



(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)



1-0049247

(51)⁷ C07K 14/47; C07K 14/605

(13) B

(21) 1-2016-04500

(22) 05/06/2015

(86) PCT/KR2015/005651 05/06/2015

(87) WO2015/186988 10/12/2015

(30) 10-2014-0068660 05/06/2014 KR

(45) 25/07/2025 448

(43) 27/03/2017 348A

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

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

(72) PARK, Sung Hee (KR); KIM, Seung Su (KR); LIM, Hyung Kyu (KR); CHOI, Jae Hyuk (KR); CHOI, In Young (KR); KWON, Se Chang (KR).

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

(54) PHƯƠNG PHÁP ỨC CHẾ PHẢN ỨNG SẢN SINH KHÁNG THỂ CỦA PROTEIN HOẶC PEPTIT CÓ HOẠT TÍNH SINH LÝ

(21) 1-2016-04500

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp ức chế phản ứng sản sinh kháng thể của protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý khi so với phản ứng sản sinh kháng thể của protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý từ đó vùng Fc của globulin miễn dịch được gắn kết với gốc chức ở đầu tận cùng, bao gồm bước gắn kết vùng Fc của globulin miễn dịch với gốc chức bên trong không ở đầu tận cùng của protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý, trong đó protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý và vùng Fc của globulin miễn dịch được gắn kết nhờ gốc liên kết phi peptidyl nằm xen giữa chúng, trong đó protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý và gốc liên kết phi peptidyl được gắn kết ở điều kiện độ pH nằm trong khoảng từ 7,5 đến 9,0, và trong đó protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý là exendin-4 hoặc dẫn xuất exendin-4.

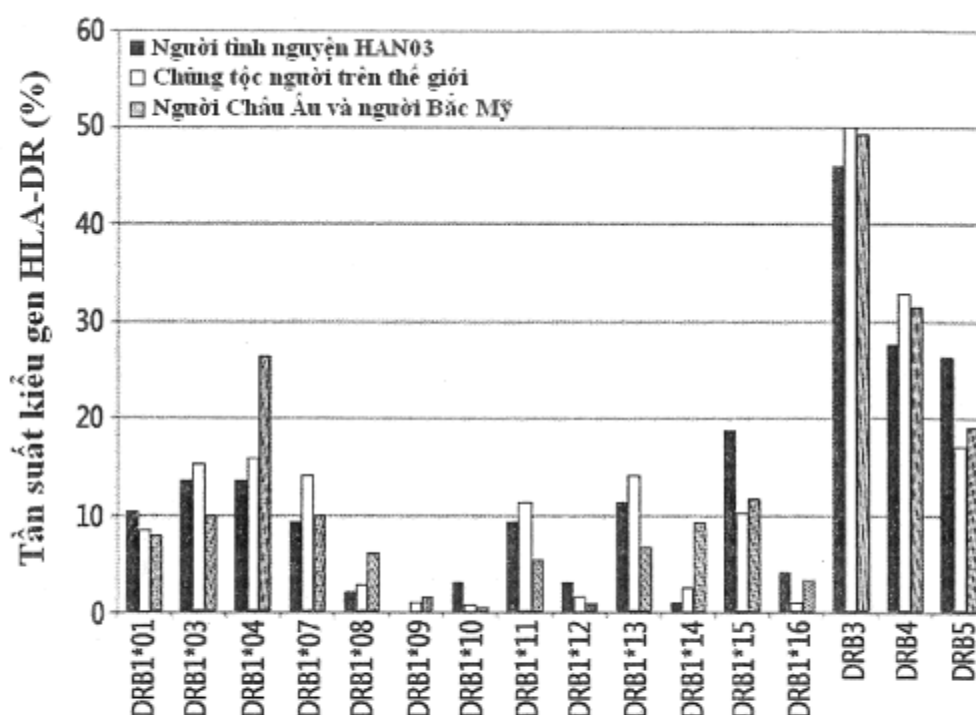


Fig.1

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp làm giảm khả năng sinh miễn dịch của protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý và làm tăng thời gian bán thải trong huyết thanh của chúng bằng cách gắn kết đặc hiệu vị trí chất mang với protein hoặc peptit này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Đáp ứng miễn dịch với các hoạt chất sinh học có thể xảy ra đối với cả protein có nguồn gốc từ người lẫn protein có nguồn gốc không phải từ người. Các đáp ứng này có thể làm giảm tác dụng lâm sàng, giảm hiệu lực, và đôi khi gây ra các bệnh lý hoặc thậm chí gây tử vong cho người bệnh. Cụ thể, sự sản sinh kháng thể trung hòa hướng đích protein tái tổ hợp có thể gây phản ứng chéo với protein có sẵn trong cơ thể người bệnh, do đó dẫn đến hậu quả nghiêm trọng (xem, Lim LC. *Hematology* 2005 10(3):255-9). Các vấn đề về sinh học dược bào chế, như nhược điểm của các kháng thể đơn dòng đã được giảm đáng kể với sự phát triển của sinh học phân tử. Tuy nhiên, nhiều dược phẩm chứa protein tái tổ hợp là giống hệt với các trình tự protein được biểu hiện trong cơ thể, do đó vẫn có thể gây đáp ứng miễn dịch trung hòa (xem, Namaka M et al, *Curr Med Res Opin* 2006 22(2):223-39). Mặc dù cơ chế sinh miễn dịch không hoàn toàn rõ ràng, nhưng đã biết rằng tính kháng protein tái tổ hợp có thể bị phá vỡ bởi các sản phẩm dùng cho người bệnh và các yếu tố khác nhau của người bệnh (được mô tả trong tài liệu Chester, K, Baker, MP and Mayer A. *Expert Rev Clin Immunol* 2005 1(4): 549-559, Baker MP and Jones TD. *Curr. Opin. Drug Disc Dev* 2007 10(2):219-227). Các yếu tố sinh miễn dịch bao gồm liều dùng, tần suất và đường đưa thuốc, khả năng điều hòa miễn dịch của dược chất protein, dược phẩm chứa chúng và các yếu tố tương tự. Yếu tố quan trọng nhất để gây đáp ứng miễn dịch là liệu có vị trí nhận diện kháng nguyên (epitop) có thể kích thích hiệu quả đáp ứng tế bào T biểu hiện CD4 hay không (được mô tả trong tài liệu Baker MP and Jones TD. *Curr. Opin. Drug Disc Dev* 2007 10(2):219-227).

Mặt khác, exendin-4 là peptit tự nhiên được phát hiện trong tuyến nước bọt của thằn lằn không lồ Gila và có độ tương đồng trình tự với peptit tương tự glucagon 1 của người bằng 52%. Exendin-4 và peptit tương tự glucagon 1 có cùng chức năng bài tiết

insulin. Tuy nhiên, peptit tương tự glucagon 1 bị bất hoạt nhanh bởi dipeptidyl peptidaza-IV (DPP-IV), do đó có thời gian bán thải rất ngắn, trong khi đó exendin-4 vẫn có tính kháng DPP-IV do có glycine thay cho alanine trong trình tự axit amin thứ cấp, do đó có thể hữu hiệu hơn trong điều trị bệnh đái tháo đường týp II. Ngoài ra, insulin và chất tương tự của nó, và chất chủ vận đặc hiệu kép GLP-1/glucagon cũng được sử dụng để điều trị bệnh đái tháo đường và bệnh béo phì. Tuy nhiên, sự có mặt của các trình tự axit amin có nguồn gốc không phải từ người này có thể đóng vai trò là vị trí nhận diện kháng nguyên của tế bào T. Exenatide (Byetta) đã được chấp nhận làm dược chất để điều trị bệnh đái tháo đường týp II là exendin-4 tổng hợp đã sản sinh kháng thể kháng exenatide trên hơn 30% người bệnh được sử dụng exenatide trong 1 năm trong các thử nghiệm lâm sàng. Gần đây, lixisenatide đã được chấp nhận làm dược chất để điều trị bệnh đái tháo đường đã sản sinh kháng thể trên khoảng 60-71% người bệnh (xem, Zinman, B. et al., *Annals of Internal Medicine*. 2007 146(7): 477-486; Schnabel CA et al, *Peptits* 2006 27:1902-1910; DeFronzo, R.A. et al, *Diabetes Care* 2005 28:1092-1100; Buse, J.B. et al, *Diabetes Care* 2004 27:2628-2635). Tức là, exentide được xác định là chất ngoại sinh *in vivo* cần được xử lý và kháng thể được tạo ra. Vì lý do này, vấn đề mà khó mong đợi hiệu quả điều trị chắc chắn là tỷ lệ sản sinh kháng thể gia tăng.

Do đó, trong trường hợp protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý được sử dụng bên trong cơ thể để điều trị hoặc phòng ngừa trong thời gian dài, thì quan trọng là cần kiểm soát khả năng sinh miễn dịch. Cụ thể, protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý liên quan đến bệnh lý trên cơ thể người trưởng thành, như insulin hoặc peptit kích thích tổng hợp và bài tiết insulin và protein chống bệnh béo phì đã được bào chế ở dạng dược phẩm tác dụng kéo dài có khả năng tồn tại lâu trong cơ thể sau khi sử dụng. Ngoài ra, ngay cả khi không được bào chế dưới dạng dược phẩm tác dụng kéo dài, các dược chất này vẫn có thể phải được sử dụng nhiều lần trong thời gian kéo dài. Do đó, vấn đề quan trọng là không gây đáp ứng miễn dịch.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Để khắc phục các vấn đề bất cập nêu trên, các tác giả sáng chế đã thực hiện nhiều nghiên cứu và thử nghiệm để phát triển dược phẩm chứa protein hoặc peptit không gây đáp ứng miễn dịch. Các tác giả sáng chế đã phát hiện thấy rằng khi chất mang gắn kết đặc hiệu vị trí với protein hoặc peptit, thì khả năng sinh miễn dịch của protein hoặc peptit này

có thể được giảm khi so với khả năng sinh miễn dịch của protein hoặc peptit không được gắn kết với chất mang, nhờ đó hoàn thành sáng chế này.

Một mục đích của sáng chế là đề cập đến phương pháp làm giảm khả năng sinh miễn dịch của protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý.

Một mục đích khác của sáng chế là đề cập đến được phẩm chứa thể tiếp hợp protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý, trong đó chất mang được gắn kết với gốc chức bên trong không ở đầu tận cùng của protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý này nhờ gốc liên kết phi peptidyl.

Một mục đích khác của sáng chế là đề cập đến phương pháp điều chế thể tiếp hợp protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý, trong đó chất mang được gắn kết với gốc chức bên trong không ở đầu tận cùng của protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý này.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến phương pháp làm giảm khả năng sinh miễn dịch của protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý khi so với khả năng sinh miễn dịch của protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý không được gắn kết với chất mang, bao gồm bước gắn kết chất mang với gốc chức bên trong không ở đầu tận cùng của protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý này.

Theo một phương án cụ thể, chất mang theo sáng chế được chọn từ nhóm bao gồm polyetylen glycol, axit béo, cholesterol, albumin hoặc mảnh peptit của nó, hợp chất gắn kết albumin, polyme có các đơn vị lặp chứa trình tự axit amin đặc hiệu, kháng thể, mảnh kháng thể, hợp chất gắn kết thụ thể vùng Fc mới sinh, mô liên kết *in vivo* hoặc dẫn xuất của nó, nucleotit, fibronectin, transferin, polypeptit tương tự elastin, polypeptit XTEN, peptit chứa đầu tận cùng carboxyl, mẫu dò cảm ứng tạo cấu trúc, sacarit và polyme khối lượng phân tử cao.

Theo một phương án cụ thể khác, hợp chất gắn kết thụ thể vùng Fc mới sinh theo sáng chế là vùng Fc của globulin miễn dịch.

Theo một phương án cụ thể khác, protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý theo sáng chế được gắn kết với chất mang nhờ gốc liên kết nằm xen giữa chúng.

Theo một phương án cụ thể khác, gốc liên kết là gốc liên kết phi peptidyl.

Theo một phương án cụ thể khác, gốc liên kết phi peptidyl theo sáng chế được

chọn từ nhóm bao gồm polyetylen glycol, polypropylen glycol, copolyme của etylen glycol và propylen glycol, rượu đa chức polyoxyetylat, rượu polyvinyllic, polysacarit, dextran, ete polyvinyl etyl, polyme có thể phân hủy sinh học, polyme lipid, kitin, axit hyaluronic và hỗn hợp của chúng.

Theo một phương án cụ thể khác, protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý theo sáng chế được gắn kết với vùng Fc của globulin miễn dịch nhờ polyme phi peptidyl được chọn từ nhóm bao gồm polyetylen glycol, polypropylen glycol, copolyme của etylen glycol và propylen glycol, rượu đa chức polyoxyetylat, rượu polyvinyllic, polysacarit, dextran, ete polyvinyl etyl, polyme có thể phân hủy sinh học, polyme lipid, kitin, axit hyaluronic và hỗn hợp của chúng.

Theo một phương án cụ thể khác, protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý theo sáng chế được chọn từ nhóm bao gồm peptit chống béo phì, peptit kích thích tổng hợp và bài tiết insulin hoặc chất tương tự của nó, leptin, insulin, chất tương tự insulin, glucagon, hormon tăng trưởng của người, hormon kích thích sản sinh và giải phóng hormon tăng trưởng, peptit kích thích sản sinh và giải phóng hormon tăng trưởng, interferon, thụ thể interferon, yếu tố kích thích tạo máu, peptit tương tự glucagon, như peptit tương tự glucagon 1, chất chủ vận đặc hiệu kép peptit tương tự glucagon 1/glucagon, polypeptit ức chế bài tiết dịch vị, thụ thể bắt cặp với protein G, interleukin, thụ thể interleukin, enzym, protein gắn kết interleukin, protein gắn kết xytokin, yếu tố hoạt hóa đại thực bào, peptit đại thực bào, yếu tố phiên mã đặc hiệu tế bào B, yếu tố phiên mã đặc hiệu tế bào T, protein A, yếu tố ức chế dị ứng, glycoprotein hoại tử tế bào, độc tố miễn dịch, độc tố lympho, yếu tố hoại tử khối u, yếu tố ức chế khối u, yếu tố tăng trưởng di căn, alpha-1 antitrypsin, albumin, α -lactalbumin, apolipoprotein-E, yếu tố tạo hồng cầu, yếu tố tạo hồng cầu được glycosyl hóa ở mức độ cao, angiopoietin, hemoglobin, thrombin, peptit hoạt hóa thụ thể thrombin, thrombomodulin, yếu tố đông máu VII, yếu tố đông máu VIIa, yếu tố đông máu VIII, yếu tố đông máu IX và yếu tố đông máu XIII, yếu tố hoạt hóa plasminogen, peptit gắn kết fibrin, urokinaza, streptokinaza, hirudin, protein C, C-reactive protein, chất ức chế renin, chất ức chế collagenaza, superoxit dismutaza, yếu tố tăng trưởng có nguồn gốc tiểu cầu, yếu tố tăng trưởng tế bào biểu mô, yếu tố tăng trưởng biểu bì, angiostatin, angiotensin, yếu tố tăng trưởng xương, protein kích thích tạo xương, calcitonin, atriopeptin, yếu tố cảm ứng sụn, elcatonin, yếu tố hoạt hóa mô liên kết, chất

ức chế chu trình yếu tố mô, hormon kích thích nang, hormon tạo hoàng thể, hormon kích thích sản sinh và giải phóng hormon tạo hoàng thể, yếu tố tăng trưởng thần kinh, hormon tuyến cận giáp, relaxin, secretin, somatomedin, yếu tố tăng trưởng tương tự insulin, hormon vỏ thượng thận, glucagon, cholecystokinin, polypepit tuyến tụy, peptit kích thích sản sinh và giải phóng gastrin, yếu tố kích thích giải phóng corticotropin, hormon kích thích tuyến giáp, autotaxin, lactoferin, myostatin, thụ thể, chất đối kháng thụ thể, kháng nguyên bề mặt tế bào, kháng nguyên vaccin có nguồn gốc virus, kháng thể đơn dòng, kháng thể đa dòng, và mảnh kháng thể.

Theo một phương án cụ thể khác, protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý theo sáng chế được chọn từ nhóm bao gồm exendin-4, dẫn xuất exendin-4, chất chủ vận peptit tương tự glucagon 1, insulin và chất chủ vận đặc hiệu kép peptit tương tự glucagon 1/glucagon.

Theo một phương án cụ thể khác, dẫn xuất exendin-4 là dẫn xuất exendin-4 có điện tích ở đầu tận cùng N của exendin-4 được cải biến, được chọn từ nhóm bao gồm dẫn xuất exendin-4 có nhóm amin ở đầu tận cùng N của exendin-4 được loại bỏ, dẫn xuất exendin-4 có nhóm amin ở đầu tận cùng N của exendin-4 được thay thế bằng nhóm hydroxyl, dẫn xuất exendin-4 có nhóm amin ở đầu tận cùng N của exendin-4 được thay thế bằng nhóm carboxyl, dẫn xuất exendin-4 có nhóm amin ở đầu tận cùng N của exendin-4 được cải biến bằng nhóm dimetyl, và dẫn xuất exendin-4 có cacbon alpha của gốc histidin ở đầu tận cùng N của exendin-4 được loại bỏ.

Theo một phương án cụ thể khác, gốc chức bên trong nêu trên là gốc lysin ở vị trí số 12 hoặc 27 của dẫn xuất exendin-4 có điện tích ở đầu tận cùng N của exendin-4 được cải biến.

Theo một phương án cụ thể khác, gốc chức bên trong nêu trên là gốc lysin ở vị trí số 27 của dẫn xuất exendin-4 có điện tích ở đầu tận cùng N của exendin-4 được cải biến.

Theo một phương án cụ thể khác, dẫn xuất exendin-4 có điện tích ở đầu tận cùng N của exendin-4 được biến đổi là dẫn xuất exendin-4 có cacbon alpha của gốc histidin ở đầu tận cùng N của exendin-4 được loại bỏ.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến dược phẩm, chứa thể tiếp hợp protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý trong đó chất mang được gắn kết với gốc chức bên

trong không ở đầu tận cùng của protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý này nhờ gốc liên kết phi peptidyl, và thể tiếp hợp này có khả năng miễn dịch được giảm khi so với khả năng sinh miễn dịch của protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý không được gắn kết với chất mang.

Theo một phương án cụ thể, thể tiếp hợp nêu trên có khả năng sinh miễn dịch (tức là tác dụng không mong muốn của dược phẩm tác dụng kéo dài) được giảm.

Theo một phương án cụ thể khác, gốc liên kết phi peptidyl là polyetylen glycol.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp điều chế thể tiếp hợp protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý, trong đó chất mang được gắn kết với gốc chức bên trong không ở đầu tận cùng của protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý này.

Khả năng sinh miễn dịch trong cơ thể người của thể tiếp hợp protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý theo sáng chế giảm đáng kể, do đó tốc độ sản sinh kháng thể kháng protein hoặc peptit này cũng giảm. Do đó, ưu điểm của thể tiếp hợp theo sáng chế là hiện tượng giảm tác dụng lâm sàng của protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý được hạn chế, và hữu hiệu trong bào chế dược phẩm tác dụng kéo dài có độ an toàn cao kháng đáp ứng miễn dịch.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 là biểu đồ thể hiện kết quả so sánh tần suất kiểu gen HLA-DR của người tình nguyện trong thử nghiệm đánh giá hoạt tính tế bào T *ex vivo* với tần suất kiểu gen HLA-DR của các chủng tộc người trên thế giới, người Châu Âu và người Bắc Mỹ.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề cập đến phương pháp làm giảm khả năng sinh miễn dịch của protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý khi so với khả năng sinh miễn dịch của protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý không được gắn kết với chất mang, bao gồm bước gắn kết chất mang với gốc chức bên trong không ở đầu tận cùng của protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý này.

Các tác giả sáng chế đã phát triển phương pháp làm giảm khả năng sinh miễn dịch của protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý trong đó gốc liên kết phi peptit và mảnh Fc được gắn kết với gốc chức bên trong chứ không phải ở đầu tận cùng của protein hoặc

peptit có hoạt tính sinh lý này, do đó ức chế cơ chế hoạt hóa protein hoặc peptit mong muốn này thành kháng nguyên. Các tác giả sáng chế đã phát hiện thấy rằng khi sử dụng phương pháp nêu trên, sự hoạt hóa tế bào T và phản ứng sản sinh kháng thể ở động vật được ức chế đáng kể so với phương pháp điều chế thể tiếp hợp bằng cách cải biến ở các vị trí khác, như đầu tận cùng N của peptit. Do đó, các tác giả sáng chế đã phát hiện thấy rằng thể tiếp hợp protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý được sử dụng dưới dạng được phẩm protein thông thường có thể được sử dụng làm được phẩm và phương pháp làm giảm khả năng sinh miễn dịch của protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý.

Mức độ giảm khả năng sinh miễn dịch trong cơ thể có thể được đánh giá bằng phương pháp đã biết và không chỉ giới hạn ở các phương pháp này. Ví dụ, mức độ khác biệt về khả năng sinh miễn dịch có thể được kiểm chứng bằng phương pháp đo hoạt tính tế bào T *ex vivo*, bao gồm bước ghép cặp mỗi chất mang với đầu tận cùng N hoặc các vị trí không phải là đầu tận cùng N, bao gồm đầu tận cùng C. Nhóm aldehyt phản ứng phản ứng chọn lọc với đầu tận cùng N ở độ pH thấp, và nhóm aldehyt phản ứng cũng tạo liên kết đồng hóa trị với gốc lysin ở độ pH cao, ví dụ độ pH = 9,0. Phản ứng gắn polyetylen glycol được thực hiện trong khi thay đổi độ pH phản ứng, sau đó các chất đồng phân vị trí có thể được phân tách ra khỏi hỗn hợp phản ứng bằng cột trao đổi ion.

Khi phản ứng ghép cặp được thực hiện ở vị trí không phải là đầu tận cùng N mà là vị trí quan trọng quyết định hoạt tính của protein hoặc peptit *in vivo*, thì nhóm thiol phản ứng có thể được chèn vào vị trí gốc axit amin cần cải biến, do đó tạo ra liên kết đồng hóa trị giữa protein hoặc peptit và nhóm maleimide của polyme phi peptidyl.

Khi phản ứng ghép cặp được thực hiện ở vị trí không phải là đầu tận cùng N mà là vị trí quan trọng trong hoạt tính của protein hoặc peptit *in vivo*, nhóm amin được chèn vào vị trí gốc axit amin cần cải biến, do đó tạo ra liên kết đồng hóa trị giữa protein hoặc peptit và nhóm aldehyt của polyme phi peptidyl.

Ngoài phương pháp dimetyl hóa, thì phương pháp bảo vệ đầu tận cùng N cũng bao gồm phương pháp metyl hóa, phương pháp khử amin hóa hoặc phương pháp axetyl hóa, nhưng không chỉ giới hạn ở các phương pháp này.

Thuật ngữ “protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý” được dùng trong bản mô tả để chỉ protein hoặc peptit có thể kiểm soát biểu hiện gen hoặc chức năng sinh lý. Protein

hoặc peptit có hoạt tính sinh lý có thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn trong phạm vi của sáng chế, miễn là chất mang được gắn kết với gốc chức bên trong không ở đầu tận cùng của protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý theo sáng chế, nhờ đó có khả năng sinh miễn dịch của protein hoặc peptit này giảm khi so với khả năng sinh miễn dịch của protein hoặc peptit không được gắn kết với chất mang. Như mô tả dưới đây, chất mang có thể được gắn kết với protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý nhờ gốc liên kết, đặc biệt là gốc liên kết phi peptidyl.

Ngoài protein hoặc peptit có hoạt tính sinh học tự nhiên thì protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý cũng bao gồm dẫn xuất, biến thể, hoặc mảnh peptit của chúng.

Ví dụ về protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý bao gồm peptit chống béo phì, peptit kích thích tổng hợp và bài tiết insulin hoặc chất tương tự của nó, leptin, insulin, chất tương tự insulin, glucagon, hormon tăng trưởng của người, hormon kích thích sản sinh và giải phóng hormon tăng trưởng, peptit kích thích sản sinh và giải phóng hormon tăng trưởng, interferon, thụ thể interferon, yếu tố kích thích tạo máu, peptit tương tự glucagon (GLP-1, v.v), chất chủ vận đặc hiệu kép peptit tương tự glucagon 1/glucagon, polypeptit ức chế bài tiết dịch vị, thụ thể bắt cặp với protein G, interleukin, thụ thể interleukin, enzym, protein gắn kết interleukin, protein gắn kết xytokin, yếu tố hoạt hóa đại thực bào, peptit đại thực bào, yếu tố phiên mã đặc hiệu tế bào B, yếu tố phiên mã đặc hiệu tế bào T, protein A, yếu tố ức chế dị ứng, glycoprotein hoại tử tế bào, độc tố miễn dịch, độc tố lympho, yếu tố hoại tử khối u, yếu tố ức chế khối u, yếu tố tăng trưởng di căn, alpha-1 antitrypsin, albumin, α -lactalbumin, apolipoprotein-E, yếu tố tạo hồng cầu, yếu tố tạo hồng cầu được glycosyl hóa ở mức độ cao, angiopoietin, hemoglobin, thrombin, peptit hoạt hóa thụ thể thrombin, thrombomodulin, yếu tố đông máu VII, yếu tố đông máu VIIa, yếu tố đông máu VIII, yếu tố đông máu IX và yếu tố đông máu XIII, yếu tố hoạt hóa plasminogen, peptit gắn kết fibrin, urokinaza, streptokinaza, hirudin, protein C, protein phản ứng C, chất ức chế renin, chất ức chế collagenaza, superoxit dismutaza, yếu tố tăng trưởng có nguồn gốc tiểu cầu, yếu tố tăng trưởng tế bào biểu mô, yếu tố tăng trưởng biểu bì, angiostatin, angiotensin, yếu tố tăng trưởng xương, protein kích thích tạo xương, calcitonin, atripectin, yếu tố cảm ứng sụn, elcatonin, yếu tố hoạt hóa mô liên kết, chất ức chế chu trình yếu tố mô, hormon kích thích nang, hormon tạo hoàng thể, hormon kích thích sản sinh và giải phóng hormon tạo hoàng thể, yếu tố tăng trưởng thần kinh,

hormon tuyến cận giáp, relaxin, secretin, somatomedin, yếu tố tăng trưởng tương tự insulin, hormon vỏ thượng thận, glucagon, cholecystokinin, polypepit tuyến tụy, peptit kích thích sản sinh và giải phóng gastrin, yếu tố kích thích giải phóng corticotropin, hormon kích thích tuyến giáp, autotaxin, lactoferin, myostatin, thụ thể, chất đối kháng thụ thể, kháng nguyên bề mặt tế bào, kháng nguyên vacxin có nguồn gốc virus, kháng thể đơn dòng, kháng thể đa dòng, và mảnh kháng thể, nhưng không chỉ giới hạn ở các protein hoặc peptit này.

Cụ thể hơn, protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý có thể bao gồm insulin, peptit kích thích tổng hợp và bài tiết insulin, hoặc chất chủ vận đặc hiệu kép peptit tương tự glucagon 1/glucagon, nhưng không chỉ giới hạn ở các protein hoặc peptit này.

Thuật ngữ “insulin” được dùng trong bản mô tả để chỉ toàn bộ các peptit hoặc peptit cải biến có tác dụng kích thích các thụ thể insulin. Ví dụ về insulin có thể bao gồm insulin tự nhiên, insulin tác dụng nhanh, insulin tác dụng kéo dài, chất tương tự insulin trong đó các axit amin bất kỳ của insulin tự nhiên được biến đổi bằng phương pháp bất kỳ được chọn từ phương pháp thay thế, bổ sung, loại bỏ, và cải biến, hoặc tổ hợp các phương pháp này, hoặc có thể là mảnh peptit của chúng. Ngoài ra, insulin theo sáng chế có thể là insulin tác dụng kéo dài được tổng hợp bằng các phương pháp bào chế được chất tác dụng kéo dài để khắc phục vấn đề về thời gian bán thải ngắn. Cụ thể, insulin có thể là insulin tác dụng kéo dài hoặc chất tương tự insulin tác dụng kéo dài có thể được sử dụng một tuần một lần, nhưng không chỉ giới hạn ở các insulin này.

Ví dụ cụ thể về insulin theo sáng chế bao gồm insulin hoặc chất tương tự insulin và dạng tác dụng kéo dài của nó được mô tả trong Patent Hàn Quốc số 10-1058290 (hoặc WO2008/082274) hoặc Công bố Đơn Patent Hàn Quốc số 2014-0106452 (hoặc WO2014/133324), được kết hợp vào sáng chế bằng cách viện dẫn, nhưng không chỉ giới hạn ở các insulin này.

Thuật ngữ “chất tương tự insulin” được dùng trong bản mô tả để chỉ chất vẫn có chức năng kiểm soát hàm lượng glucoza trong máu *in vivo* tương tự như insulin tự nhiên. Cụ thể, chất tương tự insulin bao gồm các chất trong đó một hoặc nhiều axit amin trong trình tự insulin tự nhiên được cải biến. Chất tương tự insulin có thể là chất tương tự insulin trong đó chuỗi axit amin alpha hoặc chuỗi axit amin beta của insulin tự nhiên được thay đổi. Trình tự axit amin của insulin tự nhiên là như sau.

Chuỗi alpha:

Gly-Ile-Val-Glu-Gln-Cys-Cys-Thr-Ser-Ile-Cys-Ser-Leu-Tyr-Gln-Leu-Glu-Asn-Tyr-Cys-Asn (SEQ ID NO:1).

Chuỗi beta:

Phe-Val-Asn-Gln-His-Leu-Cys-Gly-Ser-His-Leu-Val-Glu-Ala-Leu-Tyr-Leu-Val-Cys-Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Pro-Lys-Thr (SEQ ID NO:2).

Cụ thể, ít nhất một axit amin trong insulin tự nhiên có thể có gốc cải biến được chọn từ nhóm bao gồm gốc thay thế, gốc bổ sung, gốc loại bỏ, gốc cải biến và hỗn hợp của chúng, nhưng không chỉ giới hạn ở các gốc cải biến này.

Trong phản ứng thay thế hoặc bổ sung axit amin, 20 axit amin thường có trong protein của người cũng như các axit amin thông thường hoặc không có trong tự nhiên có thể được sử dụng. Các công ty sản xuất axit amin thông thường bao gồm Sigma-Aldrich, ChemPep và Genzyme. Các peptit chứa các axit amin này và trình tự peptit thông thường có thể được tổng hợp hoặc mua từ các công ty tổng hợp peptit, ví dụ American Peptide Company Inc., và Bachem (USA), hoặc Anygen (Korea).

Cụ thể, chất tương tự insulin nêu trên bao gồm insulin có cấu trúc đảo ngược, biến thể insulin, mảnh insulin, chất chủ vận insulin, dẫn xuất insulin và tương tự, và phương pháp điều chế chúng bao gồm phương pháp tái tổ hợp gen cũng như phương pháp pha rắn, nhưng không chỉ giới hạn ở các phương pháp này.

Thuật ngữ “dẫn xuất insulin” được dùng trong bản mô tả để chỉ trình tự axit amin tương đồng với chuỗi alpha và chuỗi beta của insulin tự nhiên, đồng thời vẫn có chức năng kiểm soát hàm lượng glucoza trong máu trong cơ thể, và bao gồm dạng peptit có thể có một số nhóm chức trên các gốc axit amin được thay thế (ví dụ, alpha-metyl hóa, alpha-hydroxyl hóa), loại bỏ (ví dụ, khử amin hóa), hoặc cải biến (ví dụ, N-metyl hóa). Ngoài ra, dẫn xuất insulin bao gồm hợp chất có cấu trúc tương tự peptit, và hợp chất có khối lượng phân tử thấp hoặc hợp chất có khối lượng phân tử cao, có thể gắn kết với thụ thể insulin để kiểm soát hàm lượng glucoza trong máu trong cơ thể, thậm chí không tương đồng với insulin tự nhiên và trình tự axit amin.

Thuật ngữ “mảnh insulin” được dùng trong bản mô tả để chỉ mảnh có một hoặc

nhều axit amin được bổ sung hoặc loại bỏ trong insulin. Axit amin được bổ sung có thể là axit amin không có trong tự nhiên (ví dụ, D-axit amin). Mảnh insulin theo sáng chế vẫn có chức năng kiểm soát hàm lượng glucoza trong máu trong cơ thể.

Thuật ngữ “biến thể insulin” được dùng trong bản mô tả để chỉ peptit có một hoặc nhiều trình tự axit amin khác với trình tự axit amin của insulin, và vẫn có chức năng kiểm soát hàm lượng glucoza trong máu trong cơ thể.

Phương pháp điều chế chất chủ vận insulin, dẫn xuất, mảnh và biến thể theo sáng chế, có thể được sử dụng riêng và kết hợp. Ví dụ, sáng chế cũng bao gồm peptit có một hoặc nhiều trình tự axit amin khác với trình tự axit amin của insulin tự nhiên, được khử amin hóa ở gốc axit amin đầu tận cùng, và vẫn có chức năng kiểm soát hàm lượng glucoza trong máu trong cơ thể.

Phần mô tả chất chủ vận, dẫn xuất, mảnh và biến thể của insulin nêu trên cũng có thể được áp dụng cho các dạng khác của protein hoặc peptit.

Cụ thể, chất tương tự insulin có thể là chất trong đó một hoặc nhiều axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các axit amin ở vị trí số 1, các axit amin ở vị trí số 2, các axit amin ở vị trí số 3, các axit amin ở vị trí số 5, các axit amin ở vị trí số 8, các axit amin ở vị trí số 10, các axit amin ở vị trí số 12, các axit amin ở vị trí số 16, các axit amin ở vị trí số 23, các axit amin ở vị trí số 24, các axit amin ở vị trí số 25, các axit amin ở vị trí số 26, các axit amin ở vị trí số 27, các axit amin ở vị trí số 28, các axit amin ở vị trí số 29, các axit amin ở vị trí số 30 của chuỗi beta; các axit amin ở vị trí số 1, các axit amin ở vị trí số 2, các axit amin ở vị trí số 5, các axit amin ở vị trí số 8, các axit amin ở vị trí số 10, các axit amin ở vị trí số 12, các axit amin ở vị trí số 14, các axit amin ở vị trí số 16, các axit amin ở vị trí số 17, các axit amin ở vị trí số 18, các axit amin ở vị trí số 19 và các axit amin ở vị trí số 21 của chuỗi alpha được thay thế bằng các axit amin khác, và cụ thể hơn chất tương tự insulin có thể là chất trong đó một hoặc nhiều axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các axit amin ở vị trí số 8, các axit amin ở vị trí số 23, các axit amin ở vị trí số 24, các axit amin ở vị trí số 25 của chuỗi beta; các axit amin ở vị trí số 1, các axit amin ở vị trí số 2, các axit amin ở vị trí số 14 và các axit amin ở vị trí số 19 của chuỗi alpha được thay thế bằng các axit amin khác.

Cụ thể, trong số các axit amin nêu trên, chất tương tự insulin có thể là chất trong

đó 1 hoặc nhiều, 2 hoặc nhiều, 3 hoặc nhiều, 4 hoặc nhiều, 5 hoặc nhiều, 6 hoặc nhiều, 7 hoặc nhiều, 8 hoặc nhiều, 9 hoặc nhiều, 10 hoặc nhiều, 11 hoặc nhiều, 12 hoặc nhiều, 13 hoặc nhiều, 14 hoặc nhiều, 15 hoặc nhiều, 16 hoặc nhiều, 17 hoặc nhiều, 18 hoặc nhiều, 19 hoặc nhiều, 20 hoặc nhiều, 21 hoặc nhiều, 22 hoặc nhiều, 23 hoặc nhiều, 24 hoặc nhiều, 25 hoặc nhiều, 26 hoặc nhiều, hoặc 27 hoặc nhiều axit amin được thay thế bằng các axit amin khác có thể được sử dụng, nhưng không chỉ giới hạn ở các chất này.

Các gốc axit amin ở các vị trí nêu trên có thể được thay thế bằng alanin, axit glutamic, asparagin, isoleucin, valin, glutamin, glycin, lysin, histidin, xystein, phenylalanin, tryptophan, prolin, serin, threonin, và/hoặc axit aspartic.

Thuật ngữ “peptit kích thích tổng hợp và bài tiết insulin” được dùng trong bản mô tả để chỉ peptit vẫn có chức năng kích thích bài tiết insulin. Peptit kích thích tổng hợp và bài tiết insulin có thể kích thích tổng hợp hoặc biểu hiện insulin ở tế bào beta của tụy. Cụ thể, peptit kích thích tổng hợp và bài tiết insulin là peptit tương tự glucagon 1, exendin-3, hoặc exendin-4, nhưng không chỉ giới hạn ở các peptit này. Peptit kích thích tổng hợp và bài tiết insulin bao gồm peptit kích thích tổng hợp và bài tiết insulin tự nhiên, tiền chất, chất chủ vận, dẫn xuất, mảnh peptit, và biến thể của nó cũng như hỗn hợp của chúng như mô tả nêu trên.

Peptit tương tự glucagon 1 là hormon được bài tiết bởi ruột non, và có tác dụng kích thích sinh tổng hợp và bài tiết insulin, ức chế bài tiết glucagon, và tăng cường hấp thu glucoza bởi tế bào. Ở ruột non, tiền chất glucagon được chuyển hóa thành 3 peptit, bao gồm glucagon, peptit tương tự glucagon 1, và peptit tương tự glucagon 2. Theo sáng chế, peptit tương tự glucagon 1 có nghĩa là peptit tương tự glucagon 1 (1-37) ở dạng ban đầu không có chức năng kích thích insulin, nhưng sau đó được phân cắt và chuyển hóa thành dạng peptit tương tự glucagon 1 (7-37) có hoạt tính.

Exendin-4 là peptit có 39 axit amin, có độ tương đồng trình tự axit amin với peptit tương tự glucagon 1 bằng 53%. Exendin-4 có thể có trình tự như sau, nhưng không chỉ giới hạn ở trình tự này:

Exendin-4:

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser (SEQ

ID NO:3)

Trong khi đó, exendin-3 là polypeptit có các axit amin ở vị trí số 2 và 3 khác với các axit amin ở vị trí số 2 và 3 của exendin-4. Exendin-3 là polypeptit trong đó các axit amin ở vị trí số 2 và 3 của exendin 4 lần lượt được thay thế bằng serin và axit aspartic, và exendin-3 có công thức là Ser²Asp³-exendin-4(1-39). Cụ thể, exendin-3 có thể có trình tự như sau, nhưng không chỉ giới hạn ở trình tự này:

Exendin-3:

His Ser Asp Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser (SEQ ID NO:4)

Dẫn xuất peptit kích thích tổng hợp và bài tiết insulin nêu trên có thể là dẫn xuất trong đó đầu tận cùng N của peptit kích thích tổng hợp và bài tiết insulin được cải biến. Cụ thể hơn, dẫn xuất peptit kích thích tổng hợp và bài tiết insulin có thể phân giải nhanh thụ thể bằng cách biến đổi điện tích ở đầu tận cùng N, và dẫn xuất peptit kích thích tổng hợp và bài tiết insulin có thể là dẫn xuất trong đó điện tích dương ở đầu tận cùng N được biến đổi thành điện tích trung hòa hoặc điện tích âm tuyệt đối.

Dẫn xuất peptit kích thích tổng hợp và bài tiết insulin theo sáng chế có thể bao gồm dẫn xuất histidyl đã khử amin có nhóm amin (hoặc amin) ở đầu tận cùng N của peptit kích thích tổng hợp và bài tiết insulin được loại bỏ, dẫn xuất beta-hydroxy imidazopropionyl có nhóm amin được thay thế bằng nhóm hydroxyl, dẫn xuất dimethyl-histidyl có nhóm amin được cải biến bằng hai nhóm methyl, dẫn xuất beta-carboxyimidazopropionyl có nhóm amin ở đầu tận cùng N được thay thế bằng nhóm carboxyl, hoặc dẫn xuất imidazoaxetyl có cacbon alpha của gốc histidin ở đầu tận cùng N được loại bỏ để chỉ giữ lại nhóm imidazoaxetyl, do đó điện tích dương của nhóm amin được loại bỏ, và các dẫn xuất được cải biến nhóm amin ở đầu tận cùng N khác cũng nằm trong phạm vi của sáng chế.

Ví dụ, dẫn xuất peptit kích thích tổng hợp và bài tiết insulin có thể là dẫn xuất có nhóm amin (hoặc amin) ở đầu tận cùng N hoặc gốc axit amin ở đầu tận cùng N của exendin-4 được cải biến bằng phương pháp hóa học. Cụ thể, dẫn xuất peptit kích thích tổng hợp và bài tiết insulin là dẫn xuất exendin-4 được điều chế bằng cách thay thế hoặc

loại bỏ nhóm amin alpha có trong cacbon alpha của gốc histidin ở đầu tận cùng N (axit amin thứ nhất) của exendin-4. Cụ thể hơn, dẫn xuất peptit kích thích tổng hợp và bài tiết insulin có thể bao gồm histidyl-exendin-4 đã khử amin (DA-Exendin-4) được điều chế bằng cách loại bỏ nhóm amin ở đầu tận cùng N, beta-hydroxy imidazopropyl-exendin-4 (HY-exendin-4) được điều chế bằng cách thay thế nhóm amin ở đầu tận cùng N bằng nhóm hydroxyl, beta-carboxy imidazopropyl-exendin-4 (CX-exendin-4) được điều chế bằng cách thay thế nhóm amin ở đầu tận cùng N bằng nhóm carboxyl, dimethyl-histidyl-exendin-4 (DM-exendin-4) được điều chế bằng cách cải biến nhóm amin ở đầu tận cùng N bằng hai gốc methyl, hoặc imidazoaxetyl-exendin-4 (CA-exendin-4) được điều chế bằng cách loại bỏ cacbon alpha của gốc histidin ở đầu tận cùng N, và các dẫn xuất tương tự.

Peptit kích thích tổng hợp và bài tiết insulin được mô tả trong Công bố đơn Patent Hàn Quốc số 10-2012-0135123 (hoặc WO2012/165915) hoặc WO2014/107035; được kết hợp vào sáng chế bằng cách viện dẫn; cũng nằm trong phạm vi của sáng chế.

Thuật ngữ “chất chủ vận đặc hiệu kép peptit tương tự glucagon 1/glucagon” được dùng trong bản mô tả để chỉ peptit hoặc mảnh peptit, tiền chất, biến thể hoặc dẫn xuất của nó có hoạt tính đặc hiệu kép peptit tương tự glucagon 1/glucagon, như oxyntomodulin, là chất chủ vận đặc hiệu kép peptit tương tự glucagon 1/glucagon tự nhiên. Theo sáng chế, chất chủ vận đặc hiệu kép peptit tương tự glucagon 1/glucagon có thể là chất chủ vận đặc hiệu kép peptit tương tự glucagon 1/glucagon được tổng hợp bằng các phương pháp bào chế được chất tác dụng kéo dài để khắc phục vấn đề về thời gian bán thải ngắn, và tốt hơn nếu chất chủ vận đặc hiệu kép peptit tương tự glucagon 1/glucagon tác dụng kéo dài có thể được sử dụng một tuần một lần, nhưng không chỉ giới hạn ở chất chủ vận này.

Chất chủ vận đặc hiệu kép peptit tương tự glucagon 1/glucagon bao gồm oxyntomodulin.

Thuật ngữ “oxyntomodulin” được dùng trong bản mô tả để chỉ peptit được tạo ra từ tiền glucagon, là tiền chất của glucagon. Theo sáng chế, oxyntomodulin bao gồm oxyntomodulin tự nhiên, tiền chất, dẫn xuất, mảnh peptit, biến thể của nó và peptit tương tự như mô tả nêu trên.

Oxyntomodulin có thể có trình tự axit amin là

HSQGTFTSDYSKYLDSSRAQDFVQWLMNTKRNRNNIA (SEQ ID NO:5), nhưng không chỉ giới hạn ở trình tự này.

Dẫn xuất oxyntomodulin bao gồm peptit, dẫn xuất peptit hoặc hợp chất có cấu trúc tương tự peptit được điều chế bằng cách bổ sung, loại bỏ hoặc thế axit amin bất kỳ trên trình tự của oxyntomodulin và có thể hoạt hóa cả thụ thể peptit tương tự glucagon 1 và thụ thể glucagon, và đặc biệt có thể hoạt hóa mỗi thụ thể này ở mức độ cao hơn mức độ được hoạt hóa bởi oxyntomodulin tự nhiên.

Ví dụ cụ thể về chất chủ vận đặc hiệu kép peptit tương tự glucagon 1/glucagon theo sáng chế bao gồm chất chủ vận đặc hiệu kép peptit tương tự glucagon 1/glucagon, dẫn xuất hoặc dạng tác dụng kéo dài của nó được mô tả trong Đơn công bố Patent Hàn Quốc số 10-20125-01372771 (hoặc WO2012/169798) và 10-2012-01639579 (hoặc WO2012/173422), được kết hợp vào sáng chế bằng cách viện dẫn.

Theo sáng chế, chất mang that được gắn kết với protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý có thể là chất có tác dụng làm tăng thời gian bán thải *in vivo* của protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý này.

Ví dụ về protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý bao gồm các chất khác nhau có khả năng làm giảm độ thanh thải thận của protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý, ví dụ polyetylen glycol, axit béo, cholesterol, albumin hoặc mảnh peptit của nó, hợp chất gắn kết albumin, polyme có các đơn vị lặp chứa trình tự axit amin đặc hiệu, kháng thể, mảnh kháng thể, hợp chất gắn kết thụ thể vùng Fc mới sinh, mô liên kết *in vivo* hoặc dẫn xuất của nó, nucleotit, fibronectin, transferin, polypeptit tương tự elastin, polypeptit XTEN, peptit chứa đầu tận cùng carboxyl, mẫu dò cảm ứng tạo cấu trúc, sacarit, polyme có khối lượng phân tử cao, trình tự axit amin đặc hiệu, polyme có các đơn vị lặp chứa trình tự axit amin đặc hiệu, và các chất tương tự. Ngoài ra, gốc liên kết giữa protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý và chất mang bao gồm gốc liên kết được tạo ra bằng phương pháp tái tổ hợp gen và gốc liên kết *in vitro*, nhưng không chỉ giới hạn ở các gốc liên kết này.

Chất mang có thể được liên kết đồng hóa trị hoặc không đồng hóa trị với protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý. Hợp chất gắn kết thụ thể vùng Fc mới sinh nêu trên có thể là vùng Fc của globulin miễn dịch, ví dụ vùng Fc của IgG.

Khi polyetylen glycol được sử dụng làm chất mang, thì phương pháp Recode do

Ambrx Inc. cung cấp có thể gắn kết đặc hiệu vị trí với polyetylen glycol có thể được sử dụng. Ngoài ra, phương pháp gắn polyetylen glycol do Neose company cung cấp có thể gắn kết đặc hiệu với gốc được glycosyl hóa có thể được sử dụng. Hơn nữa, phương pháp giải phóng PEG trong đó polyetylen glycol được thải trừ từ từ trong cơ thể có thể được sử dụng, nhưng không chỉ giới hạn ở các phương pháp này. Ngoài ra, các phương pháp có thể được sử dụng trong sáng chế bao gồm phương pháp làm tăng độ sinh khả dụng bằng cách sử dụng PEG. Ngoài ra, các polyme phi peptidyl, như polyetylen glycol, polypropylen glycol, copolyme của etylen glycol và propylen glycol, rượu đa chức polyoxyetylat, rượu polyvinyl, polysacarit, dextran, ete polyvinyl etyl, polyme có thể phân hủy sinh học, polyme lipid, kitin, hoặc axit hyaluronic cũng có thể được gắn kết với protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý bằng cách sử dụng các phương pháp nêu trên.

Khi albumin được sử dụng làm chất mang, phương pháp có thể được sử dụng theo sáng chế bao gồm phương pháp trong đó albumin hoặc mảnh peptit của nó có thể được liên kết đồng hóa trị trực tiếp với protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý để làm tăng độ ổn định *in vivo*. Ngay cả khi albumin không được liên kết trực tiếp, thì phương pháp trong đó hợp chất gắn kết albumin, ví dụ kháng thể hoặc mảnh kháng thể gắn kết đặc hiệu albumin được gắn kết với protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý nhờ đó gắn kết với albumin có thể được sử dụng, và phương pháp trong đó một số peptit/protein có ái lực gắn kết với albumin được gắn kết với protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý có thể được sử dụng. Ngoài ra, phương pháp trong đó axit béo có ái lực gắn kết với albumin được gắn kết với protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý có thể được sử dụng, nhưng không chỉ giới hạn ở các phương pháp này. Phương pháp gắn kết hoặc phương pháp bất kỳ có thể làm tăng độ ổn định *in vivo* bằng cách sử dụng albumin có thể được sử dụng theo sáng chế.

Phương pháp để gắn kết với protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý bằng cách sử dụng chất mang là kháng thể hoặc mảnh kháng thể để làm tăng thời gian bán thải *in vivo* cũng có thể được sử dụng theo sáng chế. Kháng thể hoặc mảnh kháng thể có vị trí gắn kết FcRn có thể được sử dụng, và mảnh kháng thể bất kỳ không chứa vị trí gắn kết FcRn, ví dụ mảnh kháng thể không chứa đoạn Fab có thể được sử dụng. Phương pháp thể CovX do CovX Company cung cấp sử dụng kháng thể xúc tác có thể được sử dụng theo sáng chế, và phương pháp làm tăng thời gian bán thải *in vivo* sử dụng vùng Fc của globulin miễn dịch có thể được sử dụng theo sáng chế.

Khi vùng Fc của globulin miễn dịch được sử dụng, thì gốc liên kết gắn kết với vùng Fc và protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý và phương pháp gắn kết của nó có thể bao gồm liên kết peptit hoặc polyetylen glycol hoặc gốc liên kết tương tự, nhưng không chỉ giới hạn ở các gốc liên kết này và phương pháp gắn kết hóa học bất kỳ có thể có trên thị trường. Ngoài ra, tỷ lệ gắn kết của vùng Fc và chất tương tự insulin có thể bằng 1:1 hoặc 1:2, nhưng không chỉ giới hạn ở các tỷ lệ này.

Vùng hằng định của globulin miễn dịch chứa vùng Fc là polypeptit có thể phân hủy sinh học có thể được chuyển hóa *in vivo*, do đó an toàn để sử dụng làm chất mang được chất. Ngoài ra, dưới góc độ sản xuất, tinh chế và hiệu suất của thể phức hợp, vùng Fc của globulin miễn dịch có ưu điểm hơn phân tử globulin miễn dịch có chiều dài đầy đủ do có khối lượng phân tử tương đối thấp. Ngoài ra, do vùng Fc của globulin miễn dịch không chứa đoạn Fab, mà có độ không đồng nhất cao do khác biệt về trình tự axit amin giữa các kháng thể với nhau, nên riêng vùng Fc của globulin miễn dịch tạo ra thể phức hợp với độ đồng nhất được cải thiện đáng kể, và làm giảm khả năng sinh kháng nguyên trong máu.

Ngoài ra, PEG nêu trên được gắn kết không đặc hiệu với vị trí đặc hiệu hoặc các vị trí đặc hiệu khác nhau của peptit đích, do đó làm tăng khối lượng phân tử của peptit này. Do đó, PEG làm giảm hữu hiệu độ thanh thải thận, ngăn ngừa thủy phân peptit và không gây ra tác dụng không mong muốn nghiêm trọng. Ngoài ra, khi được gắn kết với peptit ngoại sinh, PEG có thể làm giảm khả năng nhận diện các vị trí kháng nguyên có ở peptit ngoại sinh của tế bào miễn dịch. Cụ thể, PEG có thể ức chế peptit khỏi bị thực bào bởi tế bào trình diện kháng nguyên và ức chế phân giải protein. Do đó, PEG có thể làm giảm khả năng hoạt hóa peptit thành kháng nguyên. Đặc biệt đối với kháng nguyên là protein ngoại sinh để kích thích hoạt hóa tế bào T biểu hiện CD4, thì khoảng 14-24 peptit mạch ngắn ở dạng được gắn kết với MHC nhóm II phải được biểu hiện trên tế bào trình diện kháng nguyên. Quá trình thực bào và phân giải protein có thể bị ức chế trong quá trình phân cắt thành kích cỡ thích hợp phụ thuộc vào vị trí gắn kết của PEG.

Theo một phương án, chất mang được liên kết với protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý nhờ gốc liên kết, cụ thể gốc liên kết phi peptidyl.

Theo sáng chế, gốc liên kết phi peptidyl là polyme có thể phân hủy sinh học chứa hai hoặc nhiều đơn vị lặp lại, các đơn vị lặp lại này có thể được gắn kết với nhau bằng

liên kết đồng hóa trị bất kỳ, ngoại trừ gốc liên kết peptit. Thuật ngữ “gốc liên kết phi peptidyl” và “polyme phi peptidyl” có thể được sử dụng thay thế cho nhau.

Gốc liên kết phi peptidyl theo sáng chế có thể được chọn từ nhóm bao gồm polyme có thể phân hủy sinh học, polyme lipid, kitin, axit hyaluronic, và hỗn hợp của chúng. Polyme có thể phân hủy sinh học theo sáng chế có thể bao gồm polyetylen glycol, polypropylen glycol, copolyme của etylen glycol và propylen glycol, rượu đa chức polyoxyetylát, rượu polyvinyl, polysaccharit, dextran, ete polyvinyl etyl, axit polylactic hoặc axit polylactic-glycolic. Theo một phương án cụ thể, polyme phi peptidyl là polyetylen glycol. Ngoài ra, các dẫn xuất của các polyme nêu trên đã biết trong lĩnh vực này và dẫn xuất dễ dàng được điều chế bằng phương pháp đã biết trong lĩnh vực này cũng nằm trong phạm vi của sáng chế.

Gốc liên kết peptit được sử dụng trong protein dung hợp được điều chế bằng phương pháp dung hợp trong khung thông thường có nhược điểm là dễ bị phân cắt *in vivo* bởi enzym phân giải protein, do đó tác dụng làm tăng thời gian bán thải của dược chất bởi chất mang không thể thu được đầy đủ như mong muốn. Tuy nhiên, do không chứa gốc liên kết peptit, nên polyme phi peptidyl theo sáng chế có thể kháng enzym phân giải protein, do đó làm tăng thời gian bán thải trong huyết thanh của peptit. Khối lượng phân tử của polyme phi peptidyl theo sáng chế nằm trong khoảng từ 1 đến 100 kDa, và tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 1 đến 20 kDa. Polyme phi peptidyl theo sáng chế được liên kết với vùng Fc của globulin miễn dịch có thể là một loại polyme hoặc hỗn hợp của các loại polyme khác nhau.

Theo sáng chế, chất mang được gắn kết với gốc chức bên trong không ở đầu tận cùng của protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý. Trong trường hợp này, như nêu trên, chất mang có thể được gắn kết với gốc chức bên trong không ở đầu tận cùng của protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý nhờ gốc liên kết.

Gốc chức bên trong không ở đầu tận cùng của protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý có thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở gốc bất kỳ khi chất mang được gắn kết với protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý thì có thể làm giảm khả năng sinh miễn dịch của chúng, so với khả năng sinh miễn dịch của protein hoặc peptit không được gắn kết với chất mang hoặc protein hoặc peptit trong đó chất mang được gắn kết với vị trí đầu tận cùng của protein hoặc peptit.

Axit amin bên trong không ở đầu tận cùng của protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý có thể là lysin, xystein, hoặc tương tự.

Cụ thể hơn, khi protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý là peptit kích thích tổng hợp và bài tiết insulin, đặc biệt là exendin-4 hoặc dẫn xuất của exendin-4, thì gốc chức bên trong có thể là gốc lysin ở vị trí số 12 hoặc 27, nhưng không chỉ giới hạn ở các gốc chức này.

Ngoài ra, khi gốc liên kết aldehyt được sử dụng làm polyme phi peptidyl, thì đầu tận cùng N được phản ứng với nhóm amin trong gốc lysin, và dạng cải biến của peptit kích thích tổng hợp và bài tiết insulin có thể được sử dụng để cải thiện hiệu suất phản ứng. Ví dụ, nhóm amin phản ứng có thể được giữ ở vị trí mong muốn bằng cách sử dụng phương pháp phong bế đầu tận cùng N, phương pháp thay thế gốc lysin, phương pháp chen nhóm amin, cũng như phương pháp gắn polyetylen glycol và hiệu suất ghép cặp có thể được cải thiện.

Theo phương án ưu tiên, thể tiếp hợp peptit kích thích tổng hợp và bài tiết insulin trong đó chất mang được gắn kết với gốc chức bên trong không ở đầu tận cùng của peptit kích thích tổng hợp và bài tiết insulin theo sáng chế, là thể tiếp hợp peptit kích thích tổng hợp và bài tiết insulin trong đó vùng Fc của globulin miễn dịch được gắn kết đặc hiệu với nhóm amin không ở đầu tận cùng N của peptit kích thích tổng hợp và bài tiết insulin.

Theo một phương án cụ thể, các tác giả sáng chế đã thực hiện một loạt các thử nghiệm trong phương pháp gắn kết chọn lọc PEG với gốc lysin của peptit kích thích tổng hợp và bài tiết insulin, khi gắn kết PEG với exendin-4 tự nhiên, thì phản ứng này được thực hiện ở độ pH = 9,0, do đó gắn đặc hiệu PEG với gốc lysin; trong khi đó trong phương pháp khác, khi gắn kết PEG với dạng được bảo vệ hoặc loại bỏ đầu tận cùng N của dẫn xuất exendin-4, thì phản ứng này được thực hiện ở độ pH = 7,5, do đó gắn đặc hiệu PEG với gốc lysin. Do đó, các tác giả sáng chế đã kiểm chứng được rằng trái ngược với khi gắn kết chất mang ở đầu tận cùng N, thì khi gắn kết chất mang với gốc lysin, hoạt tính tế bào *T ex vivo* bị ức chế đáng kể (Bảng 2-4).

Thuật ngữ “vùng Fc của globulin miễn dịch” được dùng trong bản mô tả để chỉ vùng hằng định chuỗi nặng 2 (CH2) và vùng hằng định chuỗi nặng 3 (CH3) của globulin miễn dịch, không bao gồm vùng thay đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, vùng hằng định

chuỗi nặng 1 (CH1) và vùng hằng định chuỗi nhẹ 1 (CL1) của globulin miễn dịch. Vùng Fc của globulin miễn dịch có thể còn bao gồm vùng bản lề ở vùng hằng định chuỗi nặng.

Ngoài ra, vùng Fc của globulin miễn dịch theo sáng chế có thể chứa một phần hoặc toàn bộ vùng Fc bao gồm vùng hằng định chuỗi nặng 1 (CH1) và/hoặc vùng hằng định chuỗi nhẹ 1 (CL1), không bao gồm vùng thay đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch, miễn là có tác dụng sinh lý gần như tương đương hoặc mạnh hơn protein tự nhiên. Hơn nữa, vùng Fc của globulin miễn dịch có thể là mảnh có đột biến loại bỏ ở vị trí tương đối dài của trình tự axit amin của CH2 và/hoặc CH3. Tức là vùng Fc của globulin miễn dịch theo sáng chế có thể chứa 1) vùng CH1, vùng CH2, vùng CH3 và vùng CH4, 2) vùng CH1 và vùng CH2, 3) vùng CH1 và vùng CH3, 4) vùng CH2 và vùng CH3, 5) tổ hợp của một hoặc nhiều vùng và vùng bản lề của globulin miễn dịch (hoặc một phần của vùng bản lề), và 6) dime của mỗi vùng của vùng hằng định chuỗi nặng và vùng hằng định chuỗi nhẹ.

Ngoài ra, vùng Fc của globulin miễn dịch theo sáng chế bao gồm trình tự axit amin tự nhiên cũng như dẫn xuất trình tự (đột biến) của nó. Dẫn xuất trình tự axit amin có trình tự khác biệt do đột biến loại bỏ, đột biến chèn thêm, đột biến thay thế không bảo thủ hoặc bảo thủ hoặc tổ hợp của chúng ở một hoặc nhiều gốc axit amin của các trình tự axit amin tự nhiên. Ví dụ, trong vùng Fc của IgG, các gốc axit amin ở các vị trí số 214 đến 238, 297 đến 299, 318 đến 322, hoặc 327 đến 331, đã biết là quan trọng trong gắn kết, có thể được sử dụng làm đích thích hợp để cải biến. Ngoài ra, nhiều loại dẫn xuất khác nhau có thể được sử dụng, bao gồm dẫn xuất trong đó vùng có khả năng tạo ra liên kết disulfua được loại bỏ, hoặc một số gốc axit amin được loại bỏ ở đầu tận cùng N của dạng Fc tự nhiên hoặc gốc metionin được bổ sung vào. Ngoài ra, để loại bỏ chức năng tác động, gốc loại bỏ có thể xuất hiện ở vị trí gắn kết bổ thể, như vị trí gắn kết C1q và vị trí gây độc tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể. Các phương pháp điều chế dẫn xuất trình tự của vùng Fc của globulin miễn dịch được mô tả trong WO 97/34631, WO 96/32478 và các tài liệu tương tự.

Các gốc trao đổi axit amin trong protein và peptit, mà không làm thay đổi hoàn toàn hoạt tính của các phân tử, đã biết trong lĩnh vực này (H. Neurath, R. L. Hill, *The Proteins*, Academic Press, New York, 1979). Các gốc trao đổi xuất hiện thông thường nhất là các gốc trao đổi giữa các gốc axit amin Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser,

Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Thy/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu và Asp/Gly.

Ngoài ra, vùng Fc, khi cần, có thể được cải biến bằng cách phosphoryl hóa, sulfat hóa, acryl hóa, glycosyl hóa, metyl hóa, farnesyl hóa, axetyl hóa, amit hóa, và tương tự.

Dẫn xuất vùng Fc nêu trên có thể là dẫn xuất có hoạt tính sinh lý tương tự như vùng Fc theo sáng chế hoặc cải thiện độ ổn định cấu trúc kháng nhiệt, độ pH hoặc đặc tính tương tự của vùng Fc.

Hơn nữa, các vùng Fc này có thể được thu nhận từ các dạng tự nhiên phân lập từ người và các động vật khác bao gồm bò, dê, lợn, chuột nhắt, thỏ, chuột đồng, chuột cống hoặc chuột lang, hoặc có thể là thể tái tổ hợp hoặc dẫn xuất của nó, được thu nhận từ tế bào động vật chuyển gen hoặc vi sinh vật. Theo sáng chế, phương pháp thu nhận từ globulin miễn dịch tự nhiên bao gồm bước phân lập toàn bộ các globulin miễn dịch từ người hoặc động vật, sau đó xử lý chúng với enzym phân giải protein. Xử lý bằng papain dẫn đến phân giải globulin miễn dịch tự nhiên thành Fab và Fc, và xử lý bằng pepsin dẫn đến tạo ra mảnh pFc' và mảnh F(ab)₂. Các mảnh này có thể được phân tích sắc ký loại cỡ và phương pháp tương tự để phân lập mảnh Fc hoặc mảnh pFc'.

Cụ thể vùng Fc có nguồn gốc từ người là vùng Fc của globulin miễn dịch tái tổ hợp được thu nhận từ vi sinh vật.

Ngoài ra, vùng Fc của globulin miễn dịch là ở dạng có các chuỗi đường tự nhiên, chuỗi đường dài hơn dạng tự nhiên hoặc chuỗi đường ngắn hơn dạng tự nhiên, hoặc có thể ở dạng được khử glycosyl hóa. Việc tăng, giảm hoặc loại bỏ các chuỗi đường ở vùng Fc của globulin miễn dịch có thể có thể đạt được bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này, như phương pháp hóa học, phương pháp enzym và phương pháp thiết kế gen bằng cách sử dụng vi sinh vật. Việc loại bỏ các chuỗi đường khỏi vùng Fc của globulin miễn dịch dẫn đến giảm mạnh ái lực gắn kết với phần C1q của yếu tố bổ thể và làm giảm hoặc loại bỏ hoạt tính gây độc tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể hoặc hoạt tính gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể, nhờ đó không gây ra đáp ứng miễn dịch không mong muốn *in vivo*. Về vấn đề này, đối với mục đích của sáng chế vùng Fc của globulin miễn dịch ở dạng khử glycosyl hóa hoặc dạng không glycosyl hóa có thể được ưu tiên sử dụng làm chất mang dược chất.

Thuật ngữ “khử glycosyl hóa” được dùng trong bản mô tả để chỉ quá trình loại bỏ các gốc được khỏi vùng Fc bằng enzym, và thuật ngữ “không glycosyl hóa” có nghĩa là vùng Fc được tạo ra ở dạng chưa glycosyl hóa bởi sinh vật nhân sơ, đặc biệt là *E. coli*.

Trong khi đó, vùng Fc của globulin miễn dịch có thể có nguồn gốc từ người hoặc các động vật khác bao gồm bò, dê, lợn, chuột nhắt, thỏ, chuột đồng, chuột cống và chuột lang, và tốt hơn nếu từ người.

Ngoài ra, vùng Fc của globulin miễn dịch có thể là vùng Fc có nguồn gốc từ IgG, IgA, IgD, IgE và IgM, hoặc globulin miễn dịch được điều chế bằng cách tổ hợp chúng hoặc các thể lai của chúng. Cụ thể, vùng Fc của globulin miễn dịch có nguồn gốc từ IgG hoặc IgM, là một trong số các protein có nhiều nhất trong máu người, và tốt nhất nếu từ IgG, được biết là làm tăng thời gian bán thải của các protein gắn kết phôi tử, nhưng không chỉ giới hạn ở các globulin miễn dịch này.

Trái lại, thuật ngữ “tổ hợp” được dùng trong bản mô tả để chỉ các vùng Fc của globulin miễn dịch sợi đơn mã hóa polypeptit có cùng nguồn gốc được gắn kết với polypeptit sợi đơn từ nguồn khác để tạo ra dime hoặc multime. Tức là dime hoặc multime có thể được tạo ra từ hai hoặc nhiều mảnh được chọn từ nhóm bao gồm các mảnh IgG Fc, IgA Fc, IgM Fc, IgD Fc, và IgE Fc.

Thuật ngữ “thể lai” được dùng trong bản mô tả để chỉ trình tự tương ứng với ít nhất hai mảnh Fc có nguồn gốc khác nhau có trong vùng Fc của globulin miễn dịch sợi đơn. Theo sáng chế, các loại thể lai khác nhau là sẵn có. Tức là thể lai chứa 1 đến 4 vùng được chọn từ nhóm bao gồm CH1, CH2, CH3 và CH4 của IgG Fc, IgM Fc, IgA Fc, IgE Fc và IgD Fc là có sẵn, và có thể bao gồm vùng bản lề. Trái lại, IgG cũng có thể được phân loại thành các phân nhóm IgG1, IgG2, IgG3 và IgG4, và theo sáng chế, tổ hợp hoặc thể lai của chúng là có thể. Đặc biệt các phân nhóm IgG2 và IgG4, và đặc biệt hầu hết vùng Fc của IgG4 ít khi có chức năng tác động, như hoạt tính gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể.

Ví dụ về vùng Fc của globulin miễn dịch được sử dụng làm chất mang dược chất theo sáng chế có thể bao gồm vùng Fc không glycosyl hóa có nguồn gốc từ IgG4 của người, nhưng không chỉ giới hạn ở vùng Fc này. Vùng Fc có nguồn gốc từ người là ưu tiên hơn vùng Fc không có nguồn gốc từ người mà có thể gây các đáp ứng miễn dịch

không mong muốn, ví dụ có thể đóng vai trò là kháng nguyên trong cơ thể người để tạo ra kháng thể mới.

Theo một phương án cụ thể, polyme phi peptidyl được sử dụng có nhóm chức phản ứng có thể gắn kết với vùng Fc của globulin miễn dịch và protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý. Theo một phương án cụ thể khác, nhóm chức phản ứng này là nằm ở cả hai đầu tận cùng. Tốt hơn nếu nhóm chức phản ứng ở cả hai đầu tận cùng của polyme phi peptidyl được chọn từ nhóm bao gồm nhóm aldehyt phản ứng, nhóm propionaldehyt, nhóm butyraldehyt, nhóm maleimit và dẫn xuất succinimit. Dẫn xuất succinimit có thể là succinimidyl propionat, hydroxy succinimidyl, succinimidyl carboxymetyl, hoặc succinimidyl carbonat. Cụ thể, khi có nhóm aldehyt phản ứng ở cả hai đầu tận cùng của nó, polyme phi peptidyl liên kết hữu hiệu ở cả hai đầu tận cùng với polypeptit có hoạt tính sinh lý và globulin miễn dịch bằng các phản ứng không đặc hiệu tối thiểu. Hợp chất cuối cùng được tạo ra bằng phản ứng alkyl hóa khử bởi gốc liên kết aldehyt là ổn định hơn nhiều so với hợp chất được gắn kết bởi gốc liên kết amit. Nhóm aldehyt phản ứng phản ứng chọn lọc ở đầu tận cùng N ở độ pH thấp, và tạo ra liên kết đồng hóa trị với gốc lysin ở độ pH cao, như độ pH = 9,0.

Các nhóm chức phản ứng ở cả hai đầu tận cùng của polyme phi peptidyl có thể có thể giống hoặc khác nhau.

Ví dụ, polyme phi peptidyl có thể có nhóm maleimit ở một đầu tận cùng, và nhóm aldehyt, nhóm propionaldehyt hoặc nhóm butyraldehyt ở đầu tận cùng còn lại. Khi polyetylen glycol có nhóm hydroxyl phản ứng ở cả hai đầu tận cùng được sử dụng làm polyme phi peptidyl, thì nhóm hydroxyl có thể được hoạt hóa với các nhóm chức phản ứng khác nhau bằng các phản ứng hóa học đã biết, hoặc polyetylen glycol có nhóm chức phản ứng cải biến có bán trên thị trường có thể được sử dụng để điều chế thể tiếp hợp protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý, đặc biệt là thể tiếp hợp peptit kích thích tổng hợp và bài tiết insulin theo sáng chế.

Thể tiếp hợp peptit kích thích tổng hợp và bài tiết insulin theo sáng chế có thể không chỉ duy trì hoạt tính *in vivo* của peptit kích thích tổng hợp và bài tiết insulin thông thường, như tăng cường tổng hợp và bài tiết insulin, ức chế sự thèm ăn, giảm cân, tăng nhạy cảm glucoza trong máu của tế bào beta, tăng cường tăng sinh tế bào beta, hoặc làm chậm thời gian rỗng dạ dày, mà còn có thể làm tăng đáng kể thời gian bán thải trong

huyết thanh của peptit kích thích tổng hợp và bài tiết insulin, do đó kéo dài tác dụng *in vivo* của peptit này. Theo đó, thể tiếp hợp peptit kích thích tổng hợp và bài tiết insulin này là hữu ích trong điều trị bệnh đái tháo đường, bệnh béo phì, hội chứng mạch vành cấp hoặc hội chứng buồng trứng đa nang.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến dược phẩm, chứa thể tiếp hợp protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý trong đó chất mang được gắn kết với gốc chức bên trong không ở đầu tận cùng của protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý này nhờ gốc liên kết phi peptidyl, và thể tiếp hợp này có khả năng miễn dịch được giảm khi so với khả năng sinh miễn dịch của protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý không được gắn kết với chất mang.

Cụ thể, thể tiếp hợp nêu trên có khả năng sinh miễn dịch (là tác dụng không mong muốn của dược phẩm tác dụng kéo dài) được giảm.

Hơn nữa, gốc liên kết phi peptidyl có thể là polyetylen glycol.

Protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý, gốc liên kết và thể tiếp hợp được mô tả nêu trên.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp điều chế thể tiếp hợp protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý.

Sáng chế đề cập đến phương pháp điều chế thể tiếp hợp protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý, bao gồm các bước sau:

(1) gắn kết đồng hóa trị polyme phi peptidyl có nhóm chức phản ứng aldehyt, maleimit hoặc succinimit ở cả hai đầu tận cùng với nhóm amin hoặc thiol của protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý;

(2) phân tách protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý gắn kết đồng hóa trị với polyme phi peptidyl nhờ vị trí không ở đầu tận cùng N của protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý khỏi hỗn hợp phản ứng thu được ở bước (1); và

(3) gắn kết đồng hóa trị vùng Fc của globulin miễn dịch với đầu tận cùng còn lại của polyme phi peptidyl gắn kết đồng hóa trị với protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý để thu được thể tiếp hợp protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý trong đó cả hai đầu tận cùng của polyme phi peptidyl được gắn kết tương ứng với vùng Fc của globulin miễn

dịch và protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý.

Theo khía cạnh ưu tiên, sáng chế đề cập đến phương pháp điều chế thể tiếp hợp protein, bao gồm các bước sau:

(1) gắn kết đồng hóa trị polyme phi peptidyl có nhóm aldehyt phản ứng ở cả hai đầu tận cùng với gốc lysin của protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý;

(2) phân tách protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý gắn kết đồng hóa trị với polyme phi peptidyl nhờ gốc lysin của protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý khỏi hỗn hợp phản ứng thu được ở bước (1); và

(3) liên kết đồng hóa trị vùng Fc của globulin miễn dịch với đầu tận cùng còn lại của polyme phi peptidyl gắn kết đồng hóa trị với protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý để thu được thể tiếp hợp trong đó cả hai đầu tận cùng của polyme phi peptidyl được gắn kết tương ứng với vùng Fc của globulin miễn dịch và protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý.

Cụ thể hơn, polyme phi peptidyl thu được ở bước (1) và gốc lysin của peptit kích thích tổng hợp và bài tiết insulin(tức là protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý) được gắn kết ở độ pH = 7,5 hoặc cao hơn.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn thông qua các ví dụ dưới đây. Tuy nhiên, các ví dụ này chỉ nhằm mục đích minh họa chứ không giới hạn phạm vi của sáng chế.

Ví dụ 1: Quá trình gắn PEG vào exendin-4 và phân tách chất đồng phân vị trí của PEG-exendin-4

Để gắn PEG vào đầu tận cùng N của exendin-4 tự nhiên (American Peptides) bằng PEG PropionALD (2) 3,4K (PEG chứa hai nhóm propionaldehyt có khối lượng phân tử bằng 3,4 kDa, IDB Inc., Korea), peptit này và PEG được cho phản ứng ở tỷ lệ mol bằng 1:15 với nồng độ peptit bằng 3mg/mL ở nhiệt độ 4°C trong 90 phút. Ở thời điểm này, phản ứng này được thực hiện trong dung dịch đệm NaOAc 100mM (độ pH = 4,0), và chất khử SCB (20mM, NaCNBH₃) được bổ sung vào.

Ngoài ra, để gắn PEG vào gốc lysin (Lys) của exendin-4 bằng PEG PropionALD (2) 3,4K, peptit này và PEG được cho phản ứng ở tỷ lệ mol bằng 1:30 với nồng độ peptit

bằng 3mg/mL ở nhiệt độ 4°C trong 3 giờ. Ở thời điểm này, phản ứng này được thực hiện trong dung dịch đệm natri phosphat 100mM (độ pH = 9,0), và chất khử SCB (20mM) được bổ sung vào. Mono-PEG-peptit được tinh chế sơ bộ từ dung dịch phản ứng bằng cột SOURCE Q (XK 16mL, Amersham Biosciences), và chất đồng phân này được phân tách bằng cột SOURCES (XK 16mL, Amersham Biosciences). Đã quan sát thấy rằng píc được gắn PEG ở đầu tận cùng N xuất hiện sớm hơn, sau đó hai píc lysin (Lys)-PEG xuất hiện lần lượt. Các vị trí được gắn PEG được kiểm chứng từ píc rửa giải này bằng phương pháp lập bản đồ peptit.

Thế tiếp hợp Lys12-PEG được rửa giải trước, sau đó thế tiếp hợp Lys27-PEG được rửa giải ở đoạn cuối. Các píc chất đồng phân vị trí tận cùng N và píc chất đồng phân vị trí Lys12 được phân tách rõ ràng.

Cột: SOURCE Q (XK 16mL, Amersham Biosciences) 58-27.

Tốc độ dòng: 2,0mL/phút.

Gradient: A 0 → 40% 80 phút B (A: tris 20mM, độ pH = 8,5, B: A + 0,5M NaCl).

Cột: SOURCE S (XK 16mL, Amersham Biosciences).

Tốc độ dòng: 2,0mL/phút.

Gradient: A 0 → 100% 50 phút B (A: axit xitric 20mM, độ pH = 3,0, B: A + 0,5M KCl).

Ví dụ 2: Quá trình gắn PEG vào gốc lysin của CA exendin-4 và phân tách chất đồng phân vị trí

Để gắn PEG vào gốc lysin (Lys) của CA exendin-4 (American American Peptides) bằng PEG PropionALD (2) 3,4K, CA exendin-4 và PEG được cho phản ứng ở tỷ lệ mol bằng 1:30 với nồng độ CA exendin-4 bằng 3mg/mL ở nhiệt độ 4°C trong 3 giờ. CA exendin-4 là exendin-4 được cải biến ở đầu tận cùng N trong đó cacbon alpha được loại bỏ khỏi gốc histidin ở đầu tận cùng N của exendin tự nhiên và cacbon β của chuỗi bên được gắn kết trực tiếp với cacbon carboxyl. Ở thời điểm này, phản ứng này được thực hiện trong dung dịch đệm natri phosphat 100mM (độ pH = 9,0), và chất khử SCB (20mM) được bổ sung vào. Mono-PEG-peptit được tinh chế sơ bộ từ dung dịch phản ứng bằng cột SOURCE Q (XK 16mL, Amersham Biosciences), và chất đồng phân này được

phân tách bằng cột SOURCES (XK 16mL, Amersham Biosciences).

Đã quan sát thấy rằng hai píc lysin(Lys)-PEG xuất hiện. Các vị trí được gắn PEG được kiểm chứng từ các píc rửa giải này bằng phương pháp lập bản đồ peptit.

Thể tiếp hợp Lys12-PEG được rửa giải trước, sau đó thể tiếp hợp Lys27-PEG được rửa giải ở đoạn cuối. Các píc chất đồng phân vị trí tận cùng N và píc chất đồng phân vị trí Lys12 được phân tách rõ ràng.

Cột: SOURCE Q (XK 16mL, Amersham Biosciences).

Tốc độ dòng: 2,0mL/phút.

Gradient: A 0 → 40% 80 phút B (A: tris 20mM, độ pH = 8,5, B: A + 0,5M NaCl)

Cột: SOURCE S (XK 16mL, Amersham Biosciences).

Tốc độ dòng: 2,0mL/phút.

Gradient: A 0 → 100% 50 phút B (A: axit xitric 20mM, độ pH = 3,0, B: A + 0,5M KCl).

Ví dụ 3: Điều chế thể tiếp hợp imidazo-axetyl exendin-4 (Lys27)-vùng Fc của globulin miễn dịch

PEG PropionALD (2) 3,4K được cho phản ứng với gốc Lys của CA exendin-4 bằng cách sử dụng imidazo-axetyl exendin-4 (CA exendin-4, AP, USA) theo cách thức tương tự như trong ví dụ 2. Sau đó phản ứng ghép cặp được thực hiện bằng cách sử dụng píc đồng phân cuối cùng (chất đồng phân vị trí của Lys 27), có nhiều khả năng phản ứng và có thể dễ dàng phân biệt với chất đồng phân đầu tận cùng N, trong số hai píc đồng phân Lys. Peptit thu được và vùng Fc của globulin miễn dịch được cho phản ứng ở tỷ lệ mol bằng 1:8, và nồng độ protein tổng số bằng 60 mg/mL ở nhiệt độ 4°C trong 20 giờ. Phản ứng này được thực hiện trong dung dịch chứa 100mM K-P (độ pH = 6,0) và chất khử SCB (20mM) được bổ sung vào. Sau khi kết thúc phản ứng ghép cặp, quy trình tinh chế hai bước bằng cách sử dụng cột SOURCE Q dung tích 16mL và cột SOURCE ISO dung tích 16mL được thực hiện theo cùng cách thức như trong ví dụ 2. Kết quả phân tích HPLC pha đảo cho thấy độ tinh khiết của thể tiếp hợp thu được bằng 95,8%.

Ví dụ 4: Phân tách tế bào đơn nhân máu ngoại vi của người để thử nghiệm *ex vivo* và sàng lọc người tình nguyện

Tế bào đơn nhân máu ngoại vi của người được phân tách trong vòng 24 giờ khỏi máu thu được từ những người tình nguyện khỏe mạnh. Máu từ người tình nguyện khỏe mạnh do UK National Blood Transfusion Service (Addenbrooke Hospital, Cambridge, UK) cung cấp. Tế bào đơn nhân máu ngoại vi của người được phân tách khỏi lớp váng máu ly tâm thu được bằng phương pháp ly tâm theo gradient tỷ trọng bằng cách sử dụng môi trường LymphoprepTM (Axis-shield, Dundee, Scotland). Trong số chúng, các tế bào T biểu hiện CD8 được loại bỏ bằng cách sử dụng phương pháp CD8+RosetteSepTM (StemCell Technologies Inc, London, UK). Tế bào đơn nhân máu ngoại vi của mỗi người tình nguyện được bảo quản trong nitơ lỏng trước khi sử dụng. Kiểu gen HLA-DR thể đơn bội của các tế bào từ người tình nguyện được phân tích bằng kit đánh dấu mô HLA SSP-PCR (Biotest, Solihull, UK). Khả năng phản ứng của tế bào T được đánh giá bằng cách sử dụng kháng nguyên KLH (Keyhole Limpet Haemocyanin, Pierce (Perbio), Northumberland, UK), là kháng nguyên peptit có nguồn gốc từ virus cúm A và virus Epstein Barr.

50 người tình nguyện biểu hiện tần suất kiểu gen HLA-DR của các chủng tộc người trên thế giới được chọn lọc và hợp thành một nhóm thử nghiệm duy nhất. Kiểu gen MHC nhóm II thể đơn bội và khả năng phản ứng của tế bào T đối với mỗi người tình nguyện tạo ra nhóm thử nghiệm được thể hiện trong Bảng 1. Tần suất kiểu gen của người tình nguyện được so sánh với tần suất của các chủng tộc người trên thế giới và các kết quả được thể hiện trên Fig.1. Kiểu gen HLA-DR và khả năng phản ứng của tế bào T trên kháng nguyên peptit KLH đối với mỗi người tình nguyện được thể hiện trong Bảng 1.

Bảng 1

Người tình nguyện số	Thể đơn bội	KLH	
		Thử nghiệm 1	HAN03
1	DRB1*01,DRB1*13;DRB3*	2,25	18,69
2	DRB1*07,DRB1*12;DRB3*;DRB4*	1,11	1,60
3	DRB1*03,DRB1*15;DRB3*;DRB5*	2,66	2,87
4	DRB1*01,DRB1*07;DRB3*;DRB4*	5,54	7,54
5	DRB1*03,DRB1*16;DRB3*;DRB5*	7,02	3,46
6	DRB1*01,DRB1*13;DRB3*	4,36	14,17
7	DRB1*03,DRB1*04;DRB3*;DRB4*	4,45	9,98
8	DRB1*03,DRB1*13;DRB3*	8,85	4,37
9	DRB1*01,DRB1*12;DRB3*	4,79	8,45
10	DRB1*01,DRB1*13;DRB3*	2,53	3,14
11	DRB1*07,DRB1*15;DRB4*;DRB5*	3,00	10,29
12	DRB1*04,DRB1*13;DRB3*;DRB4*	2,70	9,31
13	DRB1*01,DRB1*12;DRB3*	2,55	15,07

14	DRB1*11,DRB1*15;DRB3*;DRB5*	0,27	1,55
15	DRB1*07,DRB1*15;DRB3*;DRB5*	3,03	8,78
16	DRB1*10,DRB1*13;DRB3*	4,08	4,65
17	DRB1*07,DRB1*11;DRB3*;DRB4*	1,13	5,80
18	DRB1*03,DRB1*04;DRB3*;DRB4*	0,61	5,34
19	DRB1*03,DRB1*13;DRB3*	2,42	12,17
20	DRB1*04,DRB1*12;DRB3*;DRB4*	2,76	6,51
21	DRB1*15;DRB5*	3,38	3,27
22	DRB1*04,DRB1*15;DRB4*;DRB5*	2,11	3,55
23	DRB1*04,DRB1*11;DRB3*;DRB4*	1,93	3,28
24	DRB1*13,DRB1*15;DRB3*;DRB5*	8,93	6,66
25	DRB1*11,DRB1*13;DRB3*	2,02	2,99
26	DRB1*04,DRB1*07;DRB4*	2,42	1,97
27	DRB1*11,DRB1*13;DRB3*	5,55	1,20
28	DRB1*04,DRB1*11;DRB3*;DRB4*	3,97	3,93
29	DRB1*03,DRB1*04;DRB3*;DRB4*	2,00	6,76
30	DRB1*03,DRB1*15;DRB3*;DRB5*	1,22	13,32
31	DRB1*15,DRB1*16;DRB5*	3,95	5,75
32	DRB1*03,DRB1*11;DRB3*	2,82	3,74
33	DRB1*13,DRB1*15;DRB3*;DRB5*	2,43	1,97
34	DRB1*04,DRB1*15;DRB4*;DRB5*	3,79	4,70
35	DRB1*01,DRB1*04;DRB4*	9,24	8,67
36	DRB1*03,DRB1*04;DRB3*;DRB4*	2,21	3,06
37	DRB1*10,DRB1*15;DRB5*	12,11	4,03
38	DRB1*08,DRB1*13;DRB3*	4,85	3,22
39	DRB1*04,DRB1*11;DRB3*;DRB4*	5,37	6,43
40	DRB1*01,DRB1*16;DRB5*	3,22	4,15
41	DRB1*08,DRB1*15;DRB5*	2,24	2,92
42	DRB1*14,DRB1*15;DRB3*;DRB5*	20,58	13,67
43	DRB1*15,DRB1*16;DRB5*	3,50	4,88
44	DRB1*15;DRB5*	2,01	7,01
45	DRB1*07,DRB1*11;DRB3*;DRB4*	1,93	13,71
46	DRB1*01,DRB1*04;DRB4*	29,18	19,33
47	DRB1*03,DRB1*07;DRB3*;DRB4*	2,31	3,49
48	DRB1*07,DRB1*15;DRB4*;DRB5*	2,20	29,21
49	DRB1*03,DRB1*07;DRB3*;DRB4*	0,94	1,72
50	DRB1*03,DRB1*15;DRB3*;DRB5*	0,73	3,27

Trong Bảng 1, phần in đậm (người tình nguyện 17, 18, 27, 30, và 50) là các trường hợp có khả năng phản ứng với KLH trước và sau khi rửa đông tế bào của người tình nguyện khác biệt đáng kể.

Ví dụ 5: Thử nghiệm tăng sinh tế bào *T ex vivo* EpiScreen™

Để xác định cơ chế ức chế sinh miễn dịch theo các vị trí được gắn PEG của các peptit kích thích tổng hợp và bài tiết insulin (tức là protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý), khả năng tăng sinh tế bào T của exendin-4 tự nhiên chưa gắn kết và CA exendin-4 chưa gắn kết, CA exendin-4 (CA Exendin-4-PEG (bên trong)) được gắn PEG ở gốc lysin, và exendin-4 tự nhiên (Exendin-4-PEG (đầu tận cùng N)) được gắn PEG ở đầu tận cùng

N được so sánh. Ở thời điểm này, do CA exendin-4 không có gốc chức ở đầu tận cùng N có thể được gắn PEG, nên CA-exendin-4 được gắn PEG ở đầu tận cùng N không được điều chế cho CA exendin-4.

Để thử nghiệm tăng sinh tế bào T, tế bào đơn nhân máu ngoại vi của người tình nguyện được rửa đông để đánh giá số lượng tế bào và khả năng sống sót. Các tế bào được pha loãng đến mật độ $4-6 \times 10^6$ tế bào/mL trong môi trường nuôi cấy AIM-V. Sau khi phân tán các tế bào của mỗi người tình nguyện vào đĩa nuôi cấy 24 giếng, các mẫu thử nghiệm được bổ sung đến nồng độ cuối cùng bằng $50 \mu\text{g/mL}$ ($n = 3$). Nhóm được xử lý bằng kháng nguyên peptit KLH được nạp vào để xác định độ lặp lại của mỗi tế bào người tình nguyện. Toàn bộ các nhóm thử nghiệm và nhóm đối chứng được nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C và 5% CO_2 trong 8 ngày. Một phần các tế bào được lấy ra ở ngày thứ 5, 6, 7 và 8 và chuyển vào đĩa nuôi cấy 96 giếng để xác định tốc độ tăng sinh tế bào. Để xác định tốc độ tăng sinh tế bào, $0,75 \mu\text{i}$ [^3H]-Thymidin (Perkin Elmer Buckinghamshire, UK) được bổ sung vào mỗi giếng và nuôi cấy trong 18 giờ, sau đó các tế bào được thu nhận bằng các đĩa lọc 96 giếng bằng cách sử dụng thiết bị TomTec Mach III.

Hoạt tính phóng xạ của mỗi tế bào (số lượng tế bào đếm được/phút, cpm-count per minute) được đo bằng cách sử dụng thiết bị đếm 1450 Microbeta Wallac Trilux Liquid Scintillation (Perkin Elmer Buckinghamshire, UK). Các kết quả được xác định dựa trên ngưỡng thử nghiệm của chỉ số kích thích (SI) mà hai hoặc nhiều SI ($\text{SI} \geq 2$, $p < 0,05$) cho kết quả dương tính. Trong trường hợp bao gồm các trị số ranh giới tương ứng với $\text{SI} \geq 1,9$, thì kết quả thử nghiệm được thể hiện riêng biệt dưới dạng (P^*). Kết quả thử nghiệm cho thấy CA exendin-4 và exendin-4 biểu hiện dương tính tương ứng ở 12% và 10% người tình nguyện. Tuy nhiên, CA exendin-4 được gắn PEG vào gốc chức bên trong của peptit biểu hiện âm tính ở toàn bộ người tình nguyện. Trái lại, exendin-4 được gắn PEG vào đầu tận cùng N biểu hiện dương tính ở 6% người tình nguyện. Do đó, khi PEG được gắn vào gốc lysin bên trong của peptit thay vì đầu tận cùng N, thì khả năng sinh miễn dịch của peptit này được giảm đáng kể (Bảng 2). Khả năng tăng sinh tế bào T và bài tiết interleukin-2 (IL-2) được thể hiện trong Bảng 2.

Bảng 2

	CA Exendin-4	Exendin-4	CA Exendin-4-PEG (bên trong)	Exendin- 4-PEG (đầu tận cùng N)	A33 nhân tạo	KLH
Người tình nguyện 1	PE	E				PE
Người tình nguyện 2						E
Người tình nguyện 3					E	PE
Người tình nguyện 4				P	E*	PE
Người tình nguyện 5						PE
Người tình nguyện 6						PE
Người tình nguyện 7				E*	P*E	PE
Người tình nguyện 8						P
Người tình nguyện 9	PE*	PE			E*	PE
Người tình nguyện 10						P
Người tình nguyện 11						PE
Người tình nguyện 12						PE
Người tình nguyện 13				PE		PE
Người tình nguyện 14						E
Người tình nguyện 15						P
Người tình nguyện 16		PE		PE*		PE
Người tình nguyện 17	P	PE			PE	PE
Người tình nguyện 18					PE*	PE
Người tình nguyện 19						PE
Người tình nguyện 20						PE
Người tình nguyện 21		E	E		PE	PE
Người tình nguyện 22					PE	PE
Người tình nguyện 23	E					PE
Người tình nguyện 24						PE
Người tình nguyện 25						PE
Người tình nguyện 26						P*E
Người tình nguyện 27	PE	P*E				E
Người tình nguyện 28						PE
Người tình nguyện 29	PE*					PE
Người tình nguyện 30						P
Người tình nguyện 31						PE
Người tình nguyện 32						PE*
Người tình nguyện 33					P*E	P*E
Người tình nguyện 34						PE
Người tình nguyện 35						PE
Người tình nguyện 36					PE	PE
Người tình nguyện 37						PE
Người tình nguyện 38						P
Người tình nguyện 39						PE
Người tình nguyện 40					E*	PE
Người tình nguyện 41					P*E	PE
Người tình nguyện 42						P
Người tình nguyện 43	PE				PE	PE
Người tình nguyện 44					PE	PE
Người tình nguyện 45						PE
Người tình nguyện 46					P*E	PE
Người tình nguyện 47						PE
Người tình nguyện 48		PE				PE

Người tình nguyện 49						
Người tình nguyện 50		E				PE
% Tăng sinh	12	10	0	6	22	92
% ELISpot	12	16	2	6	30	86
% Tăng sinh và ELISpot	10	10	0	4	22	80
Tỷ lệ tương quan %	83	100	N/A	67	100	87

Bảng 3 thể hiện cường độ và tần suất đáp ứng tăng sinh tế bào T (bao gồm trị số ranh giới $SI \geq 1,9$).

Bảng 3

	Chỉ số kích thích trung bình	Độ lệch chuẩn	Tần suất đáp ứng (%)
CA Exendin-4	2,09	0,2	12
Exendin-4	2,68	1,46	10
CA Exendin-4-PEG (bên trong)	N/A	N/A	0
Exendin-4-PEG (đầu tận cùng N)	2,33	0,17	6
A33 nhân tạo	2,17	0,28	22
KLH	5,16	3,94	92

Các kết quả nêu trên cho thấy rằng khả năng sinh miễn dịch của protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý gắn kết với polyme phi peptidyl, đặc biệt là PEG, thông qua gốc chức bên trong không phải là đầu tận cùng của protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý được giảm.

Ví dụ 6: Thử nghiệm bài tiết interleukin-2 (IL-2) *ex vivo* EpiScreen™

Để xác định cơ chế ức chế sinh miễn dịch theo các vị trí được gắn PEG của các peptit kích thích tổng hợp và bài tiết insulin (tức là protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý), khả năng bài tiết IL-2 của exendin-4 chưa được gắn kết và PEG-exendin-4 theo ví dụ 5 được so sánh và đánh giá bằng cách sử dụng các tế bào người tình nguyện và các mẫu, tương tự như trong thử nghiệm tăng sinh tế bào T EpiScreen™. Kháng thể kháng interleukin-2 (R & D Systems, Abingdon, UK) được phủ vào các đĩa ELISpot (Millipore, Herts, UK). Đĩa này được rửa 3 lần bằng PBS (dung dịch đệm muối phosphat), sau đó PBS có bổ sung 1% albumin huyết thanh bò được bổ sung vào và phản ứng. Sau khi rửa bằng môi trường nuôi cấy AIM-V, các tế bào người tình nguyện được pha loãng bằng môi trường AIM-V ($4-6 \times 10^6$ tế bào/mL) được phân tán ở mật độ thể tích $100 \mu\text{L}$ /giếng. Mẫu thử nghiệm được bổ sung vào mỗi $50 \mu\text{L}$ ($n = 6$) đến nồng độ cuối cùng bằng $50 \mu\text{g/mL}$ ($n = 6$). Sau khi nuôi cấy trong 8 ngày, kháng thể phát hiện biotinyl-IL-2 và streptavidin-AP (R & D Systems, Abingdon, UK) được phủ lần lượt vào các đĩa ELISpot

sau đó BCIP/NBT (R&D Systems, Abingdon, UK) được bổ sung vào các đĩa để hiển thị vết. Phản ứng này được kết thúc bằng cách rửa với nước cất, sau đó đĩa được làm khô. Số lượng vết tính trên một giếng (spw – spots per well) được chụp ảnh và phân tích bằng cách sử dụng thiết bị phân tích Immunoscan. Kết quả thử nghiệm đo hoạt tính tăng sinh tế bào T *ex vivo* được xác định dựa trên ngưỡng thử nghiệm của chỉ số kích thích (SI) mà hai hoặc nhiều SI ($SI \geq 2$, $p < 0,05$) cho kết quả dương tính. Trong trường hợp bao gồm các trị số ranh giới tương ứng với $SI \geq 1,9$, thì kết quả thử nghiệm được thể hiện riêng biệt dưới dạng (P*). Kết quả thử nghiệm cho thấy CA exendin-4 và exendin-4 biểu hiện dương tính tương ứng ở 12% và 16% người tình nguyện. Tuy nhiên, CA exendin-4 được gắn PEG vào gốc chức bên trong của peptit biểu hiện dương tính chỉ ở 2% người tình nguyện. Trái lại, exendin-4 được gắn PEG vào đầu tận cùng N biểu hiện dương tính ở 6% người tình nguyện. Do đó, khi PEG được gắn vào gốc lysin bên trong của peptit thay vì đầu tận cùng N, thì khả năng sinh miễn dịch của peptit này được giảm đáng kể (Bảng 2-4). Cường độ và tần suất của đáp ứng bài tiết interleukin-2 (IL-2) của tế bào T (bao gồm trị số ranh giới $SI \geq 1,9$) được thể hiện trong Bảng 4.

Bảng 4

	Chỉ số kích thích trung bình	Độ lệch chuẩn	Tần suất đáp ứng (%)
CA Exendin-4	2,18	0,23	12
Exendin-4	2,22	0,19	16
CA Exendin-4-PEG	2,35	N/A	2
Exendin-4-PEG 3,4K (đầu tận cùng N)	2,09	0,17	6
A33 nhân tạo	2,24	0,43	30
KLH	3,79	1,84	86

Các kết quả nêu trên cho thấy rằng khả năng sinh miễn dịch của protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý gắn kết với polyme phi peptidyl, đặc biệt là PEG, thông qua gốc chức bên trong không phải là đầu tận cùng của protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý được giảm.

Ví dụ 7: Quá trình sản sinh kháng thể kháng peptit kích thích tổng hợp và bài tiết insulin tác dụng kéo dài ở chuột cống

Chuột Sprague Dawley bình thường được tiêm dưới da với các thể tiếp hợp trong đó CA exendin-4 được liên kết với mảnh Fc của globulin miễn dịch nhờ PEG được điều chế trong ví dụ 3 một tuần một lần trong 26 tuần (liều thấp, trung bình hoặc cao), sau đó

để hồi phục trong thời gian 4 tuần ($n = 40\sim 60/\text{nhóm}$). Máu được lấy trước và trong khi sử dụng, ở tuần thứ 13, 19 và 26, và ở thời điểm kết thúc thời gian hồi phục, và huyết thanh được phân tách khỏi máu. Các kháng thể kháng peptit kích thích tổng hợp và bài tiết insulin trong máu được xác định.

Kết quả thử nghiệm cho thấy trong số 160 chuột được tiêm các thể tiếp hợp nêu trên, các kháng thể được phát hiện chỉ ở hai chuột sau thời gian hồi phục là 13 tuần. Tuy nhiên, các kháng thể này được kiểm chứng không phải là các kháng thể trung hòa các thể tiếp hợp nêu trên (Bảng 5). Quá trình sản sinh kháng thể ở chuột cống (chuột Sprague Dawley) sau 26 tuần sử dụng được thể hiện trong Bảng 5.

Bảng 5

Nhóm	Liều	n/nhóm	Dương tính	Thời điểm	% dương tính	Kháng thể trung hòa
1	giả dược	60	0	-	0	0
2	liều thấp	40	1	Tuần 13	2,5	0
3	liều trung bình	40	0	-	0	0
4	liều cao	60	1	hồi phục	1,6	0
Tổng cộng		200	2		1,0	0

Ví dụ 8: Thử nghiệm sản sinh kháng thể kháng peptit kích thích tổng hợp và bài tiết insulin ổn định ở khi đuôi dài *Cynomolgus*

Khỉ đuôi dài *Cynomolgus* được tiêm cho dưới da với các thể tiếp hợp trong đó CA exendin-4 được gắn kết với mảnh Fc của globulin miễn dịch nhờ PEG được điều chế trong ví dụ 3 một tuần một lần trong 26 tuần, sau đó để hồi phục trong thời gian 4 tuần ($n = 8\sim 12/\text{nhóm}$). Máu được lấy trước và trong khi sử dụng, ở tuần thứ 12, 19 và 26, và ở thời điểm kết thúc thời gian hồi phục, và huyết thanh được phân tách khỏi máu. Các kháng thể kháng peptit kích thích tổng hợp và bài tiết insulin trong máu được xác định.

Kết quả thử nghiệm cho thấy kháng thể không được sản sinh ở toàn bộ các khi (Bảng 6). Quá trình sản sinh kháng thể ở khi đuôi dài *Cynomolgus* sau 26 tuần sử dụng được thể hiện trong Bảng 6.

Bảng 6

Nhóm	Liều	n/nhóm	Dương tính/tổng số	% dương tính
1	giả dược	12	0	0
2	liều thấp	8	0	0
3	liều trung bình	8	0	0
4	liều cao	12	0	0
Tổng số		40	0	0

Ví dụ 9: Phát hiện kháng thể kháng được chất trong máu và đánh giá khả năng trung hòa

Để phát hiện liệu thể tiếp hợp theo ví dụ 3 có sản sinh kháng thể kháng được chất trong cơ thể chuột hoặc khi đuôi dài *Cynomolgus* hay không, thể tiếp hợp này được đánh giá bằng phương pháp ELISA tạo cầu liên kết. Thể tiếp hợp biotinyl theo ví dụ 3 được phủ vào vi đĩa 96 giếng có streptavidin đã được phủ vào đáy, và rửa bằng nước. Thể tiếp hợp được đánh dấu Digoxigenin (DIG) theo ví dụ 3 (sau đây gọi tắt là HM11260C) được bổ sung vào cùng với các mẫu huyết thanh của chuột hoặc khi để phản ứng, sau đó rửa bằng nước. Sau đó, kháng thể kháng DIG ghép cặp peroxidaza của cải ngựa (kháng thể kháng DIG-POD) được bổ sung vào và khai triển bằng cơ chất TMB (cơ chất 3,3',5,5'-tetramethylbenzidin).

Độ nhạy đo trong huyết thanh chuột bằng 3,1ng/mL, và độ nhạy đo trong huyết thanh khi bằng 12,5ng/mL. Để đánh giá khả năng trung hòa chống lại HM11260C của kháng thể kháng HM11260C phát hiện được, các mẫu huyết thanh và HM11260C được bổ sung vào dòng tế bào biểu hiện quá mức peptit tương tự glucagon 1 của người (GLP-1R/CHO), sau đó tốc độ ức chế cảm ứng AMP mạch vòng được đo. Các kháng thể được sản sinh chỉ bởi hai trong số 160 động vật được kiểm chứng là không có khả năng trung hòa. Các kết quả nêu trên cho thấy rằng khả năng sinh miễn dịch của protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý được giảm bằng cách gắn kết gốc liên kết phi peptit và mảnh Fc với gốc chức bên trong không phải là đầu tận cùng của protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý, do đó ức chế cơ chế hoạt hóa peptit mong muốn này thành kháng nguyên. Các kết quả này cũng cho thấy rằng khi sử dụng phương pháp sản xuất nêu trên, sự hoạt hóa tế bào T và phản ứng sản sinh kháng thể ở động vật bị ức chế đáng kể.

Từ phần mô tả nêu trên, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rằng sáng chế có thể được thể hiện ở các dạng đặc trưng khác mà không làm thay đổi phạm vi của sáng chế. Về vấn đề này, các phương án nêu trên chỉ nhằm mục đích minh họa chứ không giới hạn phạm vi của sáng chế. Sáng chế cũng bao gồm toàn bộ các thay đổi hoặc các dạng cải biến bắt nguồn từ các phương án tương đương của chúng trong bộ yêu cầu bảo hộ kèm theo thay vì phần mô tả chi tiết nêu trên.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp ức chế phản ứng sản sinh kháng thể của protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý khi so với phản ứng sản sinh kháng thể của protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý mà chứa vùng Fc của globulin miễn dịch được gắn kết với gốc chức ở đầu tận cùng, bao gồm bước gắn kết vùng Fc của globulin miễn dịch với gốc chức bên trong không ở đầu tận cùng của protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý, trong đó protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý và vùng Fc của globulin miễn dịch được gắn kết nhờ gốc liên kết phi peptidyl nằm xen giữa chúng, trong đó protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý và gốc liên kết phi peptidyl được gắn kết ở điều kiện độ pH nằm trong khoảng từ 7,5 đến 9,0, và trong đó protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý là exendin-4 hoặc dẫn xuất exendin-4.
2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó gốc liên kết phi peptidyl được chọn từ nhóm bao gồm polyetylen glycol, polypropylen glycol, copolyme của etylen glycol và propylen glycol, rượu đa chức polyoxyetylat, rượu polyvinyllic, polysacarit, dextran, ete polyvinyl etyl, polyme có thể phân hủy sinh học, polyme lipid, kitin, axit hyaluronon và hỗn hợp của chúng.
3. Phương pháp theo điểm 1, trong đó protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý được gắn kết với vùng Fc của globulin miễn dịch nhờ gốc liên kết phi peptidyl được chọn từ nhóm bao gồm polyetylen glycol, polypropylen glycol, copolyme của etylen glycol và propylen glycol, rượu đa chức polyoxyetylat, rượu polyvinyllic, polysacarit, dextran, ete polyvinyl etyl, polyme có thể phân hủy sinh học, polyme lipid, kitin, axit hyaluronon và hỗn hợp của chúng.
4. Phương pháp theo điểm 1, trong đó dẫn xuất exendin-4 là dẫn xuất exendin-4 có điện tích ở đầu tận cùng N của exendin-4 được cải biến, được chọn từ nhóm bao gồm dẫn xuất exendin-4 có nhóm amin ở đầu tận cùng N của exendin-4 được loại bỏ; dẫn xuất exendin-4 có nhóm amin ở đầu tận cùng N của exendin-4 được thay thế bằng nhóm hydroxyl; dẫn xuất exendin-4 có nhóm amin ở đầu tận cùng N của exendin-4 được thay thế bằng nhóm carboxyl; dẫn xuất exendin-4 có nhóm amin ở đầu tận cùng N của exendin-4 được cải biến bằng nhóm dimetyl; và dẫn xuất exendin-4 có cacbon alpha của gốc histidin ở đầu tận cùng N của exendin-4 được loại bỏ.
5. Phương pháp theo điểm 4, trong đó gốc chức bên trong là gốc lysin ở vị trí số 12 hoặc

27 của dẫn xuất exendin-4 có điện tích ở đầu tận cùng N của exendin-4 được cải biến.

6. Phương pháp theo điểm 5, trong đó gốc chức bên trong là gốc lysin ở vị trí số 27 của dẫn xuất exendin-4 có điện tích ở đầu tận cùng N của exendin-4 được cải biến.

7. Phương pháp theo điểm 5, trong đó dẫn xuất exendin-4 có điện tích ở đầu tận cùng N của exendin-4 được cải biến là dẫn xuất exendin-4 có cacbon alpha của gốc histidin ở đầu tận cùng N của exendin-4 được loại bỏ.

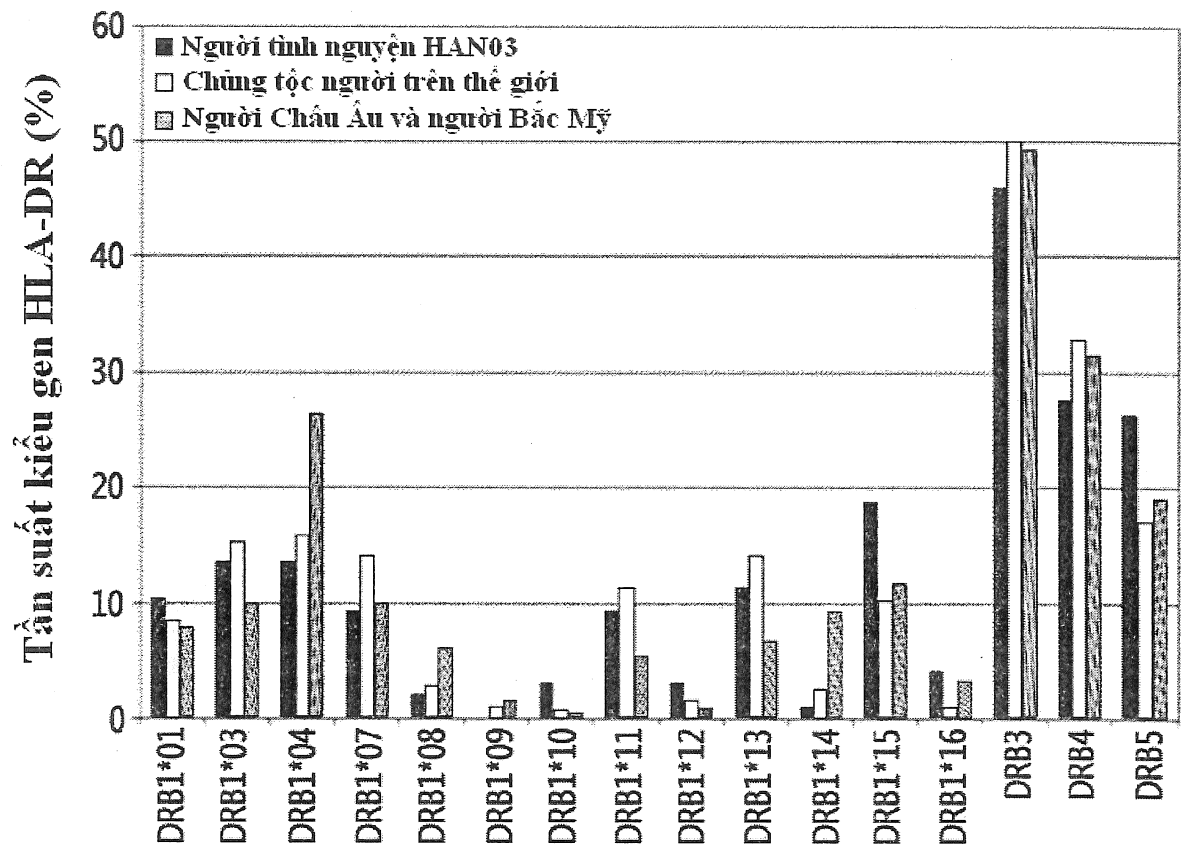


Fig.1

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> HANMI PHARM. CO., LTD.
 <120> PHƯƠNG PHÁP ỨC CHẾ PHẢN ỨNG SẴN SINH KHÁNG THỂ CỦA PROTEIN HOẶC PEPTIT CÓ HOẠT TÍNH SINH LÝ
 <130> OPA15095
 <150> KR 10-2014-0068660
 <151> 2014-06-05
 <160> 5
 <170> KopatentIn 2.0
 <210> 1
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Chuỗi alpha của insulin
 <400> 1
 Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu
 1 5 10 15
 Glu Asn Tyr Cys Asn
 20
 <210> 2
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Chuỗi beta của insulin
 <400> 2
 Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr
 1 5 10 15
 Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr
 20 25 30
 <210> 3
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Exendin-4
 <400> 3
 His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
 1 5 10 15
 Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
 20 25 30
 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
 35
 <210> 4
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Exendin-3
 <400> 4
 His Ser Asp Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
 1 5 10 15
 Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
 20 25 30
 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
 35
 <210> 5
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oxyntomodulin
 <400> 5
 His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser
 1 5 10 15
 Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr Lys Arg Asn
 20 25 30
 Arg Asn Asn Ile Ala
 35