



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

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

(11) 
1-0022665

(51)⁷ **A61K 47/48, C12N 9/82**

(13) **B**

(21)	1-2012-00299	(22)	06.07.2010		
(86)	PCT/EP2010/059599	06.07.2010	(87)	WO2011/003886	13.01.2011
(30)	61/223,320	06.07.2009	US		
	PCT/EP2010/054156	30.03.2010	EP		
(45)	27.01.2020	382	(43)	27.08.2012	293
(73)	ALIZE PHARMA II (FR) 15 Chemin Du Saquin Espace Europeen F-69130 Ecully, France				
(72)	ABRIBAT, Thierry (FR)				
(74)	Công ty TNHH Sở hữu trí tuệ WINCO (WINCO CO., LTD.)				

(54) **THỂ LIÊN HỢP CHỨA L-ASPARAGINAZA VÀ POLYETYLENGLYCOL, VÀ PHƯƠNG PHÁP TẠO THỂ LIÊN HỢP NÀY**

(57) Sáng chế đề cập đến thể liên hợp của protein có hoạt tính gần giống L-asparagin aminohydrolaza và polyetylen glycol. Cụ thể, polyetylen glycol này có trọng lượng phân tử nhỏ hơn hoặc bằng khoảng 5000Da và protein là L-asparaginaza của Erwinia. Thể liên hợp theo sáng chế có ưu điểm vượt trội như khả năng duy trì mức độ hoạt tính in vitro cao và sự gia tăng thời gian bán hủy in vivo bất ngờ. Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp tạo ra thể liên hợp này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến thể liên hợp của protein có hoạt tính gần giống L-asparagin aminohydrolaza và polyetylen glycol, đặc biệt là trong đó polyetylen glycol có trọng lượng phân tử nhỏ hơn hoặc bằng khoảng 5000Da, đặc biệt là thể liên hợp trong đó protein là L-asparaginaza của *Erwinia*.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Protein có hoạt tính L-asparagin aminohydrolaza, thường được gọi là L-asparaginaza, đã được sử dụng thành công để điều trị bệnh bạch cầu cấp dòng nguyên bào lympho (ALL) ở trẻ em trong nhiều năm qua. ALL là một bệnh ung thư ác tính ở trẻ em thường gặp nhất (Avramis và Panosyan, *Clin. Pharmacokinet.* (2005) 44:367-393).

L-asparaginaza cũng được sử dụng để điều trị bệnh Hodgkin, bệnh bạch cầu cấp dòng tủy, bệnh bạch cầu cấp tế bào đơn nhân dòng tủy, bệnh bạch cầu cấp tế bào lympho, sacoma lympho, sacom tế bào lưới, và sacom melanin (Kotzia và Labrou, *J. Biotechnol.* 127 (2007) 657-669). Hoạt tính kháng khối u của L-asparaginaza được cho là do một số tế bào ung thư ác tính không có khả năng tổng hợp L-asparagin hoặc khả năng này bị giảm (Kotzia và Labrou, *J. Biotechnol.* 127 (2007) 657-669). Do đó, các tế bào ung thư ác tính này sẽ phụ thuộc vào nguồn cung cấp L-asparagin ngoại bào. Tuy nhiên, enzym L-asparaginaza sẽ xúc tác quá trình thủy phân L-asparagin thành axit aspartic và amoniắc, nhờ đó loại bỏ nguồn L-asparagin trong hệ tuần hoàn và giết tế bào khối u không thể thực hiện quá trình tổng hợp protein khi không có L-asparagin (Kotzia và Labrou, *J. Biotechnol.* 127 (2007) 657-669).

L-asparaginaza của *E. coli* là được chất enzym đầu tiên được sử dụng trong trị liệu ALL và đã được đưa ra thị trường với nhãn hiệu Elspar® ở Mỹ hoặc Kidrolase® và L-asparaginase Medac® ở châu Âu. L-asparaginaza cũng đã được phân lập từ các vi sinh vật khác, ví dụ, protein L-asparaginaza từ *Erwinia chrysanthemi*, được gọi là crisantaspaza, được đưa ra thị trường với nhãn hiệu Erwinase® (Wriston Jr., J.C.

(1985) “L-asparaginase” *Meth. Enzymol.* 113, 608-618; Goward, C.R. et al. (1992) “Rapid large scale preparation of recombinant *Erwinia chrysanthemi* L-asparaginase”, *Bioseparation* 2, 335-341). L-asparaginaza của các loài *Erwinia* khác cũng đã được xác định, bao gồm, ví dụ như, *Erwinia chrysanthemi* 3937 (Số đăng ký trong Genbank #AAS67028), *Erwinia chrysanthemi* NCPPB 1125 (Số đăng ký trong Genbank #CAA31239), *Erwinia carotovora* (Số đăng ký trong Genbank #AAP92666), và *Erwinia carotovora* subsp. *Astroseptica* (Số đăng ký trong Genbank #AAS67027). Các L-asparaginaza của *Erwinia chrysanthemi* có mức độ tương đồng về trình tự axit amin là khoảng từ 91 đến 98%, trong khi đó L-asparaginaza của *Erwinia carotovora* có độ tương đồng về trình tự axit amin nằm trong khoảng từ khoảng 75 đến 77% với L-asparaginaza của *Erwinia chrysanthemi* (Kotzia và Labrou, *J. Biotechnol.* 127 (2007) 657-669).

L-asparaginaza có nguồn gốc vi khuẩn có tiềm năng sinh miễn dịch và hoạt tính kháng nguyên cao và thường tạo ra phản ứng bất lợi từ phản ứng dị ứng nhẹ đến sốc phản vệ ở những bệnh nhân bị quá mẫn (Wang, B. et al. (2003) “Evaluation of immunologic cross reaction of anti-asparaginase antibodies in acute lymphoblastic leukemia (ALL and lymphoma patients), *Leukemia* 17, 1583-1588). L-asparaginaza của *E. coli* có khả năng sinh miễn dịch đặc biệt, với hiệu giá kháng thể kháng asparaginaza đối với L-asparaginaza *E. coli* sau khi sử dụng qua đường tiêm tĩnh mạch (i.v.) hoặc tiêm bắp (i.m.) đạt tới 78% ở người lớn và 70% ở trẻ em (Wang, B. et al. (2003) *Leukemia* 17, 1583-1588).

L-asparaginaza của *Escherichia coli* và *Erwinia chrysanthemi* khác nhau về đặc tính dược động học và có đặc tính sinh miễn dịch khác nhau (Klug Albertsen, B. et al. (2001) “Comparison of intramuscular therapy with *Erwinia* asparaginase and asparaginase Medac: pharmacokinetics. pharmacodynamics, formation of antibodies and influence on the coagulation system” *Brit. J. Haematol.* 115, 983-990). Hơn nữa, đã chứng minh được rằng kháng thể được tạo ra sau khi điều trị bằng L-asparaginaza của *E. coli* không phản ứng chéo với L-asparaginaza của *Erwinia* (Wang, B. et al., *Leukemia* 17 (2003) 1583-1588). Do đó, L-asparaginaza của *Erwinia* (crisantaspaza) đã được sử dụng trong điều trị ALL tăng cường ở bệnh nhân đáp ứng với L-asparaginaza của *E. coli* (Duval, M. et al. (2002) “Comparison of *Escherichia coli*-asparaginase with *Erwinia*-asparaginase in the treatment of childhood lymphoid

malignancies: results of a randomized European Organisation for Research and Treatment of Cancer, Children's Leukemia Group phase 3 trial" *Blood* 15, 2734-2739; Avramis và Panosyan, *Clin. Pharmacokinet.* (2005) 44:367-393).

Trong một nỗ lực khác nhằm giảm mức độ sinh miễn dịch đi kèm với việc sử dụng L-asparaginaza của vi khuẩn, L-asparaginaza của *E. coli* được biến đổi bằng methoxy-polyetylenglycol (mPEG). Phương pháp này thường được gọi là "PEG hoá" và đã được chứng minh là có thể biến đổi hoạt tính miễn dịch của protein (Abuchowski, A. *et al.* (1977) "Alteration of Immunological Properties of Bovine Serum Albumin by Covalent Attachment of Polyethylene Glycol," *J.Biol.Chem.* 252 (11), 3578-3581). Chất được gọi là mPEG-L-asparaginaza, hoặc pegaspargaza, đã được đưa ra thị trường với nhãn hiệu Oncaspar® (Enzon Inc., USA), được phê duyệt tại thị trường Mỹ để điều trị tăng cường bệnh ALL vào năm 1994, và đã được phê duyệt để điều trị bước đầu ALL ở trẻ em và người lớn từ năm 2006. Oncaspar® có thời gian bán hủy *in vivo* kéo dài và hoạt tính sinh miễn dịch/hoạt tính kháng nguyên giảm.

Oncaspar® là L-asparaginaza của *E. coli* đã được biến đổi nhiều gốc lysin sử dụng mPEG-succinimidyl succinat 5kDa (SS-PEG) (U.S. Patent No. 4,179,337). SS-PEG là một hoạt chất PEG thế hệ thứ nhất chứa liên kết este không ổn định nhạy cảm với quá trình thủy phân bởi enzym hoặc ở độ pH hơi kiềm (U.S. Patent No. 4,670,417; *Makromol. Chem.* 1986, 187, 1131-1144). Các hoạt tính này làm giảm cả độ ổn định *in vitro* và *in vivo* và có thể ảnh hưởng đến độ an toàn của dược chất.

Hơn nữa, đã chứng minh được rằng các kháng thể được tạo ra kháng lại L-asparaginaza của *E. coli* sẽ phản ứng chéo với Oncaspar® (Wang, B. *et al.* (2003) "Evaluation of immunologic cross-reaction of anti-asparaginase antibodies in acute lymphoblastic leukemia (ALL and lymphoma patients)," *Leukemia* 17, 1583-1588). Mặc dù các kháng thể này không có hoạt tính trung hòa, nhưng những phát hiện này đã chứng minh một cách rõ ràng khả năng tăng tính miễn cảm chéo hoặc quá trình bất hoạt chéo *in vivo* của chúng. Thật vậy, theo một báo cáo, có từ 30 đến 41% trẻ em được điều trị bằng pegaspargaza có đáp ứng dị ứng (Wang, B. *et al.* (2003) *Leukemia* 17, 1583-1588).

Ngoài đáp ứng dị ứng nhanh, vấn đề về “tăng nhạy cảm tiềm ẩn” mới đây cũng đã được báo cáo, trong đó bệnh nhân tạo ra kháng thể kháng asparaginaza mà không có biểu hiện lâm sàng nào liên quan đến đáp ứng tăng nhạy cảm (Wang, B. et al. (2003) *Leukemia* 17, 1583-1588). Đáp ứng này có thể là do sự hình thành kháng thể trung hòa kháng L-asparaginaza của *E. coli* và pegaspargaza; tuy nhiên, những bệnh nhân này sẽ không được chuyển sang sử dụng L-asparaginaza của *Erwinia* vì không có các dấu hiệu biểu hiện của tăng nhạy cảm, và do đó họ chỉ nhận được quá trình điều trị hiệu quả trong một thời gian ngắn (Holcenberg, J., *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* 26 (2004) 273-274).

Quá trình điều trị bằng L-asparaginaza của *Erwinia chrysanthemi* thường được sử dụng trong trường hợp tăng nhạy cảm với L-asparaginaza của *E. coli*. Tuy nhiên, đã phát hiện được rằng khoảng 30 đến 50% bệnh nhân được điều trị bằng L-asparaginaza của *Erwinia* là dương tính với kháng thể (Avramis và Panosyan, *Clin. Pharmacokinet.* (2005) 44:367-393). Hơn nữa, vì L-asparaginaza của *Erwinia chrysanthemi* có thời gian bán hủy ngắn hơn đáng kể so với L-asparaginaza của *E. coli*, nên cần phải sử dụng thường xuyên hơn (Avramis và Panosyan, *Clin. Pharmacokinet.* (2005) 44:367-393). Theo một nghiên cứu của Avramis và các đồng tác giả, *Erwinia* asparaginaza có hoạt tính dược động học kém hơn (Avramis et al., *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* 29 (2007) 239-247). Do đó, L-asparaginaza của *E. coli* và pegaspargaza được cho là phương pháp điều trị ALL tuyến đầu được ưu tiên so với L-asparaginaza của *Erwinia*.

Rất nhiều dược chất sinh học đã được PEG hóa thành công và đưa ra thị trường trong nhiều năm qua. Để kết hợp PEG với protein, PEG phải được hoạt hóa ở đầu OH. Nhóm hoạt hóa được chọn dựa trên nhóm hoạt hóa tự do trên protein cần được PEG hóa. Đối với protein, các axit amin quan trọng nhất là lyzin, xystein, axit glutamic, axit aspartic, axit carboxylic ở đầu C và nhóm amino ở đầu N. Khi xem xét một loạt các nhóm phản ứng trong protein, gần như toàn bộ các phương pháp hóa học peptit đã được áp dụng để hoạt hóa gốc PEG. Ví dụ về PEG được hoạt hóa là cacbonat được hoạt hóa, ví dụ, p-nitrophenyl cacbonat, succinimidyl cacbonat; este hoạt hóa, ví dụ, succinimidyl este; và các aldehyt kết hợp đặc hiệu vị trí và maleimit đã được phát triển (Harris, M., *Adv. Drug Del. Rev.* 54 (2002), 459-476). Mức độ khả dụng của các phương pháp hóa học khác nhau để biến đổi PEG cho thấy mỗi protein được PEG hóa được tạo ra là mỗi nghiên cứu riêng biệt. Ngoài cấu trúc hóa học, trọng lượng phân tử

của PEG được gắn với protein có ảnh hưởng lớn lên hoạt tính dược lý của protein được PEG hóa. Trong hầu hết các trường hợp, được kỳ vọng là trọng lượng phân tử của PEG càng cao thì mức độ cải thiện về hoạt tính dược lý càng cao (Sherman, M. R., *Adv. Drug Del. Rev.* 60 (2008), 59-68; Holtsberg, F.W., *Journal of Controlled Release* 80 (2002), 259-271). Ví dụ như, Holtsberg và các đồng tác giả đã phát hiện được rằng, khi PEG được liên hợp với arginin deaminaza, là một enzym phân hủy axit amin khác được phân lập từ vi khuẩn, thì chức năng dược lực học và dược động học của enzym sẽ gia tăng khi kích thước của PEG có trọng lượng phân tử tăng từ 5000Da đến 20000Da (Holtsberg, F.W., *Journal of Controlled Release* 80 (2002), 259-271).

Tuy nhiên, trong nhiều trường hợp, các dược chất sinh học được PEG hóa có hoạt tính bị giảm đáng kể so với dược chất sinh học không được biến đổi (Fishburn, C.S. (2008) Review “The Pharmacology of PEGylation: Balancing PD with PK to Generate Novel Therapeutics” *J. Pharm. Sci.*, 1-17). Đối với L-asparaginaza của *Erwinia carotovora*, đã phát hiện được rằng quá trình PEG hoá sẽ giảm hoạt tính *in vitro* khoảng 57% (Kuchumova, A.V. *et al.* (2007) “Modification of Recombinant asparaginase from *Erwinia carotovora* with Polyethylene Glycol 5000” *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry*, 1, 230-232). L-asparaginaza của *Erwinia carotovora* có độ tương đồng khoảng 75% với L-asparaginaza của *Erwinia chrysanthemi* (crisantaspaza). Đối với Oncaspar®, cũng phát hiện được rằng hoạt tính *in vitro* bằng khoảng 50% so với L-asparaginaza không được biến đổi của *E. coli*.

Các chế phẩm L-asparaginaza hiện nay không thể cung cấp các phương pháp điều trị thay thế hoặc bổ sung, đặc biệt là để điều trị ALL đặc trưng ở hoạt tính xúc tác cao và đặc tính dược lý và dược động học được cải thiện đáng kể, cũng như hoạt tính sinh miễn dịch giảm.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

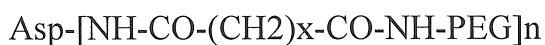
Sáng chế đề cập đến thể liên hợp của protein có hoạt tính gần giống L-asparaginaminohydrolaza và polyetylen glycol, trong đó polyetylen glycol có trọng lượng phân tử nhỏ hơn hoặc bằng khoảng 5000 Da, đặc biệt là thể liên hợp của protein là L-asparaginaza của *Erwinia*. Theo một phương án, thể liên hợp bao gồm L-asparaginaza của *Erwinia* có độ tương đồng axit amin ít nhất là 80% so với SEQ ID NO:1 và

polyetylen glycol (PEG), trong đó PEG có trọng lượng phân tử ít hơn hoặc bằng khoảng 5000Da. Theo một phương án, L-asparaginaza có độ tương đồng về trình tự axit amin ít nhất khoảng 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% so với SEQ ID NO:1. Theo một số phương án, PEG có trọng lượng phân tử khoảng 5000Da, 4000Da, 3000Da, 2500Da, hoặc 2000Da. Theo một phương án, thể liên hợp có hoạt tính *in vitro* ít nhất bằng 60%, 65%, 70%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% so với L-asparaginaza khi không được liên hợp với PEG. Theo một phương án khác, thể liên hợp có hoạt tính loại bỏ L-asparagin gấp ít nhất khoảng 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, hoặc 100 lần so với L-asparaginaza khi không được liên hợp với PEG. Theo một phương án khác, thể liên hợp sẽ làm giảm nồng độ L-asparagin trong huyết tương đến nồng độ không thể phát hiện được trong ít nhất khoảng 12, 24, 48, 96, 108, hoặc 120 giờ.

Theo một phương án, thể liên hợp có thời gian bán hủy *in vivo* dài hơn so với L-asparaginaza khi không được liên hợp với PEG. Theo một phương án cụ thể, thể liên hợp có $t_{1/2}$ dài hơn so với pegaspargaza (là L-asparaginaza của *E. coli* được liên hợp với PEG) được sử dụng với liều lượng protein tương đương (ví dụ, được xác định theo $\mu\text{g/kg}$). Theo một phương án cụ thể hơn, thể liên hợp có $t_{1/2}$ ít nhất là nằm trong khoảng từ 58 đến 65 giờ với liều khoảng $50\mu\text{g/kg}$ tính theo hàm lượng protein, và $t_{1/2}$ ít nhất nằm trong khoảng từ 34 đến 40 giờ với liều lượng khoảng $10\mu\text{g/kg}$ tính theo hàm lượng protein, sau khi sử dụng qua đường tĩnh mạch ở chuột. Theo một phương án cụ thể khác, thể liên hợp có $t_{1/2}$ ít nhất nằm trong khoảng từ 100 đến 200 giờ với liều lượng thay đổi trong khoảng từ 10000 đến 15000 IU/m² (khoảng 20 đến 30mg protein/m²). Theo một phương án, thể liên hợp có diện tích dưới đường cong (AUC) lớn hơn so với L-asparaginaza khi không được liên hợp với PEG. Theo một phương án cụ thể, thể liên hợp có AUC trung bình lớn hơn ít nhất khoảng 3 lần so với pegaspargaza ở liều protein tương đương.

Theo một phương án, PEG được liên kết cộng hoá trị với một hoặc nhiều nhóm amino (trong đó “nhóm amino” bao gồm gốc lysin và/hoặc đầu N) của L-asparaginaza. Theo một phương án cụ thể hơn, PEG được liên kết cộng hoá trị với một hoặc nhiều nhóm amino bằng liên kết amit. Theo một phương án cụ thể khác, PEG được liên kết cộng hoá trị với ít nhất từ khoảng 40% đến 100% nhóm amino có khả năng liên kết (ví

dụ, gốc lysin và/hoặc đầu N của protein) hoặc ít nhất khoảng 40% đến 90% tổng số nhóm amino (ví dụ, gốc lysin và/hoặc đầu N của protein). Theo một phương án, thể liên hợp có công thức:



trong đó Asp là L-asparaginaza, NH là một hoặc nhiều nhóm NH của gốc lysin và/hoặc đầu N của Asp, PEG là gốc polyetylen glycol, n là số lượng thể hiện ít nhất khoảng 40% đến 100% nhóm amino có thể liên kết được (ví dụ, gốc lysin và/hoặc đầu N) trong Asp, và x là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 8, cụ thể hơn là nằm trong khoảng từ 2 đến 5. Theo một phương án cụ thể, PEG là monometoxy-polyetylen glycol (mPEG).

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp tạo thể liên hợp bao gồm bước kết hợp một lượng PEG với một lượng L-asparaginaza trong dung dịch đậm trong một khoảng thời gian đủ để có liên kết đồng hoá trị PEG với L-asparaginaza.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến được phẩm chứa thể liên hợp theo sáng chế.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp điều trị bệnh có thể điều trị được bằng cách tiêu huỷ L-asparagin ở bệnh nhân bao gồm bước sử dụng lượng có hiệu quả thể liên hợp theo sáng chế. Theo một phương án, bệnh là bệnh ung thư. Theo một phương án cụ thể, bệnh ung thư là ALL. Theo một phương án cụ thể khác, thể liên hợp được sử dụng với lượng nằm trong khoảng từ 5U/kg thể trọng đến 50U/kg thể trọng. Theo một phương án cụ thể khác, thể liên hợp được sử dụng với liều lượng thay đổi trong khoảng từ 10000 đến 15000IU/m² (khoảng 20 đến 30mg protein/m²). Theo một số phương án, có thể sử dụng được phẩm theo đường tĩnh mạch hoặc tiêm bắp và có thể sử dụng với tần suất ít hơn một lần trong một tuần (ví dụ, một lần trong một tháng hoặc một lần trong nhiều tuần), một lần trong một tuần, hai lần trong một tuần, hoặc ba lần trong một tuần. Theo các phương án cụ thể khác, thể liên hợp được sử dụng ở dạng liệu pháp điều trị đơn và, cụ thể hơn, không có chất ức chế asparagin synthetaza. Theo các phương án khác, thể liên hợp được sử dụng là một phần của phương pháp điều trị kết (nhưng theo một số phương án, liệu pháp kết hợp không bao gồm chất ức chế asparagin synthetaza). Theo một phương án cụ thể, bệnh

nhân đang được điều trị có tiền sử tăng nhạy cảm với *E. coli* asparaginaza hoặc dạng được PEG hoá của nó hoặc với *Erwinia* asparaginaza. Theo một phương án cụ thể khác, bệnh nhân đang được điều trị bị tái phát bệnh, đặc biệt là tái phát xảy ra sau điều trị bằng *E. coli* asparaginaza hoặc dạng được PEG hoá của chúng.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 thể hiện quá trình điện di trên gel SDS-polyacrylamit L-asparaginaza *Erwinia chrysanthemi* tái tổ hợp tinh khiết. *L-asparaginaza* của *Erwinia chrysanthemi* (r-crisantaspaza) tái tổ hợp tinh khiết được phân tích trên SDS-PAGE. Băng protein được nhuộm nitrat bạc. Đường 1: chỉ thị trọng lượng phân tử (116, 66,2, 45, 35, 25, 18,4, và 14,4kDa), đường 2: *L-asparaginaza* của *Erwinia chrysanthemi* (r-crisantaspaza) tái tổ hợp tinh khiết.

Fig.2 thể hiện kết quả phân tích SDS-PAGE thể liên hợp mPEG-r-crisantaspaza.

Fig.3 là đồ thị thể hiện nồng độ L-asparagin trong huyết tương sau khi tiêm tĩnh mạch một liều duy nhất Erwinase® (5U/kg, 25U/kg, 125U/kg và 250U/kg thể trọng).

Fig.4 là đồ thị thể hiện nồng độ L-asparagin trong huyết tương sau khi tiêm tĩnh mạch một liều duy nhất thể liên hợp mPEG-r-crisantaspaza so với Erwinase® ở chuột. Các con số “40%” và “100%” chỉ ra mức độ PEG hoá xấp xỉ, lần lượt là khoảng 40 đến 55% (PEG hoá một phần) và khoảng 100% (PEG hoá tối đa) nhóm amino có thể liên kết được.

Fig.5 thể hiện diện tích dưới đường cong (AUC) (hoạt tính enzym dư thừa) được tính từ L-asparaginaza profiles sau khi tiêm tĩnh mạch một liều duy nhất thể liên hợp mPEG-r-crisantaspaza ở chuột.

Fig.6 là đồ thị thể hiện nồng độ L-asparagin trong huyết tương sau khi tiêm tĩnh mạch một liều duy nhất cho chuột 2kDa-100% mPEG-r-crisantaspaza (5U/kg, 25U/kg và 50U/kg thể trọng) (Fig. 6A), 5kDa-100% mPEG-r-crisantaspaza (5U/kg, 25U/kg và 50U/kg thể trọng) (Fig. 6B), hoặc 2kDa-100% mPEG-r-crisantaspaza (5U/kg), 5kDa-100% mPEG-r-crisantaspaza (5U/kg), và pegaspargaza (Oncaspar®) (1U/kg) (Fig. 6C). Việc sử dụng lượng protein tương đương nhau (10µg/kg) 2kDa-100% mPEG-r-

crisantaspaza (5U/kg), 5kDa-100% mPEG-r-crisantaspaza (5U/kg), hoặc pegaspargaza (Oncaspar®, 1U/kg), gây ra quá trình tiêu hủy L-asparagin trong vòng 72 giờ.

Fig.7 là đồ thị thể hiện mối tương quan giữa liều dùng và tác dụng của 2kDa-r-crisantaspaza được PEG hóa 100% so với 5kDa-r-crisantaspaza được PEG hóa 100%. Fig. 7A thể hiện hoạt tính enzym dư thừa trong huyết tương sau khi tiêm tĩnh mạch một liều duy nhất 2kDa-r-crisantaspaza được PEG hóa 100% ở các nồng độ 5U/kg (10µg/kg tính theo hàm lượng protein), 25U/kg, và 50U/kg. Fig. 7B thể hiện hoạt tính enzym dư thừa trong huyết tương sau khi tiêm tĩnh mạch một liều duy nhất 5kDa-r-crisantaspaza được PEG hóa 100% ở các nồng độ 5U/kg (10µg/kg tính theo hàm lượng protein), 25U/kg, và 50U/kg.

Fig.8 là đồ thị thể hiện mối tương quan giữa liều dùng và tác dụng của 2kDa-r-crisantaspaza được PEG hóa 100% so với 5kDa-r-crisantaspaza được PEG hóa 100%. AUC của hoạt tính enzym dư thừa được đo ở chuột sau khi tiêm tĩnh mạch một liều duy nhất 2kDa-100% hoặc 5kDa-100% mPEG-thể liên hợp. Toàn phần, khi so sánh với liều lượng giống nhau, AUC đo được đối với 5kDa-100% mPEG-r-crisantaspaza là cao hơn so với AUC đo được đối với 2-kDa-100% mPEG-r-crisantaspaza. Có sự khác biệt lần lượt là 31, 37, và 14% đo được ở các liều lần lượt là 5, 25, và 50U/kg.

Fig.9 là đồ thị thể hiện đặc tính dược động học của thể liên hợp mPEG-r-crisantaspaza so với pegaspargaza (Oncaspar®) ở chuột. Fig. 9A thể hiện hoạt tính enzym dư thừa đo được ở chuột sau khi tiêm tĩnh mạch một liều duy nhất 2kDa-100% mPEG-r-crisantaspaza, 5kDa-100% mPEG-r-crisantaspaza, hoặc pegaspargaza (Oncaspar®). Fig. 9B thể hiện AUC của hoạt tính enzym dư thừa đo được ở chuột sau khi tiêm tĩnh mạch một liều duy nhất 2kDa-100% mPEG-r-crisantaspaza, 5kDa-100% mPEG-r-crisantaspaza, hoặc pegaspargaza (Oncaspar®).

Fig.10 là đồ thị thể hiện nồng độ trong huyết thanh của kháng thể đặc hiệu kháng crisantaspaza sau khi điều trị bằng thể liên hợp mPEG-r-crisantaspaza hoặc Erwinase®. Kháng thể kháng crisantaspaza. Kết quả được thể hiện ở dạng giá trị trung bình $\pm$ SD (n=8).

Fig.11 là đồ thị thể hiện nồng độ trong huyết thanh của kháng thể đặc hiệu kháng thể liên hợp sau khi điều trị bằng thể liên hợp mPEG-r-crisantaspaza được PEG hóa một cách tối đa (100%). Fig. 11A: kết quả được thể hiện ở dạng giá trị trung bình

$\pm$ SD (n=8); Fig. 11B: kết quả được thể hiện ở dạng tỷ lệ phần trăm động vật có giá trị hấp thụ $> 0,5$ trong thử nghiệm ELISA kháng thể liên hợp.

Mô tả chi tiết sáng chế

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến chế phẩm L-asparaginaza có đặc tính sau đây:

- Hoạt tính sinh học *in vitro* cao;
- Liên kết PEG-protein ổn định;
- Thời gian bán hủy *in vivo* kéo dài;
- Hoạt tính sinh miễn dịch bị giảm một cách đáng kể, được khẳng định bằng, ví dụ như, việc giảm hoặc loại trừ đáp ứng kháng thể kháng lại chế phẩm L-asparaginaza sau khi sử dụng nhiều lần; và
- Hữu dụng là liệu pháp tăng cường cho bệnh nhân đã bị miễn cảm với các liệu pháp bước đầu đã sử dụng, ví dụ, L-asparaginaza thu được từ *E. coli*.

Vấn đề này đã không được giải quyết bởi các thể liên hợp L-asparaginaza đã biết, vì chúng có hoạt tính phản ứng chéo đáng kể với chế phẩm L-asparaginaza biến đổi (Wang, B. et al. (2003) *Leukemia* 17, 1583-1588), hoặc có hoạt tính *in vitro* bị giảm đáng kể (Kuchumova, A.V. et al. (2007) *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry*, 1, 230-232). Do đó, sáng chế đề cập đến thể liên hợp của L-asparaginaza của *Erwinia* với một polyme ưa nước, cụ thể hơn, polyetylen glycol có trọng lượng phân tử là 5000Da hoặc thấp hơn, phương pháp bào chế thể liên hợp và việc sử dụng thể liên hợp để giải quyết vấn đề nêu trên.

Sáng chế đề cập đến L-asparaginaza được PEG hóa của *Erwinia* có đặc tính được lý được cải thiện so với protein L-asparaginaza không được biến đổi, cũng như so với chế phẩm PEGaspargaza từ *E. coli*. Thể liên hợp L-asparaginaza được PEG hóa được đề cập theo sáng chế, ví dụ, L-asparaginaza của *Erwinia chrysanthemi* được PEG hoá bằng PEG có trọng lượng phân tử 5000Da, được cho là hoạt chất điều trị đặc biệt để sử dụng ở bệnh nhân có biểu hiện tăng nhạy cảm (ví dụ, đáp ứng dị ứng hoặc tăng nhạy cảm tiềm ẩn) đối với quá trình điều trị bằng L-asparaginaza hoặc L-asparaginaza được PEG hóa của *E. coli*. hoặc L-asparaginaza không được biến đổi của *Erwinia*. Thể liên hợp L-asparaginaza được PEG hóa được đề cập theo sáng chế cũng

hữu dụng là hoạt chất điều trị để sử dụng ở bệnh nhân bị tái phát bệnh, ví dụ, tái phát ALL, và đã được điều trị trước đó bằng một dạng asparaginaza khác, ví dụ, bằng L-asparaginaza hoặc L-asparaginaza được PEG hóa của *E. coli*.

Như được mô tả chi tiết theo sáng chế, thể liên hợp theo sáng chế có hoạt tính vượt trội một cách không ngờ so với các chế phẩm L-asparaginaza khác như pegaspargaza. Ví dụ như, L-asparaginaza không được biến đổi của *Erwinia chrysanthemi* (crisantaspaza) có thời gian bán hủy thấp hơn đáng kể so với L-asparaginaza không được biến đổi của *E. coli* (Avramis và Panosyan, *Clin. Pharmacokinet.* (2005) 44:367-393). Thể liên hợp được PEG hoá theo sáng chế có thời gian bán hủy lớn hơn so với L-asparaginaza được PEG hóa của *E. coli* ở liều protein tương đương.

Các định nghĩa

Trừ khi được định nghĩa theo một cách khác, các thuật ngữ được sử dụng trong bản mô tả này sẽ được hiểu theo nghĩa thông thường trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “bao gồm” có nghĩa là “bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở,” và các thuật ngữ được sử dụng ở dạng số ít sẽ bao gồm cả dạng số nhiều và ngược lại, trừ khi có quy định khác.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “bệnh có thể điều trị được bằng quá trình tiêu huỷ asparagin” dùng để chỉ tình trạng hoặc rối loạn trong đó các tế bào có liên quan có vai trò gây ra tình trạng hoặc rối loạn đó khả năng tổng hợp L-asparagin không có hoặc bị giảm. Quá trình tiêu huỷ hoặc là mất L-asparagin có thể là một phần hoặc gần như hoàn toàn (ví dụ, đến mức độ không thể phát hiện được bằng cách sử dụng các phương pháp và thiết bị đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này).

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “lượng có hiệu quả điều trị” dùng để chỉ lượng protein (ví dụ, asparaginaza hoặc thể liên hợp của chúng), cần để tạo ra hiệu quả điều trị mong muốn.

Protein L-asparaginaza:

Protein theo sáng chế là enzym có hoạt tính L-asparagin aminohydrolaza, được gọi là L-asparaginaza.

Đã xác định được nhiều protein L-asparaginaza trong lĩnh vực kỹ thuật này, được phân lập bằng các phương pháp đã biết từ vi sinh vật, (ví dụ, xem tài liệu của Savitri và Azmi, *Indian J. Biotechnol* 2 (2003) 184-194). L-asparaginaza được bán trên thị trường nhiều nhất và được sử dụng rộng rãi nhất là loại được phân lập từ *E. coli* hoặc *Erwinia chrysanthemi*, cả hai loại có độ tương đồng về cấu trúc là 50% hoặc ít hơn. Trong các loài *Erwinia*, enzym thu được từ *Erwinia chrysanthemi* và *Erwinia carotovora* thường có độ tương đồng về trình tự là 75 đến 77%, và enzym thu được từ các phân loài *Erwinia chrysanthemi* khác nhau thường có độ tương đồng về trình tự là 90% (Kotzia GA, Labrou E, *Journal of Biotechnology* (2007) 127:657-669). Một số loại L-asparaginaza đại diện của *Erwinia* bao gồm, ví dụ như, các L-asparaginaza được nêu trong bảng 1:

Bảng 1

Loài	Số đăng ký trong Genbank	tỷ lệ % tương đồng với <i>Erwinia Chrysanthemi</i> NCPPB 1066
<i>Erwinia chrysanthemi</i> 3937	AAS67028	91%
<i>Erwinia chrysanthemi</i> NCPPB 1125	CAA31239	98%
<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>Astroseptica</i>	AAS67027	75%
<i>Erwinia carotovora</i>	AAP92666	77%

Trình tự của L-asparaginaza của *Erwinia* và các L-asparaginaza trong GenBank trong bảng 1 được đưa vào đây để tham khảo. L-asparaginaza được ưu tiên sử dụng trong điều trị là L-asparaginaza được phân lập từ *E. coli* và *Erwinia*, cụ thể là, *Erwinia chrysanthemi*.

L-asparaginaza có thể là enzym nguyên gốc được phân lập từ các vi sinh vật. Chúng cũng có thể được sản xuất bằng kỹ thuật enzym tái tổ hợp trong quá trình sản xuất vi sinh vật như *E. coli*. Ví dụ, protein được sử dụng trong thể liên hợp theo sáng chế có thể là từ *E. coli* được tạo ra trong chủng *E. coli* tái tổ hợp, là protein của một

loài *Erwinia*, đặc biệt là *Erwinia chrysanthemi*, được tạo ra trong chủng *E. coli* tái tổ hợp.

Enzym có thể được xác định nhờ hoạt tính đặc hiệu của chúng. Do đó, định nghĩa về L-asparaginaza sẽ bao gồm tất cả polypeptit có hoạt tính đặc hiệu đã được xác định có ở các loài khác, cụ thể hơn là ở các vi sinh vật khác. Thông thường, các enzym có hoạt tính tương tự có thể được xác định bằng phương pháp phân loại chúng vào các họ được xác định bởi PFAM hoặc COG. PFAM (protein family Database of alignments and hidden Markov models; <http://pfam.sanger.ac.uk/>) là một bộ sưu tập lớn các đoạn trình tự xếp thẳng của protein. Với mỗi PFAM, có thể xem được nhiều đoạn trình tự xếp thẳng, các vùng chức năng của protein, đánh giá sự phân bố giữa các loài, kết nối được với các cơ sở dữ liệu khác, và có thể nhìn bằng mắt thường các cấu trúc protein đã biết. COGs (Clusters of Orthologous Groups of proteins; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/>) thu được bằng cách so sánh trình tự protein của 43 hệ gen đã được xác định trình tự một cách đầy đủ thể hiện 30 dòng phát sinh loài chính. Mỗi COG được xác định từ ít nhất ba dòng, cho phép xác định các vùng được bảo toàn.

Phương pháp xác định các trình tự tương đồng và tỷ lệ phần trăm tương đồng đã được biết rõ với các chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này, và bao gồm chương trình BLAST, có thể được sử dụng từ trang web <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> với các thông số mặc định trên trang web này. Sau đó, các trình tự thu được có thể được sử dụng, ví dụ như, với chương trình CLUSTALW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>) hoặc MULTALIN (<http://bioinfo.genotoul.fr/multalin/multalin.html>) với các thông số mặc định được chỉ ra trên các trang web. Bằng cách sử dụng các thông số tham chiếu trong GenBank đối với các gen đã biết, các chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể xác định các gen tương đương trong các loài khác, chủng vi khuẩn, nấm men, nấm, động vật có vú, thực vật, v.v.. Công việc thông thường này sẽ được thực hiện bằng cách sử dụng các trình tự liên ứng có thể được xác định bằng cách tiến hành xếp thẳng trình tự bằng các gen thu được từ các vi sinh vật khác, và thiết kế đoạn dò thoái hoá để tách dòng gen tương ứng trong một sinh vật khác. Các phương pháp thường được sử dụng trong lĩnh vực sinh học phân tử đã được biết rõ với các chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này, và được đề cập, ví dụ như, trong tài liệu Sambrook *et al.* (1989 MOLECULAR CLONING: A

LABORATORY MANUAL. 2nd ed. Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, New York).

Thật vậy, chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ biết làm thế nào để chọn lọc và thiết kế các protein tương đồng vẫn giữ được gần như hoàn toàn hoạt tính L-asparaginaza. Thông thường, thử nghiệm Nessler sẽ được sử dụng để xác định hoạt tính L-asparaginaza theo phương pháp được đề cập bởi Mashburn và Wriston (Mashburn, L., và Wriston, J. (1963) “Tumor Inhibitory Effect of L-Asparaginase,” *Biochem Biophys Res Commun* 12, 50).

Theo một phương án cụ thể của thể liên hợp theo sáng chế, protein L-asparaginaza có độ tương đồng ít nhất là 80% với protein bao gồm trình tự SEQ ID NO:1, cụ thể hơn ít nhất khoảng 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% tương đồng với protein bao gồm trình tự SEQ ID NO:1. SEQ ID NO:1 như sau:

```
ADKLPNIVILATGGTIAGSAATGTQTTGYKAGALGVDTLINAVPEVKKLA
NVKGE
QFSNMASENMTGDVVLKLSQRVNELLARDDVDGVVITHGTDTVEESAYF
LHLTV
KSDKPVPVFVAAMRPATAISADGPMNLLAVRVAGDKQSRGRGVMVVLN
DRIGSA
RYITKTNASTLDTFKANEEGYLGVIIGNRIYYQNRIDKLHTTRSVFDVRGL
TSLPKVDILYGYQDDPEYLYDAAIQHGVKGIVYAGMGAGSVSVRGIAGM
RKAMEKGVVVIRSTRTGNGIVPPDEELPGLVSDSLNPAHARILLMLALTR
TSDPKVIQEYFHTY (SEQ ID NO:1)
```

Thuật ngữ “bao gồm trình tự SEQ ID NO:1” nghĩa là trình tự axit amin của protein có thể không bị hạn chế một cách nghiêm ngặt ở SEQ ID NO:1 mà có thể có các axit amin khác.

Theo một phương án cụ thể, protein là L-asparaginaza của *Erwinia chrysanthemi* có trình tự SEQ ID NO:1. Theo một phương án khác, L-asparaginaza là của *Erwinia chrysanthemi* NCPPB 1066 (Số đăng ký trong Genbank CAA32884), có hoặc không có peptit tín hiệu và/hoặc trình tự dẫn đầu.

Các đoạn của protein có trình tự SEQ ID NO:1 cũng được bao gồm trong định nghĩa của protein được sử dụng trong thể liên hợp theo sáng chế. Thuật ngữ “đoạn của SEQ ID NO:1” có nghĩa là trình tự của polypeptit có thể chứa ít axit amin hơn so với SEQ ID NO: 1 nhưng vẫn đủ số lượng axit amin để tạo ra hoạt tính L-aminohydrolaza.

Đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này rằng polypeptit có thể được biến đổi bằng cách thay thế, xen, loại bỏ và/hoặc thêm một hoặc nhiều axit amin trong khi vẫn giữ được hoạt tính enzym. Ví dụ như, việc thay thế một axit amin tại một vị trí xác định bằng một axit amin tương đương về mặt hoá học mà không ảnh hưởng đến chức năng của protein là thường gặp. Các thay thế có thể được cho là sự trao đổi trong cùng một nhóm trong số các nhóm sau đây:

- Các gốc béo có kích thước nhỏ không phân cực hoặc ít phân cực: Ala, Ser, Thr, Pro, Gly
- Các gốc phân cực tích điện âm và amit của chúng: Asp, Asn, Glu, Gln
- Các gốc phân cực tích điện dương: His, Arg, Lys
- Các gốc béo có kích thước lớn và không phân cực: Met, Leu, Ile, Val, Cys
- Các gốc thơm có kích thước lớn: Phe, Tyr, Trp.

Do đó, các thay đổi tạo ra sự thay thế một gốc tích điện âm bằng một gốc khác (như axit glutamic thay thế cho axit aspartic) hoặc một gốc tích điện dương cho một gốc khác (như lyzin thay cho arginin) có thể được kỳ vọng là tạo ra sản phẩm tương đương về mặt chức năng.

Các vị trí tại đó axit amin được biến đổi và số lượng axit amin sẽ được biến đổi trong trình tự axit amin không bị giới hạn một cách cụ thể. Chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ có thể nhận biết được các biến đổi có thể được đưa vào mà không làm ảnh hưởng đến hoạt tính của protein. Ví dụ như, các biến đổi ở phần đầu N- hoặc đầu C- của protein có thể được kỳ vọng là không làm thay đổi hoạt tính của protein trong một số trường hợp. Cụ thể, đối với asparaginaza, là enzym đã được xác định rất nhiều đặc điểm, đặc biệt là đối với trình tự, cấu trúc và các gốc tạo thành vị trí xúc tác hoạt động. Điều này là cơ sở để chọn các gốc có thể được biến đổi mà không làm ảnh hưởng đến hoạt tính enzym. Tất cả các L-asparaginaza đã biết có nguồn gốc vi khuẩn có các đặc điểm cấu trúc chung. Tất cả đều có cấu trúc gồm 4 monome giống nhau có

4 vị trí hoạt động giữa các vùng đầu N và đầu C của hai monome kề nhau (Aghaipour *et al.*, *Biochemistry* 40 (2001) 5655-5664). Tất cả đều có mức độ tương đồng cao trong cấu trúc bậc ba và bậc bốn (Papageorgiou *et al.*, *FEBS J.* 275 (2008) 4306-4316). Trình tự của các vị trí xúc tác của L-asparaginaza được bảo toàn cao giữa *Erwinia chrysanthemi*, *Erwinia carotovora* và L-asparaginaza của *E. coli* II (Papageorgiou *et al.*, *FEBS J.* 275 (2008) 4306-4316). Vòng linh động trong vị trí hoạt động chứa gốc axit amin từ 14 đến 33, và phân tích cấu trúc chỉ ra rằng Thr15, Thr95, Ser62, Glu63, Asp96, và Ala120 liên kết với phối tử (Papageorgiou *et al.*, *FEBS J.* 275 (2008) 4306-4316). Aghaipour và các đồng tác giả đã tiến hành phân tích chi tiết về 4 vị trí hoạt động của L-asparaginaza của *Erwinia chrysanthemi* bằng cách nghiên cứu cấu trúc tinh thể có độ phân giải cao của enzym được tạo phức hệ với cơ chất của nó (Aghaipour *et al.*, *Biochemistry* 40 (2001) 5655-5664). Kotzia và các đồng tác giả đã cung cấp trình tự L-asparaginaza của một số loài và phân loài của *Erwinia* và, mặc dù các protein này chỉ có độ tương đồng khoảng 75 đến 77% giữa *Erwinia chrysanthemi* và *Erwinia carotovora*, chúng vẫn có hoạt tính L-asparaginaza (Kotzia *et al.*, *J. Biotechnol.* 127 (2007) 657-669). Moola và các đồng tác giả thực hiện nghiên cứu thiết lập bản đồ epitop của L-asparaginaza *Erwinia chrysanthemi* 3937 và enzym này vẫn có thể giữ được hoạt tính enzym ngay cả sau khi gây đột biến các trình tự có hoạt tính kháng nguyên khác nhau để giảm hoạt tính sinh miễn dịch của asparaginaza (Moola *et al.*, *Biochem. J.* 302 (1994) 921-927). Mỗi bài báo viện dẫn trong bản mô tả này đều được đưa vào phần tài liệu tham khảo. Dựa trên các nghiên cứu xác định đặc điểm đã được thực hiện trên L-asparaginaza, chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể xác định làm thế nào để thay thế trình tự và/hoặc mảnh protein trong khi vẫn duy hoạt tính enzym.

Polyme được sử dụng trong thể liên hợp:

Polyme được chọn từ nhóm bao gồm polyme tan trong nước không độc như polysaccarit, chẳng hạn hydroxyetyl tinh bột, poly axit amin, chẳng hạn poly lyzin, polyeste, ví dụ, poly axit lactic, và poly alkylen oxit, ví dụ, polyetylen glycol (PEG).

Polyetylen glycol (PEG) hoặc mono-metoxypolyetylen glycol (mPEG) đã được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này và gồm có polyme thẳng và phân nhánh. Ví dụ về một số polyme, đặc biệt là PEG, được đề cập trong các tài liệu sau đây, được viện dẫn trong bản mô tả trong phần tài liệu tham khảo: các Patent Mỹ số 5672662; 4179337;

5252714; cooUS Pat. Appl. Publ. No. 2003/0114647; US Pat. No. 6,113,906; US Pat. No. 7,419,600; và PCT Publ. No. WO2004/083258.

Chất lượng của polyme được đặc trưng bởi chỉ số đa phân tán (PDI). PDI phản ánh quá trình phân bố của trọng lượng phân tử trong một mẫu polyme nhất định và được tính bằng trọng lượng phân tử trung bình chia cho số lượng trọng lượng phân tử trung bình. Chỉ số này cho biết quá trình phân bố của các trọng lượng phân tử riêng biệt trong một mẻ polyme. PDI có giá trị luôn luôn lớn hơn 1, nhưng vì mạch polyme thường tiến tới phân bố Gauss lý tưởng (= đơn phân tán), nên PDI thường tiến tới 1.

Polyetylen glycol có trọng lượng phân tử nằm trong khoảng từ 500Da đến 9000Da. Cụ thể hơn, polyetylen glycol (ví dụ, mPEG) có trọng lượng phân tử được chọn từ nhóm bao gồm polyetylen glycol có trọng lượng phân tử là 2000Da, 2500Da, 3000Da, 3500Da, 4000Da, 4500Da, và 5000Da. Theo một phương án cụ thể, polyetylen glycol (ví dụ, mPEG) có trọng lượng phân tử là 5000Da.

Phương pháp bào chế thể liên hợp:

Để kết hợp polyme vào protein có hoạt tính L-asparagin aminohydrolaza, gốc polyme chứa nhóm chức đã được hoạt hoá thường phản ứng với nhóm amino trong protein. Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến phương pháp tạo ra thể liên hợp, phương pháp này bao gồm bước kết hợp một lượng polyetylen glycol (PEG) với một lượng L-asparaginaza trong dung dịch đệm trong một khoảng thời gian đủ để có liên kết đồng hoá trị PEG với L-asparaginaza. Theo một phương án cụ thể, L-asparaginaza là của loài *Erwinia*, cụ thể hơn là *Erwinia chrysanthemi*, và cụ thể hơn, L-asparaginaza bao gồm trình tự SEQ ID NO:1. Theo một phương án, PEG là monomethoxy-polyetylen glycol (mPEG).

Theo một phương án, phản ứng giữa polyetylen glycol và L-asparaginaza được thực hiện trong dung dịch đệm. Theo một số phương án cụ thể, độ pH của dung dịch đệm sẽ thay đổi trong khoảng từ 7,0 đến 9,0. Độ pH được ưu tiên nhất thay đổi trong khoảng từ 7,5 đến 8,5, ví dụ, độ pH bằng khoảng 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8,0, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, hoặc 8,5. Theo một phương án cụ thể, L-asparaginaza là của loài *Erwinia*, cụ thể hơn là *Erwinia chrysanthemi*, và cụ thể hơn, L-asparaginaza bao gồm trình tự SEQ ID NO:1.

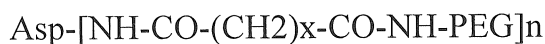
Hơn nữa, quá trình PEG hóa L-asparaginaza sẽ được thực hiện ở nồng độ protein nằm trong khoảng từ 0,5 đến 25mg/ml, cụ thể hơn là nằm trong khoảng từ 2 đến 20mg/ml và cụ thể hơn nữa là nằm trong khoảng từ 3 đến 15mg/ml. Ví dụ, nồng độ protein khoảng 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, hoặc 20mg/ml. Theo một phương án cụ thể, quá trình PEG hoá L-asparaginaza ở những nồng độ protein là của loài *Erwinia*, cụ thể hơn là *Erwinia chrysanthemi*, và cụ thể hơn, L-asparaginaza bao gồm trình tự SEQ ID NO:1.

Ở nồng độ protein cao hơn 2mg/ml phản ứng PEG hoá sẽ diễn ra rất nhanh, trong vòng ít hơn 2 giờ. Hơn nữa, sự dư thừa tỷ lệ mol của polyme so với nhóm amino trong L-asparaginaza được sử dụng là ít hơn khoảng 20:1. Ví dụ như, lượng dư tỷ lệ mol ít hơn khoảng 20:1, 19:1, 18:1, 17:1, 16:1, 15:1, 14:1, 13:1, 12:1, 11:1, 10:1, 9:1, 8:1, 7,5:1, 7:1, 6,5:1, 6:1, 5,5:1, 5:1, 4,5:1, 4:1, 3,5:1, 3:1, 2,5:1, 2:1, 1,5:1, hoặc 1:1. Theo một phương án cụ thể lượng dư tỷ lệ mol ít hơn khoảng 10:1 và theo một phương án cụ thể hơn, lượng dư tỷ lệ mol ít hơn khoảng 8:1. Theo một phương án cụ thể, L-asparaginaza là của loài *Erwinia*, cụ thể hơn là *Erwinia chrysanthemi*, và cụ thể hơn, L-asparaginaza bao gồm trình tự SEQ ID NO:1.

Số lượng các gốc PEG có thể được liên hợp với protein sẽ phụ thuộc vào số lượng nhóm amino tự do và, hơn thế nữa, phụ thuộc vào nhóm amino có thể liên kết được trong phản ứng PEG hoá. Theo một phương án cụ thể, mức độ PEG hoá (nghĩa là, số lượng gốc PEG được liên hợp với nhóm amino trên L-asparaginaza) trong khoảng từ 10% đến 100% số nhóm amino tự do và/hoặc nhóm amino có thể liên kết được (ví dụ, khoảng 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, hoặc 100%). Mức độ PEG hoá 100% số nhóm amino có thể liên kết được (ví dụ, gốc lysin và/hoặc đầu N của protein) ở trong bản mô tả này được gọi là “được PEG tối đa.” Một phương pháp để xác định nhóm amino được biến đổi trong thể liên hợp mPEG-r-crisantaspaza (mức độ PEG hoá) là phương pháp được mô tả bởi Habeeb (A.F.S.A. Habeeb, “Determination of free amino group in proteins by trinitrobenzensulfonic acid”, *Anal. Biochem.* 14 (1966), p. 328). Theo một phương án, gốc PEG được liên hợp với một hoặc nhiều nhóm amino (trong đó nhóm amino bao gồm gốc lysin và/hoặc đầu N) của L-asparaginaza. Theo một phương án cụ thể, mức độ PEG hoá nằm trong khoảng từ 10% đến 100% của tổng số hoặc số nhóm amino có thể liên kết được (ví dụ, gốc lysin và/hoặc đầu N), ví dụ, khoảng 10%, 15%, 20%, 25%, 30%,

35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% hoặc 100%. Theo một phương án cụ thể, khoảng 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% tổng số nhóm amino (ví dụ, gốc lysin và/hoặc đầu N) được liên hợp với một gốc PEG. Theo một phương án cụ thể khác, khoảng 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% nhóm amino có thể liên kết được (ví dụ, gốc lysin và/hoặc đầu N) được liên hợp với một gốc PEG. Theo một phương án cụ thể, 40 đến 55% hoặc 100% số nhóm amino có thể liên kết được (ví dụ, gốc lysin và/hoặc đầu N) được liên hợp với một gốc PEG. Theo một số phương án, các gốc PEG được liên hợp với L-asparaginaza bằng liên kết đồng hoá trị. Theo một phương án cụ thể, L-asparaginaza là của loài *Erwinia*, cụ thể hơn là *Erwinia chrysanthemi*, và cụ thể hơn, L-asparaginaza bao gồm trình tự SEQ ID NO:1.

Theo một phương án, thể liên hợp theo sáng chế có thể có công thức



trong đó Asp là protein L-asparaginaza, NH là một nhóm NH của gốc lysin và/hoặc đầu N của chuỗi protein, PEG là gốc polyetylen glycol, n là số lượng thể hiện ít nhất khoảng 40% đến 100% nhóm amino có thể liên kết được (ví dụ, gốc lysin và/hoặc đầu N) trong protein, và x là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 8 (ví dụ 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8), tốt hơn là nằm trong khoảng từ 2 đến 5 (ví dụ, 2, 3, 4, 5). Theo một phương án cụ thể, L-asparaginaza là của loài *Erwinia*, cụ thể hơn là *Erwinia chrysanthemi*, và cụ thể hơn nữa, L-asparaginaza bao gồm trình tự SEQ ID NO:1.

Các phương pháp PEG hoá khác có thể được sử dụng để tạo ra thể liên hợp theo sáng chế cũng được đề cập, ví dụ như, trong các tài liệu U.S. Pat. No. 4,179,337, U.S. Pat. No. 5,766,897, U.S. Pat. Appl. Publ. No. US 2002/0065397A1, và U.S. Pat. Appl. Publ. No. US 2009/0054590A1, được viện dẫn trong bản mô tả trong phần tài liệu tham khảo.

Theo các phương án cụ thể, sáng chế đề cập đến thể liên hợp protein có hoạt tính gần giống L-asparagin aminohydrolaza và polyetylen glycol, được chọn từ nhóm bao gồm các thể liên hợp trong đó:

(A)

- protein có độ tương đồng về cấu trúc ít nhất là 90% với L-asparaginaza của *Erwinia chrysanthemi* như được thể hiện trong SEQ ID NO:1
- polyetylen glycol có trọng lượng phân tử khoảng 5000Da,
- protein và gốc polyetylen glycol được liên kết cộng hoá trị với protein bằng liên kết amit, và
- khoảng 100% nhóm amino có thể liên kết được (ví dụ, gốc lysin và/hoặc đầu N) hoặc khoảng 80 đến 90%, cụ thể là, khoảng 84%, tổng số nhóm amino (ví dụ, gốc lysin và/hoặc đầu N) được liên hợp với một gốc polyetylen glycol.

(B)

- protein có độ tương đồng về cấu trúc ít nhất là 90% so với L-asparaginaza của *Erwinia chrysanthemi* như được thể hiện trong SEQ ID NO:1
- polyetylen glycol có trọng lượng phân tử khoảng 5000Da,
- protein và gốc polyetylen glycol được liên kết cộng hoá trị với protein bằng liên kết amit, và
- khoảng 40% đến 45 %, và cụ thể là khoảng 43% số nhóm amino có thể liên kết được (ví dụ, gốc lysin và/hoặc đầu N), hoặc khoảng 36% tổng số nhóm amino (ví dụ, gốc lysin và/hoặc đầu N) được liên hợp với một gốc polyetylen glycol.

(C)

- protein có độ tương đồng về cấu trúc ít nhất là 90% so với L-asparaginaza của *Erwinia chrysanthemi* như được thể hiện trong SEQ ID NO:1
- polyetylen glycol có trọng lượng phân tử khoảng 2000Da,
- protein và gốc polyetylen glycol được liên kết cộng hoá trị với protein bằng liên kết amit, và

- khoảng 100% nhóm amino có thể liên kết được (ví dụ, một hoặc nhiều gốc lysin và/hoặc đầu N) hoặc khoảng 80 đến 90%, cụ thể là, khoảng 84% tổng số nhóm amino (ví dụ, gốc lysin và/hoặc đầu N) được liên hợp với một gốc polyetylen glycol.

(D)

- protein có độ tương đồng về cấu trúc ít nhất là 90% so với L-asparaginaza của *Erwinia chrysanthemi* như được thể hiện trong SEQ ID NO:1
- polyetylen glycol có trọng lượng phân tử khoảng 2000Da,
- protein và gốc polyetylen glycol được liên kết cộng hoá trị với protein bằng liên kết amit, và
- từ khoảng 50% đến 60%, và cụ thể là khoảng 55% số nhóm amino có thể liên kết được (ví dụ, gốc lysin và/hoặc đầu N) hoặc khoảng 47% tổng số nhóm amino (ví dụ, gốc lysin và/hoặc đầu N) được liên hợp với một gốc polyetylen glycol.

Thể liên hợp L-Asparaginaza-PEG:

Thể liên hợp theo sáng chế có một số ưu điểm và đặc điểm bất ngờ so với L-asparaginaza không được biến đổi, đặc biệt là so với L-asparaginaza không được biến đổi của *Erwinia*, đặc biệt hơn nữa là so với L-asparaginaza không được biến đổi của *Erwinia chrysanthemi*, và đặc biệt hơn nữa là so với L-asparaginaza không được biến đổi có trình tự SEQ ID NO:1.

Theo một số phương án, thể liên hợp theo sáng chế sẽ làm giảm nồng độ L-asparagin trong huyết tương trong một khoảng thời gian ít nhất khoảng 12, 24, 48, 72, 96, hoặc 120 giờ khi được sử dụng ở liều 5U/kg thể trọng hoặc 10 µg/kg (dựa trên hàm lượng protein). Theo các phương án khác, thể liên hợp theo sáng chế sẽ làm giảm nồng độ L-asparagin trong huyết tương đến nồng độ không thể phát hiện được trong một khoảng thời gian ít nhất khoảng 12, 24, 48, 72, 96, 120, hoặc 144 giờ khi được sử dụng ở liều 25U/kg thể trọng hoặc 50 µg/kg (hàm lượng protein). Theo các phương án khác, thể liên hợp theo sáng chế sẽ làm giảm nồng độ L-asparagin trong huyết tương trong một giai đoạn ít nhất khoảng 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216, hoặc 240 giờ khi được sử dụng ở liều 50U/kg thể trọng hoặc 100 µg/kg (hàm lượng protein). Theo một phương án khác, thể liên hợp theo sáng chế sẽ làm giảm nồng độ L-asparagin

trong huyết tương đến nồng độ không thể phát hiện được trong một giai đoạn ít nhất khoảng 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216, hoặc 240 giờ khi được sử dụng với liều lượng thay đổi trong khoảng từ 10000 đến 15000IU/m² (khoảng 20 đến 30mg protein/m²). Theo một phương án cụ thể, thể liên hợp bao gồm L-asparaginaza của *Erwinia*, cụ thể hơn là *Erwinia chrysanthemi*, và cụ thể hơn, L-asparaginaza bao gồm trình tự SEQ ID NO:1. Theo một phương án cụ thể, thể liên hợp bao gồm PEG (ví dụ, mPEG) có trọng lượng phân tử ít hơn hoặc bằng khoảng 5000Da. Theo một phương án cụ thể hơn, ít nhất khoảng 40% đến 100% nhóm amino có thể liên kết được (ví dụ, gốc lysin và/hoặc đầu N) được PEG hoá.

Theo một phương án, thể liên hợp có tỷ lệ mol PEG/mol monome nằm trong khoảng từ 4,5 đến 8,5, đặc biệt là khoảng 6,5; hoạt tính đặc hiệu nằm trong khoảng từ 450 đến 550U/mg, đặc biệt là khoảng 501U/mg; và hoạt tính tương đối nằm trong khoảng từ 75% đến 85%, đặc biệt là khoảng 81% so với L-asparaginaza không được biến đổi tương ứng. Theo một phương án cụ thể, thể liên hợp có các đặc điểm trên chứa L-asparaginaza của loài *Erwinia*, cụ thể hơn là *Erwinia chrysanthemi*, và cụ thể hơn, L-asparaginaza bao gồm trình tự SEQ ID NO:1, với mức độ PEG hoá khoảng 40% đến 55% nhóm amino có thể liên kết được (ví dụ, gốc lysin và/hoặc đầu N) bằng mPEG 5000Da.

Theo một phương án, thể liên hợp có tỷ lệ mol PEG/mol monome nằm trong khoảng từ 12,0 đến 18,0, đặc biệt là khoảng 15,1; hoạt tính đặc hiệu nằm trong khoảng từ 450 đến 550U/mg, đặc biệt là khoảng 483U/mg; và hoạt tính tương đối nằm trong khoảng từ 75% đến 85%, đặc biệt là khoảng 78% so với L-asparaginaza không được biến đổi tương ứng. Theo một phương án cụ thể, thể liên hợp có các đặc điểm nêu trên bao gồm L-asparaginaza của loài *Erwinia*, cụ thể hơn là *Erwinia chrysanthemi*, và cụ thể hơn, L-asparaginaza bao gồm trình tự SEQ ID NO:1, với mức độ PEG hoá khoảng 100% nhóm amino có thể liên kết được (ví dụ, gốc lysin và/hoặc đầu N) bằng mPEG 5000Da.

Theo một phương án, thể liên hợp có tỷ lệ mol PEG/mol monome nằm trong khoảng từ 5,0 đến 9,0, đặc biệt là khoảng 7,0; hoạt tính đặc hiệu nằm trong khoảng từ 450 đến 550U/mg, đặc biệt là khoảng 501U/mg; và hoạt tính tương đối nằm trong khoảng từ 80% đến 90%, đặc biệt là khoảng 87% so với L-asparaginaza không được biến đổi tương ứng. Theo một phương án cụ thể, thể liên hợp có các đặc điểm nêu trên

bao gồm L-asparaginaza của loài *Erwinia*, cụ thể hơn là *Erwinia chrysanthemi*, và cụ thể hơn, L-asparaginaza bao gồm trình tự SEQ ID NO:1, với mức độ PEG hoá khoảng từ 40% đến 55% nhóm amino có thể liên kết được (ví dụ, gốc lysin và/hoặc đầu N) bằng mPEG 10000Da.

Theo một phương án, thể liên hợp có tỷ lệ mol PEG/mol monome nằm trong khoảng từ 11,0 đến 17,0, đặc biệt là khoảng 14,1; hoạt tính đặc hiệu nằm trong khoảng từ 450 đến 550U/mg, đặc biệt là khoảng 541U/mg; và hoạt tính tương đối nằm trong khoảng từ 80% đến 90%, đặc biệt là khoảng 87% so với L-asparaginaza không được biến đổi tương ứng. Theo một phương án cụ thể, thể liên hợp có các đặc điểm nêu trên bao gồm L-asparaginaza của loài *Erwinia*, cụ thể hơn là *Erwinia chrysanthemi*, và cụ thể hơn, L-asparaginaza bao gồm trình tự SEQ ID NO:1, với mức độ PEG hoá khoảng 100% nhóm amino có thể liên kết được (ví dụ, gốc lysin và/hoặc đầu N) bằng mPEG 10000Da.

Theo một phương án, thể liên hợp có tỷ lệ mol PEG/mol monome nằm trong khoảng từ 6,5 đến 10,5, cụ thể là khoảng 8,5; hoạt tính đặc hiệu nằm trong khoảng từ 450 đến 550U/mg, cụ thể là khoảng 524U/mg; và hoạt tính tương đối nằm trong khoảng từ 80% đến 90%, cụ thể là khoảng 84% so với L-asparaginaza không được biến đổi tương ứng. Theo một phương án cụ thể, thể liên hợp có các đặc điểm nêu trên bao gồm L-asparaginaza của loài *Erwinia*, cụ thể hơn là *Erwinia chrysanthemi*, và cụ thể hơn, L-asparaginaza bao gồm trình tự SEQ ID NO:1, với mức độ PEG hoá khoảng 40 đến 55% nhóm amino có thể liên kết được (ví dụ, gốc lysin và/hoặc đầu N) bằng mPEG 2000Da.

Theo một phương án, thể liên hợp có tỷ lệ mol PEG/mol monome nằm trong khoảng từ 12,5 đến 18,5, đặc biệt là khoảng 15,5; hoạt tính đặc hiệu nằm trong khoảng từ 450 đến 550U/mg, đặc biệt là khoảng 515U/mg; và hoạt tính tương đối nằm trong khoảng từ 80 đến 90%, đặc biệt là khoảng 83% so với L-asparaginaza không được biến đổi tương ứng. Theo một phương án cụ thể, thể liên hợp có các đặc điểm nêu trên bao gồm L-asparaginaza của loài *Erwinia*, cụ thể hơn là *Erwinia chrysanthemi*, và cụ thể hơn, L-asparaginaza bao gồm trình tự SEQ ID NO:1, với mức độ PEG hoá khoảng 100% nhóm amino có thể liên kết được (ví dụ, gốc lysin và/hoặc đầu N) bằng mPEG 2000Da.

Theo các phương án khác, thể liên hợp theo sáng chế có hoạt lực gia tăng ít nhất khoảng 10 lần, 20 lần, 30 lần, 40 lần, 50 lần, 60 lần, 70 lần, 80 lần, 90 lần, hoặc 100 lần sau khi tiêm một liều duy nhất so với L-asparaginaza không được biến đổi tương ứng. Theo một phương án cụ thể, thể liên hợp có các đặc điểm nêu trên bao gồm L-asparaginaza của loài *Erwinia*, cụ thể hơn là *Erwinia chrysanthemi*, và cụ thể hơn, L-asparaginaza bao gồm trình tự SEQ ID NO:1. Theo một phương án cụ thể, thể liên hợp bao gồm PEG (ví dụ, mPEG) có trọng lượng phân tử ít hơn hoặc bằng khoảng 5000Da. Theo một phương án cụ thể hơn, ít nhất khoảng 40% đến 100% nhóm amino có thể liên kết được (ví dụ, gốc lysin và/hoặc đầu N) được PEG hoá.

Theo một khía cạnh, thể liên hợp theo sáng chế có đặc điểm động lực học theo các thông số sau đây:

Thông số	Định nghĩa
$A_{\max}$	Hoạt tính enzym dư thừa tối đa
$t_{A_{\max}}$	Thời gian đạt $A_{\max}$ sau khi bộc lộ với mẫu xét nghiệm
$d_{A_{\max}}$	Khoảng thời gian tối đa duy trì $A_{\max}$ hoặc A trên 0

Thời gian bán hủy của hoạt tính enzym dư thừa trong huyết tương được tính theo công thức sau:

Trung bình:

$$t_{1/2} = \frac{-\ln 2 \times t}{\ln(c_t / c_0)}$$

trong đó $t_{1/2}$ là thời gian bán hủy, t là thời điểm xác định, c_t hoạt tính trong huyết tương dư thừa tại một thời điểm xác định và c_0 là hoạt tính trong huyết tương dư thừa tại thời điểm ban đầu. Diện tích dưới đường cong (AUC) được tính bằng cách sử dụng chương trình phần mềm được động lực học, ví dụ, SigmaPlot Version 11.

Theo một phương án, thể liên hợp theo sáng chế có đặc điểm dược động học liều đơn như sau, cụ thể là trong đó thể liên hợp bao gồm mPEG có trọng lượng phân tử ít hơn hoặc bằng 2000Da và L-asparaginaza của loài *Erwinia*, cụ thể hơn là *Erwinia chrysanthemi*, và cụ thể hơn, L-asparaginaza bao gồm trình tự SEQ ID NO:1:

$A_{\max}$: nằm trong khoảng từ 150U/l đến 250U/l;

T_{Amax} : nằm trong khoảng từ 4 giờ đến 8 giờ, cụ thể là khoảng 6 giờ;

d_{Amax} : nằm trong khoảng từ 220 giờ đến 250 giờ, cụ thể là, khoảng 238,5 giờ (lớn hơn 0, nằm trong khoảng từ 90 phút đến 240 giờ);

AUC: nằm trong khoảng từ 12000 đến 30000; và

$t_{1/2}$: nằm trong khoảng từ 50 giờ đến 90 giờ.

Theo một phương án, thể liên hợp theo sáng chế có đặc điểm dược động học liều đơn như sau, cụ thể là trong đó thể liên hợp bao gồm mPEG có trọng lượng phân tử ít hơn hoặc bằng 5000Da và L-asparaginaza của loài *Erwinia*, cụ thể hơn là *Erwinia chrysanthemi*, và cụ thể hơn nữa là L-asparaginaza bao gồm trình tự SEQ ID NO:1:

A_{max} : nằm trong khoảng từ 18U/l đến 250U/l;

T_{Amax} : nằm trong khoảng từ 1 giờ đến 50 giờ;

d_{Amax} : nằm trong khoảng từ 90 giờ đến 250 giờ, cụ thể là, khoảng 238,5 giờ (lớn hơn 0, nằm trong khoảng từ 90 phút đến 240 giờ);

AUC: nằm trong khoảng từ 500 đến 35000; và

$t_{1/2}$: nằm trong khoảng từ 30 giờ đến 120 giờ.

Theo một phương án, thể liên hợp theo sáng chế gây ra mức độ tiêu huỷ L-asparagin trong một khoảng thời gian với mức độ tương tự (ví dụ, 24, 48, hoặc 72 giờ) sau một liều duy nhất so với một lượng protein pegaspargaza tương đương. Theo một phương án cụ thể, thể liên hợp bao gồm L-asparaginaza của loài *Erwinia*, cụ thể hơn là *Erwinia chrysanthemi*, và cụ thể hơn, L-asparaginaza bao gồm trình tự SEQ ID NO:1. Theo một phương án cụ thể, thể liên hợp bao gồm PEG (ví dụ, mPEG) có trọng lượng phân tử ít hơn hoặc bằng khoảng 5000Da. Theo một phương án cụ thể hơn, ít nhất nằm trong khoảng từ 40% đến 100%, đặc biệt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 40 đến 55% hoặc 100% nhóm amino có thể liên kết được (ví dụ, gốc lysin và/hoặc đầu N), được PEG hoá.

Theo một phương án, thể liên hợp theo sáng chế có $t_{1/2}$ dài hơn so với pegaspargaza khi được sử dụng ở liều protein tương đương. Theo một phương án cụ thể, thể liên hợp có $t_{1/2}$ ít nhất là khoảng 50, 52, 54, 56, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, hoặc 65 giờ với liều lượng khoảng 50µg/kg (hàm lượng protein). Theo một phương án cụ

thể khác, thể liên hợp có $t_{1/2}$ ít nhất là khoảng 30, 32, 34, 36, 37, 38, 39, hoặc 40 giờ với liều lượng khoảng 10 μ g/kg (hàm lượng protein). Theo một phương án cụ thể khác, thể liên hợp có $t_{1/2}$ ít nhất là khoảng 100 đến 200 giờ với liều lượng thay đổi trong khoảng từ 10000 đến 15000IU/m² (khoảng 20 đến 30mg protein/m²).

Theo một phương án, thể liên hợp theo sáng chế có AUC trung bình lớn hơn ít nhất khoảng 2, 3, 4 hoặc 5 lần so với pegaspargaza với liều lượng protein tương đương.

Theo một phương án, thể liên hợp theo sáng chế không tạo ra đáp ứng kháng thể đáng kể nào trong một giai đoạn cụ thể sau khi sử dụng một liều duy nhất, ví dụ, lớn hơn khoảng 1 tuần, 2 tuần, 3 tuần, 4, tuần, 5 tuần, 6 tuần, 7 tuần, 8 tuần, 9 tuần, 10 tuần, 11 tuần, 12 tuần, v.v.. Theo một phương án cụ thể, thể liên hợp theo sáng chế không tạo ra đáp ứng kháng thể đáng kể nào trong ít nhất 8 tuần. Ví dụ, “không tạo ra đáp ứng kháng thể đáng kể nào” nghĩa là đối tượng được điều trị bằng thể liên hợp được xác định bằng các thông số đã được biết trong lĩnh vực kỹ thuật này là “âm tính kháng thể.” Nồng độ kháng thể có thể được xác định bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ như ELISA hoặc thử nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR-Biacore) (Zalewska-Szewczyk *et al.*, *Clin. Exp. Med.* (2009) 9:113-116; Avramis *et al.*, *Anticancer Research* 29 (2009) 299-302). Thể liên hợp theo sáng chế có thể có một tổ hợp bất kỳ các đặc tính nêu trên.

Phương pháp điều trị và sử dụng thể liên hợp:

Thể liên hợp theo sáng chế có thể được sử dụng trong điều trị bệnh có thể điều trị được nhờ quá trình tiêu huỷ asparagin. Ví dụ như, thể liên hợp là hữu dụng trong điều trị hoặc sản xuất dược phẩm để sử dụng trong điều trị bệnh bạch cầu cấp dòng nguyên bào lympho (ALL) ở cả người lớn và trẻ em, cũng như các tình trạng khác khi quá trình tiêu huỷ asparagin được kỳ vọng là có tác dụng hữu ích. Các tình trạng như vậy bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở: ung thư ác tính, hoặc ung thư, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở ung thư máu ác tính, u lympho không Hodgkin, u lympho NK, ung thư tụy, bệnh Hodgkin, bệnh bạch cầu cấp dòng tủy, bệnh bạch cầu cấp tế bào đơn nhân dòng tủy, bệnh bạch cầu cấp tế bào lympho, sacoma lympho, sacom tế bào lưới, và sacom melanin. Ung thư máu không ác tính đáp ứng với quá trình tiêu huỷ asparagin bao gồm bệnh về máu do hệ miễn dịch gây ra, ví dụ, bệnh truyền nhiễm như

bệnh do nhiễm HIV gây ra (nghĩa là, AIDS). Bệnh không phải là bệnh máu đi kèm với sự phụ thuộc asparagin bao gồm bệnh tự miễn, ví dụ như viêm khớp dạng thấp, SLE, tự miễn, bệnh collagen mạch, AIDS, v.v.. Các bệnh tự miễn khác bao gồm viêm xương khớp, hội chứng Issac, vảy nến, đái tháo đường phụ thuộc insulin, xơ cứng rải rác, viêm tiểu não xơ cứng, luput ban đỏ toàn thân, sốt thấp khớp, bệnh viêm ruột (ví dụ, viêm ruột loét và bệnh Crohn), xơ gan mật nguyên phát, viêm gan mãn tính hoạt động, viêm tiểu cầu thận, nhược cơ năng, pemphigut thông thường và bệnh Graves. Tế bào bị nghi ngờ là gây bệnh có thể được thử nghiệm sự phụ thuộc asparagin trong một thử nghiệm *in vitro* hoặc *in vivo* thích hợp bất kỳ, ví dụ, thử nghiệm *in vitro* trong đó môi trường nuôi cấy thiếu asparagin. Do đó, theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến phương pháp điều trị bệnh có thể điều trị được trên bệnh nhân, phương pháp bao gồm bước sử dụng trên bệnh nhân lượng có hiệu quả thể liên hợp theo sáng chế. Theo một phương án cụ thể, bệnh là ALL. Theo một phương án cụ thể, thể liên hợp được sử dụng trong quá trình điều trị bệnh có thể điều trị được bằng quá trình tiêu huỷ asparagin bao gồm L-asparaginaza của loài *Erwinia*, cụ thể hơn là *Erwinia chrysanthemi*, và cụ thể hơn, L-asparaginaza bao gồm trình tự SEQ ID NO:1. Theo một phương án cụ thể, thể liên hợp bao gồm PEG (ví dụ, mPEG) có trọng lượng phân tử ít hơn hoặc bằng khoảng 5000Da. Theo một phương án cụ thể hơn, ít nhất khoảng 40% đến 100% (ví dụ, gốc lysin và/hoặc đầu N), đặc biệt hơn nữa là khoảng 40% đến 55% hoặc 100% nhóm amino có thể liên kết được được PEG hoá.

Theo một phương án, quá trình điều trị bằng thể liên hợp theo sáng chế sẽ được sử dụng là phép điều trị bước đầu. Theo một phương án khác, quá trình điều trị bằng thể liên hợp theo sáng chế sẽ được sử dụng là phép điều trị tăng cường ở bệnh nhân, đặc biệt là các bệnh nhân bị ALL, trong đó các triệu chứng khách quan của hiện tượng dị ứng hoặc tăng nhạy cảm, bao gồm “tăng nhạy cảm tiềm ẩn,” xuất hiện khi sử dụng các chế phẩm asparaginaza khác, cụ thể là, L-asparaginaza thu được từ *Escherichia coli* nguyên gốc hoặc dạng được PEG hoá của nó (pegaspargaza). Ví dụ không làm hạn chế về triệu chứng khách quan của hiện tượng dị ứng hoặc tăng nhạy cảm bao gồm xét nghiệm “dương tính kháng thể” đối với enzym asparaginaza. Theo một phương án cụ thể, thể liên hợp theo sáng chế được sử dụng trong phép điều trị tăng cường khi điều trị bằng pegaspargaza. Theo một phương án cụ thể hơn, thể liên hợp được sử dụng trong phép điều trị thứ hai bao gồm L-asparaginaza của loài *Erwinia*, cụ thể hơn

là *Erwinia chrysanthemi*, và cụ thể hơn, L-asparaginaza bao gồm trình tự SEQ ID NO:1. Theo một phương án cụ thể hơn, thể liên hợp bao gồm PEG (ví dụ, mPEG) có trọng lượng phân tử ít hơn hoặc bằng khoảng 5000Da, cụ thể hơn khoảng 5000Da. Theo một phương án cụ thể hơn nữa, ít nhất khoảng 40% đến 100% (ví dụ, gốc lysin và/hoặc đầu N), đặc biệt hơn nữa là khoảng 40% đến 55% hoặc 100% nhóm amino có thể liên kết được được PEG hoá.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp điều trị bệnh bạch cầu cấp dòng nguyên bào lympho bao gồm việc sử dụng trên bệnh nhân cần điều trị lượng có hiệu quả điều trị thể liên hợp theo sáng chế. Theo một phương án cụ thể, quá trình điều trị sẽ sử dụng liều lượng thể liên hợp thay đổi trong khoảng từ 1500IU/m² đến 15000IU/m², thường là nằm trong khoảng từ 10000 đến 15000IU/m² (khoảng 20 đến 30mg protein/m²), theo một lịch trình từ khoảng hai lần một tuần một lần một tháng, thường là một lần trong một tuần hoặc một lần trong nhiều tuần, làm hoạt chất duy nhất (ví dụ, phép điều trị đơn) hoặc là một phần của phép điều trị kết hợp với các thuốc hoá trị liệu, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở glucocorticoid, corticosteroid, hợp chất chống ung thư hoặc các hoạt chất khác, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở methotrexat, dexamethason, prednison, prednisolon, vincristin, cyclophosphamid và anthracyclin. Ví dụ, bệnh nhân bị ALL sẽ được sử dụng thể liên hợp theo sáng chế là một thành phần của phép hoá trị liệu bao gồm nhiều hoạt chất trong 3 giai đoạn hoá trị bao gồm kích thích, củng cố hoặc tăng cường độ, và duy trì. Ví dụ, thể liên hợp không được sử dụng cùng với chất ức chế asparagin synthetaza (ví dụ, như các chất ức chế được đề cập trong công bố đơn PCT số WO 2007/103290). Ví dụ khác, thể liên hợp không được sử dụng cùng với chất ức chế asparagin synthetaza, nhưng lại được sử dụng cùng với các chất hoá trị liệu khác. Thể liên hợp có thể được sử dụng trước, sau hoặc đồng thời với các hợp chất khác như một phần của chế độ hoá trị liệu bao gồm nhiều hoạt chất. Theo một phương án cụ thể, thể liên hợp bao gồm L-asparaginaza của loài *Erwinia*, cụ thể hơn là *Erwinia chrysanthemi*, và cụ thể hơn, L-asparaginaza bao gồm trình tự SEQ ID NO:1. Theo một phương án cụ thể, thể liên hợp bao gồm PEG (ví dụ, mPEG) có trọng lượng phân tử ít hơn hoặc bằng khoảng 5000Da. Theo một phương án cụ thể hơn, ít nhất khoảng 40% đến 100% (ví dụ, gốc lysin và/hoặc đầu N), đặc biệt hơn nữa là khoảng 40% đến 55% hoặc 100% nhóm amino có thể liên kết được được PEG hoá.

Theo một phương án cụ thể, sáng chế đề cập đến phương pháp bao gồm bước sử dụng thể liên hợp theo sáng chế với lượng nằm trong khoảng từ 1U/kg đến 25U/kg (ví dụ, khoảng 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, hoặc 25U/kg) hoặc một lượng tương đương của chúng (ví dụ, tính theo hàm lượng protein). Theo một phương án cụ thể hơn, thể liên hợp được sử dụng với lượng được chọn từ nhóm bao gồm các giá trị là khoảng 5, khoảng 10, và khoảng 25U/kg. Theo một phương án cụ thể khác, thể liên hợp được sử dụng với liều lượng nằm trong khoảng từ 1000IU/m² đến 20000IU/m² (ví dụ, 1000IU/m², 2000IU/m², 3000IU/m², 4000IU/m², 5000IU/m², 6000IU/m², 7000IU/m², 8000IU/m², 9000IU/m², 10000IU/m², 11000IU/m², 12000IU/m², 13000IU/m², 14000IU/m², 15000IU/m², 16000IU/m², 17000IU/m², 18000IU/m², 19000IU/m², hoặc 20000IU/m²). Theo một phương án cụ thể khác, thể liên hợp được sử dụng với liều lượng làm giảm nồng độ L-asparagin đến nồng độ không thể phát hiện được bằng cách sử dụng phương pháp và thiết bị đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này trong một thời gian nằm trong khoảng từ 3 ngày đến 10 ngày (ví dụ, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, hoặc 10 ngày) với một liều duy nhất. Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến phương pháp bao gồm bước sử dụng thể liên hợp theo sáng chế tạo ra đáp ứng miễn dịch thấp hơn ở bệnh nhân so với khi sử dụng L-asparaginaza không được liên hợp. Theo một phương án khác, phương pháp bao gồm bước sử dụng thể liên hợp theo sáng chế có thời gian bán hủy tuần hoàn *in vivo* dài hơn sau khi sử dụng một liều duy nhất so với L-asparaginaza không liên hợp. Theo một phương án, phương pháp bao gồm bước sử dụng thể liên hợp có $t_{1/2}$ dài hơn so với pegaspargaza được sử dụng với liều lượng protein tương đương. Theo một phương án cụ thể, phương pháp bao gồm bước sử dụng thể liên hợp có $t_{1/2}$ ít nhất khoảng 50, 52, 54, 56, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, hoặc 65 giờ với liều lượng khoảng 50µg/kg (hàm lượng protein). Theo một phương án cụ thể khác, phương pháp bao gồm bước sử dụng thể liên hợp có $t_{1/2}$ ít nhất khoảng 30, 32, 34, 36, 37, 37, 39, hoặc 40 giờ với liều lượng khoảng 10µg/kg (hàm lượng protein). Theo một phương án cụ thể khác, phương pháp bao gồm bước sử dụng thể liên hợp có $t_{1/2}$ ít nhất nằm trong khoảng từ 100 đến 200 giờ với liều lượng thay đổi trong khoảng từ 10000 đến 15000IU/m² (20 đến 30mg protein/m²). Theo một phương án, phương pháp bao gồm bước sử dụng thể liên hợp có AUC trung bình lớn hơn ít nhất khoảng 2, 3, 4 hoặc 5 lần so với pegaspargaza với liều lượng protein tương đương. Theo một phương án khác, phương pháp bao gồm bước sử

dụng thể liên hợp theo sáng chế có AUC lớn hơn sau khi sử dụng liều đơn so với L-asparaginaza không liên hợp. Theo một phương án cụ thể, thể liên hợp bao gồm L-asparaginaza của loài *Erwinia*, cụ thể hơn là *Erwinia chrysanthemi*, và cụ thể hơn, L-asparaginaza bao gồm trình tự SEQ ID NO:1. Theo một phương án cụ thể, thể liên hợp bao gồm PEG (ví dụ, mPEG) có trọng lượng phân tử ít hơn hoặc bằng khoảng 5000Da. Theo một phương án cụ thể hơn, ít nhất khoảng 40% đến 100% (ví dụ, gốc lysin và/hoặc đầu N), đặc biệt hơn nữa là khoảng 40% đến 55% hoặc 100% nhóm amino có thể liên kết được được PEG hoá.

Tỷ lệ tái phát ở bệnh nhân bị ALL sau khi điều trị bằng L-asparaginaza vẫn còn rất cao, với khoảng 10 đến 25% bệnh nhi bị ALL bị tái phát sớm (ví dụ, một số bị tái phát trong giai đoạn duy trì ở thời điểm 30 đến 36 tháng sau giai đoạn điều trị kích thích) (Avramis và Panosyan, *Clin. Pharmacokinet.* (2005) 44:367-393). Nếu bệnh nhân được điều trị bằng L-asparaginaza thu được từ *E. coli* bị tái phát, thì các lần điều trị tiếp theo bằng chế phẩm từ *E. coli* có thể tạo ra tác dụng “chủng ngừa”, do đó chế phẩm từ *E. coli* sẽ gia tăng hoạt tính sinh miễn dịch trong các lần sử dụng tiếp theo. Theo một phương án, thể liên hợp theo sáng chế có thể được sử dụng trong phương pháp điều trị bệnh nhân bị ALL tái phát đã được điều trị trước đó bằng các chế phẩm asparaginaza khác, cụ thể là những bệnh nhân đã được điều trị trước đó bằng asparaginaza thu được từ *E. coli*.

Theo một số phương án, việc sử dụng và phương pháp điều trị theo sáng chế bao gồm bước sử dụng thể liên hợp L-asparaginaza có đặc tính hoặc các đặc tính được đề cập theo sáng chế (ví dụ, trong mục “thể liên hợp L-asparaginaza PEG”) hoặc mục dưới đây.

Dược phẩm, dạng bào chế và đường dùng:

Sáng chế còn đề cập đến dược phẩm chứa thể liên hợp theo sáng chế. Theo một phương án cụ thể, dược phẩm được chứa trong lọ ở dạng bột đông khô, sẽ được hoàn nguyên bằng dung môi, như dạng L-asparaginaza đang được bán trên thị trường hiện nay, không phân biệt nguồn vi khuẩn nào được sử dụng để sản xuất (Kidrolase®, Elspar®, Erwinase®...). Theo một phương án khác, dược phẩm ở dạng dung dịch “pha sẵn để sử dụng”, như pegaspargaza (Oncaspar®), ngoài cách sử dụng thông

thường, còn có thể sử dụng theo các đường khác như, được tiêm bắp, qua tĩnh mạch (truyền và/hoặc tiêm), dùng trong vỏ não – não thất (icv), dưới da.

Thế liên hợp theo sáng chế, bao gồm cả chế phẩm chứa thế liên hợp theo sáng chế (*ví dụ*, được phẩm) có thể được sử dụng cho bệnh nhân bằng cách sử dụng các kỹ thuật chuẩn. Có thể thấy các kỹ thuật và dạng bào chế trong tài liệu “Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1990”.

Dạng liều thích hợp phụ thuộc một phần vào mục đích sử dụng hoặc đường dùng, ví dụ như, qua đường miệng, qua da, qua niêm mạc, hoặc theo đường tiêm (ngoài đường tiêu hoá). Dạng liều như vậy sẽ cho phép hoạt chất điều trị tới được tế bào đích hoặc theo cách khác có tác dụng điều trị mong muốn. Ví dụ như, được phẩm được tiêm vào dòng máu thường ở dạng dung dịch.

Thế liên hợp và/hoặc được phẩm theo sáng chế có thể được bào chế ở dạng muối được dụng và phức hợp của chúng. Muối được dụng là muối không độc khi ở hàm lượng và nồng độ được sử dụng. Chế phẩm các muối này có thể hỗ trợ mục đích sử dụng bằng cách biến đổi đặc điểm vật lý của hợp chất mà không mất đi tác dụng sinh lý. Các cách thay đổi đặc tính vật lý hữu dụng bao gồm giảm nhiệt độ nóng chảy để hỗ trợ việc sử dụng qua niêm mạc và tăng độ hoà tan để hỗ trợ việc sử dụng ở nồng độ được chất cao hơn. Muối được dụng của asparaginaza có thể ở dạng phức hệ, như đã biết rõ đối với các chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Muối được dụng bao gồm muối cộng axit như muối sulfat, hydroclorua, fumarat, maleat, phosphat, sulfamat, axetat, xitrat, lactat, tartrat, metansulfonat, etansulfonat, benzenesulfonat, p-toluensulfonat, xyclohexylsulfamat, và quinat. Muối được dụng cũng có thể thu được từ axit, bao gồm axit hydrocloric, axit maleic, axit sulfuric, axit phosphoric, axit sulfamic, axit axetic, axit xitric, axit lactic, axit tartaric, axit malonic, axit metansulfonic, axit etansulfonic, axit benzensulfonic, axit p-toluensulfonic, axit xyclohexylsulfamic, axit fumaric, và axit quinic.

Muối được dụng cũng bao gồm các muối cộng bazơ như muối benzathin, cloprocain, cholin, dietanolamin, etylendiamin, meglumin, procain, nhôm, canxi, lithi, magie, kali, natri, amoni, alkylamin, và kẽm, khi có các nhóm chức axit như axit carboxylic hoặc phenol. Ví dụ như, tham khảo tài liệu “Remington's Pharmaceutical

Sciences”. Có thể tạo ra các loại muối này bằng cách sử dụng các loại bazơ tương ứng thích hợp.

Tá dược và/hoặc chất mang dược dụng cũng có thể được đưa vào dược phẩm theo sáng chế để hỗ trợ việc sử dụng asparaginaza. Ví dụ về chất mang thích hợp để sử dụng theo sáng chế bao gồm canxi cacbonat, canxi phosphat, các loại đường khác nhau như lactoza, glucoza, hoặc sucroza, hoặc các loại tinh bột, dẫn xuất xenluloza, gelatin, dầu thực vật, polyetylen glycol, và dung môi tương hợp sinh lý. Ví dụ về dung môi tương hợp sinh lý bao gồm dung dịch nước vô trùng để pha nước pha tiêm (WFI), dung dịch muối sinh lý và dextroza.

Dược phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng theo nhiều đường dùng khác nhau, bao gồm qua tĩnh mạch, qua phúc mạc ổ bụng, dưới da, qua cơ, qua đường miệng, tại chỗ (qua da), hoặc qua niêm mạc. Để sử dụng toàn thân, việc sử dụng qua đường miệng được ưu tiên. Để sử dụng qua đường miệng, ví dụ, hợp chất có thể được bào chế thành dạng liều dùng đường miệng thông thường như viên nang, viên nén, và dạng bào chế lỏng như xi-rô, cồn thuốc và chế phẩm nhỏ giọt dạng cô đặc.

Theo cách khác, có thể sử dụng dược phẩm theo đường tiêm (sử dụng ngoài đường tiêu hoá), ví dụ, tiêm bắp, tiêm tĩnh mạch, tiêm phúc mạc ổ bụng, và tiêm dưới da. Để sử dụng theo đường tiêm, dược phẩm sẽ được bào chế ở dạng dung dịch lỏng, thường ở dạng dung dịch đậm hoặc dung dịch tương hợp sinh lý như dung dịch muối sinh lý, dung dịch Hank, dung dịch Ringer. Ngoài ra, hợp chất có thể được bào chế ở dạng rắn và được tái hoà tan hoặc phân tán ngay trước khi sử dụng. Ví dụ như, có thể tạo ra thể liên hợp ở dạng đông khô. Theo một phương án cụ thể, thể liên hợp được sử dụng theo đường tiêm bắp. Theo một phương án cụ thể khác, thể liên hợp được sử dụng theo đường tiêm tĩnh mạch.

Việc sử dụng toàn thân cũng có thể được thực hiện theo đường qua niêm mạc hoặc qua da. Để sử dụng qua niêm mạc hoặc qua da, chất thấm thích hợp có thể thấm qua các hàng rào sẽ được sử dụng trong dạng bào chế. Các chất thấm đã được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này, và bao gồm, ví dụ như để sử dụng qua niêm mạc là muối mật và dẫn xuất của axit fusidic. Ngoài ra, chất tẩy có thể được sử dụng để hỗ trợ quá trình thấm. Việc sử dụng qua niêm mạc có thể được thực hiện bằng cách xịt mũi hoặc xông hít (để phân phối vào phổi), thuốc đặt trực tràng, hoặc thuốc đặt âm đạo. Để sử

dụng tại chỗ, hợp chất có thể được bào chế thành thuốc mỡ, sáp, gel, hoặc kem như đã được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Lượng thể liên hợp cần được phân phối sẽ phụ thuộc vào nhiều yếu tố, ví dụ như, the IC_{50} , EC_{50} , thời gian bán hủy sinh học của hợp chất, tuổi, kích thước, thể trọng, tình trạng thể chất của bệnh nhân, bệnh hoặc rối loạn cần được điều trị. Tầm quan trọng của các yếu tố này và các yếu tố khác cần phải xem xét đã được biết rõ đối với các chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này. Thông thường, lượng thể liên hợp cần được sử dụng sẽ thay đổi trong khoảng từ 10 IU/m^2 đến 50000 IU/m^2 (diện tích bề mặt của cơ thể bệnh nhân), trong đó liều lượng thay đổi trong khoảng từ 1000 IU/m^2 đến 15000 IU/m^2 là được ưu tiên, và tốt hơn nữa là thay đổi trong khoảng từ 6000 IU/m^2 đến 15000 IU/m^2 , và đặc biệt tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 10000 đến 15000 IU/m^2 (khoảng 20 đến $30 \text{ mg protein/m}^2$) để điều trị bệnh về máu ác tính, ví dụ, bệnh bạch cầu. Thông thường, liều sẽ được sử dụng bằng cách tiêm bắp hoặc tiêm tĩnh mạch với khoảng cách liều là khoảng 3 lần một tuần đến một lần trong một tháng, thường là một lần trong một tuần hoặc một lần trong nhiều tuần trong quá trình điều trị. Tất nhiên, các chế độ liều và/hoặc chế độ điều trị khác cũng có thể được sử dụng, và sẽ được quyết định bởi bác sĩ điều trị.

Theo các phương án cụ thể, thể liên hợp và/hoặc được phẩm hoặc dạng bào chế được sử dụng theo sáng chế bao gồm L-asparaginaza của loài *Erwinia*, cụ thể hơn là *Erwinia chrysanthemi*, và cụ thể hơn, L-asparaginaza bao gồm trình tự SEQ ID NO:1. Theo một phương án cụ thể, thể liên hợp bao gồm L-asparaginaza của loài *Erwinia*, cụ thể hơn là *Erwinia chrysanthemi*, và cụ thể hơn nữa là L-asparaginaza bao gồm trình tự SEQ ID NO:1. Theo một phương án cụ thể, thể liên hợp bao gồm PEG (ví dụ, mPEG) có trọng lượng phân tử ít hơn hoặc bằng khoảng 5000Da. Theo một phương án cụ thể hơn, ít nhất khoảng 40% đến 100% nhóm amino (ví dụ, gốc lysin và/hoặc đầu N) được PEG hoá.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Bào chế crisantaspaza tái tổ hợp

Chủng vi khuẩn tái tổ hợp được sử dụng để sản xuất protein L-asparaginaza trần tái tổ hợp của *Erwinia chrysanthemi* (còn được gọi là “r-crisantaspaza”) là chủng *E. coli* BL21 bị loại bỏ gen *ansB* (gen mã hóa L-asparaginaza typ II nội sinh của *E.*

coli) để tránh tạp nhiễm L-asparaginaza tái tổ hợp của *Erwinia chrysanthemi* với enzym này. Việc loại bỏ gen *ansB* dựa trên phương pháp tái tổ hợp tương đồng và chuyển nạp thể thực khuẩn được thực hiện theo 3 bước sau đây: 1) chủng vi khuẩn (NM1100) biểu hiện thể thực khuẩn lambda khuyết thiếu bộ trợ chức năng bảo vệ và tái tổ hợp ADN thẳng được biến nạp điện trong tế bào vi được biến nạp plasmit thẳng (catxet kanamycin) chứa gen kanamycin nằm bên trình tự đích nhận điện FLP (FRT). Quá trình tái tổ hợp xảy ra để thay thế gen *ansB* bằng catxet *kanamycin* trong hệ gen vi khuẩn, tạo ra chủng $\Delta ansB$; 2) quá trình chuyển nạp thể thực khuẩn được sử dụng để kết hợp trình tự catxet kanamycin từ chủng $\Delta ansB$ NM1100 vào locut *ansB* trong chủng BL21. Quá trình này tạo ra chủng *E. coli* BL21 bị loại bỏ gen *ansB* và kháng lại kanamycin; 3) chủng này được biến nạp bằng plasmit trợ giúp FLP để tách gen kanamycin bằng quá trình tái tổ hợp tương đồng ở trình tự FRT. Hệ gen của chủng cuối cùng (chủng BL21 $\Delta ansB$) được đọc trình tự, khẳng định quá trình loại bỏ hoàn toàn gen *ansB* nội sinh.

Trình tự ADN được tối ưu của *E. coli* mã hóa L-asparaginaza của *Erwinia chrysanthemi* hoàn thiện được dung hợp với peptit tín hiệu ENX của *Bacillus subtilis* được xen vào vector biểu hiện. Vector này cho phép biểu hiện L-asparaginaza tái tổ hợp của *Erwinia chrysanthemi* dưới sự kiểm soát của đoạn khởi đầu T5/lac lai được kích thích bằng cách thêm Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranosid (IPTG) và tạo ra tính kháng kanamycin.

Chủng BL21 $\Delta ansB$ được biến nạp vector biểu hiện này. Tế bào được biến nạp được sử dụng để sản xuất r-crisantaspaza bằng phương pháp lên men glucoza bề nạp trong môi trường Reisenberg. Quá trình kích thích tế bào được thực hiện 16 giờ ở 23°C bằng chất kích thích IPTG. Sau khi thu hoạch tế bào và phân giải bằng phương pháp đồng nhất hóa trong đệm natri phosphat 10mM ở pH=6 EDTA 5mM (đệm A), dung dịch protein được làm trong bằng phương pháp ly tâm hai lần ở tốc độ 15000 vòng/phút, sau đó là lọc qua màng lọc 0,45 μ m và 0,22 μ m. L-asparaginaza tái tổ hợp của *Erwinia chrysanthemi* được tinh chế sử dụng phương pháp sắc ký và cô đặc. Một cách vắn tắt, điểm đẳng điện theo lý thuyết của L-asparaginaza của *Erwinia chrysanthemi* (7,23) cho phép enzym tái tổ hợp hấp phụ lên nhựa trao đổi cation ở pH 6. Do đó, enzym tái tổ hợp được bắt giữ trên cột Capto S (sắc ký trao đổi cation) và tách rửa bằng gradient muối trong đệm A. Các phân đoạn chứa enzym tái tổ hợp được

gom lại. Tiếp theo, dung dịch nói trên được tinh chế trên cột Capto MMC (sắc ký trao đổi cation) trong đệm A bằng gradient muối. Các phân đoạn được tách rửa chứa L-asparaginaza của *Erwinia chrysanthemi* được gom lại và cô đặc trước khi tách protein trên sắc ký loại theo kích thước sử dụng cột Superdex 200pg như một bước tinh chế. Các phân đoạn chứa enzym tái tổ hợp được gom lại, cô đặc và lọc thẩm tách với đệm natri phosphat 100mM pH 8. Độ tinh khiết của chế phẩm L-asparaginaza của *Erwinia chrysanthemi* được đánh giá bằng SDS-PAGE (Fig. 1) và RP-HPLC và ít nhất là bằng 90%. Mức độ nguyên vẹn của enzym tái tổ hợp được khẳng định bằng phương pháp đọc trình tự đầu N và LC-MS. Hoạt tính enzym được xác định ở 37°C sử dụng hóa chất Nessler. Hoạt tính đặc hiệu của L-asparaginaza tái tổ hợp tinh khiết của *Erwinia chrysanthemi* là khoảng 600U/mg. Một đơn vị hoạt tính enzym được định nghĩa là lượng enzym giải phóng 1µmol amoniắc từ L-asparagin tính theo phút ở 37°C.

Ví dụ 2: Bào chế thể liên hợp L-asparaginaza- mPEG 10kDa

Dung dịch L-asparaginaza của *Erwinia chrysanthemi* được khuấy trong đệm natri phosphat 100mM ở pH=8,0 ở nồng độ protein từ 2,5 đến 4mg/ml, khi có mặt mPEG-NHS 10kDa nồng độ 150mg/ml hoặc 36mg/ml, trong 2 giờ ở 22°C. L-asparaginaza- mPEG 10kDa thô thu được được tinh chế bằng sắc ký loại theo kích thước sử dụng cột Superdex 200 pg trên máy tinh chế Äkta UPC 100. Phân đoạn chứa protein được gom lại và cô đặc để tạo ra nồng độ protein từ 2 đến 8mg/ml. Hai thể liên hợp L-asparaginaza-mPEG 10kDa được tạo ra theo cách này, khác nhau về mức độ PEG hoá được xác định bằng thử nghiệm TNBS với L-asparaginaza không được biến đổi là đối chứng, một thể liên hợp tương ứng với mức PEG hoá hoàn toàn (100% nhóm amino có thể liên kết được (ví dụ, gốc lysin và/hoặc đầu N) được liên hợp tương ứng với mức độ PEG hoá 78% tổng số nhóm amino (ví dụ, gốc lysin và/hoặc đầu N)); thể liên hợp thứ hai tương ứng với mức độ PEG hoá một phần (39% tổng số nhóm amino (ví dụ, gốc lysin và/hoặc đầu N) hoặc khoảng 50% nhóm amino có thể liên kết được (ví dụ, gốc lysin và/hoặc đầu N)). Phân tích SDS-PAGE các thể liên hợp được thể hiện trên Fig. 2. Thể liên hợp thu được ở dạng một băng gần như đồng nhất không chứa r-crisantaspaza không được biến đổi ở mức có thể phát hiện được.

Ví dụ 3: Bào chế thể liên hợp L-asparaginaza – mPEG 5kDa

Dung dịch L-asparaginaza của *Erwinia chrysanthemi* được khuấy trong đệm natri phosphat 100mM ở pH=8,0 ở nồng độ protein 4mg/ml, khi có mặt mPEG-NHS 5kDa với nồng độ 150mg/ml hoặc 22,5mg/ml, trong 2 giờ ở 22°C. L-asparaginaza-mPEG 5kDa thô thu được được tinh chế bằng sắc ký loại kích thước sử dụng cột Superdex 200 pg trên máy tinh chế Äkta UPC 100. Phân đoạn chứa protein được gom lại và cô đặc để tạo ra nồng độ protein từ 2 đến 8mg/ml. Hai thể liên hợp L-asparaginaza-mPEG 5kDa được tạo ra theo cách này, khác nhau về mức độ PEG hoá được xác định bằng thử nghiệm TNBS với L-asparaginaza không được biến đổi là đối chứng, một thể liên hợp tương ứng với mức độ PEG hoá hoàn toàn (100% nhóm amino có thể liên kết được (ví dụ, gốc lysin và/hoặc đầu N) được liên hợp tương ứng với mức độ PEG hoá 84% tổng số nhóm amino (ví dụ, gốc lysin và/hoặc đầu N)); thể liên hợp thứ hai tương ứng với PEG hoá một phần (36% tổng số nhóm amino (ví dụ, gốc lysin và/hoặc đầu N) hoặc khoảng 43% nhóm amino có thể liên kết được (ví dụ, gốc lysin và/hoặc đầu N)). Phân tích SDS-PAGE các thể liên hợp được thể hiện trên Fig. 2. Thể liên hợp thu được ở dạng một băng gần như đồng nhất không có r-crisantaspaza không được biến đổi ở mức có thể phát hiện được.

Ví dụ 4: Bào chế thể liên hợp L-asparaginaza – mPEG 2kDa

Dung dịch L-asparaginaza của *Erwinia chrysanthemi* được khuấy trong đệm natri phosphat 100mM ở pH=8,0 ở nồng độ protein 4mg/ml, khi có mặt mPEG-NHS 2kDa với nồng độ 150mg/ml hoặc 22,5mg/ml, trong 2 giờ ở 22°C. L-asparaginaza-mPEG 2kDa thô thu được được tinh chế bằng sắc ký loại kích thước sử dụng cột Superdex 200 pg trên máy tinh chế Äkta UPC 100. Phân đoạn chứa protein được gom lại và cô đặc để tạo ra nồng độ protein từ 2 đến 8mg/ml. Hai thể liên hợp L-asparaginaza-mPEG 2kDa được tạo ra theo cách này, khác nhau về mức độ PEG hoá được xác định bằng thử nghiệm TNBS với L-asparaginaza không được biến đổi là đối chứng, một thể liên hợp tương ứng với mức độ PEG hoá hoàn toàn (100% nhóm amino có thể liên kết được (ví dụ, gốc lysin và/hoặc đầu N) được liên hợp tương ứng với mức độ PEG hoá 86% tổng số nhóm amino (ví dụ, gốc lysin và/hoặc đầu N)); thể liên hợp thứ hai tương ứng với PEG hoá một phần (47% tổng số nhóm amino (ví dụ, gốc lysin và/hoặc đầu N) hoặc khoảng 55% nhóm amino có thể liên kết được (ví dụ, gốc lysin và/hoặc đầu N)). Phân tích SDS-PAGE các thể liên hợp được thể hiện trên

Fig. 2. Thể liên hợp thu được ở dạng một băng gần như đồng nhất chứa không chứa r-crisantaspaza không được biến đổi có thể phát hiện được.

Ví dụ 5: Hoạt tính của thể liên hợp mPEG-r-crisantaspaza

Hoạt tính L-asparaginaza aminohydrolaza của từng thể liên hợp được đề cập trong các ví dụ trước được xác định bằng quá trình Nessler hóa amoniắc được giải phóng từ L-asparagin nhờ hoạt tính enzym. Một cách vắn tắt, 50 μ L dung dịch enzym được trộn với L-asparagin 20mM trong đệm Natri borat 50mM pH=8,6 và ủ trong 10 phút ở 37°C. Dừng phản ứng bằng cách thêm 200 μ L hóa chất Nessler. Mức độ hấp thụ của dung dịch này được đo ở bước sóng 450 nm. Hoạt tính được tính từ đường cong hiệu chỉnh thu được từ đối chứng amoni sulfat. Kết quả được nêu trong bảng 2, dưới đây:

Bảng 2: Hoạt tính của thể liên hợp mPEG-r-crisantaspaza

Mẫu *	mol PEG/ mol monome**	Hoạt tính đặc hiệu [U/mg]	Tỷ lệ hoạt tính tương đối
r-crisantaspaza-mPEG 10kDa 40%	7,0	543	87
r-crisantaspaza-mPEG 10kDa 100%	14,1	541	87
r-crisantaspaza-mPEG 5kDa 40%	6,5	501	81
r-crisantaspaza-mPEG 5kDa 100%	15,1	483	78
r-crisantaspaza-mPEG 2kDa 40%	8,5	524	84
r-crisantaspaza-mPEG 2kDa 100%	15,5	515	83
r-crisantaspaza	-	622	100

* các con số “40%” và “100%” chỉ ra mức độ PEG hoá xấp xỉ của lần lượt 40% đến 55% và 100% nhóm amino có thể liên kết được (Ví dụ 2 đến 4, đã dẫn).

** tỷ lệ mol PEG/mol monome được ngoại suy từ số liệu sử dụng thử nghiệm TNBS, với giả thiết rằng tất cả các nhóm amino của protein (ví dụ, gốc lysin và đầu N) đều có thể liên kết được.

Hoạt tính dư thừa của thể liên hợp mPEG-r-crisantaspaza thay đổi từ 483 đến 543U/mg. Số liệu này là tương ứng với 78 đến 87% hoạt tính L-asparagin aminohydrolaza của enzym không được biến đổi.

Ví dụ 6: Tác dụng tiêu hủy L-Asparagin của crisantaspaza không được biến đổi

Đặc điểm dược động học của Erwinase® được xác định trong thể động vật lai B6D2F1 (có hoạt lực miễn dịch, con cái), do Charles River Germany cung cấp. Erwinase® là crisantaspaza được bán trên thị trường (L-asparaginaza của *Erwinia chrysanthemi*). Một cách vắn tắt, 2 động vật trong một nhóm được tiêm Erwinase® tĩnh mạch một mũi duy nhất với liều 5, 25, 125, hoặc 250U/kg thể trọng. Tại các thời điểm 1 giờ trước khi tiêm và 6 giờ, 12 giờ, 24 giờ, và 48 giờ sau khi tiêm, mẫu huyết tương được lấy từ hốc mắt và phân tích nồng độ L-asparagin trong huyết tương.

Nồng độ axit amin trong huyết tương được xác định bằng bộ kit phân tích axit amin PICO-TAG (Waters). Một cách vắn tắt, mẫu huyết tương được khử protein hóa bằng phương pháp kết tủa metanol. Axit amin tự do trong dịch nổi sau ly tâm được tạo dẫn xuất bằng phenylisothioxyanat và định lượng bằng RP-HPLC.

Như được thể hiện trên Fig. 3, các liều lượng 5 và 25U/kg không có hiệu quả trong việc giảm nồng độ L-asparagin ở chuột sau khi sử dụng qua đường tĩnh mạch. Chỉ có liều 250U/kg mới gây ra quá trình tiêu hủy hoàn toàn sau 48 giờ.

Kết quả này đã chứng minh hạn chế lâm sàng của Erwinase®, một crisantaspaza không được biến đổi, cần phải được sử dụng lên tới 3 lần một tuần ở bệnh nhân bị ALL, đồng thời khi tiêm gây đau và ở liều cao thường gây ra đáp ứng dị ứng và hoạt tính sinh miễn dịch.

Ví dụ 7: Tác dụng tiêu hủy L-asparagin và hoạt tính L-asparaginaza trong huyết tương sau khi dùng một liều duy nhất 6 thể liên hợp mPEG-r-crisantaspaza

Đặc điểm dược động học và dược động học của 6 thể liên hợp mPEG-r-crisantaspaza khác nhau được đánh giá ở mẫu động vật lai B6D2F1 (có hoạt lực miễn dịch, con cái), do Charles River Germany cung cấp. Sáu thể liên hợp được thử nghiệm khác nhau ở kích thước phân tử của PEG (2, 5 hoặc 10kDa) và ở mức độ PEG hoá (PEG hoá tối đa và PEG hóa một phần). Crisantaspaza không được biến đổi (Erwinase®) được sử dụng là đối chứng. Một cách vắn tắt, 4 động vật trong một nhóm

được tiêm một mũi duy nhất thể liên hợp qua tĩnh mạch với liều 5U/kg thể trọng và Erwinase® với liều 250U/kg thể trọng. Tại các thời điểm -1 giờ trước khi dùng thuốc và 6 giờ, 24 giờ, 48 giờ, 96 giờ và 192 giờ sau khi tiêm, mẫu huyết tương được lấy từ hốc mắt của từng động vật và phân tích nồng độ L-asparagin và hoạt tính enzym dư thừa trong huyết tương.

Nồng độ axit amin trong huyết tương được xác định bằng bộ kit phân tích axit amin PICO-TAG (Waters). Một cách vắn tắt, mẫu huyết tương được khử protein hóa bằng phương pháp kết tủa metanol. Axit amin tự do trong dịch nổi sau ly tâm được tạo dẫn xuất bằng phenylisothioxyanat và định lượng bằng RP-HPLC.

Hoạt tính enzym trong huyết tương được xác định bằng thử nghiệm tạo màu. L-aspartic β -hydroxamat (AHA) được sử dụng là cơ chất. Enzym này thủy phân AHA thành L-Asp và hydroxylamin, được đánh giá ở bước sóng 710nm sau khi ngưng tụ bằng 8-hydroxyquinolin và oxy hóa thành indooxin. (Analytical Biochemistry 309 (2002): 117-126).

Như được thể hiện trên Fig. 4, thể liên hợp được sử dụng với liều lượng 5U/kg cho thấy khả năng tiêu hủy L-asparagin ít nhất là tốt bằng Erwinase® 250U/kg, cho thấy quá trình PEG hoá đã gia tăng khả năng của protein lên ít nhất 50 lần. Tất cả các thể liên hợp đều có khả năng tương tự nhau, giảm nồng độ L-asparagin trong huyết tương trong 2 ngày, trừ thể liên hợp 5kDa-100% có thời gian tác động dài hơn (96 giờ = 4 ngày so với 48 giờ = 2 ngày đối với các thể liên hợp khác).

Do đó, việc gia tăng kích thước của PEG trong thể liên hợp với r-crisantaspaza từ 2kDa đến 5kDa làm tăng khả năng và thời gian tác động của thể liên hợp. Tuy nhiên, ngạc nhiên là, khi gia tăng kích thước của PEG lên 10kDa lại không làm tăng thêm hoạt lực và thời gian tác động của thể liên hợp hơn nữa, thậm chí việc này còn làm giảm hoạt lực và thời gian tác động so với thể liên hợp được PEG hoá tối đa bằng mPEG 5kDa .

Hoạt tính enzym là phù hợp với mức độ tiêu hủy L-asparagin. Như được thể hiện trên Fig.5, thể liên hợp 5kDa-100% có AUC lớn nhất, cho thấy thời gian bán hủy dài hơn. AUC thấp hơn quan sát được ở thể liên hợp PEG-40% (PEG hóa một phần) so với PEG-100% (PEG tối đa) đối với thể liên hợp được PEG hóa bằng mPEG 2kDa và 5kDa và không thấy có sự khác biệt giữa các thể liên hợp 10kDa.

Phù hợp với kết quả mức độ tiêu hủy L-asparagin, việc gia tăng kích thước phân tử của PEG được liên hợp r-crisantaspaza từ 2kDa lên 5kDa tạo ra hoạt tính L-asparaginaza trong vòng tuần hoàn dài hơn. Tuy nhiên, ngạc nhiên là, khi gia tăng kích thước của PEG lên 10kDa không làm tăng thêm nữa hoạt tính enzym *in vivo* của thể liên hợp, thậm chí việc này còn làm giảm hoạt tính enzym *in vivo* so với thể liên hợp được PEG hoá tối đa bằng mPEG 5kDa. Cũng đáng chú ý là, khi r-crisantaspaza được monoPEG hoá tại đầu N bằng mPEG trọng lượng phân tử cao (nghĩa là, 40kDa), không có ảnh hưởng đáng kể lên độ ổn định *in vitro* của enzym đối với quá trình thủy phân protein (không nêu kết quả).

Ví dụ 8: Tác dụng phụ thuộc liều của hai thể liên hợp mPEG-r-crisantaspaza lên L-asparagin trong huyết tương

Đặc điểm dược động học của 2 thể liên hợp mPEG-r-crisantaspaza khác nhau được đánh giá ở mẫu động vật lai B6D2F1 (có hoạt lực miễn dịch, con cái), do Charles River Germany cung cấp. Thể liên hợp được thử nghiệm là r-crisantaspaza được PEG hóa tối đa bằng mPEG 2kDa (100%) và r-crisantaspaza được PEG hóa tối đa bằng mPEG 5kDa (100%) ở 3 liều lượng khác nhau. Một cách vắn tắt, 8 động vật trong một nhóm được tiêm một mũi duy nhất qua tĩnh mạch thể liên hợp r-crisantaspaza với liều 5, 25 hoặc 50U/kg thể trọng, tương ứng với 10, 50 hoặc 100µg protein/kg. Để làm đối chứng, Oncaspar® được thử nghiệm ở liều 1 đơn vị/kg, tương ứng với 10µg protein/kg. Tại các thời điểm -1 giờ trước khi dùng thuốc và 6 giờ, 24 giờ, 48 giờ, 96 giờ, 192 giờ và 240 giờ sau khi tiêm, mẫu huyết tương được lấy từ hốc mắt của từng động vật và phân tích nồng độ L-asparagin và hoạt tính enzym dư thừa trong huyết tương.

Nồng độ axit amin trong huyết tương được xác định bằng bộ kit phân tích axit amin PICO-TAG (Waters). Một cách vắn tắt, mẫu huyết tương được khử protein hóa bằng phương pháp kết tủa metanol. Axit amin tự do trong dịch nổi sau ly tâm được tạo dẫn xuất bằng phenylisothioxyanat và định lượng bằng RP-HPLC.

Tác dụng phụ thuộc liều của thể liên hợp lên nồng độ L-asparagin trong huyết tương được thể hiện trên Fig. 6. Như được thể hiện trên Fig. 6A và 6B, cả hai thể liên hợp đều có hiệu quả cao trong việc tiêu hủy L-asparagin. Đối với thể liên hợp 2kDa 100%, quan sát được mức độ tiêu hủy hoàn toàn trong 3, 6 và ít nhất là 10 ngày lần

lượt ở các liều 5U, 25U và 50U/kg. Đối với thể liên hợp 5kDa 100%, qua sát được mức độ tiêu hủy hoàn toàn trong 3, 10 và ít nhất là 10 ngày lần lượt ở các liều 5U, 25U và 50U/kg. Đối với cả hai thể liên hợp được sử dụng, các liều 5, 25 và 50U/kg được thử nghiệm tương ứng với 10, 50 và 100 µg/kg tính theo hàm lượng protein, là lượng protein rất thấp khi so với các chế phẩm L-asparaginaza có bán trên thị trường hiện nay. Thật vậy, Erwinase® 250U/kg tương ứng với khoảng 520µg/kg, và Oncaspar® 1U/kg tương ứng với khoảng 10µg/kg (hàm lượng protein). Fig. 6C chỉ ra rằng khi sử dụng một lượng protein tương đương (10µg/kg) thể liên hợp 2kDa-100%, thể liên hợp 5kDa-100% hoặc Oncaspar® sẽ tạo ra mức độ tiêu hủy L-asparagin tương tự nhau trong 72 giờ.

Ví dụ 9: Đặc điểm dược động học của 2 thể liên hợp mPEG-r-crisantaspaza

Đặc điểm dược động học của 2 thể liên hợp mPEG-r-crisantaspaza khác nhau được đánh giá ở mẫu động vật lai B6D2F1 (có hoạt lực miễn dịch, con cái), do Charles River Germany cung cấp. Thể liên hợp được thử nghiệm là r-crisantaspaza được PEG hóa tối đa bằng mPEG 2kDa (100%) và r-crisantaspaza được PEG hóa tối đa (100%) bằng mPEG 5kDa ở 3 liều lượng khác nhau. Crisantaspaza không được biến đổi (Erwinase®) ở liều 250U/kg và Oncaspar® ở liều 1U/kg được thử nghiệm làm đối chứng. Một cách vắn tắt, 8 động vật trong một nhóm được tiêm một mũi duy nhất qua tĩnh mạch liều 5, 25 hoặc 50U/kg thể trọng thể liên hợp r-crisantaspaza so với Erwinase® và Oncaspar®. Tại các thời điểm -1 giờ trước khi dùng thuốc và 6 giờ, 24 giờ, 48 giờ, 96 giờ và 192 giờ sau khi tiêm, mẫu huyết tương được lấy từ hốc mắt của từng động vật và phân tích nồng độ L-asparagin và hoạt tính enzym dư thừa trong huyết tương.

Hoạt tính enzym trong huyết tương được xác định bằng thử nghiệm tạo màu. L-aspartic β-hydroxamat (AHA) được sử dụng là cơ chất. Enzym này thủy phân AHA thành L-Asp và hydroxylamin, được đánh giá ở bước sóng 710nm sau khi ngưng tụ bằng 8-hydroxyquinolin và oxi hóa thành indooxin. (*Analytical Biochemistry* 309 (2002): 117-126).

Để tính thời gian bán hủy, đường phù hợp tối đa ngoại suy của các hoạt tính trong huyết tương tương ứng thu được bằng các sử dụng công cụ hàm MS-excel. Giá trị hoạt tính âm tính được loại ra khỏi phép tính toán.

Thông số	Định nghĩa
$A_{\max}$	Hoạt tính enzym dư thừa tối đa
$t_{A_{\max}}$	Thời gian đạt $A_{\max}$ sau khi bộc lộ với mẫu xét nghiệm
$d_{A_{\max}}$	Khoảng thời gian tối đa duy trì $A_{\max}$ hoặc A trên 0

Thời gian bán hủy của hoạt tính enzym dư thừa trong huyết tương được tính từ công thức sau sử dụng công cụ hàm trong MS-excel và công thức tương ứng của đường phù hợp nhất ngoại suy:

Trung bình:

$$t_{1/2} = \frac{-\ln 2 \times t}{\ln(c_t / c_0)}$$

trong đó $t_{1/2}$ là thời gian bán hủy, t là thời điểm xác định, c_t hoạt tính trong huyết tương dư thừa tại thời điểm xác định và c_0 là hoạt tính trong huyết tương dư thừa tại thời điểm ban đầu.

Diện tích dưới đường cong (AUC) được tính bằng cách sử dụng chương trình phần mềm dược động lực học, ví dụ, SigmaPlot Version 11. Kết quả dược động học được nêu trong bảng 3 và 4, dưới đây, và Fig.7 đến 9.

Bảng 3:

Dược động học sơ bộ của quá trình điều trị bằng Erwinase® liều 250U/kg thể trọng, Pegaspargaza (Oncaspar®) liều 1U/kg thể trọng, hoặc thể liên hợp mPEG-r-crisantaspaza 2kDa 100% (hoạt tính enzym trong huyết tương dư thừa)

Thông số	Erwinase®	Pegaspargaza 1U/kg thể trọng	2kDa / 100% 5U/kg thể trọng	2kDa / 100% 25U/kg thể trọng	2kDa / 100% 50U/kg thể trọng
A _{max}	83,9U/l	6U/l	14U/l	153U/l	208U/l
t _{Amax}	6 giờ	90 phút	90 phút	6 giờ	6 giờ
d _{Amax} lớn hơn 0	18 giờ Từ 6 giờ đến 24 giờ	46,5 giờ 90 phút đến 48 giờ	70,5 giờ 90 phút đến 72 giờ	238,5 giờ 90 phút đến 240 giờ	238,5 giờ 90 phút đến 240 giờ
AUC (trung bình)	1205	222	627	12446	28349
t _{1/2}	6 giờ	28 giờ	31 giờ	55 giờ	85 giờ

Bảng 4:

Dược động học sơ bộ của quá trình điều trị bằng Erwinase® liều 250U/kg thể trọng, Pegaspargaza (Oncaspar®) liều 1U/kg thể trọng, hoặc thể liên hợp mPEG-r-crisantaspaza 5kDa 100% (hoạt tính enzym trong huyết tương dư thừa)

Thông số	Erwinase®	Pegaspargaza 1U/kg thể trọng	5kDa / 100% 5U/kg thể trọng	5kDa / 100% 25U/kg thể trọng	5kDa / 100% 50U/kg thể trọng
A _{max}	83,9U/l	6U/l	18U/l	188U/l	226U/l
t _{Amax}	6 giờ	90 phút	90 phút	6 giờ	48 giờ
d _{Amax} lớn hơn 0	18 giờ Từ 6 giờ đến 24 giờ	46,5 giờ 90 phút đến 48 giờ	94,5 giờ 90 phút đến 96 giờ	238,5 giờ 90 phút đến 240 giờ	238,5 giờ 90 phút đến 240 giờ
AUC (trung bình)	1205	222	798	19748	33151
t _{1/2}	6 giờ	28 giờ	38 giờ	63 giờ	104 giờ

Kết quả chỉ ra rằng quá trình PEG hoá r-crisantaspaza kéo dài đáng kể thời gian bán hủy so với crisantaspaza, và theo kiểu phụ thuộc liều (Bảng 3 và 4, Fig. 7 đến 9). Ngoài ra, khi so sánh ở cùng một liều lượng, AUC được xác định đối với thể liên hợp 5kDa-100% là cao hơn so với thể liên hợp 2-kDa-100%. Có sự khác biệt 21%, 37% và 14% được thấy ở thể liên hợp 5kDa-100%, ở lần lượt các liều 5, 25 và 50U/kg (Fig. 8). Thể liên hợp 5kDa-100% cũng có thời gian bán hủy dài hơn so với Oncaspar® khi được thử nghiệm ở cùng một liều lượng tính theo hàm lượng protein, như được thể hiện trên Fig. 9 và trong các thông số dược động học thu được nêu trong bảng 4. Đặc điểm dược động học vượt trội đối với thể liên hợp của *Erwinia* là đáng ngạc nhiên, vì L-asparaginaza thu được từ *E. coli* đã được biết là có thời gian bán hủy dài hơn ở người và ở động vật so với L-asparaginaza thu được từ *Erwinia chrysanthemi* (crisantaspaza). Do đó, có thể dự đoán một cách logic là thời gian bán hủy của L-asparaginaza được PEG hóa của *E. coli* (pegaspargaza) là dài hơn so với thời gian bán hủy của r-crisantaspaza được PEG hóa. Tuy nhiên, rất bất ngờ là, r-crisantaspaza được PEG hóa lại có thời gian bán hủy dài hơn so với pegaspargaza.

Bảng 5 dưới đây nêu kết quả dược động học và dược lực học thu được từ một vài thử nghiệm, bao gồm các thử nghiệm được mô tả trong ví dụ 7 đến 9, cho thấy: 1) cả thể liên hợp 2kDa-100% và 5kDa-100% đều có khả năng cao trong việc gia tăng hoạt lực và thời gian tác dụng của crisantaspaza, như được thể hiện bởi sự khác biệt đáng kể quan sát được so với Erwinase®; 2) thể liên hợp 5kDa-100% có tác dụng kéo dài hơn so với cả thể liên hợp 2kDa-100% và Oncaspar®, như được thể hiện bởi thời gian bán hủy dài hơn quan sát được ở tất cả các liều lượng được thử nghiệm. Kết quả kém hơn một cách đáng ngạc nhiên thu được với thể liên hợp 10kDa-100% cho thấy rằng lợi ích của việc PEG hoá sẽ gia tăng cùng với kích thước của PEG được gắn với crisantaspaza nhưng không quá 5kDa. PEG trọng lượng phân tử cao hơn không tạo ra thêm lợi ích gì, và, ít nhất trong trường hợp 10kDa, còn có hại. Điều này là không mong đợi và ngược hoàn toàn với kết quả quan sát được, ví dụ, khi Holtsberg và các đồng tác giả liên hợp các PEG có trọng lượng phân tử khác nhau với arginin deaminaza, một enzym phân hủy axit amin khác được phân lập từ vi sinh vật. Trong các nghiên cứu đó, chức năng dược động học và dược động hoặc của enzym arginin deaminaza gia tăng khi kích thước PEG liên hợp gia tăng từ trọng lượng phân tử

5000Da lên 20000Da (Holtsberg, F.W., *Journal of Controlled Release* 80 (2002), 259-271),).

Bảng 5

	Erwinase®	2kDa-100% mPEG-r- crisantaspaza		5kDa-100% mPEG- r-crisantaspaza		Oncaspar®	
Liều (µg/kg)	520	10	50	10	50	10	50
Liều (U/kg)	250	5	25	5	25	1	5
T _{1/2} (h)	6	31	55	38	63	28	51
Thời gian quá trình tiêu hủy L- asparagin (ngày)	2	2 đến 3	6	3 đến 4	10+	3	8+

Ngoài ra, như được thấy chi tiết dưới đây, kết quả hoạt tính sinh miễn dịch chỉ ra rằng thể liên hợp 10kDa-100% có hoạt tính sinh miễn dịch không thể chấp nhận được, một nhược điểm chính cần xem xét khi sử dụng hợp chất cho bệnh nhân bị dị ứng với L-asparaginaza của *E. coli* hoặc đã phát triển kháng thể kháng L-asparaginaza. Theo khía cạnh này, thể liên hợp 10kDa-100% thực sự là không thích hợp. Thể liên hợp 2kDa-100% và 5kDa-100% là thích hợp hơn, và thể liên hợp 5kDa-100% là đặc biệt thích hợp.

Ví dụ 10: Hoạt tính sinh miễn dịch

Hoạt tính sinh miễn dịch của thể liên hợp mPEG-r-crisantaspaza được xác định ở mẫu động vật lai B6D2F1 (có hoạt lực miễn dịch, con cái), do Charles River Germany cung cấp. Động vật được điều trị hai lần một tuần vào các tuần 1, 2, 3, 4, và 8 bằng cách tiêm tĩnh mạch Erwinase® với liều 250U/kg thể trọng và tất cả các thể liên hợp r-crisantaspaza với liều 5U/kg thể trọng. Mẫu huyết thanh được lấy ở các thời điểm -1 giờ trước khi điều trị và sau 1 tuần, 2 tuần, 4 tuần, 6 tuần và 8 tuần từ hốc mắt. Nồng độ kháng thể kháng crisantaspaza hoặc kháng mPEG-r-crisantaspaza trong huyết thanh được xác định bằng thử nghiệm ELISA. Kết quả được thể hiện trên Fig. 10 và 11.

Hiệu giá kháng thể kháng crisantaspaza cao được quan sát thấy ở Erwinase® bắt đầu từ tuần thứ 2 và được duy trì trong toàn bộ giai đoạn nghiên cứu. Ngược lại, không quan sát được nồng độ kháng thể đáng kể đối với thể liên hợp r-crisantaspaza (Fig.10).

Như được thể hiện trên Fig. 11, quá trình sản xuất kháng thể kháng thể liên hợp được duy trì ở cường độ và tần suất thấp đối với thể liên hợp mPEG-r-crisantaspaza 2kDa và 5kDa, và gia tăng với giá trị và tần suất cao hơn đối với thể liên hợp mPEG-r-crisantaspaza 10kDa. Không có sự khác biệt rõ ràng giữa thể liên hợp được PEG hoá một phần và tối đa (không nêu kết quả).

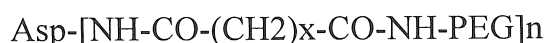
Do đó, kết quả này chứng minh rằng phương pháp PEG hoá được chọn đã làm giảm hoạt tính sinh miễn dịch của thể liên hợp so với L-asparaginaza không được biến đổi, giảm đáng kể đáp ứng kháng thể kháng crisantaspaza. Tuy nhiên, vẫn phát hiện được kháng thể kháng thể liên hợp, đặc biệt là với thể liên hợp 10kDa, và với cường độ thấp hơn với thể liên hợp 2kDa và 5kDa.

Như vậy, có thể kết luận là, khi sử dụng mPEG không quá 5kDa, quá trình PEG hoá đã thành công trong việc cải thiện đặc tính dược động học, hoạt lực và thời gian tác dụng của r-crisantaspaza, đồng thời làm giảm hoạt tính sinh miễn dịch so với protein không được biến đổi, với hoạt lực và thời gian tác động gia tăng cùng với kích thước của polyme được sử dụng, thể liên hợp mPEG-r-crisantaspaza 5kDa có hoạt lực cao hơn một chút so với thể liên hợp mPEG-r-crisantaspaza 2kDa. Tuy nhiên, nếu gia tăng thêm nữa kích thước của PEG lên 10kDa sẽ không thể gia tăng hoạt lực và thời gian tác động hơn nữa, vì thể liên hợp mPEG-r-crisantaspaza 10kDa có hoạt lực *in vivo* thấp hơn so với thể liên hợp mPEG-r-crisantaspaza 5kDa, mặc dù có hoạt lực *in vitro* tương tự nhau. Ngoài ra, thể liên hợp mPEG-r-crisantaspaza 10kDa có hoạt tính sinh miễn dịch không thể chấp nhận được, là kết quả không mong đợi so với các kết quả đã được công bố với các protein khác.

Trong khi một số phương án và ứng dụng của sáng chế đã được mô tả chi tiết theo cách minh họa và bằng ví dụ, các chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này hiểu rằng sẽ có thể có nhiều biến đổi được tạo ra đối với phương án trên mà không vượt ra khỏi phạm vi của sáng chế.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Thễ liên hợp chứa L-asparaginaza của *Erwinia chrysanthemi* có độ tương đồng về trình tự ít nhất là 90% so với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:1 và polyetylen glycol (PEG), trong đó PEG này có trọng lượng phân tử nhỏ hơn hoặc bằng 5000Da.
2. Thễ liên hợp theo điểm 1, trong đó L-asparaginaza có độ tương đồng về trình tự ít nhất là 99% so với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:1.
3. Thễ liên hợp theo điểm 1, trong đó L-asparaginaza tương đồng với trình tự nêu trong SEQ ID NO:1.
4. Thễ liên hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó PEG có trọng lượng phân tử ít nhất là 500Da.
5. Thễ liên hợp theo điểm 3, trong đó PEG có trọng lượng phân tử bằng 5000Da, nhỏ hơn 5000Da, nhỏ hơn 4000Da, nhỏ hơn 3000Da, hoặc nhỏ hơn 2500Da.
6. Thễ liên hợp theo điểm 1, trong đó L-asparaginaza tương đồng với SEQ ID NO:1 và PEG có trọng lượng phân tử bằng 5000Da.
7. Thễ liên hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, trong đó PEG được liên kết cộng hoá trị với một hoặc nhiều nhóm amino của L-asparaginaza.
8. Thễ liên hợp theo điểm 7, trong đó PEG được liên kết cộng hoá trị với một hoặc nhiều nhóm amino bằng liên kết amit.
9. Thễ liên hợp theo điểm 7 hoặc 8, trong đó PEG được liên kết cộng hoá trị với từ 40% đến 100% số nhóm amino có thể liên kết được.
10. Thễ liên hợp theo điểm 9, trong đó PEG được liên kết cộng hoá trị với từ 40% đến 90% tổng số nhóm amino.
11. Thễ liên hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 10 có công thức:



trong đó Asp là L-asparaginaza, NH là một hoặc nhiều nhóm NH của gốc lysin và/hoặc đầu N của Asp, PEG là gốc polyetylen glycol, n là giá trị thể hiện ít nhất là 40% đến 100% số nhóm amino có thể liên kết được trong Asp, và x là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 8.

12. Thẻ liên hợp theo điểm 11, trong đó n là giá trị thể hiện ít nhất là 40% đến 100% số nhóm amino của các gốc lysin và/hoặc các nhóm amino có đầu tận cùng chứa N trong Asp.
13. Thẻ liên hợp theo điểm 11 hoặc 12, trong đó x là số nguyên nằm trong khoảng từ 2 đến 5.
14. Thẻ liên hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 13, trong đó PEG là monometoxy-polyetylen glycol.
15. Thẻ liên hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 13, trong đó thẻ liên hợp này có hoạt tính *in vitro* ít nhất là 70% so với L-asparaginaza khi không được liên hợp với PEG.
16. Thẻ liên hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 13, trong đó thẻ liên hợp này chứa PEG có trọng lượng phân tử bằng 5000 Da có hoạt tính enzym dư thừa *in vivo* tăng lên so với L-asparaginaza của *Erwinia chrysanthemi* được liên hợp với ít nhất một phân tử PEG có trọng lượng phân tử 10000 Da.
17. Thẻ liên hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 13, trong đó thẻ liên hợp này có tính sinh miễn dịch giảm khi được sử dụng cho đối tượng là người quá mẫn cảm với L-asparaginaza của *E. coli*.
18. Phương pháp tạo thẻ liên hợp nêu trong điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 13, trong đó phương pháp này bao gồm bước kết hợp một lượng chất thử PEG với một lượng L-asparaginaza trong dung dịch đệm trong khoảng thời gian đủ để có liên kết cộng hoá trị giữa chất thử PEG với L-asparaginaza.
19. Phương pháp theo điểm 18, trong đó dung dịch đệm có độ pH nằm trong khoảng từ 7,0 đến 9,0.
20. Phương pháp theo điểm 19, trong đó dung dịch đệm có độ pH nằm trong khoảng từ 7,5 đến 8,5.
21. Phương pháp theo điểm 18, trong đó lượng L-asparaginaza là nồng độ protein nằm trong khoảng từ 0,5mg/ml đến 25mg/ml.
22. Phương pháp theo điểm 21, trong đó lượng L-asparaginaza là nồng độ protein nằm trong khoảng từ 2mg/ml đến 20mg/ml.

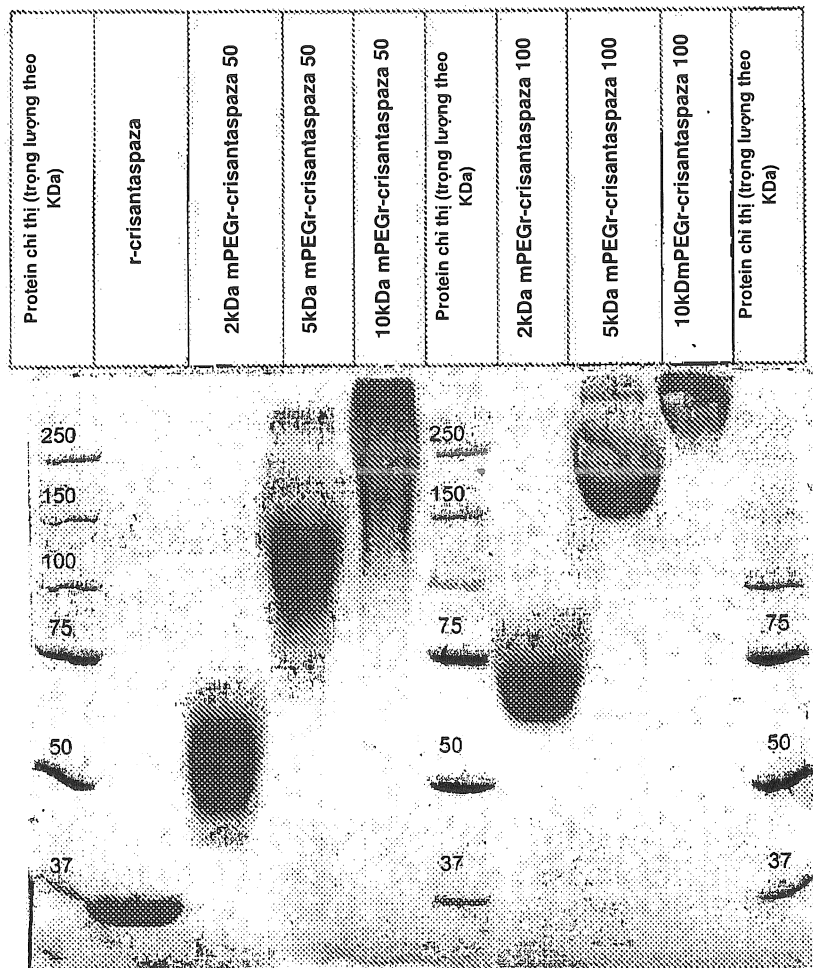
23. Phương pháp theo điểm 21, trong đó lượng L-asparaginaza là nồng độ protein nằm trong khoảng từ 3mg/ml đến 15mg/ml.
24. Phương pháp theo điểm 18, trong đó lượng PEG ở mức sao cho tỷ lệ mol dư của polyme so với các nhóm amino trong L-asparaginaza nhỏ hơn khoảng 20:1.
25. Phương pháp theo điểm 24, trong đó lượng PEG ở mức sao cho tỷ lệ mol dư của polyme so với các nhóm amino trong L-asparaginaza nhỏ hơn 10:1.
26. Phương pháp theo điểm 24, trong đó lượng PEG ở mức sao cho tỷ lệ mol dư của polyme so với các nhóm amino trong L-asparaginaza nhỏ hơn 8:1.
27. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 18 đến 26, trong đó PEG là monometoxy-polyetylen glycol.

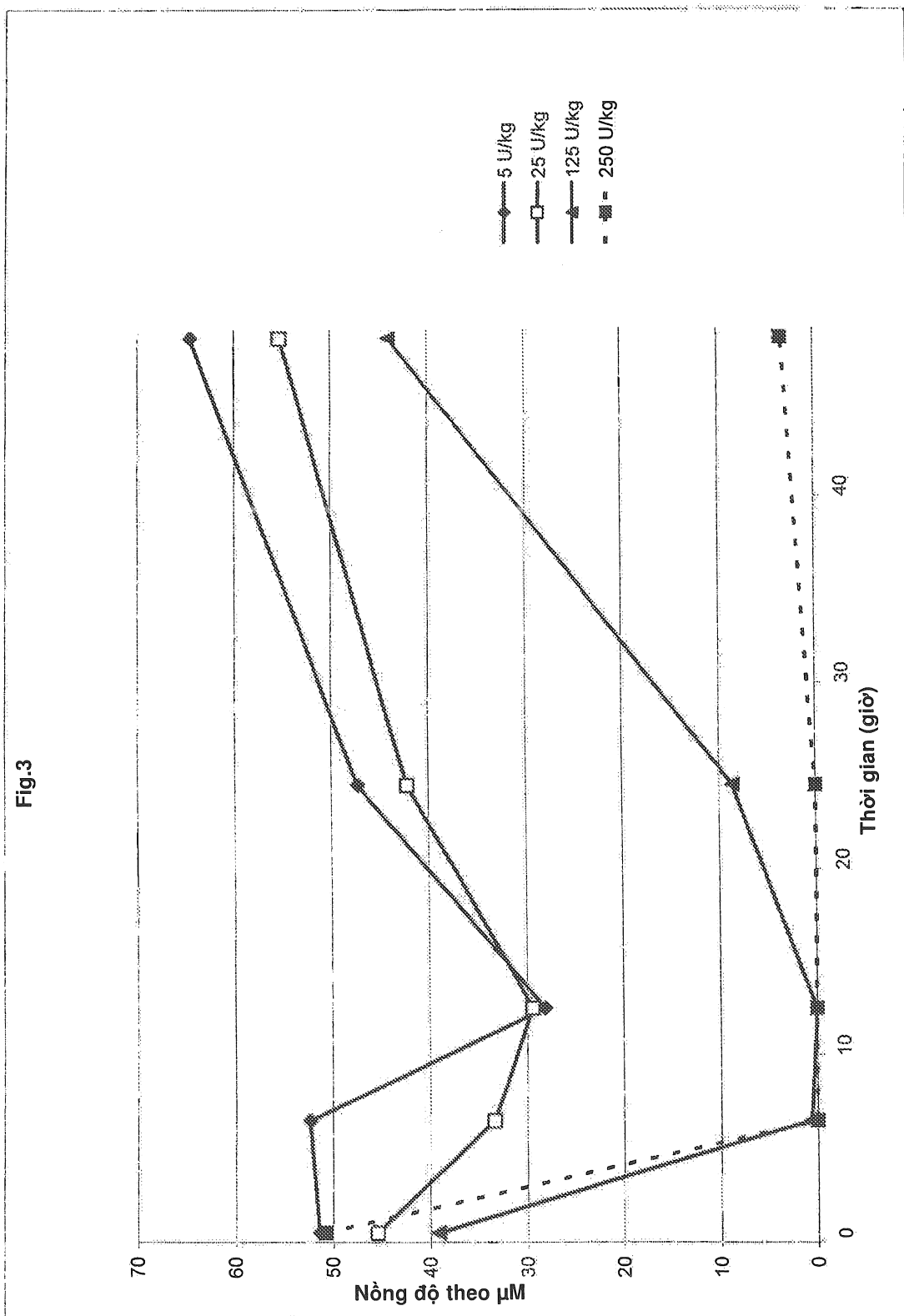
1/15



Fig. 1

Fig. 2





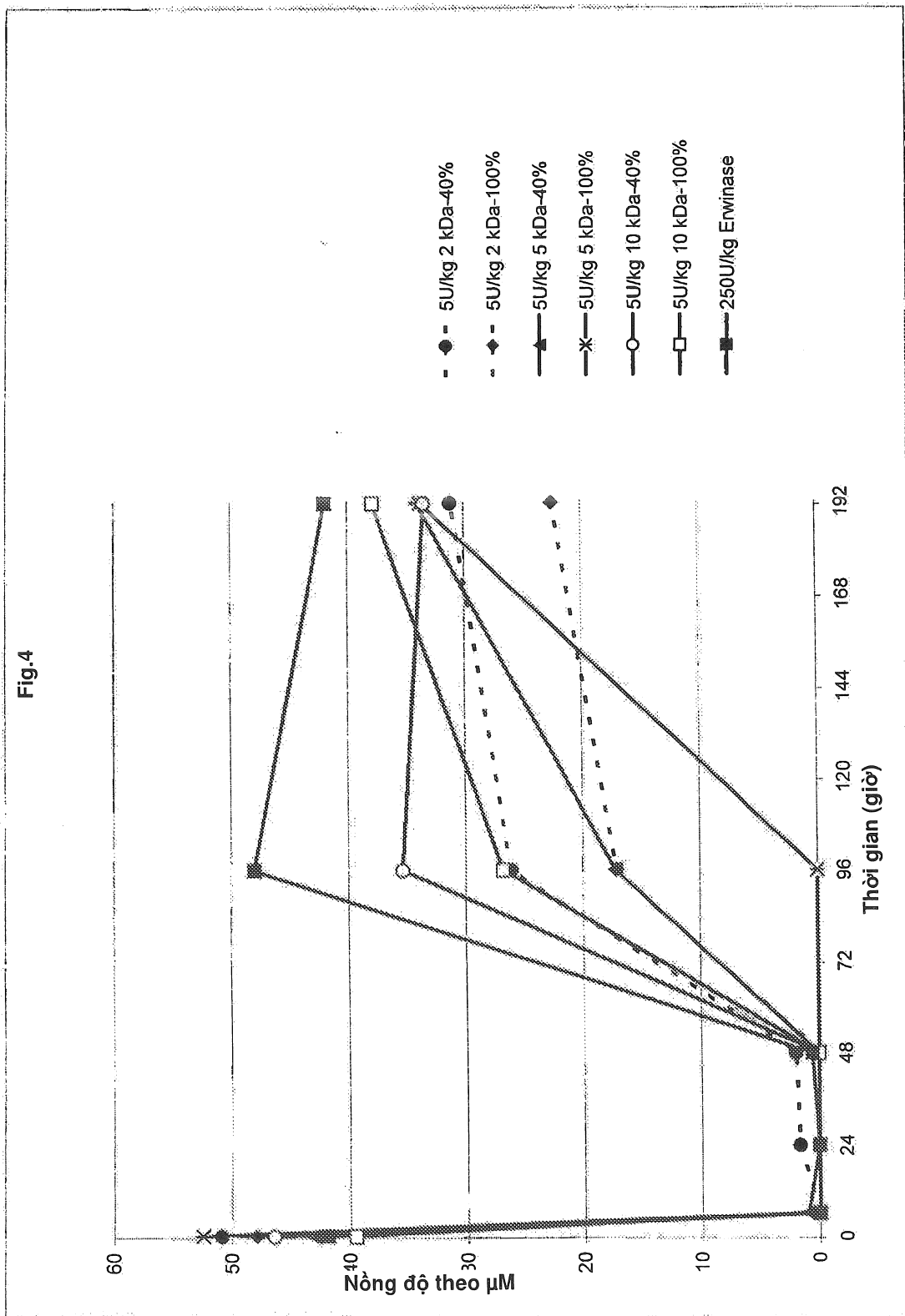
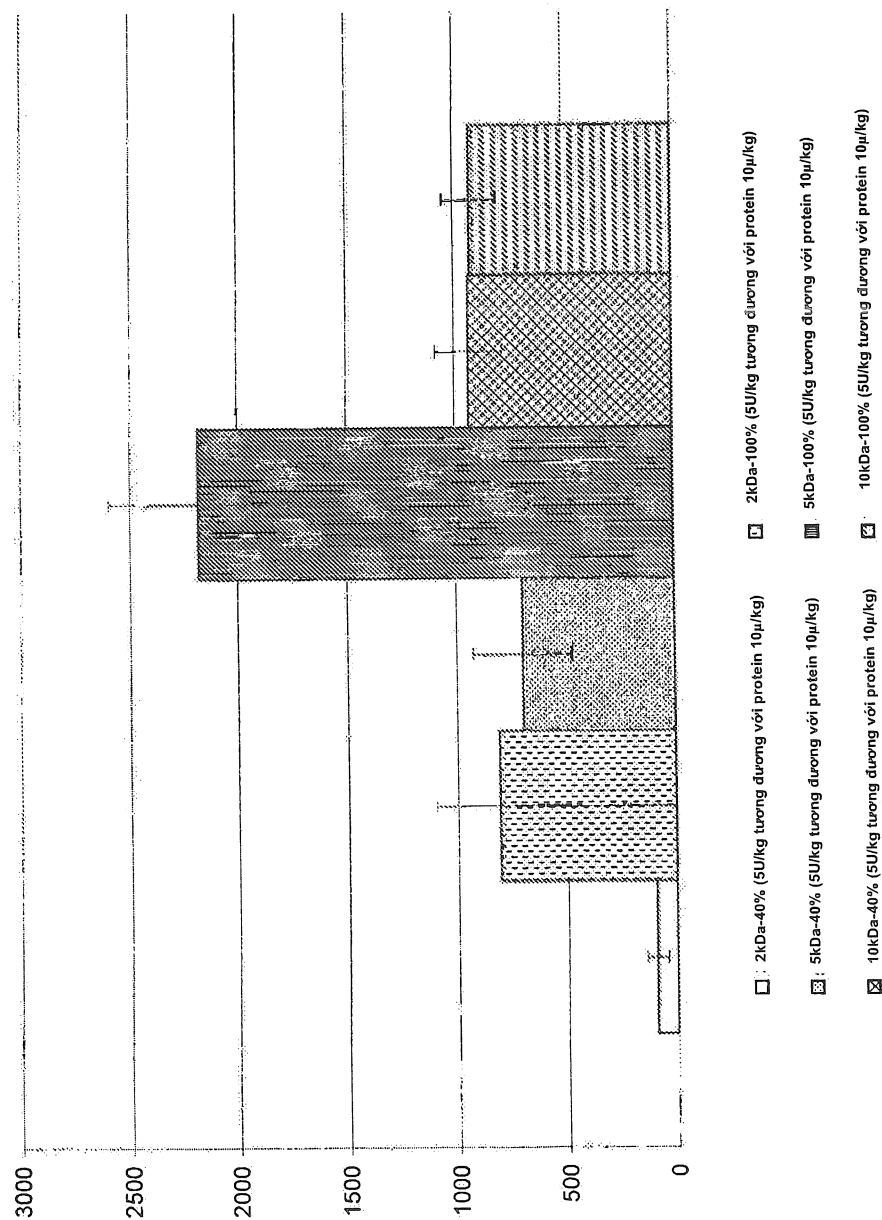
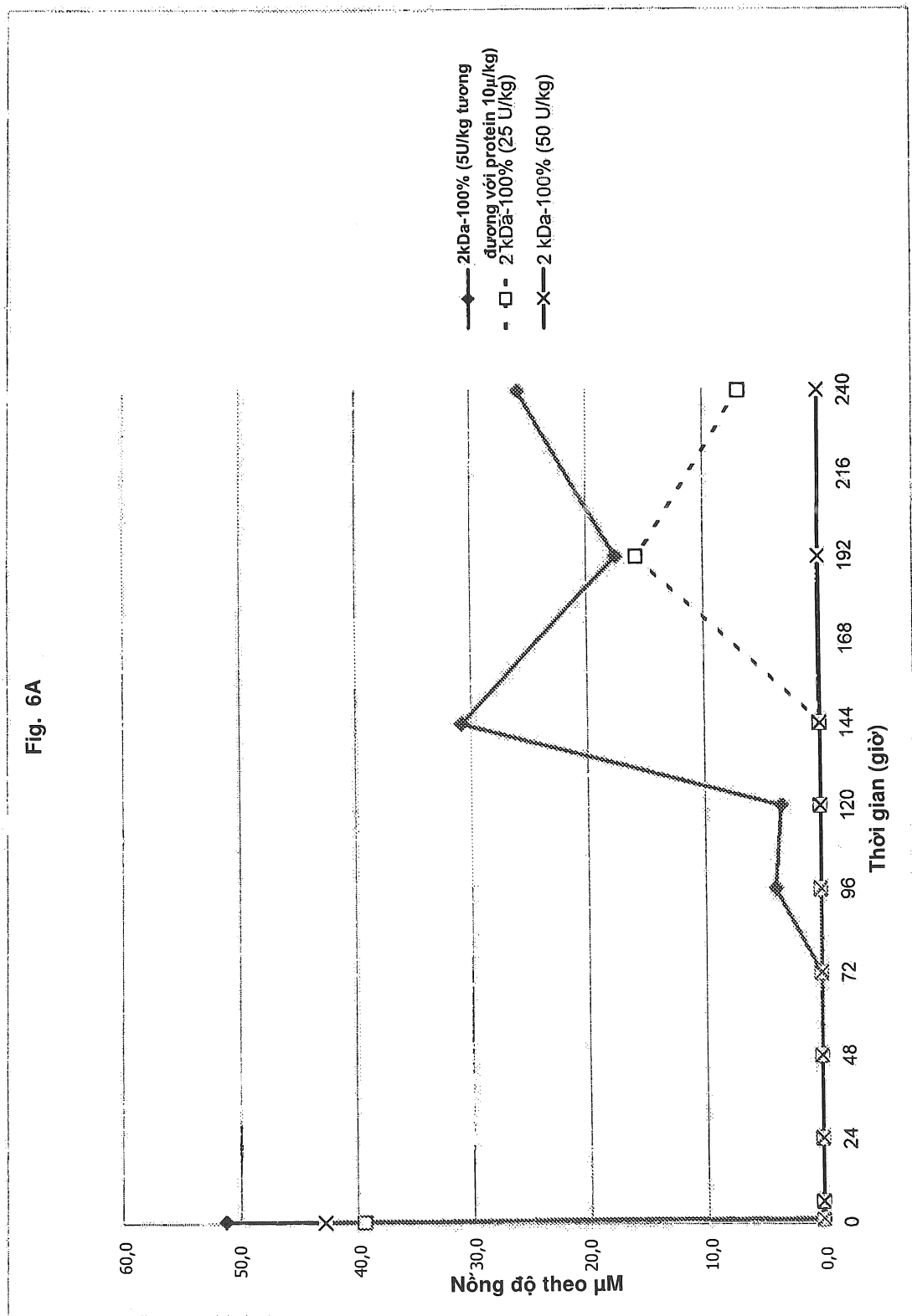
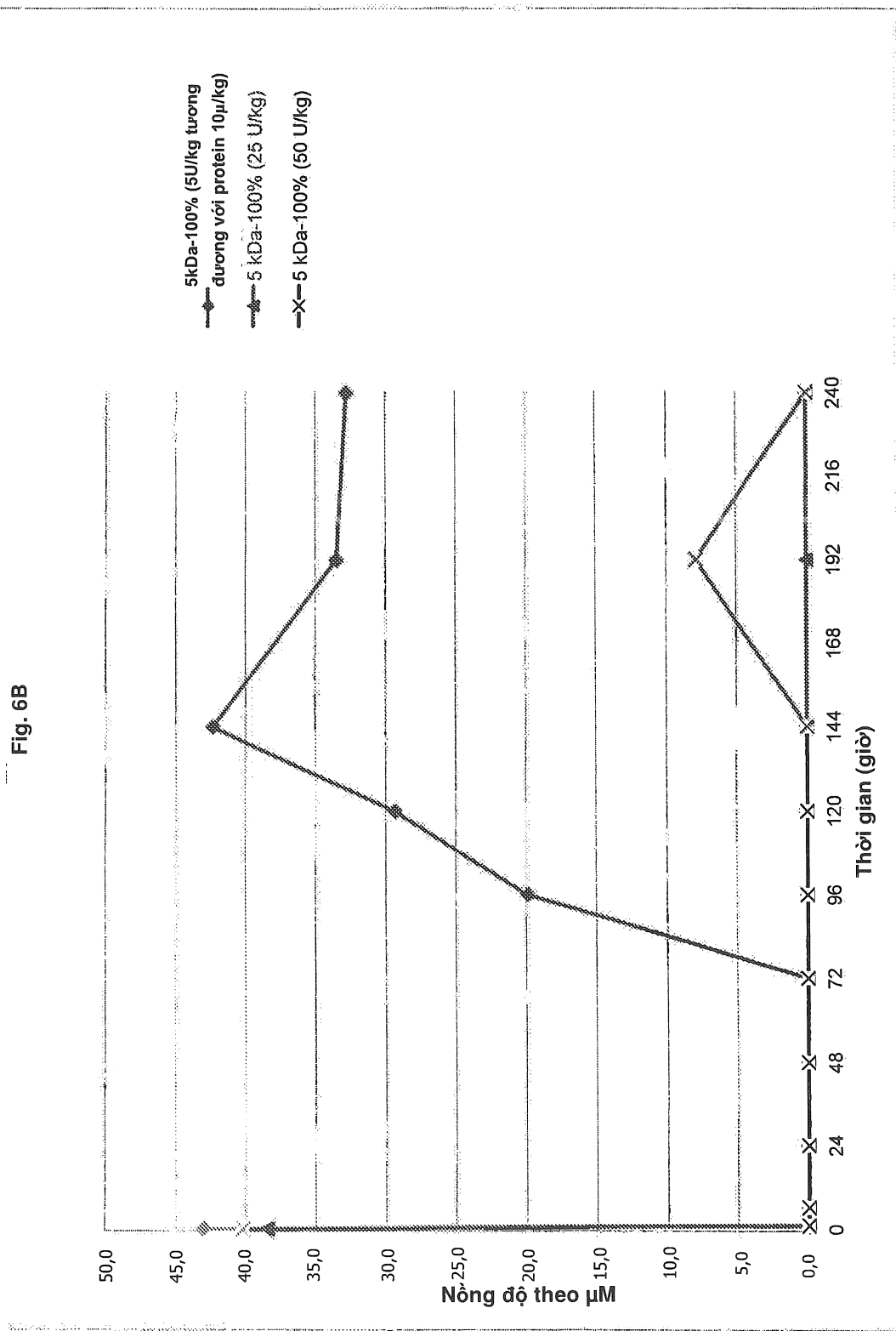
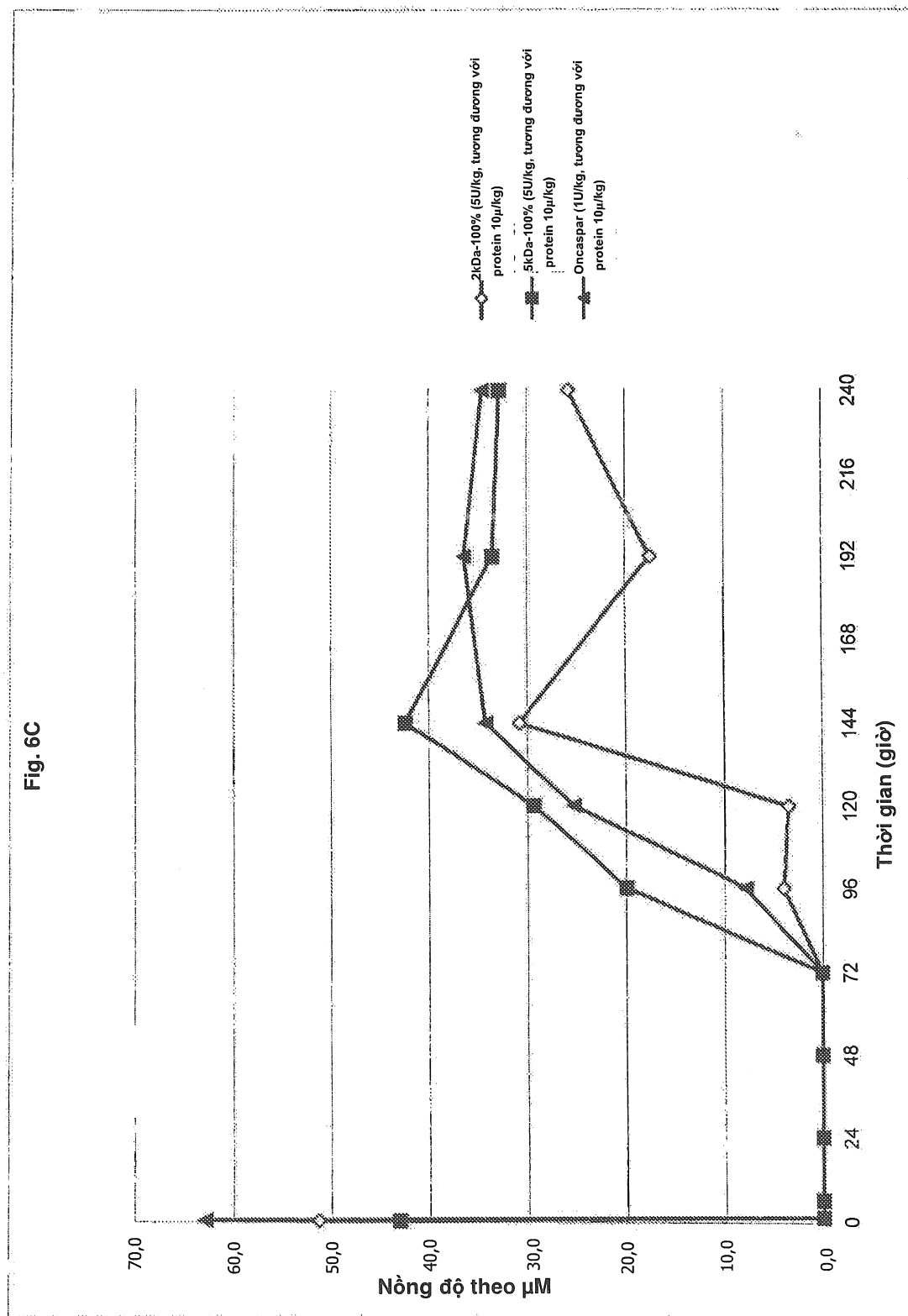


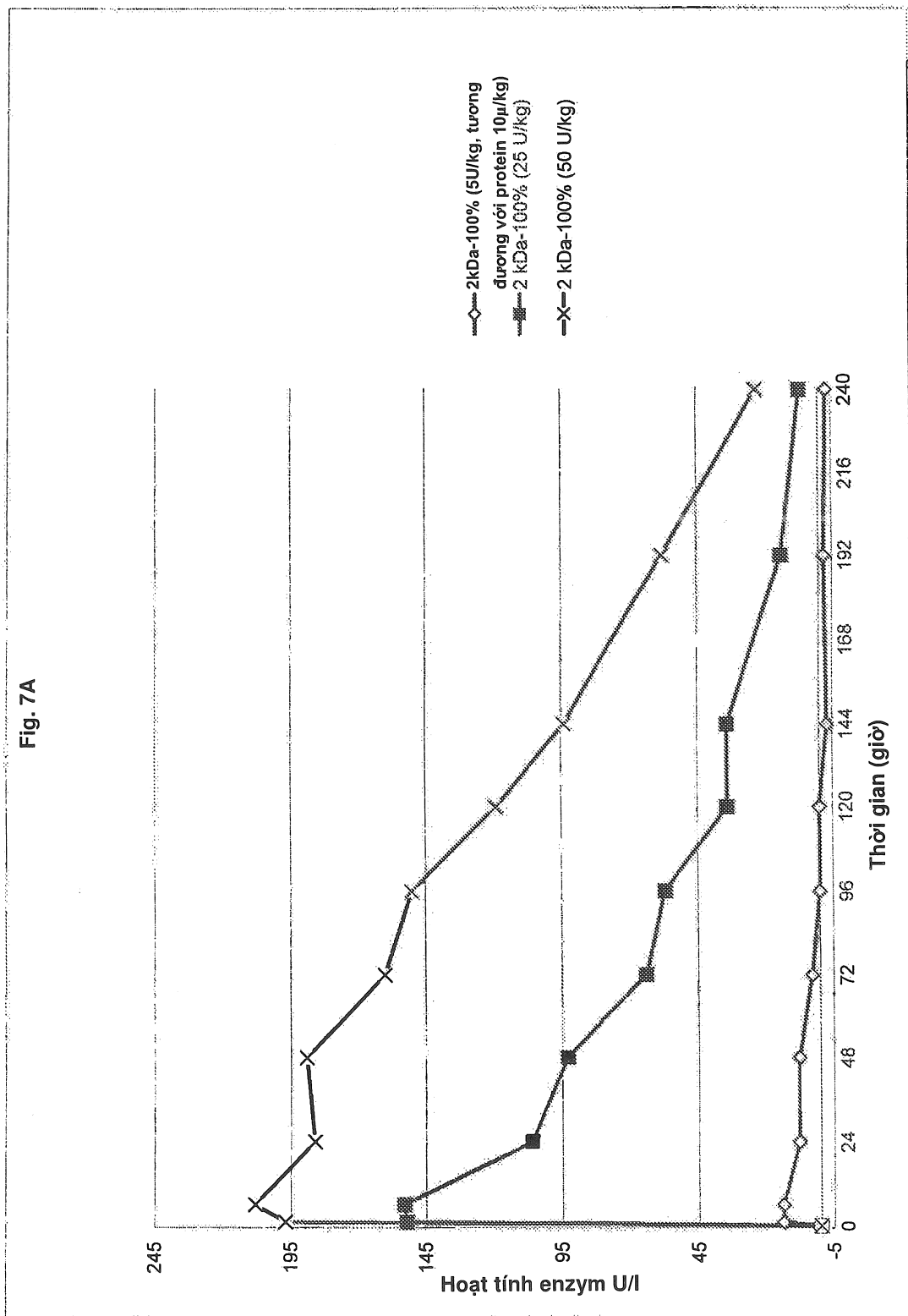
Fig.5



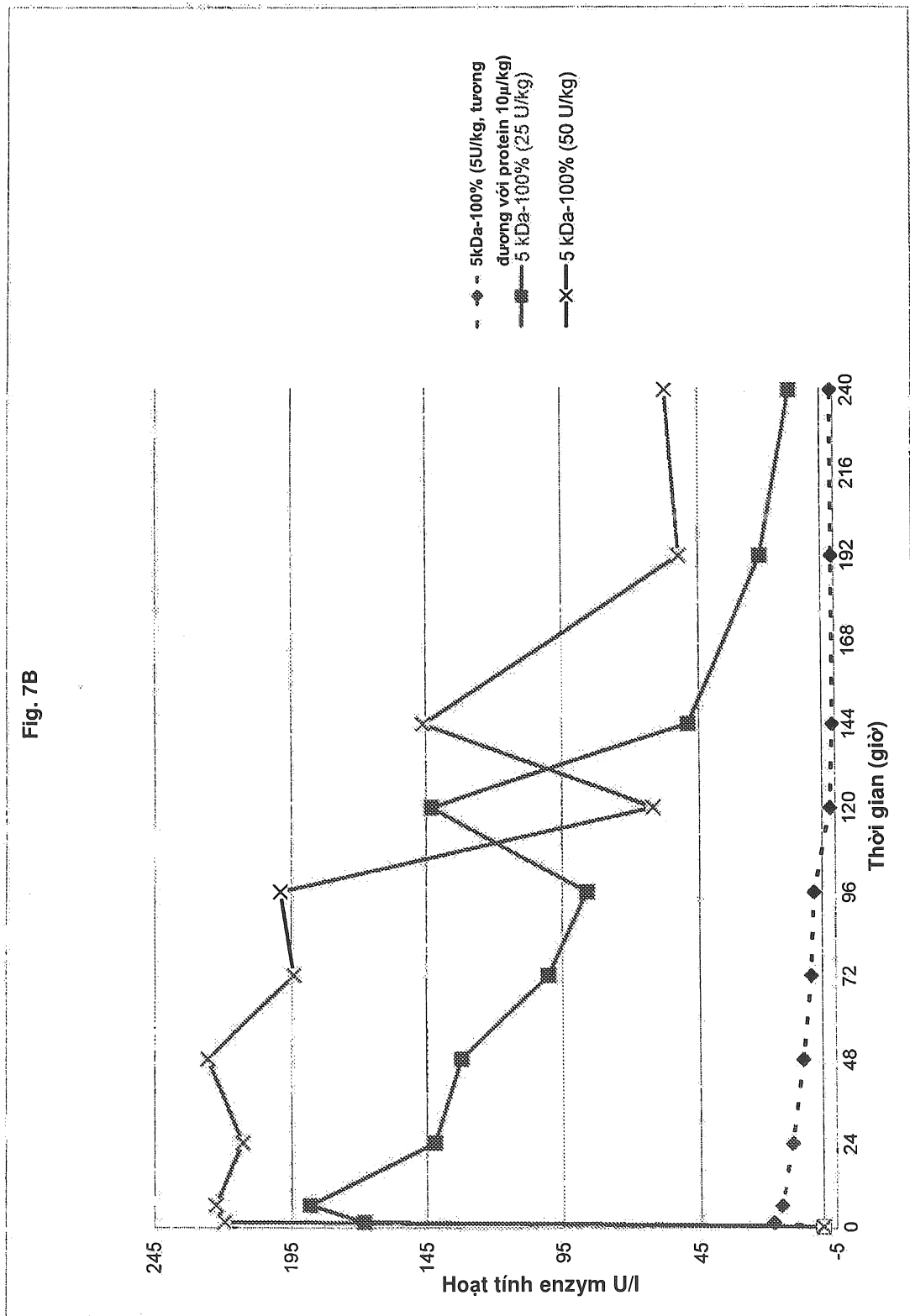








10/15



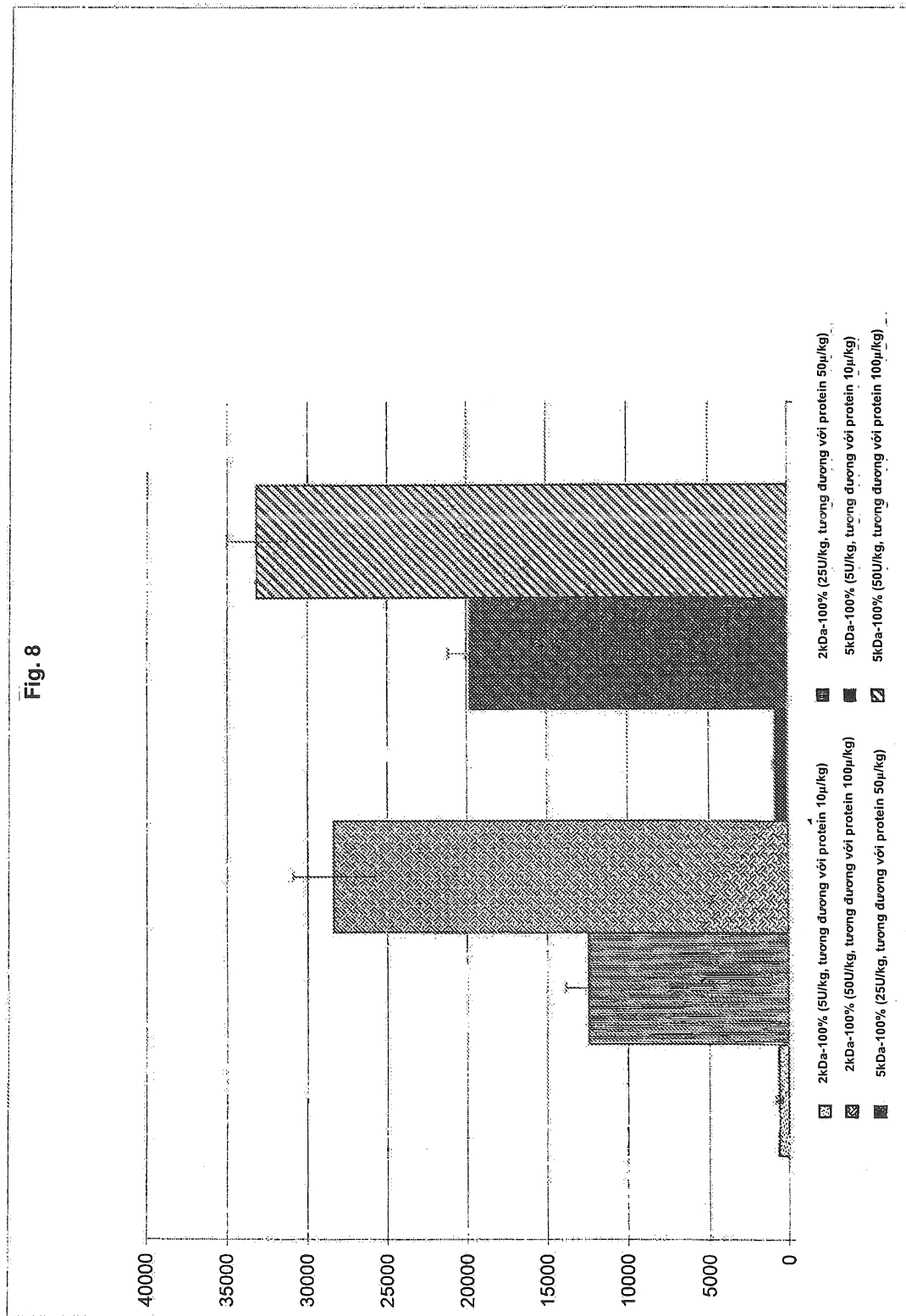


Fig.9A

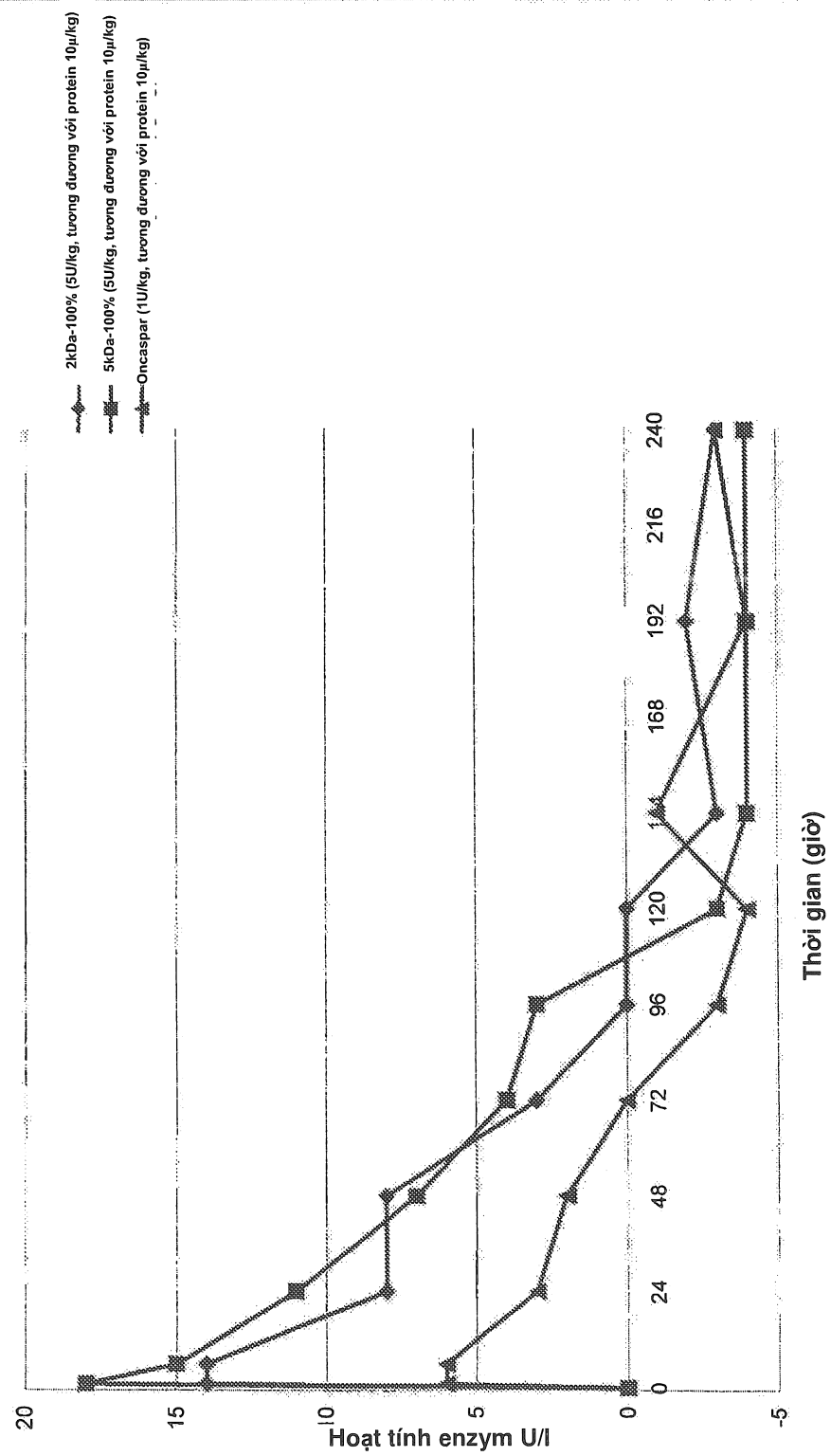
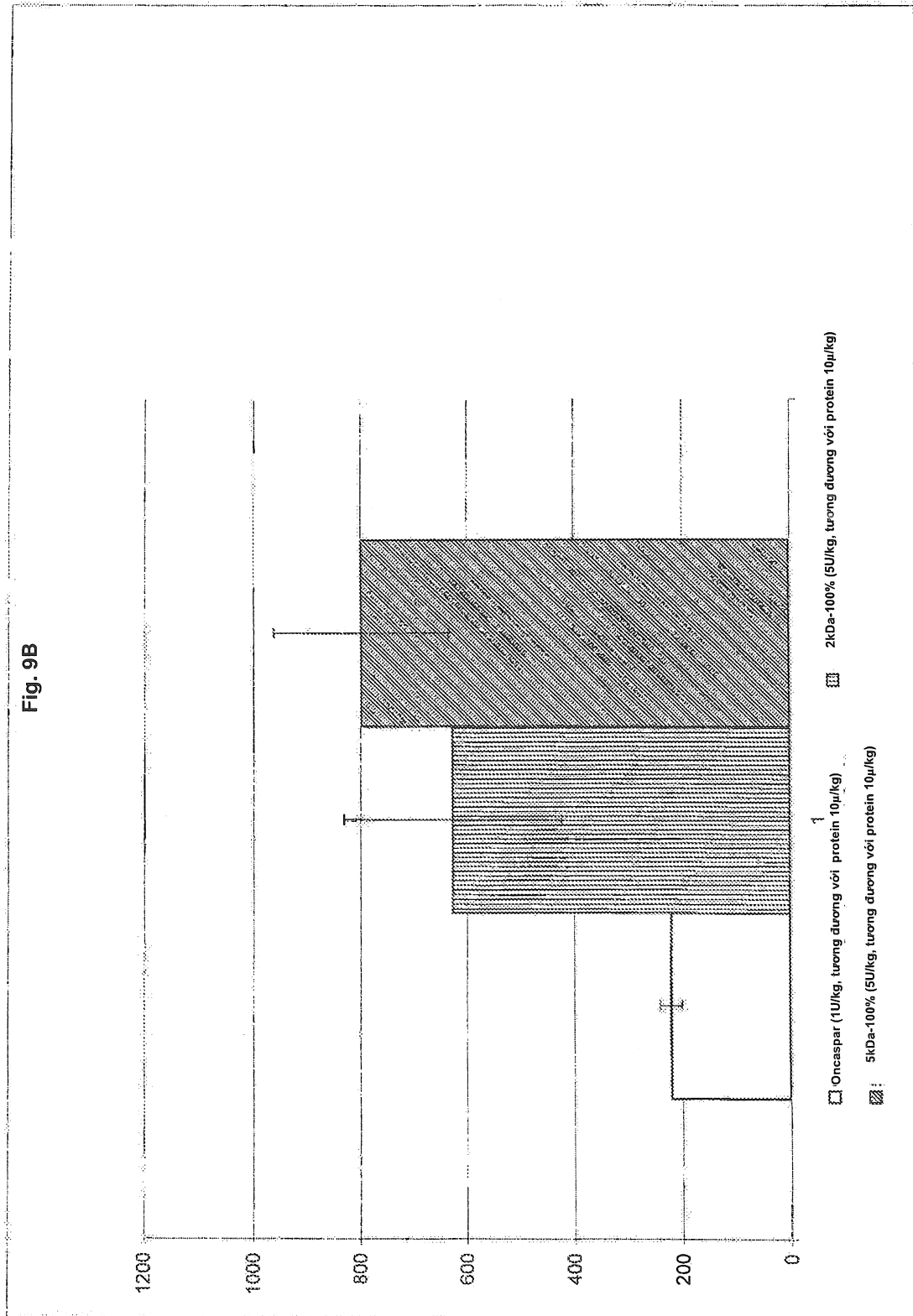


Fig. 9B



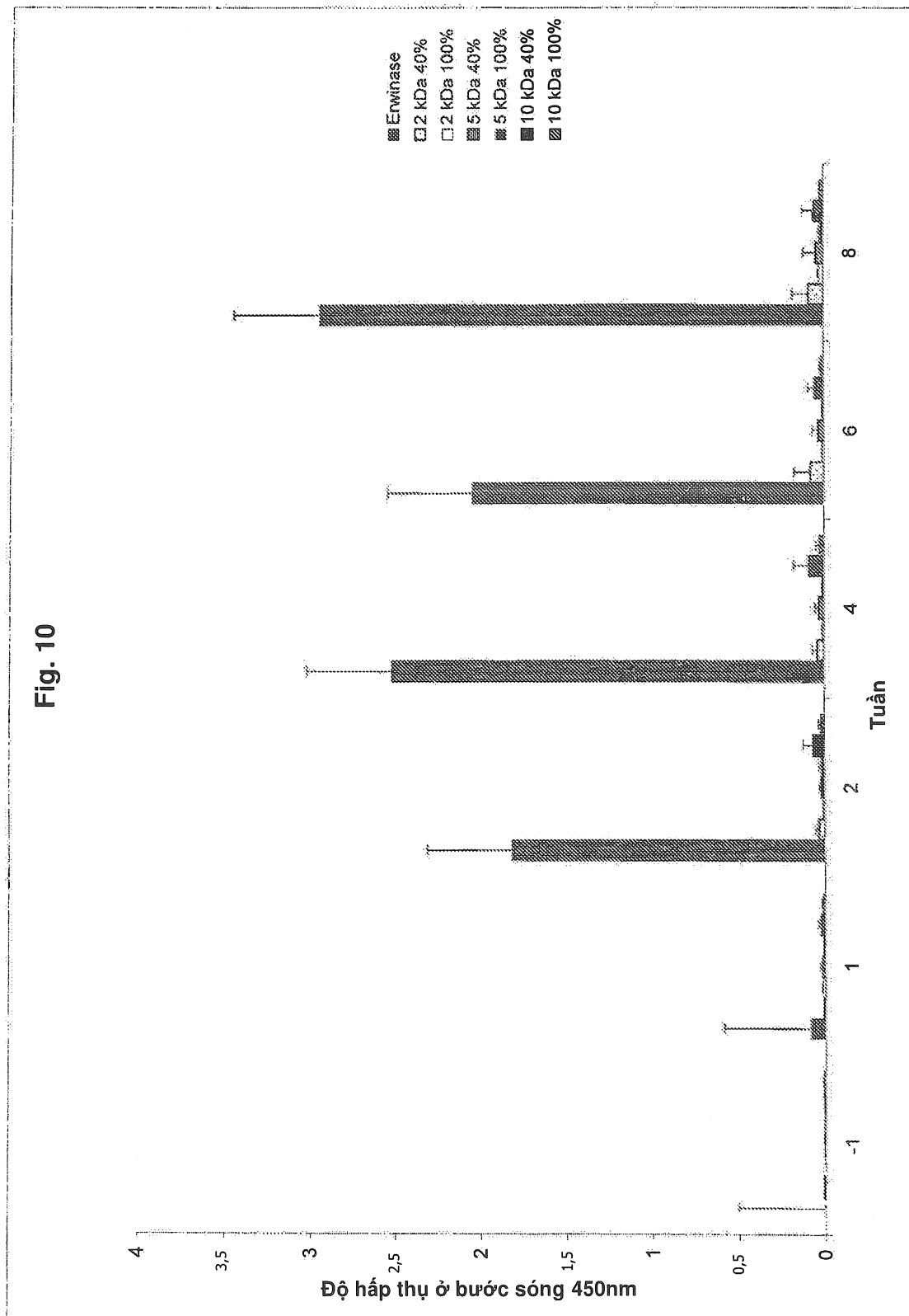
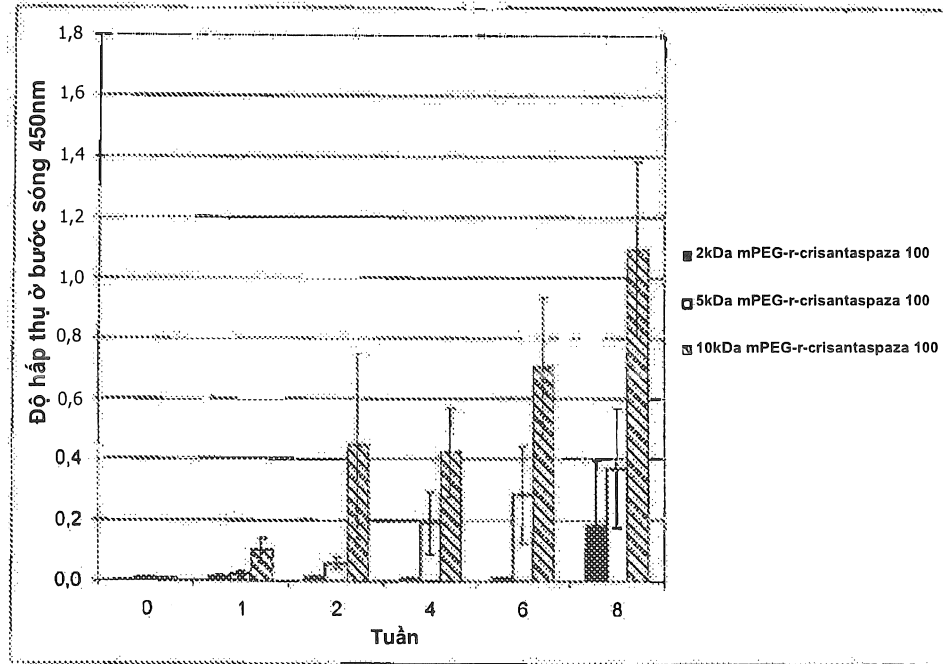
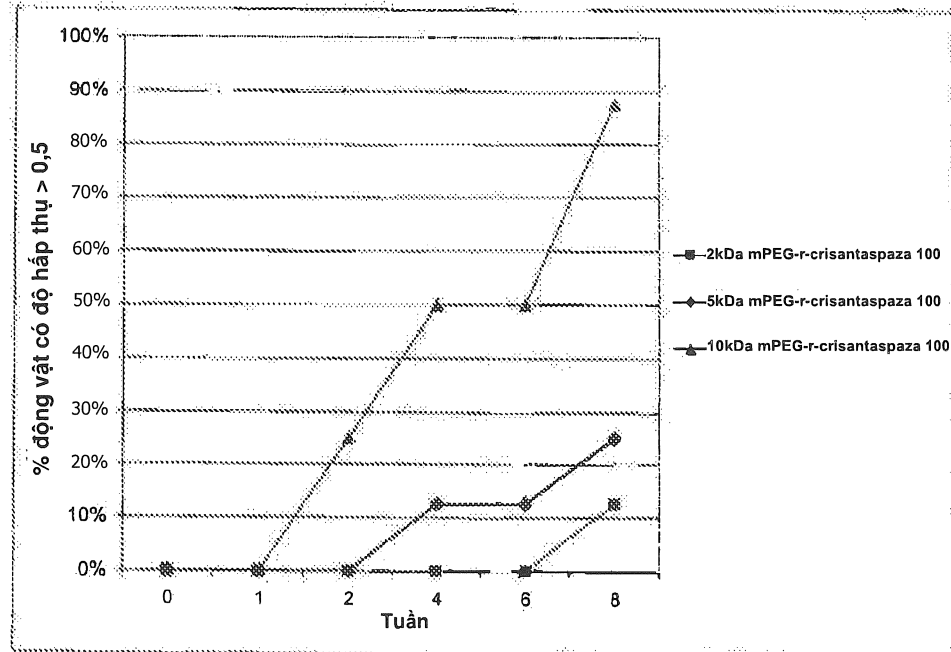


Fig. 11

11A



11B



DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> ALIZE PHARMA II
ABRIBAT, THIERRY

<120> THỂ LIÊN HỢP CHỨA L-ASPARAGINAZA VÀ POLYETYLENGYCOL, VÀ PHƯƠNG PHÁP TẠO
THỂ LIÊN HỢP NÀY

<130> 356729D28474

<150> US 61/223,320

<151> 2009-07-06

<150> PCT/EP2010/054156

<151> 2010-03-30

<160> 1

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 327

<212> PRT

<213> Erwinia chrysanthemi

<400> 1

Ala Asp Lys Leu Pro Asn Ile Val Ile Leu Ala Thr Gly Gly Thr Ile
1 5 10 15

Ala Gly Ser Ala Ala Thr Gly Thr Gln Thr Thr Gly Tyr Lys Ala Gly
20 25 30

Ala Leu Gly Val Asp Thr Leu Ile Asn Ala Val Pro Glu Val Lys Lys
35 40 45

Leu Ala Asn Val Lys Gly Glu Gln Phe Ser Asn Met Ala Ser Glu Asn
50 55 60

Met Thr Gly Asp Val Val Leu Lys Leu Ser Gln Arg Val Asn Glu Leu
65 70 75 80

Leu Ala Arg Asp Asp Val Asp Gly Val Val Ile Thr His Gly Thr Asp
85 90 95

Thr Val Glu Glu Ser Ala Tyr Phe Leu His Leu Thr Val Lys Ser Asp
100 105 110

Lys Pro Val Val Phe Val Ala Ala Met Arg Pro Ala Thr Ala Ile Ser
115 120 125

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> ALIZE PHARMA II
ABRIBAT, THIERRY

<120> THỂ LIÊN HỢP CHỨA L-ASPARAGINAZA VÀ POLYETYLENGLYCOL, VÀ PHƯƠNG
PHÁP TẠO THỂ LIÊN HỢP NÀY

<130> 356729D28474

<150> US 61/223,320

<151> 2009-07-06

<150> PCT/EP2010/054156

<151> 2010-03-30

<160> 1

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 327

<212> PRT

<213> Erwinia chrysanthemi

<400> 1

Ala Asp Lys Leu Pro Asn Ile Val Ile Leu Ala Thr Gly Gly Thr Ile
1 5 10 15

Ala Gly Ser Ala Ala Thr Gly Thr Gln Thr Thr Gly Tyr Lys Ala Gly
20 25 30

Ala Leu Gly Val Asp Thr Leu Ile Asn Ala Val Pro Glu Val Lys Lys
35 40 45

Leu Ala Asn Val Lys Gly Glu Gln Phe Ser Asn Met Ala Ser Glu Asn
50 55 60

Met Thr Gly Asp Val Val Leu Lys Leu Ser Gln Arg Val Asn Glu Leu
65 70 75 80

Leu Ala Arg Asp Asp Val Asp Gly Val Val Ile Thr His Gly Thr Asp
85 90 95

Thr Val Glu Glu Ser Ala Tyr Phe Leu His Leu Thr Val Lys Ser Asp
100 105 110

Lys Pro Val Val Phe Val Ala Ala Met Arg Pro Ala Thr Ala Ile Ser
115 120 125

Ala Asp Gly Pro Met Asn Leu Leu Glu Ala Val Arg Val Ala Gly Asp
 130 135 140

Lys Gln Ser Arg Gly Arg Gly Val Met Val Val Leu Asn Asp Arg Ile
 145 150 155 160

Gly Ser Ala Arg Tyr Ile Thr Lys Thr Asn Ala Ser Thr Leu Asp Thr
 165 170 175

Phe Lys Ala Asn Glu Glu Gly Tyr Leu Gly Val Ile Ile Gly Asn Arg
 180 185 190

Ile Tyr Tyr Gln Asn Arg Ile Asp Lys Leu His Thr Thr Arg Ser Val
 195 200 205

Phe Asp Val Arg Gly Leu Thr Ser Leu Pro Lys Val Asp Ile Leu Tyr
 210 215 220

Gly Tyr Gln Asp Asp Pro Glu Tyr Leu Tyr Asp Ala Ala Ile Gln His
 225 230 235 240

Gly Val Lys Gly Ile Val Tyr Ala Gly Met Gly Ala Gly Ser Val Ser
 245 250 255

Val Arg Gly Ile Ala Gly Met Arg Lys Ala Met Glu Lys Gly Val Val
 260 265 270

Val Ile Arg Ser Thr Arg Thr Gly Asn Gly Ile Val Pro Pro Asp Glu
 275 280 285

Glu Leu Pro Gly Leu Val Ser Asp Ser Leu Asn Pro Ala His Ala Arg
 290 295 300

Ile Leu Leu Met Leu Ala Leu Thr Arg Thr Ser Asp Pro Lys Val Ile
 305 310 315 320

Gln Glu Tyr Phe His Thr Tyr
 325