



(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)



1-0049189

(51)^{2020.01} C12N 9/96; A61K 47/68; C12N 9/40; (13) B
A61K 38/00; C12N 9/38

(21) 1-2020-04117

(22) 21/12/2018

(86) PCT/KR2018/016487 21/12/2018

(87) WO2019/125059 27/06/2019

(30) 10-2017- 0178378 22/12/2017 KR

(45) 25/07/2025 448

(43) 25/11/2020 392A

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

214, Muha-ro, Paltan-myeon, Hwaseong-si, Gyeonggi-do 18536, Korea

(72) JUNG, Eui Joon (KR); KIM, Jin Young (KR); CHOI, In Young (KR); JUNG, Sung Youb (KR).

(74) Văn phòng Luật sư Ân Nam (ANNAM IP & LAW)

(54) PROTEIN DUNG HỢP ENZYM TRỊ LIỆU VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA PROTEIN NÀY

(21) 1-2020-04117

(57) Sáng chế đề cập đến protein dung hợp giữa enzym trị liệu dạng dime và vùng Fc globulin miễn dịch, phương pháp điều chế protein này, và dược phẩm chứa protein dung hợp này.

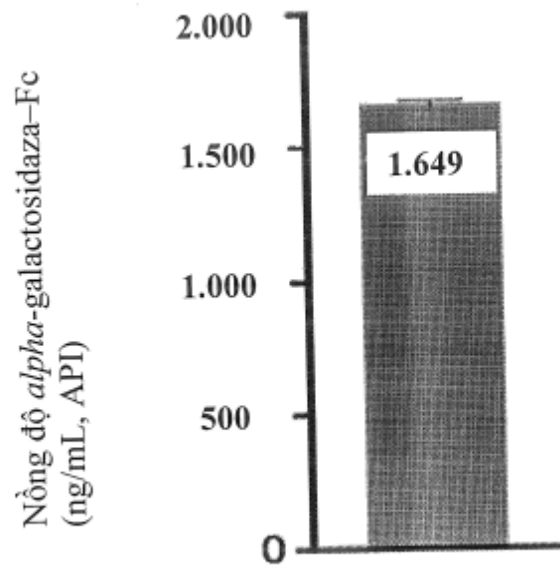


Fig. 1

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến protein dung hợp enzym chứa enzym trị liệu dạng dime, phương pháp điều chế protein này, và chế phẩm chứa protein này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Tiêu thể là bào quan tế bào chất có chức năng làm phân giải các đại phân tử như protein, polynucleotit, polysaccarit và lipit. Môi trường bên trong của tiêu thể có tính axit và enzym xúc tác thủy phân thúc đẩy quá trình thủy phân các đại phân tử sinh học có trong đó. Tiêu thể cũng được phát hiện là có vai trò nhất định trong việc hấp thụ các phân tử thông qua quá trình nội bào.

Rối loạn tích tụ trong tiêu thể (sau đây gọi là LSD - Lysosomal storage disorder) là rối loạn chuyển hóa di truyền đặc trưng bởi sự mất chức năng của tiêu thể. LSD được gây ra bởi sự thiếu hụt các enzym làm phân giải chất như lipit, protein, polysaccarit, v.v., và chúng thường xảy ra với tỷ lệ 1 trên 100.000 và được di truyền như tính trạng lặn của nhiễm sắc thể thường. LSD xuất hiện khi thiếu hụt hoặc không có enzym phân giải đặc hiệu và khi thiếu enzym phân giải này, các chất dư thừa sẽ tích tụ mà không bị phân giải, cuối cùng gây ra các vấn đề về chức năng tế bào. Như nhiều bệnh rối loạn di truyền khác, LSD được di truyền từ bố mẹ. Ngoài ra, mỗi trong số các bệnh này đều xảy ra do đột biến ở bất kỳ gen nào có liên quan đến dịch mã các enzym khác nhau. Enzym gây ra các bệnh này thường có đặc tính sinh hóa tương tự, và tất cả các LSD là do sự tích tụ bất thường của các chất trong tiêu thể. Hiện nay, có khoảng 50 loại LSD khác nhau được biết đến (ví dụ, bệnh Niemann-Pick, bệnh Fabry, bệnh Gaucher, hội chứng Hunter, hội chứng Maroteaux-Lamy, v.v.).

Bệnh Fabry, được biết đến là rối loạn LSD, là một loại rối loạn chuyển hóa bẩm sinh glycosphingolipit xảy ra do thiếu hụt hoặc không có hoạt tính enzym của *alpha*-galactosidaza A, là một enzym xúc tác thủy phân có trong tiêu thể.

alpha-Galactosidaza A là enzym mà thủy phân globotriaosylceramit (Gb3) thành lactosylceramit, và đã biết rằng rối loạn ở *alpha*-galactosidaza A dẫn đến sự tích tụ bất thường của Gb3 ở thành tĩnh mạch và nhiều phần khác của cơ thể, do đó gây ra

bệnh Fabry.

Phương pháp tiêu biểu để điều trị các rối loạn LSD này có thể là liệu pháp thay thế enzym (ERT) và nhiều nghiên cứu liên quan hiện đang được tiến hành (Frances M. Platt et al., J Cell Biol. 2012 Nov 26; 199 (5): 723 đến 34). Cụ thể, vì LSD là rối loạn gây ra bởi các khiếm khuyết di truyền ở enzym cụ thể, cho nên liệu pháp thay thế là cần thiết để điều trị các enzym khiếm khuyết. Liệu pháp thay thế enzym là liệu pháp tiêu chuẩn đối với LSD và liệu pháp này có tác dụng làm giảm bớt các triệu chứng hiện có hoặc trì hoãn sự tiến triển của bệnh bằng cách thay thế enzym khiếm khuyết.

Tuy nhiên, protein có tác dụng trị liệu nói chung có độ ổn định thấp và do đó dễ bị biến tính và phân hủy bởi proteaza trong máu. Do đó, để duy trì nồng độ trong máu và hiệu lực của các protein này, cần cho bệnh nhân dùng thường xuyên.

Tuy nhiên, trong trường hợp thuốc protein được dùng cho bệnh nhân dưới dạng tiêm, việc tiêm thường xuyên để duy trì nồng độ polypeptit hoạt tính trong máu có thể gây đau đớn đáng kể cho bệnh nhân. Để giải quyết các vấn đề này, đã có các nỗ lực liên tục để tối đa hóa hiệu quả được lý bằng cách tăng tính ổn định trong máu của các enzym trị liệu và duy trì nồng độ trong máu của các enzym này ở mức cao trong thời gian dài hơn. Cần có các dạng bào chế có hoạt tính lâu dài như vậy để tăng tính ổn định của các enzym trị liệu và đồng thời duy trì hiệu lực của thuốc ở mức đủ cao, cũng như không gây ra phản ứng miễn dịch ở bệnh nhân.

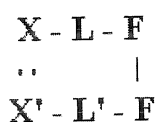
Theo đó, có nhu cầu phát triển tác nhân trị liệu có hiệu quả trị liệu đối với bệnh đích, trong đó hoạt tính của protein dung hợp được duy trì đồng thời thời gian tồn tại của protein protein dung hợp được tăng cường ổn định *in vivo*.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề kỹ thuật

Mục đích của sáng chế là tìm ra protein dung hợp enzym có công thức 1 sau đây:

[Công thức 1]



trong đó mỗi X và X' độc lập là cùng một loại hoặc khác loại enzym trị liệu;

L và L' là cầu nối, mỗi nhóm độc lập là cùng một loại hoặc khác loại cầu nối;

F là vùng Fc globulin miễn dịch;

| là liên kết cộng hóa trị; và

: là liên kết cộng hóa trị hoặc không cộng hóa trị.

Một mục đích khác của sáng chế là tìm ra được phẩm ngăn chặn hoặc điều trị LSD chứa protein dung hợp enzym.

Một mục đích khác của sáng chế là tìm polynucleotit mã hóa protein dung hợp enzym.

Một mục đích khác nữa của sáng chế là tìm ra vector biểu hiện chứa polynucleotit.

Một mục đích khác nữa của sáng chế là tìm ra thể biến nạp mà vector biểu hiện được đưa vào đó.

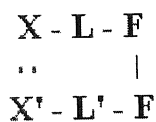
Một mục đích khác nữa của sáng chế là tìm ra phương pháp sản xuất protein dung hợp enzym, phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy thể biến nạp để thu mẫu nuôi cấy; và bước thu hồi protein dung hợp enzym từ mẫu nuôi cấy.

Giải pháp kỹ thuật

Một khía cạnh của sáng chế đề xuất protein dung hợp enzym trong đó enzym trị liệu và vùng Fc globulin miễn dịch được dung hợp cùng nhau.

Theo phương án cụ thể của sáng chế, protein dung hợp enzym có thể được thể hiện bằng công thức 1 sau đây:

[Công thức 1]



trong đó mỗi X và X' độc lập là cùng một loại hoặc khác loại enzym trị liệu;

L và L' là cầu nối, mỗi nhóm độc lập là cùng một loại hoặc khác loại cầu nối;

F là vùng Fc globulin miễn dịch;

| là liên kết cộng hóa trị; và

: là liên kết cộng hóa trị hoặc không cộng hóa trị.

Ở protein dung hợp enzym theo các phương án cụ thể nêu trên, enzym trị liệu có thể tạo thành dime thông qua liên kết không cộng hóa trị.

Ở protein dung hợp enzym theo phương án bất kỳ trong số các phương án cụ thể nêu trên, enzym trị liệu có thể tạo thành dime ở cấu hình đối song song với nhau.

Ở protein dung hợp enzym theo phương án bất kỳ trong số các phương án cụ thể nêu trên, protein dung hợp enzym có thể có độ ổn định được tăng cường và ái lực liên kết đối với thụ thể tiêu thể được giảm xuống, so với enzym trị liệu mà vùng Fc globulin miễn dịch không được dung hợp vào đó.

Ở protein dung hợp enzym theo phương án bất kỳ trong số các phương án cụ thể nêu trên, enzym có thể được lựa chọn từ nhóm bao gồm *beta*-glucosidaza, *alpha*-galactosidaza, *beta*-galactosidaza, iduronidaza, iduronat-2-sulfataza, galactosa-6-sulfataza, *alpha*-glucosidaza axit, ceramidaza axit, sphingomyelinaza axit, galactocerebrosidaza, arylsulfataza A, B, *beta*-hexosaminidaza A, B, heparin N-sulfataza, *alpha*-D-mannosidaza, *beta*-glucuronidaza, N-acetylgalactosamin-6-sulfataza, lipaza axit của tiêu thể, *alpha*-N-acetyl-glucosaminidaza, glucocerebrosidaza, butyrylcholinesteraza, chitinaza, glutamat decarboxylaza, imiglucaraza, lipaza, uricaza, axetylhydrolaza yếu tố hoạt hóa tiểu cầu, endopeptidaza trung tính, và myeloperoxidaza.

Ở protein dung hợp enzym theo phương án bất kỳ trong số các phương án cụ thể nêu trên, enzym có thể là *alpha*-galactosidaza A hoặc *beta*-galactosidaza.

Ở protein dung hợp enzym theo phương án bất kỳ trong số các phương án cụ thể nêu trên, vùng Fc globulin miễn dịch có thể có biến đổi được chọn từ nhóm bao gồm biến đổi thay thế, thêm, bớt, cải biến, và tổ hợp các biến đổi này ở ít nhất một axit amin của vùng Fc globulin miễn dịch tự nhiên.

Ở protein dung hợp enzym theo phương án bất kỳ trong số các phương án cụ thể nêu trên, ở vùng Fc globulin miễn dịch có trình tự amin nêu trong SEQ ID NO: 8, axit amin thứ 2 có thể được thế bằng prolin; axit amin thứ 71 được thế bằng glutamin; hoặc axit amin thứ 2 có thể được thế bằng prolin và axit amin thứ 71 có thể được thế bằng glutamin.

Ở protein dung hợp enzym theo phương án bất kỳ trong số các phương án cụ thể nêu trên, không có sự trao đổi chuỗi nào có thể xảy ra ở vùng Fc globulin miễn dịch.

Ở protein dung hợp enzym theo phương án bất kỳ trong số các phương án cụ thể nêu trên, vùng Fc globulin miễn dịch có thể được lựa chọn từ nhóm bao gồm:

- (a) miền CH1, miền CH2, miền CH3, và miền CH4;
- (b) miền CH1 và miền CH2;

(c) miền CH1 và miền CH3;

(d) miền CH2 và miền CH3; và

(e) tổ hợp giữa một hoặc hai hoặc nhiều miền trong số miền CH1, miền CH2, miền CH3, và miền CH4 và vùng bản lề globulin miễn dịch hoặc một phần của vùng bản lề.

Ở protein dung hợp enzym theo phương án bất kỳ trong số các phương án cụ thể nêu trên, vùng Fc globulin miễn dịch có thể ở dạng monome.

Ở protein dung hợp enzym theo phương án bất kỳ trong số các phương án cụ thể nêu trên, vùng Fc globulin miễn dịch có thể bao gồm vùng bản lề, miền CH2, và miền CH3.

Ở protein dung hợp enzym theo phương án bất kỳ trong số các phương án cụ thể nêu trên, ở vùng Fc globulin miễn dịch:

vùng có thể tạo thành liên kết disulfua có thể được loại bỏ;

gốc axit amin nhất định có thể được loại bỏ ở đầu N của Fc tự nhiên;

gốc methionin có thể được thêm vào ở đầu N của dạng Fc tự nhiên;

vị trí liên kết bổ sung có thể được loại bỏ; hoặc

vị trí gây độc tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity - ADCC) có thể được loại bỏ.

Ở protein dung hợp enzym theo phương án bất kỳ trong số các phương án cụ thể nêu trên, vùng Fc globulin miễn dịch có thể được aglycosyl hóa.

Ở protein dung hợp enzym theo phương án bất kỳ trong số các phương án cụ thể nêu trên, vùng Fc globulin miễn dịch có thể là mảnh Fc có nguồn gốc từ IgG, IgA, IgD, IgE, hoặc IgM.

Ở protein dung hợp enzym theo phương án bất kỳ trong số các phương án cụ thể nêu trên, vùng Fc globulin miễn dịch có thể là thể lai của các miền có nguồn gốc khác nhau từ globulin miễn dịch được chọn từ nhóm bao gồm IgG, IgA, IgD, IgE, và IgM.

Ở protein dung hợp enzym theo phương án bất kỳ trong số các phương án cụ thể nêu trên, vùng Fc globulin miễn dịch có thể là vùng Fc IgG4.

Ở protein dung hợp enzym theo phương án bất kỳ trong số các phương án cụ thể nêu trên, vùng bản lề của vùng Fc IgG4 có thể được thế bằng vùng bản lề IgG1.

Ở protein dung hợp enzym theo phương án bất kỳ trong số các phương án cụ thể nêu trên, protein dung hợp enzym có thể bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID

NO: 13.

Một khía cạnh khác của sáng chế đề xuất được phẩm để ngăn ngừa hoặc điều trị LSD chứa protein dung hợp enzym.

Ở được phẩm theo phương án cụ thể, LSD có thể được lựa chọn từ nhóm bao gồm bệnh tích tụ mucopolysaccharit (MPS), bệnh tích tụ glycogen, bệnh tích tụ sphingolipit, bệnh Niemann-Pick, bệnh Fabry, bệnh Gaucher, hội chứng Hunter, và hội chứng Maroteaux-Lamy.

Ở được phẩm theo phương án cụ thể nêu trên, được phẩm này có thể làm giảm ái lực liên kết của enzym đối với thụ thể tiêu thể.

Một khía cạnh khác nữa của sáng chế đề xuất polynucleotit mã hóa protein dung hợp enzym.

Một khía cạnh khác nữa của sáng chế đề xuất vector biểu hiện chứa polynucleotit.

Một khía cạnh khác nữa của sáng chế đề xuất thể biến nạp mà vector biểu hiện được đưa vào đó.

Một khía cạnh khác nữa của sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất protein dung hợp enzym.

Ở phương pháp sản xuất protein dung hợp enzym theo phương án cụ thể, phương pháp này có thể bao gồm bước nuôi cấy thể biến nạp để thu mẫu nuôi cấy; và bước thu hồi protein dung hợp enzym từ mẫu nuôi cấy.

Lợi ích của sáng chế

Sáng chế đề cập đến protein dung hợp chứa enzym trị liệu dạng dime, và cụ thể hơn, đề cập đến protein dung hợp enzym trong đó vùng Fc globulin miễn dịch được dung hợp với enzym trị liệu nhờ đó enzym trị liệu có độ ổn định được tăng cường và cơ chế loại bỏ enzym bởi thận được giảm xuống. Protein dung hợp enzym theo sáng chế có thể hiệu quả khi được sử dụng cho bệnh nhân do thời gian tồn tại tăng lên. Ngoài ra, protein dung hợp enzym theo sáng chế chứa enzym trị liệu dạng dime, và do đó, có thể giảm bước sản xuất và chi phí sản xuất.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1 thể hiện kết quả đo lường minh họa hoạt tính của protein dung hợp *alpha*-galactosidaza-Fc.

Fig. 2 thể hiện kết quả so sánh của hoạt tính enzym *in vitro* giữa agalsidaza-*beta* và protein dung hợp *alpha*-galactosidaza-Fc.

Fig. 3 thể hiện biểu đồ minh họa kết quả so sánh của hoạt tính hấp thụ nội bào *in vitro* giữa agalsidaza-*beta* và protein dung hợp *alpha*-galactosidaza-Fc.

Fig. 4 thể hiện biểu đồ minh họa kết quả so sánh của hành vi được động học giữa galsidaza-*beta* và protein dung hợp *alpha*-galactosidaza-Fc.

Mô tả chi tiết sáng chế

Các phương án ưu tiên được mô tả chi tiết sau đây. Trong khi đó, phần mô tả và phương án tương ứng được bộc lộ trong sáng chế cũng có thể được áp dụng cho phần mô tả và phương án khác. Tức là, tất cả các sự kết hợp của các yếu tố khác nhau được bộc lộ trong sáng chế đều nằm trong phạm vi của sáng chế. Ngoài ra, phạm vi của sáng chế không bị giới hạn bởi phần mô tả cụ thể dưới đây.

Ngoài ra, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật sẽ có thể hiểu hoặc xác nhận, dựa vào thí nghiệm thông thường, nhiều yếu tố tương đương với các phương án cụ thể của sáng chế được mô tả trong đơn này, và các yếu tố tương đương này được dự định bao gồm trong sáng chế.

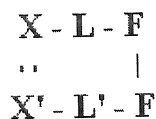
Xuyên suốt toàn bộ bản mô tả, không chỉ mã một ký tự hoặc ba ký tự thông thường được sử dụng cho các axit amin tồn tại trong tự nhiên, mà mã ba ký tự này còn thường được cho phép dùng cho axit amin khác, như axit α -aminoisobutyric (Aib), Sar (*N*-methylglyxin), axit α -metyl-glutamic, v.v.. Ngoài ra, axit amin được đề cập trong phần chữ viết tắt trong bản mô tả này được mô tả theo quy định IUPAC-IUB như sau:

Alanin	A;	Arginin	R;
Asparagin	N;	Axit Aspartic	D;
Cystein	C;	Axit Glutamic	E;
Glutamin	Q;	Glyxin	G;
Histidin	H;	Isoleuxin	I;
Leuxin	L;	Lysin	K;
Methionin	M;	Phenylalanin	F;
Prolin	P;	Serin	S;

Threonin	T;	Tryptophan	W;
Tyrosin	Y; và	Valin	V.

Một khía cạnh của sáng chế đề xuất protein dung hợp enzym có công thức 1;

[Công thức 1]



trong đó mỗi X và X' độc lập là cùng một loại hoặc khác loại enzym trị liệu;

L và L' là cầu nối, mỗi nhóm độc lập là cùng một loại hoặc khác loại cầu nối;

F là vùng Fc globulin miễn dịch;

| là liên kết cộng hóa trị; và

: là liên kết cộng hóa trị hoặc không cộng hóa trị.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “protein dung hợp enzym” có thể chỉ protein mà trong đó vùng Fc globulin miễn dịch được dung hợp với enzym trị liệu sao cho enzym trị liệu có thể duy trì hoạt tính của nó đồng thời ái lực liên kết đối với thụ thể tiêu thể được giảm xuống, so với enzym trị liệu mà vùng Fc globulin miễn dịch không được dung hợp vào đó, qua đó tăng thời gian bán hủy trong máu. Protein dung hợp enzym theo sáng chế có thể được sử dụng làm thuốc cho liệu pháp thay thế enzym (enzymatic replacement therapy - ERT). Liệu pháp thay thế enzym có thể ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh thông qua việc khôi phục chức năng của enzym thiếu hụt hoặc khiếm khuyết mà gây ra bệnh.

Các tác giả sáng chế đã tạo ra protein dung hợp có vùng Fc globulin miễn dịch để tăng thời gian bán hủy trong máu của enzym trị liệu. Cụ thể, như vùng Fc, chất tương tự Fc IgG4 được sử dụng trong đó trình tự glycosyl hóa tiềm năng được thể để ức chế quá trình glycosyl hóa và ngoài ra trình tự bản lề của Fc IgG4 được thể để ức chế sự trao đổi chuỗi.

Ngoài ra, đã xác nhận rằng, trong sản xuất protein dung hợp enzym theo sáng chế, khi mỗi enzym trị liệu mà được dung hợp với vùng Fc globulin miễn dịch tạo thành dime, cụ thể dime được liên kết ở cấu hình đối song song, thời gian tồn tại *in vivo* của protein dung hợp enzym có thể tăng lên đồng thời vẫn duy trì hoạt tính của enzym trị liệu, và ngoài ra, bước sản xuất protein dung hợp enzym có thể được rút ngắn, qua đó

cho phép sản xuất hiệu quả.

Như vậy, protein dung hợp enzym theo sáng chế có các lợi ích trong đó hoạt tính của enzym có thể được duy trì đồng thời độ ổn định của enzym được tăng lên, và chi phí sản xuất có thể giảm xuống, so với enzym trị liệu mà vùng Fc globulin miễn dịch không được dung hợp vào đó.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “enzym trị liệu” dùng để chỉ enzym để điều trị bệnh mà là do không có, thiếu hụt, hư hỏng, v.v. enzym, và enzym có thể điều trị cho đối tượng mắc bệnh bởi liệu pháp thay thế enzym, sử dụng enzym, v.v.. Cụ thể là, enzym có thể là enzym để điều trị LSD mà là do không có, thiếu hụt, v.v. enzym tiêu thể, tuy nhiên không giới hạn ở các enzym này.

Enzym trị liệu được bao gồm trong protein dung hợp enzym theo sáng chế không bị giới hạn cụ thể, nhưng có thể bao gồm enzym trị liệu bất kỳ mà có thể có lợi ích là kéo dài thời gian tồn tại *in vivo* so với enzym trị liệu mà vùng Fc globulin miễn dịch không được dung hợp vào đó. Theo phương án ví dụ của sáng chế, protein dung hợp enzym là protein dung hợp của enzym trị liệu.

Enzym trị liệu được bao gồm trong protein dung hợp enzym theo sáng chế có thể là enzym mà tạo thành dime thông qua liên kết không cộng hóa trị, tuy nhiên không giới hạn ở các enzym trị liệu này. Cụ thể là, enzym trị liệu có thể tạo thành dime khi protein dung hợp được biểu hiện trong thể biến nạp và vùng Fc globulin miễn dịch tạo thành dime.

Dime này của enzym trị liệu có thể là enzym được tạo thành bởi hai enzym tương đồng với nhau, hoặc enzym được tạo thành bởi hai enzym khác nhau. Các loại cụ thể của enzym mà tạo thành dime không bị giới hạn miễn là các enzym này có hoạt tính mong muốn *in vivo*.

Trong khi đó, các enzym trị liệu này tạo thành dime có thể ở dạng dime song song hoặc dime đối song song phụ thuộc vào hướng trong đó enzym này được liên kết, tuy nhiên không giới hạn ở các enzym trị liệu này.

Theo phương án ví dụ của sáng chế, protein dung hợp trong đó *alpha*-galactosidaza (tức là, enzym trị liệu) được dung hợp vào vùng Fc globulin miễn dịch được sản xuất, và đã xác nhận rằng, dạng *alpha*-galactosidaza tạo thành dime đối song song thông qua liên kết không cộng hóa trị đồng thời vùng Fc globulin miễn dịch của protein dung hợp tạo thành dime. Ngoài ra, đã xác nhận rằng protein dung hợp có thể

duy trì hoạt tính của enzym thậm chí ở trạng thái mà protein dung hợp được dung hợp với vùng Fc globulin miễn dịch (ví dụ 2).

Theo một phương án ví dụ khác của sáng chế, protein dung hợp trong đó *alpha*-galactosidaza được dung hợp với vùng Fc globulin miễn dịch và agalsidaza-*beta* mà không được dung hợp với vùng Fc globulin miễn dịch được so sánh. Do vậy, đã xác nhận rằng protein dung hợp duy trì hoạt tính enzym và hoạt tính hấp thụ nội bào *in vitro* bất kể việc dung hợp với vùng Fc (ví dụ 2 và 3), và cũng xác nhận rằng các protein dung hợp này có hành vi được động học vượt trội do việc dung hợp với vùng Fc (ví dụ 4).

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “dime song song” có nghĩa là đầu N và đầu C của trình tự axit amin của mỗi monome tạo thành dime cùng hướng khi mỗi monome tạo thành dime. Cụ thể, dime có thể được tạo thành thông qua liên kết không cộng hóa trị hoặc liên kết cộng hóa trị, tuy nhiên không giới hạn ở các phương pháp tạo thành dime song song này.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “dime đối song song” có nghĩa là đầu N và đầu C của trình tự axit amin của mỗi monome tạo thành dime theo hướng khác nhau khi mỗi monome tạo thành dime. Cụ thể, dime có thể được tạo thành thông qua liên kết không cộng hóa trị hoặc liên kết cộng hóa trị, tuy nhiên không giới hạn ở các phương pháp tạo thành dime đối song song này.

Nói cách khác, ở protein dung hợp enzym theo sáng chế, (i) đầu N của một enzym trị liệu (X) và đầu N của một enzym trị liệu khác (X') có thể tạo thành dime cùng hướng; (ii) đầu C của một enzym trị liệu (X) và đầu C của một enzym trị liệu khác (X') có thể tạo thành dime cùng hướng; (iii) đầu N của một enzym trị liệu (X) và đầu C của một enzym trị liệu khác (X') có thể tạo thành dime cùng hướng; hoặc (iv) đầu C của một enzym trị liệu (X) và đầu N của một enzym trị liệu khác (X') có thể tạo thành dime cùng hướng. Các dime trong các trường hợp (i) và (ii) được gọi là dime song song và các dime trong các trường hợp (iii) và (iv) được gọi là dime đối song song. Việc tạo thành các dime này có thể là bởi liên kết cộng hóa trị hoặc liên kết không cộng hóa trị, tuy nhiên không giới hạn ở việc tạo thành dime này.

Cụ thể là, trong việc tạo thành các dime nêu trên, việc tạo thành dime song song hoặc dime đối song song có thể là sao cho, như vùng Fc globulin miễn dịch tạo thành dime, *alpha*-galactosidaza A của monome được liên kết với nó tạo thành dime thông qua dime liên kết cộng hóa trị hoặc liên kết không cộng hóa trị.

Liên quan đến protein dung hợp chứa enzym trị liệu dạng dime trong cấu hình đối song song theo sáng chế, quy trình sản xuất protein dung hợp có lợi ích vượt trội trong đó nó thể giảm số lượng các bước sản xuất, qua đó giảm chi phí sản xuất, và hoạt tính enzym có thể được duy trì đồng thời giảm sự mất ổn định ở các loại dime do sự thay đổi pH *in vivo*.

Enzym trị liệu theo sáng chế có thể là enzym được chọn từ nhóm bao gồm *beta*-glucosidaza, *alpha*-galactosidaza, *beta*-galactosidaza, iduronidaza, iduronat-2-sulfataza, galactosa-6-sulfataza, *alpha*-glucosidaza axit, ceramidaza axit, sphingomyelinaza axit, galactocerebrosidaza, arylsulfataza A, B, *beta*-hexosaminidaza A, B, heparin N-sulfataza, *alpha*-D-mannosidaza, *beta*-glucuronidaza, N-axetyl galactosamin-6 sulfataza, lipaza axit của tiêu thể, *alpha*-N-axetyl-glucosaminidaza, glucocerebrosidaza, butyrylcholinesteraza, chitinaza, glutamat decarboxylaza, imiglucaraza, lipaza, uricaza, axetylhydrolaza yếu tố hoạt hóa tiểu cầu, endopeptidaza trung tính, và myeloperoxidaza. Enzym trị liệu theo sáng chế có thể là enzym có nguồn gốc từ người, tuy nhiên enzym trị liệu bất kỳ có hiệu quả trị liệu đối với LSD có thể được bao gồm trong sáng chế mà không bị giới hạn, bất kể nguồn gốc hoặc loại enzym.

Cụ thể hơn, enzym có thể là *alpha*-galactosidaza A hoặc *beta*-galactosidaza.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “*alpha*-galactosidaza A” là enzym có mặt trong tiêu thể của lá lách, não, gan, v.v., mà thủy phân gốc *alpha*-galactosyl ở glycolipit và glycoprotein, và là glycoprotein đồng dime. Cụ thể là, *alpha*-galactosidaza A được biết là thủy phân ceramit trihexosit, xúc tác quá trình thủy phân của melibioza thành galactosa và glucoza, và cụ thể, được biết là liên quan đến bệnh Fabry, một loại rối loạn LSD.

Theo sáng chế, *alpha*-galactosidaza A có thể được sử dụng thay thế với agalsidaza-*alpha* hoặc agalsidaza-*beta* (tức là, loại tái tổ hợp), và enzym bất kỳ mà có hoạt tính tương đương và có hiệu quả trị liệu đối với LSD có thể được bao gồm trong phạm vi của sáng chế mà không bị giới hạn, bất kể trình tự của nó, nguồn gốc, phương pháp sản xuất, v.v.. Cụ thể là, *alpha*-galactosidaza có thể được mã hóa bởi trình tự polynucleotit nêu trong SEQ ID NO: 5, và có thể bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 6, tuy nhiên không giới hạn ở các trình tự của *alpha*-galactosidaza này.

Enzym trị liệu được bao gồm trong protein dung hợp enzym theo sáng chế có thể là loại tồn tại trong tự nhiên, và mảnh chứa một phần của enzym trị liệu, hoặc chất

tương tự của enzym trị liệu trong đó biến đổi được chọn từ nhóm bao gồm biến đổi thay thế, thêm, bớt, và cải biến của một số axit amin, và tổ hợp có thể có của các biến đổi này, có thể được bao gồm trong sáng chế mà không bị giới hạn, miễn là nó có hoạt tính tương đương với hoạt tính của loại tồn tại trong tự nhiên của enzym trị liệu.

Ngoài ra, chất tương tự của enzym trị liệu bao gồm bao gồm tất cả các loại mà một hoặc nhiều axit amin được thêm vào đầu amino và/hoặc đầu cacboxy của loại tồn tại trong tự nhiên của enzym trị liệu.

Đối với việc thay thế hoặc thêm axit amin, không những có thể sử dụng 20 axit amin thường được tìm thấy trong các protein của người, mà còn có thể sử dụng axit amin không điển hình hoặc không tồn tại trong tự nhiên. Các nguồn thương mại của các axit amin không điển hình có thể bao gồm Sigma-Aldrich, ChemPep Inc., Genzyme Pharmaceuticals, v.v.. Peptit bao gồm các axit amin này và trình tự peptit không điển hình có thể được tổng hợp và mua từ các nhà cung cấp thương mại, ví dụ, American Peptide Company, Bachem (USA), hoặc Anygen (Korea), nhưng không giới hạn ở các nguồn thương mại này.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “mảnh” dùng để chỉ dạng mà một hoặc nhiều axit amin ở đầu amino hoặc cacboxy của enzym trị liệu tự nhiên hoặc chất tương tự của enzym trị liệu tự nhiên được loại bỏ. Enzym trị liệu tự nhiên hoặc chất tương tự của nó thuộc phạm vi của sáng chế bất kể kích thước mảnh hoặc loại axit amin miễn là chúng có hoạt tính của của enzym trị liệu.

Chất tương tự enzym trị liệu có thể bao gồm chất tương tự sinh học hoặc chất cải tiến sinh học của enzym trị liệu tương ứng. Ví dụ, liên quan đến chất tương tự sinh học, xem xét đến sự khác nhau ở vật chủ về sự biểu hiện của nó so với enzym trị liệu đã biết, sự khác nhau ở đặc điểm glycosyl hóa và mức độ của nó, và sự khác nhau ở mức độ thay thế ở gốc axit amin cụ thể của enzym tương ứng về mặt trình tự tiêu chuẩn trong đó mức độ thay thế là không phải thế 100%, chúng thuộc về enzym tương tự sinh học được sử dụng làm protein dung hợp enzym theo sáng chế. Enzym trị liệu có thể được sản xuất bằng phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật, cụ thể là bằng cách tái tổ hợp gen ở tế bào động vật, *E. coli*, nấm men, tế bào côn trùng, tế bào thực vật, động vật sống, v.v., và không giới hạn ở các phương pháp sản xuất này, và các enzym thương mại có sẵn có thể được mua và sử dụng, nhưng không giới hạn ở các enzym này.

Ngoài ra, enzym trị liệu có thể bao gồm trình tự axit amin có độ tương đồng ít

nhất 60%, 70%, hoặc 80%, cụ thể hơn là 90%, và thậm chí cụ thể hơn là 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% hoặc cao hơn so với các enzym nêu trên hoặc chất tương tự của nó, và enzym trị liệu có thể thu được từ vi sinh vật bằng kỹ thuật tái tổ hợp hoặc các enzym trị liệu có sẵn thương mại, tuy nhiên không giới hạn ở các enzym trị liệu này.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “độ tương đồng” dùng để chỉ mức độ giống nhau của trình tự axit amin kiểu đại hoặc trình tự nucleotit kiểu đại, và sự so sánh độ tương đồng có thể được thực hiện bằng mắt thường hoặc sử dụng chương trình so sánh mà có thể được mua dễ dàng. Độ tương đồng giữa hai hoặc nhiều trình tự có thể được tính toán dưới dạng phần trăm (%) sử dụng chương trình máy tính thương mại. Độ tương đồng (%) có thể được tính toán cho các trình tự liên kề.

Thông tin trên trình tự của enzym trị liệu hoặc chất tương tự của nó và trình tự nucleotit mã hóa enzym trị liệu này có thể thu được từ dữ liệu đã biết (ví dụ, NCBI, v.v.).

Enzym trị liệu có thể được tạo ra hoặc sản xuất bằng phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật, và cụ thể là, enzym có thể được tinh sạch từ mẫu nuôi cấy sau khi nuôi cấy tế bào động vật mà vector biểu hiện của động vật được chèn vào đó, hoặc có thể được sử dụng sau khi mua enzym có sẵn thương mại, tuy nhiên không giới hạn ở các enzym này.

Protein dung hợp enzym theo sáng chế có thể là protein trong đó enzym trị liệu và vùng Fc globulin miễn dịch được dung hợp thông qua cầu nối peptit. Tức là, L hoặc L' có công thức 1 có thể là cầu nối peptit, tuy nhiên không giới hạn cụ thể ở L hoặc L' miễn là chúng có thể dung hợp vùng Fc globulin miễn dịch với enzym trị liệu.

Cầu nối peptit có thể bao gồm ít nhất một axit amin, ví dụ, từ 1 đến 1.000 axit amin, cầu nối peptit bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật (ví dụ, bao gồm cầu nối $[GS]_x$, cầu nối $[GGGS]_x$, và cầu nối $[GGGGS]_x$, v.v., trong đó x là số tự nhiên bằng 1 hoặc lớn hơn (ví dụ, 1, 2, 3, 4, 5, hoặc lớn hơn), tuy nhiên không giới hạn ở các cầu nối peptit này. Cụ thể là, cầu nối peptit theo sáng chế có thể bao gồm từ 10 đến 50 trình tự axit amin, và cụ thể hơn là từ 20 đến 40 trình tự axit amin, và có thể bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 11.

Đối với mục đích của sáng chế, vị trí mà tại đó cầu nối peptit được dung hợp với enzym trị liệu và Fc globulin miễn dịch không bị giới hạn, miễn là cầu nối peptit có thể liên kết enzym trị liệu và Fc globulin miễn dịch đồng thời duy trì hoạt tính của enzym

trị liệu, cụ thể là, cả hai đầu của enzym trị liệu và vùng Fc globulin miễn dịch, và cụ thể hơn, đầu C của enzym trị liệu và đầu N của vùng Fc globulin miễn dịch, tuy nhiên không giới hạn ở các vị trí này.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, các thuật ngữ “đầu N” và “đầu C” dùng để chỉ đầu amino và đầu cacboxyl của protein, tương ứng. Ví dụ, “đầu N” hoặc “đầu C” có thể bao gồm không chỉ các gốc axit amin gần đầu nhất của đầu N hoặc đầu C, mà còn các gốc axit amin liền kề với gốc axit amin của đầu N hoặc đầu C, và cụ thể là, gốc axit amin thứ nhất đến gốc axit amin thứ 20 từ đầu cuối của nó, tuy nhiên không giới hạn ở các đầu N hoặc đầu C này.

Theo phương án của sáng chế, protein dung hợp (SEQ ID NO: 13) trong đó đầu N của IgG4 được dung hợp với đầu C của enzym trị liệu được tạo ra bằng cách tổng hợp sao cho *alpha*-galactosidaza (enzym trị liệu) được dung hợp với cầu nối-IgG4 ở mức độ gen, và đã xác nhận rằng protein dung hợp được biểu hiện trong thể biến nạp mà protein dung hợp được biến nạp vào (ví dụ 2).

Theo sáng chế, cầu nối peptit có thể là cầu nối mà được liên kết với mỗi vùng Fc globulin miễn dịch của dime được tạo thành bởi vùng Fc globulin miễn dịch của monome, và cầu nối được liên kết với mỗi vùng Fc globulin miễn dịch có thể là cùng một loại hoặc khác loại.

Vùng Fc globulin miễn dịch, mà là gốc của protein dung hợp enzym theo sáng chế, có thể là vùng mà trong đó dime được tạo thành giữa các vùng Fc globulin miễn dịch của mỗi monome.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “vùng Fc globulin miễn dịch” dùng để chỉ vùng của phân tử globulin miễn dịch bao gồm vùng hằng định chuỗi nặng 2 (CH₂) và/hoặc vùng hằng định chuỗi nặng 3 (CH₃), ngoại trừ vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ. Đối với mục đích của sáng chế, vùng Fc globulin miễn dịch này có thể bao gồm vùng bản lề được biến đổi, tuy nhiên không bị giới hạn ở đó. Cụ thể là, vùng Fc globulin miễn dịch có thể là vùng mà có biến đổi được chọn từ nhóm bao gồm biến đổi thay thế, thêm, bớt, cải biến, và tổ hợp các biến đổi này ở ít nhất một axit amin của vùng Fc globulin miễn dịch tự nhiên, tuy nhiên không giới hạn ở các vùng Fc globulin miễn dịch này.

Vùng Fc globulin miễn dịch là nguyên liệu được sử dụng làm chất mang trong sản xuất thuốc, và các nghiên cứu protein dung hợp sử dụng vùng Fc globulin miễn dịch

đã được tiến hành tích cực gần đây để ổn định protein và ngăn cản chúng không bị loại bỏ khỏi thận. Globulin miễn dịch là thành phần chính của máu, và có năm loại khác nhau (tức là, IgG, IgM, IgA, IgD, và IgE). Loại được sử dụng thường xuyên nhất cho các nghiên cứu protein dung hợp là IgG, và loại này được phân thành bốn phân nhóm. Protein dung hợp được sản xuất sử dụng Fc globulin miễn dịch có thể làm tăng kích thước protein và qua đó ngăn cản chúng bị loại bỏ ở thận và còn liên kết với thụ thể FcRn, và do đó đóng vai trò làm tăng thời gian bán hủy trong máu thông qua quá trình nhập bào và luân chuyển vào tế bào.

Vùng Fc globulin miễn dịch này có thể bao gồm vùng bản lề ở vùng hằng định chuỗi nặng, và vùng Fc globulin miễn dịch monome có thể tạo thành dime do vùng bản lề, tuy nhiên không giới hạn ở các vùng Fc globulin miễn dịch này. Ngoài ra, vùng Fc globulin miễn dịch theo sáng chế có thể là vùng Fc được kéo dài bao gồm tất cả hoặc một phần của vùng hằng định chuỗi nặng 1 (CH1) và/hoặc vùng hằng định chuỗi nhẹ 1 (CL1), trừ vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch, miễn là vùng Fc globulin miễn dịch có hiệu quả giống hoặc ưu việt hơn vùng Fc globulin miễn dịch của loại tự nhiên. Ngoài ra, vùng Fc globulin miễn dịch theo sáng chế có thể là vùng mà trong đó một phần của trình tự axit amin dài đáng kể tương ứng với CH2 và/hoặc CH3 được loại bỏ.

Cụ thể là, vùng Fc globulin miễn dịch theo sáng chế có thể là vùng được chọn từ nhóm bao gồm (a) miền CH1, miền CH2, miền CH3, và miền CH4; (b) miền CH1 và miền CH2; (c) miền CH1 và miền CH3; (d) miền CH2 và miền CH3; và (e) tổ hợp giữa một hoặc hai hoặc nhiều miền trong số miền CH1, miền CH2, miền CH3, và miền CH4 và vùng bản lề globulin miễn dịch hoặc một phần của vùng bản lề, tuy nhiên không giới hạn ở các vùng Fc globulin miễn dịch này. Cụ thể hơn, vùng Fc globulin miễn dịch có thể là vùng mà bao gồm vùng bản lề, miền CH2, và miền CH3, tuy nhiên không giới hạn ở các vùng Fc globulin miễn dịch này.

Theo một phương án, vùng bản lề có thể là vùng mà trong đó một phần của trình tự bản lề có trình tự axit amin sau đây được loại bỏ hoặc biến đổi.

Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro-Ser-Cys-Pro (SEQ ID NO: 14)

Cụ thể là, vùng bản lề có thể là vùng có biến đổi mà tại đó một phần của vùng bản lề được loại bỏ để chỉ bao gồm gốc cystein (Cys); hoặc có thể là vùng mà tại đó gốc serin (Ser) có sự trao đổi chuỗi được thế bằng gốc prolin (Pro), và cụ thể hơn, vùng mà

tại đó serin thứ hai của trình tự bản lề được thế bằng gốc prolin, tuy nhiên không giới hạn ở các vùng bản lề này.

Theo sáng chế, vùng Fc globulin miễn dịch có thể làm tăng độ ổn định của enzym trị liệu được dung hợp đồng thời ngăn cản trao đổi chuỗi và tạo thành monome ở vùng Fc bằng cách bao gồm vùng bản lề ở dạng tự nhiên của nó hoặc vùng bản lề được biến đổi.

Theo sáng chế, vùng Fc globulin miễn dịch có thể ở dạng monome, tuy nhiên không giới hạn ở các vùng Fc globulin miễn dịch này. Cụ thể là, vùng Fc globulin miễn dịch mà được biểu thị là F ở công thức 1 nêu trên có thể ở dạng monome và được biểu hiện bởi sự dung hợp với enzym trị liệu monome thông qua cầu nối peptit. Bởi vì monome của vùng Fc globulin miễn dịch tạo thành dime, enzym trị liệu được dung hợp với vùng Fc globulin miễn dịch có thể tạo thành dime bằng liên kết không cộng hóa trị, tuy nhiên không bị giới hạn ở đó.

Vùng Fc globulin miễn dịch được sử dụng làm chất mang thuốc có hạn chế là nó có thể gây ra đáp ứng miễn dịch không mong muốn, ví dụ, có chức năng của cơ quan phản ứng lại kích thích như gây độc tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC) và gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể (CDC). Các chức năng này xảy ra thông qua việc liên kết vùng Fc globulin miễn dịch với thụ thể Fc hoặc bổ thể, hoặc quá trình glycosyl hóa của vùng Fc. Ngoài ra, rất có khả năng xảy ra sự mất ổn định của chính Fc *in vivo*.

Theo sáng chế, các tác giả sáng chế đã có nhiều nỗ lực để giải quyết vấn đề nêu trên bằng cách thay thế trình tự của vùng bản lề ở vùng Fc globulin miễn dịch. Cụ thể là, vùng Fc globulin miễn dịch theo sáng chế có thể là vùng mà trong đó trình tự glycosyl hóa tiềm năng được thay thế để điều hòa quá trình glycosyl hóa hoặc trình tự có sự trao đổi chuỗi được thay thế, hoặc có thể tương ứng cả hai trường hợp. Cụ thể hơn, vùng Fc globulin miễn dịch của protein dung hợp enzym theo sáng chế có thể là vùng mà trong đó không xảy ra trao đổi chuỗi.

Cụ thể là, vùng Fc globulin miễn dịch theo sáng chế có thể là vùng mà trong đó axit amin thứ 2 và/hoặc axit amin thứ 71 của vùng Fc globulin miễn dịch của SEQ ID NO: 8 được thế bằng axit amin khác để ngăn cản sự trao đổi chuỗi và N-glycosyl hóa. Cụ thể hơn, vùng Fc globulin miễn dịch theo sáng chế có thể là 1) vùng mà trong đó axit amin thứ 2 (tức là, serin) được thế bằng prolin, 2) vùng mà trong đó axit amin thứ 71

(tức là, asparagin) được thế bằng glutamin, hoặc 3) vùng mà trong đó axit amin thứ 2 được thế bằng prolin và axit amin thứ 71 được thế bằng glutamin, và cụ thể là vùng Fc globulin miễn dịch được thể hiện bởi trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 9, tuy nhiên không giới hạn ở các vùng Fc globulin miễn dịch này. Ngoài các biến đổi được mô tả ở trên, vùng Fc globulin miễn dịch có thể bao gồm các biến đổi thích hợp khác như chất mang thuốc để tăng độ ổn định của enzym trị liệu.

Cụ thể là, vùng Fc globulin miễn dịch có thể là vùng mà trong đó vùng bản lề của Fc globulin miễn dịch IgG4 được thế bằng vùng bản lề IgG1, tuy nhiên không giới hạn ở các vùng Fc globulin miễn dịch này.

Theo phương án của sáng chế, axit amin thứ 2 của Fc globulin miễn dịch được thế bằng prolin và axit amin thứ 71 của Fc globulin miễn dịch được thế bằng glutamin, và qua đó làm giảm sự trao đổi chuỗi và N-glycosyl hóa (ví dụ 1).

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “trao đổi chuỗi” dùng để chỉ vấn đề mà trong đó khi Fc IgG4 được sử dụng làm chất mang của thể dung hợp protein, Fc IgG4 tạo thành thể lai với IgG4 có mặt *in vivo* hoặc có mặt dưới dạng monome và thay đổi cấu trúc gốc để có cấu trúc có hoạt tính trị liệu thấp, và đã được ghi nhận trước đây rằng có sự khác nhau đáng kể khi thể dung hợp protein, mà trong đó protein được dung hợp, được sử dụng cho mục đích trị liệu (van der Neut Kolfshoten, *et al.*, *Science*, 317:1554 đến 1557. 2007).

Ngoài ra, theo một phương án cụ thể khác, vùng Fc globulin miễn dịch theo sáng chế không chỉ bao gồm trình tự axit amin tự nhiên mà còn bao gồm chất tương tự trình tự của nó. Chất tương tự axit amin có nghĩa rằng biến đổi được chọn từ nhóm bao gồm biến đổi thay thế, thêm, bớt, cải biến, và tổ hợp của các biến đổi này xảy ra ở ít nhất một gốc axit amin của trình tự axit amin tự nhiên.

Ví dụ, gốc axit amin ở vị trí từ 214 đến 238, từ 297 đến 299, từ 318 đến 322, hoặc từ 327 đến 331 ở Fc IgG, mà được biết đến là quan trọng cho liên kết, có thể được sử dụng làm vị trí thích hợp cho biến đổi.

Ngoài ra, nhiều loại chất tương tự có thể được sử dụng, ví dụ, chất mà ở đó vùng có khả năng tạo thành liên kết disulfua được loại bỏ; chất mà tại đó một số axit amin đầu N từ Fc tự nhiên được loại bỏ; chất mà tại đó gốc methionin được bổ sung vào đầu N của Fc tự nhiên, v.v.. Ngoài ra, vị trí liên kết bổ sung (ví dụ, vùng liên kết C1q) hoặc vị trí gây độc tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC) có thể được loại

bỏ để loại bỏ chức năng của cơ quan phản ứng lại kích thích. Các kỹ thuật để tạo ra chất tương tự trình tự của vùng Fc globulin miễn dịch được bộc lộ trong công bố quốc tế số WO 97/34631, WO 96/32478, v.v..

Các axit amin thay thế ở phân tử protein hoặc peptit không làm thay đổi toàn bộ hoạt tính của phân tử đã được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật (H. Neurath, R. L. Hill, *The Proteins*, Academic Press, New York, 1979). Sự thay thế thông thường nhất xảy ra giữa gốc axit amin của Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Thy/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu, và Asp/Gly. Trong một số trường hợp, axit amin có thể được biến đổi bằng cách phosphoryl hóa, sulfat hóa, acryl hóa, glycosyl hóa, metyl hóa, farnesyl hóa, axetyl hóa, amit hóa, v.v..

Ngoài ra, chất tương tự Fc được mô tả ở trên có thể là chất mà có hoạt tính sinh học giống vùng Fc theo sáng chế, nhưng có độ ổn định cấu trúc của vùng Fc chống lại nhiệt, pH, v.v. tốt hơn.

Ngoài ra, vùng Fc này có thể thu được từ loại tự nhiên được phân lập từ người hoặc động vật (ví dụ, bò, dê, lợn, chuột, thỏ, chuột đồng, chuột cống, chuột lang, v.v.) hoặc có thể là chất tái tổ hợp hoặc chất tương tự của nó thu được từ tế bào động vật hoặc vi sinh vật được biến nạp. Trong sáng chế này, vùng Fc có thể thu được từ Fc tự nhiên bằng cách phân lập cả globulin miễn dịch từ cơ quan của người hoặc động vật và xử lý với proteaza. Papain tiêu hóa vùng Fc tự nhiên thành Fab và vùng Fc, và việc xử lý pepsin dẫn đến sản xuất mảnh pF'c và F(ab)₂. Các mảnh này được cho trải qua sắc ký rây phân tử để phân lập Fc hoặc pF'c. Theo phương án cụ thể khác, vùng Fc có thể là vùng Fc globulin miễn dịch tái tổ hợp mà ở đó vùng Fc có nguồn gốc từ người thu được từ vi sinh vật.

Ngoài ra, vùng Fc globulin miễn dịch có thể ở dạng glycan tự nhiên, glycan tăng hoặc giảm so với loại tự nhiên của nó, hoặc ở dạng khử glycosyl hóa hoặc aglycosyl hóa. Việc tăng, giảm hoặc loại bỏ glycan Fc globulin miễn dịch có thể đạt được bằng cách phương pháp thông thường như phương pháp hóa học, phương pháp enzym, và phương pháp kỹ thuật gen sử dụng vi sinh vật. Cụ thể, vùng Fc globulin miễn dịch mà tại đó glycan được loại bỏ khỏi vùng Fc thể hiện sự giảm đáng kể ở ái lực liên kết với bổ thể (C1q) và giảm hoặc loại bỏ sự gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể hoặc gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể, và do đó không gây ra đáp ứng miễn dịch không cần thiết *in vivo*. Về

điều này, vùng Fc globulin miễn dịch ở vùng Fc globulin miễn dịch được khử glycosyl hóa hoặc aglycosyl hóa có thể là dạng thích hợp hơn để phù hợp mục đích ban đầu của sáng chế như chất mang thuốc.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “khử glycosyl hóa” dùng để chỉ việc loại bỏ gốc đường khỏi vùng Fc bởi enzym, và thuật ngữ “aglycosyl hóa” dùng để chỉ vùng Fc không bị glycosyl hóa được tạo ra ở sinh vật nhân sơ, cụ thể hơn, *E. coli*.

Trong khi đó, vùng Fc globulin miễn dịch có thể có nguồn gốc từ người hoặc động vật (ví dụ, bò, dê, lợn, chuột, thỏ, chuột đồng, chuột cống, chuột lang, v.v.), và theo phương án cụ thể hơn, nó có thể có nguồn gốc từ người.

Ngoài ra, vùng Fc globulin miễn dịch có thể là vùng Fc có nguồn gốc từ IgG, IgA, IgD, IgE, IgM, hoặc tổ hợp hoặc thể lai của chúng. Theo phương án cụ thể khác, nó có thể có nguồn gốc từ IgG hoặc IgM, một trong số các protein có nhiều nhất trong máu người và theo phương án cụ thể khác nữa, nó có thể có nguồn gốc từ IgG, mà được biết đến là tăng cường thời gian bán hủy của protein liên kết phối tử. Theo phương án cụ thể khác, vùng Fc globulin miễn dịch có thể là vùng Fc IgG4, theo phương án cụ thể khác nữa, nó có thể là vùng Fc aglycosyl hóa có nguồn gốc từ IgG4 của người, và theo phương án cụ thể nhất, trình tự axit amin của vùng Fc globulin miễn dịch là SEQ ID NO: 9 và trình tự polynucleotit mã hóa trình tự axit amin có thể là SEQ ID NO: 7, tuy nhiên không giới hạn ở các vùng Fc globulin miễn dịch này.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “tổ hợp” có nghĩa là polypeptit mã hóa vùng Fc globulin miễn dịch chuỗi đơn có cùng nguồn gốc được liên kết với polypeptit chuỗi đơn khác nguồn gốc để tạo thành dime hoặc đa phân. Tức là, dime hoặc đa phân có thể được tạo ra từ hai hoặc nhiều mảnh được chọn từ nhóm bao gồm mảnh Fc của Fc IgG, Fc IgA, Fc IgM, Fc IgD, và Fc IgE.

Ngoài ra, enzym trị liệu hoặc protein dung hợp enzym theo sáng chế có thể là enzym mà tại đó đầu N và/hoặc đầu C của protein không được biến đổi, tuy nhiên, để bảo vệ enzym trị liệu khỏi proteaza và tăng độ ổn định của enzym trị liệu *in vivo*, các enzym trị liệu này hoặc protein dung hợp enzym mà tại đó đầu N và/hoặc đầu C của enzym trị liệu được biến đổi hóa học hoặc được bảo vệ bởi nhóm hữu cơ, hoặc đầu amin của enzym trị liệu được biến đổi bằng cách thêm axit amin, v.v. cũng được bao gồm trong phạm vi của protein theo sáng chế. Khi đầu C của enzym trị liệu không được biến đổi, đầu cuối của enzym trị liệu hoặc protein dung hợp enzym theo sáng chế có thể có

đầu cacboxyl, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn cụ thể ở các enzym trị liệu hoặc protein dung hợp enzym này.

Cụ thể, bởi vì đầu N và đầu C của protein được tổng hợp hóa học có điện tích, đầu N có thể được axetylat hóa và/hoặc đầu C có thể được amit hóa để loại bỏ các điện tích này, tuy nhiên không giới hạn cụ thể ở các phương pháp này.

Trừ khi chỉ ra cụ thể khác trong bản mô tả, các kỹ thuật liên quan đến “enzym” hoặc “protein dung hợp” theo sáng chế được mô tả chi tiết trong bản mô tả hoặc yêu cầu bảo hộ của sáng chế sẽ được áp dụng không chỉ đối với enzym hoặc protein dung hợp theo sáng chế, mà còn áp dụng với phạm vi mà bao gồm tất cả các muối của enzym hoặc protein dung hợp theo sáng chế (ví dụ, muối được dung của protein dung hợp), hoặc solvat của chúng. Theo đó, mặc dù chỉ được đề cập đơn giản là “enzym” hoặc “protein dung hợp” trong bản mô tả, phần mô tả đối tượng sẽ được áp dụng với muối cụ thể, solvat cụ thể, và solvat cụ thể của muối cụ thể. Các dạng muối này có thể ở dạng, ví dụ, sử dụng muối được dung bất kỳ, tuy nhiên không giới hạn cụ thể ở loại muối này. Các dạng muối này có thể là, ví dụ, dạng muối an toàn và hiệu quả cho động vật có vú, tuy nhiên không giới hạn cụ thể ở các dạng muối này.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “được dung” dùng để chỉ nguyên liệu mà có thể được sử dụng hiệu quả cho mục đích sử dụng mà không gây độc quá mức, gây kích thích hoặc phản ứng dị ứng, v.v., nằm trong phạm vi quyết định y được.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “muối được dung” dùng để chỉ muối có nguồn gốc từ muối vô cơ, muối hữu cơ, hoặc bazơ được dung. Ví dụ về các axit thích hợp có thể bao gồm axit clohydric, axit bromic, axit sulfuric, axit nitric, axit perchloric, axit fumaric, axit maleic, axit phosphoric, axit glycolic, axit lactic, axit salicylic, axit succinic, axit toluen-*p*-sulfonic, axit tartaric, axit axetic, axit xitric, axit methanesulfonic, axit formic, axit benzoic, axit malonic, axit naphtalen-2-sulfonic, axit benzenesulfonic, v.v.. Ví dụ về các muối có nguồn gốc từ bazơ thích hợp có thể bao gồm kim loại kiềm như natri, kali, v.v.; kim loại kiềm thổ như mangan; amoni, v.v..

Ngoài ra, như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “solvat” dùng để chỉ phức hợp được tạo thành giữa phân tử dung môi và enzym, protein dung hợp theo sáng chế, hoặc muối của nó.

Protein dung hợp enzym theo sáng chế có thể được sản xuất bằng phương pháp

đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật.

Theo phương án của sáng chế, vector tái tổ hợp được tạo ra mà tại đó *alpha*-galactosidaza (tức là, enzym trị liệu) có thể được biểu hiện ở dạng được dung hợp với cầu nối peptit-Fc globulin miễn dịch, và enzym trị liệu được tạo ra bằng cách biểu hiện nó trong dòng tế bào CHO (ví dụ 1 và 2).

Tuy nhiên, protein dung hợp enzym theo sáng chế có thể được sản xuất bằng các phương pháp khác các phương pháp được mô tả ở các phương án nêu trên. Protein dung hợp enzym theo sáng chế có thể bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 13, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở các trình tự axit amin này.

Protein dung hợp enzym theo sáng chế có thể làm tăng thời gian bán hủy của enzym trị liệu mà có hiệu quả trị liệu đối với LSD, bằng cách làm tăng độ ổn định *in vivo* của enzym trị liệu đồng thời duy trì hoạt tính của enzym trị liệu, bằng cách dung hợp enzym trị liệu với vùng Fc globulin miễn dịch. Cụ thể, enzym trị liệu được dung hợp với vùng Fc globulin miễn dịch được biến đổi làm giảm sự trao đổi chuỗi và glycosyl hóa, và do đó có thể có ái lực liên kết thấp hơn đối với thụ thể tiêu thể so với enzym trị liệu mà Fc không được dung hợp vào đó, và qua đó có thể có thời gian tồn tại lâu, chứng thực rằng enzym trị liệu này có hiệu quả điều trị LSD.

Một khía cạnh khác nữa của sáng chế đề xuất được phẩm ngăn chặn hoặc điều trị LSD chứa protein dung hợp enzym làm thành phần hoạt tính.

Dược phẩm theo sáng chế đặc trưng ở chỗ thời gian tồn tại *in vivo* và độ ổn định của enzym trị liệu được tăng lên.

Cụ thể là, protein dung hợp enzym của dược phẩm theo sáng chế có thể là protein mà trong đó *alpha*-galactosidaza A và vùng Fc globulin miễn dịch được dung hợp cùng nhau, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở các protein dung hợp này.

Ngoài ra, dược phẩm theo sáng chế có thể làm dược phẩm mà trong đó *alpha*-galactosidaza A (tức là, enzym trị liệu) ở protein dung hợp cũng có thể tạo thành dime khi vùng Fc globulin miễn dịch tạo thành dime, và cụ thể hơn, dime của *alpha*-galactosidaza A là dime được tạo thành bởi liên kết không cộng hóa trị lẫn nhau, và cụ thể, nó đặc trưng ở chỗ dime được tạo thành theo hướng đối song song.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “tiêu thể”, là một bào quan có trong tế bào chất, chứa nhiều enzym xúc tác thủy phân và do đó phân giải nguyên liệu không mong muốn trong cơ thể như đại phân tử, vi khuẩn, v.v., và hỗ trợ trong việc sử

dụng các sản phẩm phân giải ở các phần khác của tế bào. Chức năng của tiêu thể có thể được thực hiện bởi nhiều enzym. Khi enzym cụ thể mất chức năng của nó do biến đổi, thiếu hụt, v.v., nó có gây ra mất chức năng phân giải của tiêu thể và dẫn đến tích tụ đại phân tử, v.v., mà phải được phân giải, trong tế bào và gây hư hỏng tế bào, v.v. do đó gây bệnh.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "bệnh tích tụ các chất trong tiêu thể (lysosomal storage disease - LSD)" dùng để chỉ bệnh di truyền hiếm do mất chức năng tiêu thể được mô tả ở trên, và liệu pháp thay thế enzym sử dụng enzym khiếm khuyết là cần thiết. LSD có thể bao gồm bệnh tích tụ mucopolysaccharit (MPS), bệnh tích tụ glycogen, bệnh tích tụ sphingolipit, bệnh Niemann-Pick, bệnh Fabry, bệnh Gaucher, hội chứng Hunter, hội chứng Maroteaux-Lamy, v.v..

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "bệnh Fabry", là bệnh LSD, được di truyền dưới dạng lặn liên quan đến nhiễm sắc thể giới tính và gây ra bởi sự bất hoạt X. Bệnh Fabry là rối loạn chuyển hóa bẩm sinh glycosphingolipit mà xảy ra do không có hoặc thiếu hoạt tính của *alpha*-galactosidaza A, mà là enzym xúc tác thủy phân có mặt trong tiêu thể. Sự khiếm khuyết ở *alpha*-galactosidaza A được biết đến là gây ra tích tụ bất thường của globotriaosylceramit (Gb3) ở thành tĩnh mạch và nhiều phần của cơ thể (ví dụ, da, thận, tim, hệ thần kinh, v.v.) và do đó ảnh hưởng tuần hoàn máu và làm giảm việc cung cấp chất dinh dưỡng. Các triệu chứng của chứng giảm tiết mồ hôi (không tiết mồ hôi), cảm giác kiến bò, đau dữ dội, đau thắt ngực, mờ giác mạc, thiếu máu cơ tim, nhồi máu cơ tim, suy thận, v.v. có thể được biểu hiện, dẫn đến suy thận và cuối cùng dẫn đến tử vong.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "ngăn ngừa" dùng để chỉ tất cả các hành động ngăn chặn hoặc trì hoãn sự xuất hiện của LSD bằng cách dùng protein dung hợp enzym hoặc được phẩm chứa protein dung hợp enzym, và thuật ngữ "điều trị" dùng để chỉ tất cả các hành động cải thiện hoặc làm thay đổi có lợi các triệu chứng của LSD bằng cách dùng protein dung hợp enzym hoặc được phẩm chứa protein dung hợp enzym.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "dùng" dùng để chỉ việc đưa chất cụ thể vào bệnh nhân bằng phương pháp bất kỳ thích hợp, và đường dùng của được phẩm có thể là đường dùng thông thường mà có thể phân phối được phẩm đến đích *in vivo*, ví dụ, dùng trong bụng, tiêm tĩnh mạch, dùng trong cơ, dùng dưới da, dùng trong

da, dùng theo đường miệng, dùng khu trú, dùng trong mũi, dùng trong phổi, dùng trong ruột, v.v.. Tuy nhiên, bởi vì peptit bị tiêu hóa khi dùng theo đường miệng, thành phần hoạt tính của dược phẩm để dùng theo đường miệng tốt hơn là được phủ hoặc được bào chế để bảo vệ chống lại sự phân hủy trong dạ dày, và cụ thể là, có thể được dùng ở dạng viên. Ngoài ra, dược phẩm có thể được dùng bằng cách sử dụng thiết bị nhất định có khả năng vận chuyển thành phần hoạt tính vào tế bào đích.

Tổng lượng liều có hiệu quả của dược phẩm theo sáng chế có thể được dùng cho bệnh nhân ở liều đơn hoặc có thể được dùng trong thời gian dài ở liều đa theo quy trình điều trị phân tách. Ở dược phẩm theo sáng chế, hàm lượng của thành phần hoạt tính có thể thay đổi phụ thuộc vào mức độ nghiêm trọng của bệnh. Cụ thể là, tổng liều hàng ngày của protein dung hợp theo sáng chế có thể nằm trong khoảng từ 0,0001 mg đến 500 mg trên 1 kg trọng lượng cơ thể của bệnh nhân. Tuy nhiên, liều có hiệu quả của protein dung hợp được xác định khi xem xét đến nhiều yếu tố khác nhau bao gồm tuổi của bệnh nhân, trọng lượng cơ thể, tình trạng sức khỏe, giới tính, mức độ nghiêm trọng của bệnh, chế độ ăn, tốc độ bài tiết, v.v., ngoài ra còn có đường dùng và tần suất điều trị của dược phẩm. Về vấn đề này, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật có thể dễ dàng xác định liều có hiệu quả thích hợp để sử dụng cụ thể dược phẩm theo sáng chế. Dược phẩm theo sáng chế không bị giới hạn cụ thể ở cách bào chế, đường dùng, và phương pháp, miễn là nó thể hiện lợi ích của theo sáng chế.

Trong sáng chế, liều thực tế của protein dung hợp enzym được sử dụng làm chất mang có thể được xác định dựa vào loại của enzym trị liệu được sử dụng làm thành phần hoạt tính cùng với các nhiều yếu tố khác như bệnh cần điều trị, đường dùng, tuổi tác, giới tính, và trọng lượng của bệnh nhân, mức độ nghiêm trọng của bệnh, v.v.. Bởi vì protein dung hợp enzym theo sáng chế có thời gian tồn tại *in vivo* vượt trội đáng kể, liều, số lượng, và tần suất dùng dược phẩm chứa protein dung hợp enzym theo sáng chế có thể được giảm đáng kể.

Dược phẩm theo sáng chế có thể còn chứa chất mang chấp nhận được trong lĩnh vực dược, tá dược, hoặc chất pha loãng. Chất mang chấp nhận được trong lĩnh vực dược có thể không tồn tại trong tự nhiên.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “dược dụng/chấp nhận được trong lĩnh vực dược” dùng để chỉ các đặc tính có lượng đủ để có hiệu quả trị liệu và không gây ra tác dụng phụ, và có thể dễ dàng được xác định bởi người có hiểu biết trung

bình trong lĩnh vực kỹ thuật dựa vào các yếu tố đã biết rõ trong lĩnh vực y học, như loại bệnh, tuổi tác, trọng lượng, tình trạng sức khỏe, giới tính, độ nhạy thuốc của bệnh nhân, đường dùng, phương pháp dùng, tần suất dùng, thời gian điều trị, (các) thuốc được trộn hoặc được dùng đồng thời, v.v..

Chất mang chấp nhận được trong lĩnh vực dược có thể bao gồm, để dùng theo đường miệng, chất kết dính, chất keo, chất tan rã, tá dược, chất hòa tan, chất phân tán, chất ổn định, chất tạo huyền phù, chất tạo màu, chất tạo hương vị, v.v.; để tiêm, chất đệm, chất bảo quản, chất giảm đau, chất hòa tan, chất đẳng trương, chất ổn định, v.v., có thể được kết hợp để sử dụng; và để dùng khu trú, bazơ, tá dược, chất làm trơn, chất bảo quản, v.v..

Loại bào chế của dược phẩm theo sáng chế có thể được tạo ra khác nhau theo từng trường hợp bằng cách kết hợp với chất mang dược dụng được mô tả ở trên. Ví dụ, để dùng theo đường miệng, dược phẩm có thể được bào chế thành viên nén, viên tròn dẹt, viên nang, viên ngọt, huyền phù, si rô, viên nhện, v.v.. Để tiêm, dược phẩm có thể được bào chế thành ống thuốc tiêm liều đơn vị hoặc vật chứa đa liều. Ngoài ra, dược phẩm có thể còn được bào chế thành dạng dung dịch, huyền phù, viên nén, viên nhỏ, viên nang, dạng bào chế giải phóng lâu dài, v.v..

Trong khi đó, ví dụ về chất mang thích hợp, tá dược, và chất pha loãng có thể bao gồm lactoza, dextroza, sucroza, sorbitol, mannitol, xylitol, erythritol, maltitol, tinh bột, cao su cây keo, alginat, gelatin, canxi phosphat, canxi silicat, xenluloza, metyl xenluloza, xenluloza vi tinh thể, polyvinylpyrrolidon, nước, metyl hydroxybenzoat, propyl hydroxybenzoat, bột tan, mangan stearat, dầu khoáng, v.v.. Ngoài ra, dược phẩm có thể còn chứa chất làm đầy, chất chống đông, chất làm trơn, chất hút ẩm, chất tạo hương vị, chất bảo quản, v.v..

Ngoài ra, protein dung hợp enzym có thể được sử dụng bằng cách trộn với nhiều chất mang chấp nhận được trong lĩnh vực dược được cấp phép dùng làm thuốc dược phẩm như muối sinh lý hoặc dung môi hữu cơ. Để tăng độ ổn định hoặc khả năng hấp thụ, cacbohydrat như glucoza, sucroza, hoặc dextran, và chất chống oxy hóa như axit ascorbic và glutathion, chất tạo vòng càng, protein khối lượng phân tử thấp, hoặc chất ổn định khác có thể được sử dụng làm thuốc dược phẩm.

Dược phẩm có thể chứa các thành phần nêu trên (thành phần hoạt tính) với lượng là từ 0,01% đến 99% (khối lượng/thể tích), tuy nhiên không giới hạn ở lượng này.

Một khía cạnh khác nữa của sáng chế đề xuất polynucleotit mã hóa protein dung hợp enzym theo sáng chế.

Polynucleotit mã hóa protein dung hợp enzym theo sáng chế có thể là polynucleotit ở dạng mà tại đó một phần mã hóa enzym trị liệu và một phần mã hóa cầu nối peptit-vùng Fc globulin miễn dịch được liên kết, và cụ thể là, polynucleotit mã hóa protein dung hợp mà tại đó đầu N của vùng Fc globulin miễn dịch được liên kết với đầu C của enzym trị liệu thông qua cầu nối GGGGS, tuy nhiên không giới hạn ở các polynucleotit này. Cụ thể hơn, polynucleotit theo sáng chế có thể bao gồm trình tự của SEQ ID NO: 12, tuy nhiên không giới hạn ở trình tự này miễn là polynucleotit có thể mã hóa protein dung hợp giữa enzym trị liệu và vùng Fc globulin miễn dịch.

Một khía cạnh khác nữa của sáng chế đề xuất vector tái tổ hợp biểu hiện bao gồm polynucleotit.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “vector tái tổ hợp” dùng để chỉ cấu trúc ADN mà tại đó peptit đích (ví dụ, protein dung hợp enzym) được liên kết hoạt động với trình tự đối chứng thích hợp để có thể biểu hiện peptit đích (ví dụ, protein dung hợp enzym) ở vật chủ thích hợp. Vector tái tổ hợp theo sáng chế có thể được thiết kế như vector để tách dòng thông thường hoặc làm vector biểu hiện, và có thể được thiết kế bằng cách sử dụng tế bào nhân sơ hoặc tế bào nhân thực làm tế bào vật chủ.

Trình tự đối chứng bao gồm vùng khởi đầu có khả năng bắt đầu phiên mã, trình tự vận hành bất kỳ để kiểm soát phiên mã, trình tự mã hóa vùng liên kết ribosom mRNA thích hợp, và trình tự kiểm soát sự kết thúc phiên mã và dịch mã. Vector tái tổ hợp, sau khi được biến nạp vào tế bào vật chủ thích hợp, có thể được tái bản hoặc hoạt động bất kể bộ gen của vật chủ, hoặc có thể được tích hợp vào chính bộ gen của vật chủ.

Vector tái tổ hợp được sử dụng trong sáng chế có thể không bị giới hạn cụ thể miễn là vector có thể tái bản ở tế bào vật chủ, và có thể được thiết kế bằng cách sử dụng vector bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật. Ví dụ về vector có thể bao gồm plasmit tự nhiên hoặc tái tổ hợp, cosmit, virus, và thực khuẩn. Vector mà có thể được sử dụng trong sáng chế không bị giới hạn cụ thể tuy nhiên bất kỳ vector biểu hiện đã biết nào đều có thể được sử dụng.

Vector tái tổ hợp được sử dụng để biến nạp tế bào vật chủ để sản xuất protein dung hợp enzym theo sáng chế. Ngoài ra, các tế bào được biến nạp này, là một phần theo sáng chế, có thể được sử dụng để khuếch đại mảnh axit nucleic và vector, hoặc

chúng có thể là tế bào được nuôi cấy hoặc dòng tế bào được sử dụng trong sản xuất tái tổ hợp protein dung hợp enzym theo sáng chế.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “biến nạp” dùng để chỉ quá trình đưa vector tái tổ hợp bao gồm polynucleotit mã hóa protein đích (ví dụ, enzym trị liệu, protein dung hợp enzym) vào tế bào vật chủ, qua đó có thể biểu hiện protein được mã hóa bởi polynucleotit ở tế bào vật chủ. Đối với polynucleotit được biến nạp, không có vấn đề gì nếu nó được chèn vào nhiễm sắc thể của tế bào vật chủ và nằm ở đó hoặc nằm ở bên ngoài nhiễm sắc thể, miễn là nó có thể được biểu hiện ở tế bào vật chủ, và cả hai trường hợp đều được bao gồm.

Ngoài ra, polynucleotit bao gồm ADN và ARN mà mã hóa protein đích. Polynucleotit có thể được chèn ở dạng bất kỳ miễn là nó có thể được đưa vào tế bào vật chủ và được biểu hiện ở đó. Ví dụ, polynucleotit có thể được đưa vào tế bào vật chủ ở dạng băng biểu hiện, mà là cấu trúc gen bao gồm tất cả các yếu tố thiết yếu cần để tự biểu hiện. Băng biểu hiện có thể thường bao gồm vùng khởi đầu được liên kết hoạt động với polynucleotit, tín hiệu kết thúc phiên mã, vùng liên kết ribosom, và tín hiệu kết thúc dịch mã. Băng biểu hiện có thể ở dạng vector biểu hiện có khả năng tự tái bản. Ngoài ra, polynucleotit có thể được đưa vào tế bào vật chủ như là và được liên kết hoạt động với trình tự cần thiết cho sự biểu hiện của nó ở tế bào vật chủ, tuy nhiên không giới hạn ở các polynucleotit này.

Ngoài ra, như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “liên kết hoạt động” dùng để chỉ liên kết chức năng giữa trình tự vùng khởi đầu, mà bắt đầu và làm trung gian điều chỉnh quá trình phiên mã của polynucleotit mã hóa peptit đích theo sáng chế, và trình tự gen nêu trên.

Vật chủ thích hợp được sử dụng trong sáng chế có thể không bị giới hạn cụ thể miễn là nó có thể biểu hiện polynucleotit theo sáng chế. Ví dụ về vật chủ thích hợp có thể bao gồm vi khuẩn thuộc chi *Escherichia* như *E. coli*; vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* như *Bacillus subtilis*; vi khuẩn thuộc chi *Pseudomonas* như *Pseudomonas putida*; nấm men như *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, và *Schizosaccharomyces pombe*; tế bào côn trùng như *Spodoptera frugiperda* (Sf9); và tế bào động vật như CHO, COS, BSC, v.v..

Một khía cạnh khác nữa của sáng chế đề xuất thể biến nạp mà vector biểu hiện được đưa vào đó.

Đối với mục đích của sáng chế, thể biến nạp mà vector biểu hiện theo sáng chế được đưa vào đó có thể không bị giới hạn miễn là thể biến nạp có thể biểu hiện và sản xuất protein dung hợp enzym, trừ thể biến nạp có thể vi khuẩn thuộc chi *Escherichia* như *E. coli*; vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* như *Bacillus subtilis*; vi khuẩn thuộc chi *Pseudomonas* như *Pseudomonas putida*; nấm men như *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, và *Schizosaccharomyces pombe*; tế bào côn trùng như *Spodoptera frugiperda* (Sf9); và tế bào động vật như CHO, COS, BSC, v.v..

Một khía cạnh khác nữa của sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất protein dung hợp enzym theo sáng chế.

Cụ thể là, phương pháp có thể bao gồm (a) nuôi cấy thể biến nạp để thu mẫu nuôi cấy; và

(b) thu hồi protein dung hợp enzym từ mẫu nuôi cấy, tuy nhiên không giới hạn ở các phương pháp này.

Trong sáng chế, môi trường được sử dụng trong nuôi cấy thể biến nạp phải đáp ứng các yêu cầu cho nuôi cấy tế bào vật chủ theo cách thích hợp. Nguồn cacbon mà có thể có trong môi trường để tăng trưởng tế bào vật chủ có thể được lựa chọn thích hợp theo quyết định của người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật theo loại của thể biến nạp được tạo ra từ đó, và các điều kiện nuôi cấy thích hợp có thể được lựa chọn để kiểm soát thời gian và lượng nuôi cấy.

Ví dụ về nguồn đường được sử dụng trong môi trường có thể bao gồm đường và cacbohydrat như glucoza, saccaroza, lactoza, fructoza, maltoza, tinh bột, và xenluloza; dầu và chất béo như dầu đậu nành, dầu hướng dương, dầu hải ly, và dầu dừa; axit béo như axit palmitic, axit stearic, và axit linoleic; alcohol như glyxerol và etanol; và axit hữu cơ như axit axetic. Nguyên liệu này có thể được sử dụng một mình hoặc kết hợp.

Ví dụ về nguồn nitơ được sử dụng có thể bao gồm pepton, chất chiết nấm men, nước thịt, chất chiết mạch nha, nước ngâm ngô, bột đậu nành, và urê, hoặc hợp chất vô cơ như amoni sulfat, amoni clorua, amoni phosphat, amoni cacbonat, và amoni nitrat. Nguồn nitơ có thể được sử dụng một mình hoặc kết hợp.

Ví dụ về nguồn phospho được sử dụng có thể bao gồm kali dihydro phosphat hoặc dikali hydro phosphat hoặc muối chứa natri tương ứng. Ngoài ra, môi trường nuôi cấy có thể chứa muối kim loại như mangan sulfat hoặc sắt sulfat cần cho tăng trưởng.

Cuối cùng, nguyên liệu tăng trưởng thiết yếu như axit amin và vitamin có thể

được sử dụng. Ngoài ra, tiền chất thích hợp cho môi trường nuôi cấy có thể cũng được sử dụng. Các nguồn này có thể được thêm một cách thích hợp vào mẫu nuôi cấy bằng cách nuôi cấy theo mẻ hoặc nuôi cấy liên tục. pH của mẫu nuôi cấy được điều chỉnh một cách thích hợp sử dụng hợp chất bazơ như natri hydroxit, kali hydroxit, và amoniac, hoặc hợp chất axit như axit phosphoric hoặc axit sulfuric. Ngoài ra, chất tạo bọt như polyglycol este axit béo có thể được thêm vào để ngăn chặn sự tạo thành bọt. Ngoài ra, để duy trì trạng thái có khí của mẫu nuôi cấy, oxy hoặc khí chứa oxy (ví dụ, không khí) có thể được bơm vào mẫu nuôi cấy.

Thế biến nạp theo sáng chế có thể được nuôi cấy ở nhiệt độ từ 20°C đến 45°C, và cụ thể là, từ 25°C đến 40°C. Ngoài ra, việc nuôi cấy được tiếp tục cho đến khi thu được lượng tối đa lượng sản xuất của enzym trị liệu hoặc protein dung hợp enzym mong muốn, và về vấn đề này, việc nuôi cấy thông thường có thể được tiếp tục trong khoảng thời gian từ 10 giờ đến 160 giờ.

Như được mô tả ở trên, thế biến nạp theo sáng chế có thể sản xuất enzym trị liệu hoặc protein dung hợp enzym được cung cấp các điều kiện nuôi cấy thích hợp theo tế bào vật chủ, và enzym trị liệu hoặc protein dung hợp enzym được sản xuất theo cấu tạo của vectơ và đặc tính của tế bào vật chủ có thể được tiết trong tế bào chất vào chu chất của tế bào vật chủ hoặc ngoại bào.

Protein được biểu hiện bên trong hoặc bên ngoài tế bào vật chủ có thể được tinh sạch bởi phương pháp thông thường. Ví dụ về phương pháp tinh sạch có thể bao gồm loại muối (ví dụ, kết tủa amoni sulfat, kết tủa natri phosphat, v.v.), kết tủa dung môi (ví dụ, protein kết tủa từng phần sử dụng axeton hoặc etanol, v.v.), thẩm tách, lọc gel, trao đổi ion, hoặc sắc ký như sắc ký cột pha đảo, siêu lọc, v.v., và các phương pháp này có thể được sử dụng một mình hoặc kết hợp.

Một khía cạnh khác nữa của sáng chế đề xuất phương pháp mà bao gồm bước cho đối tượng dùng protein dung hợp enzym hoặc dược phẩm để ngăn ngừa hoặc điều trị LSD chứa protein dung hợp.

Bởi vì protein dung hợp enzym theo sáng chế chứa enzym trị liệu mà có thể ngăn ngừa hoặc điều trị LSD, LSD có thể được ngăn ngừa hoặc điều trị bằng cách cho đối tượng mắc LSD dùng protein dung hợp enzym chứa enzym trị liệu hoặc dược phẩm chứa protein dung hợp enzym.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “đối tượng” dùng để chỉ đối

tượng mắc bệnh LSD, và đối tượng mắc bệnh LSD là động vật có vú bao gồm người, chuột cống, gia súc, v.v. mà có hoặc có nguy cơ phát triển thành LSD, tuy nhiên bất kỳ đối tượng nào mà có thể được điều trị với protein dung hợp enzym theo sáng chế hoặc được phẩm chứa protein dung hợp enzym đều được bao gồm không giới hạn.

Phương pháp theo sáng chế có thể bao gồm dùng lượng có hiệu quả dược lý của dược phẩm chứa protein dung hợp enzym. Tổng lượng liều hàng ngày thích hợp của dược phẩm có thể được xác định trong phạm vi đánh giá y tế chính xác bởi thầy thuốc, và dược phẩm có thể được dùng một lần hoặc một vài lần theo liều được chia ra trên ngày. Tuy nhiên, đối với mục đích của sáng chế, tốt hơn là, liều có hiệu quả trị liệu cụ thể của dược phẩm có bệnh nhân cụ thể bất kỳ được áp dụng khác nhau phụ thuộc vào nhiều yếu tố khác nhau bao gồm loại và mức độ đáp ứng đạt được, hỗn hợp cụ thể bao gồm cả chất khác đôi khi được sử dụng thêm vào đó, tuổi của bệnh nhân, trọng lượng, tình trạng sức khỏe, giới tính và chế độ ăn, thời gian dùng, đường dùng, tốc độ bài tiết của dược phẩm, thời gian điều trị, các thuốc khác được sử dụng kết hợp hoặc đồng thời với hỗn hợp cụ thể, và các yếu tố tương tự đã biết rõ trong lĩnh vực y tế.

Trong khi đó, phương pháp để ngăn ngừa hoặc điều trị LSD có thể là liệu pháp kết hợp mà còn bao gồm bước dùng hợp chất hoặc nguyên lại có hiệu quả trị liệu cho ít nhất một LSD, tuy nhiên không giới hạn ở các phương pháp này.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “kết hợp” phải được hiểu là việc dùng đồng thời, riêng biệt hoặc liên tục. Khi dùng liên tục hoặc riêng biệt, khoảng thời gian cho phép để dùng thành phần thứ hai phải là khoảng thời gian mà không làm mất hiệu quả có lợi của việc kết hợp.

Liều dùng của protein dung hợp enzym có hoạt tính trị liệu đối với LSD có thể nằm trong khoảng từ 0,0001 μ g đến 500 mg trên 1 kg trọng lượng cơ thể của bệnh nhân, tuy nhiên không giới hạn cụ thể ở các liều này.

Một khía cạnh khác nữa của sáng chế đề xuất việc sử dụng protein dung hợp enzym, hoặc dược phẩm chứa protein dung hợp enzym để bào chế thuốc (hoặc dược phẩm) để ngăn ngừa hoặc điều trị LSD.

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn với tham chiếu đến các ví dụ sau. Tuy nhiên, các ví dụ này chỉ nhằm mục đích minh họa và không làm giới hạn phạm vi của sáng chế.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Sản xuất protein dung hợp enzym

Để sản xuất protein dung hợp enzym bao gồm enzym trị liệu ở dạng dime đối song song, các tác giả sáng chế đã dung hợp *alpha*-galactosidaza tự nhiên, cầu nối (SEQ ID NO: 10), và vùng globulin miễn dịch Fc (SEQ ID NO: 7) ở mức độ gen, và chèn sản phẩm dung hợp vào vector biểu hiện.

Để loại bỏ vị trí để trao đổi chuỗi và N-glycosyl hóa ở vùng Fc của protein dung hợp được thiết kế, sử dụng kỹ thuật PCR gây đột biến gen hướng vùng.

Cụ thể là, axit amin thứ 2 của vùng Fc (tức là, serin) có trao đổi chuỗi được thế bằng prolin sử dụng môi (SEQ ID NO: 1 và 2), và axit amin thứ 71 của vùng Fc (tức là, asparagin) có N-glycosyl hóa được thế bằng glutamin sử dụng môi (SEQ ID NO: 3 và 4) từ vùng Fc (SEQ ID NO: 8).

Bảng1: Môi để gây đột biến gen

Môi	Trình tự	SEQ ID NO
Fc(S2P)_F	5'- CTGGCGGTGGCGGATCGCCACCATGCCCAGCA CCTGAGTTCCT-3'	1
Fc(S2P)_R	5'- AGGAACTCAGGTGCTGGGCATGGTGGCGATCC GCCACCGCCAG-3'	2
Fc(N71Q)_F	5'- AGCCGCGGGAGGAGCAGTTCCAAAGCACGTAC CGTGTGGTCAG-3'	3
Fc(N71Q)_R	5'- CTGACCACACGGTACGTGCTTTGGAAGTCTCC TCCCGCGGCT-3'	4

Polynucleotit mã hóa protein dung hợp *alpha*-galactosidaza–Fc được tổng hợp được chèn vào vector biểu hiện (vector XOGC) sử dụng enzym cắt giới hạn. Cả *Bam*HI và *Xho*I đều là enzym cắt giới hạn mà không phân cắt *alpha*-galactosidaza và vùng

globulin miễn dịch Fc. *Alpha*-galactosidaza–Fc được phân cắt với enzym giới hạn ở trên được chèn vào vector XOGC được phân cắt với cùng một enzym giới hạn, và do đó vector có khả năng biểu hiện protein dung hợp *alpha*-galactosidaza–Fc được hoàn thiện. *Alpha*-galactosidaza tạo thành dime đối song song khi vùng Fc globulin miễn dịch tạo thành dime.

Trình tự ADN và protein của *alpha*-galactosidaza–Fc được thể hiện ở bảng 2 dưới đây, trong đó phần gạch chân thể hiện trình tự tín hiệu, phần in đậm thể hiện axit amin được thế, và phần in nghiêng thể hiện cầu nối.

Bảng 2: ADN trình tự và protein trình tự của protein dung hợp enzym

Tên	Trình tự		SEQ ID NO
<i>alpha</i> -Galactosidaza–Fc	ADN	<u>ATGCAGCTGA GGAACCCAGA ACTACATCTG</u> <u>GGCTGCGCGC TTGCGCTTCG CTCCTGGCC</u> <u>CTCGTTTCCT GGGACATCCC TGGGGCTAGA</u> <u>GCACTGGACA ATGGATTGGC AAGGACGCCT</u> ACCATGGGCT GGCTGCACTG GGAGCGCTTC ATGTGCAACC TTGACTGCCA GGAAGAGCCA GATTCCTGCA TCAGTGAGAA GCTCTTCATG GAGATGGCAG AGCTCATGGT CTCAGAAGGC TGGAAGGATG CAGGTTATGA GTACCTCTGC ATTGATGACT GTTGGATGGC TCCCCAAAGA GATTCAGAAG GCAGACTTCA GGCAGACCCT CAGCGCTTTC CTCATGGGAT TCGCCAGCTA GCTAATTATG TTCACAGCAA AGGACTGAAG CTAGGGATTT ATGCAGATGT TGGAAATAAA ACCTGCGCAG GCTTCCCTGG GAGTTTTGGA TACTACGACA TTGATGCCCA GACCTTTGCT GACTGGGGAG TAGATCTGCT AAAATTTGAT GGTTGTTACT GTGACAGTTT GGAAAATTTG GCAGATGGTT ATAAGCACAT GTCCTTGGCC CTGAATAGGA CTGGCAGAAG CATTGTGTAC	12

		TCCTGTGAGT GGCCTCTTTA TATGTGGCCC TTTCAAAAGC CCAATTATAC AGAAATCCGA CAGTACTGCA ATCACTGGCG AAATTTTGCT GACATTGATG ATTCCTGGAA AAGTATAAAG AGTATCTTGG ACTGGACATC TTTTAACCAG GAGAGAATTG TTGATGTTGC TGGACCAGGG GGTTGGAATG ACCCAGATAT GTTAGTGATT GGCAACTTTG GCCTCAGCTG GAATCAGCAA GTAAGTCAGA TGGCCCTCTG GGCTATCATG GCTGCTCCTT TATTCATGTC TAATGACCTC CGACACATCA GCCCTCAAGC CAAAGCTCTC CTTCAGGATA AGGACGTAAT TGCCATCAAT CAGGACCCCT TGGGCAAGCA AGGGTACCAG CTTAGACAGG GAGACAACTT TGAAGTGTGG GAACGACCTC TCTCAGGCTT AGCCTGGGCT GTAGCTATGA TAAACCGGCA GGAGATTGGT GGACCTCGCT CTTATACCAT CGCAGTTGCT TCCCTGGGTA AAGGAGTGGC CTGTAATCCT GCCTGCTTCA TCACACAGCT CCTCCCTGTG AAAAGGAAGC TAGGGTTCTA TGAATGGACT TCAAGGTAA GAAGTCACAT AAATCCCACA GGCACTGTTT TGCTTCAGCT AGAAAATACA ATGCAGATGT CATTAAAAGA CTTACTTGGC GGCGGAGGTT CAGGTGGTGG TGGCTCTGGC GGTGGAGGGT CGGGGGGAGG CGGCTCTGGA GGAGGGGGCT CCGGTGGGGG AGGTAGCCCA CCATGCCCAG CACCTGAGTT CCTGGGGGGA CCATCAGTCT TCCTGTTCCC CCCAAACCC AAGGACACCC TCATGATCTC CCGGACCCCT GAGGTCACAT GCGTGGTGGT GGACGTGAGC CAGGAAGACC CTGAGGTCCA GTTCAACTGG	
--	--	--	--

		TACGTGGACG GCGTGGAGGT GCATAATGCC AAGACAAAGC CGCGGGAGGA GCAGTTCCAA AGCACGTACC GTGTGGTCAG CGTCCTCACC GTCCTGCACC AGGACTGGCT GAATGGCAAG GAGTACAAGT GCAAGGTCTC CAACAAAGGC CTCCCATCCT CCATCGAGAA AACCATCTCC AAAGCCAAAG GGCAGCCCCG AGAACCACAG GTGTACACCC TGCCCCCATC CCAGGAGGAG ATGACCAAGA ACCAGGTCAG CCTGACCTGC CTGGTCAAAG GCTTCTATCC CAGCGACATC GCCGTGGAGT GGGAGAGCAA TGGGCAGCCG GAGAACAAC TACAAGACCAC GCCTCCCGTG CTGGACTCCG ACGGCTCCTT CTCCTCTAC AGCAGGCTAA CCGTGGACAA GAGCAGGTGG CAGGAGGGGA ACGTCTTCTC ATGCTCCGTG ATGCATGAGG CTCTGCACAA CCACTACACG CAGAAGAGCC TCTCCCTGTC TCTGGGTAAA TGA	
	Protein	<u>MQLRNPELHL GCALALRFLA LVSWDIPGAR</u> <u>ALDNGLARTP</u> TMGWLHWERF MCNLDCQEEP DSCISEKLFM EMAELMVSEG WKDAGYEYLC IDDCWMAPQR DSEGRLQADP QRFPHGIRQL ANYVHSKGLK LGIYADVGNK TCAGFPGSFG YYDIDAQTFA DWGVDLLKFD GCYCDSLENL ADGYKHMSLA LNRTGRSIVY SCEWPLYMWP FQKPNYTEIR QYCNHWRNFA DIDDSWKSII SILDWTSFNQ ERIVDVAGPG GWNDPDMLVI GNFGLSWNQQ VTQMALWAIM AAPLFMSNDL RHISPQAKAL LQDKDVIAIN QDPLGKQGYQ	13

		LRQGDNFEVW ERPLSGLAWA VAMINRQEIG GPRSYTIAVA SLGKGVACNP ACFITQLLPV KRKLGIFYEW SRLRSHINPT GTVLLQLENT MQMSLKDLLG GGGSGGGGSG GGGSGGGGSG GGGSGGGGSP PCPAPEFLGG PSVFLFPPKP K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S QEDPEVQFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQFQ S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K EYKCKVSNKG LPSSIEKTIS KAKGQPREPQ V Y T L P P S Q E E M T K N Q V S L T C LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV L D S D G S F F L Y S R L T V D K S R W QEGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSLGK	
--	--	--	--

Protein dung hợp enzym vector biểu hiện được sản xuất ở ví dụ 1 được đặt tên là *alpha*-galactosidaza-Fc.

Ví dụ 2: Xác định hoạt tính enzym *in vitro* của protein dung hợp enzym

Ví dụ 2-1: Sản xuất protein dung hợp *alpha*-galactosidaza-Fc

Alpha-galactosidaza-vector biểu hiện Fc (pX0GC-*alpha* galactosidaza-Fc) được tạo ra ở ví dụ 1 được biến nạp vào dòng tế bào CHO-S và do đó dòng tế bào có khả năng sản xuất sinh khối của protein dung hợp *alpha*-galactosidaza-Fc được tạo ra.

Cụ thể là, tế bào CHO-S được cho sinh trưởng bằng cách nuôi cấy huyền phù trong bình Erlenmeyer 1L (Corning Inc., Cat. No. 431147) sử dụng môi trường không có huyết thanh (FreeStyle™ CHO Expression Medium, Thermo Fisher Scientific, Cat. No. 12651014). Khi tế bào trong bình nuôi cấy đạt hợp lưu là 5×10^8 tế bào, chúng được biến nạp sử dụng FreeStyle™ MAX (Thermo Fisher Scientific, Cat. No. 16447-100). Tức là, mỗi ống được nạp độc lập với 10 mL OptiPro™ SFM (Thermo Fisher Scientific, Cat. No. 12309-019), và sau đó, một ống được nạp với 500 µg ADN và ống còn lại được nạp với 500 µL FreeStyle™ MAX. Hai dung dịch trong mỗi ống được trộn đều, để ở nhiệt độ phòng trong 10 phút, và được thêm vào tế bào mà trong đó môi trường được thay thế trước bằng môi trường biểu hiện CHO FreeStyle™ mới (Thermo Fisher Scientific, Cat. No. 12651014), tương ứng. Nuôi cấy tế bào ở buồng nuôi cấy (37°C, 5%

CO₂) ở tốc độ quay là 125 rpm trong khoảng 96 giờ.

Sau đó, thu chất nổi trên bề mặt của mẫu nuôi cấy bằng cách ly tâm vào ngày thứ 4, và xác định hoạt tính enzym *in vitro* để kiểm tra sự thay đổi của hoạt tính enzym theo sự sản xuất *alpha*-galactosidaza-Fc.

Ví dụ 2-2: Xác định hoạt tính enzym *in vitro* của *alpha*-galactosidaza-Fc

Để kiểm tra hoạt tính enzym *in vitro* của *alpha*-galactosidaza-Fc, cho protein dung hợp *alpha*-galactosidaza-Fc được sản xuất tạo thành cân bằng nhiệt với pNP-gal (*p*-nitrophenyl- α -D-galactopyranosit), là cơ chất đã biết cho enzym, ở 37°C trong 30 phút. Sau đó, cho dung dịch cơ chất phản ứng với *alpha*-galactosidaza-Fc ở 37°C trong 30 phút và xác định khả năng hấp thụ tổng hợp để xác định hoạt tính enzym *in vitro* của *alpha*-galactosidaza-Fc.

Qua đó, từ việc xác định hoạt tính enzym *in vitro*, đã xác nhận rằng mức độ biểu hiện của *alpha*-galactosidaza-Fc là 1.649 ng/mL (Fig. 1). Các kết quả này gợi ý rằng *alpha*-galactosidaza của protein dung hợp enzym theo sáng chế tạo thành dime đối song song và rằng *alpha*-galactosidaza của dime đối song song duy trì hoạt tính enzym ở mức độ đáng kể.

Ví dụ 2-3: So sánh hoạt tính enzym *in vitro* giữa *alpha*-galactosidaza và *alpha*-galactosidaza-Fc

Trong khi đó, hoạt tính enzym *in vitro* của protein dung hợp *alpha*-galactosidaza-Fc được sản xuất ở ví dụ 1 được so sánh với hoạt tính của agalsidaza-*beta*, mà vùng Fc không được liên kết vào đó.

Cụ thể là, cho *alpha*-galactosidaza-Fc và agalsidaza-*beta* tạo thành cân bằng nhiệt với pNP-gal (*p*-nitrophenyl- α -D-galactopyranosit), cơ chất cho enzym, ở 37°C trong 30 phút. Sau đó, cho dung dịch cơ chất phản ứng với protein dung hợp *alpha*-galactosidaza-Fc ở 37°C trong 20 phút. Sau đó, xác định khả năng hấp thụ của 4-nitrophenol được tạo ra cuối cùng để so sánh hoạt tính enzym giữa *alpha*-galactosidaza-Fc và agalsidaza-*beta*.

Do đó, đã xác nhận rằng hoạt tính enzym (hoạt tính đặc hiệu) của *alpha*-galactosidaza-Fc và agalsidaza-*beta* lần lượt là 70,9 μ mol/phút/mg và 67,6 μ mol/phút/mg (Fig. 2). Từ các kết quả này, đã xác nhận rằng protein dung hợp

alpha-galactosidaza–Fc có hoạt tính enzym là 95,4%, là mức độ tương tự với mức độ của enzym mà vùng Fc không liên kết vào đó. Điều này có nghĩa là protein dung hợp *alpha*-galactosidaza–Fc theo sáng chế không làm mất hoạt tính enzym, thậm chí khi vùng Fc được liên kết vào đó.

Ví dụ 3: Xác định hoạt tính hấp thụ nội bào *in vitro* của *alpha*-galactosidaza–Fc

Biết rằng *alpha*-galactosidaza hoạt động thông qua thụ thể mannoza-6-phosphat (M6PR) sau khi bị hấp thụ vào tế bào. Do đó, các tác giả sáng chế đã xác nhận rằng hoạt tính hấp thụ tế bào được biểu hiện bởi protein dung hợp *alpha*-galactosidaza–Fc như sau.

Cụ thể là, tế bào CCD986SK (nguyên bào sợi da của người), mà được biết đến là biểu hiện M6PR, được xử lý với mỗi agalsidaza-*beta* và protein dung hợp *alpha*-galactosidaza–Fc, và gây hấp thụ nội bào ở 37°C. Sau 24 giờ, sự có mặt của agalsidaza-*beta* và protein dung hợp *alpha*-galactosidaza–Fc được xác nhận bằng phương pháp đo lường hoạt tính enzym.

Từ kết quả phân tích tương quan giữa nồng độ của protein dung hợp *alpha*-galactosidaza–Fc và sự hấp thụ nội bào, tìm ra rằng giá trị K_m , là hằng số Michaelis-Menten thể hiện một nửa tốc độ hấp thụ tối đa, là 11,55 nM, do đó thể hiện mức độ của hoạt tính hấp thụ nội bào tương tự với agalsidaza-*beta* ($K_m = 10,92$ nM) (Fig. 3). Từ các kết quả này, xác nhận rằng protein dung hợp *alpha*-galactosidaza–Fc theo sáng chế không làm mất hoạt tính hấp thụ nội bào, thậm chí khi vùng Fc được liên kết vào đó.

Ví dụ 5: Xác định hành vi dược lực học của protein dung hợp *alpha*-galactosidaza–Fc ở chuột ICR

Độ ổn định trong máu và hệ số dược động học của agalsidaza-*beta* (nhóm đối chứng) và protein dung hợp *alpha*-galactosidaza–Fc (nhóm thử nghiệm), được tạo ra ở ví dụ, trên mẫu máu thu được theo mỗi nhóm được so sánh ở chuột ICR (3 chuột/nhóm), trên mỗi thời điểm thu mẫu máu.

Cụ thể là, trên cơ sở agalsidaza, agalsidaza-*beta* (nhóm đối chứng) và protein dung hợp *alpha*-galactosidaza–Fc (nhóm thử nghiệm) được dùng cho chuột ICR của nhóm đối chứng và nhóm thử nghiệm, tương ứng, bằng cách tiêm tĩnh mạch hoặc tiêm dưới da ở nồng độ là 1,0 mg/kg. Mẫu máu thu được từ nhóm được dùng bằng cách tiêm

tĩnh mạch tại thời điểm 0, 0,25, 0,5, 0,75, 1, 1,25, 1,5, 1,75, 2, và 4 giờ sau khi tiêm và từ nhóm được dùng bằng cách tiêm dưới da tại thời điểm 0, 1, 4, 8, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, và 216 giờ sau khi tiêm. Lượng protein ở huyết thanh máu được định lượng bằng cách xác định hoạt tính enzym *in vitro*.

Do đó, protein dung hợp *alpha*-galactosidaza–Fc thể hiện sự tăng trong tất cả các thời gian bán hủy ($T_{1/2}$), nồng độ thuốc tối đa trong máu (C_{max}), và khu vực dưới đường cong (AUC), so với nhóm đối chứng mà vùng Fc không được liên kết vào đó. AUC thể hiện mức độ phơi nhiễm *in vivo* với phân tử thuốc (Fig. 4, bảng 3). Từ các kết quả này, đã xác nhận rằng protein dung hợp *alpha*-galactosidaza–Fc theo sáng chế, bất kể đường dùng nào, đều thể hiện thời gian bán hủy lâu, nồng độ thuốc tối đa trong máu (C_{max}) cao, và khả năng sinh khả dụng (AUC) *in vivo* tốt do liên kết với vùng Fc.

Bảng 3: Thông số dược động học của agalsidaza-*beta* và protein dung hợp *alpha*-galactosidaza–Fc

Nguyên liệu	Đường dùng	AUC _{cuối cùng} (ng*giờ/mL)	C_{max} (ng/mL)	$T_{1/2}$ (giờ)	MRT _{cuối cùng} (giờ)
Agalsidaza- <i>beta</i>	Tiêm tĩnh mạch	798,4	5108,5	NA	0,2
Protein dung hợp <i>alpha</i> -galactosidaza–Fc	Tiêm tĩnh mạch	74553,6	2908,9	60,8	42,0
Protein dung hợp <i>alpha</i> -galactosidaza–Fc	Tiêm dưới da	59017,1	706,6	58,2	57,5

*NA = Không áp dụng

Các kết quả này gợi ý rằng loại mới của protein dung hợp theo sáng chế, có khả năng tăng thời gian bán hủy và độ sinh khả dụng *in vivo* của *alpha*-galactosidaza (tức là, ví dụ enzym trị liệu mà đã biết là có hiệu quả trị liệu đối với LSD), có thể được sử dụng làm chất trị liệu cho LSD đồng thời có khả năng duy trì hoạt tính enzym.

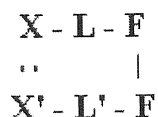
Như đã nêu ở trên, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật liên quan đến sáng chế sẽ có thể hiểu được rằng sáng chế có thể có nhiều phương án khác mà không làm thay đổi ý tưởng kỹ thuật các dấu hiệu cơ bản của sáng chế. Về vấn đề này, các phương án ví dụ được bộc lộ trong bản mô tả này chỉ nhằm mục đích minh họa sáng chế và không nên hiểu là làm giới hạn phạm vi của sáng chế. Trái lại, sáng chế có

mục đích bao gồm không chỉ các phương án ví dụ này mà còn bao gồm các cải biến, thay đổi, tương đương và các phương án khác mà có thể được nằm trong tinh thần và phạm vi của sáng chế như được xác định bởi bộ yêu cầu bảo hộ được đính kèm.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Protein dung hợp enzym có công thức 1;

[Công thức 1]



trong đó mỗi X và X' độc lập là cùng một loại hoặc khác loại enzym trị liệu;

L và L' là cầu nối, mỗi nhóm độc lập là cùng một loại hoặc khác loại cầu nối;

F là vùng Fc globulin miễn dịch;

| là liên kết cộng hóa trị; và

: là liên kết cộng hóa trị hoặc không cộng hóa trị,

trong đó enzym trị liệu tạo thành dime thông qua liên kết không cộng hóa trị, và

trong đó vùng Fc globulin miễn dịch được chọn từ nhóm bao gồm

(a) miền CH1, miền CH2, miền CH3, và miền CH4;

(b) miền CH1 và miền CH2;

(c) miền CH1 và miền CH3;

(d) miền CH2 và miền CH3; và

(e) tổ hợp giữa một hoặc hai hoặc nhiều miền trong số miền CH1, miền CH2, miền CH3, và miền CH4 và vùng bản lề globulin miễn dịch hoặc một phần của vùng bản lề.

2. Protein dung hợp enzym theo điểm 1, trong đó enzym được chọn từ nhóm bao gồm *beta*-glucosidaza, *alpha*-galactosidaza, *beta*-galactosidaza, iduronidaza, iduronat-2-sulfataza, galactosa-6-sulfataza, *alpha*-glucosidaza axit, ceramidaza axit, sphingomyelinaza axit, galactocerebrosidaza, arylsulfataza A, B, *beta*-hexosaminidaza A, B, heparin N-sulfataza, *alpha*-D-mannosidaza, *beta*-glucuronidaza, N-axetyl-galactosamin-6 sulfataza, lipaza axit của tiêu thể, *alpha*-N-axetyl-glucosaminidaza, glucocerebrosidaza, butyrylcholinestaraza, chitinaza, glutamat decarboxylaza, imiglucaraza, lipaza, uricaza, axetylhydrolaza yếu tố hoạt hóa tiêu cầu, endopeptidaza trung tính, và myeloperoxidaza.

3. Protein dung hợp enzym theo điểm 2, trong đó enzym là *alpha*-galactosidaza A hoặc *beta*-galactosidaza.
4. Protein dung hợp enzym theo điểm 1, trong đó vùng Fc globulin miễn dịch có biến đổi được chọn từ nhóm bao gồm biến đổi thay thế, thêm, bớt, cải biến, và tổ hợp của các biến đổi này ở ít nhất một axit amin của vùng Fc globulin miễn dịch tự nhiên.
5. Protein dung hợp enzym theo điểm 4, trong đó, ở vùng Fc globulin miễn dịch có trình tự amin nêu trong SEQ ID NO: 8, axit amin thứ 2 được thế bằng prolin; axit amin thứ 71 được thế bằng glutamin; hoặc axit amin thứ 2 được thế bằng prolin và axit amin thứ 71 được thế bằng glutamin.
6. Protein dung hợp enzym theo điểm 5, trong đó không có sự trao đổi chuỗi xảy ra ở vùng Fc globulin miễn dịch.
7. Protein dung hợp enzym theo điểm 1, trong đó vùng Fc globulin miễn dịch ở dạng monome.
8. Protein dung hợp enzym theo điểm 1, trong đó vùng Fc globulin miễn dịch bao gồm vùng bản lề, miền CH2, và miền CH3.
9. Protein dung hợp enzym theo điểm 1, trong đó, ở vùng Fc globulin miễn dịch,
- (a) vùng có thể tạo thành liên kết disulfua được loại bỏ;
 - (b) gốc axit amin nhất định được loại bỏ ở đầu N của Fc tự nhiên;
 - (c) gốc methionin được thêm vào đầu N của dạng Fc tự nhiên;
 - (d) vị trí liên kết bổ sung được loại bỏ; hoặc
 - (e) vị trí gây độc tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC) được loại bỏ.
10. Protein dung hợp enzym theo điểm 1, trong đó vùng Fc globulin miễn dịch được aglycosyl hóa.

11. Protein dung hợp enzym theo điểm 1, trong đó vùng Fc globulin miễn dịch là mảnh Fc có nguồn gốc từ IgG, IgA, IgD, IgE, hoặc IgM.
12. Protein dung hợp enzym theo điểm 1, trong đó vùng Fc globulin miễn dịch là thể lai của các miền có nguồn gốc khác nhau từ globulin miễn dịch được chọn từ nhóm bao gồm IgG, IgA, IgD, IgE, và IgM.
13. Protein dung hợp enzym theo điểm 12, trong đó vùng Fc globulin miễn dịch là vùng Fc IgG4.
14. Protein dung hợp enzym theo điểm 13, trong đó vùng bản lề của vùng Fc IgG4 được thế bằng vùng bản lề IgG1.
15. Protein dung hợp enzym theo điểm 1, trong đó protein dung hợp enzym chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 6.
16. Dược phẩm để ngăn ngừa hoặc điều trị rối loạn tích tụ ở tiêu thể (LSD) chứa protein dung hợp enzym theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 15.
17. Polynucleotit mã hóa protein dung hợp enzym theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 15.
18. Vector biểu hiện chứa polynucleotit theo điểm 17.
19. Tế bào mà vector biểu hiện theo điểm 18 được đưa vào đó.
20. Phương pháp sản xuất protein dung hợp enzym, bao gồm các bước:
- (a) nuôi cấy tế bào theo điểm 19 để thu mẫu nuôi cấy; và
 - (b) thu hồi protein dung hợp enzym từ mẫu nuôi cấy.

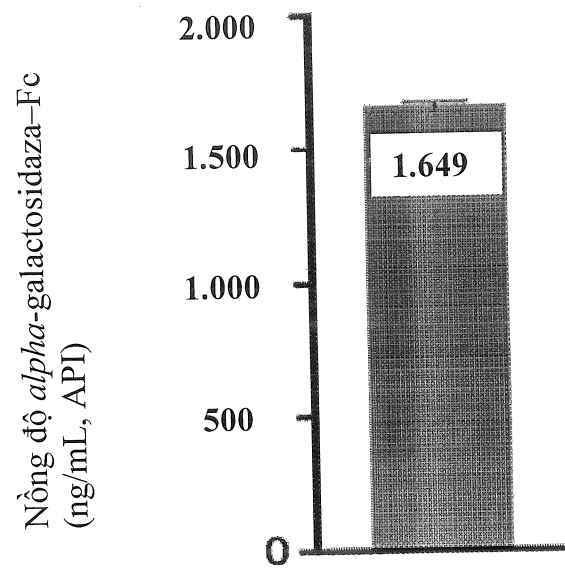


Fig. 1

Hoạt tính enzym của agalsidaza *beta* và protein dung hợp *alpha*-galactosidaza-Fc

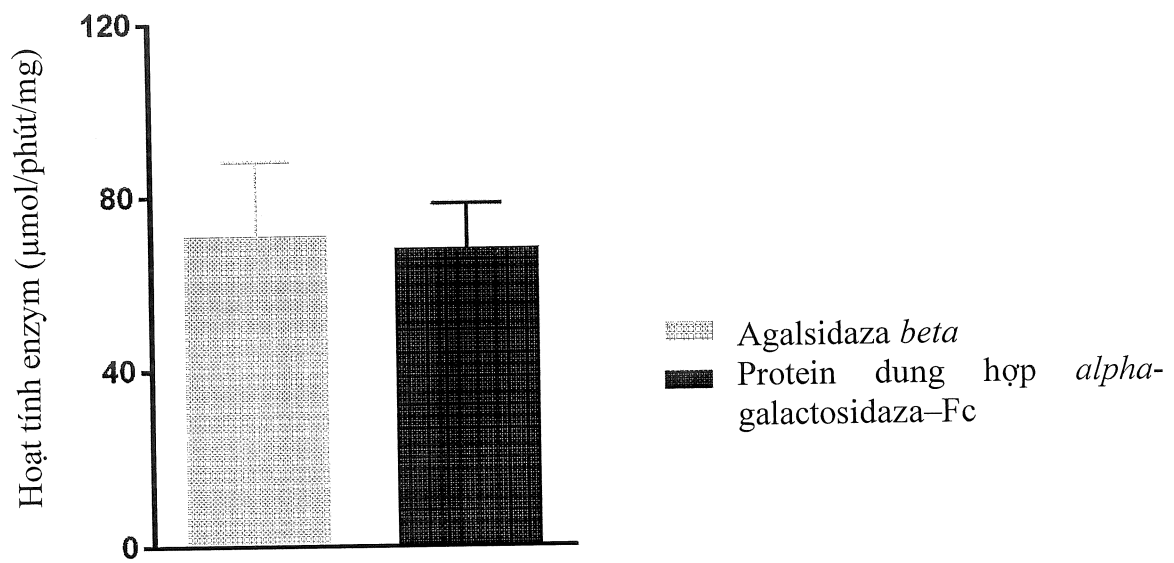


Fig. 2

Hoạt tính hấp thụ nội bào của *Agalsidaza beta* và protein dung hợp *alpha*-galactosidaza-Fc

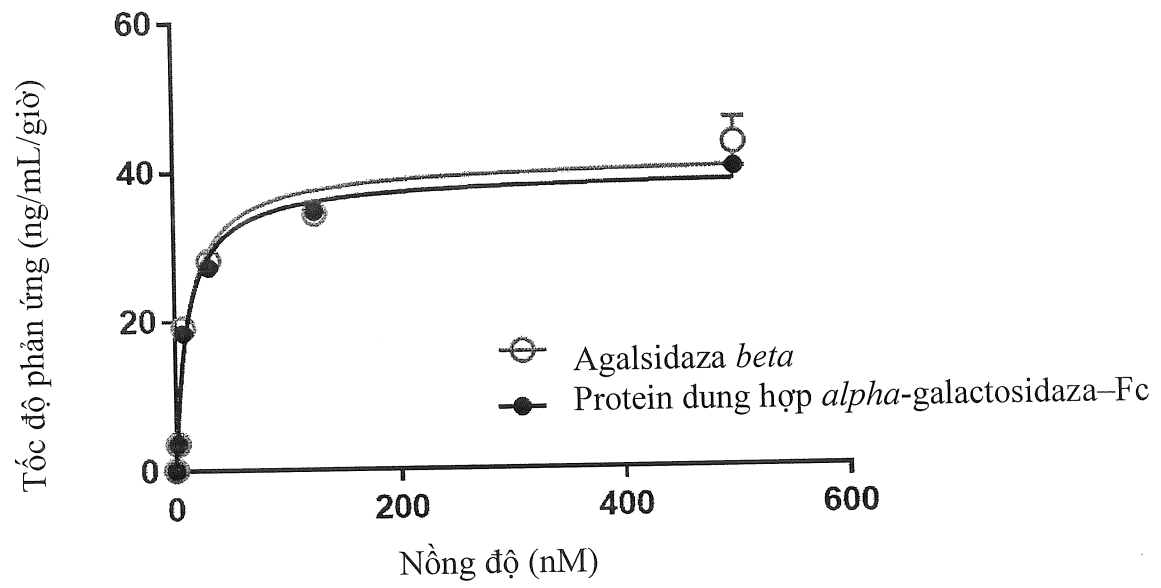
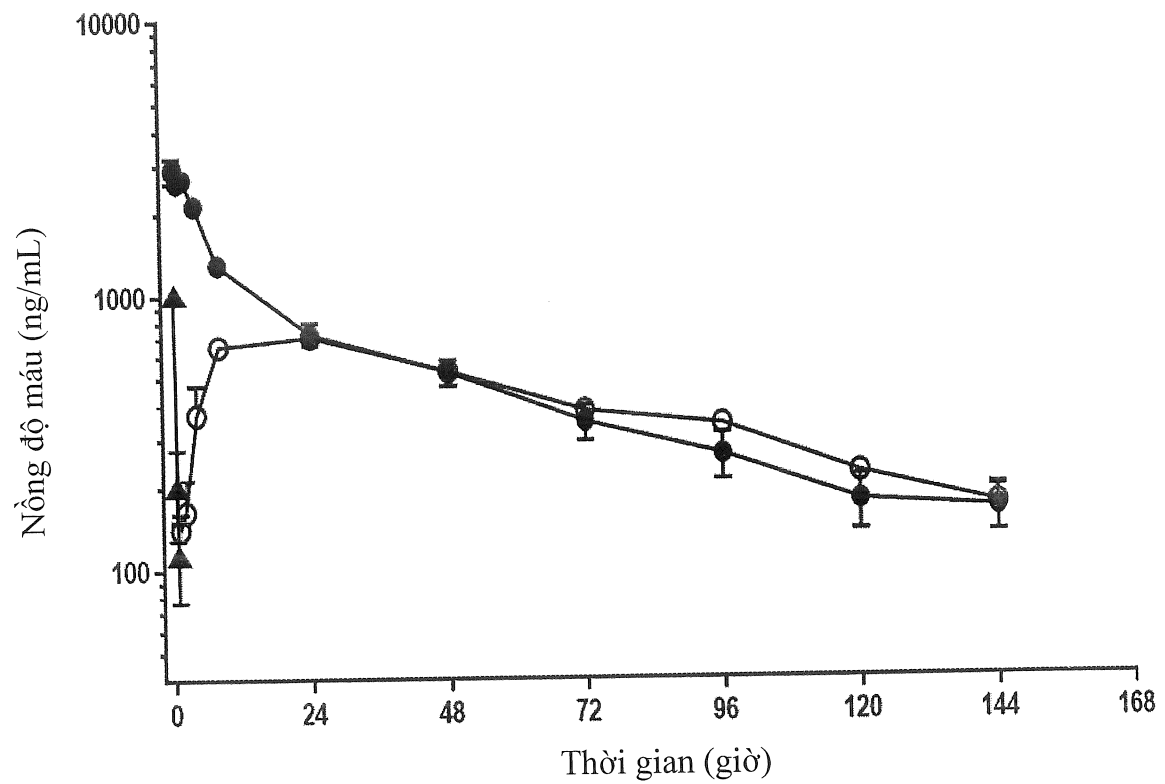


Fig. 3



- ▲ Agalsidaza *beta* 1,0 mg/kg, tiêm tĩnh mạch
- Protein dung hợp *alpha*-galactosidaza-Fc 1,0 mg/kg, tiêm tĩnh mạch (như agalsidaza *beta*)
- Protein dung hợp *alpha*-galactosidaza-Fc 1,0 mg/kg, tiêm dưới da (như agalsidaza *beta*)

Fig. 4

<110> HANMI PHARM. CO., LTD.

<120> Protein dung hợp enzym trị liệu và dược phẩm chứa protein này

<130> OPA18301-PCT

<150> KR 10-2017-0178378

<151> 2017-12-22

<160> 14

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 43

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Fc(S2P)_F

<400> 1

ctggcgggtgg cggatcgcca ccatgcccag cacctgagtt cct
43

<210> 2

<211> 43

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Fc(S2P)_R

<400> 2

aggaactcag gtgctgggca tgggtggcgat ccgccaccgc cag
43

<210> 3

<211> 43

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Fc(N71Q)_F

<400> 3

agccgcggga ggagcagttc caaagcacgt accgtgtggt cag
43

<210> 4
<211> 43
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Fc(N71Q)_R

<400> 4
ctgaccacac ggtacgtgct ttggaactgc tcctcccgcg gct
43

<210> 5
<211> 1287
<212> ADN
<213> Người tinh khôn

<400> 5
atgcagctga ggaaccaga actacatctg ggctgcgcgc ttgcgcttcg cttcctggcc
60

ctcgtttcct gggacatccc tggggctaga gcactggaca atggattggc aaggacgcct
120

accatgggct ggctgcactg ggagcgcttc atgtgcaacc ttgactgcca ggaagagcca
180

gattcctgca tcagtgagaa gctcttcatg gagatggcag agctcatggt ctgagaaggc
240

tggaaggatg caggttatga gtacctctgc attgatgact gttggatggc tcccaaaga
300

gattcagaag gcagacttca ggcagaccct cagcgctttc ctcatgggat tcgccagcta
360

gctaattatg ttcacagcaa aggactgaag ctagggattt atgcagatgt tggaaataaa
420

acctgcgcag gcttccctgg gaggtttggga tactacgaca ttgatgccca gacctttgct
480

gactggggag tagatctgct aaaatttgat ggttggttact gtgacagttt ggaaaatttg
540

gcagatgggtt ataagcacat gtccttggcc ctgaatagga ctggcagaag cattgtgtac
600

tcctgtgagt ggccctcttta tatgtggccc tttcaaaagc ccaattatac agaaatccga
660

cagtactgca atcactggcg aaattttgct gacattgatg attcctggaa aagtataaag
720

agtatcttgg actggacatc ttttaaccag gagagaattg ttgatgttgc tggaccaggg
780

ggttggaaatg acccagatat gttagtatt ggcaactttg gcctcagctg gaatcagcaa
840

gtaactcaga tggccctctg ggctatcatg gctgctcctt tattcatgtc taatgacctc
900

cgacacatca gccctcaagc caaagctctc cttcaggata aggacgtaat tgccatcaat
960

caggaccctc tgggcaagca aggggtaccag cttagacagg gagacaactt tgaagtgtgg
1020

gaacgacctc tctcaggctt agcctgggct gtagctatga taaaccggca ggagattggt
1080

ggacctcgct cttataccat cgcagttgct tccctgggta aaggagtggc ctgtaatcct
1140

gcctgcttca tcacacagct cctccctgtg aaaaggaagc tagggttcta tgaatggact
1200

tcaaggttta gaagtcacat aaatcccaca ggcactgttt tgcttcagct agaaaatata
1260

atgcagatgt cattaaaaga cttactt
1287

<210> 6
<211> 429
<212> PRT
<213> Người tinh khôn

<400> 6
Met Gln Leu Arg Asn Pro Glu Leu His Leu Gly Cys Ala Leu Ala Leu
1 5 10 15

Arg Phe Leu Ala Leu Val Ser Trp Asp Ile Pro Gly Ala Arg Ala Leu
20 25 30

Asp Asn Gly Leu Ala Arg Thr Pro Thr Met Gly Trp Leu His Trp Glu
 35 40 45
 Arg Phe Met Cys Asn Leu Asp Cys Gln Glu Glu Pro Asp Ser Cys Ile
 50 55 60
 Ser Glu Lys Leu Phe Met Glu Met Ala Glu Leu Met Val Ser Glu Gly
 65 70 75 80
 Trp Lys Asp Ala Gly Tyr Glu Tyr Leu Cys Ile Asp Asp Cys Trp Met
 85 90 95
 Ala Pro Gln Arg Asp Ser Glu Gly Arg Leu Gln Ala Asp Pro Gln Arg
 100 105 110
 Phe Pro His Gly Ile Arg Gln Leu Ala Asn Tyr Val His Ser Lys Gly
 115 120 125
 Leu Lys Leu Gly Ile Tyr Ala Asp Val Gly Asn Lys Thr Cys Ala Gly
 130 135 140
 Phe Pro Gly Ser Phe Gly Tyr Tyr Asp Ile Asp Ala Gln Thr Phe Ala
 145 150 155 160
 Asp Trp Gly Val Asp Leu Leu Lys Phe Asp Gly Cys Tyr Cys Asp Ser
 165 170 175
 Leu Glu Asn Leu Ala Asp Gly Tyr Lys His Met Ser Leu Ala Leu Asn
 180 185 190
 Arg Thr Gly Arg Ser Ile Val Tyr Ser Cys Glu Trp Pro Leu Tyr Met
 195 200 205
 Trp Pro Phe Gln Lys Pro Asn Tyr Thr Glu Ile Arg Gln Tyr Cys Asn
 210 215 220
 His Trp Arg Asn Phe Ala Asp Ile Asp Asp Ser Trp Lys Ser Ile Lys
 225 230 235 240
 Ser Ile Leu Asp Trp Thr Ser Phe Asn Gln Glu Arg Ile Val Asp Val
 245 250 255
 Ala Gly Pro Gly Gly Trp Asn Asp Pro Asp Met Leu Val Ile Gly Asn
 260 265 270
 Phe Gly Leu Ser Trp Asn Gln Gln Val Thr Gln Met Ala Leu Trp Ala
 275 280 285
 Ile Met Ala Ala Pro Leu Phe Met Ser Asn Asp Leu Arg His Ile Ser
 290 295 300
 Pro Gln Ala Lys Ala Leu Leu Gln Asp Lys Asp Val Ile Ala Ile Asn

```
<400>      7
ccaccatgcc cagcacctga gttcctgggg ggaccatcag tcttcctgtt ccccccaaaa
60

cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc cctgagggtca catgcgtggt ggtggacgtg
120

agccaggaag accctgaggt ccagttcaac tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat
180

gccaaagacaa agccgcggga ggagcagttc caaagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc
240

accgtcctgc accaggactg gctgaatggc aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa
300

ggcctcccat cctccatcga gaaaaccatc tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca
360
```

caggtgtaca ccctgcccc atcccaggag gagatgacca agaaccaggt cagcctgacc
420

tgcctgtgtca aaggcttcta tcccagcgac atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag
480

ccggagaaca actacaagac cacgcctccc gtgctggact ccgacggctc cttcttcctc
540

tacagcaggc taaccgtgga caagagcagg tggcaggagg ggaacgtctt ctcatgctcc
600

gtgatgcatg aggctctgca caaccactac acgcagaaga gcctctccct gtctctgggt
660

aaatga
666

<210> 8
<211> 221
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Biến thể Fc

<400> 8
Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
1 5 10 15
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
20 25 30
Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln
35 40 45
Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
50 55 60
Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
65 70 75 80
Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
85 90 95
Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
100 105 110
Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
115 120 125

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

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

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
165 170 175

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
180 185 190

Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
195 200 205

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
210 215 220

<210> 9
<211> 221
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Biễn thể Fc

<400> 9
Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

115	120	125
Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys		
130	135	140
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln		
145	150	155
Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly		
	165	170
Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln		
	180	185
Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn		
	195	200
His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys		
	210	215
		220

<210> 10
 <211> 90
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Liên kết peptit

<400> 10
 ggcggcggag gttcaggtgg tgggtggctct ggcggtggag ggtcgggggg aggcggctct
 60
 ggaggagggg gctccggtgg gggaggttagc
 90

<210> 11
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Liên kết peptit

<400> 11
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 1 5 10 15
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

20

25

30

<210> 12
 <211> 2043
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Protein dung hợp alpha galactosidaza-Fc

<400> 12
 atgcagctga ggaaccaga actacatctg ggctgcgcgc ttgcgcttcg cttcctggcc
 60
 ctcgtttcct gggacatccc tggggctaga gcactggaca atggattggc aaggacgcct
 120
 accatgggct ggctgcactg ggagcgcttc atgtgcaacc ttgactgcca ggaagagcca
 180
 gattcctgca tcagtgagaa gctcttcatg gagatggcag agctcatggt ctcagaaggc
 240
 tggaaggatg caggttatga gtacctctgc attgatgact gttggatggc tcccaaaga
 300
 gattcagaag gcagacttca ggcagaccct cagcgctttc ctcattggat tcgccagcta
 360
 gctaattatg ttcacagcaa aggactgaag ctagggattt atgcagatgt tggaaataaa
 420
 acctgcgcag gcttccctgg gagttttgga tactacgaca ttgatgcca gacctttgct
 480
 gactggggag tagatctgct aaaatttgat gggtgttact gtgacagttt ggaaaatttg
 540
 gcagatgggtt ataagcacat gtccttggcc ctgaatagga ctggcagaag cattgtgtac
 600
 tcctgtgagt ggcctcttta tatgtggccc tttcaaaagc ccaattatac agaaatccga
 660
 cagtactgca atcactggcg aaattttgct gacattgatg attcctggaa aagtataaag
 720
 agtatcttgg actggacatc ttttaaccag gagagaattg ttgatgttgc tggaccaggg
 780

ggttggaatg acccagatat gttagtatt ggcaactttg gcctcagctg gaatcagcaa
840

gtaactcaga tggccctctg ggctatcatg gctgctcctt tattcatgtc taatgacctc
900

cgacacatca gccctcaagc caaagctctc cttcaggata aggacgtaat tgccatcaat
960

caggaccctt tgggcaagca aggggtaccag cttagacagg gagacaactt tgaagtgtgg
1020

gaacgacctc tctcaggctt agcctgggct gtagctatga taaaccggca ggagattggt
1080

ggacctcgct cttataccat cgcagttgct tccctgggta aaggagtggc ctgtaatcct
1140

gcctgcttca tcacacagct cctccctgtg aaaaggaagc tagggttcta tgaatggact
1200

tcaagggttaa gaagtcacat aaatcccaca ggcactgttt tgcttcagct agaaaatata
1260

atgcagatgt cattaaaaga cttacttggc ggcggagggt cagggtgggtg tggctctggc
1320

ggtggagggt cggggggagg cggctctgga ggagggggct ccggtggggg aggtagccca
1380

ccatgcccag cacctgagtt cctgggggga ccatcagtct tcctgttccc cccaaaacct
1440

aaggacaccc tcatgatctc ccggaccctt gaggtcacat gcgtgggtgg ggacgtgagc
1500

caggaagacc ctgagggtcca gttcaactgg tacgtggacg gcgtggagggt gcataatgcc
1560

aagacaaagc cgcgggagga gcagttccaa agcacgtacc gtgtgggtcag cgtcctcacc
1620

gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag gagtacaagt gcaaggctct caacaaaggc
1680

ctcccatcct ccatcgagaa aaccatctcc aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag
1740

gtgtacaccc tgccccatc ccaggaggag atgaccaaga accagggtcag cctgacctgc
1800

ctgggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg
1860

gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg ctggactccg acggctcctt cttcctctac
1920

agcaggctaa ccgtggacaa gagcagggtg caggagggga acgtcttctc atgctccgtg
1980

atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg cagaagagcc tctccctgtc tctgggtaaa
2040

tga
2043

<210> 13
<211> 680
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Protein dung hợp alpha galactosidaza-Fc

<400> 13
Met Gln Leu Arg Asn Pro Glu Leu His Leu Gly Cys Ala Leu Ala Leu
1 5 10 15
Arg Phe Leu Ala Leu Val Ser Trp Asp Ile Pro Gly Ala Arg Ala Leu
20 25 30
Asp Asn Gly Leu Ala Arg Thr Pro Thr Met Gly Trp Leu His Trp Glu
35 40 45
Arg Phe Met Cys Asn Leu Asp Cys Gln Glu Glu Pro Asp Ser Cys Ile
50 55 60
Ser Glu Lys Leu Phe Met Glu Met Ala Glu Leu Met Val Ser Glu Gly
65 70 75 80
Trp Lys Asp Ala Gly Tyr Glu Tyr Leu Cys Ile Asp Asp Cys Trp Met
85 90 95
Ala Pro Gln Arg Asp Ser Glu Gly Arg Leu Gln Ala Asp Pro Gln Arg
100 105 110
Phe Pro His Gly Ile Arg Gln Leu Ala Asn Tyr Val His Ser Lys Gly
115 120 125
Leu Lys Leu Gly Ile Tyr Ala Asp Val Gly Asn Lys Thr Cys Ala Gly
130 135 140

Phe Pro Gly Ser Phe Gly Tyr Tyr Asp Ile Asp Ala Gln Thr Phe Ala
 145 150 155 160
 Asp Trp Gly Val Asp Leu Leu Lys Phe Asp Gly Cys Tyr Cys Asp Ser
 165 170 175
 Leu Glu Asn Leu Ala Asp Gly Tyr Lys His Met Ser Leu Ala Leu Asn
 180 185 190
 Arg Thr Gly Arg Ser Ile Val Tyr Ser Cys Glu Trp Pro Leu Tyr Met
 195 200 205
 Trp Pro Phe Gln Lys Pro Asn Tyr Thr Glu Ile Arg Gln Tyr Cys Asn
 210 215 220
 His Trp Arg Asn Phe Ala Asp Ile Asp Asp Ser Trp Lys Ser Ile Lys
 225 230 235 240
 Ser Ile Leu Asp Trp Thr Ser Phe Asn Gln Glu Arg Ile Val Asp Val
 245 250 255
 Ala Gly Pro Gly Gly Trp Asn Asp Pro Asp Met Leu Val Ile Gly Asn
 260 265 270
 Phe Gly Leu Ser Trp Asn Gln Gln Val Thr Gln Met Ala Leu Trp Ala
 275 280 285
 Ile Met Ala Ala Pro Leu Phe Met Ser Asn Asp Leu Arg His Ile Ser
 290 295 300
 Pro Gln Ala Lys Ala Leu Leu Gln Asp Lys Asp Val Ile Ala Ile Asn
 305 310 315 320
 Gln Asp Pro Leu Gly Lys Gln Gly Tyr Gln Leu Arg Gln Gly Asp Asn
 325 330 335
 Phe Glu Val Trp Glu Arg Pro Leu Ser Gly Leu Ala Trp Ala Val Ala
 340 345 350
 Met Ile Asn Arg Gln Glu Ile Gly Gly Pro Arg Ser Tyr Thr Ile Ala
 355 360 365
 Val Ala Ser Leu Gly Lys Gly Val Ala Cys Asn Pro Ala Cys Phe Ile
 370 375 380
 Thr Gln Leu Leu Pro Val Lys Arg Lys Leu Gly Phe Tyr Glu Trp Thr
 385 390 395 400
 Ser Arg Leu Arg Ser His Ile Asn Pro Thr Gly Thr Val Leu Leu Gln
 405 410 415

Leu Glu Asn Thr Met Gln Met Ser Leu Lys Asp Leu Leu Gly Gly Gly
 420 425 430
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 435 440 445
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Pro Pro Cys Pro Ala
 450 455 460
 Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 465 470 475 480
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 485 490 495
 Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val
 500 505 510
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 515 520 525
 Phe Gln Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 530 535 540
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly
 545 550 555 560
 Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 565 570 575
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr
 580 585 590
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 595 600 605
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 610 615 620
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 625 630 635 640
 Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe
 645 650 655
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 660 665 670
 Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 675 680

<210> 14
<211> 12
<212> PRT
<213> Người tình khôn

<400> 14
Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro
1 5 10