(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) **1-0020411**

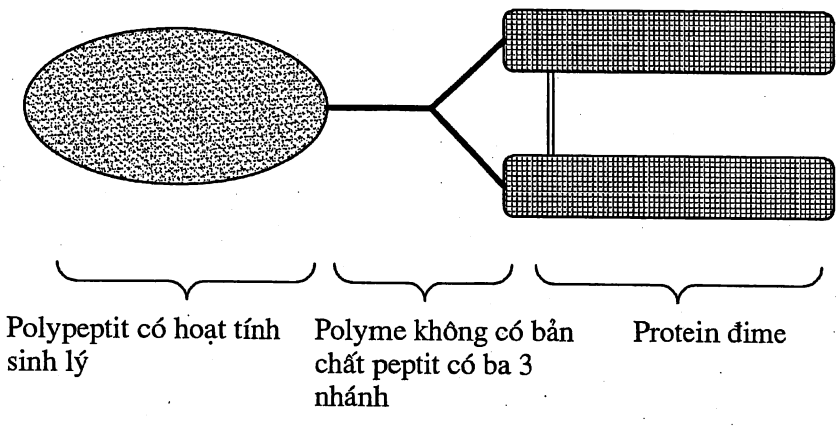
(51)[7] **C07K 19/00**, A61K 47/48

(13) **B**

(21) 1-2011-00196
(22) 23.07.2009
(86) PCT/KR2009/004114 23.07.2009
(87) WO2010/011096 28.01.2010
(30) 10-2008-0071766 23.07.2008 KR
(45) 25.02.2019 371
(43) 26.12.2011 285
(73) HANMI SCIENCE CO., LTD. (KR)
550, Dongtangiheung-ro, Dongtan-myeon, Hwaseong-si, Gyeonggi-do, 445-813, Republic of Korea
(72) SONG, Dae Hae (KR), SHIN, Jae Hee (KR), LEE, Mi Ji (KR), HONG, Sung Hee (KR), KWON, Se Chang (KR), LEE, Gwan Sun (KR)
(74) Văn phòng luật sư Phạm và Liên danh (PHAM & ASSOCIATES)

(54) PHỨC HỢP PROTEIN CHỨA POLYPEPTIT CÓ HOẠT TÍNH SINH LÝ, PHƯƠNG PHÁP ĐIỀU CHẾ PHỨC HỢP PROTEIN VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA PHỨC HỢP PROTEIN NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến phức hợp protein chứa polypeptit có hoạt tính sinh lý, miền Fc của globulin miễn dịch và polyme phi peptit có ba đầu có chức (3 nhánh) trong đó mối liên kết của cả polypeptit có hoạt tính sinh lý và miền Fc của globulin miễn dịch này với polyme phi peptit 3 nhánh đều là các liên kết cộng hoá trị tương ứng. Phức hợp protein này đảm bảo rằng polypeptit có hoạt tính sinh lý giữ được hoạt tính tác động trong thời gian dài và có tính ổn định sinh học. Nhờ duy trì được hoạt tính sinh học cao của polypeptit hoặc peptit có hoạt tính sinh lý và cải thiện đáng kể thời gian bán tồn trong huyết thanh của polypeptit hoặc peptit này, phức hợp protein này có thể được dùng để phát triển chế phẩm giải phóng kéo dài cho các thuốc polypeptit có hoạt tính sinh lý khác nhau. Ngoài ra, quá trình sản xuất chỉ sử dụng chất liệu thô chứa polypeptit có hoạt tính sinh lý mà không gây thất thoát đáng kể, do đó làm tăng hiệu suất sản xuất. Hơn nữa, có thể tinh chế sản phẩm thu được một cách dễ dàng. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến phương pháp điều chế phức hợp protein như nêu trên.



**Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập**

Sáng chế đề cập đến phức hợp protein cho phép tạo ra hoạt tính tác động kéo dài của polypeptit có hoạt tính sinh lý cùng với protein đime. Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến phức hợp protein trong đó polypeptit có hoạt tính sinh lý và protein đime được liên kết với polyme phi peptit có ba đầu có chức (3 nhánh) thông qua liên kết cộng hoá trị tương ứng, và phương pháp tạo ra polyme này.

**Tình trạng kỹ thuật của sáng chế**

Do có độ ổn định thấp nên các polypeptit thường dễ bị biến tính và bị thoái biến dưới tác động của các proteinaza và do đó bị mất hoạt tính. Mặt khác, peptit có kích cỡ tương đối nhỏ nên dễ bị bài tiết qua thận.

Do đó, để duy trì được mức nồng độ trong máu và hiệu giá của chúng như mong muốn, cần phải sử dụng thường xuyên thuốc protein chứa hoạt chất là polypeptit hoặc peptit. Tuy nhiên, vì trong phần lớn trường hợp các thuốc protein ở dạng dùng để tiêm, nên để duy trì nồng độ polypeptit hoặc peptit có hoạt tính sinh lý thích hợp trong máu cần tiến hành tiêm thường xuyên, điều này gây đau nhiều cho bệnh nhân. Để khắc phục các nhược điểm này, đã có nhiều cố gắng để tạo ra tác dụng thuốc tối đa bằng cách làm tăng độ ổn định các thuốc protein trong máu và đồng thời duy trì nồng độ thuốc trong máu ở mức cao trong khoảng thời gian dài. Các tác nhân trong thuốc protein có tác dụng trong thời gian dài phải không những gia tăng được độ ổn định thuốc protein và duy trì mức hiệu giá của các thuốc này đủ cao, mà còn phải không gây ra các đáp ứng miễn dịch ở bệnh nhân.

Thông thường, các polyme có độ tan cao như polyetylenglycol (PEG) được ghép nối hoá học vào bề mặt protein để làm ổn định protein, ngăn không cho các proteinaza tiếp xúc với protein, và hạn chế sự thất thoát qua thận các peptit có kích thước nhỏ. Khi được ghép với một ví trí đặc hiệu hoặc với nhiều ví trí khác nhau trên protein, PEG có tác dụng làm ổn định và ngăn cản phản ứng thủy phân protein mà không gây ra tác dụng phụ đáng kể. Ngoài ra, khi được ghép với PEG thì phân tử

lượng của protein tăng lên, nhờ đó hạn chế được tổn thất protein qua thận và đồng thời duy trì hoạt tính sinh lý của protein.

Ví dụ, WO 2006/076471 đề cập đến việc sử dụng peptit tăng bài tiết natri niệu dạng B (*B-type natriuretic peptide* - BNP) để điều trị chứng suy tim sung huyết. BNP gắn kết với thụ thể peptit A tăng bài tiết natri niệu (*natriuretic peptide receptor* A - NPR-A) để gây ra quá trình tổng hợp cGMP, nhờ đó làm giảm huyết áp tại động mạch. Khi được PEG hoá (gắn với polyme polyetylen glycol bằng liên kết cộng hoá trị), nhận thấy là BNP có hoạt tính sinh lý kéo dài hơn trong khoảng thời gian dài. Patent Mỹ số 6,924,264 cũng cho thấy có sự tăng thời gian tác động của exendin-4 khi ghép PEG lên gốc lysin.

Để gia tăng hoạt tính sinh lý của polypeptit làm thuốc, một polypeptit làm thuốc được gắn vào cả hai đầu tận cùng của PEG để tạo ra thể liên hợp kép (theo Patent Mỹ số 5,738,846). Mặc khác, có thể cho hai protein làm thuốc khác nhau gắn kết với các đầu tận cùng tương ứng của PEG để tạo ra phức hợp protein có hai hoạt tính sinh lý khác nhau (theo WO 92/16221). Tuy nhiên, nhận thấy không có sự thay đổi có ý nghĩa về khả năng duy trì hoạt tính ở thuốc protein này.

Ngoài ra, theo như báo cáo, protein dung hợp mà trong đó G-CSF và albumin người được gắn kết với một PEG, có độ ổn định tăng lên (Kinstler et al., Pharmaceutical Research 12(12): 1883-1888, 1995). Tuy nhiên, nhận thấy là dạng thuốc cải biến có cấu trúc G-CSF-PEG-albumin này chỉ làm tăng thời gian lưu khoảng bốn lần khi so với dạng thuốc ban đầu không gắn kết, và chỉ tăng thời gian bán tồn trong huyết thanh lên đôi chút. Do đó, dạng thuốc cải biến này trên thực tế không được dùng làm tác nhân kéo dài.

Khi được liên hợp với PEG, peptit trở nên ổn định tới mức có thể kéo dài thời gian tồn tại của chúng in vivo. Tuy nhiên, vì có phân tử lượng cao, nên PEG làm cho hiệu giá của peptit có hoạt tính sinh lý thấp đáng kể và làm giảm tính phản ứng của peptit, điều này dẫn đến hiệu suất thấp.

Một phương pháp khác làm tăng độ ổn định của protein có hoạt tính sinh lý in vivo là dùng kỹ thuật tái tổ hợp gen. Trước hết, gắn kết một gen mã hoá protein có độ ổn định trong máu cao với gen mã hoá protein có hoạt tính sinh lý quan tâm, sau đó biến nạp vào tế bào động vật, tiếp theo nuôi cấy tế bào này để tạo ra protein dung hợp.

Ví dụ, đã có nghiên cứu về protein dung hợp mà trong đó albumin hoặc phần của nó, đến nay được cho là hữu hiệu nhất trong việc làm ổn định protein, được dung hợp với protein có hoạt tính sinh lý quan tâm (WO 93/15199 và 93/15200, công bố đơn châu Âu số 413622). Ngoài ra, protein dung hợp của interferon alpha và albumin, được Human Genome Sciences tạo ra từ nấm men (tên thương mại: Albuferon$^{TM}$), có thể làm tăng thời gian bán tồn trong huyết thanh từ 5 giờ đến 93 giờ, nhưng vẫn có nhược điểm quan trọng là làm giảm hoạt tính sinh học thấp hơn 5% so với interferon nguyên thể (Osborn et al., J. Phar. Exp. Ther. 303(2): 540-548, 2002).

Liên quan đến peptit, có các cải biến khác như được đề cập trong WO 02/46227, trong đó GLP-1, exendin-4 và các chất tương tự của chúng được dung hợp với albumin huyết thanh người hoặc mảnh globulin miễn dịch (Fc) bằng cách sử dụng các kỹ thuật tái tổ hợp di truyền và patent Mỹ số 6756480 bộc lộ protein dung hợp giữa hormon cận giáp (parathyroid hormone - PTH) hoặc các chất tương tự của nó và mảnh globulin miễn dịch (Fc). Các phương pháp này có thể khắc phục được vấn đề hiệu suất PEG hoá thấp và tính không đặc hiệu, nhưng lại có nhược điểm là thời gian bán tồn trong huyết thanh không tăng lên đáng kể và trong một số trường hợp, tạo ra hiệu giá thấp. Để tăng thời gian bán tồn trong huyết thanh lên cao nhất, có thể sử dụng các nhánh liên kết peptit khác nhau, nhưng phương án này lại có nguy cơ gây ra đáp ứng miễn dịch cao. Khi áp dụng phương pháp này, peptit có cầu nối đisulfua, chẳng hạn như BNP, có nhiều khả năng gây ra cuộn gập sai và do đó khó áp dụng.

WO 94/11399 A1 bộc lộ việc liên kết đặc hiệu vị trí của tiểu phần tử β hemoglobin ở vị trí lys-82 của mỗi tiểu phần tử thành dạng tetra ổn định hơn của nó bằng mối liên kết có ba chức như trimesoyl tris (3,5-đibrosalixylat) (TTDS). Ahrends, Nucleic Acids Research, vol. 34, no. 10, 3169-3180, 2006 nhận diện mối liên kết ngang quang được tạo ra giữa thể đột biến A223C của xystein MutH được đánh dấu bằng mối liên kết có ba chức ở vòng xoắn đầu tận cùng C và protein kích hoạt MutL của nó để khảo sát tương tác protein-protein. WO 2007/062177 A1 mô tả liên kết ngang của hai tiểu phần tử với nhau và thể liên hợp kháng thể để tạo ra độ nhạy nhuộm màu đặc biệt và tính đặc hiệu trong các thử nghiệm hóa miễn dịch mô và lai *in situ* . Tất cả WO 93/02105 A1 A1, WO 2004/054615 A1 và Studdert et al., PNAS, tập 102, số 43, 15623-15628, 2006 đều bộc lộ 3 protein được liên kết bằng tác nhân liên kết ngang có ba chức. WO 2008/082274 A1 bộc lộ thể liên hợp protein chứa miền Fc.

Cũng đã biết đến các protein dung hợp khác nhau khác được tạo ra bằng cách gắn kết miền Fc của globulin miễn dịch với interferon (công bố đơn patent Hàn quốc số 2003-9464), thụ thể interleukin-4, thụ thể interleukin-7 hoặc thụ thể erythropoietin (Patent Hàn quốc số 249572) bằng công nghệ tái tổ hợp di truyền. Công bố đơn quốc tế số WO 01/03737 bộc lộ protein dung hợp trong đó xytokin hoặc yếu tố tăng trưởng được gắn kết thông qua mối liên kết oligopeptit với phần Fc của globulin miễn dịch. Patent Mỹ số 5,116,964 bộc lộ dạng dung hợp giữa LHR (glycoprotein bề mặt tế bào lympho - *lymphocyte cell surface glycoprotein*) hoặc protein CD4 với đầu amino hoặc carboxy của miền Fc của globulin miễn dịch được tạo ra bằng kỹ thuật tái tổ hợp di truyền. Ngoài ra, Patent Mỹ số 5349053 bộc lộ protein dung hợp trong đó IL-2 được gắn kết với miền Fc của globulin miễn dịch. Đã biết nhiều protein dung hợp với Fc khác được tạo ra bằng kỹ thuật tái tổ hợp di truyền, ví dụ bao gồm protein dung hợp tạo ra từ miền Fc của globulin miễn dịch với interferon-beta hoặc các dẫn xuất của chúng (công bố đơn quốc tế số WO 00/23472), miền Fc của globulin miễn dịch với thụ thể IL-5 (Patent Mỹ số 5712121), miền Fc của globulin miễn dịch G4 với interferon alpha (Patent Mỹ số 5723125) và miền Fc của globulin miễn dịch G2 với protein CD4 (Patent Mỹ số 6451313). Mặc khác, Patent Mỹ số 5605690 hướng dẫn việc sử dụng dạng cải biến của miền Fc của globulin miễn dịch để sản xuất protein dung hợp. Ví dụ, sử dụng Fc globulin miễn dịch có các gốc axit amin được cải biến đặc biệt nhằm bổ trợ cho vị trí gắn kết hoặc vị trí gắn kết thụ thể để tạo ra protein dung hợp TNFR-IgG1 Fc bằng phương pháp tái tổ hợp di truyền. Các Patent Mỹ số 6277375, 6410008 và 6444792 bộc lộ các protein dung hợp khác của miền Fc globulin miễn dịch cải biến được tạo ra bằng kỹ thuật tái tổ hợp gen.

Các globulin miễn dịch hoạt động như là kháng thể, thể hiện độc tính tế bào phụ thuộc kháng thể (*antibody-dependent cell cytotoxicity*: ADCC) hoặc độc tính tế bào phụ thuộc bổ thể (*complement-dependent cytotoxicity*: CDC) và theo như báo cáo, các chuỗi đường có mặt trong miền Fc của globulin miễn dịch đóng một vai trò quan trọng trong các quá trình ADCC và CDC (Burton D., Molec. Immun. 22, 161-206,1985). Đã biết rằng bản thân globulin miễn dịch, khi không có chuỗi đường, có thời gian bán tồn trong huyết thanh tương tự với globulin miễn dịch có các chuỗi đường, nhưng có lực gắn kết với bổ thể và lực gắn kết với thụ thể giảm từ 10 đến 1000 lần (Waldmann H., Eur. J. Immunol. 23, 403-411, 1993; Morrison S., J. Immunol. 143, 2595-2601, 1989).

Patent Mỹ số 6660843 bộc lộ dạng dung hợp của miền Fc với peptit quan tâm thông qua mối liên kết và phương pháp sản xuất protein dung hợp ở E. coli bằng kỹ thuật tái tổ hợp gen. Khi được sử dụng trong việc điều chế các phức hợp, mối liên kết cho phép chọn lọc vị trí liên hợp giữa hai protein quan tâm và hướng của chúng, và giúp sản xuất ra phức hợp ở dạng monome, đime hoặc multime đồng nhất hoặc khác loại. Ngoài ra, khi sử dụng phương pháp này, có thể tạo ra phức hợp với chi phí thấp hơn khi sử dụng tế bào động vật có vú. Ngoài ra, có thể tạo ra phức hợp ở dạng không chứa chuỗi đường. Tuy nhiên, vì cùng một lúc sản xuất cả protein quan tâm và miền Fc của globulin miễn dịch trong E. coli, nên khó áp dụng phương pháp này cho protein đích khi dạng nguyên thể của protein đích có chuỗi đường. Dựa vào các thể vùi, phương pháp này dễ có khuynh hướng gây ra cuộn gập sai. Trong protein dung hợp Fc tạo ra bằng kỹ thuật tái tổ hợp di truyền, dung hợp chỉ có thể xảy ra ở vị trí cụ thể, nói cách khác đầu tận cùng amino hoặc carboxy của miền Fc globulin miễn dịch. Protein dung hợp Fc chỉ biểu hiện ở dạng đime đồng nhất, chứ không ở dạng monome. Ngoài ra, dung hợp chỉ có thể xảy ra giữa các protein được glycosyl hoá hoặc giữa các protein không được glycosyl hoá, chứ không thể xảy ra giữa các protein được glycosyl hoá và protein không được glycosyl hoá. Khi có mặt trong cơ thể, trình tự axit amin mới được tạo ra do quá trình dung hợp có thể gây ra đáp ứng miễn dịch. Hơn nữa, mối liên kết này có thể dễ bị phân huỷ bằng enzym.

Theo như các báo cáo trước đây, trong quá trình phát triển protein dung hợp bằng cách sử dụng miền Fc của globulin miễn dịch, chưa có cố gắng nào tạo ra phức hợp của protein đích với Fc nguyên thể ở người thông qua mối liên kết ngang. Có thể tạo ra miền Fc của globulin miễn dịch ở tế bào động vật có vú hoặc E. coli bằng cách sử dụng các kỹ thuật tái tổ hợp di truyền, nhưng báo cáo trước đây chưa hề có nỗ lực nhằm tạo ra chỉ miền Fc của globulin miễn dịch nguyên thể không có protein đích với hiệu suất cao và sử dụng chúng để tạo ra dạng ổn định. Ngoài ra, chưa có nỗ lực nào được thực hiện để tạo ra phức hợp của Fc globulin miễn dịch tái tổ hợp với các protein đích thông qua mối liên kết ngang.

Như vậy, đã thực hiện nhiều phương pháp khác nhau để liên hợp polypeptit có hoạt tính sinh lý với polyme. Theo các phương pháp thường dùng, có thể cải thiện độ ổn định của polypeptit, nhưng lại làm giảm đáng kể hoạt tính, hoặc có thể cải thiện được hoạt tính nhưng lại không xét đến độ ổn định. Do đó, vẫn cần tìm ra phương

pháp mà có thể làm tăng độ ổn định của các thuốc protein mà chỉ làm giảm ở mức tối thiểu hoạt tính gây ra do cải biến.

Với mục đích này, các tác giả sáng chế đã xây dựng nên phức hợp protein có thời gian bán tồn trong huyết thanh cải thiện và có hoạt tính cao bằng cách gắn globulin miễn dịch và polypeptit có hoạt tính sinh lý lần lượt vào các đầu tận cùng đối xứng của mối liên kết phi peptit như được bộc lộ trong các Patent Hàn quốc số 10-0725315 và 10-0775343.

Thông thường, điều chế phức hợp protein trong đó globulin miễn dịch và polypeptit có hoạt tính sinh lý lần lượt được gắn kết với đầu tận cùng đối xứng của polyme phi peptit bằng cách gắn kết polyme phi peptit theo xu hướng ưu tiên với polypeptit có hoạt tính sinh lý và sau đó với miền Fc của globulin miễn dịch. Tuy nhiên, phương pháp tạo ra thông thường này thường tạo ra các tạp chất ngoài mong muốn, cũng như làm mất một lượng lớn polypeptit có hoạt tính sinh lý. Nói cách khác, phương pháp thông thường này là không có lợi về mặt kinh tế cho việc dùng trong công nghiệp và cần phải tinh chế phức hợp tạo ra theo phương pháp có phần phức tạp. Trong trường hợp mà polypeptit có hoạt tính sinh lý ở dạng đime, nó tạo ra liên kết cầu nối với polyme phi peptit ở cả hai đầu tận cùng làm cho polyme không thể tạo phức hợp với miền Fc globulin miễn dịch hoặc có thể tạo phức hợp nhưng với hiệu suất rất thấp. Mặc khác, khi miền Fc của globulin miễn dịch được gắn kết trước tiên với polyme phi peptit, thì cũng xảy ra hiện tượng tương tự. Vì Fc của globulin miễn dịch là đime đồng nhất với hai đầu tận cùng cuàng N nằm gần nhau, nên tạo thành các mối liên kết tương ứng giữa hai đầu tận cùng N của Fc globulin miễn dịch và đầu tận cùng đối xứng của polyme phi peptit để tạo ra dạng cầu nối, do đó không còn đầu có chức nào để cho phản ứng với polypeptit có hoạt tính sinh lý. Theo đó, hiệu suất sản xuất giảm đi đáng kể.

**Bản chất kỹ thuật của sáng chế**

Để đạt đến sáng chế, các tác giả sáng chế đã thực hiện nhiều nghiên cứu chuyên môn và kỹ lưỡng về phức hợp protein, nhằm mục đích khắc phục được nhược điểm vấp phải trước đây, đã tìm ra được rằng việc sử dụng polyme phi peptit 3 nhánh làm mối liên kết để điều chế phức hợp protein gồm có protein đime là miền Fc của Ig và polypeptit có hoạt tính sinh lý ngăn cản sự thất thoát polypeptit có hoạt tính sinh lý làm gia tăng đáng kể hiệu suất sản xuất, cho phép tinh chế phức hợp bằng phương pháp đơn giản, và cho phép tạo ra phức hợp protein có cấu trúc ổn định nên kéo dài thời gian bán tồn trong huyết thanh đồng thời duy trì hoạt tính sinh học của phức hợp.

Giải pháp kỹ thuật

Do đó, mục đích của sáng chế là tạo ra phức hợp protein trong đó polypeptit có hoạt tính sinh lý, polyme phi peptit 3 nhánh, và protein đime là miền Fc của Ig được liên kết với nhau thông qua các liên kết cộng hoá trị, và phương pháp tạo ra phức hợp này.

Sáng chế giúp tạo ra tác nhân thuốc protein có tác dụng kéo dài chứa phức hợp protein có polypeptit có hoạt tính sinh lý với thời gian bán tồn trong huyết thanh tăng lên mà vẫn đồng thời duy trì hoạt tính sinh học của mình.

Tác dụng mang tính ưu điểm của sáng chế

Nhờ có cấu trúc trong đó có liên kết giữa polypeptit có hoạt tính sinh lý và protein đime với polyme phi peptit 3 nhánh thông qua các liên kết cộng hoá trị, phức hợp protein theo sáng chế có thể duy trì nồng độ của polypeptit hoạt tính trong máu cao trong khoảng thời gian dài mang lại tác dụng y học ổn định.

Ngoài ra, phương pháp tạo ra phức hợp protein theo sáng chế có thể làm giảm rõ rệt lượng polypeptit có hoạt tính sinh lý cần dùng so với phương pháp thông thường có sử dụng polyme phi peptit hai nhánh và có các ưu điểm so với phương pháp thông thường, là chỉ cần phương pháp tinh chế đơn giản hơn và làm tăng đáng kể hiệu suất sản xuất. Đặc biệt là, tốt hơn nếu phức hợp protein bền với polypeptit có hoạt tính sinh lý có bản chất đime được điều chế bằng phương pháp theo sáng chế.

**Mô tả vắn tắt hình vẽ**

FIG. 1 là hình đại diện thể hiện phức hợp protein dùng polyme phi peptit có ba đầu có chức (3 nhánh).

FIG. 2 thể hiện hiệu quả in vivo của phức hợp PEG-Octreotit (N) 3 nhánh với Fc globulin miễn dịch trên đồ thị (HM11760B: phức hợp PEG-Octreotit (N) 3 nhánh với Fc globulin miễn dịch, Sandostatin-LAR: chế phẩm giải phóng kéo dài của octreotit).

FIGS. 3 thể hiện hiệu quả in vivo của phức hợp PEG-FSH(N) 3 nhánh với Fc globulin miễn dịch (HM12160A: phức hợp PEG-FSH(N) 2 nhánh với Fc globulin miễn dịch, HM12160B: phức hợp PEG-FSH(N) 3 nhánh với Fc globulin miễn dịch).

**Mô tả chi tiết sáng chế**

Theo một khía cạnh của sáng chế, sáng chế đề cập đến phức hợp protein trong đó polypeptit có hoạt tính sinh lý và là miền Fc của Ig được liên kết cộng hoá trị với polyme phi peptit 3 nhánh.

Như được sử dụng ở bản mô tả này, thuật ngữ "phức hợp protein" hoặc "phức hợp" được dự định để được dùng để chỉ cấu trúc bao gồm ít nhất một polypeptit có hoạt tính sinh lý, ít nhất một polyme phi peptit 3 nhánh và ít nhất một protein đime, kết nối thông qua các liên kết cộng hoá trị giữa các chất này. Để phân biệt với thuật ngữ "phức hợp", thuật ngữ "liên hợp" được sử dụng trong bản mô tả này được dùng để chỉ cấu trúc trong đó chỉ có kết nối giữa các cặp đôi polypeptit có hoạt tính sinh lý, polyme phi peptit và protein đime thông qua liên kết cộng hoá trị.

Phức hợp protein theo sáng chế là thuốc protein được cải biến để gia tăng sự tồn tại của phức hợp in vivo và làm giảm thiểu sự mất hoạt tính sinh học của phức hợp. Sáng chế đề xuất việc sử dụng polyme phi peptit 3 nhánh gắn kết polypeptit có hoạt tính sinh lý và là miền Fc của Ig qua nó để tạo ra phức hợp protein, nhờ đó cho phép có thể áp dụng phương pháp tạo ra mà có thể ngăn được sự thất thoát polypeptit có hoạt tính sinh lý và tạo ra phức hợp protein có thể có cấu trúc ổn định để tinh chế được dễ dàng.

Như được sử dụng ở bản mô tả này, thuật ngữ "protein đime" được dùng để chỉ protein có hai đầu tận cùng N. Tốt hơn là có thể sử dụng miền Fc của globulin miễn

dịch làm chất mang. Các homođime hoặc heterođime có hoạt tính sinh lý cũng thuộc phạm vi của protein đime này.

Miền Fc của globulin miễn dịch là có độ ổn định thích hợp để dùng làm chất mang cho thuốc bởi vì đó là polypeptit phân huỷ sinh học khi được trao đổi chất in vivo. Ngoài ra, nhờ có phân tử lượng tương đối nhỏ, nên miền Fc của globulin miễn dịch có ưu điểm hơn so với phân tử globulin miễn dịch toàn thể khi xét về phương pháp tạo ra, tinh chế và hiệu suất tạo phức hợp. Ngoài ra, bởi vì miền này không chứa miền Fab mà là khác nhau nhiều về trình tự axit amin giữa các kháng thể khác nhau, Fc có tác động tăng cường mạnh đến mức tương đồng của phức hợp và được cho là làm giảm khả năng gây ra tính kháng nguyên.

Thuật ngữ "miền Fc của globulin miễn dịch", như được sử dụng ở bản mô tả này, được dự định để chỉ miền ổn định của chuỗi nặng 2 ($C_H2$) và miền ổn định của chuỗi nặng 3 ($C_H3$) không chứa miền thay đổi của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng, miền ổn định của chuỗi nặng 1 ($C_H1$) và miền ổn định của chuỗi nhẹ 1 ($C_L1$) và có thể chứa vùng bản lề. Miền Fc của globulin miễn dịch theo sáng chế có thể là miền Fc kéo dài còn chứa một phần hoặc toàn bộ cả miền ổn định của chuỗi nặng 1 ($C_H1$) và/hoặc miền ổn định của chuỗi nhẹ 1 ($C_L1$) và không có miền thay đổi của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng nếu miền này đảm bảo mang lại tác dụng về cơ bản là giống hoặc cao hơn tác dụng của dạng nguyên thể. Theo cách khác, miền Fc có thể là dạng cắt ngắn của $C_H2$ và/hoặc $C_H3$ không có phần đáng kể trình tự axit amin tương ứng. Nói tóm lại, miền Fc của globulin miễn dịch theo sáng chế có thể 1) miền $C_H1$, miền $C_H2$, miền $C_H3$ và miền $C_H4$, 2) miền $C_H1$ và miền $C_H2$, 3) miền $C_H1$ và miền $C_H3$, 4) miền $C_H2$ và miền $C_H3$, 5) kết hợp của một hoặc nhiều miền và vùng bản lề của globulin miễn dịch (hoặc một phần của vùng bản lề) hoặc 6) đime bao gồm một miền ổn định của chuỗi nhẹ và miền ổn định của chuỗi nhẹ.

Ngoài ra, thuật ngữ "miền Fc của globulin miễn dịch", như được sử dụng ở bản mô tả này, được dự định để chỉ không chỉ trình tự axit amin nguyên thể mà còn cả các đột biến của chúng. Đột biến trình tự axit amin được dùng để chỉ trình tự axit amin khác với trình tự nguyên thể bởi khuyết đoạn, cài xen, thay thế bảo toàn hoặc không bảo toàn của một hoặc nhiều gốc axit amin hoặc kết hợp của chúng. Ví dụ, các gốc axit amin ở các vị trí từ 214 đến 238, 297 đến 299, 318 đến 322, hoặc 327 đến 331 của Fc IgG, mà đã được biết là đóng một vai trò quan trọng trong gắn kết với kháng thể

liên kết, có thể được cải biến sao cho được sử dụng là vị trí gắn kết thích hợp . Ngoài ra, có thể có các đột biến khác nhau, ví dụ như, không có gốc tạo liên kết đisulfua hoặc một số axit amin đầu tận cùng N của Fc nguyên thể, hoặc có thêm gốc metionin ở đầu tận cùng N ở Fc nguyên thể. Ngoài ra, có thể làm mất chức năng hiệu ứng bằng cách loại motif gắn kết bổ trợ, ví dụ, motif gắn kết với C1q, hoặc motif ADCC (độc tính tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể - antibody-dependent cell cytotoxicity). Có thể tham khảo WO 97/34631 và WO 96/32478 liên quan đến việc tạo ra các đột biến trình tự axit amin của miền Fc của globulin miễn dịch.

Trong lĩnh vực kỹ thuật này cũng đã biết đến các thay thế axit amin mà không làm biến đổi hoạt tính của toàn bộ protein hoặc peptit nguyên thể (H. Neurath, R. L. Hill, Proteins, Academic Press, New York, 1979). Các thay thế phổ biến nhất xuất hiện giữa 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. Nếu cần, có thể tiến hành cải biến axit amin, chẳng hạn như thông qua quá trình phosphoryl hóa, sulfat hoá, acryl hoá, glycosyl hoá, metyl hoá, farnesyl hoá, axetyl hoá, amit hoá, v.v.

Tốt hơn nếu các đột biến Fc được mô tả trên đây là các biến đổi tương đương chức năng so với dạng tự nhiên, do đó có hoạt tính sinh học tương tự, có cải thiện về độ ổn định cấu trúc đối với tác động của nhiệt và độ pH.

Miền Fc có thể là dạng nguyên thể được phân tách từ người và các động vật khác bao gồm bò, dê, lợn, chuột nhắt, thỏ, chuột đồng, chuột cống và chuột lang, hoặc có thể là dạng tái tổ hợp hoặc các dẫn xuất của chúng, thu được từ tế bào động vật hoặc vi sinh vật được biến nạp. Trong trường hợp sau này, toàn bộ globulin miễn dịch được phân tách từ người hoặc động vật, sau đó xử lý bằng proteaza. Khi xử lý bằng papain, toàn bộ globulin miễn dịch được phân chia thành Fab và Fc. Pepsin phân cắt toàn bộ globulin miễn dịch thành pF'c và F(ab)2. Từ các phần này, có thể tách riêng Fc hoặc pF'c bằng cách sử dụng phương pháp sắc ký rây phân tử. Được ưu tiên là miền Fc của globulin miễn dịch tái tổ hợp thu được từ miền Fc của người ở vi sinh vật.

Miền Fc của globulin miễn dịch hữu ích trong sáng chế có thể có chuỗi đường với chiều dài ít hơn, bằng, hoặc dài hơn miền Fc nguyên thể, hoặc có thể không có chuỗi đường. Có thể thực hiện việc bổ sung, làm giảm hoặc loại bỏ chuỗi đường ở Fc

globulin miễn dịch bằng cách sử dụng kỹ thuật thông thường, chẳng hạn như kỹ thuật hoá học, kỹ thuật enzym hoặc kỹ thuật tái tổ hợp di truyền bằng cách sử dụng vi sinh vật. Miền Fc của globulin miễn dịch được khử glycosyl hoá làm giảm đáng kể về lực gắn kết của đoạn bổ trợ (C1q) và có độc tính tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể hoặc độc tính tế bào phụ thuộc bổ thể rất nhỏ hoặc là không có, và do đó không gây ra các đáp ứng miễn dịch không cần thiết. Trong bản mô tả này, miền Fc của globulin miễn dịch được khử glycosyl hoá hoặc không được glycosyl hoá có xu hướng trùng khớp với chức năng dự định làm chất mang thuốc.

Như được sử dụng ở bản mô tả này, thuật ngữ "khử glycosyl hoá" được dùng để chỉ việc loại bỏ chuỗi đường ra khỏi Fc nguyên thể bằng phương pháp enzym. Thuật ngữ "không được glycosyl hoá"được dùng để chỉ rằng không có mặt các chuỗi đường trong miền Fc bởi vì miền này được tạo ra ở sinh vật có nhân chuẩn và tốt hơn nếu là ở E. coli.

Miền Fc của globulin miễn dịch có thể có nguồn gốc từ động vật bao gồm người, bò, dê, lợn, chuột nhắt, thỏ, chuột đồng, chuột cống và chuột lang, tốt hơn là có nguồn gốc từ người. Ngoài ra, miền Fc của globulin miễn dịch hữu ích trong sáng chế có thể thu được từ trong số IgG, IgA, IgD, IgE, IgM và kết hợp của chúng hoặc thể lai của chúng. Tốt hơn nếu, miền Fc này thu được từ IgG hoặc IgM, là các dạng có nhiều hơn các dạng globulin miễn dịch khác, và tốt nhất nếu từ IgG mà đã được biết đến là kéo dài thời gian bán tồn trong huyết thanh của protein gắn kết với phối tử.

Ngoài ra, miền Fc của globulin miễn dịch có thể ở dạng đime hoặc multime (kết hợp của Fc globulin miễn dịch), mỗi dạng chứa globulin miễn dịch được glycosyl hoá cấu thành từ các miền có cùng nguồn gốc.

Thuật ngữ "kết hợp", như được sử dụng ở bản mô tả này, dùng để chỉ sự gắn kết của polypeptit mã hoá phần Fc của globulin miễn dịch chuỗi đơn có cùng nguồn gốc với polypeptit chuỗi đơn có nguồn gốc khác để tạo ra đime hoặc multime. Nói cách khác có thể điều chế đime hoặc multime bằng cách kết hợp hai hoặc nhiều phần được chọn trong số các phần Fc của IgG Fc, IgA Fc, IgM Fc, IgD Fc và IgE Fc.

Thuật ngữ "thể lai", như được sử dụng ở bản mô tả này, có nghĩa là trình tự mã hoá hai hoặc nhiều phần Fc của globulin miễn dịch có nguồn gốc khác nhau có mặt trong phần Fc của globulin miễn dịch chuỗi đơn. Theo sáng chế, có thể có các dạng thể

lai khác nhau. Ví dụ, miền Fc bao gồm từ một đến bốn miền khác nhau chọn từ $C_H1$, $C_H2$, $C_H3$ và $C_H4$ của Fc IgG, Fc IgM, Fc IgA, Fc IgE và Fc IgD và có thể chứa vùng bản lề.

IgG còn được phân chia tiếp thành các phân lớp IgG1, IgG2, IgG3 và IgG4 và kết hợp hoặc thể lai của chúng là được phép theo sáng chế. Được ưu tiên là miền Fc của IgG2 hoặc IgG4, trong đó ưu tiên nhất là miền Fc của IgG4 không có chức năng hiệu ứng chẳng hạn như độc tính tế bào phụ thuộc bổ thể (CDC).

Theo đó, miền Fc không được glycosyl hoá của IgG4 của người là chất mang thuốc được ưu tiên cao nhất. Miền Fc có nguồn gốc từ người là được ưu tiên hơn dạng có nguồn gốc không phải là người vì dạng sau này có thể tác động như là kháng nguyên trong cơ thể, gây ra sản xuất kháng thể chống lại nó.

Sáng chế đề xuất mối liên kết của thuốc protein với protein đime thông qua polyme phi peptit.

Theo sáng chế, polyme phi peptit được dùng để chỉ polyme tương thích sinh học bao gồm hai hoặc nhiều mắt xích cơ sở được liên kết với nhau thông qua liên kết cộng hoá trị không phải là liên kết peptit.

Mối kết nối dạng peptit thường được dùng trong protein dung hợp được điều chế thông qua dung hợp trong khung có nhược điểm là dễ bị proteinaza phân cắt in vivo, do đó không đảm bảo được thuốc hoạt tính có thời gian bán tồn trong huyết thanh lâu như dự tính khi chất mang vẫn còn nguyên vẹn. Ngược lại, polyme theo sáng chế bền đối với tác dụng phân cắt bằng enzym, duy trì thời gian bán tồn trong huyết thanh của thuốc lâu như đảm bảo miễn là chất mang vẫn còn nguyên vẹn. Với điều kiện là polyme có tác dụng như nêu trên, nói cách khác là bền với tác dụng của proteinaza in vivo, thì polyme bất kỳ đều có thể được sử dụng theo sáng chế không có hạn chế nào cả. Polyme phi peptit hữu ích theo sáng chế có phân tử lượng từ 1 đến 100 kDa và tốt hơn nếu từ 1 đến 20 kDa. Polyme phi peptit theo sáng chế được liên hợp với miền Fc globulin miễn dịch có thể là polyme hoặc kết hợp của các polyme khác nhau.

Ví dụ về polyme phi peptit hữu ích theo sáng chế bao gồm polyme phân huỷ sinh học như polyetylen glycol, polypropylen glycol, copolyme của etylen glycol và propylen glycol, polyol được polyoxyetyl hoá, rượu polyvinyl, polysacarit, đextran,

polyvinyl etyl ete, polyme phân huỷ sinh học chẳng hạn như PLA (axit polylactic) và PLGA (axit polylactic-glycolic), lipopolyme, chitin, axit hyaluronic và kết hợp của chúng, trong đó polyetylen glycol là được ưu tiên. Ngoài ra, các dẫn xuất của chúng đã được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật này hoặc có thể điều chế dễ dàng bằng cách sử dụng kỹ thuật thông thường đều nằm trong phạm vi của sáng chế.

Polyme phi peptit được sử dụng theo sáng chế các nhóm chức mà miền Fc của globulin miễn dịch và thuốc protein có thể gắn kết với.

Ngược lại phương pháp đã biết điều chế phức hợp protein bằng cách sử dụng polyme phi peptit có hai đầu có chức (có hai nhánh) (Patent Hàn quốc số 10-0725315), sáng chế sử dụng polyme phi peptit 3 nhánh. Khác với polyme phi peptit thông thường có một đầu có chức và các nhánh từ lõi phân tử, polyme phi peptit hữu ích theo sáng chế có ba đầu có chức trong đó hai đầu chịu trách nhiệm cho sự tạo thành liên kết cộng hoá trị với protein đime còn đầu kia được liên kết cộng hoá trị với polypeptit có hoạt tính sinh lý.

Chi tiết hơn nữa, vì Fc globulin miễn dịch là đime đồng nhất có hai đầu tận cùng N nằm gần nhau, nên tạo thành liên kết tương ứng giữa hai đầu tận cùng N của Fc globulin miễn dịch và đầu tận cùng đối xứng của polyme phi peptit. Do đó, khi trước hết polyme phi peptit có hai nhánh tạo thành liên kết cộng hoá trị với miền Fc của globulin miễn dịch, thì không còn đầu có chức nào khác có thể phản ứng với polypeptit có hoạt tính sinh lý, làm giảm đáng kể hiệu suất sản xuất. Do đó, polypeptit có hoạt tính sinh lý, trước khi phản ứng với polyme phi peptit có hai nhánh, được cho phản ứng với miền Fc của globulin miễn dịch. Tuy nhiên, khi cho polypeptit có hoạt tính sinh lý phản ứng trước, tạo ra nhiều tạp chất ngoài mong muốn, do đó làm thất thoát polypeptit có hoạt tính sinh lý. Ngược lại, có thể cho polyme phi peptit 3 nhánh phản ứng với miền Fc của globulin miễn dịch trước khi phản ứng với polypeptit có hoạt tính sinh lý vì hai trong số ba đầu có chức của polyme chịu trách nhiệm cho liên kết với hai đầu tận cùng N của Fc globulin miễn dịch còn đầu chức kia của nó có thể liên kết với polypeptit có hoạt tính sinh lý. Do vậy, có thể tạo ra phức hợp protein với hiệu suất cao. Trên thực tế, nhận thấy hiệu suất sản xuất cao hơn từ hai đến chín lần khi sử dụng polyme phi peptit có hai nhánh.

Ba nhóm chức đầu tận cùng của polyme phi peptit có thể gắn kết với các gốc lysin, histiđin hoặc xystein tự do ở đầu tận cùng N của miền Fc của globulin miễn dịch và polypeptit có hoạt tính sinh lý.

Tốt hơn nếu, ba nhóm chức đầu tận cùng của polyme phi peptit được chọn trong số các nhóm alđehyt, nhóm propionalđehyt, nhóm butyl alđehyt, nhóm maleimit và các dẫn xuất suxinimit. Ví dụ về các dẫn xuất suxinimit hữu ích theo sáng chế bao gồm suxinimiđyl propionat, hyđroxy suxinimiđyl, suxinimiđyl carboxymetyl và suxinimiđyl cacbonat. Các nhóm alđehyt là được ưu tiên. Khi có mặt trên ba đầu tận cùng của polyme phi peptit, các nhóm alđehyt dễ phản ứng có thể giảm thiểu các phản ứng không đặc hiệu và là hữu hiệu trong việc tạo thành các mối liên kết với cả polypeptit có hoạt tính sinh lý lẫn protein đime. Ngoài ra, sản phẩm cuối tạo thành do quá trình alkyl hoá khử với alđehyt là ổn định hơn nhiều sản phẩm được tạo thành với mối liên kết amit. Thông thường, các nhóm chức alđehyt phản ứng chọn lọc với đầu amino ở độ pH thấp trong khi đó tạo thành liên kết cộng hoá trị với gốc lysin ở độ pH cao, ví dụ, pH 9,0. Ba nhóm chức đầu tận cùng của polyme phi peptit có thể là giống nhau hoặc khác nhau.

Theo sáng chế, thể liên hợp của protein đime với polyme phi peptit này được liên kết với polypeptit có hoạt tính sinh lý để tạo ra phức hợp protein.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "polypeptit có hoạt tính sinh lý", "protein có hoạt tính sinh lý", "protein hoạt tính", "polypeptit hoạt tính" hoặc "thuốc protein" được dùng để chỉ polypeptit, peptit hoặc protein có hoạt tính đối kháng nào đó chống lại một hiện tượng sinh lý in vivo và các thuật ngữ này có thể được sử dụng thay cho nhau.

Polypeptit có hoạt tính sinh lý có thể dùng tạo ra phức hợp protein theo sáng chế có thể được nêu ví dụ là các hormon, xytokin, interleukin, protein gắn kết với interleukin, enzym, kháng thể, yếu tố sinh trưởng, yếu tố phiên mã, nhân tố máu, vacxin, protein cấu trúc, protein phối tử, thụ thể, kháng nguyên bề mặt tế bào, chất đối kháng thụ thể, và các dẫn xuất hoặc các chất tương tự của chúng.

Ví dụ cụ thể về polypeptit có hoạt tính sinh lý hữu ích theo sáng chế bao gồm hormon sinh trưởng ở người, hormon giải phóng hormon sinh trưởng, peptit giải phóng hormon sinh trưởng, interferon và các thụ thể interferon (ví dụ, interferon-α, -β và -γ, các thụ thể interferon typ I hoà tan), yếu tố kích thích khuẩn lạc, peptit giống

glucagon (GLP-1, v.v.), peptit exendin-4, ANP, BNP, CNP, DNP, thụ thể hoạt động gắn với protein G, interleukin (e.g, interleukin-1, -2, -3, -4, -5, -6, -7, -8, -9, -10, -11, -12, -13, -14, -15, -16, -17, -18, -19, -20, -21, -22, -23, -24, -25, -26, -27, -28, -29, -30) và các thụ thể interleukin (ví dụ, thụ thể IL-1, thụ thể IL-4, v.v.), enzym (ví dụ, glucocerebrosidaza, iduronate-2-sulfataza, α-galactosidaza-A, α-L-iduronidaza, butyrylcholinesteraza, chitinaza, glutamat đecarboxylaza, imigluceraza, lipaza, uricaza, axetylhyđrolaza yếu tố hoạt hoá tiểu cầu, neutralendopeptiđaza, myeloperoxiđaza, v.v.), protein gắn kết với interleukin và xytokin (ví dụ, protein gắn kết với IL-18bp, TNF, v.v.), các yếu tố hoạt hoá đại thực bào, peptit đại thực bào, yếu tố tế bào B, yếu tố tế bào T, Protein A, chất ức chế dị ứng, glycoprotein hoại tử tế bào, độc tố miễn dịch, độc tố lympho bào, yếu tố hoại tử u, chất ức chế khối u, yếu tố tăng trưởng chuyển dạng, kháng trypsin alpha-1, albumin, α-lactalbumin, apolipoprotein-E, erythropoietin, erythropoietin được glycosyl hoá, angiopoeitin, hemoglobin, thrombin, peptit hoạt hoá thụ thể thrombin, thrombomodulin, nhân tố máu VII, VIIa, VIII, IX và XIII, chất hoạt hoá plasminogen, peptit gắn kết fibrin, urokinaza, streptokinaza, hirudin, Protein C, Protein C phản ứng, chất ức chế renin, chất ức chế colagenaza, superoxit đismutaza, leptin, yếu tố tăng trưởng có nguồn gốc từ tiểu cầu, yếu tố tăng trưởng biểu mô, yếu tố tăng trưởng biểu bì, angiostatin, angiotensin, yếu tố tăng trưởng xương, protein kích thích xương, calcitonin, insulin, somatostatin, octreotit (chất chủ vận somatostatin), atriopeptin, yếu tố cảm ứng sụn, elcatonin, yếu tố hoạt hoá mô liên kết, chất ức chế thông nối yếu tố mô (TFPI), hormon kích thích bao nang phát triển (FSH), hormon tạo hoàng thể (LH), hormon giải phóng hormon tạo hoàng thể (LHRH), yếu tố tăng trưởng thần kinh (ví dụ, yếu tố tăng trưởng thần kinh, yếu tố kích thần kinh lông mao, yếu tố ngoại sinh-1, peptit tương tự glucagon (GLP-1), peptit exendin-4, peptit tăng bài tiết natri niệu-não, yếu tố kích thần kinh có nguồn gốc thần kinh đệm, netrin, yếu tố ức chế vùng kết thần kinh, neurturin, v.v.), hormon cận giáp, relaxin, secretin, somatomedin, yếu tố tăng trưởng tương tự insulin, hormon vỏ trên thận, glucagon, cholecystokinin, polypeptit tuỵ, peptit giải phóng gastrin, tác nhân tiết corticotropin, hormon kích thích tuyến giáp, autotaxin, lactoferrin, myostatin, các thụ thể (ví dụ, TNFR(P75), TNFR(P55), thụ thể IL-1, thụ thể VEGF, thụ thể chất hoạt hoá tế bào B , v.v.), các chất đối kháng thụ thể (ví dụ, IL1-Ra, v.v.), kháng nguyên bề mặt tế bào (ví dụ, CD 2, 3, 4, 5, 7, 11a, 11b, 18, 19, 20, 23, 25, 33, 38, 40, 45, 69, v.v.),

kháng thể đơn dòng, kháng thể đa dòng, mảnh kháng thể (ví dụ, scFv, Fab, Fab' F(ab')2 và Fd), và kháng nguyên vacxin có nguồn gốc virut. Tốt hơn nếu, polypeptit có hoạt tính sinh lý được chọn trong số hormon sinh trưởng ở người, interferon-alpha, interferon-beta, yếu tố kích thích khuẩn lạc bạch cầu hạt, erythropoietin, exendin-4, peptit imiđazol axetyl exendin-4 (chất chủ vận exendin-4), calcitonin, octreotit (chất chủ vận somatostatin), BNP và Fab'.

Một bất tiện là, các thuốc protein này không thể duy trì hoạt tính sinh học của mình in vivo trong một thời gian dài vì chúng dễ bị biến tính hoặc dễ bị proteinaza phân huỷ. Tuy nhiên, phức hợp theo sáng chế trong đó protein đime và polypeptit được liên hợp qua polyme phi peptit làm tăng cả độ ổn định cấu trúc và thời gian bán thanh thải của thuốc. Sự giảm hoạt tính sinh học của polypeptit vì liên hợp với protein đime này là rất không đáng kể, so với sự giảm trong phức hợp thông thường. Do đó, phức hợp của polypeptit và miền Fc của globulin miễn dịch theo sáng chế đặc trưng ở chỗ có độ sinh khả dụng được cải thiện đáng kể, so với độ sinh khả dụng của tác nhân là thuốc polypeptit thông thường.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp tạo ra phức hợp protein trong đó miền Fc của Ig được liên hợp với polypeptit có hoạt tính sinh lý thông qua polyme phi peptit có 3 nhánh, bao gồm các bước: (1) tạo liên kết cộng hoá trị hai nhánh của polyme phi peptit 3 nhánh với các nhóm amino ở đầu tận cùng N đối diện của miền Fc của Ig để tạo ra thể liên hợp (2) tách thể liên hợp trong đó miền Fc của Ig được liên kết cộng hoá trị ở đầu tận cùng N của nó với polyme phi peptit ra khỏi hỗn hợp phản ứng ở bước (1) và (3) tạo liên kết cộng hoá trị giữa polypeptit có hoạt tính sinh lý với nhánh tự do của polyme phi peptit trong thể liên hợp được tách ra.

Theo một phương án được ưu tiên khác, ba nhánh của polyme phi peptit này ở bước (1) có các nhóm chức alđehyt tương ứng ở đầu tận cùng của nó. Tốt hơn nữa nếu, polyme phi peptit này được liên kết với nhóm amino ở đầu tận cùng N của polypeptit có hoạt tính sinh lý ở độ pH 6,0.

Trong bước (1), miền Fc của Ig được cho phản ứng với tỷ số mol nằm trong khoảng từ 1:2 đến 1:5 so với polyme phi peptit này. Trong bước (3), tốt hơn nếu tỷ số mol của thể liên hợp được phân lập ở bước (2): polypeptit có hoạt tính sinh lý nằm trong khoảng từ 1: 0,5 đến 1: 0,05.

Các phản ứng ở các bước (1) và (3) tuỳ thuộc vào ba nhóm đầu tận cùng của polyme phi peptit này. Nếu cần, có thể thực hiện các phản ứng với sự có mặt của tác nhân khử. Ví dụ được ưu tiên về tác nhân khử bao gồm natri xyanobohyđrua ($NaCNBH_3$), natri bohyđrua, đimetylamin borat và pyriđin borat.

Mối liên kết giữa miền Fc của globulin miễn dịch và polypeptit có hoạt tính sinh lý được thực hiện không phải do dung hợp dựa trên tái tổ hợp di truyền, mà là thông qua liên kết cộng hoá trị.

Theo một khía cạnh nữa, sáng chế đề xuất dược phẩm chứa phức hợp protein theo sáng chế và chất mang dược dụng, mà thể hiện cải thiện về tính chống chịu in-vivo của polypeptit có hoạt tính sinh lý.

Dược phẩm theo sáng chế phải được đưa vào mô hoặc cơ quan quan tâm qua đường dùng thích hợp. Có thể sử dụng đường dùng bất kỳ để cấp dược phẩm theo sáng chế miễn là phân phối được dược phẩm đến mô đích. Ví dụ, có thể tiến hành cấp qua đường màng bụng, trong tĩnh mạch, qua cơ, dưới da, trong da, qua đường miệng, cấp khu trú, qua đường mũi, trong phổi, và trong trực tràng, nhưng không chỉ giới hạn ở các đường dùng này. Tốt hơn, nếu sử dụng dược phẩm sáng chế ở dạng tiêm. Ngoài ra, có thể cấp dược phẩm nhờ thiết bị mà qua đó hoạt chất được phân phối đến tế bào hướng đích.

Dược phẩm trên cơ sở phức hợp theo sáng chế có thể chứa thêm chất mang dược dụng. Có thể chọn tá dược dính, tá dược trơn, tá dược rã, tá dược, chất hoà tan, chất phân tán, chất làm ổn định, chất làm ổn định huyền phù, chất màu, và/hoặc mảnh làm chất mang dược dụng cho dạng phân liều dùng qua đường miệng. Khi dược phẩm theo sáng chế này được chế hoá thành dạng thuốc tiêm, có thể sử dụng dung dịch đệm, chất bảo quản, chất giảm đau, chất hoà tan, chất đẳng trương, và chất làm ổn định, ở dạng đơn lẻ hoặc kết hợp. Đối với ứng dụng khu trú, có thể sử dụng chất nền, tá dược, tá dược trơn, và chất bảo quản. Đối với mỗi ứng dụng trên thực tế, có thể chế hoá dược phẩm theo sáng chế kết hợp với chất mang dược dụng thành các dạng phân liều khác nhau. Liên quan đến dạng phân liều, ví dụ, có thể chế hoá thành viên nén, phiến thuốc hình thoi, viên nang, cồn thuốc ngọt, hỗn dịch, xi rô, bánh xốp thuốc, v.v.. Liên quan đến chế phẩm tiêm, chế phẩm này có thể ở dạng ống thuốc tiêm đơn liều hoặc nhiều liều. Các dạng có thể áp dụng khác bao gồm dung dịch, hỗn dịch, viên thuốc tròn, bột,

viên nang, và thuốc giải phóng kéo dài. Ví dụ về chất mang, tá dược và tá dược độn hữu ích dùng cho chế phẩm này bao gồm lactoza, d-lactoza, đextroza, sucroza, sorbitol, manitol, xylitol, erytritol, maltitol, tinh bột, gôm acacia, alginat, gelatin, canxi phosphat, canxi silicat, xenluloza, metyl xenluloza, xenluloza vô định hình, polyvinyl pyroliđon, nước, metylhyđroxybenzoat, propylhyđroxybenzoat, bột đá tan, magie stearat và dầu khoáng. Ngoài ra, cũng có lợi nếu dùng chất độn, tác nhân chống đông tụ, tá dược trơn, chất tạo hương, chất nhũ hoá, và chất bảo quản.

Lượng có hiệu dược dụng của phức hợp protein theo sáng chế thay đổi tuỳ thuộc vào dạng bệnh cần được điều trị, đường dùng và tần số cấp, tuổi tác, giới tính và thể trọng của bệnh nhân, và mức độ nghiêm trọng của bệnh, cũng như dạng polypeptit có hoạt tính sinh lý. Do phức hợp protein có đặc tính tốt về thời gian tồn tại in vivo và hiệu giá nên nó làm giảm liều lượng dùng và tần số dùng dược phẩm theo sáng chế.

Theo như được bộc lộ trong các Patent Hàn quốc số 10-0725315 và 10-0775343, đề xuất phức hợp protein trong đó miền ổn định của globulin miễn dịch và polypeptit có hoạt tính sinh lý lần lượt được liên kết với đầu tận cùng đối xứng của polyme phi peptit. Phức hợp protein này được điều chế bằng cách cho polyme phi peptit này liên kết với polypeptit có hoạt tính sinh lý để tạo ra thể liên hợp và sau đó liên kết với Fc globulin miễn dịch. Quá trình điều chế này có nhược điểm ở chỗ tổn thất một lượng lớn polypeptit có hoạt tính sinh lý trong khi điều chế. Ngược lại, khác biệt là việc sử dụng polyme phi peptit 3 nhánh để điều chế phức hợp protein có thể làm giảm tổn thất polypeptit có hoạt tính sinh lý. Ngoài ra, có thể phân tách phức hợp protein bằng phương pháp tinh chế đơn giản.

Có thể đạt được đến hiểu biết tốt hơn sáng chế sau đây bằng cách tham khảo các Ví dụ thực hiện sáng chế mà được đưa ra nhằm mục đích minh hoạ, nhưng không phải là nhằm giới hạn phạm vi sáng chế.

**Ví dụ thực hiện sáng chế**

Ví dụ 1: Điều chế phức hợp Fc globulin miễn dịch-PEG 3 nhánh-octreotit (N)

Để PEG hoá Fc của globulin miễn dịch ở đầu tận cùng N, cho 10 mg/ml Fc globulin miễn dịch phản ứng với PEG 5K PropionALD(3) (PEG với ba nhóm propionalđehyt, NOF, Japan) với tỷ số mol 1:2 ở nhiệt độ 4°C trong thời gian 4,5 giờ. Tiến hành phản ứng trong dung dịch đệm kali phosphat 100 mM, pH 6,0, với sự có

mặt của 20 mM SCB ($NaCNBH_3$) làm tác nhân khử. Tinh chế Fc globulin miễn dịch được pegyl hoá một lần ra khỏi hỗn hợp phản ứng này bằng cách sử dụng SOURCE Q (XK 16ml, GE Healthcare). Sau đó, cho octreotit phản ứng với thể liên hợp Fc globulin miễn dịch-PEG 5K theo tỷ số mol 1:2 ở nhiệt độ 4°C trong thời gian 20 giờ, với tổng nồng độ protein được thiết lập ở mức 25mg/ml. Thực hiện phản ứng liên hợp này trong 100mM kali phosphat, pH 6,0, với sự có mặt của tác nhân khử 20mM SCB. tinh chế hỗn hợp phản ứng liên hợp này qua cột tinh chế SP HP. Sử dụng dung dịch đệm natri phosphat 10 mM (pH 5,4) làm dung dịch đệm gắn kết, thể liên hợp Fc globulin miễn dịch-PEG 5K không thực hiện phản ứng liên hợp không gắn với cột SP HP (XK 16 ml, GE Healthcare), mà được tách ra khi nạp qua cột, trong khi đó globulin miễn dịch-PEG-octreotit (HM11760B) được liên kết nhẹ với cột và sau đó rửa giải bằng gradient muối 1M NaCl.

Cột: SP HP (XK 16 ml, GE Healthcare)

Vận tốc dòng chảy: 2,0 ml/phút

Gradient: A 0 → 20% 60 phút B (A: 10mM Na-P pH5,4, B: A + 1M NaCl )

Ví dụ 2: Điều chế phức hợp Fc globulin miễn dịch-PEG 3 nhánh-calcitonin(N)

Cho Fc globulin miễn dịch phản ứng ở đầu tận cùng N với PEG 5K PropionALD(3) theo cùng cách thức như ở ví dụ 1, sau đó chỉ Fc globulin miễn dịch được pegyl hoá một lần được tinh chế và liên hợp với calcitonin. Liên quan đến phản ứng này, cho calcitonin cho phản ứng với thể liên hợp Fc globulin miễn dịch-PEG 5K với tỷ số mol 1:2 ở nhiệt độ 4°C trong thời gian 20 giờ, với tổng nồng độ protein được thiết lập ở mức 25mg/ml. Bổ sung 100 mM dung dịch đệm kali phosphat, pH 6,0, cùng với tác nhân khử 20 mM SCB ($NaCNBH_3$) để dùng làm môi trường trong phản ứng liên hợp này. Tinh chế hỗn hợp phản ứng liên hợp này uqa cột tinh chế SP HP. Trước hết, dùng cột SP HP (XK 16ml, GE Healthcare) để tách loại thể liên hợp Fc globulin miễn dịch-PEG 5K vẫn không liên hợp với calcitonin. Sử dụng dung dịch đệm natri phosphat 10 mM (pH 5,4) làm dung dịch đệm gắn kết, thể liên hợp Fc globulin miễn dịch-PEG 5K không thực hiện phản ứng liên hợp không gắn với cột SP HP (XK 16 ml, GE Healthcare), nhưng được tách ra khi nạp qua cột này, trong khi đó globulin miễn dịch-PEG-calcitonin được liên kết nhẹ với cột này và sau đó rửa giải bằng gradient muối 1M NaCl.

Cột: SP HP (XK16ml, GE Healthcare)

Vận tốc dòng chảy: 2,0 ml/phút

Građient: A 0 → 20% 60 phút B (A: 10mM Na-P pH5,4, B: A + 1M NaCl )

Ví dụ 3: So sánh hiệu suất sản xuất và tính đơn giản của quá trình tinh chế giữa phức hợp PEG 3 nhánh (ví dụ 1 và 2) và phức hợp PEG 2 nhánh

So sánh hiệu suất sản xuất của phức hợp PEG 3 nhánh và phức hợp PEG 2 nhánh bằng cách sử dụng phức hợp Fc globulin miễn dịch-PEG 3 nhánh-Octreotit (N) và phức hợp Fc globulin miễn dịch-PEG 3 nhánh-Calcitonin(N) được điều chế lần lượt ở ví dụ 1 và 2 (bảng 1).

Điều chế phức hợp PEG hai nhánh như là chất đối chứng bằng cách gắn kết Octreotit hoặc Calcitonin như là polypeptit có hoạt tính sinh lý với Fc globulin miễn dịch thông qua PEG 2 nhánh (PEG với hai nhóm propionalđehyt, IDB, South Korea) như là mối liên kết. Cụ thể là, liên hợp PEG có hai nhánh với octreotit hoặc calcitoninand sau đó với miền Fc của globulin miễn dịch thông qua liên kết cộng hoá trị (KR10-0725315).

Bảng 10

| Thành phần hoạt tính dược (API) | dạng PEG | Hiệu suất sản xuất (trên cơ sở API) |
|---|---|---|
| Octreotit | 2 nhánh | 9% |
| | 3 nhánh | 33% |
| Calcitonin | 2 nhánh | 18% |
| | 3 nhánh | 30% |

Phân tích các quy trình tinh chế phức hợp từ hỗn hợp phản ứng liên hợp về tính đơn giản và kích cỡ cột sơ cấp và tổng kết các kết quả trong Bảng 2, sau đây.

Bảng 2

| API | Dạng PEG | Quá trình tinh chế | Kích cỡ cột sơ cấp |
|---|---|---|---|
| Octreotit | 2 nhánh | Nguồn Q -> Nguồn ISO | 5 |
| | 3 nhánh | SP HP | 1 |
| Calcitonin | 2 nhánh | Nguồn Q -> Nguồn ISO | 4 |
| | 3 nhánh | SP HP | 1 |

Khi sử dụng phức hợp PEG 2 nhánh, toàn bộ Fc globulin miễn dịch vẫn không liên hợp được gắn với cột giúp tách riêng Fc này với Fc globulin miễn dịch-PEG 2 nhánh-Octreotit hoặc Fc globulin miễn dịch-PEG 2 nhánh-Calcitonin. Ngược lại, khi sử dụng phức hợp PEG 3 nhánh, việc tách giữa thể liên hợp Fc globulin miễn dịch-PEG 5K vẫn không liên hợp với polypeptit có hoạt tính sinh lý và Fc globulin miễn dịch-PEG 3 nhánh-octreotit hoặc Fc globulin miễn dịch-PEG 3 nhánh-calcitonin được thực hiện sao cho thể liên hợp Fc globulin miễn dịch-PEG 5K được loại ra khi nạp qua cột này trong khi đó Fc globulin miễn dịch-PEG 3 nhánh-octreotit hoặc Fc globulin miễn dịch-PEG 3 nhánh-calcitonin vẫn gắn với cột này. Do đó, không chỉ giảm quá trình tinh chế từ hai bước còn một bước, mà còn làm giảm kích cỡ cột còn 1/5 lần.

Ví dụ 4: Điều chế phức hợp Fc globulin miễn dịch-PEG 3 nhánh-FSH(N)

Cho Fc globulin miễn dịch phản ứng ở đầu tận cùng N với PEG 5K PropionALD(3) theo cùng cách thức như ở ví dụ 1, sau chỉ Fc globulin miễn dịch được pegyl hoá một lần được tinh chế và được cho liên hợp với FSH. Liên quan đến phản ứng này, FSH được cho phản ứng với thể liên hợp Fc globulin miễn dịch-PEG 5K với tỷ số mol 1:15 ở nhiệt độ 4°C trong thời gian 20 giờ, với tổng nồng độ protein được thiết lập ở mức 40 mg/ml. Để dùng làm môi trường trong phản ứng liên hợp này, bổ sung 100 mM dung dịch đệm kali phosphat, pH 6,0, với tác nhân khử 20 mM SCB. Tinh chế hỗn hợp phản ứng liên hợp qua hai cột tinh chế. Trước hết, dùng cột Blue HP (Hitrap 5ml, GE Healthcare) để tách loại thể liên hợp Fc globulin miễn dịch-PEG 5K vẫn không liên hợp với FSH. Sau đó, đa polyme trong đó hai hoặc nhiều thể liên hợp Fc globulin miễn dịch-PEG 5K được liên hợp với FSH được loại ra qua Resource Iso (1 ml, GE Healthcare) dựa trên tính kỵ nước.

Cột: Blue HP (Hitrap 5ml, GE Healthcare)

Vận tốc dòng chảy: 3,0 ml/phút

Gradient: A 0 → 100% 20 phút B

A: 50mM Gly-NaOH + 0,2M KCl

B: 50mM Gly-NaOH + 2,5M KCl

Cột: Nguồn ISO (1ml, GE Healthcare)

A 0 → 100% 90min B (A: 20mM Tris pH 7,5, B: A + 1,3M A.S )

Ví dụ 5: Điều chế phức hợp Fc globulin miễn dịch-PEG 3 nhánh-insulin(N)

Để PEG hoá Fc globulin miễn dịch ở đầu tận cùng N, cho 10 mg/ml Fc globulin miễn dịch phản ứng với 5K PEG PropionALD(3) PEG (PEG với ba nhóm propionalđehyt, NOF, Japan) với tỷ số mol 1:2 ở nhiệt độ 4°C trong thời gian 4,5 giờ. Thực hiện phản ứng này trong 100 mM dung dịch đệm kali phosphat, pH 6,0, với sự có mặt của 20 mM SCB ($NaCNBH_3$) làm tác nhân khử. Bằng cách sử dụng SOURCE Q (LRC25 85 ml, GE Healthcare), tinh chế Fc globulin miễn dịch được pegyl hoá một lần ra khỏi hỗn hợp phản ứng này. Sau đó, cho insulin phản ứng với thể liên hợp Fc globulin miễn dịch-PEG 5K với tỷ số mol 1:4 ở nhiệt độ 4°C trong thời gian 19,5 giờ. Để dùng làm môi trường cho phản ứng liên hợp này, bổ sung 100 mM dung dịch đệm

kali phosphat, pH 6,0, với tác nhân khử 20 mM SCB. Tinh chế hỗn hợp phản ứng liên hợp này qua hai cột tinh chế. Trước hết, dùng cột SOURCE Q (LRC25 85 ml, GE Healthcare) để tách loại thể liên hợp Fc globulin miễn dịch-PEG 5K vẫn không liên hợp với insulin. Dùng građient muối 1 M NaCl trong 20 mM Tris (pH7,5) cho phép thể liên hợp Fc globulin miễn dịch-PEG 5K được rửa giải ra trước tiên do lực gắn kết tương đối yếu, ngay sau đó là giải hấp Fc globulin miễn dịch-PEG-insulin. Qua quá trình tinh chế sơ bộ này, tách ra được thể liên hợp Fc globulin miễn dịch-PEG 5K , nhưng không tách riêng được hoàn toàn đa polyme Fc-PEG 5K và insulin. Do đó, tiến hành bước tinh chế thứ hai tiếp theo dựa trên sự khác biệt phân tử lượng giữa phức hợp và đa polyme bằng cách sử dụng cột Sephacryl S-300 (GE Healthcare). Đồng thời, chế hoá phức hợp Fc globulin miễn dịch-PEG-Insulin. Đa polyme của Fc globulin miễn dịch-PEG 5K và insulin có phân tử lượng được rửa giải trước tiên, sau đó là phức hợp Fc globulin miễn dịch-PEG-insulin.

Cột: Nguồn Q (LRC25 85ml, GE Healthcare)

Vận tốc dòng chảy: 8,0ml/phút

Građient: A 0 → 25% 100min B (A: 20mM Tris pH7,5, B: A + 1M NaCl)

Cột: Sephacryl S-300 (HiPrep 120ml, GE Healthcare)

Vận tốc dòng chảy: 0,6ml/phút

Ví dụ 6: So sánh hiệu suất sản xuất giữa phức hợp PEG 3 nhánh (ví dụ 4 và 5) và phức hợp PEG 2 nhánh

Tiến hành so sánh hiệu suất sản xuất phức hợp PEG 3 nhánh và phức hợp PEG 2 nhánh bằng cách sử dụng phức hợp Fc globulin miễn dịch-PEG 3 nhánh-FSH(N) và phức hợp Fc globulin miễn dịch-PEG 3 nhánh-insulin(N) lần lượt được điều chế từ ví dụ 4 và 5, (bảng 3).

Khi sử dụng quy trình điều chế thông thường dùng PEG 2 nhánh, đime polypeptit có hoạt tính sinh lý, chẳng hạn như FSH (phân tử lượng vào khoảng 40.000Da) và insulin (phân tử lượng 5,807), chiếm giữ cả hai đầu tận cùng polyme phi peptit sao cho polyme không thể tạo thành liên kết cộng hoá trị với miền Fc của globulin miễn dịch tồn tại in vivo. Hiện tượng này là dễ thấy hơn với đime polypeptit có hoạt tính sinh lý có phân tử lượng nhỏ như insulin.

Theo đó, tốt hơn nếu điều chế phức hợp protein tồn tại với đime polypeptit có hoạt tính sinh lý bằng cách sử dụng PEG 3 nhánh

Sự khác nhau về hiệu suất sản xuất của FSH và Insulin theo quy trình điều chế sử dụng PEG 2 nhánh và PEG 3 nhánh được tổng kết trong Bảng 3, sau đây.

Bảng 3

| Thành phần hoạt tính dược (API) | dạng PEG | Hiệu suất sản xuất (trên cơ sở API) |
|---|---|---|
| FSH | PEG 2 nhánh | 10% |
| | PEG 3 nhánh | 32% |
| Insulin | PEG 2 nhánh | 3% |
| | PEG 3 nhánh | 27% |

Ví dụ 7: Điều chế phức hợp Fc globulin miễn dịch-PEG-FacVIIa(N)

Để PEG hoá Fc globulin miễn dịch ở đầu tận cùng N, cho 6 mg/ml Fc globulin miễn dịch phản ứng với PEG 5K PropionALD(3) (PEG có ba nhóm propionalđehyt, NOF, Japan) với tỷ số mol 1:2 ở nhiệt độ 4°C trong thời gian 4,5 giờ. Thực hiện phản ứng này trong 100 mM dung dịch đệm kali phosphat, pH 6,0, với sự có mặt của 20 mM SCB ($NaCNBH_3$) làm tác nhân khử. Nhờ sử dụng SOURCE Q (LRC25 85 ml, GE Healthcare), tinh chế được Fc globulin miễn dịch được pegyl hoá một lần từ hỗn hợp phản ứng này. Sau đó, cho FVIIa phản ứng với thể liên hợp Fc globulin miễn dịch-PEG 5K với tỷ số mol 1:9 ở nhiệt độ 4°C trong thời gian 18 giờ, với tổng nồng độ protein được thiết lập ở mức 20 mg/ml. Để dùng làm môi trường cho phản ứng liên hợp này, bổ sung 100 mM dung dịch đệm kali phosphat, pH 6,0, cùng với tác nhân khử này 20 mM SCB. Tinh chế hỗn hợp phản ứng liên hợp này qua hai cột tinh chế. Trước hết, dùng cột SOURCE Q (LRC25 85 ml, GE Healthcare) để tách loại thể liên hợp Fc globulin miễn dịch-PEG 5K vẫn không liên hợp với FVIIa. Dùng građient muối 1 M NaCl trong 20 mM Tris (pH7,5) cho phép thể liên hợp Fc globulin miễn dịch-PEG 5K được rửa giải ra trước tiên do lực liên kết tương đối yếu, ngay sau đó là sự giải hấp Fc globulin miễn dịch-PEG 3 nhánh-FVIIa. Sau đó, thực hiện bước tinh chế thứ hai tiếp theo để tách riêng Fc globulin miễn dịch-PEG 3 nhánh-FVIIa ra khỏi

các tạp chất multime FVIIa bằng cách sử dụng cột RESOURCE ISO (GE Healthcare). Fc globulin miễn dịch-PEG 3 nhánh-FVIIa được rửa giải trước tiến, sau đó là các tạp chất multime FVIIa.

Cột: Nguồn Q (LRC25 85ml, GE Healthcare)

Vận tốc dòng chảy: 4 ml/phút

Građient: A 0 → 7% 1 phút B, 7% 37% 80 min B (A: 20 mM Tris pH7,5, B: A + 1M NaCl)

Cột: RESOURCE ISO (Pre-packed 1ml, GE Healthcare)

Vận tốc dòng chảy: 2 ml/phút

Građient: B 100 0% 60 phút A (A: 20 mM Tris pH7,5, B: A + 1,6 M $(NH_4)_2SO_4$)

Bảng 4

| Thành phần hoạt tính dược (API) | Dạng PEG | Hiệu suất sản xuất (trên cơ sở API) |
|---|---|---|
| FacVIIa | PEG 2 nhánh | Không được điều chế |
| | PEG 3 nhánh | Khoảng trê 3% |

Ví dụ 8: Thử nghiệm in-vivo của phức hợp Fc globulin miễn dịch-PEG 3 nhánh-Octreotit(N)

Thử nghiệm đánh giá tác dụng của Fc globulin miễn dịch-PEG 3 nhánh-Octreotit (N) đến thể trọng và lượng IGF-l ở chuột cống SD được cấp dưới da chất này. Octreotit là chất có tác dụng ức chế hormon sinh trưởng, và chủ yếu được dùng để điều trị bệnh to cực. Thuốc này có thể mua trên thị trường từ Novatis ở hai dạng: Sandostatin, phiên bản tác dụng ngắn; và Sandostatin-LAR, phiên bản tác dụng trong thời gian dài. Đến nay, cho rằng bệnh to cực là hội chứng do sự tăng sản xuất hormon sinh trưởng ở người (hGH). Trong các thử nghiệm in-vivo của octreotit, chuột cống khi được tiêm dưới da chất này được theo dõi về thể trọng và lượng IGF-1 để kiểm tra tác dụng của chất này đến sự ức chế tiết GH. Tương tự, Fc globulin miễn dịch-PEG 3 nhánh-Octreotit (N) được thử nghiệm in vivo về các thay đổi thể trọng và lượng IGF-1 ở chuột cống. Cấp đơn liều Fc globulin miễn dịch-PEG 3 nhánh-Octreotit(N) là 0,5,

1,0, và 2,0 mg/kg còn Sandostatin-LAR như là mẫu đối chứng được cấp đơn liều 1,0 và 2,0 mg/kg, sau đó theo dõi các chuột cống này về thể trọng và lượng IGF-1 trong thời gian hai tuần. Cả hai chất liệu thí nghiệm được cấp dưới da.

So với nhóm được cấp tá dược, nhận thấy là các nhóm Sandostatin-LAR gây giảm thể trọng vào khoảng 3,7% khi được dùng với liều lượng 1,0mg/kg và khoảng 8,9% khi được dùng với liều lượng 2,0 mg/kg. Mặc khác, các nhóm Fc globulin miễn dịch-PEG 3 nhánh-Octreotit(N) làm giảm thể trọng vào khoảng 44,3% khi cấp 0,5mg/kg, vào khoảng 40,1% khi cấp 1,0 mg/kg và vào khoảng 55,1% khi cấp 2,0 mg/kg.

Phân tích định lượng thay đổi IGF-1 ở chuột cống sử dụng bộ kit ELISA xác định IGF-1 ở chuột cống. So với nhóm dùng tá dược, lượng IGF-1 trong máu phát hiện được giảm khoảng 15% với Sandostatin 1,0 mg/kg và giảm khoảng 11% với Sandostatin 2,0 mg/kg dựa trên AUC của lượng IGF-1 trong máu. Trong khi đó, các nhóm Fc globulin miễn dịch-PEG 3 nhánh-Octreotit(N) làm giảm lượng IGF-1 trong máu vào khoảng 23% với liều lượng 0,5 mg/kg, giảm khoảng 18% với liều lượng 1,0 mg/kg, và giảm khoảng 25% với liều lượng 2,0 mg/kg [FIG. 2].

Các số liệu thử nghiệm in-vivo cho thấy rằng Fc globulin miễn dịch-PEG 3 nhánh-Octreotit(N) có hoạt tính công hiệu hơn Sandostatin-LAR, là chế phẩm có tác dụng kéo dài octreotit.

Ví dụ 9: Thử nghiệm in-vivo của phức hợp Fc globulin miễn dịch-PEG 3 nhánh-FSH(N)

Thực hiện thử nghiệm in-vivo về Fc globulin miễn dịch-PEG 3 nhánh-FSH(N) theo phương pháp Steelman-Pohley (Endocrinology 53, 504-616). Sử dụng các con chuột cống cái chưa trưởng thành SD (21 ngày tuổi) cho thử nghiệm in vivo Fc globulin miễn dịch-PEG 3 nhánh-FSH(N). Cấp Fc globulin miễn dịch-PEG 3 nhánh-FSH(N) theo các đơn liều 0,018, 0,075, và 0,3 µg/chuột cống còn Follitrope, dạng nguyên thể có sẵn trên thị trường của FSH, được dùng làm mẫu đối chứng ở liều lượng 4, 2 và 1 IU/chuột cống một lần mỗi ngày trong ba ngày. Tá dược và các chất liệu thí nghiệm được cấp phối hợp với hCG (gonadotropin màng đệm người) ở liều 13,3 U/chuột cống. Mỗi chất liệu thí nghiệm được cấp dưới da với một lượng 0,25 ml/kg. 72 giờ sau sau lần cấp đầu tiên các chất liệu thí nghiệm, các con chuột này được

xử lý làm chết nhẹ nhàng và được cắt buồng trứng. Cân nặng buồng trứng được cắt ra theo cách đó.

Như được thể hiện trên Fig. 3, Fc globulin miễn dịch-PEG 3 nhánh-FSH(N) cho hoạt tính in vivo theo cách thức phụ thuộc liều lượng, với tác dụng tương tự như Fc globulin miễn dịch-PEG 2 nhánh-FSH(N).

## YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phức hợp protein chứa polypeptit có hoạt tính sinh lý, miền Fc của globulin miễn dịch và polyme phi peptit có ba đầu mút chức năng, trong đó hai đầu chức của polyme phi peptit được liên kết cộng hoá trị với hai nhóm amino đầu tận cùng N của miền Fc của globulin miễn dịch và đầu mút chức năng thứ ba được liên kết cộng hoá trị với polypeptit có hoạt tính sinh lý.

2. Phức hợp protein theo điểm 1, trong đó miền Fc của globulin miễn dịch này là không được glycosyl hoá.

3. Phức hợp protein theo điểm 1, trong đó miền Fc của globulin miễn dịch này bao gồm một đến bốn miền khác nhau được chọn trong số $C_H1$, $C_H2$, $C_H3$ và $C_H4$.

4. Phức hợp protein theo điểm 3, trong đó miền Fc của globulin miễn dịch này còn chứa vùng bản lề.

5. Phức hợp protein theo điểm 1, trong đó miền Fc của globulin miễn dịch này được chọn từ nhóm bao gồm miền Fc của IgG, IgA, IgD, IgE, IgM, dạng kết hợp và thể lai của chúng.

6. Phức hợp protein theo điểm 5, trong đó miền Fc của globulin miễn dịch này được chọn từ nhóm bao gồm miền Fc của IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, dạng kết hợp và thể lai của chúng.

7. Phức hợp protein theo điểm 5, trong đó miền Fc của globulin miễn dịch này ở dạng đime hoặc multime là tổ hợp Fc globulin miễn dịch, mỗi dạng chứa globulin miễn dịch được glycosyl hoá bao gồm các miền có cùng nguồn gốc.

8. Phức hợp protein theo điểm 5, trong đó miền Fc của globulin miễn dịch này là miền Fc của IgG4.

9. Phức hợp protein theo điểm 8, trong đó miền Fc của globulin miễn dịch này là miền Fc của IgG4 không được glycosyl hoá của người.

10. Phức hợp protein theo điểm 1, trong đó polyme phi peptit được chọn từ nhóm bao gồm polyetylen glycol, polypropylen glycol, copolyme của etylen glycol và propylen glycol, polyol được polyoxyetyl hoá, rượu polyvinyl, polysacarit, đextran, polyvinyl etyl ete, polyme phân huỷ sinh học chẳng hạn như axit polylactic (PLA) và axit

polylactic-glycolic (PLGA), polyme phân huỷ sinh học, lipopolyme, chitin, axit hyaluronic và kết hợp của chúng.

11. Phức hợp protein theo điểm 10, trong đó polyme phi peptit này là polyetylen glycol.

12. Phức hợp protein theo điểm 1, trong đó polyme phi peptit này có nhóm chức đầu tận cùng được chọn trong số các nhóm alđehyt, nhóm propionalđehyt, nhóm butyl alđehyt, nhóm maleimit và các dẫn xuất suxinimit.

13. Phức hợp protein theo điểm 12, trong đó polyme phi peptit này có ba nhóm chức alđehyt ở đầu tận cùng của mình.

14. Phức hợp protein theo điểm 1, trong đó ba đầu chức của polyme phi peptit này gắn kết với nhóm chức đầu tận cùng N của miền Fc của globulin miễn dịch và polypeptit có hoạt tính sinh lý, các nhóm chức đầu tận cùng N nêu trên được chọn từ nhóm bao gồm các gốc lysin, histiđin, xystein và kết hợp của chúng.

15. Phức hợp protein theo điểm 1, trong đó polypeptit có hoạt tính sinh lý được chọn từ nhóm bao gồm các hormon, xytokin, interleukin, protein gắn kết với interleukin, enzym, kháng thể, yếu tố sinh trưởng, yếu tố phiên mã, nhân tố máu, vacxin, protein cấu trúc, protein phối tử, thụ thể, kháng nguyên bề mặt tế bào, chất đối kháng thụ thể, và các dẫn xuất hoặc các chất tương tự của chúng.

16. Phức hợp protein theo điểm 15, trong đó polypeptit có hoạt tính sinh lý được chọn từ nhóm bao gồm các hormon sinh trưởng ở người, hormon giải phóng hormon sinh trưởng, peptit giải phóng hormon sinh trưởng, interferon và thụ thể interferon, yếu tố kích thích khuẩn lạc, peptit giống glucagon, peptit exendin-4, ANP, BNP, CNP, DNP, thụ thể hoạt động gắn với protein G, interleukin và thụ thể interleukin, enzym, protein gắn kết với interleukin, protein gắn kết với xytokin, yếu tố hoạt hoá đại thực bào, peptit đại thực bào, yếu tố tế bào B, yếu tố tế bào T, Protein A, chất ức chế dị ứng, glycoprotein hoại tử tế bào, độc tố miễn dịch, độc tố lympho bào, yếu tố hoại tử u, chất ức chế khối u, yếu tố tăng trưởng chuyển dạng, kháng trypsin alpha-1, albumin, α-lactalbumin, apolipoprotein-E, erythropoietin, erythropoietin được glycosyl hoá ở mức cao, angiopoeitin, hemoglobin, thrombin, peptit hoạt hoá thụ thể thrombin, thrombomodulin, nhân tố máu VII, VIIa, VIII, IX và XIII, chất hoạt hoá plasminogen, peptit gắn kết fibrin, urokinaza, streptokinaza, hirudin, Protein C, protein C phản ứng,

chất ức chế renin, chất ức chế colagenaza, superoxit đismutaza, leptin, yếu tố tăng trưởng có nguồn gốc từ tiểu cầu, yếu tố tăng trưởng biểu mô, yếu tố tăng trưởng biểu bì, angiostatin, angiotensin, yếu tố tăng trưởng xương, protein kích thích xương, calcitonin, insulin, somatostatin, octreotit là chất chủ vận somatostatin, atriopeptin, yếu tố cảm ứng sụn, elcatonin, yếu tố hoạt hoá mô liên kết, chất ức chế thông nối yếu tố mô (*tissue factor pathway inhibitor*: TFPI), hormon kích thích bao nang phát triển (*follicle stimulating hormone*: FSH), hormon tạo hoàng thể (*luteinizing hormone*: LH), hormon giải phóng hormon tạo hoàng thể (*luteinizing hormone releasing hormone*: LHRH), yếu tố tăng trưởng thần kinh, hormon cận giáp, relaxin, secretin, somatomedin, yếu tố tăng trưởng tương tự insulin, hormon vỏ trên thận, glucagon, cholecystokinin, polypeptit tuỵ, peptit giải phóng gastrin, tác nhân tiết corticotropin, hormon kích thích tuyến giáp, autotaxin, lactoferrin, myostatin, thụ thể, chất đối kháng thụ thể, kháng nguyên bề mặt tế bào, kháng nguyên vacxin có nguồn gốc virut, kháng thể đơn dòng, kháng thể đa dòng, mảnh kháng thể.

17. Phức hợp protein theo điểm 16, trong đó polypeptit có hoạt tính sinh lý chọn từ nhóm bao gồm hormon sinh trưởng ở người, interferon-alpha, interferon-beta, yếu tố kích thích khuẩn lạc bạch cầu hạt, erythropoietin, exendin-4, peptit imiđazol axetyl exendin-4 là chất chủ vận exendin-4, calcitonin, octreotit là chất chủ vận somatostatin, BNP và mảnh Fab'.

18. Phương pháp điều chế phức hợp protein bao gồm polypeptit có hoạt tính sinh lý, miền Fc của globulin miễn dịch và polyme phi peptit có ba đầu có chức, có sự liên kết giữa cả polypeptit có hoạt tính sinh lý và miền Fc của globulin miễn dịch với polyme phi peptit thông qua các liên kết cộng hoá trị tương ứng, bao gồm các bước:

(1) tạo liên kết cộng hoá trị giữa hai đầu chức của polyme phi peptit với các nhóm amino đối xứng ở đầu tận cùng N của miền Fc của globulin miễn dịch để tạo ra thể liên hợp;

(2) tách ra khỏi hỗn hợp phản ứng ở bước (1) thể liên hợp mà trong đó miền Fc của globulin miễn dịch được liên kết cộng hoá trị ở đầu tận cùng N của nó với polyme phi peptit; và

(3) tạo liên kết cộng hoá trị giữa polypeptit có hoạt tính sinh lý với một đầu chức tự do của polyme phi peptit của thể liên hợp được tách ra.

19. Phương pháp theo điểm 18, trong đó polyme phi peptit này có ba nhóm chức alđehyt ở đầu tận cùng tương ứng của chúng.

20. Phương pháp theo điểm 18, trong đó trong bước (1), miền Fc của globulin miễn dịch được cho phản ứng với polyme phi peptit với tỷ số mol nằm trong khoảng từ 1:2 đến 1:5.

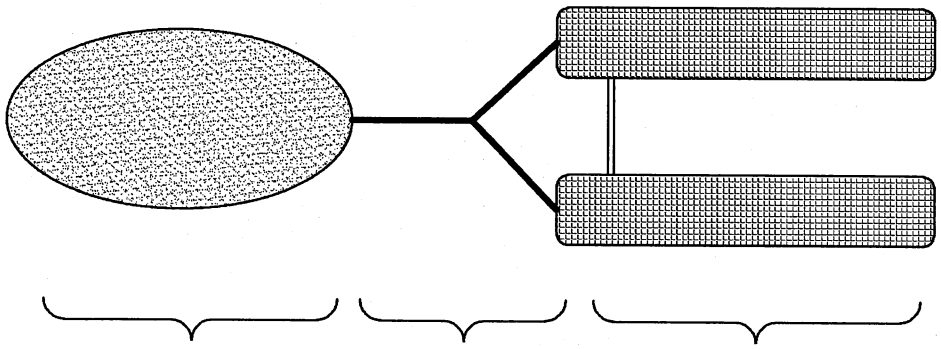
21. Phương pháp theo điểm 18, trong đó trong bước (3) thể liên hợp được cho phản ứng với polypeptit có hoạt tính sinh lý với tỷ số mol nằm trong khoảng từ 1:0,5 đến 1:0,05.

22. Phương pháp theo điểm 18, trong đó ở cả hai bước (1) và (3), các phản ứng được thực hiện với sự có mặt của tác nhân khử.

23. Phương pháp theo điểm 22, trong đó tác nhân khử này được chọn từ nhóm bao gồm natri xyanobohyđrua ($NaCNBH_3$), natri bohyđrua, đimetylamin borat và pyriđin borat.

24. Dược phẩm, chứa phức hợp protein theo điểm 1 và tuỳ ý tá dược dược dụng.

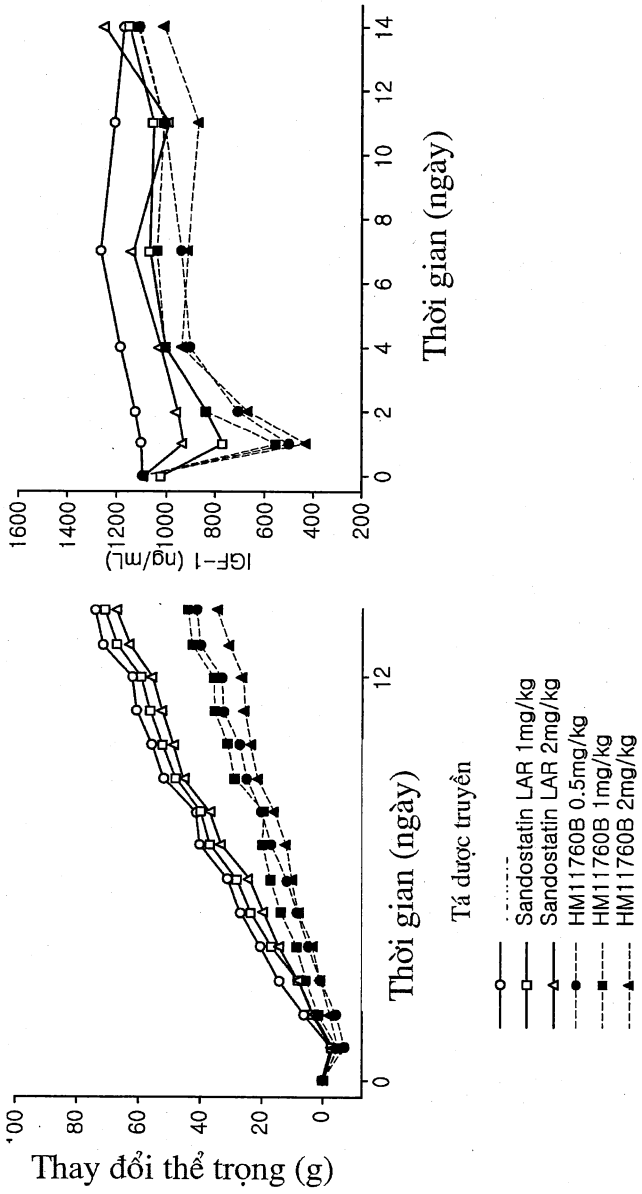
25. Phức hợp protein được điều chế bằng phương pháp theo điểm 18.

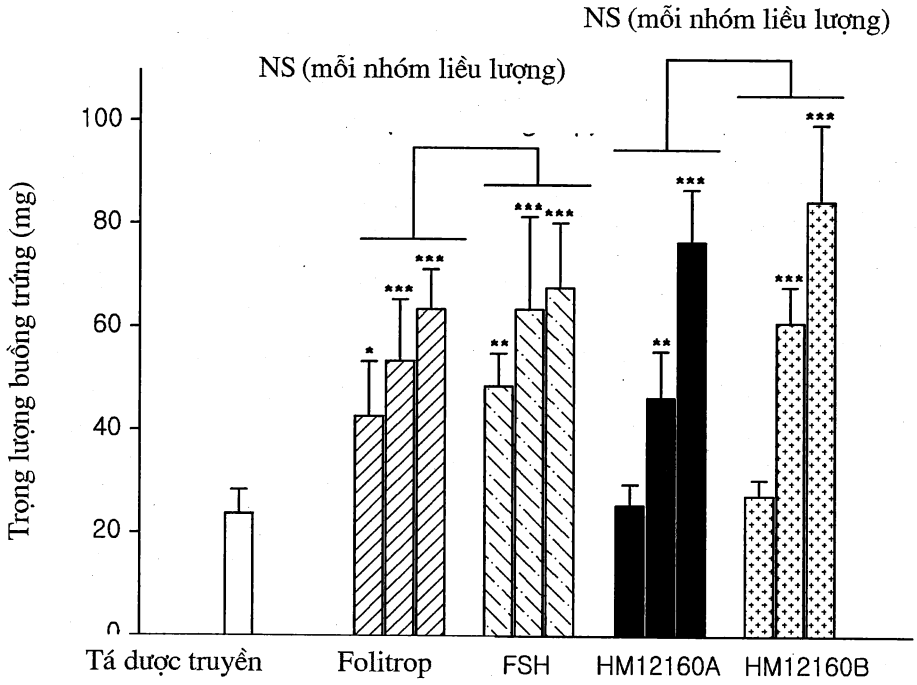


Polypeptit có hoạt tính sinh lý

Polyme không có bản chất peptit có ba 3 nhánh

Protein đime


IGF-1 (ng/mL)
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
2
4
6
8
10
12
14
Thời gian (ngày)
Thay đổi thể trọng (g)
100
80
60
40
20
0
0
12
Thời gian (ngày)
Tá dược truyền
Sandostatin LAR 1mg/kg
Sandostatin LAR 2mg/kg
HM11760B 0.5mg/kg
HM11760B 1mg/kg
HM11760B 2mg/kg


NS (mỗi nhóm liều lượng)
NS (mỗi nhóm liều lượng)
Trọng lượng buồng trứng (mg)
100
80
60
40
20
0
Tá dược truyền
Folitrop
FSH
HM12160A
HM12160B