



(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)



1-0045741

(51)^{2017.01} C07K 16/00; C07K 5/02; A61K 38/22; (13) B
A61K 39/00; A61K 45/06; A61K 47/60;
A61K 47/64; A61K 47/68; A61K 49/00;
A61P 3/00; A61P 3/04; A61P 3/06;
A61P 3/08; A61P 3/10; C07K 1/12;
C07K 1/18; C07K 14/575; C07K 16/24;
A61K 38/00; A61K 38/17

(21) 1-2019-02757

(22) 26/10/2017

(67) 2-2019-00181

(86) PCT/US2017/058462 26/10/2017

(87) WO/2018/081375 03/05/2018

(30) 62/413,613 27/10/2016 US; 62/413,586 27/10/2016 US

(45) 26/05/2025 446

(43) 25/10/2019 379A

(73) Janssen Pharmaceutica NV (BE)

Turnhoutseweg 30, B-2340 Beerse, BE

(72) MACIELAG, Mark (US); PATCH, Raymond, J. (US); ZHANG, Rui (CN); CASE, Martin, A. (GB); WALL, Mark (CA); ZHANG, Yue-Mei (US); RANGWALA, Shamina, M. (US); LEONARD, James, N. (US); CAMACHO, Raul, C. (US); HUNTER, Michael, J. (US); D'AQUINO, Katharine, E. (US); EDWARDS, Wilson (US); SWANSON, Ronald V. (US); JIAN, Wenying (CN); CHI, Ellen (US).

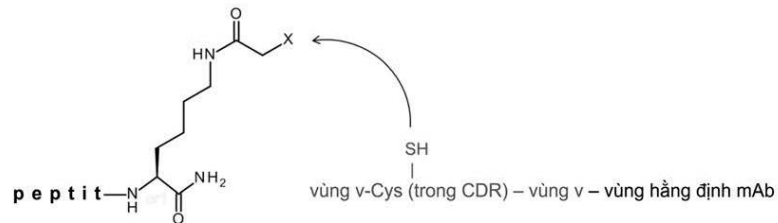
(74) Công ty Cổ phần Sở hữu công nghiệp INVESTIP (INVESTIP)

(54) KHÁNG THỂ ĐƠN DÒNG, LIÊN HỢP KHÁNG THỂ, VÀ DƯỢC PHẨM BAO GỒM LIÊN HỢP NÀY

(21) 1-2019-02757

(57) Sáng chế đề cập đến nền kháng thể đơn dòng được thiết kế để ghép với peptit điều trị để tăng thời gian bán thải của peptit điều trị ở đối tượng. Sáng chế cũng đề cập đến thể liên hợp kháng thể và dược phẩm bao gồm thể liên hợp này.

Hình 1



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế nhìn chung đề cập đến kháng thể mới hoặc mảnh của chúng, và việc sử dụng chúng làm chất mang để được ghép với peptit điều trị để tăng thời gian bán thải của peptit điều trị *trong cơ thể sống*. Sáng chế cũng đề cập đến các chế phẩm được và các phương pháp sử dụng chúng.

Tham chiếu danh sách liệt kê trình tự được nộp bằng đường điện tử

Đơn xin cấp bằng sáng chế này bao gồm danh sách liệt kê trình tự được nộp bằng đường điện tử qua EFS-Web theo định dạng ASCII với tên tập tin là “PRD3459 Sequence Listing” (“Danh sách liệt kê trình tự PRD3411”) và ngày tạo là 23 tháng 10 năm 2017, dung lượng 20 kb. Danh sách liệt kê trình tự nộp qua EFS-Web là một phần của bản mô tả và sau đây được kết hợp toàn bộ vào đây bằng viện dẫn. Trong trường hợp có bất kỳ sự thiếu nhất quán nào xảy ra với cấu trúc có các SỐ ID TRÌNH TỰ: 1-27 giữa thông tin được mô tả trong bản mô tả này và danh sách liệt kê trình tự được nộp bằng đường điện tử qua EFS-Web có tiêu đề “PRD3459 Sequence Listing”, thông tin trong bản mô tả này sẽ được sử dụng.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các thuốc điều trị nền peptit thường được phát hiện và phát triển do chúng có thể cung cấp tính đặc hiệu và tính chọn lọc, như đã được minh chứng bằng nhiều thuốc điều trị nền peptit đã được phê chuẩn, nhưng các cách sử dụng chúng bị hạn chế bởi thời gian bán thải *trong cơ thể sống* của chúng tương đối ngắn. Có rất nhiều phương pháp làm kéo dài thời gian bán thải được đánh giá và sử dụng với thuốc điều trị nền peptit. Kháng thể hoặc mảnh kháng thể đã được sử dụng làm phần kéo dài thời gian bán thải cho các phân hoạt tính được lý để ngăn ngừa hoặc giảm thiểu việc đào thải nhanh chóng các phân hoạt tính được lý *trong cơ thể sống*.

Cần có globulin miễn dịch được cải thiện để có thể được dùng làm các phần kéo dài thời gian bán thải không hoạt tính được lý cho các phân hoạt tính được lý, tốt hơn là thuốc điều trị nền peptit.

Phần trình bày trên đây chỉ nhằm giúp hiểu thêm về bản chất của các vấn đề tồn tại trong ngành, không nên hiểu là sự thừa nhận đối với kỹ thuật trước đây, cũng không nên cho rằng việc nêu tài liệu tham chiếu bất kỳ là sự thừa nhận rằng tài liệu tham chiếu đó cấu thành “kỹ thuật trước đây” đối với đơn xin cấp bằng sáng chế này.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Trong một phương án chung, sáng chế đề cập đến kháng thể đơn dòng được phân lập hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó bao gồm vùng xác định bổ sung chuỗi nặng 1 (HCDR1), HCDR2, HCDR3 và vùng xác định bổ sung chuỗi nhẹ 1 (LCDR1), LCDR2 và LCDR3, có các trình tự polypeptit có SỐ ID TRÌNH TỰ: lần lượt là 16, 17, 18, 19, 20 và 21.

Trong phương án ưu tiên, kháng thể đơn dòng được phân lập của sáng chế hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó bao gồm miền biến đổi chuỗi nặng (VH) có trình tự polypeptit có SỐ ID TRÌNH TỰ: 12 và miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) có trình tự polypeptit có SỐ ID TRÌNH TỰ: 14. Tốt hơn là, kháng thể đơn dòng được phân lập của sáng chế bao gồm chuỗi nặng (HC) có trình tự polypeptit có SỐ ID TRÌNH TỰ: 13 và chuỗi nhẹ (LC) có trình tự polypeptit có SỐ ID TRÌNH TỰ: 15.

Sáng chế cũng đề cập đến axit nucleic được phân lập mã hóa kháng thể đơn dòng của sáng chế hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó; vectơ, tốt hơn là vectơ biểu hiện, bao gồm axit nucleic; và tế bào chủ bao gồm vectơ. Sáng chế cũng cung cấp phương pháp sản xuất kháng thể đơn dòng được phân lập của sáng chế hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó, phương pháp bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ của sáng chế trong các điều kiện để có thể tạo ra kháng thể đơn dòng hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó, và bước thu hồi kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó từ tế bào hoặc quá trình nuôi cấy.

Các phương án của sáng chế bao gồm kháng thể đơn dòng của sáng chế hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó được tiếp hợp với ít nhất một phần hoạt tính dược lý, tốt hơn là peptit điều trị, trực tiếp hoặc thông qua cầu nối. Kháng thể đơn dòng của sáng chế hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó có thể được tiếp hợp với bất kỳ peptit điều trị nào. Các ví dụ về các peptit điều trị bao gồm, nhưng không giới hạn trong oxyntomodulin, peptit giống như glucagon 1 (GLP1), peptit tyrosin tyrosin (PYY), exendin (exenatide), amylin (pramlintide), hormon kích thích tế bào hắc tố alpha

(MSH), sản phẩm phiên mã điều hòa bởi cocain và chất kích thích (CART), chất đối kháng thụ thể neuropeptit Y Y1 (NPY1), chất đối kháng thụ thể neuropeptit Y Y5 (NPY5), neurotensin S, neuropeptit B, neuropeptit W, ghrelin, thụ thể giống bombesin 3 (BRS3), galanin, cholecystokinin (CCK), orexin, hormon tích tụ hắc tố (MCH), oxytocin, và stresscopin.

Sáng chế cũng cung cấp phương pháp sản xuất kháng thể đơn dòng của sáng chế hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó tiếp hợp với peptit điều trị, bao gồm bước cho phân tử ưa điện tử, tốt hơn là bromoaxetamit hoặc maleimit, được đưa vào mạch bên của peptit điều trị, phản ứng với nhóm sulfhydryl, tốt hơn là nhóm sulfhydryl có đơn phân xystein có SỐ ID TRÌNH TỰ: 18, của kháng thể đơn dòng hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó, từ đó tạo ra liên kết cộng hóa trị giữa peptit điều trị và kháng thể đơn dòng hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó.

Sáng chế cũng đề cập đến chế phẩm được bao gồm kháng thể đơn dòng của sáng chế hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó được tiếp hợp với ít nhất một phần hoạt tính dược lý, tốt hơn là peptit điều trị, trực tiếp hoặc thông qua cầu nối, và chất mang được dùng.

Phương án chung khác của sáng chế đề cập đến phương pháp làm tăng thời gian bán thải của peptit điều trị ở đối tượng, phương pháp bao gồm bước tiếp hợp peptit điều trị này với kháng thể đơn dòng hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó bao gồm vùng xác định bổ sung chuỗi nặng 1 (HCDR1), HCDR2, HCDR3 và vùng xác định bổ sung chuỗi nhẹ 1 (LCDR1), LCDR2 và LCDR3, có các trình tự polypeptit có SỐ ID TRÌNH TỰ: lần lượt là 16, 17, 18, 19, 20, và 21, trong đó peptit điều trị này được tiếp hợp với kháng thể đơn dòng hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó ở vị trí nhóm sulfhydryl, tốt hơn là nhóm sulfhydryl có đơn phân Cys có SỐ ID TRÌNH TỰ: 18.

Các phương án, đặc trưng và ưu điểm khác của sáng chế sẽ được hiểu rõ hơn với phần mô tả chi tiết về sáng chế và các điểm yêu cầu bảo hộ sau đây.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Bản chất kỹ thuật của sáng chế nêu trên, cũng như phần mô tả chi tiết sau đây về các phương án ưu tiên của đơn này, sẽ được hiểu rõ hơn khi tham khảo các hình vẽ

kèm theo. Tuy nhiên, cần hiểu rằng sáng chế không bị giới hạn trong các phương án chính xác được minh họa trong các hình vẽ.

Hình 1: Thể hiện thể hiện giai đoạn tiếp hợp peptit-mAb (kháng thể đơn dòng) chung theo phương án của sáng chế. X là phân tử ưa điện tử được đưa vào mạch bên của peptit điều trị, như bromoacetamid hoặc maleimit, phân tử này phản ứng đặc hiệu vị trí với nhóm sulfhydryl có đơn phân Cys được kiến tạo vào CDR của mAb kéo dài thời gian bán thải, từ đó tạo liên kết hóa trị giữa peptit điều trị và mAb.

Hình 2: Tổng hợp lượng dư CDR được chọn để thay thế trong PH9H5_VH (SỐ ID TRÌNH TỰ: 4) và PH9L3_VL (SỐ ID TRÌNH TỰ: 3). Các lượng dư được thay thế bằng Cys được tô đậm và gạch chân.

Hình 3: Thể hiện thể hiện cấu trúc của hợp chất 1 (SỐ ID TRÌNH TỰ: 2)

Hình 4: Dược động học của hợp chất 1 ở chuột DIO.

Hình 5: Dược động học của hợp chất 1 ở khỉ đuôi dài.

Hình 6: Lượng thức ăn thu nạp ở chuột DIO được điều trị bằng hợp chất 1: liều cấp tính.

Hình 7: Tổn hao trọng lượng ở chuột DIO được điều trị bằng hợp chất 1: liều cấp tính.

Hình 8: Lượng thức ăn thu nạp ở chuột DIO được điều trị bằng hợp chất 1: liều mạn tính.

Hình 9: Tổn hao trọng lượng ở chuột DIO được điều trị bằng hợp chất 1: liều mạn tính.

Hình 10: Thể hiện thể hiện sơ đồ phản ứng để tạo hợp chất kháng thể đơn dòng oxyntomodulin (mAb-OXM) theo phương án của sáng chế. Phản ứng phía trên là phản ứng khử disulfua tại Cys102 của mAb (ví dụ như MSCB97). Phản ứng bên dưới là sự tiếp hợp của mAb bị khử với biến thể peptit OXM. R là xystein hoặc glutathion. Cys102 trên chuỗi nặng của MSCB97 được thể hiện với các axit amin vùng hai bên dưới dạng mã một chữ cái. OXM chỉ phần axit amin của biến thể peptit. Aib2, Lys30 và phần đệm polyetylglycol (dPEG)12 riêng biệt được bromaxetyl hóa được thể hiện. His1 của mAb được thể hiện dưới dạng mã một chữ cái.

Hình 11: Thể hiện cấu trúc của hợp chất 2 (SỐ ID TRÌNH TỰ: 27)

Hình 12: Thể hiện thể hiện đồ thị chứng minh hiệu quả hoạt động ổn định của hợp chất 2 trong huyết tương người trong 168 giờ. Tỷ lệ phần trăm còn lại được chuẩn

hóa theo thời gian không ($t=0$) của hợp chất 2 là liên hợp mAb với chất tương tự peptit OXM▲, đối chứng 1, mà đã được minh chứng từ trước là ổn định trong huyết tương người *ngoài cơ thể sống* ◆, đối chứng 2, đã được minh chứng từ trước là không ổn định trong huyết tương người *ngoài cơ thể sống* ● và ○, và hợp chất 3 bổ sung là liên hợp mAb với chất tương tự peptit OXM (mAb liên hợp với H-Aib-QGTFTSDYSKYLDERRARDFVEWLLNK-(COCH₂CH₂(OCH₂CH₂)₁₂ NHCOCH₂Br)-NH₂ (SỐ ID TRÌNH TỰ: 25)) ▼ và hợp chất 4 (mAb liên hợp với H-Aib-QGTFTSDYSKYLDERRARDFVEWLLNTK-(COCH₂CH₂(OCH₂CH₂)₁₂ NHCOCH₂Br)-NH₂ (SỐ ID TRÌNH TỰ: 26))▼, trong một khoảng thời gian tính bằng giờ trên trục X.

Hình 13: Thể hiện đồ thị chứng tỏ hiệu quả hoạt động ổn định của hợp chất 2 trong huyết tương khi trong 168 giờ. Tỷ lệ phần trăm còn lại được chuẩn hóa theo thời gian không ($t=0$) của hợp chất 2 ▲, đối chứng 1, mà đã được minh chứng từ trước là ổn định trong huyết tương người *ngoài cơ thể sống* ◆, đối chứng 2, mà đã được minh chứng từ trước là không ổn định trong huyết tương người *ngoài cơ thể sống* ● và ○, và hợp chất 3 bổ sung là liên hợp mAb với chất tương tự peptit OXM▼ và hợp chất 4▼, trong một khoảng thời gian tính bằng giờ trên trục X.

Hình 14: Thể hiện đồ thị mô tả % thay đổi lượng thu nạp thức ăn ở khi đuôi dài được điều trị bằng hợp chất 2.

Hình 15: Thể hiện đồ thị mô tả % thay đổi cân nặng cơ thể ở khi đuôi dài được điều trị bằng hợp chất 2.

Mô tả chi tiết các phương án thực hiện sáng chế

Nhiều ấn phẩm, bài báo và bằng sáng chế được nêu hoặc được mô tả trong phần tình trạng kỹ thuật của sáng chế và trong toàn bộ bản mô tả; mỗi tham chiếu này được kết hợp đầy đủ vào tài liệu này bằng viện dẫn. Việc trình bày về tài liệu, hoạt động, vật liệu, thiết bị, thành phần, v.v. đã được đưa vào bản mô tả nhằm mục đích cung cấp ngữ cảnh của sáng chế. Việc trình bày này không có ý rằng vấn đề bất kỳ hoặc tất cả các vấn đề này là một phần của kỹ thuật trước đây liên quan đến sáng chế bất kỳ được bộc lộ hoặc được yêu cầu bảo hộ.

Trừ khi được quy định khác đi, tất cả các thuật ngữ kỹ thuật và khoa học được sử dụng trong bản mô tả này có cùng nghĩa thông thường theo hiểu biết của người có trình độ bình thường trong ngành mà sáng chế này có liên quan. Hoặc, các thuật ngữ nhất định được sử dụng trong bản mô tả này có nghĩa như đã nêu trong bản mô tả.

Cần lưu ý là khi được sử dụng trong bản mô tả này và trong các điểm yêu cầu bảo hộ, dạng số ít "một" bao gồm cả các số nhiều trừ khi ngữ cảnh quy định khác.

Trừ khi được quy định khác, giá trị bằng số bất kỳ, như nồng độ hoặc khoảng nồng độ được mô tả trong bản mô tả này, được hiểu là sẽ được điều chỉnh trong tất cả các trường hợp theo thuật ngữ "khoảng". Theo đó, giá trị bằng số thường bao gồm $\pm 10\%$ của giá trị được nêu. Ví dụ, nồng độ bằng 1 mg/mL bao gồm 0,9 mg/mL đến 1,1 mg/mL. Tương tự, khoảng nồng độ bằng từ 1% đến 10% (khối lượng/thể tích) bao gồm 0,9% (khối lượng/thể tích) đến 11% (khối lượng/thể tích). Trong bản mô tả này, việc sử dụng khoảng số rõ ràng bao gồm tất cả các khoảng phụ có thể có, tất cả từng giá trị bằng số trong khoảng đó, bao gồm các số nguyên trong các khoảng này và các phân số có các giá trị này trừ khi ngữ cảnh nêu ý khác một cách rõ ràng.

Trừ khi được quy định khác, thuật ngữ "ít nhất" đứng trước một dãy các phần tử sẽ được hiểu là chỉ mọi phần tử trong dãy. Người có trình độ trong ngành sẽ nhận diện, hoặc có khả năng biết rõ, chỉ cần bằng cách sử dụng thực nghiệm thường quy, nhiều phương án tương đương với các phương án cụ thể của sáng chế được mô tả tại đây. Các phương án tương đương được dự kiến bao gồm trong sáng chế.

Trong bản mô tả này, các thuật ngữ "bao gồm", "gồm", "gồm có", "có", "chứa" hoặc "có chứa", hoặc bất kỳ biến thể nào khác của nó, sẽ được hiểu là ngụ ý bao gồm một số nguyên hoặc nhóm số nguyên đã nêu nhưng không loại trừ bất kỳ số nguyên hoặc nhóm số nguyên nào khác, và được dự kiến là không hạn chế hoặc có thể mở rộng.

Ví dụ, chế phẩm, hỗn hợp, quy trình, phương pháp, mục hoặc thiết bị bao gồm danh sách các phần tử không nhất thiết chỉ giới hạn ở các phần tử này mà có thể bao gồm các phần tử khác không được liệt kê rõ ràng hoặc vốn thuộc chế phẩm, hỗn hợp, quy trình, phương pháp, mục hoặc thiết bị đó. Ngoài ra, trừ khi được quy định ngược lại một cách rõ ràng, "hoặc" đề cập đến yếu tố được bao gồm với hoặc và không đề cập yếu tố bị loại trừ với hoặc. Ví dụ, một điều kiện A hoặc B được thỏa mãn bởi điều bất kỳ trong những điều sau đây: A đúng (hoặc có) và B sai (hoặc không có), A sai (hoặc không có) và B đúng (hoặc có), và cả A và B đúng (hoặc có).

Cần hiểu rằng trong bản mô tả này, người có trình độ bình thường trong ngành cũng biết rằng, các thuật ngữ “khoảng”, “xấp xỉ”, “nói chung”, “về cơ bản” và các thuật ngữ tương tự để chỉ kích thước hoặc đặc điểm của thành phần của sáng chế được ưu tiên, được sử dụng để chỉ báo rằng kích thước/đặc điểm không phải là giới hạn hoặc thông số nghiêm ngặt và bao gồm các biến thiên nhỏ mà về nguyên tắc là giống hoặc tương tự. Tối thiểu, các tham chiếu bao gồm thông số thể hiện giá trị bằng số sẽ bao gồm các biến thiên mà, khi sử dụng các nguyên lý toán học và nguyên lý công nghiệp được áp dụng trong ngành (ví dụ, làm tròn, sai số đo lường hoặc sai số hệ thống khác, dung sai chế tạo, v.v.), sẽ không khác số có giá trị đáng kể thấp nhất.

Thuật ngữ “đồng nhất” hoặc phần trăm “đồng nhất”, trong ngữ cảnh có hai hoặc nhiều axit nucleic hoặc trình tự polypeptit (ví dụ, trình tự polypeptit PYY₃₋₃₆ vòng, trình tự polypeptit oxyntomodulin, trình tự chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ của kháng thể), chỉ hai hoặc nhiều trình tự hoặc trình tự con giống nhau hoặc có phần trăm xác định các đơn phân axit amin hoặc nucleotit giống nhau, khi so sánh và bắt cặp sẽ tạo sự tương ứng tối đa, như được đo lường bằng cách sử dụng một trong các thuật toán so sánh hoặc bằng cách kiểm tra bằng mắt sử dụng các phương pháp được biết đến trong ngành theo quan điểm của sáng chế.

Để so sánh trình tự, thông thường một trình tự đóng vai trò là trình tự tham chiếu còn trình tự thử nghiệm được so sánh với nó. Khi sử dụng thuật toán so sánh trình tự, các trình tự tham chiếu và thử nghiệm được nhập vào máy tính, tọa độ trình tự con được chỉ định, nếu cần, và các tham số chương trình thuật toán trình tự được chỉ định. Thuật toán so sánh trình tự sau đó tính toán phần trăm đồng nhất trình tự cho trình tự thử nghiệm so với trình tự tham chiếu, dựa trên các tham số chương trình được chỉ định.

Có thể thực hiện bất cập tối đa các trình tự để so sánh, ví dụ, bằng thuật toán tương đồng tại chỗ của Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. (Tiến bộ trong toán học ứng dụng) 2:482 (1981), bằng thuật toán bất cập tương đồng của Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. (Tập chí sinh học phân tử) 48:443 (1970), bằng phương pháp tìm kiếm sự đồng dạng của Pearson & Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA (Kỷ yếu Viện Hàn lâm Khoa học Quốc gia Hoa Kỳ) 85:2444 (1988), bằng sự triển khai các thuật toán này trên máy tính (GAP, BESTFIT, FASTA, và TFASTA trong Gói phần mềm di truyền Wisconsin, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), hoặc qua kiểm tra bằng mắt (xem tổng thể, Current Protocols in Molecular Biology (Các quy trình hiện nay trong sinh học phân tử), F.M. Ausubel và cộng sự, btv, Current Protocols ((Các quy trình hiện nay), dự án hợp tác giữa Greene Publishing Associates, Inc. và John Wiley & Sons, Inc., (1995 Supplement) (Ausubel)).

Các ví dụ về các thuật toán phù hợp để xác định phần trăm đồng nhất trình tự và đồng dạng trình tự là thuật toán BLAST and BLAST 2.0, được mô tả lần lượt trong Altschul và cộng sự (1990) J. Mol. Biol. (Tập chí sinh học phân tử) 215: 403-410 và Altschul và cộng sự (1997) Nucleic Acids Res. (Nghiên cứu axit nucleic) 25: 3389-3402. Phần mềm để thực hiện phân tích BLAST đã có trên thị trường thông qua Trung tâm quốc gia Thông tin công nghệ sinh học (National Center for Biotechnology Information).

Chỉ báo khác rằng hai trình tự axit nucleic hoặc polypeptit về cơ bản là đồng nhất là polypeptit được mã hóa bởi axit nucleic thứ nhất phản ứng chéo miễn dịch với polypeptit được mã hóa bởi axit nucleic thứ hai, như được mô tả ở phần dưới. Theo đó, polypeptit về cơ bản là đồng nhất với polypeptit thứ hai, ví dụ, trong đó hai peptit chỉ khác nhau các thay thế bảo thủ. Chỉ báo khác rằng hai trình tự axit nucleic hoặc polypeptit về cơ bản là đồng nhất là hai phân tử lai hóa với nhau trong các điều kiện khắc nghiệt, như được mô tả dưới đây.

Trong tài liệu này, “đối tượng” có nghĩa là động vật bất kỳ, tốt hơn là động vật có vú, tốt hơn là con người. Thuật ngữ “động vật có vú” được sử dụng trong bản mô tả này bao hàm động vật có vú bất kỳ. Các ví dụ về động vật có vú bao gồm, nhưng không giới hạn ở bò, ngựa, cừu, lợn, mèo, chó, chuột nhắt, chuột, thỏ, chuột lang, khỉ, con người, v.v., cụ thể hơn là con người.

Thuật ngữ “cho sử dụng” theo các phương pháp trong sáng chế nghĩa là phương pháp phòng ngừa, điều trị hoặc cải thiện một hội chứng, rối loạn hoặc bệnh như được mô tả trong tài liệu này bằng cách sử dụng liên hợp của sáng chế hoặc dạng, chế phẩm hoặc được phẩm chứa hợp chất này. Những phương pháp trên bao gồm bước cho sử dụng một lượng điều trị hữu hiệu liên hợp, dạng liên hợp, chế phẩm hoặc được phẩm nói trên vào các thời điểm khác nhau trong quá trình trị liệu hoặc cho sử dụng đồng thời ở dạng kết hợp. Các phương pháp trong sáng chế phải được hiểu là bao hàm tất cả các phác đồ điều trị được biết đến.

Thuật ngữ "lượng điều trị hữu hiệu" có nghĩa là lượng liên hợp hoạt tính hoặc được chất tạo ra các phản ứng sinh học hoặc được học trong hệ mô, động vật hoặc con người đang được nghiên cứu bởi nhà nghiên cứu, bác sĩ thú y, bác sĩ tư vấn hoặc bác sĩ lâm sàng, có tác dụng phòng ngừa, điều trị hoặc cải thiện hội chứng, rối loạn hoặc bệnh hoặc các triệu chứng của hội chứng, rối loạn hoặc bệnh đang được điều trị.

Trong tài liệu này, thuật ngữ “chế phẩm” dùng để chỉ một sản phẩm bao gồm các thành phần xác định với lượng xác định, cũng như sản phẩm bất kỳ là kết quả, trực tiếp hay gián tiếp, của sự kết hợp các thành phần xác định với lượng xác định.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “được ghép” chỉ sự liên kết hoặc kết nối hai hoặc nhiều vật thể với nhau. Khi đề cập đến các hợp chất hóa học hoặc sinh học, được ghép có thể đề cập đến kết nối cộng hóa trị giữa hai hoặc nhiều hợp chất hóa học hoặc sinh học. Ví dụ không giới hạn, kháng thể của sáng chế có thể được ghép với một peptit quan tâm để tạo thành peptit ghép với kháng thể. Peptit ghép kháng thể có thể được hình thành thông qua các phản ứng hóa học đặc hiệu được thiết kế để liên hợp kháng thể với peptit. Trong một số phương án nhất định, kháng thể của sáng chế có thể được ghép cộng hóa trị với peptit của sáng chế bằng cầu nối. Ví dụ, cầu nối có thể trước hết được kết nối hóa trị với kháng thể hoặc peptit, sau đó được kết nối hóa trị với peptit hoặc kháng thể.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “cầu nối” chỉ mô-đun hóa học bao gồm mạch nguyên tử hoặc hóa trị gắn kết cộng hóa trị peptit với kháng thể. Cầu nối có thể, ví dụ, bao gồm, nhưng không giới hạn ở cầu nối peptit, cầu nối hydrocarbon, cầu nối polyetylen glycol (PEG), cầu nối polypropylen glycol (PPG), cầu nối polysacarit, cầu nối polyeste, cầu nối hỗn hợp bao gồm PEG và dị vòng được nhúng vào, và mạch hydrocarbon. Ví dụ, cầu nối PEG có thể bao gồm 2-24 đơn vị PEG.

Trong tài liệu này, thuật ngữ “liên hợp” đề cập đến kháng thể hoặc mảnh của chúng được liên kết cộng hóa trị với một phần hoạt tính được lý. Thuật ngữ “được tiếp hợp với” đề cập đến kháng thể của sáng chế hoặc mảnh của chúng được liên kết cộng hóa trị hoặc kết nối cộng hóa trị với một phần hoạt tính được lý, tốt hơn là peptit điều trị, trực tiếp hoặc gián tiếp thông qua cầu nối. Ví dụ không giới hạn, kháng thể có thể là kháng thể đơn dòng của sáng chế và phần hoạt tính được lý có thể là một peptit điều trị, như PYY vòng, peptit oxyntomodulin hoặc bất kỳ peptit điều trị nào khác được quan tâm. Phần hoạt tính được lý cũng có thể là phần gốc hữu cơ không peptit (tức là, “phân tử nhỏ”). Trong bản công bố này, đối với kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên của chúng theo phương án của sáng chế, cụm từ “liên hợp bao gồm kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó và phần hoạt tính được lý (hoặc peptit điều trị) được tiếp hợp với nó” được sử dụng thay thế với cụm từ “kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó được tiếp hợp với phần hoạt tính được lý (hoặc peptit điều trị)”.

Các trình tự peptit được mô tả trong bản mô tả này được viết theo thông lệ trong đó vùng đầu N của peptit ở phía trái và vùng đầu C ở phía phải. Mặc dù đã biết dạng đồng phân của axit amin, dạng L của axit amin được làm đại diện trừ khi được quy định khác một cách rõ ràng.

Kháng thể

Trong một phương án chung, sáng chế đề cập đến kháng thể mới, được kiến tạo là không nhắm đích và có chứa đơn phân xystein có khả năng được sử dụng để tiếp hợp hóa học (ví dụ như ghép) với phần hoạt tính được lý, như peptit điều trị (ví dụ, peptit PYY vòng, oxyntomodulin hoặc peptit biến thể, v.v.), đặc hiệu theo vị trí, sao cho peptit ghép kháng thể có thời gian bán thải kéo dài/tăng so với peptit đứng riêng. Trong bản mô tả này, thuật ngữ “không nhắm đích” trong ngữ cảnh kháng thể chỉ kháng thể không liên kết đặc hiệu với bất kỳ đích nào *trong cơ thể sống*. Trong bản mô tả này, kháng thể “liên kết đặc hiệu với đích” chỉ kháng thể liên kết với kháng nguyên đích, với KD nhỏ hơn hoặc bằng 1×10^{-7} M, tốt hơn là nhỏ hơn hoặc bằng 1×10^{-8} M, tốt hơn nữa là nhỏ hơn hoặc bằng 5×10^{-9} M, hoặc nhỏ hơn hoặc bằng 1×10^{-9} M, hoặc nhỏ hơn hoặc bằng 5×10^{-10} M, hoặc nhỏ hơn hoặc bằng 1×10^{-10} M. Thuật ngữ “KD” chỉ hằng số phân ly, thu được từ tỷ lệ Kd với Ka (tức là, Kd/Ka) và được biểu diễn dưới dạng nồng độ mol (M). Có thể xác định giá trị KD cho các kháng thể bằng các phương pháp trong ngành theo quan điểm của sáng chế. Ví dụ, KD của

kháng thể có thể được xác định bằng cách sử dụng cộng hưởng plasmon bề mặt, như sử dụng hệ thống cảm biến sinh học, ví dụ, hệ thống Biacore®, hoặc sử dụng công nghệ đo giao thoa tầng sinh học, như hệ thống Octet RED96. Giá trị KD của kháng thể của càng nhỏ, ái lực của kháng thể liên kết với kháng nguyên đích càng cao.

Có thể sử dụng các kháng thể đơn dòng, toàn bộ hoặc mảnh của nó, làm phần kéo dài thời gian bán thải. Các kháng thể đơn dòng là các protein được nghiên cứu kỹ đã được sử dụng và được đặc trưng hóa để được sử dụng *trong cơ thể sống*, và như vậy, các cơ chế chuyển hóa cho phép thời gian bán thải kéo dài *trong cơ thể sống* và các cơ chế chuyển hóa cho phép loại bỏ chúng *trong cơ thể sống* đã được biết rõ. Ngoài ra, sự phân tách theo không gian và thể hiện của hai “nhánh” của kháng thể đơn dòng có thể có ích cho biểu hiện lưỡng trị hiệu quả của phần điều trị (nghĩa là một peptit điều trị). Các thuốc điều trị trong đó độc tố hoặc các loại thuốc phân tử nhỏ khác được liên kết hóa học với kháng thể đơn dòng đã được phát triển nhưng thường sử dụng kháng thể đơn dòng liên kết với kháng nguyên đặc hiệu và nhắm đích liên hợp kháng thể - thuốc vào mô/tế bào quan tâm, mà tốt hơn là biểu hiện kháng nguyên, và thông thường thuốc/phân tử nhỏ được gắn vào kháng thể sao cho không ảnh hưởng đến việc liên kết kháng nguyên của kháng thể.

Đối với các liên hợp peptit điều trị-mAb, kháng thể đơn dòng kéo dài thời gian bán thải không cần phải liên kết đặc hiệu với kháng nguyên. Do đó, một cặp miền biến đổi (V) chuỗi nặng (HC) và chuỗi nhẹ (LC) dự kiến sẽ không liên kết đặc hiệu với đích bất kỳ nào được sử dụng để điều chế kháng thể đơn dòng không nhắm đích được phép ghép cặp của sáng chế. Để thu được kháng thể đơn dòng không nhắm đích được phép ghép cặp, đơn phân xystein được kiến tạo vào một trong những vùng xác định bổ sung (CDR) của kháng thể không nhắm đích được chọn. Phần hoạt tính dược lý (ví dụ, peptit điều trị/hợp chất) có thể chứa phân hóa học thích hợp để cho phép tiếp hợp phần hoạt tính dược lý với đơn phân xystein được kiến tạo của kháng thể đơn dòng không nhắm đích. Hình 1 thể hiện phương pháp tiếp hợp peptit-kháng thể đơn dòng khái quát theo phương án của sáng chế.

Thuật ngữ “kháng thể” như được sử dụng trong bản mô tả này, có nghĩa trong phạm vi rộng và bao gồm các kháng thể đơn dòng bao gồm kháng thể đơn dòng không phải người (ví dụ, chuột), người, thích nghi với người, nhân hóa và hỗn hợp, mảnh

kháng thể, kháng thể đặc hiệu đôi hoặc kháng thể đa hiệu, các kháng thể dạng dime, dạng tetrame hoặc đa phân, và kháng thể đơn chuỗi.

Chuỗi nhẹ của kháng thể từ loài động vật có xương sống bất kỳ có thể được phân thành một trong hai loại có sự khác biệt rõ ràng, được gọi là kappa (κ) và lambda (λ), dựa trên trình tự axit amin của các miền hằng định của chúng. Theo đó, các kháng thể của sáng chế có thể chứa miền hằng định của chuỗi nhẹ kappa hoặc lambda. Theo các phương án cụ thể, các kháng thể của sáng chế bao gồm các vùng hằng định của chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ, ví dụ, từ kháng thể của chuột hoặc người. Ngoài các miền hằng định nặng và nhẹ, các kháng thể chứa vùng liên kết kháng nguyên được tạo thành từ vùng biến đổi chuỗi nhẹ và vùng biến đổi chuỗi nặng, mỗi vùng chứa ba miền (nghĩa là vùng xác định bổ sung 1-3; (CDR1, CDR2, và CDR3)). Các miền của vùng biến đổi chuỗi nhẹ được gọi là LCDR1, LCDR2, và LCDR3, và các miền của vùng biến đổi chuỗi nặng được gọi là HCDR1, HCDR2, và HCDR3.

Các globulin miễn dịch có thể được phân thành 5 lớp chính, là IgA, IgD, IgE, IgG và IgM, tùy vào trình tự axit amin của miền hằng định chuỗi nặng. IgG là lớp ổn định nhất trong năm loại globulin miễn dịch, có thời gian bán thải trong huyết thanh người là khoảng 23 ngày. IgA và IgG được phân tiếp thành các lớp kháng thể IgA₁, IgA₂, IgG₁, IgG₂, IgG₃ và IgG₄. Mỗi phân lớp trong bốn phân lớp IgG có các chức năng sinh học khác nhau được gọi là chức năng thực thi. Các chức năng thực thi này thường được thực hiện qua trung gian tương tác với thụ thể Fc (FcγR) hoặc bằng cách liên kết với C1q và cố định bổ thể. Liên kết với FcγR có thể dẫn đến sự ly giải tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể, trong khi liên kết với các yếu tố bổ thể có thể dẫn đến ly giải tế bào qua trung gian bổ thể. Kháng thể của sáng chế được sử dụng để kéo dài thời gian bán thải của peptit điều trị không có hoặc có tối thiểu chức năng thực thi, nhưng vẫn giữ được khả năng liên kết với FcRn, liên kết này có thể là phương tiện chính giúp kháng thể kéo dài thời gian bán thải *trong cơ thể sống*.

Trong một phương án, sáng chế đề cập đến kháng thể được phân lập hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự gen V dòng mầm Ig người hoàn toàn, và vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự gen V dòng mầm Ig người hoàn toàn ngoại trừ HCDR3 có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ: 18, trong đó kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó không liên kết đặc hiệu với bất kỳ kháng nguyên người nào *trong cơ thể sống*. Trong một số phương án nhất

định, sáng chế đề cập đến kháng thể được phân lập hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự gen V dòng mầm Ig người hoàn toàn, và vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự gen V dòng mầm Ig người hoàn toàn ngoại trừ HCDR3 có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ: 18, trong đó kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó không liên kết đặc hiệu với bất kỳ kháng nguyên người nào *trong cơ thể sống*, trong đó kháng thể được phân lập hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó được ghép với phần hoạt tính được lý (ví dụ peptit PYY vòng, peptit oxyntomodulin và/hoặc peptit điều trị của sáng chế).

Trong tài liệu này, thuật ngữ “mảnh gắn kháng nguyên” chỉ mảnh kháng thể, ví dụ như diabody (kháng thể đặc hiệu đôi tái tổ hợp), Fab, Fab', F(ab')₂, mảnh Fv, đoạn Fv ổn định disulfua (dsFv), (dsFv)₂, dsFv đặc hiệu đôi (dsFv-dsFv'), diabody ổn định disulfua (ds diabody), phân tử kháng thể đơn chuỗi (scFv), kháng thể đơn miền (sdab), dime scFv (diabody lưỡng trị), kháng thể đa hiệu được hình thành từ một phần của kháng thể bao gồm một hoặc nhiều CDR, kháng thể đơn miền được camel hóa, nanobody (kháng thể đơn vùng), kháng thể miền, kháng thể miền lưỡng trị hoặc mảnh kháng thể bất kỳ khác liên kết với kháng nguyên nhưng không bao gồm cấu trúc kháng thể hoàn chỉnh. Mảnh gắn kháng nguyên có khả năng liên kết với cùng kháng nguyên mà kháng thể mẹ hoặc mảnh kháng thể mẹ liên kết. Theo các phương án cụ thể, mảnh gắn kháng nguyên bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ, vùng hằng định chuỗi nhẹ, và đoạn Fd (nghĩa là, phần **chuỗi nặng** có trong mảnh Fab). Theo các phương án cụ thể khác, mảnh gắn kháng nguyên bao gồm Fab và F (ab').

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “kháng thể đơn chuỗi” đề cập đến kháng thể đơn chuỗi thông thường trong lĩnh vực, bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ được kết nối bởi một peptit ngắn gồm khoảng 15 đến khoảng 20 axit amin. Trong bản mô tả này, thuật ngữ “kháng thể đơn miền” đề cập đến kháng thể đơn miền thông thường trong lĩnh vực, bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng hằng định chuỗi nặng hoặc chỉ bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng.

Cụm từ "kháng thể hoặc mảnh kháng thể phân lập" chỉ kháng thể hoặc mảnh kháng thể về cơ bản được tách ra khỏi các kháng thể khác có các tính đặc hiệu kháng nguyên khác (ví dụ, kháng thể phân lập liên kết đặc hiệu với kháng nguyên đích về căn bản được tách khỏi các kháng thể không liên kết đặc hiệu với kháng nguyên đích này).

Ngoài ra, kháng thể hoặc mảnh kháng thể phân lập có thể gần như không có vật liệu tế bào và/hoặc hóa chất khác.

Vùng biến đổi của kháng thể bao gồm vùng “khung” bị can thiệp bởi ba “điểm gắn kháng nguyên”. Các điểm gắn kháng nguyên được định nghĩa bằng các thuật ngữ khác nhau: (i) Các vùng xác định bổ sung (CDR), ba trong VH (HCDR1, HCDR2, HCDR3) và ba trong VL (LCDR1, LCDR2, LCDR3) dựa trên sự biến đổi trình tự (Wu và Kabat, J Exp Med (Tập chí y học thực nghiệm) 132:211-50, 1970; Kabat và cộng sự, Sequences of Proteins of Immunological Interest (Trình tự protein có lợi ích miễn dịch), ấn bản lần 5. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991). (ii) “Các vùng siêu biến”, “HVR”, hoặc “HV”, ba trong VH (H1, H2, H3) và ba trong VL (L1, L2, L3) chỉ các vùng của các miền biến đổi của kháng thể siêu biến trong cấu trúc như Chothia và Lesk đã định nghĩa (Chothia và Lesk, Mol Biol (Sinh học phân tử) 196:901-17, 1987). Các thuật ngữ khác bao gồm “IMGT-CDR” (Lefranc và cộng sự, Dev Comparat Immunol (Tập chí Miễn dịch học so sánh và thực nghiệm) 27:55-77, 2003) và “Specificity Determining Residue Usage” (“Cách sử dụng đơn phân quyết định tính đặc hiệu”)(SDRU) (Almagro, Mol Recognit (Tập chí Nhận diện phân tử), 17:132-43, 2004). Cơ sở dữ liệu International ImMunoGeneTics (IMGT) ([http://www_mgt_org](http://www.mgt.org)) cung cấp cách đánh số chuẩn hóa và định nghĩa các điểm gắn kháng nguyên. Sự tương ứng giữa các mô tả về CDR, HV và IMGT được trình bày trong Lefranc và cộng sự, Dev Comparat Immunol (Tập chí Miễn dịch học so sánh và thực nghiệm) 27:55-77, 2003.

“Khung” hoặc “trình tự khung” là các trình tự còn lại của vùng biến đổi ngoài các trình tự được định nghĩa là điểm gắn kháng nguyên. Bởi vì có thể định nghĩa vị trí liên kết kháng nguyên bằng nhiều thuật ngữ khác nhau như mô tả trên đây, trình tự axit amin chính xác của khung tùy thuộc vào việc vị trí liên kết kháng nguyên được định nghĩa như thế nào.

Trong một phương án của sáng chế, kháng thể được phân lập hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ có LCDR1, LCDR2 và LCDR3 có trình tự axit amin lần lượt có SỐ ID TRÌNH TỰ: 19, SỐ ID TRÌNH TỰ: 20 và SỐ ID TRÌNH TỰ: 21, và vùng biến đổi chuỗi nặng có HCDR1, HCDR2 và HCDR3 có trình tự axit amin lần lượt có SỐ ID TRÌNH TỰ: 16, SỐ ID TRÌNH TỰ: 17 và SỐ ID TRÌNH TỰ: 18.

Trong phương án khác, kháng thể được phân lập còn bao gồm vùng Fc có nguồn gốc từ vùng Fc IgG4 người. Vùng Fc IgG4 người đã giảm khả năng liên kết với Fc γ R và các yếu tố bổ thể so với các kiểu phụ IgG khác. Tốt hơn là, vùng Fc chứa vùng Fc IgG4 người có các thay thế loại bỏ chức năng thực thi. Do đó, kháng thể phân lập còn bao gồm vùng Fc chứa vùng Fc IgG4 người được điều hòa bao gồm một hoặc nhiều thay thế sau: thay thế prolin cho glutamat ở đơn phân 233, alanin hoặc valin cho phenylalanin ở đơn phân 234 và alanin hoặc glutamat cho leuxin ở đơn phân 235 (quy tắc đánh số châu Âu, Kabat, EA và cộng sự (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest (Trình tự các protein có lợi ích miễn dịch), ấn bản lần thứ 5, Bộ Y tế và Dịch vụ Nhân sinh Hoa Kỳ (U.S. Dept. of Health and Human Services), Bethesda, Md., NIH Số công bố 91-3242). Loại bỏ vị trí glycosyl hóa liên kết N trong vùng Fc IgG4 bằng cách thay thế Ala cho Asn tại đơn phân 297 (quy tắc đánh số châu Âu) là cách khác để đảm bảo loại bỏ hoạt tính thực thi của đơn phân.

Tốt hơn là, kháng thể của sáng chế tồn tại dưới dạng dimer liên kết với nhau bằng liên kết disulfua và các loại tương tác không cộng hóa trị khác nhau. Do đó, phần Fc hữu ích cho kháng thể của sáng chế có thể là vùng Fc IgG4 người có chứa thay thế, như serin thay cho prolin ở vị trí 228 (quy tắc đánh số châu Âu), giúp ổn định sự hình thành dimer chuỗi nặng và ngăn ngừa sự hình thành chuỗi Fc nửa IgG4.

Trong một phương án khác, đơn phân Lys đầu C trong chuỗi nặng được loại bỏ, như thường thấy trong các kháng thể đơn dòng được sản xuất bằng cách tái tổ hợp.

“Kháng thể người” chỉ kháng thể có các vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ trong đó cả khung và các điểm gắn kháng nguyên đều có nguồn gốc từ các trình tự có nguồn gốc là người. Nếu kháng thể chứa vùng hằng định, vùng hằng định cũng có nguồn gốc từ các trình tự có nguồn gốc là người.

Kháng thể người bao gồm các vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ là các trình tự "có nguồn gốc" là người nếu các vùng biến đổi của kháng thể được thu từ hệ thống sử dụng globulin miễn dịch dòng mầm của người hoặc các gen globulin miễn dịch được tái cấu trúc. Các hệ thống này bao gồm các thư viện gen globulin miễn dịch người biểu hiện trên thực khuẩn, và các động vật biến đổi gen không phải là người như chuột mang lôcut globulin miễn dịch người như được mô tả trong tài liệu này. “Kháng thể người” có thể có các khác biệt về axit amin khi so sánh với các trình tự globulin miễn dịch dòng mầm người hoặc các trình tự globulin miễn dịch được tái cấu trúc, ví dụ, do

các đột biến soma xảy ra tự nhiên hoặc do đưa các thay thế vào khung hoặc điểm gắn kháng nguyên một cách có chủ ý. Thông thường, “kháng thể người” có % trình tự axit amin đồng nhất ít nhất ở mức khoảng 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với trình tự axit amin được mã hóa bởi dòng mầm người hoặc gen globulin miễn dịch được tái cấu trúc. Trong một số trường hợp, “kháng thể người” có thể bao gồm các trình tự khung liên ứng có nguồn gốc từ các phân tích trình tự khung của người, ví dụ như được mô tả trong Knappik và cộng sự, J Mol Biol (Tập chí Sinh học phân tử) 296:57-86, 2000), hoặc HCDR3 tổng hợp được hợp nhất vào thư viện gen globulin miễn dịch người biểu hiện trên thực khuẩn, ví dụ như được mô tả trong Shi và cộng sự, J Mol Biol (Tập chí Sinh học phân tử) 397:385-96, 2010 và Bằng sáng chế quốc tế số công bố WO2009/085462). Các kháng thể trong đó các điểm gắn kháng nguyên có nguồn gốc từ các loài không phải là người không bao gồm trong định nghĩa về “kháng thể người”.

Có thể tổng hợp kháng thể được phân lập theo phương án của sáng chế. Các kháng thể, mặc dù có nguồn gốc từ các trình tự globulin miễn dịch người, có thể được tạo bằng cách sử dụng các hệ thống như CDR tổng hợp và/hoặc các khung tổng hợp hợp nhất vào bề mặt biểu hiện của thực khuẩn (phage display), hoặc có thể được gây đột biến trong ống nghiệm để tăng cường các đặc tính của kháng thể, tạo nên các kháng thể không tồn tại một cách tự nhiên trong tập hợp toàn bộ các loại dòng mầm của kháng thể người trong cơ thể sống.

Trong tài liệu này, thuật ngữ “kháng thể tái tổ hợp” bao gồm tất cả các kháng thể được điều chế, biểu hiện, tạo hoặc phân lập bằng phương tiện tái tổ hợp, như các kháng thể phân lập từ động vật (ví dụ, chuột) được biến đổi gen hoặc chuyển đoạn nhiễm sắc thể đối với các gen globulin miễn dịch người hoặc tế bào lai được tạo từ đó, các kháng thể được phân lập từ tế bào chủ được biến nạp để biểu hiện kháng thể, các kháng thể được phân lập từ thư viện kháng thể tổ hợp, tái tổ hợp, và các kháng thể được điều chế, biểu hiện, tạo hoặc phân lập bằng phương tiện khác bất kỳ liên quan đến việc cắt nối các trình tự gen globulin miễn dịch người với các trình tự ADN khác, hoặc các kháng thể được tạo trong ống nghiệm bằng cách trao đổi nhánh Fab.

Trong tài liệu này, thuật ngữ “kháng thể đơn dòng” chỉ chế phẩm gồm các phân tử kháng thể có thành phần đơn phân tử. Thành phần kháng thể đơn dòng thể hiện tính đặc hiệu liên kết đơn và ái lực đối với epitope cụ thể, hoặc trong trường hợp kháng thể

đơn dòng đặc hiệu đôi, là tính đặc hiệu liên kết đôi với hai epitope khác nhau. Các kháng thể đơn dòng của sáng chế có thể được tạo ra bằng phương pháp tế bào lai, kỹ thuật biểu hiện trên thực khuẩn, kỹ thuật tạo dòng gen lympho bào đơn hoặc bằng phương pháp ADN tái tổ hợp. Ví dụ, có thể tạo các kháng thể đơn dòng bằng tế bào lai bao gồm tế bào B thu được từ một động vật, không phải là người, được chuyển gen, chẳng hạn như chuột nhắt hoặc chuột biến đổi gen, có bộ gen bao gồm gen biến đổi chuỗi nặng và gen biến đổi chuỗi nhẹ của người.

Trong một số phương án, thuật ngữ “mAb” có nghĩa là kháng thể đơn dòng. Trong một phương án, mAb có trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) bao gồm SỐ ID TRÌNH TỰ: 12 và trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) bao gồm SỐ ID TRÌNH TỰ: 14. Trong một số phương án nhất định, mAb là kháng thể đơn dòng người hoàn chỉnh có trình tự chuỗi nặng (HC) bao gồm SỐ ID TRÌNH TỰ: 13 và trình tự chuỗi nhẹ (LC) bao gồm SỐ ID TRÌNH TỰ: 15. Trong một số phương án nhất định, tùy chọn có thể không có đơn phân lysin ở vị trí 446 có SỐ ID TRÌNH TỰ: 13.

Trong tài liệu này, thuật ngữ “kháng thể hỗn hợp” đề cập đến kháng thể trong đó trình tự axit amin của phân tử globulin miễn dịch có nguồn gốc từ hai hoặc nhiều loài. Vùng biến đổi của cả chuỗi nhẹ và chuỗi nặng thường tương ứng với vùng biến đổi của kháng thể có nguồn gốc từ một loài động vật có vú (ví dụ chuột nhắt, chuột, thỏ, v.v.) có tính đặc hiệu, ái lực và khả năng mong muốn, trong khi các vùng hằng định tương ứng với các trình tự của kháng thể có nguồn gốc từ loài động vật có vú khác (ví dụ, con người) để tránh gây ra đáp ứng miễn dịch ở loài đó.

Trong tài liệu này, thuật ngữ “kháng thể đa hiệu” đề cập đến kháng thể bao gồm một số lượng lớn các trình tự miền biến đổi globulin miễn dịch, trong đó trình tự miền biến đổi globulin miễn dịch thứ nhất có tính đặc hiệu liên kết đối với epitope thứ nhất hoặc bao gồm các trình tự dòng mầm thiếu tính đặc hiệu liên kết đã biết bất kỳ và trình tự miền biến đổi globulin miễn dịch thứ hai có tính đặc hiệu liên kết đối với epitope thứ hai hoặc bao gồm các trình tự dòng mầm thiếu tính đặc hiệu liên kết đã biết bất kỳ, và trong đó miền biến đổi globulin miễn dịch thứ nhất và/hoặc thứ hai tùy chọn bao gồm phần hoạt tính được lý được tiếp hợp (ví dụ peptit điều trị). Trong một phương án, các epitope thứ nhất và thứ hai nằm trên cùng một kháng nguyên, ví dụ, cùng một protein (hoặc tiểu phần của protein đa phân). Trong một phương án, các epitope thứ nhất và thứ hai chồng lấp hoặc về cơ bản là chồng lấp lên nhau. Trong một phương án, các epitope

thứ nhất và thứ hai không chồng lấp hoặc về cơ bản không chồng lấp lên nhau. Trong một phương án, các epitope thứ nhất và thứ hai không nằm trên cùng một kháng nguyên, ví dụ, các protein khác nhau (hoặc các tiểu phần khác nhau của protein đa phân). Trong một phương án, miền biến đổi globulin miễn dịch thứ nhất và thứ hai bao gồm cùng một phần hoạt tính được lý được tiếp hợp. Trong một phương án, miền biến đổi globulin miễn dịch thứ nhất và thứ hai bao gồm các phần hoạt tính được lý được tiếp hợp khác nhau. Trong một phương án, chỉ miền biến đổi globulin miễn dịch thứ nhất là bao gồm phần hoạt tính được lý được tiếp hợp. Trong một phương án, chỉ miền biến đổi globulin miễn dịch thứ hai là bao gồm phần hoạt tính được lý được tiếp hợp. Trong một phương án, kháng thể đa hiệu bao gồm miền biến đổi globulin miễn dịch thứ ba, thứ tư hoặc thứ năm. Trong một phương án, kháng thể đa hiệu là phân tử kháng thể đặc hiệu đôi, kháng thể đặc hiệu ba hoặc phân tử kháng thể đặc hiệu bốn.

Trong tài liệu này, thuật ngữ "kháng thể đặc hiệu đôi" đề cập đến kháng thể đa hiệu liên kết với không quá hai epitope hoặc hai kháng nguyên và/hoặc bao gồm hai phần hoạt tính được lý được tiếp hợp (ví dụ, phần hoạt tính được lý được tiếp hợp giống hoặc khác nhau). Kháng thể đặc hiệu đôi có đặc trưng ở chỗ trình tự miền biến đổi globulin miễn dịch thứ nhất có tính đặc hiệu liên kết đối với epitope thứ nhất hoặc bao gồm các trình tự dòng mầm thiếu tính đặc hiệu liên kết đã biết bất kỳ và trình tự miền biến đổi globulin miễn dịch thứ hai có tính đặc hiệu liên kết đối với epitope thứ hai hoặc bao gồm các trình tự dòng mầm thiếu tính đặc hiệu liên kết đã biết bất kỳ, và trong đó miền biến đổi globulin miễn dịch thứ nhất và/hoặc thứ hai tùy chọn bao gồm phần hoạt tính được lý được tiếp hợp. Trong một phương án, các epitope thứ nhất và thứ hai nằm trên cùng một kháng nguyên, ví dụ, cùng một protein (hoặc tiểu phần của protein đa phân). Trong một phương án, các epitope thứ nhất và thứ hai chồng lấp hoặc về cơ bản là chồng lấp lên nhau. Trong một phương án, các epitope thứ nhất và thứ hai không nằm trên cùng một kháng nguyên, ví dụ, các protein khác nhau (hoặc các tiểu phần khác nhau của protein đa phân). Trong một phương án, miền biến đổi globulin miễn dịch thứ nhất và thứ hai bao gồm cùng một phần hoạt tính được lý được tiếp hợp. Trong một phương án, miền biến đổi globulin miễn dịch thứ nhất và thứ hai bao gồm các phần hoạt tính được lý khác nhau. Trong một phương án, chỉ miền biến đổi globulin miễn dịch thứ nhất là bao gồm phần hoạt tính được lý được tiếp hợp. Trong một phương án, chỉ miền biến đổi globulin miễn dịch thứ hai là bao gồm phần hoạt tính được lý được tiếp hợp. Trong một phương án, kháng thể đặc hiệu đôi bao gồm trình tự miền biến

đôi chuỗi nhẹ và trình tự miền biến đổi chuỗi nặng thứ nhất có tính đặc hiệu liên kết đối với epitope thứ nhất hoặc bao gồm các trình tự dòng mầm thiếu tính đặc hiệu liên kết đã biết bất kỳ và trình tự miền biến đổi chuỗi nhẹ và trình tự miền biến đổi chuỗi nặng thứ hai có tính đặc hiệu liên kết đối với epitope thứ hai hoặc bao gồm các trình tự dòng mầm thiếu tính đặc hiệu liên kết đã biết bất kỳ, và trong đó miền biến đổi chuỗi nặng thứ nhất và/hoặc thứ hai tùy chọn bao gồm phần hoạt tính được lý được tiếp hợp. Trong một phương án, miền biến đổi chuỗi nặng thứ nhất và thứ hai bao gồm cùng một phần hoạt tính được lý được tiếp hợp. Trong một phương án, miền biến đổi chuỗi nặng thứ nhất và thứ hai bao gồm các phần hoạt tính được lý được tiếp hợp khác nhau. Trong một phương án, chỉ miền biến đổi chuỗi nặng thứ nhất là bao gồm phần hoạt tính được lý được tiếp hợp. Trong một phương án, chỉ miền biến đổi chuỗi nặng thứ hai là bao gồm phần hoạt tính được lý được tiếp hợp.

Trong bản mô tả này, “kháng thể đầy đủ chiều dài” chỉ một kháng thể có hai chuỗi nặng kháng thể đầy đủ chiều dài và hai chuỗi nhẹ kháng thể đầy đủ chiều dài. Chuỗi nặng (HC) kháng thể đầy đủ chiều dài bao gồm các vùng biến đổi (VH) và miền hằng định (CH1, CH2, và CH3) chuỗi nặng. Chuỗi nhẹ (LC) kháng thể đầy đủ chiều dài bao gồm các vùng biến đổi (VL) và miền hằng định (CL) chuỗi nhẹ. Kháng thể đầy đủ chiều dài có thể thiếu lysin đầu C (K) trong một hoặc cả hai chuỗi nặng.

Thuật ngữ “nhánh Fab” hay “nửa phân tử” chỉ một cặp chuỗi nặng-chuỗi nhẹ.

Có thể tạo các kháng thể đặc hiệu đôi đầy đủ chiều dài, ví dụ, bằng cách trao đổi nhánh Fab (hoặc trao đổi nửa phân tử) giữa hai kháng thể lưỡng trị đơn đặc hiệu bằng cách đưa các thay thế tại giao diện CH3 chuỗi nặng tại mỗi nửa phân tử để hỗ trợ hình thành dị dimer của hai nửa phân tử kháng thể có tính đặc hiệu khác nhau trong ống nghiệm trong môi trường không có tế bào hoặc bằng cách đồng biểu hiện. Phản ứng trao đổi nhánh Fab là kết quả của phản ứng isome hóa liên kết disulfua và sự phân ly-kết hợp các miền CH3. Các liên kết disulfua chuỗi nặng trong các vùng bản lề của các kháng thể đơn đặc hiệu mẹ bị khử. Các cystein tự do thu được của một trong các kháng thể đơn đặc hiệu mẹ tạo thành liên kết disulfua giữa các chuỗi nặng với các đơn phân xystein của phân tử kháng thể đơn đặc hiệu mẹ thứ hai và đồng thời các miền CH3 của các kháng thể mẹ được giải phóng và tái tạo bằng quá trình phân ly-kết hợp. Các miền CH3 của các nhánh Fab có thể được kiến tạo để hỗ trợ quá trình dị dimer hóa hơn là đồng

đime hóa. Sản phẩm tạo thành là kháng thể đặc hiệu đôi có hai nhánh Fab hoặc hai nửa phân tử mỗi nửa liên kết với một epitope khác nhau.

Trong bản mô tả này, “đồng đime hóa”, đối với các kháng thể, chỉ sự tương tác của hai chuỗi nặng có các trình tự axit amin CH3 đồng nhất. Trong bản mô tả này, “đồng đime”, đối với các kháng thể, chỉ kháng thể có hai chuỗi nặng có các trình tự axit amin CH3 đồng nhất.

Trong bản mô tả này, “dị đime hóa”, đối với các kháng thể, chỉ sự tương tác của hai chuỗi nặng có các trình tự axit amin CH3 không đồng nhất. Trong bản mô tả này, “dị đime”, đối với các kháng thể, chỉ kháng thể có hai chuỗi nặng có các trình tự axit amin CH3 không đồng nhất.

Có thể sử dụng phương pháp “knob-in-hole” (nghĩa là mô hình gói các mạch bên của axit amin giữa các chuỗi xoắn alpha liên kề) (xem, ví dụ, Bằng sáng chế quốc tế Số công bố WO 2006/028936) để tạo các kháng thể đặc hiệu đôi đầy đủ chiều dài. Tóm tắt như sau, các axit amin được chọn tạo thành giao diện của các miền CH3 trong IgG người có thể bị đột biến ở các vị trí tác động đến các tương tác của các miền CH3 để thúc đẩy việc tạo thành dị đime. Một axit amin có mạch bên nhỏ (hole - lỗ) được đưa vào chuỗi nặng của một kháng thể liên kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ nhất và một axit amin có mạch bên lớn (knob - đầu núp) được đưa vào chuỗi nặng của một kháng thể liên kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ hai. Sau khi đồng biểu hiện hai kháng thể, dị đime được tạo thành, là kết quả của tương tác ưu tiên của chuỗi nặng có “hole” (“lỗ”) với chuỗi nặng có “knob” (“đầu núp”). Ví dụ về các cặp thay thế CH3 tạo thành đầu núp và lỗ là (được biểu hiện là vị trí điều hòa tại miền CH3 thứ nhất của chuỗi nặng thứ nhất/vị trí điều hòa tại miền CH3 thứ hai của chuỗi nặng thứ hai): T366Y/F405A, T366W/F405W, F405W/Y407A, T394W/Y407T, T394S/Y407A, T366W/T394S, F405W/T394S và T366W/T366S_L368A_Y407V.

Có thể sử dụng các phương pháp khác như phương pháp thúc đẩy quá trình dị đime hóa chuỗi nặng bằng tương tác tĩnh điện bằng cách thay thế các gốc tích điện dương tại một mặt CH3 và các gốc tích điện âm tại mặt CH3 thứ hai, như được mô tả trong Bằng sáng chế Hoa Kỳ Số công bố US2010/0015133; Bằng sáng chế Hoa Kỳ Số công bố US2009/0182127; Bằng sáng chế Hoa Kỳ Số công bố US2010/028637, hoặc Bằng sáng chế Hoa Kỳ Số công bố US2011/0123532. Trong các phương pháp khác, quá trình dị đime hóa có thể được thúc đẩy bởi các thay thế sau (được biểu hiện là vị trí điều

hòa tại miền CH3 thứ nhất của chuỗi nặng thứ nhất/vị trí điều hòa tại miền CH3 thứ hai của chuỗi nặng thứ hai): L351Y_F405A_Y407V/T394W, T366I_K392M_T394W/F405A_Y407V, T366L_K392M_T394W/F405A_Y407V, L351Y_Y407A/T366A_K409F, L351Y_Y407A/T366V_K409F, Y407A/T366A_K409F, hoặc T350V_L351Y_F405A_Y407V/T350V_T366L_K392L_T394W như được mô tả trong Bằng sáng chế Hoa Kỳ Số công bố US2012/0149876 hoặc Bằng sáng chế Hoa Kỳ Số công bố US2013/0195849.

Ngoài các phương pháp được mô tả ở phần trên, các kháng thể đặc hiệu đôi có thể được tạo trong ống nghiệm trong môi trường không có tế bào bằng cách đưa các đột biến bất đối xứng vào các vùng CH3 của hai kháng thể đồng dimer đơn đặc hiệu và tạo thành kháng thể dị dimer đặc hiệu đôi từ hai kháng thể đồng dimer đơn đặc hiệu mẹ trong các điều kiện khử để cho phép isome hóa liên kết disulfua theo các phương pháp được mô tả trong Bằng sáng chế quốc tế Số công bố WO2011/131746. Trong các phương pháp này, kháng thể lưỡng trị đơn đặc hiệu thứ nhất và kháng thể lưỡng trị đơn đặc hiệu thứ hai được kiến tạo để có một số thay thế nhất định tại miền CH3 làm tăng tính bền của dị dimer; các kháng thể được ủ cùng nhau trong các điều kiện khử đủ để cho phép các xystein trong vùng bản lề trải qua quá trình isome hóa liên kết disulfua; từ đó tạo ra kháng thể đặc hiệu đôi bằng cách trao đổi nhánh Fab. Các điều kiện ủ nuôi cấy có thể được khôi phục lại tình trạng không khử. Ví dụ về các chất khử có thể được sử dụng là 2-mercaptoethylamin (2-MEA), dithiothreitol (DTT), dithioerythritol (DTE), glutathion, tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP), L-xystein và beta-mercaptoetanol, tốt nhất là chất khử được chọn từ nhóm bao gồm: 2-mercaptoethylamin, dithiothreitol và tris(2-carboxyethyl)phosphin. Ví dụ, có thể ủ trong ít nhất 90 phút ở nhiệt độ ít nhất bằng 20°C với sự có mặt của ít nhất 2-MEA 25 mM hoặc với sự có mặt của ít nhất dithiothreitol 0,5 mM với độ pH bằng từ 5-8, ví dụ với độ pH bằng 7,0 hoặc độ pH bằng 7,4.

Việc đánh số đơn phân axit amin trong miền hằng định của kháng thể trong toàn bộ bản mô tả tuân thủ theo chỉ mục EU như được mô tả trong Kabat và cộng sự, Sequences of Proteins of Immunological Interest (Trình tự protein có lợi ích miễn dịch), Tái bản lần 5. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991), trừ khi được quy định khác.

Các liên hợp

Trong phương án chung khác, sáng chế đề cập đến liên hợp bao gồm kháng thể của sáng chế được tiếp hợp cộng hóa trị với phần hoạt tính được lý, như peptit điều trị tổng hợp (ví dụ, peptit PYY vòng, hoặc peptit biến thể oxyntomodulin), đặc hiệu theo vị trí, sao cho peptit ghép kháng thể có thời gian bán thải kéo dài/tăng so với peptit khi đứng riêng. Các liên hợp này hữu ích trong việc phòng ngừa, điều trị hoặc làm giảm nhẹ bệnh và rối loạn được bộc lộ trong bản mô tả này. Sáng chế cũng đề cập đến các chế phẩm dược và các phương pháp điều chế và sử dụng chúng.

Trong một số phương án, kháng thể của sáng chế được biến đổi để bao gồm ít nhất một thay thế đơn phân xystein có khả năng được tiếp hợp với phần hoạt tính được lý để kéo dài/tăng thời gian bán thải của phần hoạt tính được lý. Trong một số phương án, ít nhất một thay thế đơn phân xystein có mặt trong vùng xác định bổ sung của kháng thể. Trong một số phương án, ít nhất một thay thế đơn phân xystein có mặt trong vùng xác định bổ sung chuỗi nặng (HCDR). Trong một số phương án, ít nhất một thay thế đơn phân xystein có mặt trong HCDR3, trong đó HCDR3 bao gồm trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ: 18. Trong một số phương án, kháng thể bao gồm HCDR3 bao gồm trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ: 18 có ít nhất một thay thế xystein bổ sung có khả năng được tiếp hợp với phần hoạt tính được lý.

Trong một số phương án, phần hoạt tính được lý có thể bao gồm cầu nối. Cầu nối có thể được biến đổi hóa học để cho phép tiếp hợp kháng thể với phần hoạt tính được lý. Cầu nối có thể, ví dụ, bao gồm, nhưng không giới hạn ở cầu nối peptit, cầu nối hydrocarbon, cầu nối polyetylen glycol (PEG), cầu nối polypropylen glycol (PPG), cầu nối polysacarit, cầu nối polyeste, cầu nối hỗn hợp bao gồm PEG và dị vòng được nhúng vào, và mạch hydrocarbon. Ví dụ, cầu nối PEG có thể bao gồm 2-24 đơn vị PEG.

Trong một số phương án, kháng thể đơn dòng của sáng chế được tiếp hợp với một, hai, ba, bốn, năm hoặc sáu phần hoạt tính được lý (ví dụ như (các) peptit điều trị) được đề cập. Trong các phương án ưu tiên, kháng thể đơn dòng không nhắm đích được tiếp hợp với hai phần hoạt tính được lý được đề cập. Trong một số phương án nhất định trong đó kháng thể đơn dòng được tiếp hợp với ít nhất hai phần hoạt tính được lý được quan tâm, các phần hoạt tính được lý được quan tâm có thể là cùng một phần hoạt tính được lý hoặc có thể là các phần hoạt tính được lý khác nhau.

Các phương pháp tiếp hợp kháng thể của sáng chế với các phần hoạt tính được lý của sáng chế đã được biết đến trong ngành. Tóm lại, các kháng thể của sáng chế có thể được khử bằng chất khử (ví dụ: TCEP (tris(2-carboxyethyl) phosphin), được tinh chế (ví dụ, bằng cách hấp phụ protein A hoặc lọc gel) và được tiếp hợp với phần hoạt tính được lý (ví dụ, bằng cách cung cấp peptit đông khô cho kháng thể được khử trong các điều kiện cho phép tiếp hợp). Sau phản ứng tiếp hợp, liên hợp có thể được tinh chế bằng phép sắc ký trao đổi ion hoặc sắc ký tương tác kỵ nước (HIC) với bước tinh chế cuối cùng là hấp phụ protein A. Trong một số phương án nhất định, các kháng thể của sáng chế có thể được tinh chế trước khi được khử bằng các phương pháp HIC. Xem mô tả chi tiết hơn về các phương pháp tiếp hợp, ví dụ trong, Ví dụ 3 và 7, và Dennler và cộng sự, Antibodies (Kháng thể) 4: 197-224 (2015).

Trong bản mô tả này, “đồng dime hóa”, đối với các liên hợp, chỉ sự tương tác giữa hai phần hoạt tính được lý đồng nhất với kháng thể. Trong bản mô tả này, “đồng dime”, đối với các liên hợp, chỉ kháng thể được ghép với hai phần hoạt tính được lý đồng nhất.

Trong bản mô tả này, “dị dime hóa”, đối với các liên hợp, chỉ sự tương tác giữa hai phần hoạt tính được lý khác nhau với kháng thể. Trong bản mô tả này, “dị dime”, đối với các liên hợp, chỉ kháng thể được ghép với hai phần hoạt tính được lý khác nhau.

Các peptit PYY vòng

PYY₃₋₃₆ là hormon nội sinh được các tế bào L tiết ra tại phần ruột đầu xa, có tác dụng làm chất chủ vận của thụ thể Y2 để ức chế lượng thu nạp thức ăn. Với vai trò trong việc kiểm soát cảm giác ngon miệng và lượng thu nạp thức ăn cũng như tác dụng chống xuất tiết và hỗ trợ hấp thụ ở đường ruột - dạ dày ở động vật có vú, PYY₃₋₃₆ có thể có hiệu quả trong điều trị bệnh béo phì và các tình trạng liên quan trong một số rối loạn đường ruột - dạ dày. Tuy nhiên, việc sử dụng PYY₃₋₃₆ làm thuốc điều trị bị giới hạn bởi cơ chế chuyển hóa nhanh và thời gian bán thải lưu hành ngắn ngủi của nó. Theo đó, có thể sử dụng kháng thể của sáng chế dưới dạng chất mang cho PYY₃₋₃₆, tốt hơn là PYY₃₋₃₆ được biến đổi, giúp kéo dài thời gian bán thải của peptit PYY₃₋₃₆ và giảm cơ chế chuyển hóa của peptit *trong cơ thể sống*.

Trong các phương án của sáng chế, các peptit PYY₃₋₃₆ được biến đổi là các peptit PYY vòng. Thuật ngữ “peptit PYY vòng”, “chất tương tự PYY₃₋₃₆ vòng” và “chất

tương tự peptit PYY₃₋₃₆ vòng” có thể sử dụng thay thế cho nhau. Các ví dụ về các peptit PYY vòng có thể được sử dụng trong các liên hợp được mô tả trong Đơn xin cấp bằng sáng chế tạm thời Hoa Kỳ số 62/413,613, nộp ngày 27 tháng 10 năm 2016, và Đơn xin cấp bằng sáng chế Hoa Kỳ số _____ có tiêu đề “Cyclic peptit tyrosin tyrosin compounds as modulators of neuropeptit receptors,” (Hợp chất peptit tyrosin tyrosin vòng làm chất điều hòa của thụ thể neuropeptit”), được nộp cùng ngày với đơn này với số hồ sơ tham chiếu PRD3411, nội dung của cả hai đơn này sau đây được kết hợp đầy đủ vào tài liệu này bằng viện dẫn.

Các ví dụ về các liên hợp bao gồm kháng thể của sáng chế và peptit PYY vòng cũng được mô tả trong Đơn xin cấp bằng sáng chế tạm thời Hoa Kỳ số 62/413,586, nộp ngày 27 tháng 10 năm 2016, và Đơn xin cấp bằng sáng chế Hoa Kỳ số _____ có tiêu đề “Antibody coupled cyclic peptit tyrosin tyrosin compounds as modulators of neuropeptit receptors,” (“Hợp chất peptit tyrosin tyrosin vòng ghép cặp với kháng thể làm chất điều hòa của thụ thể neuropeptit”), được nộp cùng ngày với đơn này với số hồ sơ tham chiếu PRD3436, nội dung của cả hai đơn này sau đây được kết hợp đầy đủ vào tài liệu này bằng viện dẫn. Ví dụ, trong peptit PYY vòng, đơn phân axit amin đầu N của vòng sẽ liên kết qua nhóm chức α -amino của chúng với nhóm liên kết, mà nhóm này cũng liên kết với đơn phân mạch bên của axit amin ở vị trí 31 của peptit NTSC-PYY. Có thể hợp nhất các đơn phân lysin ở một số vị trí của trình tự hPYY₃₋₃₆ để cung cấp thành phần xử lý chức năng thuận tiện cho việc dẫn xuất thêm. Các đơn phân lysin có thể được điều hòa để được ghép cặp với kháng thể đơn dòng trực tiếp hoặc gián tiếp. Trong ghép cặp gián tiếp với kháng thể đơn dòng, đơn phân lysin có thể được điều hòa để bao gồm cầu nối mà sẽ cho phép peptit PYY vòng được ghép cặp với kháng thể đơn dòng. Chuyên gia trong ngành sẽ nhận thấy rằng các đồng đẳng liên quan có thể được sử dụng hiệu quả như vậy và đã được dự kiến trong bản mô tả này.

Các peptit oxyntomodulin

Oxyntomodulin (OXM) là peptit 37 axit amin được tế bào L nội tiết ruột tiết ra tại ruột. Qua hoạt tính chủ vận của mình tại thụ thể GLP-1 (GLP1R) và thụ thể glucagon (GCGR), OXM tăng cường chức năng tế bào β , giảm lượng thu nạp thức ăn và tăng tiêu thụ năng lượng. Thông qua các cơ chế bổ sung này, giảm cân qua trung gian OXM có thể vượt trội hơn so với qua trung gian là các chất chủ vận GLP1R hiện được bán trên thị trường. OXM cũng có thể làm giảm cholesterol và triglycerit trong

huyết tương. Thời gian bán thải của OXM ở người rất ngắn, chỉ khoảng vài phút (Schjoldager và cộng sự, Eur. J. Clin. Invest. (Tập chí nghiên cứu lâm sàng châu Âu) 18(5):499-503 (1988)). Do đó, phương án của sáng chế đề cập đến liên hợp bao gồm kháng thể của sáng chế liên kết cộng hóa trị với oxyntomodulin để cung cấp các đặc tính chủ vận kép của oxyntomodulin và thời gian bán hủy kéo dài đủ để có thể cho liều mỗi tuần một lần.

Có thể kéo dài thời gian bán hủy của peptit bằng cách ổn định peptit OXM chống lại tính nhạy đối với sự phân giải protein và bằng cách giảm độ thanh thải trong huyết tương. Ví dụ, giảm thiểu sự phân giải protein bằng DPP4 bằng cách thay thế serin ở vị trí 2 bằng axit aminoisobutyric (Aib). Ổn định cấu trúc liên kết xoắn ốc của peptit bằng cách đưa vào cầu muối rẽ làm hai nhánh từ Q20R thành S16E và Q24E, và giảm thiểu nguy cơ oxy hóa bằng cách thay thế methionin 27 bằng leuxin. Thời gian lưu hành của peptit được tăng lên nhờ sự gắn kết cộng hóa trị của kháng thể đơn dòng (mAb). Các liên hợp kháng thể-thuốc này có thể thể hiện thời gian bán thải kéo dài trong huyết tương nhờ kích thước của chúng, với kích thước này, có thể làm giảm quá trình lọc cầu thận, và bằng cách quay vòng thông qua thụ thể Fc mới sinh. Phần đệm oligoetylen glycol ngắn được đặt xen kẽ giữa mAb và peptit để đảm bảo peptit tiếp cận đến GCGR và GLP1R mà không bị cản trở.

Theo các phương án của sáng chế, liên hợp oxyntomodulin của sáng chế có bốn đặc trưng. (A) Cơ chế đồng vận kép: các liên hợp oxyntomodulin có cơ chế đồng vận kép ở các thụ thể GLP-1 và glucagon. (B) Cân bằng thụ thể: các liên hợp oxyntomodulin không có sự lệch quá mức về hiệu lực đối với GLP1R hoặc GCGR, vì sự lệch quá mức đối với GLP1R có thể dẫn đến việc tạo thành một liên hợp trong đó các biến cố bất lợi ở đường tiêu hóa qua trung gian GLP-1 xảy ra khi tăng tiếp xúc với nó trước khi gắn kết với đích GCGR, và sự lệch quá mức với GCGR có thể giảm thiểu hiệu quả đường huyết. (C) Phân phối sinh học: liên hợp oxyntomodulin có hiệu lực lệch tối thiểu về phía thụ thể GLP-1 (so với chỉ riêng oxyntomodulin), với mục tiêu là gắn kết đích với GCGR ngoại vi và với GLP1R trung tâm, điều hòa lượng thu nạp năng lượng, khi ở cùng mức tiếp xúc. (D) Liều dùng mỗi tuần một lần: các liên hợp oxyntomodulin cạnh tranh về khả năng được sử dụng cho đối tượng cần điều trị mỗi tuần một lần.

Các peptit điều trị khác

Sáng chế cũng cung cấp các liên hợp bao gồm các peptit khác có khả năng được tiếp hợp với nền kháng thể đơn dòng được mô tả trong bản mô tả này. Có thể chọn các peptit điều trị, ví dụ, từ nhóm bao gồm peptit giống như glucagon 1 (GLP1), exendin (exenatide), amylin (pramlintide), hormon kích thích tế bào hắc tố alpha (MSH), sản phẩm phiên mã điều hòa bởi cocain và chất kích thích (CART), chất đối kháng thụ thể neuropeptit Y Y1 (NPY1), chất đối kháng thụ thể neuropeptit Y Y5 (NPY5), neurotensin S, neuropeptit B, neuropeptit W, ghrelin, thụ thể giống bombesin 3 (BRS3), galanin, cholecystokinin (CCK), orexin, hormon tích tụ hắc tố (MCH), oxytoxin, và stresscopin.

Peptit giống như glucagon 1 (GLP1) là hormon peptit có độ dài gồm 30 axit amin có nguồn gốc từ việc xử lý hậu dịch mã đặc hiệu mô đối với gen proglucagon (tiền chất glucagon). GLP-1 được tế bào L nội tiết ruột trong ruột và một số tế bào thần kinh sản xuất và tiết ra khi tiêu thụ thực phẩm. Sản phẩm ban đầu GLP-1 (1-37) dễ bị amit hóa và phân cắt protein, tạo ra hai dạng hoạt tính sinh học rút ngắn và đẳng năng là amit GLP-1 (7-36) và GLP-1 (7-37). GLP-1 nội sinh bị phân giải nhanh chóng qua nhiều con đường, chủ yếu là do dipeptidyl peptidaza-4 (DPP-4 hoặc DPP-IV), nhưng cũng do endopeptidaza trung tính 24.11 (NEP 24.11) và do thanh thải qua thận, dẫn đến thời gian bán thải bằng khoảng 2 phút. Các phương pháp điều trị dựa trên GLP-1 có liên quan đến giảm cân và giảm nguy cơ hạ đường huyết, rất quan trọng trong điều trị bệnh đái tháo đường type II.

Exendin (exenatide) là chất chủ vận GLP-1 thuộc nhóm giả incretin, đã được chấp thuận là thuốc điều trị đái tháo đường type II (T2DM). Exenatide là phiên bản tổng hợp của exendin-4, một loại hormon peptit gồm 39 axit amin, là chất kích thích tiết insulin với tác dụng điều hòa cơ chế chuyển hóa đường. Exendin-4 có nhiều tương đồng và có cùng chức năng với GLP-1 của động vật có vú, nhưng có lợi thế điều trị vì nó chống lại việc bị DPP-4 (DPP-IV) phân giải, cho phép kéo dài thời gian bán thải được lý lâu hơn. Các đặc tính sinh học của exendin-4 khiến cho nó được xem xét sử dụng làm thuốc điều trị T2DM.

Amylin (polypeptit amyloid tại tiểu đảo tụy) (IAPP)) là hormon peptit gồm 37 axit amin, được tiết ra cùng với insulin từ tế bào β tụy. Amylin có vai trò trong điều hòa đường huyết bằng cách làm chậm việc làm rỗng dạ dày và thúc đẩy cảm giác no. Amylin (IAPP) được tạo từ peptit gồm 89 axit amin. Polypeptit proiset amyloid (proIAPP), được tạo tại các

tế bào β tụy từ peptit 89 axit amin thành peptit 67 axit amin sau khi 22 peptit tín hiệu axit amin bị phân cắt. Người ta cho rằng việc suy yếu trong xử lý proIAPP có thể dẫn đến các điều kiện gây ra bệnh đái tháo đường type II, vì thiếu sản xuất amylin (IAPP) có thể dẫn đến thiếu kiểm soát đường huyết. Pramlintide là chất giả amylin và ít nhất có hiệu lực như amylin người. Chất này là polypeptit gồm 37 axit amin và khác nhau về trình tự axit amin với amylin người do thay thế axit amin ở các vị trí 25 (alanin), 28 (serin) và 29 (serin) bằng prolin. Các prolin là các biến thể xuất hiện tự nhiên được tìm thấy ở amylin chuột. Kết quả của những thay thế này là pramlintide hòa tan, không kết dính và không kết tụ, do đó vượt qua một số hạn chế của amylin người tự nhiên (Janes và cộng sự, Diabetes (Đái tháo đường) 45(Suppl 2):235A (1996); Young và cộng sự, Drug Dev. Res. (Nghiên cứu phát triển dược phẩm) 37:231-48 (1996b)).

Hormon kích thích tế bào hắc tố α (α -MSH) là hormon peptit nội sinh và neuropeptit của họ melanocortin. α -MSH là hormon quan trọng nhất trong các hormon kích thích tế bào hắc tố (MSH) trong kích thích sự hình thành hắc tố, đây là quá trình ở động vật có vú chịu trách nhiệm hình thành sắc tố lông tóc và da. α -MSH cũng đóng vai trò trong hành vi ăn uống, cân bằng nội môi năng lượng, hoạt động tình dục, và bảo vệ khỏi chứng thiếu máu não và tổn thương do tái tưới máu.

Sản phẩm phiên mã điều hòa cocain và amphetamin (CART) là protein neuropeptit được mã hóa bởi gen CARTPT ở người. Các peptit CART, cụ thể CART (55-102), có vẻ có chức năng quan trọng trong việc điều hòa cân bằng nội môi năng lượng, khi các peptit CART tương tác với một số mạch phụ trách cảm giác ngon miệng ở vùng dưới đồi. Biểu hiện CART được điều hòa bởi các hormon peptit ngoại biên liên quan đến sự điều hòa cảm giác ngon miệng, bao gồm leptin, cholecystokinin và ghrelin. CART và cholecystokinin có tác dụng đồng vận đối với sự điều hòa cảm giác ngon miệng. Người ta cho rằng các peptit CART đóng vai trò trong hành vi giống như lo lắng, gây ra bởi việc cai etanol; điều chỉnh sự vận động, sở thích định hình có điều kiện (conditioned place preference) và tác dụng tự sử dụng cocaine của thuốc kích thích tâm thần; ức chế lượng thu nạp thức ăn; và có liên quan đến hành vi sợ hãi và giết mình. Giảm hoạt tính CART ở vùng dưới đồi có liên quan đến chứng ăn nhiều và tăng cân, và CART được cho là có vai trò trong mạch thần kinh hormon dopamine đường viền giữa chứa opioid điều chỉnh các quy trình tương thưởng tự nhiên.

Neuropeptit Y (NPY) có nhiều vai trò trong cơ thể bao gồm, ví dụ: kiểm soát hành vi ăn uống, hoạt động thần kinh vỏ não, hoạt động của tim và điều hòa cảm xúc. NPY cũng có liên quan đến một số bệnh ở người bao gồm béo phì, nghiện rượu và trầm cảm. Ngoài ra, việc ngăn chặn các tác dụng trung tâm của NPY bằng cách sử dụng kháng thể kháng NPY, oligodeoxynucleotit đối mã kháng NPY và các chất đối kháng thụ thể NPY dẫn đến giảm lượng thu nạp thức ăn ở động vật bị thiếu năng lượng. Cụ thể, thụ thể neuropeptit Y Y5 (NPY5) và thụ thể neuropeptit Y Y1 (NPY1) đã cho thấy là kích thích các giai đoạn ăn uống khác nhau (*Br J Pharmacol. (Tập chí Dược học Anh)* 08/2003;139(8):1433-40). Do đó, chất đối kháng NPY5 và NPY1 có thể có hiệu quả trong điều trị béo phì và các bệnh chuyển hóa liên quan khác.

Neurotensin là neuropeptit 13 axit amin có liên quan đến sự điều hòa hormon tạo thể vàng, giải phóng prolactin và có tương tác đáng kể với hệ thống giải phóng dopamine. Neurotensin được phân phối khắp hệ thần kinh trung ương với nồng độ cao nhất là ở vùng dưới đồi, hạch hạnh nhân và vùng nhân não. Neurotensin có thể gây ra một loạt các tác dụng, bao gồm gây tê, hạ thân nhiệt, tăng hoạt động của cơ quan vận động và tham gia vào việc điều hòa các đường dẫn dopamine.

Neuropeptit B (NPB) là một peptit ngắn, có hoạt tính sinh học, có tiền chất được mã hóa bởi gen NBP. NPB có thể hoạt động thông qua hai thụ thể ghép protein G, được gọi là thụ thể B/W 1 và 2 của neuropeptit (NPBWR1 và NPBWR2). Người ta cho rằng neuropeptit B có liên quan đến việc điều hòa ăn uống, hệ thần kinh nội tiết, trí nhớ, học tập và đường cảm nhận sự đau đớn hướng tâm.

Neuropeptit W (NPW) tồn tại ở hai dạng, bao gồm 23 (NPW23) hoặc 30 (NPW30) axit amin. Các neuropeptit này liên kết với và có thể hoạt động thông qua hai thụ thể ghép protein G, NPBWR1 (còn gọi là GPR7) và NPBWR2 (còn gọi là GPR8). NPW đã được chứng minh là ức chế lượng thu nạp thức ăn và trọng lượng cơ thể và tăng cả sản xuất nhiệt và nhiệt độ cơ thể, cho thấy NPW hoạt động như một phân tử phát tín hiệu dị hóa nội sinh.

Ghrelin (còn gọi là ienomorelin (INN)) là một hormon peptit, được sản xuất bởi các tế bào giải phóng ghrelin trong đường tiêu hóa, có chức năng như một neuropeptit trong hệ thần kinh trung ương. Ghrelin đóng một vai trò trong việc điều hòa cảm giác ngon miệng, điều hòa sự phân phối và tốc độ sử dụng năng lượng, điều hòa sự cảm nhận khen thưởng trong các tế bào thần kinh dopamine. Ghrelin được mã

hóa bởi gen GHRL. Người ta cho là ghrelin được sản xuất từ sự phân cắt của preproghrelin, chất này được tách ra để sản xuất chất tiền ghrelin, rồi chất tiền ghrelin sản xuất ghrelin gồm 28 axit amin. Không giống như các peptit nội sinh khác, ghrelin có thể vượt qua hàng rào máu não, giúp ghrelin được sử dụng ngoại sinh có tiềm năng lâm sàng độc đáo.

Thụ thể giống bombesin 3 (BRS3) là thụ thể ghép protein G chỉ tương tác với các peptit liên quan đến bombesin tự nhiên đã biết có ái lực thấp, và vì nó không có phối tử ái lực cao, BRS3 được phân loại là thụ thể mồ côi.

Galanin là sự mã hóa neuropeptit bởi gen GAL. Galanin được biểu hiện rộng rãi trong não, tủy sống và ruột của con người cũng như các động vật khác. Chức năng của galanin vẫn chưa được phân loại đầy đủ; tuy nhiên, galanin chủ yếu liên quan đến sự điều hòa và ức chế các điện thế hoạt động trong tế bào thần kinh. Galanin liên quan đến nhiều chức năng đa dạng sinh học bao gồm, nhưng không giới hạn trong cảm thụ đau, điều hòa thức và ngủ, nhận thức, ăn uống, điều hòa tâm trạng và điều hòa huyết áp. Galanin thường được đồng định vị với các chất dẫn truyền thần kinh cổ điển như axetylcholin, serotonin và norepinephrine, và với cả các chất điều hòa thần kinh như neuropeptit Y, chất P và peptit đường ruột vận mạch.

Cholecystokinin (CCK) là hormon peptit của hệ thống đường tiêu hóa chịu trách nhiệm kích thích tiêu hóa chất béo và protein. CCK được các tế bào nội tiết ruột tổng hợp và tiết ra trong ruột non và sự hiện diện của nó gây ra sự giải phóng các enzyme tiêu hóa và mật từ tuyến tụy và túi mật. CCK đóng vai trò trong tiêu hóa, cảm giác no và lo lắng.

Orexin (còn gọi là hypocretin) là neuropeptit điều chỉnh sự tỉnh thức, sự tỉnh táo và cảm giác ngon miệng. Có hai loại orexin: orexin A và B (hypocretin 1 và 2), lần lượt có độ dài bao gồm 33 và 28 axit amin. Hệ orexin chủ yếu được cho là có liên quan đến việc kích thích lượng thu nạp thức ăn, và ngoài các vai trò được mô tả ở trên, orexin còn điều hòa việc tiêu hao năng lượng và điều chỉnh chức năng nội tạng.

Hormon tích tụ hắc tố (MCH) là peptit vòng ở vùng dưới đồi làm tăng khẩu vị, gồm 19 axit amin, được cho là có liên quan đến việc điều chỉnh hành vi ăn uống, tâm trạng, chu kỳ ngủ thức và cân bằng năng lượng. Các tế bào thần kinh biểu hiện MCH nằm trong vùng dưới đồi ngang bên và vùng vô định (zona incerta), và mặc dù được phân bố hạn chế như vậy, các tế bào thần kinh MCH vẫn lan rộng khắp não.

Oxytocin là hormon peptit và neuropeptit thường được sản xuất bởi nhân quanh não thất của vùng dưới đồi và được phóng thích bởi thụ thể sau tuyến yên. Oxytocin được cho là có vai trò trong liên kết xã hội, sinh sản hữu tính, và trong và sau khi sinh con. Thụ thể oxytocin là thụ thể ghép protein G cần magie và cholesterol và thuộc nhóm sắc tố thị giác (loại I) của các thụ thể ghép protein G.

Stresscopin người (h-SCP) là peptit 40 axit amin, là thành viên của họ peptit hormon giải phóng corticotrophin (CRH). Các tác dụng sinh học của họ peptit CRH được bắt nguồn từ hai thụ thể ghép protein G xuyên màng 7, thụ thể CRH loại 1 (CRHR1) và thụ thể CRH loại 2 (CRHR2). Mặc dù các thụ thể này có sự tương đồng trình tự cao, các thành viên khác nhau của họ peptit CRH biểu hiện sự khác biệt đáng kể trong ái lực liên kết tương đối của chúng, mức độ hoạt hóa thụ thể và tính chọn lọc của hai thụ thể này. Không giống như nhiều thành viên trong họ CRH, h-SCP biểu hiện tính chọn lọc cao hơn đối với CRHR2 và đóng vai trò là chất trung gian hỗ trợ quá trình làm suy giảm sự khởi tạo và duy trì căng thẳng sinh lý. Ngoài vai trò rõ ràng của nó trong căng thẳng sinh lý, h-SCP đã được báo cáo là gây ra một số tác dụng sinh lý khác. Nó gây ra các tác dụng lên nội tiết, thần kinh trung ương, tim mạch, phổi, đường tiêu hóa, thận, cơ xương và hệ viêm. Hoạt tính của CRHR2 cũng có liên quan đến bệnh suy kiệt cơ xương, chẳng hạn như thiếu cơ, hoạt động vận động và thu nạp thức ăn, tham gia vào vai trò bảo vệ tim mạch và thể hiện hoạt tính giãn phế quản và chống viêm. Ngoài ra, các chất giả stresscopin đã được xác định là có ích trong điều trị các chỉ định y tế qua trung gian hoạt tính thụ thể hormon giải phóng corticotrophin 2, xem, ví dụ, Đơn xin cấp bằng sáng chế Hoa Kỳ Số: 20100130424.

Các phần kéo dài thời gian bán thải

Bên cạnh kháng thể của sáng chế hoặc mảnh gắn kháng nguyên của chúng, các liên hợp của sáng chế có thể hợp nhất một hoặc nhiều phần khác để kéo dài thời gian bán thải của phần hoạt tính được lý, ví dụ như thông qua tương tác cộng hóa trị. Các ví dụ về các phần kéo dài thời gian bán thải khác bao gồm, nhưng không hạn chế trong albumin, biến thể albumin, protein và/hoặc miền liên kết với albumin, transferrin và các mảnh và các chất tương tự của nó. Các phần kéo dài thời gian bán thải bổ sung có thể hợp nhất vào các liên hợp của sáng chế có thể bao gồm, ví dụ, các phân tử polyetylen glycol (PEG), như PEG5000 hoặc PEG20,000, axit béo và các este của axit béo có các chiều dài mạch khác nhau, ví dụ: flaurat, myristat, stearat, arachidat,

behenat, oleat, arachidonat, axit octanedioic, axit tetradecanedioic, axit octadecanedioic, axit docosanedioic, v.v., polylysin, octan, carbohydrat (dextrans, xenluloza, oligo- hoặc polysacarit) để mang lại các tính chất mong muốn. Các phân này có thể là thể dung hợp trực tiếp với trình tự mã hóa giàn giáo protein và có thể được tạo ra bằng các kỹ thuật tạo dòng và biểu hiện tiêu chuẩn. Hoặc, có thể sử dụng các phương pháp ghép hóa học thông thường để gắn các phân này vào các liên hợp được tạo bằng cách tái tổ hợp và hóa học của sáng chế.

Chẳng hạn, phân pegyl có thể được thêm vào các phân tử peptit của sáng chế bằng cách hợp nhất đơn phân cystein với đầu C của phân tử và gắn nhóm pegyl vào cystein bằng các phương pháp đã biết.

Các phân tử peptit của sáng chế hợp nhất các phân bổ sung có thể được so sánh về chức năng bằng một số xét nghiệm thông thường. Ví dụ, hoạt tính sinh học hoặc dược động học của peptit điều trị được đề cập, khi đứng riêng hoặc khi trong liên hợp theo sáng chế, có thể được xét nghiệm bằng các xét nghiệm đã biết trong ống nghiệm hoặc trong cơ thể sống và được so sánh.

Chế phẩm được

Trong phương án chung khác, sáng chế đề cập đến chế phẩm được bao gồm các liên hợp của sáng chế và chất mang được dụng. Trong tài liệu này, thuật ngữ “chế phẩm được” có nghĩa là sản phẩm bao gồm liên hợp của sáng chế cùng với chất mang được dụng. Các liên hợp của sáng chế và chế phẩm bao gồm chúng cũng có ích trong sản xuất dược phẩm cho các ứng dụng điều trị được đề cập trong bản mô tả.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “chất mang” chỉ tá dược, chất pha loãng, chất làm đầy, dung dịch đệm, muối, chất ổn định, chất làm tan, dầu, lipid, lipid chứa túi tinh, vi cầu, bao nang trong hạt mỡ, hoặc vật liệu khác phổ biến trong ngành để sử dụng trong chế phẩm được. Cần hiểu rằng các đặc trưng của chất mang, tá dược hoặc chất pha loãng sẽ phụ thuộc vào đường dùng được áp dụng cụ thể. Trong bản mô tả này, thuật ngữ “chất mang được dụng” chỉ vật liệu không gây độc hại và không ảnh hưởng đến hiệu quả của chế phẩm theo sáng chế hoặc hoạt tính sinh học của chế phẩm theo sáng chế. Theo các phương án cụ thể, theo quan điểm của bản mô tả này, chất mang được dụng bất kỳ phù hợp để sử dụng trong chế phẩm được kháng thể có thể được sử dụng trong sáng chế.

Các muối axit/anion được dùng để sử dụng trong sáng chế bao gồm, và không giới hạn axetat, benzen sulfonat, benzoat, bicarbonat, bitartrat, bromua, canxi edetat, camsylat, cacbonat, clorua, xitrat, dihydroclorua, edetat, edisylat, estolat, esylat, fumarat, glyceptat, gluconat, glutamat, glycolylarsanilat, hexylresorcinat, hydrabamin, hydrobromua, hydroclorua, hydroxynaphthoat, iodua, isethionat, lactat, lactobionat, malat, maleat, mandelat, mesylat, metylbromua, metylnitrat, metylsulfat, mucat, napsylat, nitrat, pamoat, pantothenat, photphat/diphotphat, polygalacturonat, salixylat, stearat, subaxetat, succinat, sulfat, tannat, tartrat, teoclat, tosylat và triethiodit. Các axit hữu cơ hoặc vô cơ bao gồm, và không giới hạn, axit hydriodic, perchloric, sulfuric, phosphoric, propionic, glycolic, metansulfonic, hydroxyetansulfonic, oxalic, 2-naphtalensulfonic, p-toluensulfonic, xyclohexansulfamic, sacarinic hoặc trifloaxetic.

Các muối bazơ/cation được dùng bao gồm, và không giới hạn trong các chất sau: nhôm, 2-amino-2-hydroxymetyl-propan-1,3-diol (còn gọi là tris(hydroxymetyl)aminometan, trometan hay “TRIS”), amoniac, benzathin, t-butylamin, canxi, cloprocain, cholin, xyclohexylamin, dietanolamin, etylendiamin, liti, L-lysin, magiê, meglumin, N-metyl-D-glucamin, piperidin, kali, procain, quinin, natri, trietanolamin, hoặc kẽm.

Trong các phương án khác, các chế phẩm được dùng được cung cấp bao gồm các liên hợp của sáng chế với khối lượng bằng từ khoảng 0,001 mg/ml đến khoảng 100 mg/ml, từ khoảng 0,01 mg/ml đến khoảng 50 mg/ml, hoặc từ khoảng 0,1 mg/ml đến khoảng 25 mg/ml. Chế phẩm được dùng có thể có độ pH bằng từ khoảng 3,0 đến khoảng 10, ví dụ từ khoảng 3 đến khoảng 7, hoặc từ khoảng 5 đến khoảng 9. Chế phẩm có thể còn bao gồm ít nhất một thành phần được chọn từ nhóm bao gồm hệ chất đệm, (các) chất bảo quản, (các) chất trương lực, (các) chất tạo chelat, (các) chất ổn định và (các) chất hoạt động bề mặt.

Chế phẩm bao gồm các hoạt chất được với các chất mang được dùng đã được biết đến trong ngành, ví dụ, Remington: The Science and Practice of Pharmacy (Khoa học và thực hành dược phẩm) (ví dụ, Ấn bản thứ 21 (2005), và các ấn bản bất kỳ sau đó). Các ví dụ không giới hạn về thành phần bổ sung bao gồm: chất đệm, chất pha loãng, dung môi, chất điều hòa trương lực, chất bảo quản, chất ổn định, và chất tạo chelat. Một hoặc nhiều chất mang được dùng có thể được sử dụng trong điều chế chế phẩm được của sáng chế.

Trong một phương án của sáng chế, chế phẩm được là chế phẩm dạng lỏng. Ví dụ ưu tiên về chế phẩm dạng lỏng là chế phẩm chứa nước, tức là chế phẩm có chứa nước. Chế phẩm dạng lỏng có thể bao gồm dung dịch, huyền phù, nhũ tương, vi nhũ tương, gel, v.v. Chế phẩm chứa nước thường bao gồm ít nhất 50% khối lượng nước, hoặc ít nhất 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, hoặc ít nhất 95% khối lượng nước.

Trong một phương án, chế phẩm được có thể được bào chế thành dung dịch tiêm có thể được tiêm, ví dụ, qua ống tiêm hoặc bơm truyền. Dung dịch tiêm có thể được truyền, ví dụ, dưới da, trong cơ, trong màng bụng, hoặc trong tĩnh mạch.

Trong phương án khác, chế phẩm được là chế phẩm dạng rắn, ví dụ, chế phẩm được sấy khô đông lạnh hoặc sấy phun, mà có thể được sử dụng như nguyên trạng, hoặc bác sĩ hoặc bệnh nhân thêm dung môi và/hoặc chất pha loãng vào trước khi dùng. Dạng bào chế rắn có thể bao gồm viên nén, như viên được ép, và/hoặc viên nén được bao phủ và viên nang (ví dụ như viên nang gelatin rắn hoặc mềm). Chế phẩm được có thể ở dạng gói, kẹo, bột, hạt, viên ngậm, hoặc bột để pha hoàn nguyên dung dịch, chẳng hạn.

Các dạng bào chế có thể giải phóng ngay tức thì, trong trường hợp này chúng có thể bao gồm chất mang tan trong nước hoặc có thể phân tán, hoặc chúng có thể giải phóng chậm, giải phóng lâu dài, hoặc giải phóng biến đổi, trong trường hợp này chúng có thể bao gồm các polyme không tan trong nước điều hòa tốc độ phân ly của dạng bào chế trong đường dạ dày ruột.

Trong các phương án khác, chế phẩm được có thể được truyền bằng đường trong mũi, trong miệng hoặc dưới lưỡi.

Độ pH trong chế phẩm chứa nước có thể bằng từ 3 đến 10. Trong một phương án của sáng chế, độ pH của chế phẩm bằng từ khoảng 7,0 đến khoảng 9,5. Trong phương án khác của sáng chế, độ pH của chế phẩm bằng từ khoảng 3,0 đến khoảng 7,0.

Trong phương án khác của sáng chế, chế phẩm được bao gồm chất đệm. Các ví dụ không hạn chế về chất đệm bao gồm: arginin, axit aspartic, bixin, xitrat, đinatri hydrophosphat, axit fumaric, glyxin, glyxylglyxin, histidin, lysin, axit maleic, axit malic, natri axetat, natri carbonat, natri dihydrophosphat, natri phosphat, succinat, axit tartaric, trixin, và tris(hydroxymetyl)-aminometan, và hỗn hợp của chúng. Chất đệm có thể có mặt riêng biệt theo từng chất hoặc có mặt trong tổ hợp, với nồng độ bằng khoảng 0,01 mg/ml đến khoảng 50 mg/ml, ví dụ từ khoảng 0,1 mg/ml đến khoảng 20 mg/ml.

Chế phẩm được bao gồm từng chất đệm cụ thể này trong các phương án thay thế của sáng chế.

Trong phương án khác của sáng chế, chế phẩm được bao gồm chất bảo quản. Các ví dụ không hạn chế về chất đệm bao gồm: benzethoni clorua, axit benzoic, rượu benzylic, bronopol, butyl 4-hydroxybenzoat, clobutanol, clocresol, clohexidín, clophenesin, o-cresol, m-cresol, p-cresol, etyl 4-hydroxybenzoat, imidurea, metyl 4-hydroxybenzoat, phenol, 2-phenoxyetanol, 2-phenyletanol, propyl 4-hydroxybenzoat, natri dehydroaxetat, thiomerosal, và hỗn hợp của chúng. Chất bảo quản có thể có mặt riêng biệt theo từng chất hoặc có mặt trong tổ hợp, với nồng độ bằng khoảng 0,01 mg/ml đến khoảng 50 mg/ml, ví dụ từ khoảng 0,1 mg/ml đến khoảng 20 mg/ml. Chế phẩm được bao gồm từng chất đệm cụ thể này trong các phương án thay thế của sáng chế.

Trong phương án khác của sáng chế, chế phẩm được bao gồm chất trương lực. Các ví dụ không hạn chế của phương án bao gồm muối (như natri clorua), axit amin (như glyxin, histidin, arginin, lysin, isoleuxin, axit aspartic, tryptophan, và threonin), alditol (như glyxerol, 1,2-propandirol propylenglycol), 1,3-propandirol, và 1,3-butandirol), polyetylenglycol (ví dụ PEG400), và hỗn hợp của nó. Ví dụ khác về chất trương lực bao gồm đường. Các ví dụ không hạn chế về đường có thể là mono-, di-, hoặc polysacarit, hoặc glucan tan trong nước, bao gồm, ví dụ fructoza, glucoza, mannoza, sorboza, xyloza, maltoza, lactoza, sucroza, trehaloza, đextran, pululan, đextrin, xyclodextrin, alpha và beta-HPCD, tinh bột tan, tinh bột hydroxyetyl và natri carboxymetylxenluloza. Ví dụ khác về chất trương lực là rượu đường, trong đó thuật ngữ “rượu đường” được xác định là C(4-8) hydrocarbon có ít nhất một nhóm —OH. Các ví dụ không hạn chế về rượu bao gồm manitol, sorbitol, inositol, galactitol, dulxitol, xylitol, và arabitol. Chế phẩm được bao gồm từng chất trương lực cụ thể này trong các phương án thay thế của sáng chế. Chất trương lực có thể có mặt riêng biệt theo từng chất hoặc có mặt trong tổ hợp, với nồng độ bằng khoảng 0,01 mg/ml đến khoảng 50 mg/ml, ví dụ từ khoảng 0,1 mg/ml đến khoảng 20 mg/ml. Chế phẩm được bao gồm từng chất trương lực cụ thể này trong các phương án thay thế của sáng chế.

Trong phương án khác của sáng chế, chế phẩm được bao gồm chất tạo chelat. Các ví dụ không giới hạn về chất tạo chelat bao gồm axit xitric, axit aspartic, muối của axit etylendiãmintetraaxetic (EDTA), và hỗn hợp của chúng. Chất tạo chelat có thể có

mặt riêng biệt theo từng chất hoặc có mặt trong tổ hợp, với nồng độ bằng khoảng 0,01 mg/ml đến khoảng 50 mg/ml, ví dụ từ khoảng 0,1 mg/ml đến khoảng 20 mg/ml. Chế phẩm được bao gồm từng chất tạo chelat cụ thể này trong các phương án thay thế của sáng chế.

Trong phương án khác của sáng chế, chế phẩm được bao gồm chất ổn định. Các ví dụ không hạn chế về các chất ổn định bao gồm một hoặc nhiều chất ức chế cộng gộp, một hoặc nhiều chất ức chế oxy hóa, một hoặc nhiều chất hoạt động bề mặt, và/hoặc một hoặc nhiều chất ức chế proteaza.

Trong phương án khác của sáng chế, chế phẩm được bao gồm chất ổn định, trong đó chất ổn định này bao gồm carboxy-/hydroxyxenluloza và chất dẫn xuất của nó (như HPC, HPC-SL, HPC-L và HPMC), cyclodextrin, 2-metylthioetanol, polyetylen glycol (như PEG 3350), rượu polyvinyl (PVA), polyvinyl pyrrolidon, muối (như natri clorua), chất chứa lưu huỳnh như monothioglycerol), hoặc axit thioglycolic. Chất ổn định có thể có mặt riêng biệt theo từng chất hoặc có mặt trong tổ hợp, với nồng độ bằng khoảng 0,01 mg/ml đến khoảng 50 mg/ml, ví dụ từ khoảng 0,1 mg/ml đến khoảng 20 mg/ml. Chế phẩm được bao gồm từng chất ổn định cụ thể này trong các phương án thay thế của sáng chế.

Trong các phương án khác của sáng chế, chế phẩm được bao gồm một hoặc nhiều chất hoạt động bề mặt, tốt hơn là bao gồm chất hoạt động bề mặt, ít nhất một chất hoạt động bề mặt, hoặc hai chất hoạt động bề mặt khác nhau. Thuật ngữ “chất hoạt động bề mặt” chỉ phân tử bất kỳ hoặc ion bao gồm một phần tan trong nước (ưa nước), và phần tan trong chất béo. Chất hoạt động bề mặt có thể, ví dụ, được chọn từ nhóm bao gồm các chất hoạt động bề mặt anion, chất hoạt động bề mặt cation, chất hoạt động bề mặt không điện ly, và/hoặc chất hoạt động bề mặt ion lưỡng tính. Chất hoạt động bề mặt có thể có mặt riêng biệt theo từng chất hoặc có mặt trong tổ hợp, với nồng độ bằng khoảng 0,1 mg/ml đến khoảng 20 mg/ml. Chế phẩm được bao gồm từng chất hoạt động bề mặt cụ thể này trong các phương án thay thế của sáng chế.

Trong phương án khác của sáng chế, chế phẩm được bao gồm một hoặc nhiều chất ức chế proteaza, như, ví dụ, EDTA (axit ethylenediamin tetraaxetic), và/hoặc axit benzamidin hydroclorua (HCl). Chất ức chế proteaza có thể có mặt riêng biệt theo từng chất hoặc có mặt trong tổ hợp, với nồng độ bằng khoảng 0,1 mg/ml đến khoảng

20 mg/ml. Chế phẩm được bao gồm từng chất ức chế proteaza cụ thể này trong các phương án thay thế của sáng chế.

Chế phẩm được của sáng chế có thể bao gồm lượng axit amin dạng bazơ đủ để giảm sự hình thành kết tụ polypeptit trong quá trình bảo quản chế phẩm. Thuật ngữ “bazơ axit amin” chỉ một hoặc nhiều axit amin (như methionin, histidin, imidazol, arginin, lysin, isoleuxin, axit apartic, tryptophan, threonin), hoặc chất tương tự của chúng. Axit amin bất kỳ có thể có mặt dưới dạng bazơ tự do hoặc dạng muối. Chất đồng phân lập thể bất kỳ (tức là, L, D, hoặc hỗn hợp của nó) của bazơ axit amin có thể có mặt. Bazơ axit amin có thể có mặt riêng biệt theo từng chất hoặc kết hợp với bazơ axit amin khác, với nồng độ bằng khoảng 0,01 mg/ml đến khoảng 50 mg/ml, ví dụ từ khoảng 0,1 mg/ml đến khoảng 20 mg/ml. Chế phẩm được bao gồm từng bazơ axit amin này trong các phương án thay thế của sáng chế.

Đối với chuyên gia trong ngành, rõ ràng liều hiệu dụng trong điều trị đối với các liên hợp trong sáng chế này hoặc chế phẩm được của các hợp chất đó sẽ khác nhau theo tác dụng mong muốn. Vì vậy, các liều lượng tối ưu được sử dụng có thể đã được người có trình độ trong ngành xác định và sẽ khác nhau tùy theo liên hợp cụ thể được dùng, chế độ dùng, độ mạnh của chế phẩm, và sự phát triển của tình trạng bệnh. Ngoài ra, các yếu tố liên quan đến đối tượng cụ thể đang được điều trị, bao gồm tuổi tác, cân nặng, chế độ ăn và thời gian dùng thuốc, sẽ dẫn đến việc cần phải điều chỉnh liều lượng đến mức điều trị thích hợp.

Đối với tất cả chỉ định, các liên hợp của sáng chế tốt hơn là được cho sử dụng bên ngoài với liều bằng khoảng 1 μ g đến khoảng 5 mg mỗi ngày theo liều đơn hoặc liều được chia nhỏ (ví dụ, liều đơn có thể được chia thành 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, hoặc 10 liều nhỏ), hoặc khoảng 0,01 μ g/kg đến khoảng 500 μ g/kg mỗi liều, tốt hơn là khoảng 0,05 μ g/kg đến khoảng 250 μ g/kg, tốt hơn là thấp hơn khoảng 50 μ g/kg. Các liều trong các khoảng này dĩ nhiên sẽ khác nhau tùy vào từng chất chủ vận, và người có trình độ trong ngành hoàn toàn có thể xác định được. Do đó, các liều lượng trên là điển hình cho trường hợp trung bình. Dĩ nhiên có thể có những trường hợp khuyến dùng phạm vi liều lượng cao hơn hoặc thấp hơn, và những trường hợp đó nằm trong phạm vi sáng chế này.

Trong những phương án khác, liên hợp của sáng chế được cho sử dụng với liều bằng khoảng 1 μ g đến khoảng 5 mg, hoặc với liều bằng khoảng 0,01 μ g/kg đến khoảng

500 µg/kg, tốt hơn là với liều bằng khoảng 0,05 µg/kg đến khoảng 250 µg/kg, tốt hơn là với liều thấp hơn khoảng 50 µg/kg, với thuốc điều trị thứ hai (ví dụ, liraglutide) với liều bằng khoảng 1 µg đến khoảng 5 mg, hoặc với liều bằng khoảng 0,01 µg/kg đến khoảng 500 µg/kg, tốt hơn là với liều bằng khoảng 0,05 µg/kg đến khoảng 250 µg/kg, tốt hơn là với liều thấp hơn khoảng 50 µg/kg.

Muối được dụng của các liên hợp của sáng chế bao gồm các muối không độc thường gặp hoặc các muối amoni bậc bốn được hình thành từ các axit hoặc bazơ vô cơ hoặc hữu cơ. Ví dụ về các muối axit trên bao gồm axetat, adipat, benzoat, benzen sulfonat, xitrat, long não, đodexylsulfat, hydroclorua, hydrobromua, lactat, maleat, metansulfonat, nitrat, oxalat, pivalat, propionat, suxinat, sulfat và tartrat. Các muối bazơ bao gồm muối amoni, muối của kim loại kiềm như muối natri và muối kali, muối của kim loại kiềm thổ như muối canxi và muối magiê, muối có bazơ hữu cơ như muối dicyclohexylamino và muối có axit amin như arginin. Ngoài ra, các nhóm có tính bazơ chứa nitơ có thể được tạo thành bazơ bậc bốn, ví dụ bằng các halogenua alkyl.

Các chế phẩm được của sáng chế có thể được sử dụng theo bất cứ phương thức nào đảm bảo mục đích sử dụng của chế phẩm. Ví dụ các phương thức này bao gồm sử dụng qua đường ngoài ruột, dưới da, trong tĩnh mạch, trong cơ, trong màng bụng, qua da, trong miệng hoặc mắt. Có thể sử dụng qua đường miệng. Các chế phẩm thích hợp để sử dụng qua đường ngoài ruột bao gồm các dung dịch chứa nước của liên hợp có hoạt tính ở dạng tan trong nước, ví dụ các muối tan trong nước, dung dịch axit, dung dịch kiềm, dung dịch dextroza-nước, dung dịch hydrat cacbon đẳng trương và các phức hệ bao thể.

Sáng chế này cũng bao gồm phương pháp tạo chế phẩm được bao gồm việc pha trộn một chất mang được dụng với liên hợp bất kỳ của sáng chế này. Ngoài ra, sáng chế này bao gồm các chế phẩm được tạo ra bằng cách pha trộn một hoặc nhiều chất mang được dụng với liên hợp bất kỳ của sáng chế này.

Ngoài ra, các liên hợp của sáng chế này có thể chứa một hoặc nhiều chất đa hình hoặc dạng tinh thể vô định hình và do vậy được đưa vào phạm vi sáng chế. Ngoài ra, các liên hợp có thể hình thành các solvat, ví dụ với nước (tức là hydrat) hoặc các dung môi hữu cơ thông thường. Trong bản mô tả này, thuật ngữ “solvat” nghĩa là sự liên kết vật lý của các liên hợp của sáng chế với một hoặc nhiều phân tử dung môi. Sự liên kết vật lý này liên quan đến các mức độ liên kết cộng hóa trị và ion khác nhau,

bao gồm liên kết hydro. Trong một số trường hợp, solvat sẽ có khả năng phân lập, ví dụ khi một hoặc nhiều phân tử dung môi được kết hợp trong mạng tinh thể của chất rắn tinh thể. Thuật ngữ “solvat” có ý bao hàm cả solvat pha dung dịch và solvat có thể được phân lập. Có rất nhiều ví dụ về solvat phù hợp như các etanolat, metanolat và tương tự.

Sáng chế này dự kiến, trong phạm vi của mình, bao gồm các chất đa hình và solvat của các liên hợp trong sáng chế này. Vì vậy, trong các phương pháp điều trị của sáng chế này, thuật ngữ “sử dụng” bao gồm các phương thức điều trị, cải thiện hoặc phòng ngừa một hội chứng, rối loạn hoặc bệnh mô tả trong tài liệu này bằng các liên hợp trong sáng chế này hoặc một chất đa hình hoặc solvat của hợp chất đó mà rõ ràng sẽ nằm trong phạm vi của sáng chế mặc dù không được tiết lộ cụ thể.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến liên hợp của sáng chế để sử dụng làm dược phẩm.

Sáng chế này bao gồm tiền dược của các liên hợp của sáng chế này trong phạm vi của nó. Nhìn chung, những tiền dược này sẽ là các dẫn xuất chức năng của các liên hợp sẵn sàng được chuyển đổi *trong cơ thể sống* thành liên hợp yêu cầu. Vì vậy, trong các phương pháp điều trị của sáng chế này, thuật ngữ “sử dụng” bao hàm việc điều trị các rối loạn khác nhau đã được mô tả bằng liên hợp được bộc lộ cụ thể hoặc liên hợp không được bộc lộ cụ thể, nhưng chuyển đổi thành liên hợp chỉ định *trong cơ thể sống* sau khi sử dụng cho bệnh nhân. Các quy trình truyền thống về cách chọn lọc và điều chế các dẫn xuất tiền dược phù hợp được mô tả, ví dụ trong “Kiểu tiền dược” (“Design of Prodrugs”), btv. H. Bundgaard, Elsevier, 1985.

Ngoài ra, trong phạm vi của sáng chế này, bất cứ nguyên tố nào, cụ thể khi được đề cập liên quan đến liên hợp của sáng chế, đều bao hàm tất cả đồng vị và hỗn hợp đồng vị của nguyên tố đó, dù xuất hiện tự nhiên hay được tổng hợp, dù phân bố trong tự nhiên hay ở dạng làm giàu đồng vị. Ví dụ, đề cập đến hydro có nghĩa là đề cập đến ^1H , ^2H (D), và ^3H (T) trong phạm vi của nó. Tương tự, các đề cập đến cacbon và oxy có nghĩa là đề cập đến lần lượt ^{12}C , ^{13}C và ^{14}C và ^{16}O và ^{18}O trong phạm vi của nó. Các chất đồng vị có thể phóng xạ hoặc không phóng xạ. Các liên hợp được gắn nhãn phóng xạ của sáng chế có thể bao gồm đồng vị phóng xạ được chọn từ nhóm gồm ^3H , ^{11}C , ^{18}F , ^{122}I , ^{123}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{75}Br , ^{76}Br , ^{77}Br và ^{82}Br . Đồng vị phóng xạ nên được chọn từ nhóm gồm ^3H , ^{11}C và ^{18}F .

Một số liên hợp của sáng chế này có thể tồn tại dưới dạng atropisomer. Atropisomer là các đồng phân lập thể tạo ra từ quá trình quay bị cản trở về các liên kết đơn trong đó hàng rào tương tác lập thể đối với quá trình quay đủ cao để cho phép phân lập các đồng phân hình thể. Cần hiểu rằng tất cả các đồng phân hình thể nói trên và hỗn hợp của chúng được bao hàm trong phạm vi của sáng chế này.

Trong trường hợp các liên hợp theo sáng chế này có ít nhất một tâm lập thể, chúng có thể tồn tại theo đó dưới dạng đồng phân đối ảnh hoặc đồng phân không đối ảnh. Cần hiểu rằng tất cả các đồng phân nói trên và hỗn hợp của chúng được bao hàm trong phạm vi của sáng chế này.

Trong trường hợp quá trình điều chế các liên hợp theo sáng chế đòi hỏi phải trộn lẫn các đồng phân lập thể, các đồng phân này có thể được phân tách bằng các kỹ thuật truyền thống như sắc ký điều chế. Các liên hợp có thể được điều chế ở dạng triet quang, hoặc từng đồng phân đối ảnh có thể được điều chế bằng cách tổng hợp từng đồng phân đối ảnh hay bằng cách phân giải. Ví dụ, các liên hợp có thể được phân giải thành các đồng phân đối ảnh cấu phần bằng các kỹ thuật tiêu chuẩn như hình thành các cặp đồng phân phi đối ảnh bằng cách tạo muối với một axit có hoạt tính quang học như axit (-)-đi-p-toluoyl-D-tartaric và/hoặc axit (+)-đi-p-toluoyl-L-tartaric, sau đó kết tinh phân đoạn và tái tạo bazơ tự do. Các liên hợp cũng có thể được phân giải bằng cách tạo các este hoặc amit đồng phân phi đối ảnh, sau đó phân tách bằng phương pháp sắc ký và loại bỏ chất phụ trợ bất đối xứng. Hoặc, cũng có thể phân giải các liên hợp bằng cách sử dụng sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) hoặc SFC cột bất đối xứng. Trong một số trường hợp đồng phân quay của các liên hợp có thể tồn tại mà có thể được quan sát bằng ^1H NMR dẫn đến các mũi đa phức tạo và hợp nhất đỉnh trong phổ ^1H NMR.

Trong các quá trình điều chế các liên hợp của sáng chế này, có thể sẽ cần và/hoặc phát sinh nhu cầu bảo vệ các nhóm nhạy cảm hoặc nhóm phản ứng trên bất kỳ phân tử nào liên quan. Điều này có thể đạt được bằng các nhóm bảo vệ thông dụng như các nhóm bảo vệ được mô tả trong Các nhóm bảo vệ trong hóa học hữu cơ, btw. J.F.W. McOmie, Plenum Press, 1973; và T.W. Greene & P.G.M. Wuts, Các nhóm bảo vệ trong tổng hợp hữu cơ, John Wiley & Sons, 1991, mỗi tài liệu này sau đây được hợp nhất vào bản mô tả này bằng viện dẫn vì tất cả các lý do. Các nhóm bảo vệ có thể được loại bỏ ở giai đoạn thuận tiện tiếp theo bằng các phương pháp được biết đến trong ngành.

Phương pháp sử dụng

Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp phòng ngừa, điều trị, trì hoãn khởi phát, hoặc cải thiện rối loạn, bệnh hoặc tình trạng hoặc một hoặc nhiều triệu chứng bất kỳ của rối loạn, bệnh hoặc tình trạng ở đối tượng cần điều trị, phương pháp bao gồm bước cho đối tượng cần điều trị sử dụng một lượng hữu hiệu liên hợp hoặc chế phẩm được của sáng chế.

Theo các phương án cụ thể của sáng chế, bệnh, rối loạn hoặc tình trạng có thể là bệnh, rối loạn hoặc tình trạng bất kỳ mà có thể được điều trị bằng peptit hoặc hợp chất có khả năng được ghép với nền kháng thể đơn dòng của sáng chế. Trong một số phương án nhất định, bệnh, rối loạn hoặc tình trạng được chọn từ nhóm bao gồm béo phì, tiểu đường tít I hoặc tít II, hội chứng chuyển hóa (tức là Hội chứng X), kháng insulin, suy giảm dung nạp glucoza (ví dụ như không dung nạp glucoza), tăng đường huyết, tăng insulin máu, tăng triglyxerit máu, giảm glucoza huyết do tăng insulin máu bẩm sinh (CHI), rối loạn mỡ máu, xơ vữa động mạch, bệnh thận do tiểu đường, các yếu tố nguy cơ tim mạch khác như tăng huyết áp và các yếu tố nguy cơ tim mạch liên quan đến nồng độ cholesterol và/hoặc lipit không được kiểm soát, loãng xương, viêm, bệnh gan nhiễm mỡ không do uống rượu (NAFLD), viêm gan nhiễm mỡ không do rượu (NASH), bệnh thận và/hoặc bệnh chàm.

Theo các phương án cụ thể, lượng điều trị hữu hiệu là lượng điều trị đủ để đạt một, hai, ba, bốn hoặc nhiều hiệu quả sau đây: (i) giảm hoặc cải thiện mức độ nghiêm trọng của bệnh, chứng rối loạn hoặc tình trạng được điều trị hoặc triệu chứng liên quan; (ii) giảm thời gian bệnh, chứng rối loạn hoặc tình trạng được điều trị hoặc triệu chứng liên quan; (iii) ngăn chặn sự tiến triển bệnh, chứng rối loạn hoặc tình trạng được điều trị hoặc triệu chứng liên quan; (iv) làm thoái lui bệnh, chứng rối loạn hoặc tình trạng được điều trị hoặc triệu chứng liên quan; (v) ngăn chặn sự phát triển hoặc khởi phát bệnh, chứng rối loạn hoặc tình trạng được điều trị hoặc triệu chứng liên quan; (vi) ngăn chặn sự tái phát bệnh, chứng rối loạn hoặc tình trạng được điều trị hoặc triệu chứng liên quan; (vii) giảm việc nhập viện của đối tượng bị bệnh, chứng rối loạn hoặc tình trạng được điều trị hoặc triệu chứng liên quan; (viii) giảm thời gian nằm viện của đối tượng bị bệnh, chứng rối loạn hoặc tình trạng được điều trị hoặc triệu chứng liên quan; (ix) tăng khả năng sống của đối tượng bị bệnh, chứng rối loạn hoặc tình trạng được điều trị hoặc triệu chứng liên quan; (xi) ức chế hoặc làm giảm bệnh, chứng rối loạn hoặc tình trạng được

điều trị hoặc triệu chứng liên quan ở đối tượng; và/hoặc (xii) tăng cường hoặc cải thiện hiệu quả điều trị hoặc phòng ngừa của liệu pháp khác.

Liều hoặc lượng điều trị hữu hiệu có thể thay đổi theo nhiều yếu tố, như bệnh, chứng rối loạn hoặc tình trạng được điều trị, cách sử dụng, vị trí đích, tình trạng sinh lý học của đối tượng (bao gồm, ví dụ, tuổi, cân nặng, sức khỏe), dù đối tượng là người hoặc con vật, dược phẩm khác được sử dụng, và dù việc điều trị là phòng ngừa hoặc chữa bệnh. Các liều điều trị được chuẩn độ tối ưu để tối ưu hóa tính an toàn và hiệu quả.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “trị bệnh”, “trị”, và “điều trị” đều chỉ việc cải thiện, đảo ngược ít nhất một thông số cơ thể có thể đo được liên quan đến bệnh, rối loạn hoặc tình trạng, làm chậm sự tiến triển hoặc phát triển, mà có thể, nhưng không nhất thiết, được thể hiện ra ở đối tượng. Thuật ngữ “trị bệnh”, “trị”, và “điều trị” có thể chỉ việc dẫn đến sự thoái lui, ngăn chặn hoặc ít nhất làm chậm sự tiến triển của bệnh, rối loạn hoặc tình trạng. Trong phương án cụ thể, “trị bệnh”, “trị”, và “điều trị” chỉ sự làm giảm nhẹ, ngăn chặn sự tiến triển hoặc khởi phát, hoặc giảm thời gian diễn ra một hoặc nhiều triệu chứng liên quan đến bệnh, rối loạn hoặc tình trạng. Trong phương án cụ thể, “trị bệnh”, “trị”, và “điều trị” chỉ việc ngăn chặn sự tái phát của bệnh, rối loạn hoặc tình trạng. Trong phương án cụ thể, “trị bệnh”, “trị”, và “điều trị” chỉ mức tăng thời gian sống sót của đối tượng mắc bệnh, rối loạn hoặc tình trạng. Trong phương án cụ thể, “trị bệnh”, “trị”, và “điều trị” chỉ việc loại bỏ bệnh, rối loạn hoặc tình trạng ở đối tượng.

Trong một phương án, sáng chế cũng cung cấp phương pháp phòng ngừa, điều trị, trì hoãn khởi phát, hoặc cải thiện bệnh béo phì hoặc một hoặc nhiều triệu chứng bất kỳ của bệnh béo phì ở đối tượng cần điều trị, phương pháp bao gồm bước cho đối tượng cần điều trị sử dụng một lượng hữu hiệu liên hợp hoặc chế phẩm dược của sáng chế. Trong một số phương án, cân nặng cơ thể của đối tượng được giảm ở mức, ví dụ, bằng từ khoảng 0,01% đến khoảng 0,1%, bằng từ khoảng 0,1% đến khoảng 0,5%, bằng từ khoảng 0,5% đến khoảng 1%, bằng từ khoảng 1% đến khoảng 5%, bằng từ khoảng 2% đến khoảng 3%, bằng từ khoảng 5% đến khoảng 10%, bằng từ khoảng 10% đến khoảng 15%, bằng từ khoảng 15% đến khoảng 20%, bằng từ khoảng 20% đến khoảng 25%, bằng từ khoảng 25% đến khoảng 30%, bằng từ khoảng 30% đến khoảng 35%, bằng từ khoảng 35% đến khoảng 40%, bằng từ khoảng 40% đến khoảng 45%, hoặc bằng từ khoảng 45% đến khoảng 50%, so với cân nặng cơ thể của đối tượng trước khi sử dụng

loại bất kỳ trong các liên hợp, chế phẩm được, dạng bào chế hoặc được phẩm của sáng chế được mô tả trong bản mô tả này, hoặc so với đối tượng đối chứng không được nhận loại bất kỳ trong các liên hợp, chế phẩm, dạng bào chế hoặc được phẩm của sáng chế được mô tả trong bản mô tả này.

Trong một số phương án, sự giảm cân nặng cơ thể được duy trì, ví dụ, trong khoảng 1 tuần, trong khoảng 2 tuần, trong khoảng 3 tuần, trong khoảng 1 tháng, trong khoảng 2 tháng, trong khoảng 3 tháng, trong khoảng 4 tháng, trong khoảng 5 tháng, trong khoảng 6 tháng, trong khoảng 7 tháng, trong khoảng 8 tháng, trong khoảng 9 tháng, trong khoảng 10 tháng, trong khoảng 11 tháng, trong khoảng 1 năm, trong khoảng 1,5 năm, trong khoảng 2 năm, trong khoảng 2,5 năm, trong khoảng 3 năm, trong khoảng 3,5 năm, trong khoảng 4 năm, trong khoảng 4,5 năm, trong khoảng 5 năm, trong khoảng 6 năm, trong khoảng 7 năm, trong khoảng 8 năm, trong khoảng 9 năm, trong khoảng 10 năm, trong khoảng 15 năm, hoặc trong khoảng 20 năm.

Sáng chế này đưa ra phương pháp phòng ngừa, điều trị, trì hoãn sự khởi phát hoặc cải thiện hội chứng, rối loạn hoặc bệnh, hoặc một hoặc nhiều triệu chứng của hội chứng, rối loạn hoặc bệnh đã nêu ở đối tượng cần điều trị, trong đó hội chứng, rối loạn hoặc bệnh này được chọn từ nhóm bao gồm béo phì, tiểu đường tít 1 hoặc tít 2, hội chứng chuyển hóa (tức là Hội chứng X), kháng insulin, suy giảm dung nạp glucoza (ví dụ như không dung nạp glucoza), tăng đường huyết, tăng insulin máu, tăng triglycerit máu, , rối loạn mỡ máu, xơ vữa động mạch, bệnh thận do tiểu đường, các yếu tố nguy cơ tim mạch khác như tăng huyết áp và các yếu tố nguy cơ tim mạch liên quan đến nồng độ cholesterol và/hoặc lipit không được kiểm soát, loãng xương, viêm, viêm gan nhiễm mỡ không do rượu (NASH), bệnh thận và chàm, bao gồm bước cho đối tượng cần điều trị sử dụng một lượng hữu hiệu liên hợp hoặc chế phẩm được của sáng chế.

Trong bản mô tả này, hội chứng chuyển hóa đề cập đến đối tượng có một hoặc nhiều triệu chứng bất kỳ sau đây: lượng đường trong máu cao (ví dụ, đường huyết lúc đói cao), huyết áp cao, nồng độ cholesterol bất thường (ví dụ, nồng độ HDL thấp), nồng độ triglycerit trong máu bất thường (ví dụ, triglycerit trong máu cao), vòng eo lớn (tức là chu vi vòng eo), tăng mỡ trong vùng bụng, kháng insulin, không dung nạp glucoza, tăng nồng độ protein phản ứng C (nghĩa là trạng thái tiền viêm) và tăng nồng độ chất ức chế hoạt hóa plasminogen trong huyết tương 1 và nồng độ fibrinogen (nghĩa là trạng thái tiền huyết khối).

Sáng chế cũng cung cấp phương pháp làm giảm lượng thu nạp thức ăn ở đối tượng cần điều trị, phương pháp bao gồm bước cho đối tượng cần điều trị sử dụng một lượng hữu hiệu liên hợp hoặc chế phẩm được của sáng chế. Trong một số phương án, lượng thức ăn thu nạp của đối tượng được giảm ở mức, ví dụ, bằng từ khoảng 0,01% đến khoảng 0,1%, bằng từ khoảng 0,1% đến khoảng 0,5%, bằng từ khoảng 0,5% đến khoảng 1%, bằng từ khoảng 1% đến khoảng 5%, bằng từ khoảng 2% đến khoảng 3%, bằng từ khoảng 5% đến khoảng 10%, bằng từ khoảng 10% đến khoảng 15%, bằng từ khoảng 15% đến khoảng 20%, bằng từ khoảng 20% đến khoảng 25%, bằng từ khoảng 25% đến khoảng 30%, bằng từ khoảng 30% đến khoảng 35%, bằng từ khoảng 35% đến khoảng 40%, bằng từ khoảng 40% đến khoảng 45%, hoặc bằng từ khoảng 45% đến khoảng 50%, so với lượng thức ăn thu nạp của đối tượng trước khi sử dụng loại bất kỳ trong các liên hợp, chế phẩm, dạng bào chế, dược phẩm, hoặc các tổ hợp của sáng chế được mô tả trong bản mô tả này, hoặc so với đối tượng đối chứng không được nhận loại bất kỳ trong các liên hợp, chế phẩm, dạng bào chế, dược phẩm hoặc tổ hợp của sáng chế được mô tả trong bản mô tả này.

Trong một số phương án, lượng thức ăn thu nạp được duy trì, ví dụ, trong khoảng 1 tuần, trong khoảng 2 tuần, trong khoảng 3 tuần, trong khoảng 1 tháng, trong khoảng 2 tháng, trong khoảng 3 tháng, trong khoảng 4 tháng, trong khoảng 5 tháng, trong khoảng 6 tháng, trong khoảng 7 tháng, trong khoảng 8 tháng, trong khoảng 9 tháng, trong khoảng 10 tháng, trong khoảng 11 tháng, trong khoảng 1 năm, trong khoảng 1,5 năm, trong khoảng 2 năm, trong khoảng 2,5 năm, trong khoảng 3 năm, trong khoảng 3,5 năm, trong khoảng 4 năm, trong khoảng 4,5 năm, trong khoảng 5 năm, trong khoảng 6 năm, trong khoảng 7 năm, trong khoảng 8 năm, trong khoảng 9 năm, trong khoảng 10 năm, trong khoảng 15 năm, hoặc trong khoảng 20 năm.

Sáng chế cũng cung cấp phương pháp làm giảm glycated hemoglobin (A1C) ở đối tượng cần điều trị, phương pháp bao gồm bước cho đối tượng cần điều trị sử dụng một lượng hữu hiệu liên hợp hoặc chế phẩm được của sáng chế. Trong một số phương án, lượng A1C của đối tượng được giảm ở mức, ví dụ, bằng từ khoảng 0,001% đến khoảng 0,01%, từ khoảng 0,01% đến khoảng 0,1%, từ khoảng 0,1% đến khoảng 0,2%, từ khoảng 0,2% đến khoảng 0,3%, từ khoảng 0,3% đến khoảng 0,4%, từ khoảng 0,4% đến khoảng 0,5%, từ khoảng 0,5% đến khoảng 1%, từ khoảng 1% đến khoảng 1,5%, từ khoảng 1,5% đến khoảng 2%, từ khoảng 2% đến khoảng 2,5%, từ khoảng 2,5% đến khoảng 3%, từ khoảng 3% đến

khoảng 4%, từ khoảng 4% đến khoảng 5%, từ khoảng 5% đến khoảng 6%, từ khoảng 6% đến khoảng 7%, từ khoảng 7% đến khoảng 8%, từ khoảng 8% đến khoảng 9%, hoặc từ khoảng 9% đến khoảng 10% so với lượng A1C của đối tượng trước khi sử dụng loại bất kỳ trong các liên hợp, chế phẩm, dạng bào chế, dược phẩm, hoặc các tổ hợp của sáng chế được mô tả trong bản mô tả này, hoặc so với đối tượng đối chứng không được nhận loại bất kỳ trong các liên hợp, chế phẩm, dạng bào chế, dược phẩm hoặc tổ hợp của sáng chế được mô tả trong bản mô tả này.

Trong các phương án khác, sáng chế cung cấp các phương pháp làm giảm nồng độ glucoza trong máu khi đói ở đối tượng cần điều trị, các phương pháp bao gồm bước cho đối tượng cần điều trị sử dụng một lượng hữu hiệu liên hợp hoặc chế phẩm dược của sáng chế. Nồng độ glucoza trong máu khi đói có thể được giảm xuống thấp hơn khoảng 140 đến khoảng 150 mg/dL, thấp hơn khoảng 140 đến khoảng 130 mg/dL, thấp hơn khoảng 130 đến khoảng 120 mg/dL, thấp hơn khoảng 120 đến khoảng 110 mg/dL, thấp hơn khoảng 110 đến khoảng 100 mg/dL, thấp hơn khoảng 100 đến khoảng 90 mg/dL, hoặc thấp hơn khoảng 90 đến khoảng 80 mg/dL, so với nồng độ glucoza trong máu khi đói của đối tượng trước khi sử dụng loại bất kỳ trong các liên hợp, chế phẩm, dạng bào chế, dược phẩm, hoặc các tổ hợp của sáng chế được mô tả trong bản mô tả này, hoặc so với đối tượng đối chứng không được nhận loại bất kỳ trong các liên hợp, chế phẩm, dạng bào chế, dược phẩm hoặc tổ hợp của sáng chế được mô tả trong bản mô tả này.

Sáng chế cũng cung cấp phương pháp điều hòa hoạt tính thụ thể Y2 ở đối tượng cần điều trị, phương pháp bao gồm bước cho đối tượng cần điều trị sử dụng một lượng hữu hiệu liên hợp hoặc chế phẩm dược của sáng chế. Trong tài liệu này, “điều hòa” có nghĩa là tăng hoặc giảm hoạt tính của thụ thể.

Trong một số phương án, lượng hữu hiệu liên hợp của sáng chế hoặc dạng, chế phẩm hoặc dược phẩm của nó được cho đối tượng cần điều trị sử dụng mỗi ngày một lần, hai lần một ngày, ba lần một ngày, bốn lần một ngày, năm lần một ngày, sáu lần một ngày, bảy lần một ngày, hoặc tám lần một ngày. Trong các phương án khác, lượng hữu hiệu liên hợp của sáng chế hoặc dạng, chế phẩm hoặc dược phẩm của nó được cho đối tượng cần điều trị sử dụng hai ngày một lần, mỗi tuần một lần, mỗi tuần hai lần, mỗi tuần ba lần, mỗi tuần bốn lần, mỗi tuần năm lần, mỗi tuần sáu lần, mỗi tháng hai lần, mỗi tháng ba lần, hoặc mỗi tháng bốn lần.

Trong phương án khác, sáng chế cung cấp phương pháp phòng ngừa, điều trị, trì hoãn khởi phát, hoặc cải thiện bệnh, rối loạn hoặc hội chứng hoặc một hoặc nhiều triệu chứng bất kỳ của bệnh, rối loạn hoặc hội chứng này ở đối tượng cần điều trị, phương pháp bao gồm bước cho đối tượng cần điều trị sử dụng một lượng hữu hiệu liên hợp hoặc chế phẩm dược của sáng chế trong liệu pháp kết hợp. Trong một số phương án nhất định, liệu pháp kết hợp là dùng với thuốc điều trị thứ hai. Trong một số phương án nhất định, liệu pháp kết hợp là kết hợp với liệu pháp phẫu thuật.

Như được sử dụng trong tài liệu này, thuật ngữ “kết hợp” trong ngữ cảnh sử dụng hai hoặc nhiều liệu pháp điều trị cho đối tượng, chỉ việc sử dụng nhiều hơn một liệu pháp.

Trong tài liệu này, liệu pháp điều trị kết hợp chỉ việc cho đối tượng cần điều trị sử dụng một hoặc nhiều thuốc điều trị bổ sung, hoặc một hoặc nhiều liệu pháp phẫu thuật, sử dụng đồng thời với lượng hữu hiệu liên hợp của sáng chế hoặc dạng, chế phẩm hoặc chế phẩm dược của nó. Trong một số phương án, một hoặc nhiều thuốc điều trị hoặc các liệu pháp phẫu thuật bổ sung có thể được dùng trong cùng ngày với lượng hữu hiệu liên hợp của sáng chế, còn trong các phương án khác, một hoặc nhiều thuốc điều trị hoặc các liệu pháp phẫu thuật bổ sung có thể được dùng trong cùng tuần hoặc cùng tháng với lượng hữu hiệu liên hợp của sáng chế.

Trong một số phương án nhất định, trong đó bệnh hoặc rối loạn được chọn từ nhóm bao gồm bệnh béo phì, đái tháo đường type II, hội chứng chuyển hóa, kháng insulin và rối loạn mỡ máu, thuốc điều trị thứ hai có thể là thuốc chống đái tháo đường. Trong một số phương án nhất định, thuốc chống đái tháo đường có thể là thuốc điều hòa thụ thể peptit giống như glucagon 1 (GLP-1).

Sáng chế cũng nhằm mục đích phòng ngừa, điều trị, trì hoãn sự khởi phát hoặc cải thiện bệnh, rối loạn, hội chứng, hoặc triệu chứng được mô tả trong bản mô tả này ở đối tượng cần điều trị bằng liệu pháp điều trị kết hợp bao gồm bước cho đối tượng cần điều trị sử dụng một lượng hữu hiệu liên hợp hoặc chế phẩm dược của sáng chế, kết hợp với một hoặc nhiều thuốc điều trị sau đây: chất ức chế dipeptidyl peptidaza-4 (DPP-4) (ví dụ: sitagliptin, saxagliptin, linagliptin, alogliptin, v.v.); chất chủ vận thụ thể GLP-1 (ví dụ: chất chủ vận thụ thể GLP-1 tác dụng thời gian ngắn như exenatide và lixisenatide; chất chủ vận thụ thể GLP-1 tác dụng tức thì như liraglutide; chất chủ vận thụ thể GLP-1 tác dụng kéo dài như exenatide giải phóng chậm, albiglutide, dulaglutide); chất ức chế đồng

vận chuyển natri- glucoza 2 (SGLT-2) (ví dụ, canaglifozin, dapaglifozin, empaglifozin, v.v.); các chất càng hóa axit mật (ví dụ, colesevelam, v.v.); chất chủ vận thụ thể dopamin (ví dụ, bromocriptin giải phóng nhanh). diguanua (ví dụ, metformin, v.v.); insulin; oxyntomodulin; sulfonilurea (ví dụ, chlorpropamide, glimepiride, glipizide, glyburide, glibenclamide, glibornuride, glisoxepide, glyclopamide, tolazamide, tolbutamide, acetohexamide, carbutamide, v.v.); và thiazolidindion (ví dụ; pioglitazon, rosiglitazon, lobeglitazon, ciglitazon, darglitazon, englitazon, netoglitazon, rivoglitazon, troglitazon, v.v.). Trong một số phương án, giảm liều lượng của thuốc điều trị bổ sung khi được cho kết hợp với liên hợp của sáng chế. Trong một số phương án, khi sử dụng kết hợp với liên hợp của sáng chế, thuốc điều trị bổ sung có thể được sử dụng với liều thấp hơn khi sử dụng từng thuốc riêng biệt.

Theo một số phương án nhất định, trong đó bệnh, rối loạn được chọn từ nhóm bao gồm béo phì, tiểu đường tít I hoặc tít II, hội chứng chuyển hóa (tức là Hội chứng X), kháng insulin, suy giảm dung nạp glucoza (ví dụ như không dung nạp glucoza), tăng đường huyết, tăng insulin máu, tăng triglyxerit máu, giảm glucoza huyết do tăng insulin máu bẩm sinh (CHI) rối loạn mỡ máu, xơ vữa động mạch, bệnh thận do tiểu đường, các yếu tố nguy cơ tim mạch khác như tăng huyết áp và các yếu tố nguy cơ tim mạch liên quan đến nồng độ cholesterol và/hoặc lipit không được kiểm soát, loãng xương, viêm, bệnh gan nhiễm mỡ không do uống rượu (NAFLD), viêm gan nhiễm mỡ không do rượu (NASH), bệnh thận và/hoặc bệnh chàm, thuốc điều trị thứ hai có thể là liraglutide.

Sáng chế nhằm mục đích phòng ngừa, điều trị, trì hoãn sự khởi phát hoặc cải thiện bệnh, rối loạn, hội chứng, hoặc triệu chứng được mô tả trong bản mô tả này ở đối tượng cần điều trị bằng liệu pháp điều trị kết hợp bao gồm bước cho đối tượng cần điều trị sử dụng một lượng hữu hiệu liên hợp hoặc chế phẩm được của sáng chế, kết hợp với liệu pháp phẫu thuật. Trong một số phương án nhất định, liệu pháp phẫu thuật có thể là phẫu thuật giảm cân (ví dụ, phẫu thuật nối tắt dạ dày, như phẫu thuật nối tắt dạ dày Roux-en-Y; cắt tạo dạ dày hình ống; phẫu thuật thắt dạ dày điều chỉnh; chuyển dòng mật tụy kèm chuyển dòng tá tràng; bóng đặt trong dạ dày; tạo nếp gấp dạ dày; và kết hợp bất kỳ của chúng).

Trong các phương án trong đó một hoặc nhiều thuốc điều trị bổ sung có thể được dùng trong cùng ngày với lượng hữu hiệu liên hợp của sáng chế, liên hợp của

sáng chế có thể được cho dùng trước, sau hoặc đồng thời với thuốc điều trị bổ sung. Việc sử dụng thuật ngữ “kết hợp” không giới hạn trình tự sử dụng liệu pháp điều trị cho đối tượng. Ví dụ, có thể cho đối tượng sử dụng liệu pháp thứ nhất (ví dụ, chế phẩm được mô tả trong tài liệu này) trước khi (ví dụ, 5 phút, 15 phút, 30 phút, 45 phút, 1 giờ, 2 giờ, 4 giờ, 6 giờ, 12 giờ, 16 giờ, 24 giờ, 48 giờ, 72 giờ, 96 giờ, 1 tuần, 2 tuần, 3 tuần, 4 tuần, 5 tuần, 6 tuần, 8 tuần, hoặc 12 tuần trước), đồng thời với, hoặc sau khi (ví dụ, 5 phút, 15 phút, 30 phút, 45 phút, 1 giờ, 2 giờ, 4 giờ, 6 giờ, 12 giờ, 16 giờ, 24 giờ, 48 giờ, 72 giờ, 96 giờ, 1 tuần, 2 tuần, 3 tuần, 4 tuần, 5 tuần, 6 tuần, 8 tuần, hoặc 12 tuần sau) sử dụng liệu pháp thứ hai.

CÁC PHƯƠNG ÁN

Sáng chế còn cung cấp các phương án không giới hạn sau đây.

Phương án 1 là kháng thể được phân lập hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự gen V dòng mầm Ig người hoàn toàn, và vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự gen V dòng mầm Ig người hoàn toàn ngoại trừ HCDR3 có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ: 18, trong đó kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó không liên kết đặc hiệu với bất kỳ kháng nguyên người nào *trong cơ thể sống*.

Phương án 2 là kháng thể đơn dòng được phân lập hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó theo phương án 1, trong đó kháng thể đơn dòng được phân lập hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó bao gồm vùng xác định bổ sung chuỗi nặng 1 (HCDR1), HCDR2, HCDR3 và vùng xác định bổ sung chuỗi nhẹ 1 (LCDR1), LCDR2 và LCDR3, có các trình tự polypeptit có SỐ ID TRÌNH TỰ: lần lượt là 16, 17, 18, 19, 20 và 21

Phương án 3 là kháng thể đơn dòng được phân lập hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó theo phương án 2, trong đó kháng thể đơn dòng được phân lập bao gồm miền biến đổi chuỗi nặng (VH) có trình tự polypeptit có SỐ ID TRÌNH TỰ: 12 và miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) có trình tự polypeptit có SỐ ID TRÌNH TỰ: 14.

Phương án 4 là kháng thể đơn dòng được phân lập theo phương án bất kỳ trong các phương án 1-3, còn bao gồm phần Fc.

Phương án 5 là kháng thể đơn dòng được phân lập theo phương án 4, trong đó phần Fc còn bao gồm vùng Fc được dẫn xuất từ vùng Fc của IgG4 người.

Phương án 6 là kháng thể đơn dòng được phân lập theo phương án 5, trong đó vùng Fc của IgG4 người có các thay thế loại trừ chức năng thực thi.

Phương án 7 là kháng thể đơn dòng được phân lập theo phương án 6, trong đó kháng thể đơn dòng còn bao gồm vùng Fc của IgG4 người được biến đổi chứa ít nhất một thay thế được chọn từ nhóm bao gồm thay thế prolin cho glutamat ở đơn phân 233, alanin hoặc valin cho phenylalanin ở đơn phân 234 và alanin hoặc glutamat cho leuxin ở đơn phân 235, alanin cho asparagin ở đơn phân 297.

Phương án 8 là kháng thể đơn dòng được phân lập theo phương án 6 hoặc 7, trong đó vùng Fc của IgG4 người bao gồm thay thế serin cho prolin ở vị trí 228.

Phương án 9 là kháng thể đơn dòng được phân lập theo phương án bất kỳ trong các phương án 4-8, bao gồm chuỗi nặng (HC) có trình tự polypeptit có SỐ ID TRÌNH TỰ: 13 và chuỗi nhẹ (LC) có trình tự polypeptit có SỐ ID TRÌNH TỰ: 15.

Phương án 10 là axit nucleic được phân lập mã hóa kháng thể đơn dòng hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó theo phương án bất kỳ trong các phương án từ 1-9.

Phương án 11 là vectơ bao gồm axit nucleic được phân lập theo phương án 10.

Phương án 12 là tế bào chủ bao gồm vectơ theo phương án 11.

Phương án 13 là phương pháp sản xuất kháng thể đơn dòng được phân lập hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó, phương pháp bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ theo phương án 12 trong các điều kiện để tạo ra kháng thể đơn dòng hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó, và bước thu hồi kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó từ tế bào hoặc quá trình nuôi cấy.

Phương án 14 là kháng thể đơn dòng được phân lập hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó theo phương án bất kỳ trong các phương án từ 1-9, còn bao gồm ít nhất một phần hoạt tính được lý được tiếp hợp vào kháng thể này.

Phương án 15 là kháng thể đơn dòng được phân lập hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó theo phương án 14, trong đó phần hoạt tính được lý là peptit điều trị.

Phương án 16 là kháng thể đơn dòng được phân lập hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó theo phương án 15, trong đó peptit điều trị được tiếp hợp ở đơn phân xystein có SỐ ID TRÌNH TỰ: 18.

Phương án 17 là kháng thể đơn dòng được phân lập hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó theo phương án 15 hoặc 16, trong đó peptit điều trị được tiếp hợp với kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó qua cầu nối.

Phương án 18 là kháng thể đơn dòng được phân lập hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó theo phương án 17, trong đó cầu nối bao gồm cầu nối peptit, cầu nối hydrocarbon, cầu nối polyetylen glycol (PEG), cầu nối polypropylen glycol (PPG), cầu nối polysacarit, cầu nối polyeste, cầu nối hỗn hợp bao gồm PEG và dị vòng được nhúng vào.

Phương án 19 là kháng thể đơn dòng được phân lập hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó theo phương án bất kỳ trong các phương án 15-18, trong đó peptit điều trị được chọn từ nhóm bao gồm oxyntomodulin, peptit giống như glucagon 1 (GLP1), peptit tyrosin tyrosin (PYY), exendin (exenatide), amylin (pramlintide), hormon kích thích tế bào hắc tố alpha (MSH), sản phẩm phiên mã điều hòa bởi cocain và chất kích thích (CART), chất đối kháng thụ thể neuropeptit Y Y1 (NPY1), chất đối kháng thụ thể neuropeptit Y Y5 (NPY5), neurotensin S, neuropeptit B, neuropeptit W, ghrelin, thụ thể giống bombesin 3 (BRS3), galanin, cholecystokinin (CCK), orexin, hormon tích tụ hắc tố (MCH), oxytoxin, và stresscopin.

Phương án 20 là kháng thể đơn dòng được phân lập hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó theo phương án 19, trong đó peptit điều trị là oxyntomodulin bao gồm trình tự polypeptit có SỐ ID TRÌNH TỰ: 24.

Phương án 21 là liên hợp bao gồm kháng thể đơn dòng hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó được ghép với peptit điều trị là oxyntomodulin, trong đó liên hợp có cấu trúc có SỐ ID TRÌNH TỰ: 27 như được thể hiện trong Hình 11, trong đó mAb là kháng thể đơn dòng hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó theo phương án bất kỳ trong các phương án 1-9 và J_2 là 1 hoặc 2 peptit điều trị oxyntomodulin được tiếp hợp cộng hóa trị với mAb.

Phương án 22 là phương pháp sản xuất kháng thể đơn dòng được phân lập hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó theo phương án bất kỳ trong các phương án 15-21, bao gồm bước cho phân tử ưa điện tử, tốt hơn là bromoaxetamid hoặc maleimit, được đưa vào mạch bên của peptit điều trị, phản ứng với nhóm sulfhydryl có đơn phân xystein có SỐ ID TRÌNH TỰ: 18 của kháng thể đơn dòng hoặc mảnh gắn kháng nguyên của chúng, từ đó tạo ra liên kết cộng hóa trị giữa peptit điều trị và kháng thể đơn dòng hoặc mảnh gắn kháng nguyên của chúng.

Phương án 23 là chế phẩm được bao gồm kháng thể đơn dòng được phân lập hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó theo phương án bất kỳ trong các phương án 14-21 và chất mang được dụng.

Phương án 24 là phương pháp sản xuất chế phẩm được bao gồm kháng thể đơn dòng hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó theo phương án bất kỳ trong các phương án 14-21, phương pháp bao gồm bước kết hợp kháng thể đơn dòng hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó với chất mang được dụng để thu về chế phẩm được.

Phương án 25 là kit bao gồm kháng thể đơn dòng hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó theo phương án bất kỳ trong các phương án 1-9 và 14-21.

Phương án 26 là phương pháp làm tăng thời gian bán thải của peptit điều trị ở đối tượng, phương pháp bao gồm bước tiếp hợp peptit điều trị này với kháng thể đơn dòng hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó bao gồm vùng xác định bổ sung chuỗi nặng 1 (HCDR1), HCDR2, HCDR3 và vùng xác định bổ sung chuỗi nhẹ 1 (LCDR1), LCDR2 và LCDR3, có các trình tự polypeptit có SỐ ID TRÌNH TỰ: lần lượt là 16, 17, 18, 19, 20, và 21, trong đó peptit điều trị này được tiếp hợp với kháng thể đơn dòng hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó ở vị trí đơn phân Cys có SỐ ID TRÌNH TỰ: 18.

Phương án 27 là phương pháp theo phương án 26, trong đó peptit điều trị được chọn từ nhóm bao gồm oxyntomodulin, peptit giống như glucagon 1 (GLP1), peptit tyrosin tyrosin (PYY), exendin (exenatide), amylin (pramlintide), hormon kích thích tế bào hắc tố alpha (MSH), sản phẩm phiên mã điều hòa bởi cocain và chất kích thích (CART), chất đối kháng thụ thể neuropeptit Y Y1 (NPY1), chất đối kháng thụ thể neuropeptit Y Y5 (NPY5), neurotensin S, neuropeptit B, neuropeptit W, ghrelin, thụ thể giống bombesin 3 (BRS3), galanin, cholecystokinin (CCK), orexin, hormon tích tụ hắc tố (MCH), oxytoxin, và stresscopin.

Phương án 28 là phương pháp theo phương án 27, trong đó peptit điều trị là oxyntomodulin.

Phương án 29 là phương pháp theo điểm 28, trong đó oxyntomodulin có trình tự polypeptit có SỐ ID TRÌNH TỰ: 24.

Phương án 30 là phương pháp theo phương án bất kỳ trong các phương án 25-29, trong đó kháng thể đơn dòng bao gồm miền biến đổi chuỗi nặng (VH) có trình tự polypeptit có SỐ ID TRÌNH TỰ: 12.

Phương án 31 là phương pháp theo phương án bất kỳ trong các phương án 25-30, trong đó kháng thể đơn dòng bao gồm chuỗi nặng (HC) có trình tự polypeptit có SỐ ID TRÌNH TỰ: 13.

Phương án 32 là phương pháp theo phương án bất kỳ trong các phương án 25-31, trong đó kháng thể đơn dòng bao gồm miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) có trình tự polypeptit có SỐ ID TRÌNH TỰ: 14.

Phương án 33 là phương pháp theo phương án bất kỳ trong các phương án 25-32, trong đó kháng thể đơn dòng bao gồm chuỗi nhẹ (LC) có trình tự polypeptit có SỐ ID TRÌNH TỰ: 15.

Phương án 34 là kháng thể đơn dòng được phân lập hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó bao gồm vùng xác định bổ sung chuỗi nặng 3 có SỐ ID TRÌNH TỰ: 18, trong đó kháng thể đơn dòng được phân lập hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó có khả năng được ghép với peptit điều trị.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Nhận dạng và sản xuất mAb MSCB97

Chọn VL PH9L3 và VH PH9H5 làm các vùng V bắt đầu để kiến tạo

Vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) kháng thể được ký hiệu là PH9L3 (SỐ ID TRÌNH TỰ:3) (Teplyakov và cộng sự, “Structural diversity in a human antibody germline library,” (“Sự đa dạng cấu trúc trong thư viện dòng mầm kháng thể người”) mAb tháng 8-tháng 9 8(6):1045-63 (2016)) và vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) kháng thể được ký hiệu là PH9H5 (SỐ ID TRÌNH TỰ:4) (Teplyakov và cộng sự, “Structural diversity in a human antibody germline library,” (“Sự đa dạng cấu trúc trong thư viện dòng mầm kháng thể người”) mAb tháng 8-tháng 9 8(6):1045-63 (2016)) được chọn làm vùng biến đổi bắt đầu mà từ đó kiến tạo mAb cho phép tiếp hợp peptit. PH9L3 được tạo thành hoàn toàn từ các trình tự gen V dòng mầm Ig người và do đó không chứa đột biến trình tự bất kỳ từ quá trình trưởng thành ái lực trong cơ thể sống, mà có thể dẫn đến liên kết đặc hiệu kháng nguyên ái lực cao. CDR3 của PH9H5 là đoạn duy nhất không bao gồm các trình tự gen V dòng mầm người trong VH đó. CDR3 (SỐ ID TRÌNH TỰ:5) của PH9H5 đồng nhất với CDR3 của kháng thể kháng CCL2 người, CNTO 888, kháng thể CCL2 trung hòa, xem, ví dụ, US 20100074886 A1, tài liệu công bố CNTO 888 được kết hợp đầy đủ vào bản mô tả này bằng viện dẫn. Fab chứa cặp VH/VL PH9H5/PH9L3 được tạo.

Trình tự PH9L3, PH9H5 và vùng V và vùng J dòng mầm Ig người mà các trình tự này giống nhất được bắt cặp để xác định độ đồng nhất hoặc đồng dạng trình tự với trình tự dòng mầm. PH9H5 được bắt cặp với chuỗi nối (SỐ ID TRÌNH TỰ:6) của các gen dòng mầm Ig người IGHV3-23*01 (PubMed ID: M99660) (SỐ ID TRÌNH TỰ:7) và IGHJ1*01 người (PubMed ID: J00256) (SỐ ID TRÌNH TỰ:8), với sự khác biệt duy nhất giữa trình tự axit amin PH9H5 và trình tự IGHV3-23*01-IGHJ1*01 người được nối chuỗi là ở CDR3 của VH, mà có SỐ ID TRÌNH TỰ:5 cho PH9H5.

PH9L3 được bắt cặp với chuỗi nối (SỐ ID TRÌNH TỰ:9) của các gen dòng mầm Ig người IGKV3-11*01 (PubMed ID: X01668) (SỐ ID TRÌNH TỰ:10) và IGKJ1*01 (PubMed ID: J00242) (SỐ ID TRÌNH TỰ:11), với sự khác biệt duy nhất là một chỗ lệch ở điểm tiếp giáp gen V/gen J.

Thiết kế và tạo biến thể thay thế Cys của PH9H5 và PH9L3

Các biến thể của VH PH9H5 có chứa thay thế Cys duy nhất tại các đơn phân CDR được chọn trên cả ba CDR của vùng V được thiết kế, tạo và tạo dòng thành chuỗi nặng hoàn chỉnh với vùng hằng định IgG1 người hợp nhất vào vector biểu hiện của ký chủ là động vật có vú. Cấu trúc Fab PH9H5/PH9L3 được sử dụng để hỗ trợ lựa chọn đơn phân CDR để thay thế có vẻ dễ tiếp cận hơn để tiếp hợp và trong một số biến thể, các đơn phân glyxin (Gly) bổ sung được chèn vào hai bên của đơn phân Cys được đưa vào nhằm tăng khả năng tiếp cận của Cys cho việc tiếp hợp. Các biến thể tương tự của VL PH9L3 được thiết kế và được tạo trừ khi chúng được tạo dòng là các chuỗi nhẹ hoàn chỉnh với vùng hằng định kappa hợp nhất vào vector biểu hiện. Tổng cộng có 24 cấu trúc biểu hiện của các biến thể Cys đơn PH9H5 và 22 cấu trúc biểu hiện của các biến thể Cys đơn PH9L3 đã được tạo. Các đơn phân được chọn để thay thế bên trong PH9H5_VH (SỐ ID TRÌNH TỰ: 4) và bên trong PH9L3_VL (SỐ ID TRÌNH TỰ: 3) được tổng hợp trong Hình 2.

Các cấu trúc biểu hiện tạo thành đã được sử dụng để biểu hiện các biến thể Cys bằng đồng chuyển nhiễm tạm thời từng cấu trúc biến thể Cys HC dựa trên PH9H5 với cấu trúc LC PH9L3 kiểu đại hoặc đồng chuyển nhiễm từng cấu trúc biến thể Cys LC dựa trên PH9L3 với cấu trúc HC PH9H5 kiểu đại. Các chuyển nhiễm thử nghiệm ban đầu đã sử dụng Expi293 có nguồn gốc HEK làm ký chủ biểu hiện và ở quy mô 20 ml. Phần lớn các biến thể Cys HC và LC được biểu hiện tốt dựa trên định lượng protein biến thể từ lớp bề mặt dung dịch nuôi cấy.

Năm biến thể Cys HC ban đầu, MSCB33-MSCB37, được biểu hiện trong Expi293 ở quy mô 750 ml và protein biến thể được tinh chế. Năng suất tinh chế và các đặc tính chất lượng của các biến thể tinh chế tương đối giống nhau và đủ để sử dụng các protein tinh chế trong các phản ứng tiếp hợp peptit ban đầu.

Đánh giá liên hợp peptit với các biến thể Cys HC nền PH9H5

Xác định phân tích khối lượng protein MSCB33 và các protein biến thể khác cho thấy sự hiện diện của các phức xystein tại Cys được kiến tạo để tiếp hợp, với hai trên mỗi mAb, cũng như loại bỏ đơn phân Lys đầu C của HC, đây là điều thường gặp trong các mAb được tái tổ hợp. Để chuẩn bị các mAb biến thể cho liên hợp, các phức đã được loại bỏ bằng quy trình khử được phát triển để duy trì các liên kết disulfua tự nhiên trong mAb (xem Ví dụ 3). Các liên hợp thử nghiệm ban đầu với chất tương tự peptit oxyntomodulin (OXM) người (GCG Aib2, Gly16,24, Arg20, Leu27, Lys30 (PEG₁₂)-NH₂) đã được thực hiện bằng cách sử dụng hóa học maleimide trên tất cả năm kháng thể biến thể Cys HC. Hiệu suất liên hợp khác nhau giữa các biến thể mAb. Hiệu suất này được ước tính định tính bằng các sản phẩm phản ứng liên hợp và tỷ lệ phần trăm tương đối của mỗi sản phẩm. Hiệu suất lớn nhất, được đo bằng tỷ lệ phần trăm lớn nhất của sản phẩm đồng dime, đã được quan sát ở MSCB33, so với các biến thể I102C khác có đơn phân Gly ở hai bên. Quan sát thấy ít hoặc không có liên hợp với các biến thể Y103C là MSCB35 hoặc MSCB37.

Một số biến thể Cys HC và LC khác, với sự thay thế xystein được kiến tạo trong các CDR khác nhau (thay thế T28C, S30C và S54C trong PH9H5_VH (SỐ ID TRÌNH TỰ: 129) và thay thế S30C và S92C trong PHpL3_VL (SỐ ID TRÌNH TỰ:128)) thể hiện ở quy mô lớn trong Expi293. Việc loại bỏ các phức Cys khỏi các protein tinh chế này bằng cách khử là rất khó khăn và do đó người ta không theo đuổi các biến thể này thêm nữa. Do những thách thức được quan sát với hầu hết các biến thể Cys và hiệu suất liên hợp ban đầu tốt được quan sát với mAb biến thể PH9H5 I102C, MSCB33, các nỗ lực phát triển quy trình và kiến tạo tiếp theo đã tập trung vào biến thể đặc biệt này.

Kiến tạo Fc của MSCB33

MSCB33 đã được tái kiến tạo để chứa Fc IgG4_PAA người bất hoạt để làm giảm chức năng Fc *trong cơ thể sống*. IgG4_PAA người có các đột biến S228P/F234A/L235A trên allotyp IgG4 người nG4m(a) (dựa trên alenIGHG4*01 như được định nghĩa trong

IMGT). Cấu trúc biểu hiện với VH của MSCB33 dung hợp với Fc của IgG4_PAA được tạo và sử dụng cùng với cùng cấu trúc biểu hiện LC được sử dụng để biểu hiện MSCB33 để tạo ra biến thể IgG4_PAA của MSCB33, được ký hiệu là MSCB97. Các trình tự axit amin của VH, HC, VL và LC của MSCB97 lần lượt được cung cấp theo SỐ ID TRÌNH TỰ: 12, 13, 14 và 15.

Biểu hiện thử nghiệm của MSCB97 được thực hiện tạm thời ở quy mô 20 ml trong các tế bào Expi293 và biến thể mAb này đã biểu hiện tốt. MSCB97 đã được tinh chế từ việc thực hiện biểu hiện Expi293 quy mô lớn. Năng suất tinh chế của MSCB97 là 264,53 mg/L và chất lượng được xác định ở mức 85% thành phần monome. Những lần thực hiện biểu hiện và tinh chế quy mô lớn sau đó có năng suất và chất lượng tương tự hoặc tốt hơn và cho thấy sự nhất quán của mAb có thể được tạo này.

Đánh giá liên hợp peptit với MSCB97 và khả năng mở rộng phản ứng liên hợp

Sự kết nối disulfua LC-HC khác nhau giữa các lớp kháng thể IgG1 và IgG4, do đó sự khử và liên hợp maleimide đã được thử nghiệm và được xác nhận là có thể chuyển đổi được từ mAb IgG1 MSCB33 sang mAb IgG4_PAA MSCB97, bằng cách sử dụng sự khử TCEP và liên hợp OXM-peptit thử nghiệm maleimide như được mô tả ở phần trên.

Liên kết tạo thành từ liên hợp maleimide được biết là có khả năng đảo ngược, do đó hóa học liên hợp bromoaxetamid, mà từ đó tạo ra liên kết ổn định hơn, đã được áp dụng và thực hiện thành công trên quy mô 10 mg dựa trên MSCB97 là vật liệu ban đầu.

Liên hợp MSCB97 của chất tương tự OXM là GCG Aib2, Glu16,24, Arg20, Leu27, Lys30-ε-(PEG₁₂)-NH₂ (hợp chất 2—ở đây “hợp chất 2” và “liên hợp 2” có thể sử dụng thay thế cho nhau) (MSCB97 được tiếp hợp với H-Aib-QGTFTSDYSKYLDERRARDFVEWLLNTK-

(COCH₂CH₂(OCH₂CH₂)₁₂NHCOCH₂Br)-NH₂ (SỐ ID TRÌNH TỰ: 24) để tạo hợp chất 2 (Hình 11; SỐ ID TRÌNH TỰ:27)) được tạo thông qua hóa học bromoaxetamid đã được xét nghiệm để xác định hiệu lực của GLP-1R và GCGR *trong ống nghiệm*. Hiệu lực liên quan đến các peptit tham chiếu và các liên hợp peptit không cấu trúc tham chiếu là hợp lý và tương tự như hiệu lực của liên hợp được tạo ra với cùng peptit đối với MSCB33 (IgG1). Điều này cho thấy rằng sự khác biệt duy nhất giữa MSCB97 (IgG4_PAA) và MSCB33 (IgG1), là lớp kháng thể, không tác động đến hiệu lực của các liên hợp chứa cùng peptit. Ngoài ra, những dữ liệu này cho thấy các hiệu lực *trong*

ống nghiệm mong muốn có thể được giữ lại trong liên hợp peptit-mAb, mà được tạo với hóa học bromoacetamid đem lại liên kết ổn định *trong cơ thể sống*. Các chất tương tự OXM khác cũng được tiếp hợp với MSCB97 và các hiệu lực *trong ống nghiệm* của các liên hợp này đã được xét nghiệm. Các liên hợp này có hiệu lực GLP-1R và GCGR tương tự như hợp chất 2, nêu bật khả năng tiếp hợp nhiều loại peptit với MSCB97, trong khi vẫn giữ được hiệu lực của peptit.

Đánh giá liên hợp peptit-MSCB97 liên kết với CCL2 người

Mặc dù MSCB97 đã được chọn và được kiến tạo do không có liên kết kháng nguyên đặc hiệu, nhưng kháng nguyên có khả năng cao nhất mà mAb này sẽ liên kết, nếu có, là CCL2 người dựa trên nguồn gốc của CDR3 của VH. Đánh giá việc MSCB97 có cho thấy được bất kỳ liên kết CCL2 đặc hiệu nào hay không bằng cách sử dụng hai liên hợp peptit-MSCB97, với chất tương tự peptit OXM, (hợp chất 2) hoặc chất tương tự peptit PYY, (hợp chất 1- “hợp chất 1” và “liên hợp 1” có thể sử dụng thay thế cho nhau trong tài liệu này).

Liên kết CCL2 tiềm năng được đo trực tiếp bằng cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR) trong đó các liên hợp được cố định bề mặt bằng phương pháp bất kháng thể kháng Fc. mAb chuột kháng CCL2 có bán trên thị trường được dùng làm đối chứng dương và hai kháng thể không đặc hiệu ở người, CNTO 9412 và HH3B33, đóng vai trò đối chứng âm. Tất cả các đối chứng được cố định bề mặt tương tự như vậy, và CCL2 người tái tổ hợp được truyền đến các liên hợp và đối chứng được cố định ở các nồng độ lên tới 400 nM. Dựa trên các tiêu chí xét nghiệm được thiết lập trước, quan sát thấy việc tích tụ CCL2 chỉ báo liên kết kháng nguyên đặc hiệu ở đối chứng dương chứ không phải với các đối chứng âm cũng như với liên hợp peptit-MSCB97 (hợp chất 1 hoặc 2). Điều này khẳng định rằng MSCB97, ở dạng điều trị phù hợp của liên hợp peptit-mAb, không có liên kết với CCL2 người.

Phương pháp liên kết bằng SPR: Đo lường liên kết bằng cách sử dụng cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR) được thực hiện bằng hệ thống ProteOn XPR36 (BioRad). Bề mặt bộ cảm biến sinh học được chuẩn bị bằng cách ghép hỗn hợp Fc kháng IgG người (Jackson cat#109-005-098) và Fc kháng IgG chuột (Jackson cat#315-005-046) với bề mặt lớp polyme alginat được điều hòa của chip GLC (BioRad, Cat#176-5011) theo hướng dẫn của nhà sản xuất về hóa học ghép đôi amin. Khoảng 5700 RU (đơn vị đáp ứng) kháng thể đơn dòng được cố định. Các thí nghiệm về liên kết được thực hiện

ở 25°C trong dung dịch đệm đang chảy (DPBS; P20 0,01%; BSA 100 µg/ml). Để thực hiện thí nghiệm động học liên kết, thu thập các mẫu (hợp chất 2, hợp chất 1 và mAb đối chứng dương và âm) sau khi bơm CCL2 người tái tổ hợp (Thermo, mã danh mục RMCP120) ở 5 nồng độ (trong dung dịch pha loãng tuần tự gấp 4 lần). Pha kết hợp được theo dõi trong 3 phút với lượng 50 µL/phút, sau đó là 5 phút chảy dung dịch đệm (pha phân ly). Bề mặt chip được tái tạo với hai xung 18 giây của H₃PO₄ 100 mM (Sigma, Cat#7961) với lượng 100 µL/phút.

Dữ liệu thu thập được xử lý bằng phần mềm ProteOn Manager. Trước tiên, dữ liệu được chỉnh sửa về nền bằng cách sử dụng các liên điểm. Sau đó, thực hiện trừ tham chiếu kép dữ liệu bằng cách tiêm dung dịch đệm để tiêm chất phân tích. Tiêu chí xét nghiệm được thiết lập trước để xác định liên kết đặc hiệu có thể phát hiện của hợp chất 2, hợp chất 1 và đối chứng dương đối với CCL2 yêu cầu đáp ứng tỷ lệ liều với tín hiệu > 10 RU ở nồng độ cao nhất và tín hiệu đáp ứng của đối chứng âm <10 RU. Dựa trên các tiêu chí xét nghiệm, kết quả cho từng mẫu được báo cáo là Có hoặc Không đối với liên kết đáp ứng - liều với CCL2 người.

Ví dụ 2: Biểu hiện và tinh chế mAb

Kháng thể đơn dòng (mAb) người hoàn toàn có thể được biểu hiện tái tổ hợp trong vật chủ biểu hiện là động vật có vú và được tinh chế từ lớp bề mặt dung dịch nuôi cấy tế bào bằng các phương pháp tiêu chuẩn được biết đến trong lĩnh vực. Ví dụ, trình tự ADN bổ sung mã hóa chuỗi nhẹ (LC) và chuỗi nặng (HC) của mAb, mỗi chuỗi bao gồm một peptit tín hiệu thích hợp để hoạt hóa sự tiết, có thể được tạo dòng thành các vector biểu hiện riêng biệt của động vật có vú hoặc thành một vector biểu hiện duy nhất bằng phương pháp sinh học phân tử tiêu chuẩn. Các vector biểu hiện được sử dụng có thể là vector bất kỳ trong các vector có bán trên thị trường như pEE12.4, pcDNA™3.1(+) hoặc pIRESpuro3 hoặc vector biểu hiện tùy chỉnh bất kỳ có chức năng tương tự. Trong các vector này, sự phiên mã từng chuỗi nặng và nhẹ của mAb được điều khiển bởi vùng khởi động hiệu quả đã biết bất kỳ như vùng khởi động hCMV-MIE. ADN plasmid cấp độ chuyển nhiễm được chuẩn bị cho các cấu trúc biểu hiện LC và HC riêng biệt hoặc một cấu trúc đơn biểu hiện cả LC và HC bằng các phương pháp tiêu chuẩn như bộ dụng cụ QIAGEN Plasmid Midi Kit.

ADN plasmid tinh chế được chuẩn bị để chuyển nhiễm với thuốc thử chuyển nhiễm nền lipid như thuốc thử chuyển nhiễm Freestyle™ Max, theo hướng dẫn của nhà sản xuất,

và sau đó được chuyển nhiễm vào dòng tế bào chủ biểu hiện thuộc động vật có vú tiêu chuẩn, như CHO-S hoặc HEK 293-F. Nếu LC và HC của mAb được mã hóa bởi các cấu trúc biểu hiện riêng biệt, thì hai cấu trúc đó được chuyển nhiễm đồng thời. Trước và sau khi chuyển nhiễm, các tế bào động vật có vú được nuôi cấy để duy trì hoặc để biểu hiện mAb theo phương pháp nuôi cấy tế bào tiêu chuẩn, theo đó khoảng mật độ tế bào để duy trì, môi trường nuôi cấy để sử dụng và các điều kiện nuôi cấy tế bào khác được xác định theo dòng tế bào chủ động vật có vú cụ thể được sử dụng. Các thông số này thường được nhà cung cấp dòng tế bào ghi lại hoặc trong có tài liệu khoa học. Ví dụ, các tế bào CHO-S được duy trì trong môi trường CHO Freestyle™ ở trạng thái huyền phù, lắc ở tốc độ 125 vòng/phút trong tủ ủ được tạo ẩm ở 37°C và CO₂ 8%, và phân tách khi nồng độ tế bào nằm trong khoảng 1,5 đến 2,0 x 10⁶ tế bào/ml.

Vài ngày sau khi chuyển nhiễm, thu hoạch lớp bề mặt dung dịch nuôi cấy tế bào từ các tế bào động vật có vú được chuyển nhiễm tạm thời biểu hiện mAb. Lớp này được làm sạch bằng cách ly tâm và lọc. Thời gian biểu hiện cho các tế bào CHO-S thường là bốn ngày nhưng có thể được điều chỉnh và có thể khác nhau đối với các dòng tế bào chủ động vật có vú khác nhau. Các lượng chuyển nhiễm quy mô lớn (>10 lít) được cô đặc gấp 10 lần bằng cách sử dụng thiết bị cô quay như Centramate. mAb được tinh chế từ lớp bề mặt được làm sạch bằng cách sử dụng cột ái lực protein A như HiTrap MabSelect Sure trong các phương pháp tiêu chuẩn để liên kết mAb với nhựa protein A, rửa nhựa và rửa giải protein bằng cách sử dụng dung dịch đệm có độ pH thấp. Các phần cắt protein được trung hòa ngay lập tức bằng cách rửa giải vào các ống chứa dung dịch đệm có độ pH bằng 7 và các phần cắt đỉnh được tập hợp, lọc và thẩm tách trong dung dịch muối đệm phosphat (PBS), pH 7,2 qua đêm ở 4°C. Sau khi thẩm tách, mAb được lọc lại (bộ lọc 0,2 µ) và nồng độ protein được xác định theo độ hấp thụ ở 280 nm. Chất lượng của protein mAb tinh chế được đánh giá bằng SDS-PAGE (điện di trên gel polyacrylamit) và HPLC loại kích cỡ phân tích và nồng độ nội độc tố được đo bằng xét nghiệm dung dịch thủy phân tế bào amip của loài sam Mỹ (LAL, limulus amebocyte lysate). mAb tinh chế được bảo quản ở 4°C.

Biểu hiện và tinh chế MSCB97 từ các tế bào CHO được chuyển nhiễm tạm thời

MSCB97 được biểu hiện trong tế bào ExpiCHO-S™ (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA; Cat # A29127) bằng cách chuyển nhiễm tạm thời các tế bào với ADN plasmid tinh chế của cấu trúc biểu hiện MSCB97 theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Tóm lại,

các tế bào ExpiCHO-S™ được duy trì ở trạng thái huyền phù trong môi trường biểu hiện ExpiCHO™ (ThermoFisher Scientific, Cat # A29100) trong tủ ủ lắc ở 37°C, CO₂ 8% và 125 vòng/phút. Các tế bào được tách chuyển sao cho vào ngày chuyển nhiễm, có thể đạt được độ pha loãng xuống mức $6,0 \times 10^6$ tế bào/ml, duy trì khả năng tồn tại của tế bào ở mức 98% hoặc cao hơn. Việc chuyển nhiễm tạm thời đã được thực hiện bằng cách sử dụng kit chuyển nhiễm ExpiFectamine™ CHO (ThermoFisher Scientific Cat # A29131). Đối với mỗi ml tế bào pha loãng được chuyển nhiễm, sẽ sử dụng và pha loãng một microgam ADN plasmit vào môi trường tạo phức OptiPRO™ SFM. Thuốc thử ExpiFectamine™ CHO được sử dụng theo tỷ lệ 1: 3 (thể tích/thể tích, ADN:thuốc thử) và cũng được pha loãng trong OptiPRO™. ADN pha loãng và thuốc thử chuyển nhiễm được kết hợp trong một phút, cho phép hình thành phức hợp ADN/lipit và sau đó được thêm vào các tế bào. Sau khi ủ qua đêm, vật liệu ExpiCHO™ và chất tăng cường ExpiFectamine™ CHO đã được thêm vào các tế bào. Các tế bào được nuôi cấy trong tình trạng lắc ở 32°C trong năm ngày trước khi thu hoạch lớp bề mặt dung dịch nuôi cấy.

Lớp bề mặt dung dịch nuôi cấy từ các tế bào ExpiCHO-S™ được chuyển nhiễm tạm thời đã được thu hoạch bằng cách làm sạch thông qua quá trình ly tâm (30 phút, 6000 vòng/phút) sau đó là lọc (màng PES 0,2 µ, Corning). Các lượng chuyển nhiễm quy mô lớn (5 đến 20 lít) trước hết được cô đặc 10 lần bằng hệ thống Lọc dòng tiếp tuyến Pall Centramate. 10x dung dịch muối đệm phosphat Dulbecco (DPBS), pH 7,2 được bổ sung vào lớp bề mặt đến khi đạt nồng độ cuối x1 trước khi nạp vào cột protein A HiTrap MabSelect Sure (DPBS, pH 7,2) cân bằng (GECare; Little Chalfont, Vương quốc Anh) với nồng độ tương đối ~ 20 mg protein trên mỗi ml nhựa, sử dụng hệ thống sắc ký AKTA FPLC. Sau khi tải, cột được rửa với thể tích 10 cột DPBS, pH 7,2. Protein được rửa giải với thể tích 10 cột Na-acetat 0,1 M, pH 3,5. Các phân cắt protein được trung hòa ngay lập tức bằng cách rửa giải vào các ống chứa tris (hydroxymetyl) aminometan (Tris) 2,0 M, pH 7 ở mức 20% thể tích phân cắt rửa giải. Phân cắt đỉnh được tập hợp và độ pH được điều chỉnh thành ~ 5,5 với Tris bổ sung, nếu cần. Protein tinh chế được lọc (0,2 µ) và nồng độ được xác định theo độ hấp thụ ở 280 nm trên quang phổ kế BioTek SynergyHT™. Chất lượng của protein tinh chế được đánh giá bởi SDS-PAGE và HPLC loại kích cỡ phân tích (hệ thống HPLC Dionex). Nồng độ nội độc tố được đo bằng xét nghiệm LAL đo độ đục (Pyrotell®-T, Associates of Cape Cod).

Ví dụ 3: Liên hợp giữa mAb và peptit PYY vòng

Phương pháp A: Khử một phần mAb bằng TCEP

Dung dịch mAb 10 mg/mL trong dung dịch đệm tris-axetat (20 mL, 1 mM trong EDTA) được xử lý bằng 3 đương lượng TCEP. Dung dịch được điều chỉnh đến khi đạt độ pH 6 và sau 1 giờ ở nhiệt độ phòng (rt), sắc ký chất lỏng cao áp với khối quang phổ kế (LCMS) cho thấy rằng các phức disulfua ở vị trí C102 đã được khử hoàn toàn. mAb khử được tinh chế bằng hấp phụ và rửa giải protein A (4 CV axit axetic 100 mM) để cung cấp 180 mg mAb khử.

Liên hợp giữa mAb khử và peptit PYY vòng

Peptit đông khô (5 đương lượng so với mAb) đã được thêm vào mAb khử được mô tả ở trên. EDTA được thêm vào nồng độ cuối là 1 mM và độ pH được điều chỉnh thành 7. Nồng độ được điều chỉnh thành 8 mg/mL và phản ứng được tiến hành với việc khuấy trộn nhẹ trong 16 giờ ở nhiệt độ phòng. TCEP (0,5 đương lượng so với mAb) đã được thêm vào và phản ứng được tiếp tục trong 4 giờ ở nhiệt độ phòng, khuấy trộn nhẹ, sau thời gian đó, các thành phần có khối lượng phân tử cao (MW) đã giảm xuống dưới 3%.

Hỗn hợp phản ứng được điều chỉnh đến khi đạt pH 5,5 và được tinh chế bằng phép sắc ký trao đổi ion trên nhựa CaptoSP bằng cách sử dụng gradien 100% A (TRIS-axetat 100 mM, pH 5,5) đến 100% B (TRIS-axetat 100 mM, pH 5,5; NaCl 0,5 M) trên 20 CV. Các phần cắt có chứa liên hợp mong muốn được tập hợp lại và 140 mg liên hợp đã được thu thập, đồng rửa giải với một lượng nhỏ peptit không phản ứng. Tinh chế cuối cùng là bằng cách hấp phụ và rửa giải protein A (4 CV axit axetic 100 mM). Độ pH của sản phẩm được điều chỉnh đến khi bằng 6 để cung cấp 120 mg liên hợp (năng suất 60%) với độ tinh khiết > 90% với các thành phần MW cao <3%.

Phương pháp B

Tinh chế mAb bằng sắc ký tương tác kỵ nước (HIC)

Dung dịch mAb 20 mg/mL trong dung dịch đệm tris-axetat được nạp vào cột tương tác kỵ nước (TOSOH TSKgel phenyl 7,5x21 cm) và rửa giải với gradien tuyến tính (0-70% B/A, dung môi A: iPrOH 5%, (NH₄)₂SO₄ 1M, dung dịch đệm phosphate 100 mM, pH 6,0; dung môi B: iPrOH 20%, dung dịch đệm phosphate 100 mM). Các đỉnh monome mAb được tập hợp, cô đặc (5-10 mg/mL) và được thẩm tách trong dung dịch đệm axit 3-(N-morpholino) propansulfonic (MOPS) (100 mM, pH 5,5).

Khử một phần bằng TCEP và liên hợp giữa mAb khử và chất tương tự peptit

mAb tinh chế (27 mL, 9,28 mg/mL) được thêm 4 đương lượng TCEP, sau đó là EDTA (1 mM). Sau 2 giờ ở nhiệt độ phòng, LCMS cho thấy các phức disulfua ở vị trí C102 đã được khử hoàn toàn. mAb khử được xử lý bằng cột quay khử muối Zebra (7x10 mL, 7K MWCO, cân bằng trước với MOPS 100 mM pH 5,5) để loại bỏ các xystein/GSH được giải phóng. Hỗn hợp phần cất của mAb bị khử (28 mL) được thêm vào dung dịch peptit PYY vòng trong nước loại Milli Q (6,5 đương lượng so với mAb, 15-20 mg/mL), theo sau là EDTA (1 mM). Độ pH của phản ứng được điều chỉnh đến khi đạt 7,2 đến 7,4 bằng cách thêm từng giọt NaOH 1N. Phản ứng được tiến hành trong 18 giờ ở nhiệt độ phòng và được khuấy trộn nhẹ nhàng. Phản ứng được tiếp tục trong 12 giờ nữa sau khi thêm 0,5 đương lượng TCEP để khử dime mAb-mAb được hình thành trong quá trình phản ứng và để chuyển đổi sang đồng dime mAb mong muốn. Độ pH của phản ứng được hạ xuống bằng pH 5,5 bằng cách thêm axit axetic 2 M và liên hợp thô này được tinh chế bằng phép sắc ký tương tác kỵ nước và rửa giải bằng gradien tuyến tính (0-100% B/A, dung môi A: iPrOH 5%, (NH₄)₂SO₄ 1M, dung dịch đệm phosphate 100 mM, pH 6,0; dung môi B: iPrOH 20%, dung dịch đệm phosphate 100 mM). Tinh chế cuối cùng là bằng cách hấp phụ protein A (PBS) và rửa giải (NaOAc, pH 3,5). Độ pH của sản phẩm được điều chỉnh đến khi bằng 6 và được thẩm tách trong PBS để cho ra mẫu cuối (56%).

Hoặc, mAb được khử bằng GSH và/hoặc Cys. Sau khi loại bỏ chất khử bằng Lọc dòng tiếp tuyến (TFF), một lượng dư peptit được thêm vào mAb được khử tùy chọn với sự có mặt của 0,2-0,5 đương lượng TCEP.

Ví dụ 4: Nghiên cứu *trong ống nghiệm*

Hợp chất 1 (SỐ ID TRÌNH TỰ: 2), là kháng thể đơn dòng ghép với peptit PYY vòng (Hình 3), được đánh giá về khả năng hoạt hóa thụ thể NPY *trong ống nghiệm* trong tế bào tạo dòng (HEK hoặc CHO) biểu hiện thụ thể Y2 người, chuột, chuột nhắt, khỉ vàng, và thụ thể Y1, Y4 và Y5 người. PYY₃₋₃₆, NPY và PP được đưa vào các xét nghiệm này dưới dạng đối chứng nghiên cứu.

Dòng tế bào

Các dòng tế bào tạo dòng ổn định biểu hiện thụ thể NPY được phát triển để sử dụng trong xét nghiệm cAMP. Tóm lại, các dòng tế bào HEK293 đã được chuyển nhiễm bằng kit Lipofectamine 2000 (Invitrogen) theo quy trình của nó với các plasmit biểu hiện mang trình tự mã hóa cho thụ thể Y2 người (Mã truy cập: NM_000910.2), thụ thể Y5 người (Mã truy cập: NM_006174.2), thụ thể Y2 chuột (Mã truy cập: NM_008731) và thụ thể Y2 khỉ

vàng (Mã truy cập: NM_001032832). Bốn mươi tám giờ sau khi chuyển nhiễm, các tế bào được cho lại vào đĩa với môi trường chọn lọc (glucoza cao DMEM với huyết thanh thai bò (FBS) 10%, 50 I.U. penixilin, streptomycin 50 µg/ml, L-glutamin 2 mM, natri pyruvat 1 mM và G418 600 µg/ml). Các tế bào được giữ trong môi trường chọn lọc trong 2 tuần trước khi các dòng đơn được chọn bằng phương pháp pha loãng giới hạn. Các tế bào được chuyển nhiễm sau đó được duy trì bằng cách nuôi cấy trong môi trường glucoza cao-DMEM (Cellgro) được bổ sung huyết thanh thai bò 10%, L-glutamin 1%, natri pyruvat 1%, penixilin/streptomycin 1% và G418 600 µg/ml.

Ngoài ra, các dòng tế bào CHO-K1 được lấy từ DiscoverX Corporation, biểu hiện thụ thể Y1 người (Mã danh mục: 93-0397C2), thụ thể Y4 người (Mã danh mục: 95-0087C2). Các tế bào DiscoverX được nuôi cấy trong môi trường F12 (Gibco) được bổ sung FBS 10% và theo lựa chọn G418 (800 µg/mL). Thụ thể Y2 chuột được biểu hiện trong dòng CHO-K1 Glo-Sensor lấy từ Promega Corporation. Các tế bào này được chuyển nhiễm bằng plasmit cAMP pGloSensor™ -23F cho xét nghiệm cAMP dựa trên phát quang nhưng đã được thử nghiệm và xác nhận để sử dụng với xét nghiệm cAMP Perkin-Elmer LANCE. Các tế bào Y2 chuột được nuôi cấy trong môi trường F12 (Gibco) được bổ sung FBS 10% và G418 800 µg/ml.

Tất cả các dòng tế bào được để trong lọ (4×10^6 tế bào/lọ) và được bảo quản trong nitơ lỏng cho đến khi sử dụng. Một ngày trước khi thử nghiệm, các lọ được rã đông và thêm vào 15 ml môi trường thích hợp. Các tế bào được ly tâm ở 450 x g trong 5 phút, các lớp bề mặt được hút ra và các tế bào được tái huyền phù trong môi trường không có G418 với mật độ $0,2 \times 10^6$ tế bào/ml. Các tế bào được phân tán (25 µl/giếng) vào các đĩa 384 giếng màu trắng được phủ collagen Biocoat đến khi đạt mật độ cuối là 5000 tế bào/giếng. Các đĩa tế bào được ủ qua đêm trong tủ ủ nuôi cấy mô ẩm ở 37°C trong môi trường khí quyển 5% CO₂/90% O₂.

Quy trình thí nghiệm

Xét nghiệm cAMP tương tự như các xét nghiệm thụ thể khác. Kit LANCE cAMP (Perkin Elmer Corporation; Waltham, MA) đã được sử dụng trong tất cả các thí nghiệm để định lượng nồng độ cAMP nội bào. Vào ngày xét nghiệm, môi trường tế bào được lắng gạn từ các tế bào và 6 µl peptit (nồng độ 2X) được thêm vào giếng. Các peptit được tạo thành dưới dạng đáp ứng liều 11 điểm (bắt đầu từ nồng độ 100 nM hoặc 10 µM với tỷ lệ pha loãng 1: 3 tuần tự) trong dung dịch đệm kích thích. Dung dịch đệm kích thích bao gồm HEPES

(axit 4-(2-hydroxyetyl)-1-piperazinetsulfonic) 5 mM, IBMX 500 μ M và albumin huyết thanh bò (BSA) 0,1% trong HBSS (dung dịch muối cân bằng Hank). 6 μ l dung dịch đệm kích thích tiếp theo chứa forskolin (2X, nồng độ cuối 5 μ M) và kháng thể LANCE cAMP (1: 100) được thêm vào các tế bào. Sau khi ủ 25 phút ở nhiệt độ phòng, 12 μ l hỗn hợp phát hiện của xét nghiệm đã được thêm vào từng giếng. Hỗn hợp phát hiện được điều chế bằng cách pha loãng biotin-cAMP (1: 750) và Europium-W8044 (1: 2250) trong dung dịch đệm phát hiện được cung cấp với kit LANCE cAMP. Đĩa được ủ trong 2 giờ ở nhiệt độ phòng và sau đó được đọc dưới dạng xét nghiệm TR-FRET trên thiết bị đọc đĩa Envision (kích thích 320 nm, phát xạ 615 nm và 665 nm). Huỳnh quang kênh 1 (đơn vị huỳnh quang tương đối ở 615 nm) và huỳnh quang kênh 2 (đơn vị huỳnh quang tương đối ở 665 nm) cùng với tỷ lệ của chúng được xuất dưới dạng tập tin Excel.

Phân tích dữ liệu

Dữ liệu từ thiết bị đọc đĩa Envision được thể hiện dưới dạng đơn vị huỳnh quang tương đối (RFU) được tính bằng (615 nm/665 nm) x 10.000. Tất cả mẫu được đo theo bộ ba. Dữ liệu được phân tích bằng phần mềm phân tích dữ liệu tại chỗ Crucible do Eudean Shaw thiết kế. Nồng độ cAMP chưa xác định trong mỗi lỗ được nội suy từ mẫu tham chiếu về nồng độ cAMP đã xác định được bao gồm trong mỗi đĩa. Thu được các thông số như EC_{50} , $\text{Log}(EC_{50})$, HillSlope (nH), cao nhất và thấp nhất bằng cách lập biểu đồ giá trị nồng độ cAMP so với nồng độ hợp chất log, được khớp bằng mô hình 4-P, sử dụng phương pháp bình phương tối thiểu trọng số phi tuyến tính trong môi trường R (Nguồn mở <http://cran.us.r-project.org/>). Phương pháp này được thực hiện bởi phòng Thống kê & Tính toán phi lâm sàng, Janssen R&D.

Bảng 1: Dữ liệu trong ống nghiệm

	Hiệu lực thể đồng dạng người (EC_{50} nM)				Hiệu lực trong các thành phần (EC_{50} nM)		
Hợp chất	hY2	hY1	hY4	hY5	Y2 chuột nhất	Y2 chuột	Y2 khi vàng
Hợp chất 1	0,006	>2910	>2910	345,7	0,004	0,04	0,004
PYY3-36	0,08	66,4	136,7	12,3	0,03	0,50	0,06

Ví dụ 5: Dược động học (PK)

PK chuột DIO

Chuột DIO C57BL/6N đực (20 tuần tuổi, được cho ăn chế độ ăn có lượng chất béo cao trong 14 tuần) được Taconic Laboratory cung cấp. Chuột được nhốt một con một chuồng trên lớp lót AlphaDri trong phòng được điều khiển nhiệt độ với chu kỳ 12

giờ sáng/tối. Chuột được cho tiếp xúc với nước tùy thích và được duy trì chế độ ăn có hàm lượng chất béo cao (D12492, Research Diet).

Chuột được cho liều dưới da (s.c.) với 1 mg/kg hợp chất 1, 3 con được cho tử vong tại mỗi thời điểm và máu được thu thập tại $t = 4, 8, 24, 48, 72, 120$ và 168 giờ. Máu từ 3 con chưa được điều trị cũng được thu thập. Khoảng $300 \mu\text{L}$ máu của mỗi động vật được thu thập qua tĩnh mạch cổ sau khi cắt đầu trong khi gây mê bằng khí được cảm ứng với hỗn hợp $70\% \text{CO}_2$ và $30\% \text{O}_2$. Các mẫu máu (khoảng $300 \mu\text{L}$) đã được thu thập trong các ống Sarstedt Microvette® được phủ K3E (EDTA) chứa $12 \mu\text{L}$ (tỷ lệ 4%) dung dịch ức chế proteaza hoàn chỉnh và $3 \mu\text{L}$ (tỷ lệ 1%) chất ức chế DPP-IV. Các mẫu máu được đặt trên nước đá uớt trước khi được ly tâm ở 10.000 vòng/phút trong ~ 4 phút trong điều kiện lạnh ($\sim 5^\circ\text{C}$) để loại bỏ tế bào trong vòng 30 phút sau khi thu thập tại mỗi thời điểm và tất cả huyết tương được chuyển đến đĩa 96 giếng. Đĩa chứa giếng được bảo quản trên đá khô cho đến khi được đặt trong tủ đông -80°C . Dữ liệu được trình bày trong Bảng 2 và Hình 4.

PK ở chuột

Hợp chất 1 được cho sử dụng dưới da và tĩnh mạch cho chuột đực Sprague-Dawley (Charles River Laboratories, Wilmington, MA) với nồng độ liều $1,0 \text{ mg/kg}$ trong PBS, (pH $7,0-7,6$). Khoảng $500 \mu\text{L}$ máu được thu thập từ ba con tại mỗi thời điểm thông qua tĩnh mạch hiển ($t = 1, 4, 24, 48, 72, 96, 168$ và 240 giờ sau khi cho liều). Mẫu máu sau khi cho liều 336 giờ được thu thập qua tĩnh mạch cổ sau khi cắt đầu trong khi gây mê bằng khí được cảm ứng với hỗn hợp $70\% \text{CO}_2$ và $30\% \text{O}_2$. Các mẫu máu đã được thu thập trong các ống Sarstedt Microvette® được phủ K3E (EDTA) chứa $20 \mu\text{L}$ (tỷ lệ 4%) dung dịch ức chế proteaza hoàn chỉnh và $5 \mu\text{L}$ (tỷ lệ 1%) chất ức chế DPPIV. Các mẫu máu được đặt trên nước đá uớt trước khi được ly tâm ở 10.000 vòng/phút trong ~ 4 phút trong điều kiện lạnh ($\sim 5^\circ\text{C}$) để loại bỏ tế bào trong vòng 60 phút sau khi thu thập tại mỗi thời điểm và tất cả huyết tương được chuyển đến đĩa 96 giếng. Nồng độ Hợp chất 1 được đo bằng phương pháp LCMS được mô tả dưới đây. Dữ liệu được trình bày trong Bảng 3.

PK khi đuôi dài (khí)

Tất cả các con khi được cho nhịn ăn ít nhất tám giờ trước khi cho liều và thu thập mẫu máu qua bốn giờ đầu tiên. Ba con được nhận liều đơn IV 1 mg/kg Hợp chất 1 và ba con khác được nhận liều đơn SC là 1 mg/kg Hợp chất 1. Máu được thu thập trước khi cho

liều và ở 1, 6, 10, 24, 36, 48, 72, 120, 168, 240, 336, 432, và 504 giờ sau khi cho liều. Mẫu bổ sung được thu thập ở 0,5 giờ sau khi cho liều cho nhóm IV. Khoảng 1 ml máu từ mỗi con được thu thập trong các ống Sarstedt Microvette® được phủ K3E (EDTA) chứa tỷ lệ 4% dung dịch ức chế proteaza hoàn chỉnh và tỷ lệ 1% chất ức chế DPPIV. Các mẫu máu được đặt trên nước đá ướt trước khi được ly tâm trong 30 phút sau khi thu thập tại mỗi thời điểm và tất cả huyết tương tạo thành được chia làm ba phần và được chuyển đến đĩa 96 giếng bộ ba. Đĩa chứa giếng được bảo quản trên đá khô cho đến khi được đặt trong tủ đông -80°C. Dữ liệu được trình bày trong Bảng 4 và Hình 5.

Xét nghiệm khối phổ nguyên vẹn để xác định nồng độ trong huyết tương

Các mẫu huyết tương được xử lý bằng kỹ thuật bất giữ ái lực miễn dịch bằng kháng thể kháng Fc người, sau đó là phân tích MS quét toàn bộ độ phân giải cao LC pha đảo trên khối quang phổ kế ba TOF (time-of-flight, thời gian bay). Phổ MS thô được giải chập để giải thích khối lượng phân tử của các thành phần trong các mẫu được tiêm. Định của ion phân tử của liên hợp nguyên vẹn được sử dụng để định lượng. Đường cong tiêu chuẩn và các mẫu kiểm soát chất lượng đã được chuẩn bị bằng cách thêm nồng độ mẫu chuẩn trong huyết tương và được xử lý bằng cách sử dụng cùng một quy trình cùng lúc với các mẫu phát sinh. Dữ liệu PK của chuột DIO, chuột và khí lần lượt được trình bày trong Bảng 2-4. Dữ liệu PK của chuột DIO và khí cũng lần lượt được trình bày trong Hình 4 và 4.

Bảng 2: PK ở chuột DIO

Thí nghiệm	Liều lượng (mg/kg)	T _{1/2} giờ	T _{max} giờ	C _{max} ng/mL	AUC _{last} giờ*ng/mL
Nguyên vẹn	1,0	81,05	48	8750	995460

Bảng 3: PK ở chuột

Đường dùng	Liều lượng (mg/kg)	T _{1/2} giờ	T _{max} giờ	C _{max} ng/mL	AUC _{last} giờ*ng/mL
IV	1,0	93,0	1	19,5	809,2
SC	1,0	88,7	48	4,2	602,0

Bảng 4: PK ở khí

Đường dùng	Liều lượng (mg/kg)	T _{1/2} giờ	T _{max} giờ	C _{max} ng/mL	AUC _{last} giờ*ng/mL
IV	1,0	178,39	0,67	30290	1207,39
SC	1,0	104,32	10	5590	712,19

Ví dụ 6: Các nghiên cứu về tính hiệu lực *trong cơ thể sống*

Giảm cân ở chuột béo phì do chế độ ăn (DIO): Cho liều cấp tính

Hợp chất 1 được đánh giá về khả năng giảm lượng thu nạp thức ăn và cân nặng cơ thể ở chuột DIO C57B1/6 đực sau khi sử dụng đơn liều. Chuột DIO C57BL/6N đực (20 tuần tuổi, được cho ăn chế độ ăn có lượng chất béo cao trong 14 tuần) được Taconic Laboratory cung cấp. Chuột được nhốt một con một chuồng trên lớp lót AlphaDri trong phòng được điều khiển nhiệt độ với chu kỳ 12 giờ sáng/tối. Chuột được cho tiếp xúc với nước tùy thích và được duy trì chế độ ăn có hàm lượng chất béo cao (D12492, Research Diet). Các con vật được cho thích nghi với cơ sở trong ít nhất một tuần trước khi bắt đầu thí nghiệm.

Một ngày trước khi cho liều, chuột được lập nhóm thành các đoàn hệ gồm 8 con dựa trên cân nặng cơ thể của từng con. Vào lúc 3 giờ-4 giờ chiều ngày hôm sau, các con chuột được cân và được điều trị bằng chất mang (dPBS, pH 7,2), Hợp chất 1 với liều 0,1, 0,3, 1,0, 3,0 hoặc 7,5 nmol/kg hoặc Dulaglutide liều 0,3 nmol/kg dưới da (sc). Trọng lượng cơ thể và lượng thu nạp thức ăn được đo lúc 24 giờ, 48 giờ và 72 giờ sau khi cho liều và tỷ lệ phần trăm giảm cân và giảm lượng thu nạp thức ăn được tính toán. Các phân tích thống kê được thực hiện bằng cách sử dụng kỹ thuật ANOVA lặp lại hai yếu tố cùng hậu kiểm định Tukey trên Prism. Tất cả dữ liệu được trình bày dưới dạng giá trị trung bình $\pm$ SEM (Hình 6 và Hình 7).

Giảm cân ở chuột béo phì do chế độ ăn (DIO): Cho liều mạn tính

Hợp chất 1 được đánh giá về khả năng làm giảm lượng thu nạp thức ăn và cân nặng và cải thiện cân bằng nội môi glucoza khi cho liều lặp lại ở chuột DIO C57B1/6 đực trong khoảng thời gian 8 ngày. Chuột DIO C57BL/6N đực (20 tuần tuổi, được cho ăn chế độ ăn có lượng chất béo cao trong 14 tuần) được Taconic Laboratory cung cấp. Chuột được nhốt một con một chuồng trên lớp lót AlphaDri trong phòng được điều khiển nhiệt độ với chu kỳ 12 giờ sáng/tối. Chuột được cho tiếp xúc với nước tùy thích và được duy trì chế độ ăn có hàm lượng chất béo cao (D12492, Research Diet). Các con vật được cho thích nghi với cơ sở trong ít nhất một tuần trước khi bắt đầu thí nghiệm.

Một ngày trước khi cho liều, chuột được lập nhóm dựa trên cân nặng cơ thể của từng con. Vào lúc 3 giờ-4 giờ chiều mỗi ngày trong 8 ngày tiếp theo, các con chuột và lượng thu nạp thức ăn được cân. Các con chuột được điều trị bằng chất mang (dPBS, pH 7,2) hoặc dulaglutide liều 0,3 nmol/kg dưới da mỗi ngày, hoặc Hợp chất 1 với liều 0,1, 0,3, 1,0,

3,0 nmol/kg dưới da ba ngày một lần. Sau 8 ngày, chuột được cho nhịn đói trong 5 giờ và sau đó được bơm nhanh bằng đường miệng 2 g/kg glucoza tại $t=0$. Vào thời điểm $t=0$, 30, 60, 90, và 120 phút sau thử nghiệm glucoza, glucoza trong máu được đo và vào thời điểm $t=0$, 30, và 90 phút, máu được rút ra để đo insulin trong huyết thanh. Các phân tích thống kê được thực hiện bằng cách sử dụng ANOVA một yếu tố hoặc hai yếu tố lặp lại cùng với hậu kiểm định Tukey trên Prism. Tất cả dữ liệu được trình bày dưới dạng giá trị trung bình $\pm$ SEM (Hình 8 và 9 và Bảng 5-8).

Bảng 5: Tác dụng của hợp chất 1 đối với cân nặng cơ thể (g) trong 8 ngày điều trị

Điều trị	Chất mang	Hợp chất 1 (nmol/kg)				Dulaglutide (nmol/kg)
Ngày	n/a	0,1	0,3	1,0	3,0	0,3
-1	46,3 $\pm$ 0,6	46,3 $\pm$ 0,6	46,7 $\pm$ 0,8	46,3 $\pm$ 0,6	46,3 $\pm$ 0,6	46,3 $\pm$ 0,6
0	46,1 $\pm$ 0,7	46,0 $\pm$ 0,6	46,8 $\pm$ 0,7	46,3 $\pm$ 0,6	46,3 $\pm$ 0,6	45,9 $\pm$ 0,6
1	45,8 $\pm$ 0,7	45,0 $\pm$ 0,6	45,2 $\pm$ 0,7	43,9 $\pm$ 0,5	43,9 $\pm$ 0,6	44,1 $\pm$ 0,6
2	45,2 $\pm$ 0,7	43,9 $\pm$ 0,6	43,6 $\pm$ 0,7	42,4 $\pm$ 0,7*	41,8 $\pm$ 0,7*	42,2 $\pm$ 0,6*
3	45,1 $\pm$ 0,7	43,9 $\pm$ 0,6	42,8 $\pm$ 0,6	41,0 $\pm$ 0,6*	40,1 $\pm$ 0,6*	40,6 $\pm$ 0,6*
4	44,7 $\pm$ 0,7	43,4 $\pm$ 0,6	42,0 $\pm$ 0,6	39,9 $\pm$ 0,6*	38,5 $\pm$ 0,6*	39,3 $\pm$ 0,6*
5	44,5 $\pm$ 0,7	43,0 $\pm$ 0,6	41,5 $\pm$ 0,5*	39,1 $\pm$ 0,6*	36,8 $\pm$ 0,7*	38,1 $\pm$ 0,7*
6	44,5 $\pm$ 0,7	43,1 $\pm$ 0,6	41,4 $\pm$ 0,5*	38,6 $\pm$ 0,6*	35,5 $\pm$ 0,8*	37,1 $\pm$ 0,8*
7	44,3 $\pm$ 0,7	43,1 $\pm$ 0,7	41,3 $\pm$ 0,5*	38,2 $\pm$ 0,6*	34,8 $\pm$ 0,9*	36,4 $\pm$ 1,0*
8	45,2 $\pm$ 0,6	46,3 $\pm$ 0,7	41,9 $\pm$ 0,5*	38,8 $\pm$ 0,6	34,7 $\pm$ 1,0*	36,5 $\pm$ 1,1*

Các giá trị thể hiện giá trị trung bình $\pm$ SEM cho dữ liệu từ 8 con vật theo thời gian cho mỗi nhóm

* $p<0,05$, so với chất mang; phân tích ANOVA RM hai yếu tố, kiểm định so sánh nhiều cặp Tukey

Bảng 6: Tác dụng của hợp chất 1 đối với các nồng độ glucoza trong máu (mg/dL) trong quá trình OGTT sau 8 ngày điều trị

Điều trị	Liều lượng (nmol/kg)	Thời gian sau thử nghiệm glucoza (phút)					Tổng AUC (mg/dL/120 phút)	Delta AUC (mg/dL/120 phút)
		0	30	60	90	120		
Chất mang	NA	148 $\pm$ 6	227 $\pm$ 15	272 $\pm$ 12	206 $\pm$ 9	209 $\pm$ 13	26492 $\pm$ 1232	8702 $\pm$ 1082
Hợp chất 1	0,1	151 $\pm$ 4	213 $\pm$ 9	249 $\pm$ 10	186 $\pm$ 11	194 $\pm$ 15	24598 $\pm$ 849	6433 $\pm$ 677
	0,3	137 $\pm$ 6	191 $\pm$ 11	208 $\pm$ 10*	146 $\pm$ 8*	160 $\pm$ 8*	20786 $\pm$ 728*	4379 $\pm$ 364*
	1,0	117 $\pm$ 5	146 $\pm$ 9*	203 $\pm$ 10*	135 $\pm$ 8*	136 $\pm$ 5*	18285 $\pm$ 769*	4319 $\pm$ 522*
	3,0	73 $\pm$ 11*	129 $\pm$ 5*	149 $\pm$ 10*	93 $\pm$ 9*	101 $\pm$ 9*	13703 $\pm$ 913*	5004 $\pm$ 585
Dulaglutide	0,3	76 $\pm$ 9*	151 $\pm$ 14*	174 $\pm$ 17*	104 $\pm$ 10*	119 $\pm$ 9*	15758 $\pm$ 1054*	6668 $\pm$ 1846

Các giá trị thể hiện giá trị trung bình $\pm$ SEM cho dữ liệu từ 8 con vật theo thời gian cho mỗi nhóm

* $p<0,05$, so với chất mang; phân tích ANOVA RM hai yếu tố, kiểm định so sánh nhiều cặp Tukey cho các giá trị glucoza; phân tích ANOVA một yếu tố, kiểm định so sánh nhiều cặp Tukey cho AUC

Bảng 7: Tác dụng của hợp chất 1 đối với các nồng độ insulin (ng/dL) trong quá trình OGTT sau 8 ngày điều trị

Điều trị	Liều lượng (nmol/kg)	Thời gian sau thử nghiệm glucoza (phút)			Tổng AUC (mg/dL/120 phút)
		0	30	90	
Chất mang	NA	5,6 ±1,4	11,3 ±3,0	4,0±0,6	711,4±164,1
Hợp chất 1	0,1	3,0±0,4	6,6±0,8*	2,4±0,2	415,6 ±44,2
	0,3	2,3±0,2	4,0±0,6*	1,7±0,2	264,3±33,0*
	1,0	1,3±0,2*	2,2±0,1*	1,1±0,2	151,6±12,5*
	3,0	0,4±0,1*	1,2±0,1*	0,4±0,1*	73,9±9,0*
Dulaglutide	0,3	0,6±0,1*	1,7±0,2*	0,7±0,2	108,8±12,3*

Các giá trị thể hiện giá trị trung bình ±SEM cho dữ liệu từ 8 con vật theo thời gian cho mỗi nhóm

*p<0,05, so với chất mang; phân tích ANOVA RM hai yếu tố, kiểm định so sánh nhiều cặp Tukey cho các giá trị glucoza; phân tích ANOVA một yếu tố, kiểm định so sánh nhiều cặp Tukey cho AUC

Bảng 8: Tác dụng của hợp chất 1 đối với các nồng độ glucoza trong máu (mg/dL) sau ăn sau 8 ngày điều trị

Điều trị	Liều lượng (nmol/kg)	Glucoza trong máu (mg/dL)
Chất mang	NA	180 ±5
Hợp chất 1	0,1	164 ±6
	0,3	160 ±5
	1,0	149 ±6
	3,0	105±12*
Dulaglutide	0,3	114±13*

Các giá trị thể hiện giá trị trung bình ±SEM cho dữ liệu từ 8 con vật theo thời gian cho mỗi nhóm

*p<0,05, so với chất mang; phân tích ANOVA một yếu tố, kiểm định so sánh nhiều cặp Tukey

Ví dụ 7: Phương pháp tổng hợp để điều chế hợp chất mAb-oxyntomodulin (mAb-OXM)

Oxyntomodulin (OXM) người là peptit nội tiết ruột chứa 37 axit amin (SỐ ID TRÌNH TỰ: 23) đã được chứng minh là có tính chất dược lý có lợi cho bệnh nhân đái tháo đường tít 2. Dược lý học là kết quả của cơ chế đồng vận ở cả GLP1R và GCGR. Các nghiên cứu về chất tương tự OXM cho thấy biến thể peptit đã kiểm soát được glucoza và giảm cân tốt ở mẫu động vật gặm nhấm. Thời gian bán thải của OXM trong cơ thể sống là khoảng vài phút ở người. Do đó, thiết kế bổ sung cho OXM đã được thực hiện để tạo thời gian bán thải tương xứng với liều dùng mỗi tuần một lần. Tăng thời gian bán thải bằng cách tăng tính bền của peptit OXM đối với sự phân giải protein và bằng cách tăng thời gian bán thải lưu hành của peptit qua việc gắn kết cộng hóa trị với kháng thể đơn dòng (mAb). Giảm thiểu sự phân giải protein bằng DPP4 đối với

tải lượng peptit bằng cách thay thế serin ở vị trí 2 bằng axit aminoisobutyric (Aib). Ổn định cấu trúc liên kết xoắn ốc của peptit bằng cách đưa vào cầu muối rẽ làm hai nhánh từ Q20R thành S16E và Q24E, và giảm thiểu nguy cơ oxy hóa bằng biến đổi M27L. mAb mẹ, MSCB97 (được mô tả ở trên), được chọn để có liên kết kháng nguyên nội sinh thấp và đột biến điểm isoleuxin thành xystein trong vùng HCDR3 (SỐ ID TRÌNH TỰ: 18) của chuỗi nặng (I102C) có vai trò làm điểm gắn kết cho tải lượng peptit tổng hợp. Chức năng thực thi bị bất hoạt bằng cách sử dụng lớp kháng thể IgG4 PAA. Phần đệm oligoetylen glycol ngăn được hợp nhất giữa mAb và peptit để đảm bảo peptit tiếp cận đến GLP1R và GCGR mà không bị cản trở. Các phần đệm cũng tạo ra khả năng hòa tan trong nước được ưa thích thuận lợi cho hóa học liên hợp. Sự gắn kết peptit-phần đệm vào mAb đã được thực hiện bằng cách đưa nhóm bromoaxetamid phản ứng tại đầu xa của phần đệm glycol. Đầu gần của phần đệm được gắn vào biến thể OXM thông qua mạch bên K30. Các trình tự axit amin của glucagon và của biến thể peptit OXM lần lượt được cung cấp theo SỐ ID TRÌNH TỰ: 22 và 24. Sự tiếp hợp đã được thực hiện bằng phản ứng với nhóm chức thiol của đột biến điểm xystein trong chuỗi nặng mAb. Các trình tự axit amin của chuỗi nặng và nhẹ mAb được cung cấp theo SỐ ID TRÌNH TỰ: lần lượt là 13 và 15.

Tổng hợp hóa học hợp chất mAb-OXM

Sơ đồ tổng hợp tổng thể cho quy trình sản xuất hợp chất mAb-OXM được thể hiện trong Hình 10.

Điều chế biến thể peptit oxyntomodulin (OXM): Peptit được bảo vệ bằng liên kết nhựa được tổng hợp bằng các axit amin 9-fluorenylmetyloxycarbonyl (Fmoc) chuẩn (ngoại trừ His đầu N, N α -Boc-His (Boc) -OH và Lys30, N α -Fmoc-Lys (ivDDE) -OH) trên nhựa PAL-PEG-polystyren. Các phương pháp hoạt hóa axit amin chuẩn và khử bảo vệ Fmoc đã được sử dụng trong toàn bộ quy trình. Sau khi hoàn thành trình tự, mạch bên của lysin đầu C bị khử bảo vệ một cách chọn lọc bằng cách xử lý bằng hydrazin khan pha loãng trong N, N-dimetylformamid (DMF). Fmoc-dPEG₁₂-CO₂H đã được ghép với amin được giải phóng bằng cách hoạt hóa diisopropylcarbodiimide (DIC)/etyl (hydroxyimino) -xyanoaxetat. Nhóm Fmoc được loại bỏ và amin tạo thành được bromoaxetyl hóa sử dụng dung dịch anhydrit bromoaxetic trong DMF.

Peptit đã được loại bỏ khỏi nhựa với việc tắt cả các nhóm bảo vệ được khử bảo vệ đồng thời bằng cách xử lý bằng axit trifluoroaxetic (TFA) có chứa phenol, nước

và triisopropylsilan làm chất chống muối. Peptit thô được phân lập bằng cách kết tủa lạnh với ete và được tinh chế bằng phép sắc ký lỏng hiệu năng cao pha đảo (RP-HPLC) sử dụng axetonitril/nước với TFA 0,1% làm dung môi rửa giải. Peptit tinh khiết được thu thập dưới dạng chất rắn màu trắng mịn sau khi đông khô và được bảo quản ở -80°C.

Khử kháng thể đơn dòng MSCB97: Kháng thể đơn dòng được phân lập với disulfua đơn phân Cys102 được kiến tạo liên kết với đơn phân cystein hoặc glutathion bất định được rút ra từ chất dịch bào tương hoặc từ môi trường tăng trưởng. Do đó, việc khử sơ bộ các disulfua này sau khi loại bỏ cystein không mong muốn là cần thiết trước khi tiếp hợp với biến thể peptit OXM. Hoàn tất việc khử mAb được cố định trên hạt nhựa protein A.

Chất khử (tricarboxyethyl phosphin, TCEP) được lưu hành qua cột ở độ pH bằng 5 cho đến khi quá trình khử hoàn tất (1 giờ). Ưu điểm của TCEP làm chất khử trong các điều kiện này là khử có hiệu quả, với việc tái tạo liên kết disulfua không đáng kể khi ở độ pH thấp hơn. Sau khi rửa sạch các sản phẩm phụ, protein bị hấp phụ bị khử được rửa giải khỏi cột, sử dụng dung dịch đệm có tính axit (natri axetat ở pH 3,5). mAb khử được thẩm tách hai lần trong axit 3-(N-morpholino) propansulfonic (MOPS) 50 mM ở độ pH 5,5

Các lô thăm dò nhỏ hơn được điều chế bằng cách khử với 2,5 đương lượng TCEP cho mAb trong dung dịch ở độ pH 5. Tiến hành khử trong 2 giờ ở nhiệt độ phòng. Loại bỏ sản phẩm phụ phân tử nhỏ bằng cách lọc gel (cột PD10) và MSCB97 đã khử được rửa giải với MOPS 10 mM, pH 5,5.

Điều chế hợp chất mAb-OXM: Dung dịch MSCB97 khử được thêm vào một lượng gấp 7,6 lần biến thể peptit OXM đông khô. Dung dịch EDTA 1 mM được thêm vào để bảo vệ các thiol phản ứng chống lại quá trình oxy hóa được xúc tác bằng kim loại, và độ pH của dung dịch phản ứng được nâng lên 7,3 bằng cách thêm dung dịch đệm MOPS (1 M, pH 8,1). Phản ứng được tiến hành trong 18 giờ ở nhiệt độ phòng và được khuấy trộn nhẹ nhàng. Phản ứng được dập tắt bằng cách điều chỉnh đến khi đạt độ pH 5,5 bằng cách thêm axit axetic 2 M và liên hợp thô được tinh chế bằng cách hấp phụ trên protein A kèm rửa để loại bỏ peptit dư, sản phẩm bị đuổi và sản phẩm phụ. Sau khi rửa giải sản phẩm (natri axetat, pH 3,6), tiến hành thẩm tách trong dung dịch đệm axetat pH 5.

Ba quy trình tổng hợp độc lập đã được thực hiện bắt đầu với 250 mg, 500 mg và 500 mg MSCB97, và các sản phẩm được kết hợp lại trong một lô duy nhất.

Phân tích hợp chất mAb-OXM

Các tính chất của hợp chất mAb-OXM đã điều chế được phân tích bằng cách sử dụng (i) phương pháp sắc ký tương tác kỵ nước phân tích (HIC), (ii) phép đo khối lượng nguyên vẹn bằng khối phổ ion hóa phun điện từ sắc ký lỏng (LC-ESIMS), (iii) sắc ký loại kích cỡ phân tích (SEC) và (iv) điện di trên gel SDS-polyacrylamit.

Độ bền trong huyết tương người và khỉ

OXM được chuyển hóa nhanh chóng bởi peptidaza trong huyết tương. Để xác định tính kháng của hợp chất mAb-OXM (“hợp chất 2”) (Hình 11) đối với sự phân giải bằng enzym trong huyết tương người và khỉ, độ bền *ngoài cơ thể sống* của hợp chất 2 đã được đánh giá. Hợp chất 2 được ủ ở nồng độ 20 nM với huyết tương được chống đông bằng heparin mới (không đông lạnh) ở 37°C trong khoảng thời gian lên đến 168 giờ. Thực hiện phân tích sinh học bằng cách sử dụng xét nghiệm sinh học dựa trên tế bào chức năng để đo sản lượng cAMP trong các tế bào HEK chuyển nhiễm thụ thể GLP-1 người. Lượng cAMP được tạo ra tỷ lệ thuận với nồng độ của chất tương tự OXM hoạt tính và nồng độ của chất tương tự OXM hoạt tính trong các mẫu ổn định được xác định trong xét nghiệm này bằng cách nội suy từ các mẫu chuẩn có nồng độ đã biết. Xét nghiệm này được sử dụng để xếp hạng độ bền so với chất đối chứng 1 ổn định hơn được xác định trước đó, và chất đối chứng 2 kém ổn định hơn được xác định trước đó. Dữ liệu được sử dụng để xếp hạng độ bền tương đối và được trình bày trong Hình 12 và 13.

Ví dụ 8: Nghiên cứu *trong ống nghiệm*: Hiệu lực *trong ống nghiệm* của hợp chất 2 ở thụ thể GLP1 và glucagon người, chuột nhắt, chuột và khỉ đuôi dài.

Hiệu lực và tính đặc hiệu loài của các hợp chất được đề cập, bao gồm hợp chất 2, được đặc trưng hóa trong các xét nghiệm sử dụng tế bào HEK293 được chuyển nhiễm để biểu hiện ổn định cả thụ thể GLP1 hoặc GCG người, khỉ đuôi dài, chuột, hoặc chuột nhắt. Đối với mỗi xét nghiệm thụ thể, các tế bào tạo dòng được gieo mầm vào các đĩa 384 giếng với mật độ thích hợp từ 2000-5000 tế bào/giếng. Các hợp chất được pha loãng trong HBSS được bổ sung HEPES 5 mM, BSA 0,1% và IBMX 0,5 mM và được thêm vào các tế bào. Các đĩa tế bào được ủ ở nhiệt độ phòng trong 5 hoặc 10 phút tùy thuộc vào dòng tế bào và sau đó được ly giải để đo cAMP. Nồng độ cAMP được định lượng bằng cách sử dụng kit LANCE cAMP với đầu đọc đĩa EnVision. Các đường cong chuẩn được bao gồm trong

mỗi đĩa xét nghiệm để tính lại nồng độ cAMP. Đường cong liều-đáp ứng được phân tích và các giá trị EC₅₀ của hợp chất được tính bằng Graphpad Prism hoặc Crucible. Dữ liệu EC₅₀ được tổng hợp trong Bảng 9-10.

Bảng 9: Tổng hợp các giá trị EC₅₀ (nM) từ các xét nghiệm cAMP thụ thể GLP1 và glucagon người.

	Người	
	GCGR	GLP1R
Glucagon	0,05 ±0,01	0,96 ±0,21
Ser-8 GLP1	>100	0,07 ±0,01
OXM	3,01 ±0,35	2,40 ±0,59
Hợp chất 2	3,31 ±0,22	0,43 ±0,02
Dulaglutide	>100	0,17 ±0,04

Các giá trị thể hiện giá trị trung bình ±SEM từ 3-7 thí nghiệm.

Bảng 10: Tổng hợp các giá trị EC₅₀ (nM) từ các xét nghiệm cAMP thụ thể GLP1 và glucagon chuột nhất, chuột và khi đuôi dài.

	Chuột nhất		Chuột		Khi đuôi dài	
	GCGR	GLP1R	GCGR	GLP1R	GCGR	GLP1R
Glucagon	0,09 ±0,01	2,13 ±0,42	1,57 ±0,33	4,73 ±0,20	0,03 ±0,002	1,96 ±0,38
Ser-8 GLP1	>100	0,06 ±0,005	>100	0,14 ±0,03	>100	0,08 ±0,002
OXM	6,31 ±2,58	1,90 ±0,31	12,74 ±3,54	0,98 ±0,16	0,49 ±0,08	0,80 ±0,07
Hợp chất 2	0,82 ±0,38	0,11 ±0,02	5,90 ±1,46	0,97 ±0,13	2,03 ±0,14	0,40 ±0,03
Dulaglutide	>100	0,035 ±0,002	>100	0,13 ±0,03	>100	0,18 ±0,01

Các giá trị thể hiện giá trị trung bình ±SEM từ 3-8 thí nghiệm.

Ví dụ 9: Hiệu lực tại các GPCR liên quan khác

Hiệu lực của hợp chất 2 được đánh giá trong các xét nghiệm sử dụng các tế bào biểu hiện một số GPCR loại B. Hợp chất 2 đã được thử nghiệm trong một bộ gồm sáu xét nghiệm cAMP trong ống nghiệm sử dụng các tế bào biểu hiện CALCR, PTHR1, PTHR2, CRHR1, CRHR2 và VIPR1. Các xét nghiệm được thực hiện theo quy trình vận hành tiêu chuẩn của nhà cung cấp, có đối chứng dương cho từng thụ thể được thử nghiệm.

Ngoài ra, hợp chất 2 đã được thử nghiệm trong dòng tế bào ổn định biểu hiện thụ thể GIP người. Các tế bào được gieo mầm vào các đĩa 384 giếng và được xử lý 24 giờ sau đó với các hợp chất trong 5 phút ở nhiệt độ phòng. Nồng độ cAMP được đo bằng kit CisBio HTRF cAMP và kết quả được phân tích bằng GraphPad Prism. Dữ liệu được trình bày trong Bảng 11-12.

Bảng 11: Tổng hợp hiệu lực của hợp chất 2 trong xét nghiệm cAMP.

Hợp chất	Đích	RC ₅₀ (μM)	Dốc	Đáy đường cong	Đỉnh đường cong	Đáp ứng tối đa
Calcitonin	CALCR	0,0007764259	1,5254	-6,2187	105	101,04
PTH(1-34)	PTHR1	0,001080165	1,8672	-5,9767	101	93,574
Sauvagine	CRHR1	0,0003082264	1,8133	-3,2011	102,19	106,16
Sauvagine	CRHR2	0,003395158	1,3095	-1,175	102,76	107,04
TIP-39	PTHR2	0,0003934505	1,1032	-3,7746	100,33	100,71
VIP	VIPR1	0,0003567715	1,9827	-0,96244	105	104,01
Hợp chất 2	CALCR	>0,1				0,070838
Hợp chất 2	CRHR1	>0,1				1,5625
Hợp chất 2	CRHR2	>0,1				0,928
Hợp chất 2	PTHR1	>0,1				0,86197
Hợp chất 2	PTHR2	>0,1				2,2789
Hợp chất 2	VIPR1	>0,1				0,60373

Bảng 12: Hiệu lực của hợp chất 2 trong xét nghiệm thụ thể GIP người

	xét nghiệm 1		xét nghiệm 2	
	EC ₅₀ (nM)	R bình phương	EC ₅₀ (nM)	R bình phương
GIP	2,31	1,00	1,28	0,99
Hợp chất 2	≥100	≥100	≥100	≥100
Oxyntomodulin	≥100	≥100	≥100	≥100

Ví dụ 10: Nghiên cứu *trong cơ thể sống*: hiệu quả đơn liều ở chuột DIO

Lượng thu nạp thức ăn, cân nặng cơ thể, độ dung nạp glucoza và nồng độ FGF21 trong huyết tương được đánh giá ở chuột DIO sau đơn liều hợp chất 2, hoặc chất chủ vận GLP1R, dulaglutide. Một ngày trước khi cho liều, các con vật được cân và lập nhóm theo cân nặng (BW). Chuột được cho liều theo chỉ định bằng cách tiêm dưới da. Sáng hôm sau, thức ăn được lấy đi và 6 giờ nhịn đói bắt đầu. BW và trọng lượng thực phẩm (FW) đã được ghi lại. Glucoza trong máu khi đói được đo và máu được thu thập để đo insulin lúc 12 giờ trưa. Một giờ sau, chuột được tiêm glucoza (1 g/kg, glucoza 20%, 5 ml/kg) trong màng bụng. Thêm 20 μL máu được thu thập ở đuôi sau 10 phút để đo insulin trong huyết tương. Nồng độ glucoza trong máu được đo bằng máy đo đường huyết ở 10, 30, 60 và 90 phút sau khi thử nghiệm glucoza. Chuột sau đó được trợ tử bằng CO₂ và các mẫu máu cuối được thu thập bằng cách chọc thủng tim. Dữ liệu được trình bày trong Bảng 13-19.

Bảng 13: Tác dụng của hợp chất 2 và dulaglutide đối với lượng thu nạp thức ăn (gram) ở chuột DIO trong 18 giờ sau khi điều trị

Điều trị	24 giờ trước khi cho liều	18 giờ sau khi cho liều
Chất mang	3,1±0,1	2,9±0,1
Dulaglutide (0,3 nmol/kg)	3,1±0,1	1,5±0,1* [^]
Hợp chất 2 (1,0 nmol/kg)	3,2±0,1	2,5±0,1* [^] #
Hợp chất 2 (2,0 nmol/kg)	3,4±0,1	2,2±0,1* [^] #
Hợp chất 2 (4,0 nmol/kg)	3,2±0,1	1,7±0,1* [^]
Hợp chất 2 (8,0 nmol/kg)	3,4±0,1	1,4±0,2* [^]

*p<0,01, so với chất mang (18 giờ sau khi cho liều); ^p<0,001, so với 24 giờ trước khi cho liều tương ứng;
#p<0,0001, so với dulaglutide (0,3 nmol/kg) 18 giờ sau khi cho liều

Phân tích ANOVA hai yếu tố, kiểm định so sánh nhiều cặp Sidak

Các giá trị thể hiện giá trị trung bình ±SEM cho dữ liệu từ 8 con vật theo từng thời điểm cho mỗi nhóm, ngoại trừ chất mang 24 giờ trước khi cho liều (n=7)

Bảng 14: Tác dụng của hợp chất 2 và dulaglutide đối với phần trăm thay đổi cân nặng cơ thể ở chuột DIO 18 giờ sau khi điều trị

Điều trị	Thay đổi cân nặng (%)
Chất mang	-0,7±0,3
Dulaglutide (0,3 nmol/kg)	-4,1±0,3*
Hợp chất 2 (1,0 nmol/kg)	-1,9±0,3* [^]
Hợp chất 2 (2,0 nmol/kg)	-2,8±0,4* [^]
Hợp chất 2 (4,0 nmol/kg)	-4,4±0,3*
Hợp chất 2 (8,0 nmol/kg)	-5,2±0,3* [^]

*p<0,01, so với chất mang; ^p<0,05, so với dulaglutide (0,3 nmol/kg)

Phân tích ANOVA RM hai yếu tố, kiểm định so sánh nhiều cặp Tukey. Dữ liệu chỉ trình bày cho thời điểm 18 giờ

Phần trăm cân nặng cơ thể được tính so với cân nặng cơ thể vào ngày 0 (trước khi cho liều)

Các giá trị thể hiện giá trị trung bình ±SEM cho dữ liệu từ 8 con vật cho mỗi nhóm

Bảng 15: Tác dụng của hợp chất 2 và dulaglutide đối với lượng glucoza trong máu (mg/dL) ở chuột DIO trong IPGTT 24 giờ sau khi điều trị

Điều trị	Thời gian (phút)				
	0	10	30	60	90
Chất mang	215±9	353±20	436±19	424±25	391±25
Dulaglutide (0,3 nmol/kg)	140±7	264±18	267±22	228±12	193±9
Hợp chất 2 (1,0 nmol/kg)	169±6	349±17	411±30	411±19	384±18
Hợp chất 2 (2,0 nmol/kg)	138±11	288±19	349±27	303±29	229±20
Hợp chất 2 (4,0 nmol/kg)	114±8	235±23	237±34	239±30	195±25
Hợp chất 2 (8,0 nmol/kg)	96±7	206±13	168±22	166±19	131±12

Các giá trị thể hiện giá trị trung bình ±SEM cho dữ liệu từ 8 con vật theo từng thời điểm cho mỗi nhóm

Bảng 16: AUC của lượng glucoza thực trong máu trong IPGTT ở chuột DIO 24 giờ sau khi điều trị

Điều trị	AUC của lượng glucoza thực trong máu
Chất mang	16539±1400
dulaglutide (0,3 nmol/kg)	8471±1204*
Hợp chất 2 (1,0 nmol/kg)	19214±1596^
Hợp chất 2 (2,0 nmol/kg)	13805±1840
Hợp chất 2 (4,0 nmol/kg)	9827±1046*
Hợp chất 2 (8,0 nmol/kg)	6035±742*

*p<0,05, so với chất mang; ^p<0,05, so với dulaglutide (0,3 nmol/kg) và JNJ-64151789 (4,0 và 8,0 nmol/kg)

Phân tích ANOVA một yếu tố, kiểm định so sánh nhiều cặp Tukey

Các giá trị thể hiện giá trị trung bình ±SEM cho dữ liệu từ 8 con vật cho mỗi nhóm

Bảng 17: Tác dụng của hợp chất 2 và dulaglutide đối với lượng glucoza (mg/dL) khi nhịn đói 6 giờ ở chuột DIO, 24 giờ sau khi điều trị

Điều trị	Glucoza trong máu (mg/dL)
Chất mang	215±9
Dulaglutide (0,3 nmol/kg)	140±7*
Hợp chất 2 (1,0 nmol/kg)	169±6*
Hợp chất 2 (2,0 nmol/kg)	138±11*
Hợp chất 2 (4,0 nmol/kg)	114±8*
Hợp chất 2 (8,0 nmol/kg)	96±7*^

*p<0,05, so với chất mang; ^p<0,05, so với dulaglutide (0,3 nmol/kg)

Phân tích ANOVA một yếu tố, kiểm định so sánh nhiều cặp Tukey

Các giá trị thể hiện giá trị trung bình ±SEM cho dữ liệu từ 8 con vật cho mỗi nhóm

Bảng 18: Tác dụng của hợp chất 2 và dulaglutide đối với nồng độ insulin trong huyết tương (ng/dL) ở chuột DIO trước thử nghiệm glucoza (24 giờ sau khi điều trị) và 10 phút sau thử nghiệm glucoza trong quá trình IPGTT

Điều trị	Insulin trong huyết tương (ng/mL)	
	Trước thử nghiệm glucoza	10 phút sau thử nghiệm glucoza
Chất mang	2,7±0,4	2,0±0,3
Dulaglutide (0,3 nmol/kg)	1,6±0,2	1,7±0,2
Hợp chất 2 (1,0 nmol/kg)	2,8±0,4	1,8±0,2
Hợp chất 2 (2,0 nmol/kg)	2,3±0,5	2,9±0,4
Hợp chất 2 (4,0 nmol/kg)	2,1±0,2	2,5±0,5
Hợp chất 2 (8,0 nmol/kg)	1,5±0,4	2,7±0,3

Các giá trị thể hiện giá trị trung bình ±SEM cho dữ liệu từ 8 con vật cho mỗi nhóm

Bảng 19: Tác dụng của hợp chất 2 và dulaglutide đối với FGF21 trong huyết tương (ng/dL) ở chuột DIO 26 giờ sau khi điều trị

Điều trị	FGF21 trong huyết tương (ng/mL)
Chất mang	0,4±0,1
Dulaglutide (0,3 nmol/kg)	0,8±0,2
Hợp chất 2 (1,0 nmol/kg)	0,7±0,1
Hợp chất 2 (2,0 nmol/kg)	1,5±0,3
Hợp chất 2 (4,0 nmol/kg)	2,1±0,4 [^]
Hợp chất 2 (8,0 nmol/kg)	3,5±0,3*

*p<0,0001, so với tất cả các nhóm; [^]p<0,05, so với tất cả các nhóm trừ hợp chất 2 (2,0 nmol/kg)

Phân tích ANOVA một yếu tố, kiểm định so sánh nhiều cặp Tukey

Các giá trị thể hiện giá trị trung bình ±SEM cho dữ liệu từ 8 con vật cho mỗi nhóm

Ví dụ 11: Nghiên cứu *trong cơ thể sống*: Cho liệu lặp lại ở chuột DIO

Tác dụng của chất chủ vận kép GLP1R/GCGR, hợp chất 2 và chất chủ vận GLP1R, dulaglutide ở chuột DIO được theo dõi trong thời gian cho liệu lặp lại trong 9 ngày. Để kiểm soát tần suất cho liệu, tất cả động vật được cho liệu mỗi ngày một lần. Tần suất cho liệu được xác định dựa trên dữ liệu PK của chuột DIO cho hợp chất 2 và dulaglutide. Động vật trong nhóm dulaglutide nhận được thuốc này mỗi ngày một lần. Các động vật được điều trị bằng chất mang nhận được chất mang mỗi ngày một lần. Những động vật được cho dùng hợp chất 2 ở mức 1,0, 2,0 hoặc 4,0 nmol/kg được cho dùng hợp chất ba ngày một lần và nhận chất mang vào những ngày mà chúng không được tiêm hợp chất. Trong ngày trước khi bắt đầu cho liệu, các con vật được cân và lập nhóm theo cân nặng. Tất cả chuột được cho liệu theo chỉ định bằng cách tiêm dưới da trong khoảng 1-3 giờ chiều. Lượng thu nạp thức ăn và cân nặng cơ thể được theo dõi hàng ngày từ 1-3 giờ chiều trong các nhóm điều trị này.

Bắt đầu 24 giờ sau liệu đầu tiên, ba nhóm chuột được cho ăn theo cặp (PF), đó là các con chuột được điều trị bằng hợp chất 2 với liều 1,0, 2,0 hoặc 4,0 nmol/kg. Lượng thức ăn trong phễu của những con chuột được cho ăn theo cặp được điều chỉnh để phù hợp với lượng thức ăn trung bình được tiêu thụ trong 24 giờ trước bởi những con chuột trong nhóm điều trị hợp chất mà chúng được ghép. Tất cả các nhóm PF được cho liệu chất mang mỗi ngày một lần. Vào ngày thứ chín (hoặc ngày 10 đối với các nhóm được cho ăn theo cặp), chuột được cho nhịn ăn trong 6 giờ và được đo cân nặng cơ thể và glucoza khi đói. Máu được thu thập để đo insulin, FGF21 và lipit trong huyết tương. Dữ liệu lượng thu nạp thức ăn, cân nặng cơ thể, thành phần cơ thể, glucoza lúc

đôi, insulin lúc đói, FGF21 lúc đói và lipit trong huyết tương lúc đói được trình bày trong bảng 20-26.

Bảng 20: Tác dụng của hợp chất 2 và dulaglutide đối với lượng thu nạp thức ăn (gram) hàng ngày ở chuột DIO trong 9 ngày điều trị

	Thời gian (ngày)									
Điều trị	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Chất mang	2,7±0,1	2,9±0,0	3,1± 0,1	2,9±0,1	2,9±0,1	3,0±0,1	2,9±0,1	3,0±0,1	3,0± 0,1	2,9± 0,1
Dulaglutide (0,3 nmol/kg)	3,1±0,2	1,5±0,2*	1,3± 0,2*	1,7±0,3*	1,9±0,2*	2,1±0,2*	2,2±0,2*	2,3±0,2	2,9± 0,4	2,5± 0,2
Hợp chất 2 (1,0 nmol/kg)	3,1±0,1	2,3±0,1*#	2,5± 0,1*#	2,6±0,2	2,4±0,1#	2,7±0,2#	2,6±0,1#	2,9±0,2#	2,8± 0,1#	2,7± 0,1
Hợp chất 2 (2,0 nmol/kg)	3,1±0,1	2,0±0,1*	2,0± 0,1*^	2,7±0,1^	2,5±0, 2^	2,3±0,1	2,5±0,2	2,7±0,1	2,8± 0,3	2,7± 0,1
Hợp chất 2 (4,0 nmol/kg)	2,9±0,2	1,5±0,1*	1,5± 0,2*	2,1±0,2*	1,7±0,1*	1,6±0,1*	1,6±0,1*	1,8±0,2*	2,2± 0,3*^	2,1± 0,1*

*p<0,05, so với chất mang; ^p<0,05, so với dulaglutide (0,3 nmol/kg); #p<0,05, so với hợp chất 2 (4,0 nmol/kg)

Phân tích ANOVA RM hai yếu tố, kiểm định so sánh nhiều cặp Tukey

Tất cả các nhóm PF được nhận lượng thu nạp thức ăn trung bình (dữ liệu không được trình bày) của các nhóm được điều trị tương ứng.

Các giá trị thể hiện giá trị trung bình ±SEM cho dữ liệu từ 6-10 con vật theo thời điểm cho mỗi nhóm

Bảng 21: Tác dụng của hợp chất 2 và dulaglutide đối với phần trăm thay đổi cân nặng cơ thể ở chuột DIO trong 9 ngày điều trị

	Thời gian (ngày)									
T	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
V	0,0	-0,1±0,2	-0,1±0,2*	-0,2±0,2*	-0,7±0,3*	-0,5±0,3*	0,2±0,5*	0,1±0,6*	0,0±0,5*	-1,7±0,6*
1	0,0	-3,7±0,3	-6,2±0,6	-7,8±0,8	-9,2±0,8	-10,1±0,8	-10,2±0,8	-10,7±1,0	-11,1±0,9	-13,1±1,1
2	0,0	-1,9±0,4	-2,9±0,5^	-3,2±0,4^	-4,4±0,7 ^&	-4,7±0,8^&	-4,5±0,8^&	-5,3±1,0^&	-5,2±1,1^&	-6,6±1,1^&
3	0,0	-1,6±0,3	-2,7±0,4^	-3,5±0,4^	-3,8±0,3^	-3,8±0,4^	-3,9±0,5^	-3,5±0,5^	-3,4±0,5^	-4,5±0,5^
4	0,0	-2,8±0,4	-4,7±0,5	-4,9±0,6^	-7,1±0,7	-8,0±0,8	-8,0±0,8	-9,1±0,8#	-10,0±0,9#	-11,5±0,9#
5	0,0	-3,0±0,4	-4,5±0,4	-5,1±0,5^	-5,3±0,5^	-5,8±0,5^	-6,1±0,5^	-5,8±0,5^	-6,2±0,4^	-6,9±0,4^
6	0,0	-3,7±0,3	-6,8±0,3	-8,8±0,5\$	-11,6±0,6#\$	-14,2±0,7^#\$	-15,6±0,9^#\$	-18,4±1,2^#\$	-20,4±1,5^#\$	-21,9±1,6^#\$
7	0,0	-3,6±0,1	-5,6±0,1	-6,9±0,1	-7,9±0,2	-9,1±0,2	-10,5±0,3	-11,4±0,3	-12,3±0,3	-13,3±0,3

T: điều trị; V: chất mang; 1: dulaglutide (0,3 nmol/kg); 2-3: hợp chất 2 (1,0 nmol/kg); 4-5: hợp chất 2 (2,0 nmol/kg); 6-7: hợp chất 2 (4,0 nmol/kg)

*p<0,01, so với tất cả điều trị khác; ^p<0,05, so với dulaglutide (0,3 nmol/kg); #p<0,05, so với nhóm PF tương ứng; \$p<0,05, so với JNJ-64151789 (1,0 và 2,0 nmol/kg); &p<0,05, so với JNJ-64151789 (2,0 nmol/kg);

Phân tích ANOVA RM hai yếu tố, kiểm định so sánh nhiều cặp Tukey.

% thay đổi cân nặng được tính so với cân nặng cơ thể vào ngày 0 (trước khi cho liều)

Các giá trị thể hiện giá trị trung bình ±SEM cho dữ liệu từ 10 con vật theo từng thời điểm cho mỗi nhóm

Bảng 22: Tác dụng của hợp chất 2 và dulaglutide đối với thành phần cơ thể (khối lượng và phần trăm cân nặng cơ thể) ở chuột DIO sau khi cho điều lặp lại

	Thời gian (ngày)			
	Khối lượng (g)		% cân nặng cơ thể	
Điều trị	Nạc	Mỡ	Nạc	Mỡ
Chất mang	24,0±0,2	10,6±0,5	57,5±0,8	25,4±0,8
Dulaglutide (0,3 nmol/kg)	22,1±0,3*	7,6±1,1	61,0±1,7	22,8±1,2
Hợp chất 2 (1,0 nmol/kg)	23,1±0,5	9,5±1,3	57,4±2,5	23,1±2,5
Hợp chất 2 (1,0 nmol/kg) PF	23,9±0,3	10,6±0,3	57,7±0,7	25,5±0,5
Hợp chất 2 (2,0 nmol/kg)	22,2±0,4*	8,2±0,7	59,7±1,1	22,0±1,6
Hợp chất 2 (2,0 nmol/kg) PF	23,4±0,1	9,8±0,4	58,5±0,8	24,4±0,8
Hợp chất 2 (4,0 nmol/kg)	20,9±0,3*	7,4±0,7	61,9±2,4	21,6±1,1
Hợp chất 2 (4,0 nmol/kg) PF	21,4±0,6	9,3±0,5	56,8±1,4	24,7±1,0

*p<0,05, so với chất mang

Phân tích ANOVA một yếu tố, kiểm định so sánh nhiều cặp Tukey

Các giá trị thể hiện giá trị trung bình ±SEM cho dữ liệu từ 5 con vật cho mỗi nhóm

Bảng 23: Tác dụng của hợp chất 2 và dulaglutide đối với lượng glucoza (mg/dL) khi nhện đói 6 giờ ở chuột DIO, sau khi cho điều lặp lại

Điều trị	Glucoza trong máu (mg/dL)
Chất mang	170±5
Dulaglutide (0,3 nmol/kg)	123±5*
Hợp chất 2 (1,0 nmol/kg)	164±5^
Hợp chất 2 (1,0 nmol/kg) PF	168±7^
Hợp chất 2 (2,0 nmol/kg)	140±7*
Hợp chất 2 (2,0 nmol/kg) PF	155±6^
Hợp chất 2 (4,0 nmol/kg)	98±4*#
Hợp chất 2 (4,0 nmol/kg) PF	133±6*

*p<0,05, so với chất mang; ^p<0,05, so với dulaglutide (0,3 nmol/kg); #p<0,05, so với JNJ-64151789 (4,0 nmol/kg) PF

Phân tích ANOVA một yếu tố, kiểm định so sánh nhiều cặp Tukey

Các giá trị thể hiện giá trị trung bình ±SEM cho dữ liệu từ 10 con vật mỗi nhóm

Bảng 24: Tác dụng của hợp chất 2 và dulaglutide đối với lượng insulin trong huyết tương (ng/mL) khi nhện đói 6 giờ ở chuột DIO sau khi cho điều lặp lại

Điều trị	Insulin trong huyết tương (ng/mL)
Chất mang	3,0±0,4
Dulaglutide (0,3 nmol/kg)	1,4±0,2*
Hợp chất 2 (1,0 nmol/kg)	2,0±0,3
Hợp chất 2 (1,0 nmol/kg) PF	2,0±0,1*

Hợp chất 2 (2,0 nmol/kg)	1,1±0,1*^
Hợp chất 2 (2,0 nmol/kg) PF	2,3±0,3
Hợp chất 2 (4,0 nmol/kg)	0,5±0,1*
Hợp chất 2 (4,0 nmol/kg) PF	1,2±0,1*

*p<0,05, so với chất mang; ^p<0,05, so với hợp chất 2 (2,0 nmol/kg) PF

Phân tích ANOVA một yếu tố, kiểm định so sánh nhiều cặp Tukey

Các giá trị thể hiện giá trị trung bình ±SEM cho dữ liệu từ 10 con vật mỗi nhóm

Bảng 25: Tác dụng của hợp chất 2 và dulaglutide đối với lượng FGF21 trong huyết tương (ng/mL) khi nhịn đói 6 giờ ở chuột DIO sau khi cho liệu lặp lại

Điều trị	FGF21 (ng/mL)
Chất mang	0,7±0,1
Dulaglutide (0,3 nmol/kg)	0,5±0,1
Hợp chất 2 (1,0 nmol/kg)	0,7±0,2
Hợp chất 2 (1,0 nmol/kg) PF	0,4±0,1
Hợp chất 2 (2,0 nmol/kg)	0,6±0,1
Hợp chất 2 (2,0 nmol/kg) PF	0,2±0,1
Hợp chất 2 (4,0 nmol/kg)	1,5±0,3*^
Hợp chất 2 (4,0 nmol/kg) PF	0,3±0,1

*p<0,05, so với tất cả các nhóm; ^p<0,05, so với hợp chất 2 (4,0 nmol/kg) PF

Phân tích ANOVA một yếu tố, kiểm định so sánh nhiều cặp Tukey

Các giá trị thể hiện giá trị trung bình ±SEM cho dữ liệu từ 10 con vật mỗi nhóm, trừ hợp chất 2 (1,0 nmol/kg) và hợp chất 2 (4,0 nmol/kg) PF trong đó N=9

Bảng 26: Tác dụng của hợp chất 2 và dulaglutide đối với lipid trong huyết tương ở chuột DIO sau khi cho liệu lặp lại

Điều trị	Thời gian (ngày)			
	Axit béo tự do (μmol/L)	Glycerol tự do (mmol/L)	Tri-glycerit (mg/dL)	Cholesterol tổng (mg/dL)
Chất mang	66,2±3,9	0,6±0,0	30,1±2,8	142,1±5,2
Dulaglutide (0,3 nmol/kg)	73,2±12,0	0,5±0,1	24,1±2,3	146,1±3,3
Hợp chất 2 (1,0 nmol/kg)	71,8±5,4	0,5±0,0*	32,5±4,5	149,1±2,3
Hợp chất 2 (1,0 nmol/kg) PF	58,8±6,1	0,6±0,1	33,7±4,1	161,4±2,0
Hợp chất 2 (2,0 nmol/kg)	73,8±4,6	0,5±0,0*	30,4±3,4	128,0±6,6#
Hợp chất 2 (2,0 nmol/kg) PF	84,8±25,3	0,6±0,0*	34,5±3,3	149,9±4,4
Hợp chất 2 (4,0 nmol/kg)	71,2±6,4	0,4±0,0*	16,1±2,0\$	85,7±4,9^
Hợp chất 2 (4,0 nmol/kg) PF	102,6±14,5	0,7±0,0	31,8±1,1	137,8±5,7

*p<0,05, so với hợp chất 2 (4,0 nmol/kg) PF; ^p<0,05, so với tất cả các nhóm khác; #p<0,05, so với hợp chất 2 (1,0 nmol/kg) và hợp chất 2 (2,0 nmol/kg) PF; \$p<0,05, so với tất cả các nhóm trừ dulaglutide (0,3 nmol/kg)

Phân tích ANOVA một yếu tố, kiểm định so sánh nhiều cặp Tukey

Các giá trị thể hiện giá trị trung bình $\pm$ SEM cho dữ liệu từ 10 con vật mỗi nhóm đối với axit béo tự do, 8-10 con vật mỗi nhóm đối với glyxerol tự do, 9-10 con vật mỗi nhóm đối với triglyxerit và cholesterol tổng

Ví dụ 12: Nghiên cứu *trong cơ thể sống*: hiệu quả đơn liều ở khỉ đuôi dài

Khỉ đuôi dài chưa được điều trị bằng thuốc sinh học được theo dõi hàng ngày về lượng thu nạp thức ăn trong ba tuần trước khi điều trị. Khi bắt đầu điều trị, động vật được đặt trong bốn nhóm để đạt được trọng lượng cơ thể trung bình tương tự ($n = 8-9$, trọng lượng cơ thể trung bình 7,4-7,9 kg, cho mỗi nhóm). Động vật trong mỗi nhóm nhận được liều đơn tiêm dưới da tương ứng với 1, 3, 5 hoặc 7,5 nmol/kg hợp chất 2. Lượng thực phẩm tiêu thụ được theo dõi hàng ngày thêm 14 ngày nữa. Cân nặng cơ thể được đo vào ngày cho liều và 4, 7, 10, 14 và 21 ngày sau khi cho liều. Sự thay đổi tỷ lệ phần trăm trong lượng thu nạp thức ăn được xác định hàng ngày bằng cách so sánh lượng thu nạp thức ăn trong ngày đó với lượng thu nạp thức ăn hàng ngày trung bình trong bảy ngày trước khi dùng thuốc. Các kết quả được trình bày trong Hình 14 và 15.

Ví dụ 13: Dược động học (PK), phân tích dược động học (PK)/dược lực học (PD)

PK ở chuột nhắt DIO

Sự thay đổi hoạt tính theo thời gian của hợp chất 2 được đánh giá ở chuột DIO (Bảng 27). Động vật ($n=3$ /thời điểm) được cho liều 10 nmol/kg dưới da.

Bảng 27: Sự thay đổi phơi nhiễm theo thời gian đối với hợp chất 2 trong huyết tương được đánh giá bằng xét nghiệm sinh học và xét nghiệm miễn dịch

Thời gian (giờ)	Phơi nhiễm trong huyết tương (nM)	
	Xét nghiệm sinh học	Xét nghiệm miễn dịch
0	N/A	N/A
7	6,9 $\pm$ 2,0	16,7 $\pm$ 6,7
24	32,6 $\pm$ 3,5	71,0 $\pm$ 8,9
48	55,5 $\pm$ 2,4	111,9 $\pm$ 16,4
72	45,3 $\pm$ 4,0	95,7 $\pm$ 9,7
96	42,3 $\pm$ 14,5	86,8 $\pm$ 6,8
120	26,5 $\pm$ 6,9	58,1 $\pm$ 14,2

Các giá trị thể hiện giá trị trung bình $\pm$ SEM cho dữ liệu từ 3 con vật theo thời điểm cho mỗi nhóm

PK ở chuột

Các thông số dược động học của hợp chất 2 được đánh giá ở chuột Sprague-Dawley. Để xác định các thông số dược động học (Bảng 28), phơi nhiễm được xác định bằng xét nghiệm sinh học được sử dụng từ các mẫu được thu thập ở các thời điểm 0, 24, 48, 72, 144, 216, 312, 408 và 504 giờ sau khi cho liều.

Bảng 28: Các thông số dược động học của hợp chất 2 ở chuột Sprague-Dawley

Thông số	Dưới da	Tĩnh mạch
$C_{\max}$ (nM)	5,7±2,1	N/A
$T_{\max}$ (giờ)	64,0±13,9	N/A
$AUC_{0-\infty}$ (nM*giờ)	456±154	865±185
$t_{1/2}$ (giờ)	38,5±12,8	26,2±6,2

Dữ liệu là giá trị trung bình +/- độ lệch chuẩn, xét nghiệm sinh học phối nhiễm

PK ở khi đuôi dài

Các thông số dược động học của hợp chất 2 được đánh giá ở khi đuôi dài. Các con vật được cho liều 6,45 nmol/kg trong tĩnh mạch hoặc dưới da. Để xác định các thông số dược động học (Bảng 29), phối nhiễm được xác định bằng xét nghiệm sinh học được sử dụng từ các mẫu được thu thập ở các thời điểm 0, 1, 6, 24, 48, 72, 120, 240, 336, 432, và 528 giờ sau khi cho liều.

Bảng 29: Thông số dược động học của hợp chất 2 ở khi đuôi dài

Thông số	Dưới da	Tĩnh mạch
$C_{\max}$ (nM)	89,1±8,7	N/A
$T_{\max}$ (giờ)	56,0±13,9	N/A
$AUC_{0-\infty}$ (nM*giờ)	11.700±1380	14.700±5260
$t_{1/2}$ (giờ)	51,9±6,2	55,9±41,7

Giá trị là giá trị trung bình +/- độ lệch chuẩn

Người có trình độ bình thường trong ngành sẽ hiểu là có thể có những phương án thay đổi so với các phương án được mô tả ở phần trên mà không tách rời ý tưởng chung của sáng chế. Do đó, cần hiểu rằng sáng chế này không bị giới hạn trong các phương án cụ thể được bộc lộ, mà sáng chế dự kiến bao gồm cả các phương án cải biến nhưng vẫn thuộc ý tưởng và phạm vi của sáng chế, như được nêu trong bản mô tả này.

Tất cả các tài liệu được trích dẫn trong tài liệu này đều có trong phần tham khảo.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể đơn dòng được phân lập hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó bao gồm vùng xác định bổ sung chuỗi nặng 1 (HCDR1), HCDR2, HCDR3 và vùng xác định bổ sung chuỗi nhẹ 1 (LCDR1), LCDR2 và LCDR3, có các trình tự polypeptit có SỐ ID TRÌNH TỰ: lần lượt là 16, 17, 18, 19, 20 và 21.
2. Kháng thể đơn dòng được phân lập hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể đơn dòng được phân lập bao gồm miền biến đổi chuỗi nặng (VH) có trình tự polypeptit có SỐ ID TRÌNH TỰ: 12 và miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) có trình tự polypeptit có SỐ ID TRÌNH TỰ: 14.
3. Kháng thể đơn dòng được phân lập theo điểm 1, còn bao gồm phần Fc.
4. Kháng thể đơn dòng được phân lập theo điểm 3, bao gồm chuỗi nặng (HC) có trình tự polypeptit có SỐ ID TRÌNH TỰ: 13, và chuỗi nhẹ (LC) có trình tự polypeptit có SỐ ID TRÌNH TỰ: 15.
5. Axit nucleic được phân lập mã hóa kháng thể đơn dòng hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó theo điểm 1.
6. Vector bao gồm axit nucleic được phân lập theo điểm 5.
7. Tế bào chủ bao gồm vector theo điểm 6.
8. Phương pháp sản xuất kháng thể đơn dòng được phân lập hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó, phương pháp bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ theo điểm 7 trong các điều kiện sản xuất kháng thể đơn dòng hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó, và bước thu hồi kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó từ tế bào hoặc từ quá trình nuôi cấy.
9. Liên hợp bao gồm kháng thể đơn dòng hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó theo điểm 1 và ít nhất một phần hoạt tính được lý được tiếp hợp vào kháng thể này.
10. Dược phẩm bao gồm liên hợp theo điểm 9 và chất mang dược dụng.
11. Phương pháp sản xuất chế phẩm bao gồm liên hợp theo điểm 9, phương pháp này bao gồm kháng thể đơn dòng hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó với chất mang dược dụng để thu được chế phẩm này.
12. Liên hợp theo điểm 9, trong đó phần hoạt tính được lý là peptit điều trị.
13. Liên hợp theo điểm 12, trong đó peptit điều trị này được tiếp hợp với kháng thể đơn dòng hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó ở vị trí đơn phân cystein có SỐ ID TRÌNH TỰ:
- 18.

14. Liên hợp theo điểm 12, trong đó peptit điều trị này được tiếp hợp với kháng thể đơn dòng hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó qua cầu nối.
15. Liên hợp theo điểm 14, trong đó cầu nối bao gồm cầu nối peptit, cầu nối hydrocarbon, cầu nối polyetylen glycol (PEG), cầu nối polypropylen glycol (PPG), cầu nối polysacarit, cầu nối polyeste, hoặc cầu nối hỗn hợp bao gồm PEG và dị vòng được nhúng vào.
16. Liên hợp theo điểm 12, trong đó peptit điều trị được chọn từ nhóm bao gồm oxyntomodulin, peptit giống như glucagon 1 (GLP1), exendin (exenatide), amylin (pramlintide), hormon kích thích tế bào hắc tố alpha (MSH), sản phẩm phiên mã điều hòa bởi cocain và chất kích thích (CART), chất đối kháng thụ thể neuropeptit Y Y1 (NPY1), chất đối kháng thụ thể neuropeptit Y Y5 (NPY5), neurotensin S, neuropeptit B, neuropeptit W, ghrelin, thụ thể giống bombesin 3 (BRS3), galanin, cholecystokinin (CCK), orexin, hormon tích tụ hắc tố (MCH), oxytoxin, và stresscopin.
17. Liên hợp theo điểm 16, trong đó peptit điều trị là oxyntomodulin bao gồm trình tự polypeptit có SỐ ID TRÌNH TỰ: 24.
18. Phương pháp sản xuất liên hợp bao gồm kháng thể đơn dòng hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó và peptit điều trị, trong đó phương pháp này bao gồm bước cho phân tử ưa điện tử, được đưa vào mạch bên của peptit điều trị, phản ứng với nhóm sulfhydryl có đơn phân xystein có SỐ ID TRÌNH TỰ: 18 của kháng thể đơn dòng hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó theo điểm 1.
19. Phương pháp theo điểm 18, trong đó phân tử ưa điện tử là bromoaxetamit hoặc maleimit.
20. Phương pháp làm tăng thời gian bán thải của peptit điều trị trong đối tượng, phương pháp này bao gồm bước tiếp hợp ngoài cơ thể sống của peptit điều trị này với kháng thể đơn dòng hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó bao gồm vùng xác định bổ sung chuỗi nặng 1 (HCDR1), HCDR2, HCDR3 và vùng xác định bổ sung chuỗi nhẹ 1 (LCDR1), LCDR2 và LCDR3, có các trình tự polypeptit có SỐ ID TRÌNH TỰ: lần lượt là 16, 17, 18, 19, 20, và 21, trong đó peptit điều trị này được tiếp hợp với kháng thể đơn dòng hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó ở vị trí đơn phân Cys có SỐ ID TRÌNH TỰ: 18.
21. Phương pháp theo điểm 20, trong đó peptit điều trị được chọn từ nhóm bao gồm oxyntomodulin, peptit giống như glucagon 1 (GLP1), exendin (exenatide), amylin (pramlintide), hormon kích thích tế bào hắc tố alpha (MSH), sản phẩm phiên mã điều

hòa bởi cocain và chất kích thích (CART), chất đối kháng thụ thể neuropeptit Y Y1 (NPY1), chất đối kháng thụ thể neuropeptit Y Y5 (NPY5), neurotensin S, neuropeptit B, neuropeptit W, ghrelin, thụ thể giống bombesin 3 (BRS3), galanin, cholecystokinin (CCK), orexin, hormon tích tụ hắc tố (MCH), oxytoxin, và stresscopin.

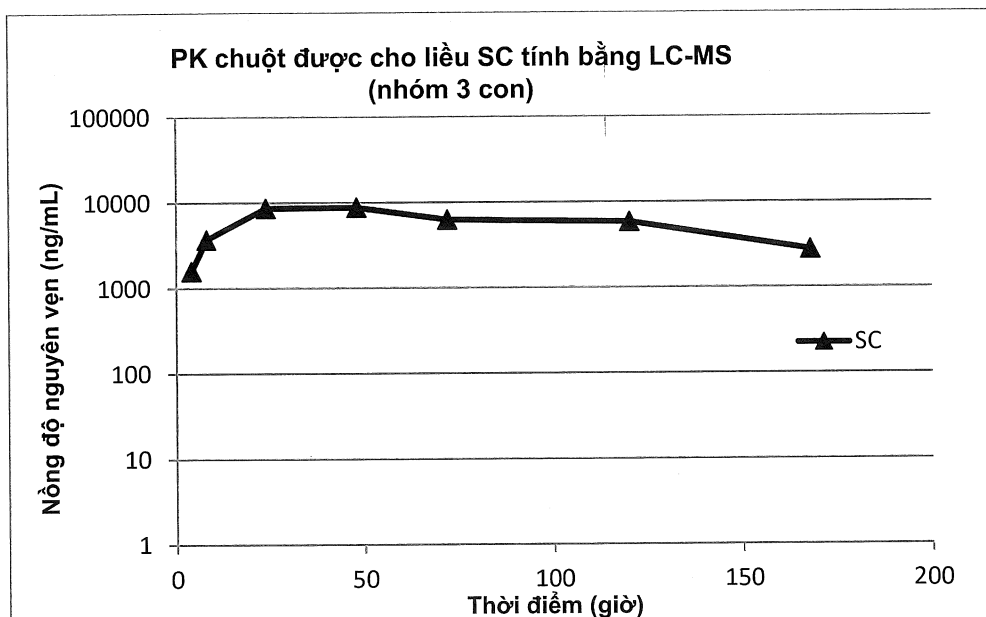
p e p t i t-NH-CH(CH₂CH₂CH₂NH-C(=O)-CH₂-X)-C(=O)NH₂

vùng v-Cys (trong CDR) – vùng v – vùng hằng định mAb

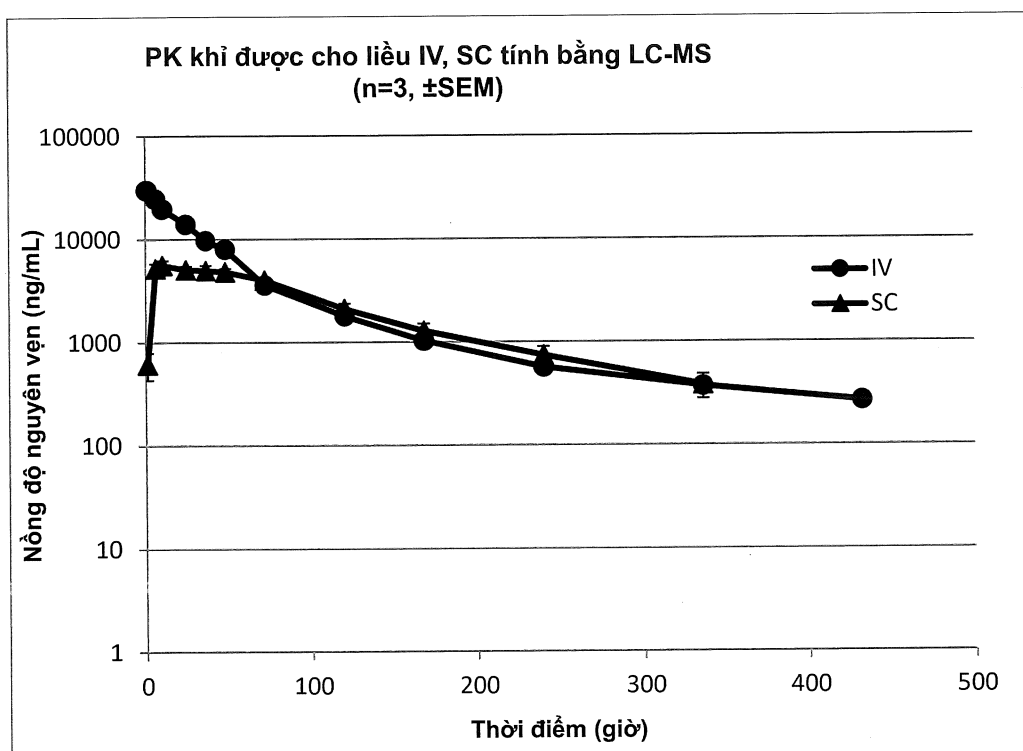
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSG
SGSGTDFLTITISLEPEDFAVYYCQQRSNWPLTFGQGTKVEIK

[illegible]

Hình 4

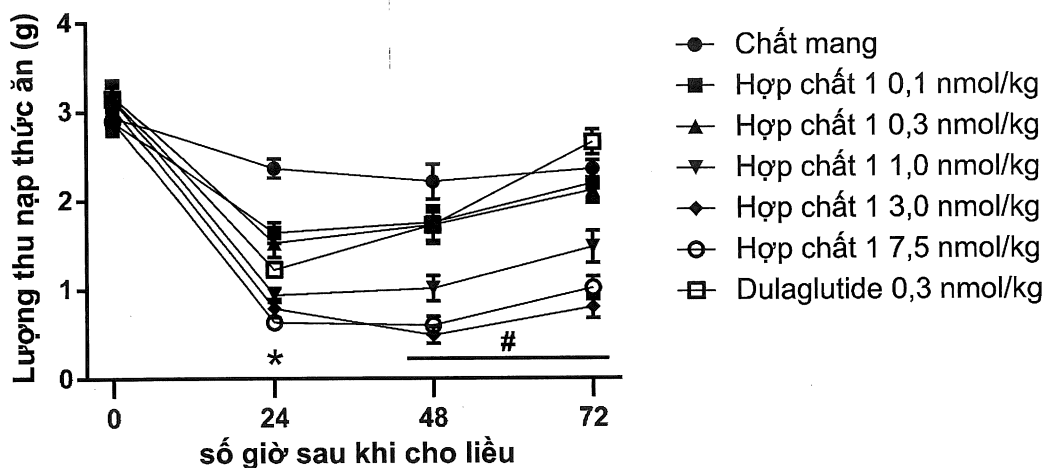


Hình 5



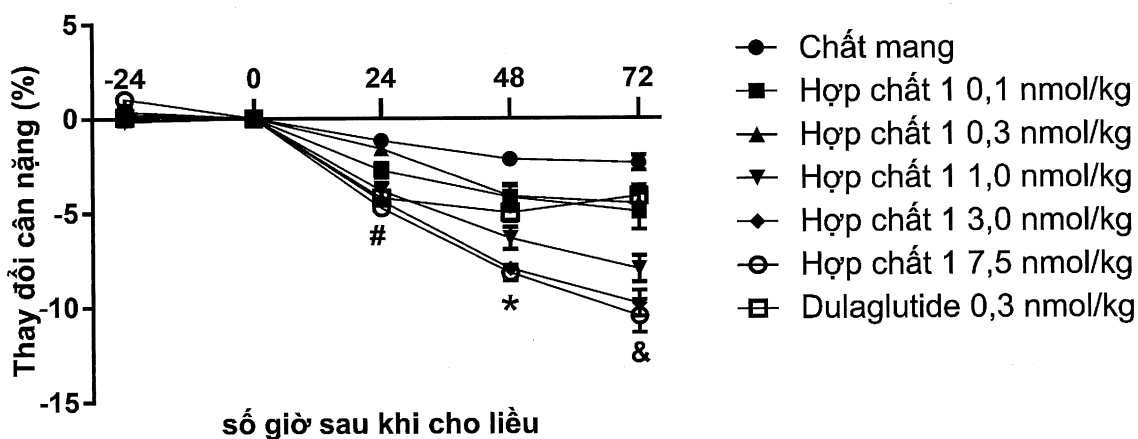
Hình 6

Lượng thu nạp thức ăn ở chuột DIO sau khi dùng hợp chất 1



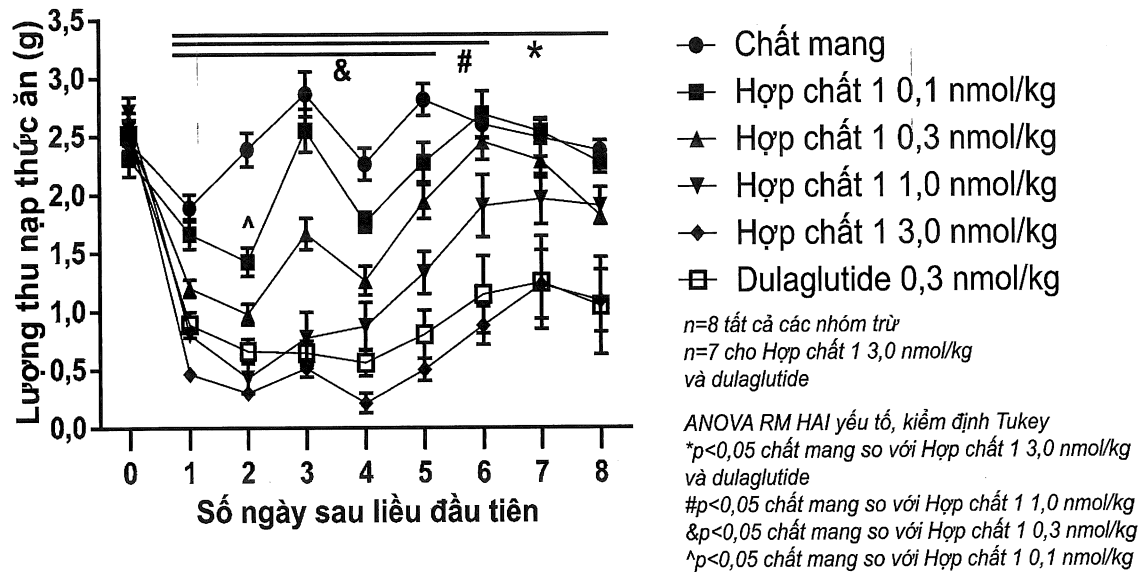
Hình 7

Thay đổi cân nặng cơ thể (BW) ở chuột DIO sau khi dùng hợp chất 1



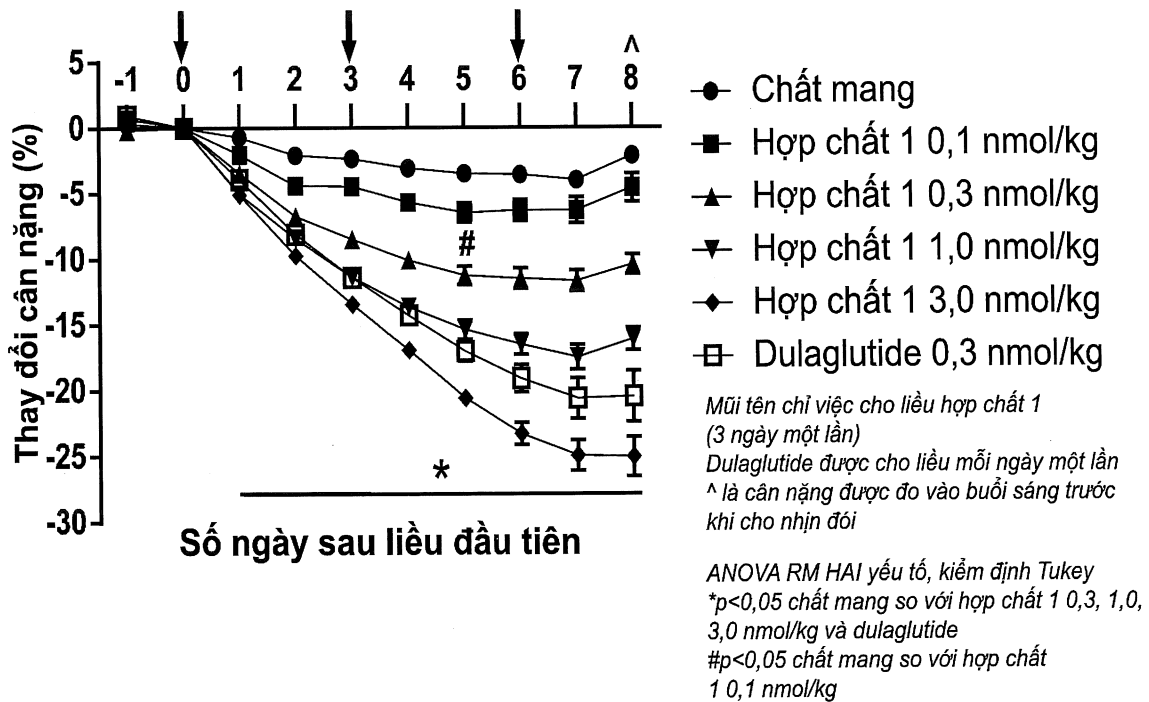
Hình 8

Lượng thu nạp thức ăn ở chuột DIO sau khi dùng hợp chất 1

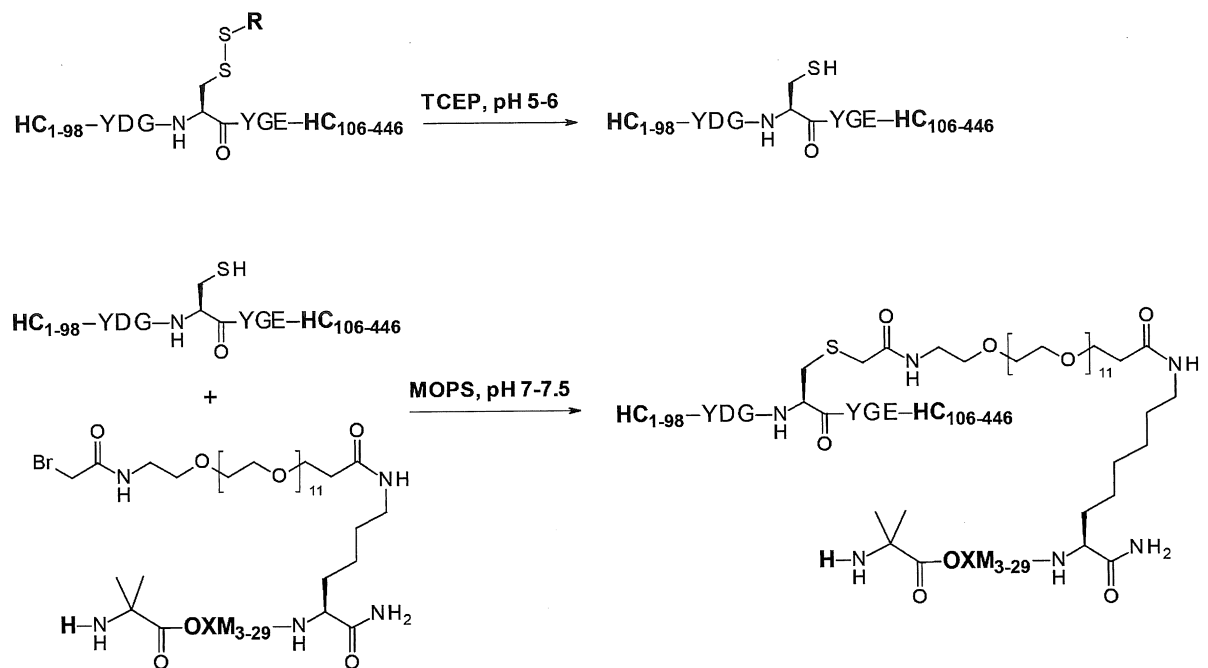


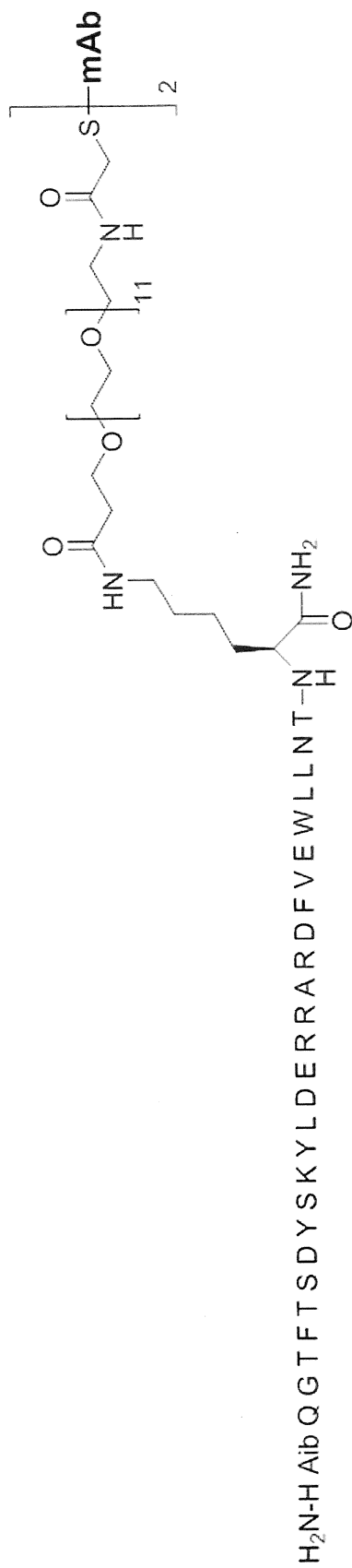
Hình 9

Thay đổi cân nặng cơ thể (BW) ở chuột DIO sau khi dùng hợp chất 1



Hình 10

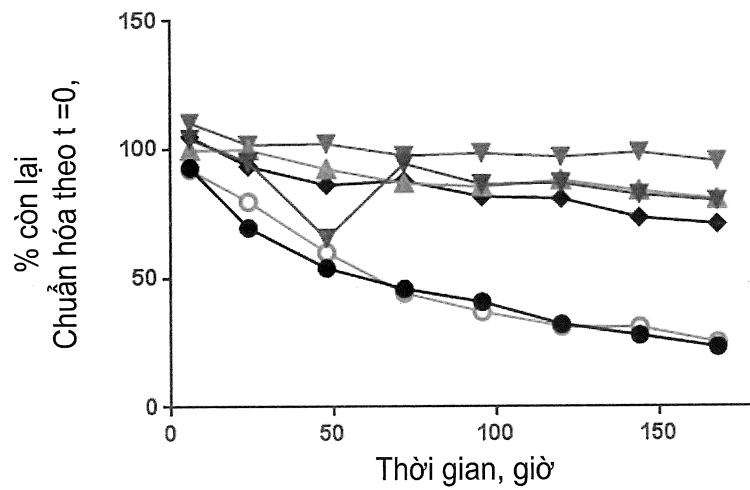




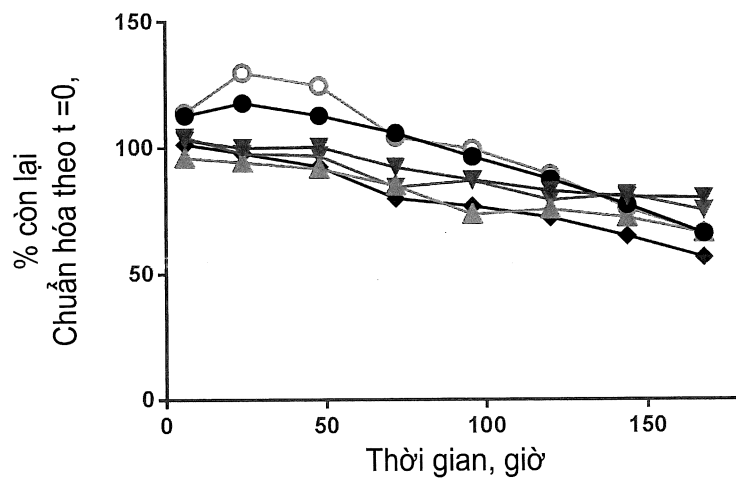
Hình 11

Hình 12

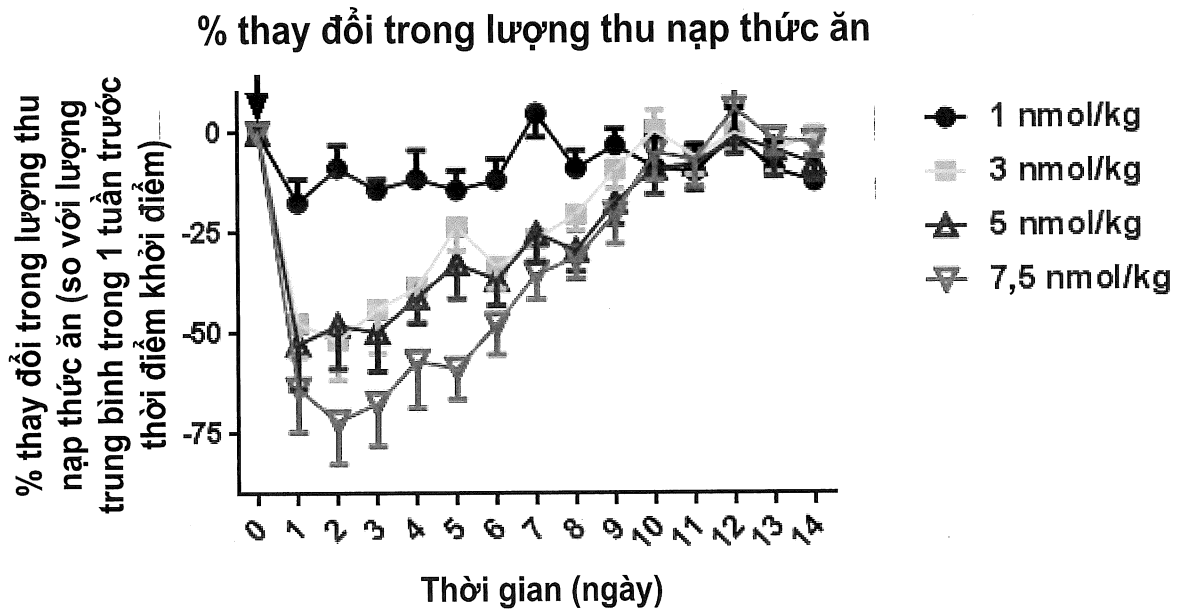
Xét nghiệm cAMP cho GLP-1R người về độ ổn định của liên hợp OXM-mAb trong huyết tương người ngoài cơ thể sống

**Hình 13**

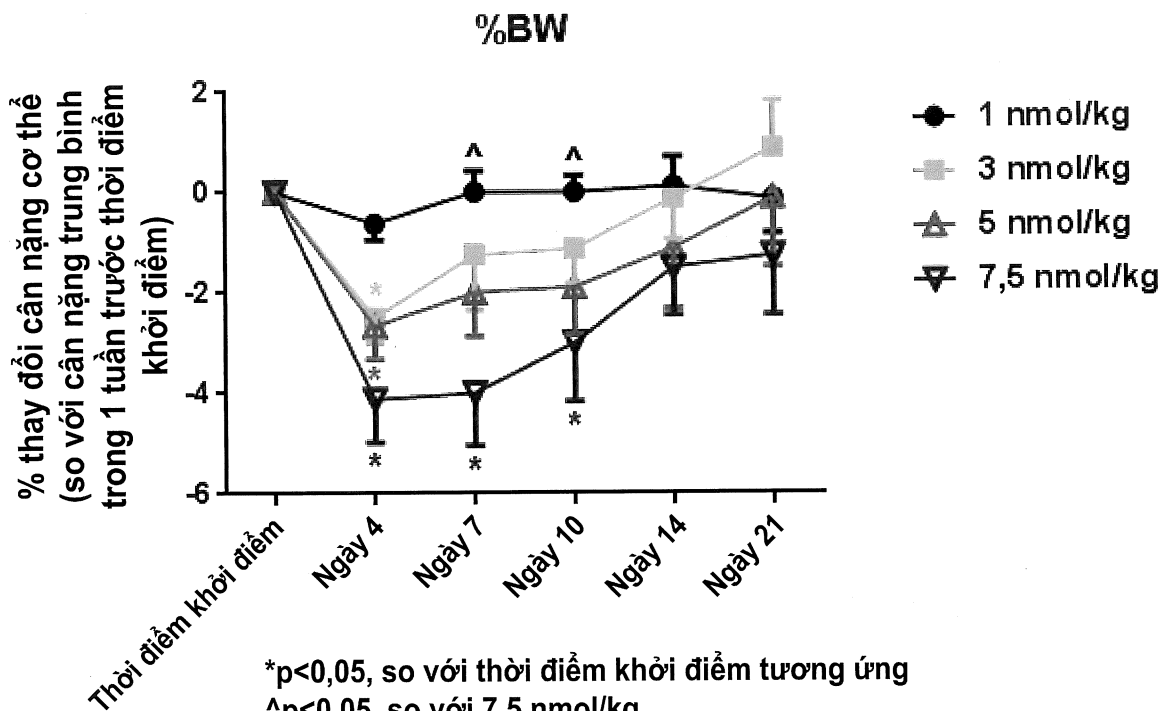
Xét nghiệm cAMP cho GLP-1R người về độ ổn định của liên hợp OXM-mAb trong huyết tương khi ngoài cơ thể sống



Hình 14



Hình 15



* $p < 0,05$, so với thời điểm khởi điểm tương ứng

^ $p < 0,05$, so với 7,5 nmol/kg

ANOVA RM HAI yếu tố, kiểm định Tukey

DANH SÁCH LIỆT KÊ TRÌNH TỰ

<110> Janssen Pharmaceutica NV

<120> KHÁNG THỂ ĐƠN DÒNG, LIÊN HỢP KHÁNG THỂ, VÀ DƯỢC PHẨM BAO GỒM LIÊN HỢP NÀY

<130> PRD3459

<150> US62/413,613

<151> 2016-10-27

<150> US62/413,586

<151> 2016-10-27

<160> 27

<170> Phiên bản sáng chế 3.5

<210> 1

<211> 34

<212> PRT

<213> Homo sapiens (Người thông minh)

<400> 1

Ile	Lys	Pro	Glu	Ala	Pro	Gly	Glu	Asp	Ala	Ser	Pro	Glu	Glu	Leu	Asn
1				5										10	15

Arg	Tyr	Tyr	Ala	Ser	Leu	Arg	His	Tyr	Leu	Asn	Leu	Val	Thr	Arg	Gln
				20						25					30

Arg Tyr

<210> 2

<211> 35

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Hợp chất 1

<220>

<221> Ala

<222> (1)..(1)

<223> Ala được biến đổi hóa học như mô tả trong bản mô tả

<220>

<221> Lys

<222> (10)..(10)

<223> Lys được biến đổi hóa học như mô tả trong bản mô tả

<220>

<221> Cys

<222> (30)..(30)

<223> Cys, trong đó Cys là homoxystein được biến đổi hóa học như mô tả trong bản mô tả

<220>

<221> Arg

<222> (34)..(34)

<223> Arg được biến đổi hóa học như mô tả trong bản mô tả

<400> 2

Ala	Ile	Lys	Pro	Glu	Ala	Pro	Gly	Glu	Lys	Ala	Ser	Pro	Glu	Glu	Leu
1			5				10						15		

Asn	Arg	Tyr	Tyr	Ala	Ser	Leu	Arg	His	Tyr	Leu	Asn	Leu	Cys	Thr	Arg
			20					25					30		

Gln	Arg	Tyr
		35

<210> 3

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens (Người thông minh)

<400> 3

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 4

<211> 119

<212> PRT

<213> Homo sapiens (Người thông minh)

<400> 4

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

```
<210>    6
<211>    115
<212>    PRT
<213>    Trình tự nhân tạo
```

<220>

<223> Chuỗi nối IGHV3-23*01 và IGHJ1*01

<400> 6

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Lys Ala Glu Tyr Phe Gln His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110

Val Ser Ser
 115

<210> 7

<211> 98

<212> PRT

<213> Homo sapiens (Người thông minh)

<400> 7

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys

<210> 8

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens (Người thông minh)

<400> 8

Ala Glu Tyr Phe Gln His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
1 5 10 15

Ser

<210> 9

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nối IGKV3-11*01 và IGKJ1*01

<400> 9

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 10

<211> 95

<212> PRT

<213> Homo sapiens (Người thông minh)

<400> 10

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro
 85 90 95

<210> 11

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens (Người thông minh)

<400> 11

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 1 5 10

<210> 12

<211> 119

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> VH của MSCB97

<400> 12

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Tyr Asp Gly Cys Tyr Gly Glu Leu Asp Phe Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 13

<211> 446

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> HC CỦA MSCB97

<400> 13

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Tyr Asp Gly Cys Tyr Gly Glu Leu Asp Phe Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115 120 125

Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu
130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro
195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro
210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe
225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
245 250 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val
260 265 270

Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser
325 330 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 340 345 350

Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 370 375 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 385 390 395 400

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 405 410 415

Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 435 440 445

<210> 14

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> VL CỦA MSCB97

<400> 14

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 15
<211> 214
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> LC CỦA MSCB97

<400> 15

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 16

<211> 5

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> MSCB97 HCDR1

<400> 16

Ser Tyr Ala Met Ser

1

5

<210> 17

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> MSCB97 HCDR2

<400> 17

Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1

5

10

15

Gly

<210> 18

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> MSCB97 HCDR3

<400> 18

Tyr Asp Gly Cys Tyr Gly Glu Leu Asp Phe
1 5 10

<210> 19

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> MSCB97 LCDR1

<400> 19

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 20

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> MSCB97 LCDR2

<400> 20

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

<210> 21

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> MSCB97 LCDR3

<400> 21

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu Thr
1 5

<210> 22

<211> 29

<212> PRT

<213> Homo sapiens (Người thông minh)

<400> 22

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser
1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
20 25

<210> 23

<211> 37

<212> PRT

<213> Homo sapiens (Người thông minh)

<400> 23

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser
1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr Lys Arg Asn
20 25 30

Arg Asn Asn Ile Ala
35

<210> 24

<211> 30

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Biến thể OXM 1

<220>

<221> Xaa

<222> (2)..(2)

<223> Xaa là axit aminoisobutyric (alpha, alpha dimethylglyxin)

<220>

<221> Lys

<222> (30)..(30)

<223> Lys được biến đổi hóa học như mô tả trong bản mô tả

<400> 24

His	Xaa	Gln	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Tyr	Ser	Lys	Tyr	Leu	Asp	Glu
1				5					10					15	

Arg	Arg	Ala	Arg	Asp	Phe	Val	Glu	Trp	Leu	Leu	Asn	Thr	Lys
			20					25					30

<210> 25

<211> 29

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Biến thể OXM 2

<220>

<221> Xaa

<222> (2)..(2)

<223> Xaa là axit aminoisobutyric (alpha, alpha dimethylglyxin)

<220>

<221> Lys

<222> (29)..(29)

<223> Lys được biến đổi hóa học như mô tả trong bản mô tả

<400> 25

His	Xaa	Gln	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Tyr	Ser	Lys	Tyr	Leu	Asp	Glu
1				5					10					15	

Arg	Arg	Ala	Arg	Asp	Phe	Val	Glu	Trp	Leu	Leu	Asn	Lys
			20					25				

<210> 26

<211> 30

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Biến thể OXM 3

<220>

<221> Xaa

<222> (2)..(2)

<223> Xaa là axit aminoisobutyric (alpha, alpha-dimethylglyxin)

<220>

<221> Leu

<222> (27)..(27)

<223> Leu, trong đó leu là norleuxin được biến đổi hóa học như mô tả trong bản mô tả

<220>

<221> Lys

<222> (30)..(30)

<223> Lys được biến đổi hóa học như mô tả trong bản mô tả

<400> 26

His	Xaa	Gln	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Tyr	Ser	Lys	Tyr	Leu	Asp	Glu
1				5					10					15	

Arg Arg Ala Arg Asp Phe Val Glu Trp Leu Leu Asn Thr Lys
 20 25 30

<210> 27

<211> 30

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Biễn thể OXM 1/Hợp chất 1

<220>

<221> Xaa

<222> (2)..(2)

<223> Xaa là axit aminoisobutyric (alpha, alpha-dimethylglyxin)

<220>

<221> Lys

<222> (30)..(30)

<223> Lys được biến đổi hóa học như mô tả trong bản mô tả

<400> 27

His Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu
 1 5 10 15

Arg Arg Ala Arg Asp Phe Val Glu Trp Leu Leu Asn Thr Lys
 20 25 30