



(12) **BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẢNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ**

(19) **Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)**
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11) 
1-0022184

(51)⁷ **C07K 14/47, A61K 38/17, A61P 29/00** (13) **B**

(21)	1-2012-00023	(22)	04.06.2010		
(86)	PCT/US2010/037542	04.06.2010	(87)	WO2010/141918A1	09.12.2010
(30)	61/217,931	04.06.2009	US		
(45)	25.11.2019	380	(43)	26.03.2012	288
(73)	PROMEDIOR, INC. (US) 371 Phoenixville Pike, Malvern, PA 19355, United States of America				
(72)	WILLETT, W., Scott (US), CAIMI, Richard, J. (US)				
(74)	Công ty TNHH Sở hữu trí tuệ WINCO (WINCO CO., LTD.)				

(54) **PROTEIN TINH BỘT HUYẾT THANH P, PHƯƠNG PHÁP TẠO RA PROTEIN NÀY, TẾ BÀO BUỒNG TRÚNG CHUỘT ĐỒNG TRUNG QUỐC VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA PROTEIN NÀY**

(57) Theo một khía cạnh, sáng chế liên quan đến sự phát hiện bất ngờ rằng việc cải biến cấu trúc glycan trên polypeptit SAP của người có thể làm tăng hoạt tính sinh học của polypeptit SAP so với mẫu SAP kiểu đại tương ứng được phân lập từ huyết thanh của người. Sáng chế đề cập đến cả polypeptit SAP biến thể của người và các phương pháp tạo ra chúng. Cụ thể, sáng chế đề cập đến các phương pháp và chế phẩm để bổ sung, loại bỏ hoặc cải biến các gốc đường in vitro hoặc in vivo để tạo ra polypeptit SAP, như polypeptit SAP của người, có kiểu glycosyl hóa mong muốn.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến protein tinh bột huyết thanh P (Serum Amyloid P: SAP), phương pháp tạo ra protein này, tế bào buồng trứng chuột đồng Trung Quốc (Chinese Hamster Ovary: CHO) và được phẩm chứa protein này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Protein tinh bột huyết thanh P (SAP) là một thành viên của họ protein pentraxin. SAP được tiết ra bởi gan và tuần hoàn trong máu dưới dạng pentamer ổn định. Nghiên cứu trước đây đã chứng minh rằng SAP đóng vai trò quan trọng trong cả pha khởi mào và pha quyết định của đáp ứng miễn dịch. SAP có thể gắn kết với các gốc đường trên bề mặt của vi khuẩn và nhờ đó kích thích quá trình opsonin hoá và thực bào của chúng bởi các tế bào trình diện kháng nguyên. SAP cũng gắn kết với ADN tự do và cromatin được sinh ra bởi các tế bào chết theo chương trình ở giai đoạn quyết định của đáp ứng miễn dịch, do đó ngăn ngừa đáp ứng viêm thứ phát kháng lại các kháng nguyên này. Các phân tử được gắn kết bởi SAP được loại bỏ ra khỏi vùng ngoại bào do SAP có khả năng gắn kết với cả ba thụ thể Fcγ (Fcγ receptor: FcγR) cổ điển, có ái lực cụ thể đối với FcγRII (CD32) và FcγRIII (CD16). Sau khi gắn kết thụ thể, SAP và phức hợp đã gắn kết bất kỳ thường được nội bào hóa và xử lý bởi tế bào.

Gần đây, đã có gợi ý rằng SAP có thể được sử dụng làm tác nhân điều trị để điều trị nhiều rối loạn khác nhau, bao gồm các rối loạn liên quan đến sự xơ hoá, rối loạn quá mẫn, rối loạn tự miễn, viêm niêm mạc và các rối loạn viêm như các rối loạn do sự nhiễm vi khuẩn gây ra. Ví dụ, xem đơn yêu cầu cấp Bằng độc quyền sáng chế Mỹ số 11/707333, 12/217617, 12/720845 và 12/720847. Các liệu pháp protein để điều trị bệnh ở người đã cách mạng hoá ngành công nghiệp chăm sóc sức khoẻ. Tuy nhiên, có rất nhiều khó khăn trong việc tạo ra liệu pháp protein có hiệu quả cần thiết và/hoặc với lượng đủ để hữu ích làm tác nhân điều trị. Nhiều tác

nhân điều trị tiềm năng đã được cải biến để làm tăng hoạt tính sinh học của chúng, như thời gian bán huỷ trong huyết tương, so với protein có nguồn gốc tự nhiên. Công nghệ biểu hiện tái tổ hợp thường được thực hiện để tạo ra các polypeptit với lượng đủ. Đáng tiếc là nhiều hệ tái tổ hợp tạo ra các polypeptit có đặc tính sinh học khác với các dạng có nguồn gốc tự nhiên, điều này có thể ảnh hưởng đến được động học, độ an toàn và hiệu quả của sản phẩm điều trị.

Do đó, vẫn cần phát triển các polypeptit SAP và phương pháp sản xuất chúng sao cho phù hợp với việc điều trị ở người.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Một phần sáng chế đề xuất các polypeptit tinh bột huyết thanh P (SAP) biến thể và phương pháp tạo ra chúng. Sáng chế bao gồm cả phương pháp và chế phẩm để bổ sung, loại bỏ hoặc cải biến các gốc đường để tạo ra polypeptit SAP biến thể có kiểu glycosyl hoá mong muốn cả *in vitro* và *in vivo*.

Theo một số khía cạnh, sáng chế đề xuất polypeptit SAP của người được glycosyl hoá chứa chuỗi oligosacarit được liên kết với N hoặc được liên kết với O có ít nhất một nhánh kết thúc bằng gốc axit sialic có liên kết α 2,3.

Theo một số khía cạnh, sáng chế đề xuất polypeptit SAP của người đã glycosyl hoá chứa chuỗi oligosacarit được liên kết với N hoặc được liên kết với O có các gốc axit sialic có liên kết α 2,6 ít hơn ít nhất 50% so với SAP kiểu đại được phân lập từ huyết thanh của người.

Theo một số khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp tạo ra polypeptit SAP của người glycosyl hoá, bao gồm bước biểu hiện polypeptit SAP trong tế bào và phân lập polypeptit SAP từ tế bào này. Theo phương án được ưu tiên, tế bào là tế bào CHO. Theo một số khía cạnh, tế bào là tế bào CHO - S.

Theo một số khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp tạo ra polypeptit SAP của người, bao gồm bước biểu hiện polypeptit SAP của người trong tế bào CHO và phân lập polypeptit SAP của người từ tế bào này.

Theo một số khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp tạo ra polypeptit SAP của người, bao gồm bước cung cấp polypeptit SAP của người glycosyl hoá chứa chuỗi oligosacarit được liên kết với N hoặc được liên kết với O và biến đổi bằng

phương pháp enzym hoặc hoá học chuỗi oligosacarit được liên kết với N hoặc được liên kết với O của polypeptit SAP để tạo ra polypeptit SAP glycosyl hoá được cải biến.

Theo một số khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp tạo ra polypeptit SAP của người, bao gồm bước cung cấp polypeptit SAP của người và biến đổi polypeptit SAP bằng phương pháp enzym hoặc hoá học này để tạo ra polypeptit SAP glycosyl hoá chứa oligosacarit được liên kết với N hoặc được liên kết với O.

Theo một số khía cạnh, sáng chế đề xuất polypeptit SAP của người được tạo ra bằng quy trình bao gồm bước biểu hiện polypeptit SAP trong tế bào CHO và phân lập polypeptit SAP từ tế bào này.

Theo một số khía cạnh, sáng chế đề xuất tế bào CHO chứa polypeptit SAP của người mang chuỗi oligosacarit được liên kết với N có ít nhất một nhánh của chuỗi oligosacarit kết thúc bằng gốc axit sialic có liên kết $\alpha 2,3$.

Theo một số khía cạnh, sáng chế đề xuất tế bào CHO chứa trình tự polynucleotit mã hoá polypeptit SAP của người.

Theo một số khía cạnh, sáng chế đề xuất polypeptit SAP của người có nồng độ IC_{50} để ức chế sự biệt hoá của bạch cầu đơn nhân to thành tế bào sợi *in vitro* thấp hơn một phần hai, thấp hơn một phần ba, thấp hơn một phần tư, thấp hơn một phần mười hoặc thấp hơn một phần một trăm so với giá trị này của mẫu SAP kiểu đại tương ứng được phân lập từ huyết thanh của người.

Theo các phương án được ưu tiên, polypeptit SAP của người theo sáng chế có chuỗi oligosacarit được liên kết với N. Theo một số phương án, ít nhất một nhánh của chuỗi oligosacarit được liên kết với N kết thúc bằng gốc axit sialic có liên kết $\alpha 2,3$. Theo một số phương án, chuỗi oligosacarit được liên kết với N có các gốc axit sialic có liên kết $\alpha 2,6$ ít hơn ít nhất 50% so với SAP kiểu đại được phân lập từ huyết thanh của người. Theo một số phương án, tất cả các nhánh của chuỗi oligosacarit được liên kết với N kết thúc bằng các gốc axit sialic có liên kết $\alpha 2,3$. Theo một số phương án, chuỗi oligosacarit được liên kết với N gần như không chứa các gốc axit sialic có liên kết $\alpha 2,6$. Các polypeptit SAP biến thể glyco theo sáng chế có thể chứa một hoặc nhiều nhánh, ví dụ, chuỗi oligosacarit được liên kết với N có thể có đặc trưng là có cấu trúc nhánh đôi, nhánh ba, nhánh tư hoặc nhánh năm.

Theo một số phương án, chuỗi oligosacarit được liên kết với N chứa nhân sacarit năm là $\text{Man}[(\alpha 1,6)-(\text{Man}(\alpha 1,3))-\text{Man}(\beta 1,4)-\text{GlcNAc}(\beta 1,4)-\text{GlcNAc}(\beta 1,N)-\text{Asn}]$. Theo một số phương án, chuỗi oligosacarit được liên kết với N chứa ít nhất một nhánh có cấu trúc $\text{NeuNAc}2\alpha 3\text{Gal}\beta 4\text{GlcNAc}\beta 2\text{Man}\alpha 6$. Theo một số phương án, ít nhất một nhánh của chuỗi oligosacarit được liên kết với N gần như không chứa galactosa và N - axetylglucosamin. Theo một số phương án, tất cả các nhánh của chuỗi oligosacarit được liên kết với N gần như không chứa galactosa và N-axetylglucosamin. Theo một số phương án, ít nhất một nhánh của oligosacarit được liên kết với N chứa một hoặc nhiều gốc manosa. Theo một số phương án, chuỗi oligosacarit được liên kết với N chứa ít nhất một gốc fucoza. Polypeptit bất kỳ trong số các polypeptit SAP biến thể glyco theo sáng chế có thể chứa ít nhất gốc glycosyl được cải biến. Gốc glycosyl được cải biến có thể liên hợp với một hoặc nhiều nhóm cải biến được chọn từ các polyme tan và không tan trong nước, các gốc điều trị, tác nhân chẩn đoán và phân tử sinh học.

Theo một số khía cạnh, polypeptit SAP theo sáng chế có thể là polypeptit tái tổ hợp. Polypeptit SAP theo sáng chế có thể chứa trình tự axit amin có mức độ giống về trình tự ít nhất 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% so với các trình tự SEQ ID No. 1, 2 3, hoặc 4. Tốt hơn, nếu polypeptit SAP này là protein SAP của người. Polypeptit SAP của người theo sáng chế có thể chứa trình tự axit amin có mức độ giống về trình tự ít nhất 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% so với SEQ ID NO: 1,

Theo một số khía cạnh, polypeptit SAP của người theo sáng chế là protein dung hợp chứa vùng SAP và một hoặc nhiều vùng khác loại. Vùng khác loại này có thể làm tăng một hoặc nhiều đặc tính trong số tính ổn định *in vivo*, thời gian bán huỷ *in vivo*, sự hấp thu/sử dụng, sự phân bố hoặc khu trú mô, sự tạo thành phức hợp protein và/hoặc tinh thể.

Theo một số khía cạnh, polypeptit SAP của người theo sáng chế chứa một hoặc nhiều gốc axit amin được cải biến, ví dụ, axit amin PEGyl hoá, axit amin glycosyl hoá (ví dụ, sự glycosyl hoá được liên kết với O), axit amin prenyl hoá, axit amin axetyl hoá, axit amin biotinyl hoá và/hoặc axit amin được liên hợp với chất dẫn xuất hóa hữu cơ. Các gốc axit amin được cải biến có thể làm tăng một hoặc

nhiều đặc tính trong số tính ổn định *in vivo*, thời gian bán huỷ *in vivo*, sự hấp thu/sử dụng, sự phân bố hoặc khu trú mô, sự tạo thành phức hợp protein và/hoặc tinh thể.

Theo các phương án được ưu tiên, polypeptit SAP của người theo sáng chế có hoạt tính sinh học tăng lên so với mẫu SAP kiểu đại tương ứng được phân lập từ huyết thanh của người. Theo một số khía cạnh, polypeptit SAP theo sáng chế có nồng độ IC_{50} để ức chế sự biệt hoá của bạch cầu đơn nhân to thành tế bào sợi *in vitro* thấp hơn một phần hai, thấp hơn một phần ba, thấp hơn một phần tư, thấp hơn một phần mười hoặc thấp hơn một phần một trăm so với mẫu SAP kiểu đại tương ứng được phân lập từ huyết thanh của người.

Theo một số khía cạnh, phương pháp tạo ra polypeptit bất kỳ trong số các polypeptit SAP của người theo sáng chế bao gồm bước bổ sung là biến đổi polypeptit SAP bằng phương pháp enzym hoặc hoá học để liên kết chuỗi oligosacarit được liên kết với N hoặc được liên kết với O vào polypeptit SAP hoặc để cải biến chuỗi oligosacarit được liên kết với N hoặc được liên kết với O sẵn có trên polypeptit SAP. Theo một số phương án, bước biến đổi polypeptit SAP bằng phương pháp enzym hoặc hoá học bao gồm việc xử lý polypeptit SAP bằng một hoặc nhiều protein có hoạt tính enzym được chọn từ glycosyltransferaza, glycosidaza và phosphataza. Theo một số phương án, quá trình biến đổi polypeptit SAP bằng phương pháp enzym hoặc hoá học bị tác động bởi sự có mặt của một hoặc nhiều tiền chất đường. Các tiền chất đường thích hợp bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, UDP - N - axetylglucosamin, CMP - N - axit glycoylneuraminic, UDP - N - axetylgalactosamin, CMP - N - axit axetylneuraminic, UDP - galactosa và GDP - fucoza. Theo một số phương án, quá trình biến đổi polypeptit SAP bằng phương pháp enzym hoặc hoá học loại bỏ một hoặc nhiều gốc axit sialic có liên kết $\alpha,6$ tận cùng ra khỏi chuỗi oligosacarit được liên kết với N hoặc được liên kết với O. Theo một số phương án, quá trình biến đổi polypeptit SAP đã phân lập bằng phương pháp enzym hoặc hoá học thay thế một hoặc nhiều gốc axit sialic có liên kết $\alpha,6$ tận cùng trên chuỗi oligosacarit bằng một hoặc nhiều gốc axit sialic có liên kết $\alpha,3$.

Sáng chế còn đề xuất được phẩm chứa polypeptit SAP của người theo sáng chế thích hợp để sử dụng trên động vật có vú. Dược phẩm theo sáng chế chứa ít

nhất một polypeptit SAP được bộc lộ trong bản mô tả này và chất mang được dụng. Theo một số phương án, dược phẩm này còn chứa chất có hoạt tính bổ sung. Theo một số phương án, dược phẩm được bào chế dưới dạng sản phẩm giải phóng duy trì. Theo một số phương án, dược phẩm theo sáng chế thích hợp để sử dụng cho bệnh nhân qua đường khu trú bằng cách tiêm, tiêm trong tĩnh mạch, bằng cách xông, thuốc cấy có tác dụng liên tục hoặc bằng cách bơm.

Sáng chế còn mô tả phương pháp điều trị hoặc phòng ngừa các rối loạn hoặc tình trạng bệnh đáp ứng với SAP bằng cách cho bệnh nhân cần điều trị sử dụng lượng hữu hiệu có tác dụng điều trị của một hoặc nhiều polypeptit SAP theo sáng chế. Các rối loạn hoặc tình trạng bệnh đáp ứng với SAP bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, sự rối loạn hoặc tình trạng bệnh hoá xơ hoặc tăng sinh hoá xơ, sự rối loạn hoặc tình trạng bệnh quá mẫn, sự rối loạn hoặc tình trạng bệnh tự miễn, bệnh hoặc tình trạng viêm, và viêm niêm mạc. Polypeptit SAP theo sáng chế có thể được sử dụng cho bệnh nhân qua đường khu trú, bằng cách tiêm, tiêm trong tĩnh mạch, bằng cách xông, thuốc cấy có tác dụng liên tục hoặc bơm, hoặc kết hợp các đường này. Theo một số phương án, polypeptit SAP theo sáng chế được sử dụng với một hoặc nhiều chất có hoạt tính bổ sung.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1. Thử nghiệm biệt hoá tế bào sợi. Thử nghiệm trên cơ sở thử nghiệm ELISA được sử dụng để xác định mức độ tạo ra MDC sau khi ủ bạch cầu đơn nhân to với polypeptit SAP. Trục Y thể hiện hiệu lực trung bình (nghĩa là giá trị trung bình của 7 thử nghiệm độc lập) của SAP thu được từ huyết thanh của người (human serum - derived SAP: hSAP) so với SAP của người tái tổ hợp (recombinant human SAP: rhSAP) được phân lập từ tế bào CHO - S. Hoạt tính tương đối của hSAP được đặt bằng 1,0.

Fig.2. Phân tích cấu trúc glycan của các polypeptit SAP biến thể. Phân tích sắc ký lỏng khối phổ (Liquid Chromatography Mass Spectrometry: LCMS) (được thể hiện trên Fig.2A) và phân tích sắc ký lỏng hiệu năng cao trao đổi anion (Anion - Exchange High Performance Liquid Chromatography: AEX - HPLC) (được thể hiện trên Fig.2B) được sử dụng để xác định sự liên kết axit sialic trên SAP của

người tái tổ hợp tái cấu trúc glyco được phân lập từ tế bào CHO - S. Phân tích sắc ký lỏng khối phổ (LCMS) (được thể hiện trên Fig.2C) và phân tích sắc ký lỏng hiệu năng cao trao đổi anion (AEX - HPLC) (được thể hiện trên Fig.2D) được sử dụng để xác định sự liên kết axit sialic trên hSAP (SAP thu được từ huyết thanh của người) tái cấu trúc glyco. Phân tích sắc ký lỏng khối phổ (LCMS) (được thể hiện trên Fig.2E) và phân tích sắc ký lỏng hiệu năng cao trao đổi anion (AEX - HPLC) (được thể hiện trên Fig.2F) được sử dụng để xác định sự liên kết axit sialic trên rhSAP đã được xử lý bằng α 2,3-sialyltransferaza để làm tăng số lượng axit sialic có liên kết α 2,3 tận cùng trên các glycan SAP. Đối với các hình vẽ LCMS, trục X thể hiện khối lượng tính theo Dalton và trục Y thể hiện cường độ tương đối. Đối với các vết HPLC, trục X là thời gian tính theo phút và trục Y là đơn vị hấp thụ (mAU).

Fig.3. Thử nghiệm biệt hoá tế bào sợi. Thử nghiệm trên cơ sở thử nghiệm ELISA được sử dụng để xác định mức độ tạo ra MDC sau khi ủ bạch cầu đơn nhân to với polypeptit SAP biến thể. Trục Y thể hiện hoạt tính tương đối trung bình của mỗi biến thể SAP so với chất chuẩn tham chiếu hSAP có hoạt tính được đặt bằng 1,0 (xem thanh ngoài cùng bên trái).

Fig.4. Thử nghiệm biệt hoá tế bào sợi. Bạch cầu đơn nhân to được xử lý bằng hMCSF và sau đó được định lượng về mức độ biệt hoá tế bào sợi. Trục X thể hiện nồng độ hMCSF được ủ với bạch cầu đơn nhân to của thể cho. Trục Y thể hiện lượng tăng sinh tế bào sợi vào ngày thứ năm được xác định bằng cách đếm tế bào sợi trên mỗi $5,0 \times 10^4$ tế bào.

Fig.5. Thử nghiệm biệt hoá tế bào sợi. Bạch cầu đơn nhân to được xử lý bằng hSAP và sau đó được định lượng về mức độ biệt hoá tế bào sợi. Trục X thể hiện nồng độ hSAP được ủ với bạch cầu đơn nhân to của thể cho. Trục Y thể hiện lượng tăng sinh tế bào vào ngày thứ năm được xác định bằng cách đếm tế bào sợi trên mỗi $5,0 \times 10^4$ tế bào.

Mô tả chi tiết sáng chế

Tổng quan

Phần lớn các peptit có trong tự nhiên đều có gốc hydrat cacbon (nghĩa là các glycan) gắn với peptit qua các liên kết đặc hiệu với các axit amin nhất định

dọc theo chiều dài của chuỗi peptit sơ cấp, nhờ đó tạo ra “glycopeptit”. Dạng glycosyl hoá của peptit cho trước bất kỳ có thể có nhiều tiềm năng về chức năng cho peptit đó. Ví dụ, cấu trúc của glycan được liên kết với N trên peptit có thể tạo ra nhiều đặc tính của peptit, bao gồm tính miễn cảm với proteaza, vận chuyển nội bào, sự tiết ra, hướng đích mô, thời gian bán huỷ sinh học và tính kháng nguyên. Sự biến đổi của một hoặc nhiều đặc tính này sẽ ảnh hưởng lớn đến hiệu quả của peptit ở dạng tự nhiên của nó.

Các cấu trúc glycan được tìm thấy trong các glycopeptit có trong tự nhiên thường được chia thành hai nhóm, glycan liên kết với N và glycan liên kết với O. Các peptit được biểu hiện trong tế bào có nhân điển hình thường là dạng được N - glycosyl hoá trên gốc asparagin ở vị trí trong cấu trúc ban đầu của peptit chứa trình tự asparagin - X - serin/threonin, trong đó X có thể là axit amin bất kỳ ngoại trừ prolin và axit aspartic. Phần hydrat cacbon của các peptit này được gọi là glycan được liên kết với N hoặc oligosacarit được liên kết với N. Các sự kiện giai đoạn sớm của quá trình N - glycosyl hoá xảy ra trong lưới nội bào tương (endoplasmic reticulum: ER) và được bảo toàn ở động vật có vú, thực vật, côn trùng và các sinh vật có nhân điển hình bậc cao khác. Trước tiên, chuỗi oligosacarit chứa mười bốn gốc đường được tạo cấu trúc trên phân tử chất mang lipid. Khi peptit mới tạo ra được dịch mã và chuyển đoạn vào ER, toàn bộ chuỗi oligosacarit được chuyển thành nhóm amit của gốc asparagin trong phản ứng được xúc tác bởi enzym glycosyltransferaza gắn kết màng. Glycan được liên kết với N được xử lý thêm ở cả ER và phức hệ Golgi. Quá trình xử lý tiếp thêm này thường đòi hỏi phải loại bỏ một số gốc đường và bổ sung thêm các gốc đường khác trong các phản ứng được xúc tác bởi glycosylaza và glycosyltransferaza đặc hiệu với các gốc đường được loại bỏ và bổ sung thêm.

Thông thường, cấu trúc cuối của các glycan được liên kết với N phụ thuộc vào sinh vật mà peptit được tạo ra. Ví dụ, các peptit do vi khuẩn sinh ra thường không được glycosyl hoá. Các peptit được biểu hiện trong tế bào côn trùng thường chứa chuỗi oligosacarit được liên kết với N nhiều manosa hoặc ít manosa. Peptit được tạo ra trong môi trường nuôi cấy tế bào của động vật có vú thường được glycosyl hoá khác biệt tùy thuộc vào loài và điều kiện nuôi cấy tế bào. Thậm chí

trong cùng một loài và trong cùng điều kiện, đôi khi vẫn gặp một lượng khác biệt nhất định trong chuỗi glycosyl. Nói chung, các peptit được tạo ra trong tế bào thực vật chứa cấu trúc glycan khác biệt đáng kể với các peptit được tạo ra ở tế bào động vật.

Đã có nhiều phương pháp khác nhau được đề xuất trong lĩnh vực này để tùy chọn theo yêu cầu dạng glycosyl hoá của peptit, bao gồm các phương pháp được mô tả trong các Công bố đơn quốc tế WO 99/22764, WO 98/58964 và WO 99/54342 cũng như trong Bằng độc quyền sáng chế Mỹ số US 5047335. Về cơ bản, nhiều enzym cần thiết cho quá trình glycosyl hoá peptit *in vitro* đã được tách dòng và giải trình tự. Trong một số trường hợp, các enzym này được sử dụng *in vitro* để bổ sung các đường đặc hiệu vào glycan trên peptit. Trong các trường hợp khác, tế bào đã được tạo ra bằng kỹ thuật di truyền để biểu hiện sự kết hợp của các enzym và peptit mong muốn sao cho việc bổ sung gốc đường mong muốn vào peptit được biểu hiện diễn ra trong tế bào.

Có hai loại enzym chính được sử dụng trong quá trình tổng hợp hydrat cacbon là glycosyltransferaza và glycosidaza. Glycosyltransferaza bổ sung hoặc cải biến các cấu trúc oligosacarit sẵn có trên peptit. Glycosyltransferaza có hiệu quả trong việc tạo ra các sản phẩm đặc hiệu với khả năng kiểm soát hoá học lập thể và hóa học vị trí tốt. Glycosyltransferaza đã được sử dụng để tạo ra oligosacarit và để cải biến cấu trúc của hydrat cacbon được liên kết với N và được liên kết với O ở đầu tận cùng, cụ thể là trên các peptit được tạo ra trong tế bào của động vật có vú. Ví dụ, oligosacarit ở đầu tận cùng của glycopeptit có thể được sialyl hoá và/hoặc fucosyl hoá hoàn toàn để tạo ra cấu trúc đường bền vững hơn bằng cách sử dụng glycosyltransferaza, điều này có thể cải thiện được lực của glycopeptit và nhiều đặc tính sinh học khác.

Các glycosidaza còn được phân loại là exoglycosidaza (như β -manosidaza, β -glucosidaza) và endoglycosidaza (như Endo-A, Endo-M). Các glycosidaza thường xúc tác quá trình thủy phân của liên kết glycosit. Tuy nhiên, trong các điều kiện thích hợp, chúng có thể được sử dụng để tạo ra liên kết này. Phần lớn các glycosidaza được sử dụng để tổng hợp hydrat cacbon là exoglycosidaza, sự chuyển gốc glycosyl xuất hiện ở đầu tận cùng không khử của cơ chất. Glycosidaza gắn kết

với thể cho glycosyl trong thể trung gian glycosyl - enzym có thể bị phân cắt bởi nước để tạo ra sản phẩm thủy phân và bởi thể nhận để tạo ra glycosit hoặc oligosacarit mới. Con đường làm ví dụ sử dụng exoglycosidaza là sự tổng hợp trisacarit nhân của tất cả các glycopeptit được liên kết với N, bao gồm cả liên kết β -manosit, được tạo ra bởi tác dụng của β -manosidaza (Singh *et al.*, Chem. Commun. 993-994 (1996)). Mặc dù việc sử dụng chúng thường là ít hơn so với việc sử dụng exoglycosidaza, endoglycosidaza cũng được sử dụng để tạo ra hydrat cacbon. Endoglycosidaza có thể được sử dụng để chuyển toàn bộ chuỗi oligosacarit, đúng hơn là một monosacarit, vào polypeptit. Các mảnh oligosacarit được bổ sung vào cơ chất bằng cách sử dụng endo- β -N-acetylglucosamin, như endo-F andendo-M (Wang *et al.*, Tetrahedron Lett. 37: 1975-1978; và Haneda *et al.*, Carbohydr. Res. 292: 61-70 (1996)). Mỗi enzym trong nhóm enzym này đều được sử dụng thành công để tạo ra peptit glycosyl hoá. Để đánh giá chung, xem tài liệu: Crout *et al.*, Curr. Opin. Chem. Biol. 2: 98-111 (1998).

Protein tinh bột huyết thanh P (SAP) là một protein huyết thanh có trong tự nhiên ở động vật có vú gồm năm cấu trúc dưới phân tử, hoặc “gen khởi đầu” giống hệt nhau, được liên kết không cộng hoá trị trong thể phức hợp dạng đĩa. SAP thuộc về siêu họ protein pentraxin, được đặc trưng bởi cấu trúc pentame vòng này. Các pentraxin ngắn cổ điển bao gồm SAP cũng như protein có khả năng phản ứng với C (Osmand, A.P., *et al.*, Proc. Nat. Acad. Sci., 74: 739-743, 1997). SAP thường được tổng hợp tại gan và có thời gian bán huỷ sinh lý là hai mươi tư giờ. Trình tự của cấu trúc dưới phân tử SAP của người được thể hiện dưới đây, trình tự này tương ứng với các axit amin từ 20 đến 223 của mã số truy nhập Accession NO. NP_001630 tại Ngân hàng gen (trình tự tín hiệu không được thể hiện).

```
HTDLSGKVFVFPRESVTDHVNLTIPLEKPLQNFTLCFRAYSCLS
RAYSLFSYNTQGRDNELLVYKERVGEYSLYIGRHKVTSKVIE
KFPAPVHICVSWESSGIAEFWINGTPLVKKGLRQGYFVEAQP
KIVLGQEQDSYGGKFDRSQSFVGEIGDLYMWDSVLPPENILSA
YQGTPLPANILDWQALNYEIRGYVVIKPLVWV (SEQ ID NO: 1)
```

Trình tự của cấu trúc dưới phân tử SAP *Gallus gallus* được thể hiện dưới đây.

QEDLYRKVFVFREDPSDAYVLLQVQLERPLLNFTVCLRSYTD
 LTRPHSLFSYATKAQDNEILLFKPKPGYRFYVGGKYVTFRVP
 ENRGEWEHVCASWESGSGIAEFWLNGRPWPRKGLQKGYEVG
 NEAVVMLGQEQDAYGGGFDVYNSFTGEMADVHLWDAGLSP
 DKMRSAYLALRLPPAPLAWGRLRYEAKGDVVKPRLREALG
 A (SEQ ID NO: 2)

Trình tự của cấu trúc dưới phân tử SAP *Bos taurus* được thể hiện dưới đây.

QTDLRGKVFVFPRESSTDHVTLITKLEKPLKNLTLCLRAYSDL
 SRGYSLFSYNIHSDKNELLVFKNGIGEYSLYIGKTKVTVRATE
 KFPSPVHICTSWESSTGIAEFWINGKPLVKRGLKQGYAVGAHP
 KIVLGQEQDSYGGGFDKNQSFMEIGDLYMWDSVLSPEEILL
 VYQGSSSISPTILDWQALKYEIKGYVIVKPMVWG (SEQ ID NO:
 3)

Trình tự của cấu trúc dưới phân tử SAP *Cricetulus migratorius* được thể hiện dưới đây.

QTDLTGKVFVFPRESESDYVKLIPRLEKPLENFTLCFRTYTDLSRPHSLFSYN
 TKNKDNELLIYKERMGEYGLYIENVGAIVRGVEEFASPVHFCTSWESSGIA
 DFWVNGIPWVKKGLKKGYTVKTQPSIILGQEQDNYGGGFDKSQSFGEMG
 DLNMWDSVLTPEEIKSVYEGSWLEPNILDWRALNYEMSGYAVIRPRVWH
 (SEQ ID NO: 4)

Theo một khía cạnh, sáng chế liên quan đến sự phát hiện bất ngờ rằng việc cải biến cấu trúc glycan trên polypeptit SAP của người có thể làm tăng hoạt tính sinh học của polypeptit so với mẫu SAP kiểu đại tương ứng được phân lập từ huyết thanh của người. Như được chứng minh bởi các ví dụ trong phần mô tả, SAP được phân lập từ huyết thanh của người chỉ chứa các gốc axit sialic có liên kết $\alpha 2,6$. Ngược lại, SAP của người tái tổ hợp được tạo ra trong các tế bào CHO chỉ chứa các gốc axit sialic có liên kết $\alpha 2,3$. Bằng cách sử dụng các thử nghiệm sinh học trên cơ sở tế bào *in vitro*, các polypeptit SAP axit sialic có liên kết $\alpha 2,3$ được chứng minh là có hoạt tính cao hơn một cách ổn định so với SAP kiểu đại (nghĩa là SAP chứa các gốc axit sialic có liên kết $\alpha 2,6$) được phân lập từ huyết thanh của người. Các polypeptit SAP biến thể theo sáng chế sẽ là các chất điều trị hiệu quả hơn do tiềm

năng sinh học được tăng lên của chúng. Ví dụ, các biến thể SAP có tiềm năng cao hơn có thể cần sử dụng liều thấp hơn và/hoặc sử dụng liều ít thường xuyên hơn so với SAP kiểu đại được phân lập từ huyết thanh của người. Sáng chế đề xuất cả polypeptit SAP biến thể của người và phương pháp tạo ra chúng. Cụ thể, sáng chế bao gồm cả các phương pháp và chế phẩm để bổ sung, loại bỏ hoặc cải biến các gốc đường *in vitro* và *in vivo* để tạo ra polypeptit SAP của người có kiểu glycosyl hoá mong muốn.

Các định nghĩa

Trừ khi được định nghĩa theo cách khác, tất cả các thuật ngữ khoa học và kỹ thuật được sử dụng ở đây thường có cùng ý nghĩa theo cách hiểu thông thường của người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Nói chung, thuật ngữ chuyên ngành được sử dụng trong đây và các quy trình trong phòng thí nghiệm về môi trường nuôi cấy tế bào, công nghệ di truyền phân tử, hoá học hữu cơ, hoá học và phép lai axit nucleic là đã được biết rõ và thường được sử dụng trong lĩnh vực này. Các kỹ thuật cơ bản được sử dụng trong tổng hợp axit nucleic và peptit. Các kỹ thuật và quy trình này thường được thực hiện theo các phương pháp thông thường trong lĩnh vực này và các tài liệu tham khảo chung khác nhau (ví dụ, Sambrook *et al.*, 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2d ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y) được thể hiện trong toàn bộ tài liệu này.

Mạo từ số ít “a” và “an” được sử dụng trong bản mô tả này để chỉ một hoặc nhiều hơn một (nghĩa là ít nhất một) đối tượng ngữ pháp của mạo từ này. Ví dụ như “thành phần” có nghĩa là một thành phần hoặc nhiều hơn một thành phần.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, các thuật ngữ “điều trị” và “việc điều trị” để chỉ việc thu được hiệu quả dược lý và/hoặc sinh lý mong muốn. Hiệu quả này có thể là phòng bệnh dưới dạng ngăn ngừa hoàn toàn hoặc một phần rối loạn hoặc triệu chứng của nó và/hoặc có thể là chữa bệnh dưới dạng chữa khỏi hoàn toàn hoặc một phần đối với rối loạn và/hoặc tác dụng phụ có thể quy cho rối loạn này. Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “điều trị” bao gồm việc điều trị bất kỳ bệnh ở động vật có vú, cụ thể là người, và bao gồm: (a) làm tăng thời gian

sống; (b) làm giảm nguy cơ tử vong do bệnh; (c) ức chế bệnh, nghĩa là làm ngừng sự phát triển của nó hoặc làm giảm tốc độ tiến triển của bệnh; và (d) làm giảm mức độ bệnh, nghĩa là làm cho bệnh thoái triển.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, việc trị liệu để “ức chế” hoặc “ngăn ngừa” rối loạn hoặc tình trạng bệnh là một hợp chất mà trong mẫu thống kê, làm giảm sự xuất hiện của rối loạn hoặc tình trạng bệnh trong mẫu được điều trị so với mẫu đối chứng không được điều trị, hoặc làm chậm sự khởi phát hoặc làm giảm mức độ nặng của một hoặc nhiều triệu chứng của rối loạn hoặc tình trạng bệnh so với mẫu đối chứng không được điều trị.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, các thuật ngữ “đối tượng” và “bệnh nhân” để chỉ các động vật bao gồm cả động vật có vú, như người. Thuật ngữ “động vật có vú” bao gồm động vật linh trưởng, động vật nuôi trong nhà bao gồm chó, mèo, cừu, gia súc, ngựa, dê, lợn, chuột, chuột cống, thỏ, chuột lang, các động vật nuôi nhốt như các động vật trong vườn thú và động vật hoang dã.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “mô” để chỉ cơ quan hoặc tập hợp tế bào biệt hoá như mô da, mô phổi, mô thận và các dạng tế bào khác.

Thuật ngữ “hiệu quả điều trị” là đã biết trong lĩnh vực này và để chỉ hiệu quả tại chỗ hoặc toàn thân ở động vật, cụ thể là động vật có vú, và cụ thể hơn nữa là người do chất có hoạt tính dược lý gây ra. Cụm từ “lượng có hiệu quả điều trị” có nghĩa là lượng của một chất mà sẽ tạo ra hiệu quả tại chỗ hoặc toàn thân mong muốn với tỷ lệ lợi ích/nguy cơ hợp lý có thể áp dụng cho việc điều trị bất kỳ. Lượng có hiệu quả điều trị của chất này sẽ thay đổi tùy theo đối tượng và tình trạng bệnh được điều trị, trọng lượng và độ tuổi của đối tượng, mức độ nặng của tình trạng bệnh, cách thức sử dụng, mà một người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể xác định dễ dàng. Ví dụ, một số chế phẩm được mô tả ở đây có thể được sử dụng với lượng đủ để tạo ra hiệu quả mong muốn với tỷ lệ lợi ích/nguy cơ hợp lý với việc điều trị đó.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “axit nucleic” để chỉ polynucleotit như axit deoxyribonucleic (ADN) và, khi thích hợp, axit ribonucleic (ARN). Thuật ngữ này cũng cần được hiểu là bao gồm, với nghĩa tương đương, các chất tương tự của ARN hoặc ADN được tạo ra từ các chất tương tự nucleotit và,

như có thể áp dụng với phương án được mô tả, polynucleotit sợi đơn (như sợi có nghĩa hoặc sợi đối nghĩa) và polynucleotit sợi kép.

Các thuật ngữ “peptit”, “protein” và “polypeptit” được sử dụng thay thế lẫn nhau ở đây. Thuật ngữ “protein đã tinh chế” để chỉ việc tạo ra một hoặc nhiều protein, tốt hơn là được phân lập từ, hoặc theo cách khác, gần như không chứa, các protein khác thường đi kèm với (các) protein trong tế bào hoặc dịch tan tế bào. Thuật ngữ “gần như không chứa các protein tế bào khác” hoặc “gần như không chứa các protein tạp nhiễm khác” được định nghĩa là bao gồm các chế phẩm riêng biệt của mỗi protein chứa ít hơn 20% (tính theo trọng lượng khô) protein tạp nhiễm, tốt hơn là chứa ít hơn 5% protein tạp nhiễm. Các dạng chức năng của mỗi protein này có thể được tạo ra dưới dạng chế phẩm đã tinh chế bằng cách sử dụng gen đã tách dòng như đã được biết rõ trong lĩnh vực này. Thuật ngữ “đã tinh chế”, có nghĩa là phân tử được nêu có mặt khi gần như không có mặt các đại phân tử sinh học khác, như các protein khác (cụ thể là các protein khác mà về cơ bản có thể che, giảm bớt, làm nhầm lẫn hoặc thay đổi các tính chất của protein thành phần cả dưới dạng chế phẩm đã tinh chế hoặc về chức năng của chúng trong hỗn hợp được hoàn nguyên cho đối tượng). Khi được sử dụng trong bản mô tả này, tốt hơn là thuật ngữ “đã tinh chế” có nghĩa là có tỷ lệ các đại phân tử sinh học thuộc cùng một dạng có mặt, tốt hơn là với lượng ít nhất 80% tính theo trọng lượng khô, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng 85% khối lượng, tốt hơn nữa là từ 95 đến 99% trọng lượng và tốt nhất là ít nhất 99,8% trọng lượng (nhưng có thể có mặt nước, chất đệm và các phân tử nhỏ khác, đặc biệt là các phân tử có trọng lượng phân tử thấp hơn 5000). Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “tinh khiết” tốt hơn là có cùng các giá trị giới hạn bằng số như thuật ngữ “đã tinh chế” ngay trên đây.

Oligosacarit “được liên kết với N” là các oligosacarit liên kết với khung chính peptit qua asparagin, bằng liên kết asparagin - N - axetylglucosamin. Oligosacarit được liên kết với N còn được gọi là “N - glycan”. Các oligosacarit được liên kết với N có trong tự nhiên có nhân pentasacarit chung $\text{Man}[(\alpha 1,6)-(\text{Man}(\alpha 1,3))-\text{Man}(\beta 1,4)-\text{GlcNAc}(\beta 1,4)-\text{GlcNAc}(\beta 1,N)]$. Chúng khác nhau về sự có mặt của, và về số lượng nhánh (còn được gọi là anten) của các đường ngoại biên như N - axetylglucosamin, galactosa, N - axetylgalactosamin, fucoza và axit sialic.

Tuỳ ý, cấu trúc này cũng có thể chứa phân tử fucoza nhân và/hoặc phân tử xyloza.

Thuật ngữ “axit sialic” để chỉ thành viên bất kỳ của họ đường carboxyl hoá có chín nguyên tử cacbon. Thành viên phổ biến nhất của họ axit sialic là axit N - axetyl - neuraminic (thường được viết tắt là Neu5Ac, NeuAc hoặc NANA). Thành viên thứ hai của họ này là axit N-glycolyl-neuraminic (Neu5Gc hoặc NeuGc), trong đó nhóm N - axetyl của NeuAc được hydroxyl hoá. Thành viên thứ ba của họ axit sialic là axit 2-keto-3-deoxy-nonulosonic (KDN) (Nadano *et al.* (1986) J. Biol. Chem. 261: 11550-11557; Kanamori *et al.*, J. Biol. Chem. 265: 21811-21819 (1990)). Axit này còn bao gồm các axit sialic được thế ở vị trí 9 như 9-O-C₁C₆-axyl-Neu5Ac tương tự 9-O-lactyl-Neu5Ac hoặc 9-O-axetyl-Neu5Ac, 9-deoxy-9-flo-Neu5Ac và 9-azido-9-deoxy-Neu5Ac. Để tham khảo họ axit sialic, xem tài liệu, ví dụ, Varki, Glycobiology 2: 25-40 (1992); Sialic Acids: Chemistry, Metabolism and Function, R. Schauer, Ed. (Springer-Verlag, New York (1992)).

Tế bào “được tạo ra bằng kỹ thuật di truyền” hoặc “tái tổ hợp” là tế bào có một hoặc nhiều sự cải biến về vật liệu di truyền của tế bào này. Các cải biến này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, sự chèn vật liệu di truyền, sự loại bỏ vật liệu di truyền và sự chèn vật liệu di truyền là vật liệu ngoài nhiễm sắc thể bất kể vật liệu này có được duy trì ổn định hoặc không.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “đường được cải biến” để chỉ hydrat cacbon có trong tự nhiên hoặc không có trong tự nhiên được bổ sung bằng phương pháp enzym vào một axit amin hoặc gốc glycosyl của peptit trong quy trình theo sáng chế. Đường được cải biến này được chọn từ nhiều cơ chất enzym bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, đường nucleotit (mono- , di- và tri-phosphat), đường hoạt hoá (ví dụ, glycosyl halogenua, glycosyl mesylat) và các đường không hoạt hoá hoặc nucleotit. “Đường được cải biến” có thể được chức hoá cộng hoá trị với “nhóm cải biến”. Các nhóm cải biến hữu ích bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các polyme tan trong nước và polyme không tan trong nước, các gốc điều trị, gốc chẩn đoán, phân tử sinh học. Locut của sự chức hoá bằng nhóm cải biến được chọn sao cho không ngăn ngừa “đường được cải biến” được bổ sung bằng phương pháp enzym vào peptit hoặc gốc glycosyl của peptit này.

Polypeptit SAP biến thể

Một phần, sáng chế đề xuất polypeptit tinh bột huyết thanh P (SAP) biến thể. Cụ thể, các biến thể SAP theo sáng chế bao gồm các polypeptit SAP của người được glycosyl hoá chứa một hoặc nhiều chuỗi oligosacarit được liên kết với N hoặc được liên kết với O mà mỗi chuỗi này độc lập có một, hai, ba, bốn, năm hoặc nhiều nhánh kết thúc bằng gốc axit sialic có liên kết $\alpha 2,3$. Theo một số phương án, tất cả các nhánh của chuỗi oligosacarit được liên kết với N hoặc được liên kết với O kết thúc ở gốc có liên kết $\alpha 2,3$. Các biến thể SAP khác theo sáng chế bao gồm các polypeptit SAP của người được glycosyl hoá chứa các chuỗi oligosacarit được liên kết với N hoặc được liên kết với O có các gốc axit sialic có liên kết $\alpha 2,6$ ít hơn ít nhất 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 75%, 80%, 85% hoặc thậm chí ít nhất 95% so với polypeptit SAP kiểu đại thu được từ huyết thanh của người. Theo một số phương án, các chuỗi oligosacarit được liên kết với N hoặc được liên kết với O gần như không chứa gốc axit sialic có liên kết $\alpha 2,6$, ví dụ, có các gốc axit sialic có liên kết $\alpha 2,6$ ít hơn 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% hoặc thậm chí ít hơn 99% so với polypeptit SAP kiểu đại thu được từ huyết thanh của người. Các polypeptit SAP biến thể glyco theo sáng chế có thể chứa oligosacarit được liên kết với N hoặc chuỗi được liên kết với O có một hoặc nhiều nhánh (ví dụ, có cấu trúc hai nhánh, ba nhánh, bốn nhánh, năm nhánh, v.v.). Theo một số phương án, các polypeptit SAP theo sáng chế chứa chuỗi oligosacarit được liên kết với N hoặc được liên kết với O trong đó một, hai, ba, bốn hoặc năm nhánh của chuỗi oligosacarit gần như không chứa galactosa và N - axetylglucosamin (nghĩa là chứa N - axetylglucosamin ít hơn 80%, 85%, 90%, 95% 97%, 98% hoặc thậm chí ít hơn 99% so với polypeptit kiểu đại thu được từ huyết thanh của người). Một số polypeptit SAP theo sáng chế có các chuỗi oligosacarit được liên kết với N hoặc được liên kết với O gần như không chứa galactosa và N - axetylglucosamin (ví dụ, có galactosa và/hoặc N - axetylglucosamin ít hơn 80%, 85%, 90%, 95% 97%, 98% hoặc thậm chí ít hơn 99% so với polypeptit kiểu đại thu được từ huyết thanh của người). Theo một số phương án, polypeptit SAP theo sáng chế chứa chuỗi oligosacarit được liên kết với N hoặc được liên kết với O trong đó một, hai, ba, bốn hoặc năm nhánh của chuỗi oligosacarit đó chứa một hoặc nhiều gốc mannoza. Theo

một số phương án, polypeptit SAP theo sáng chế chứa oligosacarit được liên kết với N có nhân pentasacarit $\text{Man}[(\alpha 1,6)-(\text{Man}(\alpha 1,3))-\text{Man}(\beta 1,4)-\text{GlcNAc}(\beta 1,4)-\text{GlcNAc}(\beta 1,N)-\text{Asn}]$. Nhân pentasacarit này cũng có thể chứa một hoặc nhiều gốc fucoza hoặc xyloza. Theo một số phương án, polypeptit SAP theo sáng chế chứa chuỗi oligosacarit được liên kết với N trong đó một, hai, ba, bốn hoặc năm nhánh của chuỗi oligosacarit có cấu trúc $\text{NeuNAc}2\alpha 3\text{Gal}\beta 4\text{GlcNAc}\beta 2\text{Man}\alpha 6$. Polypeptit SAP theo sáng chế cũng có thể chứa chuỗi oligosacarit được liên kết với N trong đó tất cả các nhánh có cấu trúc $\text{NeuNAc}2\alpha 3\text{Gal}\beta 4\text{GlcNAc}\beta 2\text{Man}\alpha 6$.

Polypeptit SAP biến thể theo sáng chế có thể chứa một hoặc nhiều gốc đường “được cải biến”. Các đường được cải biến được thể ở vị trí bất kỳ để cho phép gắn kết gốc hoặc nhóm cải biến. Theo các khía cạnh được ưu tiên, đường được cải biến được thể ở vị trí mà vẫn cho phép đường này có tác dụng làm cơ chất cho enzym được sử dụng để gắn kết đường được cải biến với peptit SAP. Nhóm cải biến có thể được gắn kết với gốc đường bằng phương pháp enzym, phương pháp hoá học hoặc tổ hợp của các phương pháp này, nhờ đó tạo ra đường được cải biến, ví dụ, galactoza, fucoza hoặc axit sialic được cải biến. Các nhóm cải biến thích hợp để sử dụng trong sáng chế này cũng như các phương pháp liên hợp các nhóm cải biến này với gốc đường được mô tả trong phần sau đây.

Theo các khía cạnh được ưu tiên, polypeptit SAP biến thể theo sáng chế có nồng độ IC_{50} để ức chế sự biệt hoá của bạch cầu đơn nhân to thành tế bào sợi *in vitro* thấp hơn một phần hai so với giá trị này của mẫu SAP kiểu đại tương ứng được phân lập từ huyết thanh của người. Theo một số phương án, polypeptit SAP biến thể theo sáng chế có nồng độ IC_{50} để ức chế sự biệt hoá của bạch cầu đơn nhân to thành tế bào sợi *in vitro* thấp hơn 1/3, thấp hơn 1/4, thấp hơn 1/10 hoặc thấp hơn 1/100 so với giá trị này của mẫu SAP kiểu đại tương ứng được phân lập từ huyết thanh của người.

Polypeptit SAP biến thể theo sáng chế có thể mức độ về giống trình tự ít nhất 60%, ít nhất 70%, ít nhất 80%, ít nhất 85%, ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 96%, ít nhất 97%, ít nhất 98%, ít nhất 99% hoặc 100% với trình tự axit amin SEQ ID NO:1, như được xác định bằng cách sử dụng chương trình máy tính FASTDB dựa trên thuật toán của Brutlag và các đồng tác giả (Comp. App. Biosci., 6:237-245

(1990)). Theo một phương án cụ thể, các thông số được sử dụng để tính toán tỷ lệ phần trăm mức độ giống và tính tương tự của sự đóng thẳng hàng axit amin bao gồm: Matrix=PAM 150, k-tuple=2, Mismatch Penalty=1, Joining Penalty=20, Randomization Group Length=0, Cutoff Score=1, Gap Penalty=5 và Gap Size Penalty=0,05.

Thuật ngữ “polypeptit SAP” bao gồm các đoạn chức năng và protein dung hợp chứa bất kỳ yếu tố bất kỳ trong số các yếu tố đã nêu trên đây. Nói chung, polypeptit SAP sẽ được thiết kế để tan được trong dung dịch nước ở nhiệt độ, độ pH và nồng độ mol thích hợp về mặt sinh học. Các protome SAP liên kết không cộng hoá trị với nhau để tạo thành phức hợp SAP pentame có thể có các trình tự axit amin và/hoặc các cải biến sau dịch mã giống hệt nhau hoặc theo cách khác, các protome SAP riêng biệt trong cùng một phức hợp có thể có các trình tự và sự cải biến khác nhau. Thuật ngữ polypeptit SAP bao gồm cả các polypeptit chứa polypeptit SAP có trong tự nhiên bất kỳ cũng như biến thể bất kỳ của nó (bao gồm cả các thể đột biến, mảnh và thể dung hợp). Polypeptit SAP theo sáng chế có thể là polypeptit tái tổ hợp. Theo các phương án được ưu tiên, polypeptit SAP theo sáng chế là polypeptit SAP của người.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất được phẩm chứa polypeptit SAP biến thể theo sáng chế, hoặc mảnh chức năng của nó. Theo một số khía cạnh, trình tự axit amin của biến thể SAP có thể khác biệt so với SEQ ID NO: 1 bởi một hoặc nhiều sự thay thế bảo toàn hoặc không bảo toàn. Khi được sử dụng trong bản mô tả này, “sự thay thế bảo toàn” là các gốc tương tự về mặt vật lý hoặc chức năng với các gốc tham chiếu tương ứng, nghĩa là sự thay thế bảo toàn và gốc tham chiếu của nó có kích thước, hình dạng, điện tích và/hoặc tính chất hoá học tương tự (ví dụ, khả năng tạo ra liên kết cộng hoá trị hoặc hydro). Sự thay thế bảo toàn được ưu tiên là sự thay thế thoả mãn tiêu chuẩn được xác định đối với đột biến điểm chấp nhận được theo tài liệu: Dayhoff *et al.*, Atlas of Protein Sequence and Structure 5:345-352 (1978 & Supp.). Các ví dụ về sự thay thế bảo toàn là sự thay thế trong số các nhóm sau: (a) valin, glyxin; (b) glyxin, alanin; (c) valin, isoleuxin, leuxin; (d) axit aspartic, axit glutamic; (e) asparagin, glutamin; (f) serin, threonin; (g) lysin, arginin, methionin; và (h) phenylalanin, tyrosin. Hướng dẫn bổ sung liên quan đến

sự thay đổi axit amin có khả năng không ảnh hưởng đến kiểu hình có thể được tìm thấy trong tài liệu: Bowie *et al.*, Science 247:1306-1310 (1990).

Polypeptit SAP biến thể và mảnh của nó vẫn duy trì được chức năng sinh học là hữu ích trong các dược phẩm và phương pháp được mô tả ở đây. Theo một số phương án, polypeptit SAP biến thể hoặc mảnh của nó gắn kết với FcγRI, FcγRIIA, và/hoặc FcγRIIIB. Theo một số phương án, polypeptit SAP biến thể hoặc mảnh của nó ức chế một hoặc nhiều sự biệt hóa của tế bào sợi, tiền chất tế bào sợi, tiền chất tế bào sợi cơ và/hoặc tiền chất bạch cầu đơn nhân to tạo máu. Các biến thể SAP có thể được tạo ra bằng cách cải biến cấu trúc của polypeptit SAP với mục đích như tăng cường hiệu quả điều trị hoặc tính ổn định (ví dụ, thời hạn sử dụng *ex vivo* và độ bền với sự thoái biến phân giải protein *in vivo*).

Theo các khía cạnh cụ thể, polypeptit SAP biến thể theo sáng chế có thể còn chứa các cải biến sau dịch mã, ngoài cải biến bất kỳ có trong tự nhiên trong polypeptit SAP. Các cải biến này gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, sự axetyl hoá, cacboxyl hoá, glycosyl hoá (ví dụ, oligosacarit được liên kết với O, oligosacarit được liên kết với N, v.v), sự phosphoryl hoá và lipit hoá. Kết quả là polypeptit SAP được cải biến có thể chứa các thành phần không phải axit amin như polyetylen glycol, lipit, poly- hoặc mono- sacarit và phosphat.

Theo một số khía cạnh, một hoặc nhiều cải biến với polypeptit SAP được mô tả ở đây có thể làm tăng tính ổn định của polypeptit SAP. Ví dụ, các cải biến này có thể làm tăng thời gian bán huỷ *in vivo* của polypeptit SAP hoặc làm giảm sự thoái biến phân giải protein của polypeptit SAP.

Theo một số khía cạnh, polypeptit SAP biến thể theo sáng chế bao gồm cả protein dung hợp có ít nhất một phần thuộc polypeptit SAP của người và một hoặc nhiều vùng dung hợp hoặc phần khác loại. Các ví dụ đã biết rõ về các vùng dung hợp này gồm, nhưng không giới hạn ở, polyhistidin, Glu-Glu, glutathion S transferaza (GST), thioredoxin, protein A, protein G và vùng ổn định của chuỗi nặng globulin miễn dịch (Fc), protein gắn kết với maltoza (maltose binding protein: MBP) hoặc albumin huyết thanh của người. Vùng dung hợp có thể được chọn sao cho nó tạo ra đặc tính mong muốn. Ví dụ, một số vùng dung hợp là đặc biệt hữu ích để phân lập protein dung hợp bằng phương pháp sắc ký ái lực. Để tinh chế ái lực,

các chất nền thích hợp cho phương pháp sắc ký ái lực, như glutathion-, amylaza- và các nhựa liên hợp niken- hoặc coban- được sử dụng. Theo ví dụ khác, vùng dung hợp có thể được chọn sao cho nó tạo điều kiện thuận lợi cho việc phát hiện polypeptit SAP. Ví dụ về các vùng phát hiện này bao gồm các protein phát huỳnh quang khác nhau (ví dụ, GFP) cũng như các “đuôi epitop”, thường là các trình tự peptit ngắn mà các kháng thể đặc hiệu có thể sử dụng. Các đuôi epitop đã biết rõ mà các kháng thể đơn dòng đặc hiệu có thể sử dụng bao gồm FLAG, hemagglutinin (HA) của virus cúm và đuôi c-myc. Trong một số trường hợp, các vùng dung hợp có vị trí phân cắt bằng proteaza cho phép proteaza tương ứng phân huỷ một phần protein dung hợp và nhờ đó giải phóng protein tái tổ hợp từ đó. Sau đó, các protein được giải phóng có thể được phân lập từ vùng dung hợp bằng phương pháp tách sắc ký tiếp. Trong một số trường hợp, polypeptit SAP có thể được dung hợp với vùng khác loại để làm ổn định polypeptit SAP *in vivo*. Thuật ngữ “làm ổn định” có nghĩa là bất cứ việc gì làm tăng thời gian bán hủy trong huyết thanh, bất kể việc đó là do mức độ phá vỡ giảm, mức độ thanh thải giảm do thận hoặc hiệu quả được động học khác. Sự dung hợp với phần Fc của globulin miễn dịch và albumin huyết thanh đã được biết là tạo ra tính ổn định tăng.

Cần hiểu rằng các thành phần khác nhau của protein dung hợp có thể được sắp xếp theo cách bất kỳ để phù hợp với chức năng mong muốn. Ví dụ, polypeptit SAP có thể là đầu tận cùng C được đặt vào vùng khác loại hoặc theo cách khác, vùng khác loại có thể là đầu tận cùng C được đặt vào polypeptit SAP. Polypeptit SAP và vùng khác loại này không cần phải nằm cạnh nhau trong protein dung hợp và các vùng hoặc các trình tự axit amin bổ sung (ví dụ, các trình tự của nhóm liên kết) có thể được đưa vào đầu tận cùng C hoặc N với vùng khác hoặc giữa các vùng.

Phương pháp tạo ra phân tử N - glycosyl hoá biến đổi

Sáng chế mô tả ở đây các phương pháp tạo ra polypeptit SAP biến thể của người. Các phương pháp này thường bao gồm bước cho polypeptit SAP tiếp xúc với một hoặc nhiều chất hoá học hoặc enzym để tạo ra hoặc cải biến cấu trúc glycosyl hoá trên polypeptit SAP. Các phương pháp này có thể là phương pháp trên cơ sở tế bào hoặc không trên cơ sở tế bào.

Các enzym hữu ích để tạo ra hoặc cải biến cấu trúc glycan là đã được biết rõ trong lĩnh vực này. Phần lớn các enzym/protein hữu ích trong các phương pháp theo sáng chế có thể được phân loại thành một trong hai nhóm chức: glycosyltransferaza và glycosidaza. Glycosyltransferaza (ví dụ, N - axetylglucosaminyl-transferaza, galactosyl-transferaza, fucosyl-transferaza, sialyl-transferaza, glucosyl-transferaza, manosyl-transferaza, v.v) khi được sử dụng trong bản mô tả này để chỉ enzym/protein bất kỳ có khả năng chuyển đường của thể cho đến gốc của thể nhận. Glycosidaza (ví dụ, glucosidaza, manosidaza, N-axetylglucosaminidaza, sialidaza, fucosidaza, v.v), khi được sử dụng trong bản mô tả này, để chỉ enzym/protein bất kỳ có khả năng xúc tác sự thủy phân của liên kết glycosit giữa các gốc đường.

Các phương pháp trên cơ sở tế bào để tạo ra các dạng glyco biến đổi của polypeptit SAP sử dụng các tế bào kiểu đại (ví dụ, tế bào CHO) hoặc tế bào được tạo ra bằng kỹ thuật di truyền có ít nhất một hoạt tính glycosyl hoá được cải biến so với tế bào của người. Các tế bào thích hợp cho phương pháp của sáng chế bao gồm, ví dụ, tế bào nấm, tế bào không nhân (như vi khuẩn, vi khuẩn cổ), tế bào thực vật hoặc tế bào động vật (ví dụ, giun tròn, côn trùng, thực vật, chim, bò sát hoặc động vật có vú (ví dụ, chuột, chuột cống, thỏ, chuột lang, chuột nhảy, chó, mèo, dê, lợn, bò, ngựa, cá voi, khỉ hoặc người)). Các tế bào có thể là tế bào sơ cấp, tế bào được làm bất tử hoặc tế bào được biến nạp. Các tế bào này có thể thu được từ nhiều nguồn thương mại và cơ sở nguồn lực nghiên cứu khác nhau, ví dụ, Bảo tàng giống chuẩn vi sinh vật Mỹ (American Type Culture Collection (Rockville, Md.)). Theo một số khía cạnh, tế bào được sử dụng để tạo ra polypeptit SAP biến thể là tế bào CHO.

Thuật ngữ “hoạt tính glycosyl hoá” để chỉ hoạt tính bất kỳ mà (i) có khả năng bổ sung các glycan được liên kết với N hoặc được liên kết với O vào phân tử đích (như hoạt tính oligosaccharyl-transferaza); (ii) loại bỏ các glycan được liên kết với N hoặc được liên kết với O từ phân tử đích; (iii) cải biến một hoặc nhiều glycan được liên kết với N hoặc được liên kết với O trên phân tử đích; (iv) cải biến oligosacarit liên kết với dolichol; (v) có khả năng hỗ trợ hoạt tính của một hoặc nhiều hoạt tính được nêu trong các mục từ i đến iv. Theo đó, hoạt tính glycosyl hoá

bao gồm, ví dụ, hoạt tính glycosidaza, hoạt tính glycosyltransferaza, tổng hợp đường nucleotit, hoạt tính cải biến hoặc vận chuyển. Sự cải biến một hoặc nhiều glycan được liên kết với N hoặc được liên kết với O trên phân tử đích bao gồm tác dụng của hoạt tính manosylphosphoryl-transferaza, hoạt tính kinaza hoặc hoạt tính phosphataza, ví dụ, hoạt tính manosylphosphoryl-transferaza, kinaza, hoặc hoạt tính phosphataza làm thay đổi trạng thái phosphoryl hoá của glycan trên phân tử đích.

Các tế bào đã xử lý hữu ích trong các phương pháp theo sáng chế có thể có một hoặc nhiều cải biến di truyền bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, (i) loại bỏ gen nội sinh mã hoá protein có hoạt tính glycosyl hoá; (ii) bổ sung axit nucleic tái tổ hợp mã hoá dạng đột biến của protein (ví dụ, protein nội sinh hoặc ngoại sinh) có hoạt tính glycosyl hoá; (iii) bổ sung hoặc biểu hiện phân tử ARN can thiệp vào sự biểu hiện chức năng của protein có hoạt tính glycosyl hoá; (iv) bổ sung axit nucleic tái tổ hợp mã hoá protein kiểu dại (ví dụ, protein nội sinh hoặc ngoại sinh) có hoạt tính glycosyl hoá hoặc (v) biến đổi yếu tố khởi đầu hoặc tăng cường của một hoặc nhiều gen nội sinh mã hoá protein có hoạt tính glycosyl hoá để nhờ đó làm thay đổi sự biểu hiện protein được mã hoá. Các phân tử ARN được mô tả trên đây bao gồm, ví dụ, ARN can thiệp nhỏ (small interfering RNA: siRNA), ARN kẹp tóc ngắn (short hairpin RNA: shRNA), ARN đối nghĩa hoặc vi ARN (micro RNA: miRNA). Cần hiểu rằng mục (ii) gồm, ví dụ, sự thay thế gen nội sinh (ví dụ, bằng cách tái tổ hợp tương đồng) bằng gen mã hoá protein có hoạt tính glycosyl hoá cao hơn so với gen nội sinh được thay thế.

Các tế bào được tạo ra bằng kỹ thuật di truyền được mô tả ở đây có một hoặc nhiều hoạt tính glycosyl hoá được thay đổi như: (i) sự tăng một hoặc nhiều hoạt tính glycosyl hoá trong tế bào được cải biến di truyền, (ii) sự giảm một hoặc nhiều hoạt tính glycosyl hoá trong tế bào được cải biến di truyền, (iii) sự thay đổi về sự khu trú hoặc phân bố nội bào của một hoặc nhiều hoạt tính glycosyl hoá trong tế bào được cải biến di truyền, (iv) sự thay đổi về tỷ lệ của một hoặc nhiều hoạt tính glycosyl hoá trong tế bào được cải biến di truyền so với tế bào không được cải biến có cùng nguồn gốc. Cần hiểu rằng sự tăng lượng hoạt tính glycosyl hoá có thể là do sự biểu hiện quá mức của một hoặc nhiều protein có hoạt tính glycosyl hoá, sự tăng

số lượng bản sao của gen nội sinh (ví dụ, sự nhân đôi gen) hoặc sự thay đổi về yếu tố khởi đầu, yếu tố tăng cường, yếu tố ức chế của gen nội sinh để kích thích sự tăng mức độ biểu hiện của protein được mã hoá bởi gen này. Sự giảm một hoặc nhiều hoạt tính glycosyl hoá có thể là do sự biểu hiện quá mức của dạng đột biến (ví dụ, dạng âm tính trội) của một hoặc nhiều protein có hoạt tính biến đổi glycosyl hoá, sự bổ sung hoặc biểu hiện của một hoặc nhiều phân tử ARN can thiệp làm giảm sự biểu hiện của một hoặc nhiều protein có hoạt tính glycosyl hoá, hoặc sự loại bỏ một hoặc nhiều gen nội sinh mã hoá protein có hoạt tính glycosyl hoá.

Các tế bào được tạo ra bằng kỹ thuật di truyền được sử dụng trong phương pháp theo sáng chế có thể biểu hiện (ví dụ, biểu hiện quá mức) các gen kiểu dại hoặc đột biến mã hoá protein có hoạt tính glycosyl hoá. Các gen này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, ALG7, ALG13, ALG14, ALG1, ALG2, ALG11, RFT1, ALG3, ALG9, ALG12, ALG6, ALG8, ANL1, ALG10, ALG5, OST3, OST4, OST6, STT3, OST1, OST5, WBP1, SWP1, OST2, DPM1, SEC59, OCH1, MNN9, VAN1, MNN8, MNN10, MNN11, HOC1, MNN2, MNN5, MNN6, KTR1, YUR1, MNN4, KRE2, KTR2, KTR3, MNN1, MNS1, MNN4, PNO1, MNN9, glucosidaza I, glucosidaza II hoặc endomannosidaza. Các gen mã hoá protein có hoạt tính glycosyl hoá có thể từ loài bất kỳ (ví dụ, sinh vật có nhân điển hình bậc thấp (ví dụ, nấm (bao gồm cả nấm men) hoặc *Trypanosoma*), sinh vật có nhân nguyên thủy (nghĩa là vi khuẩn hoặc vi khuẩn cổ), thực vật hoặc động vật (ví dụ, côn trùng, chim, bò sát hoặc động vật có vú như chuột hoặc chuột cống, chó, mèo, ngựa, dê, bò, lợn, động vật linh trưởng không phải người hoặc người). Cần hiểu rằng các tế bào được tạo ra bằng kỹ thuật di truyền được sử dụng trong các phương pháp của sáng chế có thể biểu hiện số lượng gen bất kỳ (ví dụ, các gen mã hoá protein có hoạt tính glycosyl hoá) và/hoặc tổ hợp bất kỳ của một hoặc nhiều (ví dụ, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 15 hoặc 20 hoặc nhiều hơn) gen bất kỳ trong số các gen được nêu ở đây. Ngoài ra, các tế bào được tạo ra bằng kỹ thuật di truyền bất kỳ được sử dụng trong các phương pháp theo sáng chế này có thể chứa số lượng đột biến bất kỳ làm thay đổi hoặc phá huỷ một hoặc nhiều hoạt tính glycosyl hoá.

Theo một số phương án, thuật ngữ “sự biểu hiện gen” hoặc “sự biểu hiện” để chỉ các quá trình tế bào mà qua đó polypeptit có hoạt tính sinh học được tạo ra

từ trình tự ADN và có hoạt tính sinh học trong tế bào. Như vậy, sự biểu hiện gen gồm cả quá trình phiên mã và dịch mã, mà cũng bao gồm các quá trình sau phiên mã và sau dịch có thể ảnh hưởng đến hoạt tính sinh học của gen hoặc sản phẩm gen. Các quá trình này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, quá trình tổng hợp, xử lý và vận chuyển ARN, cũng như quá trình tổng hợp, vận chuyển polypeptit và cải biến sau dịch mã polypeptit.

Ví dụ, sáng chế đề xuất quy trình tạo ra polypeptit SAP theo sáng chế bằng cách biểu hiện gen SAP trong tế bào. Theo một số phương án, tế bào này có thể chứa gen SAP nội sinh hoặc mảnh của nó. Theo các phương án khác, polynucleotit mã hoá polypeptit SAP ngoại sinh hoặc mảnh của nó có thể được đưa vào (ví dụ, được biến nạp, chuyển nhiễm, v.v) tế bào. Các polynucleotit SAP thích hợp có thể được đưa vào tế bào bao gồm các mảnh axit nucleic cũng như cấu trúc axit nucleic hoặc vector biểu hiện. Theo các phương án được ưu tiên, gen nội sinh hoặc ngoại sinh này mã hoá polypeptit SAP của người.

Theo một số phương án, mảnh axit nucleic, ví dụ, mã hoá polypeptit SAP của người, được sử dụng để biến nạp tế bào chủ có thể bao gồm vị trí Shine-Dalgarno (ví dụ, vị trí gắn kết với ribosom) và vị trí bắt đầu (ví dụ, codon ATG) để khởi mào sự dịch mã của thông tin đã được phiên mã để tạo ra enzym. Mảnh này cũng có thể bao gồm trình tự kết thúc để kết thúc dịch mã. Trình tự kết thúc thường là một codon mà không có aminoaxetyl-tARN tương ứng với nó, nhờ đó kết thúc quá trình tổng hợp polypeptit. Theo một số phương án, cấu trúc của axit nucleic mã hoá polypeptit SAP có thể được vận chuyển, ví dụ, dưới dạng plasmid biểu hiện mà khi được phiên mã trong tế bào, tạo ra dưới dạng polypeptit SAP.

Theo một số phương án, vector biểu hiện thích hợp chứa trình tự nucleotit mã hoá polypeptit SAP theo sáng chế liên kết hoạt động với ít nhất một trình tự điều hòa. Các trình tự điều hòa là đã biết trong lĩnh vực này và được lựa chọn để định hướng sự biểu hiện của polypeptit bất kỳ trong số các polypeptit theo sáng chế. Theo đó, thuật ngữ trình tự điều hòa bao gồm yếu tố khởi đầu, yếu tố tăng cường và các yếu tố kiểm soát sự biểu hiện khác. Các trình tự điều hòa làm ví dụ được mô tả trong tài liệu của Goeddel; *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology*, Academic Press, San Diego, CA (1990). Chẳng hạn, trình tự kiểm soát sự biểu hiện

bất kỳ để điều hòa sự biểu hiện của một trình tự ADN khi liên kết hoạt động với nó có thể được sử dụng trong các vector này để biểu hiện polypeptit bất kỳ trong số các polypeptit theo sáng chế. Các trình tự kiểm soát sự biểu hiện hữu ích này bao gồm, ví dụ, yếu tố khởi đầu sớm và muộn của SV40, yếu tố khởi đầu *tet*, yếu tố khởi đầu sớm qua trung gian adenovirut hoặc cytomegalovirut, hệ *lac*, hệ *trp*, hệ TAC hoặc TRC, yếu tố khởi đầu T7 có sự biểu hiện được định hướng bởi T7 ARN polymeraza, các vùng của yếu tố điều khiển và yếu tố khởi đầu của thể thực khuẩn lamda, các vùng kiểm soát đối với protein bao fd, yếu tố khởi đầu cho 3-phosphoglyxeryl kinaza hoặc các enzym phân giải đường khác, các yếu tố khởi đầu của axit phosphatase, ví dụ, Pho5, yếu tố khởi đầu của yếu tố gắn α nấm men, yếu tố khởi đầu đa diện của hệ baculovirut và các trình tự khác đã biết để kiểm soát sự biểu hiện của các gen của tế bào có nhân điển hình hoặc tế bào không nhân hoặc các virut của chúng và các tổ hợp khác nhau của chúng. Cần hiểu rằng việc thiết kế vector biểu hiện có thể phụ thuộc vào các yếu tố như việc lựa chọn tế bào chủ cần được biến nạp và/hoặc loại protein mong muốn được biểu hiện. Hơn nữa, số lượng bản sao của vector, khả năng kiểm soát số lượng bản sao này và sự biểu hiện của protein khác bất kỳ được mã hoá bởi vector này như gen đánh dấu kháng sinh, cũng cần được xem xét.

Theo một số phương án, mảnh axit nucleic hoặc hệ biểu hiện được sử dụng để biến nạp tế bào chủ có thể tùy ý chứa một hoặc nhiều trình tự của gen đánh dấu. Nói chung, các trình tự của gen đánh dấu thích hợp thường mã hoá sản phẩm gen, thường là enzym bất hoạt hoặc theo cách khác, phát hiện hoặc được phát hiện bằng hợp chất trong môi trường sinh trưởng. Ví dụ, thể vùi của trình tự gen đánh dấu có thể làm cho tế bào đã biến nạp kháng kháng sinh hoặc nó có thể làm cho sự chuyển hoá đặc hiệu hợp chất trên tế bào đã biến nạp. Ví dụ về các trình tự của gen đánh dấu thích hợp tạo ra tính kháng bao gồm kanamycin, ampicillin, chloramphenicol và tetracycline. Theo cách khác, đúng hơn là áp lực chọn lọc, gen đánh dấu có thể được sử dụng để cho phép phát hiện khuẩn lạc cụ thể chứa gen đó, như β -galactosidase, trong đó cơ chất được sử dụng để cung cấp cho sản phẩm được nhuộm màu.

Nhiều phương pháp khác nhau thích hợp để biến nạp tế bào theo sáng chế

bằng đoạn axit nucleic hoặc vector biểu hiện. Các phương pháp biến nạp thông thường bao gồm đánh thủng bằng điện, biến nạp qua trung gian liposom, biến nạp qua trung gian canxi hoặc chuyển nhiễm qua trung gian virut.

Theo một số khía cạnh, khi một tế bào chủ được biến nạp bằng đoạn axit nucleic hoặc hệ biểu hiện theo sáng chế, gen (ví dụ, SAP của người) trong hệ này có thể được hợp nhất vào ADN nhiễm sắc thể của tế bào chủ bằng phương pháp còn được gọi là tái tổ hợp tương đồng và hệ biểu hiện này sẽ được mang ổn định trong vật chủ.

Để hợp nhất hệ biểu hiện trong vector vào ADN nhiễm sắc thể của tế bào chủ, một gen đánh dấu chọn lọc thích hợp có thể được sử dụng trong đó gen đánh dấu này có trình tự tương đồng với gen trên ADN nhiễm sắc thể của tế bào chủ cụ thể. Các gen đánh dấu chọn lọc cho mục đích này có thể được lựa chọn dễ dàng bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Theo một ví dụ, gen đánh dấu được ưu tiên là gen tồn tại trên nhiễm sắc thể và liên quan với sự trao đổi chất của tế bào chủ. Cụ thể là, tốt hơn nếu sử dụng tế bào chủ đã được cải biến theo cách sao cho gen nêu trên ở trên nhiễm sắc thể sẽ bị bất hoạt bởi phương pháp thích hợp như đột biến. Sau đó, tế bào chủ có thể được tái tổ hợp tương đồng với vector biểu hiện chứa gen nguyên vẹn tương ứng, trong đó chỉ các thể biến nạp chứa gen trao đổi chất bình thường có thể sinh trưởng được chọn lọc. Do đó, nếu gen đánh dấu này đã được đưa vào vector biểu hiện, sự tái tổ hợp tương đồng sẽ diễn ra giữa gen đánh dấu trong vector biểu hiện đó và phần tương ứng của ADN nhiễm sắc thể, nhờ đó cat xet biểu hiện của gen khác loài sẽ được hợp nhất đồng thời vào ADN nhiễm sắc thể.

Theo một số phương án, thuật ngữ "biểu hiện" một protein trong tế bào cũng bao gồm các phương pháp đưa chính protein đó vào tế bào. Vì thế, theo một số khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp tạo ra polypeptit SAP theo sáng chế bằng cách đưa polypeptit SAP vào tế bào. Các kỹ thuật để đưa trực tiếp polypeptit vào tế bào là đã biết trong lĩnh vực này và thường gồm quá trình thấm xuyên qua màng tế bào. Các kỹ thuật này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, vi tiêm polypeptit SAP, bao nang polypeptit SAP trong túi màng (ví dụ, liposom, thể bao nang, xác hồng cầu, thể nguyên sinh, v.v.) và cho chúng tiếp xúc với màng tế bào để nhờ đó tạo

thành sự chuyển nội bào của polypeptit SAP bằng cách dung hợp; bằng cách sử dụng các phương pháp vật lý (ví dụ, phương pháp cơ học, phương pháp hóa học, phương pháp điện tử, v.v.) dựa vào việc các đại phân tử thâm nhập vào tế bào bằng cách khuếch tán qua các lỗ nhanh chóng được đưa vào màng sinh chất của chúng (ví dụ, tải vết, tải giọt, v.v.); và bằng cách hấp thu qua sự nhập nội bào tự nhiên thông qua sự thực bào của tế bào. Phương pháp chuyển nội bào có thể sử dụng con đường qua trung gian thụ thể, trong đó một trong số các thụ thể khác nhau được biểu hiện trên bề mặt tế bào được đặt làm đích và polypeptit SAP được liên kết (cộng hóa trị hoặc không cộng hóa trị) với phối tử đồng gốc có tác dụng làm gốc mang. Một số phương pháp đã được mô tả để đưa protein vào tế bào sống bằng cách sử dụng sự hấp phụ tĩnh điện, trong đó trước tiên, protein này được cation hóa, sau đó được cho tiếp xúc với bề mặt mang điện tích âm của tế bào (xem công bố Bằng độc quyền sáng chế Nhật số 2004/049214).

Theo một số khía cạnh, sáng chế đề xuất tế bào CHO biểu hiện polypeptit SAP. Theo một số phương án, tế bào CHO biểu hiện polypeptit SAP ngoại sinh. Theo các phương án được ưu tiên, tế bào CHO biểu hiện polypeptit SAP của người. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất tế bào CHO chứa trình tự polynucleotit mã hóa polypeptit SAP. Theo các phương án được ưu tiên, trình tự polynucleotit mã hóa polypeptit SAP của người. Kỹ thuật bất kỳ trong số các kỹ thuật nêu trên có thể được sử dụng để “biểu hiện” polypeptit SAP theo sáng chế trong tế bào CHO hoặc tế bào thích hợp khác bất kỳ được mô tả ở đây.

Khi hoạt tính bất kỳ trong số các hoạt tính glycosyl hóa của tế bào kiểu đại hoặc tế bào được tạo ra bằng kỹ thuật di truyền có thể cảm ứng hoặc có điều kiện khi có mặt tác nhân cảm ứng (ví dụ, tác nhân lý học hoặc hóa học), tế bào kiểu đại hoặc tế bào được tạo ra bằng kỹ thuật di truyền có thể, tùy ý, được nuôi cấy với sự có mặt của tác nhân gây cảm ứng trước, trong khi hoặc sau khi đưa axit nucleic mã hóa polypeptit SAP hoặc polypeptit SAP vào. Ví dụ, khi đưa polypeptit SAP vào tế bào có thể được cho tiếp xúc với tác nhân gây cảm ứng hóa học là tác nhân có khả năng kích thích sự biểu hiện của một hoặc nhiều protein có hoạt tính N-glycosyl hóa kiểu đại hoặc biến đổi. Khi nhiều tác nhân cảm ứng gây ra sự biểu hiện có điều kiện của một hoặc nhiều protein có hoạt tính N-glycosyl hóa kiểu đại và/hoặc biến

đổi, tế bào có thể được cho tiếp xúc với nhiều tác nhân gây cảm ứng. Theo một số phương án, môi trường nuôi cấy có thể được cải biến để tạo ra cấu trúc glycan mong muốn trên polypeptit SAP. Ví dụ, nồng độ trong huyết thanh, glucoza và/hoặc lipit (ví dụ, dolichol) của môi trường có thể được cải biến để tạo thành lượng tối ưu của biến thể glyco SAP mong muốn. Theo một số phương án, nhiệt độ, độ pH và/hoặc nồng độ mol của môi trường nuôi cấy có thể được biến đổi để tạo ra lượng tối ưu của biến thể SAP mong muốn.

Polypeptit SAP biến thể theo sáng chế có thể được xử lý tiếp *in vivo* hoặc có thể được xử lý *in vitro* trước hoặc sau khi phân lập từ tế bào hoặc môi trường tế bào. Việc xử lý tiếp theo này có thể bao gồm cải biến một hoặc nhiều gốc glycan của polypeptit SAP hoặc cải biến chính polypeptit SAP chứ không phải chỉ (các) cấu trúc glycan của nó. Theo một số phương án, việc xử lý bổ sung của polypeptit SAP có thể bao gồm việc bổ sung (liên kết cộng hóa trị hoặc không cộng hóa trị) một hoặc nhiều gốc khác loại. Theo một số phương án, việc xử lý bổ sung bao gồm cả xử lý polypeptit SAP bằng phương pháp enzym hoặc hóa học. Phương pháp xử lý bằng enzym có thể gồm bước cho polypeptit SAP tiếp xúc với một hoặc nhiều enzym glycosidaza, phosphodiesteraza, phospholipaza, glycosyltransferaza hoặc proteaza trong thời gian đủ để gây ra sự cải biến, bổ sung hoặc loại bỏ gốc glycan (ví dụ, galactoza, mannoza, fucoza, axit sialic, xyloza, N-axetylglucosamin, v.v.) trên polypeptit SAP. Việc tùy chọn theo yêu cầu của chuỗi oligosacarit được liên kết với N có thể được thực hiện bằng cách cải biến, bổ sung hoặc loại bỏ lần lượt các gốc đường mong muốn, bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã biết rõ trong lĩnh vực này. Sự phân cắt các gốc hydrat cacbon bằng enzym trên các biến thể peptit có thể đạt được bằng cách sử dụng nhiều loại endo- hoặc exo-glycosidaza khác nhau như được mô tả trong tài liệu: Thotakura *et al.*, 1987, Meth. Enzymol. 138: 350. Các phương pháp bổ sung gốc đường làm ví dụ được bộc lộ trong các Bằng độc quyền sáng chế Mỹ số US 5.876.980, 6.030.815, 5.728.554, và 5.922.577.

Theo một số phương án, sự cải biến cấu trúc glycan SAP cần sự có mặt của một hoặc nhiều đường nucleotit. Các đường nucleotit làm ví dụ được sử dụng trong sáng chế này bao gồm nucleotit mono-, di- hoặc triphosphat hoặc chất tương tự của chúng. Theo phương án được ưu tiên, đường nucleotit được cải biến được chọn từ

UDP-glycosit, CMP-glycosit hoặc GDP-glycosit. Đặc biệt tốt nếu đường nucleotit được chọn từ UDP-galatozam UDP-galactosamin, UDP-glucoza, UDP-glucosamin, GDP-mannoza, GDP-fucoza, CMP-axit sialic, CMP-N-axit glycolylneuraminic hoặc CMP-NeuAc. Theo một số phương án, đường nucleotit được cải biến được sử dụng để bổ sung gốc đường được cải biến vào polypeptit SAP. Dẫn xuất N-axetylamin của các đường nucleotit cũng được sử dụng trong phương pháp theo sáng chế.

Việc bổ sung hoặc loại bỏ các gốc glycosyl bằng phương pháp hóa học có thể được tiến hành bằng phương pháp thích hợp bất kỳ. Ví dụ, việc deglycosyl hóa bằng phương pháp hóa học có thể gồm việc cho polypeptit SAP tiếp xúc với axit triflometansulfonic hoặc axit mạnh khác. Việc xử lý này tạo ra sự phân giải phần lớn hoặc tất cả các đường, ngoại trừ đường liên kết (N-axetylglucosamin hoặc N-axetylgalactosamin) trong khi để lại peptit nguyên vẹn. Các phương pháp deglycosyl hóa hóa học được mô tả trong tài liệu: Haldmuddin *et al.*, 1987, Arch. Biochem. Biophys. 259: 52 và Edge *et al.*, 1981, Anal. Biochem. 118: 131. Việc xử lý hóa học có thể bao gồm bước, ví dụ, cho polypeptit SAP biến đổi tiếp xúc với axit, như axit flohydric trong thời gian đủ để gây ra sự cải biến của polypeptit SAP. Việc xử lý bằng axit flohydric, trong các điều kiện nhất định, cụ thể là loại bỏ các gốc mannoza là phosphodiester liên kết với glycan trong khi để lại phosphat trên glycan. Polypeptit SAP đã biến đổi có thể được xử lý thêm bằng cách bổ sung hoặc loại bỏ nhóm phosphat ra khỏi một hoặc nhiều N-glycan. Ví dụ, polypeptit SAP đã biến đổi có thể được cho tiếp xúc với manosyl kinaza hoặc manosyl phosphataza.

Theo một số khía cạnh, mong muốn là chỉ cải biến các gốc đường tận cùng trên cấu trúc glycan polypeptit SAP (oligosacarit được liên kết với N hoặc được liên kết với O). Theo một số phương án, một hoặc nhiều nhánh của cấu trúc glycan SAP được cải biến bằng cách bổ sung, loại bỏ, thay thế hoặc cải biến ít nhất một gốc axit sialic tận cùng. Các phương pháp thích hợp để cải biến các glycan được mô tả ở đây có thể được sử dụng để biến đổi chỉ gốc đường tận cùng trên cấu trúc glycan SAP. Theo một số phương án, gốc axit sialic tận cùng có liên kết $\alpha 2,6$, liên kết $\alpha 2,8$ hoặc liên kết $\alpha 2,9$ được thay thế bằng một hoặc nhiều gốc axit sialic có liên kết $\alpha 2,3$ tận cùng. Theo khía cạnh cụ thể, SAP của người chứa các gốc sialic có

liên kết $\alpha 2,6$ tận cùng được cải biến theo một trong số các phương pháp của sáng chế để thay thế một hoặc nhiều gốc sialic có liên kết $\alpha 2,6$ tận cùng bằng một hoặc nhiều gốc axit sialic có liên kết $\alpha 2,3$. Theo một số phương án, gốc axit sialic có liên kết $\alpha 2,3$ tận cùng được cải biến để bổ sung thêm một hoặc nhiều gốc axit sialic có liên kết $\alpha 2,6$, có liên kết $\alpha 2,8$ và/hoặc có liên kết $\alpha 2,9$.

Theo một số khía cạnh, quy trình tạo ra polypeptit SAP theo sáng chế bao gồm bước thứ nhất là deglycosyl hóa polypeptit SAP. Polypeptit SAP này có thể được deglycosyl hóa một phần hoặc hoàn toàn. Theo một số phương án, bước thứ nhất là deglycosyl hóa này bao gồm việc chỉ loại bỏ các gốc đường tận cùng ra khỏi ít nhất một nhánh của cấu trúc glycan trên polypeptit SAP. Theo một số phương án, bước thứ nhất là deglycosyl hóa này loại bỏ ít nhất một gốc axit sialic có liên kết $\alpha 2,6$. Theo một số phương án, bước thứ nhất là deglycosyl hóa này loại bỏ ít nhất một glycan được liên kết với O. Theo một số phương án, bước thứ nhất là deglycosyl hóa này loại bỏ ít nhất một glycan được liên kết với N. Theo một số phương án, bước thứ nhất là deglycosyl hóa này loại bỏ tất cả các glycan được liên kết với O và được liên kết với N. Theo một số phương án, polypeptit SAP được deglycosyl hóa (một phần hoặc hoàn toàn) được xử lý thêm theo các phương pháp trong bản mô tả, các phương pháp này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, cải biến bằng phương pháp enzym hoặc hóa học một phần hoặc hoàn toàn polypeptit SAP deglycosyl hóa, đưa polypeptit SAP đã deglycosyl hóa một phần hoặc hoàn toàn vào tế bào hoặc tổ hợp của chúng, trong đó (các) phương pháp này tạo ra polypeptit SAP biến thể theo sáng chế. Theo một số phương án, sau khi polypeptit SAP deglycosyl hóa một phần hoặc hoàn toàn đã được đưa vào tế bào, nó có thể được cải biến thêm, *in vivo* hoặc *in vitro*, theo các phương pháp trong bản mô tả để tạo ra polypeptit SAP biến thể theo sáng chế. Tương tự, polypeptit SAP đã deglycosyl hóa một phần hoặc hoàn toàn được cải biến *in vitro* bằng cách sử dụng phương pháp enzym hoặc hóa học được mô tả ở đây có thể được đưa vào tế bào để tạo ra polypeptit SAP biến thể theo sáng chế.

Cần hiểu rằng polypeptit SAP theo sáng chế có thể, nhưng không bắt buộc, được xử lý trong tế bào. Ví dụ, sáng chế cũng đề xuất các phương pháp không liên quan đến tế bào để tạo ra polypeptit SAP biến thể theo sáng chế. Theo một số khía

cạnh, các phương pháp không liên quan đến tế bào bao gồm bước cho polypeptit SAP tiếp xúc với, trong các điều kiện glycosyl hóa, dịch tan tế bào được tạo ra từ tế bào kiểu đại (ví dụ, tế bào nấm, tế bào thực vật hoặc tế bào động vật) hoặc tế bào được tạo ra bằng kỹ thuật di truyền có ít nhất một hoạt tính glycosyl hóa được cải biến, trong đó sự tiếp xúc của polypeptit SAP với dịch tan tế bào, gắn kết oligosacarit, được liên kết với N hoặc được liên kết với O, với polypeptit SAP hoặc cải biến gốc oligosacarit được liên kết với N hoặc được liên kết với O sẵn có trên polypeptit SAP. Cụm từ “điều kiện N-glycosyl hóa” nghĩa là hỗn hợp (ví dụ, của polypeptit SAP và dịch tan tế bào) được ủ trong điều kiện cho phép sự N-glycosyl hóa biến đổi mong muốn xảy ra.

Các phương pháp thích hợp để thu được dịch tan tế bào mà vẫn duy trì hoạt tính hoặc tính toàn vẹn của một hoặc nhiều hoạt tính glycosyl hóa trong dịch tan này có thể bao gồm sử dụng các chất đệm và/hoặc chất ức chế thích hợp, bao gồm cả chất ức chế nucleaza, proteaza và phosphataza để duy trì hoặc làm giảm đến mức tối thiểu sự thay đổi hoạt tính N-glycosyl hóa trong dịch tan tế bào. Các chất ức chế này bao gồm, ví dụ, các chất chelat hóa như axit etylenđiamintetraaxetic (EDTA), axit etylen glycol bis(P-aminoetyl ete) N,N,N1,N1-tetraaxetic (EGTA), các chất ức chế proteaza như phenylmetylsulfonyl florua (PMSF), aprotinin, leupeptin, antipain và các chất ức chế phosphataza như phosphat, natri florua và vanadat. Các chất ức chế có thể được chọn sao cho chúng không làm ảnh hưởng đến hoặc chỉ tác động có hại ở mức tối thiểu đến hoạt tính N-glycosyl hóa hoặc các hoạt tính quan tâm. Các chất đệm và điều kiện thích hợp để thu được dịch tan có hoạt tính enzym được mô tả trong các tài liệu, ví dụ: Ausubel et al. *Current Protocols in Molecular Biology* (Supplement 47), John Wiley & Sons, New York (1999); Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Laboratory Press (1988); Harlow and Lane, *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press (1999); Tietz *Textbook of Clinical Chemistry*, 3rd ed. Burtis and Ashwood, eds. W.B. Saunders, Philadelphia, (1999).

Dịch tan tế bào, nếu cần, có thể được xử lý thêm để loại bỏ hoặc làm giảm đến mức tối thiểu sự có mặt của các cơ chất cản trở. Nếu muốn, dịch tan tế bào có thể được phân đoạn bằng phương pháp bất kỳ trong số nhiều phương pháp đã được

biết rõ đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, bao gồm cất phân đoạn dưới mức tế bào, và các kỹ thuật sắc ký như sắc ký trao đổi ion, sắc ký kỵ nước và pha ngược, sắc ký loại trừ theo kích cỡ, sắc ký ái lực, và sắc ký cảm ứng điện tích-kỵ nước (ví dụ, xem tài liệu: Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice*, third edition, Springer-Verlag, New York (1993); Burton and Harding, J. Chromatogr. A 814:71-81 (1998)) và kỹ thuật tinh chế thích hợp khác bất kỳ.

Dịch tan tế bào có thể được tạo ra sao cho cơ quan tế bào toàn phần vẫn còn nguyên vẹn và/hoặc giữ nguyên chức năng. Ví dụ, dịch tan có thể chứa một hoặc nhiều lưới nội bào tương thô nguyên vẹn, lưới nội bào tương nhẵn nguyên vẹn hoặc thể Golgi nguyên vẹn. Các phương pháp thích hợp để tạo ra các dịch tan chứa các cơ quan tế bào nguyên vẹn và thử nghiệm về chức năng của các cơ quan này được mô tả, ví dụ, trong tài liệu: Moreau *et al.* (1991) J. Biol. Chem. 266(7):4329-4333; Moreau *et al.* (1991) J. Biol. Chem. 266(7):4322-4328; Rexach *et al.* (1991) J. Cell Biol. 114(2):219-229; và Paulik *et al.* (1999) Arch. Biochem. Biophys. 367(2):265-273; bản mô tả của mỗi tài liệu trong số các tài liệu này được đưa vào đây để tham khảo toàn bộ nội dung của chúng.

Polypeptit SAP có thể được cho tiếp xúc với chỉ một protein đã tinh chế có hoạt tính glycosyl hóa. Theo một số phương án, polypeptit SAP có thể được cho tiếp xúc với nhiều hơn một protein đã tinh chế có hoạt tính glycosyl hóa. Một hoặc nhiều protein có hoạt tính glycosyl hóa có thể được tinh chế bằng các kỹ thuật phân lập protein tiêu chuẩn. Polypeptit SAP có thể được cho tiếp xúc với một hoặc nhiều protein trong chất đệm thích hợp trong khoảng thời gian đủ để tạo ra sự cải biến polypeptit SAP như được mô tả trên đây. Polypeptit SAP có thể được cho tiếp xúc với nhiều hơn một protein đồng thời hoặc lần lượt. Khi polypeptit SAP được cho tiếp xúc lần lượt với nhiều hơn một protein có hoạt tính glycosyl hóa, polypeptit SAP này có thể, nhưng không bắt buộc, được tinh chế sau một hoặc nhiều bước. Nghĩa là, polypeptit SAP có thể được cho tiếp xúc với hoạt tính protein “A” và sau đó được tinh chế trước khi cho phân tử này tiếp xúc với hoạt tính protein “B”. Các phương pháp cải biến peptit như vậy là đã biết trong lĩnh vực này, ví dụ, tài liệu: Lee and Park (2002) 30(6):716-720 và Fujita and Takegawa (2001) Biochem. Biophys. Res. Commun. 282(3):678-682, bản mô tả của các tài liệu này được đưa

vào đây để tham khảo toàn bộ nội dung của chúng.

Theo một số khía cạnh, các phương pháp theo sáng chế bao gồm bước phân lập polypeptit SAP, ví dụ, từ tế bào hoặc từ các thành phần của dịch tan tế bào. Nhiều kỹ thuật tiêu chuẩn để phân lập protein là đã biết trong lĩnh vực này. Ví dụ, các phương pháp phân lập polypeptit bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, phương pháp sắc ký loại trừ theo kích cỡ, phương pháp sắc ký pha ngược, phương pháp sắc ký lỏng (ví dụ, HPLC), phương pháp sắc ký ái lực (ví dụ, phương pháp sắc ký ái lực miễn dịch hoặc chelat hóa kim loại), phương pháp sắc ký trao đổi ion, phương pháp sắc ký tương tác-kỵ nước, phương pháp kết tủa, phương pháp hòa tan từng phần, phương pháp kết tủa miễn dịch, phương pháp ly tâm (ví dụ, siêu ly tâm, ly tâm gradien sucroza, v.v.) hoặc tổ hợp bất kỳ của chúng. Theo một số phương án, polypeptit SAP có thể được liên hợp với đuôi ái lực để tạo điều kiện thuận lợi cho sự tinh chế polypeptit. Các đuôi ái lực thích hợp cho việc tinh chế SAP bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, protein gắn kết chitin (chitin binding protein: CBP), protein gắn kết maltoza (maltose binding protein: MBP), glutathion-S-transferaza (glutathione-S-transferase: GST), streptavidin, biotin, và các đuôi poly(His). Các đuôi ái lực có thể được tạo ra dưới dạng một phần của protein tái tổ hợp (nghĩa là dưới dạng protein dung hợp chứa vùng đuôi ái lực khác loại và vùng polypeptit SAP) hoặc được liên kết (cộng hóa trị hoặc không cộng hóa trị) *in vivo* hoặc *in vitro* với polypeptit SAP. Theo một số phương án, nhiều bước tinh chế có thể được sử dụng để phân lập polypeptit SAP. Ví dụ, polypeptit SAP chứa đuôi tinh chế có thể được tinh chế ái lực từ dịch tan tế bào hoặc hỗn hợp nhiều thành phần bằng cách sử dụng phương pháp tinh chế ái lực. Sau đó, polypeptit SAP đã tinh chế ái lực này có thể được tinh chế thêm để loại bỏ các tạp chất không mong muốn nhỏ bất kỳ bằng bước tinh chế bổ sung, ví dụ, phương pháp sắc ký loại trừ theo kích cỡ hoặc RP-HPLC. Khi polypeptit theo sáng chế được tạo ra trong tế bào, polypeptit SAP có thể được phân lập từ chính tế bào này hoặc từ môi trường trong đó tế bào được nuôi cấy. Theo một số phương án, polypeptit SAP theo sáng chế được tạo ra và tiết ra từ tế bào vào môi trường nuôi cấy. Theo các phương án này, việc phân lập có thể gồm bước tách phân đoạn tế bào ra khỏi phân đoạn chứa SAP hòa tan (ví dụ, bằng cách ly tâm).

Theo một số khía cạnh, có thể có lợi nếu liên kết polypeptit SAP với nền pha rắn trước khi cho phân tử đích tiếp xúc với một hoặc nhiều hoạt tính N-glycosyl hóa. Liên kết này có thể cho phép tinh chế dễ dàng hơn khi cải biến N-glycosyl hóa. Các nền pha rắn thích hợp bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các đĩa thử nghiệm có nhiều lỗ, các hạt (ví dụ, hạt được mã hóa hoặc có từ tính), cột sắc ký hoặc màng.

Theo một số phương án, polypeptit bất kỳ trong số các polypeptit SAP đã biến đổi được mô tả ở đây có thể được gắn kết với gốc khác loại bằng cách sử dụng phương pháp enzym hoặc hóa học. Cụm từ “gốc khác loại” để chỉ thành phần bất kỳ được liên kết (ví dụ, cộng hóa trị hoặc không cộng hóa trị) với phân tử đích đã biến đổi, thành phần này khác với thành phần ban đầu có mặt trên polypeptit SAP. Các gốc khác loại bao gồm, ví dụ, các polyme tan hoặc không tan trong nước, các gốc hướng đích, các gốc điều trị, các gốc chẩn đoán và các phân tử sinh học.

Polypeptit SAP theo sáng chế có thể chứa một hoặc nhiều gốc đường “được cải biến”. Nhóm cải biến có thể được gắn kết với gốc đường bằng phương pháp enzym, phương pháp hóa học hoặc tổ hợp của chúng, nhờ đó tạo ra đường được cải biến, ví dụ, galactosa, fucoza hoặc axit sialic được cải biến. Khi axit sialic đã cải biến được sử dụng, sialyl-transferaza hoặc trans-sialidaza có thể được sử dụng trong các phương pháp này. Các đường này có thể được thế ở vị trí bất kỳ cho phép gắn kết gốc cải biến mà vẫn cho phép đường có tác dụng làm cơ chất cho enzym được sử dụng để liên kết đường được cải biến với peptit.

Nói chung, gốc đường và nhóm cải biến được liên kết với nhau bằng cách sử dụng các nhóm có khả năng phản ứng, các nhóm này thường được biến đổi bằng quá trình liên kết vào nhóm chức hữu cơ mới hoặc các gốc không có khả năng phản ứng mới. (Các) nhóm chức có khả năng phản ứng của đường có thể nằm ở vị trí bất kỳ trên gốc đường. Các nhóm có khả năng phản ứng và các loại phản ứng hữu ích để thực hiện sáng chế này thường là các nhóm và loại đã được biết rõ trong lĩnh vực hóa sinh học liên hợp. Các loại phản ứng được ưu tiên hiện nay có thể sử dụng với các gốc đường có khả năng phản ứng là các loại phản ứng diễn ra trong các điều kiện tương đối êm dịu. Các loại phản ứng này gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, phản ứng thế ái nhân (ví dụ, các phản ứng của amin và rượu với halogenua axyl,

este có hoạt tính), các phản ứng thế ái điện tử (ví dụ, các phản ứng enamin) và bổ sung vào các đa liên kết cacbon-cacbon và cacbon-nguyên tử khác (ví dụ, phản ứng Michael, phản ứng Diels-Alder). Các phản ứng này và các phản ứng hữu ích khác được bàn luận, ví dụ, trong tài liệu: Smith and March, *Advanced Organic Chemistry*, 5th Ed., John Wiley & Sons, New York, 2001; Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, San Diego, 1996; và Feeney *et al.*, *Modification of Proteins; Advances in Chemistry Series*, Vol. 198, American Chemical Society, Washington, D.C., 1982.

Các nhóm chức có khả năng phản ứng hữu ích ở cạnh nhân đường hoặc nhóm cải biến bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở: (a) các nhóm cacboxyl và các dẫn xuất khác nhau của chúng (ví dụ, N-hydroxysuccinimide este, N-hydroxybenzotriazol este, axit halogenua, axyl imidazol, thioeste, p-nitrophenyl este, alkyl, alkenyl, alkynyl và este thơm); (b) các nhóm hydroxyl, là các gốc có thể được chuyển hóa thành, ví dụ, este, ete, andehyt, v.v.; (c) các nhóm haloalkyl, trong đó halogenua có thể được thay thế sau đó bằng nhóm ái nhân, ví dụ như amin, anion cacboxyl hóa, anion thiol, cacbanion hoặc ion alkoxit, nhờ đó tạo ra sự liên kết cộng hóa trị của một nhóm mới ở nhóm chức của nguyên tử halogen; (d) các nhóm dienophil, là các nhóm có khả năng tham gia phản ứng Diels-Alder, ví dụ như các nhóm maleimido; (e) các nhóm aldehyt hoặc keton, là các nhóm có thể dẫn xuất hóa sau đó thông qua sự tạo ra các dẫn xuất cacbonyl, ví dụ như imin, hydrazon, semicarbazon hoặc oxime, hoặc thông qua các cơ chế như sự bổ sung Grignard hoặc sự bổ sung alkylolithi; (f) các nhóm sulfonyl halogenua để phản ứng sau đó với các amin, ví dụ, để tạo thành sulfonamid; (g) các nhóm thiol, là các nhóm có thể, ví dụ, được chuyển hóa thành disulfua hoặc được cho phản ứng với alkyl và axyl halogenua; (h) các nhóm amin hoặc sulfhydryl, là các nhóm có thể, ví dụ, được axyl hóa, alkyl hóa hoặc oxy hóa; (i) alken, là nhóm có thể tham gia, ví dụ, phản ứng thêm vòng, phản ứng axyl hóa, phản ứng cộng Micheal, phản ứng trao đổi, phản ứng Heck, v.v.; (j) epoxit, là nhóm có thể phản ứng với, ví dụ, các hợp chất amin hoặc hydroxyl.

Các nhóm chức có khả năng phản ứng có thể được chọn sao cho chúng không tham gia, hoặc không ảnh hưởng đến, các phản ứng cần thiết để tập hợp các

nhân đường có khả năng phản ứng hoặc nhóm cải biến. Theo cách khác, nhóm chức có khả năng phản ứng có thể được bảo vệ khỏi sự tham gia vào phản ứng nhờ sự có mặt của nhóm bảo vệ. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ biết cách bảo vệ nhóm chức cụ thể sao cho nó không ảnh hưởng đến tập hợp các điều kiện phản ứng đã chọn. Ví dụ về các nhóm bảo vệ hữu ích, ví dụ, xem tài liệu: Greene *et al.*, *Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley & Sons, New York, 1991.

Theo một số phương án, đường được cải biến là đường được hoạt hóa. Đường cải biến được hoạt hóa hữu ích trong sáng chế là các glycosit thông thường đã được biến đổi bằng phương pháp tổng hợp để bao gồm cả nhóm rời chuyển được hoạt hóa. Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “nhóm rời chuyển được hoạt hóa” để chỉ các gốc được thay thế một cách dễ dàng trong các phản ứng thế ái nhân được điều hòa bởi enzym. Nhiều loại đường được hoạt hóa là đã biết trong lĩnh vực này. Ví dụ, xem tài liệu: Vocadlo *et al.*, In *Carbohydrate Chemistry and Biology*, Vol. 2, Ernst *et al.* Ed., Wiley-VCH Verlag: Weinheim, Germany, 2000; Kodama *et al.*, *Tetrahedron Lett.* 34: 6419 (1993); Loughheed, *et al.*, *J. Biol. Chem.* 274: 37717 (1999)). Ví dụ về các nhóm rời chuyển như vậy bao gồm flo, clo, brom, tosylat, mesylat, triflat và nhóm tương tự. Các nhóm rời chuyển được hoạt hóa được ưu tiên để sử dụng trong sáng chế là các nhóm không cản trở về không gian đáng kể sự vận chuyển enzym của các glycosit đến thể nhận. Theo đó, các phương án được ưu tiên của các dẫn xuất glycosit được hoạt hóa bao gồm glycosyl florua và glycosyl mesylat, với glycosyl florua được đặc biệt ưu tiên. Trong số các glycosyl florua, α -galactosyl florua, α -manosyl florua, α -glucosyl florua, α -fucosyl florua, α -xylosyl florua, α -sialyl florua, α -N-axetylglucosaminyl florua, α -N-axetylglucosaminyl florua, β -galactosyl florua, β -manosyl florua, β -glucosyl florua, β -fucosyl florua, β -xylosyl florua, β -sialyl florua, β -N-axetylglucosaminyl florua và β -N-axetylgalactosaminyl florua được ưu tiên nhất.

Theo một số khía cạnh, gốc đường được cải biến được liên hợp với một hoặc nhiều polyme tan trong nước. Nhiều polyme tan trong nước là đã biết với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này và hữu ích khi thực hiện sáng chế này. Thuật ngữ polyme tan trong nước bao gồm các gốc như sacarit (ví dụ, dextran, amyloza, axit hyaluronic, poly(axit sialic), heparan, heparin, v.v.); poly(axit amin),

axit nucleic, polyme tổng hợp (ví dụ, poly(axit acrylic), poly(ete), ví dụ, poly(etylen glycol)); peptit, protein và các chất tương tự. Sáng chế có thể được thực hiện với polyme tan trong nước bất kỳ chỉ với giới hạn duy nhất là polyme này phải chứa điểm mà ở đó phần còn lại của thể liên hợp có thể được gắn kết với.

Các phương pháp và hóa chất để hoạt hóa các polyme tan trong nước và các sacarit cũng như các phương pháp để liên hợp các sacarit và polyme với các gốc khác nhau đã được mô tả trong tài liệu chuyên ngành. Các phương pháp thường được sử dụng để hoạt hóa các polyme bao gồm hoạt hóa các nhóm chức bằng xyanogen bromua, periodat, glutarandehyt, bi-epoxit, epichlorhydrin, divinyl sulfon, carbodiimitt, sulfonyl halogenua, triclotriazin, v.v. (xem tài liệu: R. F. Taylor, (1991), *Protein Immobilization, Fundamentals and Applications*, Marcel Dekker, N.Y.; S. S. Wong, (1992), *Chemistry of Protein Conjugation and Crosslinking*, CRC Press, Boca Raton; G. T. Hermanson *et al.*, (1993), *Immobilized Affinity Ligand Techniques*, Academic Press, N.Y.; Dunn, R. L., *et al.*, Eds. *Polymeric Drugs and Drug Delivery Systems*, ACS Symposium Series Vol. 469, American Chemical Society, Washington, D.C. 1991).

Theo một số khía cạnh, gốc đường cải biến được liên hợp với một hoặc nhiều polyme không tan trong nước. Theo một số phương án, sự liên hợp với polyme không tan trong nước có thể được sử dụng để giải phóng peptit điều trị theo cách có kiểm soát. Các hệ giải phóng dược chất polyme là đã biết trong lĩnh vực này. Ví dụ, xem tài liệu: Dunn *et al.*, Eds. *Polymeric drugs and Drug Delivery Systems*, ACS Symposium Series Vol. 469, American Chemical Society, Washington, D.C. 1991. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rằng về cơ bản hệ giải phóng dược chất đã biết bất kỳ có thể áp dụng với các thể liên hợp theo sáng chế.

Các polyme không tan trong nước làm đại diện bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, polyphosphazen, rượu poly(vinyl), polyamit, polycarbonat, polyalkylen, polyacrylamit, polyalkylen glycol, polyalkylen oxit, polyalkylen terephthalat, polyvinyl ete, polyvinyl este, polyvinyl halogenua, polyvinylpyrrolidon, polyglycolit, polysiloxan, polyuretan, poly(metyl metacrylat), poly(etyl metacrylat), poly(butyl metacrylat), poly(isobutyl metacrylat), poly(hexyl

metacrylat), poly(isodexyl metacrylat), poly(lauryl metacrylat), poly(phenyl metacrylat), poly(metyl acrylat), poly(isopropyl acrylat), poly(isobutyl acrylat), poly(octadexyl acrylat) polyetylen, polypropylen, poly(etylen glycol), poly(etylen oxit), poly (etylen terephthalat), poly(vinyl axetat), polyvinyl clorua, polystyren, polyvinyl pyrrolidon, pluronic và polyvinylphenol và các copolyme của chúng.

Các polyme này và các polyme khác được bàn luận ở đây có thể thu được dễ dàng từ các nguồn thương mại như công ty Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo.), Polysciences (Warrenton, Pa.), Aldrich (Milwaukee, Wis.), Fluka (Ronkonkoma, N.Y.), và BioRad (Richmond, Calif.) hoặc được tổng hợp từ các monome thu được từ các nhà cung cấp này bằng cách sử dụng các kỹ thuật chuẩn. Các polyme có thể thoái biến sinh học làm đại diện hữu ích trong các thể liên hợp theo sáng chế bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, polylactit, polyglycolit và các copolyme của chúng, poly(etylen terephthalat), poly(axit butyric), poly(axit valeric), poly(lactit-co-caprolacton), poly(lactit-co-glycolit), polyanhydrit, polyorthoeste, các hỗn hợp và copolyme của chúng. Cụ thể, các thành phần được sử dụng là các thành phần tạo gel, như các thành phần bao gồm collagen và pluronic.

Theo phương án được ưu tiên, một hoặc nhiều gốc đường cải biến được liên hợp với một hoặc nhiều phân tử PEG.

Theo một số khía cạnh, đường cải biến được liên hợp với phân tử sinh học. Phân tử sinh học theo sáng chế có thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các protein chức năng, enzym, kháng nguyên, kháng thể, peptit, axit nucleic (ví dụ, nucleotit sợi đơn hoặc nucleosit, oligonucleotit, polynucleotit và axit nucleic sợi đơn và đa sợi), lectin, thụ thể hoặc tổ hợp của chúng. Về cơ bản, một số phân tử sinh học được ưu tiên không phát huỳnh quang hoặc phát ra lượng huỳnh quang tối thiểu nên chúng không thích hợp để sử dụng làm chất đánh dấu phát huỳnh quang trong thử nghiệm. Các phân tử sinh học khác có thể phát huỳnh quang.

Theo một số phương án, phân tử sinh học là gốc hướng đích. Khi được sử dụng trong bản mô tả này, các thuật ngữ “gốc hướng đích” và “tác nhân hướng đích” để chỉ các gốc sẽ khu trú chọn lọc trong một mô hoặc vùng cụ thể của cơ thể. Theo một số phương án, phân tử sinh học được chọn để định hướng polypeptit SAP theo sáng chế đến một ngăn nội bào cụ thể, nhờ đó làm gia tăng sự vận chuyển

peptit đến ngăn nội bào này so với lượng peptit không được dẫn xuất hóa được vận chuyển đến mô đó. Sự khu trú được trung gian bởi sự nhận biết đặc hiệu của yếu tố quyết định phân tử, kích thích phân tử của tác nhân hoặc thể liên hợp hướng đích, sự tương tác ion, sự tương tác kỵ nước và các yếu tố tương tự. Các cơ chế khác trong việc hướng đích một tác nhân đến một mô hoặc vùng cụ thể là đã biết với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này.

Theo một số phương án, đường được cải biến bao gồm cả gốc điều trị. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rằng có sự trùng lặp giữa lĩnh vực của các gốc điều trị và phân tử sinh học, nghĩa là nhiều phân tử sinh học có đặc tính hoặc tiềm năng điều trị.

Các nhóm gốc điều trị hữu ích bao gồm, ví dụ, các dược chất kháng viêm không steroid; các dược chất kháng viêm steroid; chất phụ trợ; dược chất kháng histamin; dược chất trị ho; dược chất trị ngứa; dược chất chống tiết cholin; dược chất chống nôn và gây buồn nôn; dược chất dùng cho chứng biếng ăn; dược chất kích thích trung tâm; dược chất chống loạn nhịp tim; dược chất ngăn tiết adrenalin β ; dược chất trợ tim; dược chất trị tăng huyết áp; dược chất lợi tiểu; dược chất gây giãn mạch; dược chất gây co mạch; dược chất chống loét; dược chất gây mê; dược chất chống trầm cảm; dược chất an thần và dược chất giảm đau; dược chất chống loạn tâm thần và dược chất kháng khuẩn.

Các gốc dược chất khác hữu ích trong việc thực hành sáng chế bao gồm dược chất chống ung thư, chất diệt tế bào, kháng estrogen và chống chuyển hóa. Nhóm này còn bao gồm các tác nhân trên cơ sở đồng vị phóng xạ để chẩn đoán (ví dụ, chụp hình ảnh) và điều trị bệnh và các độc tố liên hợp.

Gốc điều trị cũng có thể là hormon, tác nhân gây giãn cơ, tác nhân chống co thắt, tác nhân tạo xương, tác nhân điều biến nội tiết, tác nhân điều biến bệnh đái tháo đường, androgen, tác nhân chống tiết liệu hoặc dược chất calcitonin.

Các nhóm cải biến hữu ích khác bao gồm các dược chất điều biến miễn dịch, chất ức chế miễn dịch, v.v.. Các nhóm có hoạt tính kháng viêm, như sulindac, etodolac, ketoprofen và ketorolac cũng được sử dụng. Các dược chất khác được sử dụng kết hợp với sáng chế sẽ trở nên rõ ràng với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này.

Các polypeptit SAP N-glycosyl hóa biến đổi được tạo ra bằng các phương pháp theo sáng chế có thể đồng nhất (nghĩa là mẫu polypeptit SAP không thay đổi về cấu trúc N-glycan cụ thể) hoặc gần như đồng nhất. Cụm từ “gần như đồng nhất” có nghĩa là ít nhất khoảng 25% (ví dụ, ít nhất khoảng 27%, ít nhất khoảng 30%, ít nhất khoảng 35%, ít nhất khoảng 40%, ít nhất khoảng 45%, ít nhất khoảng 50%, ít nhất khoảng 55%, ít nhất khoảng 60%, ít nhất khoảng 65%, ít nhất khoảng 70%, ít nhất khoảng 75%, ít nhất khoảng 80%, ít nhất khoảng 85%, ít nhất khoảng 90%, ít nhất khoảng 95% hoặc ít nhất khoảng 99%) polypeptit SAP có cùng cấu trúc N-glycan cụ thể.

Theo một số phương án, polypeptit SAP biến thể theo sáng chế có nồng độ IC_{50} để ức chế sự biệt hóa của bạch cầu đơn nhân to thành tế bào sợi *in vitro* là thấp hơn $\frac{1}{2}$, thấp hơn $\frac{1}{3}$, thấp hơn $\frac{1}{4}$, thấp hơn $\frac{1}{10}$ hoặc thấp hơn $\frac{1}{100}$ so với mẫu SAP kiểu đại tương ứng được phân lập từ huyết thanh của người. Có nhiều phương pháp đã được biết rõ để xác định mức độ đáp ứng của các tế bào đơn nhân máu ngoại vi (Peripheral Blood Mononuclear Cell: PBMC) hoặc tế bào bạch cầu đơn nhân to với SAP đối với sự biệt hóa tế bào sợi. Các phương pháp này có thể được sử dụng để xác định hiệu lực tương đối của polypeptit bất kỳ trong số các polypeptit SAP biến thể theo sáng chế so với mẫu SAP có nguồn gốc từ huyết thanh của người, polypeptit SAP biến thể bất kỳ khác hoặc chất ức chế hoặc hoạt hóa tế bào sợi khác. Các tế bào PBMC hoặc bạch cầu đơn nhân to thích hợp để sử dụng trong các phương pháp này có thể thu được từ nhiều dòng nuôi cấy mô khác nhau. Theo cách khác, các tế bào thích hợp cho thử nghiệm biệt hóa tế bào sợi có thể thu được từ mẫu sinh học bất kỳ chứa tế bào PBMC hoặc tế bào bạch cầu đơn nhân to. Mẫu sinh học này có thể thu được từ huyết thanh, huyết tương, mô khỏe mạnh hoặc mô sợi. Nói chung, các thử nghiệm biệt hóa tế bào sợi được tiến hành bằng cách ủ tế bào PBMC hoặc tế bào bạch cầu đơn nhân to trong môi trường có nồng độ polypeptit SAP khác nhau để xác định mức độ biệt hóa tế bào sợi. Nồng độ SAP có thể nằm trong khoảng từ 0,0001 $\mu\text{g/ml}$ đến 1 mg/ml và theo một số phương án, nồng độ này bằng 0,001 $\mu\text{g/ml}$, 1,0 $\mu\text{g/ml}$, 5 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$, 15 $\mu\text{g/ml}$, 20 $\mu\text{g/ml}$, 25 $\mu\text{g/ml}$, 30 $\mu\text{g/ml}$, 35 $\mu\text{g/ml}$, 40 $\mu\text{g/ml}$, 45 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$, 200 $\mu\text{g/ml}$, 300 $\mu\text{g/ml}$, hoặc 500 $\mu\text{g/ml}$. Theo một số thử nghiệm, môi trường có thể

được bổ sung thêm khoảng từ 1 đến 100 ng/ml hMCSF, nồng độ được ưu tiên của hMCSF là 25ng/ml. Dấu hiệu cho thấy tế bào PBMC và bạch cầu đơn nhân to đã biệt hóa thành tế bào sợi có thể được xác định bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Nói chung, các tế bào sợi được xác định hình thái là các tế bào dính bám có dạng thể thoi kéo dài và sự có mặt của nhân hình ovan. Theo một số thử nghiệm, các tế bào được cố định và nhuộm bằng Hema 3 trước khi đếm tế bào sợi bằng cách đếm trực tiếp, ví dụ, bằng cách sử dụng kính hiển vi soi ngược. Mức độ biệt hóa của tế bào sợi được cho là dấu hiệu của mức độ đáp ứng tế bào với SAP đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Như được thể hiện qua các ví dụ trong phần mô tả, mức độ ức chế biệt hóa tế bào sợi cao hơn thể hiện mức độ đáp ứng với SAP cao hơn. Phương pháp khác để xác định mức độ biệt hóa của tế bào sợi bao gồm bước xác định sự biểu hiện của chất đánh dấu bề mặt tế bào đặc hiệu với tế bào sợi hoặc các yếu tố tiết, ví dụ, xytokin (ví dụ, IL-1ra, ENA-78/CXCL-5, PAI-1), fibronectin, collagen-1. Các phương pháp phát hiện và/hoặc định lượng chất đánh dấu bề mặt tế bào hoặc yếu tố tiết là đã được biết rõ trong lĩnh vực này, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các kỹ thuật dựa trên thử nghiệm ELISA và FAC khác nhau, bằng cách sử dụng các kháng thể có khả năng phản ứng miễn dịch đối với một hoặc nhiều chất đánh dấu đặc hiệu tế bào sợi. Như được mô tả trong phần ví dụ thực hiện sáng chế, phương pháp xác định mức độ biểu hiện của chemokin có nguồn gốc đại thực bào (Macrophage Derived Chemokine: MDC) là phương pháp hữu hiệu để xác định mức độ biệt hóa của tế bào sợi.

Các phương pháp để phát hiện và/hoặc xác định mức độ N-glycosyl hóa (ví dụ, mức độ N-glycosyl hóa biến đổi) của polypeptit SAP bao gồm phương pháp dựa trên thiết bị giải trình tự ADN (DNA sequencer-assisted: DSA), phương pháp điện di hydrat cacbon dựa trên nhóm huỳnh quang (fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis: FACE) hoặc phương pháp phổ khối kế thời gian bay giải hấp/ion hóa laze tăng cường bề mặt (surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry: SELDI-TOF MS). Ví dụ, phép phân tích có thể sử dụng DSA-FACE trong đó, ví dụ, các glycoprotein được làm biến tính, sau đó cố định trên, ví dụ, màng. Sau đó, glycoprotein có thể được khử bằng chất khử thích hợp như dithiothreitol (DATA) hoặc β -mercaptoethanol.

Các nhóm sulfhydryl của protein có thể được cacboxyl hóa bằng cách sử dụng axit như axit iodoaxetic. Tiếp theo, N-glycan có thể được giải phóng ra khỏi protein bằng cách sử dụng enzym như N-glycosidaza F. Các N-glycan, tùy ý, có thể được tái tạo cấu trúc và dẫn xuất hóa bằng phương pháp amin hóa khử. Sau đó, N-glycan đã dẫn xuất hóa có thể được cô đặc. Trang thiết bị thích hợp để phân tích N-glycan bao gồm, ví dụ, thiết bị giải trình tự ABI PRISM® 377 DNA (Applied Biosystems). Phương pháp phân tích dữ liệu có thể được thực hiện bằng cách sử dụng, ví dụ, chương trình phần mềm GENESCAN®. 3.1 (Applied Biosystems). Tùy ý, mannoprotein phân lập được có thể được xử lý thêm bằng một hoặc nhiều enzym để khẳng định trạng thái N-glycan của nó. Các enzym làm ví dụ bao gồm, ví dụ, α -manosidaza hoặc α -1,2 manosidaza. Các phương pháp bổ sung để phân tích N-glycan bao gồm, ví dụ, phương pháp phổ khối (ví dụ, MALDI-TOF-MS), phương pháp sắc ký lỏng ở áp suất cao (high-pressure liquid chromatography: HPLC) trên pha bình thường, phương pháp sắc ký trao đổi ion và pha ngược (ví dụ, bằng cách phát hiện bằng ampe kế gây xung khi các glycan không được đánh dấu và bằng mức độ hấp phụ UV hoặc sự phát huỳnh quang khi các glycan được đánh dấu thích hợp). Xem thêm tài liệu: Callewaert *et al.* (2001) *Glycobiology* 11(4):275-281 và Freire *et al.* (2006) *Bioconjug. Chem.* 17(2):559-564, bản mô tả của mỗi tài liệu trong số các tài liệu này được đưa vào đây để tham khảo toàn bộ nội dung của chúng.

Các phương pháp điều trị

Theo một khía cạnh, sáng chế mô tả phương pháp điều trị chứng rối loạn đáp ứng với SAP ở bệnh nhân bằng cách cho bệnh nhân cần điều trị sử dụng lượng hữu hiệu có tác dụng điều trị của polypeptit SAP biến thể theo sáng chế. Liều lượng và tần suất của việc điều trị có thể được xác định bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này và sẽ thay đổi tùy thuộc vào các triệu chứng, độ tuổi, thể trọng của bệnh nhân và tính chất và mức độ nặng của rối loạn cần được điều trị hoặc phòng ngừa. Theo một số phương án, polypeptit SAP biến thể được sử dụng cho bệnh nhân một lần hoặc hai lần mỗi ngày, một lần hoặc hai lần mỗi tuần, một lần hoặc hai lần mỗi tháng hoặc chỉ ngay trước khi hoặc ngay khi khởi phát các triệu

chứng.

Liều dùng có thể được xác định dễ dàng bởi các kỹ thuật đã biết với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này hoặc được nêu ở đây. Độc tính và hiệu quả điều trị của SAP có thể được xác định bằng các quy trình thực hành được chuẩn trên động vật thử nghiệm, ví dụ, xác định liều LD₅₀ và ED₅₀. ED₅₀ (Effective Dose 50: liều có hiệu quả 50%) là lượng dược chất cần thiết để tạo ra hiệu quả cụ thể trên 50% số lượng động vật. LD₅₀ (Lethal Dose 50: liều gây chết 50%) là liều dược chất gây chết 50% lượng mẫu.

Theo một số phương án, rối loạn đáp ứng với SAP là sự xơ hóa. Việc sử dụng SAP để điều trị bệnh đối với sự xơ hóa đã được mô tả trong đơn yêu cầu cấp Bằng độc quyền sáng chế Mỹ số US 2007/0243163, tài liệu này được đưa vào đây để tham khảo. Các rối loạn liên quan đến sự xơ hóa có thể điều trị bằng phương pháp theo sáng chế bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, bệnh collagen, bệnh phổi mô kẽ, bệnh phổi xơ hóa ở người (ví dụ, viêm tiểu phế quản tắc nghẽn, bệnh xơ hóa phổi tự phát, bệnh xơ hóa phổi do nguyên nhân bệnh đã biết, mô đờ khối u trong bệnh phổi, bệnh xơ cứng toàn thân ảnh hưởng đến phổi, hội chứng Hermansky-Pudlak, bệnh bụi phổi công nhân than, bệnh bụi amiăng, bệnh bụi silic phổi, bệnh tăng huyết áp động mạch phổi mãn tính, bệnh tăng huyết áp động mạch phổi liên quan đến hội chứng suy giảm miễn dịch mắc phải (AIDS), bệnh sarcoit, bệnh hen mức độ trung bình đến nặng và các bệnh tương tự), bệnh mạch máu xơ hóa, bệnh xơ cứng động mạch, bệnh vữa xơ động mạch, bệnh giãn tĩnh mạch, bệnh nhồi máu mạch vành, bệnh nhồi máu não, bệnh xơ nang cơ tim, bệnh xơ hóa cơ xương khớp, tình trạng dính sau phẫu thuật, bệnh thận ở người (ví dụ, hội chứng viêm thận, hội chứng Alport, bệnh thận liên quan đến bệnh nhiễm virus HIV, bệnh thận đa nang, bệnh Fabry, bệnh thận do sỏi đường, bệnh viêm cầu thận mãn tính, bệnh viêm thận liên quan đến bệnh lupút hệ thống và các bệnh tương tự), bệnh xơ cứng toàn thân tiến triển (progressive systemic sclerosis: PSS), bệnh viêm xơ chai đường mật nguyên phát (primary sclerosing cholangitis: PSC), bệnh xơ hóa gan, bệnh xơ gan, bệnh xơ hóa thận, bệnh xơ hóa phổi, bệnh xơ nang tụy, bệnh mô ghép chống tác chủ, bệnh cơ cứng bì (tại chỗ và toàn thân), bệnh mắt Grave, bệnh vồng mạc do sỏi đường, bệnh tăng nhãn áp, bệnh Peyronie, bệnh xơ hóa dương vật, chứng hẹp

niệu đạo sau khi đặt kính soi bàng quang, hiện tượng dính bên trong sau khi phẫu thuật, sự tạo sẹo, bệnh xơ hóa tủy xương, bệnh xơ hóa sau màng bụng tự phát, bệnh xơ hóa màng bụng do nguyên nhân bệnh đã biết, bệnh ngộ độc nấm cựa gà do được chất gây ra, bệnh xơ hóa liên quan đến bệnh ung thư lành tính hoặc ác tính, bệnh xơ hóa liên quan đến sự nhiễm vi sinh vật (ví dụ, virus, vi khuẩn, ký sinh trùng, nấm, v.v.), bệnh Alzheimer, bệnh xơ hóa do bệnh viêm ruột (bao gồm cả sự tạo thành đoạn hẹp trong bệnh Crohn và bệnh viêm đại tràng vi mô), khối u tế bào đệm, bệnh viêm niêm mạc, bệnh xơ hóa do chấn thương hóa học hoặc môi trường gây ra (ví dụ, liệu pháp hóa trị điều trị ung thư, thuốc trừ sâu hoặc bức xạ (ví dụ, liệu pháp xạ trị điều trị ung thư)).

Theo một số phương án, rối loạn liên quan đến sự xơ hóa được chọn từ bệnh cứng bì toàn thân hoặc tại chỗ, bệnh u sùi, sẹo phì đại, bệnh vữa xơ động mạch, bệnh tái phát hẹp (van tim), bệnh viêm phổi và xơ hóa phổi, bệnh xơ hóa phổi tự phát, bệnh xơ gan, bệnh xơ hóa do nhiễm virus viêm gan B hoặc C mãn tính, bệnh thận, bệnh tim do mô sẹo, bệnh thoái hóa điểm vàng và bệnh vồng mạc thủy tinh thể và vồng mạc. Theo một số phương án, rối loạn liên quan đến sự xơ hóa do các được chất hóa liệu pháp, sự xơ hóa, tổn thương và bỏng do bức xạ. Theo một số phương án, tình trạng bệnh hoặc rối loạn liên quan đến sự xơ hóa do sự tạo sẹo sau khi phẫu thuật, ví dụ, sau khi cắt bó dây hoặc phẫu thuật lọc khác ở mắt.

Theo một số phương án, rối loạn đáp ứng với SAP là rối loạn quá mẫn như các rối loạn do các đáp ứng Th1 hoặc Th2 làm trung gian gây ra. Việc sử dụng SAP làm liệu pháp điều trị bệnh đối với các rối loạn quá mẫn cũng đã được mô tả trong đơn tạm thời nộp ở Mỹ số US 61/209.795, tài liệu này được đưa vào đây để tham khảo. Các rối loạn liên quan tới tình trạng quá mẫn có thể điều trị bằng SAP bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, bệnh viêm mũi dị ứng, bệnh viêm xoang dị ứng, bệnh viêm kết mạc dị ứng, bệnh co thắt phế quản dị ứng, chứng khó thở dị ứng, tình trạng dị ứng tăng lên khi có dịch nhầy tiết ra trong phổi, bệnh viêm da dị ứng, bệnh viêm da, bệnh mày đay, sự phản vệ, bệnh viêm phổi, bệnh hen dị ứng.

Theo một số phương án, polypeptit SAP biến thể theo sáng chế có thể được sử dụng để điều trị các đáp ứng miễn dịch đặc hiệu với dị ứng nguyên như sự phản vệ với các kháng nguyên khác nhau bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các

kháng nguyên kháng vi sinh vật (ví dụ, cephalosporin, sulfonamide, penicillin và các β -lactam khác), thuốc chống co giật (ví dụ, phenytoin, phenobarbital, carbamazepine, dapsone, allopurinol và minocycline), các chất hóa trị liệu (ví dụ, taxane, các hợp chất platin, asparaginaza và epipodophyllotoxin), heparin, insulin, protamine, aspirin và các thuốc kháng viêm không steroid, chất làm giãn cơ (ví dụ, succinylcholine, atracurium, vecuronium, pancuronium), các chất cảm ứng (ví dụ, barbiturate, etomidate, propofol), thuốc ngủ (ví dụ, fentanyl, meperidine, morphine), chất keo để tăng thể tích nội mạch, chất cản quang, sản phẩm từ máu, latec, sản phẩm từ động vật, lông động vật, bộ ve bụi, côn trùng (ví dụ, vết cắn, đốt hoặc nọc độc), mỹ phẩm, kim loại (ví dụ, niken, coban và cromat), thực vật, bào tử, phấn hoa, thực phẩm (ví dụ, sữa, trứng, lúa mì, đậu nành, đậu phộng và các loại hạt cây, hải sản), nấm và vi khuẩn (ví dụ như các chủng *Aspergillus*, *Curvularia*, *Exserohilum* và *Alternaria*).

Theo một số phương án, rối loạn đáp ứng với SAP là rối loạn tự miễn như các rối loạn do sự đáp ứng Th1 hoặc Th2 làm trung gian gây ra. Việc sử dụng SAP làm liệu pháp điều trị bệnh đối với các rối loạn tự miễn cũng đã được mô tả trong đơn tạm thời nộp ở Mỹ số US 61/209.845, tài liệu này được đưa vào đây để tham khảo. Các rối loạn liên quan đến sự tự miễn dịch có thể điều trị bằng SAP bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, bệnh đái tháo đường typ I, bệnh xơ cứng rải rác, bệnh viêm đa khớp dạng thấp, bệnh viêm khớp vảy nến, bệnh viêm cơ tim tự miễn, bệnh pemphigut, bệnh nhược cơ năng, bệnh viêm tuyến giáp Hashimoto, bệnh Graves, bệnh Addison, bệnh viêm gan tự miễn, bệnh viêm khớp Lyme mãn tính, bệnh cơ tim giãn có tính gia đình, bệnh viêm da cơ tuổi thiếu niên, bệnh viêm đa sụn, hội chứng Sjogren, bệnh vảy nến, bệnh viêm khớp tự phát ở thiếu niên, bệnh viêm ruột, bệnh lupút ban đỏ hệ thống, bệnh phổi tắc nghẽn mãn tính, và bệnh mô ghép chống túc chủ.

Theo một số phương án, rối loạn đáp ứng với SAP là bệnh viêm niêm mạc. Việc sử dụng SAP làm liệu pháp điều trị bệnh viêm niêm mạc cũng được mô tả trong đơn yêu cầu cấp Bằng độc quyền sáng chế Mỹ số US 12/217.614, tài liệu này được đưa vào đây để tham khảo. Các phương pháp theo sáng chế có thể hữu ích để điều trị bệnh viêm niêm mạc miệng, thực quản và đường dạ dày-ruột, cũng như

bệnh loét dạ dày tá tràng hoặc viêm loét dạ dày và thực quản.

Theo một số phương án, polypeptit SAP biến thể theo sáng chế có thể được sử dụng để điều trị bệnh hoặc tình trạng viêm. Theo một số phương án, bệnh viêm có thể là bệnh nhiễm virus, vi khuẩn, nấm hoặc ký sinh trùng. Việc sử dụng SAP làm liệu pháp điều trị bệnh nhiễm virus cũng đã được mô tả trong Bằng độc quyền sáng chế Mỹ số US 6.406.698 và trong Công bố đơn quốc tế WO1997/026906, cả hai tài liệu này được đưa vào đây để tham khảo.

Các dược phẩm và dạng bào chế

Theo một số phương án, các phương pháp được mô tả ở đây bao gồm bước cho đối tượng sử dụng ít nhất một polypeptit SAP biến thể theo sáng chế dưới dạng chất điều trị. Các chất điều trị theo sáng chế có thể được bào chế theo cách thuận tiện bằng cách sử dụng một hoặc nhiều chất mang hoặc tá dược chấp nhận được về mặt sinh lý. Ví dụ, các chất điều trị và các muối và solvat của chúng chấp nhận được về mặt sinh lý có thể được bào chế để sử dụng bằng cách, ví dụ, tiêm (ví dụ, tiêm dưới da, tiêm trong cơ, tiêm qua màng bụng), xông hoặc bơm khí (qua đường miệng và mũi) hoặc sử dụng qua đường miệng, trong má, dưới lưỡi, qua da, mũi, ngoài đường tiêu hóa hoặc trực tràng. Theo một số phương án, các chất điều trị có thể được sử dụng khu trú, ở vị trí mà các tế bào đích có mặt, nghĩa là trong mô, cơ quan hoặc dịch cụ thể (ví dụ, máu, dịch não tủy, khối u, v.v.).

Sáng chế còn mô tả việc sử dụng polypeptit SAP biến thể bất kỳ theo sáng chế để sản xuất thuốc dùng để điều trị hoặc phòng ngừa rối loạn hoặc tình trạng bệnh, như được mô tả ở đây, ở bệnh nhân, ví dụ, việc sử dụng polypeptit SAP biến thể để sản xuất thuốc dùng để điều trị hoặc phòng ngừa bệnh hoặc tình trạng bệnh được mô tả ở đây.

Các chất điều trị có thể được bào chế theo nhiều chế độ sử dụng khác nhau, bao gồm sử dụng qua đường toàn thân và tại chỗ hoặc khu trú. Các kỹ thuật và dạng bào chế có thể thường được tìm thấy trong tài liệu: Remington's Pharmaceutical Sciences, Meade Publishing Co., Easton, PA. Để sử dụng ngoài đường tiêu hóa, dạng tiêm được ưu tiên, bao gồm tiêm trong cơ, tiêm trong tĩnh mạch, tiêm trong màng bụng và tiêm dưới da. Để tiêm, các hợp chất có thể được

bào chế ở dạng dịch lỏng, tốt hơn là các chất đệm tương hợp được về mặt sinh lý như dung dịch Hank hoặc dung dịch Ringer. Ngoài ra, các hợp chất có thể được bào chế ở dạng rắn và được hòa tan hoặc tạo huyền phù ngay trước khi sử dụng. Dạng tiêm cũng gồm cả các dạng đông khô nhanh. Theo một số phương án, các chất điều trị có thể được sử dụng cho tế bào bằng nhiều phương pháp khác nhau đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, phương pháp bao nang trong liposom, bằng cách điện di ion, hoặc bằng cách gắn vào các chất dẫn thuốc khác như hydrogel, xyclodextrin, nang nano có thể thoái biến sinh học và vi cầu kết dính sinh học.

Để sử dụng qua đường miệng, dược phẩm có thể ở dạng, ví dụ, các viên nén, viên ngậm hình thoi hoặc viên nang được bào chế bằng các phương pháp thông thường với các tá dược được dùng như các chất kết dính (ví dụ, tinh bột ngô tiền gelatin hóa, polyvinylpyrrolidon hoặc hydroxypropyl methylxenluloza; các chất độn (ví dụ, lactoza, xenluloza vi tinh thể hoặc canxi hydro phosphat); các chất làm trơn (ví dụ, magie stearat, bột talc, silic oxit); các chất phân rã (ví dụ, tinh bột khoai tây hoặc natri tinh bột glycolat) hoặc các chất làm ướt (ví dụ, natri lauryl sulphat). Các viên nén có thể được bao ngoài bằng các phương pháp đã biết rõ trong lĩnh vực này. Sản phẩm dạng lỏng để sử dụng qua đường miệng có thể ở dạng, ví dụ, dung dịch, sirô hoặc huyền phù hoặc chúng có thể ở dạng sản phẩm khô để hòa tan với nước hoặc chất dẫn thuốc thích hợp khác trước khi sử dụng. Các sản phẩm dạng lỏng này có thể được bào chế bằng các phương pháp thông thường với các chất phụ gia được dùng như các chất tạo huyền phù (ví dụ, sirô sorbitol, dẫn xuất xenluloza hoặc chất béo ăn được được hydro hóa); các chất nhũ hóa (ví dụ, lexitin hoặc gôm acaxia), các chất dẫn thuốc không chứa nước (ví dụ, dầu hạnh nhân, este dạng dầu, rượu etylic hoặc dầu thực vật được cắt phân đoạn) và các chất bảo quản (ví dụ, methyl hoặc propyl-p-hydroxybenzoat hoặc axit sorbic). Các dạng sản phẩm này cũng có thể chứa muối đệm, các chất tạo hương vị, tạo màu và làm ngọt thích hợp. Dạng sản phẩm để sử dụng qua đường miệng có thể được bào chế thích hợp để tạo ra sự giải phóng có kiểm soát của hợp chất có hoạt tính.

Để sử dụng bằng cách xông (ví dụ, cung cấp qua đường phổi), các chất điều trị có thể được cung cấp theo cách thuận lợi dưới dạng phun khí dung từ đồ chứa

được gia áp hoặc máy khí dung, có sử dụng chất đẩy thích hợp, ví dụ, diclodiđometan, tricloflometan, diclotetrafloetan, cacbon dioxit hoặc khí thích hợp khác. Trong trường hợp khí dung được nén, đơn vị liều dùng có thể được xác định bằng cách cung cấp một van để vận chuyển lượng xác định. Các viên nang và vỏ nang, ví dụ, gelatin, để sử dụng trong thiết bị xông hoặc bơm khí có thể được bào chế để chứa hỗn hợp bột của hợp chất và chất nền dạng bột thích hợp, như lactoza hoặc tinh bột.

Trong các phương pháp theo sáng chế, dược phẩm cũng có thể được dùng qua đường trong mũi hoặc trong phế quản bao gồm dạng bơm khí, bột và khí dung (ví dụ về dạng hít steroid, xem tài liệu: Rohatagi (1995) *J. Clin. Pharmacology*. 35:1187-1193; Tjwa (1995) *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 75:107-111). Ví dụ, các dạng khí dung có thể được đưa vào trong chất đẩy chấp nhận được đã nén, như diclodiđometan, propan, nitơ và các khí tương tự. Chúng cũng có thể được bào chế dưới dạng dược phẩm ở dạng không nén như trong máy khí dung hoặc máy phun mù. Thông thường, việc sử dụng như vậy là trong chất đệm chứa nước chấp nhận được về mặt dược lý.

Các dược phẩm thích hợp để giải phóng qua đường hô hấp (ví dụ, trong mũi, xông, v.v.) chứa các polypeptit SAP biến thể có thể được bào chế ở cả dạng rắn hoặc lỏng.

Polypeptit SAP theo sáng chế có thể được bào chế để sử dụng ngoài đường tiêu hóa bằng cách tiêm, ví dụ, bằng cách tiêm liều lớn hoặc tiêm truyền liên tục. Các dạng dùng để tiêm có thể được bào chế ở dạng liều dùng đơn vị, ví dụ, trong các ampun hoặc đồ chứa đa liều, cùng với chất bảo quản bổ sung. Các hỗn hợp này có thể ở dạng như huyền phù, dung dịch hoặc nhũ tương trong các chất dẫn thuốc dạng dầu hoặc chứa nước và có thể chứa các chất bào chế như chất tạo huyền phù, chất ổn định và/hoặc chất phân tán. Theo cách khác, thành phần có hoạt tính có thể ở dạng bột để kết hợp với chất dẫn thuốc thích hợp, ví dụ, nước không chứa chất gây sốt vô khuẩn, trước khi sử dụng.

Ngoài ra, polypeptit SAP theo sáng chế cũng có thể được bào chế dưới dạng thuốc tác dụng chậm. Dạng bào chế có tác dụng kéo dài này có thể được sử dụng bằng cách cấy (ví dụ, dưới da hoặc trong cơ) hoặc bằng cách tiêm trong cơ. Vì thế,

ví dụ, các chất điều trị có thể được bào chế với các chất kỵ nước hoặc polyme thích hợp (ví dụ, nhũ tương trong dầu chấp nhận được) hoặc các nhựa trao đổi ion hoặc dưới dạng các dẫn xuất ít tan, ví dụ như muối ít tan. Dạng bào chế giải phóng có kiểm soát cũng bao gồm dạng miếng dán.

Theo một số phương án, các hợp chất được mô tả ở đây có thể được bào chế để giải phóng tới hệ thần kinh trung ương (central nervous system: CNS) (xem tài liệu: Begley, *Pharmacology & Therapeutics* 104: 29-45 (2004)). Các phương pháp thông thường để cung cấp dược chất tới CNS bao gồm: các phương pháp phẫu thuật thần kinh (ví dụ, tiêm trong não hoặc tiêm truyền trong não thất); xử lý phân tử của chất (ví dụ, tạo ra protein dung hợp thể khả năng chứa peptit vận chuyển có ái lực với phân tử bề mặt tế bào nội mô kết hợp với một chất mà bản thân nó không có khả năng vượt qua hàng rào máu não khi nỗ lực khai thác một trong số các con đường vận chuyển nội sinh của hàng rào máu não); các phương thức dược lý được thiết kế để làm tăng độ tan trong lipid của một chất (ví dụ, sự liên hợp của chất tan trong nước với chất mang lipid hoặc cholesterol); và sự phá vỡ tạm thời tính toàn vẹn của BBB bởi sự phá vỡ tăng thẩm thấu (do sự dung hợp của dung dịch manitol vào động mạch cảnh hoặc việc sử dụng chất có hoạt tính sinh học như peptit angiotensin).

Theo một số phương án, polypeptit SAP theo sáng chế được kết hợp vào dạng sản phẩm dùng khu trú chứa chất mang dùng qua đường khu trú thường là thích hợp với việc sử dụng dược chất qua đường khu trú và chứa chất như vậy bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này. Chất mang dùng qua đường khu trú có thể được chọn sao cho tạo cho chế phẩm ở dạng mong muốn, ví dụ, dưới dạng thuốc mỡ, thuốc xức, kem, vi nhũ tương, gel, dầu, dung dịch hoặc các dạng tương tự và có thể chứa chất có trong tự nhiên hoặc có nguồn gốc tổng hợp. Tốt hơn, nếu chất mang được chọn không gây ảnh hưởng bất lợi đến chất có hoạt tính hoặc các thành phần khác của dạng sản phẩm dùng khu trú. Ví dụ về các chất mang dùng qua đường khu trú thích hợp để sử dụng ở đây bao gồm nước, rượu và các dung môi hữu cơ không độc khác, glycerin, dầu khoáng, silicon, vazolin, lanolin, axit béo, dầu thực vật, paraben, sáp và các chất tương tự.

Dược phẩm (bao gồm cả dạng mỹ phẩm) có thể chứa một hoặc nhiều polypeptit SAP biến thể được mô tả ở đây với lượng nằm trong khoảng từ 0,00001 đến 100% như từ 0,001 đến 10% hoặc từ 0,1% đến 5% trọng lượng. Trong một số dạng sản phẩm dùng khu trú, chất có hoạt tính có mặt một lượng nằm trong khoảng từ 0,25% trọng lượng đến 75% trọng lượng của dạng sản phẩm này, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0,25% trọng lượng đến 30% trọng lượng của dạng sản phẩm này, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 0,5% trọng lượng đến 15% trọng lượng của dạng sản phẩm này và tốt nhất là nằm trong khoảng từ 1,0% trọng lượng đến 10% trọng lượng của dạng sản phẩm này.

Các tình trạng bệnh về mắt có thể được điều trị hoặc phòng ngừa, ví dụ, bằng cách tiêm chất điều trị qua đường toàn thân, đường khu trú, trong mắt hoặc bằng cách đưa dụng cụ giải phóng duy trì vào để giải phóng chất điều trị. Polypeptit SAP theo sáng chế có thể được giải phóng trong chất dẫn thuốc dùng cho mắt được dụng như các hợp chất được duy trì tiếp xúc với bề mặt nhãn cầu trong khoảng thời gian đủ để cho phép hợp chất này thấm qua giác mạc và các vùng trong mắt, ví dụ như tiền phòng mắt, kết mạc, hậu phòng mắt, dịch thủy tinh, thủy dịch, thủy tinh dịch, giác mạc, mống mắt/lông mi, thể thủy tinh, màng mạch/võng mạc và củng mạc. Chất dẫn thuốc dùng cho mắt được dụng có thể là, ví dụ, thuốc mỡ, dầu thực vật hoặc chất bao nang. Theo cách khác, các hợp chất có thể được tiêm trực tiếp vào thủy tinh dịch hoặc thủy dịch. Theo phương án khác, các hợp chất có thể được sử dụng qua đường toàn thân, như bằng tiêm hoặc truyền qua đường trong tĩnh mạch, để điều trị bệnh về mắt.

Các chất điều trị được mô tả ở đây có thể được bảo quản trong môi trường không có oxy theo các phương pháp trong lĩnh vực này.

Các dược phẩm làm ví dụ chứa polypeptit SAP cùng với một hoặc nhiều chất mang được dụng và, tùy ý, các thành phần điều trị khác. (Các) chất mang này phải là "chất được dụng" với ý nghĩa là có thể tương hợp với các thành phần khác của dược phẩm và không gây ra tác dụng có hại không chấp nhận được ở đối tượng. Các chất mang này được mô tả ở đây hoặc đã được biết rõ theo cách khác với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực dược lý học. Theo một số phương

án, các dược phẩm không chứa chất gây sốt và thích hợp để sử dụng cho bệnh nhân là người. Theo một số phương án, các dược phẩm này không chứa chất gây kích thích và thích hợp để sử dụng cho bệnh nhân là người. Theo một số phương án, các dược phẩm không chứa dị ứng nguyên và thích hợp để sử dụng cho bệnh nhân là người. Các dược phẩm có thể được bào chế bằng phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp đã biết trong lĩnh vực dược phẩm.

Theo một số phương án, polypeptit SAP được sử dụng ở dạng giải phóng theo thời gian, ví dụ, trong chế phẩm chứa polyme giải phóng chậm. Polypeptit SAP có thể được bào chế với các chất mang để sẽ bảo vệ nó chống lại sự giải phóng nhanh. Các ví dụ bao gồm tá dược giải phóng có kiểm soát, như polyme, hệ giải phóng được bao vi nang hoặc gel gắn kết sinh học. Theo cách khác, sự giải phóng kéo dài của polypeptit SAP có thể đạt được bằng cách đưa các chất làm chậm hấp thu, ví dụ, nhôm monostearat hydrogel và gelatin vào chế phẩm.

Các phương pháp để giải phóng hợp chất axit nucleic là đã biết trong lĩnh vực này (ví dụ, xem tài liệu: Akhtar *et al.*, 1992, Trends Cell Bio., 2, 139; và Delivery Strategies for Antisense Oligonucleotide Therapeutics, ed. Akhtar, 1995; Sullivan *et al.*, Công bố đơn quốc tế số WO 94/02595). Các phương pháp này có thể được sử dụng để giải phóng hợp chất axit nucleic gần như bất kỳ. Các hợp chất axit nucleic có thể được sử dụng cho các tế bào bằng nhiều phương pháp khác nhau đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, phương pháp bao nang trong liposom, liệu pháp ion hóa, hoặc bằng cách kết hợp vào các chất dẫn thuốc khác như hydrogel, cyclodextrin, nang nano có thể thoái biến sinh học và vi cầu gắn kết sinh học. Theo cách khác, tổ hợp axit nucleic/chất dẫn thuốc được giải phóng qua đường khu trú bằng cách tiêm trực tiếp hoặc bằng cách sử dụng bơm tiêm truyền. Các đường giải phóng khác bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, sự giải phóng qua đường miệng (dạng viên nén hoặc viên tròn) và/hoặc qua đường trong màng não tủy (Gold, 1997, Neuroscience, 76, 1153-1158). Các phương pháp khác gồm sử dụng các hệ chất mang và vận chuyển khác nhau, ví dụ, bằng cách sử dụng các thể liên hợp và polyme có thể thoái biến sinh học. Để đánh giá toàn diện về các phương pháp giải phóng được

chất, xem tài liệu: Ho *et al.*, 1999, Curr. Opin. Mol. Ther., 1, 336-343 và Jain, Drug Delivery Systems: Technologies and Commercial Opportunities, Decision Resources, 1998 và Groothuis *et al.*, 1997, J. NeuroVirol., 3, 387-400. Phần mô tả chi tiết hơn về cách sử dụng và giải phóng axit nucleic được thể hiện trong tài liệu: Sullivan *et al.*, trên đây, Draper *et al.*, Công bố đơn quốc tế số WO93/23569, Beigelman *et al.*, Công bố đơn quốc tế số WO99/05094, và Klimuk *et al.*, Công bố đơn quốc tế số WO99/04819.

Các ví dụ sau đây dùng để mô tả đầy đủ hơn cách sử dụng giải pháp theo sáng chế đã mô tả trên đây, cũng như để đưa ra cách thức tốt nhất được dự định để tiến hành các khía cạnh khác nhau của sáng chế. Cần hiểu rằng các ví dụ này không nhằm giới hạn phạm vi thực sự của sáng chế mà đúng hơn là được thể hiện nhằm mục đích minh họa.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: SAP tái tổ hợp có hiệu quả cao hơn so với SAP thu được từ huyết thanh của người.

SAP của người tái tổ hợp được phân lập từ tế bào CHO (rhSAP) và SAP thu được từ huyết thanh của người (hSAP) được thử nghiệm về hoạt tính sinh học bằng cách sử dụng thử nghiệm sinh học *in vitro*. Trong thử nghiệm này, tế bào đơn nhân máu ngoại vi (Peripheral Blood Mononuclear Cell: PBMC) giàu bạch cầu đơn nhân to được ủ với nồng độ khác nhau của rhSAP và hSAP trong 96 giờ. Sau quá trình ủ này, các dịch nổi bề mặt nuôi cấy tạo thành được loại bỏ và thử nghiệm bằng thử nghiệm ELISA để định lượng lượng chemokine có nguồn gốc đại thực bào (Macrophage Derived Chemokine: MDC) được tạo ra. MDC được tạo bởi các tế bào sợi và do đó là dấu hiệu của sự biệt hóa bạch cầu đơn nhân to thành tế bào sợi. Bằng cách so sánh nồng độ ức chế 50% (IC₅₀) của mẫu với chất chuẩn tham chiếu hSAP, có thể xác định được hiệu quả tương đối của biến thể glyco SAP. Kết quả này được thể hiện dưới dạng tỷ lệ IC₅₀ của mẫu so với chất chuẩn tham chiếu hSAP.

Tất cả các mẫu SAP và chất chuẩn được pha loãng ban đầu tới nồng độ

1,0mg/ml trong môi trường FibroLife bổ sung. Các chất chuẩn SAP được pha loãng theo dãy để tạo ra nồng độ chất chuẩn xử lý bằng 60, 30, 20, 13,4, 8,8, 6,0, 3,0, 1,5, và 0,75 $\mu\text{g/ml}$ (nồng độ chất chuẩn cuối bằng 30, 15, 10, 6,7, 4,4, 3,0, 1,5, 0,75 và 0,375 $\mu\text{g/ml}$). Xem bảng 1 dưới đây.

Nồng độ chất chuẩn rhSAP xử lý ($\mu\text{g/ml}$)	Thể tích chất chuẩn	Thể tích môi trường FibroLife bổ sung
60	60 (1mg/ml)	940
30	600 (60 $\mu\text{g/ml}$)	600
20	800 (30 $\mu\text{g/ml}$ chất chuẩn)	400
13,4	800 (20 $\mu\text{g/ml}$ chất chuẩn)	400
8,8	800 (13,4 $\mu\text{g/ml}$ chất chuẩn)	400
6,0	800 (8,8 $\mu\text{g/ml}$ chất chuẩn)	400
3,0	600 (6,0 $\mu\text{g/ml}$ chất chuẩn)	600
1,5	600 (3,0 $\mu\text{g/ml}$ chất chuẩn)	600
0,75	600 (1,5 $\mu\text{g/ml}$ chất chuẩn)	600

Để chuẩn bị cho thử nghiệm ELISA, kháng thể bất giữ (ví dụ, kháng thể của chuột kháng MDC của người) được pha loãng tới nồng độ xử lý trong PBS mà không có protein thể mang. Kháng thể bất giữ đã pha loãng được sử dụng để phủ các đĩa có 96 lỗ và sau đó mỗi lỗ được bịt kín và ủ qua đêm ở nhiệt độ trong phòng. Trước khi sử dụng các đĩa đã phủ, mỗi lỗ được hút và rửa bằng dung dịch đệm rửa, lặp lại quá trình này hai lần trong tổng cộng ba lần rửa. Tiếp theo, các đĩa được phong bế bằng cách cho thêm 300 μl chất pha loãng chất phản ứng vào mỗi lỗ và ủ ở nhiệt độ trong phòng trong một giờ. Sau khi ủ, lặp lại quá trình hút và rửa các lỗ.

Đối với thử nghiệm ELISA, 100 μl mẫu của cả các dịch nổi bề mặt từ môi trường nuôi cấy bạch cầu đơn nhân to/tế bào sợi hoặc chất chuẩn SAP được cho thêm vào mỗi lỗ. Sau đó, đĩa này được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong hai giờ trước khi hút và rửa các lỗ. Tiếp đó, bổ sung 100 μl dung dịch pha loãng xử lý Streptavidin-HRP vào mỗi lỗ. Đĩa này được ủ trong 20 phút ở nhiệt độ trong phòng

trước khi cho thêm 50 μ l dung dịch làm ngừng phản ứng vào mỗi lỗ. Ngay lập tức, mật độ quang học của mỗi lỗ được xác định bằng cách sử dụng đầu đọc vi đĩa được thiết lập tại bước sóng 450nm. Nếu có sự hiệu chỉnh bước sóng, đầu đọc vi đĩa được đặt ở bước sóng 540nm hoặc 570nm. Nếu không có sự hiệu chỉnh bước sóng thì các kết quả đọc được ở bước sóng 540nm hoặc 570nm được trừ đi kết quả đọc được ở bước sóng 450nm. Phép trừ này hiệu chỉnh sai số về mật độ quang học trên đĩa.

Cả RHSAP và hSAP đều được thử nghiệm về hoạt tính sinh học bằng cách sử dụng thử nghiệm này (Fig.1). Tính trung bình, RHSAP có hoạt tính cao gấp 3,4 lần so với hoạt tính của hSAP (giá trị trung bình của 7 thử nghiệm độc lập).

Ví dụ 2: Cải biến cấu trúc glycan SAP

Bằng cách sử dụng các kỹ thuật mô hình hóa glyco *in vitro*, các gốc glycan trên mẫu SAP của người tái tổ hợp (recombinant human SAP: rhSAP) được cải biến để thay thế gốc axit sialic có liên kết α 2,3 tận cùng bằng gốc axit sialic có liên kết α 2,6 (Fig.2, A và B). Tương tự, mẫu SAP thu được từ huyết thanh của người (human serum-derived SAP: hSAP) cũng được cải biến để thay gốc axit sialic có liên kết α 2,6 tận cùng bằng gốc axit sialic có liên kết α 2,3 (Fig.2, C và D). Ngoài ra, do rhSAP được phân lập từ tế bào CHO-S chỉ sialyl hóa một phần, mẫu rhSAP được xử lý để sialyl hóa hoàn toàn cấu trúc glycan được gắn vào bằng gốc axit sialic có liên kết α 2,3 (Fig.2, E và F).

Cả rhSAP và hSAP (Calbiochem Cat#970549) đều được xử lý bằng α 2,3,6,8,9-sialidaza (Sigma Cat #N8271) để desialyl hóa hoàn toàn các polypeptit. Sau khi xử lý bằng sialidaza trong 17 giờ, rhSAP và hSAP đã được desialyl hóa (nghĩa là asialo) được tinh chế bằng cách sử dụng phương pháp sắc ký ái lực phosphoetanolamin (PE) và loại trừ theo kích cỡ (loại Sephadex 200 điều chế). Sau đó, polypeptit SAP asialo đã tinh chế được xử lý bằng enzym bằng cách sử dụng α 2,3- hoặc α 2,6-sialyltransferaza (Calbiochem Cat #566223) với sự có mặt của axit CMP-sialic (Calbiochem Cat #233264) trong 17 giờ ở nhiệt độ 37°C. Bảng dưới đây thể hiện chi tiết về mỗi hỗn hợp phản ứng.

Phản ứng asialo rhSAP (Asialo rhSAP Reactions: Rxns)			
Xử lý bằng $\alpha 2,3$ sialyltransferaza (ST3Gal3)			
	thông số	đơn vị	giá trị
Dung dịch gốc chứa chất phản ứng rhSAP, ST3Gal3	[asialo rhSAP] stk	mg/ml	10,8
	asialo rhSAP MW	g/mol	116293
	[asialo rhSAP] stk	μ M	93
	max [Galactoza]	μ M	929
	[ST3Gal3] stk	mg/ml	0,9
	ST3Gal3 MW	g/mol	84000
	[ST3Gal3] stk	μ M	10,7
	[CMP-SA] stk	mg/ml	25
	CMP-SA MW	g/mol	658,4
	[CMP-SA] stk	mM	38
thể tích rxn	μ l asialo rhSAP trong rxn	μ l	260
	μ l ST3Gal3 trong rxn	μ l	50
	μ l CMP-SA trong rxn	μ l	75
	chất đệm (10mM HEPES/150 mM NaCl, độ pH = 8)	μ l	615
	tot rxn vol	μ l	1000
nồng độ rxn	[asialo rhSAP] rxn	μ M	24,1
	max [Galactoza]	μ M	241
	[SAP] rxn	mg/ml	2,8
	[ST3Gal3] rxn	μ M	0,5357
	[ST3Gal3] rxn	mg/ml	0,045
	[CMP-SA] rxn	mM	2,85
	asialo rhSAP:ST3	tỷ lệ khối lượng	62
	asialo rhSAP:ST3	tỷ lệ mol	45
	CMP-SA:ST3	tỷ lệ mol	5316
	CMP-SA:asialo rhSAP	tỷ lệ mol	118
	CMP-SA:Galactoza	tỷ lệ mol	11,8
Xử lý bằng $\alpha 2,6$ sialyltransferaza (ST6 Rxn)			
	thông số	đơn vị	giá trị
Dung dịch gốc chứa chất phản ứng rhSAP, ST6	[asialo rhSAP] stk	mg/ml	10,8
	asialo rhSAP MW	g/mol	116293
	[asialo rhSAP] stk	μ M	93
	max [Galactoza]	μ M	929
	[ST6] stk	mg/ml	0,205
	ST6 MW	g/mol	42000
	[ST6] stk	μ M	4,9
	[CMP-SA] stk	mg/ml	25

	CMP-SA MW	g/mol	658,4
	[CMP-SA] stk	mM	38
thể tích rxn	µl asialo rhSAP 1 trong rxn	µl	260
	µl ST6 trong rxn	µl	30
	µl CMP-SA trong rxn	µl	75
	đệm (10mM HEPES/150 mM NaCl, pH 8)	µl	635
	tot rxn vol	µl	1000
nồng độ rxn	[asialo rhSAP] rxn	µM	24,1
	max [Galactoza]	µM	241
	[asialo rhSAP] rxn	mg/ml	2,8
	[ST6] rxn	µM	0,146
	[ST6] rxn	mg/ml	0,006
	[CMP-SA] rxn	mM	2,85
	asialo rhSAP:ST6	tỷ lệ khối lượng	457
	asialo rhSAP:ST6	tỷ lệ mol	165
	CMP-SA:ST6	tỷ lệ mol	19448
	CMP-SA:asialo rhSAP	tỷ lệ mol	118
	CMP-SA:Galactoza	tỷ lệ mol	11,8

Asialo hSAP Rxns			
Xử lý bằng α2,3 sialyltransferaza (ST3Gal3)			
	thông số	đơn vị	giá trị
Dung dịch gốc chứa chất phản ứng hSAP, ST3Gal3	[asialo hSAP] stk	mg/ml	5,6
	SAP MW	g/mol	116293
	[asialo hSAP] stk	µM	48
	max [Galactoza]	µM	482
	[ST3Gal3] stk	mg/ml	0,9
	ST3Gal3 MW	g/mol	84000
	[ST3Gal3] stk	µM	10,7
	[CMP-SA] stk	mg/ml	25
	CMP-SA MW	g/mol	658,4
	[CMP-SA] stk	mM	38
thể tích rxn	µl asialo hSAP trong rxn	µl	500
	µl ST3Gal3 trong rxn	µl	50
	µl CMP-SA trong rxn	µl	75
	chất đệm (10mM HEPES/150 mM NaCl, độ pH = 8)	µl	375

	tot rxn vol	µl	1000
nồng độ rxn	[asialo hSAP] rxn	µM	24,1
	max [Galactoza]	µM	241
	[asialo hSAP] rxn	mg/ml	2,8
	[ST3Gal3] rxn	µM	0,54
	[ST3Gal3] rxn	mg/ml	0,045
	[CMP-SA] rxn	mM	2,85
	asialo hSAP:ST3	tỷ lệ khối lượng	62
	asialo hSAP:ST3	tỷ lệ mol	45
	CMP-SA:ST3	tỷ lệ mol	5316
	CMP-SA:asialo hSAP	tỷ lệ mol	118
	CMP-SA:Galactoza	tỷ lệ mol	11,8
	Xử lý bằng α2,6 sialyltransferaza (ST6 Rxn)		
	thông số	đơn vị	giá trị
Dung dịch gốc chứa chất phản ứng hSAP, ST6	[asialo hSAP] stk	mg/ml	5,6
	asialo hSAP MW	g/mol	116293
	[asialo hSAP] stk	µM	48
	max [Galactoza]	µM	482
	[ST6] stk	mg/ml	0,205
	ST6 MW	g/mol	42000
	[ST6] stk	µM	4,9
	[CMP-SA] stk	mg/ml	25
	CMP-SA MW	g/mol	658,4
	[CMP-SA] stk	mM	38
thể tích rxn	µl asialo hSAP trong rxn	µl	500
	µl ST6 trong rxn	µl	30
	µl CMP-SA trong rxn	µl	75
	chất đệm (10mM HEPES/150 mM NaCl, độ pH = 8)	µl	395
	tot rxn vol	µl	1000
nồng độ rxn	[asialo hSAP] rxn	µM	24,1
	max [Galactoza]	µM	241
	[asialo hSAP] rxn	mg/ml	2,8
	[ST6] rxn	µM	0,146
	[ST6] rxn	mg/ml	0,006
	[CMP-SA] rxn	mM	2,85
	asialo hSAP:ST6	tỷ lệ khối lượng	455
	asialo hSAP:ST6	tỷ lệ mol	164

	CMP-SA:ST6	tỷ lệ mol	19448
	CMP-SA:asialo hSAP	tỷ lệ mol	118
	CMP-SA:Galactoza	tỷ lệ mol	11,8

Trong một phản ứng riêng biệt, sự sialyl hóa hoàn toàn của rhSAP bằng cách sử dụng α 2,3-sialyltransferaza không có bước desialyl hóa phân tử trước tiên được thực hiện ở nhiệt độ 37°C trong 17 giờ theo bảng sau.

Xử lý bằng α 2,3 sialyltransferaza (ST3Gal3)			
	thông số	đơn vị	giá trị
dung dịch gốc chứa chất phản ứng rhSAP ST3Gal3	[rhSAP] stk	mg/ml	19,0
	rhSAP MW	g/mol	116293
	[rhSAP] stk	μ M	163
	max [Galactoza]	μ M	1634
	[ST3Gal3] stk	mg/ml	0,9
	ST3Gal3 MW	g/mol	84000
	[ST3Gal3] stk	μ M	10,7
	[CMP-SA] stk	mg/ml	25
	CMP-SA MW	g/mol	658,4
	[CMP-SA] stk	mM	38
thể tích rxn	μ l rhSAP trong rxn	μ l	500
	μ l ST3Gal3 trong rxn	μ l	50
	μ l CMP-SA trong rxn	μ l	100
	chất đệm (10mM HEPES/150 mM NaCl, độ pH = 8)	μ l	350
	tot rxn vol	μ l	1000
nồng độ rxn	[rhSAP] rxn	μ M	81,7
	max [Galactoza]	μ M	817
	[rhSAP] rxn	mg/ml	9,5
	[ST3Gal3] rxn	μ M	0,54
	[ST3Gal3] rxn	mg/ml	0,045
	[CMP-SA] rxn	mM	3,80
	BTA-02-17:ST3	tỷ lệ khối lượng	211
	BTA-02-17:ST3	tỷ lệ mol	152
	CMP-SA:ST3	tỷ lệ mol	7088
	CMP-SA:BTA-02-17	tỷ lệ mol	46
	CMP-SA:Galactoza	tỷ lệ mol	4,6

Sau khi xử lý sialyl hóa, cả biến thể rhSAP và hSAP đã sialyl hóa được tinh chế bằng cách sử dụng phương pháp sắc ký ái lực PE, sau đó thẩm tách vào 10mM NaPi/5% sorbitol, độ pH = 7,5 (chất đệm P5S). Việc khẳng định liên kết axit sialic mong muốn (nghĩa là hSAP có liên kết $\alpha 2,3$ và rhSAP có liên kết $\alpha 2,6$) được thực hiện bằng cách sử dụng cả phương pháp sắc ký lỏng khối phổ (Fig.2; A, C và E) và phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao trao đổi anion (Fig.2, B, D và F) khi xử lý biến thể glyco polypeptit SAP bằng $\alpha 2,3$ sialidaza (Calbiochem Cat#480706) ở nhiệt độ 37°C trong 24 giờ.

Ví dụ 3: thử nghiệm sinh học *in vitro* để xác định hiệu quả ức chế sự biệt hóa của bạch cầu đơn nhân to thành tế bào sợi của biến thể glyco SAP.

rhSAP và hSAP đã tái mô hình hóa glyco được thử nghiệm về hoạt tính sinh học bằng cách sử dụng thử nghiệm sinh học *in vitro* giống như trong ví dụ 1. Tóm lại, các tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC) giàu bạch cầu đơn nhân to được ủ với các nồng độ khác nhau của polypeptit SAP trong 96 giờ. Sau khi ủ, các dịch nổi bề mặt nuôi cấy tạo thành được loại bỏ và phân tích bằng thử nghiệm ELISA để định lượng lượng Chemokin có nguồn gốc đại thực bào (MDC) được tạo ra. Kết quả được thể hiện dưới dạng giá trị IC_{50} của mẫu so với chất chuẩn tham chiếu hSAP và vẽ đồ thị dưới dạng hoạt tính tương đối (hoạt tính tương đối của hSAP=1). Tất cả các chất thử nghiệm chứa liên kết axit sialic $\alpha 2,3$ đều $\geq 2,4$ lần so với hSAP (Fig.3). Hỗn hợp đồng đều của dẫn xuất axit sialic có liên kết $\alpha 2,3$ - và $\alpha 2,6$ của SAP thể hiện mức hoạt tính trung bình giữa SAP có liên kết $\alpha 2,6$ 100% và có liên kết $\alpha 2,3$ 100% như dự đoán (hai cột ngoài cùng bên phải trên Fig.3).

Một phương pháp khác để định lượng mức độ biệt hóa tế bào sợi bao gồm bước đếm trực tiếp số lượng tế bào sợi được tạo ra sau khi bạch cầu đơn nhân to được ủ với chất ức chế tế bào sợi (ví dụ, SAP hoặc biến thể của nó) hoặc chất hoạt hóa (ví dụ, M-CSF). Trong một thử nghiệm, bạch cầu đơn nhân to được tinh chế từ PBMC có nguồn gốc từ máu toàn phần bằng cách sử dụng tiêu chuẩn lựa chọn hạt từ tính âm trong lĩnh vực (ví dụ, CAT# 113-41D, Invitrogen, Carlsbad, CA) và được nuôi cấy trong đĩa nuôi cấy mô có 96 lỗ chứa môi trường FibroLife được bổ sung M-CSF 25 ng/ml hoặc 50 ng/ml ba lần. Đĩa này được ủ trong 96 giờ ở nhiệt

độ 37°C trong tủ áp chứa 5% CO₂. Sau đó, tế bào được cố định bằng paraformaldehyt và nhuộm bằng thuốc nhuộm Hema 3 (Cat # 122-911, Hema 3 Stain, Fisher Scientific, Hampton, NH). Số lượng tế bào sợi trong mỗi lỗ được xác định bằng cách cộng tổng số lượng trong năm phần khác nhau trong mỗi lỗ bằng cách sử dụng kính hiển vi soi ngược. Các tế bào sợi được xác định hình thái học dưới dạng các tế bào bám dính có dạng thể thoi kéo dài và sự có mặt của nhân hình ovan. Số liệu cho thấy rằng cả M-CSF 25 ng/ml và 50 ng/ml đều đủ để làm tăng số lượng tế bào sợi biệt hóa từ bạch cầu đơn nhân to bằng khoảng ~50% trong thể cho này (Fig.4). Các thử nghiệm tiếp theo sử dụng môi trường FibroLife được bổ sung M-CSF 25ng/ml, nếu cần và được xác định dưới đây.

Môi trường FibroLife: (Cat # LM-0001, Lifeline Cell Technology, Walkersville, MD) được bổ sung HEPES 10mM (Cat # H0887, Sigma-Aldrich), 1 x axit amin không thiết yếu (Cat # M7145, Sigma-Aldrich), natri pyruvat 1mM (Cat # S8636, Sigma-Aldrich), glutamin 2mM (Cat # 25030-149, Invitrogen), penicillin 100 U/ml và streptomycin 100 ug/ml (Cat # P0781, Sigma-Aldrich) và ITS-3 (Cat # I2771, albumin huyết thanh bò 500 ug/ml, insulin 10 ug/ml, transferrin 5 ug/ml, natri selenit 5 ng/ml, axit linoleic 5 ug/ml và axit oleic 5 ug/ml; Sigma-Aldrich).

Theo một thử nghiệm bổ sung, PBMC hoặc bạch cầu đơn nhân to được tinh chế từ máu toàn phần và được nuôi cấy trong môi trường FibroLife được bổ sung các lượng khác nhau của SAP ba lần (như đã mô tả trên đây). Đĩa này được ủ trong 96 giờ ở nhiệt độ 37°C trong tủ áp chứa 5% CO₂. Sau đó, các tế bào được cố định bằng paraformaldehyt và nhuộm bằng thuốc nhuộm Hema 3 (Cat # 122-911, Hema 3 Stain, Fisher Scientific, Hampton, NH). Số lượng tế bào sợi trong mỗi lỗ được xác định bằng cách cộng tổng số lượng của năm phần khác nhau trong mỗi lỗ bằng cách sử dụng kính hiển vi soi ngược. Nồng độ SAP tối thiểu cần thiết để tạo ra mức độ ức chế tối đa sự biệt hóa tế bào sợi trong hệ này được xác định là 2ug/ml (Fig.5). Số lượng tế bào sợi giảm đi khi tăng nồng độ SAP ở tất cả các thể cho.

Tài liệu tham khảo

Tất cả các tài liệu công bố và tài liệu sáng chế được đề cập ở đây được đưa vào đây để tham khảo toàn bộ nội dung của chúng như khi mỗi tài liệu công bố và tài liệu sáng chế này được chỉ ra cụ thể và riêng rẽ là được đưa vào để tham khảo.

Trong khi các phương án cụ thể của đối tượng đã được bàn luận, bản mô tả trên đây chỉ là minh họa và không làm giới hạn. Nhiều phương án sẽ trở nên rõ ràng với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này khi xem bản mô tả này và các điểm yêu cầu bảo hộ được liệt kê dưới đây. Phạm vi đầy đủ của sáng chế cần được xác định dựa vào các điểm yêu cầu bảo hộ cùng với phạm vi đầy đủ của các phương án tương đương, và bản mô tả cùng với các phương án này.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Protein tinh bột huyết thanh P (Serum Amyloid P: SAP) của người tái tổ hợp đã glycosyl hóa chứa chuỗi oligosacarit được liên kết với N, trong đó tất cả các nhánh đã sialyl hóa của chuỗi oligosacarit kết thúc bằng các gốc axit sialic có liên kết $\alpha 2,3$, trong đó chuỗi oligosacarit được liên kết với N không chứa các gốc axit sialic có liên kết $\alpha 2,6$, trong đó protein chứa polypeptit có trình tự axit amin SEQ ID NO:1, và trong đó protein này ức chế sự biệt hóa của bạch cầu đơn nhân to thành tế bào sợi *in vitro*.
2. Protein theo điểm 1, trong đó chuỗi oligosacarit được liên kết với N chứa nhân pentasacarit $\text{Man}[(\alpha 1,6)-(\text{Man}(\alpha 1,3))-\text{Man}(\beta 1,4)-\text{GlcNAc}(\beta 1,4)-\text{GlcNAc}(\beta 1,N)-\text{Asn}]$.
3. Protein theo điểm 1 hoặc 2, trong đó chuỗi oligosacarit chứa ít nhất một nhánh có cấu trúc $\text{NeuNAc}2\alpha 3\text{Gal}\beta 4\text{GlcNAc}\beta 2\text{Man}\alpha 6$.
4. Protein theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó protein này chứa một hoặc nhiều gốc axit amin cải biến được chọn từ: axit amin PEGyl hóa, axit amin prenyl hóa, axit amin axetyl hóa, axit amin biotiny l hóa và/hoặc axit amin liên hợp với chất dẫn xuất hóa hữu cơ.
5. Protein theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó protein này có nồng độ IC₅₀ để ức chế sự biệt hóa của bạch cầu đơn nhân to thành các tế bào sợi *in vitro* thấp hơn một nửa so với giá trị này của mẫu SAP kiểu đại tương ứng được phân lập từ huyết thanh của người.
6. Dược phẩm thích hợp để sử dụng cho động vật có vú chứa protein theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5 và chất mang dược dụng.
7. Phương pháp tạo ra protein SAP của người tái tổ hợp chứa chuỗi oligosacarit

được liên kết với N, trong đó tất cả các nhánh đã sialyl hóa của chuỗi oligosacarit kết thúc bằng các gốc axit sialic có liên kết $\alpha 2,3$, và trong đó chuỗi oligosacarit được liên kết với N không chứa các gốc axit sialic có liên kết $\alpha 2,6$, phương pháp này bao gồm các bước:

- i) biểu hiện tái tổ hợp polypeptit SAP của người trong tế bào buồng trứng chuột đồng Trung Quốc (Chinese Hamster Ovary: CHO), trong đó polypeptit này chứa trình tự axit amin SEQ ID NO:1; và
- ii) phân lập protein SAP của người từ tế bào này.

8. Phương pháp theo điểm 7, trong đó protein SAP của người được phân lập có nồng độ IC₅₀ để ức chế sự biệt hóa của bạch cầu đơn nhân to thành tế bào sợi *in vitro* thấp hơn một nửa so với giá trị này của mẫu SAP kiểu đại tương ứng được phân lập từ huyết thanh của người.

9. Phương pháp tạo ra protein SAP tái tổ hợp chứa chuỗi oligosacarit được liên kết với N, phương pháp này bao gồm các bước:

- i) cung cấp protein SAP tái tổ hợp chứa trình tự axit amin SEQ ID NO:1, và
- ii) biến đổi bằng phương pháp enzym hoặc hóa học protein SAP tái tổ hợp để tạo ra protein SAP được glycosyl hóa chứa oligosacarit được liên kết với N, trong đó tất cả các nhánh đã sialyl hóa của chuỗi oligosacarit kết thúc bằng các gốc axit sialic có liên kết $\alpha 2,3$, và trong đó chuỗi oligosacarit được liên kết với N không chứa gốc axit sialic có liên kết $\alpha 2,6$.

10. Phương pháp theo điểm 9, trong đó protein này có nồng độ IC₅₀ để ức chế sự biệt hóa của bạch cầu đơn nhân to thành tế bào sợi *in vitro* thấp hơn một nửa so với giá trị này của mẫu SAP kiểu đại tương ứng được phân lập từ huyết thanh của người.

11. Protein SAP của người chứa chuỗi oligosacarit được liên kết với N, trong đó tất cả các nhánh đã sialyl hóa của chuỗi oligosacarit kết thúc bằng các gốc axit sialic có liên kết $\alpha 2,3$, và trong đó chuỗi oligosacarit được liên kết với N này

không chứa các gốc axit sialic có liên kết $\alpha 2,6$, được tạo ra bởi quy trình bao gồm các bước:

- i) biểu hiện tái tổ hợp polypeptit SAP của người trong tế bào CHO, trong đó polypeptit này chứa trình tự axit amin SEQ ID NO:1; và
- ii) phân lập protein SAP từ tế bào này.

12. Protein theo điểm 11, trong đó protein này có nồng độ IC₅₀ để ức chế sự biệt hóa của bạch cầu đơn nhân to thành tế bào sợi *in vitro* thấp hơn một nửa so với giá trị này của mẫu SAP kiểu đại tương ứng được phân lập từ huyết thanh của người.

13. Tế bào CHO chứa protein SAP của người tái tổ hợp có chuỗi oligosacarit được liên kết với N, trong đó tất cả các nhánh đã sialyl hóa của chuỗi oligosacarit kết thúc bằng các gốc axit sialic có liên kết $\alpha 2,3$, và trong đó chuỗi oligosacarit được liên kết với N này không chứa các gốc axit sialic có liên kết $\alpha 2,6$, và trong đó protein này chứa polypeptit có trình tự axit amin SEQ ID NO:1.

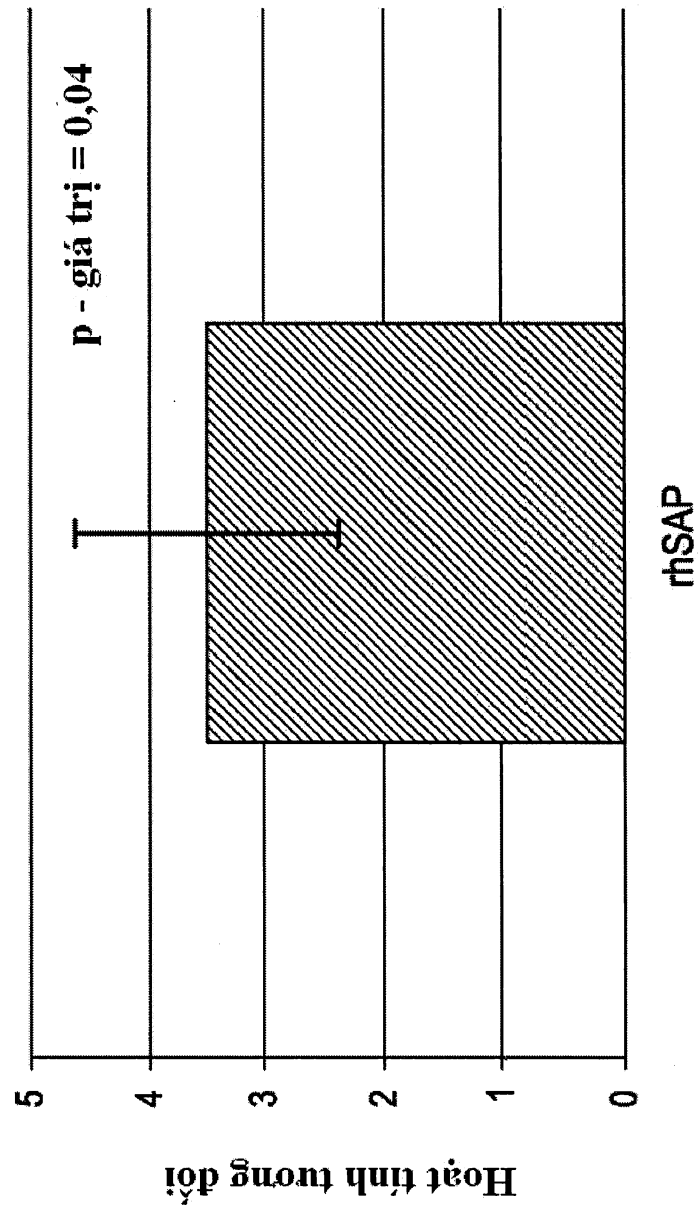


FIG. 1

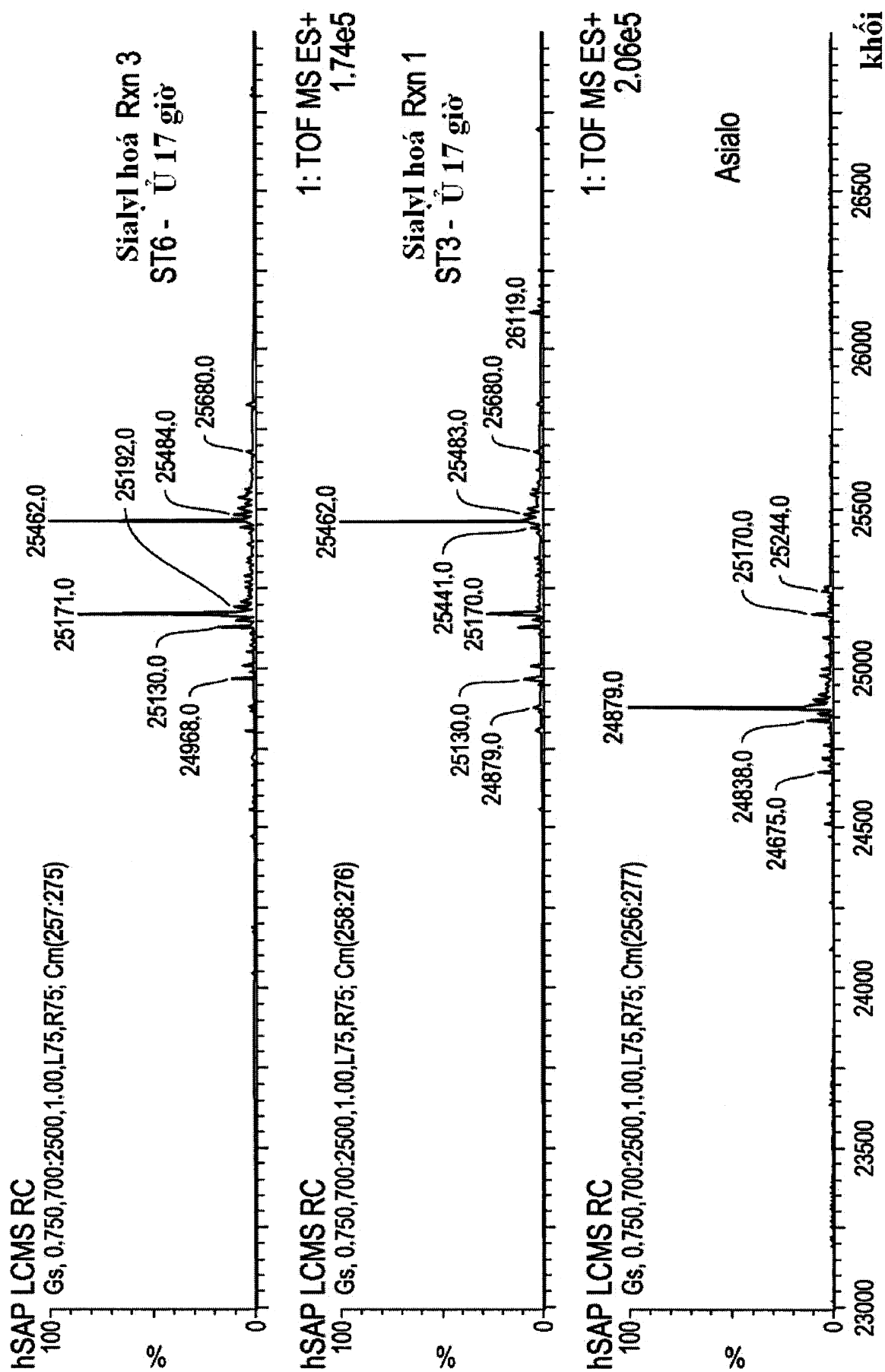


FIG. 2A

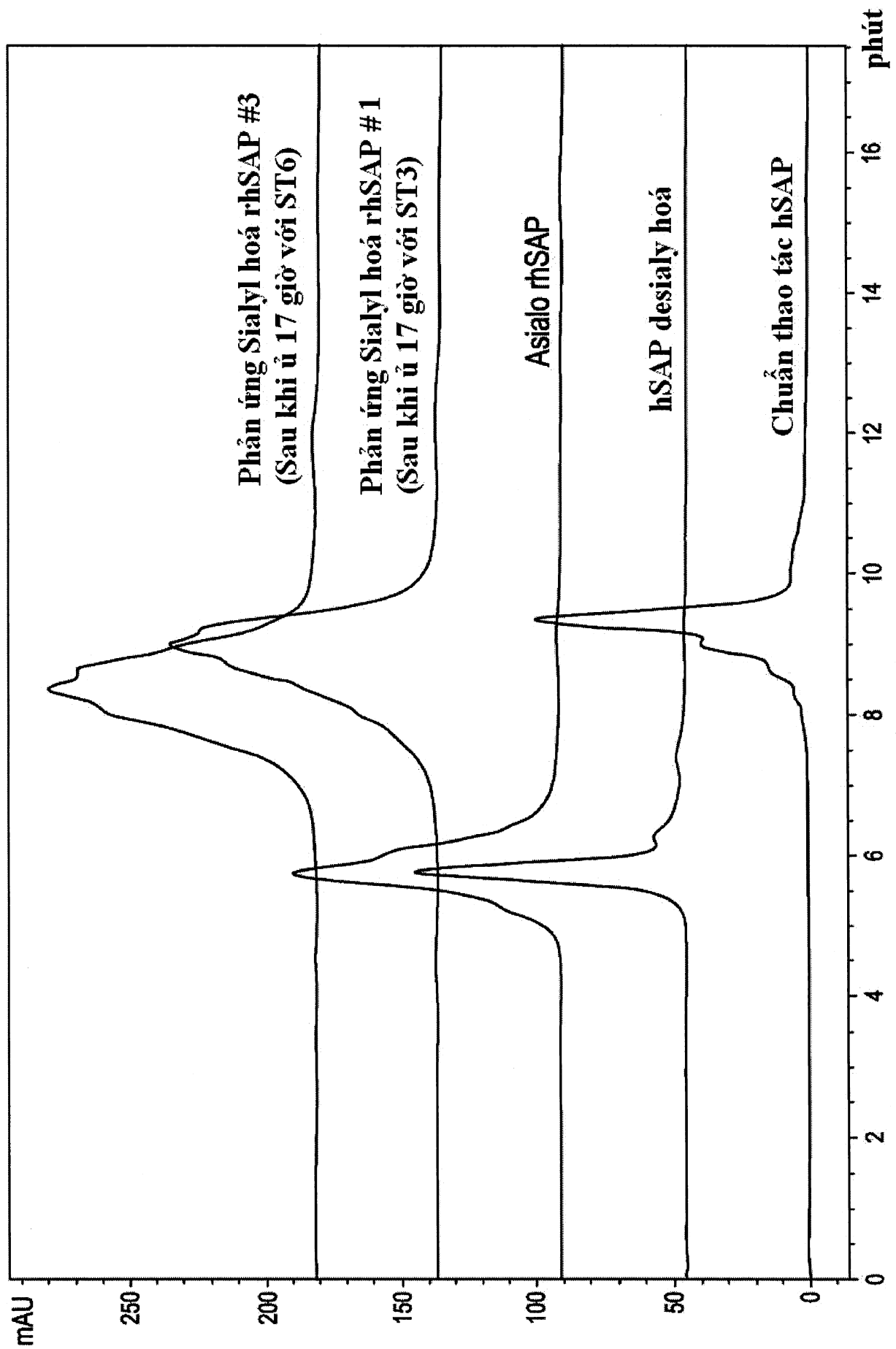


FIG. 2B

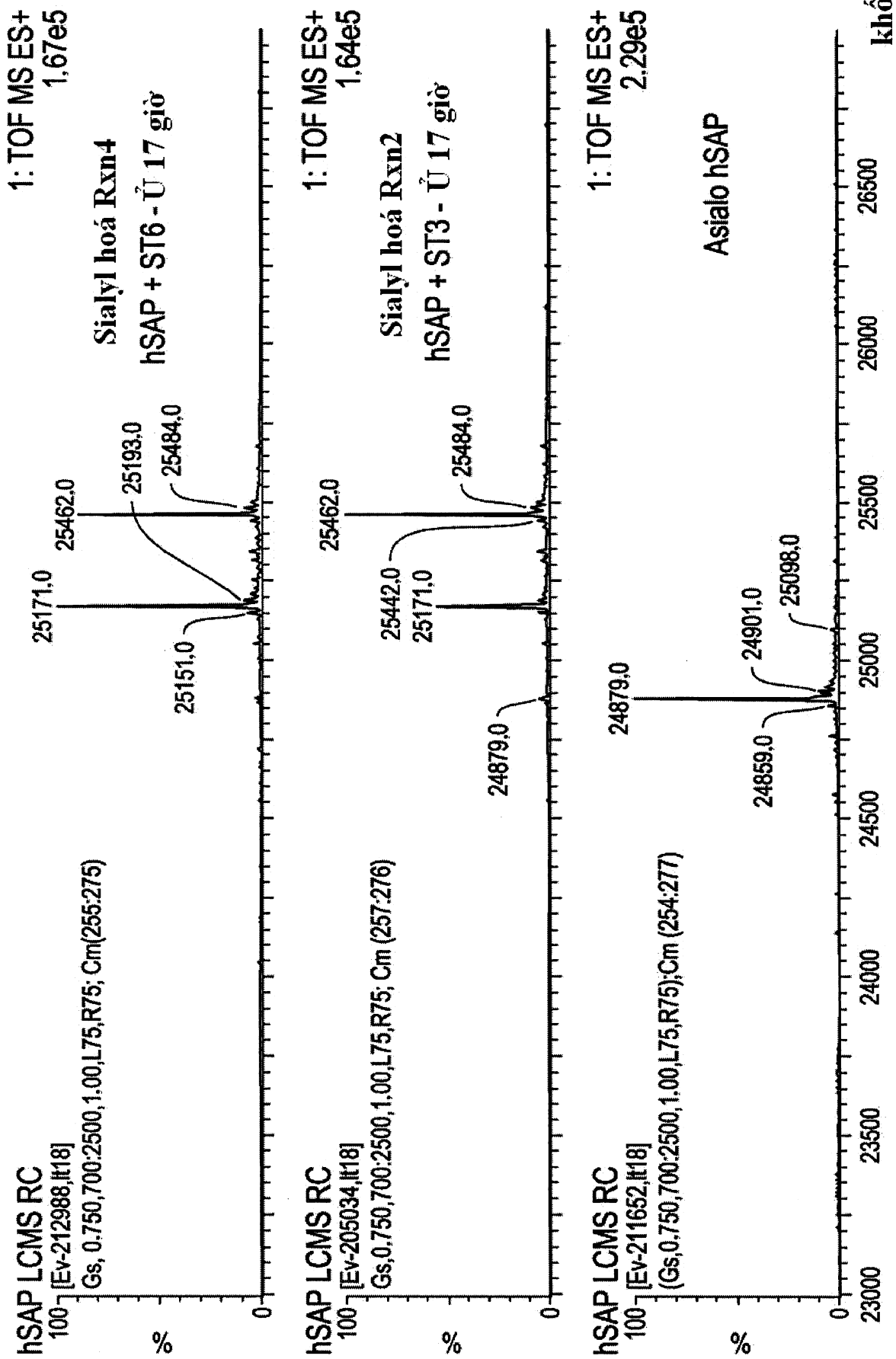


FIG. 2C

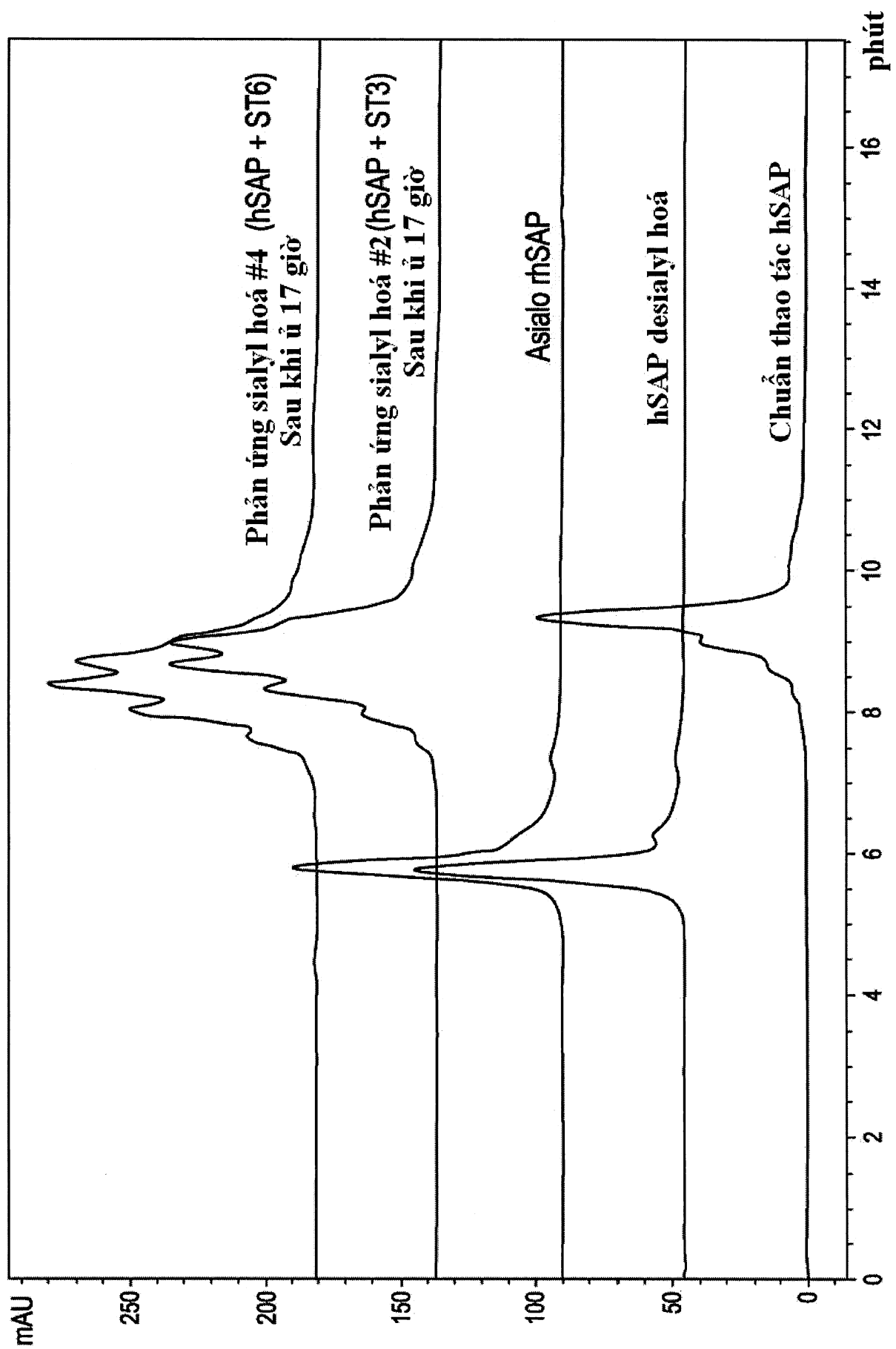


FIG. 2D

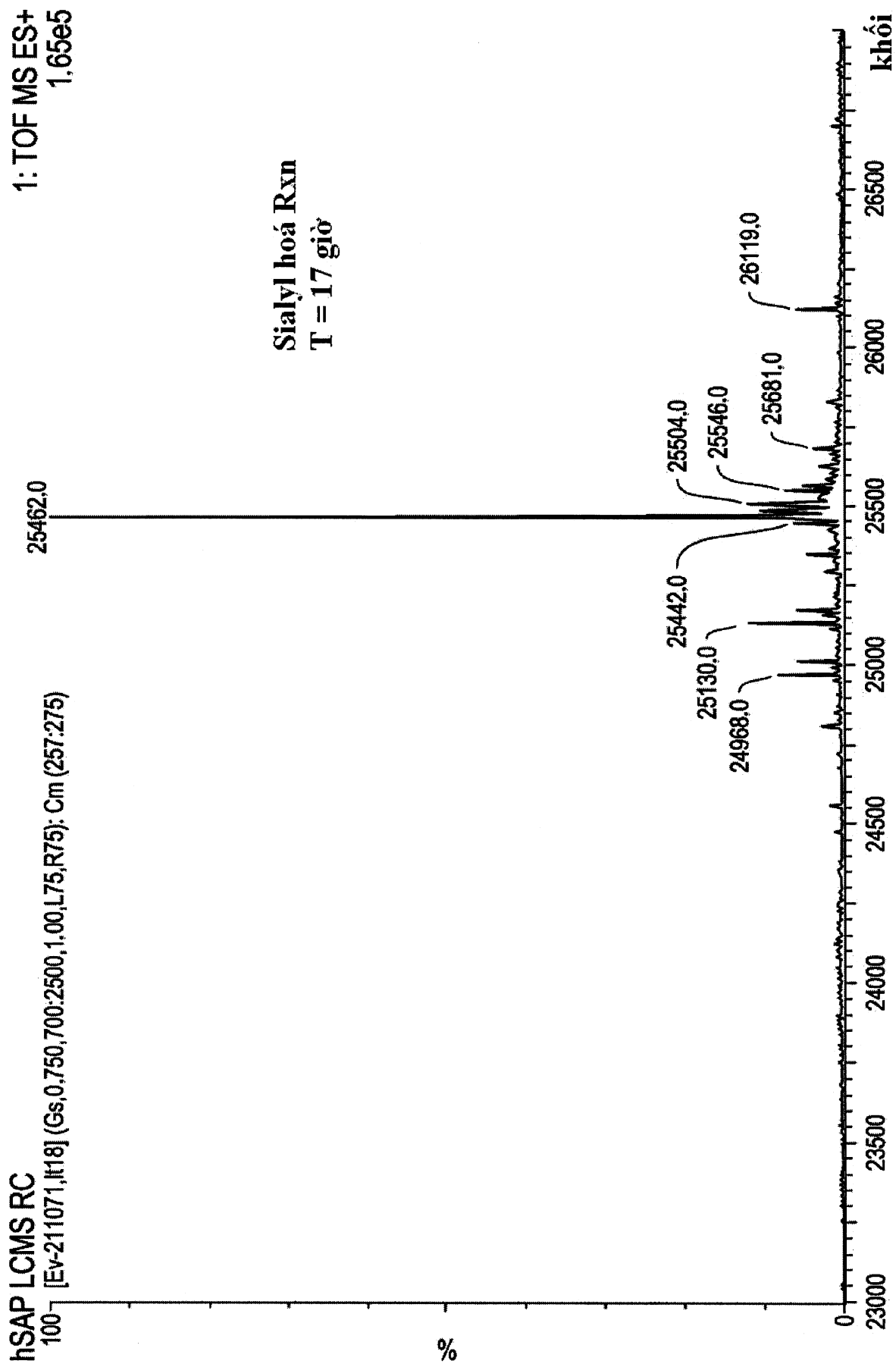


FIG. 2E

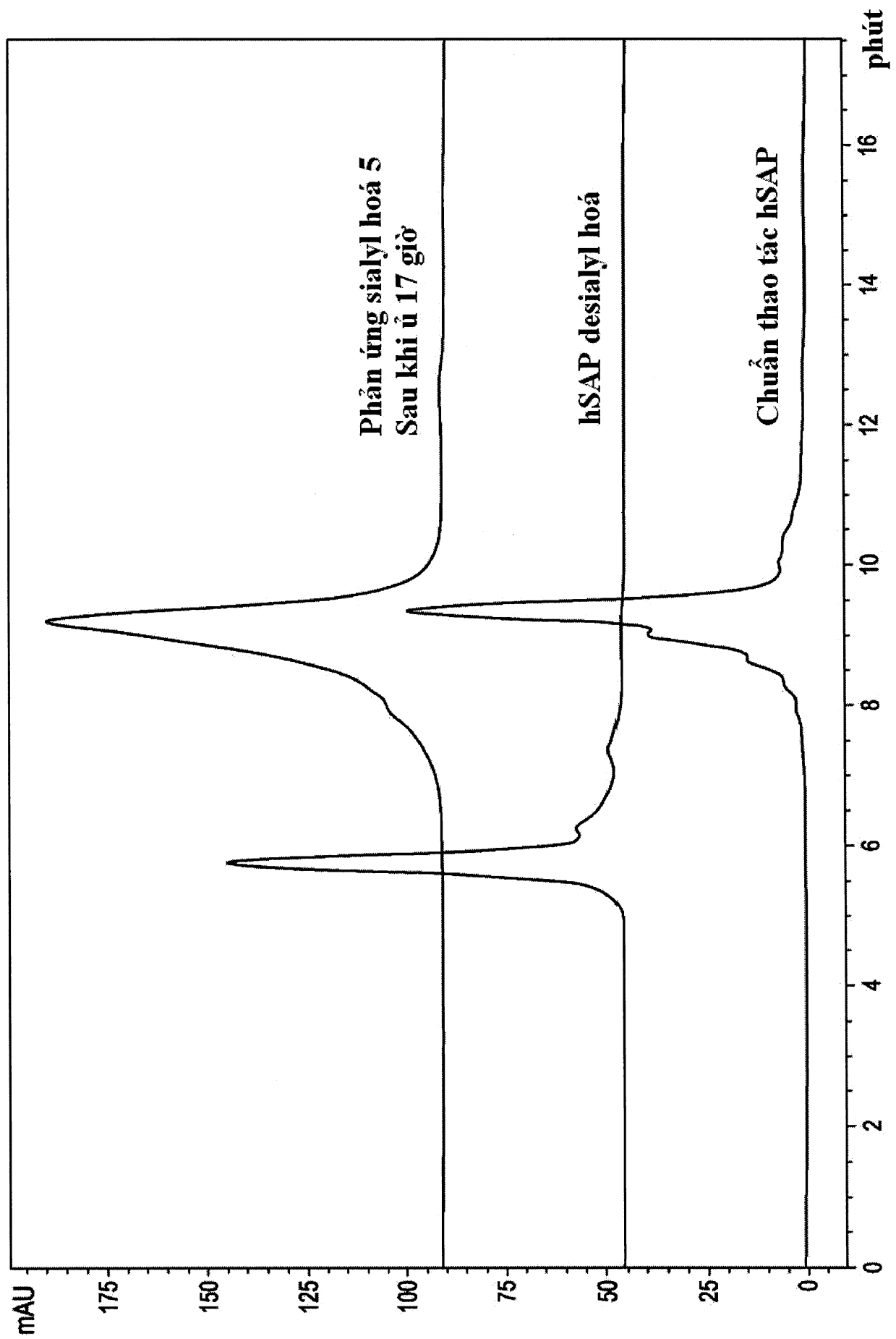
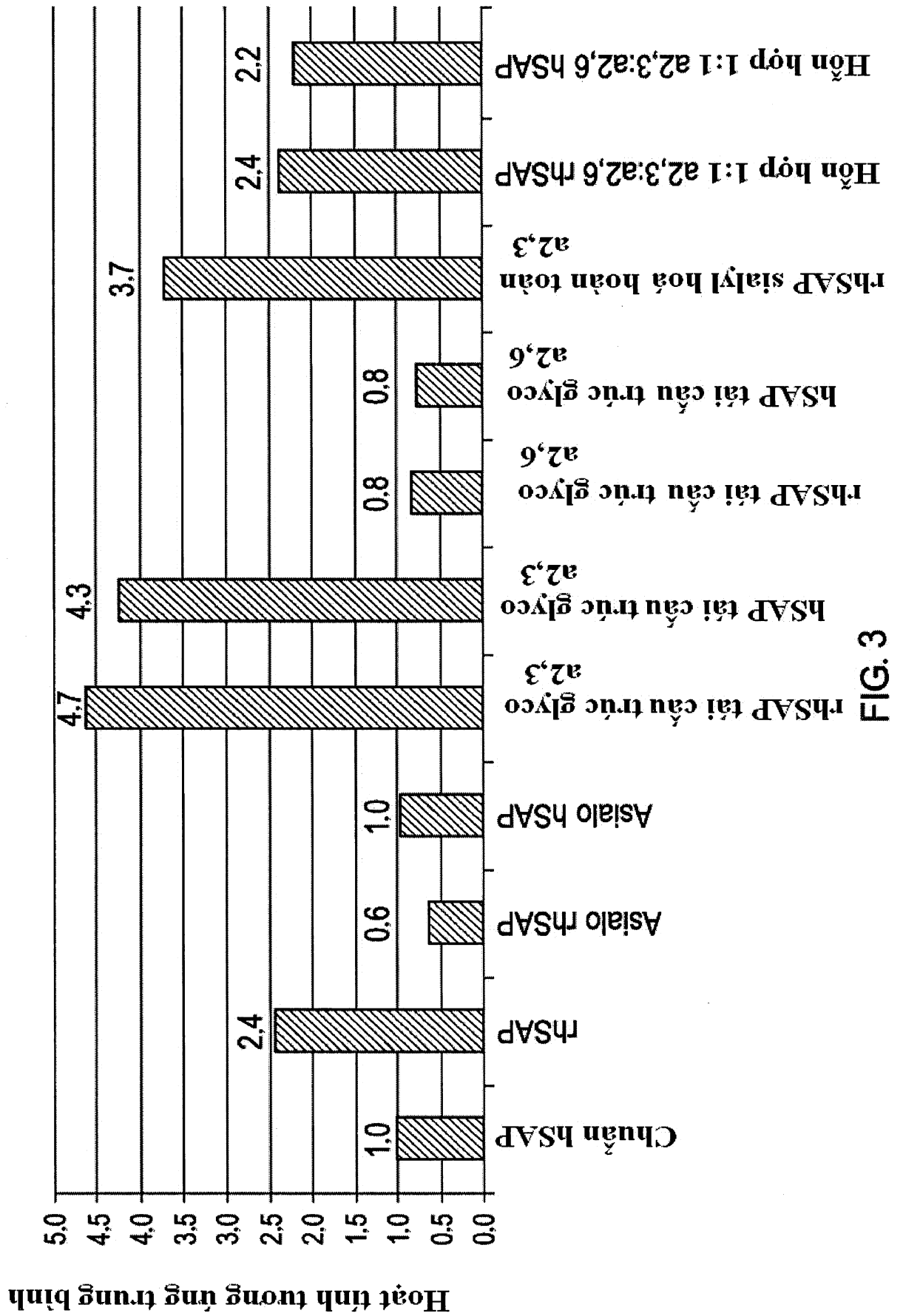


FIG. 2F



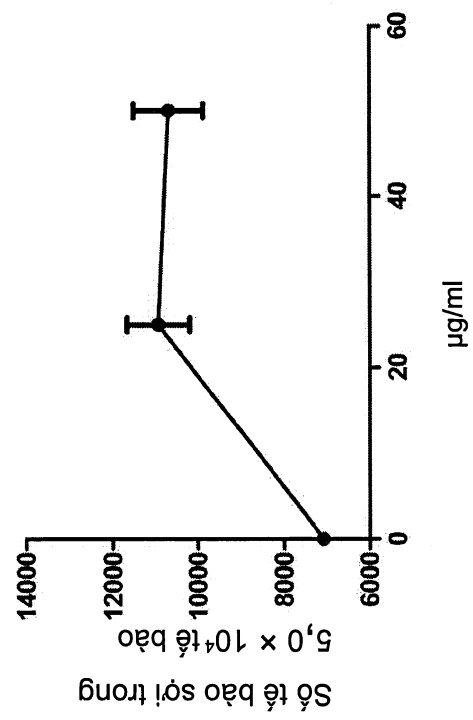


FIG. 4

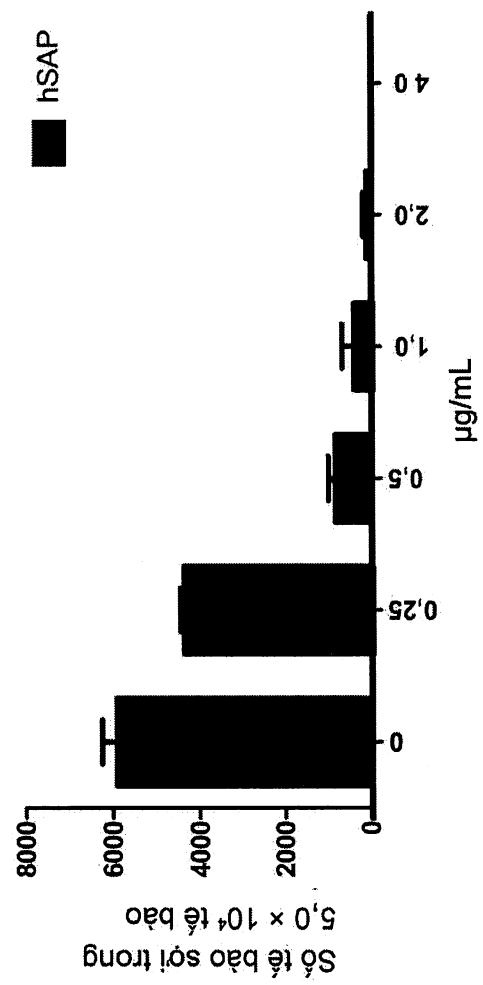


FIG. 5

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> PROMEDIOR, INC.

<120> PROTEIN TINH BỘT HUYẾT THANH P, PHƯƠNG PHÁP TẠO RA PROTEIN NÀY,
TẾ BÀO BUỒNG TRỨNG CHUỘT ĐỒNG TRUNG QUỐC VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA PROTEIN NÀY

<130> 104112-0020-W01

<140>

<141> 2010-06-04

<150> 61/217,931

<151> 2009-06-04

<160> 4

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 204

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 1

His	Thr	Asp	Leu	Ser	Gly	Lys	Val	Phe	Val	Phe	Pro	Arg	Glu	Ser	Val
1				5					10					15	

Thr	Asp	His	Val	Asn	Leu	Ile	Thr	Pro	Leu	Glu	Lys	Pro	Leu	Gln	Asn
			20					25					30		

Phe	Thr	Leu	Cys	Phe	Arg	Ala	Tyr	Ser	Asp	Leu	Ser	Arg	Ala	Tyr	Ser
		35					40					45			

Leu	Phe	Ser	Tyr	Asn	Thr	Gln	Gly	Arg	Asp	Asn	Glu	Leu	Leu	Val	Tyr
	50					55					60				

Lys	Glu	Arg	Val	Gly	Glu	Tyr	Ser	Leu	Tyr	Ile	Gly	Arg	His	Lys	Val
65					70					75				80	

Thr	Ser	Lys	Val	Ile	Glu	Lys	Phe	Pro	Ala	Pro	Val	His	Ile	Cys	Val
				85					90					95	

Ser	Trp	Glu	Ser	Ser	Ser	Gly	Ile	Ala	Glu	Phe	Trp	Ile	Asn	Gly	Thr
			100					105					110		

Pro Leu Val Lys Lys Gly Leu Arg Gln Gly Tyr Phe Val Glu Ala Gln
 115 120 125

Pro Lys Ile Val Leu Gly Gln Glu Gln Asp Ser Tyr Gly Gly Lys Phe
 130 135 140

Asp Arg Ser Gln Ser Phe Val Gly Glu Ile Gly Asp Leu Tyr Met Trp
 145 150 155 160

Asp Ser Val Leu Pro Pro Glu Asn Ile Leu Ser Ala Tyr Gln Gly Thr
 165 170 175

Pro Leu Pro Ala Asn Ile Leu Asp Trp Gln Ala Leu Asn Tyr Glu Ile
 180 185 190

Arg Gly Tyr Val Ile Ile Lys Pro Leu Val Trp Val
 195 200

<210> 2

<211> 208

<212> PRT

<213> Gallus gallus

<400> 2

Gln Glu Asp Leu Tyr Arg Lys Val Phe Val Phe Arg Glu Asp Pro Ser
 1 5 10 15

Asp Ala Tyr Val Leu Leu Gln Val Gln Leu Glu Arg Pro Leu Leu Asn
 20 25 30

Phe Thr Val Cys Leu Arg Ser Tyr Thr Asp Leu Thr Arg Pro His Ser
 35 40 45

Leu Phe Ser Tyr Ala Thr Lys Ala Gln Asp Asn Glu Ile Leu Leu Phe
 50 55 60

Lys Pro Lys Pro Gly Glu Tyr Arg Phe Tyr Val Gly Gly Lys Tyr Val
 65 70 75 80

Thr Phe Arg Val Pro Glu Asn Arg Gly Glu Trp Glu His Val Cys Ala
 85 90 95

Ser Trp Glu Ser Gly Ser Gly Ile Ala Glu Phe Trp Leu Asn Gly Arg
 100 105 110

Pro Trp Pro Arg Lys Gly Leu Gln Lys Gly Tyr Glu Val Gly Asn Glu
 115 120 125

Ala Val Val Met Leu Gly Gln Glu Gln Asp Ala Tyr Gly Gly Gly Phe
 130 135 140

Asp Val Tyr Asn Ser Phe Thr Gly Glu Met Ala Asp Val His Leu Trp
 145 150 155 160

Asp Ala Gly Leu Ser Pro Asp Lys Met Arg Ser Ala Tyr Leu Ala Leu
 165 170 175

Arg Leu Pro Pro Ala Pro Leu Ala Trp Gly Arg Leu Arg Tyr Glu Ala
 180 185 190

Lys Gly Asp Val Val Val Lys Pro Arg Leu Arg Glu Ala Leu Gly Ala
 195 200 205

<210> 3

<211> 205

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 3

Gln Thr Asp Leu Arg Gly Lys Val Phe Val Phe Pro Arg Glu Ser Ser
 1 5 10 15

Thr Asp His Val Thr Leu Ile Thr Lys Leu Glu Lys Pro Leu Lys Asn
 20 25 30

Leu Thr Leu Cys Leu Arg Ala Tyr Ser Asp Leu Ser Arg Gly Tyr Ser
 35 40 45

Leu Phe Ser Tyr Asn Ile His Ser Lys Asp Asn Glu Leu Leu Val Phe
 50 55 60

Lys Asn Gly Ile Gly Glu Tyr Ser Leu Tyr Ile Gly Lys Thr Lys Val
 65 70 75 80

Thr Val Arg Ala Thr Glu Lys Phe Pro Ser Pro Val His Ile Cys Thr
 85 90 95

Ser Trp Glu Ser Ser Thr Gly Ile Ala Glu Phe Trp Ile Asn Gly Lys
 100 105 110

Pro Leu Val Lys Arg Gly Leu Lys Gln Gly Tyr Ala Val Gly Ala His
 115 120 125

Pro Lys Ile Val Leu Gly Gln Glu Gln Asp Ser Tyr Gly Gly Gly Phe
 130 135 140

Asp Lys Asn Gln Ser Phe Met Gly Glu Ile Gly Asp Leu Tyr Met Trp
 145 150 155 160

Asp Ser Val Leu Ser Pro Glu Glu Ile Leu Leu Val Tyr Gln Gly Ser
 165 170 175

Ser Ser Ile Ser Pro Thr Ile Leu Asp Trp Gln Ala Leu Lys Tyr Glu
 180 185 190

Ile Lys Gly Tyr Val Ile Val Lys Pro Met Val Trp Gly
 195 200 205

<210> 4

<211> 204

<212> PRT

<213> Cricetulus migratorius

<400> 4

Gln Thr Asp Leu Thr Gly Lys Val Phe Val Phe Pro Arg Glu Ser Glu
 1 5 10 15

Ser Asp Tyr Val Lys Leu Ile Pro Arg Leu Glu Lys Pro Leu Glu Asn
 20 25 30

Phe Thr Leu Cys Phe Arg Thr Tyr Thr Asp Leu Ser Arg Pro His Ser
 35 40 45

Leu Phe Ser Tyr Asn Thr Lys Asn Lys Asp Asn Glu Leu Leu Ile Tyr
 50 55 60

Lys Glu Arg Met Gly Glu Tyr Gly Leu Tyr Ile Glu Asn Val Gly Ala
 65 70 75 80

Ile Val Arg Gly Val Glu Glu Phe Ala Ser Pro Val His Phe Cys Thr
 85 90 95

Ser Trp Glu Ser Ser Ser Gly Ile Ala Asp Phe Trp Val Asn Gly Ile
 100 105 110

Pro Trp Val Lys Lys Gly Leu Lys Lys Gly Tyr Thr Val Lys Thr Gln
 115 120 125

Pro Ser Ile Ile Leu Gly Gln Glu Gln Asp Asn Tyr Gly Gly Gly Phe
 130 135 140

Asp Lys Ser Gln Ser Phe Val Gly Glu Met Gly Asp Leu Asn Met Trp
 145 150 155 160

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

Trp Leu Glu Pro Asn Ile Leu Asp Trp Arg Ala Leu Asn Tyr Glu Met
 180 185 190

Ser Gly Tyr Ala Val Ile Arg Pro Arg Val Trp His
 195 200