylen mạch ngắn, heteroalkylen được thế, heteroxycloalkylen mạch ngắn, heteroxycloalkylen mạch ngắn được thế, arylen, arylen được thế, heteroarylen, heteroarylen được thế, alkarylen, alkarylen được thế, aralkylen, hoặc aralkylen được thế;

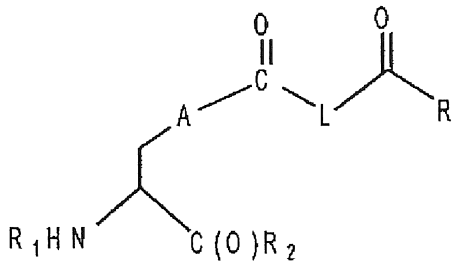
R là H, alkyl, alkyl được thế, xycloalkyl hoặc xycloalkyl được thế;

R_1 là tùy chọn, và nếu có mặt, thì là H, nhóm bảo vệ amino, nhựa, axit amin, polypeptit, hoặc polynucleotit; và

R_2 là tùy chọn, và nếu có mặt, thì là OH, nhóm bảo vệ este, nhựa, axit amin, polypeptit, hoặc polynucleotit;

X1 là C, S, hoặc S(O); và L là alkylen, alkylen được thế, N(R')(alkylen) hoặc N(R')(alkylen được thế), trong đó R' là H, alkyl, alkyl được thế, xycloalkyl hoặc xycloalkyl được thế.

Ngoài ra, sáng chế cũng đề cập đến axit amin có công thức (XIV-A):



(XIV-A)

A là tùy ý, và khi có mặt thì là alkylen mạch ngắn, alkylen mạch ngắn được thế, xycloalkylen mạch ngắn, xycloalkylen mạch ngắn được thế, alkenylen mạch ngắn, alkenylen mạch ngắn được thế, alkynylen, heteroalkylen mạch ngắn, heteroalkylen được thế, heteroxycloalkylen mạch ngắn, heteroxycloalkylen mạch ngắn được thế, arylen, arylen được thế, heteroarylen, heteroarylen được thế, alkarylen, alkarylen được thế, aralkylen, hoặc aralkylen được thế;

R là H, alkyl, alkyl được thế, xycloalkyl hoặc xycloalkyl được thế;

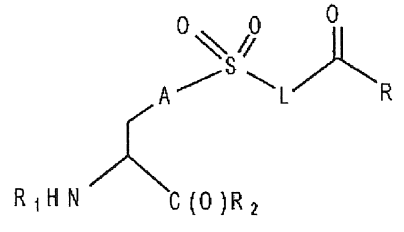
R_1 là tùy chọn, và nếu có mặt, thì là H, nhóm bảo vệ amino, nhựa, axit amin, polypeptit, hoặc polynucleotit; và

R_2 là tùy chọn, và nếu có mặt, thì là OH, nhóm bảo vệ este, nhựa, axit amin, polypeptit, hoặc polynucleotit;

L là alkylen, alkylen được thế, N(R') (alkylen) hoặc N(R')(alkylen được thế),

trong đó R' là H, alkyl, alkyl được thế, xycloalkyl hoặc xycloalkyl được thế.

Ngoài ra, sáng chế cũng đề cập đến axit amin có công thức sau (XIV-B):



(XIV-B)

trong đó:

A là tùy ý, và khi có mặt thì là alkylen mạch ngắn, alkylen mạch ngắn được thế, xycloalkylen mạch ngắn, xycloalkylen mạch ngắn được thế, alkenylen mạch ngắn, alkenylen mạch ngắn được thế, alkynylen, heteroalkylen mạch ngắn, heteroalkylen được thế, heteroxycloalkylen mạch ngắn, heteroxycloalkylen mạch ngắn được thế, arylen, arylen được thế, heteroarylen, hetero arylen được thế, alkarylen, alkarylen được thế, aralkylen, hoặc aralkylen được thế;

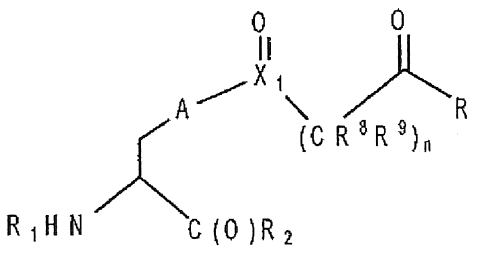
R là H, alkyl, alkyl được thế, xycloalkyl hoặc xycloalkyl được thế;

R_1 là tùy chọn, và nếu có mặt, thì là H, nhóm bảo vệ amino, nhựa, axit amin, polypeptit, hoặc polynucleotit; và

R_2 là tùy chọn, và nếu có mặt, thì là OH, nhóm bảo vệ este, nhựa, axit amin, polypeptit, hoặc polynucleotit;

L là alkylen, alkylen được thế, N(R') (alkylen) hoặc N(R')(alkylen được thế), trong đó R' là H, alkyl, alkyl được thế, xycloalkyl hoặc xycloalkyl được thế.

Ngoài ra, sáng chế cũng đề cập đến axit amin có công thức (XV):



(XV);

trong đó:

A là tùy ý, và khi có mặt thì là alkylen mạch ngắn, alkylen mạch ngắn được thế, xycloalkylen mạch ngắn, xycloalkylen mạch ngắn được thế, alkenylen mạch ngắn, alkenylen mạch ngắn được thế, alkynylen, heteroalkylen mạch ngắn, heteroalkylen được thế, heteroxycloalkylen mạch ngắn, heteroxycloalkylen mạch ngắn được thế, arylen, arylen được thế, heteroarylen, heteroarylen được thế, alkarylen, alkarylen được thế, aralkylen, hoặc aralkylen được thế;

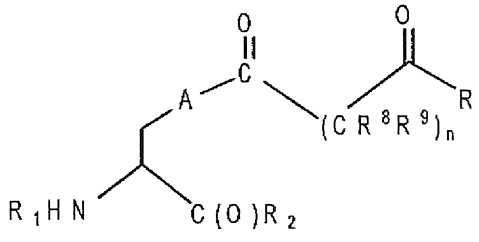
R là H, alkyl, alkyl được thế, xycloalkyl hoặc xycloalkyl được thế;

R_1 là tùy chọn, và nếu có mặt, thì là H, nhóm bảo vệ amino, nhựa, axit amin, polypeptit, hoặc polynucleotit; và

R_2 là tùy chọn, và nếu có mặt, thì là OH, nhóm bảo vệ este, nhựa, axit amin, polypeptit, hoặc polynucleotit;

X_1 là C, S, hoặc S(O); và n bằng 0, 1, 2, 3, 4, hoặc 5; và mỗi nhóm R^8 và R^9 trên mỗi nhóm CR^8R^9 độc lập được chọn từ nhóm bao gồm H, alkoxy, alkylamin, halogen, alkyl, aryl, hoặc R^8 và R^9 bất kỳ có thể cùng nhau tạo ra =O hoặc xycloalkyl, hoặc các nhóm bất kỳ liền kề với R^8 có thể cùng nhau tạo ra xycloalkyl.

Ngoài ra, sáng chế cũng đề cập đến axit amin có công thức (XV-A):



(XV-A)

trong đó:

A là tùy ý, và khi có mặt thì là alkylen mạch ngắn, alkylen mạch ngắn được thế, xycloalkylen mạch ngắn, xycloalkylen mạch ngắn được thế, alkenylen mạch ngắn, alkenylen mạch ngắn được thế, alkynylen, heteroalkylen mạch ngắn, heteroalkylen được thế, heteroxycloalkylen mạch ngắn, heteroxycloalkylen mạch ngắn được thế, arylen,

arylen được thế, heteroarylen, heteroarylen được thế, alkarylen, alkarylen được thế, aralkylen, hoặc aralkylen được thế;

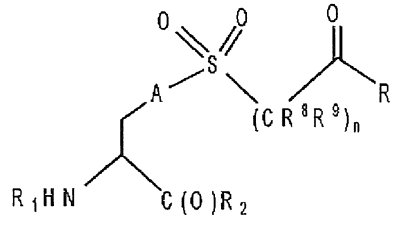
R là H, alkyl, alkyl được thế, xycloalkyl hoặc xycloalkyl được thế;

R_1 là tùy chọn, và nếu có mặt, thì là H, nhóm bảo vệ amino, nhựa, axit amin, polypeptit, hoặc polynucleotit; và

R_2 là tùy chọn, và nếu có mặt, thì là OH, nhóm bảo vệ este, nhựa, axit amin, polypeptit, hoặc polynucleotit;

n bằng 0, 1, 2, 3, 4, hoặc 5; và mỗi nhóm R^8 và R^9 trên mỗi nhóm CR^8R^9 độc lập được chọn từ nhóm bao gồm H, alkoxy, alkylamin, halogen, alkyl, aryl, hoặc R^8 và R^9 bất kỳ có thể cùng nhau tạo ra =O hoặc xycloalkyl, hoặc các nhóm bất kỳ liền kề với R^8 có thể cùng nhau tạo ra xycloalkyl.

Ngoài ra, sáng chế cũng đề cập đến axit amin có công thức (XV-B):



(XV-B)

A là tùy ý, và khi có mặt thì là alkylen mạch ngắn, alkylen mạch ngắn được thế, xycloalkylen mạch ngắn, xycloalkylen mạch ngắn được thế, alkenylen mạch ngắn, alkenylen mạch ngắn được thế, alkynylen, heteroalkylen mạch ngắn, heteroalkylen được thế, heteroxycloalkylen mạch ngắn, heteroxycloalkylen mạch ngắn được thế, arylen, arylen được thế, heteroarylen, heteroarylen được thế, alkarylen, alkarylen được thế, aralkylen, hoặc aralkylen được thế;

R là H, alkyl, alkyl được thế, xycloalkyl hoặc xycloalkyl được thế;

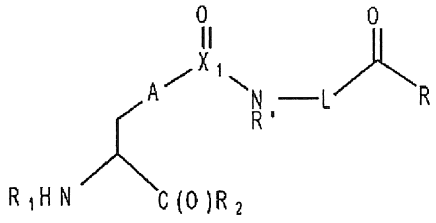
R_1 là tùy chọn, và nếu có mặt, thì là H, nhóm bảo vệ amino, nhựa, axit amin, polypeptit, hoặc polynucleotit; và

R_2 là tùy chọn, và nếu có mặt, thì là OH, nhóm bảo vệ este, nhựa, axit amin,

polypeptit, hoặc polynucleotit;

n bằng 0, 1, 2, 3, 4, hoặc 5; và mỗi nhóm R^8 và R^9 trên mỗi nhóm CR^8R^9 độc lập được chọn từ nhóm bao gồm H, alkoxy, alkylamin, halogen, alkyl, aryl, hoặc R^8 và R^9 bấtkỳ có thể cùng nhau tạo ra =O hoặc xycloalkyl, hoặc nhóm bất kỳ liền kề với R^8 có thể cùng nhau tạo ra xycloalkyl,

Ngoài ra, sáng chế cũng đề cập đến axit amin có công thức (XVI):



(XVI);

trong đó:

A là tùy ý, và khi có mặt thì là alkylen mạch ngắn, alkylen mạch ngắn được thế, xycloalkylen mạch ngắn, xycloalkylen mạch ngắn được thế, alkenylen mạch ngắn, alkenylen mạch ngắn được thế, alkynylen, heteroalkylen mạch ngắn, heteroalkylen được thế, heteroxycloalkylen mạch ngắn, heteroxycloalkylen mạch ngắn được thế, arylen, arylen được thế, heteroarylen, heteroarylen được thế, alkarylen, alkarylen được thế, aralkylen, hoặc aralkylen được thế;

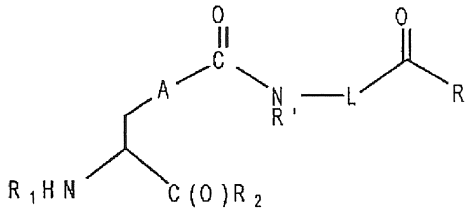
R là H, alkyl, alkyl được thế, xycloalkyl hoặc xycloalkyl được thế;

R_1 là tùy chọn, và nếu có mặt, thì là H, nhóm bảo vệ amino, nhựa, axit amin, polypeptit, hoặc polynucleotit; và

R_2 là tùy chọn, và nếu có mặt, thì là OH, nhóm bảo vệ este, nhựa, axit amin, polypeptit, hoặc polynucleotit;

X_1 là C, S, hoặc S(O); và L là alkylen, alkylen được thế, N(R')(alkylen) hoặc N(R')(alkylen được thế), trong đó R' là H, alkyl, alkyl được thế, xycloalkyl hoặc xycloalkyl được thế.

Ngoài ra, sáng chế cũng đề cập đến axit amin có công thức (XVI-A):



(XVI-A)

trong đó:

A là tùy ý, và khi có mặt thì là alkylen mạch ngắn, alkylen mạch ngắn được thế, xycloalkylen mạch ngắn, xycloalkylen mạch ngắn được thế, alkenylen mạch ngắn, alkenylen mạch ngắn được thế, alkynylen, heteroalkylen mạch ngắn, heteroalkylen được thế, heteroxycloalkylen mạch ngắn, heteroxycloalkylen mạch ngắn được thế, arylen, arylen được thế, heteroarylen, heteroarylen được thế, alkarylen, alkarylen được thế, aralkylen, hoặc aralkylen được thế;

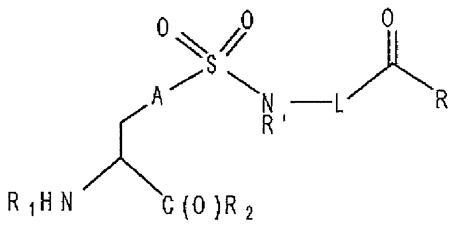
R là H, alkyl, alkyl được thế, xycloalkyl hoặc xycloalkyl được thế;

R_1 là tùy chọn, và nếu có mặt, thì là H, nhóm bảo vệ amino, nhựa, axit amin, polypeptit, hoặc polynucleotit; và

R_2 là tùy chọn, và nếu có mặt, thì là OH, nhóm bảo vệ este, nhựa, axit amin, polypeptit, hoặc polynucleotit;

L là alkylen, alkylen được thế, N(R')(alkylen) hoặc N(R')(alkylen được thế), trong đó R' là H, alkyl, alkyl được thế, xycloalkyl hoặc xycloalkyl được thế.

Ngoài ra, sáng chế cũng đề cập đến axit amin có công thức (XVI-B):



(XVI-B)

trong đó:

A là tùy ý, và khi có mặt thì là alkylen mạch ngắn, alkylen mạch ngắn được thế, xycloalkylen mạch ngắn, xycloalkylen mạch ngắn được thế, alkenylen mạch ngắn,

alkenylen mạch ngắn được thế, alkynylen, heteroalkylen mạch ngắn, heteroalkylen được thế, heteroxycloalkylen mạch ngắn, heteroxycloalkylen mạch ngắn được thế, arylen, arylen được thế, heteroarylen, heteroarylen được thế, alkarylen, alkarylen được thế, aralkylen, hoặc aralkylen được thế;

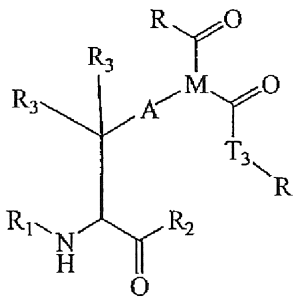
R là H, alkyl, alkyl được thế, xycloalkyl hoặc xycloalkyl được thế;

R_1 là tùy chọn, và nếu có mặt, thì là H, nhóm bảo vệ amino, nhựa, axit amin, polypeptit, hoặc polynucleotit; và

R_2 là tùy chọn, và nếu có mặt, thì là OH, nhóm bảo vệ este, nhựa, axit amin, polypeptit, hoặc polynucleotit;

L là alkylen, alkylen được thế, N(R')(alkylen) hoặc N(R')(alkylen được thế), trong đó R' là H, alkyl, alkyl được thế, xycloalkyl hoặc xycloalkyl được thế.

Ngoài ra, sáng chế cũng đề cập đến axit amin có công thức (XVII):

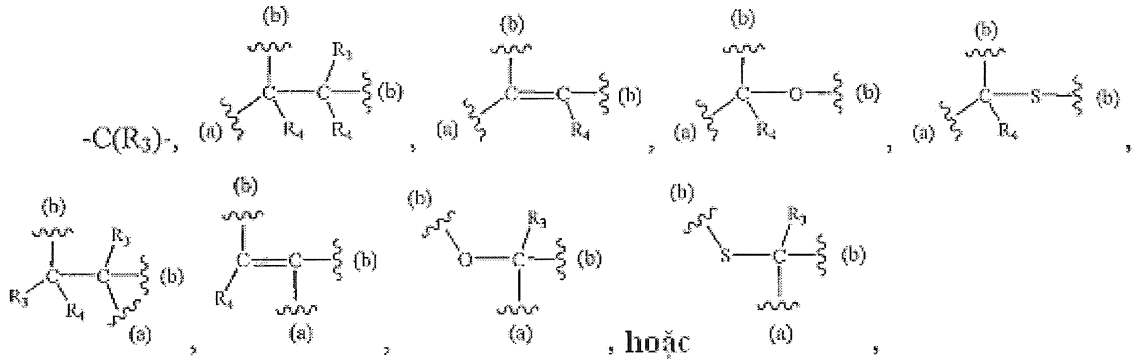


(XVII),

trong đó:

A là tùy ý, và khi có mặt thì là alkylen mạch ngắn, alkylen mạch ngắn được thế, xycloalkylen mạch ngắn, xycloalkylen mạch ngắn được thế, alkenylen mạch ngắn, alkenylen mạch ngắn được thế, alkynylen, heteroalkylen mạch ngắn, heteroalkylen được thế, heteroxycloalkylen mạch ngắn, heteroxycloalkylen mạch ngắn được thế, arylen, arylen được thế, heteroarylen, heteroarylen được thế, alkarylen, alkarylen được thế, aralkylen, hoặc aralkylen được thế;

M là



trong đó khi (a) biểu thị liên kết với nhóm A và (b) biểu thị liên kết với các nhóm carbonyl tương ứng, thì R_3 và R_4 độc lập được chọn từ H, halogen, alkyl, alkyl được thế, xycloalkyl hoặc xycloalkyl được thế, hoặc R_3 và R_4 hoặc hai nhóm R_3 hoặc hai nhóm R_4 tùy ý tạo ra xycloalkyl hoặc heteroxycloalkyl;

hoặc

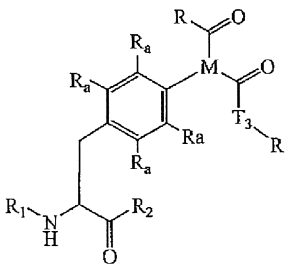
R là H, halogen, alkyl, alkyl được thế, xycloalkyl hoặc xycloalkyl được thế;

T_3 là liên kết, C(R)(R), O, hoặc S, và R là H, halogen, alkyl, alkyl được thế, xycloalkyl hoặc xycloalkyl được thế;

R_1 là tùy chọn, và nếu có mặt, thì là H, nhóm bảo vệ amino, nhựa, axit amin, polypeptit, hoặc polynucleotit; và

R_2 là tùy chọn, và nếu có mặt, thì là OH, nhóm bảo vệ este, nhựa, axit amin, polypeptit, hoặc polynucleotit.

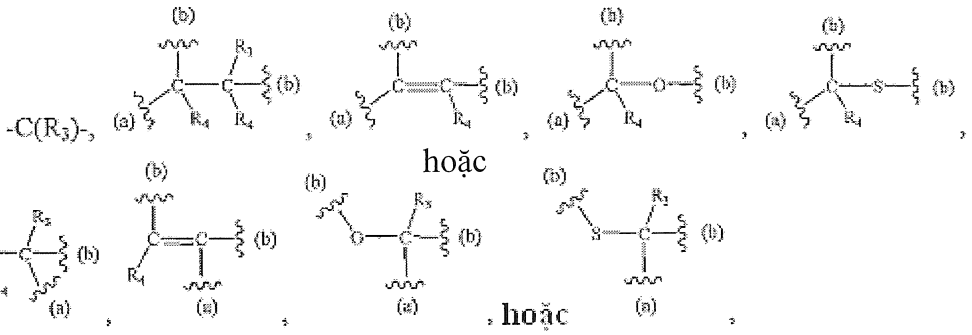
Ngoài ra, sáng chế cũng đề cập đến axit amin có công thức (XVIII):



(XVIII),

trong đó:

M là



trong đó khi (a) biểu thị liên kết với nhóm A và (b) biểu thị liên kết với các nhóm carbonyl tương ứng, thì R_3 và R_4 độc lập được chọn từ H, halogen, alkyl, alkyl được thế, xycloalkyl hoặc xycloalkyl được thế, hoặc R_3 và R_4 hoặc hai nhóm R_3 hoặc hai nhóm R_4 tùy ý tạo ra xycloalkyl hoặc heteroxycloalkyl;

R là H, halogen, alkyl, alkyl được thế, xycloalkyl hoặc xycloalkyl được thế;

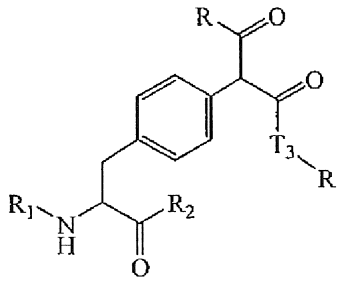
T_3 là liên kết, C(R)(R), O, hoặc S, và R là H, halogen, alkyl, alkyl được thế, xycloalkyl hoặc xycloalkyl được thế;

R_1 là tùy chọn, và nếu có mặt, thì là H, nhóm bảo vệ amino, nhựa, axit amin, polypeptit, hoặc polynucleotit; và

R_2 là tùy chọn, và nếu có mặt, thì là OH, nhóm bảo vệ este, nhựa, axit amin, polypeptit, hoặc polynucleotit;

mỗi nhóm R_a độc lập được chọn từ nhóm bao gồm H, halogen, alkyl, alkyl được thế, $-N(R')_2$, $-C(O)_kR'$, trong đó k bằng 1, 2, hoặc 3, $-C(O)N(R')_2$, $-OR^5$, và $-S(O)_kR'$, trong đó mỗi nhóm R' độc lập là H, alkyl hoặc alkyl được thế.

Ngoài ra, sáng chế cũng đề cập đến axit amin có công thức (XIX):

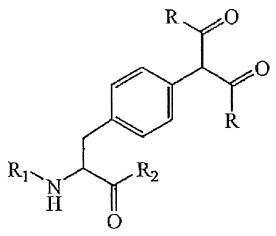


(XIX),

trong đó:

R là H, halogen, alkyl, alkyl được thế, xycloalkyl hoặc xycloalkyl được thế; và T_3 là O, hoặc S.

Ngoài ra, sáng chế cũng đề cập đến axit amin có công thức (XX):

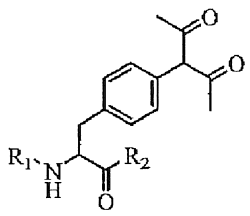
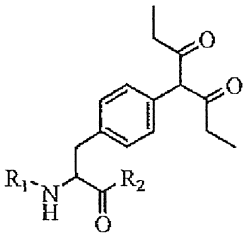


(XX),

trong đó:

R là H, halogen, alkyl, alkyl được thế, xycloalkyl hoặc xycloalkyl được thế.

Ngoài ra, sáng chế cũng đề cập đến axit amin có công thức (XXI):

và  , and  .

Theo một số phương án, polypeptit chứa axit amin không có trong tự nhiên được cải biến hóa học để tạo ra nhóm carbonyl hoặc đicarbonyl dễ phản ứng. Ví dụ, nhóm chức alđehyt dùng cho các phản ứng tiếp hợp có thể được tạo ra từ một nhóm chức có các nhóm amino và hyđroxyl liền kề. Khi phân tử có hoạt tính sinh học là polypeptit, ví dụ, đầu tận cùng N là serin hoặc threonin (mà có thể thường có mặt hoặc có thể được để lộ ra nhờ quá trình phân hủy hóa học hoặc phân hủy bằng enzym) có thể được sử dụng để tạo ra nhóm chức alđehyt trong các điều kiện phân cắt oxy hóa nhẹ bằng cách sử dụng periođat. Ví dụ, xem: Gaertner, et. al., *Bioconjug. Chem.* 3: 262-268 (1992); Geoghegan, K. & Stroh, J., *Bioconjug. Chem.* 3:138-146 (1992); Gaertner et al., *J. Biol. Chem.* 269:7224-7230 (1994). Tuy nhiên, các phương pháp đã biết trong lĩnh vực phương pháp này chỉ giới hạn ở axit amin ở đầu tận cùng N của peptit hoặc protein.

Theo sáng chế, axit amin không có trong tự nhiên mang các nhóm hyđroxyl và amin liền kề có thể được kết hợp vào polypeptit ở dạng nhóm chức alđehyt "bị chắn". Ví dụ, 5-hyđroxylysin mang nhóm hyđroxyl liền kề với amin ở vị trí epsilon. Các điều kiện phản ứng để tạo ra alđehyt thường bao gồm bước bổ sung lượng dư phân tử gam natri metaperiođat trong các điều kiện nhẹ để tránh oxy hóa ở các vị trí khác trong polypeptit. Độ pH của hỗn hợp phản ứng oxy hóa thường nằm trong khoảng 7,0. Phản ứng điển hình bao gồm bước bổ sung lượng dư khoảng 1,5 mol natri meta periođat vào dung dịch đệm polypeptit, tiếp theo ủ trong khoảng 10 phút trong bóng tối. Xem: ví dụ, patent Mỹ số 6,423,685.

Nhóm chức carbonyl hoặc đicarbonyl có thể phản ứng theo cách chọn lọc với chất phản ứng chứa hyđroxylamin trong các điều kiện nhẹ trong dung dịch nước để tạo ra liên kết oxim tương ứng bền trong các điều kiện sinh lý. Ví dụ, xem: Jencks, W. P., *J. Am. Chem. Soc*, 81, 475-481 (1959); Shao, J. and Tam, J, P., *J. Am. Chem. Soc.* 117:3893-3899 (1995). Hơn thế nữa, hoạt tính phản ứng duy nhất của nhóm carbonyl hoặc đicarbonyl cho phép cải biến chọn lọc với sự có mặt của các chuỗi bên axit amin khác. Ví dụ, xem: Cornish, V. W., et al., *J. Am. Chem. Soc.* 118:8150-8151 (1996); Geoghegan, K. F, & Stroh, J, G, *Bioconjug. Chem.* 3:138-146 (1992); Mahal, L. K., et al., *Science* 276:1125- 1128 (1997).

Cấu trúc và tổng hợp axit amin không có trong tự nhiên: axit amin chứa hyđroxylamin

Đơn yêu cầu cấp Patent Mỹ số 11/316,534 (Công bố số 20060189529) được kết hợp vào sáng chế bằng cách viện dẫn. Do đó, phần bộc lộ được nêu trong Phần V (có tên "axit amin không có trong tự nhiên"), phần B (có tên "Cấu trúc và tổng hợp các axit amin không có trong tự nhiên: axit amin chứa hyđroxylamin"), trong đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 11/316,534 (Công bố số 20060189529) áp dụng đầy đủ các phương pháp, các dược phẩm (chứa hợp chất có Công thức I-XXXV), các phương pháp và chiến lược để tạo ra, tinh chế, mô tả đặc tính, và bằng cách sử dụng axit amin không có trong tự nhiên, các polypeptit chứa axit amin không có trong tự nhiên và các polypeptit chứa axit amin không có trong tự nhiên đã được cải biến được bộc lộ trong bản mô tả này ở mức độ như thể đã được bộc lộ đầy đủ trong bản mô tả này. Toàn bộ nội dung của công bố đơn yêu cầu cấp

Patent Mỹ số 2006/0194256, 2006/0217532, và 2006/0217289 và WO 2006/069246 có tên "Dược phẩm chứa, các phương pháp, và sử dụng axit amin không có trong tự nhiên và các polypeptit", cũng được kết hợp vào sáng chế bằng cách viện dẫn.

Tổng hợp hóa học các axit amin

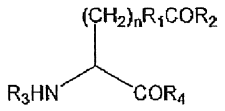
Nhiều axit amin trong số các axit amin không có trong tự nhiên thích hợp để sử dụng trong sáng chế có thể mua được trên thị trường, ví dụ, từ Sigma (USA) hoặc Aldrich (Milwaukee, WI, USA). Các axit amin không có trong tự nhiên mà không có bán trên thị trường tùy ý được tổng hợp như theo sáng chế hoặc như được nêu trong các công bố khác nhau hoặc bằng cách áp dụng các phương pháp tiêu chuẩn mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này đã biết. Đối với các phương pháp tổng hợp hữu cơ, ví dụ xem: *Organic Chemistry* của Fessendon and Fessendon, (1982, Second Edition, Willard Grant Press, Boston Mass.); *Advanced Organic Chemistry* của March (Third Edition, 1985, Wiley and Sons, New York); và *Advanced Organic Chemistry* của Carey and Sundberg (Third Edition, Parts A and B, 1990, Plenum Press, New York). Các công bố khác mô tả quy trình tổng hợp các axit amin không có trong tự nhiên bao gồm, ví dụ, WO 2002/085923 có tên "Kết hợp các axit amin không có trong tự nhiên *in vivo*;" Matsoukas et al. (1995) *J. Med. Chem.*, 38, 4660-4669; King, F.E. & Kidd, D.A.A. (1949) *A New Synthesis of Glutamin and of y-Dipeptides of Axit glutamic from Phthylated Intermediates. J. Chem. Soc.*, 3315-3319; Friedman, O.M. & Chatterrji, R. (1959) *Synthesis of Derivatives of Glutamin as Model Substrates for Anti-Tumor Agents. J. Am. Chem. Soc.* 81, 3750-3752; Craig, J.C. et al. (1988) *Absolute Configuration of the Enantiomers of 7-Chloro-4[[4-(diethylamino)-l-methylbutyl]amino]quinoline (Chloroquine). J. Org. Chem.* 53, 1167-1170; Azoulay, M., Vilmont, M, & Frappier, F. (1991) *Glutamin analogues as Potential Antimalarials, Eur. J. Med. Chem.* 26, 201-5; Koskinen, A.M.P. & Rapoport, H.*Synthesis of 4-Substituted Prolins as Conformationally Constrained Amino Acid Analogues. J. Org. Chem.* 54, 1859-1866; Christie, B.D. & Rapoport, H. (1985) *Synthesis of Optically Pure Pipecolates from L-Asparagin. Application to the Total Synthesis of (+)- Apovincamin through Amino Acid Decarbonylation and Iminium Ion Cyclization. J. Org. Chem.* 50:1239-1246; Barton et al., (1987) *Synthesis of Novel alpha-Amino-Acids and Derivatives Using Radical*

Chemistry: Synthesis of L- and D-alpha-Amino-Adipic Acids, L-alpha-aminopimelic Acid and Appropriate Unsaturated Derivatives. Tetrahedron 43:4297- 4308; và, Subasinghe et al., (1992) *Quisqualic acid analogues: synthesis of beta-heterocyclic 2-aminopropanoic acid derivatives and their activity at a novel quisqualate-sensitized site. J. Med. Chem.* 35:4602-7. Xem cả công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số US 2004/0198637 có tên "Protein Arrays" được kết hợp vào sáng chế bằng cách viện dẫn.

A. Các nhóm phản ứng carbonyl

Các axit amin với nhóm phản ứng carbonyl cho phép nhiều loại phản ứng liên kết các phân tử (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, PEG hoặc các phân tử hòa tan trong nước) nhờ các phản ứng cộng ái nhân hoặc ngưng tụ alđol giữa chúng.

Ví dụ về các axit amin chứa carbonyl có thể có công thức sau:



trong đó n bằng 0 đến 10; R_1 là alkyl, aryl, alkyl được thế, hoặc aryl được thế; R_2 là H, alkyl, aryl, alkyl được thế, và aryl được thế; và R_3 là H, axit amin, polypeptit, hoặc nhóm cải biến đầu tận cùng amino, và R_4 là H, axit amin, polypeptit, hoặc nhóm cải biến đầu tận cùng carboxy. Theo một số phương án, n bằng 1, R_1 là phenyl và R_2 là alkyl mạch thẳng (tức là metyl, etyl, hoặc propyl) và gốc keton nằm ở vị trí para so với chuỗi bên alkyl. Theo một số phương án, n bằng 1, R_1 là phenyl và R_2 là alkyl mạch thẳng (tức là metyl, etyl, hoặc propyl) và gốc keton nằm ở vị trí meta so với chuỗi bên alkyl.

Quy trình tổng hợp p-axetyl-(+/-)-phenylalanin và m-axetyl-(+/-)-phenylalanin được bộc lộ trong: Zhang, Z., et al., *Biochemistry* 42: 6735-6746 (2003), mà được kết hợp vào sáng chế bằng cách viện dẫn. Các axit amin khác chứa carbonyl có thể được điều chế theo cách tương tự bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này.

Theo một số phương án, polypeptit chứa axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên được cải biến hóa học để tạo ra nhóm phản ứng carbonyl. Ví dụ, nhóm chức dùng cho các phản ứng tiếp hợp có thể được tạo ra từ nhóm chức có các nhóm amino và hyđroxyl liền kề. Khi phân tử có hoạt tính sinh học là polypeptit, ví dụ, thì serin hoặc

threonin ở đầu tận cùng N (mà có thể thường có mặt hoặc có thể được để lộ ra bằng cách phân hủy hóa học hoặc phân hủy bằng enzym) có thể được sử dụng để tạo ra nhóm chức trong các điều kiện phân cắt oxy hóa nhẹ bằng cách sử dụng periođat. Ví dụ, xem: Gaertner, et al., *Bioconjug. Chem.* 3: 262-268 (1992); Geoghegan, K. & Stroh, J, *Bioconjug. Chem.* 3:138-146 (1992); Gaertner et al., *J. Biol Chem*, 269:7224-7230 (1994). Tuy nhiên, các phương pháp đã biết trong lĩnh vực phương pháp này chỉ giới hạn ở axit amin ở đầu tận cùng N của peptit hoặc protein.

Theo sáng chế, axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên mang các nhóm hyđroxyl và amin liền kề có thể được kết hợp vào polypeptit dưới dạng nhóm chức bị "chắn". Ví dụ, 5-hyđroxylysin mang nhóm hyđroxyl liền kề với amin ở vị trí epsilon. Các điều kiện phản ứng để tạo ra alđehyt thường bao gồm bước bổ sung lượng dư phân tả gam natri metaperiođat trong các điều kiện nhẹ để tránh oxy hóa ở các vị trí khác trong polypeptit. Độ pH của phản ứng oxy hóa thường là khoảng 7,0. Phản ứng điển hình bao gồm bước bổ sung lượng dư khoảng 1,5mol natri meta periođat vào dung dịch đệm polypeptit, tiếp theo ủ trong khoảng 10 phút trong bóng tối. Xem: ví dụ, patent Mỹ số 6,423,685, mà được kết hợp vào sáng chế bằng cách viện dẫn.

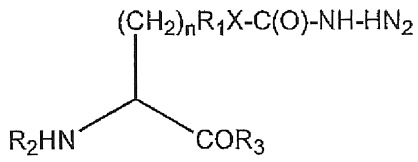
Nhóm chức carbonyl có thể phản ứng theo cách chọn lọc với chất phản ứng chứa hyđrazin, hyđrazit, hyđroxylamin, hoặc semicarbazit trong các điều kiện nhẹ trong dung dịch nước để lần lượt tạo ra các liên kết hyđrazon, oxim, hoặc semicarbazon, bền trong các điều kiện sinh lý. Ví dụ, xem: Jencks, W. P., *J. Am. Chem. Soc.* 81, 475-481 (1959); Shao, J. and Tam, J. P., *J. Am. Chem. Soc.* 117:3893-3899 (1995). Hơn thế nữa, hoạt tính phản ứng duy nhất của nhóm carbonyl cho phép cải biến chọn lọc với sự có mặt của các chuỗi bên axit amin khác. Ví dụ, xem: Cornish, V. W., et al., *J. Am. Chem. Soc.* 118:8150-8151 (1996); Geoghegan, K. F. & Stroh, J. G., *Bioconjug. Chem.* 3:138-146 (1992); Mahal, L. K. et al., *Science 2*76:1125-1128 (1997).

Nhóm phản ứng hyđrazin, hyđrazit hoặc semicarbazit

Các axit amin được mã hóa không có trong có trong tự nhiên chứa nhóm ái nhân, như hyđrazin, hyđrazit hoặc semicarbazit, cho phép phản ứng với nhiều loại nhóm ái điện tử để tạo ra các thể tiếp hợp (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, PEG hoặc các polyme

hòa tan trong nước khác).

Ví dụ về các axit amin chứa hyđrazin, hyđrazit hoặc semicarbazit có thể có công thức sau:



trong đó n bằng 0 đến 10; R_1 là alkyl, aryl, alkyl được thế, hoặc aryl được thế hoặc không có mặt; X là O, N, hoặc S hoặc không có mặt; R_2 là H, axit amin, polypeptit, hoặc nhóm cải biến đầu tận cùng amino, và R_3 là H, axit amin, polypeptit, hoặc nhóm cải biến đầu tận cùng carboxy.

Theo một số phương án, n bằng 4, R_1 không có mặt, và X là N. Theo một số phương án, n bằng 2, R_1 không có mặt, và X không có mặt. Theo một số phương án, n bằng 1, R_1 là phenyl, X là O, và nguyên tử oxy nằm ở vị trí para so với nhóm alpha trên nhân aryl này.

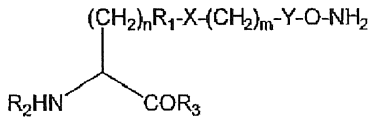
Các axit amin chứa hyđrazit, hyđrazin, và semicarbazit mua được từ các nguồn thương mại. Ví dụ, L-glutamat-□-hyđrazit mua được từ Sigma Chemical (St. Louis, MO). Các axit amin khác không có bán trên thị trường có thể được điều chế bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Ví dụ, xem: patent Mỹ số 6,281,211, mà được kết hợp vào sáng chế bằng cách viện dẫn.

Các polypeptit chứa axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên mang nhóm chức hyđrazit, hyđrazin hoặc semicarbazit có thể phản ứng hữu hiệu và chọn lọc với nhiều loại phân tử chứa alđehyt hoặc các nhóm chức khác có khả năng phản ứng hóa học tương tự. Ví dụ, xem: Shao, J. and Tam, J., *J. Am. Chem. Soc.* 117:3893-3899 (1995). Hoạt tính phản ứng duy nhất của các nhóm chức hyđrazit, hyđrazin và semicarbazit khiến cho chúng có khả năng phản ứng với alđehyt, keton và các nhóm ái điện tử khác cao hơn đáng kể so với các nhóm ái nhân hiện có trong 20 axit amin thông thường (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, nhóm hyđroxyl bao gồm serin hoặc threonin hoặc các nhóm amin của lysin và đầu tận cùng N).

Các axit amin chứa aminooxy

Các axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên chứa nhóm aminooxy (còn được gọi hyđroxylamin) cho phép phản ứng với nhiều loại nhóm ái điện tử để tạo ra các thể tiếp hợp (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, thể tiếp hợp với PEG hoặc các polyme hòa tan trong nước khác). Tương tự như hyđrazin, hyđrazit và semicarbazit, độ ái nhân gia tăng của nhóm aminooxy cho phép nó phản ứng một cách hữu hiệu và chọn lọc với nhiều loại phân tử chứa alđehyt hoặc các nhóm chức khác có khả năng phản ứng hóa học tương tự. Ví dụ, xem: Shao, J, và Tam, J., *J. Am. Chem. Soc.* 117:3893-3899 (1995); H. Hang and C. Bertozzi, *Acc. Chem. Res.* 34: 727-736 (2001). Tuy nhiên, trong khi phản ứng với nhóm hyđrazin ddeer tạo ra hyđrazon tương ứng, oxim nhìn chung được tạo ra từ phản ứng của nhóm aminooxy với nhóm chứa carbonyl như keton.

Ví dụ về các axit amin chứa nhóm aminooxy có thể có công thức sau:



trong đó n bằng 0 đến 10; R_1 là alkyl, aryl, alkyl đã được thể hoặc aryl đã được thế hoặc không có mặt; X là O, N, S hoặc không có mặt; m bằng 0 đến 10; Y = C(O) hoặc không có mặt; R_2 là H, axit amin, polypeptit, hoặc nhóm cải biến đầu tận cùng amino, và R_3 là H, axit amin, polypeptide, hoặc nhóm cải biến có đầu tận cùng carboxy. Theo một số phương án, n bằng 1, R_1 là phenyl, X là O, m bằng 1, và Y có mặt. Theo một số phương án, n bằng 2, R_1 và X không có mặt, m bằng 0, và Y không có mặt.

Các axit amin chứa aminooxy có thể được điều chế từ các tiền chất axit amin đã có sẵn (homoserin, serin và threonin). Ví dụ, xem: M. Carrasco and R. Brown, *J. Org. Chem.* 68: 8853-8858 (2003). Các axit amin nhất định chứa aminooxy, như axit L-2-amino-4-(aminooxy)butyric), đã tách được từ các nguồn tự nhiên (Rosenthal, G., *Life Sci*, 60: 1635-1641 (1997). Các axit amin chứa aminooxy khác có thể được điều chế bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này.

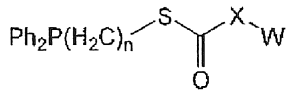
Nhóm phản ứng azit và alkyn

Hoạt tính phản ứng duy nhất của các nhóm chức azit và alkyn khiến cho chúng cực kỳ hữu ích để cải biến theo cách chọn lọc các polypeptit và các phân tử sinh học khác. Các azit hữu cơ, đặc biệt là azit alpha, và alkyn thường bền trong các điều kiện phản ứng hóa học thông thường. Cụ thể là, cả hai nhóm chức azit và alkyn đều trơ đối với chuỗi bên (tức là các nhóm R) của 20 axit amin thông thường được tìm thấy trong các polypeptit có trong tự nhiên. Tuy nhiên, khi được đưa vào rất gần, bản chất "lò xo" của các nhóm azit và alkyn bộc lộ và chúng phản ứng theo cách chọn lọc và hữu hiệu nhờ phản ứng cộng [3+2] xyclo Huisgen để tạo ra triazol tương ứng. Ví dụ, xem: Chin J. et al., *Science* 301:964-7 (2003); Wang, Q. et al., *J. Am. Chem. Soc.* 125, 3192-3193 (2003); Chin, J. W. et al., *J. Am. Chem. Soc.* 124:9026- 9027 (2002).

Do phản ứng cộng xyclo Huisgen bao gồm phản ứng cộng xyclo chọn lọc (xem tài liệu: ví dụ, Padwa, A., trong *Comprehensive Organic Synthesis*, Vol, 4, (ed. Trost, B, M., 1991), p, 1069-1109; Huisgen, R. trong *1,3-dipolar Cycloaddition Chemistry*, (ed, Padwa, A., 1984), p. 1-176) hơn là phản ứng thế ái nhân, sự kết hợp của axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên mang chuỗi bên chứa azit và alkyn cho phép các polypeptit thu được được cải biến theo cách chọn lọc ở vị trí của axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên. Phản ứng cộng xyclo bao gồm polypeptit relaxin chứa azit hoặc alkyn có thể được tiến hành ở nhiệt độ phòng trong điều kiện có nước bằng cách bổ sung Cu(II) (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, ở dạng một lượng chất xúc tác $CuSO_4$) với sự có mặt của các tác nhân khử để khử Cu(II) thành Cu(I), tại chỗ, với lượng xúc tác. Ví dụ, xem: Wang, Q., et al., *J. Am. Chem. Soc.* 125, 3192-3193 (2003); Tornoe, C. W., et al., *J. Org. Chem.* 67:3057-3064 (2002); Rostovtsev, et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* 41:2596-2599 (2002). Ví dụ về các tác nhân khử bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, ascorbat, đồng kim loại, quinin, hyđroquinon, vitamin K, glutathion, xystein, Fe^{2+}, Co^{2+}, và một điện thế ứng dụng.

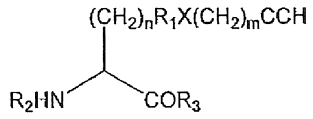
Trong một số trường hợp, nếu muốn có phản ứng cộng [3+2] xyclo Huisgen giữa một azit và một alkyn, polypeptit relaxin chứa axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên này chứa một gốc alkyn và polyme hòa tan trong nước để gắn vào axit amin chứa gốc azit này. Theo cách khác, phản ứng nghịch (tức là với gốc azit trên axit amin và gốc alkyn trên polyme hòa tan trong nước) còn có thể được thực hiện.

Nhóm chức azit còn có thể phản ứng theo cách chọn lọc với polyme hòa tan trong nước chứa thioeste và chức hóa một cách thích hợp với gốc aryl phosphin để tạo ra liên kết amit. Nhóm aryl phosphin khử azit tại chỗ và tiếp theo amin thu được phản ứng một cách hữu hiệu với liên kết thioeste để tạo ra amit tương ứng. Ví dụ về các polyme hòa tan trong nước chứa thioeste và gốc phosphin có thể có công thức sau:



trong đó n bằng 1 đến 10; X có thể là O, N, S hoặc không có mặt, Ph là phenyl, và W là polyme hòa tan trong nước.

Ví dụ về các axit amin chứa alkyn có thể có công thức sau:

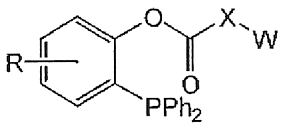


trong đó n bằng 0 đến 10; R_1 là alkyl, aryl, alkyl được thế, hoặc aryl được thế hoặc không có mặt; X là O, N, S hoặc không có mặt; m bằng 0 đến 10, R_2 là H, axit amin, polypeptit, hoặc nhóm cải biến đầu tận cùng amino, và R_3 là H, axit amin, polypeptit, hoặc nhóm cải biến đầu tận cùng carboxy. Theo một số phương án, n bằng 1, R_1 là phenyl, X không có mặt, m bằng 0 và gốc axetylen nằm ở vị trí para so với chuỗi bên alkyl. Theo một số phương án, n bằng 1, R_1 là phenyl, X là O, m bằng 1 và nhóm propargyloxy nằm ở vị trí para so với chuỗi bên alkyl (tức là O-propargyl-tyrosin). Theo một số phương án, n bằng 1, R_1 và X không có mặt và m bằng 0 (tức là proparylglyxin).

Các axit amin chứa alkyn có thể mua được trên thị trường. Ví dụ, propargylglyxin có thể mua được từ Peptech (Burlington, MA). Theo cách khác, các axit amin chứa alkyn có thể được điều chế theo các phương pháp tiêu chuẩn. Ví dụ, p-propargyloxyphenylalanin có thể được tổng hợp, ví dụ, như đã được bộc lộ trong Deiters, A., et al., *J. Am, Chem. Soc.* 125: 11782-11783 (2003), và 4-alkynyl-L-phenylalanin có thể được tổng hợp như đã được bộc lộ trong: Kayser, B., et al., *Tetrahedron* 53(7): 2475-2484 (1997). Các axit amin chứa alkyn khác có thể được điều chế bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này.

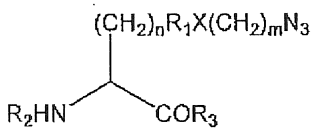
Nhóm chức azit còn có thể được cho phản ứng theo cách chọn lọc với polyme hòa tan trong nước chứa aryl este và tạo chức thích hợp với gốc aryl phosphin để tạo ra liên kết amit. Nhóm aryl phosphin khử azit tại chỗ và tiếp theo amin thu được phản ứng một cách hữu hiệu với liên kết este ở đầu gần để tạo ra amit tương ứng. Xem: tài liệu: E. Saxon and C. Bertozzi, *Science* 287, 2007-2010 (2000) chẳng hạn. Axit amin chứa azit có thể là alkyl azit (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, axit 2- amino-6-aziđo-l-hexanoic) hoặc aryl azit (p-aziđo-phenylalanin).

Ví dụ về các polyme hòa tan trong nước chứa aryl este và gốc phosphin có thể có công thức sau:



trong đó X có thể là O, N, S hoặc không có mặt, Ph là phenyl, W là polyme hòa tan trong nước và R có thể là H, các nhóm alkyl, aryl, alkyl đã được thế và aryl đã được thế. Ví dụ về các nhóm R bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, $-CH_2$, $-C(CH_3)_3$, $-OR_1$, -NR'R", -SR', -halogen, -C(O)R', - CONR'R", $-S(O)_2R'$, $-S(O)_2NR'R"$, -CN và $-NO_2$. R', R", R'" và R"" mỗi nhóm độc lập được sử dụng trong bản mô tả để chỉ hyđro, heteroalkyl được thế hoặc không được thế, aryl được thế hoặc không được thế, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, aryl được thế bằng 1-3 halogen, alkyl được thế hoặc không được thế, các nhóm alkoxy hoặc thioalkoxy, hoặc các nhóm arylalkyl. Khi hợp chất theo sáng chế chứa nhiều hơn một nhóm R, ví dụ, thì mỗi nhóm R độc lập được chọn như từng nhóm R', R", R'" và R"" khi có mặt nhiều hơn một nhóm trong số các nhóm này. Khi R' và R" được gắn vào cùng nguyên tử nitơ, thì chúng có thể được kết hợp với nguyên tử nitơ để tạo ra vòng có 5, 6, hoặc 7 cạnh. Ví dụ, -NR'R" có nghĩa bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, 1-pyroliđinyl và 4-morpholinyl. Từ phần bàn luận trên đây về các phần tử thế, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này cần phải nhận thấy rằng thuật ngữ "alkyl" được dự tính bao gồm các nhóm bao gồm nguyên tử cacbon liên kết với các nhóm khác không phải nhóm hyđro, như haloalkyl (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, $-CF_3$ và CH_2CF_3) và axyl (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, - $C(O)CH_3$, $-C(O)CF_3$, - $C(O)CH_2OCH_3$) và các nhóm tương tự).

Ví dụ về các axit amin chứa azit có thể có công thức sau:



trong đó, n bằng 0 đến 10; R_1 là alkyl, aryl, alkyl được thế, aryl đã được thế hoặc không có mặt; X là O, N, S hoặc không có mặt; m bằng 0 đến 10; R_2 là H, axit amin, polypeptit, hoặc nhóm cải biến đầu tận cùng amino, và R_3 là H, axit amin, polypeptit, hoặc nhóm cải biến đầu tận cùng carboxy. Theo một số phương án, n bằng 1, R_1 là phenyl, X không có mặt, m bằng 0 và gốc azit nằm ở vị trí para so với alkyl chuỗi bên. Theo một số phương án, n bằng 0 đến 4 và R_1 và X không có mặt, và m=0. Theo một số phương án, n bằng 1, R_1 là phenyl, X là O, m bằng 2 và gốc β-aziđoetoxy nằm ở vị trí para so với chuỗi bên alkyl.

Các axit amin chứa azit mua được từ các nguồn thương mại. Ví dụ, 4-aziđophenylalanin có thể mua được từ Chem-Impex International, Inc. (Wood Dale, IL). Đối với các axit amin chứa azit mà không có bán trên thị trường, nhóm azit có thể được điều chế tương đối dễ dàng bằng cách áp dụng các phương pháp chuẩn mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này đã biết, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, phương pháp đổi chỗ một nhóm rời chuyển thích hợp (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, halogenua, mesylat, tosylat) hoặc bằng cách mở vòng lacton được bảo vệ một cách thích hợp. Ví dụ, xem: *Advanced Organic Chemistry* by March (Third Edition, 1985, Wiley and Sons, New York).

Nhóm phản ứng aminothiol

Hoạt tính phản ứng duy nhất của các nhóm aminothiol được thế ở vị trí beta khiến cho chúng cực kỳ hữu ích để cải biến theo cách chọn lọc các polypeptit và các phân tử sinh học khác chứa các nhóm alđehyt bằng cách tạo ra thiazoliđin. Ví dụ, xem: J. Shao and J. Tam, *J. Am. Chem. Soc.* 1995, 117 (14) 3893-3899. Theo một số phương án, các axit amin aminothiol được thế ở vị trí beta có thể được kết hợp vào các polypeptit relaxin và sau đó được cho phản ứng với các polyme hòa tan trong nước chứa nhóm chức alđehyt này. Theo một số phương án, polyme hòa tan trong nước, thể tiếp hợp chứa dược chất

hoặc tổ hợp dược chất khác có thể được ghép cặp với polypeptit relaxin chứa axit amin aminothiol được thế ở vị trí beta bằng cách tạo ra thiazoliđin.

Các nhóm phản ứng khác

Các nhóm phản ứng và axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên khác, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, para-amino-phenylalanin, có thể được kết hợp vào các polypeptit relaxin theo sáng chế được bộc lộ trong các đơn yêu cầu cấp patent sau mà nội dung của nó được kết hợp vào sáng chế bằng cách viện dẫn: công bố patent Mỹ số 2006/0194256, công bố patent Mỹ số 2006/0217532, công bố patent Mỹ số 2006/0217289, đơn tạm thời yêu cầu cấp patent Mỹ số 60/755,338; đơn tạm thời yêu cầu cấp patent Mỹ số, 60/755,711; đơn tạm thời yêu cầu cấp patent Mỹ số 60/755,018; đơn quốc tế số PCT/US06/49397; WO 2006/069246; đơn tạm thời yêu cầu cấp patent Mỹ số 60/743,041; đơn tạm thời yêu cầu cấp patent Mỹ số 60/743,040; Đơn yêu cầu cấp patent quốc tế số PCT/US06/47822; Đơn tạm thời Mỹ số 60/882,819; đơn tạm thời yêu cầu cấp patent Mỹ số 60/882,500; và đơn tạm thời yêu cầu cấp patent Mỹ số 60/870,594. Các đơn này cũng bàn luận các nhóm phản ứng mà có thể có mặt trong PEG hoặc các polyme khác, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các nhóm hyđroxylamin (aminooxy) để tiếp hợp.

Sự hấp thu các axit amin không có trong tự nhiên bởi tế bào

Sự hấp thu các axit amin không có trong tự nhiên bởi tế bào là một vấn đề thường được coi trọng khi thiết kế và chọn lọc axit amin không có trong tự nhiên, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, việc kết hợp vào protein. Ví dụ, mật độ điện tích cao của các axit amin α ám chỉ rằng các hợp chất này không thấm qua được tế bào. Các axit amin có trong tự nhiên được hấp thu vào tế bào nhân thật nhờ hệ thống vận chuyển dựa trên protein. Có thể thực hiện việc sàng lọc nhanh giúp đánh giá khả năng hấp thu axit amin không có trong tự nhiên, nếu có, bởi tế bào. Ví dụ, xem các thử nghiệm về độc tính trong, ví dụ, công bố patent Mỹ số US 2004/0198637 có tên "Protein Arrays" được kết hợp vào sáng chế bằng cách viện dẫn; và Liu, D.R, & Schultz, P.G. (1999) *Progress toward the evolution of an organism with an expanded genetic code*. PNAS United States 96:4780-4785. Mặc dù mức độ hấp thu dễ dàng được phân tích bằng nhiều thử nghiệm, một lựa

chọn để thiết kế các axit amin không có trong tự nhiên tuân theo chu trình hấp thu tế bào là đề xuất chu trình sinh tổng hợp để tạo ra các axit amin *in vivo*.

Sinh tổng hợp các axit amin không có trong tự nhiên

Nhiều chu trình sinh tổng hợp đã tồn tại trong tế bào để sản sinh các axit amin và các hợp chất khác. Trong khi phương pháp sinh tổng hợp một axit amin cụ thể không có trong tự nhiên có thể không tồn tại trong tự nhiên, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, trong tế bào, sáng chế đề cập đến các phương pháp này. Ví dụ, chu trình sinh tổng hợp các axit amin không có trong tự nhiên tùy ý được tạo ra trong tế bào vật chủ bằng cách bổ sung các enzym mới hoặc cải biến chu trình hiện có trong tế bào chủ. Các enzym mới khác tùy ý là các enzym có trong tự nhiên hoặc các enzym nhân tạo. Ví dụ, quá trình sinh tổng hợp p-aminophenylalanin (như được thể hiện trong phần ví dụ nêu trong WO 2002/085923 có tên "Kết hợp các axit amin không có trong tự nhiên *in vivo*") dựa trên sự bổ sung tổ hợp gồm các enzym đã biết từ các sinh vật khác. Các gen của các enzym này có thể được đưa vào tế bào nhân thật bằng cách biến nạp tế bào với plasmit chứa gen này. Gen này, khi được biểu hiện trong tế bào, tạo ra chu trình tổng hợp hợp chất mong muốn nhờ enzym. Ví dụ về các loại enzym tùy ý được bổ sung được đưa ra trong các ví dụ nêu dưới đây. Các trình tự enzym khác được tìm thấy, ví dụ, trong ngân hàng gen. Các enzym nhân tạo cũng tùy ý được bổ sung vào tế bào theo cùng cách đó. Theo cách này, bộ máy tế bào và nguồn gốc tế bào được điều chỉnh để tạo ra axit amin không có trong tự nhiên.

Sẵn có nhiều phương pháp tổng hợp các enzym mới để sử dụng trong chu trình sinh tổng hợp hoặc để phát triển các chu trình hiện tại. Ví dụ, chu trình tái tổ hợp tái diễn, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, phương pháp được phát triển bởi Maxygen, Inc. (có trên trang web toàn cầu ở maxygen.com), tùy ý được sử dụng để phát triển các enzym và chu trình mới. Ví dụ, xem: Stemmer (1994), *Rapid evolution of protein in vitro by DNA shuffling*, *Nature* 370(4):389-391; và, Stemmer, (1994), *DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: in vitro recombination for molecular evolution*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*., 91:10747-10751. Tương tự, DesignPath™, được phát triển bởi Genencor (có trên trang web toàn cầu ở genencor.com) tùy ý được sử dụng để tạo ra chu trình trao đổi chất, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, chu trình tạo ra O-metyl-L-tyrosin trong tế bào. Công nghệ này tái cấu trúc chu trình hiện có ở sinh vật chủ bằng

cách sử dụng tổ hợp các gen mới, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các gen mà được nhận biết thông qua bộ gen chức năng, và sự khai triển và sắp xếp phân tử. Diversa Corporation (có trên trang web toàn cầu ở diversa.com) cũng đề cập đến công nghệ sàng lọc nhanh chóng các thư viện gen và chu trình gen, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, chu trình tạo ra các chu trình mới.

Nhìn chung, axit amin không có trong tự nhiên thu được từ chu trình sinh tổng hợp được tạo ra theo sáng chế được tạo ra ở nồng độ đủ để sinh tổng hợp một cách hữu hiệu protein, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, lượng tự nhiên trong tế bào, nhưng không phải ở mức đủ để ảnh hưởng đến nồng độ của các axit amin khác hoặc làm cạn kiệt nguồn tài nguyên tế bào. Nồng độ điển hình được tạo ra *in vivo* theo cách này nằm trong khoảng từ 10mM đến 0,05mM. Một khi tế bào được biến nạp với plasmit chứa gen được sử dụng để tạo ra các enzym mong muốn đối với một chu trình cụ thể và một axit amin không có trong tự nhiên được tạo ra, phương pháp chọn lọc *in vivo* tùy ý được sử dụng để tối ưu tiếp quá trình sản xuất axit amin không có trong tự nhiên đối với cả quy trình tổng hợp protein thông qua ribosom và sinh trưởng của tế bào.

Polypeptit chứa axit amin không có trong tự nhiên

Việc kết hợp axit amin không có trong tự nhiên có thể được thực hiện cho nhiều mục đích, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, việc làm thích ứng các thay đổi về cấu trúc và/hoặc chức năng protein, thay đổi kích thước, tính axit, tính ái nhân, liên kết hyđro, tính kỵ nước, khả năng tiếp cận của proteaza với các vị trí đích, hướng đích đến gốc (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, mảng protein), bổ sung phân tử có hoạt tính sinh học, gắn kết polyme, gắn kết đồng vị phóng xạ, điều biến thời gian bán thải trong huyết thanh, điều biến mức độ thấm qua mô (ví dụ, khối u), điều biến hoạt hóa vận chuyển, điều biến tính đặc hiệu hoặc sự phân bố mô, tế bào hoặc tổ chức, điều biến khả năng sinh miễn dịch, điều biến tính kháng proteaza, v.v. Các protein chứa axit amin không có trong tự nhiên có thể có các đặc tính xúc tác hoặc sinh lý gia tăng hoặc thậm chí là mới hoàn toàn. Ví dụ, các đặc tính sau tùy ý được cải biến bằng cách đưa một axit amin không có trong tự nhiên vào protein: tính độc, sự phân bố sinh học, các đặc tính cấu trúc, các đặc tính quang phổ, các đặc tính hóa học và/hoặc quang hóa, khả năng xúc tác, thời gian bán thải (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, thời gian bán thải trong huyết thanh), khả năng

phản ứng với các phân tử khác, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, cộng hóa trị hoặc không cộng hóa trị, và các đặc tính tương tự. Các dược phẩm chứa các protein chứa ít nhất một axit amin không có trong tự nhiên có thể được dùng cho, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các chất trị liệu mới, các chất chẩn đoán, các enzym xúc tác, các enzym công nghiệp, các protein liên kết (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các kháng thể), và bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, nghiên cứu cấu trúc và chức năng protein. Ví dụ, xem: Dougherty, (2000) *Unnatural Amino Acids as Probes of Protein Structure and Function*, *Current Opinion in Chemical Biology*, 4:645-652.

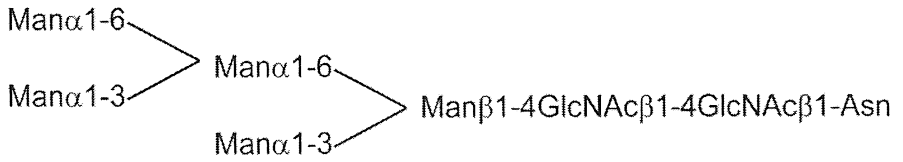
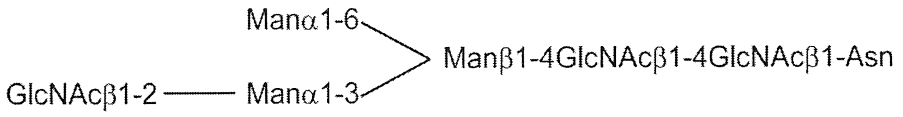
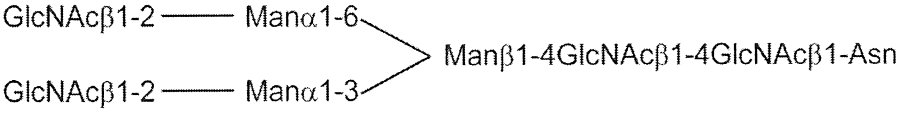
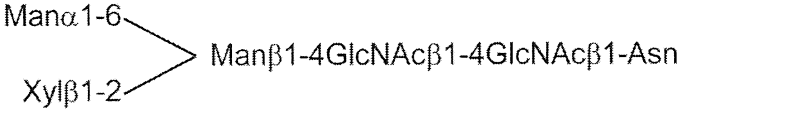
Theo một khía cạnh của sáng chế, chế phẩm chứa ít nhất một protein với ít nhất một, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, ít nhất hai, ít nhất ba, ít nhất bốn, ít nhất năm, ít nhất sáu, ít nhất bảy, ít nhất tám, ít nhất chín, hoặc ít nhất mười hoặc nhiều axit amin không có trong tự nhiên. Các axit amin không có trong tự nhiên này có thể là giống nhau hoặc khác nhau, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, axit amin mà có thể có 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, hoặc 10 hoặc nhiều vị trí khác nhau trong protein chứa 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, hoặc 10 hoặc nhiều axit amin khác nhau không có trong tự nhiên. Theo khía cạnh khác, chế phẩm chứa protein với ít nhất một, nhưng ít hơn toàn bộ, axit amin cụ thể có mặt trong protein được thế bằng axit amin không có trong tự nhiên. Đối với một protein nhất định có nhiều hơn một axit amin không có trong tự nhiên, các axit amin không có trong tự nhiên có thể là giống nhau hoặc khác nhau (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, protein có thể chứa hai hoặc nhiều loại axit amin khác nhau không có trong tự nhiên, hoặc có thể chứa hai axit amin không có trong tự nhiên giống hệt nhau). Đối với một protein nhất định có nhiều hơn hai axit amin không có trong tự nhiên, các axit amin không có trong tự nhiên có thể là giống nhau, khác nhau hoặc là tổ hợp gồm nhiều axit amin không có trong tự nhiên cùng loại với ít nhất một axit amin khác không có trong tự nhiên.

Protein hoặc các polypeptit đáng quan tâm với ít nhất một axit amin không có trong tự nhiên là một dấu hiệu của sáng chế. Sáng chế cũng đề cập đến các polypeptit hoặc các protein với ít nhất một axit amin không có trong tự nhiên được tạo ra bằng cách sử dụng các dược phẩm và các phương pháp theo sáng chế. Tá dược (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, tá dược dược dụng) cũng có thể có mặt với protein này.

Bằng cách tạo ra các protein hoặc các polypeptit đáng quan tâm với ít nhất một

axit amin không có trong tự nhiên ở tế bào nhân thật, các protein hoặc các polypeptit thường có cải biến sau dịch mã ở sinh vật nhân thật. Theo một số phương án, protein chứa ít nhất một axit amin không có trong tự nhiên và ít nhất một cải biến sau dịch mã được tạo ra *in vivo* bởi tế bào nhân thật, khi cải biến sau dịch mã không được tạo ra bởi tế bào nhân sơ. Ví dụ, cải biến sau dịch mã bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, sự axetyl hóa, sự axyl hóa, sự cải biến lipit, sự palmitoyl hóa, sự bổ sung palmitat, sự phosphoryl hóa, sự cải biến liên kết glycolipit, sự glycosyl hoá, và các cải biến tương tự. Theo một khía cạnh, cải biến sau dịch mã bao gồm sự gắn oligosacarit (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, (GlcNAc-Man)2-Man-GlcNAc-GlcNAc)) vào asparagin bằng liên kết GIcNAc-asparagin. Xem Bảng 1 liệt kê một số ví dụ về oligosacarit được liên kết tại N của các protein sinh vật nhân thật (các gốc khác cũng có thể có mặt, nhưng không được chỉ ra). Theo khía cạnh khác, cải biến sau dịch mã bao gồm sự gắn oligosacarit (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, Gal-GalNAc, Gal-GlcNAc, v.v.) vào serin hoặc threonin bởi liên kết GalNAc-serin hoặc GalNAc-threonin , hoặc liên kết GlcNAc-serin hoặc GlcNAc-threonin.

Bảng 1: Ví dụ về oligosacarit thông qua liên kết GLCNAC

Loại	Công thức cấu tạo cơ bản
Manoza bậc cao	
Thể lai	
Phức hợp	
Xyloza	

Theo khía cạnh khác, cải biến sau dịch mã bao gồm việc xử lý phân giải protein của các tiền chất (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, tiền chất canxitonin, tiền chất peptit liên quan đến gen canxitonin, hormon preproparathyroit, preproinsulin, proinsulin, preproopiomelanocortin, pro-opiomelanocortin và các tiền chất tương tự), lắp ráp thành

protein có các dưới đơn vị hoặc tập hợp phân tử lớn, dịch mã thành một vị trí khác trong tế bào (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, thành các hạt cơ quan, như lưới nội chất, thể Golgi, nhân, lysosom, peroxisom, ty thể, lục lạp, không bào, v.v., hoặc thông qua chu trình tiết). Theo một số phương án, protein chứa trình tự tiết hoặc trình tự định vị, nhãn biểu vị, nhãn FLAG, nhãn polyhistiđin, thể dung hợp GST, hoặc các trình tự tương tự.

Một ưu điểm của axit amin không có trong tự nhiên là nó có các gốc hóa học khác có thể được sử dụng để bổ sung các phân tử khác vào. Các cải biến như vậy có thể được tạo ra *in vivo* ở tế bào sinh vật nhân thật hoặc sinh vật không nhân thật, hoặc *in vitro*. Do đó, Theo một số phương án, sự cải biến sau dịch mã có được thông qua axit amin không có trong tự nhiên. Ví dụ, sự cải biến sau dịch mã có thể có được thông qua phản ứng ái nhân-ái điện tử. Hầu hết các phản ứng hiện được sử dụng để cải biến chọn lọc các protein tham gia vào sự tạo ra liên kết cộng hóa trị giữa các thành phần của phản ứng ái nhân và ái điện tử, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, phản ứng của a-haloketon với chuỗi bên histiđin hoặc xystein. Độ chọn lọc trong các trường hợp này được xác định theo số lượng và khả năng tiếp cận của các gốc ái nhân trong protein. Trong các protein theo sáng chế, các phản ứng khác có tính chọn lọc hơn có thể được sử dụng như phản ứng của keto-axit amin không có trong tự nhiên với hyđrazit hoặc các hợp chất aminooxy, *in vitro* và *in vivo*. Ví dụ, xem: Cornish, et al., (1996) *J. Am. Chem. Soc.*, 118:8150-8151; Mahal, et al., (1997) Science, 276:1125-1128; Wang, et al., (2001) Science 292:498-500; Chin, et al., (2002) *J. Am. Chem. Soc.* 124:9026-9027; Chin, et al., (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 99:11020-11024; Wang, et al., (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 100:56- 61; Zhang, et al., (2003) *Biochemistry*, 42:6735-6746; và, Chin, et al., (2003) *Science*, 301:964-7, tất cả được kết hợp vào sáng chế bằng cách viện dẫn. Điều này cho phép gắn nhãn theo cách chọn lọc hầu như protein bất kỳ với tế bào vật chủ của các chất phản ứng bao gồm các nhóm huỳnh quang, các chất liên kết ngang, các dẫn xuất sacarit và các phân tử gây độc tế bào. Xem cả, patent Mỹ số 6,927,042 có tên "Glycoprotein synthesis, được kết hợp vào sáng chế bằng cách viện dẫn. Sự cải biến sau dịch mã, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, sự cải biến thông qua aziđo axit amin, còn có thể được tạo ra thông qua quá trình nối Staudinger (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, với các chất phản ứng triarylphosphin). Ví dụ, xem: Kiick et al., (2002) *Incorporation of azides into recombinant proteins for chemoselective modification by the Staudinger ligation*, PNAS

99:19-24.

Sáng chế đề xuất phương pháp đặc biệt hữu hiệu khác để cải biến chọn lọc protein, bao gồm bước kết hợp một axit amin không có trong tự nhiên, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, axit amin không có trong tự nhiên chứa gốc azit hoặc alkynyl vào các protein để đáp lại bộ ba mã hóa chọn lọc. Sau đó, các chuỗi bên axit amin này có thể được cải biến bởi, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, phản ứng cộng [3+2] xyclo Huisgen (xem: ví dụ, Padwa, A, trong *Comprehensive Organic Synthesis*, Vol. 4, (1991) Ed. Trost, B. M., Pergamon, Oxford, p. 1069-1109; và, Huisgen, R. trong *1,3-dipolar Cycloaddition Chemistry*, (1984) Ed. Padwa, A., Wiley, New York, p. 1-176) lần lượt với, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các dẫn xuất alkynyl hoặc azit. Do phương pháp này bao gồm phản ứng cộng xyclo hơn là thế ái nhân, các protein có thể được cải biến với tính chọn lọc cực cao. Phản ứng này có thể được thực hiện ở nhiệt độ phòng trong các điều kiện có nước với tính chọn lọc vòng tuyệt vời (1,4 > 1,5) bằng cách bổ sung các lượng chất xúc tác chứa các muối Cu(I) vào hỗn hợp phản ứng. Xem: ví dụ, Tornoe, et al., (2002) *J. Org. Chem.* 67:3057-3064; và, Rostovtsev, et al., (2002) *Angew. Chem. Int. Ed.* 41:2596-2599. Một phương pháp khác có thể được sử dụng là trao đổi phối tử trên hợp chất bisarsen với motif tetraxystein, xem, ví dụ: Griffin, et al., (1998) Science 281:269-272.

Phân tử mà có thể được bổ sung vào protein theo sáng chế thông qua phản ứng cộng [3+2] xyclo hầu như là phân tử bất kỳ với dẫn xuất azit hoặc alkynyl. Các phân tử bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, chất nhuộm, các nhóm huỳnh quang, các chất liên kết ngang, các dẫn xuất sacarit, các polyme (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các dẫn xuất của polyetylen glycol), các chất liên kết ngang quang học, các hợp chất gây độc tế bào, nhãn ái lực, các dẫn xuất của biotin, resin, hạt, protein thứ hai hoặc một (hoặc nhiều) polypeptit, các polynucleotit (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, ADN, ARN, v.v.), chất tạo chelat kim loại, đồng yếu tố, các axit béo, hyđrat cacbon, và các phân tử tương tự. Các phân tử này có thể được bổ sung vào axit amin không có trong tự nhiên với nhóm alkynyl, lần lượt bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, nhóm p-propargyloxyphenylalanin, hoặc aziđo, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, p-aziđo-phenylalanin.

Tạo ra *in vivo* các polypeptit relaxin chứa axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên

Các polypeptit relaxin theo sáng chế có thể được tạo ra *in vivo* bằng cách sử dụng ARN vận chuyển và ARN vận chuyển synthetaza được cải biến để bổ sung hoặc thay thế các axit amin không được mã hóa trong các hệ có trong tự nhiên.

Phương pháp tổng hợp ARN vận chuyển và ARN vận chuyển synthetaza mà sử dụng các axit amin không được mã hóa trong hệ thống xuất hiện trong tự nhiên được bộc lộ trong, ví dụ, các patent Mỹ số 7,045,337 và 7,083,970 được kết hợp vào sáng chế bằng cách viện dẫn. Các phương pháp này bao gồm bước tạo ra cơ chế dịch mã hoạt động độc lập về synthetaza và ARN vận chuyển nội sinh với hệ dịch mã (và do đó đôi khi được gọi là "trực giao"). Nhìn chung, hệ dịch mã chứa ARN vận chuyển trực giao (O-ARN vận chuyển) và aminoaxyl ARN vận chuyển synthetaza trực giao (O-RS). Thông thường, O-RS ưu tiên aminoaxyl hóa O-ARN vận chuyển với ít nhất một axit amin không có trong tự nhiên trong hệ dịch mã và O-ARN vận chuyển nhận biết ít nhất một bộ ba mã hóa chọn lọc không được nhận biết bởi các ARN vận chuyển khác trong hệ này. Vì vậy, hệ dịch mã cài xen axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên thành protein được sản sinh trong hệ này, đáp lại bộ ba mã hóa chọn lọc đã được mã hóa, nhờ đó "thay thế" axit amin vào một vị trí trong polypeptit đã được mã hóa.

Rất nhiều ARN vận chuyển và aminoaxyl ARN vận chuyển synthetaza trực giao đã được bộc lộ trong lĩnh vực này để cài xen các axit amin tổng hợp cụ thể vào các polypeptit, và nhìn chung là thích hợp để sử dụng trong sáng chế. Ví dụ, O-tRNA đặc hiệu keto /aminoaxyl-IRNA synthetaza được bộc lộ trong Wang, L., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:56-61 (2003) và Zhang, Z. et al., Biochem. 42(22):6735-6746 (2003). Ví dụ về O-RS, hoặc các phần của chúng, mã hóa bởi các trình tự polynucleotit và bao gồm các trình tự axit amin đã được bộc lộ trong các patent Mỹ số 7,045,337 và 7,083,970, mỗi tài liệu này được kết hợp vào sáng chế bằng cách viện dẫn. Các phân tử O-tRNA tương ứng để dùng với O-RS cũng đã được bộc lộ trong các patent Mỹ số 7,045,337 và 7,083,970 được kết hợp vào sáng chế bằng cách viện dẫn. Các ví dụ khác về các cặp O-ARN vận chuyển/aminoaxyl-ARN vận chuyển synthetaza được bộc lộ trong WO 2005/007870, WO 2005/007624; và WO 2005/019415.

Ví dụ về hệ O-ARN vận chuyển đặc hiệu với azit/aminoaxyl-ARN vận chuyển synthetaza được bộc lộ trong: Chin, J. W., et al., *J. Am. Chem. Soc.* 124:9026-9027 (2002). Ví dụ về các trình tự O-RS đối với p-aziđo-L-Phe bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các trình tự nucleotit SEQ ID NO.14 đến 16 và 29 đến 32 và các trình tự axit amin SEQ ID NO.46 đến 48 và 61 đếm 64 như đã được bộc lộ trong patent Mỹ số 7,083,970 được kết hợp vào sáng chế bằng cách viện dẫn. Ví dụ về các trình tự O-ARN vận chuyển thích hợp để sử dụng trong sáng chế bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các trình tự nucleotit SEQ ID NO.1 đến 3 như đã được bộc lộ trong patent Mỹ số 7,083,970, được kết hợp vào sáng chế bằng cách viện dẫn. Các ví dụ khác về các cặp O-ARN vận chuyển/aminoaxyl-ARN vận chuyển synthetaza đặc hiệu với một axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên cụ thể được bộc lộ trong patent Mỹ số 7,045,337 được kết hợp vào sáng chế bằng cách viện dẫn, O-RS và O-ARN vận chuyển kết hợp cả axit amin chứa keto và azit ở *S. cerevisiae* được bộc lộ trong Chin, J. W., et al., *Science* 301:964-967(2003).

Một vài cặp trực giao khác đã được thông báo. Các hệ glutaminyl (xem: Liu, D. R., và Schultz, P. G. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96:4780-4785), aspartyl (xem: ví dụ, Pastrnak, M., et al., (2000) Helv. Chim. Acta 83:2277-2286), và tyrosyl (xem: ví dụ, Ohno, S., et al., (1998) *J. Biochem.* (Tokyo, Jpn.) 124:1065-1068; và, Kowal, A. K, et al., (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci.* U. S. A. 98:2268-2273) thu được từ ARN vận chuyển và synthetaza của *S. cerevisiae* đã được bộc lộ để kết hợp tiềm năng các axit amin không có trong tự nhiên ở *E. coli*. Hệ glutaminyl (xem tài liệu: ví dụ, Kowal, A. K., et al., (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci.* U. S. A. 98:2268-2273) và tyrosyl (xem: ví dụ, Edwards, H., và Schimmel, P, (1990) *Mol. Cell. Biol.* 10:1633-1641) thu được từ synthetaza *E. coli* đã được bộc lộ để dùng trong *S. cerevisiae*. Hệ tyrosyl trong *E. coli* đã được sử dụng để kết hợp 3-iođo-L-tyrosin *in vivo*, ở tế bào của động vật có vú. Xem: Sakamoto, K., et al., (2002) *Axit nucleics Res.* 30:4692-4699.

Việc sử dụng O-ARN vận chuyển/aminoaxyl-ARN vận chuyển synthetaza bao gồm việc chọn lọc bộ ba mã hóa đặc hiệu mã hóa axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên. Mặc dù bộ ba mã hóa bất kỳ có thể được sử dụng, nhìn chung nên chọn lọc bộ ba mã hóa hiếm gặp khi hoặc không bao giờ được sử dụng trong tế bào, trong đó O-ARN

vận chuyển/aminoaxyl-ARN vận chuyển synthetaza được biểu hiện. Ví dụ, các bộ ba mã hóa làm ví dụ bao có bộ ba mã hóa không đối nghĩa như bộ ba mã hóa kết thúc (amber, ochre, và opal), bộ ba mã hóa gồm bốn hoặc nhiều bazơ và các bộ ba mã hóa khác gồm ba bazơ có trong tự nhiên hiếm khi hoặc không được sử dụng.

Các bộ ba mã hóa chọn lọc đặc hiệu có thể được đưa vào vị trí thích hợp trong trình tự mã hóa relaxin polynucleotit bằng cách áp dụng các phương pháp gây đột biến đã biết trong lĩnh vực phương pháp này (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, phương pháp gây đột biến đặc hiệu vị trí, gây đột biến kết cấu, gây đột biến chọn lọc giới hạn, v.v.).

Phương pháp tổng hợp các thành phần của bộ máy sinh tổng hợp protein, như O-RSs, O-ARN vận chuyển, và các cặp O-ARN vận chuyển/O-RS trực giao có thể được sử dụng để kết hợp axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên được bộc lộ trong: Wang, L., et al., *Science* 292: 498-500 (2001); Chin, J. W, et al., *J. Am. Chem. Soc.* 124:9026-9027 (2002); Zhang, Z. et al., *Biochemistry* 42: 6735-6746 (2003). Các phương pháp và các dược phẩm để kết hợp axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên *in vivo* được bộc lộ trong patent Mỹ số 7,045,337, mà được kết hợp vào sáng chế bằng cách viện dẫn. Các phương pháp chọn lọc cặp ARN vận chuyển-ARN vận chuyển synthetaza trực giao để sử dụng trong hệ dịch mã *in vivo* của một sinh vật cũng đã được bộc lộ trong các patent Mỹ số 7,045,337 và 7,083,970 mà được kết hợp vào sáng chế bằng cách viện dẫn. Công bố đơn PCT số WO04/035743 có tên "*Site Specific Incorporation of Keto Amino Acids into Proteins*", được đưa hoàn toàn vào đây bằng cách viện dẫn, mô tả cặp RS và ARN vận chuyển trực giao để kết hợp keto axit amin, Công bố đơn PCT số WO04/094593 có tên "Expanding the Eukaryotic Genetic Code, mà được đưa hoàn toàn vào đây bằng cách viện dẫn, mô tả cặp RS và ARN vận chuyển trực giao để kết hợp axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên trong các tế bào vật chủ của sinh vật nhân thật.

Phương pháp tổng hợp ít nhất một aminoaxyl-ARN vận chuyển synthetaza (O-RS) tái tổ hợp trực giao bao gồm: (a) phương pháp tạo ra thư viện gồm các RS (tuỳ ý thể đột biến RS) thu được từ ít nhất một aminoaxyl-ARN vận chuyển synthetaza (RS) từ một sinh vật thứ nhất, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, sinh vật nhân sơ, như Methanococcus jannaschii, Methanobacterium thermoautotrophicum, Halobacterium, Escherichia coli, A.

fulgidus, P. furiosus, P. horikoshii, A. pernix, T. thermophilus, hoặc các sinh vật tương tự, hoặc sinh vật nhân thật; (b) phương pháp chọn lọc (và/hoặc sàng lọc) trong thư viện RS (tuỳ ý thể đột biến RS) này các thành phần aminoaxyl hóa ARN vận chuyển trực giao (O-ARN vận chuyển) với sự có mặt của axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên và axit amin có trong tự nhiên, nhờ đó tạo ra hỗn hợp các RS (tuỳ ý thể đột biến RS) có hoạt tính; và/hoặc, (c) chọn lọc (tuỳ ý thông qua chọn lọc âm tính) hỗn hợp các RS có hoạt tính (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, thể đột biến RS) mà ưu tiên aminoaxyl hóa O-ARN vận chuyển với sự không có mặt của axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên, nhờ đó tạo ra ít nhất một O-RS tái tổ hợp; trong đó ít nhất một O-RS tái tổ hợp ưu tiên aminoaxyl hóa O-ARN vận chuyển với axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên.

Theo một phương án, RS là RS không có hoạt tính. RS không có hoạt tính có thể được tạo ra bằng cách đột biến RS có hoạt tính. Ví dụ, RS không có hoạt tính có thể được tạo ra bằng cách đột biến ít nhất khoảng 1, ít nhất khoảng 2, ít nhất khoảng 3, ít nhất khoảng 4, ít nhất khoảng 5, ít nhất khoảng 6, hoặc ít nhất khoảng 10 hoặc nhiều axit amin thành một axit amin khác, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, alanin.

Thư viện các thể đột biến RS có thể được tạo ra bằng cách sử dụng các phương pháp khác nhau đã biết trong lĩnh vực phương pháp này, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, việc thiết kế hợp lý trên cơ sở cấu trúc không gian ba chiều của protein của RS, hoặc gây đột biến các nucleotit của RS theo phương pháp thiết kế ngẫu nhiên hoặc hợp lý. Ví dụ, thể đột biến RS có thể được tạo ra bởi các đột biến đặc hiệu với vị trí, đột biến ngẫu nhiên, đột biến tái tổ hợp tạo ra tính đa dạng, cấu trúc thể khảm, thiết kế hợp lý và bằng các phương pháp khác được bộc lộ trong bản mô tả này hoặc đã biết trong lĩnh vực phương pháp này.

Theo một phương án, chọn lọc (và/hoặc sàng lọc) trong thư viện RS (tuỳ ý thể đột biến RS) các thành phần có hoạt tính, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, aminoaxyl hóa ARN vận chuyển trực giao (O-ARN vận chuyển) với sự có mặt của axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên và axit amin có trong tự nhiên, bao gồm: việc đưa một gen đánh dấu chọn lọc hoặc sàng lọc dương tính, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, gen kháng kháng sinh, hoặc các gen tương tự, và thư viện RS (tuỳ ý thể đột biến RS) vào

nhiều tế bào, trong đó gen đánh dấu chọn lọc và/hoặc sàng lọc dương tính chứa ít nhất một bộ ba mã hóa chọn lọc, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, bộ ba mã hóa amber, bộ ba mã hóa ochre, hoặc bộ ba mã hóa opal; cho nhiều tế bào sinh trưởng với sự có mặt của một chất chọn lọc; nhận biết tế bào sống sót (hoặc thể hiện đáp ứng đặc hiệu) với sự có mặt của chất chọn lọc và/hoặc sàng lọc bằng cách ức chế ít nhất một bộ ba mã hóa chọn lọc trong gen đánh dấu chọn lọc hoặc sàng lọc dương tính, nhờ đó tạo ra phân nhóm gồm tế bào được chọn lọc dương tính chứa hỗn hợp gồm các RS (tuỳ ý thể đột biến RS) có hoạt tính. Tùy ý, nồng độ chất chọn lọc và/hoặc sàng lọc có thể thay đổi.

Theo một khía cạnh, gen đánh dấu chọn lọc dương tính là gen cloramphenicol axetyltransferaza (CAT) và bộ ba mã hóa chọn lọc là bộ ba mã hóa kết thúc amber trong gen CAT. Tùy ý, gen đánh dấu chọn lọc dương tính là gen β-lactamaza và bộ ba mã hóa chọn lọc là bộ ba mã hóa kết thúc amber trong gen β-lactamaza. Theo một khía cạnh khác, gen đánh dấu sàng lọc dương tính bao gồm gen đánh dấu huỳnh quang hoặc sàng lọc phát quang hoặc gen đánh dấu sàng lọc dựa trên ái lực (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, gen đánh dấu bề mặt tế bào).

Theo một phương án, chọn lọc hoặc sàng lọc âm tính hỗn hợp (tuỳ ý thể đột biến) gồm RS có hoạt tính ưu tiên aminoaxyl hóa O-ARN vận chuyển với sự không có mặt của axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên bao gồm: việc đưa gen đánh dấu chọn lọc hoặc sàng lọc âm tính với hỗn hợp gồm RS (tuỳ ý thể đột biến RS) có hoạt tính từ quá trình chọn lọc hoặc sàng lọc dương tính vào nhiều tế bào của sinh vật thứ hai, trong đó gen đánh dấu chọn lọc hoặc sàng lọc âm tính chứa ít nhất một bộ ba mã hóa chọn lọc (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, gen kháng kháng sinh, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, gen cloramphenicol axetyltransferaza (CAT)); và, nhận biết tế bào sống sót hoặc thể hiện đáp ứng sàng lọc đặc hiệu trong môi trường thứ nhất có bổ sung axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên và chất sàng lọc hoặc chọn lọc, nhưng lại không sống sót hoặc thể hiện đáp ứng đặc hiệu trong môi trường thứ hai không được bổ sung axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên và chất chọn lọc hoặc sàng lọc, nhờ đó tạo ra tế bào sống sót hoặc tế bào được sàng lọc với ít nhất một O-RS tái tổ hợp. Ví dụ, CAT xác định quy trình tùy ý hoạt động như quy trình chọn lọc dương tính và/hoặc sàng lọc âm tính để xác định O-RS tái tổ hợp thích hợp. Ví dụ, hỗn hợp gồm các dòng tùy ý được sao chép

trên các đĩa sinh trưởng chứa CAT (chứa ít nhất một bộ ba mã hóa chọn lọc) có hoặc không có một hoặc nhiều axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên. Vì vậy, các khuẩn lạc sinh trưởng có chọn lọc trên các đĩa này chứa axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên được xem là chứa O-RS tái tổ hợp. Theo một khía cạnh, nồng độ của chất chọn lọc (và/hoặc sàng lọc) là thay đổi. Theo một số khía cạnh, sinh vật thứ nhất và thứ hai là khác nhau. Do đó, sinh vật thứ nhất và/hoặc sinh vật thứ hai tùy ý bao gồm: sinh vật không nhân thật, sinh vật nhân thật, động vật có vú, Escherichia coli, nấm, nấm men, archaebacterium, eubacterium, thực vật, côn trùng, sinh vật đơn bào, v.v.. Theo các phương án khác, gen đánh dấu sàng lọc bao gồm gen đánh dấu sàng lọc huỳnh quang hoặc phát quang hoặc gen đánh dấu sàng lọc trên cơ sở ái lực.

Theo phương án khác, việc sàng lọc hoặc chọn lọc (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, việc chọn lọc âm tính) hỗn hợp gồm các RS (tuỳ ý thể đột biến RS) có hoạt tính bao gồm: phân lập hỗn hợp gồm các thể đột biến RS có hoạt tính từ bước chọn lọc dương tính (b); đưa gen đánh dấu chọn lọc hoặc sàng lọc âm tính, trong đó gen đánh dấu chọn lọc hoặc sàng lọc âm tính chứa ít nhất một bộ ba mã hóa chọn lọc (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, gen đánh dấu có tính độc, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, gen ribonucleaza bamaza, chứa ít nhất một bộ ba mã hóa chọn lọc), và hỗn hợp gồm các RS (tuỳ ý thể đột biến RS) có hoạt tính vào nhiều tế bào thuộc sinh vật thứ hai; và nhận biết tế bào sống sót hoặc thể hiện đáp ứng sàng lọc đặc hiệu trong môi trường thứ nhất không được bổ sung axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên, nhưng không sống sót hoặc thể hiện đáp ứng sàng lọc đặc hiệu trong môi trường thứ hai có bổ sung axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên, nhờ đó tạo ra tế bào sống sót hoặc tế bào được sàng lọc với ít nhất một O-RS tái tổ hợp, trong đó ít nhất một O-RS tái tổ hợp là đặc hiệu với axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên. Theo một khía cạnh, ít nhất một bộ ba mã hóa chọn lọc chứa khoảng hai hoặc nhiều bộ ba mã hóa chọn lọc. Các phương án tùy ý có thể bao gồm trong đó ít nhất một bộ ba mã hóa chọn lọc chứa hai hoặc nhiều các bộ ba mã hóa chọn lọc, và trong đó sinh vật thứ nhất và thứ hai là khác nhau (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, mỗi sinh vật tùy ý, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, sinh vật không nhân thật, sinh vật nhân thật, động vật có vú, Escherichia coli, nấm, nấm men, vi khuẩn cổ, Eubacteria, thực vật, côn trùng, sinh vật đơn bào, v.v.). Ngoài ra, có một số khía cạnh bao gồm việc chọn lọc âm tính gen đánh dấu chứa gen ribonucleaza

barnaza (chứa ít nhất một bộ ba mã hóa chọn lọc). Các khía cạnh khác bao gồm gen đánh dấu sàng lọc tùy ý chứa gen đánh dấu sàng lọc huỳnh quang hoặc phát quang hoặc gen đánh dấu sàng lọc dựa trên ái lực. Theo các phương án nêu trong sáng chế, việc sàng lọc và/hoặc chọn lọc tùy ý bao gồm việc thay đổi tính nghiêm ngặt sàng lọc và/hoặc chọn lọc.

Theo một phương án, các phương pháp tổng hợp ít nhất một aminoaxyl-ARN vận chuyển synthetaza tái tổ hợp trực giao (O-RS) còn bao gồm các bước: (d) phân lập ít nhất một O-RS tái tổ hợp; (e) tạo ra một tập hợp O-RS (tuỳ ý được đột biến) thứ hai thu được từ ít nhất một O-RS tái tổ hợp; và, (f) lặp lại các bước (b) và (c) cho đến khi thu được O-RS đọt biến có khả năng ưu tiên aminoaxyl hóa O-ARN vận chuyển. Tùy ý, các bước (d)-(f) được lặp lại, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, ít nhất khoảng hai lần. Theo một khía cạnh, tổ hợp O-RS cải biến thứ hai thu được từ ít nhất một O-RS tái tổ hợp có thể được tạo ra bằng cách gây đột biến, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, cách gây đột biến ngẫu nhiên, gây đột biến đặc hiệu vị trí, tái tổ hợp hoặc kết hợp của chúng.

Tính nghiêm ngặt của các bước chọn lọc/sàng lọc, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, bước chọn lọc /sàng lọc dương tính theo bước (b), chọn lọc/sàng lọc âm tính theo bước (c) hoặc cả bước chọn lọc/sàng lọc dương tính và âm tính theo các bước (b) và (c), trong các phương pháp được mô tả trên đây, tùy ý bao gồm việc thay đổi tính nhiêm ngặt chọn lọc/sàng lọc. Theo phương án khác, bước chọn lọc/sàng lọc dương tính theo bước (b), bước chọn lọc /sàng lọc âm tính theo bước (c) hoặc cả chọn lọc/sàng lọc dương tính và âm tính theo các bước (b) và (c) bao gồm bước sử dụng một gen thông báo, trong đó gen thông báo này được phát hiện bằng cách phân loại tế bào được hoạt hóa phát huỳnh quang (FACS) hoặc trong đó gen thông báo được phát hiện bởi sự phát quang. Tùy ý, gen thông báo này được biểu hiện trên bề mặt tế bào, trên thể thực khuẩn hoặc tương tự và chọn lọc dựa trên ái lực hoặc hoạt tính xúc tác liên quan đến axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên hoặc chất tương tự. Theo một phương án, synthetaza được đột biến được biểu hiện trên bề mặt tế bào, trên thể thực khuẩn hoặc tương tự.

Phương pháp tổng hợp ARN vận chuyển tái tổ hợp trực giao (O-ARN vận chuyển) bao gồm các bước: (a) tạo ra thư viện thể đột biến ARN vận chuyển thu được từ ít nhất một ARN vận chuyển, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, chất chẹn (ức chế) ARN vận chuyển, từ sinh vật thứ nhất; (b) chọn lọc (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở,

chọn lọc âm tính) hoặc sàng lọc trong thư viện này các ARN vận chuyển (tuỳ ý thể đột biến của ARN vận chuyển) được aminoaxyl hóa bởi aminoaxyl-ARN vận chuyển synthetaza (RS) từ sinh vật thứ hai với sự không có mặt của RS từ sinh vật thứ nhất, nhờ đó tạo ra hỗn hợp gồm ARN vận chuyển (tuỳ ý thể đột biến); và, (c) chọn lọc hoặc sàng lọc hỗn hợp gồm ARN vận chuyển (tuỳ ý thể đột biến) để tìm ra các thành phần được aminoaxyl hóa bởi RS trực giao (O-RS) được đưa vào, nhờ đó tạo ra ít nhất một O-ARN vận chuyển tái tổ hợp; trong đó ít nhất một O-ARN vận chuyển tái tổ hợp nhận biết bộ ba mã hóa chọn lọc và không được nhận biết một cách có hiệu quả bởi RS từ sinh vật thứ hai và ưu tiên aminoaxyl hóa bởi O-RS. Theo một số phương án, ít nhất một ARN vận chuyển là chất chẹn (ức chế) ARN vận chuyển và/hoặc chứa một bộ ba mã hóa có ba bazơ duy nhất gồm các bazơ có trong tự nhiên và/hoặc không có trong tự nhiên, hoặc là bộ ba mã hóa không đối nghĩa, bộ ba mã hóa hiếm gặp, bộ ba mã hóa không có trong tự nhiên, bộ ba mã hóa có ít nhất 4 bazơ, bộ ba mã hóa amber, bộ ba mã hóa ochre, hoặc bộ ba mã hóa kết thúc opal. Theo một phương án, O-ARN vận chuyển tái tổ hợp có sự cải tiến về tính trực giao. Có thể thấy được rằng theo một số phương án, O-ARN vận chuyển tùy ý được nhập vào sinh vật thứ nhất từ sinh vật thứ hai không cần phải cải biến. Theo các phương án khác nhau, sinh vật thứ nhất và thứ hai là giống nhau hoặc khác nhau và tùy ý được chọn từ, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, sinh vật không nhân thật (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, *Methanococcus jannaschii*, *Methanobacterium thermoautotrophicum*, *Escherichia coli*, *Halobacterium*, v.v.), sinh vật nhân thật, các động vật có vú, nấm, nấm men, vi khuẩn cổ, *Eubacter*ia, thực vật, côn trùng, sinh vật đơn bào, v.v.. Ngoài ra, ARN vận chuyển tái tổ hợp tùy ý được aminoaxyl hóa bởi axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên, trong đó axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên được tổng hợp sinh học *in vivo* theo cách tự nhiên hoặc thông qua phương pháp di truyền. Axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên tùy ý được bổ sung vào môi trường sinh trưởng cho ít nhất sinh vật thứ nhất hoặc sinh vật thứ hai.

Theo một khía cạnh, việc chọn lọc (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, việc chọn lọc âm tính) hoặc sàng lọc thư viện này để tìm ra ARN vận chuyển (tuỳ ý thể đột biến) được aminoaxyl hóa bởi aminoaxyl-ARN vận chuyển synthetaza (bước (b)) bao gồm: đưa một gen đánh dấu có tính độc, trong đó gen đánh dấu có tính độc này chứa ít nhất một bộ ba mã hóa trong số các bộ ba mã hóa chọn lọc (hoặc gen sản sinh chất độc

hoặc chất tĩnh điện hoặc gen thiết yếu đối với sinh vật này, trong đó gen đánh dấu này chứa ít nhất một bộ ba mã hóa chọn lọc) và thư viện ARN vận chuyển (tuỳ ý thể đột biến ARN vận chuyển) này vào nhiều tế bào từ sinh vật thứ hai; và, chọn lọc tế bào sống sót, trong đó tế bào sống sót chứa hỗn hợp gồm (tuỳ ý thể đột biến) ARN vận chuyển chứa ít nhất một ARN vận chuyển trực giao hoặc ARN vận chuyển không chức năng. Ví dụ, tế bào sống sót có thể được chọn lọc bằng cách sử dụng thử nghiệm so sánh về tỷ lệ mật độ tế bào.

Theo khía cạnh khác, gen đánh dấu có tính độc có thể có hai hoặc nhiều bộ ba mã hóa chọn lọc. Theo phương án khác của các phương pháp này, gen đánh dấu có tính độc là gen ribonucleaza barnaza, trong đó gen ribonucleaza barnaza này chứa ít nhất một bộ ba mã hóa amber, tùy ý, gen ribonucleaza barnaza có thể có hai hoặc nhiều bộ ba mã hóa amber.

Theo một phương án, việc chọn lọc hoặc sàng lọc hỗn hợp gồm (tuỳ ý thể đột biến) ARN vận chuyển để tìm ra các thành phần được amino axyl hóa bởi RS trực giao (O-RS) được đưa vào có thể bao gồm: việc đưa một gen đánh dấu chọn lọc hoặc sàng lọc dương tính, trong đó gen đánh dấu dương tính chứa gen kháng thuốc (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, gen □-lactamaza, chứa ít nhất một bộ ba mã hóa trong số các bộ ba mã hóa chọn lọc, như ít nhất một bộ ba mã hóa kết thúc amber) hoặc gen thiết yếu đối với sinh vật này, hoặc gen khử độc tính của chất có tính độc, cùng với O-RS, và hỗn hợp gồm (tuỳ ý thể đột biến) ARN vận chuyển vào nhiều tế bào từ sinh vật thứ hai; và, nhận biết tế bào sống sót hoặc được sàng lọc sinh trưởng với sự có mặt của chất chọn lọc hoặc sàng lọc, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, thuốc kháng sinh, nhờ đó tạo ra hỗn hợp tế bào có ít nhất một ARN vận chuyển tái tổ hợp, trong đó ít nhất một ARN vận chuyển tái tổ hợp được aminoaxyl hóa bởi O-RS và cài xen một axit amin vào sản phẩm dịch mã được mã hóa bởi gen đánh dấu dương tính, đáp lại ít nhất một bộ ba mã hóa chọn lọc. Theo phương án khác, nồng độ của chất chọn lọc và/hoặc sàng lọc là thay đổi.

Phương pháp tổng hợp cặp O-ARN vận chuyển/O-RS đặc hiệu được đề xuất. Các phương pháp bao gồm các bước: (a) tạo ra thư viện thể đột biến ARN vận chuyển thu được từ ít nhất một ARN vận chuyển từ sinh vật thứ nhất; (b) chọn lọc hoặc sàng lọc âm tính thư viện này để tìm ra (tuỳ ý thể đột biến) ARN vận chuyển được aminoaxyl hóa bởi

aminoaxyl-ARN vận chuyển synthetaza (RS) từ sinh vật thứ hai với sự không có mặt của RS từ sinh vật thứ nhất, nhờ đó tạo ra hỗn hợp (tuỳ ý thể đột biến) ARN vận chuyển; (c) chọn lọc hoặc sàng lọc hỗn hợp gồm (tuỳ ý thể đột biến) ARN vận chuyển để tìm ra các thành phần được aminoaxyl hóa bởi RS (O-RS) trực giao được đưa vào, nhờ đó tạo ra ít nhất một O-ARN vận chuyển tái tổ hợp. Ít nhất một O-ARN vận chuyển tái tổ hợp này nhận biết một bộ ba mã hóa chọn lọc và không được nhận biết một cách có hiệu quả bởi RS từ sinh vật thứ hai và ưu tiên aminoaxyl hóa bởi O-RS. Phương pháp này còn bao gồm các bước: (d) tạo ra thư viện gồm (tuỳ ý thể đột biến) RS thu được từ ít nhất một aminoaxyl-ARN vận chuyển synthetaza (RS) từ sinh vật thứ ba; (e) chọn lọc hoặc sàng lọc thư viện chứa thể đột biến RS này để tìm ra các thành phần ưu tiên aminoaxyl hóa ít nhất một O-ARN vận chuyển tái tổ hợp với sự có mặt của axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên và axit amin có trong tự nhiên, nhờ đó tạo ra hỗn hợp các RS (tuỳ ý thể đột biến RS) có hoạt tính; và, (f) chọn lọc hoặc sàng lọc âm tính hỗn hợp này để tìm ra các RS (tuỳ ý thể đột biến RS) có hoạt tính ưu tiên aminoaxyl hóa ít nhất một O-ARN vận chuyển tái tổ hợp với sự không có mặt của axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên, nhờ đó tạo ra ít nhất một cặp O-ARN vận chuyển/O-RS đặc hiệu, trong đó ít nhất một cặp O-ARN vận chuyển/O-RS đặc hiệu chứa ít nhất một O-RS tái tổ hợp mà đặc hiệu với axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên và ít nhất một O-ARN vận chuyển tái tổ hợp. Các cặp O-ARN vận chuyển/O-RS đặc hiệu được tạo ra theo các phương pháp nằm trong phạm vi của sáng chế. Ví dụ, cặp O-ARN vận chuyển/O-RS đặc hiệu có thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, cặp mutRNATyr-rnutTyrRS, như cặp mutRNATyr-SS12TyrRS, cặp mutRNALeu-mutLeuRS, cặp mutRNAThr-mutThrRS, cặp mutRNAGlu-mutGluRS, hoặc các cặp tương tự. Ngoài ra, các phương pháp này bao gồm phương pháp, trong đó sinh vật thứ nhất và sinh vật thứ ba là giống nhau (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, Methanococcus jannaschii).

Phương pháp chọn lọc cặp ARN vận chuyển-ARN vận chuyển synthetaza trực giao để sử dụng trong hệ dịch mã *in vivo* thuộc sinh vật thứ hai cũng nằm trong phạm vi của sáng chế. Các phương pháp này bao gồm: đưa gen đánh dấu, ARN vận chuyển và aminoaxyl-ARN vận chuyển synthetaza (RS) phân lập được hoặc thu được từ sinh vật thứ nhất vào hỗn hợp thứ nhất gồm các tế bào từ sinh vật thứ hai; đưa gen đánh dấu và ARN vận chuyển này vào hỗn hợp tế bào thứ hai giống hệt từ sinh vật thứ hai; và, chọn lọc tế

bào sống sót trong hỗn hợp thứ nhất mà không sống sót trong hỗn hợp tế bào thứ hai hoặc sàng lọc tế bào thể hiện đáp ứng sàng lọc đặc hiệu mà không tạo ra đáp ứng như vậy trong hỗn hợp tế bào thứ hai giống hệt, trong đó hỗn hợp thứ nhất và hỗn hợp tế bào thứ hai giống hệt được cho sinh trưởng với sự có mặt của chất chọn lọc hoặc sàng lọc, trong đó tế bào sống sót hoặc được sàng lọc chứa cặp ARN vận chuyển trực giao-ARN vận chuyển synthetaza để sử dụng trong hệ dịch mã *in vivo* của sinh vật thứ hai. Theo một phương án, bước so sánh và chọn lọc hoặc sàng lọc bao gồm thử nghiệm bổ trợ *in vivo*. Nồng độ của chất chọn lọc hoặc sàng lọc có thể thay đổi.

Sinh vật theo sáng chế bao gồm nhiều loại sinh vật và nhiều loại hỗn hợp. Ví dụ, Sinh vật thứ nhất và sinh vật thứ hai theo các phương pháp theo sáng chế có thể giống nhau hoặc khác nhau. Theo một phương án, các sinh vật này tùy ý là sinh vật nhân sơ, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, *Methanococcus jannaschii*, *Methanobacterium thermoautotrophicum*, *Halobacterium*, *Escherichia coli*, *A. fulgidus*, *P. furiosus*, *P. horikoshii*, *A. pernix*, *T. thermophilus*, hoặc các sinh vật tương tự. Theo cách khác, sinh vật này tùy ý bao gồm sinh vật nhân thật, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, thực vật (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, thực vật phức hợp như thực vật một lá mầm, hoặc thực vật hai lá mầm), tảo, sinh vật đơn bào, nấm (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, nấm men, v.v.), động vật (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các động vật có vú, côn trùng, động vật chân đốt, v.v.), hoặc các sinh vật tương tự. Theo phương án khác, sinh vật thứ hai là sinh vật nhân sơ, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, *Methanococcus jannaschii*, *Methanobacterium thermoautotrophicum*, *Halobacterium*, *Escherichia coli*, *A. fulgidus*, *Halobacterium*, *P. furiosus*, *P. horikoshii*, *A. pernix*, *T. thermophilus*, hoặc các sinh vật tương tự. Theo cách khác, sinh vật thứ hai có thể là sinh vật nhân thật, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, nấm men, tế bào động vật, tế bào thực vật, nấm mốc, tế bào của động vật có vú, hoặc các sinh vật tương tự. Theo các phương án thứ nhất và thứ hai khác nhau, vi sinh vật là khác nhau.

Vị trí của các axit amin không có trong tự nhiên trong các polypeptit relaxin

Sáng chế dự định kết hợp một hoặc nhiều axit amin không có trong tự nhiên vào các polypeptit relaxin. Một hoặc nhiều axit amin không có trong tự nhiên có thể được kết hợp vào một vị trí cụ thể mà không phá vỡ hoạt tính của polypeptit. Điều này có thể đạt

được bằng cách tạo ra các thay thế "bảo toàn", bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, sự thay thế các axit amin kỵ nước bằng axit amin kỵ nước, các axit amin cồng kềnh cho các axit amin cồng kềnh, các axit amin ưa nước cho ưa nước các axit amin và/hoặc cài xen axit amin không có trong tự nhiên vào vị trí mà không cần thiết đối với hoạt tính.

Nhiều phương pháp sinh hóa và cấu trúc có thể được sử dụng để lựa chọn vị trí mong muốn để thế bằng axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên trong Insulinpolypeptit. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này dễ dàng thấy rõ rằng vị trí bất kỳ trong mạch polypeptit là thích hợp để chọn lọc nhằm kết hợp axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên, và sự chọn lọc có thể dựa trên thiết kế hợp lý hoặc bằng cách chọn lọc ngẫu nhiên theo mục đích bất kỳ hoặc không theo một mục đích mong muốn cụ thể nào. Việc chọn lọc vị trí mong muốn có thể là để tạo ra phân tử relaxin có đặc tính hoặc hoạt tính mong muốn bất kỳ, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các chất chủ vận, chất siêu chủ vận, các chất chủ vận ngược, các chất đối kháng, các chất điều biến việc liên kết thụ thể, các chất điều biến hoạt tính thụ thể, sự hình thành đime hoặc multime, không thay đổi về hoạt tính hoặc đặc tính so với phân tử gốc, hoặc điều chỉnh các đặc tính vật lý hoặc hóa học của polypeptit như độ hòa tan, sự kết tụ, hoặc độ ổn định. Ví dụ, vị trí trong polypeptit cần thiết đối với hoạt tính sinh học của các polypeptit relaxin có thể được xác định bằng cách sử dụng phân tích đột biến điểm, quét alanin, đột biến bão hoà và sàng lọc hoạt tính sinh học, hoặc các phương pháp quét tương đồng đã biết trong lĩnh vực phương pháp này. Các phương pháp khác có thể được sử dụng để xác định gốc cải biến của các polypeptit relaxin bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, phương pháp định hình trình tự (Bowie and Eisenberg, *Science* 253(5016): 164-70, (1991)), phương pháp chọn lọc thư viện rotamer (Dahiyat and Mayo, *Protein Sci* 5(5): 895-903 (1996); Dahiyat and Mayo, *Science* 278(5335): 82-7 (1997); Desjarlais and Handel, *Protein Science* 4: 2006-2018 (1995); Harbury et al., PNAs USA 92(18): 8408-8412 (1995); Kono et al., *Proteins: Structure, Function and Genetics* 19: 244-255 (1994); Hellinga and Richards, PNAs USA 91: 5803-5807 (1994)); và các khả năng cặp của gốc (Jones, *Protein Sci*ence 3: 567-574, (1994)), và thiết kế hợp lý bằng cách áp dụng công nghệ tự động hóa thiết kế protein, (xem các patent Mỹ số 6,188,965; 6,269,312; 6,403,312; WO98/47089, mà được kết hợp vào sáng chế bằng cách viện dẫn). Các gốc quan trọng đối với hoạt tính sinh học relaxin, các gốc tham gia vào độ ổn định của dược phẩm, các

biểu vị kháng thể, hoặc các gốc liên kết thụ thể mà có thể được đột biến. Patent Mỹ số 5,580,723; 5,834,250; 6,013,478; 6,428,954; và 6,451,561, mà được kết hợp vào sáng chế bằng cách viện dẫn, mô tả các phương pháp phân tích hệ thống cấu trúc và chức năng của các polypeptit như relaxin bằng cách nhận biết miền hoạt hóa ảnh hưởng đến hoạt tính của polypeptit với chất đích. Các gốc khác ngoài các gốc được xác định là quan trọng đối với hoạt tính sinh học theo phương pháp gây đột biến quét alanin hoặc quét tương đồng có thể là các gốc tốt đối với việc thế bằng axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên tùy theo hoạt tính mong muốn cần có của polypeptit. Theo cách khác, các vị trí được xác định là quan trọng đối với hoạt tính sinh học còn có thể là những gốc tốt đối với việc thế bằng axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên, cũng tùy theo hoạt tính mong muốn cần có của polypeptit. Theo cách khác nữa, có thể dễ dàng tạo ra hàng loạt các thay thế ở mỗi vị trí trên mạch polypeptit với axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên và quan sát ảnh hưởng đến các hoạt tính của polypeptit. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này cũng sẽ biết rõ rằng phương tiện, phương pháp, hoặc phương pháp bất kỳ để lựa chọn vị trí thế axit amin không có trong tự nhiên vào polypeptit là thích hợp để sử dụng trong sáng chế.

Cấu trúc và hoạt tính của thể đột biến các polypeptit relaxin mà chứa các khuyết đoạn còn có thể được kiểm tra để xác định vùng protein có khả năng chịu được việc thế bằng axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên. Theo cách tương tự, sự phân giải bằng proteaza và các kháng thể đơn dòng có thể được sử dụng để xác định vùng relaxin chịu trách nhiệm về sự gắn kết thụ thể relaxin. Khi các gốc mà có khả năng không chịu được việc thế bằng axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên được loại bỏ, tác động của các phần tử thế được đề xuất ở mỗi vị trí còn lại có thể được kiểm tra. Các mô hình có thể được tạo ra từ các cấu trúc tinh thể ba chiều của các thành phần khác thuộc họ relaxin và các thụ thể relaxin. Ngân hàng dữ liệu protein (Protein Data Bank - PDB, có trên trang web toàn cầu ở rcsb.org) là cơ sở dữ liệu tập trung chứa dữ liệu cấu trúc ba chiều của các phân tử lớn của các protein và axit nucleic. Các mô hình có thể được tạo ra để nghiên cứu cấu trúc bậc hai và bậc ba của các polypeptit, nếu không có dữ liệu cấu trúc ba chiều. Do đó, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể dễ dàng nhận biết vị trí của axit amin có thể được thế bằng axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên.

Chuỗi A relaxin		Khả năng tiếp cận phức hợp dung môi			Mặt phân cách chuỗi A/B		
Gốc	Số thứ tự gốc/SEQ ID NO.1	Gốc trung bình	Mạch chính trung bình	Chuỗi bên trung bình	Gốc trung bình	Mạch chính trung bình	Chuỗi bên trung bình
LEU	2	2,393927	2,336841	2,451013	0,00913	0,018259	0
TYR	3	1,05745	1,412109	0,880121	0,448218	0,164923	0,589865
SER	4	2,039557	1,726208	2,666253	0,094701	0,127334	0,029435
ALA	5	1,47603	1,32887	2,064669	0,040922	0,051152	0
LEU	6	0,520247	0,621696	0,418798	0,174242	0,189235	0,159248
ALA	7	0,476043	0,450361	0,578769	0,512186	0,474717	0,662064
ASN	8	1,252271	0,865912	1,638629	0,32958	0,460124	0,199036
LYS	9	0,886439	0,727133	1,013884	0,424786	0,531522	0,339397
CY5	10	0,307912	0,414588	0,094561	0,731348	0,802621	0,588801
CYS	11	0,791671	0,774527	0,825959	1,267628	1,170385	1,462113
HIS	12	1,644891	1,389182	1,815363	0,902367	0,910146	0,897182
VAL	13	1,432029	1,329367	1,568911	0,865782	1,041144	0,631966
GLY	14	0,721258	0,721258	0	0,814179	0,814179	0
CYS	15	0,405285	0,470822	0,274212	0,79239	0,856379	0,664412
THR	16	0,511268	0,367613	0,702808	1,096358	1,011865	1,209014
LYS	17	0,376592	0,233542	0,491032	2,691742	1,414171	3,713799
ARG	18	0,97893	0,478638	1,264811	1,626733	1,12903	1,911135
SER	19	0,416177	0,424198	0,405482	0,476934	0,49423	0,453873
LEU	20	0,155542	0,267306	0,043778	0,735924	0,711222	0,760627
ALA	21	0,478645	0,507787	0,362075	1,105314	1,045545	1,344386
ARG	22	1,273184	1,102102	1,370945	0,551495	0,572567	0,539454
PHE	23	1,054989	1,153619	0,998629	0,428106	0,829454	0,198764
CYS	24	1,352353	1,506838	1,146374	2,07439	2,22276	1,876563
Chuỗi B relaxin		**Khả năng tiếp cận phức hợp dung môi**			**Mặt phân cách chuỗi A/B**		
Gốc	**Số thứ tự gốc /SEQ ID NO.2**	**Gốc trung bình**	**Mạch chính trung bình**	**Chuỗi bên trung bình**	**Gốc trung bình**	**Mạch chính trung bình**	**chuỗi bên trung bình**
SER	2	2,241497	2,362674	1,999142	1,249697	1,108926	1,531239
TRP	3	1,036157	1,320435	0,922445	0,774516	1,009561	0,680498
MET	4	0,765903	0,783709	0,748097	1,378683	1,318601	1,438766
GLU	5	1,401968	1,102195	1,641786	1,60857	1,38927	1,784009
GLU	6	1,209446	0,935167	1,428869	0,994341	1,251666	0,788481
VAL	7	1,123345	1,08403	1,175766	1,917498	1,613757	2,322484
1LE	8	0,478044	0,594216	0,361873	1,329975	1,726264	0,933686
LYS	9	1,135226	0,723724	1,464427	2,332893	1,427852	3,056925
LEU	10	0,579	0,504927	0,653072	0,906043	1,195675	0,616411
CYS	11	0,862862	0,806072	0,976442	1,030881	0,795964	1,500714
GLY	12	1,089858	1,089858	0	0,604306	0,604306	0
ARG	13	3,079311	1,482092	3,992007	0,024047	0,066128	0
GLU	14	1,46883	0,992251	1,680643	0,137036	0,204496	0,107054
LEU	15	0,378917	0,508368	0,249467	0,743117	0,470105	1,016129
VAL	16	1,018006	0,820163	1,281796	0,279417	0,29034	0,264852
ARG	17	1,660023	0,937977	2,072621	0,048147	0,132403	0
ALA	18	0,51055	0,547669	0,362075	0,379088	0,387335	0,346101
GLN	19	0,436502	0,481692	0,400351	1,12185	0,733873	1,432231
ILE	20	1,321723	0,993689	1,649758	0,294635	0,473331	0,115939

ALA	21	1,001017	0,958569	1,170807	0,362917	0,40431	0,197346
ILE	22	0,381207	0,565133	0,197281	0,689578	0,665212	0,713943
CYS	23	0,888302	0,931778	0,80135	0,782559	0,685197	0,977284
GLY	24	1,608804	1,608804	0	0,25224	0,25224	0
MET	25	1,419412	1,489301	1,349524	0,239722	0,18572	0,293724
SER	26	1,07028	1,249672	0,711497	0,582382	0,433677	0,879791
THR	27	2,199516	2,265998	2,110873	0,228179	0,155968	0,32446
TRP	28	4,74167	3,651826	4,971111	0	0	0

Theo một số phương án, các polypeptit relaxin theo sáng chế chứa một hoặc nhiều axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên nằm trong vùng protein không phá vỡ cấu trúc của polypeptit này.

Các gốc làm ví dụ để kết hợp axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên có thể là các gốc được loại trừ ra khỏi vùng liên kết thụ thể tiềm năng, có thể được cho tiếp xúc hoàn toàn hoặc một phần với dung môi, có tương tác liên kết hyđro tối thiểu hoặc không có tương tác liên kết hyđro với các gốc ở gần, có thể được tiếp xúc tối thiểu với gốc phản ứng ở gần, có thể ở trên một hoặc nhiều bề mặt lộ ra, có thể ở vị trí hoặc các vị trí mà được để cạnh một relaxin thứ hai, hoặc phân tử khác hoặc đoạn của chúng, có thể nằm trong vùng cực kỳ linh hoạt, hoặc cứng nhắc về mặt cấu trúc, như được dự đoán bởi cấu trúc không gian ba chiều, bậc hai, bậc ba, hoặc bậc bốn của relaxin, liên kết hoặc không liên kết với thụ thể của nó, hoặc được ghép cặp hoặc không được ghép cặp với một phân tử có hoạt tính sinh học khác, hoặc có thể điều biến cấu hình của chính relaxin hoặc đime hoặc multime chứa một hoặc nhiều relaxin, bằng cách thay đổi tính linh hoạt hoặc tính cứng nhắc của cấu trúc tổng thể nếu muốn.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này cần phải nhận thấy rằng các phân tích như vậy đối với relaxin cho phép xác định các gốc axit amin được để lộ bề mặt so với các gốc axit amin bị vùi trong cấu trúc bậc ba của protein. Do đó, theo một phương án của sáng chế, axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên thế cho axit amin là gốc được để lộ bề mặt.

Theo một số phương án, một hoặc nhiều axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên được kết hợp vào một hoặc nhiều vị trí sau trong relaxin: trong chuỗi A trước vị trí 1 (tức là ở đầu tận cùng N), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9,10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 (tức là ở đầu tận cùng carboxyl của protein), và tổ hợp bất kỳ của chúng (SEQ ID NO.1) hoặc trong chuỗi B trước vị trí 1 (tức là ở đầu tận cùng N), 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, 31 (SEQ ID NO.2).

Việc kiểm tra cấu trúc tinh thể của relaxin và tương tác của nó với thụ thể relaxin có thể chỉ ra một số gốc axit amin có chuỗi bên có thể có một phần hoặc toàn bộ đi vào dung môi. Chuỗi bên của axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên ở vị trí này có thể hướng ra khỏi bề mặt protein và hướng vào dung môi.

Theo một số phương án, axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên ở một hoặc nhiều vị trí này được liên kết với polyme hòa tan trong nước, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các vị trí: trong chuỗi A trước vị trí 1 (tức là ở đầu tận cùng N), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 (tức là ở đầu tận cùng carboxyl của protein), và tổ hợp bất kỳ của chúng (SEQ ID NO.1) hoặc trong chuỗi B trước vị trí 1 (tức là ở đầu tận cùng N), 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, 31 (SEQ ID NO.2).

Một loạt axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên có thể được thế cho, hoặc được kết hợp vào, một vị trí nhất định trong polypeptit relaxin. Nhìn chung, một axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên cụ thể được chọn lọc để kết hợp polypeptit relaxin hoặc các thành viên khác thuộc họ relaxin hoặc chất tương tự relaxin với thụ thể của nó trên cơ sở kiểm tra cấu trúc tinh thể ba chiều, ưu tiên cho sự thay thế bảo toàn (tức là axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên trên cơ sở aryl, như p-axetylphenylalanin hoặc O-propargyltyrosin thay cho Phe, Tyr hoặc Trp), và hóa học tiếp hợp đặc hiệu mà muốn đưa vào polypeptit relaxin (ví dụ, đưa vào 4-aziđophenylalanin nếu muốn thực hiện phản ứng cộng [3+2] xyclo Huisgen với polyme hòa tan trong nước mang gốc alkyn hoặc muốn tạo ra liên kết amit với polyme hòa tan trong nước mang aryl este, mà tiếp theo aryl este này kết hợp một gốc phosphin).

Theo một phương án, phương pháp này còn bao gồm bước kết hợp axit amin không có trong tự nhiên vào protein, trong đó axit amin không có trong tự nhiên này chứa nhóm phản ứng thứ nhất; và cho protein này tiếp xúc với phân tử (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, nhãn, chất nhuộm, polyme, polyme hòa tan trong nước, dẫn xuất của polyetylen glycol, chất liên kết ngang quang hóa, đồng vị phóng xạ, hợp chất gây độc tế

bào, dược chất, nhãn ái lực, nhãn ái lực quang học, hợp chất phản ứng, nhựa, protein thứ hai hoặc polypeptit hoặc chất tương tự polypeptit, kháng thể hoặc đoạn kháng thể, chất tạo chelat kim loại, đồng yếu tố, axit béo, hyđrat cacbon, polynucleotit, ADN, ARN, polynucleotit đối nghĩa, sacarit, polyme hòa tan trong nước tổng hợp dạng cây, xyclođextrin, axit ribonucleic ức chế, vật liệu sinh học, hạt nano, dấu spin, nhóm huỳnh quang, gốc chứa kim loại, gốc phóng xạ, nhóm chức mới, nhóm tương tác cộng hóa trị hoặc không cộng hóa trị với các phân tử khác, gốc kiểu lồng quang học, gốc dễ bị kích thích bởi sự phóng xạ quang hóa, gốc có khả năng quang đồng phân hóa, biotin, dẫn xuất của biotin, chất tương tự biotin, gốc kết hợp nguyên tử có khối lượng phân tử lớn, nhóm có thể phân cắt hóa học, nhóm có thể phân cắt quang học, chuỗi bên kéo dài, đường liên kết với cacbon, chất hoạt hóa quá trình oxy hóa khử, amino thioaxit, gốc có tính độc , gốc được gắn nhãn đồng vị, đoạn dò sinh lý, nhóm lân quang, nhóm phát quang hóa học, nhóm dày đặc điện tử, nhóm từ tính, nhóm xen giữa, nhóm mang màu, chất vận chuyển năng lượng, chất có hoạt tính sinh học, chất đánh dấu có thể phát hiện được, phân tử nhỏ, chấm lượng tử, chất vận chuyển nano, nucleotit phóng xạ, chất vận chuyển phóng xạ, chất bắt giữ nơtron, hoặc tổ hợp bất kỳ gồm các hợp chất hoặc chất nêu trên, hoặc các hợp chất hoặc chất mong muốn bất kỳ khác) chứa một nhóm phản ứng thứ hai. Nhóm phản ứng thứ nhất phản ứng với nhóm phản ứng thứ hai để gắn phân tử này vào axit amin không có trong tự nhiên thông qua phản ứng cộng [3+2] xyclo. Theo một phương án, nhóm phản ứng thứ nhất là gốc alkynyl hoặc aziđo và nhóm phản ứng thứ hai là gốc aziđo hoặc alkynyl. Ví dụ, nhóm phản ứng thứ nhất là gốc alkynyl (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, axit amin p-propargyloxyphenylalanin không có trong tự nhiên) và nhóm phản ứng thứ hai là gốc aziđo. Theo ví dụ khác, nhóm phản ứng thứ nhất là gốc aziđo (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, axit amin p-aziđo-L-phenylalanin không có trong tự nhiên) và nhóm phản ứng thứ hai là gốc alkynyl.

Trong một số trường hợp, sự thế axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên thay thế) sẽ được kết hợp với các bổ sung, thay thế hoặc khuyết đoạn khác trong polypeptit relaxin để tác động đến các đặc tính sinh học khác của polypeptit relaxin. Trong một số trường hợp, các bổ sung, thay thế hoặc khuyết đoạn khác có thể làm tăng độ ổn định (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, tính kháng phân giải protein quá trình thoái hóa) của polypeptit relaxin hoặc tăng ái lực của polypeptit relaxin đối với thụ thể

của nó. Trong một số trường hợp, các bổ sung, thay thế hoặc khuyết đoạn khác có thể làm tăng độ ổn định của dược phẩm chứa polypeptit relaxin. Trong một số trường hợp, các bổ sung, thay thế hoặc khuyết đoạn khác có thể tăng cường hoạt tính chống virut của polypeptit relaxin. Trong một số trường hợp, các bổ sung, thay thế hoặc khuyết đoạn khác này có thể làm tăng độ hòa tan của polypeptit relaxin (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, khi được biểu hiện ở *E. coli* hoặc các tế bào vật chủ khác). Theo một số phương án, sự bổ sung, thay thế hoặc khuyết đoạn khác có thể làm tăng độ hòa tan polypeptit relaxin sau khi được biểu hiện ở *E. coli* hoặc các tế bào vật chủ tái tổ hợp khác. Theo một số phương án, vị trí được chọn để thế bằng axit amin được mã hóa có trong tự nhiên hoặc axit amin không có trong tự nhiên ngoài một vị trí khác để kết hợp một axit amin không có trong tự nhiên mà để gia tăng độ hòa tan của polypeptit sau khi biểu hiện ở *E. coli* hoặc các tế bào vật chủ tái tổ hợp khác. Theo một số phương án, các polypeptit relaxin bao gồm một sự bổ sung, thay thế hoặc khuyết đoạn khác điều biến ái lực đối với thụ thể polypeptit relaxin, protein liên kết, hoặc phối tử được kết hợp, điều biến sự tải nạp tín hiệu sau khi liên kết với thụ thể relaxin, điều biến thời gian bán thải trong hệ tuần hoàn, điều biến mức giải phóng hoặc mức độ sinh khả dụng, tạo điều kiện cho việc tinh chế, hoặc cải thiện hoặc thay đổi đường dùng cụ thể. Theo một số phương án, các polypeptit relaxin chứa đoạn bổ sung, đoạn thay thế hoặc khuyết đoạn làm tăng ái lực của biến thể relaxin đối với thụ thể của nó. Tương tự, các polypeptit relaxin có thể chứa trình tự phân cắt hóa học hoặc enzym, trình tự phân cắt proteaza, nhóm phản ứng, miền gắn kết kháng thể (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, FLAG hoặc poly-His) hoặc các trình tự dựa trên ái lực khác (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, FLAG, poly-His, GST, v.v.) hoặc các phân tử được liên kết (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, biotin) cải thiện việc phát hiện (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, GFP), tinh chế, vận chuyển qua mô hoặc màng tế bào, giải phóng hoặc hoạt hóa tiền dược chất, làm giảm kích thước relaxin, hoặc các đặc điểm khác của polypeptit.

Theo một số phương án, sự thế axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên tạo ra chất đối kháng relaxin. Theo một số phương án, axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên được thế hoặc được bổ sung thuộc vùng tham gia vào việc liên kết thụ thể. Theo một số phương án, các chất đối kháng relaxin có ít nhất một thay thế khiến cho relaxin hoạt động như chất đối kháng. Theo một số phương án, chất đối kháng relaxin chứa axit

amin được mã hóa không có trong tự nhiên được liên kết với polyme hòa tan trong nước có mặt trong vùng liên kết thụ thể của phân tử relaxin.

Trong một số trường hợp, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, hoặc nhiều axit amin được thế bằng một hoặc nhiều axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên. Trong một số trường hợp, polypeptit relaxin còn có 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, hoặc nhiều thay thế một hoặc nhiều axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên cho các axit amin có trong tự nhiên. Ví dụ, theo một số phương án, một hoặc nhiều gốc trong relaxin được thế bằng một hoặc nhiều axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên. Trong một số trường hợp, một hoặc nhiều gốc được mã hóa không có trong tự nhiên được liên kết với một hoặc nhiều PEG mạch thẳng hoặc mạch nhánh có khối lượng phân tử thấp hơn, nhờ đó làm gia tăng ái lực liên kết và thời gian bán thải trong huyết thanh tương đương với các gốc đã được gắn vào một PEG duy nhất có khối lượng phân tử lớn hơn.

Theo một số phương án, có đến hai trong số các gốc sau của relaxin được thế bằng một hoặc nhiều axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên.

Sự biểu hiện ở sinh vật nhân sơ và sinh vật nhân thật

Để thu được mức biểu hiện cao của polynucleotit relaxin đã được tách dòng, một polynucleotit relaxin thường được tạo dòng phụ polynucleotit mã hóa polypeptit relaxin theo sáng chế vào vectơ biểu hiện chứa gen khởi đầu bền để điều khiển sự phiên mã, gen kết thúc phiên mã/dịch mã, và nếu axit nucleic mã hóa protein, vị trí liên kết ribosome để khởi đầu sự dịch mã. Các trình tự khởi đầu thích hợp ở vi khuẩn là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này và mô tả, ví dụ, trong tài liệu của Sambrook và đồng tác giả và của Ausubel và đồng tác giả

Hệ biểu hiện ở vi khuẩn để biểu hiện các polypeptit relaxin theo sáng chế là sẵn có trong, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, *E. coli*, *Bacillus sp.*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, và *Salmonella* (Palva et al., *Gene* 22:229-235 (1983); Mosbach et al., *Nature* 302:543-545 (1983)). Các kit dùng cho các hệ biểu hiện này có thể mua được trên thị trường. hệ biểu hiện ở sinh vật nhân thật đối với tế bào của động vật có vú, nấm men, và các tế bào côn trùng là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này và cũng có bán trên thị trường. Trong các

trường hợp khi ARN vận chuyển và aminoaxyl ARN vận chuyển synthetaza trực giao (được mô tả trên đây) được sử dụng để biểu hiện các polypeptit relaxin theo sáng chế, các tế bào vật chủ để biểu hiện được chọn trên cơ sở khả năng sử dụng các thành phần trực giao của chúng. Các tế bào vật chủ làm ví dụ bao gồm vi khuẩn Gram dương (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, *B. brevis*, *B.subtilis*, hoặc *Streptomyces*) và vi khuẩn Gram âm (*E. coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*), cũng như nấm men và các tế bào nhân thật khác. Các tế bào chứa các cặp O-ARN vận chuyển/O-RS có thể được sử dụng như được bộc lộ trong bản mô tả này.

Tế bào vật chủ của sinh vật nhân thật hoặc tế bào vật chủ của sinh vật không nhân thật theo sáng chế có khả năng tổng hợp các protein chứa các axit amin không có trong tự nhiên với số lượng hữu ích lớn. Theo một khía cạnh, dược phẩm này tùy ý chứa, nhưng không chỉ giới hạn ở, ít nhất 10 microgam, ít nhất 50 microgam, ít nhất 75 microgam, ít nhất 100 microgam, ít nhất 200 microgam, ít nhất 250 microgam, ít nhất 500 microgam, ít nhất 1 miligam, ít nhất 10 miligam, ít nhất 100 miligam, ít nhất một gam, hoặc nhiều protein chứa axit amin không có trong tự nhiên, hoặc lượng có thể có được với các phương pháp sản xuất protein *in vivo* (chi tiết về phương pháp sản xuất và tinh chế protein tái tổ hợp được nêu trong bản mô tả này). Theo khía cạnh khác, protein tùy ý có mặt trong dược phẩm này ở nồng độ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, ít nhất 10 microgam protein trong một lít, ít nhất 50 microgam protein trong một lít, ít nhất 75 microgam protein trong một lít, ít nhất 100 microgam protein trong một lít, ít nhất 200 microgam protein trong một lít, ít nhất 250 microgam protein trong một lít, ít nhất 500 microgam protein trong một lít, ít nhất 1 miligam protein trong một lít, hoặc ít nhất 10 miligam protein trong một lít hoặc nhiều hơn, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, dung dịch dung giải tế bào, dung dịch đệm, dung dịch đệm dùng cho dược phẩm, hoặc hỗn dịch lỏng khác (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, trong thể tích bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, thể tích bất kỳ nằm trong khoảng từ 1nl đến 100 l hoặc nhiều hơn). Quy trình sản xuất lượng lớn protein (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, lượng lớn hơn lượng thường có thể sản xuất được bởi các phương pháp khác, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, phương pháp dịch mã *in vitro*) trong tế bào nhân thật chứa ít nhất một axit amin không có trong tự nhiên là một dấu hiệu của sáng chế.

Tế bào vật chủ của sinh vật nhân thật hoặc tế bào vật chủ của sinh vật không nhân thật theo sáng chế tạo ra khả năng sinh tổng hợp các protein chứa các axit amin không có trong tự nhiên với số lượng hữu ích lớn. Ví dụ, các protein chứa axit amin không có trong tự nhiên có thể được tạo ra ở nồng độ, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, ít nhất 10μg/L, ít nhất 50μg/L, ít nhất 75μg/L, ít nhất 100μg/L, ít nhất 200μg/L, ít nhất 250μg/L, hoặc ít nhất 500μg/L, ít nhất 1mg/L, ít nhất 2mg/L, ít nhất 3mg/L, ít nhất 4mg/L, ít nhất 5mg/L, ít nhất 6mg/L, ít nhất 7mg/L, ít nhất 8mg/L, ít nhất 9mg/L, ít nhất 10mg/L, ít nhất 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900mg/L, 1g/L, 5g/L, 10 g/L hoặc nhiều hơn protein trong dịch chiết tế bào, dung dịch dung giải tế bào, môi trường nuôi cấy, dung dịch đệm, và/hoặc các dung dịch tương tự.

Rất nhiều vectơ thích hợp đối với sự biểu hiện của relaxin có thể mua được trên thị trường. Các vectơ biểu hiện hữu hiệu đối với vật chủ nhân thật, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các vectơ chứa các trình tự điều khiển biểu hiện từ SV40, virut gây u nhú ở bò, ađenovirut và xytomegalovirut. Các vectơ này bao gồm pCDNA3.1(+)\Hyg (Invitrogen, Carlsbad, Calif., USA) và pCI-neo (Stratagene, La Jolla, Calif, USA). Plasmit từ vi khuẩn, như các plasmit từ *E. coli*, bao gồm pBR322, pET3a và pET12a, plasmit khoảng vật chủ rộng hơn, như RP4, thể thực khuẩn ADN, ví dụ, nhiều dẫn xuất của thể thực khuẩn lambđa, ví dụ, NM989, và thể thực khuẩn ADN khác, như M13 và thể thực khuẩn ADN sợi đơn mảnh có thể được sử dụng. Plasmit 2μ và các dẫn xuất của chúng, vectơ POT1 (patent Mỹ số 4,931,373 được đưa vào bằng cách viện dẫn), vectơ pJS037 đã được bộc lộ trong (Okkels, *Ann. New York Aced. Sci.* 782, 202 207, 1996) và pPICZ A, B hoặc C (do Invitrogen cung cấp) có thể được sử dụng với các tế bào vật chủ nấm men. Đối với các tế bào côn trùng, các vectơ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, pVL941, pBG311 (Cate et al., "*Isolation of the Bovine and Human Genes for Mullerian Inhibiting Substance and Expression of the Human Gene In Animal Cells*", *Cell*, 45, pp. 685 98 (1986), pBluebac 4.5 và pMelbac (do Invitrogen, Carlsbad, CA cung cấp).

Trình tự nucleotit mã hóa polypeptit relaxin có thể hoặc có thể không còn bao gồm trình tự mà mã hóa peptit tín hiệu. Peptit tín hiệu có mặt khi polypeptit được tiết từ các tế bào trong đó nó được biểu hiện. Peptit tín hiệu như vậy có thể là trình tự bất kỳ. Peptit tín hiệu có thể là từ sinh vật nhân sơ hoặc sinh vật nhân thật. Coloma, M (1992) *J. Imm.*

Methods 152:89 104) mô tả peptit tín hiệu để dùng cho tế bào của động vật có vú (peptit tín hiệu chuỗi nhẹ kappa của Ig ở chuột). Các peptit tín hiệu khác bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, peptit tín hiệu yếu tố α từ *S. cerevisiae* (Patent Mỹ số 4,870,008 mà được kết hợp vào sáng chế bằng cách viện dẫn), peptit tín hiệu của amylaza có trong nước bọt của chuột nhắt (O. Hagenbuchle et al., *Nature* 289, 1981, pp. 643-646), peptit tín hiệu carboxypeptiđaza được cải biến (L. A. Vails et al., *Cell* 48, 1987, pp. 887-897), peptit tín hiệu BARI ở nấm men (WO 87/02670, mà được kết hợp vào sáng chế bằng cách viện dẫn), và peptit tín hiệu aspartic proteaza 3 ở nấm men (YAP3) (xem: M. Egel-Mitani et al., *Yeast* 6,1990, pp. 127-137).

Ví dụ về tế bào vật chủ của động vật có vú thích hợp đã được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này biết rõ. Các tế bào vật chủ như vậy có thể là tế bào buồng trứng (CHO) của chuột đồng , (ví dụ, CHO-K1; ATCC CCL-61), tế bào của khỉ xanh (COS) (ví dụ, COS 1 (ATCC CRL-1650), COS 7 (ATCC CRL-1651)); tế bào của chuột nhắt (ví dụ, NS/O), các dòng tế bào thận của chuột đồng Baby (BHK) (ví dụ, ATCC CRL-1632 hoặc ATCC CCL-10), và tế bào của người (ví dụ, HEK 293 (ATCC CRL-1573)), cũng như tế bào thực vật dùng trong nuôi cấy mô. Các dòng tế bào này và các dòng tế bào khác nhận được từ các cơ quan lưu trữ công cộng như Bộ sưu tập kiểu giống của Mỹ (the American Type Culture Collection, Rockville, Md). Để tạo ra sự glycosyl hoá polypeptit relaxin gia tăng, tế bào vật chủ của động vật có vú có thể được cải biến để biểu hiện sialyltransferaza, ví dụ 1,6-sialyltransferaza, ví dụ đã được bộc lộ trong patent Mỹ số 5,047,335, mà được kết hợp vào sáng chế bằng cách viện dẫn.

Phương pháp đưa ADN ngoại sinh vào các tế bào vật chủ từ động vật có vú bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, chuyển nhiễm qua trung gian canxi phosphat, xung điện, chuyển nhiễm qua trung gian DEAE-đextran, chuyển nhiễm qua trung gian liposom, các vectơ virut và các phương pháp chuyển nhiễm được mô tả bởi Life Technologies Ltd, Paisley, UK bằng cách sử dụng Lipofectamin 2000 và Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, USA bằng cách sử dụng FuGENE 6. Các phương pháp này đã được biết rõ trong lĩnh vực phương pháp này và bộc lộ bởi Ausbel et al. (eds.), 1996, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York, USA. Việc nuôi cấy tế bào của động vật có vú có thể được thực hiện theo các phương pháp đã được thiết lập, ví

dụ đã được bộc lộ trong (*Animal Cell Biotechnology, Methods and Protocols*, Edited by Nigel Jenkins, 1999, Human Press Inc. Totowa, N.J., USA và Harrison Mass. and Rae IF, *General Techniques of Cell Culture*, Cambridge University Press 1997).

Hệ biểu hiện, nuôi cấy, và phân lập

Các polypeptit relaxin có thể được biểu hiện trong số lượng bất kỳ hệ biểu hiện thích hợp bao gồm, ví dụ, nấm men, các tế bào côn trùng, tế bào của động vật có vú, và vi khuẩn. Mô tả về hệ biểu hiện được nêu làm ví dụ được đưa ra dưới đây.

Nấm men: được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ "nấm men" bao gồm nấm men bất kỳ trong số các nấm men khác nhau có khả năng biểu hiện gen mã hóa polypeptit relaxin. Các nấm men như vậy bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, nấm men sinh bào tử nang (*Endomycetales*), nấm men sinh bào tử đảm và nấm men thuộc nhóm *Fungi imperfecti* (*Blastomycetes*). Nấm men sinh bào tử nang được chia thành hai họ, *Spermophthoraceae* và *Saccharomycetaceae*. Họ *Saccharomycetaceae* bao gồm bốn phân họ, *Schizosaccharomycoideae* (ví dụ, chủng *Schizosaccharomyces*), *Nadsonioideae*, *Lipomycoideae* và *Saccharomycoideae* (ví dụ, chủng *Pichia*, *Kluyveromyces* và *Saccharomyces*). Nấm men sinh bào tử đảm bao gồm chủng *Leucosporidium*, *Rhodosporidium*, *Sporidiobolus*, *Filobasidium*, và *Filobasidiella*. Nấm men thuộc nhóm *Fungi imperfecti* (*Blastomycetes*) được chia thành hai họ, *Sporobolomycetaceae* (ví dụ, chủng *Sporobolomyces* và *Bullera*) và *Cryptococcaceae* (ví dụ, chủng *Candida*).

Đặc biệt đáng quan tâm để dùng trong sáng chế là các loài thuộc giống *Pichia*, *Kluyveromyces*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Hansenula*, *Torulopsis*, và *Candida*, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, *P. pastoris*, *P. guillerimondii*, *S. cerevisiae*, *S. carlsbergensis*, *S. diastaticus*, *S. douglasii*, *S. kluyveri*, *S. norbensis*, *S. oviformis*, *K. lactis*, *K. fragilis*, *C. albicans*, *C. maltosa*, và *H. polymorpha*.

Việc chọn lọc nấm men thích hợp để biểu hiện các polypeptit relaxin đã được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này biết rõ. Trong quá trình chọn lọc vật chủ nấm men để biểu hiện, vật chủ thích hợp có thể là các vật chủ thể hiện là có, ví dụ, khả năng tiết tốt, hoạt tính phân giải protein thấp, khả năng tiết tốt, sản sinh protein có đô hòa tan tốt, và hoàn toàn khỏe mạnh. Nấm men thường sẵn có từ nhiều nguồn bao gồm,

nhưng không chỉ giới hạn ở, trung tâm lưu trữ di truyền nấm men, Khoa Sinh lý và y lý thuộc đại học California (Yeast Genetic Stock Center, Department of Biophysics and Medical Physics, University of California (Berkeley, CA), và Bộ sưu tập chủng giống của Mỹ (The American Type Culture Collection ("ATCC") (Manassas, VA)).

Thuật ngữ "vật chủ nấm men" hoặc "tế bào vật chủ nấm men" bao gồm nấm men mà có thể, hoặc đã được, sử dụng làm thể nhận đối với các vectơ tái tổ hợp hoặc các ADN vận chuyển khác. Thuật ngữ này bao gồm thế hệ con của tế bào vật chủ nấm men ban đầu mà đã tiếp nhận các vectơ tái tổ hợp hoặc các ADN vận chuyển khác. Cần hiểu rằng thế hệ con của một tế bào bố mẹ duy nhất có thể không cần phải giống hoàn toàn về mặt hình thái học hoặc về bộ gen hoặc tổng lượng ADN bổ sung cho tế bào bố mẹ ban đầu, do sự đột biến ngẫu nhiên hoặc có chủ ý. Thế hệ con của tế bào bố mẹ mà tương tự một cách thích đáng với tế bào bố mẹ được đặc trưng bởi các đặc tính có liên quan, như sự có mặt của trình tự nucleotit mã hóa polypeptit relaxin, nằm trong phạm vi của sáng chế trong thế hệ con dự định theo định nghĩa này.

Vectơ biểu hiện và biến nạp, kể cả các bản sao ngoài nhiễm sắc thể hoặc vectơ hợp nhất, đã được phát triển để biến nạp vào nhiều vật chủ nấm men. Ví dụ, các vectơ biểu hiện đã được phát triển đối với *S. cerevisiae* (Sikorski et al., GENETICS (1989) 122:19; Ito et al., *J. BACT*ERIOL. (1983) 153:163; Hinnen et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1978) 75:1929); *C. albicans* (Kurtz et al., *Mol. Cell. Biol.* (1986) 6:142); *C. maltosa* (Kunze et al., *J. BASIC MICROBIOL.* (1985) 25:141); *H. polymorpha* (Gleeson, J. et al., GEN. MICROBIOL. (1986) 132:3459; Roggenkamp et al, MOL. GENETICS và GENOMICS (1986) 202:302); *K. fragilis* (Das et al., *J. BACT*ERIOL. (1984) 158:1165); *K. lactis* (De Louvencourt et al., *J. BACT*ERIOL. (1983) 154:737; Van den Berg et al, *Biotechnology* (NY) (1990) 8:135); *P. guillerimondii* (Kunze et al., *J. BASIC MICROBIOL.* (1985) 25:141); *P. pastoris* (patent Mỹ số 5,324,639; 4,929,555; và 4,837,148; Cregg et al., *Mol. Cell. Biol.* (1985) 5:3376); *Schizosaccharomyces* pombe (Beach et al, *Nature* (1982) 300:706); và *Y. lipolytica*; *A. nidulans* (Ballance et al., *BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN.* (1983) 112:284-89; Tilburn et al., *Gene* (1983) 26:205-221; và Yelton et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1984) 81:1470-74); *A. niger* (Kelly and Hynes, EMBO J. (1985) 4:475-479); *T. reesia* (EP 0 244 234); và nấm sợi, ví

dụ, *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium* (WO 91/00357), tất cả các tài liệu này được kết hợp vào sáng chế bằng cách viện dẫn.

Các trình tự đối chứng đối với các vectơ nấm men đã được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này biết rõ và bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, vùng gen khởi đầu từ gen như alcohol đehyđrogenaza (ADH) (EP 0 284 044); enolaza; glucokinaza; glucoza-6-phosphat isomeraza; glyxeralđehyt-3-phosphat-đehyđrogenaza (GAP hoặc GAPDH); hexokinaza; phosphofructokinaza; 3-phosphoglyxerat mutaza; và pyruvat kinaza (PyK) (EP 0 329 203). Gen PH05 của nấm men, mã hóa axit phosphataza, cũng có thể tạo ra các trình tự khởi đầu hữu ích (Miyanohara et al., *PROC. NATL, ACAD. SCI. USA* (1983) 80:1). Các trình tự đoạn mồi thích hợp khác để dùng với vật chủ nấm men có thể chứa các gen khởi đầu trong 3- phosphoglycerate kinaza (Hitzeman et al., *J. Biol. Chem.* (1980) 255:12073); và các enzym phân giải glucoza khác, như pyruvat đecarboxylaza, triozaphosphat isomeraza, và phosphoglucoza isomeraza (Holland et al., *Biochemistry* (1978) 17:4900; Hess et al., *J. ADV. ENZYME REG.* (1969) 7:149). Các gen khởi đầu có thể sinh ra ở nấm men có một lợi ích khác là sự phiên mã được điều khiển bởi các điều kiện sinh trưởng mà có thể chứa vùng gen khởi đầu này đối với đehyđrogenaza 2 của rượu; isoxytocrom C; phosphataza có tính axit; metalothionein; glyxeralđehyt-3-phosphat đehyđrogenaza; các enzym phân hủy liên quan đến sự chuyển hóa nitơ; và các enzym chịu trách nhiệm về việc sử dụng maltoza và galactoza. Các vectơ và các trình tự khởi đầu thích hợp để sử dụng trong biểu hiện ở nấm men cũng đã được bộc lộ trong EP 0 073 657.

Trình tự tăng cường ở nấm men cũng có thể được sử dụng với các trình tự khởi đầu ở nấm men. Ngoài ra, các trình tự khởi đầu tổng hợp cũng có thể có chức năng như các trình tự khởi đầu ở nấm men. Ví dụ, các trình tự hoạt hóa nằm trước (UAS) trình tự khởi đầu ở nấm men có thể được gắn với vùng hoạt hóa phiên mã của một trình tự khởi đầu khác ở nấm men, tạo ra trình tự khởi đầu lai tổng hợp. Ví dụ về các trình tự khởi đầu lai như vậy bao gồm trình tự điều hoà ADH liên kết với vùng hoạt hóa phiên mã GAP. Xem các patent Mỹ số 4,880,734 và 4,876,197, mà được kết hợp vào sáng chế bằng cách viện dẫn. Các ví dụ khác về các trình tự khởi đầu lai như vậy bao gồm các trình tự khởi đầu gồm các trình tự điều hoà của gen ADH2, GAL4, GAL 10, hoặc PH05, kết hợp với

vùng hoạt hóa phiên mã của gen enzym phân giải glucoza như GAP hoặc PyK. Xem EP 0 164 556. Hơn thế nữa, trình tự khởi đầu ở nấm men có thể bao gồm các trình tự khởi đầu có trong tự nhiên có nguồn gốc không từ nấm men mà có khả năng gắn kết ARN polymeaza ở nấm men và khởi đầu sự phiên mã.

Các yếu tố điều khiển khác mà có thể bao gồm phần vectơ biểu hiện nấm men bao gồm các trình tự kết thúc, ví dụ, từ GAPDH hoặc gen enolaza (Holland et al., *J. Biol. Chem.* (1981) 256:1385). Ngoài ra, gốc sao chép từ nguồn plasmit 2μ là thích hợp đối với nấm men. Gen chọn lọc thích hợp để sử dụng trong nấm men là gen tipi có mặt trong plasmit nấm men. Xem: Tschumper et al., *Gene* (1980) 10:157; Kingsman et al., *Gene* (1979) 7:141. Gen trpl đưa ra gen đánh dấu chọn lọc cho chủng nấm men đột biến không có khả năng sinh trưởng trên tryptophan. Tương tự, chủng nấm men thiếu hụt Leu2 (ATCC 20,622 hoặc 38,626) được bổ trợ bởi các plasmit đã biết mang gen Leu2.

Phương pháp đưa ADN ngoại sinh vào vật chủ nấm men mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này đã biết, và thường bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, bước chuyển hóa hạt cầu hoặc các tế bào vật chủ nấm men nguyên vẹn được xử lý bằng các cation có tính kiềm. Ví dụ, sự biến nạp nấm men có thể được thực hiện theo phương pháp đã được bộc lộ trong: Hsiao et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1979) 76:3829 và Van Solingen et al., *J. BACT*, (1977) 130:946. Tuy nhiên, các phương pháp khác để đưa ADN vào tế bào như bằng cách tiêm nhân, xung điện, hoặc dung hợp tế bào trần cũng có thể được sử dụng như được mô tả chung trong tài liệu SAMBROOK et al., *MOLECULAR CLONING: A LAB. MANUAL* (2001). Tiếp theo, các tế bào vật chủ nấm men có thể được nuôi cấy bằng cách áp dụng các phương pháp chuẩn mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này đã biết.

Các phương pháp khác để biểu hiện các protein khác loài ở các tế bào vật chủ nấm men đã được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này biết rõ. Xem Công bố patent Mỹ số, 20020055169, các patent Mỹ số 6,361,969; 6,312,923; 6,183,985; 6,083,723; 6,017,731; 5,674,706; 5,629,203; 5,602,034; và 5,089,398; Patent Mỹ đã được xét nghiệm lại số RE37,343 và RE35,749; công bố đơn PCT số WO 99/07862; WO 98/37208; và WO 98/26080; đơn yêu cầu cấp patent Châu Âu số EP 0 946 736; EP 0 732 403; EP 0 480 480; WO 90/10277; EP 0 340 986; EP 0 329 203; EP 0 324 274; và EP 0

164 556. Xem cả: Gellissen et al., *ANTONIE VAN LEEUWENHOEK* (1992) 62(1-2):79-93; Romanos et al., *YEAST* (1992) 8(6):423-488; Goeddel, *Methods in Enzymology* (1990) 185:3-7, tất cả các tài liệu này được kết hợp vào sáng chế bằng cách viện dẫn.

Chủng vật chủ nấm men có thể được phát triển trong thiết bị lên men trong suốt giai đoạn khuếch đại bằng cách áp dụng các phương pháp lên men theo mẻ tiếp liệu mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này đã biết. Các phương pháp lên men có thể được sửa lại cho phù hợp để giải thích các khác biệt về chu trình sử dụng cacbon của vật chủ nấm men cụ thể hoặc phương thức điều khiển biểu hiện. Ví dụ, quá trình lên men của vật chủ nấm men *Saccharomyces* có thể đòi hỏi sự nạp glucoza một lần duy nhất, bổ sung nguồn nitơ phức hợp (ví dụ, dịch thủy phân casein), và nhiều vitamin. Ngược lại, nấm men hướng metyl *P. pastoris* có thể cần đến nguyên liệu glyxerol, metanol, và lượng vết chất khoáng, nhưng chỉ cần đến các muối amoni (nitơ) đơn giản để tối ưu hóa sự phát triển và biểu hiện. Ví dụ, xem: patent Mỹ số 5,324,639; Elliott et al., *J. PROTEIN CHEM.* (1990) 9:95; và Fieschko et al., *BIOTECH. BIOENG.* (1987) 29:1113, được kết hợp vào sáng chế bằng cách viện dẫn.

Tuy nhiên, các phương pháp lên men như vậy, có thể có một số đặc điểm chung không phụ thuộc vào chủng vật chủ nấm men được sử dụng. Ví dụ, chất dinh dưỡng hạn chế sinh trưởng, thường là cacbon, có thể được bổ sung vào thiết bị lên men trong pha khuếch đại để cho phép sinh trưởng tối đa. Ngoài ra, các phương pháp lên men thường sử dụng môi trường lên men được thiết kế để chứa lượng thích hợp cacbon, nitơ, các muối cơ bản, phospho, và các chất dinh dưỡng tối thiểu khác (vitamin, lượng vết các chất khoáng và các muối, v.v.). Ví dụ về môi trường lên men thích hợp để dùng với *Pichia* được bộc lộ trong các patent Mỹ số 5,324,639 và 5,231,178, mà được kết hợp vào sáng chế bằng cách viện dẫn.

Các tế bào côn trùng nhiễm *Virut baculo*

Thuật ngữ "vật chủ côn trùng" hoặc "tế bào vật chủ côn trùng" được sử dụng trong bản mô tả để chỉ côn trùng mà có thể, hoặc đã được, sử dụng làm thể tiếp nhận các vectơ tái tổ hợp hoặc các ADN vận chuyển khác. Thuật ngữ này bao gồm thế hệ con của tế bào vật chủ côn trùng ban đầu đã được chuyển nhiễm. Cần hiểu rằng thế hệ con của

một tế bào bố mẹ duy nhất có thể là không cần phải giống hoàn toàn về mặt hình thái học hoặc về ADN bổ sung của bộ gen hoặc ADN bổ sung tổng số với tế bào bố mẹ ban đầu, do sự đột biến ngẫu nhiên hoặc sư đột biến có chủ ý. Thế hệ con của tế bào bố mẹ mà tương tự đủ với tế bào bố mẹ được đặc trưng bởi các đặc tính có liên quan, như sự có mặt của trình tự nucleotit mã hóa polypeptit relaxin, được bao hàm trong thế hệ con được dự định theo định nghĩa này. Sự biểu hiện của các polypeptit relaxin ở Virut baculo là hữu dụng theo sáng chế và việc áp dụng công nghệ ADN tái tổ hợp, các polypeptit hoặc các tiền chất của chúng do relaxin có thể được sinh tổng hợp trong số lương bất kỳ các tế bào vật chủ bao gồm vi khuẩn, tế bào của động vật có vú, các tế bào côn trùng, nấm men hoặc nấm. Phương án theo sáng chế bao gồm quá trình sinh tổng hợp relaxin, relaxin được cải biến, các polypeptit relaxin, hoặc chất tương tự relaxin trong vi khuẩn, nấm men hoặc tế bào của động vật có vú. Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến quy trình sinh tổng hợp được thực hiện ở *E. coli* hoặc nấm men. Ví dụ về quá trình sinh tổng hợp ở tế bào của động vật có vú và động vật chuyển gen được bộc lộ trong tài liệu của Hakola, K. [*Molecular and Cellular Endocrinology*, 127:59-69,(1997)].

Việc chọn lọc các tế bào côn trùng thích hợp để biểu hiện các polypeptit relaxin đã được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này biết rõ. Vài loài côn trùng đã được bộc lộ rõ trong tình trạng phương pháp và có thể mua được trên thị trường bao gồm *Aedes aegypti, Bombyx mori Drosophila melanogaster, Spodoptera frugiperda,* và *Trichoplusia ni.* Trong quá trình chọn lọc vật chủ côn trùng để biểu hiện, các vật chủ thích hợp có thể bao gồm các vật chủ thể hiện là có, trong số nhiều đặc tính khác, khả năng tiết tốt, hoạt tính phân giải protein thấp, và hoàn toàn khỏe mạnh. Côn trùng thường sẵn có từ nhiều nguồn bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, Trung tâm lưu giữ di truyền côn trùng, khoa Sinh lý và Y lý, đại học California (Insect Genetic Stock Center, Department of Biophysics và Medical Physics, University of California (Berkeley, CA)); và Cơ quan sưu tập chủng giống của Mỹ (American Type Culture Collection ("ATCC") (Manassas, VA).

Nhìn chung, các thành phần của hệ biểu hiện ở côn trùng nhiễm virut baculo bao gồm vectơ chuyển gen, thường là vi khuẩn plasmit, mà chứa cả một đoạn của bộ gen virut baculo và một vị trí phân cắt giới hạn thuận tiện để cài xen gen khác loài cần được biểu hiện; virut baculo thể dại với các trình tự tương đồng với đoạn đặc hiệu với virut baculo

trong vectơ chuyển gen (điều này cho phép tái tổ hợp tương đồng gen khác loài vào bộ gen virut baculo); và các tế bào vật chủ côn trùng thích hợp và môi trường sinh trưởng. Các nguyên liệu, phương pháp và phương pháp dùng trong việc xây dựng vectơ, chuyển nhiễm tế bào, chọn lọc vết tan tế bào, nuôi tế bào trong môi trường cấy, và các phương pháp tương tự là đã biết trong lĩnh vực phương pháp này và sách hướng dẫn mô tả các phương pháp này là sẵn có.

Sau khi cài xen gen khác loài vào vectơ chuyển gen, vectơ này và bộ gen virut thể dại được chuyển nhiễm vào tế bào vật chủ côn trùng mà trong đó vectơ này và bộ gen virut được kết hợp vào. Virut tái tổ hợp đã đóng gói được biểu hiện và vết tan tế bào tái tổ hợp được xác định và tinh chế. Nguyên liệu và các phương pháp dùng cho hệ biểu hiện virut baculo/tế bào côn trùng có thể mua được trên thị trường ở dạng kit từ, ví dụ, Invitrogen Corp. (Carlsbad, CA). Nhìn chung, các phương pháp đó được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này biết rõ và đã được bộc lộ đầy đủ trong: SUMMERS and SMITH, *TEXAS AGRICULTURAL EXPERIMENT STATION BULLETIN NO. 1555* (1987), đưa vào đây bằng cách viện dẫn. Xem cả: RICHARDSON, *39 METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY: VIRUT BACULO EXPRESSION PROTOCOLS* (1995); AUSUBEL et al., *CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY* 16.9-16.11 (1994); KING and POSSEE, *THE VIRUT BACULO SYSTEM: A LABORATORY GUIDE* (1992); và O'REILLY et al., *VIRUT BACULO EXPRESSION VECTORS: A LABORATORY MANUAL* (1992).

Thực vậy, việc sản xuất các protein khác loài khác nhau bằng cách sử dụng hệ biểu hiện virut baculo/tế bào côn trùng đã được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này biết rõ. Ví dụ, xem các patent Mỹ số 6,368,825; 6,342,216; 6,338,846; 6,261,805; 6,245,528, 6,225,060; 6,183,987; 6,168,932; 6,126,944; 6,096,304; 6,013,433; 5,965,393; 5,939,285; 5,891,676; 5,871,986; 5,861,279; 5,858,368; 5,843,733; 5,762,939; 5,753,220; 5,605,827; 5,583,023; 5,571,709; 5,516,657; 5,290,686; WO 02/06305; WO 01/90390; WO 01/27301; WO 01/05956; WO 00/55345; WO 00/20032; WO 99/51721; WO 99/45130; WO 99/31257; WO 99/10515; WO 99/09193; WO 97/26332; WO 96/29400; WO 96/25496; WO 96/06161; WO 95/20672; WO 93/03173; WO 92/16619; WO 92/02628; WO 92/01801; WO 90/14428; WO 90/10078; WO 90/02566; WO 90/02186;

WO 90/01556; WO 89/01038; WO 89/01037; WO 88/07082, được kết hợp vào sáng chế bằng cách viện dẫn.

Các vectơ mà có thể được sử dụng trong hệ biểu hiện virut baculo/tế bào côn trùng là đã biết trong lĩnh vực phương pháp này và bao gồm, ví dụ, các vectơ biểu hiện và chuyển gen ở côn trùng thu được từ virut đa diện nhân virut baculo Autographacalifomica nuclear polyhedrosis (virut baculo Autographacalifomica nuclear polyhedrosis - AcNPV), mà là vectơ biểu hiện ở virut không phụ thuộc vào tế bào trợ giúp. Các vectơ biểu hiện virut thu được từ hệ này thường sử dụng trình tự khởi đầu gen đa diện ở virut khỏe để dẫn đến sự biểu hiện của gen khác loài. Thông thường, xem: O'Reilly et al., *VIRUT BACULO EXPRESSION VECTORS: A LABORATORY MANUAL* (1992).

Trước khi cài xen gen lạ vào bộ gen virut baculo, các thành phần nêu trên, bao gồm gen khởi đầu, trình tự dẫn (nếu muốn), trình tự mã hóa đáng quan tâm, và trình tự kết thúc phiên mã, thường được lắp ráp thành cấu trúc chuyển dịch trung gian (vectơ chuyển gen). Cấu trúc chuyển dịch trung gian thường được duy trì trong một đơn vị sao chép, như một yếu tố nhiễm sắc thể phụ (ví dụ, plasmit) có khả năng duy trì độ ổn định trong vật chủ, như vi khuẩn. Đơn vị sao chép này sẽ có hệ thống sao chép, do đó cho phép nó được giữ lại trong vật chủ thích hợp để tách dòng và khuếch đại. Cụ thể hơn, plasmit có thể chứa tín hiệu polyheđrin polyađenyl hóa (Miller, ANN. REV. MICROBIOL. (1988) 42:177) và gen kháng ampixilin-(amp) ở sinh vật nhân sơ và gốc sao chép để chọn lọc và nhân lên trong *E. coli*.

Một vectơ chuyển gen thường được sử dụng để đưa gen lạ vào AcNPV là pAc373. Nhiều vectơ khác, mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này đã biết, cũng đã được thiết kế chứa, ví dụ, pVL985, mà thay đổi bộ ba mã hóa khởi đầu polyhedrin từ ATG thành ATT, và đưa vào vị trí tách dòng BamHI 32 cặp bazơ nằm sau ATT. Xem: Luckow and Summers, *VIROLOGY* 170:31 (1989). Các vectơ khác có bán trên thị trường bao gồm, ví dụ, PBlueBac4.5/V5-His; pBlueBacHis2; pMelBac; pBlueBac4.5 (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA).

Sau khi cài xen gen khác loài, vectơ chuyển gen và bộ gen virut baculo thể dại được đồng chuyển nhiễm vào tế bào vật chủ côn trùng. Các phương pháp đưa ADN khác

loài vào vị trí mong muốn trong virut baculo là đã biết trong lĩnh vực phương pháp này. Xem: SUMMERS and SMITH, *TEXAS AGRICULTURAL EXPERIMENT STATION BULLETIN NO. 1555* (1987); Smith et al., *Mol. Cell. Biol.* (1983) 3:2156; Luckow and Summers, *VIROLOGY* (1989) 170:31. Ví dụ, việc cài xen có thể là vào một gen như gen polyhedrin, bằng cách tái tổ hợp lai kép tương đồng; cài xen còn có thể là vào một vị trí enzym giới hạn được thiết kế trong gen virut baculo mong muốn. Xem Miller et al., *BIOESSAYS* (1989) 11(4):91.

Việc chuyển nhiễm có thể được thực hiện bằng xung điện. Xem: TROTTER AND WOOD, *39 METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY* (1995); Mann and King, *J. GEN. VIROL.* (1989) 70:3501. Theo cách khác, các liposom có thể được sử dụng để chuyển nhiễm các tế bào côn trùng với vectơ biểu hiện tái tổ hợp và các virut baculo. Ví dụ, xem: Liebman et al., *BIOTECHNIQUES* (1999) 26(1):36; Graves et al., *Biochemistry* (1998) 37:6050; Nomura et al., *J. Biol. Chem.* (1998) 273(22): 13570; Schmidt et al., *PROTEIN EXPRESSION AND PURIFICATION* (1998) 12:323; Siffert et al., *Nature Genetics* 18:45; TILKINS et al.; *CELL BIOLOGY*: A LABORATORY HANDBOOK 145-154 (1998); Cai et al., *PROTEIN EXPRESSION AND PURIFICATION* (1997) 10:263; Dolphin et al., *Nature Genetics* (1997) 17:491; Kost et al., *Gene* (1997) 190:139; Jakobsson et al., *J. BIOL. CHEM.* (1996) 271:22203; Rowles et al.*J. Biol. Chem.*, *J. Biol. Chem.* (1996) 271(37):22376; Reverey et al., *J. Biol. Chem.* (1996) 271(39):23607-10; Stanley et al., *J. Biol. Chem.* (1995) 270:4121; Sisk et al., *J. VIROL.* (1994) 68(2):766; và Peng et al., *BIOTECHNIQUES* (1993) 14(2):274. Các liposom có bán trên thị trường bao gồm, ví dụ, Cellfectin® và Lipofectin® (Invitrogen, Corp., Carlsbad, CA). Ngoài ra, chuyển nhiễm thông qua canxi phosphat có thể được sử dụng. Xem: TROTTER and WOOD, *39 METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY* (1995); Kitts, NAR (1990) 18(19):5667; và Mann and King, *J. GEN. VIROL.* (1989) 70:3501.

Các vectơ biểu hiện ở *Virut baculo* thường chứa trình tự khởi đầu virut baculo. Trình tự khởi đầu virut baculo là trình tự ADN bất kỳ có khả năng liên kết ARN polymeaza ở virut baculo và khởi đầu sự phiên mã nằm sau đầu tận cùng (3') trình tự mã hóa (ví dụ, gen cấu trúc) thành ARN thông tin. Trình tự khởi đầu sẽ có vùng khởi đầu phiên mã thường đặt ở đầu gần đầu 5' của trình tự mã hóa. Vùng khởi đầu phiên mã

thường có một vị trí liên kết ARN polymeaza và vị trí khởi đầu phiên mã. Trình tự khởi đầu ở virut baculo còn có thể có một miền thứ hai gọi là trình tự tăng cường, mà, nếu có mặt, thường ở xa gen cấu trúc. Hơn thế nữa, sự biểu hiện có thể được điều tiết hoặc cơ định,

Gen cấu trúc, nhiều khi được phiên mã ở khoảng thời gian cuối trong chu trình nhiễm khuẩn, tạo ra trình tự khởi đầu đặc biệt hữu ích. Các ví dụ bao gồm các trình tự thu được từ gen mã hóa protein polyhedron ở virut (FRIESEN ET AL, *The Regulation of Virut baculo Gene Expression* trong *THE MOLECULAR BIOLOGY OF VIRUT BACULOES* (1986); EP 0 127 839 và 0 155 476) và gen mã hóa protein p10 (Vlak et al., *J. GEN. VIROL.* (1988) 69:765).

Vectơ biểu hiện virut baculo mới được tạo ra được đóng gói vào virut baculo tái tổ hợp gây nhiễm và sau đó vết tan tế bào lớn lên có thể được tinh chế bằng các phương pháp mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này đã biết. Xem: Miller et al., *BIOESSAYS* (1989) 11(4):91; SUMMERS and SMITH, *TEXAS AGRICULTURAL EXPERIMENT STATION BULLETIN NO. 1555* (1987).

Các vectơ biểu hiện virut baculo tái tổ hợp đã được phát triển để gây nhiễm vào vài tế bào côn trùng. Ví dụ, virut baculoes tái tổ hợp đã được phát triển cho, trong số nhiều côn trùng, *Aedes aegypti* (ATCC No. CCL-125), *Bombyx mori* (ATCC No. CRL-8910), *Drosophila melanogaster* (ATCC No. 1963), *Spodoptera frugiperda*, và *Trichoplusia ni*. Xem: Wright, *Nature* (1986) 321:718; Carbonell et al., *J. VIROL.* (1985) 56:153; Smith et al., *Mol. Cell. Biol.* (1983) 3:2156. Nhìn chung, xem: Fraser et al., *in vitro* CELL. DEV. BIOL. (1989) 25:225. Cụ thể hơn, các dòng tế bào dùng cho hệ vectơ biểu hiện virut baculo thường bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, Sf9 (*Spodoptera frugiperda*) (ATCC No, CRL-1711), Sf21 (*Spodoptera frugiperda*) (Invitrogen Corp., Cat. No. 11497-013 (Carlsbad, CA)), Tri-368 (*Trichopulsia ni*), và High-Five™ BTI-TN-5B1-4 (*Trichopulsia ni*).

Tế bào và môi trường nuôi cấy có thể mua được trên thị trường để biểu hiện trực tiếp và dung hợp các polypeptit khác loài ở virut baculo/biểu hiện, và nhìn chung công nghệ nuôi cấy tế bào được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này biết rõ.

E. coli, *Pseudomonas*, và các sinh vật không nhân thật khác

Các phương pháp biểu hiện vi khuẩn đã được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này biết rõ. Nhiều loại vectơ là sẵn có để sử dụng trong vật chủ vi khuẩn. Các vectơ có thể là vectơ sao chép duy nhất hoặc vectơ có nhiều hoặc ít bản sao. Các vectơ có thể được sử dụng để tách dòng và/hoặc biểu hiện. Vì có nhiều tài liệu liên quan đến vectơ, tính sẵn có về mặt thương mại của nhiều vectơ, và thậm chí là các sách hướng dẫn mô tả các vectơ và bản đồ gen hạn chế và các đặc tính của chúng, việc bàn luận rộng rãi ở đây là không cần thiết. Như đã được biết rõ, các vectơ thường chứa gen đánh dấu cho phép chọn lọc, gen đánh dấu này có thể tạo ra tính kháng chất gây độc tế bào, tính dinh dưỡng hoặc khả năng miễn dịch. Thông thường, nhiều gen đánh dấu có mặt, tạo ra các đặc tính khác nhau.

Trình tự khởi đầu vi khuẩn là trình tự ADN bất kỳ có khả năng liên kết ARN polymeaza vi khuẩn và khởi đầu sự phiên mã nằm sau đầu tận cùng (3') trình tự mã hóa (ví dụ, gen cấu trúc) thành ARN thông tin. Trình tự khởi đầu sẽ có vùng khởi đầu phiên mã thường đặt ở đầu gần với đầu 5' của trình tự mã hóa. Vùng khởi đầu phiên mã này thường bao gồm vị trí liên kết ARN polymeaza và vị trí khởi đầu phiên mã. Trình tự khởi đầu của vi khuẩn còn có thể có một miền thứ hai gọi là trình tự điều khiển, có thể chồng lên một vị trí liên kết ARN polymeaza liền kề mà ở đó bắt đầu quá trình tổng hợp ARN. Trình tự điều khiển cho phép phiên mã (tạo ra) sự điều hòa âm, do protein ức chế gen có thể liên kết với trình tự điều khiển và bằng cách đó ức chế sự phiên mã của một gen cụ thể. Biểu hiện cơ định có thể xảy ra với sự không có mặt của yếu tố điều hòa âm, như trình tự điều khiển. Ngoài ra, sự điều hòa dương có thể có được nhờ trình tự liên kết protein hoạt hóa gen, mà, nếu có mặt thì thường ở gần đầu (5') của trình tự liên kết ARN polymeaza. Ví dụ về protein hoạt hóa gen là protein hoạt hóa quá trình dị hóa (catabolite activator protein - CAP), mà giúp khởi đầu sự phiên mã operon lac ở *Escherichia coli* (*E. coli*) [Raibaud et al., *ANNU. REV. GENET.* (1984) 18:173]. Do đó, sự biểu hiện được điều hòa có thể là dương tính hoặc âm tính, nhờ đó làm tăng hoặc làm giảm mức độ phiên mã.

Trình tự mã hóa các enzym trong chu trình trao đổi chất tạo ra trình tự khởi đầu đặc biệt hữu dụng. Các ví dụ bao gồm các trình tự khởi đầu thu được từ các enzym

chuyển hóa đường, như galactoza, lactoza (lac) [Chang et al., *Nature* (1977) 198:1056], và maltoza. Các ví dụ khác bao gồm các trình tự khởi đầu thu được từ các enzym sinh tổng hợp như tryptophan (trp) [Goeddel et al., *Nuc. Acids Res.* (1980) 8:4057; Yelverton et al., *Nucl. Acids Res.* (1981) 9:731; patent Mỹ số 4,738,921; công bố đơn châu Âu số EP 036 776 và 121 775, mà được kết hợp vào sáng chế bằng cách viện dẫn]. Hệ trình tự khởi đầu β-gaIactosiđaza (bla) [Weissmann (1981) "*The cloning of interferon and other mistakes*." In Interferon 3 (Ed. I. Gresser)], các hệ thống trình tự khởi đầu thể thực khuẩn lambđa PL [Shimatake et al., *Nature* (1981) 292:128] và T5 [patent Mỹ số 4,689,406, mà được kết hợp vào sáng chế bằng cách viện dẫn] cũng tạo ra các trình tự khởi đầu đặc biệt hữu dụng. Các phương pháp được ưu tiên theo sáng chế sử dụng các trình tự khởi đầu mạnh, như trình tự khởi đầu T7 để tạo ra các polypeptit relaxin với số lượng lớn. Ví dụ về các vectơ này là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này và bao gồm các dãy pET29 từ Novagen, và các vectơ pPOP đã được bộc lộ trong WO99/05297, mà được kết hợp vào sáng chế bằng cách viện dẫn. Hệ biểu hiện như vậy tạo ra các polypeptit relaxin với số lượng lớn ở vật chủ mà không làm tổn hại đến khả năng sống sót của tế bào vật chủ hoặc các thông số sinh trưởng. pET19 (Novagen) là một vectơ khác đã biết trong lĩnh vực phương pháp này.

Ngoài ra, các trình tự khởi đầu tổng hợp không có trong tự nhiên cũng đóng vai trò như các trình tự khởi đầu ở vi khuẩn. Ví dụ, các trình tự hoạt hóa phiên mã của một trình tự khởi đầu vi khuẩn hoặc thể thực khuẩn có thể được gắn với các trình tự operon của một trình tự khởi đầu vi khuẩn hoặc thể thực khuẩn, tạo ra trình tự khởi đầu lai tổng hợp [patent Mỹ số 4,551,433, mà được kết hợp vào sáng chế bằng cách viện dẫn]. Ví dụ, trình tự khởi đầu tac là trình tự khởi đầu trp-lac lai bao gồm cả trình tự khởi đầu trp và các trình tự operon lac mà được điều hòa bởi trình tự kìm hãm lac [Amann et al., *Gene* (1983) 25:167; de Boer et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1983) 80:21]. Hơn nữa, trình tự khởi đầu của vi khuẩn có thể bao gồm các trình tự khởi đầu có trong tự nhiên có nguồn gốc không từ vi khuẩn, mà có khả năng gắn kết ARN polymeaza vi khuẩn và khởi đầu phiên mã. Trình tự khởi đầu có trong tự nhiên có nguồn gốc không từ vi khuẩn còn có thể được ghép cặp với một ARN polymeaza tương thích để tạo ra sự biểu hiện ở mức cao của một số gen ở sinh vật không nhân thật. Hệ ARN polymeaza thể thực khuẩn T7/trình tự khởi đầu là ví dụ về hệ trình tự khởi đầu được ghép cặp [Studier et al., *J. Mol, Biol.* (1986)

189:113; Tabor et al., *Proc Natl. Acad. Sci.* (1985) 82:1074]. Ngoài ra, trình tự khởi đầu lai còn có thể chứa trình tự khởi đầu của thể thực khuẩn và vùng trình tự điều khiển ở *E. coli* (EP Pub. No. 267 851).

Ngoài trình tự khởi đầu chức năng, một vị trí liên kết ribosom hữu hiệu cũng có thể được sử dụng để biểu hiện gen lạ ở sinh vật không nhân thật. Ở *E. coli*, vị trí liên kết ribosom được gọi là trình tự Shine-Dalgarno (SD) và chứa bộ ba mã hóa khởi đầu (ATG) và trình tự có chiều dài 3 đến 9 nucleotit nằm trước bộ ba mã hóa khởi đầu 3 đến 11 nucleotit [Shine et al., *Nature* (1975) 254:34]. Trình tự SD được cho là thúc đẩy sự liên kết của ARN thông tin với ribosom bằng cách ghép cặp các bazơ giữa trình tự SD và đầu 3' của ARN ribosom 16S ở *E. coli* [Steitz et al. "*Genetic signals and nucleotide sequences in messenger RNA*", trong *Biological Regulation and Development: Gene Expression* (Ed. R. F. Goldberger, 1979)]. Để biểu hiện các gen ở sinh vật nhân thật và các gen ở sinh vật nhân sơ với vị trí liên kết ribosom yếu [Sambrook et al. "*Expression of cloned genes in Escherichia coli*", *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 1989].

Thuật ngữ "vật chủ vi khuẩn" hoặc "tế bào vật chủ vi khuẩn" được sử dụng trong bản mô tả để chỉ vi khuẩn có thể, hoặc đã được, sử dụng làm thể tiếp nhận các vectơ tái tổ hợp hoặc các ADN vận chuyển khác. Thuật ngữ này bao gồm thế hệ con của tế bào vật chủ vi khuẩn ban đầu đã được chuyển nhiễm. Cần hiểu rằng thế hệ con của một tế bào bố mẹ duy nhất có thể không nhất thiết phải giống hoàn toàn về mặt hình thái học hoặc về ADN bộ gen hoặc tổng số lượng ADN bổ sung cho ADN bố mẹ ban đầu, do sự đột biến ngẫu nhiên hoặc có chủ ý. Thế hệ con của tế bào bố mẹ tương tự đủ với tế bào bố mẹ được đặc trưng bởi đặc tính có liên quan, như sự có mặt của trình tự nucleotit mã hóa polypeptit relaxin, được bao hàm trong thế hệ con theo định nghĩa này.

Việc chọn lọc vi khuẩn vật chủ thích hợp để biểu hiện các polypeptit relaxin đã được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này biết rõ. Trong quá trình chọn lọc vật chủ vi khuẩn để biểu hiện, các vật chủ thích hợp có thể bao gồm các vật chủ thể hiện là có, trong số nhiều đặc tính khác, khả năng tạo thể vùi tốt, hoạt tính phân giải protein thấp, và khỏe mạnh hoàn toàn. Vật chủ vi khuẩn thường sẵn có từ nhiều nguồn bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, Trung tâm lưu trữ di truyền vi khuẩn, Khoa Sinh lý và Y lý, đại học California (the Bacterial Genetic Stock Center, Department of Biophysics and

Medical Physics, University of California (Berkeley, CA); và Bộ sưu tập chủng giống của Mỹ (American Type Culture Collection ("ATCC") (Manassas, VA)). Việc lên men công nghiệp/dược phẩm thường sử dụng vi khuẩn thu được từ các chủng K (ví dụ, W3110) hoặc từ vi khuẩn thu được từ các chủng B (ví dụ, BL21). Các chủng này là đặc biệt hữu dụng do các thông số sinh trưởng của chúng đã biết rất rõ và chúng rất khỏe. Ngoài ra, các chủng này không gây bệnh, mà điều này là quan trọng về phương diện thương mại vì lý do liên quan đến độ an toàn và môi trường. Các ví dụ khác về vật chủ *E. coli* thích hợp bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, chủng BL21, DH10B, hoặc các dẫn xuất của chúng. Theo phương án khác của các phương pháp theo sáng chế, vật chủ *E. coli* là chủng không có proteaza bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, OMP- và LON-. Chủng tế bào vật chủ có thể là các loài *Pseudomonas*, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, và *Pseudomonas putida*. *Pseudomonas fluorescens* biovar 1, được gọi là chủng MB 101, đã được biết là hữu hiệu để sản xuất tái tổ hợp và sẵn có cho các quy trình sản xuất protein trị liệu. Ví dụ về hệ biểu hiện *Pseudomonas* bao gồm hệ sẵn có do The Dow Chemical Company cung cấp làm chủng vật chủ (Midland, MI có trên trang web toàn cầu tại dow.com).

Một khi một chủng tế bào vật chủ tái tổ hợp được thiết lập (tức là cấu trúc biểu hiện đã được đưa vào tế bào vật chủ này và các tế bào vật chủ có cấu trúc biểu hiện hợp lý được phân lập), chủng tế bào vật chủ tái tổ hợp được nuôi cấy trong các điều kiện thích hợp để tạo ra các polypeptit relaxin. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ nhận thấy rằng, phương pháp nuôi cấy chủng tế bào vật chủ tái tổ hợp sẽ tùy thuộc vào bản chất của cấu trúc biểu hiện được sử dụng và tính đồng nhất của tế bào chủ. Chủng vật chủ tái tổ hợp thường được nuôi cấy bằng cách áp dụng các phương pháp mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này đã biết. Các tế bào vật chủ tái tổ hợp thường được nuôi cấy trong môi trường lỏng chứa các nguồn cacbon, nitơ, và các muối vô cơ có thể đồng hóa được và, tùy ý, chứa các vitamin, axit amin, các yếu tố sinh trưởng, và các chất bổ sung trong quá trình nuôi cấy có protein khác mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này đã biết. Môi trường lỏng để nuôi cấy các tế bào vật chủ có thể tùy ý chứa thuốc kháng sinh hoặc chất chống nấm để ngăn ngừa sự phát triển của vi sinh vật không mong muốn và/hoặc các hợp chất bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, thuốc kháng sinh để chọn lọc các tế bào vật chủ chứa vectơ biểu hiện.

Các tế bào vật chủ tái tổ hợp có thể được nuôi cấy theo mẻ hoặc nuôi cấy liên tục, có thu được tế bào (trong trường hợp polypeptit relaxin tích tụ nội bào) hoặc thu phần dịch nổi trong quá trình nuôi cấy cả ở dạng theo mẻ hoặc dạng liên tục. Để sản xuất trong các tế bào vật chủ nhân sơ, việc nuôi cấy theo mẻ và thu tế bào là được ưu tiên.

Các polypeptit relaxin theo sáng chế thường được tinh chế sau khi biểu hiện trong hệ tái tổ hợp. Polypeptit relaxin có thể được tinh chế từ các tế bào vật chủ hoặc môi trường nuôi cấy theo nhiều phương pháp khác nhau đã biết trong lĩnh vực này. Các polypeptit relaxin được tạo ra trong các tế bào vật chủ vi khuẩn có thể hòa tan kém hoặc không hòa tan (ở dạng thể vùi). Theo một phương án của sáng chế, sự thay thế axit amin có thể dễ dàng được tạo ra trong polypeptit relaxin được chọn nhằm mục đích gia tăng độ hòa tan của protein được tạo ra theo phương pháp tái tổ hợp áp dụng các phương pháp đã được bộc lộ trong bản mô tả này cũng như các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này. Trong trường hợp protein không hòa tan, protein này có thể được thu từ dung dịch dung giải tế bào vật chủ bằng cách ly tâm và tiếp theo có thể được đồng hóa tế bào. Trong trường hợp protein hòa tan kém, các hợp chất bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, polyetylen imin (PEI) có thể được bổ sung vào để làm kết tủa protein hòa tan một phần. Tiếp theo, protein đã được kết tủa có thể được thu theo cách thông thường bằng cách ly tâm. Các tế bào vật chủ tái tổ hợp có thể bị phá vỡ hoặc được đồng hoá để giải phóng thể vùi từ bên trong các tế bào bằng cách sử dụng nhiều phương pháp mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này đã biết, việc phá vỡ hoặc đồng hóa tế bào vật chủ có thể được thực hiện bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, việc phá vỡ tế bào bằng enzym, xử lý bằng siêu âm, đồng hóa kiểu dounce, hoặc phá vỡ theo công nghệ giải phóng ở áp lực cao. Theo một phương án của phương pháp theo sáng chế, công nghệ giải phóng ở áp lực cao được sử dụng để phá vỡ các tế bào vật chủ *E. coli* nhằm giải phóng thể vùi của các polypeptit relaxin. Khi xử lý thể vùi của polypeptit relaxin, có thể có lợi nếu giảm đến mức tối thiểu thời gian đồng hóa lặp lại để cực đại hóa hiệu suất của thể vùi mà không làm hao hụt hiệu suất do các yếu tố như độ hòa tan, lực cắt cơ học hoặc sự phân giải protein.

Tiếp theo, polypeptit relaxin không hòa tan hoặc kết tủa có thể được hòa tan bằng cách sử dụng tác nhân bất kỳ trong số các tác nhân hòa tan thích hợp đã biết trong lĩnh

vực này. Polyeptit relaxin có thể được hòa tan bằng ure hoặc guaniđin hyđroclorua. Thể tích của polypeptit relaxin đã được hòa tan cần phải được giảm đến mức tối thiểu sao cho có thể tạo ra các mẻ lớn bằng cách sử dụng các cỡ mẻ có thể điều khiển theo cách thông thường. Yếu tố này có thể là quan trọng trong sản xuất thương mại ở quy mô lớn, trong đó vật chủ tái tổ hợp có thể được sinh trưởng theo mẻ có thể tích đến hàng ngàn lít. Ngoài ra, khi sản xuất polypeptit relaxin trong thương mại ở quy mô lớn, cụ thể là để dùng làm dược phẩm cho người, cần phải tránh các hóa chất mạnh có thể gây tổn hại đến máy móc và đồ chứa, hoặc chính sản phẩm protein, nếu có thể. Đã được thể hiện trong phương pháp theo sáng chế rằng chất làm biến tính nhẹ ure có thể được sử dụng để hòa tan polypeptit relaxin thể vùi thay cho chất biến tính mạnh guaniđin hyđroclorua. Việc sử dụng ure làm giảm đáng kể nguy cơ tổn hại cho các thiết bị làm bằng thép không gỉ được sử dụng trong quy trình sản xuất và tinh chế polypeptit relaxin đồng thời hòa tan một cách hữu hiệu thể vùi polypeptit relaxin.

Trong trường hợp protein relaxin hòa tan, relaxin này có thể được tiết vào chất gian bào hoặc vào môi trường nuôi cấy. Ngoài ra, relaxin hòa tan có thể có mặt trong tế bào chất của tế bào chủ. Có thể muốn cô đặc relaxin hòa tan trước khi thực hiện các bước tinh chế. Các phương pháp tiêu chuẩn mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này đã biết có thể được sử dụng để cô đặc relaxin hòa tan từ, ví dụ, dung dịch dung giải tế bào hoặc môi trường nuôi cấy. Ngoài ra, các phương pháp tiêu chuẩn mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này đã biết có thể được sử dụng để phá vỡ các tế bào vật chủ và giải phóng relaxin hòa tan ra khỏi tế bào chất hoặc chất gian bào của tế bào chủ.

Khi polypeptit relaxin được tạo ra ở dạng protein dung hợp, trình tự dung hợp có thể được loại bỏ. Việc loại bỏ trình tự dung hợp có thể được thực hiện bằng cách phân cắt bằng enzym hoặc theo phương pháp hóa học. Việc loại bỏ các trình tự dung hợp bằng enzym có thể được thực hiện bằng cách áp dụng các phương pháp mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này đã biết. Việc lựa chọn enzym để loại bỏ trình tự dung hợp sẽ được xác định bằng cách nhận biết thể dung hợp, và các điều kiện phản ứng sẽ được xác định bởi sự lựa chọn enzym đã được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này biết rõ. Việc phân cắt theo phương pháp hóa học có thể được thực hiện bằng cách sử dụng các chất phản ứng mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này đã biết, bao gồm,

nhưng không chỉ giới hạn ở, xyanogen bromua, TEV proteaza, và các chất phản ứng khác. Polypeptit relaxin đã được phân cắt có thể được tinh chế từ các trình tự dung hợp đã được phân cắt theo các phương pháp mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này đã biết. Các phương pháp này sẽ được xác định bởi tính đồng nhất và các đặc tính của trình tự dung hợp và polypeptit relaxin, đã được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này biết rõ. Các phương pháp tinh chế có thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, phương pháp sắc ký loại cỡ, phương pháp sắc ký tương tác kỵ nước, phương pháp sắc ký trao đổi ion hoặc thẩm tách hoặc tổ hợp bất kỳ của chúng.

Polypeptit relaxin còn có thể được tinh chế để loại bỏ ADN ra khỏi dung dịch protein, ADN có thể được loại bỏ bằng phương pháp thích hợp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này, như kết tủa hoặc sắc ký trao đổi ion, nhưng cũng có thể được loại bỏ bằng cách làm kết tủa bằng chất kết tủa axit nucleic, như, nhưng không chỉ giới hạn ở, protamin sulfat. Polypeptit relaxin có thể được tách ra khỏi ADN đã được kết tủa bằng cách áp dụng các phương pháp tiêu chuẩn đã biết bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, ly tâm hoặc lọc. Việc loại bỏ các phân tử axit nucleic của vật chủ là yếu tố quan trọng trong trường hợp mà trong đó polypeptit relaxin được sử dụng để điều trị bệnh cho người và các phương pháp theo sáng chế làm giảm ADN tế bào vật chủ đến mức dược dụng.

Phương pháp lên men ở quy mô nhỏ hoặc ở quy mô lớn cũng có thể được sử dụng để biểu hiện protein, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các thiết bị lên men, các bình lắc, các thiết bị phản ứng sinh học tầng sôi, các thiết bị sinh học dạng ống rỗng, thiết bị nuôi cấy dạng chai lăn, và thiết bị phản ứng sinh học kiểu thùng khuấy. Mỗi phương pháp này có thể được thực hiện theo quy trình mẻ, mẻ tiếp liệu, hoặc liên tục.

Nhìn chung, các polypeptit relaxin của người theo sáng chế có thể được thu nhận bằng cách áp dụng các phương pháp tiêu chuẩn trong lĩnh vực phương pháp này. Ví dụ, môi trường nuôi cấy hoặc dung dịch dung giải tế bào có thể được ly tâm hoặc được lọc để loại bỏ mảnh vụn tế bào. Phần dịch nổi có thể được cô đặc hoặc được pha loãng đến thể tích mong muốn hoặc được thẩm tách vào dung dịch đệm thích hợp để chuẩn bị cho việc tinh chế chế phẩm tiếp theo. Việc tinh chế tiếp polypeptit relaxin theo sáng chế bao gồm việc phân cắt các dạng đã được loại amit và các dạng cắt cụt của biến thể polypeptit relaxin ra khỏi dạng nguyên vẹn.

Phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp sau có thể được sử dụng để tinh chế các polypeptit relaxin theo sáng chế: phương pháp sắc ký ái lực; phương pháp sắc ký trao đổi anion hoặc cation (bằng cách sử dụng, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, DEAE SEPHAROZA); phương pháp sắc ký trên silic đioxit; phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC); phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao pha đảo; phương pháp lọc gel (bằng cách sử dụng, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, SEPHADEX G-75); phương pháp sắc ký tương tác kỵ nước; phương pháp sắc ký loại cỡ; phương pháp sắc ký chelat-kim loại; phương pháp siêu lọc/lọc thẩm tách; phương pháp kết tủa bằng etanol; phương pháp kết tủa bằng amoni sulfat; phương pháp tinh lọc protein theo điểm đẳng điện; phương pháp sắc ký chuyển dịch; phương pháp điện di (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, phương pháp điện di hội tụ đẳng điện điều chế), độ hòa tan khác biệt (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, phương pháp kết tủa bằng amoni sulfat), SDS-PAGE, hoặc phương pháp chiết,

Protein theo sáng chế, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, protein chứa axit amin không có trong tự nhiên, peptit chứa axit amin không có trong tự nhiên, kháng thể kháng protein chứa axit amin không có trong tự nhiên, thành phần liên kết đối với protein chứa axit amin không có trong tự nhiên, v.v., có thể được tinh chế, một phần hoặc hầu như đồng nhất, theo các quy trình tiêu chuẩn mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này đã biết và sử dụng. Do đó, polypeptit theo sáng chế có thể được thu nhận và tinh chế bằng phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này đã biết, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, phương pháp làm kết tủa bằng amoni sulfat hoặc etanol, phương pháp chiết bằng axit hoặc bazơ, phương pháp sắc ký cột, phương pháp sắc ký cột ái lực, anion hoặc sắc ký trao đổi cation, phương pháp sắc ký phosphoxenluloza, phương pháp sắc ký tương tác kỵ nước, phương pháp sắc ký trên hyđroxylapatit, phương pháp sắc ký lectin, điện di trên gel và các phương pháp tương tự. Các bước tái gấp nếp protein có thể được sử dụng, nếu muốn, để tạo ra ác protein trưởng thành được gấp nếp chính xác. Phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC), phương pháp sắc ký ái lực hoặc các phương pháp thích hợp khác có thể được sử dụng ở các bước tinh chế cuối cùng khi mong muốn có được độ tinh khiết cao. Theo một phương án, các kháng thể đã được tạo ra kháng lại các axit amin không có trong tự nhiên (hoặc các protein hoặc các peptit chứa axit amin không có trong tự nhiên) được sử dụng làm các

chất phản ứng tinh chế cho việc tinh chế, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, việc tinh chế dựa trên ái lực các protein hoặc các peptit chứa một hoặc nhiều axit amin không có trong tự nhiên. Sau khi được tinh chế, một phần hoặc đến mức đồng nhất, nếu muốn, các polypeptit tùy ý được sử dụng cho nhiều loại ứng dụng, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, việc dùng làm các thành phần phân tích, các chất điều trị, phòng ngừa, chẩn đoán, các chất phản ứng dùng trong nghiên cứu, và/hoặc dùng làm tác nhân gây miễn dịch để sản xuất kháng thể. Các kháng thể đã được tạo ra kháng lại các polypeptit theo sáng chế có thể được thu bằng cách dùng các polypeptit hoặc đoạn mang biểu vị, hoặc các tế bào của động vật, tốt hơn là động vật không phải người, bằng cách áp dụng quy trình thông thường. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể tạo ra các kháng thể bằng cách sử dụng nhiều phương pháp đã biết. Hơn nữa, chuột nhắt chuyển gen, hoặc các sinh vật khác, bao gồm các động vật có vú khác, có thể được sử dụng để biểu hiện các kháng thể của người. Các kháng thể nêu trên có thể được sử dụng để phân lập hoặc để nhận biết các dòng biểu hiện polypeptit hoặc để tinh chế các polypeptit. Các kháng thể kháng lại các polypeptit theo sáng chế cũng có thể được sử dụng để điều trị bệnh.

Polypeptit và polynucleotit theo sáng chế cũng có thể được sử dụng làm vacxin. Do đó, theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp gây ra đáp ứng miễn dịch ở động vật có vú bao gồm bước chủng ngừa động vật có vú bằng polypeptit theo sáng chế, đủ để tạo ra kháng thể và/hoặc đáp ứng miễn dịch tế bào T, bao gồm, ví dụ, các tế bào T tạo ra xytokin hoặc tế bào T gây độc tế bào, để bảo vệ động vật này khỏi mắc bệnh, trong đó bệnh này đã có sẵn trong cá thể hoặc không có trong cá thể. Đáp ứng miễn dịch ở động vật có vú còn có thể được gây ra theo phương pháp bao gồm bước phân phối polypeptit theo sáng chế nhờ vectơ điều khiển sự biểu hiện của polynucleotit và mã hóa polypeptit *in vivo* để gây ra đáp ứng miễn dịch nhằm tạo ra kháng thể bảo vệ động vật đó khỏi các bệnh theo sáng chế. Một cách dùng vectơ này là cách thúc đẩy nó đi vào tế bào mong muốn ở dạng lớp bao trên các hạt hoặc các dạng khác. Vectơ axit nucleic như vậy có thể chứa ADN, ARN, axit nucleic được cải biến, hoặc thể lai ADN/ARN. Để dùng làm vacxin, polypeptit hoặc vectơ axit nucleic sẽ thường được đưa ra ở dạng chế phẩm vacxin (dược phẩm). Chế phẩm đó có thể còn chứa chất mang thích hợp. Do polypeptit có thể được phá vỡ trong dạ dày, nó có thể được sử dụng ngoài đường tiêu hóa (chẳng hạn, tiêm dưới da, tiêm bắp, tiêm tĩnh mạch, hoặc tiêm trong da). Các chế phẩm thích hợp để dùng

ngoài đường tiêu hóa bao gồm dung dịch tiêm vô trùng trong nước và không trong nước có thể chứa chất chống oxy hoá, chất đệm, chất kìm hãm vi khuẩn và các chất tan khiến cho chế phẩm này trở nên đẳng trương với máu của cơ thể nhận; và hỗn dịch tiệt trùng trong nước và không trong nước có thể bao gồm các chất tạo hỗn dịch hoặc các chất làm đặc. Chế phẩm vacxin có thể còn chứa hệ tá dược để gia tăng khả năng sinh miễn dịch của chế phẩm mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này đã biết. Liều lượng sẽ phụ thuộc vào hoạt tính cụ thể của vacxin và có thể dễ dàng được xác định bằng thử nghiệm thông thường.

Sự biểu hiện trong hệ thay thế

Một số chiến lược đã được sử dụng để đưa các axit amin không có trong tự nhiên vào các protein trong các tế bào vật chủ không tái tổ hợp, các tế bào vật chủ đã được gây đột biến, hoặc trong hệ không chứa tế bào. Các hệ này cũng là thích hợp để sử dụng nhằm tạo ra các polypeptit relaxin theo sáng chế. Việc tạo dẫn xuất của các axit amin với các chuỗi bên phản ứng như Lys, Cys và Tyr chuyển hóa lysin thành N^2-axetyl-lysin. Tổng hợp hóa học cũng đề cập đến phương pháp dễ hiểu để kết hợp các axit amin không có trong tự nhiên. Với sự phát triển gần đây về việc nối các đoạn peptit nhờ enzym và nối các đoạn peptit theo cách tự nhiên trong hóa học, có thể tạo ra các protein lớn hơn. Ví dụ, xem: P. E. Dawson and S. B. H. Kent, *Annu. Rev. Biochem*, 69:923 (2000). Việc nối peptit hóa học và nối hóa học tự nhiên được bộc lộ trong patent Mỹ số 6,184,344, công bố patent Mỹ số. 2004/0138412, công bố patent Mỹ số. 2003/0208046, WO 02/098902, và WO 03/042235, mà được kết hợp vào sáng chế bằng cách viện dẫn. Phương pháp sinh tổng hợp *in vitro* trong đó chất chẹn ARN vận chuyển được axyl hóa hóa học bằng axit amin mong muốn không có trong tự nhiên được bổ sung vào chiết phẩm *in vitro* có khả năng giúp cho quá trình sinh tổng hợp protein, đã được sử dụng để kết hợp đặc hiệu vị trí đối với 100 các axit amin không có trong tự nhiên thành nhiều loại protein có kích thước hầu như bất kỳ. Ví dụ, xem: V. W. Cornish, D. Mendel and P. G. Schultz, Angew, *Chem. Int. Ed. Engl.*, 1995, 34:621 (1995); J. Noren, S.J, Anthony-Cahill, M.C. Griffith, P.G. Schultz, *A general method for site- specific incorporation of unnatural amino acids into proteins, Science 2*44:182-188 (1989); và J.D. Bain, C.G. Glabe, T.A. Dix, A.R. Chamberlin, E.S. Diala, *Biosynthetic site-specific incorporation of a non-natural amino*

acid into polypeptit, *J. Am. Chem. Soc.* 111: 8013- 8014 (1989). Một số lượng lớn các nhóm chức đã được đưa vào các protein trong các nghiên cứu về độ ổn định protein, việc gấp nếp protein, cơ cấu enzym, và sự tải nạp tín hiệu.

Ngoài các tài liệu tham khảo khác được trích dẫn trong bản mô tả, nhiều phương pháp tinh chế/gấp nếp protein mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này đã biết, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các phương pháp nêu trong: R. Scopes, Protein Purification, Springer-Verlag, N.Y. (1982); Deutschcr, *Methods in Enzymol*ogy Vol. 182: *Guide to Protein Purification*, Academic Press, Inc. N.Y. (1990); Sandana, (1997) *Bioseparation of Proteins*, Academic Press, Inc.; Bollag et al. (1996) *Protein Methods*, 2nd Edition Wiley-Liss, NY; Walker, (1996) *The Protein Protocols Handbook Humana Press*, NJ, Harris and Angal, (1990) *Protein Purification Applications: A Practical Approach IRL Press at Oxford, Oxford, England*; Harris and Angal, *Protein Purification Methods: A Practical Approach IRL Press at Oxford*, Oxford, England; Scopes, (1993) *Protein Purification: Principles and Practice 3rd Edition Springer Verlag*, NY; Janson and Ryden, (1998) *Protein Purification: Principles, High Resolution Methods and Applications, Second Edition Wiley-VCH*, NY; và Walker (1998), *Protein Protocols on CD- ROM Humana Press*, NJ; và các tài liệu được trích dẫn trong đó.

Một ưu điểm của việc tạo ra protein hoặc polypeptit đáng quan tâm chứa axit amin không có trong tự nhiên trong tế bào vật chủ sinh vật nhân thật hoặc tế bào vật chủ sinh vật không nhân thật là ở chỗ thông thường các protein hoặc các polypeptit sẽ có cấu hình tự nhiên gấp nếp. Tuy nhiên, Theo một số phương án, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ nhận thấy rằng, sau khi tổng hợp, biểu hiện và/hoặc tinh chế, các protein hoặc các peptit có thể có cấu hình khác với các cấu hình mong muốn của các polypeptit có liên quan. Theo một khía cạnh của sáng chế, protein hoặc polypeptit được biểu hiện tùy ý được làm biến tính và sau đó được hồi tính. Điều này được thực hiện bằng cách áp dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực phương pháp này, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, việc bổ sung chaperonin vào protein hoặc polypeptit đáng quan tâm, việc hòa tan các protein trong một tác nhân chaotropic như guaniđin HCl, sử dụng protein đisulfua isomeraza, v.v..

Nhìn chung, đôi khi muốn làm biến tính và khử các polypeptit đã được biểu hiện

và sau đó khiến cho các polypeptit tái gấp nếp thành cấu hình được ưu tiên. Ví dụ, guaniđin, ure, DTT, DTE, và/hoặc chaperonin có thể được bổ sung vào sản phẩm dịch mã đáng quan tâm. Các phương pháp khử, làm biến tính và làm hồi tính các protein đã được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này biết rõ (xem: các tài liệu tham khảo nêu trên, và Debinski, et al. (1993) *J. Biol. Chem.*, 268: 14065-14070; Kreitman and Pastan (1993) *Bioconjug. Chem.*, 4: 581-585; và Buchner et al., (1992) *Anal. Biochem.*, 205: 263-270). Ví dụ, Debinski và đồng tác giả mô tả viêc làm biến tính và việc khử các protein thể vùi trong guaniđin-DTE. Các protein có thể tái gấp nếp trong dung dịch đệm oxy hóa khử chứa, nhưng không chỉ giới hạn ở, glutathion và L-arginin đã được oxy hóa. Các chất phản ứng tái gấp nếp có thể chảy hoặc theo cách khác di chuyển để tiếp xúc với một hoặc nhiều polypeptit hoặc các sản phẩm biểu hiện khác, hoặc ngược lại.

Trong trường hợp sản xuất polypeptit relaxin ở sinh vật nhân sơ, polypeptit relaxin đã được tạo ra như vậyy có thể được gấp nếp sai và do đó không có hoạt tính sinh học hoặc có hoạt tính sinh học giảm. Hoạt tính sinh học của protein có thể được phục hồi bằng cách "tái gấp nếp". Nhìn chung, polypeptit relaxin được gấp nếp sai được tái gấp nếp bằng cách hòa tan (trong đó polypeptit relaxin cũng không hòa tan), không gấp nếp và khử chuỗi polypeptit bằng cách sử dụng, ví dụ, một hoặc nhiều tác nhân chaotrope (ví dụ, ure và/hoặc guaniđin) và tác nhân khử có khả năng khử các liên kết đisulfua (ví dụ, đithiothreitol, DTT hoặc 2-mercaptoetanol, 2-ME). Ở nồng độ chaotrope vừa phải, tác nhân oxy hoá được bổ sung vào sau đó (ví dụ, oxy, xystin hoặc xystamin), mà cho phép triệt bỏ liên kết đisulfua. Polypeptit relaxin có thể được tái gấp nếp bằng cách áp dụng các phương pháp tiêu chuẩn đã biết trong lĩnh vực phương pháp này, như các phương pháp đã được bộc lộ trong các patent Mỹ số 4,511,502, 4,511,503, và 4,512,922, mà được kết hợp vào sáng chế bằng cách viện dẫn. Polypeptit relaxin còn có thể được đồng gấp nếp với các protein khác để tạo ra heterođime hoặc heteromultime.

Sau khi tái gấp nếp, relaxin có thể được tinh chế tiếp. Việc tinh chế relaxin có thể được thực hiện bằng cách sử dụng nhiều phương pháp mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này đã biết, bao gồm sắc ký tương tác kỵ nước, phương pháp sắc ký loại cỡ, phương pháp sắc ký trao đổi ion, phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao pha đảo, phương pháp sắc ký ái lực, và các phương pháp tương tự hoặc tổ hợp bất kỳ của chúng.

Việc tinh chế tiếp theo có thể còn bao gồm bước làm khô hoặc kết tủa protein đã được tinh chế.

Sau khi tinh chế, relaxin có thể được đưa vào các dung dịch đệm khác nhau và/hoặc được cô bằng phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp đã biết trong lĩnh vực phương pháp này, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, lọc thẩm tách và thẩm tách. Relaxin mà được tạo ra ở dạng protein đã được tinh chế duy nhất có thể được kết tụ và kết tủa.

Relaxin đã được tinh chế có thể có độ tinh khiết ít nhất là 90% (đo được bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao pha đảo, RP-HPLC, hoặc điện di trên gel natri đođexyl sulfat-polyacrylamit, SDS-PAGE) hoặc độ tinh khiết ít nhất là 95%, hoặc độ tinh khiết ít nhất là 98%, hoặc độ tinh khiết ít nhất là 99% hoặc độ tinh khiết lớn hơn. Bất kể trị số chính xác của độ tinh khiết của relaxin, relaxin này có độ tinh khiết đủ để sử dụng làm dược phẩm hoặc để xử lý tiếp, như tiếp hợp với polyme hòa tan trong nước như PEG.

Các phân tử relaxin nhất định có thể được sử dụng làm các tác nhân điều trị bệnh với sự không có mặt của các hoạt chất hoặc các protein khác (ngoài các tá dược, các chất mang, và các chất làm ổn định, albumin huyết thanh và các chất tương tự), hoặc cúng có thể được tạo phức với một protein hoặc polyme khác.

Các phương pháp tinh chế chung

Bước bất kỳ trong số nhiều bước phân lập có thể được thực hiện đối với dung dịch dung giải tế bào, chất chiết, môi trường nuôi cấy, thể vùi, chất gian bào của tế bào chủ, tế bào chất của tế bào chủ, hoặc các nguyên liệu khác, chứa polypeptit relaxin hoặc hỗn hợp polypeptit relaxin thu được từ bước phân lập bất kỳ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, phương pháp sắc ký ái lực, phương pháp sắc ký trao đổi ion, phương pháp sắc ký tương tác kỵ nước, phương pháp sắc ký lọc gel, phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao ("HPLC"), phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao pha đảo ("RP-HPLC"), hấp phụ trên đệm mở rộng, hoặc tổ hợp bất kỳ và/hoặc lặp lại của chúng và theo trình tự thích hợp.

Thiết bị và các nguyên liệu cần thiết khác dùng để thực hiện các phương pháp được bộc lộ trong bản mô tả này có thể mua được trên thị trường. Các bơm, thiết bị gom

phân đoạn, thiết bị giám sát, thiết bị ghi, và toàn bộ thiết bị mua được từ, ví dụ, Applied Biosystem (Foster City, CA), Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, CA), và Amersham Biosciences, Inc. (Piscataway, NJ). Các nguyên liệu dùng cho sắc ký bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, nguyên liệu trao đổi chất nền, môi trường, và dung dịch đệm cũng do các công ty này cung cấp.

Bước làm cân bằng và các bước khác trong các phương pháp sắc ký cột được bộc lộ trong bản mô tả này như rửa và rửa giải, có thể được thực hiện nhanh hơn bằng cách sử dụng các thiết bị chuyên dụng như bơm. Bơm có bán trên thị trường bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, HILOAD® Pump P-50, Peristaltic Pump P-l, Pump P-901, và Pump P-903 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ).

Ví dụ về thiết bị gom phân đoạn bao gồm RediFrac Fraction Collector, FRAC-100 và FRAC-200 Fraction Collectors, và SUPERFRAC® Fraction Collector (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). Các thiết bị trộn cũng sẵn có để tạo ra độ pH và građien nồng độ tuyến tính. Các thiết bị trộn có bán trên thị trường bao gồm Građien Mixer GM-1 và In-Line Mixers (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ).

Phương pháp sắc ký có thể được theo dõi bằng cách sử dụng thiết bị giám sát bất kỳ có bán trên thị trường. Các thiết bị giám sát như vậy có thể được sử dụng để thu thập các thông tin như UV, độ pH, và độ dẫn điện. Ví dụ về các thiết bị phát hiện bao gồm Monitor UV-1, UVICORD® S II, Monitor UV-M II, Monitor UV-900, Monitor UPC-900, Monitor pH/C-900, và Conductivity Monitor (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). Thực vậy, toàn bộ thiết bị có thể mua được trên thị trường bao gồm các thiết bị AKTA® khác nhau từ Amersham Biosciences (Piscataway, NJ),

Theo một phương án, polypeptit relaxin có thể được khử và làm biến tính bằng cách trước tiên làm biến tính polypeptit relaxin đã được tinh chế thu được trong ure, tiếp theo pha loãng trong dung dịch đệm TRIS chứa tác nhân khử (như DTT) ở độ pH thích hợp. Theo phương án khác, polypeptit relaxin được làm biến tính trong ure ở nồng độ nằm trong khoảng từ 2M đến 9M, tiếp theo pha loãng trong dung dịch đệm TRIS ở độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 8,0. Sau đó, hỗn hợp polypeptit đã được tái gấp nếp theo phương án này có thể được ủ. Theo một phương án, hỗn hợp polypeptit tái gấp nếp được

ủ ở nhiệt độ phòng trong khoảng thời gian từ bốn đến hai mươi tư giờ. Tiếp theo, hỗn hợp polypeptit relaxin đã được khử và làm biến tính có thể được phân lập hoặc tinh chế tiếp.

Như nêu trong bản mô tả này, độ pH của hỗn hợp polypeptit relaxin ban đầu có thể được điều chỉnh trước khi tiến hành các bước phân lập bất kỳ tiếp theo. Ngoài ra, hỗn hợp polypeptit relaxin ban đầu hoặc hỗn hợp bất kỳ sau đó của chúng có thể được cô đặc bằng cách áp dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực phương pháp này. Hơn thế nữa, dung dịch đệm rửa giải chứa hỗn hợp polypeptit relaxin ban đầu hoặc hỗn hợp bất kỳ sau đó của chúng có thể được trao đổi với dung dịch đệm thích hợp dùng cho bước phân lập tiếp theo bằng cách áp dụng các phương pháp mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này đã biết.

Phương pháp sắc ký trao đổi ion

Theo một phương án, và như một bước tùy chọn khác, phương pháp sắc ký trao đổi ion có thể được thực hiện đối với hỗn hợp polypeptit relaxin ban đầu. Xem: *ION EXCHANGE CHROMATOGRAPHY: PRINCIPLES AND METHODS* (Cat. No. 18-1114-21, Amersham Biosciences (Piscataway, NJ)). Các cột trao đổi ion có bán trên thị trường bao gồm các cột HITRAP®, HIPREP®, và HILOAD® (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). Các cột như vậy sử dụng các chất trao đổi aion mạnh như Q SEPHAROZA® Fast Flow, Q SEPHAROSE® High Performance, và Q SEPHAROZA® XL; các chất trao đổi cation mạnh như SP SEPHAROZA® High Performance, SP SEPHAROZA® Fast Flow, và SP SEPHAROZA® XL; các chất trao đổi anion yếu như DEAE SEPHAROZA® Fast Flow; và các chất trao đổi cation yếu như CM SEPHAROZA® Fast Flow (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). Sắc ký cột trao đổi anion hoặc cation có thể được thực hiện đối với polypeptit relaxin ở giai đoạn bất kỳ của quy trình tinh chế để phân lập polypeptit relaxin hầu như tinh khiết. Bước sắc ký trao đổi cation có thể được thực hiện bằng cách sử dụng chất nền trao đổi cation bất kỳ thích hợp. Các chất nền trao đổi cation thông thường bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, nguyên liệu nền dạng sợi, xốp, không xốp, vi hạt, giọt, hoặc nguyên liệu nền trao đổi cation được liên kết ngang. Các chất nền trao đổi cation bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, xenluloza, agaroza, đextran, polyacrylat, polyvinyl, polystyren, silic đioxit, polyete, hoặc compozit bất kỳ trong số các nguyên liệu này.

Chất nền trao đổi cation có thể là chất trao đổi cation thích hợp bao gồm các chất trao đổi cation mạnh và yếu. Chất trao đổi cation như vậy có thể vẫn còn bị ion hóa ở độ pH nằm trong khoảng rộng và do đó, có thể có khả năng liên kết relaxin ở độ pH nằm trong khoảng rộng. Tuy nhiên, các chất trao đổi cation yếu có thể không còn bị ion hoá tùy theo độ pH. Ví dụ, chất trao đổi cation yếu có thể mất điện tích khi độ pH giảm xuống thấp hơn độ pH=4 hoặc độ pH=5. Chất trao đổi cation mạnh thích hợp bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các nhóm chức mang điện tích như sulfopropyl (SP), metyl sulfonat (S), hoặc sulfoetyl (SE). Chất nền trao đổi cation có thể là chất trao đổi cation mạnh, tốt hơn là có độ pH liên kết relaxin nằm trong khoảng từ 2,5 đến 6,0. Theo cách khác, chất trao đổi cation mạnh có thể có độ pH liên kết relaxin nằm trong khoảng từ 2,5 đến 5,5. Chất nền trao đổi cation có thể là chất trao đổi cation mạnh có độ pH liên kết relaxin bằng khoảng 3,0. Theo cách khác, chất nền trao đổi cation có thể là chất trao đổi cation mạnh, tốt hơn là có độ pH liên kết relaxin nằm trong khoảng từ 6,0 đến 8,0. Chất nền trao đổi cation có thể là chất trao đổi cation mạnh, tốt hơn nếu có độ pH liên kết relaxin nằm trong khoảng từ 8,0 đến 12,5. Theo cách khác, chất trao đổi cation mạnh có thể có độ pH liên kết relaxin nằm trong khoảng từ 8,0 đến 12,0.

Trước khi nạp relaxin, chất nền trao đổi cation có thể được làm cân bằng, ví dụ, bằng cách sử dụng vài thể tích cột chứa dung dịch axit yếu loãng, ví dụ, bốn thể tích cột chứa 20mM axit axetic, độ pH = 3. Sau khi làm cân bằng, relaxin có thể được bổ sung vào và cột này có thể được rửa một đến vài lần, trước khi rửa giải relaxin hầu như tinh khiết, cũng bằng cách sử dụng dung dịch axit yếu như dung dịch axit axetic hoặc axit phosphoric yếu. Ví dụ, khoảng 2 đến 4 lần thể tích cột chứa 20mM axit axetic, độ pH = 3, có thể được sử dụng để rửa cột này. Việc rửa tiếp bằng cách sử dụng, ví dụ, 2 đến 4 lần thể tích cột chứa 0,05M natri axetat, độ pH = 5,5, hoặc 0,05M natri axetat đã được trộn với 0,1M natri clorua, độ pH = 5,5, cũng có thể được sử dụng. Theo cách khác, bằng cách áp dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực phương pháp này, chất nền trao đổi cation có thể được làm cân bằng bằng cách sử dụng vài thể tích cột chứa bazơ yếu loãng.

Theo cách khác, relaxin hầu như tinh khiết có thể được rửa giải bằng cách cho chất nền trao đổi cation tiếp xúc với dung dịch đệm có độ pH đủ thấp hoặc độ bền ion để di rời relaxin ra khỏi chất nền. Độ pH của dung dịch đệm rửa giải có thể thay đổi trong khoảng

từ độ pH = 2,5 đến độ pH = 6,0. Cụ thể hơn, độ pH của dung dịch đệm rửa giải có thể thay đổi trong khoảng từ độ pH = 2,5 đến độ pH = 5,5, từ độ pH = 2,5 đến độ pH = 5,0. Dung dịch đệm rửa giải có thể có độ pH khoảng 3,0. Ngoài ra, lượng dung dịch đệm rửa giải có thể dao động trong khoảng rộng và nhìn chung nằm trong khoảng từ 2 đến 10 lần thể tích cột.

Sau khi hấp phụ polypeptit relaxin vào chất nền trao đổi cation, polypeptit relaxin hầu như tinh khiết có thể được rửa giải bằng cách cho nền này tiếp xúc với dung dịch đệm có độ pH đủ cao hoặc độ bền ion để di rời polypeptit relaxin ra khỏi chất nền. Dung dịch đệm thích hợp dùng để rửa giải polypeptit relaxin hầu như tinh khiết ở độ pH cao có thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, dung dịch đệm xitrat, phosphat, format, axetat, HEPES, và MES có nồng độ nằm trong khoảng từ ít nhất 5mM đến ít nhất 100mm.

Phương pháp sắc ký pha đảo

RP-HPLC có thể được thực hiện để tinh chế các protein theo các quy trình thích hợp mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này đã biết. Ví dụ, xem: Pearson et al., *ANAL BIOCHEM.* (1982) 124:217-230 (1982); Rivier et al., *J. CHROM.* (1983) 268:112-119; Kunitani et al., *J. CHROM.* (1986) 359:391-402. RP-HPLC có thể được thực hiện đối với polypeptit relaxin để phân lập polypeptit relaxin hầu như tinh khiết. Liên quan đến vấn đề này, nhựa đã được tạo dẫn xuất silic đioxit với nhóm chức alkyl có chiều dài khác nhau, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, nhựa có ít nhất 3 đến 30 nguyên tử cacbon, ít nhất 3 đến 20 nguyên tử cacbon, hoặc ít nhất 3 đến 18 nguyên tử cacbon, có thể được sử dụng. Theo cách khác, nhựa polyme có thể được sử dụng. Ví dụ, nhựa TosoHaas Amberchrome CG1000sd là nhựa polyme styren có thể được sử dụng. Nhựa xyano hoặc polyme có chiều dài chuỗi Alkyl khác nhau cũng có thể được sử dụng. Hơn thế nữa, cột RP-HPLC có thể được rửa bằng dung môi như etanol. Cột Sourse RP là một ví dụ khác về cột RP-HPLC.

Dung dịch đệm rửa giải thích hợp chứa tác nhân tạo cặp ion và chất cải biến hữu cơ như metanol, isopropanol, tetrahyđrofuran, axetonitril hoặc etanol, có thể được sử dụng để rửa giải polypeptit relaxin ra khỏi cột RP-HPLC. Các tác nhân tạo cặp ion thường hay được sử dụng nhất bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, axit axetic, axit

formic, axit percloric, axit phosphoric, axit trifloaxetic, axit heptaflobutyric, trietyl amin, tetrametylamoni, tetrabutylamoni, và trietylamoni axetat. Bước rửa giải có thể được thực hiện bằng cách sử dụng một hoặc nhiều građien hoặc các điều kiện đẳng dòng, với các điều kiện được ưu tiên để làm giảm thời gian tách và làm giảm chiều rộng pic. Một phương pháp khác bao gồm bước sử dụng hai građien với khoảng nồng độ dung môi khác nhau. Ví dụ về dung dịch đệm rửa giải thích hợp để dùng trong sáng chế có thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, dung dịch amoni axetat và axetonitril.

Các phương pháp tinh chế sắc ký tương tác kỵ nước

Sắc ký tương tác kỵ nước (HIC) có thể được thực hiện đối với polypeptit relaxin. Xem: *Hydrophobic Interaction Chromatography Handbook: Principles And Methods* (Cat. No. 18-1020-90, Amersham Biosciences (Piscataway, NJ) mà được kết hợp vào sáng chế bằng cách viện dẫn. Chất nền HIC thích hợp có thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, chất nền được thế bằng alkyl hoặc aryl, như chất nền được thế bằng butyl, hexyl, octyl hoặc phenyl bao gồm chất nền agaroza, agaroza liên kết ngang, sepharoza, xenluloza, silic đioxit, đextran, polystyren, poly(metacrylat), và nhựa hỗn hợp, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, nhựa polyetylenamin hoặc chất nền poly(metacrylat) được thế bằng butyl hoặc phenyl. Các nguồn cột sắc ký tương tác kỵ nước có bán trên thị trường bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các cột HITRAP®, HIPREP®, và HILOAD® (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ).

Một cách ngắn gọn, trước khi nạp, cột HIC có thể được làm cân bằng bằng cách sử dụng các dung dịch đệm tiêu chuẩn mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này đã biết, như dung dịch axit axetic/natri clorua hoặc HEPES chứa amoni sulfat. Amoni sulfat có thể được sử dụng làm dung dịch đệm để nạp vào cột HIC. Sau khi nạp polypeptit relaxin, cột này có thể được rửa tiếp bằng cách sử dụng dung dịch đệm và các điều kiện tiêu chuẩn để loại bỏ các nguyên liệu không mong muốn mà vẫn giữ được polypeptit relaxin trên cột HIC. Polypeptit relaxin có thể được rửa giải bằng dung dịch đệm tiêu chuẩn với lượng bằng 3 đến 10 thể tích cột, như dung dịch đệm HEPES chứa nồng độ EDTA và amoni sulfat thấp hơn trong dung dịch đệm cân bằng, hoặc dung dịch đệm axit axetic/natri clorua, ngoài những dung dịch đệm khác. Việc giảm građien muối theo cách tuyến tính bằng cách sử dụng, ví dụ, građien kali phosphat, cũng có thể được sử dụng để

rửa giải các phân tử relaxin. Sau đó, dịch rửa giải có thể được cô, ví dụ, bằng cách lọc như lọc thẩm tách hoặc siêu lọc. Việc lọc thẩm tách có thể được sử dụng để loại bỏ muối dùng để rửa giải polypeptit relaxin.

Các phương pháp tinh chế khác

Một bước phân lập khác nữa bằng cách sử dụng, ví dụ, lọc gel (GEL FILTRATION: PRINCIPLES AND METHODS (Cat. No. 18-1022-18, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) mà được kết hợp vào sáng chế bằng cách viện dẫn, phương pháp sắc ký hydroxyapatit (chất nền thích hợp bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, LLA- Ultrogel, High Resolution (Calbiochem), CHT Ceramic Hydroxyapatite (BioRad), Bio - Gel HTP Hydroxyapatite (BioRad)), phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao, hấp phụ đệm mở rộng, siêu lọc, lọc thẩm tách, làm đông khô nhanh, và cách tương tự, có thể được thực hiện đối với hỗn hợp polypeptit relaxin ban đầu hoặc các hỗn hợp bất kỳ sau đó của chúng, để loại bỏ lượng dư các muối bất kỳ và để thay thế dung dịch đệm bằng một dung dịch đệm thích hợp cho bước phân lập tiếp theo hoặc thậm chí là để tạo ra dược chất thành phẩm.

Hiệu suất của polypeptit relaxin, kể cả polypeptit relaxin hầu như tinh khiết, có thể được theo dõi ở mỗi bước được bộc lộ trong bản mô tả này bằng cách áp dụng các phương pháp mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này đã biết. Các phương pháp như vậy cũng có thể được sử dụng để đánh giá hiệu suất của polypeptit relaxin hầu như tinh khiết sau bước phân lập cuối cùng. Ví dụ, hiệu suất của polypeptit relaxin có thể được theo dõi bằng cách sử dụng cột sắc ký lỏng hiệu năng cao pha đảo bất kỳ trong số các cột sắc ký lỏng hiệu năng cao pha đảo, có chiều dài chuỗi Alkyl khác nhau như xyano RP-HPLC, C18RP-HPLC; cũng như sắc ký lỏng hiệu năng cao trao đổi cation và sắc ký lỏng hiệu năng cao lọc gel.

Theo các phương án cụ thể của sáng chế, hiệu suất của relaxin sau mỗi bước tinh chế có thể ít nhất khoảng 30%, ít nhất khoảng 35%, ít nhất khoảng 40%, ít nhất khoảng 45%, ít nhất khoảng 50%, ít nhất khoảng 55%, ít nhất khoảng 60%, ít nhất khoảng 65%, ít nhất khoảng 70%, ít nhất khoảng 75%, ít nhất khoảng 80%, ít nhất khoảng 85%, ít nhất khoảng 90%, ít nhất khoảng 91%, ít nhất khoảng 92%, ít nhất khoảng 93%, ít nhất

khoảng 94%, ít nhất khoảng 95%, ít nhất khoảng 96%, ít nhất khoảng 97%, ít nhất khoảng 98%, ít nhất khoảng 99%, ít nhất khoảng 99,9%, hoặc ít nhất khoảng 99,99% relaxin trong nguyên liệu ban đầu đối với mỗi bước tinh chế.

Độ tinh khiết có thể được xác định bằng cách áp dụng các phương pháp tiêu chuẩn, như SDS-PAGE, hoặc bằng cách xác định lượng polypeptit relaxin bằng cách sử dụng phương pháp Thấm Tách Tây và thử nghiệm ELISA. Ví dụ, các kháng thể đa dòng có thể được tạo ra đối với các protein phân lập được từ việc lên men nấm men đối chứng âm tính và thu nhận chất trao đổi cation. Các kháng thể cũng có thể được sử dụng để phát hiện sự có mặt của các protein tế bào vật chủ nhiễm bệnh.

Nguyên liệu RP-HPLC Vydac C4 (Vydac) bao gồm các hạt silicagel, các bề mặt mang mạch C_4-alkyl. Việc tách polypeptit relaxin ra khỏi tạp chất có protein dựa trên sự khác biệt về độ bền của các tương tác kỵ nước. Bước rửa giải được thực hiện với gradien axetonitril trong axit trifloaxetic loãng. Việc sắc ký lỏng hiệu năng cao điều chế được thực hiện bằng cách sử dụng cột thép không gỉ (được nạp 2,8 đến 3,2 lít silicagel Vydac C4). Dịch rửa giải hydroxyapatit Ultrogel được axit hóa bằng cách bổ sung axit trifloaxetic và nạp vào cột Vydac C4. Để rửa và rửa giải, sử dụng gradien axetonitril trong axit trifloaxetic loãng. Các phân đoạn được thu gom và ngay lập tức được trung hòa bằng dung dịch đệm phosphat. Các phân đoạn polypeptit relaxin nằm trong giới hạn IPC được thu gom.

Nguyên liệu DEAE Sepharoza (Pharmacia) chứa các nhóm đietylaminoetyl (DEAE) được liên kết cộng hóa trị với bề mặt của hạt sepharoza. Việc liên kết của polypeptit relaxin và các nhóm DEAE là nhờ các tương tác ion. Axetonitril và axit trifloaxetic đi xuyên qua cột mà không được giữ lại, sau khi các chất này được rửa ra khỏi, lượng vết tạp chất được loại ra bằng cách rửa cột bằng dung dịch đệm axetat ở độ pH thấp. Tiếp theo, cột được rửa bằng dung dịch đệm phosphat trung tính và polypeptit relaxin được rửa giải bằng dung dịch đệm với độ bền ion tăng. Cột này được nạp dòng nhanh DEAE Sepharoza. Thể tích cột được điều chỉnh để đảm bảo lượng polypeptit relaxin nạp vào với lượng nằm trong khoảng 3mg đến 10mg polypeptit relaxin/mL gel. Cột này được rửa bằng nước và dung dịch đệm cân bằng (natri/kali phosphat). Các phân đoạn thu gom được của dịch rửa giải sắc ký lỏng hiệu năng cao được nạp vào và cột này

được rửa bằng dung dịch đệm cân bằng. Tiếp theo, cột được rửa bằng dung dịch đệm rửa (dung dịch đệm natri axetat) tiếp theo rửa bằng dung dịch đệm cân bằng. Tiếp đến, polypeptit relaxin được rửa giải ra khỏi cột bằng dung dịch đệm rửa giải (natri clorua, natri/kali phosphat) và thu gom thành một phân đoạn duy nhất theo profin rửa giải chính. Dịch rửa giải từ cột DEAE Sepharoza được điều chỉnh đến độ dẫn điện quy định. Dược chất tạo ra được lọc vô trùng vào chai Teflon và bảo quản ở -70°C.

Các phương pháp khác mà có thể được sử dụng bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các bước để loại bỏ nội độc tố. Nội độc tố là các lipopoly-sacarit (LPS) nằm trên màng bên ngoài của các tế bào vật chủ Gram âm, ví dụ, *Escherichia coli*. Các phương pháp làm giảm mức nội độc tố đã được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này biết rõ và bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các phương pháp tinh chế bằng cách sử dụng lớp nền silic đioxit, bột thuỷ tinh hoặc hyđroxyapatit, phương pháp sắc ký đảo pha, ái lực, loại cỡ, phương pháp sắc ký trao đổi anion, phương pháp sắc ký tương tác kỵ nước, kết hợp các phương pháp này, và các phương pháp tương tự. Các cải biến hoặc các phương pháp khác có thể là cần thiết để loại bỏ các tạp chất như các protein đồng dịch chuyển ra khỏi polypeptit đáng quan tâm. Các phương pháp để xác định mức nội độc tố đã được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này biết rõ và bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, thử nghiệm Limulus Amebocyte Lysate (LAL). Thử nghiệm EndosafeTM-PTS là hệ thống ống so màu duy nhất sử dụng khay được nạp trước thuốc thử LAL, cơ chất tạo màu, và nội độc tố tiêu chuẩn làm mẫu đối chứng cùng với quang phổ kế cầm tay. Các phương pháp thay thế bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, phương pháp Kinetic LAL đo độ đục và sử dụng đĩa có 96 giếng.

Một loạt phương pháp và quy trình có thể được sử dụng để đánh giá hiệu suất và độ tinh khiết của protein relaxin chứa một hoặc nhiều axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, thử nghiệm Bradford, SDS-PAGE, SDS-PAGE nhuộm bạc, SDS-PAGE nhuộm coomassie, phổ khối (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, MALDI- TOF) và các phương pháp khác để xác định đặc tính các protein mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này đã biết.

Các phương pháp khác bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở: SDS-PAGE được kết hợp với các phương pháp nhuộm màu protein, thấm miễn dịch, giải hấp laze có mặt

chất nền/phổ khối ion hoá (MALDI-MS), phương pháp sắc ký lỏng/phổ khối, điện di hội tụ đẳng điện, trao đổi anion phân tích, phương pháp tinh lọc protein theo điểm đẳng điện, và phổ ánh sáng phân cực vòng.

Phương pháp *in vivo*, được gọi là kết hợp áp lực chọn lọc, được phát triển để khai thác khả năng pha tap synthetaza thể dại. Ví dụ, xem: N. Budisa, C. Minks, S. Alefelder, W. Wenger, F. M. Dong, L. Moroder and R. Huber, *FASEB J.*, 13:41 (1999). Chủng dinh dưỡng thụ động, trong đó chu trình trao đổi chất liên quan mà cung cấp cho tế bào một axit amin cụ thể có trong tự nhiên bị ngừng, được cho sinh trưởng trên môi trường chứa axit amin có trong tự nhiên này với nồng độ hạn chế, trong khi sự phiên mã gen đích bị kìm hãm. Tại thời điểm khởi đầu pha sinh trưởng ổn định, axit amin có trong tự nhiên được lấy ra và thay thế bằng axit amin tương tự không có trong tự nhiên. Sự biểu hiện của protein tái tổ hợp dẫn đến sự tích tụ protein chứa axit amin tương tự không có trong tự nhiên. Ví dụ, bằng cách sử dụng chiến lược này, o, m và p-flophenylalanin đã được kết hợp vào protein, và thể hiện hai pic đặc trưng trong phổ UV có thể dễ dàng được xác định, ví dụ xem: C. Minks, R. Huber, L. Moroder and N. Budisa, *Anal. Biochem.*, 284:29 (2000); triflomethionin đã được sử dụng để thay thế methionin trong lysozym thể thực khuẩn T4 nhằm nghiên cứu tương tác của nó với các phối tử chitooligosacarit bởi ^{19}F NMR, ví dụ xem: H, Duewel, E. Daub, V. Robinson thay J. F. Honek, *Biochemistry*, 36:3404 (1997); và trifloleuxin đã được kết hợp thay cho leuxin, tạo cho protein leuxin-zipper có độ ổn định gia tăng đối với nhiệt độ và hóa chất. Ví dụ, xem: Y. Tang, G. Ghirlanda, W. A. Petka, T. Nalcajima, W. F. DeGrado and D. A. Tirrell, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 40:1494 (2001). Hơn thế nữa, selenomethionin và telluromethionin được kết hợp vào các protein tái tổ hợp khác nhau để tạo điều kiện thuận lợi cho việc hòa tan các pha trong phương pháp phân tích tinh thể bằng tia X. Ví dụ, xem: W. A. Hendrickson, J. R. Horton and D. M. Lemaster, *EMBO J.* 9:1665 (1990); J. O. Boles, K. Lewinski, M. Kunkle, J. D. Odom, B. Dunlap, L. Lebioda and M. Hatada, *Nat. Struct. Biol.*, 1:283 (1994); N. Budisa, B. Steipe, P. Demange, C. Eckerskom, J. Kellermann and R. Huber, *Eur. J. Biochem.*, 230:788 (1995); và, N. Budisa, W. Karnbrock, S. Steinbacher, A. Humm, L. Prade, T. Neuefeind, L. Moroder and R. Huber, *J. Mol. Biol.*, 270:616 (1997). Chất tương tự methionin với nhóm chức alken hoặc alkyn cũng được kết hợp một cách hữu hiệu, cho phép cải biến tiếp các protein theo cách hóa học. Ví dụ, xem: J. C. van Hest

and D. A. Tirrell, *FEBS Lett.*. 428:68 (1998); J. C.. van Hest, K, L. Kiick và D. A, Tirrell, *J. Am. Chem. Soc.*. 122:1282 (2000); và, K. L. Kiick and D. A. Tirrell, *Tetrahedron*, 56:9487 (2000); patent Mỹ số 6,586,207; công bố patent Mỹ số 2002/0042097, mà được kết hợp vào sáng chế bằng cách viện dẫn.

Sự thành công của phương pháp này phụ thuộc vào việc nhận biết chất tương tự axit amin không có trong tự nhiên bởi aminoaxyl-ARN vận chuyển synthetaza, mà, nhìn chung, đòi hỏi tính chọn lọc cao để đảm bảo độ chính xác của quá trình dịch mã protein. Một cách để mở rộng phạm vi của phương pháp này là làm giảm tính đặc hiệu cơ chất của aminoaxyl-ARN vận chuyển synthetaza, mà đã có được trong một số trường hợp hữu hạn. Ví dụ, sự thay thế Ala^{294} bởi Gly bởi phenylalanyl-ARN vận chuyển synthetaza (PheRS) ở *Escherichia coli* làm tăng kích thước của túi liên kết cơ chất, tạo ra sự axyl hóa tRNAPhe bởi p-Cl-phenylalanin (p-Cl-Phe), Xem, M. Tbba, P. Kast and H. Hennecke, *Biochemistry*, 33:7107 (1994). Chủng *Escherichia coli* chứa thể đột biến PheRS này cho phép kết hợp p-Cl-phenylalanin hoặc p-Br-phenylalanin thay vì phenylalanin. Ví dụ, xem: M, Ibba and H. Hennecke, *FEBS Lett.*, 364:272 (1995); và, N. Sharma, R. Furter, P. Kast and D. A. Tirrell, *FEBS Lett.*, 467:37 (2000). Tương tự, đột biến điểm Phel30Ser gần vị trí liên kết axit amin của tyrosyl-ARN vận chuyển synthetaza ở *Escherichia coli* đã được chỉ ra để cho phép azatyrosin được kết hợp một cách có hiệu quả hơn so với tyrosin. Xem: F. Hamano-Takaku, T. Iwama, S. Saito-Yano, K. Takaku, Y. Monden, M. Kitabatake, D. Soll and S. Nishimura, *J. Biol. Chem.*. 275:40324 (2000).

Một chiến lược khác để kết hợp các axit amin không có trong tự nhiên vào các protein *in vivo* là cải biến synthetaza mà có cơ chế đọc sửa. Các synthetaza này không thể phân biệt và do đó hoạt hóa các axit amin có cấu trúc tương tự với axit amin có trong tự nhiên có cùng nguồn trực giao gốc. Lỗi này được sửa chữa ở một vị trí riêng biệt, mà loại axyl của axit amin được nạp sai ra khỏi ARN vận chuyển để duy trì độ chính xác của quá trình dịch mã protein. Khi hoạt tính đọc sửa của synthetaza bị vô hiệu hóa, chất tương tự về mặt cấu trúc không được hoạt hóa có thể không được chỉnh sửa và kết hợp vào. Phương pháp này đã được thể hiện gần đây với valyl-ARN vận chuyển synthetaza (ValRS). Xem: V. Doring, H. D. Mootz, L. A, Nangle, T. L. Hendrickson, V. de Crecy-Lagard, P. Schimmel and P, Marliere, *Science*. 292:501 (2001), ValRS có thể aminoaxyl

hóa sai tRNAVal với Cys, Thr, hoặc aminobutyrat (Abu); sau đó các axit amin không cùng nguồn gốc này được thủy phân bằng miền chỉnh sửa. Sau khi gây đột biến ngẫu nhiên nhiễm sắc thể *Escherichia coli*, thể đột biến chủng *Escherichia coli* được chọn có đột biến ở vị trí chỉnh sửa của ValRS. ValRS có khiếm khuyết về mặt chỉnh sửa này đưa Cys vào tRNAVal theo cách không đúng. Vì Abu tương đồng về mặt không gian với Cys (nhóm -SH bao gồm Cys được thế bằng -CH3 ở Abu), thể đột biến ValRS cũng kết hợp Abu vào các protein khi chủng *Escherichia coli* đột biến này được phát triển với sự có mặt của Abu. Việc phân tích phổ khối cho thấy khoảng 24% valin được thế bằng Abu ở mỗi vị trí valin trong protein nguyên chất.

Các phương pháp tổng hợp và bán tổng hợp pha rắn cũng đã cho phép tổng hợp nhiều protein chứa các axit amin mới. Ví dụ, xem các công bố sau và các tài liệu trích dẫn trong đó, cụ thể như sau: Crick, F.H.C., Barrett, L. Brenner, S. Watts-Tobin, R. *General nature of the genetic code for proteins. Nature*. 192:1227-1232 (1961); Hofmann, K., Bohn, H. *Studies on polypeptides.* XXXVI. *The effect of pyrazole-imidazole replacements on the S-protein activating potency of an S-peptide fragment*, *J. Am Chem.* 88(24):5914-5919 (1966); Kaiser, E.T. *Synthetic approaches to biologically active peptides and proteins including enyzmes*, *Acc Chem Res.* 22:47-54 (1989); Nakatsuka, T., Sasaki, T., Kaiser, E.T. *Peptide segment coupling catalyzed by the semisynthetic enzyme thiosubtilisin*, *J Am Chem Soc.* 109:3808-3810 (1987); Schnolzer, M., Kent, S B H. *Constructing proteins by dovetailing unprotected synthetic peptides: backbone-engineered HIV protease*, *Science*. 256(5054):221-225 (1992); Chaiken, I.M. *Semisynthetic peptides and proteins*, *CRC Crit Rev Biochem.* 11(3):255-301 (1981); Offord, R.E. *Protein Engineering by chemical means? Protein Eng.*. 1(3): 151-157 (1987); và Jackson, D.Y., Burnier, J., Quan, C., Stanley, M., Tom, J., Wells, J.A. *A Designed Peptide Ligase for Total Synthesis of Ribonuclease A with Unnatural Catalytic Residues*, *Science*. 266(5183):243 (1994).

Việc cải biến hóa học đã được sử dụng để đưa nhiều loại chuỗi bên không có trong tự nhiên, bao gồm đồng yếu tố, dấu spin và oligonucleotit vào các protein *in vitro*. Ví dụ, xem: Corey, D.R., Schultz, P.G. *Generation of a hybrid sequence-specific single-stranded deoxyribonuclease*, *Science*. 238(4832): 1401-1403 (1987); Kaiser, E.T., Lawrence D.S.,

Rokita, S.E. *The chemical modification of enzymatic specificity*, *Annu Rev Biochem.* 54:565- 595 (1985); Kaiser, E.T., Lawrence, D.S. *Chemical mutation of enyzme active sites*, *Science*. 226(4674):505-511 (1984); Neet, K.E., Nanci A, Koshland, D.E. *Properties of thiol-subtilisin*, *J Biol. Chem.* 243(24):6392-6401 (1968); Polgar, L, et M.L. Bender. *A new enzyme chứa a synthetically formed active site. Thiol-subtilisin. J. Am Chem Soc.* 88:3153-3154 (1966); và Pollack, S.J., Nakayama, G. Schultz, P,G, *Introduction of nucleophiles and spectroscopic probes into antibody combining sites*, *Science*. 242(4881):1038-1040 (1988).

Theo cách khác, các phương pháp sinh tổng hợp có sử dụng aminoaxyl-ARN vận chuyển được cải biến theo phương pháp hóa học đã được sử dụng để kết hợp một số mẫu dò sinh lý vào các protein được tổng hợp *in vitro*. Xem các công bố sau và các tài liệu trích dẫn trong đó: Brunner, *J. New Photolabeling and crosslinking methods*, *Annu. Rev Biochem*, 62:483-514 (1993); và Krieg, U.C., Walter, P., Hohnson, A.E. *Photocrosslinking of the signal sequence of nascent preprolactin of the 54-kilodalton polypeptide of the signal recognition particle*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83(22):8604-8608 (1986).

[468] Trước đây, đã chỉ ra rằng các axit amin không có trong tự nhiên có thể được kết hợp đặc hiệu với vị trí vào các protein *in vitro* bằng cách bổ sung chất ức chế ARN vận chuyển đã được aminoaxyl hóa hóa học vào các phản ứng tổng hợp protein đã được lập trình với gen chứa đột biến đối nghĩa amber mong muốn. Bằng cách áp dụng các phương pháp này, có thể thay thế nhiều axit amin trong số hai mươi axit amin thông thường bằng chất đồng đẳng gần gũi về mặt cấu trúc, ví dụ, flophenylalanin thay cho phenylalanin, bằng cách sử dụng chủng khuyết dưỡng đối với một axit amin cụ thể. Ví dụ, xem: Noren, C.J,, Anthony-Cahill, Griffith, M.C., Schultz, P.G. *A general method for site-specific incorporation of unnatural amino acids into proteins*, *Science*, 244: 182-188 (1989); M.W. Nowak, et al., *Science* 268:439-42 (1995); Bain, J.D., Glabe, C.G., Dix, T.A., Chamberlin, A.R., Diala, E.S. *Biosynthetic site-specific incorporation of a non-natural amino acid into polypeptit*, *J. Am Chem Soc*, 111:8013-8014 (1989); N. Budisa et al., *FASEB J.* 13:41-51 (1998); Ellman, J.A., Mendel, D., Anthony-Cahill, S., Noren, C.J., Schultz, P.G. *Biosynthetic method for introducing unnatural amino acids site-specifically*

into proteins. *Methods in Enz.*, vol. 202, 301-336 (1992); và Mendel, D., Comish, V.W. & Schultz, P.G. *Site-Directed Mutagenesis with an Expanded Genetic Code*, *Annu Rev Biophys. Biomol Struct.* 24, 435-62 (1995).

Ví dụ, chất ức chế ARN vận chuyển được điều chế mà nhận biết bộ ba mã hóa kết thúc UAG và aminoaxyl hóa hóa học với axit amin không có trong tự nhiên. Việc gây đột biến định hướng điểm thông thường được sử dụng để đưa bộ ba mã hóa kết thúc TAG, ở vị trí đáng quan tâm vào gen protein. Ví dụ, xem: Sayers, J.R., Schmidt, W. Eckstein, F. *5'-3' Exonucleaseas in phosphorothioate-based olignoucleotide-directed mutagensis*, *Axit nucleics Res*, 16(3):791- 802 (1988). Khi chất ức chế ARN vận chuyển đã được axyl hóa và gen đột biến được kết hợp trong một hệ phiên mã/dịch mã *in vitro*, axit amin không có trong tự nhiên này được kết hợp để đáp lại bộ ba mã hóa UAG tạo ra protein chứa axit amin này ở vị trí được chỉ ra. Các thử nghiệm có sử dụng [^{3}H]-Phe và các thử nghiệm với các axit α-hyđroxy đã chứng tỏ rằng chỉ có các axit amin mong muốn được kết hợp ở vị trí được chỉ ra bởi bộ ba mã hóa UAG và chứng tỏ rằng axit amin này không được kết hợp ở vị trí bất kỳ khác trong protein. Ví dụ, xem tài liệu của Norcn và đồng tác giả nêu trên, Kobayashi et al., (2003) *Nature Structural Biology* 10(6):425-432; và Ellman, J.A., Mendel, D., Schultz, P.G. *Site-specific incorporation of novel backbone structures into proteins*, *Science*. 255(5041): 197-200 (1992).

ARN vận chuyển có thể được aminoaxyl hóa với axit amin mong muốn bằng phương pháp hoặc phương pháp bất kỳ, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, aminoaxyl hóa hóa học hoặc enzym.

Việc minoaxyl hóa có thể được thực hiện bằng aminoaxyl ARN vận chuyển synthetaza hoặc bằng các phân tử enzym khác, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, ribozym. Thuật ngữ "ribozym" có thể thay cho "ARN xúc tác". Cech và đồng tác giả (Cech, 1987, *Science*, 236:1532-1539; McCorkle et al., 1987, *Concepts Biochem.* 64:221-226) đã chứng tỏ sự có mặt của các ARN có trong tự nhiên có thể hoạt động như các chất xúc tác (ribozym). Tuy nhiên, mặc dù các chất xúc tác ARN có trong tự nhiên chỉ được chứng tỏ là tác dụng lên các cơ chất axit ribonucleic để phân cắt và ghép nối, những phát triển mới đây về khai triển nhân tạo các ribozym đã mở rộng kho chất xúc tác đối với các phản ứng hóa học khác nhau. Các nghiên cứu đã xác định được các phân tử ARN có thể

xúc tác liên kết aminoaxyl-ARN ở các đầu tận cùng (2')3' của riêng nó (Illangakekare et al., 1995 *Science* 267:643-647), và phân tử ARN mà có thể vận chuyển axit amin từ một phân tử ARN sang một phân tử khác (Lohse et al., 1996, *Nature* 381:442-444).

Công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ 2003/0228593, mà được kết hợp vào sáng chế bằng cách viện dẫn, mô tả các phương pháp xây dựng ribozym và sử dụng chúng trong aminoaxyl hóa ARN vận chuyển với axit amin được mã hóa có trong tự nhiên và axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên. Các dạng cố định cơ chất của các phân tử enzym mà có thể aminoaxyl hóa ARN vận chuyển, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, ribozym, có thể cho phép tinh chế ái lực một cách có hiệu quả các sản phẩm đã được aminoaxyl hóa. Ví dụ về các cơ chất thích hợp bao gồm agaroza, sepharoza, và hạt có từ tính. Việc sản xuất và sử dụng dạng cố định cơ chất của ribozym để aminoaxyl hóa được bộc lộ trong: *Chemistry and Biology* 2003, 10:1077-1084 và Công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 2003/0228593, mà được kết hợp vào sáng chế bằng cách viện dẫn.

Các phương pháp aminoaxyl hóa hóa học bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các phương pháp do Hecht và đồng tác giả đề xuất (Hecht, S. M, *Acc. Chem. Res.* 1992, 25, 545; Heckler, T. G.; Roesser, J. R.; Xu, C.; Chang, P.; Hecht, S. M. *Biochemistry* 1988, 27, 7254; Hecht, S. M.; Alford, B. L.; Kuroda, Y.; Kitano, S. *J. Biol. Chem.* 1978, 253, 4517) và do Schultz, Chamberlin, Dougherty và các tác giả khác đề xuất (Cornish, V. W.; Mendel, D.; Schultz, P. G. *Angew. Chem. Int. Ed.* Engl. 1995, 34, 621; Robertson, S. A.; Ellman, J, A.; Schultz, P. G. *J. Am. Chem. Soc.* 1991, 113, 2722; Noren, C. J.; Anthony-Cahill, S, J.; Griffith, M. C.; Schultz, P. *Science* 1989, 244, 182; Bain, J. D.; Glabe, C. G.; Dix, T. A.; Chamberlin, A. R. *J. Am. Chem. Soc.* 1989, 111, 8013; Bain, J. D. et al, *Nature* 1992, 356, 537; Gallivan, J. P.; Lester, A.; Dougherty, D, A. *Chem. Biol.* 1997, 4, 740; Turcatti, et al., *J. Biol. Chem,* 1996, 271, 19991; Nowak, M. W. et al., *Science*, 1995, 268, 439; Saks, M. E. et al., *J. Biol. Chem.* 1996, 271, 23169; Hohsaka, T. et al., *J. Am. Chem. Soc.* 1999, 121, 34), mà được kết hợp vào sáng chế bằng cách viện dẫn, để tránh việc sử dụng synthetaza trong quá trình aminoaxyl hóa. Các phương pháp này hoặc các phương pháp aminoaxyl hóa hóa học khác có thể được sử dụng để aminoaxyl hóa các phân tử ARN vận chuyển.

Phương pháp tổng hợp ARN xúc tác có thể bao gồm bước tạo ra các phần thu gom

riêng biệt của trình tự ribozym ngẫu nhiên, thực hiện sự khai triển định hướng đối với các phần thu gom này, sàng lọc các phần thu gom có hoạt tính aminoaxyl hóa mong muốn, và chọn lọc các trình tự của các ribozym này thể hiện hoạt tính aminoaxyl hóa mong muốn.

Ribozym có thể chứa các motif và/hoặc vùng tạo điều kiện thuận lợi cho hoạt tính axyl hóa, như motif GGU và vùng giàu U. Ví dụ, đã có thông báo rằng vùng giàu U có thể tạo điều kiện thuận lợi cho việc nhận biết cơ chất axit amin, và motif GGU có thể tạo ra các cặp bazơ với đầu tận cùng 3' của ARN vận chuyển. Kết hợp lại, motif GGU và vùng giàu U tạo điều kiện thuận lợi cho việc nhận biết đồng thời cả axit amin và ARN vận chuyển một cách đồng thời, và bằng cách đó tạo điều kiện thuận lợi cho sự aminoaxyl hóa đầu tận cùng 3' của ARN vận chuyển này.

Ribozym có thể được tạo ra bằng cách chọn lọc *in vitro* có sử dụng r24mini được ngẫu nhiên hóa một phần tiếp hợp với $tRNA^{Asn}_{CCCG}$, tiếp theo sắp xếp trong toàn hệ trình tự liên ứng tìm thấy ở các dòng có hoạt tính. Ví dụ về ribozym thu được theo phương pháp này được gọi là "Fx3 ribozym" và được bộc lộ trong công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 2003/0228593, toàn bộ nội dung của tài liệu này được kết hợp vào sáng chế bằng cách viện dẫn, hoạt động như chất xúc tác đa năng cho quy trình tổng hợp các aminoaxyl-ARN vận chuyển khác nhau chứa các axit amin không có trong tự nhiên có cùng nguồn gốc.

Việc cố định trên cơ chất có thể được sử dụng để cho phép tinh chế ái lực hữu hiệu ARN vận chuyển đã được aminoaxylat hóa. Ví dụ về các cơ chất thích hợp bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, agaroza, sepharoza, và hạt có từ tính. Ribozym có thể được cố định trên nhựa bằng cách tận dụng các cấu trúc hóa học của ARN, như 3'-cis-điol trên riboza của ARN có thể được oxy hóa bằng periođat để tạo ra đialđehyt tương ứng tạo điều kiện thuận lợi cho việc cố định ARN trên nhựa. Các loại nhựa khác nhau có thể được sử dụng bao gồm nhựa hyđrazit rẻ tiền, trong đó việc amin hóa khử tạo ra liên kết không thuận nghịch giữa nhựa và ribozym. Việc tổng hợp aminoaxyl-ARN vận chuyển có thể được tạo điều kiện thuận lợi đáng kể bởi phương pháp aminoaxyl hóa trên cột. Kourouklis và đồng tác giả, *Methods* 2005; 36:239-4, mô tả hệ aminoaxyl hóa trên cột.

Việc phân lập ARN vận chuyển đã được aminoaxyl hóa có thể được thực hiện theo

nhiều cách. Một phương pháp thích hợp là rửa giải ARN vận chuyển đã được aminoaxyl hóa ra khỏi cột bằng dung dịch đệm như dung dịch natri axetat với 10mM EDTA, dung dịch đệm chứa 50mM N-(2-hyđroxyetyl)piperazin-N'-(3-propanaxit sulfonic), 12,5mM KC1, độ pH=7,0, 10mM EDTA, hoặc đơn giản là dung dịch đệm EDTA trong nước (độ pH=7,0).

ARN vận chuyển đã được aminoaxyl hóa có thể được bổ sung vào các phản ứng dịch mã để kết hợp axit amin mà ARN vận chuyển này đã được aminoaxyl hóa với nó ở vị trí lựa chọn trong polypeptit đã được tạo ra trong phản ứng dịch mã. Ví dụ về hệ dịch mã, trong đó ARN vận chuyển đã được aminoaxyl hóa theo sáng chế có thể được sử dụng bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, dung dịch dung giải tế bào. Dung dịch dung giải tế bào tạo ra các thành phần phản ứng cần thiết để dịch mã *in vitro* polypeptit từ ARN thông tin nạp vào. Ví dụ về các thành phần phản ứng bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, protein ribosom, ARN ribosom, axit amin, ARN vận chuyển, GTP, ATP, trình tự khởi đầu dịch mã và các nhân tố kéo dài và các nhân tố khác liên quan đến sự dịch mã. Ngoài ra, hệ dịch mã có thể là dịch mã cùng một lúc hoặc dịch mã được chia thành ngăn. Hệ dịch mã cùng một lúc kết hợp các thành phần phản ứng trong một ngăn duy nhất trong khi hệ dịch mã được chia thành ngăn sẽ tách các thành phần phản ứng dịch mã ra khỏi các sản phẩm phản ứng mà có thể ức chế có hiệu quả sự dịch mã. Hệ dịch mã như vậy có bán trên thị trường.

Ngoài ra, hệ phiên mã/dịch mã kết hợp có thể được sử dụng. Hệ phiên mã/dịch mã kết hợp cho phép phiên mã cả ADN ra thành ARN thông tin tương ứng, về phần mình ARN thông tin này lại được dịch mã bởi các thành phần phản ứng. Ví dụ về hệ phiên mã/dịch mã kết hợp có bán trên thị trường là hệ dịch mã nhanh (Rapid Translation System) (RTS, Roche Inc.). Hệ này chứa hỗn hợp chứa dung dịch dung giải *E. coli* để tạo ra các thành phần dịch mã như ribosom và các yếu tố dịch mã. Ngoài ra, ARN polymeaza tham gia vào quá trình phiên mã của ADN vào thành khuôn mẫu ARN thông tin để sử dụng trong dịch mã. RTS có thể sử dụng việc chia ngăn các thành phần phản ứng bằng màng đặt giữa các ngăn phản ứng, bao gồm ngăn tiếp liệu/thải và ngăn phiên mã/dịch mã.

Aminoaxyl hóa ARN vận chuyển có thể được thực hiện bằng các tác nhân khác, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, transferaza, polymeaza, các kháng thể xúc tác,

protein đa chức năng, và các tác nhân tương tự.

Stephan, trong tài liệu: *Scientist* 2005 Oct 10; pages 30-33, đã mô tả các phương pháp khác để kết hợp axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên vào protein. Lu và đồng tác giả, trong tài liệu: *Mol Cell.* 2001 Oct;8(4):759-69, đã mô tả phương pháp trong đó protein được ghép nối hóa học với peptit tổng hợp chứa các axit amin không có trong tự nhiên (ghép nối protein đã được biểu hiện).

Các phương pháp vi tiêm cũng được sử dụng để kết hợp các axit amin không có trong tự nhiên vào protein. Ví dụ, xem: M, W. Nowak, P. C, Kearney, J. R. Sampson, M. E. Saks, C. G. Labarca, S. K. Silverman, W. G. Zhong, J. Thorson, J. N. Abelson, N. Davidson, P. G, Schultz, D. A. Dougherty and H. A. Lester, *Science*, 268:439 (1995); và, D. A. Dougherty, *Curr. Onin. Chem. Biol.*, 4:645 (2000). Noãn bào Xenopus được tiêm đồng thời với hai loại ARN được tạo ra *in vitro*: ARN thông tin mã hóa protein đích với bộ ba mã hóa kết thúc UAG ở vị trí axit amin đáng quan tâm và ARN vận chuyển ức chế amber được aminoaxyl hóa với axit amin không có trong tự nhiên mong muốn. Sau đó, bộ máy dịch mã của noãn bào cài xen axit amin không có trong tự nhiên ở vị trí được chỉ ra bởi UAG. Phương pháp này cho phép nghiên cứu cấu trúc-chức năng *in vivo* của protein màng toàn vẹn, mà thường không tuân theo hệ biểu hiện *in vitro*. Các ví dụ bao gồm việc kết hợp một axit amin phát huỳnh quang vào thụ thể tachykinin neurokinin-2 để xác định khoảng cách bằng bộ truyền năng lượng cộng hưởng phát huỳnh quang, ví dụ xem: G. Turcatti, K. Nemeth, M, D. Edgerton, U. Meseth, F. Talabot, M. Peitsch, J. Knowles, H. Vogel and A, Chollet, *J. Biol. Chem.*, 271:19991 (1996); sự kết hợp của các axit amin đã được biotinyl hóa để xác định gốc lộ ra bề mặt ở các kênh ion, ví dụ xem: J. P. Gallivan, H. A. Lester và D. A. Dougherty, *Chem. Biol.*, 4:739 (1997); việc sử dụng chất tương tự tyrosin đã được đóng khung để theo dõi các thay đổi về cấu hình ở kênh ion theo thời gian thực, ví dụ, xem: J. C. Miller, S. K. Silverman, P. M. England, D. A. Dougherty và H. A. Lester, Neuron, 20:619 (1998); và, sử dụng các axit amin alpha hyđroxy để thay đổi bộ khung kênh ion để tìm ra cơ chế đi qua của chúng. Ví dụ, xem: P. M. England, Y. Zhang, D. A. Dougherty và H. A. Lester, *Cell*, 96:89 (1999); và, T. Lu, A. Y. Ting, J. Mainland, L. Y. Jan, P. G. Schultz and J. Yang, *Nat. Neurosci.*, 4:239 (2001),

Khả năng kết hợp trực tiếp các axit amin không có trong tự nhiên vào các protein

in vivo tạo ra nhiều ưu điểm bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, hiệu suất protein đột biến cao, dễ thực hiện, có tiềm năng nghiên cứu các protein đột biến trong tế bào hoặc có thể trong vi sinh vật sống và việc sử dụng các protein đột biến này cho các ứng dụng điều trị và chẩn đoán bệnh. Khả năng đưa các axit amin không có trong tự nhiên với các kích thước, tính axit, tính ái nhân, tính kỵ nước khác nhau, và các tính chất khác vào các protein có thể giúp mở rộng rõ rệt khả năng tạo cấu trúc protein một cách hợp lý và có tính hệ thống, để khảo sát chức năng protein cũng như tạo ra các protein mới hoặc vi sinh vật với các đặc tính mới.

Khi cố gắng kết hợp đặc hiệu với vị trí para-F-Phe, cặp tRNAPheCUA ức chế amber ở nấm men/phenylalanyl-ARN vận chuyển synthetaza được sử dụng ở chủng *Escherichia coli* dinh dưỡng thụ động với Phe và kháng p-F-Phe. Ví dụ, xem: R. Furter, *Protein Sci.*, 7:419 (1998).

Cũng có thể biểu hiện được polynucleotit relaxin theo sáng chế bằng cách sử dụng hệ dịch mã không chứa tế bào (*in vitro*). hệ dịch mã có thể chứa tế bào hoặc không chứa tế bào, và có thể thuộc sinh vật nhân sơ hoặc sinh vật nhân thật. hệ dịch mã chứa tế bào bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, chế phẩm chứa toàn bộ tế bào như tế bào được thấm qua hoặc dịch nuôi cấy tế bào trong đó trình tự axit nucleic mong muốn có thể được phiên mã thành ARN thông tin và ARN thông tin này được dịch mã. hệ dịch mã không chứa tế bào có thể mua được trên thị trường và nhiều loại và hệ khác nhau đã được biết rõ. Ví dụ về hệ không chứa tế bào bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các dung dịch dung giải nhân sơ như dung dịch dung giải *Escherichia coli*, và các dung dịch dung giải của sinh vật nhân thật như dịch chiết mầm lúa mì, dung dịch dung giải tế bào côn trùng, dung dịch dung giải tế bào lưới của thỏ, các dung dịch dung giải noãn bào của thỏ và dung dịch dung giải tế bào của người. Dịch chiết hoặc dung dịch dung giải sinh vật nhân thật có thể được ưu tiên khi protein thu được được glycosyl hóa, được phosphoryl hóa hoặc theo cách khác được cải biến do nhiều cải biến như vậy chỉ có thể xảy ra ở hệ sinh vật nhân thật. Một vài trong số các dịch chiết và các dung dịch dung giải này có bán trên thị trường (Promega; Madison, Wis.; Stratagene; La Jolla, Calif.; Amersham; Arlington Heights, 111.; GIBCO/BRL; Grand Island, N.Y.). Dịch chiết màng, như dịch chiết tuyến tuỵ của giống chó chứa các màng microsom, cũng có bán, là hữu dụng đối với việc dịch

mã protein tiết. Trong các hệ này, mà có thể bao gồm ARN thông tin làm khuôn mẫu (dịch mã *in vitro*) hoặc ADN làm khuôn mẫu (kết hợp sự phiên mã và sự dịch mã *in vitro*), việc tổng hợp *in vitro* được thực hiện bởi ribosom. Các nỗ lực đáng kể đã được sử dụng để phát triển hệ biểu hiện protein không chứa tế bào. Ví dụ, xem: Kim, D.M. and J.R. Swartz, *Biotechnology and Bioengineering*, 74 :309-316 (2001); Kim, D.M. và J,R. Swartz, Biotechnology Letters, 22, 1537-1542, (2000); Kim, D.M., và J.R. Swartz, *Biotechnology Progress*, 16, 385-390, (2000); Kim, D.M., và J.R. Swartz, *Biotechnology and Bioengineering*, 66, 180-188, (1999); và Patnaik, R. và J,R. Swartz, Biotechniques 24, 862-868, (1998); patent Mỹ số 6,337,191; công bố patent Mỹ số. 2002/0081660; WO 00/55353; WO 90/05785, mà được kết hợp vào sáng chế bằng cách viện dẫn. Một cách khác mà có thể được sử dụng để biểu hiện các polypeptit relaxin chứa axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên bao gồm phương pháp dung hợp ARN thông tin-peptit. Ví dụ, xem: R. Roberts and J. Szostak, *Proc. Natl Acad. Sci.* (USA) 94:12297-12302 (1997); A. Frankel, et al., *Chemistry & Biology* 10:1043-1050 (2003). Theo cách này, khuôn mẫu ARN thông tin được liên kết với puromyxin được dịch mã thành peptit trên ribosom. Khi một hoặc nhiều phân tử ARN vận chuyển được cải biến, các axit amin không có trong tự nhiên cũng có thể được kết hợp vào peptit. Sau khi bộ ba mã hóa ARN thông tin được đọc, puromyxin chiếm đầu tận cùng C của peptit này. Khi thể tiếp hợp ARN thông tin-peptit thu được được phát hiện là có các đặc tính đáng quan tâm trong thử nghiệm *in vitro*, thì tính đồng nhất của nó có thể dễ dàng được bộc lộ từ trình tự ARN thông tin. Theo cách này, có thể sàng lọc các thư viện chứa các polypeptit relaxin chứa một hoặc nhiều axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên để xác định các polypeptit có các đặc tính mong muốn. Mới gần đây, đã có thông báo rằng sự dịch mã ribosom *in vitro* bằng các thành phần đã được tinh chế cho phép tổng hợp các peptit được thế bằng axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên. Ví dụ, xem: A. Forster et al., *Proc. Natl Acad. Sci.* (USA) 100:6353 (2003).

Hệ dịch mã được hồi phục cũng có thể được sử dụng. Các hỗn hợp chứa các yếu tố dịch mã tinh khiết cũng được sử dụng một cách thành công để dịch mã ARN thông tin thành protein cũng như kết hợp các dung dịch dung giải hoặc các dung dịch dung giải có bổ sung các yếu tố dịch mã tinh khiết như yếu tố khởi đầu-1 (IF-1), IF-2, IF-3 (α hoặc β), yếu tố kéo dài T (EF-Tu), hoặc các yếu tố kết thúc. Hệ không chứa tế bào còn có thể là hệ

phiên mã/dịch mã kết hợp, trong đó ADN được đưa vào hệ này, phiên mã thành ARN thông tin và ARN thông tin này dịch mã như đã được bộc lộ trong *Current Protocols in Biology* (F. M, Ausubel et al, editors, Wiley Interscience, 1993), mà được kết hợp vào sáng chế bằng cách viện dẫn. ARN phiên mã trong hệ phiên mã sinh vật nhân thật có thể ở dạng ARN nhân khác loại (heteronuclear RNA - hnRNA) hoặc ARN thông tin trưởng thành có đuôi poly A ở đầu 3' và gắn mũ (7-metyl guanosin) ở đầu 5', đây có thể là một lợi thế trong một số hệ dịch mã. Ví dụ, ARN thông tin đã được gắn mũ được dịch mã với hiệu quả cao ở hệ dung dịch dung giải tế bào lưới.

Các polyme phân tử lớn ghép cặp với các polypeptit relaxin

Các cải biến khác nhau đối với các polypeptit chứa axit amin không có trong tự nhiên được bộc lộ trong bản mô tả này có thể được thực hiện bằng cách sử dụng các dược phẩm, các phương pháp, các phương pháp và chiến lược được bộc lộ trong bản mô tả này. Các cải biến này bao gồm việc kết hợp một nhóm chức khác vào thành phần axit amin không có trong tự nhiên của polypeptit, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, nhãn; chất nhuộm; polyme; polyme hòa tan trong nước; dẫn xuất của polyetylen glycol; chất liên kết chéo quang học; đồng vị phóng xạ; hợp chất gây độc tế bào; dược chất; nhãn ái lực; nhãn ái lực quang học; hợp chất phản ứng; nhựa; protein thứ hai hoặc polypeptit hoặc chất tương tự polypeptit; kháng thể hoặc đoạn kháng thể; chất tạo chelat kim loại; đồng yếu tố; axit béo; hyđrat cacbon; polynucleotit; ADN; ARN; polynucleotit đối nghĩa; sacarit; polyme hòa tan trong nước tổng hợp dạng cây; xyclođextrin; axit ribonucleic ức chế; vật liệu sinh học; hạt nano; dấu spin; nhóm huỳnh quang, gốc chứa kim loại; gốc phóng xạ; nhóm chức mới; nhóm tương tác cộng hóa trị hoặc không cộng hóa trị với các phân tử khác; gốc kiểu lồng quang học; gốc dễ bị kích thích bởi sự phóng xạ quang hóa; gốc có khả năng quang đồng phân hóa; biotin; dẫn xuất của biotin; chất tương tự biotin; gốc có nguyên tử có khối lượng phân tử lớn; nhóm có thể phân cắt hóa học; nhóm có thể phân cắt quang học; chuỗi bên kéo dài; đường liên kết với cacbon; chất hoạt hóa quá trình oxy hóa khử; amino thioaxit; gốc có tính độc ; gốc được gắn nhãn đồng vị ; đoạn dò sinh lý; nhóm lân quang; nhóm phát quang hóa học; nhóm dày đặc điện tử; nhóm từ tính; nhóm xen giữa; nhóm mang màu; chất vận chuyển năng lượng; chất có hoạt tính sinh học; chất đánh dấu có thể phát hiện được; phân tử nhỏ; chấm lượng tử; chất vận chuyển nano;

nucleotit phóng xạ; chất vận chuyển phóng xạ; chất bắt giữ nơtron; hoặc tổ hợp bất kỳ của các chất này, hoặc các hợp chất hoặc chất mong muốn bất kỳ khác. Để làm ví dụ chỉ nhằm mục đích minh họa mà không giới hạn phạm vi của sáng chế về các dược phẩm, các phương pháp, các phương pháp và chiến lược được bộc lộ trong bản mô tả này, phần mô tả sau sẽ tập trung vào việc bổ sung các polyme phân tử lớn vào polypeptit chứa axit amin không có trong tự nhiên khi hiểu rằng các dược phẩm, phương pháp, phương pháp và chiến lược được bộc lộ trong bản mô tả này cũng có thể áp dụng (với những cải biến thích hợp, nếu cần và người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể tạo ra những cải biến với phần mô tả được bộc lộ ở đây) để bổ sung các nhóm chức khác, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các nhóm nêu trên.

Một loạt polyme phân tử lớn và các phân tử khác có thể được liên kết với các polypeptit relaxin theo sáng chế để điều biến các tính chất sinh học của polypeptit relaxin, và/hoặc tạo ra các tính chất sinh học mới cho phân tử relaxin. Các polyme phân tử lớn này có thể được liên kết với polypeptit relaxin nhờ một axit amin được mã hóa có trong tự nhiên, nhờ một axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên, hoặc phần tử thế chức năng bất kỳ của axit amin có trong tự nhiên hoặc axit amin không có trong tự nhiên, hoặc phần tử thế hoặc nhóm chức bất kỳ được bổ sung vào axit amin có trong tự nhiên hoặc không có trong tự nhiên. Khối lượng phân tử polyme có thể nằm trong khoảng rộng, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, nằm trong khoảng từ 100Da đến 100.000Da hoặc lớn hơn. Khối lượng phân tử polyme có thể nằm trong khoảng từ 100Da đến 100.000Da, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, 100.000Da, 95.000Da, 90.000Da, 85.000Da, 80.000Da, 75.000Da, 70.000Da, 65.000Da, 60.000Da, 55.000Da, 50.000Da, 45.000Da, 40.000Da, 35.000Da, 30.000Da, 25.000Da, 20.000Da, 15.000Da, 10.000Da, 9.000Da, 8.000Da, 7.000Da, 6.000Da, 5.000Da, 4.000Da, 3.000Da, 2.000Da, 1.000Da, 900Da, 800Da, 700Da, 600Da, 500Da, 400Da, 300Da, 200Da, và 100Da. Theo một số phương án, khối lượng phân tử polyme nằm trong khoảng từ 100Da đến 50.000Da. Theo một số phương án, khối lượng phân tử polyme nằm trong khoảng từ 100Da đến 40.000Da. Theo một số phương án, khối lượng phân tử polyme nằm trong khoảng từ 1.000Da đến 40.000Da. Theo một số phương án, khối lượng phân tử polyme nằm trong khoảng từ 5.000Da đến 40.000Da. Theo một số phương án, khối lượng phân tử polyme nằm trong khoảng từ 10.000Da đến 40.000Da.

Sáng chế đề xuất các dược phẩm hầu như đồng nhất chứa các thể tiếp hợp polyme:protein. "Hầu như đồng nhất" được sử dụng trong bản mô tả có nghĩa là các phân tử tiếp hợp polyme:protein quan sát được chiếm nhiều hơn một nửa tổng lượng protein. Thể tiếp hợp polyme:protein có hoạt tính sinh học và dược phẩm chứa polypeptit relaxin được PEGyl hóa "hầu như đồng nhất" theo sáng chế được nêu ở đây là các dược phẩm có độ đồng nhất đủ để thể hiện các ưu điểm của dược phẩm đồng nhất, ví dụ, để sử dụng trong lâm sàng để dự đoán nhiều thông số dược động học.

Cũng có thể chọn để điều chế hỗn hợp chứa các phân tử tiếp hợp polyme:protein, và ưu điểm được nêu ra ở đây là ở chỗ có thể lựa chọn tỷ lệ của thể tiếp hợp mono-polyme:protein được bao hàm trong hỗn hợp này. Do đó, nếu muốn, có thể điều chế được hỗn hợp chứa các protein khác nhau với số lượng các gốc polyme khác nhau gắn vào (tức là đi-, tri-, tetra-, v.v.) và cho các thể tiếp hợp này kết hợp với thể tiếp hợp mono-polyme:protein điều chế được bằng cách áp dụng các phương pháp theo sáng chế, và thu được hỗn hợp với tỷ lệ thể tiếp hợp mono-polyme :protein định trước.

Polyme được chọn lọc có thể hòa tan trong nước sao cho protein mà gắn vào không kết tủa trong môi trường nước, như môi trường sinh lý học. Polyme có thể là mạch nhánh hoặc không phân nhánh. Để sử dụng sản phẩm cuối nhằm mục đích điều trị, polyme sẽ phải có tính dược dụng.

Ví dụ về polyme bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, polyalkyl ete và chất tương tự được gắn mũ alkoxy của chúng (ví dụ, polyoxyetylen glycol, polyoxyetylen/propylen glycol, và chất tương tự được gắn mũ metoxy hoặc etoxy của chúng, đặc biệt là polyoxyetylen glycol, hợp chất này còn được gọi là polyetylenglycol hoặc PEG); polyvinylpyroliđon; polyvinylalkyl ete; polyoxazolin, các polyalkyl oxazolin và polyhyđroxyalkyl oxazolin; polyacrylamit, polyalkyl acrylamit, và polyhyđroxyalkyl acrylamit (ví dụ, polyhyđroxypropylmetacrylamit và các dẫn xuất của chúng); polyhyđroxyalkyl acrylat; các axit polysialic và chất tương tự của chúng; trình tự peptit ưa nước; polysacarit và các dẫn xuất của chúng, bao gồm đextran và đextran các dẫn xuất, ví dụ, carboxymetylđextran, đextran sulfat, aminođextran; xenluloza và các dẫn xuất của chúng, ví dụ, carboxymetyl xenluloza, hyđroxyalkyl xenluloza; chitin và các dẫn xuất của chúng, ví dụ, chitosan, sucxinyl chitosan, carboxymetylchitin, carboxymetylchitosan; axit

hyaluronic và các dẫn xuất của chúng; tinh bột; alginat; chonđroitin sulfat; albumin; pululan và carboxymetyl pululan; polyaminoaxit và các dẫn xuất của chúng, ví dụ, axit polyglutamic, polylysin, axit polyaspartic, polyaspartamit; copolyme của anhyđrit maleic như: copolyme của styren anhyđrit maleic, copolyme đivinyletyl ete anhyđrit maleic; rượu polyvinylic; copolyme của chúng; các polyme bậc bốn của chúng; hỗn hợp của chúng; và các dẫn xuất của các chất nêu trên.

Tỷ lệ giữa các phân tử polyetylen glycol và các phân tử protein sẽ thay đổi, như nồng độ của chúng trong hỗn hợp phản ứng. Nhìn chung, tỷ lệ tối ưu (xét trên hiệu quả của phản ứng mà trong đó lượng dư protein hoặc polyme không phản ứng là tối thiểu) có thể được xác định bằng khối lượng phân tử của polyetylen glycol được chọn lọc và dựa trên số lượng của các nhóm phản ứng có giá trị. Khi đề cập đến khối lượng phân tử, thường là khối lượng phân tử polyme càng cao thì số phân tử polyme có thể được gắn vào protein càng thấp. Tương tự, việc phân nhánh polyme cần phải được tính đến khi tối ưu hóa các thông số này. Nhìn chung, khối lượng phân tử càng cao (hoặc nhánh càng nhiều) thì tỷ lệ polyme:protein càng lớn.

Thuật ngữ "lượng hữu hiệu có tác dụng điều trị bệnh" được sử dụng trong bản mô tả này và khi đề cập đến thể tiếp hợp PEG: polypeptit relaxin chỉ lượng mang lại lợi ích mong muốn cho bệnh nhân. Lượng này sẽ thay đổi tùy theo mỗi cá nhân và sẽ phụ thuộc vào nhiều yếu tố, bao gồm tình trạng sức khỏe chung của bệnh nhân và nguyên nhân cơ bản gây ra tình trạng bệnh lý cần được điều trị. Lượng polypeptit relaxin được sử dụng để điều trị bệnh tạo ra những thay đổi ở tỷ lệ chấp nhận được và duy trì đáp ứng mong muốn ở mức có lợi. Lượng hữu hiệu có tác dụng điều trị bệnh của các dược phẩm theo sáng chế có thể dễ dàng được xác định bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này bằng cách sử dụng các nguyên liệu và các quy trình được công bố công khai.

Polyme hòa tan trong nước có thể ở dạng cấu trúc bất kỳ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, mạch thẳng, dạng chạc hoặc mạch nhánh. Nhìn chung, polyme hòa tan trong nước là poly(alkylen glycol), như poly(etylen glycol) (PEG), tuy nhiên các polyme hòa tan trong nước khác cũng có thể được sử dụng. Để làm ví dụ, PEG được sử dụng để mô tả các phương án nhất định của sáng chế.

PEG là polyme hòa tan trong nước đã được biết rõ, có bán trên thị trường hoặc có thể được điều chế bằng cách mở vòng polyme hóa của etylen glycol theo các phương pháp mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này đã biết (Sandler and Karo, *Polyme Synthesis*, Academic Press, New York, Vol. 3, pages 138-161). Thuật ngữ "PEG" được sử dụng rộng rãi để bao gồm phân tử polyetylen glycol bất kỳ, không liên quan đến kích thước hoặc đến việc cải biến ở một đầu của PEG, và có thể được thể hiện như là được liên kết với polypeptit relaxin theo công thức:

$$XO\text{-}(CH_2CH_2O)_n\text{-}CH_2CH_2\text{-}Y$$

trong đó n nằm trong khoảng từ 2 đến 10.000 và X là H hoặc cải biến đầu tận cùng, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, $C_{1\text{-}4}$ alkyl, nhóm bảo vệ, hoặc nhóm chức đầu tận cùng.

Trong một số trường hợp, PEG dùng trong sáng chế có một đầu tận cùng là hyđroxy hoặc metoxy, tức là X là H hoặc CH_3 ("metoxy PEG"). Theo cách khác, PEG có đầu tận cùng là nhóm phản ứng, nhờ đó tạo ra polyme có hai nhóm chức. Các nhóm phản ứng điển hình có thể bao gồm các nhóm phản ứng mà thường được sử dụng để phản ứng với các nhóm chức được tìm thấy ở 20 axit amin thông thường (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các nhóm maleimit, cacbonat được hoạt hóa (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, p-nitrophenyl este), este được hoạt hóa (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, N-hyđroxysucxinimit, p-nitrophenyl este) và alđehyt) cũng như các nhóm chức trơ đối với 20 axit amin thông thường nhưng lại phản ứng đặc hiệu với các nhóm chức bổ trợ có mặt trong axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các nhóm azit, các nhóm alkyn). Cần phải lưu ý rằng một đầu còn lại của PEG, mà như được thể hiện là Y trong công thức trên, sẽ gắn trực tiếp hoặc gián tiếp vào polypeptit relaxin nhờ axit amin được mã hóa có trong tự nhiên hoặc axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên. Ví dụ, Y có thể là liên kết amit, carbamat hoặc ure với nhóm amin (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, epsilon amin của lysin hoặc đầu tận cùng N) của polypeptit. Theo cách khác, Y có thể là liên kết maleimit với nhóm thiol (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, nhóm thiol của xystein). Theo cách khác, Y có thể là liên kết với một gốc không thường được sử dụng thông qua 20 axit amin thông thường. Ví dụ, nhóm azit trên PEG có thể phản ứng với nhóm alkyn trên polypeptit relaxin để tạo ra sản phẩm

cộng [3+2] xyclo Huisgen. Theo cách khác, nhóm alkyn trên PEG có thể phản ứng với nhóm azit có mặt trong axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên để tạo ra sản phẩm tương tự. Theo một số phương án, hợp chất ái nhân mạnh (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, hyđrazin, hyđrazit, hyđroxyl amin, semicarbazit) có thể phản ứng với nhóm alđehyt hoặc keton có mặt trong axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên để tạo ra hyđrazon, oxim hoặc semicarbazon, nếu thích hợp, mà trong một số trường hợp có thể được khử tiếp bằng cách xử lý bằng một tác nhân khử thích hợp. Theo cách khác, hợp chất ái nhân mạnh có thể được kết hợp vào polypeptit relaxin nhờ axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên và sử dụng để phản ứng theo cách ưu tiên với nhóm keton hoặc alđehyt có mặt trong polyme hòa tan trong nước.

Khối lượng phân tử bất kỳ của PEG có thể được sử dụng như được mong muốn trên thực tế, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở, phân tử lượng nằm trong khoảng từ 100Daltons (Da) đến 100.000Da hoặc lớn hơn nếu muốn (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, đôi khi nằm trong khoảng từ 0,1kDa đến 50kDa hoặc 10kDa đến 40kDa). Khối lượng phân tử PEG có thể thay đổi trong khoảng rộng, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, nằm trong khoảng từ 100Da đến 100.000Da hoặc lớn hơn. PEG có thể nằm trong khoảng từ 100Da đến 100.000Da, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, 100.000Da, 95.000Da, 90.000Da, 85.000Da, 80.000Da, 75.000Da, 70.000Da, 65.000Da, 60.000Da, 55.000Da, 50.000Da, 45.000Da, 40.000Da, 35.000Da, 30.000Da, 25.000Da, 20.000Da, 15.000Da, 10.000Da, 9.000Da, 8.000Da, 7.000Da, 6.000Da, 5.000Da, 4.000Da, 3.000Da, 2.000Da, 1.000Da, 900Da, 800Da, 700Da, 600Da, 500Da, 400Da, 300Da, 200Da, và 100Da. Theo một số phương án, PEG nằm trong khoảng từ 100Da đến 50.000Da. Theo một số phương án, PEG nằm trong khoảng từ 100Da đến 40.000Da. Theo một số phương án, PEG nằm trong khoảng từ 1.000Da đến 40.000Da. Theo một số phương án, PEG nằm trong khoảng từ 5.000Da đến 40.000Da. Theo một số phương án, PEG nằm trong khoảng từ 10.000Da đến 40.000Da. Các PEG mạch nhánh bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các phân tử PEG, trong đó mỗi mạch có khối lượng phân tử nằm trong khoảng từ 1kDa đến 100kDa (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, 1kDa đến 50kDa hoặc 5kDa đến 20kDa) cũng có thể được sử dụng. Khối lượng phân tử của mỗi mạch của PEG mạch nhánh có thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, khối lượng phân tửnằm trong khoảng từ 1.000Da đến 100.000Da hoặc lớn hơn. Khối lượng phân tử của mỗi mạch của PEG

mạch nhánh có thể nằm trong khoảng từ 1.000Da đến 100.000Da, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, 100.000Da, 95.000Da, 90.000Da, 85.000Da, 80.000Da, 75.000Da, 70.000Da, 65.000Da, 60.000Da, 55.000Da, 50.000Da, 45.000Da, 40.000Da, 35.000Da, 30.000Da, 25.000Da, 20.000Da, 15.000Da, 10.000Da, 9.000Da, 8.000Da, 7.000Da, 6.000Da, 5.000Da, 4.000Da, 3.000Da, 2.000Da, và 1.000Da. Theo một số phương án, khối lượng phân tử của mỗi mạch của PEG mạch nhánh nằm trong khoảng từ 1.000Da đến 50.000Da. Theo một số phương án, khối lượng phân tử của mỗi mạch của PEG mạch nhánh nằm trong khoảng từ 1.000Da đến 40.000Da. Theo một số phương án, khối lượng phân tử của mỗi mạch của PEG mạch nhánh nằm trong khoảng từ 5.000Da đến 40.000Da. Theo một số phương án, khối lượng phân tử của mỗi mạch của PEG mạch nhánh nằm trong khoảng từ 5.000Da đến 20.000Da. Nhiều loại phân tử PEG được bộc lộ trong, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, Shearwater Polymes, Inc. catalog, Nektar Therapeutics catalog, được kết hợp vào sáng chế bằng cách viện dẫn.

Nhìn chung, ít nhất một đầu tận cùng của phân tử PEG là sẵn có để phản ứng với axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên. Ví dụ, các dẫn xuất PEG mang các gốc alkyn và azit để phản ứng với chuỗi bên của axit amin có thể được sử dụng để gắn PEG vào axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên như được bộc lộ trong bản mô tả này. Nếu axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên chứa azit, thì PEG sẽ thường chứa một gốc alkyn để tạo ra sản phẩm cộng [3+2] xyclo hoặc các loại PEG đã được hoạt hóa (tức là este, cacbonat) chứa nhóm phosphin tạo ra liên kết amit. Theo cách khác, nếu axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên chứa alkyn, thì PEG sẽ thường chứa gốc azit để tạo ra sản phẩm cộng [3+2] xyclo Huisgen. Nếu axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên chứa nhóm carbonyl, thì PEG sẽ thường chứa gốc ái nhân hiệu nghiệm (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, nhóm chức hyđrazit, hyđrazin, hyđroxylamin, hoặc semicarbazit) để lần lượt tạo ra các liên kết hyđrazon, oxim, và semicarbazon tương ứng. Theo cách khác, có thể sử dụng sự đảo ngược định hướng của các nhóm phản ứng nêu trên, tức là gốc azit trong axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên có thể phản ứng với dẫn xuất PEG chứa alkyn.

Theo một số phương án, biến thể polypeptit relaxin với dẫn xuất PEG chứa nhóm chức hóa học phản ứng với nhóm chức hóa học có trên chuỗi bên của axit amin được mã

hóa không có trong tự nhiên.

Theo một số phương án, sáng chế đề cập đến các dẫn xuất polyme chứa azit và axetylen chứa bộ khung polyme hòa tan trong nước có khối lượng phân tử trung bình nằm trong khoảng từ 800Da đến 100.000Da. Bộ khung polyme của polyme hòa tan trong nước có thể là poly(etylen glycol). Tuy nhiên, cần hiểu rằng nhiều loại polyme hòa tan trong nước bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, poly(etylen)glycol và các polyme có liên quan khác, bao gồm poly(đextran) và poly(propylen glycol), cũng là thích hợp để dùng trong sáng chế và việc sử dụng thuật ngữ PEG hoặc poly(etylen glycol) nhằm bao hàm và bao gồm tất cả các phân tử như vậy. Thuật ngữ PEG bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, poly(etylen glycol) ở dạng bất kỳ trong số các dạng của chúng, bao gồm PEG hai chức năng, PEG đa nhánh, PEG được tạo dẫn xuất, PEG dạng chạc, PEG mạch nhánh, PEG nhô ra (tức là PEG hoặc các polyme có liên quan có một hoặc nhiều nhóm chức nhô ra khỏi bộ khung polyme), hoặc PEG với liên kết có thể phân hủy được trong đó.

PEG thường là trong suốt, không màu, không mùi, hòa tan trong nước, bền với nhiệt, trơ với nhiều tác nhân hóa học, không thủy phân hoặc giảm giá trị, và thường không độc. Poly(etylen glycol) được xem là tương thích về mặt sinh học, điều đó có nghĩa là PEG có khả năng cùng tồn tại với mô hoặc vi sinh vật sống mà không làm tổn hại chúng. Cụ thể hơn, PEG hầu như không sinh miễn dịch, điều đó có nghĩa là PEG không nhằm mục đích tạo ra đáp ứng miễn dịch trong cơ thể. Khi đã được gắn vào phân tử có một số chức năng mong muốn trong cơ thể, như chất có hoạt tính sinh học, PEG có xu hướng che chắn cho tác nhân này và có thể làm giảm hoặc loại trừ đáp ứng miễn dịch bất kỳ sao cho sinh vật có thể chịu được sự có mặt của tác nhân này. Các thể tiếp hợp PEG có xu hướng không tạo ra đáp ứng miễn dịch đáng kể hoặc gây ra hiện tượng đóng cục hoặc các tác dụng không mong muốn khác. PEG có công thức - CH_2CH_2O-$(CH_2CH_2O)_n$ - CH_2CH_2--, nếu n nằm trong khoảng từ 3 đến 4000, thì thường là nằm trong khoảng từ 20 đến 2000, là thích hợp để sử dụng trong sáng chế. Theo một số phương án, PEG có khối lượng phân tử nawmf trong khoảng từ 800Da đến 1.000Da là đặc biệt hữu dụng để làm bộ khung polyme. Khối lượng phân tử PEG có thể nằm trong khoảng rộng, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, khối lượng phân tử nằm trong khoảng từ 100Da đến 100.000Da hoặc lớn hơn. Khối lượng phân tử của PEG có thể nằm trong khoảng từ

100Da đến 100.000Da, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, 100.000Da, 95.000Da, 90.000Da, 85.000Da, 80.000Da, 75.000Da, 70.000Da, 65.000Da, 60.000Da, 55.000Da, 50.000Da, 45.000Da, 40.000Da, 35.000Da, 30.000Da, 25.000Da, 20.000Da, 15.000Da, 10.000Da, 9.000Da, 8.000Da, 7.000Da, 6.000Da, 5.000Da, 4.000Da, 3.000Da, 2.000Da, 1.000Da, 900Da, 800Da, 700Da, 600Da, 500Da, 400Da, 300Da, 200Da, và 100Da. Theo một số phương án, khối lượng phân tử của PEG nằm trong khoảng từ 100Da đến 50.000Da. Theo một số phương án, khối lượng phân tử của PEG nằm trong khoảng từ 100Da đến 40.000Da. Theo một số phương án, khối lượng phân tử của PEG nằm trong khoảng từ 1.000Da đến 40.000Da. Theo một số phương án, khối lượng phân tử của PEG nằm trong khoảng từ 5.000Da đến 40.000Da. Theo một số phương án, khối lượng phân tử của PEG nằm trong khoảng từ 10.000Da đến 40.000Da.

Bộ khung polyme có thể là mạch thẳng hoặc mạch nhánh. Bộ khung polyme mạch nhánh thường là đã biết trong lĩnh vực phương pháp này. Nhìn chung, polyme mạch nhánh có một gốc trung tâm ở nhánh chính và nhiều mạch polyme mạch thẳng liên kết với gốc ở nhánh chính này. PEG thường được sử dụng ở dạng mạch nhánh mà có thể được điều chế bằng cách bổ sung etylen oxit vào các polyol khác nhau, như glyxerol, glyxerol oligome, pentaerytritol và sorbitol. Gốc ở nhánh chính còn có thể thu được từ vài axit amin, như lysin. Poly(etylen glycol) mạch nhánh có thể được biểu thị ở dạng $R(-PEG-OH)_m$, trong đó R thu được từ gốc trung tâm, như glyxerol, glyxerol oligome, hoặc pentaerythrilol, và m thể hiện số lượng nhánh. Các phân tử PEG đa nhánh, như các phân tử đã được bộc lộ trong các patent Mỹ số 5,932,462; 5,643,575; 5,229,490; 4,289,872; công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 2003/0143596; WO 96/21469; và WO 93/21259, tất cả các tài liệu này được đưa hoàn toàn vào đây bằng cách viện dẫn, cũng có thể được sử dụng làm bộ khung polyme.

PEG phân nhánh cũng có thể ở dạng PEG dạng chạc có công thức $PEG(-YCHZ_2)_n$, trong đó Y là nhóm liên kết và Z là nhóm đầu tận cùng đã được hoạt hóa được liên kết với CH bằng mạch có các nguyên tử có chiều dài xác định.

Một dạng mạch nhánh khác nữa, PEG nhô ra, có các nhóm phản ứng, như carboxyl, dọc theo bộ khung PEG hơn là ở cuối mạch PEG.

Ngoài các dạng PEG này, polyme cũng có thể được điều chế với một liên kết yếu hoặc liên kết có thể phân hủy được trong bộ khung. Ví dụ, PEG có thể được điều chế với các liên kết este trong bộ khung polyme mà được thủy phân. Như được thể hiện dưới đây, phản ứng thủy phân dẫn đến sự phân cắt polyme thành các đoạn có khối lượng phân tử thấp hơn:

$$\text{-PEG-CO}_2\text{-PEG-+H}_2\text{O} \rightarrow \text{PEG-CO}_2\text{H+HO-PEG-}$$

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này hiểu rõ rằng thuật ngữ poly(etylen glycol) hoặc PEG là hoặc bao gồm tất cả các dạng đã biết trong lĩnh vực phương pháp này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các dạng đã được bộc lộ trong bản mô tả này.

Nhiều polyme khác cũng là thích hợp để sử dụng trong sáng chế. Theo một số phương án, bộ khung polyme mà hòa tan trong nước, với 2 đến 300 đầu tận cùng, là đặc biệt hữu dụng trong sáng chế. Ví dụ về các polyme thích hợp bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các poly(alkylen glycol) khác, như poly (propylen glycol) ("PPG"), copolyme của chúng (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, copolyme của etylen glycol và propylen glycol), các polyme bậc bốn của chúng, hỗn hợp của chúng, và các polyme tương tự. Mặc dù khối lượng phân tử của mỗi mạch của bộ khung polyme có thể thay đổi, nó thường nằm trong khoảng từ 800Da đến 100.000Da, thường nằm trong khoảng từ 6.000Da đến 80.000Da. Khối lượng phân tử của mỗi mạch của bộ khung polyme có thể nằm trong khoảng từ 100Da đến 100.000Da, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, 100.000Da, 95.000Da, 90.000Da, 85.000Da, 80.000Da, 75.000Da, 70.000Da, 65.000Da, 60.000Da, 55.000Da, 50.000Da, 45.000Da, 40.000Da, 35.000Da, 30.000Da, 25.000Da, 20.000Da, 15.000Da, 10.000Da, 9.000Da, 8.000Da, 7.000Da, 6.000Da, 5.000Da, 4.000Da, 3.000Da, 2.000Da, 1.000Da, 900Da, 800Da, 700Da, 600Da, 500Da, 400Da, 300Da, 200Da, và 100Da. Theo một số phương án, khối lượng phân tử của mỗi mạch của bộ khung polyme nằm trong khoảng từ 100Da đến 50.000Da. Theo một số phương án, khối lượng phân tử của mỗi mạch của bộ khung polyme nằm trong khoảng từ 100Da đến 40.000Da. Theo một số phương án, khối lượng phân tử của mỗi mạch của bộ khung polyme nằm trong khoảng từ 1.000Da đến 40.000Da. Theo một số phương án, khối lượng phân tử của mỗi mạch của bộ khung polyme nằm trong khoảng từ 5.000Da đến 40.000Da. Theo một số phương án, khối lượng phân tử của mỗi mạch của bộ khung polyme nằm trong khoảng từ

10.000Da đến 40.000Da.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực phương pháp này cần phải nhận thấy rằng danh mục nêu trên của bộ khung hầu như hòa tan trong nước không có nghĩa là danh mục đầy đủ và chỉ nhằm mục đích minh họa, và tất cả các nguyên liệu polyme có đặc tính nêu trên được cho là thích hợp để sử dụng trong sáng chế.

Theo một số phương án, các dẫn xuất polyme là "đa chức", có nghĩa là bộ khung polyme có ít nhất hai đầu tận cùng, và có thể có tới khoảng 300 đầu tận cùng, được tạo chức hoặc được hoạt hóa với nhóm chức. Các dẫn xuất polyme đa chức bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các polyme mạch thẳng có hai đầu tận cùng, mỗi đầu tận cùng được liên kết với một nhóm chức mà có thể là giống nhau hoặc khác nhau.

Theo một phương án, dẫn xuất polyme có công thức:

X-A-POLY- B-N=N=N

trong đó:

N=N=N là gốc azit;

B là gốc liên kết có thể có mặt hoặc không có mặt;

POLY là polyme không phải kháng nguyên và hòa tan trong nước;

A là gốc liên kết có thể có mặt hoặc không có mặt và nó có thể là giống hoặc khác B; và

X là nhóm chức thứ hai.

Ví dụ về gốc liên kết đối với A và B bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, nhóm alkyl đa chức chứa đến 18, và có thể chứa 1 đến 10 nguyên tử cacbon. Dị nguyên tử như nitơ, oxy hoặc lưu huỳnh có thể được đưa vào chuỗi Alkyl. Chuỗi Alkyl cũng có thể được phân nhánh ở dị nguyên tử. Các ví dụ khác về gốc liên kết đối với A và B bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, nhóm aryl đa chức, chứa đến 10 và có thể chứa 5 đến 6 nguyên tử cacbon. Nhóm aryl có thể được thế bằng một nguyên tử cacbon, nitơ, oxy hoặc lưu huỳnh nữa. Các ví dụ khác về các nhóm liên kết thích hợp bao gồm các nhóm liên kết

đã được bộc lộ trong các patent Mỹ số 5,932,462; 5,643,575; và công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 2003/0143596, tất cả các tài liệu được kết hợp vào sáng chế bằng cách viện dẫn. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này cần phải nhận thấy rằng danh mục nêu trên đối với các gốc liên kết không có nghĩa là danh mục đầy đủ và chỉ nhằm mục đích minh họa, và nhận thấy rằng tất cả các gốc liên kết có đặc tính nêu trên được cho là thích hợp để sử dụng trong sáng chế.

Ví dụ về các nhóm chức thích hợp để dùng làm nhóm X bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, hyđroxyl, hyđroxyl được bảo vệ, alkoxyl, este đã được hoạt hóa, như N-hyđroxysucxinimiđyl este và 1-benzotriazolyl este, cacbonat đã được hoạt hóa, như N-hyđroxysucxinimiđyl cacbonat và l-benzotriazolyl cacbonat, axetal, alđehyt, các alđehyt hyđrat, alkenyl, acrylat, metacrylat, acrylamit, sulfon đã được hoạt hóa, amin, aminooxy, amin được bảo vệ, hyđrazit, hyđrazit được bảo vệ, thiol được bảo vệ, axit carboxylic, axit carboxylic được bảo vệ, isoxyanat, isothioxyanat, maleimit, vinylsulfon, đithiopyriđin, vinylpyriđin, iođoaxetamit, epoxit, glyoxal, đion, mesylat, tosylat, tresylat, alken, keton, và azit. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này cần phải hiểu rõ rằng gốc X được chọn lọc cần phải tương thích với nhóm azit sao cho không xảy ra phản ứng với nhóm azit. Các dẫn xuất polyme chứa azit có thể có hai nhóm chức cùng loại, có nghĩa là nhóm chức thứ hai (tức là X) cũng là gốc azit, hoặc hai nhóm chức khác loại, có nghĩa là nhóm chức thứ hai là một nhóm chức khác.

Thuật ngữ "được bảo vệ" được sử dụng trong bản mô tả để chỉ sự có mặt của nhóm hoặc gốc bảo vệ ngăn ngừa phản ứng của nhóm chức phản ứng hóa học trong các điều kiện phản ứng nhất định. Nhóm bảo vệ thay đổi tùy theo loại nhóm phản ứng hóa học cần được bảo vệ. Ví dụ, khi nhóm phản ứng hóa học là amin hoặc hyđrazit, nhóm bảo vệ có thể được chọn từ nhóm gồm tert-butyloxycarbonyl (t-Boc) và 9-florenylmetoxycarbonyl (Fmoc). Khi nhóm phản ứng hóa học là thiol, thì nhóm bảo vệ có thể là orthopyriđyldisulfua. Khi nhóm phản ứng hóa học là axit carboxylic, như axit butanoic hoặc propionic, hoặc nhóm hyđroxyl, thì nhóm bảo vệ có thể là nhóm benzyl hoặc alkyl như metyl, etyl, hoặc tert-butyl. Các nhóm bảo vệ khác đã biết trong lĩnh vực phương pháp này cũng có thể được sử dụng trong sáng chế.

Các ví dụ cụ thể về các nhóm chức đầu tận cùng trong bản mô tả này bao gồm,

nhưng không chỉ giới hạn ở, N-sucxinimiđyl cacbonat (xem ví dụ, các patent Mỹ số 5,281,698, 5,468,478), amin (xem: ví dụ, Buckmann et al., *Makromol. Chem.* 182:1379 (1981), Zalipsky et al., *Eur.Polym. J.* 19:1177 (1983)), hyđrazit (xem: ví dụ, vàresz et al., *Makromol. Chem.* 179:301 (1978)), sucxinimiđyl propionat và sucxinimiđyl butanoat (xem: ví dụ, Olson et al. trong *Poly(etylen glycol) Chemistry & Biological Applications*, pp 170-181, Harris & Zalipsky Eds., ACS, Washington, D.C., 1997; xem cả patent Mỹ số 5,672,662), sucxinimiđyl sucxinat (xem: ví dụ, Abuchowski et al., *Cancer Biochem. Biophys.* 7:175 (1984) và Joppich et al., *Makromol. Chem.* 180:1381 (1979), sucxinimiđyl este (xem: ví dụ, patent Mỹ số 4,670,417), benzotriazol cacbonat (xem: ví dụ, patent Mỹ số 5,650,234), glyxiđyl ete (xem: ví dụ, Pitha et al., *Eur. J Biochem.* 94:11 (1979), Elling et al., *Biotech. Appl. Biochem.* 13:354 (1991), oxycarbonylimiđazol (xem: ví dụ, Beauchamp, et al., *Anal. Biochem.* 131:25 (1983), Tondelli et al., *J. Controlled Release* 1:251 (1985)), p-nitrophenyl cacbonat (xem: ví dụ, Veronese, et al., *Appl. Biochem. Biotech.*, 11: 141 (1985); và Sartore et al., *Appl. Biochem. Biotech.*, 27:45 (1991)), alđehyt (xem: ví dụ, Harris et al., *J. Polym. Sci. Chem. Ed.* 22:341 (1984), patent Mỹ số 5,824,784, patent Mỹ số 5,252,714), maleimit (xem: ví dụ, Goodson et al., *Biotechnology* (NY) 8:343 (1990), Romani et al., trong *Chemistry of Peptides and Proteins* 2:29 (1984)), và Kogan, *Synthetic Comm.* 22:2417 (1992)), orthopyriđyl-đisulfua (xem: ví dụ, Woghiren, et al., *Bioconj. Chem.* 4:314(1993)), acrylol (xem: ví dụ, Sawhney et al., *Macromolecule*, 26:581 (1993)), vinylsulfon (xem: ví dụ, patent Mỹ số 5,900,461). Tất cả các tài liệu tham khảo nêu trên và các patent được kết hợp vào sáng chế bằng cách viện dẫn.

Theo một số phương án, các dẫn xuất polyme theo sáng chế có bộ khung polyme có công thức:

$$X\text{-}CH_2CH_2O\text{-}(CH_2CH_2O)_n\text{-}CH_2CH_2\text{-}N{=}N{=}N$$

trong đó:

X là nhóm chức như nêu trên; và

n nằm trong khoảng từ 20 đến 4000.

Theo phương án khác, các dẫn xuất polyme theo sáng chế có bộ khung polyme có công thức:

$X\text{-}CH_2CH_2O\text{-}(CH_2CH_2O)_n\text{-}CH_2CH_2\text{-}O\text{-}(CH_2)_m\text{-}W\text{-}N{=}N{=}N$

trong đó:

W là gốc liên kết béo hoặc thơm chứa 1 đến 10 nguyên tử cacbon;

n nằm trong khoảng từ 20 đến 4000; và

X là nhóm chức như nêu trên, m nằm trong khoảng từ 1 đến 10.

Các dẫn xuất PEG chứa azit theo sáng chế có thể được điều chế theo nhiều phương pháp khác nhau đã biết trong lĩnh vực phương pháp này và/hoặc đã được bộc lộ trong bản mô tả này. Theo một phương pháp, được chỉ ra dưới đây, bộ khung polyme hòa tan trong nước có khối lượng phân tử trung bình nằm trong khoảng từ 800Da đến 100.000Da, bộ khung polyme có một đầu tận cùng thứ nhất liên kết với một nhóm chức thứ nhất và đầu tận cùng thứ hai liên kết với nhóm rời chuyển thích hợp, được cho phản ứng với anion azit (mà có thể được ghép cặp với ion bất kỳ trong số các ion trái dấu thích hợp, bao gồm natri, kali, tert-butylamoni và các ion tương tự). Nhóm rời chuyển này thực hiện phản ứng đổi chỗ ái nhân và thế bằng gốc azit để tạo ra polyme PEG chứa azit mong muốn.

$$X\text{-PEG-L} + N_3^- \rightarrow X\text{-PEG-}N_3$$

Như được thể hiện, bộ khung polyme thích hợp để sử dụng trong sáng chế có công thức X-PEG-L, trong đó PEG là poly(etylen glycol) và X là nhóm chức không phản ứng với nhóm azit và L là nhóm rời chuyển thích hợp. Ví dụ về các nhóm chức thích hợp bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, hyđroxyl, hyđroxyl được bảo vệ, axetal, alkenyl, amin, aminooxy, amin được bảo vệ, hyđrazit được bảo vệ, thiol được bảo vệ, axit carboxylic, axit carboxylic được bảo vệ, maleimit, đithiopyriđin, và vinylpyriđin, và keton. Ví dụ về các nhóm rời chuyển thích hợp bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, clorua, bromua, iođua, mesylat, tresylat, và tosylat.

Theo một phương pháp khác để điều chế các dẫn xuất polyme chứa azit theo sáng chế, chất liên kết mang nhóm chức azit này được cho tiếp xúc với bộ khung polyme hòa

tan trong nước có khối lượng phân tử trung bình nằm trong khoảng từ 800Da đến 100.000Da, trong đó chất liên kết mang nhóm chức hóa học sẽ phản ứng theo cách chọn lọc với một nhóm chức hóa học trên polyme PEG, để tạo ra sản phẩm dẫn xuất polyme chứa azit, trong đó azit được tách ra khỏi bộ khung polyme bởi nhóm liên kết.

Sơ đồ phản ứng cụ thể được thể hiện dưới đây:

X-PEG-M + N-nhóm liên kết-N=N=N → PG-X-PEG-nhóm liên kết-N=N=N

trong đó:

PEG là poly(etylen glycol) và X là nhóm gắn mũ như alkoxy hoặc nhóm chức như nêu trên; và

M là nhóm chức không phản ứng với nhóm chức azit nhưng sẽ phản ứng một cách hữu hiệu và chọn lọc với nhóm chức N.

Ví dụ về các nhóm chức thích hợp bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, M là axit carboxylic, cacbonat hoặc este có hoạt tính nếu N là amin; M là keton nếu N là gốc hyđrazit hoặc aminooxy; M là nhóm rời chuyển nếu N là gốc ái nhân.

Việc tinh chế sản phẩm thô có thể được thực hiện theo các phương pháp đã biết bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, phương pháp kết tủa sản phẩm tiếp theo sắc ký, nếu cần.

Ví dụ cụ thể hơn được thể hiện dưới đây trong trường hợp PEG điamin, trong đó một amin trong số các amin được bảo vệ bởi một nhóm bảo vệ như tert-butyl-Boc và PEG được bảo vệ điamin một lần thu được được cho phản ứng với gốc liên kết mang nhóm chức azit:

$$BocHN\text{-}PEG\text{-}NH_2 + HO_2C\text{-}(CH_2)_3\text{-}N{=}N{=}N$$

Trong trường hợp này, nhóm amin có thể được ghép cặp với nhóm axit carboxylic bằng cách sử dụng nhiều loại tác nhân hoạt hóa như thionyl clorua hoặc các chất phản ứng carbođiimit và N- hyđroxysucxinimit hoặc N-hyđroxybenzotriazol để tạo ra liên kết amit giữa dẫn xuất PEG monoamin và nhóm liên kết mang azit. Sau khi tạo ra liên kết

amit, dẫn xuất chứa azit được bảo vệ N-terl-butyl-Boc thu được có thể được sử dụng trực tiếp để cải biến các phân tử có hoạt tính sinh học hoặc nó có thể được tinh chế tiếp để đưa vào các nhóm chức hữu dụng khác. Ví dụ, nhóm N-t-Boc có thể được thủy phân bằng cách xử lý bằng axit mạnh để tạo ra omega-amino-PEG-azit. Amin thu được có thể được sử dụng như một chất điều khiển quá trình tổng hợp để đưa vào các nhóm chức hữu dụng khác như các nhóm maleimit, đisulfua đã được hoạt hóa, este đã được hoạt hóa và các nhóm tương tự để tạo ra các chất phản ứng hai chức khác loại có giá trị.

Các dẫn xuất hai chức khác loại là đặc biệt hữu dụng khi muốn gắn các phân tử khác nhau vào mỗi đầu tận cùng của polyme. Ví dụ, omega-N-amino-N-aziđo PEG cho phép gắn phân tử có nhóm ái điện tử đã được hoạt hóa, như alđehyt, keton, este đã được hoạt hóa, cacbonat đã được hoạt hóa và các nhóm tương tự, vào một đầu tận cùng của PEG và phân tử có nhóm axetylen vào đầu tận cùng kia của PEG.

Theo một phương án khác, dẫn xuất polyme có công thức:

X-A-POLY- B-C≡C-R

trong đó:

R có thể là H hoặc nhóm alkyl, alken, alkyoxy, hoặc aryl hoặc aryl được thế;

B là gốc liên kết có thể có mặt hoặc không có mặt;

POLY là polyme không phải kháng nguyên, hòa tan trong nước;

A là gốc liên kết, có thể có mặt hoặc không có mặt và có thể là giống hoặc khác B; và

X là nhóm chức thứ hai.

Ví dụ về gốc liên kết đối với A và B bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, nhóm alkyl đa chức chứa đến 18, và có thể chứa 1 đến 10 nguyên tử cacbon. Dị nguyên tử như nitơ, oxy hoặc lưu huỳnh có thể được đưa vào chuỗi Alkyl này. Chuỗi Alkyl còn có thể được phân nhánh ở dị nguyên tử. Các ví dụ khác về gốc liên kết đối với A và B bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, nhóm aryl đa chức, chứa đến 10 và có thể chứa 5 đến 6

nguyên tử cacbon. Nhóm aryl có thể được thế bằng một nguyên tử cacbon, nitơ, oxy, hoặc lưu huỳnh khác nữa. Các ví dụ khác về các nhóm liên kết thích hợp bao gồm các nhóm liên kết đã được bộc lộ trong các patent Mỹ số 5,932,462 và 5,643,575 và công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ 2003/0143596, mỗi tài liệu này được kết hợp vào sáng chế bằng cách viện dẫn. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này cần phải nhận thấy rằng danh mục nêu trên cho các gốc liên kết không có nghĩa là đầy đủ và cỉ nhằm múc đích minh họa, và cần phải nhận thấy rằng nhiều loại gốc liên kết có các đặc tính nêu trên được cho là có thể sử dụng được trong sáng chế.

Ví dụ về các nhóm chức thích hợp để dùng làm nhóm X bao gồm hyđroxyl, hyđroxyl được bảo vệ, alkoxyl, este đã được hoạt hóa, như N-hyđroxysucxinimiđyl este và 1-benzotriazolyl este, cacbonat đã được hoạt hóa, như N-hyđroxysucxinimiđyl cacbonat và 1-benzotriazolyl cacbonat, axetal, alđehyt, các alđehyt hyđrat, alkenyl, acrylat, metacrylat, acrylamit, sulfon đã được hoạt hóa, amin, aminooxy, amin được bảo vệ, hyđrazit, hyđrazit được bảo vệ, thiol được bảo vệ, axit carboxylic, axit carboxylic được bảo vệ, isoxyanat, isothioxyanat, maleimit, vinylsulfon, đithiopyriđin, vinylpyriđin, iođoaxetamit, epoxit, glyoxal, đion, mesylat, tosylat, và tresylat, alken, keton, và axetylen. Cần phải hiểu rõ rằng, gốc X được chọn cần phải tương thích với nhóm axetylen sao cho không xảy ra phản ứng với nhóm axetylen. Các dẫn xuất polyme chứa axetylen có thể có hai chức cùng loại, có nghĩa là nhóm chức thứ hai (tức là X) cũng là gốc axetylen, hoặc hai chức khác loại, có nghĩa là nhóm chức thứ hai là một nhóm chức khác.

Theo một phương án khác, các dẫn xuất polyme bao gồm bộ khung polyme có công thức:

$$X\text{-}CH_2CH_2O\text{-}(CH_2CH_2O)_n\text{-}CH_2CH_2\text{-}O\text{-}(CH_2)_m\text{-}C{\equiv}CH$$

trong đó:

X là nhóm chức như nêu trên;

n nằm trong khoảng từ 20 đến 4000; và

m nằm trong khoảng từ 1 đến 10.

Các ví dụ cụ thể về mỗi các polyme PEG có hai chức khác loại được thể hiện dưới đây.

Các dẫn xuất PEG chứa axetylen theo sáng chế có thể được điều chế bằng cách áp dụng các phương pháp mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này đã biết và/hoặc đã được bộc lộ trong bản mô tả này. Theo một phương pháp, bộ khung polyme hòa tan trong nước có khối lượng phân tử trung bình nằm trong khoảng từ 800Da đến 100.000Da, bộ khung polyme có đầu tận cùng thứ nhất liên kết với nhóm chức thứ nhất và đầu tận cùng thứ hai liên kết với nhóm ái nhân thích hợp, được cho phản ứng với hợp chất mang đồng thời nhóm chức axetylen và nhóm rời chuyển thích hợp để phản ứng với nhóm ái nhân trên PEG. Khi polyme PEG mang gốc ái nhân và phân tử mang nhóm rời chuyển được kết hợp, nhóm rời chuyển thực hiện phản ứng thế ái nhân và thế bằng gốc ái nhân, tạo ra polyme chứa axetylen mong muốn.

$$X\text{-PEG-Nu} + L\text{-A-C} \rightarrow X\text{-PEG-Nu-A-C}\equiv CR'$$

Như đã thể hiện, bộ khung polyme được ưu tiên để sử dụng trong phản ứng có công thức X-PEG-Nu, trong đó PEG là poly(etylen glycol), Nu là gốc ái nhân và X là nhóm chức không phản ứng với Nu, L hoặc nhóm chức axetylen.

Ví dụ về Nu bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các nhóm amin, alkoxy, aryloxy, sulfhyđryl, imino, carboxylat, hyđrazit, aminoxy sẽ phản ứng chủ yếu thông qua cơ chế kiểu SN2. Các ví dụ khác về các nhóm Nu bao gồm các nhóm chức sẽ phản ứng chủ yếu nhờ phản ứng cộng ái nhân. Ví dụ về các nhóm L bao gồm clorua, bromua, iođua, mesylat, tresylat, và tosylat và các nhóm khác có thể tham gia phản ứng thế ái nhân cũng như keton, alđehyt, thioeste, olefin, các nhóm alpha-beta carbonyl không no, cacbonat và các nhóm ái điện tử khác có thể tham gia phản ứng cộng ái nhân.

Theo một phương án khác, A là nhóm liên kết béo có 1 đến 10 nguyên tử cacbon hoặc vòng aryl được thế có 6 đến 14 nguyên tử cacbon. X là nhóm chức không phản ứng với các nhóm azit và L là nhóm rời chuyển thích hợp.

Theo một phương pháp khác để điều chế các dẫn xuất polyme chứa axetylen theo sáng chế, polyme PEG có khối lượng phân tử trung bình nằm trong khoảng từ 800Da đến

100.000Da, mang nhóm chức được bảo vệ hoặc tác nhân gắn mũ ở một đầu tận cùng và nhóm rời chuyển thích hợp ở đầu tận cùng kia, được cho tiếp xúc với anion axetylen.

Sơ đồ phản ứng cụ thể được thể hiện dưới đây:

$$X\text{-}PEG\text{-}L + -C{\equiv}CR' \rightarrow X\text{-}PEG\text{-}C{\equiv}CR'$$

trong đó:

PEG là poly(etylen glycol) và X là nhóm gắn mũ như alkoxy hoặc nhóm chức như nêu trên; và

R' là H, nhóm alkyl, alkoxy, aryl hoặc aryloxy hoặc nhóm alkyl, alkoxyl, aryl hoặc aryloxy được thế.

Trong ví dụ nêu trên, nhóm rời chuyển L cần phải phản ứng đủ để tham gia phản ứng đổi chỗ kiểu SN2 khi tiếp xúc với anion axetylen ở nồng độ đủ. Các điều kiện phản ứng cần thiết để thực hiện phản ứng đổi chỗ SN2 đối với các nhóm rời chuyển bởi anion axetylen đã được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này biết rõ.

Việc tinh chế sản phẩm thô có thể thường được thực hiện theo các phương pháp đã biết trong lĩnh vực phương pháp này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, việc làm kết tủa sản phẩm, tiếp theo sắc ký, nếu cần.

Các polyme hòa tan trong nước có thể được liên kết với các polypeptit relaxin theo sáng chế. Các polyme hòa tan trong nước có thể được liên kết nhờ axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên được kết hợp vào polypeptit relaxin hoặc nhóm chức hoặc phần tử thế bất kỳ của axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên hoặc axit amin được mã hóa có trong tự nhiên, hoặc nhóm chức hoặc phần tử thế bất kỳ được bổ sung vào axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên hoặc axit amin được mã hóa có trong tự nhiên. Theo cách khác, các polyme hòa tan trong nước được liên kết với polypeptit relaxin có kết hợp axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên nhờ axit amin có trong tự nhiên (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, xystein, lysin hoặc nhóm amin ở gốc đầu tận cùng N). Trong một số trường hợp, các polypeptit relaxin theo sáng chế chứa 1,2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 axit amin không có trong tự nhiên, trong đó một hoặc nhiều axit amin

được mã hóa không có trong tự nhiên được liên kết với polyme hòa tan trong nước (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, PEG và/hoặc oligosacarit). Trong một số trường hợp, các polypeptit relaxin theo sáng chế còn chứa 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 axit amin, hoặc nhiều axit amin được mã hóa có trong tự nhiên được liên kết với polyme hòa tan trong nước. Trong một số trường hợp, các polypeptit relaxin theo sáng chế chứa một hoặc nhiều axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên được liên kết với các polyme hòa tan trong nước và một hoặc nhiều axit amin có trong tự nhiên được liên kết với polyme hòa tan trong nước. Theo một số phương án, các polyme hòa tan trong nước được sử dụng trong sáng chế làm tăng thời gian bán thải trong huyết thanh của polypeptit relaxin so với dạng chưa tiếp hợp.

Số lượng polyme hòa tan trong nước được liên kết với polypeptit relaxin (tức là mức độ PEGyl hóa hoặc glycosyl hoá) theo sáng chế có thể được điều chỉnh để tạo ra các đặc tính dược lý, dược động học hoặc dược lực học như thời gian bán thải *in vivo* thay đổi (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, tăng hoặc giảm). Theo một số phương án, thời gian bán thải của relaxin tăng ít nhất khoảng 10 phần trăm, 20 phần trăm, 30 phần trăm, 40 phần trăm, 50 phần trăm, 60 phần trăm, 70 phần trăm, 80 phần trăm, 90 phần trăm, 2 lần, 5 lần, 6 lần, 7 lần, 8 lần, 9 lần, 10 lần, 11 lần, 12 lần, 13 lần, 14 lần, 15 lần, 16 lần, 17 lần, 18 lần, 19 lần, 20 lần, 25 lần, 30 lần, 35 lần, 40 lần, 50 lần, hoặc ít nhất khoảng 100 lần so với polypeptit chưa được cải biến.

Các dẫn xuất PEG chứa một nhóm ái nhân mạnh (tức là hyđrazit, hyđrazin, hyđroxylamin hoặc semicarbazit)

Theo một phương án của sáng chế, polypeptit relaxin chứa axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên chứa carbonyl được cải biến với dẫn xuất PEG chứa gốc hyđrazin, hyđroxylamin, hyđrazit hoặc semicarbazit ở đầu tận cùng được liên kết trực tiếp với bộ khung PEG.

Theo một số phương án, dẫn xuất PEG có đầu tận cùng hyđroxylamin sẽ có công thức:

$$RO\text{-}(CH_2CH_2O)_n\text{-}O\text{-}(CH_2)_m\text{-}O\text{-}NH_2$$

trong đó R là alkyl mạch thẳng (metyl, etyl, propyl, v.v.), m bằng 2 đến 10 và n bằng 100 đến 1.000 (tức là khối lượng phân tử trung bình nằm trong khoảng từ 5kDa đến 40kDa).

Theo một số phương án, dẫn xuất PEG chứa hyđrazin hoặc hyđrazit có công thức:

$$RO\text{-}(CH_2CH_2O)_n\text{-}O\text{-}(CH_2)_m\text{-}X\text{-}NH\text{-}NH_2$$

trong đó R là alkyl mạch thẳng (metyl, etyl, propyl, v.v.), m bằng 2 đến 10 và n bằng 100 đến 1.000 và X là nhóm carbonyl tùy ý (C=O) có thể có mặt hoặc không có mặt.

Theo một số phương án, dẫn xuất PEG chứa semicarbazit có công thức:

$$RO\text{-}(CH_2CH_2O)_n\text{ -}O\text{-}(CH_2)_m\text{-}NH\text{-}C(O)\text{-}NH\text{-}NH_2$$

trong đó R là alkyl mạch thẳng (metyl, etyl, propyl, v.v.), m bằng 2 đến 10 và n bằng 100 đến 1.000.

Theo một phương án khác, polypeptit relaxin chứa axit amin chứa carbonyl được cải biến bằng dẫn xuất PEG chứa gốc hyđroxylamin, hyđrazit, hyđrazin, hoặc semicarbazit ở đầu tận cùng được liên kết với bộ khung PEG nhờ liên kết amit.

Theo một số phương án, các dẫn xuất PEG có đầu tận cùng hyđroxyl amin có công thức:

$$RO\text{-}(CH_2CH_2O)_n\text{-}O\text{-}(CH_2)_2\text{-}NH\text{-}C(O)(CH_2)_m\text{-}O\text{-}NH_2$$

trong đó R là alkyl mạch thẳng (metyl, etyl, propyl, v.v.), m bằng 2 đến 10 và n bằng 100 đến 1.000 (tức là khối lượng phân tử trung bình nằm trong khoảng từ 5kDa đến 40kDa).

Theo một số phương án, các dẫn xuất PEG chứa hyđrazin hoặc hyđrazit có công thức:

$$RO\text{-}(CH_2CH_2O)_n\text{-}O\text{-}(CH_2)_2\text{-}NH\text{-}C(O)(CH_2)_m\text{-}X\text{-}NH\text{-}NH_2$$

trong đó R là alkyl mạch thẳng (metyl, etyl, propyl, v.v.), m bằng 2 đến 10, n bằng 100 đến 1.000 và X tùy ý là nhóm carbonyl (C=O) có thể có mặt hoặc không có mặt.

Theo một số phương án, các dẫn xuất PEG chứa semicarbazit có công thức:

$$RO\text{-}(CH_2CH_2O)_n\text{-}O\text{-}(CH_2)_2\text{-}NH\text{-}C(O)(CH_2)_m\text{-}NH\text{-}C(O)\text{-}NH\text{-}NH_2$$

trong đó R là alkyl mạch thẳng (metyl, etyl, propyl, v.v.), m bằng 2 đến 10 và n bằng 100 đến 1.000.

Theo một phương án khác, polypeptit relaxin chứa axit amin chứa carbonyl được cải biến bằng dẫn xuất PEG mạch nhánh chứa một gốc hyđrazin, hyđroxylamin, hyđrazit hoặc semicarbazit ở đầu tận cùng, trong đó mỗi mạch của PEG mạch nhánh có khối lượng phân tử (MW) nằm trong khoảng từ 10kDa đến 40kDa và, có thể nằm trong khoảng từ 5kDa đến 20kDa.

Theo một phương án khác, polypeptit relaxin chứa axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên được cải biến bằng dẫn xuất PEG có cấu trúc mạch nhánh. Ví dụ, theo một số phương án, dẫn xuất PEG có đầu tận cùng hyđrazin hoặc hyđrazit có công thức sau:

$$[RO\text{-}(CH_2CH_2O)_n\text{-}O\text{-}(CH_2)_2\text{-}NH\text{-}C(O)]_2CH(CH_2)_m\text{-}X\text{-}NH\text{-}NH_2$$

trong đó R là alkyl mạch thẳng (metyl, etyl, propyl, v.v.), m bằng 2 đến 10 và n bằng 100 đến 1.000, và X tùy ý là nhóm carbonyl (C=O) có thể có mặt hoặc không có mặt.

Theo một số phương án, các dẫn xuất PEG chứa nhóm semicarbazit có công thức:

$$[RO\text{-}(CH_2CH_2O)_n\text{-}O\text{-}(CH_2)_2\text{-}C(O)\text{-}NH\text{-}CH_2\text{-}CH_2]_2CH\text{-}X\text{-}(CH_2)_m\text{-}NH\text{-}C(O)\text{-}NH\text{-}NH_2$$

trong đó R là alkyl mạch thẳng (metyl, etyl, propyl, v.v.), X tùy ý là NH, O, S, C(O) hoặc không có mặt, m bằng 2 đến 10 và n bằng 100 đến 1.000.

Theo một số phương án, các dẫn xuất PEG chứa nhóm hyđroxylamin sẽ có công thức:

$$[RO\text{-}(CH_2CH_2O)_n\text{-}O\text{-}(CH_2)_2\text{-}C(O)\text{-}NH\text{-}CH_2\text{-}CH_2]_2CH\text{-}X\text{-}(CH_2)_m\text{-}O\text{-}NH_2$$

trong đó R là alkyl mạch thẳng (metyl, etyl, propyl, v.v.), X tùy ý là NH, O, S, C(O) hoặc không có mặt, m bằng 2 đến 10 và n bằng 100 đến 1.000.

Mức độ và vị trí mà ở đó polyme hòa tan trong nước được liên kết với polypeptit relaxin có thể điều biến sự liên kết của polypeptit relaxin với polypeptit thụ thể relaxin. Theo một số phương án, các liên kết được sắp xếp sao cho polypeptit relaxin liên kết thụ thể polypeptit relaxin với Kd bằng khoảng 400nM hoặc thấp hơn, với Kd bằng 150nM hoặc thấp hơn, và trong một số trường hợp với Kd bằng 100nM hoặc thấp hơn, như đo được nhờ thử nghiệm liên kết cân bằng, như thử nghiệm đã được bộc lộ trong Spencer et al., *J. Biol. Chem.*, 263:7862-7867(1988).

Phương pháp và hóa chất để hoạt hóa các polyme cũng như để tiếp hợp các peptit được bộc lộ trong các tài liệu chuyên ngành và đã biết trong lĩnh vực phương pháp này. Các phương pháp thường dùng để hoạt hóa các polyme bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, phương pháp hoạt hóa các nhóm chức với xyanogen bromua, periođat, glutaralđehyt, biepoxit, epiclohyđrin, đivinylsulfon, carbođiimit, sulfonyl halogenua, triclotriazin, v.v. (xem: R. F. Taylor, (1991), *PROTEIN IMMOBILISATION. FUNDAMENTAL AND APPLICATIONS*, Marcel Dekker, N.Y.; S. S. Wong, (1992), *CHEMISTRY OF PROTEIN CONJUGATION AND CROSSLINKING*, CRC Press, Boca Raton; G. T, Hermanson et al., (1993), *IMMOBILIZED AFFINITY LIGAND TECHNIQUES*, Academic Press, N.Y.; Dunn, R.L. et al., Eds. *POLYMEIC DRUGS AND DRUG DELIVERY SYSTEMS*, ACS Symposium Series Vol. 469, *American Chemical Society*, Washington, D.C. 1991).

Một số tạp chí và công trình nghiên cứu về việc tạo nhóm chức và tiếp hợp của PEG là sẵn có. Ví dụ, xem: Hams, *Macromol. Chem. Phys.* C25: 325-373 (1985); Scouten, *Methods in Enzymology* 135: 30-65 (1987); Wong et al., *Enzyme Microb. Technol.* 14: 866-874 (1992); Delgado et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* 9: 249-304 (1992); Zalipsky, *Bioconjugate Chem.* 6: 150-165 (1995).

Phương pháp hoạt hóa các polyme còn có thể được tìm thấy trong WO 94/17039, patent Mỹ số 5,324,844, WO 94/18247, WO 94/04193, patent Mỹ số 5,219,564, patent Mỹ số 5,122,614, WO 90/13540, patent Mỹ số 5,281,698, và WO 93/15189, và phương

pháp tiếp hợp giữa các polyme đã được hoạt hóa và các enzym bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, Yếu tố đông máu VIII (WO 94/15625), hemoglobin (WO 94/09027), phân tử mang oxy (patent Mỹ số 4,412,989), ribonucleaza và superoxit đismutaza (Veronese et al., *App. Biochem. Biotech.* 11: 141-52 (1985)). Tất cả các tài liệu tham khảo và các patent này được kết hợp vào sáng chế bằng cách viện dẫn.

Phản ứng PEGyl hóa (tức là bổ sung polyme bất kỳ tan trong nước) của các polypeptit relaxin chứa axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên, như p-aziđo-L-phenylalanin, được thực hiện theo phương pháp thuận tiện bất kỳ. Ví dụ, polypeptit relaxin được PEGyl hóa với dẫn xuất mPEG có đầu tận cùng alkyn. Một cách vắn tắt, lượng dư mPEG(5000)-O-CH_2-C≡CH rắn được bổ sung, đồng thời khuấy, vào dung dịch nước polypeptit relaxin chứa p-aziđo-L-Phe- ở nhiệt độ phòng. Nhìn chung, dung dịch nước này được đệm bằng dung dịch đệm có độ pKa gần với độ pH mà ở đó phản ứng được tiến hành (thường ở độ pH nằm trong khoảng từ 4 đến 10). Ví dụ về dung dịch đệm thích hợp để PEGyl hóa ở độ pH 7,5 bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, HEPES, phosphat, borat, TRIS-HC1, EPPS, và TES chẳng hạn. Độ pH được theo dõi liên tục và điều chỉnh, nếu cần. Phản ứng này thường được để xảy ra tiếp tục trong khoảng thời gian từ 1 đến 48 giờ.

Tiếp theo, các sản phẩm phản ứng được sắc ký tương tác kỵ nước để tách các biến thể polypeptit relaxin đã được PEGyl hóa ra khỏi mPEG(5000)-O-CH_2-C≡CH tự do và các phức hợp với khối lượng phân tử cao bất kỳ của polypeptit relaxin đã được pegylat hóa mà có thể tạo ra khi PEG đã được phong bế được hoạt hóa ở cả hai đầu của phân tử này, nhờ đó liên kết chéo với các phân tử biến thể của polypeptit relaxin. Các điều kiện trong quá trình sắc ký tương tác kỵ nước là các điều kiện mà không có mPEG(5000)-O-CH_2-C≡CH chảy qua cột, trong khi phức hợp bất kỳ biến thể polypeptit relaxin đã được PEGyl hóa rửa giải sau khi các dạng mong muốn, mà chứa một phân tử biến thể polypeptit relaxin được tiếp hợp với một hoặc nhiều nhóm PEG. Các điều kiện thích hợp thay đổi tùy theo kích thước tương đối của phức hợp đã liên kết ngang so với các thể tiếp hợp mong muốn và dễ dàng được xác định bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Dung môi rửa giải chứa các thể tiếp hợp mong muốn được cô bằng cách siêu lọc và loại muối bằng cách lọc thẩm tách.

Nếu cần, polypeptit relaxin đã được PEGyl hóa thu được từ sắc ký kỵ nước có thể được tinh chế tiếp bằng một hoặc nhiều quy trình mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này đã biết bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, phương pháp sắc ký ái lực; phương pháp sắc ký trao đổi anion hoặc cation (bằng cách sử dụng, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, DEAE SEPHAROZA); phương pháp sắc ký trên silic đioxit; phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao pha đảo; phương pháp lọc gel (bằng cách sử dụng, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, SEPHADEX G-75); phương pháp sắc ký tương tác kỵ nước; phương pháp sắc ký loại cỡ, phương pháp sắc ký chelat-kim loại; siêu lọc/lọc thẩm tách; phương pháp kết tủa bằng etanol; phương pháp kết tủa bằng amoni sulfat; phương pháp tinh lọc protein theo điểm đẳng điện; phương pháp sắc ký chuyển dịch; các quy trình điện di (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, điện di hội tụ đẳng điện điều chế), dựa trên độ hòa tan khác biệt (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, phương pháp làm kết tủa bằng amoni sulfat), hoặc chiết. Khối lượng phân tử biểu kiến có thể được ước tính bằng GPC bằng cách so sánh với các tiêu chuẩn đối với protein hình cầu (Preneta, AZ trong *PROTEIN PURIFICATION METHODS, A PRACTICAL APPROACH* (Harris & Angal, Eds.) IRL Press 1989, 293-306). Độ tinh khiết của thể tiếp hợp relaxin-PEG có thể được đánh giá bởi sự thoái biến phân giải protein (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, việc phân cắt trypsin) tiếp theo phân tích phổ khối. Pepinsky RB., et al., *J. Pharmcol. & Exp. Ther.* 297(3):1059-66 (2001).

Polyme hòa tan trong nước liên kết với axit amin của polypeptit relaxin theo sáng chế có thể được tạo dẫn xuất tiếp hoặc được thế mà không có giới hạn.

Các dẫn xuất PEG chứa azit

Theo một phương án khác, polypeptit relaxin được cải biến bằng dẫn xuất PEG chứa gốc azit sẽ phản ứng với gốc alkyn có mặt trên chuỗi bên của axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên. Nhìn chung, các dẫn xuất PEG sẽ có khối lượng phân tử trung bình nằm trong khoảng từ 1kDa đến 100kDa và, theo một số phương án, từ 10kDa đến 40kDa.

Theo một số phương án, dẫn xuất PEG có đầu tận cùng azit có công thức:

$$RO\text{-}(CH_2CH_2O)_n\text{-}O\text{-}(CH_2)_m\text{-}N_3$$

trong đó R là alkyl mạch thẳng (metyl, etyl, propyl, v.v.), m bằng 2 đến 10 và n bằng 100 đến 1.000 (tức là khối lượng phân tử trung bình nằm trong khoảng từ 5kDa đến 40kDa).

Theo phương án khác, dẫn xuất PEG có đầu tận cùng azit có công thức:

$$RO\text{-}(CH_2CH_2O)_n\text{-}O\text{-}(CH_2)_m\text{-}NH\text{-}C(O)\text{-}(CH_2)p\text{-}N_3$$

trong đó R là alkyl mạch thẳng (metyl, etyl, propyl, v.v.), m bằng 2 đến 10, p bằng 2 đến 10 và n bằng 100 đến 1.000 (tức là khối lượng phân tử trung bình nằm trong khoảng từ 5kDa đến 40kDa).

Theo một phương án khác, polypeptit relaxin chứa axit amin chứa alkyn được cải biến bằng dẫn xuất PEG mạch nhánh chứa một gốc azit đầu tận cùng, với mỗi mạch của PEG mạch nhánh có khối lượng phân tử (MW) nằm trong khoảng từ 10kDa đến 40kDa và có thể nằm trong khoảng từ 5kDa đến 20kDa. Ví dụ, theo một số phương án, dẫn xuất PEG có đầu tận cùng azit có công thức sau:

$$[RO\text{-}(CH_2CH_2O)_n\text{-}O\text{-}(CH_2)_2\text{-}NH\text{-}C(O)]2CH(CH_2)_m\text{-}X\text{-}(CH_2)_pN_3$$

trong đó R là alkyl mạch thẳng (metyl, etyl, propyl, v.v.), m bằng 2 đến 10, p bằng 2 đến 10, và n bằng 100 đến 1.000, và X tùy ý là O, N, S hoặc nhóm carbonyl (C=O), trong mỗi trường hợp có thể có mặt hoặc không có mặt.

Các dẫn xuất PEG chứa alkyn

Theo một phương án khác, polypeptit relaxin được cải biến bằng dẫn xuất PEG chứa gốc alkyn sẽ phản ứng với gốc azit có mặt trên chuỗi bên của axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên.

Theo một số phương án, dẫn xuất PEG có đầu tận cùng alkyn có công thức sau:

$$RO\text{-}(CH_2CH_2O)_n\text{-}O\text{-}(CH_2)_m\text{-}C\equiv CH$$

trong đó R là alkyl mạch thẳng (metyl, etyl, propyl, v.v.), m bằng 2 đến 10 và n bằng 100 đến 1.000 (tức là khối lượng phân tử trung bình nằm trong khoảng từ 5kDa đến 40kDa).

Theo một phương án khác, polypeptit relaxin chứa axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên chứa alkyn được cải biến bằng dẫn xuất PEG chứa azit ở đầu tận cùng hoặc gốc alkyn ở đầu tận cùng được liên kết với bộ khung PEG bằng liên kết amit.

Theo một số phương án, dẫn xuất PEG có đầu tận cùng alkyn có công thức sau:

$$RO\text{-}(CH_2CH_2O)_n\text{-}O\text{-}(CH_2)_m\text{-}NH\text{-}C(O)\text{-}(CH_2)_p\text{-}C{\equiv}CH$$

trong đó R là alkyl mạch thẳng (metyl, etyl, propyl, v.v.), m bằng 2 đến 10, p bằng 2 đến 10 và n bằng 100 đến 1.000.

Theo một phương án khác, polypeptit relaxin chứa axit amin chứa azit được cải biến bằng dẫn xuất PEG mạch nhánh chứa gốc alkyn ở đầu tận cùng, trong đó mỗi mạch của PEG mạch nhánh có khối lượng phân tử (MW) nằm trong khoảng từ 10kDa đến 40kDa và có thể nằm trong khoảng từ 5kDa đến 20kDa, ví dụ, theo một số phương án, dẫn xuất PEG đầu tận cùng alkyn có công thức sau:

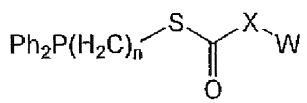
$$[RO\text{-}(CH_2CH_2O)_n\text{-}O\text{-}(CH_2)_2\text{-}NH\text{-}C(O)]2CH(CH_2)_m\text{-}X\text{-}(CH_2)_pC{\equiv}CH$$

trong đó R là alkyl mạch thẳng (metyl, etyl, propyl, v.v.), m bằng 2 đến 10, p bằng 2 đến 10, và n bằng 100 đến 1.000, và X tùy ý là O, N, S hoặc nhóm carbonyl (C=O), hoặc không có mặt.

Các dẫn xuất PEG chứa phosphin

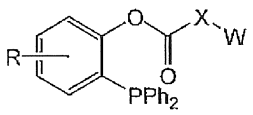
Theo một phương án khác, polypeptit relaxin được cải biến bằng dẫn xuất PEG chứa nhóm chức được hoạt hóa (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, este, cacbonat) còn chứa nhóm aryl phosphin mà sẽ phản ứng với gốc azit có mặt trên chuỗi bên của axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên. Nhìn chung, các dẫn xuất PEG sẽ có khối lượng phân tử trung bình nằm trong khoảng từ 1kDa đến 100kDa và, theo một số phương án, nằm trong khoảng từ 10kDa đến 40kDa.

Theo một số phương án, dẫn xuất PEG có công thức:



trong đó n bằng 1 đến 10; X có thể là O, N, S hoặc không có mặt, Ph là phenyl, và W là polyme hòa tan trong nước.

Theo một số phương án, dẫn xuất PEG có công thức:



trong đó X có thể O, N, S hoặc không có mặt, Ph là phenyl, W là polyme hòa tan trong nước và R có thể H, alkyl, aryl, alkyl được thế và thế các nhóm aryl. Các nhóm R làm ví dụ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, -CH_2, -C(CH3) 3, -OR', -NR'R", -SR', -halogen, -C(O)R', -CONR'R", -$S(O)_2$R', -$S(O)_2$NR'R", -CN và -NO_2. Mỗi nhóm R', R", R'" và R"" độc lập dùng để chỉ hyđro, heteroalkyl được thế hoặc không được thế, aryl được thế hoặc không được thế, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, aryl được thế bằng 1 đến 3 halogen, alkyl được thế hoặc không được thế, các nhóm alkoxy hoặc thioalkoxy, hoặc các nhóm arylalkyl. Nếu hợp chất theo sáng chế có nhiều hơn một nhóm R, ví dụ, thì mỗi nhóm R độc lập được chọn như từng nhóm R', R", R'" và R"" khi có mặt nhiều hơn một trong số các nhóm này. Nếu R' và R" được gắn vào cùng nguyên tử nitơ, thì chúng có thể được kết hợp với nguyên tử nitơ để tạo ra vòng có 5, 6, hoặc 7 cạnh. Ví dụ, -NR'R" có nghĩa bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, 1-pyroliđinyl và 4-morpholinyl. Từ phần bàn luận nêu trên về phần tử thế, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này cần hiểu rằng thuật ngữ "alkyl" được dự tính bao gồm các nhóm bao gồm nguyên tử cacbon liên kết với các nhóm khác không phải các nhóm hyđro, như haloalkyl (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, -CF_3 và -CH_2CF_3) và axyl (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, -$C(O)CH_3$, -$C(O)CF_3$, -$C(O)CH_2OCH_3$, và các nhóm tương tự).

Các dẫn xuất PEG khác và các phương pháp PEGyl hóa thông thường

Các phân tử PEG khác làm ví dụ có thể được liên kết với các polypeptit relaxin, cũng như các phương pháp PEGyl hóa bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các phương pháp đã được bộc lộ trong, ví dụ, công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số. 2004/0001838; 2002/0052009; 2003/0162949; 2004/0013637; 2003/0228274; 2003/0220447; 2003/0158333; 2003/0143596; 2003/0114647; 2003/0105275 2003/0105224;

2003/0023023; 2002/0156047; 2002/0099133; 2002/0086939; 2002/0082345 2002/0072573; 2002/0052430; 2002/0040076; 2002/0037949; 2002/0002250; 2001/0056171 2001/0044526; 2001/0021763; Patent Mỹ số 6,646,110; 5,824,778; 5,476,653; 5,219,564 5,629,384; 5,736,625; 4,902,502; 5,281,698; 5,122,614; 5,473,034; 5,516,673; 5,382,657 6,552,167; 6,610,281; 6,515,100; 6,461,603; 6,436,386; 6,214,966; 5,990,237; 5,900,461 5,739,208; 5,672,662; 5,446,090; 5,808,096; 5,612,460; 5,324,844; 5,252,714; 6,420,339 6,201,072; 6,451,346; 6,306,821; 5,559,213; 5,747,646; 5,834,594; 5,849,860; 5,980,948 6,004,573; 6,129,912; WO 97/32607, EP 229,108, EP 402,378, WO 92/16555, WO 94/04193, WO 94/14758, WO 94/17039, WO 94/18247, WO 94/28024, WO 95/00162, WO 95/11924, W095/13090, WO 95/33490, WO 96/00080, WO 97/18832, WO 98/41562, WO 98/48837, WO 99/32134, WO 99/32139, WO 99/32140, WO 96/40791, WO 98/32466, WO 95/06058, EP 439 508, WO 97/03106, WO 96/21469, WO 95/13312, EP 921 131, WO 98/05363, EP 809 996, WO 96/41813, WO 96/07670, EP 605 963, EP 510 356, EP 400 472, EP 183 503 và EP 154 316, được kết hợp vào sáng chế bằng cách viện dẫn. Các phân tử PEG bất kỳ được bộc lộ trong bản mô tả này có thể được sử dụng ở dạng bất kỳ, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, mạch đơn, mạch nhánh, mạch đa nhánh, đơn chức, hai chức, đa chức, hoặc tổ hợp bất kỳ của chúng.

Các polyme và các dẫn xuất PEG khác bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các dẫn xuất hyđroxylamin (aminooxy) PEG, bộc lộ trong các tài liệu sáng chế sau, toàn bộ nội dung của các tài liệu này được kết hợp vào sáng chế bằng cách viện dẫn: công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 2006/0194256, công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 2006/0217532, công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 2006/0217289, đơn tạm thời yêu cầu cấp patent Mỹ số 60/755,338; đơn tạm thời yêu cầu cấp patent Mỹ số 60/755,711; đơn tạm thời yêu cầu cấp patent Mỹ số 60/755,018; đơn quốc tế số PCT/US06/49397; WO 2006/069246; đơn tạm thời yêu cầu cấp patent Mỹ số 60/743,041; đơn tạm thời yêu cầu cấp patent Mỹ số 60/743,040; đơn quốc tế số PCT/US06/47822; đơn tạm thời yêu cầu cấp patent Mỹ số 60/882,819; đơn tạm thời yêu cầu cấp patent Mỹ số 60/882,500; và đơn tạm thời yêu cầu cấp patent Mỹ số 60/870,594.

Protein dung hợp Fc khác loài

Các hợp chất relaxin nêu trên có thể được dung hợp trực tiếp hoặc nhờ liên kết

peptit với phần Fc của globulin miễn dịch. Globulin miễn dịch là các phân tử chứa mạch polypeptit được liên kết với nhau bởi liên kết đisulfua, thường có hai chuỗi nhẹ và hai chuỗi nặng. Trong mỗi chuỗi, một miền (V) có trình tự axit amin thay đổi tùy theo tính đặc trưng kháng thể của phân tử. Các miền khác (C) có trình tự hằng định khá giống với các phân tử cùng loại.

Được sử dụng trong bản mô tả, phần Fc của globulin miễn dịch có nghĩa giống với nghĩa dùng cho thuật ngữ này trong lĩnh vực miễn dịch học. Cụ thể, thuật ngữ này được sử dụng trong bản mô tả để chỉ đoạn kháng thể thu được bằng cách loại bỏ hai vùng liên kết kháng nguyên (các đoạn Fab) ra khỏi kháng thể. Một cách để loại bỏ các đoạn Fab là phân giải globulin miễn dịch bằng proteaza của nhựa đu đủ. Do đó, phần Fc được tạo ra từ các đoạn có kích thước xấp xỉ nhau chứa vùng hằng định từ cả hai chuỗi nặng, mà liên kết thông qua các tương tác không cộng hóa trị và các liên kết đisulfua. Phần Fc có thể có vùng bản lề và kéo dài qua các miền CH_2 và CH_3 đến đầu tận cùng C của kháng thể. Vùng bản lề đại diện cho globulin miễn dịch của người và chuột nhắt có thể được tìm thấy trong: *Antibody Engineering, A Practical Guide*, Borrebaeck, C. A, K., ed., W. H. Freeman and Co., 1992, nội dung của nó được kết hợp vào sáng chế bằng cách viện dẫn. Phần Fc còn có thể có một hoặc nhiều vị trí glycosyl hoá. Các trình tự axit amin của nhiều protein Fc đại diện chứa vùng bản lề, các miền CH_2 và CH_3, và một vị trí N-glycosyl hoá là đã biết trong lĩnh vực phương pháp này.

Có năm loại globulin miễn dịch của vùng Fc của người với các chức năng hiêu ứng (chức năng thực hiện) và các đặc tính dược động học khác nhau: IgG, IgA, IgM, IgD, và IgE. IgG là globulin miễn dịch phong phú nhất trong huyết thanh. IgG còn có thời gian bán thải dài nhất trong huyết thanh chứa globulin miễn dịch bất kỳ (23 ngày). Không giống như các globulin miễn dịch khác, IgG được tái tuần hoàn một cách hiệu quả sau khi liên kết với thụ thể Fc. Có bốn phân nhóm IgG: G1, G2, G3, và G4, mỗi nhóm có các chức năng hiệu ứng (chức năng thực hiện) khác nhau. G1, G2, và G3 có thể liên kết C1q và sắp xếp bổ trợ trong khi G4 không thể. Mặc dù G3 có khả năng liên kết Clq hữu hiệu hơn Gl, Gl là hữu hiệu hơn trong việc gây ra quá trình phân giải tế bào được trực tiếp bổ trợ. G2 sắp xếp bổ trợ rất không hiệu quả. Vị trí liên kết Clq trên IgG được đặt trong vùng carboxy đầu tận cùng của miền CH_2.

Tất cả các phân nhóm IgG có khả năng liên kết với các thụ thể Fc (CD16, CD32, CD64), trong đó G1 và G3 là hữu hiệu hơn G2 và G4. Vùng liên kết thụ thể Fc của IgG được tạo ra bởi các gốc nằm trong cả vùng bản lề và các vùng đầu tận cùng carboxy của miền CH_2.

IgA có thể tồn tại ở cả dạng monome và đime được giữ với nhau bởi mạch J. IgA là Ig nhiều thứ hai trong huyết thanh, nhưng nó chỉ có thời gian bán thải 6 ngày. IgA có ba chức năng hiệu ứng (chức năng thực hiện). Nó liên kết với thụ thể đặc hiệu IgA trên tế bào đơn nhân lớn và tế bào ưa eosin, mà lần lượt dẫn đến sự thực bào và sự mất hạt. Nó cũng có thể bố trí bổ trợ nhờ một chu trình khác chưa biết rõ.

IgM được biểu hiện dưới dạng pentame hoặc hexame, cả hai dạng này được gắn với nhau bởi mạch J. IgM có thời gian bán thải trong huyết thanh là 5 ngày. Nó liên kết yếu với Clq nhờ vị trí liên kết nằm trên miền CH3 của nó. IgD có thời gian bán thải là 3 ngày trong huyết thanh. Vẫn chưa biết rõ Ig này có các chức năng hiệu ứng (chức năng thực hiện) nào. IgE là Ig dạng monome và có thời gian bán thải trong huyết thanh là 2,5 ngày. IgE liên kết với hai thụ thể Fc, dẫn đến sự mất hạt và giải phóng các tác nhân tiền viêm.

Tuỳ thuộc vào hiệu lực mong muốn *in vivo*, các protein dung hợp khác loài theo sáng chế có thể chứa các isotyp bất kỳ trong số các isotyp nêu trên hoặc có thể chứa các vùng Fc được đột biến trong đó các chức năng bổ trợ và/hoặc liên kết thụ thể Fc đã được thay đổi. Do đó, các protein dung hợp khác loài theo sáng chế có thể chứa toàn bộ phần Fc của globulin miễn dịch, các đoạn của phần Fc của globulin miễn dịch, hoặc phần tương tự của chúng dung hợp với hợp chất interferon beta.

Các protein dung hợp theo sáng chế có thể bao gồm các protein mạch đơn hoặc các polypeptit đa mạch. Hai hoặc nhiều protein dung hợp Fc có thể được tạo ra sao cho chúng tương tác thông qua các liên kết đisulfua thường được tạo ra giữa các vùng Fc. Các multime này có thể có các hợp chất interferon beta đồng nhất hoặc chúng có thể chứa các hợp chất interferon beta khác nhau được dung hợp ở đầu tận cùng N của phần Fc của protein dung hợp,

Bất kể cấu trúc cuối cùng của protein dung hợp, vùng Fc hoặc tương tự Fc có thể

đóng vai trò kéo dài thời gian bán thải trong huyết tương *in vivo* của hợp chất interferon beta được dung hợp ở đầu tận cùng N. Hơn nữa, thành phần interferon beta của hợp chất protein dung hợp cần phải giữ được ít nhất một hoạt tính sinh học của interferon beta. Hiện tượng tăng thời gian bán thải trong điều trị hoặc trong hệ tuần hoàn có thể được chứng minh bằng cách sử dụng phương pháp được bộc lộ trong bản mô tả này hoặc đã biết trong lĩnh vực phương pháp này, trong đó thời gian bán thải của protein dung hợp được so sánh với thời gian bán thải của hợp chất interferon beta riêng rẽ. Hoạt tính sinh học có thể được xác định bằng các phương pháp *in vitro* và *in vivo* đã biết trong lĩnh vực phương pháp này.

Do vùng Fc của IgG được tạo ra bởi sự phân giải protein có cùng thời gian bán thải *in vivo* như phân tử IgG nguyên vẹn và các đoạn Fab bị suy biến một cách nhanh chóng, tin rằng trình tự liên quan để kéo dài thời gian bán thải tập trung vào các miền CH2 và/hoặc CH3. Hơn nữa, đã được thể hiện trong các tài liệu chuyên ngành rằng tốc độ dị hóa của các biến thể IgG không gắn kết với thụ thể Fc với ái lực cao hoặc Clq không thể phân biệt được với tốc độ thanh thải của kháng thể bố mẹ thể dại, cho thấy rằng vị trí dị hóa là khác với vị trí liên quan đến thụ thể Fc hoặc liên kết Clq. [Wawrzynczak et al., (1992) *Molecular Immunology* 29:221]. Các nghiên cứu gây đột biến điểm định hướng bằng cách sử dụng vùng IgGl Fc của chuột gợi ý rằng vị trí của vùng IgGl Fc mà điều khiển tốc độ dị hóa được đặt trên bề mặt chung miền CH_2-CH_3. Vùng Fc có thể được cải biến ở vị trí dị hóa để tối ưu hóa thời gian bán thải của protein dung hợp. Vùng Fc được sử dụng cho các protein dung hợp theo sáng chế có thể thu được từ IgG1 hoặc vùng Fc của IgG4, và có thể chứa cả hai vùng CH2 và CH3, kể cả vùng bản lề.

Protein dung hợp albumin khác loài

Relaxin được bộc lộ trong bản mô tả này có thể được dung hợp trực tiếp hoặc nhờ nhóm liên kết peptit, polyme hòa tan trong nước, hoặc nhóm liên kết tiền dược chất với albumin hoặc chất tương tự, đoạn, hoặc dẫn xuất của chúng. Nhìn chung, các protein albumin là một phần của các protein dung hợp theo sáng chế có thể thu được từ albumin đã được tách dòng từ loài bất kỳ, kể cả người. Albumin huyết thanh của người (human serum albumin - HSA) có một mạch đơn polypeptit không được glycosyl hóa có 585 axit amin có khối lượng phân tử 66.500. Trình tự axit amin của HSA của người là đã biết

[xem: Meloun, et al., (1975) *FEBS Letters* 58:136; Behrens, et al., (1975) *Fed. Proc.* 34:591; Lawn, et al., (1981) *Axit nucleics Research* 9:6102-6114; Minghetti, et al., (1986) *J. Biol. Chem.* 261:6747, các tài liệu này được kết hợp vào sáng chế bằng cách viện dẫn]. Nhiều loại biến thể đa hình cũng như chất tương tự albumin và các đoạn albumin đã được mô tả. [xem: Weitkamp, et al.,, (1973) *Ann. Hum. Genet.* 37:219]. Ví dụ, trong EP 322,094, nhiều dạng HSA ngắn hơn được bộc lộ. Một vài trong số các đoạn HSA được bộc lộ, bao gồm HSA(1-373), HSA(l-388), HSA(l-389), HSA(l-369), và HSA(1-419) và các đoạn nằm trong khoảng 1 đến 369 và 1 đến 419. EP 399,666 bộc lộ các đoạn albumin chứa HSA(1-177) và HSA(1-200) và các đoạn nằm trong khoảng từ HSA(1-177) đến HSA(1-200).

Cần hiểu rằng các protein dung hợp khác loài theo sáng chế chứa các hợp chất relaxin được ghép cặp với protein albumin bất kỳ bao gồm các đoạn, chất tương tự, và các dẫn xuất, trong đó protein dung hợp này có hoạt tính sinh học và có thời gian bán thải trong huyết tương dài hơn hợp chất relaxin riêng biệt. Do đó, phần albumin của protein dung hợp không nhất thiết phải có thời gian bán thải trong huyết tương bằng thời gian bán thải trong huyết tương của albumin nguyên thể của người. Các đoạn, chất tương tự, và các dẫn xuất đã biết hoặc có thể được tạo ra mà có thời gian bán thải dài hơn hoặc có thời gian bán thải nằm giữa thời gian bán thải của albumin nguyên thể của người và hợp chất relaxin đáng quan tâm.

Các protein dung hợp khác loài theo sáng chế bao gồm các protein có sự thay thế axit amin bảo toàn trong hợp chất relaxin và/hoặc phần Fc hoặc albumin của protein dung hợp. "Sự thay thế bảo toàn" là sự thay thế axit amin bằng một axit amin khác có cùng điện tích thực và có kích thước và hình dạng gần như giống nhau. Các axit amin với chuỗi bên của axit amin là béo hoặc béo được thế có kích thước gần như nhau khi tổng số nguyên tử cacbon và các dị nguyên tử trong các chuỗi bên của chúng khác biệt không nhiều hơn bốn. Chúng có hình dạng gần như nhau khi số lượng của nhánh trên các chuỗi bên của chúng khác biệt không nhiều hơn một, các axit amin với các nhóm phenyl hoặc phenyl được thế trên các chuỗi bên của chúng được xem là có kích thước và hình dạng gần như nhau. Trừ khi có quy định cụ thể khác trong bản mô tả, tốt hơn nếu sự thay thế bảo toàn được tạo ra với các axit amin có trong tự nhiên.

Albumin thể dại và các protein globulin miễn dịch có thể nhận được từ nhiều nguồn. Ví dụ, các protein này có thể nhận được từ thư viện ADN bổ sung được điều chế từ mô hoặc tế bào biểu hiện ARN thông tin đáng quan tâm ở mức có thể phát hiện được. Các thư viện có thể được sàng lọc với mẫu dò được thiết kế bằng cách sử dụng ADN hoặc trình tự protein đã được công bố của protein cụ thể đáng quan tâm. Ví dụ, các vùng hằng định globulin miễn dịch chuỗi nhẹ hoặc chuỗi nặng được bộc lộ trong: Adams, et al., (1980) *Biochemistry* 19:2711-2719; Goughet, et al., (1980) *Biochemistry* 19:2702-2710; Dolby, et al., (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:6027- 6031; Rice, et al., (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:7862-7862; Falkner, et al., (1982) *Nature* 298:286-288; và Morrison, et al., (1984) *Ann. Rev. Immunol.* 2:239-256. Một số tài liệu tham khảo bộc lộ protein albumin và các trình tự ADN bao gồm: Meloun, et al., (1975) *FEBS Letters* 58:136; Behrens, et al., (1975) *Fed. Proc.* 34:591; Lawn, et al., (1981) *Axit nucleics Research* 9:6102-6114; và Minghetti, et al., (1986) *J. Biol. Chem.* 261:6747.

Xác định tính chất của các protein dung hợp khác loài theo sáng chế

Hiện có nhiều phương pháp mô tả đặc tính của các protein dung hợp theo sáng chế. Một vài trong số các phương pháp này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở: SDS-PAGE được ghép cặp với các phương pháp nhuộm màu protein hoặc thấm miễn dịch bằng cách sử dụng các kháng thể kháng IgG hoặc kháng HSA. Các phương pháp khác bao gồm phương pháp giải hấp bằng laze có sự trợ giúp của chất nền/ion hoá-phổ khối (MALDI-MS), phương pháp sắc ký lỏng/phổ khối, điện di hội tụ đẳng điện, trao đổi anion dùng trong phân tích, phương pháp tinh lọc protein theo điểm đẳng điện, và phổ ánh sáng phân cực vòng, chẳng hạn.

Tăng cường ái lực đối với albumin huyết thanh

Các phân tử khác nhau cũng có thể được dung hợp với các polypeptit relaxin theo sáng chế để điều biến thời gian bán thải của các polypeptit relaxin trong huyết thanh. Theo một số phương án, các phân tử được liên kết hoặc dung hợp với các polypeptit relaxin theo sáng chế để tăng cường ái lực đối với albumin huyết thanh nội sinh ở động vật.

Ví dụ, trong một số trường hợp, thể dung hợp tái tổ hợp của polypeptit relaxin và

trình tự liên kết albumin được tạo ra. Ví dụ về các trình tự liên kết albumin bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, miền liên kết albumin từ protein G của chuỗi cầu khuẩn (xem: Makrides et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 277:534-542 (1996) và Sjolander et al., *J. Immunol. Methods* 201:115-123 (1997)), hoặc các peptit liên kết albumin như các peptit đã được bộc lộ trong, ví dụ, Dennis, et al., *J. Biol. Chem.* 277:35035-35043 (2002).

Theo các phương án khác, các polypeptit relaxin theo sáng chế được axyl hóa bằng các axit béo. Trong một số trường hợp, các axit béo thúc đẩy sự liên kết với albumin huyết thanh. Ví dụ, xem: Kurtzhals, et al., *Biochem. J.* 312:725-731 (1995).

Theo các phương án khác, các polypeptit relaxin theo sáng chế được dung hợp trực tiếp với albumin huyết thanh (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, albumin huyết thanh người). Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này cần phải nhận thấy rằng nhiều loại các phân tử khác còn có thể được liên kết với relaxin theo sáng chế để điều biến việc liên kết với albumin huyết thanh hoặc các thành phần khác của huyết thanh,

Sự glycosyl hoá các polypeptit relaxin

Sáng chế bao gồm các polypeptit relaxin kết hợp một hoặc nhiều axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên mang các gốc sacarit. Gốc sacarit có thể có trong tự nhiên (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, N-axetylglucosamin) hoặc không có trong tự nhiên (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, 3-flogalactoza). Sacarit có thể được liên kết với axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên bằng liên kết glycosiđic được liên kết ở N hoặc O (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, N-axetylgalactoza-L-serin) hoặc liên kết không có trong tự nhiên (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, oxim hoặc glycosit tương ứng được liên kết ở C hoặc S).

Các gốc sacarit (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, glycosyl) có thể được bổ sung vào các polypeptit relaxin *in vivo* hoặc *in vitro*. Theo một số phương án, polypeptit relaxin chứa axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên chứa carbonyl được cải biến bằng sacarit được tạo dẫn xuất với nhóm aminooxy để tạo ra polypeptit tương ứng được glycosyl hóa được liên kết nhờ liên kết oxim. Sau khi đã được gắn vào axit amin đã được mã hóa không có trong tự nhiên, thì sacarit có thể được xử lý tiếp bằng cách xử lý bằng glycosyltransferaza và các enzym khác để tạo ra oligosacarit liên kết với polypeptit

relaxin. Ví dụ, xem: H. Liu, et al., *J. Am. Chem. Soc.* 125: 1702-1703 (2003).

Theo một số phương án, polypeptit relaxin chứa axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên chứa carbonyl được cải biến trực tiếp bằng glycan có cấu trúc xác định điều chế được ở dạng dẫn xuất aminooxy. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này cần phải nhận thấy rằng các nhóm chức khác, bao gồm azit, alkyn, hyđrazit, hyđrazin, và semicarbazit, có thể được sử dụng để liên kết sacarit với axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên.

Theo một số phương án, polypeptit relaxin chứa axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên chứa azit hoặc alkynyl sau đó có thể được cải biến lần lượt bằng, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, phản ứng cộng [3+2] xyclo Huisgen, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các dẫn xuất alkynyl hoặc azit. Phương pháp này cho phép các protein được cải biến với tính chọn lọc cực cao.

Các đime và multime relaxin

Sáng chế cũng đề cập đến hỗn hợp chứa relaxin và chất tương tự relaxin như homođime, heterođime, homomultime, hoặc heteromultime (tức là trime, tetrame, v.v.), trong đó relaxin chứa một hoặc nhiều axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên được liên kết với một relaxin khác hoặc biến thể relaxin của chúng hoặc polypeptit bất kỳ khác không phải là relaxin hoặc biến thể relaxin của chúng, trực tiếp vào bộ khung polypeptit hoặc nhờ nhóm liên kết. Do có khối lượng phân tử tăng so với monome, các thể tiếp hợp đime hoặc multime relaxin có thể có các đặc tính mới hoặc các đặc tính mong muốn, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các đặc tính dược lý, dược động học, dược lực học khác, thời gian bán thải trong quá trình điều trị bệnh được điều biến, hoặc thời gian bán thải trong huyết tương được điều biến so với relaxin ở dạng monome. Ví dụ về các chất tương tự relaxin ở dạng monome xem, ví dụ, patent Mỹ số 5,164,366 được cấp ngày 17 tháng 11 năm 1992 cho Balschmidt, P., và các đồng tác giả; patent Mỹ số 5,618,913 được cấp ngày 8 tháng 4 năm 1997 cho Brange, J., và các đồng tác giả; patent Mỹ số 5,514,646 được cấp ngày 7 tháng 5 năm 1996 cho Chance, R. E., và các đồng tác giả; và công bố EPO số 885,961, ngày 23 tháng 12 năm 1998 của Ertl, J., và đồng tác giả. Theo một số phương án, sáng chế đề cập đến chất tương tự relaxin ở dạng monome chứa

một hoặc nhiều gốc axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên và theo một số phương án, sáng chế đề cập đến chất tương tự relaxin dạng monomer, trong đó vị trí B28 là Asp, Lys, lie, Leu, Val hoặc Ala và gốc axit amin ở vị trí B29 là Lys hoặc Pro; chất tương tự relaxin dạng monome với Lys(B28)Pro(B29)-relaxin của người; chất tương tự relaxin dạng monome Asp(B28)-relaxin của người; và chất tương tự relaxin dạng monome Lys(B3)Ile(B28)-relaxin của người. Theo một số phương án, đime relaxin theo sáng chế sẽ điều biến sự tải nạp tín hiệu của thụ thể relaxin. Theo các phương án khác, đime hoặc multime relaxin theo sáng chế đóng vai trò làm chất đối kháng, chất chủ vận, hoặc chất điều biến thụ thể relaxin.

Theo một số phương án, một hoặc nhiều phân tử relaxin có mặt trong relaxin chứa đime hoặc multime chứa axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên được liên kết với polyme hòa tan trong nước.

Theo một số phương án, các polypeptit relaxin được liên kết trực tiếp, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, nhờ liên kết amit Asn-Lys hoặc liên kết đisulfua Cys-Cys. Theo một số phương án, các polypeptit relaxin, và/hoặc phân tử không phải relaxin được liên kết, bao gồm các axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên khác nhau để tạo điều kiện thuận lợi cho việc đime hoá, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, alkyn trong một axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên của polypeptit relaxin thứ nhất và azit trong một axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên của phân tử thứ hai sẽ được tiếp hợp nhờ phản ứng cộng [3+2] xyclo Huisgen. Theo cách khác, relaxin, và/hoặc phân tử không phải relaxin liên kết chứa axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên chứa keton có thể được tiếp hợp với polypeptit thứ hai chứa axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên chứa hyđroxylamin và các polypeptit được cho phản ứng nhờ sự tạo ra oxim tương ứng.

Theo cách khác, hai polypeptit relaxin, và/hoặc phân tử không phải relaxin được liên kết, liên kết nhờ nhóm liên kết. Nhóm liên kết hai chức khác loại hoặc cùng loại bất kỳ có thể được sử dụng để liên kết hai phân tử, và/hoặc các phân tử không phải relaxin được liên kết, mà có thể có trình tự bậc một giống nhau hoặc khác nhau. Trong một số trường hợp, nhóm liên kết mà được sử dụng để buộc relaxin, và/hoặc các phân tử không phải relaxin được liên kết với nhau có thể là chất phản ứng PEG hai chức năng. Nhóm

liên kết có thể có khối lượng phân tử hoặc chiều dài phân tử thay đổi trong khoảng rộng. Nhóm liên kết có khối lượng phân tử lớn hơn hoặc nhỏ hơn có thể được sử dụng để tạo ra mối liên hệ không gian hoặc cấu hình mong muốn giữa relaxin và thực thể được liên kết hoặc giữa relaxin và thụ thể của nó, hoặc giữa thực thể được liên kết và thành phần liên kết của nó, nếu có. Các nhóm liên kết có chiều dài phân tử dài hơn hoặc ngắn hơn cũng có thể được sử dụng để tạo ra khoảng trống mong muốn hoặc tính linh hoạt giữa relaxin và thực thể được liên kết, hoặc giữa thực thể được liên kết và thành phần liên kết của nó, nếu có.

Theo một số phương án, sáng chế đề cập đến nhóm liên kết hai chức năng hòa tan trong nước mà có cấu trúc quả tạ bao gồm: a) gốc chứa azit, alkyn, hyđrazin, hyđrazit, hyđroxylamin, hoặc carbonyl ở ít nhất một đầu thứ nhất của bộ khung polyme; và b) ít nhất một nhóm chức thứ hai ở đầu thứ hai của bộ khung polyme. Nhóm chức thứ hai có thể là giống hoặc khác với nhóm chức thứ nhất. Nhóm chức thứ hai, theo một số phương án, không phản ứng với nhóm chức thứ nhất. Theo một số phương án, sáng chế đề cập đến các hợp chất tan trong nước có ít nhất một nhánh thuộc cấu trúc phân tử mạch nhánh. Ví dụ, cấu trúc phân tử mạch nhánh có thể có dạng hình cây.

Theo một số phương án, sáng chế đề cập đến multime chứa một hoặc nhiều polypeptit relaxin, được tạo ra bởi các phản ứng với các polyme được hoạt hóa hòa tan trong nước có công thức:

$$R\text{-}(CH_2CH_2O)_n\text{-}O\text{-}(CH_2)_m\text{-}X$$

trong đó n nằm trong khoảng từ 5 đến 3.000, m bằng 2 đến 10, X có thể là nhóm azit, alkyn, hyđrazin, hyđrazit, aminooxy, hyđroxylamin, axetyl, hoặc gốc chứa carbonyl, và R là nhóm gắn mũ, nhóm chức, hoặc nhóm rời chuyển có thể là giống hoặc khác X. R có thể là, ví dụ, nhóm chức được chọn từ nhóm bao gồm hyđroxyl, hyđroxyl được bảo vệ, alkoxyl, N-hyđroxysucxinimiđyl este, 1-benzotriazolyl este, N-hyđroxysucxinimiđyl cacbonat, 1-benzotriazolyl cacbonat, axetal, alđehyt, các alđehyt hyđrat, alkenyl, acrylat, metacrylat, acrylamit, sulfon đã được hoạt hóa, amin, aminooxy, amin được bảo vệ, hyđrazit, hyđrazit được bảo vệ, thiol được bảo vệ, axit carboxylic, axit carboxylic được bảo vệ, isoxyanat, isothioxyanat, maleimit, vinylsulfon, đithiopyriđin, vinylpyriđin,

iođoaxetamit, epoxit, glyoxal, đion, mesylat, tosylat, và tresylat, alken, và keton.

Xác định hoạt tính polypeptit relaxin và ái lực của polypeptit relaxin đối với thụ thể relaxin

Hoạt tính polypeptit relaxin có thể được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm tiêu chuẩn hoặc đã biết *in vitro* hoặc *in vivo*. Các polypeptit relaxin có thể được phân tích về hoạt tính sinh học bằng các phương pháp thích hợp đã biết trong lĩnh vực phương pháp này. Các phương pháp như vậy bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, phương pháp hoạt hóa gen đáp ứng interferon, thử nghiệm về sự liên kết thụ thể, thử nghiệm về hoạt tính chống virut, thử nghiệm về ức chế tác dụng gây độc tế bào, (Familletti et al., *Meth. Enzymol.* 78:387-394), thử nghiệm chống tăng sinh, (Aebersold and Sample, *Meth. Enzymol.* 119:579-582), các thử nghiệm điều biến miễn dịch (các patent Mỹ số 4,914,033; 4,753,795), và các thử nghiệm theo dõi mức độ tạo ra các phân tử MHC (ví dụ, Hokland et al., *Meth. Enzymol.* 119:688-693), như đã được bộc lộ trong: Meager, *J. Immunol. Meth.*, 261:21-36 (2002).

Sự hấp thu glucoza trong tế bào tạo mỡ $3T_3$-1 có thể được đánh giá bằng cách sử dụng phương pháp sau. Tế bào $3T_3$-L1 thu được từ American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, Md.). Các tế bào này được nuôi cấy trong môi trường sinh trưởng (growth medium - GM) chứa 10% huyết thanh bào thai bò đã được làm giàu sắt trong môi trường Eagle đã được cải biến theo Dulbecco. Để biệt hóa tế bào tạo mỡ tiêu chuẩn, 2 ngày sau khi tế bào đạt được sự nhập dòng (được gọi là ngày 0), tế bào này được tiếp xúc với môi trường biệt hóa (differentiation medium - DM) chứa 10% huyết thanh bào thai bò, 10µg/mL relaxin, 1µM đexamethason, và 0,5µM isobutylmetylxanthin, trong 48 giờ. Tiếp theo, các tế bào này được giữ trong môi trường sau biệt hóa chứa 10% huyết thanh bào thai bò, và 10µg/mL relaxin. Hiệu lực *in vitro* có thể được xác định theo các thử nghiệm hấp thu glucoza mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này đã biết. Hiệu lực *in vitro* có thể được xác định theo phương pháp xác định độ hấp thu glucoza của hợp chất relaxin trong thử nghiệm dựa trên tế bào và là số đo về hiệu lực sinh học của hợp chất relaxin. Nó có thể được biểu hiện dưới dạng EC50 là nồng độ hữu hiệu của hợp chất mà gây ra 50% hoạt tính trong thử nghiệm đáp ứng liều đơn.

Thử nghiệm về sự vận chuyển glucoza - hấp thu hexoza phụ thuộc vào relaxin, như được đánh giá bởi sự tích tụ 0,1mM 2-đeoxy-D-[14C]glucoza, được đo như sau: tế bào tạo mỡ $3T_3$-L1 trong các đĩa 12 giếng được rửa hai lần bằng dung dịch đệm KRP (136mM NaCl, 4,7mM KCl, 10mM $NaPO_4$, 0,9mM $CaCl_2$, 0,9mM $MgSO_4$, độ pH=7,4) được làm ấm đến 37°C và chứa 0,2% BSA, ủ trong môi trường Leibovitz L-15 chứa 0,2% BSA trong 2 giờ ở 37°C trong không khí trong phòng, được rửa lại hai lần bằng KRP chứa 0,2% dung dịch đệm BSA, và ủ trong dung dịch đệm KRP chứa 0,2% BSA khi không có mặt (chỉ có Me_2SO) hoặc có mặt wortmanin trong 30 phút ở 37°C trong không khí trong phòng. Sau đó, relaxin được bổ sung vào đến nồng độ cuối cùng là 100nM trong 15 phút, và độ hấp thu của 2-đeoxy-D-[14C]glucoza được đo trong 4 phút cuối. Độ hấp thu không đặc trưng, được đo với sự có mặt của 10μM xytochalasin B, được trừ đi từ tất cả các trị số. Nồng độ protein được xác định bằng thử nghiệm axit Pierce bicinchoninic. Độ hấp thu được đo theo cách thông thường lặp lại ba lần hoặc bốn lần đối với mỗi thử nghiệm. Ảnh hưởng của việc xử lý sơ bộ cấp tính và mạn tính tế bào tạo mỡ $3T_3$-L1 bằng FGF-21 với sự có mặt của relaxin có thể được nghiên cứu.

Thử nghiệm về sự vận chuyển glucoza – độc lập relaxin - nguyên bào sợi $3T_3$-LI được cấy vào đĩa 96 giếng và biệt hóa thành tế bào chất béo (tế bào tạo mỡ) trong 2 tuần. Sau khi biệt hóa chúng được đưa vào môi trường không chứa huyết thanh và xử lý bằng các polypeptit relaxin khác nhau theo sáng chế trong thời gian 24 giờ. Trong lúc xử lý, tế bào được rửa hai lần bằng dung dịch đệm KRBH chứa 0,1% BSA. Sự hấp thu glucoza được thực hiện với sự có mặt của glucoza đã được gắn nhãn trong dung dịch đệm KPBH. Điều này cho phép đánh giá chất lượng nhiều loại polypeptit relaxin và các chất tương tự đã được tạo ra theo phương pháp theo sáng chế, và các polypeptit relaxin mà đã được pegylat hóa ở dạng pegyl hóa được biết là gây ra sự giảm hiệu quả của phân tử tự nhiên, và so sánh hiệu quả của các insulin khác nhau. Ngoài ra, có thể thấy đươc các polypeptit relaxin theo sáng chế gây ra sự hấp thu glucoza trong mô hình mô *ex vivo*.

Trong mô hình vận chuyển glucoza *ex vivo*, thử nghiệm về sư vận chuyển glucoza được mô tả như sau: Dung dịch gốc đệm Krebs-Henseleit – dung dịch gốc 1: NaCl (1,16M); KC1 (0,046M); KH_2PO_4 (0,0116M); $NaHCO_3$ (0,0253M). Dung dịch gốc 2: $CaCl_2$ (0,025M); $MgSO_4$ ($2H_2O$) (0,0116M). BSA: Sử dụng trực tiếp BSA không chứa

axit béo Phân đoạn V của ICN Cohn mà không cần thẩm tách. Điều chế môi trường: Bổ sung 50mL dung dịch gốc Krebs 1 đến 395ml dH_2O và khí với 95% 02/5% CO_2 trong 1 giờ. Bổ sung 50mL dung dịch gốc 2 và điều chỉnh đến 500mL bằng dH_2O. Bổ sung 500mg BSA không chứa axit béo ICN. Môi trường ủ sơ bộ và môi trường ủ: 32mM Manitol, 8mM Glucos, môi trường rửa: 40mm Manitol, 2mM Pyruvat. Môi trường vận chuyển: 39mM Manitol, 1mM 2-DG; 32mM Manitol, 8mM 3-O-MG. Dung dịch relaxin: (Relaxin lợn [Lilly] 100.000.000µU/mL) ở nồng độ cuối cùng 2000µU/mL hoặc 13,3nM. Điều chế môi trường gắn nhãn phóng xạ: Hoạt tính riêng được sử dụng: 2DG=1,5mCi/mL; 3-O-MG=437µCi/mL; hoặc Manitol=8µCi/m. Chuột cống được gây tê bằng 0,1cc Nembutal trên 100g thể trọng. Mô cơ được cắt ra và tráng trong 0,9% nước muối sau đó được đặt trong môi trường ủ sơ bộ (2mL) ở 29°C trong 1 giờ. Mô cơ được chuyển vào môi trường ủ (2mL; giống như ủ sơ bộ chỉ khác là chứa relaxin hoặc hợp chất thử nghiệm) và ủ trong 30 phút (phụ thuộc vào các điều kiện thử nghiệm). Sau đó, mô cơ được chuyển vào môi trường rửa (2mL) trong 10 phút ở 29°C, sau đó được chuyển sang môi trường gắn nhãn (1,5mL) trong 10 phút (3-O-MG) hoặc 20 phút (2DG). Cơ mô được lọc ra, cân và đặt trong các ống nghiệm polypropylen trên nước đá khô. 1mL dung dịch KOH 1N được bổ sung vào các ống nghiệm, sau đó được đặt trong bể nước 70°C trong thời gian 10 phút đến 15 phút, xoáy các ống nghiệm này cứ vài phút một lần. Các ống nghiệm này được làm lạnh trên nước đá và 1mL dung dịch HCl 1N được bổ sung vào, sau đó trộn kỹ. Tiếp theo, 200µL dịch nổi được đưa vào các ống nhấp nháy thành hai bản sao và đếm trên thiết bị đếm nhấp nháy so với các tiêu chuẩn phóng xạ đã biết.

Để co lại, cơ này trước tiên được ủ trong 1 giờ trong môi trường ủ sơ bộ/ môi trường ủ. Sau 1 giờ, một cơ thuộc mỗi cặp (một cặp cho mỗi chuột cống) được ghim vào thiết bị kích thích và cơ còn lại được chuyển vào bình thót cổ mới chứa môi trường ủ. Cơ đã co lại được kích thích bởi huấn luyện 200 phần nghìn giây ở 70Hz với mỗi xung trong quá trình huấn luyện là 0,1 phần nghìn giây. Quá trình huấn luyện được thực hiện ở 1/giây ở 10V đến 15V trong 2x10 phút có nghỉ 1 phút ở giữa. Ở cuối khoảng thời gian kích thích, cơ được loại bỏ ra khỏi thiết bị kích thích và đặt trong môi trường rửa trong 10 phút, tiếp theo trong môi trường gắn nhãn như đã được thể hiện trên đây.

Lượng trung bình relaxin, các polypeptit relaxin, và/hoặc chất tương tự relaxin

theo sáng chế có thể thay đổi và cụ thể là cần phải dựa trên khuyến cáo và đơn thuốc của bác sỹ điều trị bệnh đủ tư cách. Lượng chính xác relaxin, các polypeptit relaxin, và/hoặc chất tương tự relaxin theo sáng chế là đối tượng được ưu tiên hơn các yếu tố như kiểu chính xác và/hoặc mức độ nghiêm trọng của tình trạng bệnh lý được điều trị, tình trạng bệnh của bệnh nhân được điều trị, cũng như các thành phần khác trong dược phẩm này. Sáng chế cũng đề cập đến việc dùng lượng hữu hiệu để điều trị bệnh của một hoạt chất khác. Lượng này có thể dễ dàng được xác định bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này dựa vào phương pháp điều trị bệnh bằng relaxin, các chất trị liệu relaxin sẵn có, và/hoặc các chất khác tương tự relaxin.

Các dược phẩm theo sáng chế có thể được bào chế theo cách thông thường.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ sau được đưa ra nhằm mục đích minh họa, mà không giới hạn phạm vi của sáng chế cần được bảo hộ.

Ví dụ 1

Ví dụ này mô tả một trong nhiều bộ tiêu chí tiềm năng để chọn lọc vị trí kết hợp axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên vào relaxin.

Các Fig.1 đến 4 thể hiện cấu trúc và trình tự của relaxin và bảng dưới đây bao gồm các trình tự với chuỗi A, chuỗi B, relaxin và prorelaxin. Các polypeptit relaxin được tạo ra bằng cách thế axit amin được mã hóa có trong tự nhiên bằng axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên. Mỗi polypeptit chứa một trong số các axit amin được thế bằng para-axetylphenylalanin (pAcF hoặc pAF). Các polypeptit đã được tạo ra không có trình tự dẫn và là các polypeptit relaxin chuỗi A/B (SEQ ID NO. 1 đến 3). Mỗi polypeptit đã được tạo ra có sự thế axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên ở một vị trí trong số các vị trí sau: 1, 5, 18, 13, 2 của trình tự SEQ ID NO.4 hoặc ở các vị trí này của chuỗi A của các trình tự relaxin bất kỳ trong số các trình tự relaxin đã biết hoặc 5, 7, 18, 28 của trình tự SEQ ID NO.5 hoặc 6 ở vị trí của chuỗi B của trình tự bất kỳ trong số các trình tự relaxin đã biết. Fig.2 thể hiện cấu trúc của relaxin của người được gắn nhãn bằng cách sử dụng phần mềm PyMOL (DeLano Scientific; Palo Alto, CA) và một số axit amin tương

ứng với các axit amin đã được thế bằng para-axetylphenylalanin trong các polypeptit relaxin theo sáng chế.

Một bộ tiêu chí khác để chọn lọc vị trí ưu tiên kết hợp của axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên bao gồm bước sử dụng và so sánh các cấu trúc tinh thể từ ngân hàng dữ liệu protein hoặc các ngân hàng dữ liệu khác, được sử dụng cho mô hình cấu trúc của relaxin và các gốc được xác định mà 1) không cản trở việc liên kết với thụ thể của chúng, và 2) không có mặt ở bên trong protein này. Theo một số phương án, một hoặc nhiều axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên được kết hợp vào, nhưng không chỉ giới hạn ở, một hoặc nhiều vị trí sau của relaxin: 1, 5, 18, 13, 2 của trình tự SEQ ID NO.4 hoặc ở những vị trí này của chuỗi A của các trình tự relaxin bất kỳ đã biết hoặc các vị trí 5, 7, 18, 28 của trình tự SEQ ID NO.5 hoặc 6 ở cùng các vị trí này của chuỗi B của các trình tự relaxin bất kỳ đã biết,

Các tiêu chí sau được áp dụng để đánh giá mỗi vị trí của relaxin và chất tương tự relaxin để đưa vào axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên: gốc (a) cần phải không gây cản trở việc liên kết của thụ thể trên cơ sở phân tích cấu trúc, b) cần phải không bị ảnh hưởng bởi sự gây đột biến alanin hoặc sự quét tương đồng (c) cần phải được để lộ trên bề mặt và có tương tác van der Waals hoặc tương tác gắn kết hyđro tối thiểu với các gốc xung quanh, (d) cần phải được làm khuyết đoạn hoặc thay đổi trong các biến thể relaxin, (e) gây ra sự thay đổi bảo toàn nhờ việc thế bằng axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên và (f) có thể được tìm thấy ở vùng cực kỳ linh hoạt hoặc vùng không linh hoạt về mặt cấu trúc. Ngoài ra, các tính toán khác có thể được thực hiện đối với phân tử relaxin, bằng cách sử dụng chương trình Cx (Pintar et al., (2002) *Bioinformatics*, 18, pp 980) để đánh giá mức độ nhô ra của mỗi nguyên tử protein.

Theo một số phương án, một hoặc nhiều axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên được kết hợp vào một hoặc nhiều vị trí sau trong chuỗi A của relaxin: trước vị trí 1 (tức là ở đầu tận cùng N), 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 (tức là ở đầu tận cùng carboxyl của protein) (SEQ ID NO.4 hoặc các axit amin tương ứng nêu trong SEQ ID NO.1 đến 3), Theo một số phương án, một hoặc nhiều axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên được kết hợp vào một hoặc nhiều vị trí sau trong chuỗi B của relaxin: trước vị trí 1 (tức là ở đầu tận cùng N), 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 (tức là ở đầu tận cùng carboxyl của protein) (SEQ ID NO.5 hoặc 6 hoặc các axit amin tương ứng nêu trong SEQ ID NO.1 đến 3). Theo một số phương án, một hoặc nhiều axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên được kết hợp vào một hoặc nhiều vị trí sau trong relaxin: 1, 5, 31, 2, 13, 29, 18, 52 (SEQ ID NO.1 hoặc các axit amin tương ứng nêu trong SEQ ID NO.2 và SEQ ID NO.3), Theo một số phương án, một hoặc nhiều axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên được kết hợp vào một hoặc nhiều vị trí sau trong relaxin: 5, 31, 2, 13, 29, 18, 52 (SEQ ID NO.1 hoặc các axit amin tương ứng nêu trong SEQ ID NO.2 và SEQ ID NO.3). Theo một số phương án, một hoặc nhiều axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên được kết hợp vào một hoặc nhiều vị trí sau trong relaxin: 1, 5, 31, 2, 13, 29 (SEQ ID NO.1 hoặc các axit amin tương ứng nêu trong SEQ ID NO.2 và SEQ ID NO.3). Theo một số phương án, một hoặc nhiều axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên được kết hợp vào một hoặc nhiều vị trí sau trong relaxin: 5, 31, 2, 13, 29 (SEQ ID NO.1 hoặc các axit amin tương ứng nêu trong SEQ ID NO.2 và SEQ ID NO.3). Theo một số phương án, một hoặc nhiều axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên được kết hợp vào một hoặc nhiều vị trí sau trong relaxin: 1, 5, 31, 2, 13 (SEQ ID NO.1 hoặc các axit amin tương ứng nêu trong SEQ ID NO.2 và SEQ ID NO.3). Theo một số phương án, một hoặc nhiều axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên được kết hợp vào một hoặc nhiều vị trí sau trong relaxin: 5, 31, 2, 13 (SEQ ID NO.1 hoặc các axit amin tương ứng nêu trong SEQ ID NO.2 và SEQ ID NO.3).

Ví dụ 2

Ví dụ này mô tả chi tiết việc tách dòng và biểu hiện polypeptit relaxin chứa axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên ở *E. coli*.

Các phương pháp tách dòng relaxin đã được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này biết rõ. Các trình tự polypeptit và polynucleotit đối với relaxin và việc tách dòng relaxin vào các tế bào vật chủ đã được nêu cụ thể trong patent Mỹ số 4,758,516; patent Mỹ số 5,166,191; patent Mỹ số 5,179,195, 5,945,402; và 5,759,807; tất cả các patent này được kết hợp vào sáng chế bằng cách viện dẫn.

ADN bổ sung mã hóa relaxin được thể hiện như SEQ ID NO.12 và trình tự axit

amtrong polypeptit trưởng thành được thể hiện như SEQ ID NO.1.

Bảng 1: Các trình tự relaxin được trích dẫn

SEQ ID NO:	Tên trình tự	Trình tự
1	Trình tự axit amin relaxin	QLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC DSWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWS
2	Trình tự axit amin relaxin B1 Ala	QLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC ASWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWS
3	Trình tự axit amin tiền relaxin	DSWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWSRREAEDLQVGQVELGG GPGAGS LQPLALEGSLQKRQLYSALANKCCHVGCTKRSL ARFC
4	Trình tự axit amin chuỗi A relaxin	QLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC
5	Trình tự axit amin chuỗi B relaxin	DSWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWS
6	Trình tự axit amin chuỗi B relaxin với B1 Ala	AS WMEEVIKLCGREL VRAQI AICGMS T WS
7	Trình tự axit amin peptit C	RREAEDLQ VGQ VELGGGP GAGS LQPL ALEGS LQKR
8	Trình tự axit amin của trình tự dẫn relaxin	MKKNIAFLLKR
9	Trình tự axit amin của trình tự dẫn insulin	MIEGGR
10	Trình tự axit nucleic chuỗi A của relaxin	caactctacagtgcattggctaataaatgttgccatgttggttgtaccaaaagatctcttgctagattttgc
11	Trình tự axit nucleic chuỗi B của relaxin	gactcatggatggaggaagttattaaattatgcggccgcgaattagttcgcgcgcagattgccatttgcggc atgagcacctggagc
12	Trình tự axit nucleic các chuỗi A và B của relaxin	caactctacagtgcattggctaataaatgttgccatgttggttgtaccaaaagatctcttgctagattttgc gactcatggatggaggaagttattaaattatgcggccgcgaattagttcgcgcgcagattgccatttgcggc atgagcacctggagc

13	Trình tự axit nucleic của trình tự dẫn relaxin	atgaaaaagaatatcgcatttcttcttaaacgg
14	Trình tự axit nucleic của trình tự dẫn insulin	atgattgaaggtggtcgt
15	Ví dụ về trình tự axit amin của cấu trúc biểu hiện relaxin	MIEGGRDSWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWSRREAEDLQVGQV ELGGGPGAGSLQPLALEGSLQKRQLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC

Hệ dịch mã theo sáng chế chứa ARN vận chuyển trực giao (O-ARN vận chuyển) và aminoaxyl ARN vận chuyển synthetaza trực giao (O-RS) được sử dụng để biểu hiện relaxin hoặc chất tương tự relaxin chứa axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên. O-RS ưu tiên aminoaxyl hóa O-ARN vận chuyển bằng axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên. Về phần mình, hệ dịch mã này cài xen axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên vào relaxin hoặc chất tương tự relaxin, đáp lại bộ ba mã hóa chọn lọc đã được mã hóa. Các trình tự O-RS và O-ARN vận chuyển thích hợp được bộc lộ trong WO 2006/068802 có tên "Compositions of Aminoacyl-tRNA Synthetaza and Uses Thereof" (E9; SEQ ID NO.16) và WO 2007/021297 có tên "Compositions of tRNA and Uses Thereof" (FI3; SEQ ID NO.17), được kết hợp vào sáng chế bằng cách viện dẫn.

Bảng 2: Các trình tự được trích dẫn

SEQ ID NO.18	M. jannaschii ARN ty thể $^{Tyr}_{CUA}$	ARN vận chuyển
SEQ ID NO.19	HLAD03; ARN vận chuyển ức chế amber tối ưu hóa	ARN vận chuyển
SEQ ID NO.20	HL325A; ARN vận chuyển ức chế dịch chuyển khung AGGA tối ưu hóa	ARN vận chuyển
SEQ ID NO.21	Aminoaxyl ARN vận chuyển synthetaza dùng để kết hợp p-aziđo-L-phenylalanin p-Az-PheRS(6)	RS
SEQ ID NO.22	Aminoaxyl ARN vận chuyển synthetaza dùng để kết hợp p-benzoyl-L-phenylalanin p-BpaRS(l)	RS
SEQ ID NO.23	Aminoaxyl ARN vận chuyển synthetaza dùng để kết hợp propargyl-phenylalanin Propargyl-PheRS	RS
SEQ ID NO.24	Aminoaxyl ARN vận chuyển synthetaza dùng để kết hợp propargyl-phenylalanin Propargyl-PheRS	RS
SEQ ID NO.25	Aminoaxyl ARN vận chuyển synthetaza dùng để kết hợp propargyl-phenylalanin Propargyl-PheRS	RS
SEQ ID NO.26	Aminoaxyl ARN vận chuyển synthetaza dùng để kết hợp p-aziđo-phenylalanin p-Az-PheRS(1)	RS
SEQ ID NO.27	Aminoaxyl ARN vận chuyển synthetaza dùng để kết hợp p-aziđo-phenylalanin p-Az-PheRS(3)	RS

SEQ ID NO.28	Aminoaxyl ARN vận chuyển synthetaza dùng để kết hợp p-aziđo-phenylalanin p-Az-PheRS(4)	RS
SEQ ID NO.29	Aminoaxyl ARN vận chuyển synthetaza dùng để kết hợp p-aziđo-phenylalanin p-Az-PheRS(2)	RS
SEQ ID NO.30	Aminoaxyl ARN vận chuyển synthetaza dùng để kết hợp p-axetyl-phenylalanin (LW1)	RS
SEQ ID NO.31	Aminoaxyl ARN vận chuyển synthetaza dùng để kết hợp p-axetyl-phenylalanin (LW5)	RS
SEQ ID NO.32	Aminoaxyl ARN vận chuyển synthetaza dùng để kết hợp p-axetyl-phenylalanin (LW6)	RS
SEQ ID NO.33	Aminoaxyl ARN vận chuyển synthetaza dùng để kết hợp p-aziđo-phenylalanin (AzPheRS-5)	RS
SEQ ID NO.34	Aminoaxyl ARN vận chuyển synthetaza dùng để kết hợp p-aziđo-phenylalanin (AzPheRS-6)	RS

Việc biến nạp *E. coli* với các plasmit chứa relaxin được cải biến hoặc gen tương tự relaxin và cặp aminoaxyl ARN vận chuyển synthetaza/ARN vận chuyển trực giao (đặc hiệu với axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên mong muốn) cho phép axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên kết hợp đặc hiệu với vị trí vào polypeptit relaxin.

Relaxin trưởng thành thể dại được khuếch đại bằng PCR từ phản ứng tổng hợp ADN bổ sung có áp dụng quy trình tiêu chuẩn và tách dòng vào pET30 (NcoI-BamHI). Trước khi, hoặc theo cách khác sau khi xác nhận trình tự, relaxin chứa trình tự HHHHHHSGG đầu tận cùng N được tạo dòng phụ vào vectơ ức chế chứa tyrosyl ARN vận chuyển Tyr/CUA ức chế amber từ *Methanococcus jannaschii* (Mj ARN vận chuyển Tyr/CUA) dưới sự điều khiển cơ định của trình tự khởi đầu tổng hợp thu được từ trình tự khởi đầu lipoprotein ở *E. coli* (Miller, J.H., *Gene*, 1986), cũng như tyrosyl-ARN vận chuyển-synthetaza trực giao (MjTyrRS) dưới sự kiểm soát của trình tự khởi đầu GlnRS ở *E. coli*. Sự biểu hiện của relaxin dưới sự kiểm soát của trình tự khởi đầu T7. Đột biến amber được đưa vào bằng cách áp dụng quy trình đột biến thay đổi nhanh (Stratagene; La Jolla, California). Các cấu trúc được xác nhận trình tự.

Việc thử nghiệm các hợp chất relaxin tác dụng trong thời gian dài có thể được thực hiện bằng cách sử dụng mô hình chuột cống mắc bệnh tiểu đường STZ (PCO 08-400-209).

Ức chế bằng para-axetyl-phenvlalanin (pAcF)

Các plasmit (ví dụ, pt_RLX_B A1_AV 13am p 1395 (AXID2381)) được sử dụng để biến nạp vào *Escherichia coli* chủng W3110B57 để tạo ra chủng RLX-BAl-AV13pAF

W3110 B2 của *E. coli*, trong đó sự biểu hiện của T7 polymeaza đặt dưới sự kiểm soát của trình tự khởi đầu tạo ra bởi arabinoza. Giống cấy vi khuẩn qua đêm được pha loãng 1:100 vào các bình lắc chứa môi trường nuôi cấy 2X YT và nuôi ở nhiệt độ 37°C đến OD_{600} ~ 0,8. Sự biểu hiện protein được tạo ra bằng cách bổ sung arabinoza (nồng độ cuối là 0,2%), và para-axetyl-phenylalanin (pAcF) đến nồng độ cuối cùng 4mM. Giống cấy được ủ ở nhiệt độ 37°C trong 5 giờ. Các tế bào được kết viên và tạo hỗn dịch lại trong dung dịch đệm phân giải B-PER (Pierce) 100ul/OD/mL + 10ug/mL DNaza và ủ ở nhiệt độ 37°C trong 30 phút. Nguyên liệu tế bào được loại bỏ bằng cách ly tâm và phần dịch nổi được loại bỏ. Viên kết được tạo hỗn dịch lại trong một lượng tương đương dung dịch đệm nạp protein SDS-PAGE. Tất cả các mẫu được đưa lên gel 4% đến 12% PAGE với MES và DTT. Các phương pháp tinh chế relaxin là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này và xác nhận bằng SDS-PAGE, phân tích Thấm Tách Tây, hoặc phép đo phổ khối bẫy ion bằng cách sử dụng ion hoá phun điện và các phương pháp tương tự.

Các protein relaxin đột biến gắn nhãn His có thể được tinh chế bằng cách áp dụng các phương pháp mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này đã biết. Nhựa ProBond Nickel-Chelating Resin (do Invitrogen, Carlsbad, CA cung cấp) có thể được sử dụng theo các quy trình tinh chế protein gắn nhãn His tiêu chuẩn do nhà sản xuất đề xuất. Việc xác định chức năng của các protein có thể được thực hiện thông qua các phương pháp đã biết trong lĩnh vực phương pháp này, các phương pháp được đề xuất trong đơn sáng chế này và các tài liệu tham khảo kết hợp, và theo cách khác phương pháp ELISA trên tế bào sống có thể được phát triển để đánh giá các polypeptit relaxin theo sáng chế.

Bảng 3: Phân tích các biến thể relaxin

Mẻ/Mô tả	**SDS-PAGE**	**LAL (EU/mg)**	**Một lần ở A280**	**Độ tinh khiết xác định được theo RP-HPLC**	**Độ tinh khiết xác định được theo SE-HPLC**
Relaxin thể dại[3]	Băng chính NR di chuyển gần dải tiêu chuẩn có khối lượng phân tử 6kDa	NT	2,4	91,2%	NT
Q1pAF[1,3,4] 20K đã được PEGyl hóa	Băng chính NR di chuyển giữa các dải tiêu	7,7	3,4	100%	NT

A5pAF[1,3,4] 20K đã được PEGyl hóa	chuẩn có khối lượng phân tử là 49kDa và 38kDa	3,6	2,4	100%	NT
R18pAF[1,3,4] 20K đã được PEGyl hóa		16,1	2,4	100%	NT
E5pAF[2,3] 20K đã được PEGyl hóa		NT	0,6	99,8%	NT
V7pAF[2,3,4] 20K đã được PEGyl hóa		10,5	2,3	99,4%	NT
A18pAF[2,3] 20K đã được PEGyl hóa		NT	2,0	99,0%	NT
W28pAF[2,3,4] 20K đã được PEGyl hóa		9,1	2,2	99,4%	NT
V13pAF[1,3,4] 20K đã được PEGyl hóa		5,1	3,7	99,5%	NT
20K đã được PEGyl hóa E5pAF[2]		NT	0,6	99,6%	NT
L2pAF[1] 20K đã được PEGyl hóa		0,0	1,6	99,5%	NT
Relaxin thể dại[3]	Băng chính NR di chuyển gần dải tiêu chuẩn có khối lượng phân tử 6kDa	0,1	2,5	85,6%	NT
QlpAF[1,3] 20K đã được PEGyl hóa	Băng chính NR di chuyển giữa hai dải tiêu chuẩn có khối lượng phân tử 49 và 38kDa	<0,4	2,3	99,3%	99,3%
V13pAF[1,3] 5K đã được PEGyl hóa	Băng chính NR di chuyển gần dải tiêu chuẩn có khối lượng phân tử 14kDa	5,4	1,5	99,4%	99,8%
V13pAF[1,3] 10K đã được PEGyl hóa	Băng chính NR di chuyển giữa hai dải tiêu chuẩn có khối lượng phân tử 28 và 17kDa	9,8	1,8	99,4%	99,5%
V13pAF[1,3] 20K đã được PEGyl hóa	Băng chính NR di chuyển giữa hai dải tiêu chuẩn có khối lượng phân tử 49 và 38kDa	4,7	1,9	99,0%	99,5%
V13pAF[U3] 30K đã được PEGyl hóa	Băng chính NR di chuyển giữa hai dải tiêu chuẩn có khối lượng phân tử 62 và 49kDa	8,0	2,1	99,5%	99,8%

Các mẫu không được khử (NR); NT = Không được thử nghiệm

[1] thế pAcF trên chuỗi A

[2] thế pAcF trên chuỗi B

[3] thế Asp thành Ala trên chuỗi B (BA1)

[4] được sử dụng cho PK ban đầu

Bảng 4: Sự mất hoạt tính của biến thể relaxin

Biến thể	Số lần giảm hoạt tính *in vitro*	Kích thước PEG	Thời hạn PK *in vivo* HL (giờ)	Dược phẩm *in vivo*	Bình lắc	Độ chuẩn lên men (dịch đặc tế bào)	Mô tả phương pháp phân tích
RLX-A-AV13	17	5K, 10 K, 20K, 30K	2,6(5K), 8,7(10K), 13,8(20K), 26,8(30K)		có	1gm/L	SDS-PAGE, đậm đặc, LAL, RP-HPLC, SE-HPLC
RLX-A-AQ1	12	20K	10,7	20K thể hiện hiệu quả	có	720mg/L	SDS-PAGE, đậm đặc, RP-HPLC, LAL, SE- HPLC
RLX-A-AA5	12	20K	12,2		có		SDS-PAGE, đậm đặc, RP-HPLC, LAL
RLX-A-BV7	15	20K	13,1		có		SDS-PAGE, đậm đặc, RP-HPLC, LAL
RLX-A-AL2	17	20 K			có		SDS-PAGE, đậm đặc, RP-HPLC
RLX-A-BE5	17	20K			có		SDS-PAGE, đậm đặc, RP-HPLC
RLX-A-AR18	21	20K	12,5		có		SDS-PAGE, đậm đặc, RP-HPLC, LAL
RLX-BE5	22	20K			có		SDS-PAGE, đậm đặc, RP-HPLC
RLX-A-BA18	48	20K			có		SDS-PAGE, đậm đặc, RP-HPLC
RLX-A-BW28	48	20K	13,9		có		SDS-PAGE, đậm đặc, RP-HPLC, LAL

Ví dụ 3

Ví dụ này mô tả chi tiết sự biểu hiện của các polypeptit pro-relaxin bởi *E. coli*.

E.coli biểu hiện pro-relaxin ở dạng protein mạch đơn có 88 axit amin. Bằng cách phân giải với trypsin và carboxypeptiđaza, peptit kết nối và trình tự dẫn được loại bỏ. Peptit thu được là thành phần peptit mạch kép nhỏ 6kDa thuộc liên họ insulin chứa chuỗi A có 24 gốc và chuỗi B có 29 gốc. Việc gấp nếp cấu trúc khác biệt ở chỗ hai mạch peptit được gắn với nhau bởi hai liên kết đisulfua giữa mạch (Cys11-Cys36, và Cys24-Cys48) và một liên kết đisulfua nằm ngoài mạch (Cys10-Cysl5). Cấu trúc bậc ba trên cơ sở cấu trúc tinh thể của relaxin-2 của người bộc lộ một nếp gấp chắc chắn có ba đoạn xoắn ốc và một vùng mở rộng ngắn kèm theo nhân kỵ nước.

Relaxin với một hoặc nhiều axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên tao ra hóa học độc nhất và cho phép biến thể tái tổ hợp được PEGyl hóa đặc hiệu chứa nhóm carbonyl phản ứng hóa học được kết hợp theo cách sinh tổng hợp bằng cách thay thế một axit amin có trong tự nhiên bằng para-axetylphenylalanin (pAcF) để tạo ra vị trí cộng hóa trị duy nhất nhằm gắn kết poly(etylen) glycol (PEG).

Ví dụ 4

Ví dụ này mô tả chi tiết sự biểu hiện của các polypeptit pro-relaxin ở *E. coli*.

Ví dụ này mô tả quy mô sản xuất polypeptit relaxin bằng cách sử dụng thiết bị lên men có dung tích năm (5) lít. Các phương pháp này và quy mô cũng có thể được sử dụng cho các mẻ 10L, 30L, 150L và 1000L. Theo một số phương án, ít nhất 2g protein relaxin được tạo ra đối với mỗi lít giống cấy tế bào. Theo phương án khác của sáng chế, ít nhất 4g protein relaxin được tạo ra đối với mỗi lít giống cấy tế bào. Theo phương án khác của sáng chế, ít nhất 6g protein relaxin được tạo ra đối với mỗi lít giống cấy tế bào. Theo phương án khác của sáng chế, ít nhất 8g protein relaxin được tạo ra đối với mỗi lít giống cấy tế bào. Theo phương án khác của sáng chế, ít nhất 10g protein relaxin được tạo ra đối với mỗi lít giống cấy tế bào. Theo phương án khác của sáng chế, ít nhất 15g protein relaxin được tạo ra đối với mỗi lít giống cấy tế bào. Theo phương án khác của sáng chế, ít nhất 20g protein relaxin được tạo ra đối với mỗi lít giống cấy tế bào.

Bình lắc nhân giống

Chủng *Escherichia coli* W3110B57 [F- IN(rrnD-rrnE) lambđa-araB:gl tetA fhuA:dhfr ompT:cat] chứa plasmit pt_RLX_BAl_AV13am_pl395 (AXID2381) được sử dụng để tạo ra RLX-BAI-AV13pAF. Các lọ từ ngân hàng nghiên cứu tế bào riêng rẽ (research cell bank - RCB) được lấy ra ở nhiệt độ -80°C và làm tan giá ở nhiệt độ phòng, sau đó 50µL được sử dụng để chủng ngừa 50mL môi trường Seed Media (môi trường xác định về mặt hóa học) có bổ sung 50µg/mL kanamyxin sulfat trong bình thót cổ Erlenmeyer có vách ngăn với dung tích 250mL. Giống cấy ban đầu được nuôi trong khoảng 18 giờ ở nhiêt độ 37°C và 250 vòng/phút (xê dịch 1 insơ). Dịch nhân giống sơ cấp này được cấy chuyển vào dịch nhân giống thứ cấp đến mật độ quang đo được ở bước sóng 600nm (OD600) là 0,05 trong bình thót cổ Erlenmeyer dung tích 500mL có vách ngăn

chứa 100mL môi trường nhân giống có bổ sung 50µg/mL kanamyxin sulfat. Dịch nhân giống thứ cấp được nuôi ở 37°C và 250 vòng/phút (xê dịch 1 insơ) trong khoảng 8 giờ hoặc khi OD600 đạt trị số nằm trong khoảng từ 2 đến 4.

Thiết bị lên men

Bình 5 lít Sartorius Biostat B được nạp 2,1 l Production Media (môi trường xác định về mặt hóa học) có bổ sung 50µg/L kanamyxin sulfat. Dịch nhân giống thứ cấp được sử dụng để chủng ngừa thiết bị lên men đến OD600 ban đầu là 0,035. Giống cấy được nuôi ở 37°C và oxy hòa tan được đặt để duy trì 30% (bão hòa không khí) đồng thời xử lý bằng cách khuấy (480 vòng/phút đến 1200 vòng/phút) và tiếp theo xử lý O_2. Luồng không khí với tốc độ 5LPM với áp lực ngược 6psi (41,34KPa) được duy trì trong suốt quá trình lên men. Độ pH của dịch nuôi cấy được đặt ở 7,2 ± 0,05 có bổ sung 15% amoni hyđroxit và chất chống tạo bọt Dow Chemical P2000 được bổ sung, nếu cần, để điều chỉnh bọt. Khi dịch nuôi cấy đạt OD600 nằm trong khoảng từ 35 ± 5 (khi glyxerol ban đầu trong mẻ môi trường này gần như là kiệt), bắt đầu tiếp thêm một thể tích lớn 200mL và đồng thời điểm cài đặt độ pH được điều chỉnh từ 7,2 đến 6,6. Sau khi tiếp liệu ban đầu, bắt đầu liên tục tiếp liệu ở tốc độ 0,25mL/L/phút và tiếp tục cho đến khi thu. Ngay sau khi bắt đầu tiếp liệu, 2,5mL/L (0,2g/L thể tích dịch nuôi cấy cuối cùng) dung dịch nước L-Ala-pAcF đipeptit 100g/L được bổ sung vào bình lên men. Mười lăm phút sau khi bổ sung đipeptit, dịch nuôi cấy được tạo ra bằng cách bổ sung L-arabinoza (công thức được đưa ra trong PTR-FGF-002) đến nồng độ 2g/L (thể tích dịch nuôi cấy cuối cùng). Dịch nuôi cấy được nuôi trong thời gian 6 giờ sau khi bổ sung arabinoza và thu.

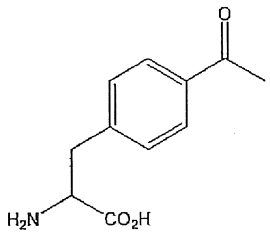
Fig.5 là gel SDS-PAGE của prorelaxin tạo ra bởi các phương pháp này với axit amin chuỗi B1 là Ala và para-axetyl phenylalanin ở vị trí axit amin thứ 13 của chuỗi A, được thế cho valin.

Ví dụ 5

Ví dụ này mô tả chi tiết việc đưa vào một axit amin chứa carbonyl và tiếp theo phản ứng với PEG chứa aminooxy.

Ví dụ này minh họa phương pháp tổng hợp polypeptit relaxin kết hợp một axit

amin được mã hóa không có trong tự nhiên chứa keton mà sau đó phản ứng với PEG chứa aminooxy có khoảng 5.000 MW. Mỗi gốc trước vị trí 1 (tức là ở đầu tận cùng N), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 (tức là ở đầu tận cùng carboxyl của protein có trình tự SEQ ID NO; 1 hoặc các axit amin tương ứng trong SEQ ID NOs; 3, 5, 7, 9, 11) và mỗi gốc trước vị trí 1 (tức là ở đầu tận cùng N), 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, 31, 32 (tức là ở đầu tận cùng carboxyl của protein có trình tự SEQ ID NO.2 hoặc các axit amin tương ứng nêu trong SEQ ID NO.4, 6, 8, 10, 12) được thế riêng rẽ bằng axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên có công thức sau:



Các trình tự dùng để kết hợp đặc hiệu vị trí p-axetyl-phenylalanin vào relaxin là SEQ ID NO.1 và 2 (các chuỗi A và B của relaxin), và SEQ ID NO.16 hoặc 17 (ARN vận chuyển đột biến, M. jannaschii), và 15, 29, 30 hoặc 31 (TyrRS LW1, 5, hoặc 6) được bộc lộ trong Ví dụ 2 nêu trên.

Sau khi được cải biến, biến thể polypeptit relaxin chứa axit amin chứa carbonyl được cho phản ứng với dẫn xuất PEG chứa aminooxy có công thức:

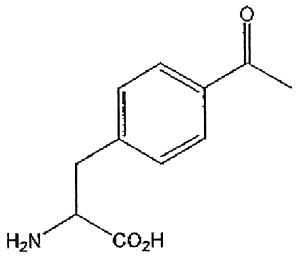
$$R\text{-}PEG(N)\text{-}O\text{-}(CH_2)n\text{-}O\text{-}NH_2$$

trong đó R là metyl, n bằng 3 và N bằng khoảng 5.000 MW. Relaxin đã được tinh chế chứa p-axetylphenylalanin được hòa tan ở 10mg/mL trong dung dịch chứa 25mM MES (do Sigma Chemical, St. Louis, MO cung cấp) pH 6,0, 25mM Hepes (do Sigma Chemical, St. Louis, MO cung cấp) độ pH=7,0, hoặc trong dung dịch chứa 10mM natri axetat (do Sigma Chemical, St. Louis, MO cung cấp) độ pH=4,5, được cho phản ứng với PEG chứa aminooxy với lượng dư gấp 10 lần đến 100 lần, và sau đó được khuấy trong thời gian 10 giờ đến 16 giờ ở nhiệt độ phòng (Jclicks. W. *J. Am. Chem. Soc.* 1959, 81, pp 475). Tiếp theo, PEG-relaxin được pha loãng trong dung dịch đệm thích hợp để tinh chế và phân tích ngay lập tức.

Ví dụ 6

Ví dụ này mô tả chi tiết việc đưa axit amin chứa carbonyl vào và sau đó phản ứng với PEG chứa aminooxy.

Ví dụ này thể hiện phương pháp tổng hợp polypeptit relaxin kết hợp axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên chứa keton, mà sau đó phản ứng với PEG chứa aminooxy có khối lượng phân tử (MW) khoảng 20.000. Mỗi gốc trước vị trí 1 (tức là ở đầu tận cùng N), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12,13, 14, 15, 15, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54 (tức là ở đầu tận cùng carboxyl của protein có trình tự SEQ ID NO.1 hoặc các axit amin tương ứng nêu trong SEQ ID NO.2 và SEQ ID NO.3) được thế riêng rẽ bằng axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên có công thức sau:



Các trình tự dùng để kết hợp p-aminophenylalanin đặc hiệu với vị trí vào relaxin là SEQ ID NO.4 và 5 hoặc 6 (các chuỗi A và B của relaxin), và SEQ ID NO.16 hoặc 17 (ARN vận chuyển đột biến, M. jannaschii), và các trình tự nêu trên và kết hợp vào để kết hợp p-aminophenylalanin đặc hiệu với vị trí.

Sau khi được cải biến, biến thể polypeptit relaxin chứa axit amin chứa carbonyl được cho phản ứng với dẫn xuất PEG chứa aminooxy có công thức:

$$R\text{-}PEG(N)\text{-}O\text{-}(CH_2)n\text{-}O\text{-}NH_2$$

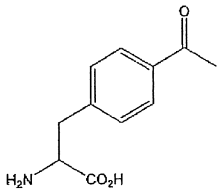
trong đó R là metyl, n bằng 3 và N bằng khoảng 20.000 MW. Relaxin đã tinh chế chứa p-aminophenylalanin được hòa tan ở 10mg/mL trong dung dịch chứa 25mM MES (do Sigma Chemical, St. Louis, MO cung cấp) độ pH=6,0, dung dịch chứa 25mM Hepes (do Sigma Chemical, St. Louis, MO cung cấp) đô pH=7,0, hoặc trong dung dịch chứa 10mM natri axetat (do Sigma Chemical, St. Louis, MO cung cấp) độ pH=4,5, được cho

phản ứng với PEG chứa aminooxy với lượng dư gấp 10 đến 100 lần, sau đó được khuấy trong thời gian 10 giờ đến 16 giờ ở nhiệt độ phòng (Jencks, W. *J. Am. Chem. Soc.* 1959, 81, pp 475). Sau đó, PEG-relaxin được pha loãng trong dung dịch đệm thích hợp để tinh chế hoặc phân tích ngay.

Ví dụ 7

Ví dụ này mô tả chi tiết việc đưa axit amin chứa carbonyl vào và sau đó phản ứng với PEG chứa aminooxy.

Ví dụ này thể hiện phương pháp tổng hợp polypeptit relaxin kết hợp một axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên chứa keton mà sau đó phản ứng với PEG chứa aminooxy bằng khoảng 20.000 MW. Mỗi gốc trước vị trí 1 (tức là ở đầu tận cùng N), 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, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53 (tức là ở đầu tận cùng carboxyl của protein có trình tự SEQ ID NO.1 hoặc axit amin ở vị trí tương ứng nêu trong SEQ ID NO.2 và SEQ ID NO.3) được thế riêng rẽ bằng axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên có công thức sau:



Các trình tự dùng để kết hợp p-aminophenylalanin đặc hiệu với vị trí vào relaxin là SEQ ID NO.13, và SEQ ID NO.16 hoặc 17 (ARN vận chuyển đột biến, M. jannaschii), và các trình tự nêu trên và các trình tự được kết hợp vào để kết hợp p-aminophenylalanin đặc hiệu với vị trí.

Khi được cải biến, biến thể polypeptit relaxin chứa axit amin chứa carbonyl được cho phản ứng với dẫn xuất PEG chứa aminooxy có công thức:

$$R\text{-}PEG(N)\text{-}O\text{-}(CH_2)n\text{-}O\text{-}NH_2$$

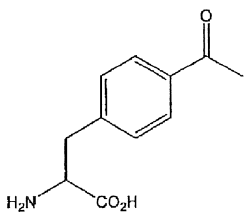
trong đó R là metyl, n bằng 3 và N có khối lượng phân tử khoảng 20.000. Relaxin đã được tinh chế chứa p-aminophenylalanin được hòa tan ở 10mg/mL, trong dung dịch

chứa 25mM MES (do Sigma Chemical, St. Louis, MO cung cấp) độ pH=6,0, dung dịch chứa 25mM Hepes (do Sigma Chemical, St. Louis, MO cung cấp) độ pH=7,0, hoặc trong dung dịch chứa 10mM natri axetat (do Sigma Chemical, St. Louis, MO cung cấp) độ pH=4,5, được cho phản ứng với PEG chứa aminooxy với lượng dư gấp 10 đến 100 lần, và sau đó được khuấy trong thời gian 10 giờ đến 16 giờ ở nhiệt độ phòng (Jencks, W. *J. Am. Chem. Soc.* 1959, 81, pp 475). Tiếp theo, PEG-relaxin được pha loãng trong dung dịch đệm thích hợp để tinh chế và phân tích ngay lập tức.

Ví dụ 8

Ví dụ này mô tả chi tiết việc đưa một axit amin chứa carbonyl vào và sau đó phản ứng với PEG chứa aminooxy.

Ví dụ này thể hiện phương pháp tổng hợp polypeptit relaxin kết hợp một axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên chứa keton mà sau đó phản ứng với PEG chứa aminooxy khoảng 20.000 MW. Mỗi gốc trước vị trí 1 (tức là ở đầu tận cùng N), 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, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54 (tức là ở đầu tận cùng carboxyl của protein có trình tự SEQ ID NO.1 hoặc axit amin ở vị trí tương ứng nêu trong SEQ ID NO.2 và SEQ ID NO.3) được thế riêng rẽ bằng axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên có công thức sau:



Các trình tự dùng để kết hợp p-aminophenylalanin đặc hiệu với vị trí vào relaxin là SEQ ID NO.1, và SEQ ID NO.16 hoặc 17 (ARN vận chuyển đột biến, M. jannaschii), và các trình tự nêu trên và kết hợp vào để kết hợp p-aminophenylalanin đặc hiệu với vị trí.

Sau khi được cải biến, biến thể polypeptit relaxin chứa axit amin chứa carbonyl được cho phản ứng với dẫn xuất PEG chứa aminooxy có công thức:

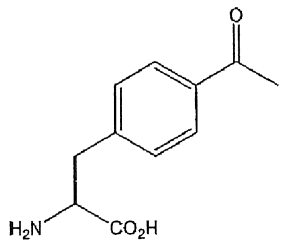
R-PEG(N)-O- (CH_2)n- O $-NH_2$

trong đó R là metyl, n bằng 3 và N có khối lượng phân tử khoảng 20.000. Relaxin đã được tinh chế chứa p-aminophenylalanin được hòa tan ở 10mg/mL trong dung dịch chứa 25mM MES (do Sigma Chemical, St. Louis, MO cung cấp) độ pH=6,0, dung dịch chứa 25mM Hepes (do Sigma Chemical, St. Louis, MO cung cấp) độ pH=7,0, hoặc trong dung dịch chứa 10mM natri axetat (do Sigma Chemical, St. Louis, MO cung cấp) độ pH=4,5, được cho phản ứng với PEG chứa aminooxy với lượng dư gấp 10 lần đến 100 lần, và sau đó được khuấy trong thời gian 10 giờ đến 16 giờ ở nhiệt độ phòng (Jencks, W. *J. Am. Chem. Soc.* 1959, 81, pp 475). Sau đó, PEG-relaxin được pha loãng trong dung dịch đệm thích hợp để tinh chế hoặc phân tích ngay.

Ví dụ 9

Ví dụ này mô tả chi tiết việc đưa axit amin chứa carbonyl vào và sau đó phản ứng với PEG chứa aminooxy.

Ví dụ này thể hiện phương pháp tổng hợp polypeptit relaxin kết hợp một axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên chứa keton mà sau đó phản ứng với PEG chứa aminooxy có khối lượng phân tử khoảng 30.000. Mỗi gốc trước vị trí 1 (tức là ở đầu tận cùng N), 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, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54 (tức là ở đầu tận cùng carboxyl của protein có trình tự SEQ ID NO.1 hoặc vị trí tương ứng nêu trong SEQ ID NO.2 và SEQ ID NO.3) được thế riêng rẽ bằng axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên có công thức sau:



Các trình tự dùng để kết hợp p-aminophenylalanin đặc hiệu với vị trí vào relaxin là SEQ ID NO.1 (hoặc SEQ ID NO.2, hoặc 3), và SEQ ID NO.16 hoặc 17 (ARN vận chuyển đột biến, M. jannaschii), và các trình tự nêu trên và các trình tự được kết hợp vào để kết hợp p-aminophenylalanin đặc hiệu với vị trí.

Sau khi được cải biến, biến thể polypeptit relaxin chứa axit amin chứa carbonyl được cho phản ứng với dẫn xuất PEG chứa aminooxy có công thức:

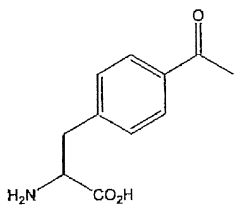
$$R\text{-}PEG(N)\text{-}O\text{-}(CH_2)_n\text{-}O\text{-}NH_2$$

trong đó R là metyl, n bằng 3 và N có khối lượng phân tử bằng khoảng 30.000. Relaxin đã tinh chế chứa p-aminophenylalanin được hòa tan ở 10mg/mL trong dung dịch chứa 25mM MES (do Sigma Chemical, St. Louis, MO cung cấp) độ pH=6,0, dung dịch chứa 25mM Hepes (do Sigma Chemical, St. Louis, MO cung cấp) độ pH=7,0, hoặc trong dung dịch chứa 10mM natri axetat (do Sigma Chemical, St. Louis, MO cung cấp) độ pH=4,5, được cho phản ứng với PEG chứa aminooxy với lượng dư gấp 10 lần đến 100 lần, và sau đó được khuấy trong thời gian 10 giờ đến 16 giờ ở nhiệt độ phòng (Jencks, W. *J. Am. Chem. Soc.* 1959, 81, pp475). Sau đó, PEG-relaxin được pha loãng trong dung dịch đệm thích hợp để tinh chế và phân tích ngay.

Ví dụ 10

Ví dụ này mô tả chi tiết việc đưa axit amin chứa carbonyl vào và sau đó phản ứng với PEG chứa aminooxy.

Ví dụ này thể hiện phương pháp tổng hợp polypeptit relaxin kết hợp một axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên chứa keton mà sau đó phản ứng với PEG chứa aminooxy có khối lượng phân tử bằng khoảng 40.000. Mỗi gốc trước vị trí 1 (tức là ở đầu tận cùng N), 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, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54 (tức là ở đầu tận cùng carboxyl của protein có trình tự SEQ ID NO.1 hoặc vị trí tương ứng nêu trong SEQ ID NO.2 và SEQ ID NO.3) được thế riêng rẽ bằng axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên có công thức sau:



Các trình tự dùng để kết hợp p-aminophenylalanin đặc hiệu với vị trí vào relaxin là

SEQ ID NO.13 (hoặc SEQ ID NO.1, 2, hoặc 14), và SEQ ID NO.16 hoặc 17 (ARN vận chuyển đột biến, M. jannaschii), và các trình tự nêu trên và các trình tự được kết hợp vào để kết hợp p-aminophenylalanin đặc hiệu với vị trí.

Sau khi được cải biến, biến thể polypeptit relaxin chứa axit amin chứa carbonyl được cho phản ứng với dẫn xuất PEG chứa aminooxy có công thức:

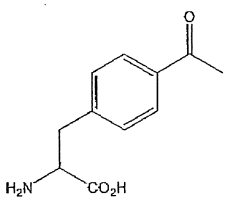
$$R\text{-}PEG(N)\text{-}O\text{-}(CH_2)n\text{-}O\text{-}NH_2$$

trong đó R là metyl, n bằng 3 và N có khối lượng phân tử bằng khoảng 40.000. Relaxin đã được tinh chế chứa p-aminophenylalanin được hòa tan ở 10mg/mL trong dung dịch chứa 25mM MES (do Sigma Chemical, St. Louis, MO cung cấp) độ pH=6,0, dung dịch chứa 25mM Hepes (do Sigma Chemical, St. Louis, MO cung cấp) độ pH=7,0, hoặc trong dung dịch chứa 10mM natri axetat (do Sigma Chemical, St. Louis, MO cung cấp) độ pH=4,5, được cho phản ứng với PEG chứa aminooxy với lượng dư gấp 10 lần đến 100 lần, và sau đó được khuấy trong thời gian 10 giờ đến 16 giờ ở nhiệt độ phòng (Jencks, W. *J. Am. Chem. Soc.* 1959, 81, pp 475). Tiếp theo, PEG-relaxin được pha loãng trong dung dịch đệm thích hợp để tinh chế và phân tích ngay lập tức.

Ví dụ 11

Ví dụ này mô tả chi tiết việc đưa axit amin chứa carbonyl vào và tiếp theo phản ứng với PEG chứa aminooxy.

Ví dụ này thể hiện phương pháp tổng hợp polypeptit relaxin kết hợp một axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên chứa keton mà sau đó phản ứng với PEG chứa aminooxy có khối lượng phân tử bằng khoảng 10.000. Mỗi gốc trước vị trí 1 (tức là ở đầu tận cùng N), 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, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54 (tức là ở đầu tận cùng carboxyl của protein có trình tự SEQ ID NO.1 hoặc vị trí tương ứng nêu trong SEQ ID NO.2 và SEQ ID NO.3) được thế riêng rẽ bằng axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên có công thức sau:



Các trình tự dùng để kết hợp p-aminophenylalanin đặc hiệu với vị trí vào relaxin là SEQ ID NO.13 (hoặc vị trí tương ứng nêu trong SEQ ID NO.1, 2, hoặc 14), và SEQ ID NO.16 hoặc 17 (ARN vận chuyển đột biến, M. jannaschii), và các trình tự được mô tả trên đây và kết hợp để kết hợp p-aminophenylalanin đặc hiệu với vị trí.

Khi được cải biến, biến thể polypeptit relaxin, chứa axit amin chứa carbonyl được cho phản ứng với dẫn xuất PEG chứa aminooxy có công thức:

$$R\text{-}PEG(N)\text{-}O\text{-}(CH_2)n\text{-}O\text{-}NH_2$$

trong đó R là metyl, n bằng 3 và N có khối lượng phân tử bằng khoảng 10.000. Relaxin đã tinh chế chứa p-aminophenylalanin được hòa tan ở 10mg/mL trong dung dịch chứa 25mM MES (do Sigma Chemical, St. Louis, MO cung cấp) độ pH=6,0, dung dịch chứa 25mM Hepes (do Sigma Chemical, St. Louis, MO cung cấp) độ pH=7,0, hoặc trong dung dịch chứa 10mM natri axetat (do Sigma Chemical, St. Louis, MO cung cấp) độ pH=4,5, được cho phản ứng với PEG chứa aminooxy với lượng dư gấp 10 lần đến 100 lần, và sau đó được khuấy trong thời gian 10 giờ đến 16 giờ trong điều kiện trong phòng (Jencks, W. *J. Am. Chem. Soc.* 1959, 81, pp 475). Sau đó, PEG-relaxin được pha loãng trong dung dịch đệm thích hợp để tinh chế hoặc phân tích ngay.

Ví dụ 12

Tiếp hợp với PEG chứa nhóm hyđroxylamin được liên kết với PEG thông qua liên kết amit.

Chất phản ứng PEG có cấu trúc sau được ghép cặp với axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên chứa keton bằng cách áp dụng quy trình được bộc lộ trong các ví dụ 3 đến 9:

$$R\text{-}PEG(N)\text{-}O\text{-}(CH_2)_2\text{-}NH\text{-}C(O)(CH_2)n\text{-}O\text{-}NH_2$$

trong đó R = metyl, n=4 và N có khối lượng phân tử nằm trong khoảng từ 5.000 đến 40.000. Các điều kiện phản ứng, tinh chế, và phân tích là như đã được mô tả và là đã biết trong lĩnh vực phương pháp này.

Ví dụ 13

Ví dụ này mô tả chi tiết việc đưa hai axit amin khác biệt được mã hóa không có trong tự nhiên vào các polypeptit relaxin và polypeptit tương tự relaxin.

Ví dụ này thể hiện phương pháp tổng hợp polypeptit relaxin kết hợp mộtxit amin được mã hóa không có trong tự nhiên chứa nhóm chức keton ở hai vị trí trong số các vị trí sau: trước vị trí 1 (tức là ở đầu tận cùng N), 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, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54 (tức là ở đầu tận cùng carboxyl của protein có trình tự SEQ ID NO.1 hoặc vị trí tương ứng nêu trong SEQ ID NO.2 và SEQ ID NO.3). Polypeptit relaxin được điều chế như nêu trên, chỉ khác là bộ ba mã hóa chọn lọc được đưa vào ở hai vị trí khác biệt trong axit nucleic.

Ví dụ 14

Ví dụ này mô tả chi tiết việc tiếp hợp polypeptit relaxin hoặc polypeptit tương tự relaxin với PEG chứa hyđrazit và tiếp theo khử tại chỗ.

Polypeptit relaxin có kết hợp axit amin chứa carbonyl được điều chế theo quy trình nêu trên. Khi được cải biến, PEG chứa hyđrazit có cấu trúc sau được tiếp hợp với polypeptit relaxin:

$$R\text{-}PEG(N)\text{-}O\text{-}(CH_2)_2\text{-}NH\text{-}C(O)(CH_2)_n\text{-}X\text{-}NH\text{-}NH_2$$

trong đó R = metyl, n=2 và N có khối lượng phân tử = 5.000; 10.000, 20.000; 30.000; hoặc 40.000 và X là nhóm carbonyl (C=O). Relaxin đã được tinh chế chứa p-axetylphenylalanin được hòa tan ở nồng độ nằm trong khoảng từ 0,1mg/mL đến 10mg/mL trong dung dịch chứa 25mM MES (do Sigma Chemical, St. Louis, MO cung cấp) độ pH=6,0, dung dịch chứa 25mM Hepes (do Sigma Chemical, St. Louis, MO cung cấp) độ pH=7,0, hoặc trong dung dịch chứa 10mM natri axetat (do Sigma Chemical, St.

Louis, MO cung cấp) độ pH=4,5, được cho phản ứng với PEG chứa hyđrazit với lượng dư gấp từ 1 lần đến 100 lần, và hyđrazon tương ứng được khử tại chỗ bằng cách bổ sung dung dịch gốc NaCNBH3 1M (do Sigma Chemical, St. Louis, MO cung cấp), được hòa tan trong H_2O, đến nồng độ cuối cùng nằm trong khoảng 10mM đến 50mM. Các phản ứng được thực hiện trong bóng tối ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 4°C đến nhiệt độ phòng trong thời gian 18 giờ đến 24 giờ. Các phản ứng được dừng bằng cách bổ sung dung dịch Tris 1M (do Sigma Chemical, St. Louis, MO cung cấp) ở độ pH khoảng 7,6 đến nồng độ Tris cuối là 50mM hoặc được pha loãng trong dung dịch đệm thích hợp để tinh chế ngay lập tức.

Ví dụ 15

Ví dụ này mô tả chi tiết việc tiếp hợp giữa polypeptit relaxin hoặc polypeptit tương tự relaxin với PEG chứa hyđrazit và sau đó khử tại chỗ.

Polypeptit relaxin có kết hợp axit amin chứa carbonyl được điều chế theo quy trình nêu trên. Khi được cải biến, PEG chứa hyđrazit có cấu trúc sau được tiếp hợp với polypeptit relaxin:

$$R\text{-}PEG(N)\text{-}O\text{-}(CH_2)_2\text{-}NH\text{-}C(O)(CH_2)_n\text{-}X\text{-}NH\text{-}NH_2$$

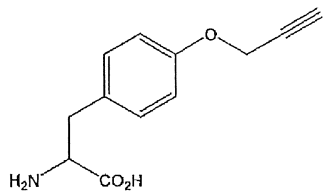
trong đó R = metyl, n=2 và N có khối lượng phân tử bằng 20.000 và X là nhóm carbonyl (C=O). Relaxin đã được tinh chế chứa p-axetylphenylalanin được hòa tan ở nồng độ nằm trong khoảng từ 0,1mg/mL đến 10mg/mL trong dung dịch chứa 25mM MES (do Sigma Chemical, St. Louis, MO cung cấp) độ pH=6,0, dung dịch chứa 25mM Hepes (do Sigma Chemical, St. Louis, MO cung cấp) độ pH=7,0, hoặc trong dung dịch chứa 10mM natri axetat (do Sigma Chemical, St. Louis, MO cung cấp) độ pH=4,5, được cho phản ứng với PEG chứa hyđrazit với lượng dư gấp từ 1 lần đến 100 lần, và hyđrazon tương ứng được khử tại chỗ bằng cách bổ sung dung dịch gốc NaCNBH3 1M (do Sigma Chemical, St. Louis, MO cung cấp), hòa tan trong H_2O, đến nồng độ cuối nằm trong khoảng từ 10mM đến 50mM. Các phản ứng được thực hiện trong bóng tối ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 4°C đến nhiệt độ phòng trong thời gian 18 giờ đến 24 giờ. Các phản ứng được dừng bằng cách bổ sung dung dịch Tris 1M (do Sigma Chemical, St. Louis, MO cung cấp) ở độ pH khoảng 7,6 đến nồng độ Tris cuối là 50mM hoặc được pha loãng trong

dung dịch đệm thích hợp để tinh chế ngay lập tức.

Ví dụ 16

Ví dụ này mô tả chi tiết việc đưa axit amin chứa alkyn vào polypeptit relaxin hoặc polypeptit tương tự relaxin và tạo dẫn xuất với mPEG-azit.

Các gốc sau đây, trước vị trí 1 (tức là ở đầu tận cùng N), 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, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54 (tức là ở đầu tận cùng carboxyl của protein có trình tự SEQ ID NO.1 hoặc vị trí tương ứng nêu trong SEQ ID NO.2 và SEQ ID NO.3), mỗi gốc được thế bằng các axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên có công thức sau:



Các trình tự dùng để kết hợp đặc hiệu vị trí p-propargyl-tyrosin vào relaxin là SEQ ID NO.1 (hoặc vị trí tương ứng nêu trong SEQ ID NO.2 hoặc 3), SEQ ID NO.16 hoặc 17 (ARN vận chuyển đột biến, M. jannaschii), và 22, 23 hoặc 24 nêu trên. Polypeptit relaxin chứa propargyl tyrosin được biểu hiện ở *E. coli* và tinh chế bằng cách sử dụng các điều kiện nêu trên.

Relaxin đã được tinh chế chứa propargyl-tyrosin được hòa tan ở nồng độ nằm trong khoảng từ 0,1 đến 10mg/mL trong dung dịch đệm PB (100mM natri phosphat, 0,15M NaCl, độ pH = 8) và PEG chứa azit với lượng dư gấp 10 lần đến 1000 lần được bổ sung vào hỗn hợp phản ứng này. Sau đó, lượng xúc tác CuSO4 và dây Cu được bổ sung vào hỗn hợp phản ứng này. Sau khi hỗn hợp này được ủ (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, khoảng 4 giờ ở nhiệt độ phòng hoặc 37°C, hoặc qua đêm ở 4°C), H_2O được bổ sung vào và hỗn hợp này được lọc qua màng thẩm tách. Mẫu có thể được phân tích thêm, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, bằng quy trình tương tự được bộc lộ trong Ví dụ 3. Trong Ví dụ này, PEG có công thức sau:

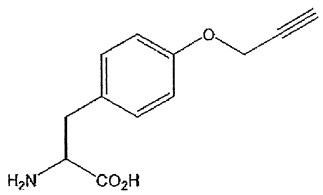
R-PEG(N)-O-(CH2)2-NH-C(O)(CH2)n-N_3

trong đó R là metyl, n bằng 4 và N có khối lượng phân tử bằng 5.000; 10.000, 20.000; 30.000; hoặc 40.000.

Ví dụ 17

Ví dụ này mô tả chi tiết việc thế một axit amin kỵ nước lớn trong polypeptit relaxin bằng propargyl tyrosin.

Gốc Phe, Trp hoặc Tyr có mặt trong một trong số các vùng sau của relaxin: trước vị trí 1 (tức là ở đầu tận cùng N), 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, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54 (tức là ở đầu tận cùng carboxyl của protein có trình tự SEQ ID NO.1 hoặc các vị trí tương ứng nêu trong SEQ ID NO.2 và SEQ ID NO.3), được thế bằng axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên có công thức sau như đã được mô tả trên đây:



Sau khi được cải biến, PEG được gắn vào biến thể polypeptit relaxin chứa axit amin chứa alkyn. PEG có công thức sau:

Me-PEG(N)-O-$(CH_2)_2$-N_3

và các quy trình ghép cặp sẽ tuân theo các quy trình nêu trong các ví dụ nêu trên. Điều này sẽ tạo ra biến thể polypeptit relaxin chứa axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên mà gần như đồng vị trí với một trong số các axit amin kỵ nước lớn có trong tự nhiên và cải biến với dẫn xuất PEG ở một vị trí khác trong polypeptit.

Ví dụ 18

Ví dụ này mô tả chi tiết phương pháp sản xuất polypeptit relaxin homođime,

heterođime, homomultime, hoặc heteromultime được tách bởi một hoặc nhiều nhóm liên kết PEG. Relaxtrong polypeptit multime có thể được tạo ra bởi proinsulin hoặc giữa các polypeptit relaxin chuỗi A và B thành thục theo sáng chế.

Biến thể polypeptit relaxin chứa alkyn được tạo ra trong ví dụ nêu trên được cho phản ứng với dẫn xuất PEG hai chức có dạng:

N_3-$(CH_2)_n$-C(O)-NH-$(CH_2)_2$-O-PEG(N)-O-$(CH_{2)2}$-NH-C(O)-$(CH_2)_n$-N_3

trong đó n bằng 4 và PEG có khối lượng phân tử trung bình bằng khoảng 5.000; 10.000; 20.000; 30.000; hoặc 40.000 để tạo ra polypeptit relaxin homođime tương ứng trong đó hai phân tử relaxin được tách vật lý bằng PEG. Theo cách tương tự, polypeptit relaxin có thể được ghép cặp với một hoặc nhiều polypeptit khác để tạo ra heterođime, homomultime, hoặc heteromultime. Phản ứng ghép cặp, tinh chế, và phân tích sẽ được thực hiện như nêu trong các ví dụ nêu trên.

Ví dụ 19

Ví dụ này mô tả chi tiết phương pháp sản xuất polypeptit relaxin homođime, heterođime, homomultime, hoặc heteromultime được tách bằng một hoặc nhiều nhóm liên kết PEG. Polypeptit relaxin multime có thể được tạo ra bởi các chuỗi A và các chuỗi A khác hoặc các chuỗi B và các chuỗi B khác.

Biến thể polypeptit relaxin chứa alkyn được tạo ra trong ví dụ nêu trên được cho phản ứng với dẫn xuất PEG hai chức có công thức:

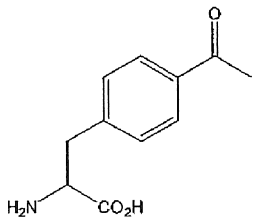
N_3-$(CH_2)_n$-C(O)-NH-$(CH_2)_2$-O-PEG(N)-O-$(CH_2)_2$-NH-C(O)-$(CH_2)_n$-N_3

trong đó n bằng 4 và PEG có khối lượng phân tử trung bình bằng khoảng 5.000; 10.000; 20.000; 30.000; hoặc 40.000 để tạo ra polypeptit relaxin homođime tương ứng, trong đó hai phân tử relaxin được tách vật lý bằng PEG. Theo cách tương tự polypeptit relaxin có thể được ghép cặp với một hoặc nhiều polypeptit khác để tạo ra heterođime, homomultime, hoặc heteromultime. Phản ứng ghép cặp, tinh chế, và phân tích sẽ được thực hiện như nêu trong các ví dụ nêu trên.

Ví dụ 20

Ví dụ này mô tả chi tiết phản ứng ghép cặp gốc sacarit với polypeptit relaxin.

Một gốc trong số các gốc sau đây được thế bằng axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên sau: trước vị trí 1 (tức là ở đầu tận cùng N), 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, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54 (nghĩa là, ở đầu tận cùng carboxyl của protein có trình tự SEQ ID NO.1 hoặc các vị trí tương ứng nêu trong SEQ ID NO.2 và SEQ ID NO.3), như được mô tả trên đây.



Sau khi được cải biến, biến thể polypeptit relaxin chứa axit amin chứa carbonyl được cho phản ứng với chất tương tự aminooxy được liên kết ở vị trí β của N-axetylglucosamin (GlcNAc). Biến thể polypeptit relaxin (10mg/mL) và aminooxy sacarit (21mM) được trộn trong dung dịch đệm natri axetat 100mM trong nước (độ pH =5,5) và ủ ở nhiệt độ 37°C trong khoảng thời gian từ 7 giờ đến 26 giờ. Sacarit thứ hai được ghép cặp với sacarit thứ nhất nhờ enzym bằng cách ủ polypeptit relaxin đã tiếp hợp với sacarit (5mg/mL) với UDP-galactoza (16mM) và p-1,4-galacytosyltransferaza (0,4 đơn vị/mL) trong dung dịch đệm HEPES 150mM (độ pH=7,4) trong 48 giờ ở nhiệt độ môi trường (Schanbacher et al., *J. Biol. Chem.* 1970, 245, 5057-5061).

Ví dụ 22

Ví dụ này mô tả chi tiết phương pháp sản xuất polypeptit relaxin chất đối kháng được PEGyl hóa.

Gốc, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các gốc liên quan đến việc liên kết thụ thể relaxin được thế bằng axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên sau như nêu trên. Sau khi được cải biến, biến thể polypeptit relaxin chứa axit amin chứa carbonyl sẽ phản ứng với dẫn xuất PEG chứa aminooxy có công thức:

$$R\text{-}PEG(N)\text{-}O\text{-}(CH_2)_n\text{-}O\text{-}NH_2$$

trong đó R là metyl, n bằng 4 và N có khối lượng phân tử bằng 5.000; 10.000; 20.000; 30.000; hoặc 40.000 để tạo ra chất đối kháng polypeptit relaxin chứa axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên được cải biến với dẫn xuất PEG ở một vị trí duy nhất trong polypeptit. Phản ứng ghép cặp, tinh chế, và phân tích được thực hiện như nêu trên.

Ví dụ 21

Phương pháp sản xuất polypeptit relaxin homođime, heterođime, homomultime, hoặc heteromultime, trong đó các phân tử relaxin được liên kết trực tiếp

Biến thể polypeptit relaxin chứa axit amin chứa alkyn có thể trực tiếp được ghép cặp với một biến thể polypeptit relaxin khác chứa axit amin chứa aziđo. Theo cách tương tự, polypeptit relaxin có thể được ghép cặp với một hoặc nhiều polypeptit khác để tạo ra heterođime, homomultime, hoặc heteromultime. Mô tả thêm về các multime có thể được tạo ra được nêu trong ví dụ 16 và ví dụ 17 và phản ứng ghép cặp, tinh chế, và phân tích được thực hiện như nêu trên.

Ví dụ 22

$$PEG\text{-}OH + Br\text{-}(CH_2)_n\text{-}C{\equiv}CR' \rightarrow PEG\text{-}O\text{-}(CH_2)_n\text{-}C{\equiv}CR'$$

A B

Polyalkylen glycol (P-OH) được cho phản ứng với alkyl halogenua (A) để tạo ra ete (B). Trong các hợp chất này, n là số nguyên từ một đến chín và R’ có thể là nhóm alkyl hoặc heteroalkyl có 1 đến 20 nguyên tử cacbon, bão hoà hoặc không no, mạch thẳng hoặc mạch nhánh. R' cũng có thể là alkyl mạch vòng hoặc heteroalkyl mạch vòng, bão hoà hoặc không no, có 3 đến 7 nguyên tử cacbon, aryl được thế hoặc không được thế hoặc nhóm heteroaryl, hoặc alkaryl được thế hoặc không được thế (alkyl là alkyl bão hoà hoặc không no có 1 đến 20 nguyên tử cacbon) hoặc nhóm heteroalkaryl. Nhìn chung, PEG-OH là polyetylen glycol (PEG) hoặc monometoxy polyetylen glycol (mPEG) có khối lượng phân tử nằm trong khoảng từ 800Dalton đến 40.000Dalton (Da).

Ví dụ 23

$$mPEG\text{-}OH + Br\text{-}CH_2\text{-}C{\equiv}CH \rightarrow mPEG\text{-}O\text{-}CH_2\text{-}C{\equiv}CH$$

mPEG-OH với khối lượng phân tử 20.000Da (mPEG-OH 20kDa; 2,0g, 0,1mmol, Sunbio) được xử lý bằng dung dịch chứa NaH (12mg, 0,5mmol) trong THF (35mL). Sau đó, dung dịch chứa propargyl bromua, hòa tan ở dạng dung dịch 80% khối lượng trong xylen (0,56ml, 5mmol, 50 đương lượng, do Aldrich cung cấp), và lượng xúc tác KI được bổ sung vào dung dịch này và hỗn hợp thu được được tăng nhiệt độ để hồi lưu trong 2 giờ. Tiếp theo, nước (1mL) được bổ sung vào và dung môi được loại bỏ trong điều kiện chân không. Bổ sung CH_2Cl_2 (25mL) vào phần cặn và lớp hữu cơ được tách, làm khô trên Na_2SO_4 khan, và thể tích được giảm đến khoảng 2mL. Dung dịch CH_2Cl_2 được bổ sung nhỏ giọt vào đietyl ete (150mL). Chất kết tủa thu được được gộp lại, rửa bằng vài phần đietyl ete lạnh, và làm khô để tạo ra propargyl-O-PEG.

Ví dụ 24

$$mPEG\text{-}OH + Br\text{-}(CH_2)_3\text{-}C{\equiv}CH \rightarrow mPEG\text{-}O\text{-}(CH_2)_3\text{-}C{\equiv}CH$$

mPEG-OH với khối lượng phân tử 20.000Da (mPEG-OH 20kDa; 2,0g, 0,1mmol, Sunbio) được xử lý bằng dung dịch NaH (12mg, 0,5mmol) trong THF (35mL). Năm mươi đương lượng 5-bromo-l-pentyn (0,53ml, 5mmol, do Aldrich cung cấp) và lượng xúc tác KI sau đó được bổ sung vào hỗn hợp này. Hỗn hợp thu được được tăng nhiệt độ để hồi lưu trong 16 giờ. Tiếp theo, nước (1mL) được bổ sung vào và dung môi được loại bỏ trong điều kiện chân không. Bổ sung CH_2Cl_2 (25mL) vào phần cặn và lớp hữu cơ được tách, làm khô trên Na_2SO_4 khan, và thể tích được giảm đến khoảng 2mL. Dung dịch CH_2Cl_2 được bổ sung nhỏ giọt vào đietyl ete (150mL). Chất kết tủa thu được được gộp lại, rửa bằng vài phần đietyl ete lạnh, và làm khô để tạo ra alkyn tương ứng. 5-clo-l-pentyn có thể được sử dụng trong phản ứng tương tự.

Ví dụ 25

$$m\text{-}HOCH_2C_6H_4OH + NaOH + Br\text{-}CH_2\text{-}C{\equiv}CH \rightarrow m\text{-}HOCH_2C_6H_4O\text{-}CH_2\text{-}C{\equiv}CH$$

$$m\text{-}HOCH_2C_6H_4O\text{-}CH_2\text{-}C{\equiv}CH + MsCl + N(Et)_3 \rightarrow m\text{-}MsOCH_2C_6H_4O\text{-}CH_2\text{-}C{\equiv}CH$$

$$m\text{-}MsOCH_2C_6H_4O\text{-}CH_2\text{-}C{\equiv}CH + LiBr \rightarrow m\text{-}Br\text{-}CH_2C_6H_4O\text{-}CH_2\text{-}C{\equiv}CH$$

*m*PEG-OH + *m*-Br-$CH_2C_6H_4O$-CH_2-C≡CH → *m*PEG-O-CH_2-C_6H_4O-CH_2-C≡CH

Trước tiên, bổ sung natri hyđroxit ở dạng bột (1,5g, 37,5mmol) vào dung dịch chứa 3-hyđroxybenzylalcohol (2,4g, 20mmol) trong THF (50mL) và nước (2,5mL), sau đó bổ sung dung dịch propargyl bromua, được hòa tan ở dạng dung dịch 80% khối lượng trong xylen (3,36ml, 30mmol). Hỗn hợp phản ứng này được đun nóng ở nhiệt độ hồi lưu trong 6 giờ. Bổ sung dung dịch axit xitric 10% (2,5mL) vào hỗn hợp này và dung môi được loại bỏ trong điều kiện chân không. Cặn được chiết bằng etyl axetat (3 x 15 mL) và các lớp hữu cơ kết hợp được rửa bằng dung dịch NaCl bão hoà (10mL), làm khô trên $MgSO_4$ và cô để tạo ra rượu 3-propargyloxybenzylic.

Bổ sung metansulfonyl clorua (2,5g, 15,7mmol) và trietylamin (2,8ml, 20mmol) vào dung dịch chứa hợp chất 3 (2,0g, 11,0mmol) trong CH_2Cl_2 ở nhiệt độ 0°C và hỗn hợp phản ứng này được đặt trong tủ lạnh trong 16 giờ. Xử lý theo cách thông thường tạo ra mesylat ở dạng dầu màu vàng nhạt. Dầu này (2,4g, 9,2mmol) được hòa tan trong THF (20mL) và LiBr (2,0g, 23,0mmol) được bổ sung vào. Hỗn hợp phản ứng này được tăng nhiệt độ để hồi lưu trong 1 giờ và sau đó được làm nguội đến nhiệt độ phòng. Bổ sung nước (2,5mL) vào hỗn hợp này và dung môi được loại bỏ trong điều kiện chân không. Cặn được chiết bằng etyl axetat (3 x 15 mL) và các lớp hữu cơ kết hợp được rửa bằng dung dịch NaCl bão hoà (10mL), làm khô trên Na_2SO_4 khan, và cô để tạo ra bromua mong muốn.

mPEG-OH 20kDa (1,0g, 0,05mmol, Sunbio) được hòa tan trong THF (20mL) và dung dịch này được làm nguội trong chậu nước đá. NaH (6mg, 0,25mmol) được bổ sung đồng thời khuấy mạnh trong khoảng thời gian vài phút, tiếp theo bổ sung bromua thu được ở trên (2,55g, 11,4mmol) và lượng chất xúc tác KI. Loại bỏ chậu làm lạnh và hỗn hợp thu được được tăng nhiệt độ để hồi lưu trong 12 giờ, nước (1,0mL) được bổ sung vào hỗn hợp này và dung môi được loại bỏ trong điều kiện chân không. Bổ sung CH_2Cl_2 (25mL) vào phần cặn và lớp hữu cơ được tách, làm khô trên Na_2SO_4 khan, và thể tích được giảm đến khoảng 2mL. Bổ sung nhỏ giọt dung dịch ete (150mL) vào, thu được chất kết tủa màu trắng, chất này được thu gom để tạo ra dẫn xuất PEG.

Ví dụ 26

$$mPEG\text{-}NH_2 + X\text{-}C(O)\text{-}(CH_2)_n\text{-}C{\equiv}CR' \rightarrow mPEG\text{-}NH\text{-}C(O)\text{-}(CH_2)_n\text{-}C{\equiv}CR'$$

Các polyme poly(etylen glycol) chứa alkyn ở đầu tận cùng cũng có thể thu được bằng cách cho poly(etylen glycol) polyme chứa nhóm chức đầu tận cùng ghép cặp với phân tử phản ứng chứa nhóm chức alkyn như được thể hiện trên đây, n nằm trong khoảng từ 1 đến 10. R' có thể là H hoặc nhóm alkyl nhỏ có 1 đến 4 nguyên tử cacbon.

Ví dụ 27

$$HO_2C\text{-}(CH_2)_2\text{-}C{\equiv}CH + NHS + DCC \rightarrow NHSO\text{-}C(O)\text{-}(CH_2)_2\text{-}C{\equiv}CH$$

$$mPEG\text{-}NH_2 + NHSO\text{-}C(O)\text{-}(CH_2)_2\text{-}C{\equiv}CH \rightarrow mPEG\text{-}NH\text{-}C(O)\text{-}(CH_2)_2\text{-}C{\equiv}CH$$

Axit 4-pentynoic (2,943g, 3,0mmol) được hòa tan trong CH_2Cl_2 (25mL). N-hyđroxysucxinimit (3,80g, 3,3mmol) và DCC (4,66g, 3,0mmol) được bổ sung vào và dung dịch này được khuấy qua đêm ở nhiệt độ phòng. NHS este 7 thô thu được được sử dụng trong phản ứng nêu dưới đây mà không cần tinh chế thêm.

$mPEG\text{-}NH_2$ có khối lượng phân tử 5.000Da ($mPEG\text{-}NH_2$, 1g, Sunbio) được hòa tan trong THF (50mL) và hỗn hợp này được làm lạnh đến 4°C. NHS este 7 (400mg, 0,4mmol) được bổ sung từng phần đồng thời khuấy mạnh. Hỗn hợp này được khuấy trong 3 giờ trong khi nâng nhiệt độ lên đến nhiệt độ phòng. Sau đó, nước (2mL) được bổ sung vào và dung môi được loại bỏ trong điều kiện chân không. Bổ sung CH_2Cl_2 (50mL) vào phần cặn và lớp hữu cơ được tách, làm khô trên Na_2SO_4 khan, và thể tích được giảm đến khoảng 2mL. Dung dịch CH_2Cl_2 này được bổ sung nhỏ giọt vào ete (150mL). Chất kết tủa thu được được thu gom và làm khô trong điều kiện chân không.

Ví dụ 28

Ví dụ này mô tả phương pháp điều chế metan sulfonyl este củpoly(etylen glycol), cũng có thể được gọi là metansulfonat hoặc mesylat củpoly(etylen glycol). Tosylat tương ứng và các halogenua có thể được điều chế theo quy trình tương tự.

$$mPEG\text{-}OH + CH_3SO_2Cl + N(Et)_3 \rightarrow mPEG\text{-}O\text{-}SO_2CH_3 \rightarrow mPEG\text{-}N_3$$

mPEG-OH (khối lượng phân tử = 3,400, 25g, 10mmol) trong 150mL toluen được

chưng cất đẳng phí trong 2 giờ trong nitơ và dung dịch này được làm nguội đến nhiệt độ phòng. 40mL CH_2Cl_2 khan và 2,1mL trietylamin khan (15mmol) được bổ sung vào dung dịch này. Dung dịch này được làm nguội trong chậu nước đá và 1,2mL metansulfonyl clorua đã được chưng cất (15mmol) được bổ sung nhỏ giọt vào. Dung dịch này được khuấy ở nhiệt độ phòng trong nitơ qua đêm, và phản ứng được dừng bằng cách bổ sung 2mL cồn tuyệt đối. Hỗn hợp này được làm bay hơi trong điều kiện chân không để loại bỏ các dung môi, chủ yếu là các dung môi khác ngoài toluen, lọc, cô lại trong điều kiện chân không, và sau đó được kết tủa trong 100mL đietyl ete. Dịch lọc được rửa bằng vài phần đietyl ete lạnh và làm khô trong điều kiện chân không để tạo ra mesylat.

Mesylat (20g, 8mmol) được hòa tan trong 75ml THF và dung dịch này được làm lạnh đến 4°C. Bổ sung natri azit (1,56g, 24mmol) vào dung dịch đã được lầm lạnh này. Hỗn hợp phản ứng được tăng nhiệt độ để hồi lưu trong khí quyển nitơ trong 2 giờ. Sau đó, các dung môi được làm bay hơi và phần cặn được pha loãng bằng CH_2Cl_2 (50mL). Phân đoạn hữu cơ được rửa bằng dung dịch NaCl và làm khô trên $MgSO_4$ khan. Thể tích được giảm đến 20mL và sản phẩm này được kết tủa bằng cách bổ sung 150mL ete khan lạnh.

Ví dụ 29

$$N_3\text{-}C_6H_4\text{-}CO_2H \rightarrow N_3\text{-}C_6H_4CH_2OH$$

$$N_3\text{-}C_6H_4CH_2OH \rightarrow Br\text{-}CH_2\text{-}C_5H_4\text{-}N_3$$

$$mPEG\text{-}OH + Br\text{-}CH_2\text{-}C_6H_4\text{-}W_3 \rightarrow mPEG\text{-}O\text{-}CH_2\text{-}C_6H_4\text{-}N_3$$

Rượu 4-aziđobenzylic có thể được tạo ra bằng cách sử dụng phương pháp đã được bộc lộ trong Patent Mỹ số 5,998,595, mà được kết hợp vào sáng chế bằng cách viện dẫn. Metansulfonyl clorua (2,5g, 15,7mmol) và trietylamin (2,8ml, 20mmol) được bổ sung vào dung dịch rượu 4-aziđobenzylic (1,75g, 11,0mmol) trong CH_2Cl_2 ở nhiệt độ 0°C và hỗn hợp phản ứng này được đặt trong tủ lạnh trong 16 giờ. Việc xử lý thông thường tạo ra mesylat ở dạng dầu màu vàng nhạt. Dầu này (9,2mmol) được hòa tan trong THF (20mL) và LiBr (2,0g, 23,0mmol) được bổ sung vào. Hỗn hợp phản ứng này được tăng nhiệt độ để hồi lưu trong 1 giờ và sau đó được làm nguội đến nhiệt độ phòng. Bổ sung nước (2,5mL) vào hỗn hợp này và dung môi được loại bỏ trong điều kiện chân không. Cặn

được chiết bằng etyl axetat (3 x 15 mL) và các lớp hữu cơ kết hợp được rửa bằng dung dịch NaCl bão hoà (10mL), làm khô trên Na_2SO_4 khan, và cô để tạo ra bromua mong muốn.

mPEG-OH 20kDa (2,0g, 0,1mmol, Sunbio) được xử lý bằng dung dịch NaH (12mg, 0,5mmol) trong THF (35mL) và bromua (3,32g, 15mmol) được bổ sung vào hỗn hợp này cùng với lượng chất xúc tác KI. Hỗn hợp thu được tăng nhiệt độ để hồi lưu trong 12 giờ. Nước (1,0mL) được bổ sung vào hỗn hợp này và dung môi được loại bỏ trong điều kiện chân không. Bổ sung CH_2Cl_2 (25mL) vào phần cặn và lớp hữu cơ được tách, làm khô trên Na_2SO_4 khan, và thể tích được giảm đến khoảng 2mL. Bổ sung nhỏ giọt vào dung dịch ete (150mL) thu được chất kết tủa, chất này được thu gom để tạo ra mPEG-O-CH_2-C_6H_4-N_3.

Ví dụ 30

$$NH_2\text{-PEG-O-}CH_2CH_2CO_2H + N_3\text{-}CH_2CH_2CO_2\text{-NHS} \rightarrow N_3CH_2CH_2\text{-C(O)NH-PEG-O-}CH_2CH_2CO_2H$$

NH_2-PEG-O-$CH_2CH_2CO_2H$ (khối lượng phân tử 3.400Da, 2,0g) được hòa tan trong dung dịch $NaHCO_3$ bão hòa trong nước (10mL) và dung dịch được làm lạnh đến 0°C. 3-aziđo-1-N-hyđroxysucxinimiđo propionat (5 đương lượng) được bổ sung đồng thời khuấy mạnh. Sau 3 giờ, 20mL H_2O được bổ sung vào và hỗn hợp này được khuấy tiếp trong 45 phút ở nhiệt độ phòng. Độ pH được điều chỉnh đến 3 bằng 0,5N H_2SO_4 và NaCl được bổ sung vào ở nồng độ khoảng 15% khối lượng. Hỗn hợp phản ứng này được chiết bằng CH_2Cl_2 (100mL x 3), làm khô trên Na_2SO_4 và cô. Sau khi kết tủa bằng đietyl ete lạnh, sản phẩm được thu gom bằng cách lọc và làm khô trong điều kiện chân không để tạo ra dẫn xuất omega-carboxy-azit PEG.

Ví dụ 31

$$\text{mPEG-OMs} + HC{\equiv}CLi \rightarrow \text{mPEG-O-}CH_2\text{-}CH_2\text{-}C{\equiv}C\text{-}H$$

Bổ sung nhỏ giọt dung dịch chứa mPEG-OMs được hòa tan trong THF vào dung dịch lithi axetylit (4 đương lượng) được điều chế như đã biết trong lĩnh vực phương pháp này và làm lạnh đến -78°C trong THF, đồng thời khuấy mạnh. Sau 3 giờ, phản ứng được để ấm đến nhiệt độ phòng và làm nguội bằng cách bổ sung 1mL butanol. Tiếp theo, 20mL

H_2O được bổ sung vào và hỗn hợp này được khuấy tiếp trong 45 phút ở nhiệt độ phòng. Độ pH được điều chỉnh đến 3 bằng dung dịch H_2SO_4 0,5N và NaCl được bổ sung vào ở nồng độ khoảng 15% khối lượng. Hỗn hợp phản ứng này được chiết bằng CH_2Cl_2 (100mL x 3), làm khô trên Na_2SO_4 và cô. Sau khi kết tủa với đietyl ete lạnh, sản phẩm được thu gom bằng cách lọc và làm khô trong điều kiện chân không để tạo ra 1-(but-3-ynyloxy)-metoxypolyetylen glycol (mPEG).

Ví dụ 32

Các axit amin chứa azit và axetylen có thể được kết hợp đặc hiệu với vị trí vào các protein bằng cách áp dụng các phương pháp đã được bộc lộ trong: L. Wang, et al., (2001), *Science* 292:498-500, J.W. Chin et al., *Science* 301:964-7 (2003)), J. W. Chin et al., (2002), *Journal of the American Chemical Society* 124:9026-9027; J. W. Chin, & P. G. Schultz, (2002), *Chem Bio Chem* 3(11): 1135-1137; J. W. Chin, et al., (2002), *PNAs United States of America* 99:11020-11024: và, L. Wang, & P. G. Schultz, (2002), *Chem. Comm*, 1:1-11. Khi các axit amin được kết hợp, phản ứng cộng xyclo được thực hiện với 0,01mM protein trong dung dịch đệm phosphat (PB), độ pH=8, với sự có mặt của 2mM dẫn xuất PEG, 1mM CuSO4, và ~1mg dây Cu trong 4 giờ ở nhiệt độ 37°C.

Ví dụ 33

Ví dụ này mô tả quy trình tổng hợp p-Axetyl-D,L-phenylalanin (pAF) và các dẫn xuất m-PEG-hyđroxylamin.

pAF triệt quang được tổng hợp bằng cách áp dụng quy trình đã được mô tả trước đây trong: Zhang, Z., Smith, B. A. C., Wang, L., Brock, A., Cho, C. & Schultz, P. G., *Biochemistry*, (2003) 42, 6735-6746 .

Để tổng hợp dẫn xuất m-PEG-hyđroxylamin, thực hiện các quy trình sau. Metoxy-polyetylen glycol amin (m-PEG-NH_2, 7,5g, 0,25mmol, Mt. 30 K, từ BioVectra) và điisopropyletylamin (0,1mL, 0,5mmol) được bổ sung vào dung dịch chứa axit (N-t-Boc-aminooxy)axetic (0,382g, 2,0mmol) và 1,3-điisopropylcarbođiimit (0,16ml, 1,0mmol) trong điclometan (DCM, 70mL) được khuấy ở nhiệt độ phòng (RT) trong 1 giờ. Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 48 giờ, và sau đó được cô đến 100mL. Hỗn

hợp này được bổ sung nhỏ giọt vào ete lạnh (800mL). Hợp chất được bảo vệ t-Boc được kết tủa khỏi hỗn hợp và gộp lại bằng cách lọc, rửa bằng ete 3xl00mL. Sản phẩm này được tinh chế tiếp bằng cách hòa tan lại trong DCM (100mL) và kết tủa trong ete (800mL) hai lần. Sản phẩm này được sấy khô trong điều kiện chân không để tạo ra 7,2g (96%), được xác nhận theo phương pháp cộng hưởng từ (NMR) và thử nghiệm Nihyđrin.

Phản ứng khử bảo vệ Boc của hợp chất được bảo vệ (7,0g) thu được trên đây được thực hiện trong 50% TFA/DCM (40mL) ở nhiệt độ 0°C trong 1 giờ và sau đó ở nhiệt độ phòng trong 1,5 giờ. Sau khi loại bỏ hầu hết TFA trong điều kiện chân không, muối TFA của dẫn xuất hyđroxylamin được biến đổi thành muối HCl bằng cách bổ sung dung dịch HC1 4N trong đioxan (1mL) vào phần cắn. Chất kết tủa được hòa tan trong DCM (50mL) và kết tủa lại trong ete (800mL). Hợp chất cuối cùng (6,8g, 97%) được thu gom bằng cách lọc, rửa bằng ete 3x l00mL, sấy khô trong điều kiện chân không, bảo quản trong khí quyển nitơ. Các dẫn xuất hyđroxylamin PEG khác (5K, 20K) được tổng hợp bằng cách sử dụng cùng quy trình.

Ví dụ 34

Nghiên cứu relaxin được PEGyl hóa *in vivo*

PEG-Relaxin, relaxin chưa được cải biến và dung dịch đệm được sử dụng cho chuột nhắt hoặc chuột cống. Kết quả cho thấy relaxin được PEGyl hóa theo sáng chế có hoạt tính cao hơn và chu kỳ bán thải dài hơn so với relaxin chưa được cải biến. Tương tự, relaxin đã được cải biến, relaxin chưa được cải biến, và dung dịch đệm được sử dụng cho chuột nhắt hoặc chuột cống.

Phân tích dược động học

Polypeptit relaxin theo sáng chế được sử dụng qua đường tĩnh mạch hoặc dùng dưới da cho chuột nhắt. Các chuột được lấy máu trước khi và tại các thời điểm sau khi sử dụng hoạt chất. Huyết tương được thu gom từ mỗi mẫu và phân tích bằng thử nghiệm miễn dịch phóng xạ. Thời gian bán thải giảm có thể được tính và so sánh giữa các polypeptit relaxin chứa axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên và relaxin thể dại hoặc các polypeptit tương tự relaxin khác theo sáng chế. Tương tự, các polypeptit relaxin

theo sáng chế có thể được sử dụng cho khỉ Cynomolgus. Khỉ được lấy máu trước khi và ở các thời điểm sau khi sử dụng hoạt chất. Huyết tương được thu gom từ mỗi mẫu và phân tích bằng thử nghiệm miễn dịch phóng xạ.

Polypeptit có thể được sử dụng cho chuột nhắt bằng cách dùng đa liều, truyền liên tục, hoặc liều đơn, v.v..

Ví dụ 35

Relaxin được biểu hiện bằng cách sử dụng hệ biểu hiện Novagen (trình tự khởi đầu cảm ứng T7; đã được bộc lộ một cách chi tiết trong: pET System Manual, phiên bản 9, được kết hợp vào sáng chế bằng cách viện dẫn), vectơ biểu hiện pET30a và chủng biểu hiện BL21(DE3).

2mL giống cấy LB/Kanamyxin (10µg/mL) được cấy thành dải từ đĩa BL21 (DE3) được biến nạp với chất tương tự mong muốn. Điều này làm giảm tác động gây ra bởi tính thay đổi giữa các khuẩn lạc lên mức biểu hiện. Dịch nuôi cấy này được để phát triển qua đêm ở nhiệt độ 37°C và lắc mạnh và ngày tiếp theo, 10mL giống cấy LB/Kanamyxin được cấy với 1mL dịch nuôi cấy qua đêm (OD600 ~ 0,4 đến 0,5). Số ml còn lại của dịch nuôi cấy qua đêm có thể được làm đông lạnh ở dạng dung dịch gốc glyxerol.

10mL dịch nuôi cấy đã đươc phát triển được đặt ở nhiệt độ 37°C và 250 vòng/phút trong 30-45 phút cho đến khi OD600 đạt 0,8 đến 0,9. Tiếp theo, dịch này được cảm ứng với 1mM IPTG (với 1mL có thể để dành làm mẫu đối chứng dịch nuôi cấy không được cảm ứng) và thu thường là 3 giờ đến 4 giờ sau cảm ứng và phân tích trên SDS-PAGE.

Cũng có thể theo dõi sự biểu hiện theo thời gian (ví dụ, các thời điểm 1, 2, 4, 6 giờ sau cảm ứng và O/N) để xác định tốc độ tích lũy, hoạt tính protein, v.v..

Phân tích gel; ở các thời điểm mong muốn, 1mL sau cảm ứng được thu từ dịch nuôi cấy, các tế bào được xoay tròn, tạo hỗn dịch lại trong 100µL 2X SDS-PAGE, được xử lý bằng cách siêu âm để làm giảm độ nhớt và 10µL được chạy trên SDS-PAGE. Nếu muốn, mẫu này có thể được so sánh với mẫu đối chứng không được cảm ứng hoặc các mẫu đối chứng và/hoặc mẫu đối chứng dương tính hoặc chất chuẩn đã biết và mức biểu hiện có thể được đánh giá (ví dụ, biểu hiện tốt có thể ở > 100µg/mL). Phương pháp phân

tích Thấm Tách Tây cũng có thể được sử dụng. Cũng có thể để dành 4ml giống cấy, để điều chế thể vùi (nếu biểu hiện các chất tương tự không hòa tan) và thực hiện phân tích phổ khối đối với các mẫu này để xác nhận tính đồng nhất của protein được biểu hiện quá mức.

Để biểu hiện protein ở quy mô lớn hơn, > 250mL LB/Kanamyxin (10µg/mL) được cấy với 250µL dung dịch gốc glyxerol được làm đông lạnh và cho sinh trưởng qua đêm. Ngày tiếp theo, 10 X 1L giống cấy LB/Kanamyxin được cấy với 25ml dịch nuôi cấy qua đêm (OD600 ~ 0,1).

1L giống cấy được cho sinh trưởng ở nhiệt độ 37°C và 250 vòng/phút ~ 2 giờ cho đến khi OD600 đạt 0,8 đến 0,9. Tiếp theo, dịch nuôi cấy này được cảm ứng với 1mM IPTG và thu 4 giờ sau cảm ứng hoặc thu vào sáng ngày hôm sau (có thể áp dụng ly tâm trong 15 phút ở 4.000 vòng/phút để thu). Viên kết được rửa bằng 50mM Tris-HCl, độ pH=8,0 (50mL cho mỗi viên kết + 50mL để tráng chai) nếu cần để làm giảm nội độc tố và tạo điều kiện thuận lợi cho tinh chế. Viên kết được thu gom lại với nhau và lại được quay.

Ví dụ 36

Nghiên cứu việc biểu hiện ở Pichia - quy trình điều chế ADN, xung điện, biểu hiện

Ví dụ này đề cập đến quy trình điều chế các polypeptit relaxin theo sáng chế ở *Pichia*. SEQ ID NO.34, 35, 36, và 37 được sử dụng, và plasmit có thể được sử dụng để tách dòng vào *Pichia* và plasmit này hoặc các plasmit được cải biến khác có thể được sử dụng để thu được sự biểu hiện protein của các polypeptit relaxin ở *Pichia*, các cải biến được tạo ra cho plasmit bằng cách áp dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực phương pháp này.

Ở ngày 1 của quy trình, có sự phân giải qua đêm, thường là bằng cách sử dụng 2U enzym cho một µg ADN cần phân giải và 10mL giống cấy YPhyD được cấy qua đêm trong bình có dung tích 50mL, lắc ở 260 vòng/phút ở 30°C từ dung dịch gốc glyxerol.

Điều chế ADN

ADN được kết tủa bằng cách trước tiên bổ sung 1/10 thể tích dung dịch NaOAc

3M vô trùng và sau đó 0,7 thể tích IPA vô trùng, tiếp theo mẫu được khuấy mạnh và tiếp tục để kết tủa qua đêm ở -20°C hoặc ở -70°C cho đến khi được làm đông lạnh. Tiếp theo, ADN được kết viên bằng cách ly tâm (máy ly tâm để bàn 14.000 vòng/phút/10 phút), phần dịch nổi được loại bỏ, và viên kết được rửa bằng cách sử dụng 500µL ETOH 70% vô trùng. Quay (máy ly tâm để bàn 14.000 vòng/phút/10 phút) và gạn phần dịch nổi và làm khô viên kết bằng không khí trong 15-20 phút. Tạo hỗn dịch lại viên kết ADN bằng nước vô trùng đến nồng độ 1µg/µL và biến nạp *Pichia* với 10µg ADN.

Phương pháp đục lỗ bằng xung điện

Bằng cách sử dụng dịch nuôi cấy qua đêm với OD_{600}, pha loãng trong YPhyD đến OD_{600} = 0,2. Lắc dịch nuôi cấy ở 260 vòng/phút ở 30°C cho đến khi OD_{600} đạt 0,8-1,0. Gom tế bào bằng cách ly tâm (4000 vòng/phút/5 phút). Gạn môi trường, rửa tế bào trong 20mL nước vô trùng đã được làm lạnh trong nước đá, gạn lại và lặp lại. Sau khi rửa bằng nước, rửa viên kết trong 20mL dung dịch sorbitol 1M vô trùng đã được làm lạnh trong nước đá, gạn, và tạo hỗn dịch lại viên kết tế bào đã được rửa trong 600µL dung dịch sorbitol 1M lạnh, sau đó hỗn dịch này có thể được bảo quản trên nước đá.

Trộn 50µL tế bào đã được rửa bằng 10µg ADN đã được duỗi thẳng trong ống eppendorf vô trùng có dung tích 1,5ml, trộn nhẹ nhàng và ủ trên nước đá trong 25 phút. Chuyển hỗn hợp tế bào/ADN vào cuvet 0,2cm đã được làm lạnh bằng cách sử dụng đầu hút pipet dài. Điện di tế bào bằng cách sử dụng thiết bị BioRad GenePulsar II với các điều kiện cài đặt sau: 2000 V, 200 Ohms, 25 µFd (sử dụng xung đơn) và ngay lập tức bổ sung 0,5ml môi trường YPhyD vào cuvet và trộn bằng pipet. Chuyển toàn bộ lượng hỗn hợp vào ống đáy tròn vô trùng và lắc nhẹ (200 vòng/phút) trong 30 phút ở 30°C. Đưa tế bào lên đĩa và dàn đều tế bào và ủ đĩa, lộn ngược lại, trong thời gian 3 ngày ở 30°C.

Sau ba ngày ủ, lựa chọn các khuẩn lạc có vòng và cấy vào 10mL môi trường BYPhyD trong bình có dung tích 50mL và ủ trong thời gian 3 ngày ở 30°C. Đếm các khuẩn lạc trên các đĩa 20µL và ghi lại số khuẩn lạc trung bình và sau đó thu tế bào, trước tiên bằng cách chuẩn bị 2 bộ lọ nhỏ đựng mẫu giữ lạnh được đánh dấu bằng tên chủng và số dòng, relaxin (tức là protein được biểu hiện), và ngày. Chuyển dịch nuôi cấy đến ống côn 15ml, xác định OD_{600} của mỗi dịch nuôi cấy, pha loãng dịch nuôi cấy trong môi

trường YPhyD theo tỷ lệ 1:50 hoặc 1:20. Để dành môt phần phân ước của dịch nuôi cấy làm dung dịch glyxerol gốc. Tiếp theo, kết viên nấm men ở 4000 vòng/phút trong 5 phút ở nhiệt độ phòng, chuyển phần dịch nổi đến một ống hình côn có dung tích 15ml được gắn nhãn mới, và bảo quản ở -20°C hoặc -80°C cho đến khi cần để phân tích dữ liệu.

Phân tích biểu hiện protein

Chạy các mẫu trên gel 4% đến 12% NuPAGE TB (Novex). Các chất phản ứng SDS-PAGE được sử dụng do Invitrogen cung cấp, phân tích bằng phương pháp phân tích Thấm Tách Tây hoặc phân tích gel được nhuộm

Thành phần môi trường

Dung dịch đệm chứa đextroza phyton của nấm men (BYPhyD)

Dịch chiết nấm men 10g/L

Phyton pepton 20g/L

Dung dịch đệm kali phosphat 1M (độ pH =6) 100mL/L

10XYNB 100mL/L

Đextroza 20% 100mL/L

Đextroza phyton của nấm men (YPhyD)

Dịch chiết nấm men 10g/L

phyton pepton 20g/L

Đextroza 20% 100mL/L

10X YNB (13,4% bazơ nitơ nấm men với amoni sulfat không chứa axit amin)

Bazơ nitơ nấm men 134 g/L

Ví dụ 37

Sản xuất relaxin A21G

Trong ví dụ này, 4,0l giống cấy được lên men để tạo ra 13,4g dịch đặc tế bào ướt và thực hiện điều chế thể vùi với và không cùng với Triton-X100. 2,07g thể vùi ướt được sản xuất theo cách này, và sau đó hòa tan và gấp nếp lại. Thể vùi này được tạo hỗn dịch lại với 200mL H_2O cho một gam thể vùi ướt (IBs) đến nồng độ cuối cùng 3mM và xystein được bổ sung vào hỗn dịch được tạo lại này. Tiếp theo, IB được hòa tan bằng cách tăng độ pH đến 11,5 trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng. Sau đó để xảy ra sự gấp nếp lại bằng cách giảm độ pH của nguyên liệu đã được hòa tan đến 10,6±0,1 và bảo quản ở 2°C đến 8°C trong ~72 giờ và các kết quả này được thể hiện trên Fig.10. Phản ứng gấp nếp được dừng bằng cách bổ sung HCl đến độ pH cuối bằng 3,0, 0,45µM được lọc và bảo quản ở 2°C đến 8°C cho đến khi xử lý tiếp.

Protein đã được gấp nếp lại được tinh chế bằng cách tăng độ pH của hỗn hợp gấp nếp đã được dừng phản ứng đến 8,0 bằng bazơ Tris và nạp trực tiếp vào cột Q HP. Độ dẫn điện của tải lượng trong trường hợp này là >3,5mS/cm. Các điều kiện chạy cột là (A) 20mM Tris, 8,0; (B) 20mM Tris, 8,0; 200mM NaCl và có 0% đến 100%B trong 30CV. Proinsulin đã được gấp nếp lại một cách chính xác được thu gom và 79mg proinsulin được thu nhận.

Siêu lọc/lọc thẩm tách (UF/DF) được thực hiện và bước kết tủa được tiến hành với 25mM kẽm, protein đã được kết tủa được tạo hỗn dịch lại đến nồng độ 2mg/mL bằng 20mM NaOAc, 4,0, 30% ACN, 5mM EDTA và 20K PEG được bổ sung đến tỷ lệ mol cuối cùng giữa PEG : protein là 10:1 và để ủ trong thời gian 48 giờ đến 72 giờ ở nhiệt độ 28°C.

Phản ứng PEG được pha loãng 1:10 trong dung dịch đệm A 0,5X PEG, 0,22µM được lọc và chạy trên cột SP 650S. Các điều kiện chạy là (A) 10mM NaOAc, 4,0, 1mM EDTA; (B) 10mM NaOAc, 4,0, 1mM EDTA, 0,4M NaCl; 0-50%B trong 20CV và các mẫu PEG được bào chế trong 10mM NaXitrat, 6,5; 150mM NaCl và kết quả này được thể hiện trên Fig.12.

Các phương pháp này được sử dụng để tạo ra nhiều loại polypeptit relaxin với axit amin không có trong tự nhiên và khoảng 0,1mg đến 22mg protein thành phẩm của các biến thể đã được tinh chế và PEGyl hóa. Nhận thấy rằng ACN giúp hòa tan hỗn hợp

PEG/protein trong phản ứng PEG và sự kết tủa kẽm ở độ pI tạo điều kiện thuận lợi cho việc cô đặc với sự có mặt của CAN.

Ví dụ 38

Thử nghiệm lâm sàng trên người về độ an toàn và/hoặc hiệu lực của relaxin đã được PEGyl hóa chứa axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên.

Mục đích: Để theo dõi độ an toàn và dược động học của relaxin tái tổ hợp của người được PEGyl hóa được sử dụng dưới da chứa axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên.

Bệnh nhân: Mười tám người tình nguyện khỏe mạnh có độ tuổi nằm trong khoảng từ 20 đến 40 và thể trọng nằm trong khoảng từ 60kg đến 90kg tham gia vào nghiên cứu này. Các đối tượng không có chỉ số huyết học hoặc hóa học huyết thanh thí nghiệm bất thường có nghĩa trong lâm sàng, và thử nghiệm về độc tính nước tiểu, thử nghiệm về HIV, và kháng nguyên bề mặt viêm gan B là âm tính. Họ không có dấu hiệu bất kỳ nào trong số các dấu hiệu sau: bệnh tăng huyết áp; tiền sử bệnh huyết học sơ cấp bất kỳ; tiền sử đáng kể về bệnh gan, thận, tim mạch, dạ dày-ruột, sinh dục-niệu, trao đổi chất, bệnh thần kinh; tiền sử bệnh thiếu máu hoặc rối loạn tai biến; tính mẫn cảm đã biết với các sản phẩm có nguồn gốc vi khuẩn hoặc động vật có vú, PEG, hoặc albumin huyết thanh người; có thói quen và rất hay sử dụng đồ uống chứa cafein; tham gia vào thử nghiệm lâm sàng bất kỳ khác hoặc được truyền máu hoặc cho máu trong vòng 30 ngày trước khi nghiên cứu; có tiếp xúc với relaxin trong vòng ba tháng trước khi nghiên cứu; bị ốm trong vòng bảy ngày trước nghiên cứu; và có sự bất thường đáng kể khi khám sức khỏe trước nghiên cứu hoặc theo đánh giá lâm sàng trong phòng thí nghiệm trong vòng 14 ngày trước nghiên cứu. Tất cả các đối tượng đều được đánh giá về độ an toàn và tất cả các hỗn hợp máu để phân tích dược động học đều được thu gom theo lịch trình. Tất cả các nghiên cứu được thực hiện với sự phê chuẩn của tổ chức ủy ban đạo đức và sự đồng thuận của bệnh nhân.

Kế hoạch nghiên cứu: Đây là nghiên cứu giao nhau hai thời kỳ, ngẫu nhiên, nhãn mở, đơn tâm, Pha I ở những người tình nguyện là nam giới khỏe mạnh. Mười tám đối tượng chia ngẫu nhiên thành một trong hai nhóm trình tự điều trị (chín đối tượng/nhóm).

Relaxin được sử dụng cho hai đợt sử dụng hoạt chất riêng biệt ở dạng tiêm liều lớn dưới da ở bắp đùi bằng cách sử dụng relaxin được PEGyl hóa chứa axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên ở các liều lượng tương đương và sản phẩm có bán trên thị trường được chọn lọc. Liều dùng và tần suất dùng của sản phẩm có bán trên thị trường là như được giới thiệu trên nhãn bao gói. Liều dùng, tần xuất dùng, hoặc thông số khác nữa nếu muốn, khi sử dụng các sản phẩm có bán trên thị trường có thể được bổ sung vào nghiên cứu này bằng cách kể cả các nhóm đối tượng khác nữa. Mỗi đợt sử dụng hoạt chất được phân cách nhau bởi khoảng thời gian rửa trôi là 14 ngày. Các đối tượng được giữ ở trung tâm nghiên cứu ít nhất 12 giờ trước khi và 72 giờ sau khi sử dụng hoạt chất đối với mỗi trong số hai đợt sử dụng hoạt chất, nhưng không thuộc các đợt sử dụng hoạt chất này. Các nhóm gồm đối tượng khác có thể được bổ sung vào nếu relaxin đã được PEGyl hóa còn cần thử nghiệm về liều dùng, tần suất, hoặc thông số khác nữa. Chế phẩm thử nghiệm của relaxin là relaxin đã được PEGyl hóa chứa axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên.

Lấy mẫu máu: Máu được rút ra theo từng dãy bằng cách đâm thủng trực tiếp tĩnh mạch trước và sau khi dùng relaxin. Các mẫu máu tĩnh mạch (5mL) dùng để xác định nồng độ relaxin trong huyết thanh được lấy khoảng 30 phút, 20 phút, và 10 phút trước khi sử dụng hoạt chất (3 mẫu đường nền) và ở các thời điểm sau sau khi sử dụng hoạt chất: 30 phút và ở 1 giờ, 2 giờ, 5 giờ, 8 giờ, 12 giờ, 15 giờ, 18 giờ, 24 giờ, 30 giờ, 36 giờ, 48 giờ, 60 giờ và 72 giờ. Mỗi mẫu huyết thanh được chia thành hai phần phân ước. Tất cả các mẫu huyết thanh được bảo quản ở -20°C. Các mẫu huyết thanh được chuyển lên nước đá khô. Các thử nghiệm lâm sàng nhanh trong phòng thí nghiệm (huyết học, hóa học huyết thanh, và phân tích nước tiểu) được thực hiện ngay lập tức trước khi dùng liều ban đầu vào ngày thứ 1, sáng ngày thứ 4, ngay lập tức trước khi dùng vào ngày thứ 16 và sáng ngày thứ 19.

Các phương pháp phân tích sinh học: kit ELISA được sử dụng để xác định nồng độ relaxin trong huyết thanh.

Xác định độ an toàn: Dấu hiệu sinh tồn được ghi lại ngay lập tức trước mỗi lần dùng (Ngày 1 và 16), và ở 6, 24, 48, và 72 giờ sau mỗi lần dùng. Việc xác định độ an toàn dựa trên cơ sở tỷ lệ mắc phải và kiểu trường hợp bất lợi và các thay đổi về thử nghiệm

lâm sàng trong phòng thí nghiệm so với trị số nền. Ngoài ra, những thay đổi về số đo dấu hiệu sinh tồn so với các nghiên cứu trước đây, bao gồm huyết áp, và các kết quả khám sức khỏe được đánh giá.

Phân tích dữ liệu: các trị số nồng độ trong huyết thanh sau khi sử dụng hoạt chất được hiệu chỉnh dựa trên nồng độ relaxin nền trước khi sử dụng hoạt chất bằng cách lấy mỗi trị số sau khi sử dụng hoạt chất trừ đi nồng độ relaxin nền trung bình được xác định bằng cách lấy trung bình các hàm lượng relaxin của ba mẫu được thu gom ở 30 phút, 20 phút, và 10 phút trước khi sử dụng hoạt chất. Nồng độ relaxin trong huyết thanh trước khi sử dụng hoạt chất không được kể đến khi tính trị số trung bình nếu chúng thấp hơn mức định lượng của thử nghiệm. Các thông số dược động học được xác định từ dữ liệu nồng độ trong huyết thanh đã được hiệu chỉnh dựa trên nồng độ relaxin nền. Các thông số dược động học được tính theo các phương pháp không phụ thuộc mô hình trên hệ thống máy tính Digital Equipment Corporation VAX 8600 bằng cách sử dụng phiên bản mới nhất của phần mềm BIOAVL. Các thông số dược động học sau được xác định: nồng độ huyết thanh đạt đỉnh (Cmax); thời gian để nồng độ huyết thanh đạt đỉnh (tmax); diện tích dưới đường cong nồng độ theo thời gian (AUC) từ thời gian zero đến lúc lấy mẫu máu lần cuối cùng (AUCO-72) được tính bằng cách sử dụng quy tắc hình thành tuyến tính; và thời gian bán thải cuối cùng (t1/2), được tính từ hằng số tốc độ thải loại. Hằng số tốc độ thải loại được xác định theo phương pháp hồi quy tuyến tính các điểm dữ liệu liên tiếp trong vùng tuyến tính cuối cùng của đồ thị nồng độ-thời gian tuyến tính loga. Độ lệch chuẩn (SD) trung bình, và hệ số biến thiên (CV) của các thông số dược động học được tính đối với mỗi lần điều trị. Tỷ lệ giữa các trị số trung bình của thông số (chế phẩm được bảo quản/chế phẩm không được bảo quản) được tính.

Kết quả về độ an toàn: tỷ lệ mắc phải các trường hợp bất lợi là ngang bằng giữa các nhóm điều trị. Không có sự thay đổi đáng kể về mặt lâm sàng so với trị số nền hoặc các thử nghiệm nghiên cứu tiền lâm sàng trong phòng thí nghiệm hoặc huyết áp, và không có sự thay đổi một chút nào về các kết quả khám sức khỏe và các số đo về dấu hiệu sinh tồn so với trước khi nghiên cứu. Profin độ an toàn đối với hai nhóm điều trị dường như là tương tự nhau.

Các kết quả dược động học: profin nồng độ relaxin trung bình trong huyết thanh

theo thời gian (chưa được hiệu chỉnh các mức relaxin nền) ở cả 18 đối tượng sau khi nhận relaxin đã được PEGyl hóa chứa axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên ở mỗi thời điểm được xác định. Tất cả các đối tượng cần phải có nồng độ relaxin nền trước khi sử dụng hoạt chất nằm trong khoảng sinh lý thông thường. Các thông số dược động học được xác định từ dữ liệu huyết thanh được hiệu chỉnh dựa trên nồng độ relaxin nền trung bình trước khi sử dụng hoạt chất và Cmax và tmax được xác định. Tmax trung bình đối với các mẫu so sánh lâm sàng bất kỳ được chọn ngắn hơn đáng kể so với tmax đối với relaxin đã được PEGyl hóa chứa axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên. Thời gian bán thải cuối của các mẫu so sánh tiền lâm sàng ngắn hơn đáng kể khi so với thời gian bán thải cuối của relaxin đã được PEGyl hóa chứa axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên.

Mặc dù thử nghiệm này được thực hiện ở các đối tượng nam giới khỏe mạnh, các đặc tính hấp thụ và profin độ an toàn tương tự sẽ được dự đoán ở các quần thể bệnh nhân khác; như các bệnh nhân nam và nữ mắc bệnh tiểu đường, các bệnh nhân nam và nữ mắc bệnh ung thư hoặc bệnh suy thận mãn tính, bệnh nhân nhi bị suy thận, bệnh nhân đang trong các chương trình chữa bệnh dự phòng tự thân, hoặc bệnh nhân dự kiến phẫu thuật chọn lọc.

Tóm lại, một liều duy nhất relaxin được PEGyl hóa chứa axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên được sử dụng dưới da sẽ an toàn và dung nạp tốt bởi các đối tượng nam giới khỏe mạnh. Dựa vào tỷ lệ so sánh mắc phải hiện tượng bất lợi, các giá trị thử nghiệm lâm sàng, dấu hiệu sinh tồn, và các kết quả khám sức khỏe, profin độ an toàn của các dạng relaxin và relaxin được PEGyl hóa chứa axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên có bán trên thị trường là tương đương. Relaxin đã được PEGyl hóa chứa axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên có khả năng tạo ra tính hữu dụng lớn trong lâm sàng cho các bệnh nhân và những người chăm sóc sức khỏe.

Ví dụ 39

Phát triển thử nghiệm về chức năng relaxin

Ví dụ này đề cập đến các chi tiết của thử nghiệm về chức năng relaxin. Bạch cầu đơn nhân to ngoại biên của máu người, tế bào THP-1, được sử dụng để chứng minh sự

gia tăng ađenosin monophosphat vòng (cAMP) so với các mẫu đối chứng dương tính Isoproterenol và Forskolin. Các tế bào THP-1 được ủ sơ bộ trong 500uM IBMX trong 30 phút, RLX đồng kích thích với 2uM Forskolin trong 20 phút. Isoproterenol, Forskolin, và các polypeptit relaxin, chứa thể dại A (với Alanin ở vị trí axit amin thứ nhất trên chuỗi B) và biến thể RLX-BAl-AV13pAF (biến thể relaxin với trình tự axit amin bộ khung gồm Alanin ở vị trí axit amin thứ nhất của chuỗi B với pAF được thế ở vị trí 13 (valin) trong chuỗi A, với bốn (4) PEG có kích thước khác nhau được gắn vào: 5K, 10K, 20K, và 30K.

Bảng 5: Trị số EC_{50} thô trong thử nghiệm về chức năng [ng/mL]

Mẫu	11/4/2010	11/5/2010	11/5/2010
RLX-D-WT	1,5	1,5	1,0
RLX-A-WT-001	3,6	3,3	2,6
RLX-A-AQ1-20KPEG-001		38	
RLX-A-AA5-20KPEG-001		41	
RLX-A-AV13-20KPEG-001		56	
RLX-A-AR18-20KPEG-001		68	
RLX-A-BV7-20KPEG-001	54		
RLX-A-BA18-20KPEG-001	172		
RLX-A-BW28-20KPEG-001	172		
RLX-A-BE5-20KPEG-001			45
RLX-D-BE5-20KPEG-001			58
RLX-D-AL2-20KPEG-001			43

Ví dụ 40

Ví dụ này đánh giá các đặc tính dược động học của các polypeptit relaxin đã được PEGyl hóa có kích thước 20kDa sau khi tiêm một liều duy nhất dưới da ở chuột cống SD.

Chuột cống Sprague-Dawley (SD) nhận được từ phòng thí nghiệm Charles River Laboratories (CRL) khoảng 7 đến 8 tuần tuổi (có trọng lượng khoảng 280g ở thời điểm bắt đầu nghiên cứu). Các chuột nhận được này được thông tĩnh mạch cổ ở CRL. Sau đó, các chuột này được cho thích nghi trong thời gian 3 ngày trước khi đưa vào nghiên cứu.

Các chuột này được nhận một liều tiêm duy nhất dưới da vào ngày thứ 1 và các mẫu PK được thu gom trong vòng 80 giờ tiếp theo. Các mẫu máu được lấy ra từ chuột được xử lý bằng PEG-relaxin để phân tích nồng độ trong huyết thanh theo lịch trình lấy mẫu sau (lần lấy mẫu là gần đúng):

Ngày 1: trước khi sử dụng hoạt chất, 1 giờ, 2 giờ, 4 giờ, 8 giờ, 12 giờ, 25 giờ, 34

giờ, 50 giờ, 58 giờ, 73 giờ và 80 giờ sau khi sử dụng hoạt chất

Nồng độ hợp chất được đo bằng cách sử dụng cầu nối ECLA dựa trên thử nghiệm được phát triển ở Ambrx. Nồng độ được tính bằng cách sử dụng đường cong chuẩn được tạo ra từ hợp chất phân liều tương ứng và đưa ra ở định dạng bảng tính excel (xem phụ lục). Các thông số dược động học được tính bằng cách sử dụng chương trình mẫu WinNonlin (Pharsight, phiên bản 5.1). Phân tích không chia ngăn đối với dữ liệu mỗi chuột với tổ hợp hình thang tuyến tính đi lên/loga đi xuống được sử dụng, và dữ liệu nồng độ được hoạch định đồng đều. Phân tích chia ngăn được thực hiện bằng cách sử dụng mô hình loại trừ trình tự thứ nhất có hai ngăn, và phương trình điều chỉnh mô hình Gauss-Newton (Levenberg-Hartley). Bảng 6 cho thấy trị số nồng độ PEG-Relaxin trung bình nhóm trong huyết thanh theo thời gian. Fig.8 so sánh nồng độ trung bình nhóm trong huyết thanh theo thời gian của tất cả các hợp chất PEG-Relaxin được sử dụng. Tất cả các nhóm liều lượng đều có mức PEG-Relaxin trong huyết thanh có thể đo được.

Nồng độ trong huyết thanh theo thời gian của mỗi chuột được sử dụng liều dưới da (SC) 0,5mg/kg PEG20K-AQ1-RLX được lập đồ thị trên Fig.9. Nồng độ trong huyết thanh theo thời gian của mỗi chuột được sử dụng liều dưới da 0,5mg/kg PEG20K-AA5-RLX được lập đồ thị trên Fig.10. Nồng độ trong huyết thanh theo thời gian của mỗi chuột được sử dụng liều dưới da 0,5mg/kg PEG20K-AR18-RLX được lập đồ thị trên Fig.11. Nồng độ trong huyết thanh theo thời gian của mỗi chuột được sử dụng liều dưới da 0,5mg/kg PEG20K-BV7-RLX được lập đồ thị trên Fig.12. Nồng độ trong huyết thanh theo thời gian của mỗi chuột được sử dụng liều dưới da 0,5mg/kg PEG20K-BW28-RLX được lập đồ thị trên Fig.13. Nồng độ trong huyết thanh theo thời gian của mỗi con chuột được sử dụng liều dưới da 0,5mg/kg PEG20K-AV13 được lập đồ thị trên Fig.14.

Kết quả phân tích không chia ngăn dữ liệu nồng độ trong huyết thanh theo thời gian của các chuột được sử dụng dưới da được tổng kết trong Bảng 6.

Bảng 6: Nồng độ trung bình trong huyết thanh ở chuột cống SD sau khi dùng một liều PEG-Relaxin duy nhất.

Nhóm	Mẫu thử nghiệm	Liều dùng (mg/kg)	Đường dùng	Giới tính	Thời gian (giờ)	Nồng độ trung bình	SD (ng/mL)	N

						(ng/mL)		
1	20KPEG-AQ1	0,5	tiêm dưới da	Đực	PD	BQL	NE	5
1	20KPEG-AQ1	0,5	tiêm dưới da	Đực	1	30,8	19,4	5
1	20KPEG-AQ1	0,5	tiêm dưới da	Đực	2	87,4	25,2	5
1	20KPEG-AQ1	0,5	tiêm dưới da	Đực	4	184,8	50,2	5
1	20KPEG-AQ1	0,5	tiêm dưới da	Đực	8	237,6	61,9	5
1	20KPEG-AQ1	0,5	tiêm dưới da	Đực	12	371,2	106,1	5
1	20KPEG-AQ1	0,5	tiêm dưới da	Đực	25	394,0	50,1	5
1	20KPEG-AQ1	0,5	tiêm dưới da	Đực	34	278,7	59,1	5
1	20KPEG-AQ1	0,5	tiêm dưới da	Đực	50	63,4	11,9	5
1	20KPEG-AQ1	0,5	tiêm dưới da	Đực	58	45,6	6,8	5
1	20KPEG-AQ1	0,5	tiêm dưới da	Đực	73	20,3	5,6	5
1	20KPEG-AQ1	0,5	tiêm dưới da	Đực	80	11,6	1,3	5
2	20KPEG-AA5	0,5	tiêm dưới da	Đực	PD	BQL	NE	5
2	20KPEG-AA5	0,5	tiêm dưới da	Đực	1	19,9	6,4	5
2	20KPEG-AA5	0,5	tiêm dưới da	Đực	2	100,1	51,8	5
2	20KPEG-AA5	0,5	tiêm dưới da	Đực	4	185,0	104,8	5
2	20KPEG-AA5	0,5	tiêm dưới da	Đực	S	264,7	128,0	5
2	20KPEG-AA5	0,5	tiêm dưới da	Đực	12	434,3	135,0	5
2	20KPEG-AA5	0,5	tiêm dưới da	Đực	25	438,0	55,2	5
2	20KPEG-AA5	0,5	tiêm dưới da	Đực	34	353,5	44,2	5
2	20KPEG-AA5	0,5	tiêm dưới da	Đực	50	86,9	19,1	5
2	20KPEG-AA5	0,5	tiêm dưới da	Đực	58	62,4	10,6	5
2	20KPEG-AA5	0,5	tiêm dưới da	Đực	73	32,8	8,1	5
2	20KPEG-AA5	0,5	tiêm dưới da	Đực	80	22,1	5,4	5
3	20KPE6-AR18	0,5	tiêm dưới da	Đực	PD	BQL	NE	5
3	20KPEG-AR18	0,5	tiêm dưới da	Đực	1	33,9	17,3	5
3	20KPEG-AR18	0,5	tiêm dưới da	Đực	2	109,7	32,9	5
3	20KPEG-AR18	0,5	tiêm dưới da	Đực	4	172,7	48,2	5
3	20KPEG-AR18	0,5	tiêm dưới da	Đực	8	270,5	55,3	5
3	20KPEG-AR18	0,5	tiêm dưới da	Đực	12	332,5	57,7	5
3	20KPEG-AR18	0,5	tiêm dưới da	Đực	25	398,6	37,6	5
3	20KPEG-AR18	0,5	tiêm dưới da	Đực	34	264,3	33,8	5
3	20KPEG-AR18	0,5	tiêm dưới da	Đực	50	76,7	6,9	5
3	20KPEG-AR18	0,5	tiêm dưới da	Đực	58	61,8	9,0	5
3	20KPEG-AR18	0,5	tiêm dưới da	Đực	73	25,0	4,8	5
3	20KPEG-AR18	0,5	tiêm dưới da	Đực	80	14,9	37	5
4	20KPEG-BV7	0,5	tiêm dưới da	Đực	PD	BQL	NE	5
4	20KPEG-8V7	0,5	tiêm dưới da	Đực	1	25,7	4,6	5
4	20KPEG-BV7	0,5	tiêm dưới da	Đực	2	98,9	20,1	5
4	20KPEG-BV7	0,5	tiêm dưới da	Đực	4	248,5	75,5	5
4	20KPEG BV7	0,5	tiêm dưới da	Đực	8	343,5	81,8	5
4	20KPEG-BV7	0,5	tiêm dưới da	Đực	12	457,3	91,0	5
4	20KPEG-BV7	0,5	tiêm dưới da	Đực	25	518,5	57,7	5
4	20KPEG-BV7	0,5	tiêm dưới da	Đực	34	270,4	64,5	5
4	20KPEG-BV7	0,5	tiêm dưới da	Đực	50	104,0	14,8	5
4	20KPEG-BV7	0,5	tiêm dưới da	Đực	58	63,5	8,1	5
4	20KPEG-8V7	0,5	tiêm dưới da	Đực	73	26,0	3,1	5
4	20KPEG-BV7	0,5	tiêm dưới da	Đực	80	22,6	2,6	5
5	20KPEG-BW28	0,5	tiêm dưới da	Đực	PD	BQL	NE	5
5	20KPEG-BW28	0,5	tiêm dưới da	Đực	1	36,4	15,4	5
5	20KPEG-BW28	0,5	tiêm dưới da	Đực	2	107,9	61,5	5
5	20KPEG-BW28	0,5	tiêm dưới da	Đực	4	228,5	86,0	5
5	20KPEG-BW28	0,5	tiêm dưới da	Đực	8	380,9	144,0	5

5	20KPEG-BW28	0,5	tiêm dưới da	Đực	12	486,6	135,4	5
5	20KPEG-BW28	0,5	tiêm dưới da	Đực	25	511,0	60,3	5
5	20KPEG-BW28	0,5	tiêm dưới da	Đực	34	404,8	51,2	5
5	20KPEG-BW28	0,5	tiêm dưới da	Đực	50	184,2	31,3	5
5	20KPEG-BW28	0,5	tiêm dưới da	Đực	58	122,3	37,2	5
5	20KPEG-BW28	0,5	tiêm dưới da	Đực	73	48,8	6,1	5
5	20KPEG-BW28	0,5	tiêm dưới da	Đực	80	37,1	5,1	5
6	20KPEG-AV13	0,5	tiêm dưới da	Đực	PD	BQL	NE	5
6	20KPEG-AV13	0,5	tiêm dưới da	Đực	1	44,9	16,8	5
6	20KPEG-AV13	0,5	tiêm dưới da	Đực	2	138,9	60,1	5
6	20KPEG-AV13	0,5	tiêm dưới da	Đực	4	345,7	117,1	5
6	20KPEG-AV13	0,5	tiêm dưới da	Đực	8	533,6	157,4	5
6	20KPEG-AV13	0,5	tiêm dưới da	Đực	12	630,1	201,2	5
6	20KPEG-AV13	0,5	tiêm dưới da	Đực	25	742,5	117,4	5
6	20KPEG-AV13	0,5	tiêm dưới da	Đực	34	540,7	31,0	5
6	20KPEG-AV13	0,5	tiêm dưới da	Đực	50	320,9	21,3	5
6	20KPEG-AV13	0,5	tiêm dưới da	Đực	58	209,4	22,5	5
6	20KPEG-AV13	0,5	tiêm dưới da	Đực	73	75,0	4,8	5
6	20KPEG-AV13	0,5	tiêm dưới da	Đực	80	58,7	7,7	5

NE: không đánh giá: BQL: thấp hơn giới hạn định lượng; PD: trước khi sử dụng hoạt chất

Bảng 7

	AQ1-RLX	**AA5-RLX**	**AR18-RLX**	**BV7-RLX**	**BW28-RLX**	**AV13-RLX**
Thời gian bán thải (HL) cuối (giờ)	10,7	12,2	12,5	13,1	13,9	14,6
C_{max} (ng/mL)	394,0	438,0	345,9	471,6	511,0	742,5
T_{max} (giờ)	25,0	25,0	25,0	12,0	25,0	25,0
AUC_{inf} (ng*giờ/mL)	14237,9	16095,9	12985,5	17260,9	22191,2	32230,5
Vz (mL/kg)	540,7	547,4	694,7	546,9	452,6	325,4
CL (mL/giờ)	35,1	31,1	38,4	28,9	22,5	15,5
MRT (giờ)	26,7	29,4	27,7	27,9	31,1	32,7

Đường cong nồng độ theo thời gian được đánh giá bằng cách phân tích không phân ngăn (Pharsight, phiên bản 4.1). N=5 chuột cống mỗi nhóm, HL cuối cùng: thời gian bán thải cuối cùng; C_{max}: nồng độ cực đại đo được trong huyết thanh; T_{max}: thời gian mà tại đó đạt được C_{max}; AUC_{inf}: diện tích dưới đường cong nồng độ theo thời gian đối với tất cả các mẫu huyết thanh/ thời điểm được ngoại suy đến vô cực; CL: tổng độ thanh thải huyết thanh biểu kiến; Vz: thể tích phân bố biểu kiến trong pha cuối.

Dung dịch dạng liều được xác định bằng các phương pháp ECLIA được sử dụng để đo nồng độ trong huyết thanh. Dung dịch dạng phân liều được pha loãng sao cho nằm trong khoảng thử nghiệm. Tất cả các dung dịch dạng liều 20KPEG-RLX đều có sự khác

biệt 30 phần trăm theo danh nghĩa so với lý thuyết (PDT). Bảng 8 sau tóm tắt kết quả phân tích dung dịch dạng liều cho nghiên cứu này.

Bảng 8

Trước khi dùng trong dung dịch đệm (DSA1)	Nồng độ chuẩn (ng/mL)	Hệ số pha loãng	Nồng độ (ng/mL)	%PDT
RLX A-AQ1-20K PEG	500000	20000	495012	-1
RLX-A-AA5-20K PEG	500000	20000	474478	-5
RLX-A-AR18-20K PEG	500000	20000	432033	-14
RLX-A-BV7-20K PEG	500000	20000	377302	-25
RLX-A-BV7-20K PEG	500000	20000	475452	-5
RLX-A-AV13-20K PEG	500000	20000	571645	14

Ví dụ 41

Ví dụ này đánh giá các đặc tính dược động học của hợp chất Relaxin thể dại (WT) sau khi tiêm liều duy nhất dưới da ở chuột cống SD.

Chuột cống SD nhận được từ Charles River Laboratories (CRL) ở khoảng 5 tuần tuổi (khoảng 280g ở thời điểm bắt đầu nghiên cứu). Các chuột này nhận được được thông tĩnh mạch cổ tai CRL. Sau đó, chuột này được làm thích nghi trong thời gian 3 ngày trước khi đưa vào nghiên cứu.

Các chuột nhận một liều tiêm duy nhất dưới da vào ngày thứ 1 và các mẫu PK được thu gom sau 12 giờ tiếp theo. Các mẫu máu được lấy ra từ chuột được xử lý bằng rhRelaxin WT để phân tích nồng độ trong huyết thanh theo lịch trình lấy mẫu sau (thời gian lấy mẫu là gần đúng): ngày 1: trước khi sử dụng hoạt chất, 0,33 giờ, 0,66 giờ, 1 giờ, 1,5 giờ, 2 giờ, 3 giờ, 4 giờ, 5 giờ, 6 giờ, 9 giờ và 12 giờ sau khi sử dụng hoạt chất.

Nồng độ hợp chất được đo bằng cách sử dụng cầu nối ECLA dựa trên thử nghiệm được phát triển tại Ambrx. Nồng độ được tính bằng cách sử dụng đường cong chuẩn được tạo ra từ hợp chất phân liều tương ứng và đưa ra theo định dạng bảng tính excel (xem phụ lục). Các thông số dược động học được tính bằng cách sử dụng chương trình mẫu WinNonlin (Pharsight, phiên bản 5.1). Phân tích không phân ngăn đối với dữ liệu của mỗi chuột với tổ hợp hình thang tuyến tính-đi lên/log-đi xuống được sử dụng, và dữ liệu nồng độ được hoạch định đồng nhất.

Bảng 9 thể hiện trị số nồng độ rhRelaxin loại thông thường trong huyết thanh trung bình nhóm theo thời gian. Fig.1 so sánh nồng độ rhRelaxin loại thông thường trung bình nhóm trong huyết thanh theo thời gian. Tất cả động vật đều có mức Relaxin trong huyết thanh có thể đo được.

Nồng độ trong huyết thanh theo thời gian của mỗi chuột được sử dụng liều dưới da 0,5mg/kg wt Relaxin được lập đồ thị trên Fig.2. Phân tích phi mô hình dữ liệu nồng độ huyết thanh theo thời gian của các chuột được sử dụng liều dưới da được tổng kết trong Bảng 2. Bảng 9 là tổng kết về phân tích dung dịch dạng liều. Các dung dịch dạng phân liều đạt tiêu chí chấp nhận được nhỏ hơn hoặc bằng 30% PDT.

Bảng 9

Nhóm	Mẫu thử nghiệm	Liều dùng (mg/kg)	Đường dùng	Giới tính	Thời gian (giờ)	Nồng độ trung bình (ng/mL)	SD (ng/mL)	N
1	rhRelaxin thể dại	0,5	tiêm dưới da	Đực	PD	BQL	NE	5
1	rhRelaxin thể dại	0,5	tiêm dưới da	Đực	0,33	244,0	18,7	5
1	rhRelaxin thể dại	0,5	tiêm dưới da	Đực	0,66	227,9	45,6	5
1	rhRelaxin thể dại	0,5	tiêm dưới da	Đực	1	211,7	45,9	5
1	rhRelaxin thể dại	0,5	tiêm dưới da	Đực	1,5	166,7	38,7	5
1	rhRelaxin thể dại	0,5	tiêm dưới da	Đực	2	119,9	24,5	5
1	rhRelaxin thể dại	0,5	tiêm dưới da	Đực	3	52,5	23,0	5
1	rhRelaxin thể dại	0,5	tiêm dưới da	Đực	4	24,1	11,4	5
1	rhRelaxin thể dại	0,5	tiêm dưới da	Đực	5	7,7	2,6	5
1	rhRelaxin thể dại	0,5	tiêm dưới da	Đực	6	BQL	NE	5
1	rhRelaxin thể dại	0,5	tiêm dưới da	Đực	9	BQL	NE	5
1	rhRelaxin thể dại	0,5	tiêm dưới da	Đực	12	SQL	NE	5
NE: không đươc đánh giá; BQL: thấp hơn giới hạn định lượng; PD: trước khi sử dụng hoạt chất								

Bảng 10

Trị số thông số dược động học đối với rhRelaxin loại thông thường được phân liều ở chuột cống SD.

	rh Relaxin thể dại
Thời gian bán thải (HL) cuối (giờ)	0,8 (0,1)
C_{max} (ng/mL)	258,1(26,1)
T_{max}(giờ)	0,5 (0,2)
AUC_{inf}(ng*giờ/mL)	508,9 (81,8)
Vz (mL/kg)	1159 (284)
CL (mL/giờ)	1006(185)
MRT (giờ)	1,56 (0,16)

Đường cong nồng độ theo thời gian được đánh giá bằng phương pháp phân tích

không phân ngăn (Pharsight, phiên bản 4.1). N=5 chuột cống mỗi nhóm, HL cuối cùng: thời gian bán thải cuối cùng; Cmax, nồng độ tối đa trong huyết thanh đo được; Tmax, thời gian mà tại đó xảy ra Cmax; AUC_{inf}: diện tích dưới đường cong nồng độ theo thời gian đối với tất cả các mẫu huyết thanh / thời điểm được ngoại suy đến vô cực; Cl: tổng độ thanh thải huyết thanh biểu kiến; Vz: thể tích phân bố biểu kiến trong pha cuối cùng. Các số là trị số trung bình với độ lệch chuẩn SD trong ngoặc đơn.

Bảng 11

Dung dịch dạng liều được xác định bằng các phương pháp ECLA dùng để đo nồng độ trong huyết thanh. Dung dịch dạng phân liều được pha loãng sao cho nằm trong khoảng thử nghiệm. Tất cả dung dịch dạng phân liều rhRelaxin loại thông thường đều có sự khác biệt 30 phần trăm theo danh nghĩa so với lý thuyết (PDT). Bảng 3 dưới đây tóm tắt kết quả phân tích dung dịch dạng liều cho thử nghiệm này.

Bảng 11: Phân tích dung dịch dạng liều của mẫu thử nghiệm

Phân tích dung dịch dạng liều	Nồng độ chuẩn (ng/mL)	Hệ số pha loãng	Nồng độ (ng/mL)	%PDT
Trước khi dùng liều 0,5mg/mL trong dung dịch đệm bào chế (DSA1)	250000	10000	208830	**-16**
Trước khi dùng liều 0,5mg/mL trong huyết thanh (DSA2)	250000	10000	225898	**-10**

Ví dụ 42

Ví dụ này đánh giá các đặc tính dược động học của hợp chất Relaxin được PEGyl hóa có kích thước 20kDa sau khi tiêm liều duy nhất dưới da hoặc trong tĩnh mạch ở chuột cống SD.

Chuột cống SD nhận được từ Charles River Laboratories (CRL) khoảng 7 đến 8 tuần tuổi (khoảng 280g ở thời điểm bắt đầu nghiên cứu). Các chuột nhận được được thông tĩnh mạch cổ tại CRL. Sau đó, chuột được làm thích nghi với môi trường trong thời gian 3 ngày trước khi đưa vào nghiên cứu. Các chuột này được tiêm liều duy nhất dưới da vào ngày thứ 1 và các mẫu PK được thu gom sau 82 giờ tiếp theo. Các mẫu máu được lấy ra từ chuột được xử lý bằng PEG-Relaxin để phân tích nồng độ trong huyết thanh theo lịch trình lấy mẫu sau đây (thời điểm lấy mẫu là tương đối): ngày 1: trước khi sử dụng

hoạt chất, 1 giờ, 3 giờ, 5 giờ, 10 giờ, 25 giờ, 34 giờ, 48 giờ, 58 giờ, 72 giờ và 82 giờ sau khi sử dụng hoạt chất.

Nồng độ hợp chất được đo bằng cách sử dụng cầu nối ECLA dựa trên thử nghiệm được phát triển tại Ambrx. Nồng độ được tính bằng cách sử dụng đường cong chuẩn được tạo ra từ hợp chất được phân liều tương ứng và đươc báo cáo theo định dạng bảng tính excel (xem phụ lục). Các thông số dược động học được tính bằng cách sử dụng chương trình tạo mẫu WinNonlin (Pharsight, phiên bản 5.1). Phân tích không phân ngăn đối với mỗi dữ liệu động vật với tổ hợp hình thang tuyến tính-lên/loga-xuống được sử dụng, và nồng độ dữ liệu được hoạch định đồng nhất. Phân tích phân ngăn được thực hiện bằng cách sử dụng mô hình hai ngăn giới hạn trình tự thứ nhất và phương trình điều chỉnh mô hình Gauss-Newton (Levenberg-Hartley).

Bảng 12 thể hiện trị số nồng độ trung bình nhóm của PEG-Relaxin trong huyết thanh theo thời gian.

Bảng 12

Nhóm	Mẫu thử nghiệm	Liều dùng (mg/kg)	Đường dùng	Giới tính	Thời gian (giờ)	Nồng độ trung bình (ng/mL)	SD (ng/mL)	N
1	20KPEG-AQ1	0,25	IV	Đực	PD	BQL	NE	4
1	20KPEG-AQ1	0,25	IV	Đực	1	2912,8	203,7	4
1	20KPEG-AQ1	0,25	IV	Đực	3	1310,8	115,2	4
1	20KPEG-AQ1	0,25	IV	Đực	5	700,7	68,3	4
1	20KPEG-AQ1	0,25	IV	Đực	10	241,6	27,2	4
1	20KPEG-AQ1	0,25	IV	Đực	25	61,2	5,4	4
1	20KPEG-AQ1	0,25	IV	Đực	34	27,0	2,6	4
1	20KPEG-AQ1	0,25	IV	Đực	48	13,7	2,2	4
1	20KPEG-AQ1	0,25	IV	Đực	58	8,0	2,2	4
1	20KPEG-AQ1	0,25	IV	Đực	72	4,3	1,4	4
1	20KPEG-AQ1	0,25	IV	Đực	82	2,2	0,6	4
2	20KPEG-AQ1	0,5	tiêm dưới da	Đực	PD	BQL	NE	5
2	20KPEG-AQ1	0,5	tiêm dưới da	Đực	1	16,3	4,4	5
2	20KPEG-AQ1	0,5	tiêm dưới da	Đực	3	75,8	20,2	5
2	20KPEG-AQ1	0,5	tiêm dưới da	Đực	5	96,3	26,7	5
2	20KPEG-AQ1	0,5	tiêm dưới da	Đực	10	135,1	30,1	5
2	20KPEG-AQ1	0,5	tiêm dưới da	Đực	25	257,4	48,5	5
2	20KPEG-AQ1	0,5	tiêm dưới da	Đực	34	184,9	26,8	5
2	20KPEG-AQ1	0,5	tiêm dưới da	Đực	48	159,9	31,7	5
2	20KPEG-AQ1	0,5	tiêm dưới da	Đực	58	86,5	24,6	5
2	20KPEG-AQ1	0,5	tiêm dưới da	Đực	72	20,3	1,4	5
2	20KPEG-AQ1	0,5	tiêm dưới da	Đực	82	11,8	1,1	5
3	20KPEG-AQ1	0,25	tiêm dưới da	Đực	PD	BQL	NE	3

3	20KPEG-AQ1	0,25	tiêm dưới da	Đực	1	12,8	1,3	3
3	20KPEG-AQ1	0,25	tiêm dưới da	Đực	3	45,3	6,9	3
3	20KPEG-AQ1	0,25	tiêm dưới da	Đực	5	62,2	8,6	3
3	20KPEG-AQ1	0,25	tiêm dưới da	Đực	10	90,1	10,9	3
3	20KPEG-AQ1	0,25	tiêm dưới da	Đực	25	127,4	20,2	3
3	20KPEG-AQ1	0,25	tiêm dưới da	Đực	34	83,2	13,8	3
3	20KPEG-AQ1	0,25	tiêm dưới da	Đực	48	32,6	2,6	3
3	20KPEG-AQ1	0,25	tiêm dưới da	Đực	58	16,3	0,3	3
3	20KPEG-AQ1	0,25	tiêm dưới da	Đực	72	4,9	0,9	3
3	20KPEG-AQ1	0,25	tiêm dưới da	Đực	82	2,7	0,4	3
4	20KPEG-AQ1	0,125	tiêm dưới da	Đực	PD	BQL	NE	5
4	20KPEG-AQ1	0,125	tiêm dưới da	Đực	1	5,7	1,5	5
4	20KPEG-AQ1	0,125	tiêm dưới da	Đực	3	26,4	6,2	5
4	20KPEG-AQ1	0,125	tiêm dưới da	Đực	5	37,2	8,6	5
4	20KPEG-AQ1	0,125	tiêm dưới da	Đực	10	50,1	6,1	5
4	20KPEG-AQ1	0,125	tiêm dưới da	Đực	25	75,9	8,8	5
4	20KPEG-AQ1	0,125	tiêm dưới da	Đực	34	46,9	6,7	5
4	20KPEG-AQ1	0,125	tiêm dưới da	Đực	48	20,8	8,2	5
4	20KPEG-AQ1	0,125	tiêm dưới da	Đực	58	8,4	2,4	5
4	20KPEG-AQ1	0,125	tiêm dưới da	Đực	72	2,3	0,8	5
4	20KPEG-AQ1	0,125	tiêm dưới da	Đực	82	1,3	0,4	5
NE: không đánh giá; BQL: thấp hơn giới hạn định lượng; PD: trước khi sử dụng hoạt chất								

Ví dụ 43

Ví dụ này đánh giá liều lượng có hoạt tính dược lý và sự tiếp xúc toàn thân của relaxin thể dại và biến thể PEG-relaxin ở chuột cống Long-Evans cái.

Mục tiêu của các nghiên cứu tạo tín hiệu này là nhằm chứng minh hoạt tính *in vivo* và xác định liều có hoạt tính dược lý của biến thể PEG-relaxin. Để thực hiện được những mục tiêu này, điểm cuối có liên quan về mặt sinh lý đáp lại relaxin được đánh giá ở chuột cống Long-Evans cái bao gồm lượng nước lấy vào, lượng nước tiểu thải ra, và hóa học lâm sàng nước tiểu và máu. Để cho phép xác định điểm cuối của các mẫu thử nghiệm, relaxin thể dại được thử nghiệm trước tiên (Pha 1), ở các liều lượng đã được tính để đạt được nồng độ trong huyết tương là 0,3X, 1X và 10X nồng độ ức chế đích *in vitro*. Liều dùng đích được phân phối bằng cách cho dùng liều lớn trong tĩnh mạch (IV), tiếp theo truyền liên tục trong 6 giờ. Liều dùng 0,3X, IX, và 10X của relaxin thể dại lần lượt làm tăng 95%, 68%, và 32% lượng hợp chất trong nước hấp thụ cơ thể so với chất dẫn. Các thay đổi về nồng độ trung bình natri trong huyết tương so với trị số nền ở 2 giờ và 6 giờ là -9,5 và 1,2mEq/l đối với chất dẫn (0X); -5,8 và -9,0mEq/l ở 0,3X; 1,0 và -1,5mEq/l ở 1X; -4,7 và -1,4mEq/l ở 10X. Sự thay đổi về nồng độ osmol/L dung dịch huyết tương so với trị số nền ở 2 giờ và 6 giờ là -20,7 và 1,0mosmol/kg nước đối với chất dẫn (0X); -11,0 và

-19,1mosmol/kg nước ở 0,3X; 0,3 và -4,4mosmol/kg nước đối với 1X; -10,3 và -3,8mosmol/kg nước đối với 10X.

PEG-relaxin (Pha 2) được sử dụng ở thể tích lớn là 1µL cho một gam thể trọng, máu được thu gom 2 giờ và 6 giờ sau khi sử dụng hoạt chất và nước tiểu được thu gom trong khoảng thời gian 6 giờ sau khi sử dụng hoạt chất. Phương pháp điều trị bệnh bằng PEG-relaxin ở các liều lượng 0,1X, 0,3X và 1X lần lượt tạo ra mức tăng 93%, 128% và 105% lượng hợp chất trong nước hấp thụ cơ thể so với nhóm dùng chất dẫn. Các thay đổi về nồng độ trung bình của natri trong huyết tương so với trị số nền ở 2 giờ và 6 giờ là 2,5 và 1,5mEq/l đối với chất dẫn (0X); -1,5 và -4,8mEq/l ở 0,1X; -4,0 và -2,9mEq/l ở 0,3X; -2,3 và -4,0mEq/l ở 1X. Sự thay đổi về nồng độ osmol/L dung dịch huyết tương so với trị số nền ở 2 giờ và 6 giờ là 4,5 và 2,1mosmol/kg nước đối với chất dẫn (0X); -5,1 và -11,0mosmol/kg nước ở 0,1X; -8,2 và -5,0mosmol/kg nước ở 0,3X; -5,6 và -9,5mosmol/kg nước ở 1X. Không có bất cứ sự thay đổi rõ rệt nào về các giá trị hóa học lâm sàng nước tiểu sau khi điều trị bệnh bằng relaxin thể dại hoặc PEG-relaxin. Các dữ liệu này chứng minh hoạt tính *in vivo* và cho phép lựa chọn liều hợp lý dùng cho các nghiên cứu mô hình bệnh *in vivo* tiếp theo với PEG-relaxin.

Bảng 13: Sắp xếp nhóm động vật

Nhóm	**Mẫu thử nghiệm**	**Số nhận dạng chuột**	**Nồng độ trong huyết tương (số lần tăng so với nồng độ đích)**	**Nồng độ liều lớn qua tĩnh mạch(mg/mL)**	**Nồng độ truyền qua tĩnh mạch (mg/mL)[c]**	**Số lượng chuột trong mỗi nhóm**
Liều Relaxin thể dại pha 1[a]						
1	Relaxin thể dại	1F001-1F004	1X	0,003	0,08	4
2	Relaxin thể dại	2F001-2F004	10X	0,03	0,8	4
3[b]	Relaxin thể dại	3F001-3F004	chất dẫn	chất dẫn	chất dẫn	4
4[b]	Relaxin thể dại	4F001-4F004	0,3X	0,001	0,026	4

[a] Các nhóm 1 và 2 (1x và 10x) được đánh giá trước tiên, và do các ảnh hưởng rõ rệt của mẫu thử nghiệm đối với lượng nước uống vào, hematocrit (tỷ lệ thể tích huyết cầu), và lượng nước tiểu thải ra, liều dùng đối với nhóm chuột cống thứ hai đã được sửa đổi ở chất dẫn và 0,3X lần lượt thành nhóm 3 và 4. Có khoảng thời gian rửa trôi ít nhất

bằng 36 giờ giữa các nhóm 1 và 2. Khoảng thời gian rửa trôi ít nhất bằng 36 giờ cũng xảy ra giữa các nhóm 3 và 4.

[b] Chuột cống ở Nhóm 1 phải chịu sự ngẫu nhiên thứ hai và giao cho Nhóm 2 sau khoảng thời gian rửa trôi. Chuột cống ở Nhóm 3 phải chịu sự ngẫu nhiên thứ hai và giao cho Nhóm 4. Số lượng chuột, 001-004 vẫn giống nhau trong nhóm 2 và 4 cũng như chúng ở trong nhóm 1 và 3; tuy nhiên, thứ bậc số nhóm, Nhóm 2 và Nhóm 4, được sử dụng để cho phép gắn nhãn ống và làm rõ hơn về việc nhận dạng mẫu.

[c] Relaxin thể dại được tiêm qua đường tĩnh mạch với thể tích lớn là 100µL sau đó truyền ở tốc độ là 50µL/giờ.

Bảng 14:

Nhóm	**Mẫu thử nghiệm**	**Số nhận dạng chuột**	**Nồng độ trong huyết tương (số lần tăng so với nồng độ đích)**	**Nồng độ liều cao qua tĩnh mạch (mg/mL)[a]**	**Số lượng chuột trong mỗi nhóm**
		Liều PEG-Relaxin Pha 2			
5	PEG-Relaxin	5F001-5F004	Chất dẫn	IMA	4
6	PEG-Relaxin	6F001-6F004	0,3X	0,03	4
7	PEG-Relaxin	7F001-7F004	0,1X	0,01	4
8	PEG-Relaxin	8F001-8F004	1,0X	0,1	4
[a] Liều cao được sử dụng ở thể tích là 1µL/g thể trọng.					

Relaxin thể dại Pha 1

Chuột cống Long-Evans cái 12 đến 14 tuần tuổi với các ống thông tĩnh mạch cổ hai bên được đặt nhờ phẫu thuật bởi nhà cung cấp thu được từ Charles River Laboratories. Hai tập hợp gồm bốn chuột cống được sử dụng. Mỗi tập hợp được sử dụng để đánh giá hai liều dùng của relaxin thể dại. Có khoảng thời gian rửa trôi là 36 giờ hoặc dài hơn giữa các nhóm 1 và 2 và các nhóm 3 và 4 do chuột để tạo ra các nhóm 1 và 3 lần lượt được tái sử dụng thành nhóm 2 và 4. Chuột cống được cho ăn và uống nước tùy ý và nhốt trong lồng trao đổi chất Culex ABS (Culex Automated Blood Sampler, Bioanalytical System Inc) vào đêm trước khi bắt đầu sử dụng thuốc và trong 6 giờ sau khi tiêm qua tĩnh mạch với liều lớn và bắt đầu truyền thuốc.

Sử dụng liều Relaxin thể dại ở Pha 1

Ở pha 1, mỗi nhóm chuột cống được sử dụng liều lớn qua tĩnh mạch một lần và truyền qua tĩnh mạch tổng 6 giờ. Tiêm liều lớn qua đường tĩnh mạch qua ống thông tĩnh mạch cảnh được cấy dưới da nhờ phẫu thuật, tiếp theo là truyền qua đường tĩnh mạch qua ống thông tĩnh mạch cảnh được cấy dưới da nhờ phẫu thuật. Thời gian rửa trôi ít nhất bằng 36 giờ giữa các nhóm 1 và 2 trong hỗn hợp thứ nhất của chuột cống và các nhóm 3 và 4 trong hỗn hợp thứ hai của chuột cống.

PEG-Relaxin Pha 2

Chuột cống Long-Evans cái 12 đến 14 tuần tuổi với ống thông tĩnh mạch cảnh hai bên được đặt nhờ phẫu thuật bởi nhà cung cấp thu được từ Charles River Laboratories. Bốn tập hợp gồm bốn chuột cống được sử dụng, mỗi tập hợp được sử dụng để đánh giá một liều PEG-Relaxin. Chuột cống nhận PEG-Relaxin không được tái sử dụng sau khoảng thời gian rửa trôi do sự tiếp xúc của các hợp chất PEGyl hóa trong huyết tương trong khoảng thời gian kéo dài. Chuột cống được cho ăn và uống nước tùy ý và nhốt trong các lồng trao đổi chất Culex ABS.

Sử dụng liều PEG-Relaxin Pha 2

Ở Pha 2, chuột cống được tiêm một lần qua đường tĩnh mạch nhờ ống thông tĩnh mạch cảnh được cấy dưới da nhờ phẫu thuật.

Tất cả các dung dịch dạng liều cao và dung dịch dạng liều tiêm qua đường tĩnh mạch được bào chế theo hướng dẫn làm tan giá và trộn đối với tất cả các dung dịch dạng liều:

Chai mẫu đã được làm đông lạnh của mỗi chế phẩm liều được để tan giá ở 4°C trong 3 đến 4 giờ, có kiểm tra quy trình tan giá mỗi giờ. Khi quá trình tan giá hoàn tất, chế phẩm được trộn kèm theo đảo nhẹ để không tạo ra bọt. Trộn nhẹ nhàng và kỹ mỗi dược phẩm ngay trước khi dùng qua đường tĩnh mạch. Mỗi dược phẩm liều được giữ ở 4°C cho đến khi được sử dụng để phân liều.

Các liều được bào chế ngay trước khi chuẩn bị và mỗi nhóm được cho nhận các nồng độ liều như sau:

Pha 1 (các nhóm 1 đến 4)

Nhóm 1: (IX) Liều cao IV 0,003mg/mL; Truyền IV 0,08mg/mL

Nhóm 2: (10X) Liều cao IV 0,03mg/mL; Truyền IV 0,8mg/mL

Nhóm 3: (chất dẫn) Liều cao và truyền

Nhóm 4: (0,3X) Liều cao IV 0,001mg/mL; Truyền IV 0,026mg/mL

Pha 2 (các nhóm 5 đến 8)

Nhóm 5: Chất dẫn Liều cao IV NA

Nhóm 6: (0,3X) Liều cao IV 0,03mg/mL

Nhóm 7: (0,1X) Liều cao IV 0,01mg/mL

Nhóm 8: (1,0X) Liều cao IV 0,1mg/mL

Các chuột được sử dụng trong thử nghiệm này được chọn lọc dựa trên các kết quả chấp nhận được của số đo thể trọng, độ mở ống thông tĩnh mạch cảnh, và chức năng. Các chuột được xác định là có các ống thông không thích hợp để sử dụng hoạt chất hoặc thu nhận máu trước khi bắt đầu nghiên cứu hoặc trong suốt khoảng thời gian thu nhận máu sau khi bắt đầu sử dụng hoạt chất được loại bỏ ra khỏi nghiên cứu và thay thế bằng chuột cống với các ống thông thích hợp. Việc thay thế chuột cống đã được đặt ống thông và việc phân liều hợp chất xảy ra ở thời điểm sớm nhất có thể so với chế độ liều, tính sẵn có của chuột, và việc nhận chuột từ nhà cung cấp.

Pha 1: Các chuột được chia ngẫu nhiên theo thể trọng trước nghiên cứu và phân vào Nhóm 1. Sau khi hoàn tất việc phân liều, chuột cống ở Nhóm 1 được chịu sự phân chia ngẫu nhiên thứ hai sau khoảng thời gian rửa trôi và phân lại vào Nhóm 2. Sau khi hoàn tất việc phân liều, chuột cống ở Nhóm 3 được chịu sự phân chia ngẫu nhiên thứ hai sau khoảng thời gian rửa trôi và phân lại vào Nhóm 4.

Pha 2: Các chuột được chia ngẫu nhiên theo thể trọng trước nghiên cứu và phân vào các nhóm từ 5 đến 8.

Hằng ngày, ở khoảng 30 phút và 1 giờ, 2 giờ, 4 giờ, và 6 giờ sau khi khởi đầu phân liều. Thực hiện kiểm tra bằng mắt thường các thay đổi về thể chất và tập tính và chuột được kiểm tra theo các thay đổi về tư thế cơ thể, lông, khả năng hoạt động, chất bài tiết, v.v.. Thể trọng hằng ngày được xác định và ghi lại trước khi sử dụng hoạt chất.

Lấy mẫu máu và nước tiểu, thu gom, bảo quản, và phân tích

Quy trình nghiên cứu Pha 1

Việc thu gom nước tiểu đường nền bắt đầu vào tối trước khi sử dụng hoạt chất, tiếp tục trong khoảng thời gian 15 giờ đến 18 giờ, và nước tiểu được thu gom vào ống đã được làm lạnh (trên nước đá ướt). Các mẫu máu đường nền (~400µL máu nguyên chất) được thu gom ở cuối quá trình thu gom nước tiểu đường nền. Vào ngày thử nghiệm, chuột cống được tiêm liều lớn qua đường tĩnh chuỗi Bằng hợp chất thử nghiệm, tiếp theo là truyền liên tục relaxin thể dại ở tốc độ truyền không đổi được phân phối bởi bơm tiêm (Harvard 11 plus) trong 6 giờ qua ống thông tĩnh mạch cảnh trái ở thể tích 50µL/giờ. Hai mẫu máu nữa (~400µL máu nguyên chất mỗi mẫu) được thu gom ở 2 và 6 giờ sau khi truyền relaxin. Tất cả các mẫu máu được thu gom qua ống thông tĩnh mạch cảnh phải vào các ống nghiệm lấy mẫu chứa chất chống đông máu K3EDTA bằng cách sử dụng phương pháp lấy mẫu theo lập trình Culex ABS và các mẫu được bảo quản trong môi trường đã được làm lạnh cho đến khi xử lý mẫu. Nước tiểu được thu gom liên tục vào ống ngihệm đã được làm lạnh trong suốt thời gian truyền relaxin. Tổng thể tích nước tiểu từ mỗi lần gom được ghi lại, và 2mL đến 5ml mỗi mẫu nước tiểu được bảo quản trong máy làm lạnh Seventh Wave Labs được đặt để duy trì khoảng -80°, nước được uống vào trong khoảng thời gian truyền trong 6 giờ được ghi lại bằng cách so sánh thể trọng trước và sau khi truyền của chai + nước. Bơm truyền được dừng sau khi truyền liên tục trong 6 giờ, và chuột cống trải qua một khoảng thời gian rửa trôi ít nhất là 36 giờ trước khi chúng được đưa vào thử nghiệm đánh giá liều thứ hai.

Truyền liên tục qua đường tĩnh mạch là cần thiết để duy trì nồng độ đích ổn định của thuốc trong huyết tương.

Quy trình nghiên cứu Pha 2

Việc thu gom nước tiểu đường nền bắt đầu vào tối trước khi sử dụng hoạt chất trong khoảng thời gian 15 giờ đến 18 giờ, và các mẫu được thu gom vào ống đã được làm lạnh Các mẫu máu đường nền (~400µL máu nguyên chất) được thu gom ở cuối quá trình thu gom nước tiểu đường nền. Vào ngày thử nghiệm, chuột cống được sử dụng liều PEG-Relaxin duy nhất qua đường tĩnh mạch ở thể tích không quá 10mL/kg/ngày (một lần dùng). Hai mẫu máu nữa (~400µL máu nguyên chất) được thu gom ở 2 giờ và 6 giờ sau khi dùng relaxin. Tất cả các mẫu máu được thu gom qua ống thông tĩnh mạch cảnh phải vào các ống nghiệm lấy mẫu chứa chất chống đông máu K3EDTA bằng cách sử dụng phương pháp lấy mẫu theo lập trình Culex ABS và bảo quản trong môi trường lạnh cho đến khi xử lý. Các mẫu nước tiểu được thu gom liên tục từ thời điểm 0 đến 6 giờ sau khi dùng PEG-Relaxin vào ống nghiệm đã làm lạnh trong khi lấy mẫu. Tổng thể tích nước tiểu từ mỗi lần thu gom được ghi lại, và 2mL đến 5ml mỗi mẫu nước tiểu được bảo quản trong thiết bị làm lạnh Seventh Wave Labs được đặt để duy trì khoảng -80°C. Chuột cống được cho chết không đau 6 giờ sau khi sử dụng hoạt chất. Lượng nước uống vào trong khoảng thời gian truyền trong 6 giờ được ghi lại bằng cách so sánh trọng lượng của chai + nước ở thời điểm đầu và cuối của giai đoạn truyền thuốc.

Bệnh lý học

Các mẫu nước tiểu được thu gom như đã được bộc lộ trong ví dụ này. Từ 2 đến 5ml mẫu nước tiểu đã làm lạnh được làm đông lạnh trên đá khô và bảo quản trong tủ lạnh được đặt để duy trì khoảng -80°C cho đế khi được chuyển lên nước đá khô đến AVL để phân tích creatinin trong nước tiểu và đến BUN để xác định độ thanh thải creatinin.

Mẫu máu được thu gom bằng cách sử dụng Culex ABS có sử dụng K_3EDTA làm chất chống đông máu. Mười lăm microlit các mẫu máu nguyên chất được nạp vào ống mao quản chưa được xử lý, được bịt kín bằng đất sét ở một đầu, và ly tâm trong máy ly tâm hematocrit (International Equipment Company, IEC MB centrifuge) trong năm phút. Các kết quả hematocrit thu được bằng cách sử dụng thiết bị đọc vi huyết học do nhà sản xuất cung cấp.

Máu được thu gom để xác định tiềm năng tiếp xúc toàn thân của thể dại và PEG-Relaxin theo lịch trình thu gom và các quy trình nêu dưới đây. Có ba khoảng thời gian thu

gom. Thời điểm thu gom là 0 giờ, 2 giờ, và 6 giờ sau khi sử dụng hoạt chất đối với chuột cống Pha 1 và Pha 2. Pha 1: 8 chuột mỗi thời điểm. Pha 2: 16 chuột mỗi thời điểm. Thể tích thu gom là gần 400 microlit máu nguyên chất. Tất cả các chuột ở các nhóm từ 1 đến 8 được lấy máu tại ba thời điểm: đường nền (trước khi sử dụng hoạt chất t=0) và lần lượt 2 giờ và 6 giờ sau khi bắt đầu truyền đối với liều dùng qua đường tĩnh mạch relaxin thể dại và sau khi dùng qua đường tĩnh mạch đối với các nhóm dùng liều PEG-Relaxin. Thời gian khởi đầu truyền qua đường tĩnh mạch và thời gian thực của mỗi lần lấy máu được ghi lại trong dữ liệu thô đối với mỗi chuột. Theo quyết định của Sponsor, máu không được gửi đến Ambrx để xác định sự tiếp xúc toàn thân trong khi tiến hành nghiên cứu. Các mẫu đã được lưu trữ được làm đông lạnh trong thiết bị làm lạnh Seventh Wave Labs được đặt để duy trì khoảng -80°C và sẽ được đưa trở lại cho Sponsor.

Kết quả relaxin thể dại Pha I

Lượng nước trung bình uống vào trong khi truyền trong 6 giờ ở chuột cống được xử lý bằng chất dẫn (OX) là 1,8ml cho 100 gam thể trọng, lần lượt tăng đến 3,6ml, 3,1mL, và 2,4ml trên 100 gam thể trọng ở chuột cống được xử lý bằng 0,3X, IX và 10X relaxin thể dại. Có sự tăng 95%, 68%, 32% lần lượt ở các nhóm cho dùng liều 0,3X, IX và 10X so với nhóm dùng chất dẫn.

Hematocrit trung bình ở mức đường nền, 2 giờ và 6 giờ sau khi bắt đầu sử dụng hoạt chất lần lượt là 35,1%, 35,0%, và 34,3% ở chuột cống được xử lý bằng chất dẫn, lần lượt; 33,1%, 33,7%, và 32,3% ở nhóm dùng 0,3X; 31,4T, 32,0% và 33,7% ở nhóm 1X; 29,7%, 31,9% và 30,4% ở nhóm 10X.

Lượng nước tiểu trung bình thải ra trong 6 giờ truyền lần lượt là 1,8ml, 1,5ml, 1,2mL và 1,2mL trên 100 gam thể trọng đối với các nhóm dùng chất dẫn (0X), 0,3X, 1X và 10X.

Nồng độ natri trung bình trong huyết tương ở mức đường nền, 2 và 6 giờ sau khi bắt đầu sử dụng hoạt chất là 139,3, 129,8, 140,5mEq/l ở nhóm dùng chất dẫn (0X); 141,8, 136,0 và 132,8mEq/l ở nhóm 0,3X; 138,8, 139,8 và 137,3mEq/l ở nhóm 1X; 137,0, 132,3 và 135,6mEq/l ở nhóm 10X. Mức thay đổi so với mức đường nền ở 2 và 6 giờ là -9,5 và 1,2mEq/l đối với nhóm dùng chất dẫn (0X); -5,8 và -9,5mEq/l đối với nhóm 0,3X; 1,0 và

-1,5mEq/l đối với nhóm 1X; -4,7 và -1,4 mEq/l đối với nhóm 10X.

Nồng độ osmol/L dung dịch huyết tương được tính bằng cách sử dụng công thức sau: nồng độ osmol/L dung dịch huyết tương (OSM) = (2* na) + (Glu/18) + (BUN/2,8). Nồng độ osmol/L dung dịch huyết tương trung bình ở mức đường nền, 2 và 6 giờ sau khi khởi đầu là 277,3mosmol/kg nước ở nhóm 0,3X; 291,0, 291,3 và 286,6mosmol/kg nước ở nhóm 1X; 286,4, 276,1 và 282,6mosmol/kg nước ở nhóm 10X. Mức thay đổi so với mức đường nền ở 2 và 6 giờ là -10,7 và 1,0mosmol/kg nước đối với nhóm dùng chất dẫn (0X); =11,0 và =19,1mosmol/kg nước đối với nhóm 0,3X; 0,3 và -4,4mosmol/kg nước đối với nhóm 1X; -10,3 và -3,8mosmol/kg nước đối với nhóm 10X. Dữ liệu hóa học lâm sàng đối với nước tiểu của BUN/Cr, sự bài tiết Na được tổng kết trong các bảng sau:

Bảng 3. Tóm tắt dữ liệu hóa học lâm sàng của nước tiểu của nhóm dùng Relaxin thể dại (nghiên cứu Pha 1)

Nhóm	BUN /Cr	sem	Thải Na (mEq/giờ)	sem	Thải BUN (mg/giờ)	sem	CrCl (mL/phút /100g)	sem
Chất dẫn (giá trị đường nền – tại thời điểm bắt đầu nghiên cứu) Chất dẫn (6 giờ nghiên cứu)	36	12	0,083	0,010	13,5	4,4	0,65	0,04
	26	3	0,079	0,018	9,4	2,3	0,60	0,15
0,3X (giá trị đường nền) 0,3X (6 giờ nghiên cứu)	66	9	0,055	0,005	17,3	3,9	0,38	0,06
	43	6	0,071	0,015	12,1	1,3	0,45	0,07
1X (giá trị đường nền) 1X (6 giờ nghiên cứu)	18	2	0,046	0,010	7,6	1,5	0,62	0,09
	19	4	0,030	0,003	4,6	1,5	0,36	0,05
10X (giá trị đường nền) 10X (6 giờ nghiên cứu)	21	2	0,063	0,001	8,5	1,1	0,69	0,04
	17	4	0,055	0,005 I 4,9		0,7	0,81	0,11

Bảng 4. Dữ liệu thô hóa học lâm sàng nước tiểu của nhóm relaxin thể dại (Nghiên cứu Pha 1)

Liều dùng	Nhóm	Chỉ số nhận dạng	K	Na	Creat	BUN	CrCl(mL/phút/100g)
Chất dẫn	3F001 TO	68232	136	119	84	1080	0,7Q2
Chất dẫn	3F001 T6	68233	74	67	33	850	0,257
Chất dẫn	3F002 TO	68234	122	130	59	980	0,692
Chất dẫn	3F002 T6	68235	99	66	39	920	0,979
Chất dẫn	3F003 TO	68236	276	130	54	2950	0,694
Chất dẫn	3F003 T6	68237	110	154	58	1980	0,552

Chất dẫn	3F004 TO	68238	355	126	52	3000	0,522
Chất dẫn	3F004 T6	68239	176	152	71	1320	0,614
0,3X	4F001 TO	68791	272	47	22	1950	0,413
0,3X	4F001 T6	68792	174	112	25	1500	0,356
0,3X	4F002 TO	68793	274	68	42	1860	0,522
0,3X	4F002 T6	68794	180	88	42	1500	0,657
0,3X	4F003 TO	68795	230	54	25	1800	0,329
0,3X	4F003 T6	68796	180	82	60	1880	0,449
0,3X	4F004 TO	68797	225	68	23	1440	0,260
0,3X	4F004 T6	68798	365	152	68	3100	0,352
1X	1F001-TQ	67488	194	<40	64	1480	0,526
1X	1F001-T6	67489	138	62	57	960	0,394
1X	1F002-T0	67487	203	74	93	1540	0,579
1X	1F002-T6	67496	296	161	88	1300	0,337
1X	1FQ03-T0	67490	110	85	64	820	0,495
1X	1F003-T6	67495	176	167	104	1440	0,236
1X	1F004-T0	67483	224	74	67	1420	0,882
1X	1F004-T6	67492	94	<40	24	740	0,476

Bảng 4. Dữ liệu thô hóa học lâm sàng nước tiểu của nhóm relaxin thể dại (Nghiên cứu Pha 1) (tiếp theo)

Liều dùng	Nhóm	Chỉ số nhận dạng	K	Na	Creat	BUN	CrCl(mL/phút/100g)
10X	2F001-T0	67497	140	64	40	900	0,670
10X	2F001-T6	67498	54	68	64	500	0,729
10X	2F002-T0	67484	166	101	75	1120	0,598
10X	2F002-T6	67485	214	126	57	1260	0,618
10X	2FOOS-TO	67491	254	<40	103	1650	0,696
10X	2F003-T6	67486	60	<40	106	800	1,129
10X	2F004-T0	67494	294	88	74	1600	0,809
10X	2F0D4-T6	67493	212	125	85	1400	0,756

Đơn vị: Na (mEq/L); Creatinin (mg/dL); BUN (mg/dL), glucoza (mg/dL), K (mmol/l). CrCl:mL/phút/100g BW

Độ thanh thải creatinin (CrCl)= ($U_{creat.}$ * $U_{thể\ tích}$)/(P creat* $U_{thời\ gian}$)

Bảng 5. Tóm tắt dữ liệu sinh lý của Relaxin thể dại (Nghiên cứu Pha 1)

Liều dùng	Lượng nước uống vào (0 giờ đến 6 giờ) mL/100g BW Trung bình	sem	Nước tiểu gốc (-16 giờ đến 0 giờ) mL/100 g BW Trung bình	sem	Nước tiểu (0giờ đến 6 giờ) mL/100g BW Trung bình	sem
Chất dẫn	1,8	0,4	4,1	0,4	1,8	0,3
0,3X	3,6	0,2	5,7	1,1	1,5	0,4
1X	3,1	0,6	3,8	0,6	1,2	0,6
10X	2,4	0,7	4,3	0,8	1,2	0,1

Liều dùng	Hematocrit (%)					
	Trung bình tại 0 giờ	sem	Trung bình tại 2 giờ	sem	Trung bình tại 6 giờ	sem
Chất dẫn	35,1	1,0	35,0	0,9	34,3	0,5
0,3X	29,7	1,1	31,9	1,2	30,4	0,4
1X	31,4	2,7	32,0	2,9	33,7	2,1
10X	29,7	1,1	31,9	1,2	30,4	0,4

Kết quả đối với biến thể PEG-Relaxin trong Pha 2

Lượng nước uống vào trung bình trong khoảng thời gian 6 giờ sau khi sử dụng hoạt chất ở nhóm được xử lý bằng chất dẫn (0X) là 1,5ml trên 100 gam thể trọng, lượng này lần lượt tăng đến 2,9ml, 3,4ml, và 3,1mL cho 100 gam thể trọng ở chuột cống được xử lý bằng biến thể 0,1X, 0,3X và 1X PEG-relaxin. Những lượng này biểu thị mức tăng 93%, 128% và 105% lần lượt ở các nhóm 0,1X, 0,3X và 1X so với trị số trung bình của các nhóm dùng chất dẫn.

Lượng nước tiểu trung bình thải ra trong khoảng thời gian 6 giờ sau khi sử dụng hoạt chất là 0,9, 0,2, 0,5 và 0,4ml trên 100 gam thể trọng đối với nhóm dùng chất dẫn (các nhóm 0X, 0,3X và 1X lần lượt). Nồng độ natri trung bình trong huyết tương ở mức đường nền, 2 và 6 giờ sau khi sử dụng hoạt chất lần lượt là 136,3, 138,8 và 137,8mEq/l ở nhóm dùng chất dẫn (0X); lần lượt là 138,5, 137,0 và 133,7mEq/l ở nhóm 0,1X; lần lượt là 137,5, 133,5 và 134,6mEq/l ở nhóm 0,3X; lần lượt là 137,3, 135,0 và 133,3mEq/l ở nhóm 1X. Mức thay đổi so với mức đường nền ở 2 và 6 giờ là 2,5 và 1,5mEq/l đối với nhóm dùng chất dẫn (0X); -1,5 và -4,8mEq/l đối với nhóm 0,1X; -4,0 và -2,9 mEq/l đối với nhóm 0,3X; -2,3 và -4,0mEq/l đối với nhóm 1X.

Nồng độ osmol/L dung dịch huyết tương trung bình ở mức đường nền, 2 giờ và 6 giờ sau khi sử dụng hoạt chất lần lượt là 285,4, 289,9, và 287,5mosmol/kg nước ở nhóm dùng chất dẫn (0X); lần lượt là 292,7, 287,6 và 281,7mosmol/kg nước ở nhóm 0,1X; lần lượt là 287,6, 279,4 và 282,6mosmol/kg nước ở nhóm 0,3X; lần lượt là 289,3, 283,7 và 279,4mosmol/kg nước ở nhóm 1X. Mức thay đổi so với mức đường nền ở 2 và 6 giờ là 4,5 và 2,1mosmol/kg nước đối với nhóm chất dẫn (0X); -5,1 và -11,0mosmol/kg nước đối với nhóm 0,1X; -8,2 và -5,0mosmol/kg nước đối với nhóm 0,3X; -5,6 và -9,9mosmol kg nước đối với nhóm 1X.

Cần hiểu rằng các ví dụ và các phương án được bộc lộ trong bản mô tả này chỉ

nhằm mục đích minh họa và các cải biến hoặc các thay đổi khác nhau dựa vào các phương án này sẽ được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này thừa nhận và bao hàm trong ý tưởg và nội dung của sáng chế và phạm vi của yêu cầu bảo hộ kèm theo. Tất cả nội dung của các công bố, patent, đơn yêu cấu cấp patent, và/hoặc các tài liệu khác được trích dẫn trong bản mô tả này được đưa vào bằng cách viện dẫn đối với mọi mục đích ở cùng mức độ như thể mỗi công bố, patent, đơn yêu cầu cấp patent, và/hoặc tài liệu khác được nêu riêng rẽ để được kết hợp vào sáng chế bằng cách viện dẫn đối với mọi mục đích.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Polypeptit relaxin được cải biến chứa axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên, trong đó:

(a) polypeptit relaxin được cải biến này chứa polypeptit relaxin chuỗi A có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.4 và polypeptit relaxin chuỗi B có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.5 hoặc SEQ ID NO.6 được thế bằng axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên ở vị trí được chọn từ nhóm bao gồm gốc 1 của polypeptit relaxin chuỗi A, gốc 5 của polypeptit relaxin chuỗi A, gốc 13 của polypeptit relaxin chuỗi A, gốc 18 của polypeptit relaxin chuỗi A, và gốc 7 của polypeptit relaxin chuỗi B; và

(b) axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên là para-axetyl-phenylalanin tùy ý được liên kết với nhóm liên kết, polyme, hoặc phân tử có hoạt tính sinh học.

2. Polypeptit relaxin được cải biến theo điểm 1, trong đó axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên là ở vị trí của gốc 1 của polypeptit relaxin chuỗi A.

3. Polypeptit relaxin được cải biến theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 2, trong đó axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên được liên kết với nhóm liên kết, polyme, hoặc phân tử có hoạt tính sinh học.

4. Polypeptit relaxin được cải biến chứa axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên, trong đó:

(a) polypeptit relaxin được cải biến này chứa polypeptit relaxin chuỗi A và polypeptit relaxin chuỗi B, trong đó polypeptit relaxin chuỗi A có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 95% so với trình tự SEQ ID NO.4, và polypeptit relaxin chuỗi B có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 95% so với trình tự SEQ ID NO.5 hoặc SEQ ID NO.6, và axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên được thế trong polypeptit relaxin chuỗi A ở gốc 1; và

(b) axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên được liên kết với nhóm liên kết, polyme, hoặc phân tử có hoạt tính sinh học, trong đó axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên chứa nhóm chức thứ nhất và nhóm liên kết, polyme, hoặc phân tử có

hoạt tính sinh học chứa nhóm chức thứ hai, trong đó nhóm chức thứ nhất và nhóm chức thứ hai không giống hệt nhau và mỗi nhóm chứa nhóm carbonyl, nhóm aminooxy, nhóm hyđrazit, nhóm hyđrazin, nhóm semicarbazit, nhóm azit, hoặc nhóm alkylen, và liên kết cộng hóa trị thu được được tạo ra bởi phản ứng của nhóm chức thứ nhất và nhóm chức thứ hai chứa liên kết oxim hoặc triazol.

5. Polypeptit relaxin được cải biến chứa axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên, trong đó:

(a) polypeptit relaxin được cải biến này chứa polypeptit relaxin chuỗi A có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.4 và polypeptit relaxin chuỗi B có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.5 hoặc SEQ ID NO.6 và trình tự polypeptit relaxin chuỗi A và trình tự polypeptit relaxin chuỗi B này chứa lên đến hai gốc thay thế axit amin được chọn từ gốc thay thế bằng axit amin có trong tự nhiên hoặc axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên và polypeptit relaxin chuỗi A còn được thế bằng axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên ở gốc 1 của polypeptit relaxin chuỗi A; và

(b) axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên ở gốc 1 của polypeptit relaxin chuỗi A được liên kết với nhóm liên kết, polyme, hoặc phân tử có hoạt tính sinh học, trong đó axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên chứa nhóm chức thứ nhất và nhóm liên kết, polyme, hoặc phân tử có hoạt tính sinh học chứa nhóm chức thứ hai, trong đó nhóm chức thứ nhất và nhóm chức thứ hai không giống hệt nhau và mỗi nhóm chứa nhóm carbonyl, nhóm aminooxy, nhóm hyđrazit, nhóm hyđrazin, nhóm semicarbazit, nhóm azit, hoặc nhóm alkylen, và liên kết cộng hóa trị thu được được tạo ra bởi phản ứng của nhóm chức thứ nhất và nhóm chức thứ hai chứa liên kết oxim hoặc triazol.

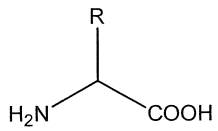
6. Polypeptit relaxin được cải biến theo điểm 5, trong đó polypeptit relaxin chuỗi A chứa trình tự SEQ ID NO.4 có gốc thay thế axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên ở gốc 1 của polypeptit relaxin chuỗi A và lên đến một gốc thay thế axit amin bổ sung, và polypeptit relaxin chuỗi B chứa trình tự SEQ ID NO.5 hoặc SEQ ID NO.6 có lên đến một gốc thay thế axit amin.

7. Polypeptit relaxin được cải biến theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 4 đến 6, trong đó polypeptit relaxin chuỗi A có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.4 chứa gốc thay thế axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên ở gốc 1.

8. Polypeptit relaxin được cải biến theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 4 đến 7, trong đó polypeptit relaxin chuỗi B có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.5 hoặc SEQ ID NO.6.

9. Polypeptit relaxin được cải biến theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 4 đến 8, trong đó axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên là chất tương tự phenylalanin hoặc dẫn xuất của phenylalanin.

10. Polypeptit relaxin được cải biến theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 4 đến 8, trong đó axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên có công thức:



trong đó nhóm R là phần tử thế bất kỳ khác với chuỗi bên có trong alanin, arginin, asparagin, axit aspartic, xystein, glutamin, axit glutamic, glyxin, histiđin, isoleucin, leucin, lysin, metionin, phenylalanin, prolin, serin, threonin, tryptophan, tyrosin hoặc valin và được thế ở gốc 1 của polypeptit relaxin chuỗi A.

11. Polypeptit relaxin được cải biến theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 4 đến 10, trong đó axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên chứa para-axetyl-L-phenylalanin hoặc para-aziđo-L-phenylalanin.

12. Polypeptit relaxin được cải biến theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 4 đến 11, trong đó (i) nhóm chức thứ nhất trên axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên là gốc carbonyl và nhóm chức thứ hai được chứa trên nhóm liên kết, polyme, hoặc phân tử có hoạt tính sinh học là gốc aminooxy, và liên kết cộng hóa trị thu được được tạo ra bởi phản ứng của nhóm chức thứ nhất và nhóm chức thứ hai là liên kết oxim; hoặc (ii) nhóm chức thứ nhất trên axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên là gốc azit và nhóm chức thứ hai được chứa trên nhóm liên kết, polyme, hoặc phân tử có hoạt tính sinh học là gốc

alkyn, và liên kết cộng hóa trị thu được được tạo ra bởi phản ứng của nhóm chức thứ nhất và nhóm chức thứ hai chứa liên kết triazol.

13. Polypeptit relaxin được cải biến theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 4 đến 10, trong đó axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên được chọn từ phenylalanin được thế para, phenylalanin được thế ortho, hoặc phenylalanin được thế meta chứa nhóm carbonyl, nhóm aminooxy, nhóm hyđrazit, nhóm hyđrazin, nhóm semicarbazit, nhóm azit, hoặc nhóm alkylen.

14. Polypeptit relaxin được cải biến theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 4 đến 13, trong đó axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên là para-axetyl-L-phenylalanin.

15. Polypeptit relaxin được cải biến theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 3 đến 14, trong đó axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên được liên kết với nhóm liên kết, polyme, hoặc phân tử có hoạt tính sinh học bằng liên kết oxim.

16. Polypeptit relaxin được cải biến theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 15, trong đó axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên được liên kết với polyme.

17. Polypeptit relaxin được cải biến theo điểm 16, trong đó polyme là polyme hòa tan trong nước.

18. Polypeptit relaxin được cải biến theo điểm 16, trong đó polyme là oligosacarit.

19. Polypeptit relaxin được cải biến theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 17, trong đó axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên được liên kết với polyme chứa poly(etylen glycol).

20. Polypeptit relaxin được cải biến theo điểm 19, trong đó poly(etylen glycol) có khối lượng phân tử trung bình nằm trong khoảng từ 0,1kDa đến 100kDa, nằm trong khoảng từ 0,1kDa đến 50kDa, nằm trong khoảng từ 1kDa đến 40kDa, nằm trong khoảng từ 5kDa đến 40kDa, hoặc khoảng 20kDa.

21. Polypeptit relaxin được cải biến theo điểm 19, trong đó axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên được liên kết với polyme chứa poly(etylen glycol) có khối lượng phân tử trung bình nằm trong khoảng từ 0,1kDa đến 100kDa.

22. Polypeptit relaxin được cải biến theo điểm 19, trong đó gốc poly(etylen glycol) có khối lượng phân tử trung bình nằm trong khoảng từ 1kDa đến 40kDa.

23. Polypeptit relaxin được cải biến theo điểm 19, trong đó gốc poly(etylen glycol) có khối lượng phân tử trung bình nằm trong khoảng từ 5kDa đến 40kDa.

24. Polypeptit relaxin được cải biến theo điểm 19, trong đó gốc poly(etylen glycol) có khối lượng phân tử trung bình khoảng 20kDa.

25. Polypeptit relaxin được cải biến chứa axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên, trong đó:

(a) polypeptit relaxin được cải biến này chứa polypeptit relaxin chuỗi A và polypeptit relaxin chuỗi B, trong đó polypeptit relaxin chuỗi A chứa trình tự SEQ ID NO.4 chứa gốc thay thế axit amin bằng axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên ở gốc 1 và polypeptit relaxin chuỗi B chứa trình tự SEQ ID NO.6 hoặc SEQ ID NO.5;

(b) axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên là para-axetyl-L-phenylalanin; và

(c) para-axetyl-L-phenylalanin được liên kết với poly(etylen glycol) có khối lượng phân tử trung bình khoảng 20kDa.

26. Polypeptit relaxin được cải biến theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 25, trong đó polypeptit relaxin chuỗi B là polypeptit có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.6.

27. Polypeptit relaxin được cải biến theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 26, trong đó polypeptit relaxin được cải biến này là polypeptit relaxin tái tổ hợp, được sản sinh trong tế bào vật chủ nhân thật, được sản sinh trong tế bào vật chủ không phải là tế bào nhân thật, hoặc được sản sinh bằng quá trình dịch mã in vitro.

28. Polypeptit relaxin được cải biến theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 27, trong đó polypeptit relaxin được cải biến này có thời gian bán thải trong huyết thanh cao hơn polypeptit relaxin thể dại bao gồm trình tự như nêu trong SEQ ID NO.4 và SEQ ID NO.5, trong đó thời gian bán thải trong huyết thanh của polypeptit relaxin được cải biến này tùy

ý được gia tăng ở mức độ được chọn từ ít nhất khoảng hai lần, ít nhất khoảng ba lần, ít nhất khoảng năm lần, hoặc ít nhất khoảng mười lần.

29. Polypeptit relaxin được cải biến theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 28, trong đó polypeptit relaxin được cải biến này có hoạt tính sinh học.

30. Tế bào vật chủ chứa axit nucleic mã hóa polypeptit relaxin chuỗi A có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.4 hoặc polypeptit relaxin chuỗi B có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.5 hoặc SEQ ID NO.6 được thế bằng axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên ở vị trí được chọn từ nhóm bao gồm: gốc 1 của polypeptit relaxin chuỗi A, gốc 5 của polypeptit relaxin chuỗi A, gốc 13 của polypeptit relaxin chuỗi A, gốc 18 của polypeptit relaxin chuỗi A, và gốc 7 của polypeptit relaxin chuỗi B, trong đó axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên là para-axetyl-phenylalanin, tế bào vật chủ này chứa ARN vận chuyển trực giao synthetaza và/hoặc ARN vận chuyển trực giao, và khi axit nucleic nêu trên được dịch mã, tạo ra sự kết hợp axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên trong polypeptit relaxin chuỗi A hoặc polypeptit relaxin chuỗi B, và polynucleotit này chứa ít nhất một bộ ba mã hóa chọn lọc tùy ý được chọn từ nhóm bao gồm bộ ba mã hóa amber, bộ ba mã hóa ochre, bộ ba mã hóa opal, bộ ba mã hóa duy nhất, bộ ba mã hóa hiếm gặp, và bộ ba mã hóa bốn bazơ, trong đó bộ ba mã hóa chọn lọc này mã hóa axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên.

31. Phương pháp sản xuất polypeptit relaxin được cải biến theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 29, bao gồm các bước: nuôi cấy tế bào chứa (1) polynucleotit hoặc các polynucleotit mã hóa polypeptit relaxin chuỗi A và polypeptit relaxin chuỗi B chứa bộ ba mã hóa chọn lọc mã hóa axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên, (2) ARN trực giao synthetaza và (3) ARN vận chuyển trực giao trong các điều kiện để cho phép biểu hiện polypeptit relaxin chứa axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên; và tinh chế polypeptit relaxin chứa axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên.

32. Axit nucleic phân lập được mã hóa chuỗi polypeptit relaxin được cải biến chứa axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên, trong đó: (a) axit nucleic phân lập được này chứa bộ ba mã hóa chọn lọc mã hóa axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên; (b) polypeptit relaxin được cải biến và mã hóa này chứa polypeptit relaxin chuỗi A có độ

tương đồng trình tự ít nhất bằng 95% so với trình tự SEQ ID NO.4; và (c) axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên xuất hiện ở gốc 1 của polypeptit relaxin chuỗi A có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.4 hoặc vị trí tương ứng của polypeptit relaxin được cải biến này, và axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên chứa nhóm chức được chọn từ nhóm carbonyl, nhóm aminooxy, nhóm hyđrazit, nhóm hyđrazin, nhóm semicarbazit, nhóm azit, hoặc nhóm alkylen.

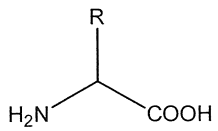
33. Axit nucleic phân lập được theo điểm 32, trong đó axit nucleic này mã hóa polypeptit relaxin chuỗi A có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.4 chứa axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên này.

34. Axit nucleic phân lập được theo điểm 32 hoặc 33, trong đó axit nucleic này cũng mã hóa polypeptit relaxin chuỗi B có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.5 hoặc SEQ ID NO.6.

35. Axit nucleic phân lập được theo điểms 32 hoặc 33, trong đó axit nucleic này cũng mã hóa polypeptit relaxin chuỗi B có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 95% so với trình tự SEQ ID NO.5 hoặc SEQ ID NO.6.

36. Axit nucleic phân lập được theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 32 đến 35, trong đó axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên là chất tương tự phenylalanin hoặc dẫn xuất của phenylalanin.

37. Axit nucleic phân lập được theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 32 đến 35, trong đó axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên có công thức:



trong đó nhóm R là phần tử thế bất kỳ khác với chuỗi bên có trong alanin, arginin, asparagin, axit aspartic, xystein, glutamin, axit glutamic, glyxin, histiđin, isoleucin, leucin, lysin, metionin, phenylalanin, prolin, serin, threonin, tryptophan, tyrosin hoặc valin.

38. Axit nucleic phân lập được theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 32 đến 35, trong đó axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên chứa para-axetyl-L-phenylalanin hoặc para-aziđo-L-phenylalanin.

39. Axit nucleic phân lập được theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 32 đến 35, trong đó axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên được chọn từ phenylalanin được thế para, phenylalanin được thế ortho, hoặc phenylalanin được thế meta chứa nhóm carbonyl, nhóm aminooxy, nhóm hyđrazit, nhóm hyđrazin, nhóm semicarbazit, nhóm azit, hoặc nhóm alkylen.

40. Axit nucleic phân lập được theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 32 đến 39, trong đó bộ ba mã hóa chọn lọc này chứa bộ ba mã hóa amber, bộ ba mã hóa ochre, hoặc bộ ba mã hóa opal.

41. Axit nucleic phân lập được theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 32 đến 40, trong đó axit nucleic phân lập được này còn chứa axit nucleic mã hóa trình tự tín hiệu bài tiết.

42. Axit nucleic phân lập được mã hóa chuỗi polypeptit relaxin được cải biến chứa axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên, trong đó: (a) axit nucleic phân lập được này chứa bộ ba mã hóa chọn lọc mã hóa axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên; (b) polypeptit relaxin được cải biến và mã hóa này chứa polypeptit relaxin chuỗi A có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.4 chứa một gốc thay thế axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên; và (c) axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên xuất hiện ở gốc 1 của polypeptit relaxin chuỗi A có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.4 hoặc vị trí tương ứng của polypeptit relaxin được cải biến này, và axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên chứa para-axetyl-L-phenylalanin.

43. Tế bào vật chủ chứa axit nucleic phân lập được theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 32 đến 42.

44. Tế bào vật chủ theo điểm 43, trong đó tế bào vật chủ này còn chứa ARN vận chuyển trực giao nhận diện bộ ba mã hóa chọn lọc này và chèn axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên trong quá trình dịch mã axit nucleic phân lập được này.

45. Tế bào vật chủ theo điểm 44, trong đó tế bào vật chủ này còn chứa ARN vận chuyển trực giao synthetaza tổng hợp ARN vận chuyển trực giao này.

46. Tế bào vật chủ theo điểm 44, trong đó axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên chứa para-axetyl-L-phenylalanin.

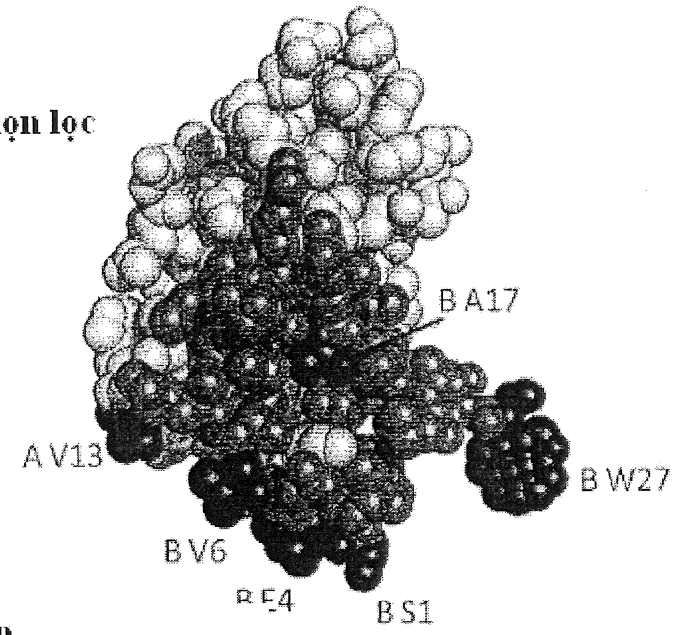
47. Hệ dịch mã *in vitro* chứa axit nucleic phân lập được theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 32 đến 42.

48. Hệ dịch mã *in vitro* theo điểm 47, trong đó hệ dịch mã *in vitro* này còn chứa ARN vận chuyển trực giao nhận diện bộ ba mã hóa chọn lọc này và chèn axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên trong quá trình dịch mã axit nucleic phân lập được này.

49. Hệ dịch mã *in vitro* theo điểm 48, trong đó hệ dịch mã *in vitro* này còn chứa ARN vận chuyển trực giao synthetaza tổng hợp ARN vận chuyển trực giao này.

50. Hệ dịch mã *in vitro* theo điểm 48, trong đó axit amin được mã hóa không có trong tự nhiên chứa para-axetyl-L-phenylalanin.

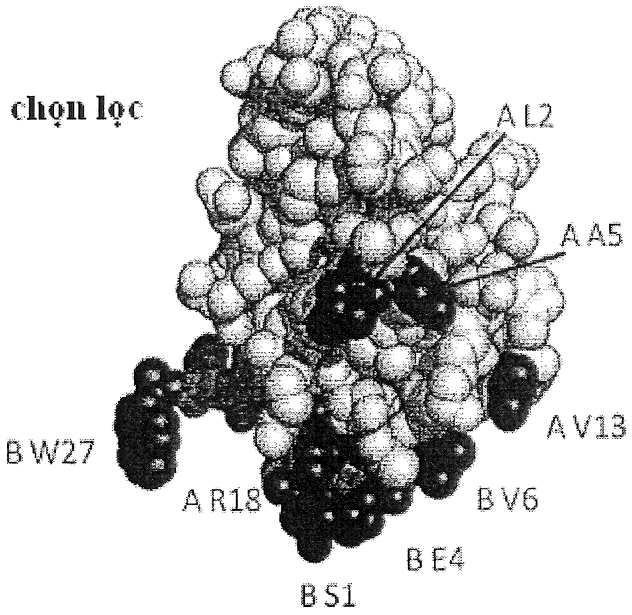
Màu xám nhạt = chuỗi A
Màu xám sẫm = chuỗi B
Màu đen = các vị trí được chọn lọc



6RLX
Đánh số thứ tự insulin
Vị trí không có trong cấu trúc: A Q-3

Fig.1

Màu xám nhạt = chuỗi A
Màu xám sẫm = chuỗi B
Màu đen = các vị trí được chọn lọc

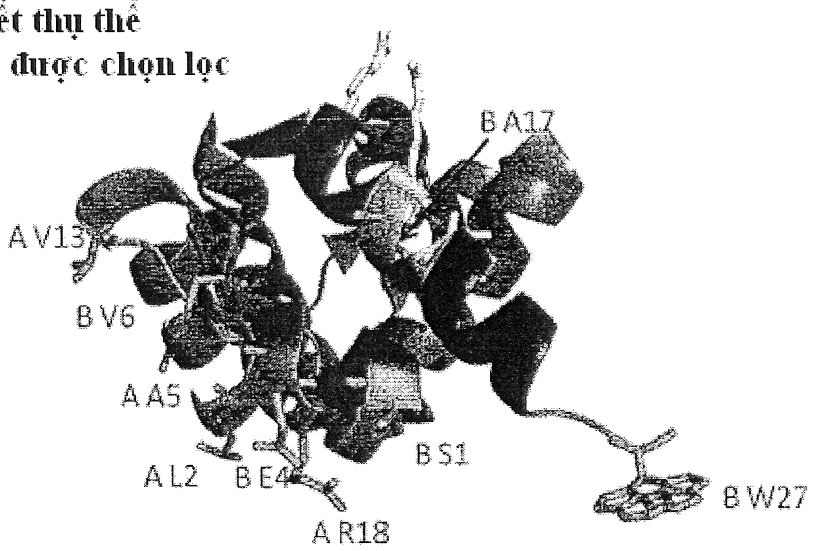


6RLX

Đánh số thứ tự insulin
Vị trí không có trong cấu trúc: A Q-3

Fig.2

Màu xanh nhạt = chuỗi A
Màu xanh sẫm = chuỗi B
Màu vàng = vị trí liên kết thụ thể
Màu da cam = các vị trí được chọn lọc



6RLX

Đánh số thứ tự insulin
Vị trí không có trong cấu trúc: A Q-3

Fig.3

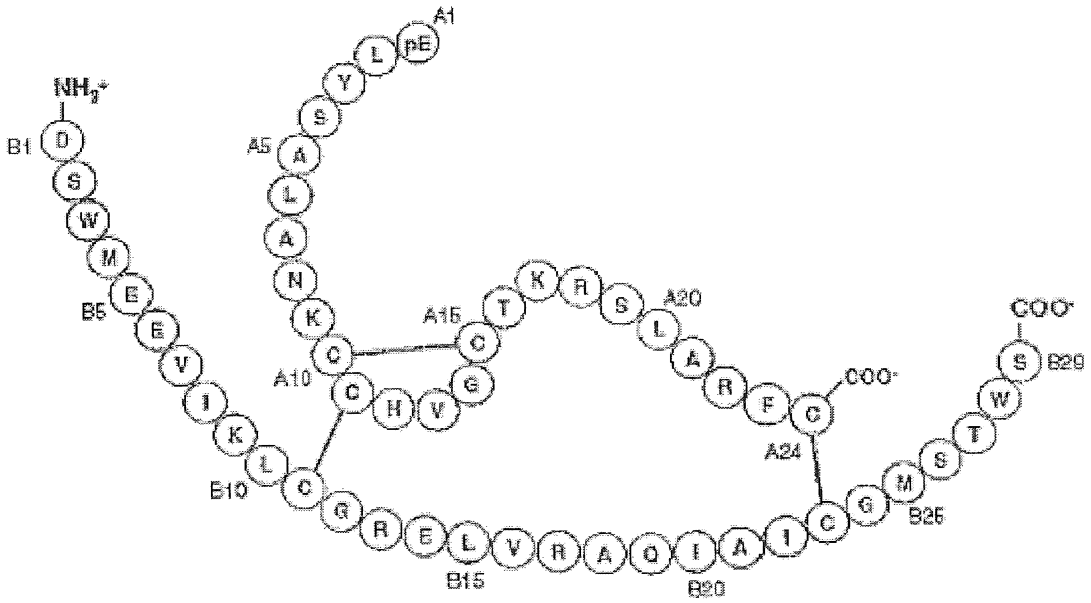
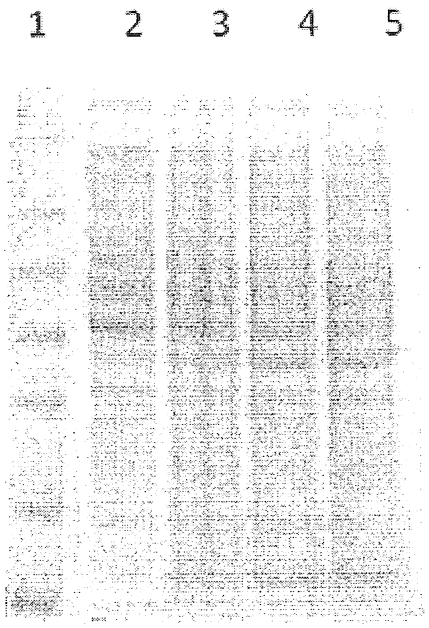

NH2+
B1
D
S
W
M
E
B5
E
V
I
K
L
B10
C
G
R
E
L
V
R
A
Q
I
A
I
B20
C
G
M
S
T
W
S
B29
COO-
B25
A1
pE
L
Y
S
A5
A
L
A
N
K
C
A10
C
H
V
G
C
A15
T
K
R
S
A20
L
A
R
F
C
A24
COO-
B15

Fig.4

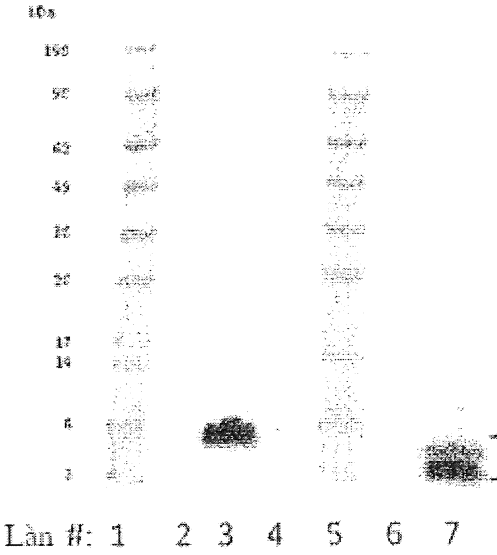


Làn	Mẫu
1	Gen đánh dấu MW SeeBlue2
2	RLX-EX-002-129: **0 giờ**
3	RLX-EX-002-129: **2 giờ**
4	RLX-EX-002-129: **4 giờ**
5	RLX-EX-002-129: **6 giờ**

Fig.5

A.

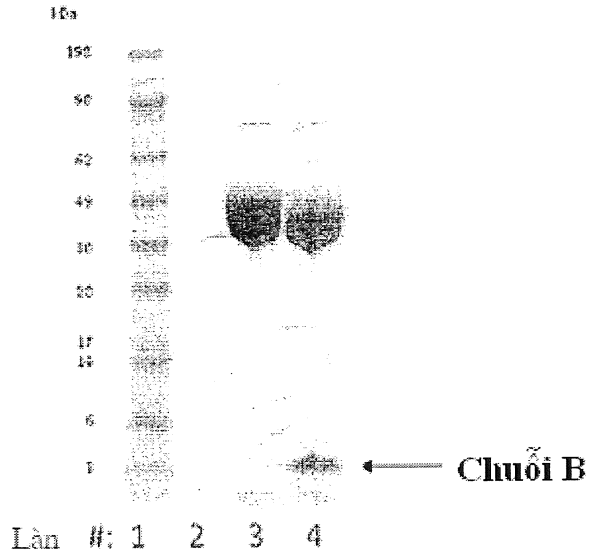
SDS-PAGE → Relaxin chưa được PEGyl hóa



Lane #	Lane assignment
1	Gen đánh dấu MW
2	---
3	**Relaxin thể đại (NR)**
4	---
5	Gen đánh dấu MW
6	---
7	**Relaxin thể đại (R)**

B.

SDS-PAGE → Relaxin được PEGyl hóa 20K



Lane #	Lane assignment
1	Gen đánh dấu MW
2	---
3	PEG Relaxin (NR) 20K
4	PEG Relaxin (R) 20K

Fig.6

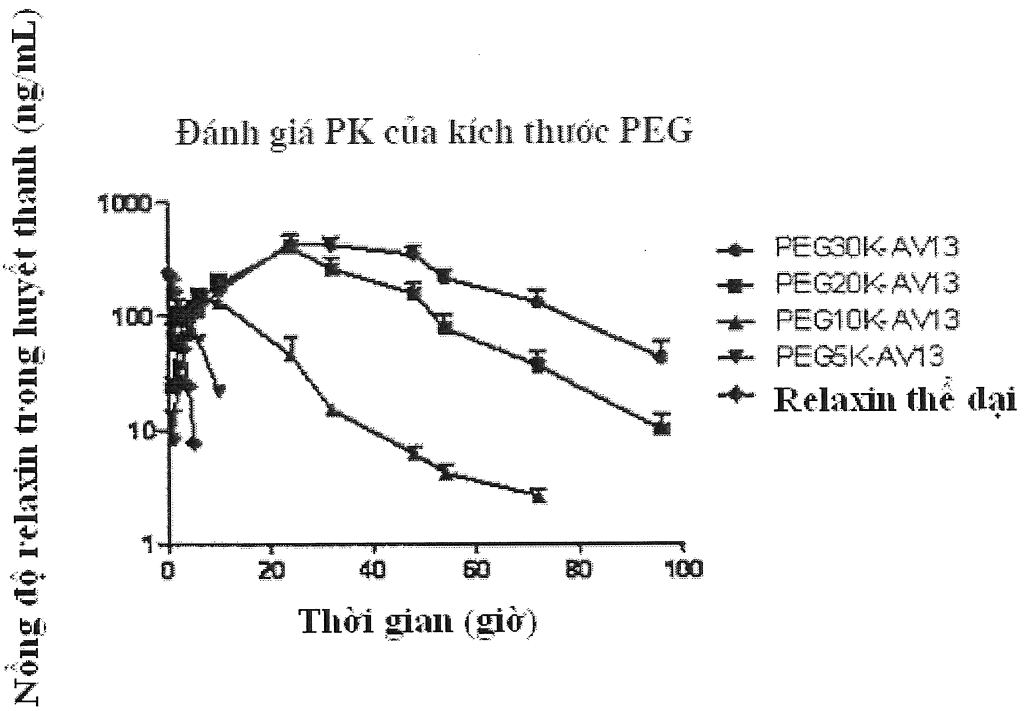

Đánh giá PK của kích thước PEG
Nồng độ relaxin trong huyết thanh (ng/mL)
1000
100
10
1
0
20
40
60
80
100
Thời gian (giờ)
PEG30K-AV13
PEG20K-AV13
PEG10K-AV13
PEG5K-AV13
Relaxin thể dại

Fig.7

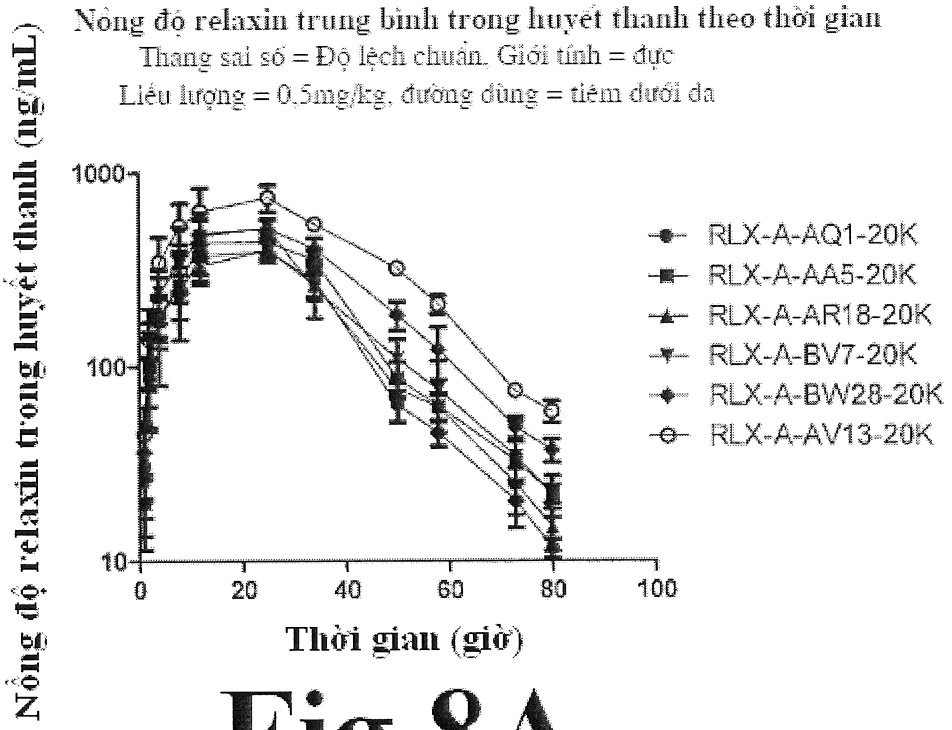

Nồng độ relaxin trung bình trong huyết thanh theo thời gian
Thang sai số = Độ lệch chuẩn. Giới tính = đực
Liều lượng = 0.5mg/kg, đường dùng = tiêm dưới da
Nồng độ relaxin trong huyết thanh (ng/mL)
1000
100
10
0
20
40
60
80
100
Thời gian (giờ)
RLX-A-AQ1-20K
RLX-A-AA5-20K
RLX-A-AR18-20K
RLX-A-BV7-20K
RLX-A-BW28-20K
RLX-A-AV13-20K

Fig.8A

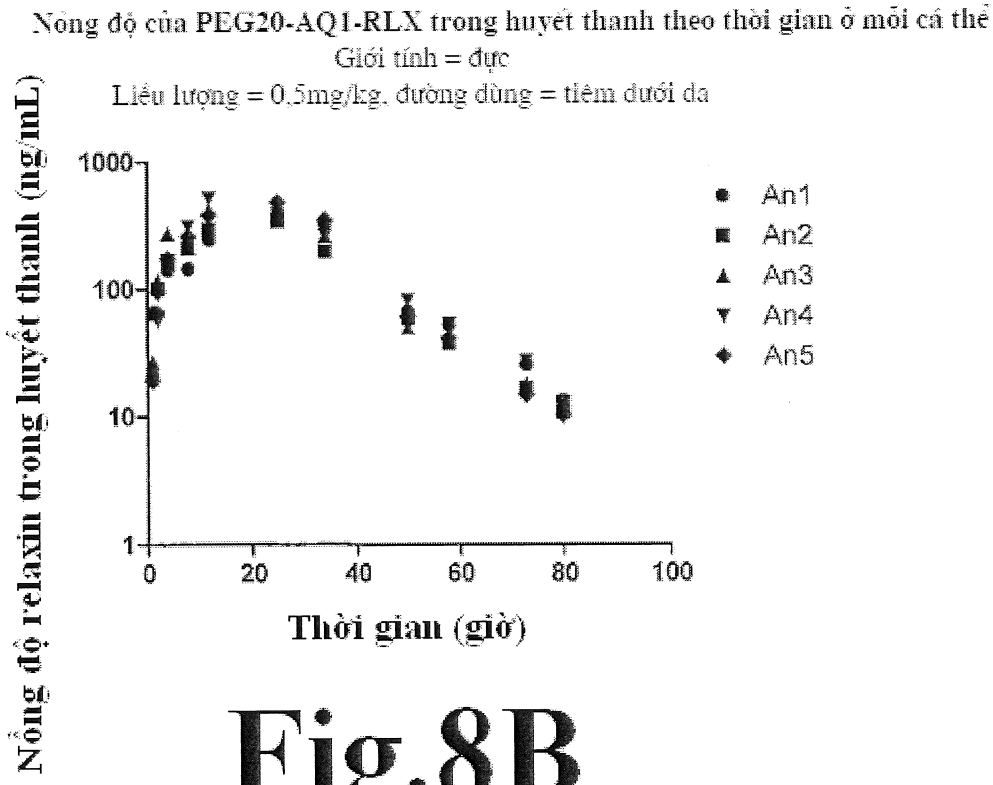

Nồng độ của PEG20-AQ1-RLX trong huyết thanh theo thời gian ở mỗi cá thể
Giới tính = đực
Liều lượng = 0.5mg/kg, đường dùng = tiêm dưới da
Nồng độ relaxin trong huyết thanh (ng/mL)
1000
100
10
1
0
20
40
60
80
100
Thời gian (giờ)
An1
An2
An3
An4
An5

Fig.8B

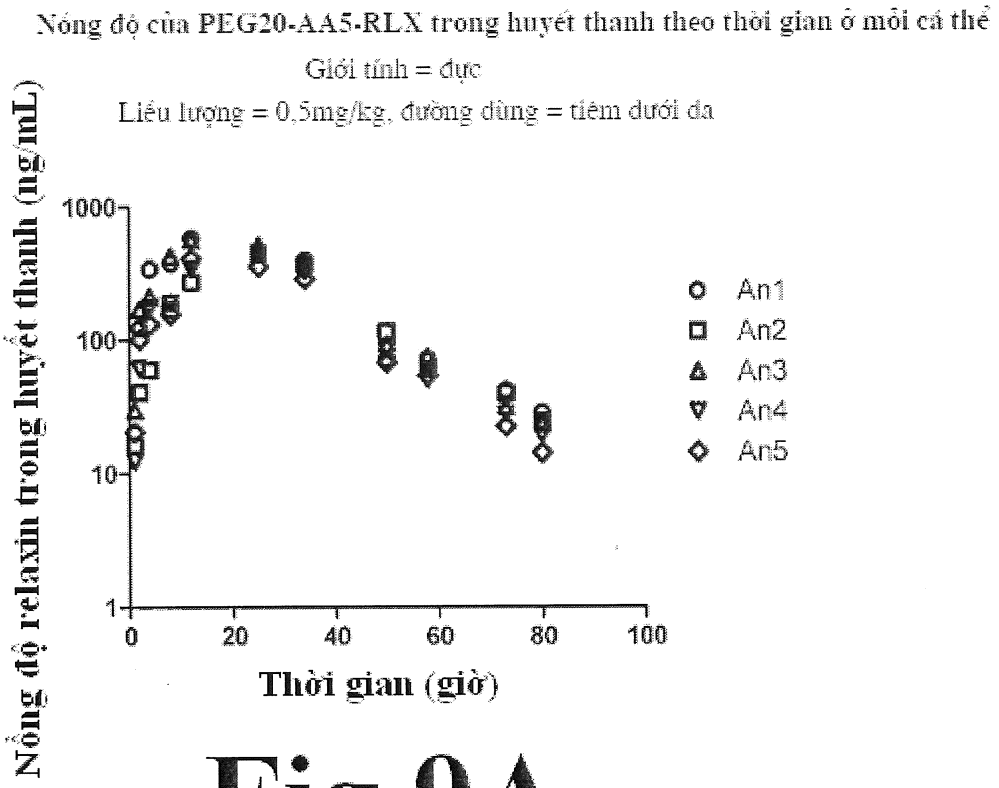

Nồng độ của PEG20-AA5-RLX trong huyết thanh theo thời gian ở mỗi cá thể
Giới tính = đực
Liều lượng = 0,5mg/kg, đường dùng = tiêm dưới da
Nồng độ relaxin trong huyết thanh (ng/mL)
1000
100
10
1
0
20
40
60
80
100
Thời gian (giờ)
An1
An2
An3
An4
An5

Fig.9A

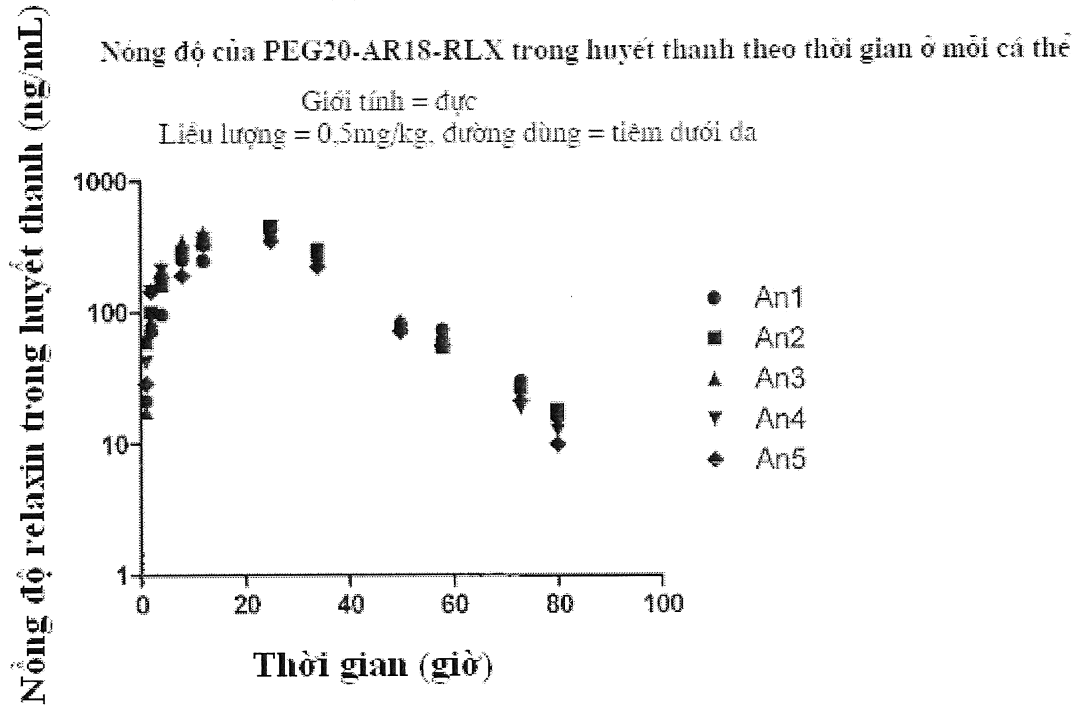

Nồng độ của PEG20-AR18-RLX trong huyết thanh theo thời gian ở mỗi cá thể
Giới tính = đực
Liều lượng = 0,5mg/kg, đường dùng = tiêm dưới da
Nồng độ relaxin trong huyết thanh (ng/mL)
1000
100
10
1
0
20
40
60
80
100
Thời gian (giờ)
An1
An2
An3
An4
An5

Fig.9B

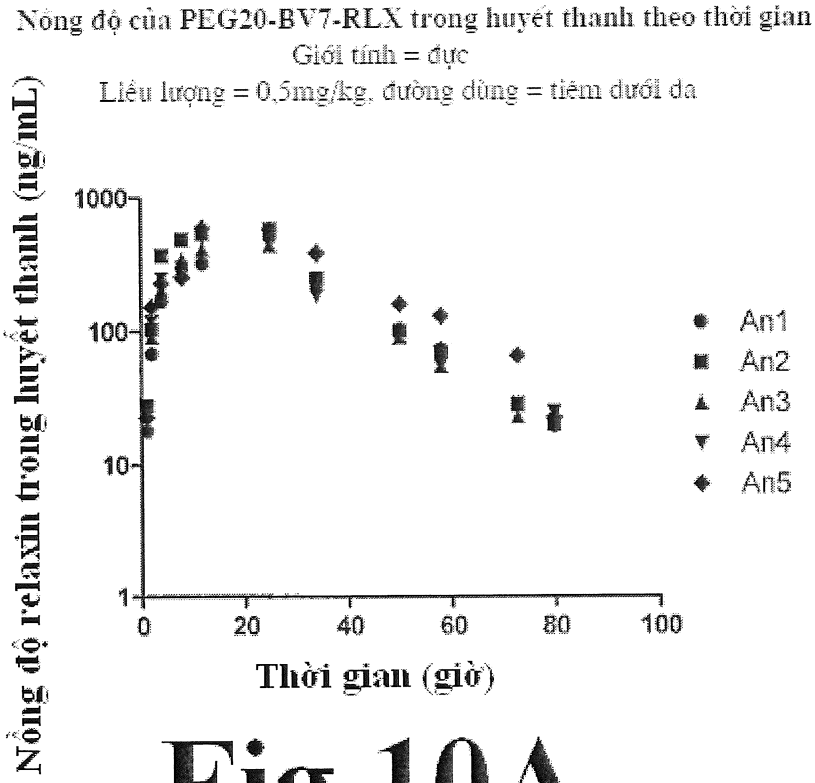


Fig.10A

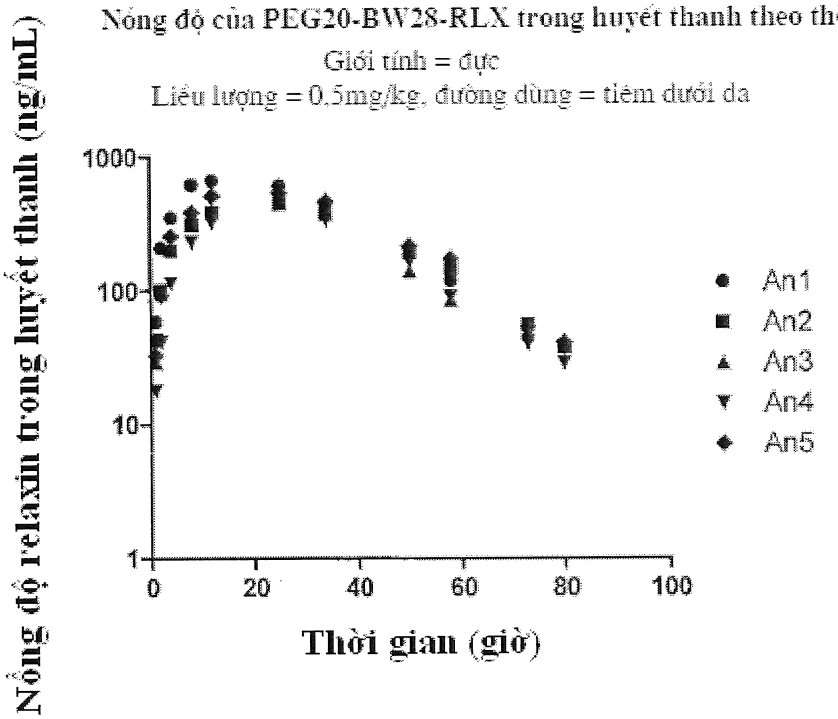


Fig.10B

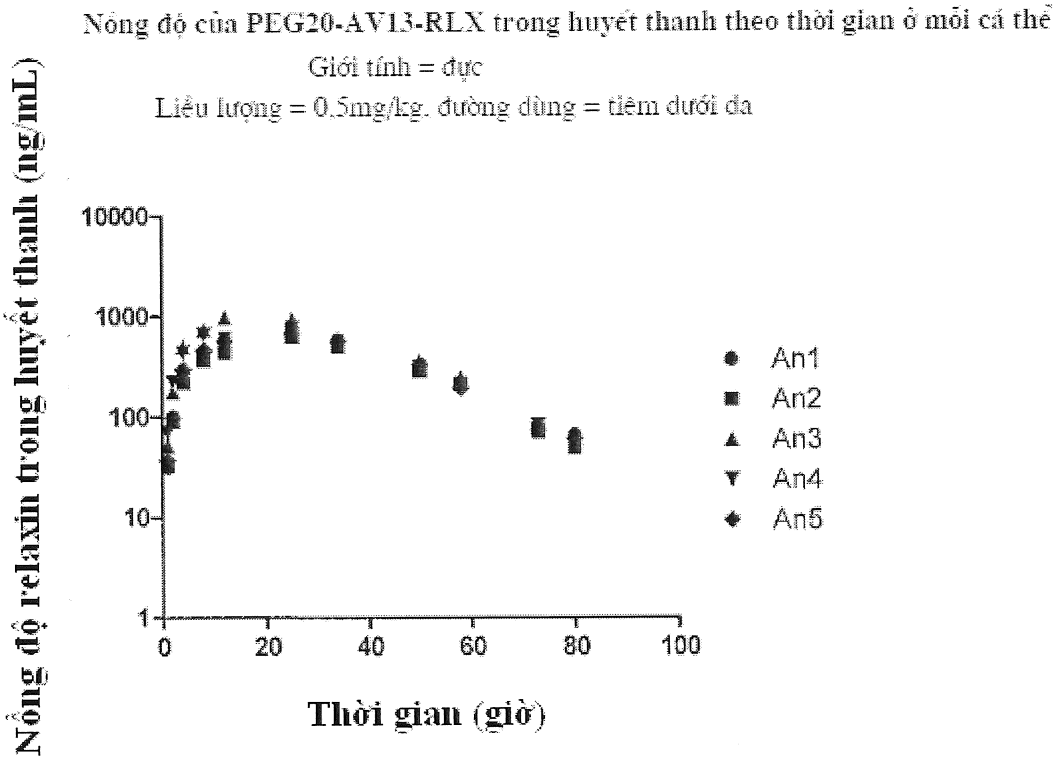

Nồng độ của PEG20-AV13-RLX trong huyết thanh theo thời gian ở mỗi cá thể
Giới tính = đực
Liều lượng = 0.5mg/kg, đường dùng = tiêm dưới da
Nồng độ relaxin trong huyết thanh (ng/mL)
10000
1000
100
10
1
0
20
40
60
80
100
Thời gian (giờ)
An1
An2
An3
An4
An5

Fig.11

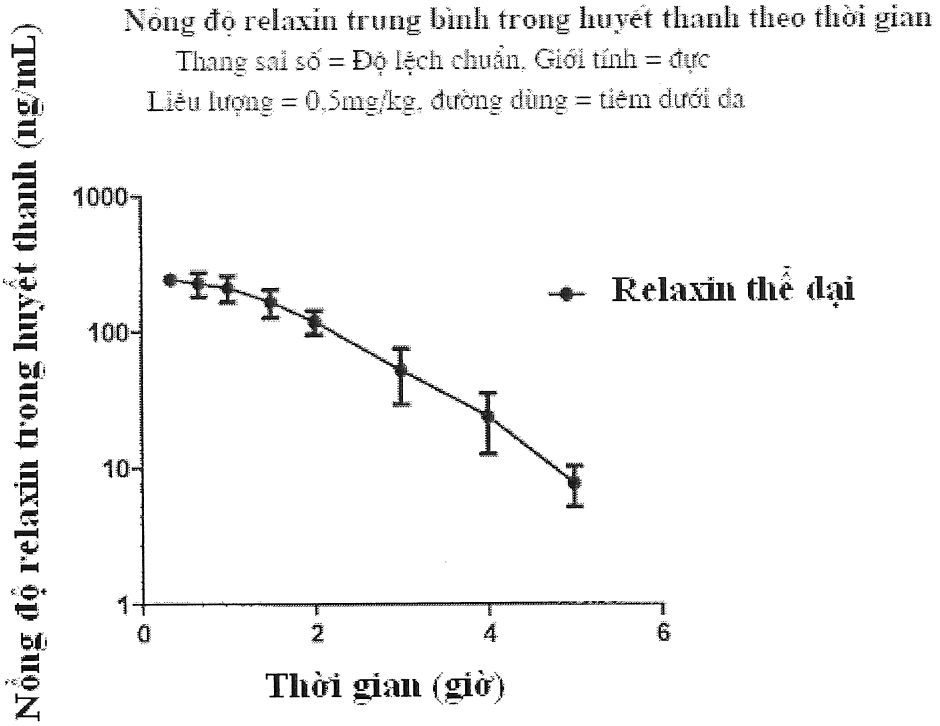


Fig.12A

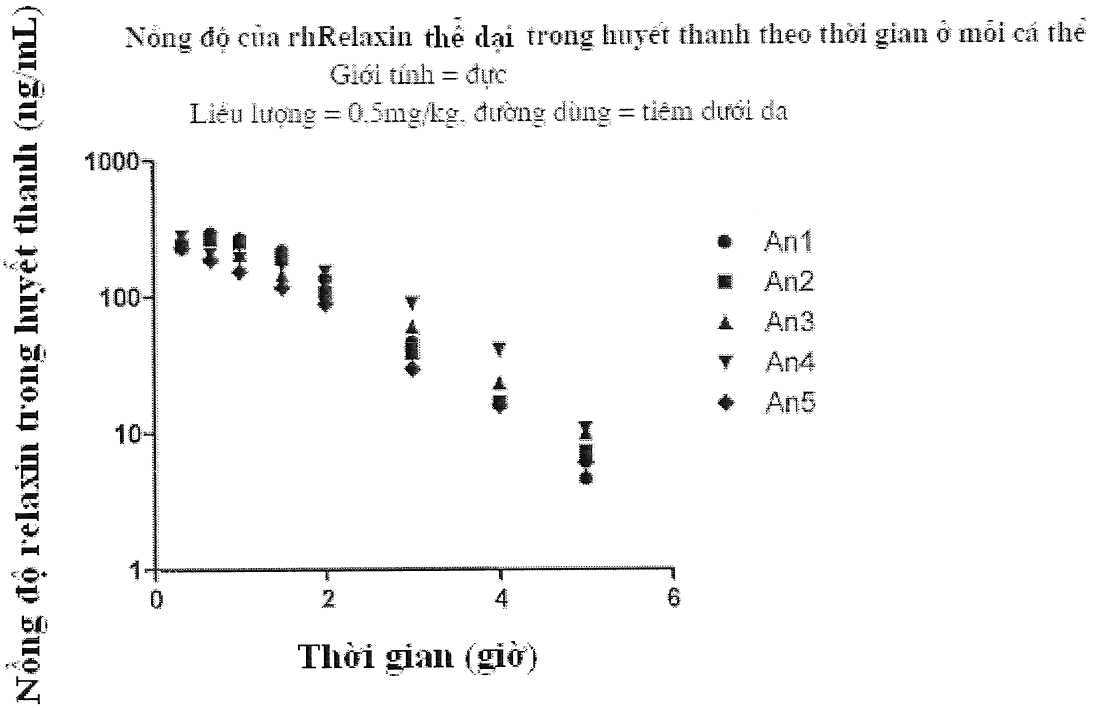


Fig.12B

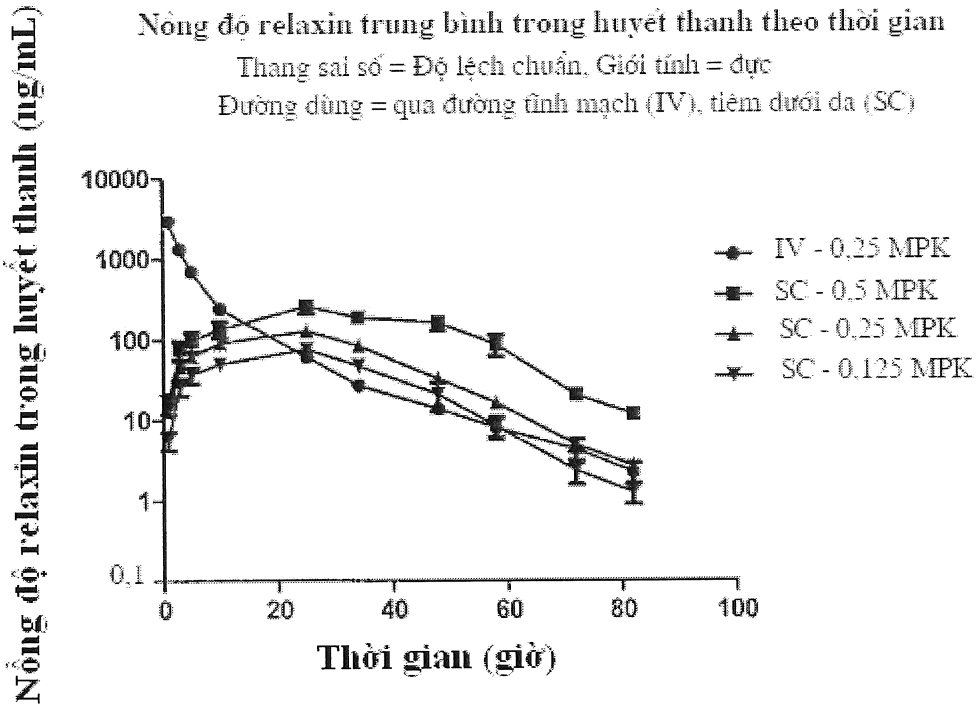


Fig.13A

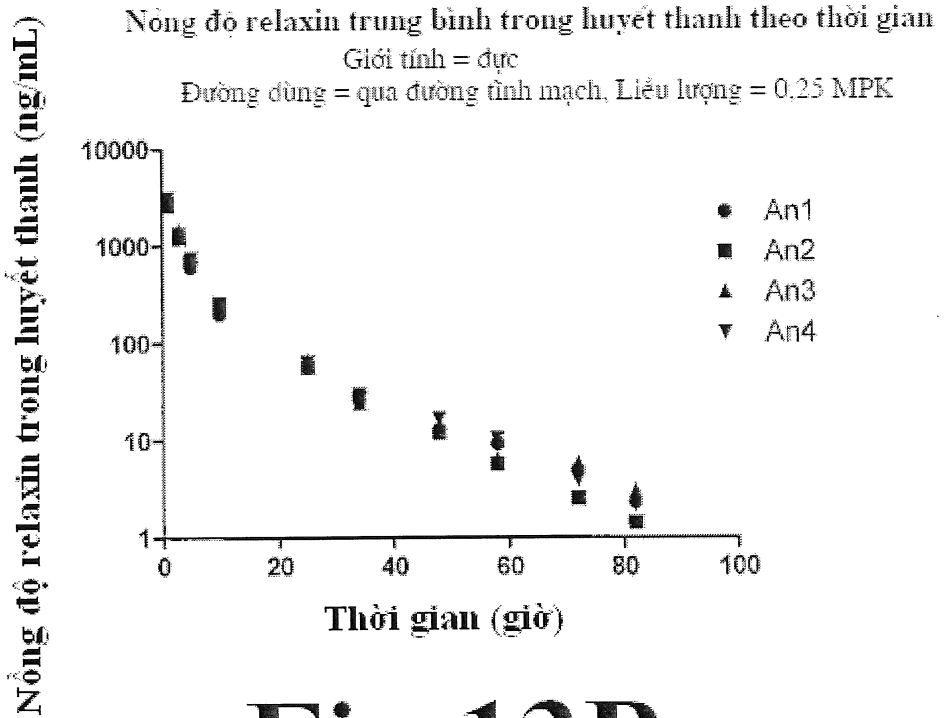


Fig.13B

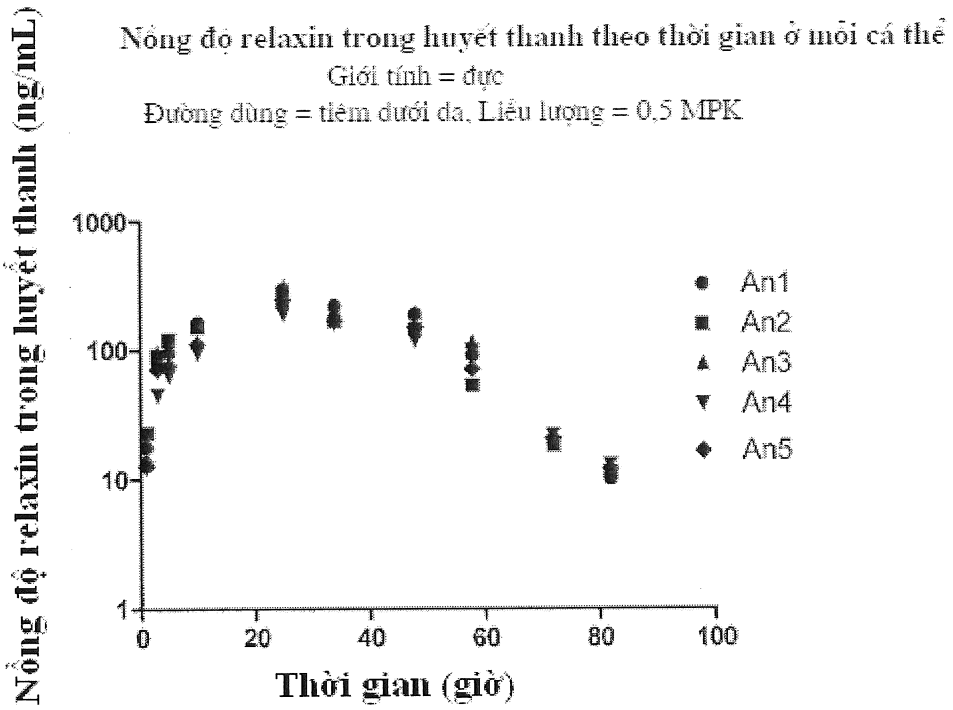


Fig.14A

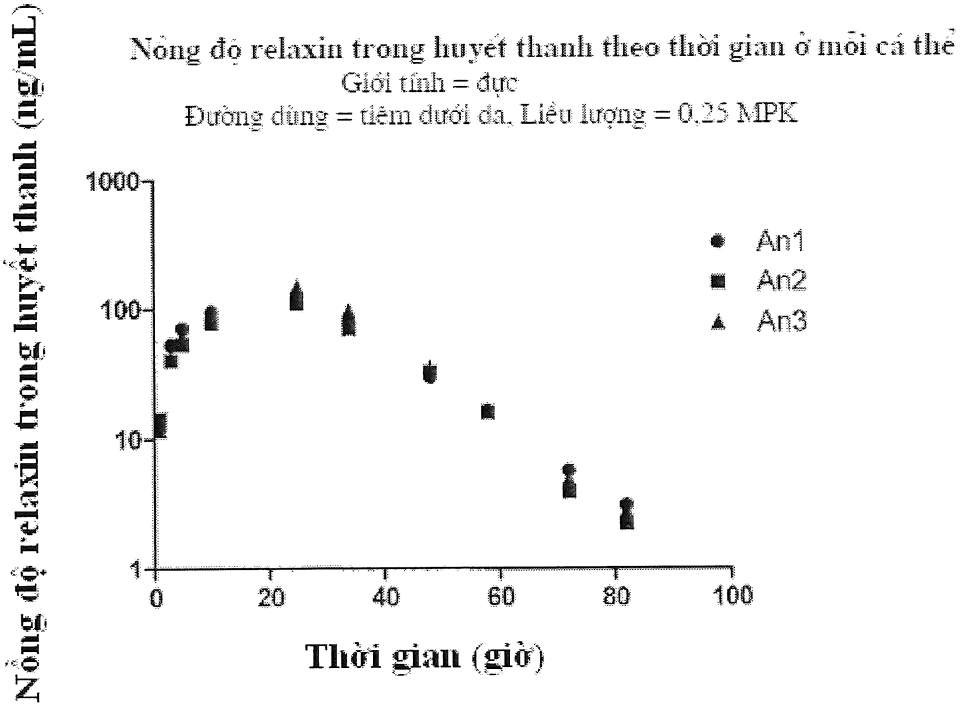


Fig.14B

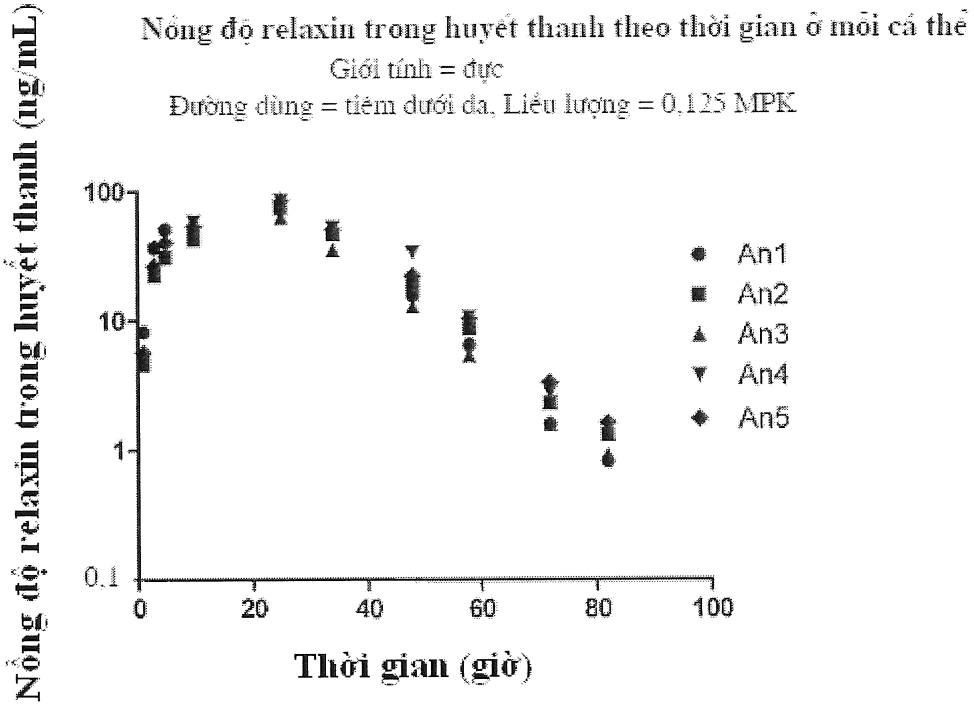

Nồng độ relaxin trong huyết thanh theo thời gian ở mỗi cá thể
Giới tính = đực
Đường dùng = tiêm dưới da, Liều lượng = 0.125 MPK
Nồng độ relaxin trong huyết thanh (ng/mL)
100
10
1
0.1
0
20
40
60
80
100
Thời gian (giờ)
An1
An2
An3
An4
An5

Fig.15

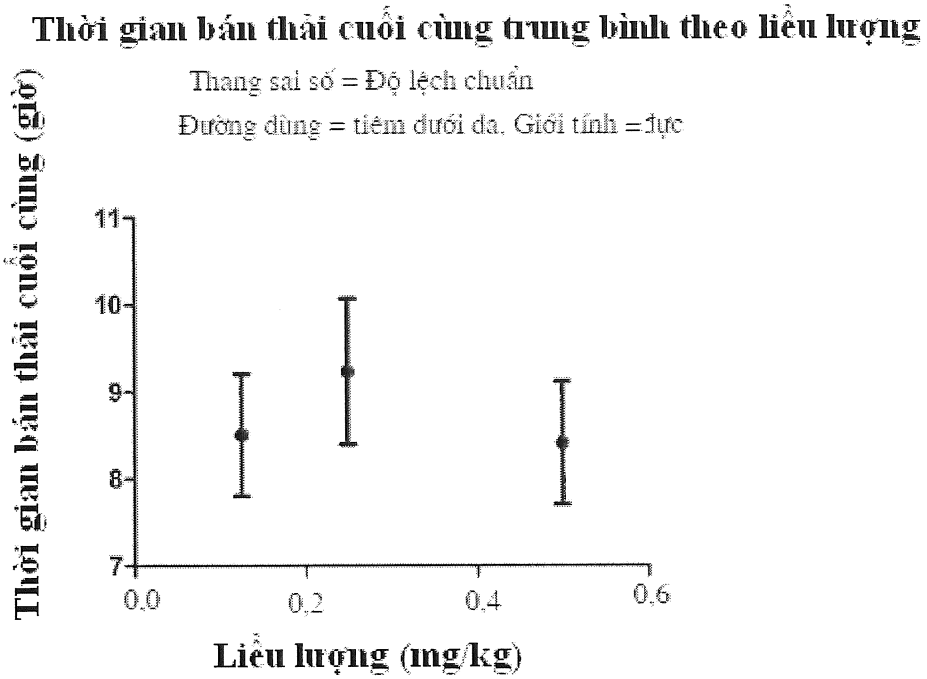


Fig.16A

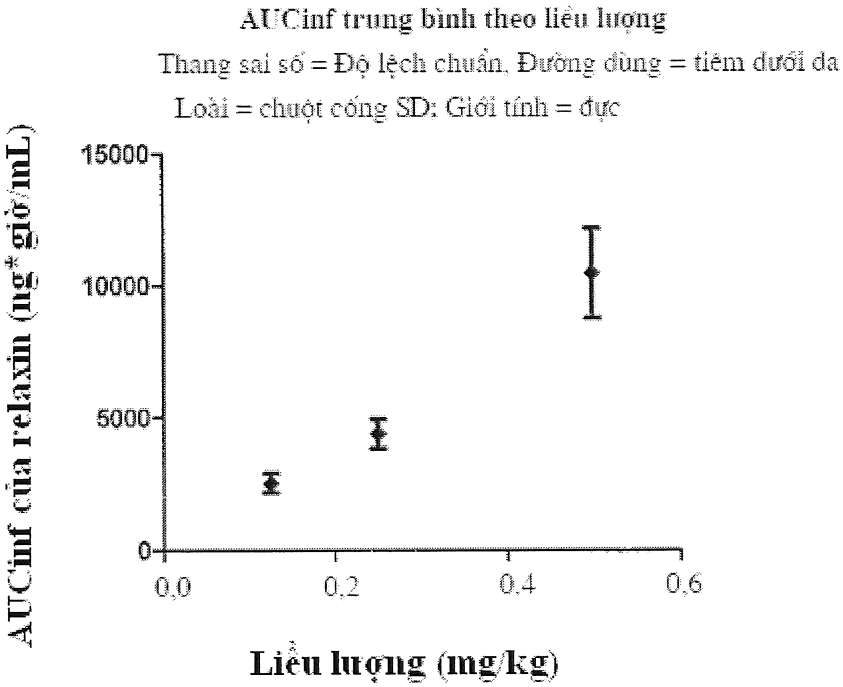


Fig.16B

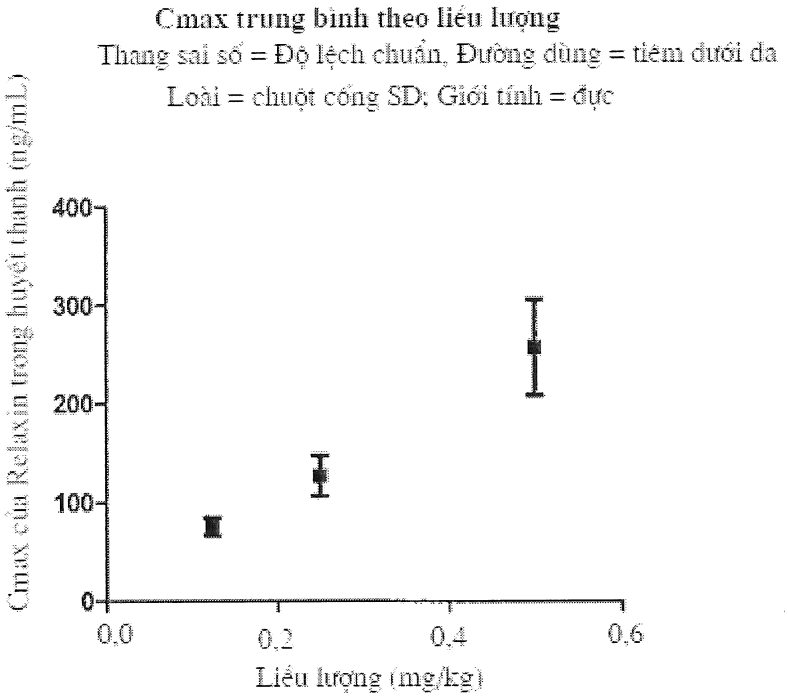


Fig.17A

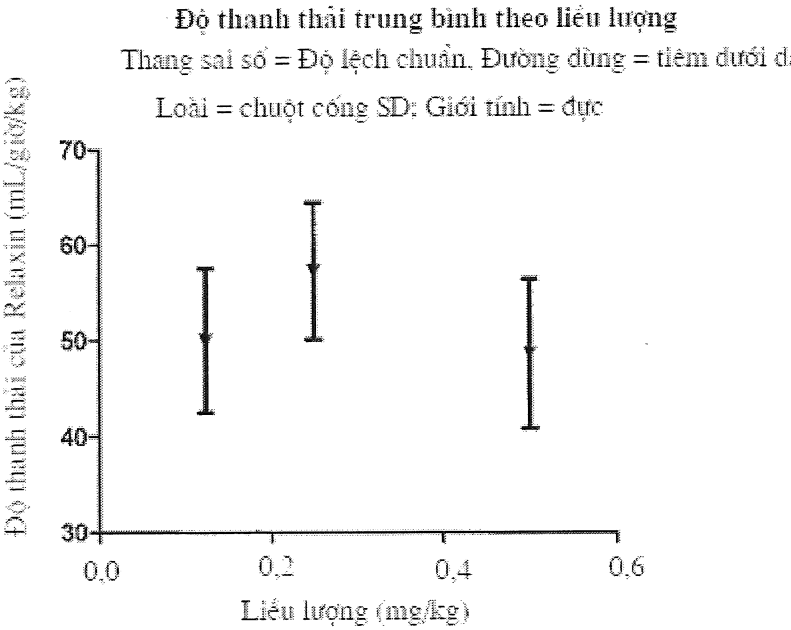


Fig.17B

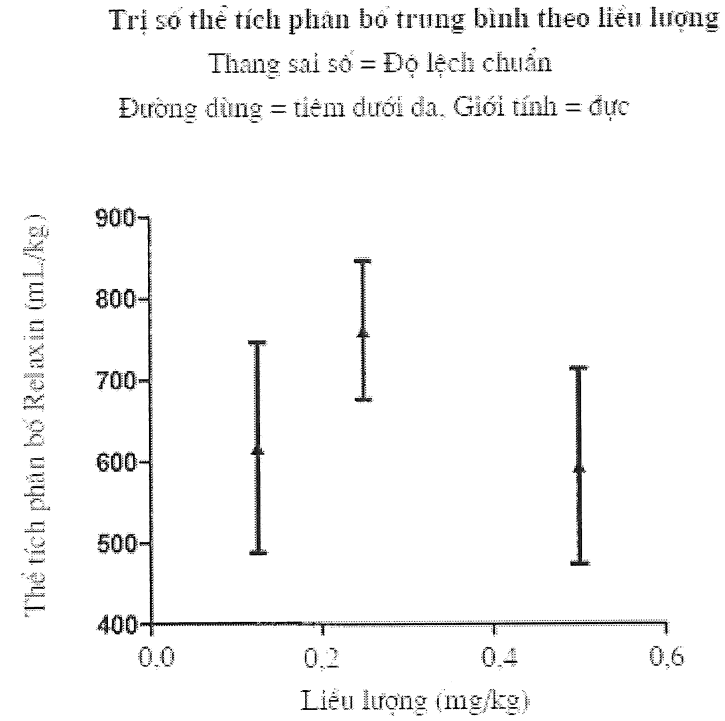


Fig.18A

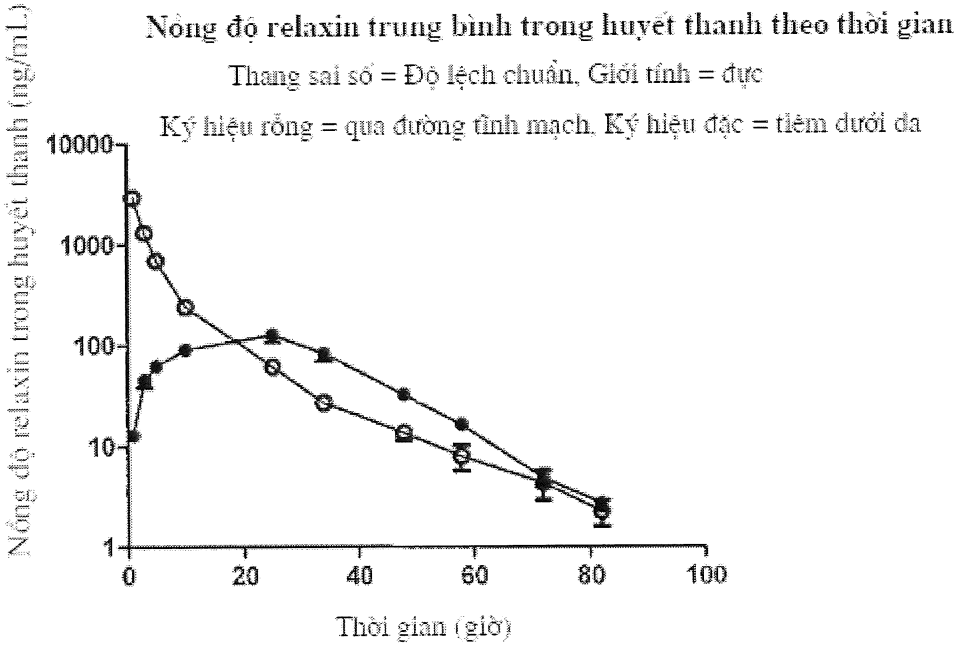


Fig.18B

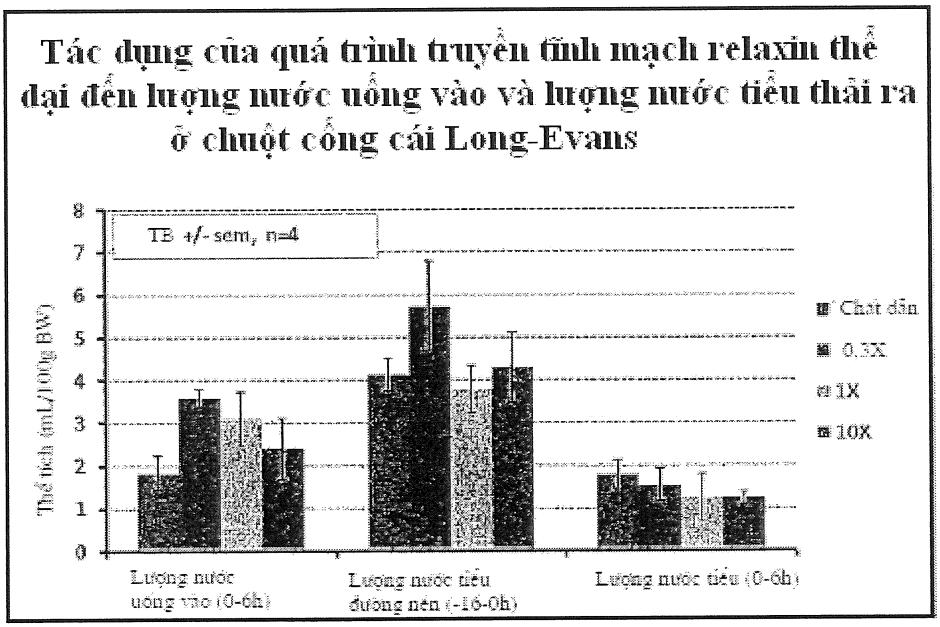


Fig.19A

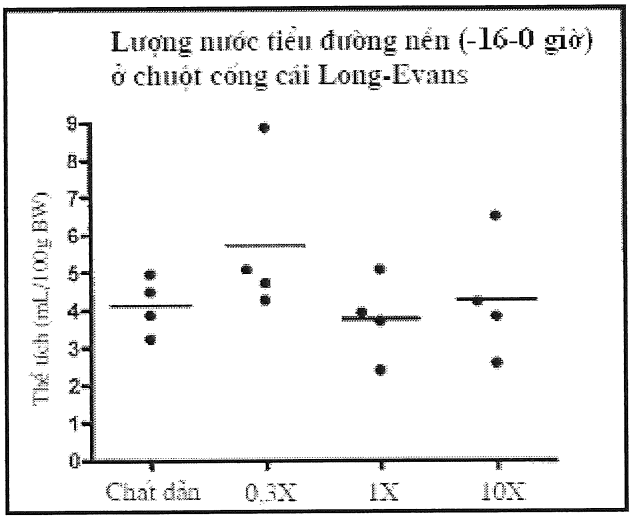


Fig.19B

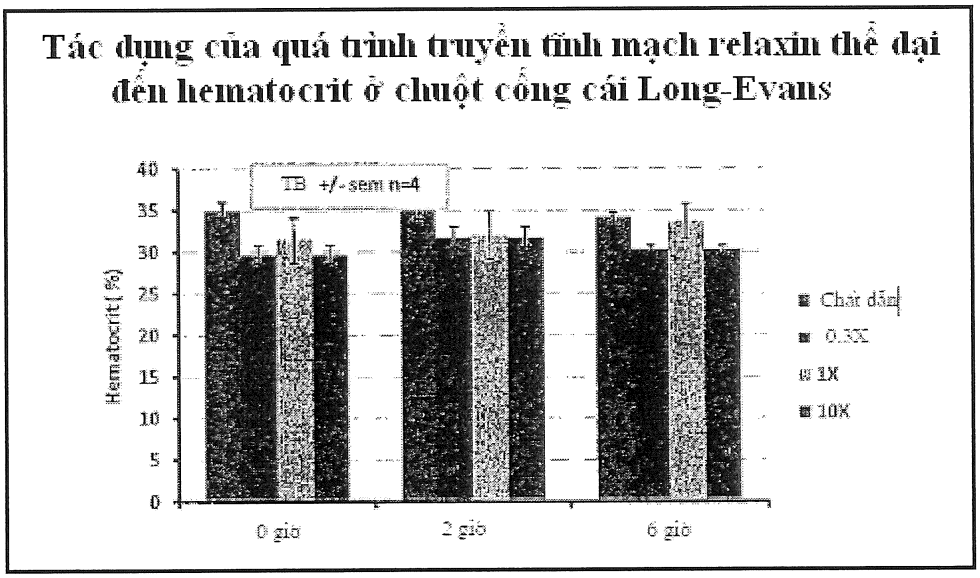


Fig.19C

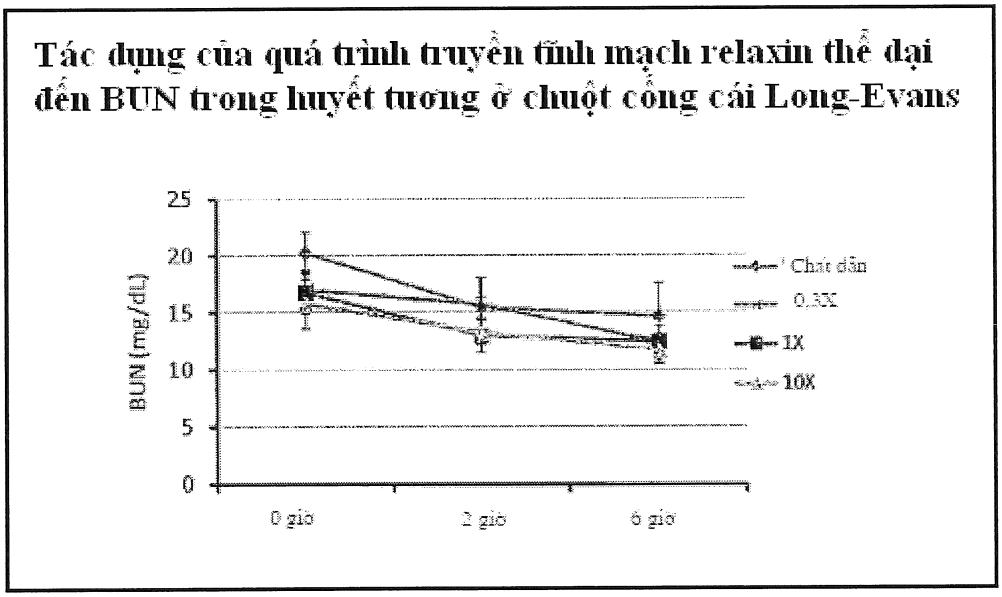


Fig.19D

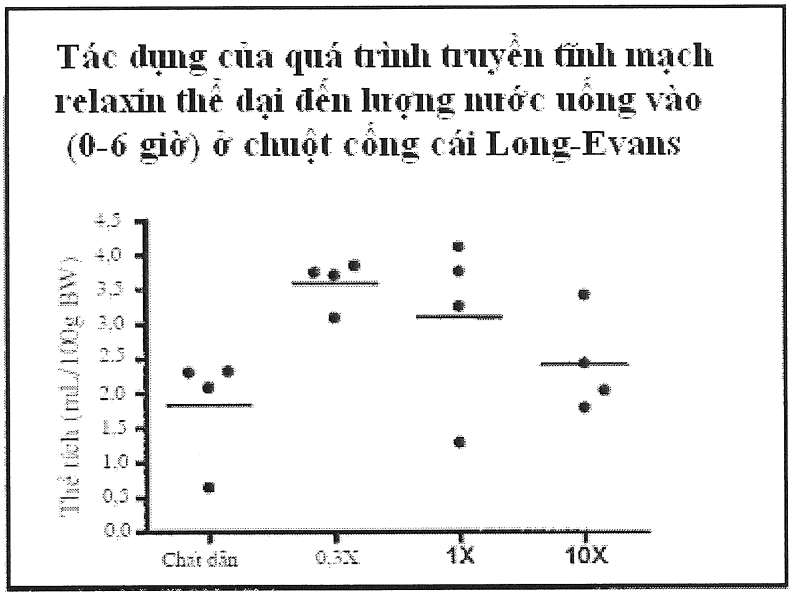


Fig.19E

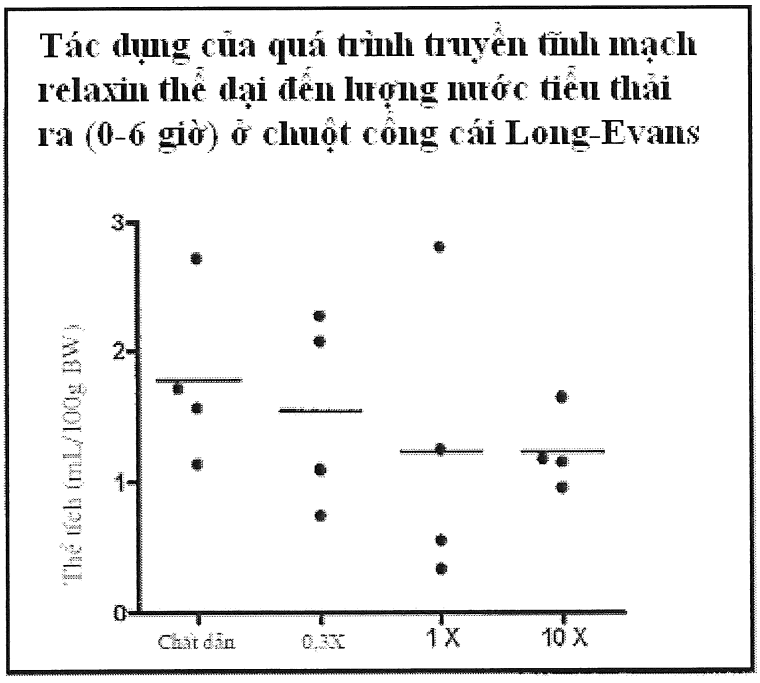


Fig.19F

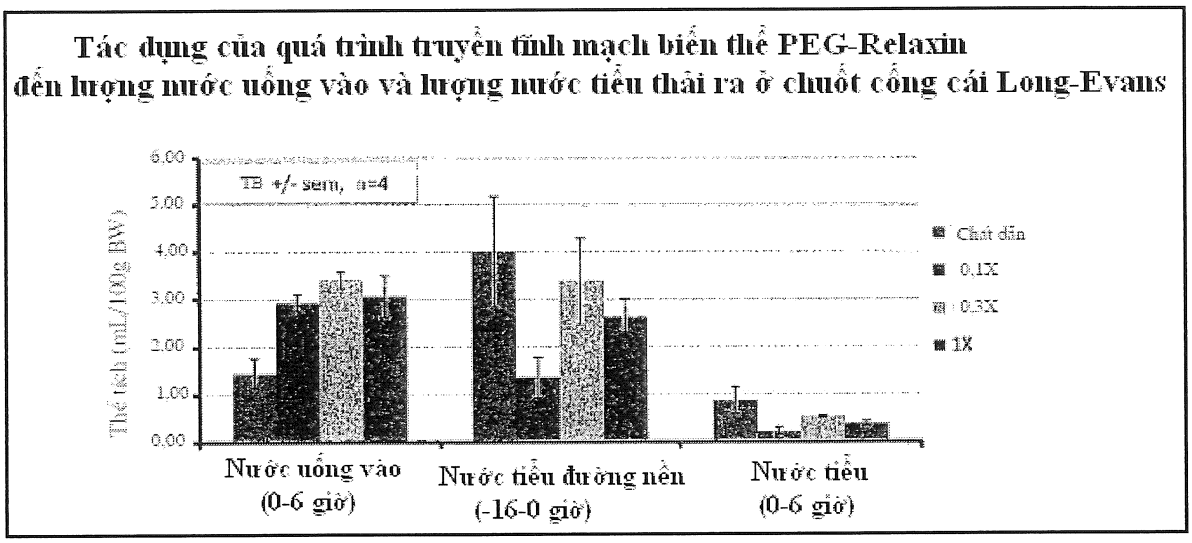


Fig.20A

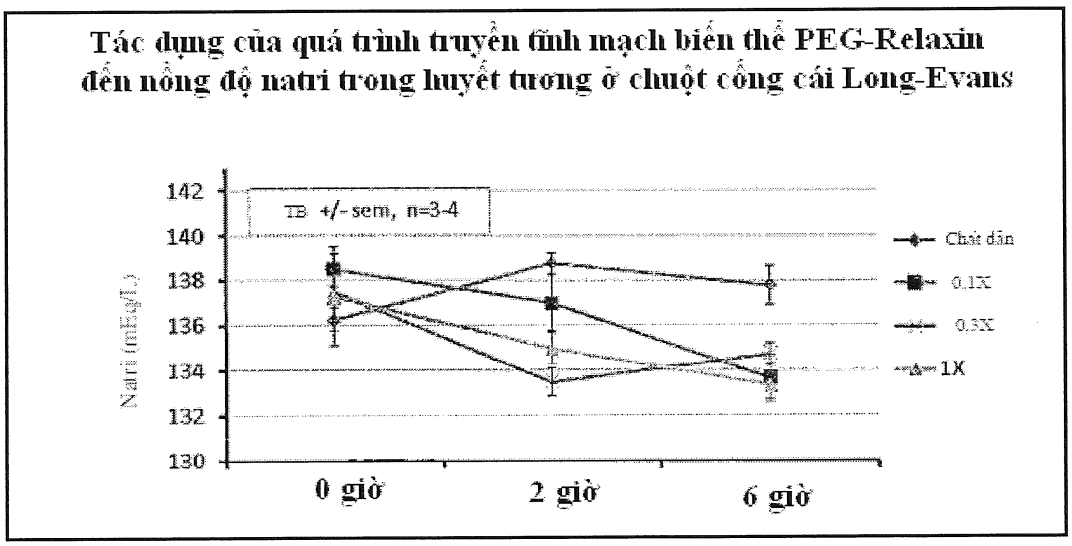


Fig.20B

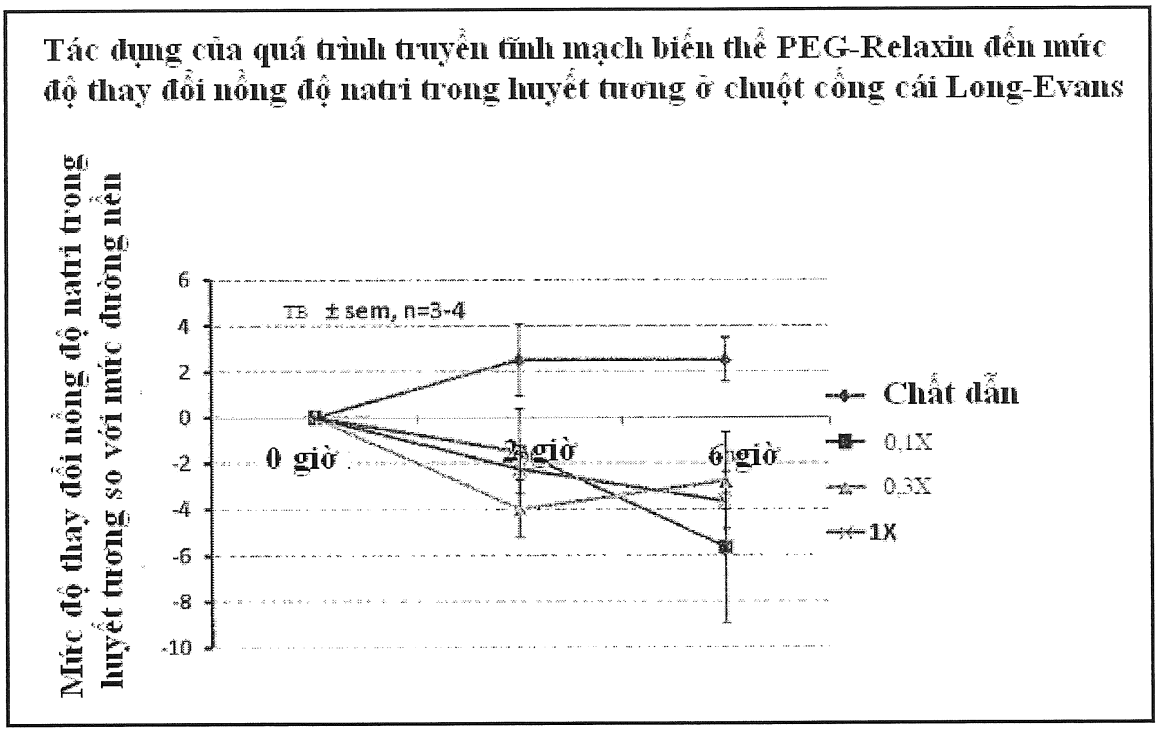


Fig.20C

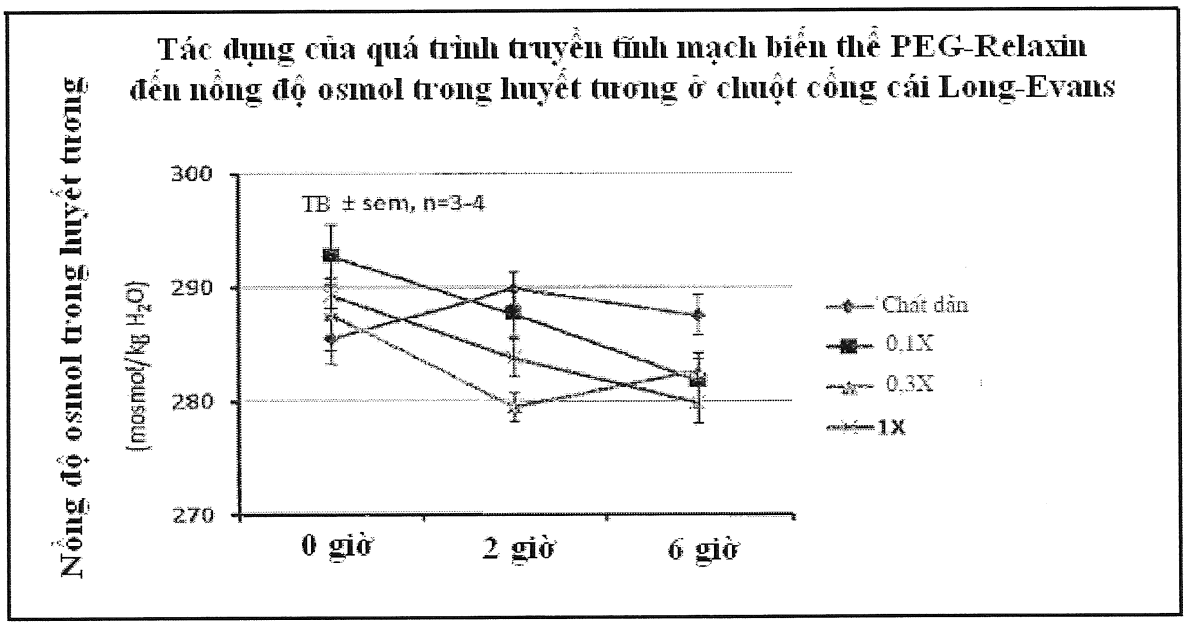


Fig.20D

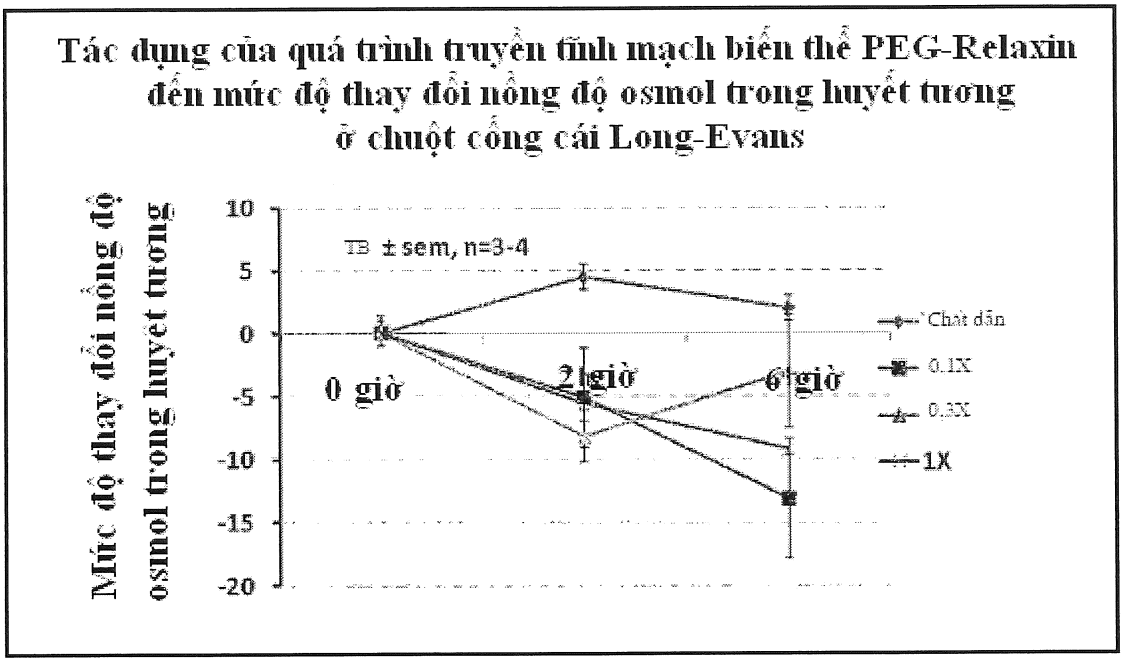


Fig.20E

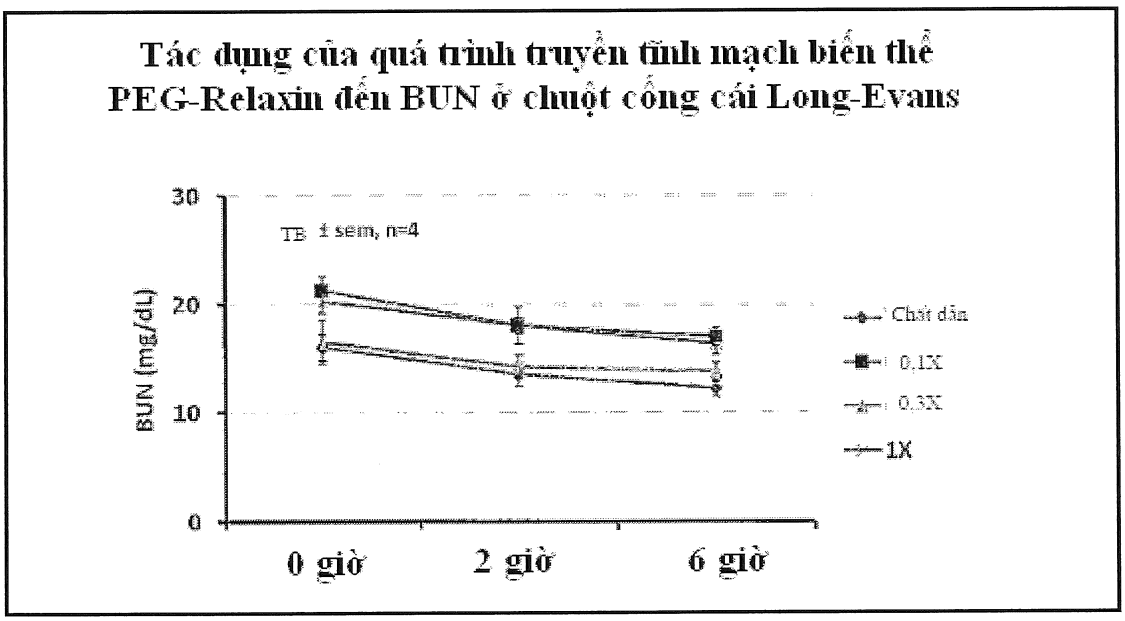


Fig.20F

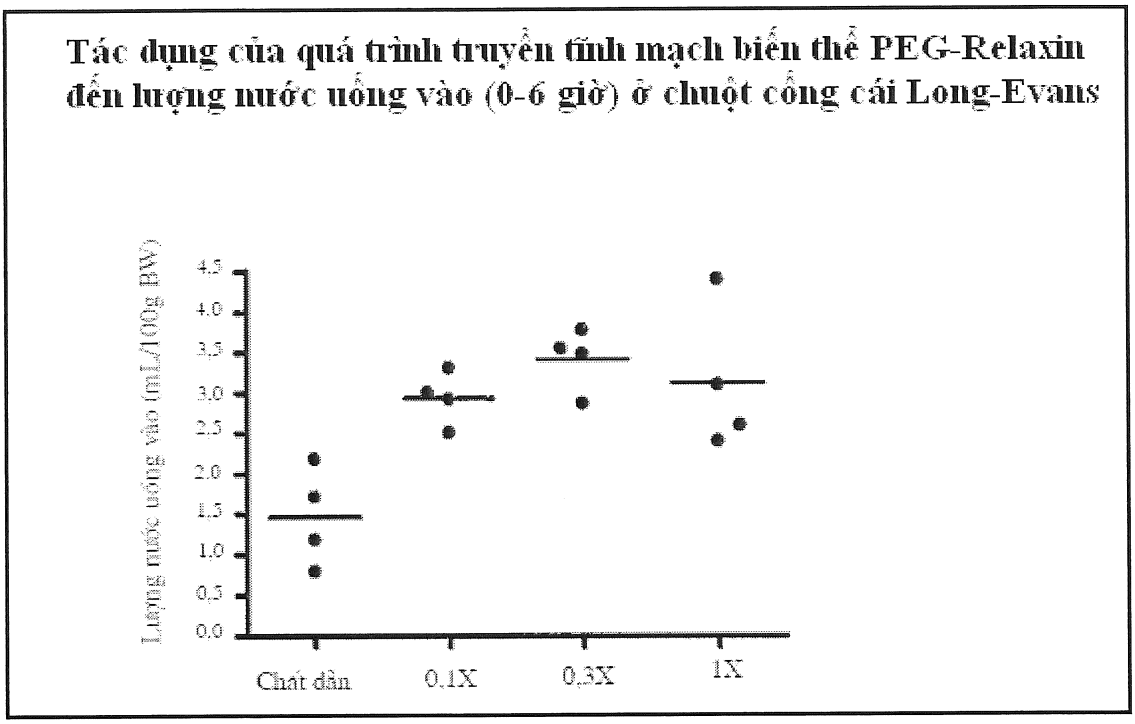


Fig.20G

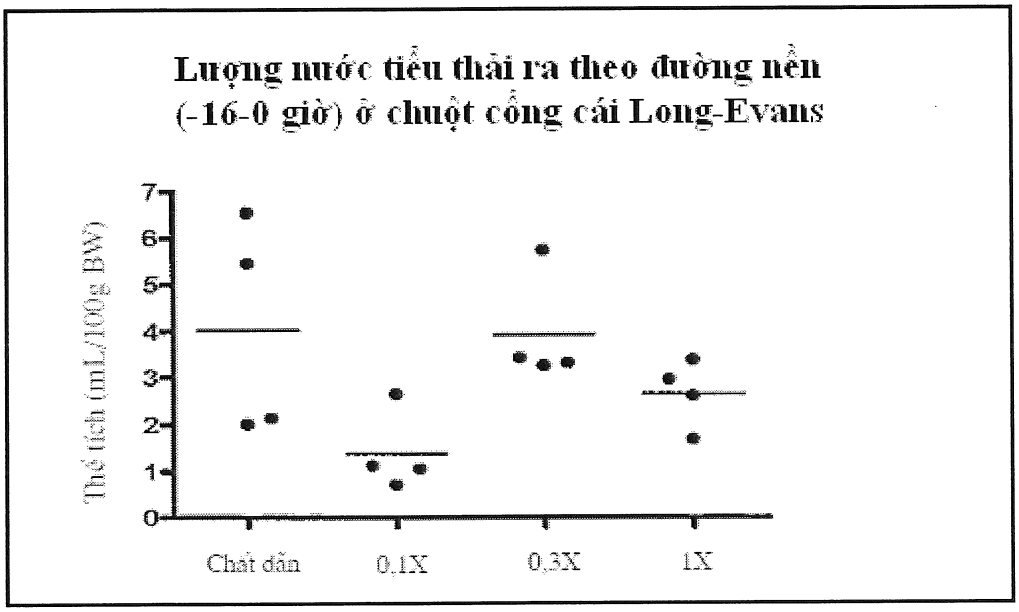


Fig.20H

Tác dụng của quá trình truyền tĩnh mạch biến thể PEG-Relaxin đến lượng nước tiểu thải ra (0-6 giờ) ở chuột cống cái Long-Evans

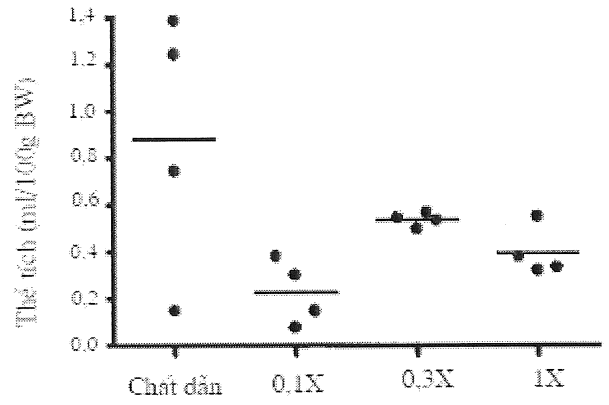


Fig.20I

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> AMBRX, INC.
<120> POLYPEPTIT RELAXIN ĐƯỢC CẢI BIẾN VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT POLYPEPTIT NÀY
<130> AMBX-0174.00PCT
<150> 61/374,582
<151> 2010-08-17
<160> 34
<170> PatentIn version 3.4
<210> 1
<211> 53
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 1

Gln Leu Tyr Ser Ala Leu Ala Asn Lys Cys Cys His Val Gly Cys Thr
1 5 10 15
Lys Arg Ser Leu Ala Arg Phe Cys Asp Ser Trp Met Glu Glu Val Ile
20 25 30
Lys Leu Cys Gly Arg Glu Leu Val Arg Ala Gln Ile Ala Ile Cys Gly
35 40 45
Met Ser Thr Trp Ser
50
<210> 2
<211> 53
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 2
Gln Leu Tyr Ser Ala Leu Ala Asn Lys Cys Cys His Val Gly Cys Thr
1 5 10 15
Lys Arg Ser Leu Ala Arg Phe Cys Ala Ser Trp Met Glu Glu Val Ile
20 25 30
Lys Leu Cys Gly Arg Glu Leu Val Arg Ala Gln Ile Ala Ile Cys Gly
35 40 45
Met Ser Thr Trp Ser
50
<210> 3
<211> 88
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 3
Asp Ser Trp Met Glu Glu Val Ile Lys Leu Cys Gly Arg Glu Leu Val
1 5 10 15
Arg Ala Gln Ile Ala Ile Cys Gly Met Ser Thr Trp Ser Arg Arg Glu
20 25 30
Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly
35 40 45
Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg
50 55 60
Gln Leu Tyr Ser Ala Leu Ala Asn Lys Cys Cys His Val Gly Cys Thr
65 70 75 80
Lys Arg Ser Leu Ala Arg Phe Cys
85
<210> 4
<211> 24
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 4
Gln Leu Tyr Ser Ala Leu Ala Asn Lys Cys Cys His Val Gly Cys Thr
1 5 10 15
Lys Arg Ser Leu Ala Arg Phe Cys
20
<210> 5
<211> 29
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 5
Asp Ser Trp Met Glu Glu Val Ile Lys Leu Cys Gly Arg Glu Leu Val
1 5 10 15
Arg Ala Gln Ile Ala Ile Cys Gly Met Ser Thr Trp Ser
20 25
<210> 6
<211> 29
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 6
Ala Ser Trp Met Glu Glu Val Ile Lys Leu Cys Gly Arg Glu Leu Val
1 5 10 15
Arg Ala Gln Ile Ala Ile Cys Gly Met Ser Thr Trp Ser
20 25
<210> 7
<211> 35
<212> PRT

<213> Homo sapiens
<400> 7
Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly
1 5 10 15
Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu
20 25 30
Gln Lys Arg
35
<210> 8
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 8
Met Lys Lys Asn Ile Ala Phe Leu Leu Lys Arg
1 5 10
<210> 9
<211> 6
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 9
Met Ile Glu Gly Gly Arg
1 5
<210> 10
<211> 72
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 10
caactctaca gtgcattggc taataaatgt tgccatgttg gttgtaccaa aagatctctt 60
gctagatttt gc 72
<210> 11
<211> 87
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 11
gactcatgga tggaggaagt tattaaatta tgcggccgcg aattagttcg cgcgcagatt 60
gccatttgcg gcatgagcac ctggagc 87
<210> 12
<211> 159
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 12
caactctaca gtgcattggc taataaatgt tgccatgttg gttgtaccaa aagatctctt 60
gctagatttt gcgactcatg gatggaggaa gttattaaat tatgcggccg cgaattagtt 120
cgcgcgcaga ttgccatttg cggcatgagc acctggagc 159
<210> 13
<211> 33
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 13
atgaaaaaga atatcgcatt tcttcttaaa cgg 33
<210> 14
<211> 18
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 14
atgattgaag gtggtcgt 18
<210> 15
<211> 94
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 15
Met Ile Glu Gly Gly Arg Asp Ser Trp Met Glu Glu Val Ile Lys Leu
1 5 10 15
Cys Gly Arg Glu Leu Val Arg Ala Gln Ile Ala Ile Cys Gly Met Ser
20 25 30
Thr Trp Ser Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu
35 40 45
Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu
50 55 60
Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gln Leu Tyr Ser Ala Leu Ala Asn Lys Cys
65 70 75 80
Cys His Val Gly Cys Thr Lys Arg Ser Leu Ala Arg Phe Cys
85 90
<210> 16
<211> 306
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Synthetaza đột biến có nguồn gốc từ synthetaza của Methanococcus jannaschii
<400> 16
Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser
1 5 10 15
Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Val
20 25 30
Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln

```
        35                  40                  45
Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile
    50                  55                  60
Tyr Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp
65                  70                  75                  80
Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met
                85                  90                  95
Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Glu His Gly Leu Asp Lys
            100                 105                 110
Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys
        115                 120                 125
Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro
    130                 135                 140
Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Gly Ile His
145                 150                 155                 160
Tyr Glu Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile
                165                 170                 175
His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His
            180                 185                 190
Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser
        195                 200                 205
Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala
    210                 215                 220
Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro
225                 230                 235                 240
Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys
                245                 250                 255
Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu
            260                 265                 270
Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys
        275                 280                 285
Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys
    290                 295                 300
Arg Leu
305
<210>  17
<211>  77
<212>  ADN
<213>  Trình tự nhân tạo
<220>
<223>  ARN vận chuyển đột biến có nguồn gốc từ ARN vận chuyển của Methanococcus jannaschii
<400>  17
ccggcggtag ttcagcaggg cagaacggcg gactctaaat ccgcatggcg ctggttcaaa      60
tccagcccgc cggacca                                                    77
<210>  18
<211>  77
<212>  ADN
<213>  Methanococcus jannaschii
<400>  18
ccggcggtag ttcagcaggg cagaacggcg gactctaaat ccgcatggcg ctggttcaaa      60
tccggcccgc cggacca                                                    77
<210>  19
<211>  88
<212>  ADN
<213>  Trình tự nhân tạo
<220>
<223>  ARN vận chuyển ức chế amber đã được tối ưu hóa
<400>  19
cccagggtag ccaagctcgg ccaacggcga cggactctaa atccgttctc gtaggagttc      60
gagggttcga atcccttccc tgggacca                                        88
<210>  20
<211>  89
<212>  ADN
<213>  Trình tự nhân tạo
<220>
<223>  ARN vận chuyển ức chế dịch chuyển khung AGGA đã được tối ưu hóa
<400>  20
gcgagggtag ccaagctcgg ccaacggcga cggacttcct aatccgttct cgtaggagtt      60
cgagggttcg aatccctccc ctcgcacca                                       89
<210>  21
<211>  306
<212>  PRT
<213>  Trình tự nhân tạo
<220>
<223>  Aminoaxyl ARN vận chuyển synthetaza để kết hợp p-aziđo-L-phenylalanin
<400>  21
Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser
1               5                   10                  15
Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Gly
            20                  25                  30
Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln
        35                  40                  45
Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile
    50                  55                  60
Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp
```

65 70 75 80
Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met
85 90 95
Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Thr Phe Gln Leu Asp Lys
100 105 110
Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys
115 120 125
Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro
130 135 140
Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Thr Tyr Tyr
145 150 155 160
Tyr Leu Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile
165 170 175
His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His
180 185 190
Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser
195 200 205
Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala
210 215 220
Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro
225 230 235 240
Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys
245 250 255
Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu
260 265 270
Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys
275 280 285
Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys
290 295 300
Arg Leu
305

<210> 22
<211> 306
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Aminoaxyl ARN vận chuyển synthetaza để kết hợp p-benzoyl-L-phenylalanin

<400> 22
Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser
1 5 10 15
Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Gly
20 25 30
Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln
35 40 45
Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile
50 55 60
Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp
65 70 75 80
Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met
85 90 95
Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Ser Phe Gln Leu Asp Lys
100 105 110
Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys
115 120 125
Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro
130 135 140
Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Thr Ser His
145 150 155 160
Tyr Leu Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile
165 170 175
His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His
180 185 190
Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser
195 200 205
Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala
210 215 220
Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro
225 230 235 240
Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys
245 250 255
Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu
260 265 270
Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys
275 280 285
Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys
290 295 300
Arg Leu
305

<210> 23
<211> 305
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Aminoaxyl ARN vận chuyển synthetaza để kết hợp propargyl-phenylalanin

<400> 23
Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser
1 5 10 15
Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Ala
20 25 30
Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln
35 40 45
Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile
50 55 60
Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp
65 70 75 80
Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met
85 90 95
Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Pro Phe Gln Leu Asp Lys
100 105 110
Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys
115 120 125
Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro
130 135 140
Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Ala Ile Tyr
145 150 155 160
Leu Ala Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile His
165 170 175
Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His Asn
180 185 190
Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser Lys
195 200 205
Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala Lys
210 215 220
Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro Ile
225 230 235 240
Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys Arg
245 250 255
Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu Leu
260 265 270
Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys Asn
275 280 285
Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys Arg
290 295 300
Leu
305
<210> 24
<211> 305
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Aminoaxyl ARN vận chuyển synthetaza để kết hợp propargyl-phenylalanin
<400> 24
Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser
1 5 10 15
Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Ala
20 25 30
Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln
35 40 45
Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile
50 55 60
Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp
65 70 75 80
Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met
85 90 95
Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Pro Phe Gln Leu Asp Lys
100 105 110
Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys
115 120 125
Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro
130 135 140
Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Ile Pro Tyr
145 150 155 160
Leu Pro Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile His
165 170 175
Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His Asn
180 185 190
Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser Lys
195 200 205
Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala Lys
210 215 220
Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro Ile
225 230 235 240
Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys Arg
245 250 255
Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu Leu
260 265 270
Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys Asn
275 280 285

```
Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys Arg
    290                 295                 300
Leu
305
<210>  25
<211>  305
<212>  PRT
<213>  Trình tự nhân tạo
<220>
<223>  Aminoaxyl ARN vận chuyển synthetaza để kết hợp propargyl-phenylalanin
<400>  25
Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser
1               5                  10                  15
Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Ala
            20                  25                  30
Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln
        35                  40                  45
Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile
    50                  55                  60
Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp
65                  70                  75                  80
Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met
                85                  90                  95
Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Lys Phe Gln Leu Asp Lys
            100                 105                 110
Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys
        115                 120                 125
Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro
    130                 135                 140
Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Ala Ile Tyr
145                 150                 155                 160
Leu Ala Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile His
                165                 170                 175
Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His Asn
            180                 185                 190
Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser Lys
        195                 200                 205
Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala Lys
    210                 215                 220
Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro Ile
225                 230                 235                 240
Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys Arg
                245                 250                 255
Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu Leu
            260                 265                 270
Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys Asn
        275                 280                 285
Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys Arg
    290                 295                 300
Leu
305
<210>  26
<211>  306
<212>  PRT
<213>  Trình tự nhân tạo
<220>
<223>  Aminoaxyl ARN vận chuyển synthetaza để kết hợp p-aziđo-phenylalanin
<400>  26
Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser
1               5                  10                  15
Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Thr
            20                  25                  30
Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln
        35                  40                  45
Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile
    50                  55                  60
Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp
65                  70                  75                  80
Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met
                85                  90                  95
Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Asn Phe Gln Leu Asp Lys
            100                 105                 110
Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys
        115                 120                 125
Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro
    130                 135                 140
Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Pro Leu His
145                 150                 155                 160
Tyr Gln Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile
                165                 170                 175
His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His
            180                 185                 190
Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser
        195                 200                 205
```

Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala
210 215 220
Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro
225 230 235 240
Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys
245 250 255
Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu
260 265 270
Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys
275 280 285
Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys
290 295 300
Arg Leu
305

<210> 27
<211> 306
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Aminoaxyl ARN vận chuyển synthetaza để kết hợp p-azido-phenylalanin
<400> 27
Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser
1 5 10 15
Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Thr
20 25 30
Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln
35 40 45
Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile
50 55 60
Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp
65 70 75 80
Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met
85 90 95
Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Ser Phe Gln Leu Asp Lys
100 105 110
Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys
115 120 125
Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro
130 135 140
Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Pro Leu His
145 150 155 160
Tyr Gln Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile
165 170 175
His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His
180 185 190
Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser
195 200 205
Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala
210 215 220
Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro
225 230 235 240
Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys
245 250 255
Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu
260 265 270
Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys
275 280 285
Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys
290 295 300
Arg Leu
305

<210> 28
<211> 306
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Aminoaxyl ARN vận chuyển synthetaza để kết hợp p-azido-phenylalanin
<400> 28
Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser
1 5 10 15
Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Leu
20 25 30
Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln
35 40 45
Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile
50 55 60
Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp
65 70 75 80
Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met
85 90 95
Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Thr Phe Gln Leu Asp Lys
100 105 110
Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys
115 120 125

```
Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro
    130                 135                 140
Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Pro Val His
145                 150                 155                 160
Tyr Gln Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile
                165                 170                 175
His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His
            180                 185                 190
Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser
        195                 200                 205
Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala
    210                 215                 220
Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro
225                 230                 235                 240
Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys
                245                 250                 255
Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu
            260                 265                 270
Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys
        275                 280                 285
Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys
    290                 295                 300
Arg Leu
305
<210>  29
<211>  306
<212>  PRT
<213>  Trình tự nhân tạo
<220>
<223>  Aminoaxyl ARN vận chuyển synthetaza để kết hợp p-aziđo-phenylalanin
<400>  29
Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser
1                 5                  10                  15
Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Thr
            20                  25                  30
Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln
        35                  40                  45
Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile
    50                  55                  60
Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp
65                  70                  75                  80
Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met
                85                  90                  95
Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Ser Phe Gln Leu Asp Lys
            100                 105                 110
Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys
        115                 120                 125
Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro
    130                 135                 140
Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Pro Ser His
145                 150                 155                 160
Tyr Gln Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile
                165                 170                 175
His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His
            180                 185                 190
Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser
        195                 200                 205
Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala
    210                 215                 220
Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro
225                 230                 235                 240
Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys
                245                 250                 255
Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu
            260                 265                 270
Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys
        275                 280                 285
Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys
    290                 295                 300
Arg Leu
305
<210>  30
<211>  306
<212>  PRT
<213>  Trình tự nhân tạo
<220>
<223>  Aminoaxyl ARN vận chuyển synthetaza để kết hợp p-axetyl-phenylalanin
<400>  30
Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser
1                 5                  10                  15
Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Leu
            20                  25                  30
Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln
        35                  40                  45
```

```
Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile
    50                  55                  60
Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp
65                  70                  75                  80
Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met
                85                  90                  95
Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Glu Phe Gln Leu Asp Lys
            100                 105                 110
Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys
        115                 120                 125
Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro
    130                 135                 140
Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Gly Cys His
145                 150                 155                 160
Tyr Arg Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile
                165                 170                 175
His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His
            180                 185                 190
Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser
        195                 200                 205
Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala
    210                 215                 220
Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro
225                 230                 235                 240
Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys
                245                 250                 255
Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu
            260                 265                 270
Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys
        275                 280                 285
Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys
    290                 295                 300
Arg Leu
305
<210>  31
<211>  306
<212>  PRT
<213>  Trình tự nhân tạo
<220>
<223>  Aminoaxyl ARN vận chuyển synthetaza để kết hợp p-axetyl-phenylalanin
<400>  31
Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser
1               5                   10                  15
Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Leu
            20                  25                  30
Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln
        35                  40                  45
Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile
    50                  55                  60
Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp
65                  70                  75                  80
Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met
                85                  90                  95
Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Glu Phe Gln Leu Asp Lys
            100                 105                 110
Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys
        115                 120                 125
Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro
    130                 135                 140
Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Gly Thr His
145                 150                 155                 160
Tyr Arg Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile
                165                 170                 175
His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His
            180                 185                 190
Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser
        195                 200                 205
Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala
    210                 215                 220
Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro
225                 230                 235                 240
Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys
                245                 250                 255
Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu
            260                 265                 270
Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys
        275                 280                 285
Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys
    290                 295                 300
Arg Leu
305
<210>  32
<211>  306
<212>  PRT
```

<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Aminoaxyl ARN vận chuyển synthetaza để kết hợp p-axetyl-phenylalanin
<400> 32
Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser
1 5 10 15
Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Ala
20 25 30
Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln
35 40 45
Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile
50 55 60
Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp
65 70 75 80
Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met
85 90 95
Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Glu Phe Gln Leu Asp Lys
100 105 110
Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys
115 120 125
Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro
130 135 140
Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Gly Gly His
145 150 155 160
Tyr Leu Gly Val Asp Val Ile Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile
165 170 175
His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His
180 185 190
Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser
195 200 205
Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala
210 215 220
Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro
225 230 235 240
Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys
245 250 255
Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu
260 265 270
Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys
275 280 285
Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys
290 295 300
Arg Leu
305
<210> 33
<211> 306
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Aminoaxyl ARN vận chuyển synthetaza để kết hợp p-azido-phenylalanin
<400> 33
Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser
1 5 10 15
Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Ala
20 25 30
Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln
35 40 45
Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile
50 55 60
Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp
65 70 75 80
Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met
85 90 95
Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Arg Phe Gln Leu Asp Lys
100 105 110
Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys
115 120 125
Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro
130 135 140
Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Val Ile His
145 150 155 160
Tyr Asp Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile
165 170 175
His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His
180 185 190
Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser
195 200 205
Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala
210 215 220
Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro
225 230 235 240
Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys
245 250 255
Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu
260 265 270

```
Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys
        275                 280                 285
Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys
    290                 295                 300
Arg Leu
305
<210>  34
<211>  306
<212>  PRT
<213>  Trình tự nhân tạo
<220>
<223>  Aminoaxyl ARN vận chuyển synthetaza để kết hợp p-aziđo-phenylalanin
<400>  34
Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser
1               5                   10                  15
Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Gly
            20                  25                  30
Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln
        35                  40                  45
Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile
    50                  55                  60
Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp
65                  70                  75                  80
Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met
                85                  90                  95
Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Thr Phe Gln Leu Asp Lys
            100                 105                 110
Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys
        115                 120                 125
Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro
    130                 135                 140
Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Thr Tyr Tyr
145                 150                 155                 160
Tyr Leu Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile
                165                 170                 175
His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His
            180                 185                 190
Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser
        195                 200                 205
Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala
    210                 215                 220
Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro
225                 230                 235                 240
Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys
                245                 250                 255
Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu
            260                 265                 270
Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys
        275                 280                 285
Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys
    290                 295                 300
Arg Leu
305
```