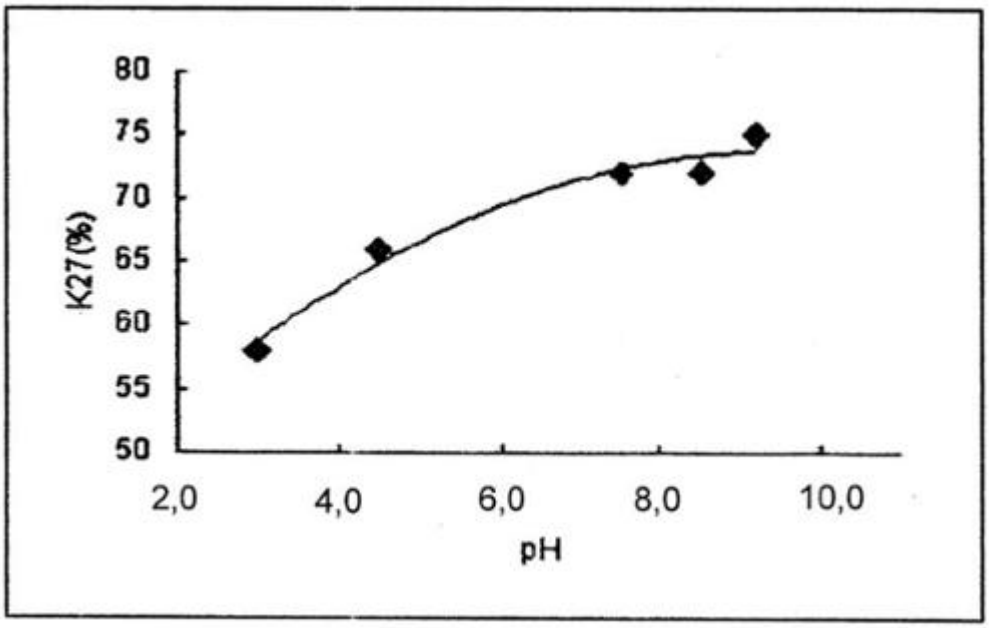
(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ
(19) **Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)**
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ
(11) **1-0023863**
(51)[7] **C07K 1/14**; C07K 1/18; C07K 1/10 (13) **B**

(21) 1-2011-02785 (22) 18/03/2010
(86) PCT/KR2010/001674 18/03/2010 (87) WO2010/107256 23/09/2010
(30) 10-2009-0023953 20/03/2009 KR
(45) 25/05/2020 386 (43) 30/01/2012 286A
(73) HANMI SCIENCE CO., LTD. (KR)
214, Muha-ro, Paltan-myeon, Hwaseong-si, Gyeonggi-do 445-958, Republic of Korea
(72) SONG Dae Hae (KR); SHIN Jae Hee (KR); LEE Jae Min (KR); PARK Young Kyung (KR); KWON Se Chang (KR); LEE Gwan Sun (KR)
(74) Công ty Luật TNHH Phạm và Liên danh (PHAM & ASSOCIATES)

(54) PHƯƠNG PHÁP ĐIỀU CHẾ THỂ TIẾP HỢP POLYPEPTIT CÓ HOẠT TÍNH SINH LÝ HỌC ĐẶC HIỆU VỊ TRÍ

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp điều chế thể tiếp hợp polypeptit có hoạt tính sinh lý học đặc hiệu vị trí với hiệu suất cao bằng cách xử lý polypeptit có hoạt tính sinh lý học với polyme không peptiđyl với sự có mặt của rượu ở độ pH đặc hiệu, có thể mong muốn được sử dụng để phát triển chế phẩm của nhiều loại thuốc peptit có tác dụng lâu dài có hoạt tính *in-vivo* cao và kéo dài rõ rệt trong chu kỳ bán phân rã trong máu.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp điều chế thể tiếp hợp polypeptit có hoạt tính sinh lý học đặc hiệu vị trí, cụ thể hơn là phương pháp điều chế thể tiếp hợp này với hiệu suất cao bằng cách liên kết polypeptit có hoạt tính sinh lý học với polyme không peptiđyl .

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Peptit bị biến tính một cách dễ dàng do độ ổn định thấp của chúng, suy biến bởi proteaza *in-vivo*, và bài tiết qua thận do kích thước tương đối nhỏ của chúng. Do đó, để duy trì nồng độ đặc biệt trong máu của thuốc peptit ở dạng hoạt tính của nó, cần thiết dùng thuốc peptit thường xuyên cho người bệnh. Tuy nhiên, thuốc peptit thường được dùng dưới dạng chế phẩm tiêm, và việc dùng thường xuyên như vậy sẽ vô cùng bất tiện cho bệnh nhân. Để giải quyết vấn đề này, đã phát triển một số phương pháp, ví dụ, phương pháp chuyển vận thuốc peptit nhờ hít qua miệng-họng hoặc mũi-họng bằng cách làm tăng tính thấm của thuốc peptit qua màng sinh học, phương pháp cải biến trình tự axit amin đặc hiệu nhạy với proteaza (ví dụ, trình tự axit amin GLP-1 để ngăn ngừa sự hao hụt hiệu giá bởi đipeptiđyl peptiđaza) để làm ổn định peptit bằng cách ức chế sự suy biến bởi enzym, và phương pháp bổ sung bằng hóa học polyme không peptiđyl với khả năng hoà tan cao như polyetylen glycol (PEG), trên bề mặt của peptit.

PEG, đã được sử dụng như một trong những polyme không peptiđyl, không gắn kết đặc hiệu với vị trí đặc hiệu hoặc nhiều vị trí của peptit đích để đạt được hiệu quả của việc tăng trọng lượng phân tử của peptit, PEG-peptit thu được cản được sự hao hụt qua thận và thủy phân bằng enzym, mà không gây ra tác dụng phụ bất kỳ. Ví dụ, Công bố đơn quốc tế số WO 2006/076471 mô tả việc tăng lực hoạt tính sinh lý học của peptit lợi niệu natri não typ B (BNP - B-type natriuretic peptide) được sử dụng làm tác nhân trị liệu bệnh suy tim sung huyết bằng cách gắn kết PEG vào đó, và patent Mỹ số 6,924,264 mô tả việc tăng thời gian lưu trú *in-vivo* của thuốc exenđin-4 bằng con đường gắn kết PEG với gốc lysin của chúng.

Các phương pháp này kéo dài thời gian lưu trú *in-vivo* của thuốc peptit bằng cách làm tăng trọng lượng phân tử của PEG, nhưng khi trọng lượng phân tử tăng, hiệu giá của thuốc peptit giảm đáng kể. Ngoài ra, PEG không gắn kết đặc hiệu có thể bảo vệ miền hoạt tính của polypeptit có hoạt tính sinh lý học để làm giảm đáng kể hoạt tính của polypeptit.

Do đó, cần phát triển phương pháp điều chế thể tiếp hợp của polypeptit có hoạt tính sinh lý học và polyme không peptiđyl cải tiến, trong đó polyme được liên kết với peptit theo cách đặc hiệu vị trí không gây ảnh hưởng đến hoạt tính của polypeptit.

Các tác giả sáng chế đã hoàn thành sáng chế bằng việc khẳng định rằng thể tiếp hợp polypeptit có hoạt tính sinh lý học có polyme không peptiđyl được liên kết đặc hiệu vị trí có thể được điều chế với hiệu suất cao bằng cách điều chỉnh độ pH và hàm lượng rượu của môi trường phản ứng.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Do đó, một mục đích của sáng chế là đề xuất phương pháp điều chế với hiệu suất cao thể tiếp hợp polypeptit có hoạt tính sinh lý học trong đó polyme không peptiđyl được gắn kết đặc hiệu vị trí với polypeptit có hoạt tính sinh lý học.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp điều chế thể tiếp hợp polypeptit có hoạt tính sinh lý học đặc hiệu vị trí, bao gồm các bước: i) cho polypeptit có hoạt tính sinh lý học phản ứng với polyme không peptiđyl trong môi trường phản ứng chứa lượng rượu đặc hiệu và có độ pH đặc hiệu để có thể gắn kết polyme không peptiđyl với vị trí đích của polypeptit có hoạt tính sinh lý học; và ii) tách và tinh chế polypeptit có hoạt tính sinh lý học thể tiếp hợp ra khỏi hỗn hợp phản ứng của bước (i) bằng sắc ký trao đổi ion sử dụng rượu.

Mô tả vắt tắt các hình vẽ

Các dấu hiệu và đối tượng trên đây và các dấu hiệu và đối tượng khác của sáng chế sẽ được hiểu rõ hơn với phần mô tả dưới đây của sáng chế, khi được kết hợp với các hình vẽ kèm theo, lần lượt thể hiện:

Fig. 1: profin tinh chế của các chất đồng phân vị trí của DA-exenđin-4-PEG bằng cách sử dụng cột SOURCE S;

Fig. 2: profin tinh chế của các chất đồng phân vị trí của CA-exenđin-4-PEG bằng cách sử dụng cột SOURCE S;

Fig. 3: đồ thị thể hiện các chất đồng phân được peg hóa Lys27 thu được khi CA-exenđin-4 được peg hóa ở các độ pH khác nhau;

Fig. 4: đồ thị thể hiện các chất đồng phân được peg hóa Lys27 thu được khi CA-exenđin-4 được peg hóa ở các độ pH khác nhau và ở EtOH 45%.

Fig. 5: đồ thị thể hiện các chất đồng phân được peg hóa Lys27 thu được khi CA-exenđin-4 được peg hóa ở độ pH 7,5 và với lượng etanol (%) khác nhau;

Fig. 6: đồ thị thể hiện các chất đồng phân được peg hóa Lys27 thu được khi CA-exenđin-4 được peg hóa ở độ pH 7,5 và với lượng isopropanol (%) khác nhau;

Fig. 7: phân tích SDS-PAGE của CA-exenđin-PEG-Fc globulin miễn dịch;

Fig. 8: phân tích SDS-PAGE của CA-exenđin-PEG Lys12 và Lys27;

Fig. 9: profin phân tích của các chất đồng phân được peg hóa Lys12 của CA-exenđin-4 bằng cách lập bản đồ peptit;

Fig. 10: profin phân tích của các chất đồng phân được peg hóa Lys27 của CA-exenđin-4 bằng cách lập bản đồ peptit;

Fig. 11: profin tinh chế của các chất đồng phân vị trí của oxyntomođulin-PEG bằng cách sử dụng cột SOURCE S;

Fig. 12: profin tinh chế của các chất đồng phân vị trí của imiđazo-axetyl oxyntomođulin-PEG bằng cách sử dụng cột SOURCE S;

Fig. 13: profin phân tích của các chất đồng phân được peg hóa Lys30 của oxyntomođulin bằng cách lập bản đồ peptit;

Fig. 14: profin tinh chế của thể tiếp hợp của imiđazo-axetyl oxyntomođulin-PEG và Fc globulin miễn dịch bằng cách sử dụng cột SOURCE Q;

Fig. 15: phân tích SDS-PAGE của thể tiếp hợp của imiđazo-axetyl oxyntomođulin-PEG và Fc globulin miễn dịch;

Fig. 16: profin tinh chế của các chất đồng phân vị trí của PEG tương tự oxyntomođulin bằng cách sử dụng cột SOURCE S;

Fig. 17: profin phân tích của các chất đồng phân được peg hóa Lys27 của chất tương tự oxyntomođulin bằng cách lập bản đồ peptit;

Fig. 18: profin tinh chế của các chất đồng phân vị trí của PEG tương tự imiđazo-axetyl oxyntomođulin bằng cách sử dụng cột SOURCE S;

Fig. 19: profin phân tích của các chất đồng phân được peg hóa Lys27 của

chất tương tự imiđazo-axetyl oxyntomođulin bằng cách lập bản đồ peptit;

Fig. 20: profin tinh chế của thể tiếp hợp của PEG tương tư imiđazo-axetyl oxyntomođulin và Fc globulin miễn dịch bằng cách sử dụng cột SOURCE Q;

Fig. 21: phân tích SDS-PAGE của thể tiếp hợp của PEG tương tư imiđazo-axetyl oxyntomođulin và Fc globulin miễn dịch;

Fig. 22: profin tinh chế của các chất đồng phân vị trí của GLP-1-PEG bằng cách sử dụng cột SOURCE S;

Fig. 23: profin phân tích của các chất đồng phân được peg hóa Lys34 của GLP-1 bằng cách lập bản đồ peptit;

Fig. 24: profin tinh chế của các chất đồng phân vị trí của imiđazo-axetyl GLP-1-PEG bằng cách sử dụng cột SOURCE S;

Fig. 25: profin phân tích của các chất đồng phân được peg hóa Lys34 của imiđazo-axetyl GLP-1 bằng cách lập bản đồ peptit;

Fig. 26: profin tinh chế của thể tiếp hợp của imiđazo-axetyl GLP-1-PEG và Fc globulin miễn dịch bằng cách sử dụng cột SOURCE Phe;

Fig. 27: phân tích SDS-PAGE của thể tiếp hợp của imiđazo-axetyl GLP-1-PEG và Fc globulin miễn dịch;

Fig. 28: profin tinh chế của các chất đồng phân vị trí của GLP-2-PEG bằng cách sử dụng cột SOURCE S;

Fig. 29: profin phân tích của các chất đồng phân được peg hóa Lys30 của GLP-2 bằng cách lập bản đồ peptit;

Fig. 30: profin tinh chế của các chất đồng phân vị trí của imiđazo-axetyl GLP-2-PEG bằng cách sử dụng cột SOURCE S;

Fig. 31: profin tinh chế của thể tiếp hợp của imiđazo-axetyl GLP-2-PEG và Fc globulin miễn dịch bằng cách sử dụng cột SOURCE Phe;

Fig. 32: phân tích SDS-PAGE của thể tiếp hợp của imiđazo-axetyl GLP-2-PEG và Fc globulin miễn dịch;

Fig. 33: profin tinh chế của các chất đồng phân vị trí của insulin-PEG (B1F) của người bằng cách sử dụng cột SOURCE S;

Fig. 34: profin tinh chế của các chất đồng phân vị trí của insulin-PEG (A1G) của người bằng cách sử dụng cột SOURCE S;

Fig. 35: profin tinh chế của các chất đồng phân vị trí của insulin-PEG (B29K) của người bằng cách sử dụng cột SOURCE S; và

Fig. 36: profin phân tích của các chất đồng phân được peg hóa A1G, B1F, hoặc B29K của insulin của người bằng cách lập bản đồ peptit.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế được mô tả chi tiết dưới đây.

Sáng chế đề xuất phương pháp điều chế thể tiếp hợp polypeptit có hoạt tính sinh lý học đặc hiệu vị trí, bao gồm các bước:

i) xử lý polypeptit có hoạt tính sinh lý học với polyme không peptiđyl trong môi trường phản ứng chứa lượng rượu đặc hiệu và có độ pH đặc hiệu để có thể gắn kết polyme không peptiđyl với vị trí đích của polypeptit có hoạt tính sinh lý học; và

ii) tách và tinh chế polypeptit có hoạt tính sinh lý học thể tiếp hợp ra khỏi hỗn hợp phản ứng của bước (i) bằng sắc ký trao đổi ion sử dụng rượu.

Thể tiếp hợp polypeptit có hoạt tính sinh lý học theo sáng chế dùng để chỉ chất chứa polypeptit có hoạt tính sinh lý học và đầu tận của polyme không peptiđyl được liên kết cộng hóa trị với nhau, và khác biệt ở chỗ, liên kết polypeptit với polyme trong các điều kiện đặc biệt và tách thể tiếp hợp polypeptit thu được có polyme được liên kết trên vị trí đích của nó.

Thuật ngữ "polypeptit có hoạt tính sinh lý học hoặc peptit" sử dụng trong bản mô tả này dùng để chỉ peptit có thể có hoạt tính sinh lý học *in-vivo*, ví dụ, có thể là được chọn từ nhóm bao gồm peptit hướng insulin, yếu tố máu, hormon tiêu hóa, hormon hướng vỏ thượng thận, hormon tuyến giáp, hormon ruột, xytokin, enzym, yếu tố sinh trưởng, peptit thần kinh, hormon hypophyseotropic, hormon kích thích tuyến yên, peptit chống béo phì, peptit kháng virut, và dẫn xuất peptit không tự nhiên có hoạt tính sinh lý học, nhưng không giới hạn ở đó. Cụ thể hơn, polypeptit có hoạt tính sinh lý học hoặc peptit được chọn từ nhóm bao gồm erythropoietin, GM-CSF (yếu tố kích thích quần thể bạch cầu hạt-đại thực bào), amylin, glucagon, insulin, somatostatin, PYY (peptit YY), NPY (peptit thần kinh Y), GLP-1, GLP-2, exenđin-4, oxyntomođulin, ghrelin, angiotensin, brađykinin, canxitonin, corticotropin, eledoisin, gastrin, leptin, oxytoxin, vasopressin, LH (hormon lutein hóa), prolactin, FSH (hormon kích thích nang trứng), PTH (hormon tuyến cận giáp), secretin, sermorelin, hGH (hormon tăng trưởng của người), peptit giải phóng hormon sinh trưởng, G-CSF (yếu tố kích thích quần thể

bạch cầu hạt), interferon, interleukin, peptit giải phóng prolactin, orexin, peptit giải phóng tuyến giáp, cholecystokinin, peptit ức chế gaxtrin, calmodulin, peptit giải phóng gaxtrin, motilin, peptit ruột vận mạch, ANP (peptit lợi niệu natri tâm nhĩ), BNP (peptit lợi niệu natri não), CNP (peptit lợi niệu natri typ C), neurokinin A, neuromedin, renin, endothelin, peptit sarafotoxin, peptit carsomorphin, dermorphin, dynorphin, endorphin, enkepalin, yếu tố tế bào T, yếu tố gây hoại tử khối u, thụ thể yếu tố gây hoại tử khối u , thụ thể urokinaza, yếu tố ức chế khối u, chất ức chế colagenaza, thymopoietin, thymulin, thymopentin, tymosin, yếu tố thể dịch tuyến ức, ađrenomođulin, allatostatin, mảnh beta-protein amyloit, peptit diệt khuẩn, peptit chống oxy hoá, bombesin, osteocalcin, CART peptit, E-selectin, ICAM-1, VCAM-1, leucokin, kringle-5, laminin, inhibin, galanin, fibronectin, pancreastatin, và fuzeon. Ngoài ra, polypeptit có hoạt tính sinh lý học bao gồm tiền chất, dẫn xuất, mảnh, hoặc biến thể của chúng.

Polypeptit có hoạt tính sinh lý học được ưu tiên được sử dụng trong sáng chế là exenđin, insulin, GLP-1, GLP-2, oxyntomođulin, ghrelin, angiotensin, brađykinin, canxitonin, hoặc dẫn xuất của chúng. Dẫn xuất của chúng có thể được điều chế, ví dụ, bằng cách thay thế hóa học (ví dụ, alpha-metyl hóa hoặc alpha-hyđroxyl hóa), khuyết đoạn (ví dụ khử amin hóa hoặc khuyết đoạn cacbon) hoặc cải biến (ví dụ N-metyl hóa) của các nhóm bất kỳ trên một gốc axit amin, và cụ thể là điều chế dẫn xuất exenđin được mô tả chi tiết trong đơn yêu cầu cấp patent Hàn quốc số 2008-69234.

Trong khi đó, thuật ngữ "polyme không peptiđyl" sử dụng trong bản mô tả này dùng để chỉ polyme tương hợp sinh học bao gồm hai hoặc nhiều đơn vị lặp lại được liên kết với nhau bằng liên kết cộng hoá trị chỉ khác là liên kết peptit.

Polyme không peptiđyl có thể được sử dụng trong sáng chế có thể là dạng được chọn từ nhóm bao gồm polyetylen glycol, polypropylen glycol, copolyme của etylen glycol và propylen glycol, rượu polyhyđric được polyoxyetyl hóa, rượu polyvinylic, polysaccarit, đextran, polyvinyl etyl ete, polyme dễ bị vi sinh vật phá hủy như PLA (poly(axit lactic)) và PLGA (axit polylactic-glycolic), polyme lipit, kitin, axit hyaluronic, và tổ hợp của chúng, và được ưu tiên là polyetylen glycol. Dẫn xuất của chúng, là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này hoặc được điều chế một cách dễ dàng bởi người có hiểu biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, cũng nằm

trong phạm vi của sáng chế. Polyme không peptiđyl có thể được sử dụng theo sáng chế thực hiện chức năng để làm tăng trọng lượng phân tử của polypeptit có hoạt tính sinh lý học để ngăn ngừa việc mất thể tiếp hợp qua thận. Polyme không peptiđyl bất kỳ, chừng nào mà nó bền với proteaza *in-vivo*, có thể được sử dụng mà không cần giới hạn bất kỳ. Trọng lượng phân tử của polyme không peptiđyl có thể nằm trong khoảng từ 0,5 đến 100 kDa, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0,5 đến 20 kDa, và tỷ lệ mol thích hợp của polypeptit có hoạt tính sinh lý học và polyme không peptiđyl có thể được chọn nằm trong khoảng từ 1:1 đến 1:50.

Polyme không peptiđyl được sử dụng trong sáng chế có nhóm phản ứng ở một đầu hoặc ở cả hai đầu. Trong trường hợp polyme không peptiđyl có nhóm phản ứng ở cả hai đầu, nó có thể gắn kết với chất mang có hoạt tính sinh lý học và thuốc protein hộ trợ hoạt động chức năng như chế phẩm có tác dụng lâu dài.

Tốt hơn là, nhóm phản ứng ở một đầu hoặc ở cả hai đầu của polyme không peptiđyl được chọn từ nhóm bao gồm nhóm alđehyt phản ứng, nhóm propionalđehyt, nhóm butyralđehyt, nhóm maleimit và nhóm sucxinimit. Ví dụ về nhóm sucxinimit bao gồm sucxinimiđyl propionat, sucxinimiđyl butanoat, hyđroxy sucxinimiđyl, sucxinimiđyl carboxymetyl, hoặc sucxinimiđyl cacbonat. Cụ thể, khi polyme không peptiđyl có nhóm alđehyt phản ứng hoặc nhóm sucxinimiđyl phản ứng ở một đầu, hiệu quả là liên kết ở cả hai đầu với polypeptit có hoạt tính sinh lý học và globulin miễn dịch với các phản ứng không đặc hiệu ở mức tối thiểu. Nhóm phản ứng alđehyt gắn kết một cách có chọn lọc với đầu tận cùng N ở độ pH thấp, và có thể gắn kết với gốc lysin để thu được amin liên kết ở độ pH cao như pH 9,0. Ngoài ra, nhóm phản ứng sucxinimiđyl có thể tạo thành liên kết amit bền với đầu tận amino hoặc gốc lysin ở độ pH nằm trong khoảng từ 7,0 đến 9,0.

Ngoài ra, các nhóm phản ứng ở cả hai đầu của polyme không peptiđyl có thể là giống nhau hoặc khác nhau. Khi polyetylen glycol có nhóm hyđroxyl phản ứng ở cả hai đầu của nó được dùng làm polyme không peptiđyl, nhóm hyđroxyl có thể được hoạt hóa thành các nhóm phản ứng khác nhau bằng các phản ứng hóa học đã biết, hoặc polyetylen glycol có bán trên thị trường có nhóm phản ứng đã được cải biến có thể được sử dụng.

Bước (i) của sáng chế là điều chế thể tiếp hợp polypeptit có hoạt tính sinh lý học bằng cách liên kết đặc hiệu vị trí polyme không peptiđyl với polypeptit có hoạt tính sinh lý học trong môi trường phản ứng thích hợp.

Thuật ngữ "đặc hiệu vị trí" hoặc "mang tính đặc hiệu vị trí" sử dụng trong bản mô tả này dùng để chỉ liên kết polyme không peptiđyl vào vị trí axit amin đích đặc hiệu của polypeptit có hoạt tính sinh lý học, tốt hơn là amin của gốc lysin hoặc đầu tận cùng N. Liên kết đặc hiệu vị trí hoặc liên kết có thể ngăn ngừa sự tạo thành của thể tiếp hợp ngẫu nhiên trong đó polyme không peptiđyl được liên kết với gốc axit amin quan trọng về mặt sinh lý học. Ví dụ, khi polyme không peptiđyl gắn kết với đầu tận cùng N của exenđin-4, hoạt tính *in-vitro* của exenđin-4 bị giảm, nhưng khi polyme không peptiđyl gắn kết với gốc lysin, hoạt tính *in-vitro* được duy trì. Cụ thể, khi polyme không peptiđyl gắn kết với gốc lysin thứ 27 chứ không phải là gốc lysin thứ 12, đã quan sát được hoạt tính *in-vitro* cao hơn nhiều (xem Ví dụ 10 và Bảng 2).

Các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng sự có mặt của rượu trong môi trường phản ứng và độ pH của môi trường phản ứng ở bước (i) là các yếu tố quan trọng đối với liên kết đặc hiệu vị trí của polyme không peptiđyl và polypeptit có hoạt tính sinh lý học. Do đó, ở bước (i) của sáng chế, polyme không peptiđyl trở nên liên kết với vị trí đặc hiệu của polypeptit có hoạt tính sinh lý học, bằng cách sử dụng môi trường phản ứng chứa hàm lượng rượu đặc hiệu và có độ pH đặc hiệu.

Theo phương án đặc biệt của sáng chế, tỷ lệ của chất đồng phân vị trí đặc hiệu của thể tiếp hợp polypeptit có thể thay đổi dựa trên cơ sở độ pH của môi trường phản ứng, hoặc dựa trên cơ sở nồng độ (%) của rượu ở cùng độ pH. Do đó có thể liên kết polyme không peptiđyl với axit amin mong muốn của polypeptit có hoạt tính sinh lý học theo cách đặc hiệu vị trí.

Nghĩa là, bước (i) của sáng chế được tiến hành ở độ pH đặc hiệu để có thể gắn kết polyme không peptiđyl với vị trí mong muốn (hoặc đích), tức là không gây ảnh hưởng đến hoạt tính của polypeptit. Khoảng giá trị pH có thể phụ thuộc vào các dạng polypeptit có hoạt tính sinh lý học. Ví dụ, trong trường hợp an peptit hướng insulin (ví dụ, exenđin-4), chất đồng phân trong đó polyme được liên kết

với lysin thứ 12 đã quan sát rõ ở độ pH thấp của môi trường phản ứng, trong khi đó đã quan sát rõ chất đồng phân trong đó polyme được liên kết với lysin thứ 27 không gây ảnh hưởng đến hoạt tính insulinotropic ở độ pH cao của môi trường phản ứng (xem Ví dụ 3 và Fig. 3). Do đó, tốt hơn là bước (i) được tiến hành ở độ pH nằm trong khoảng từ 7,5 đến 9,0 sao cho polyme không peptiđyl được liên hợp một cách có chọn lọc với lysin thứ 27.

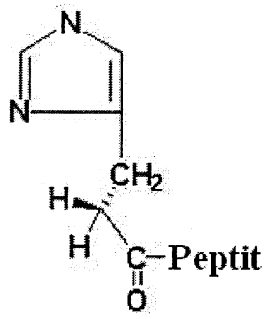
Ngoài ra, bước (i) của sáng chế được tiến hành trong môi trường phản ứng chứa rượu sao cho polyme không peptiđyl có thể gắn kết với vị trí không gây ảnh hưởng đến hoạt tính của polypeptit. Ví dụ về rượu bao gồm rượu bậc một, bậc hai, và bậc ba, tốt hơn là rượu có số nguyên tử cacbon nằm trong khoảng từ một đến mười, tốt hơn nữa là etanol hoặc isopropanol. Trong trường hợp peptit hướng insulin (ví dụ, exenđin-4), rượu có thể có mặt trong môi trường phản ứng, với lượng nằm trong khoảng từ 0,1% đến 100% thể tích, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 25% đến 90%, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 35% đến 60%, tính theo tổng thể tích của môi trường phản ứng, để có thể gắn kết polyme không peptiđyl với lysin thứ 27 mà không gây ảnh hưởng đến hoạt tính insulinotropic.

Theo một phương án của sáng chế, khi polypeptit có hoạt tính sinh lý học là exenđin-4 hoặc dẫn xuất của chúng, độ pH được sử dụng ở bước (i) có thể nằm trong khoảng từ 7,0 đến 10,0 để làm tăng tỷ lệ gắn kết của polyme không peptiđyl với Lys27. Theo phương án khác của sáng chế, khi polypeptit có hoạt tính sinh lý học là canxitonin, độ pH được sử dụng ở bước (i) có thể nằm trong khoảng từ 4,0 đến 6,0 để làm tăng tỷ lệ gắn kết của polyme không peptiđyl với đầu tận cùng N. Theo phương án khác của sáng chế, khi polypeptit có hoạt tính sinh lý học là oxyntomođulin hoặc dẫn xuất của chúng, độ pH được sử dụng ở bước (i) có thể nằm trong khoảng từ 7,0 đến 10,0 để làm tăng tỷ lệ gắn kết của polyme không peptiđyl với Lys27 hoặc Lys30. Theo phương án khác của sáng chế, khi polypeptit có hoạt tính sinh lý học là insulin của người hoặc dẫn xuất của chúng, độ pH được sử dụng ở bước (i) có thể nằm trong khoảng từ 4,0 đến 6,0 để làm tăng tỷ lệ gắn kết của polyme không peptiđyl với đầu tận cùng N của Phe1 (phenylalanin thứ nhất) trong mạch B. Theo phương án khác của sáng chế, khi polypeptit có hoạt tính sinh lý học là insulin của người hoặc dẫn xuất của chúng, độ pH được sử dụng ở bước (i) có thể nằm trong khoảng từ 7,0 đến 10,0 để làm tăng tỷ lệ gắn kết của polyme không peptiđyl với đầu tận cùng N của Gly1 (glyxin

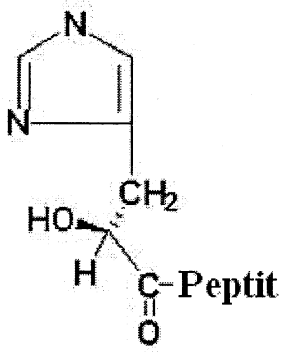
thứ nhất) trong mạch A, hoặc với Lys29 (lysin thứ 29) trong mạch B. Theo phương án khác của sáng chế, khi polypeptit có hoạt tính sinh lý học là GLP-1 hoặc dẫn xuất của chúng, độ pH được sử dụng ở bước (i) có thể nằm trong khoảng từ 7,0 đến 10,0 để làm tăng tỷ lệ gắn kết của polyme không peptiđyl với Lys34. Theo phương án khác của sáng chế, khi polypeptit có hoạt tính sinh lý học là GLP-2 hoặc dẫn xuất của chúng, độ pH được sử dụng ở bước (i) có thể nằm trong khoảng từ 7,0 đến 10,0 để làm tăng tỷ lệ gắn kết của polyme không peptiđyl với Lys30.

Do đó, thể tiếp hợp polypeptit có hoạt tính sinh lý học đặc hiệu vị trí được ưu tiên theo sáng chế là thể tiếp hợp exenđin-4 trong đó PEG được liên kết với Lys27, thể tiếp hợp canxitonin trong đó PEG được liên kết với đầu tận cùng N, oxyntomođulin thể tiếp hợp hoặc chất tương tự của nó trong đó PEG được liên kết với Lys27 hoặc Lys30, thể tiếp hợp insulin của người hoặc chất tương tự của nó trong đó PEG được liên kết với đầu tận cùng N của Phe1 trong mạch B, đầu tận cùng N của Gly1 trong mạch A, hoặc với Lys29 trong mạch B, hoặc thể tiếp hợp GLP-1 hoặc GLP-2 trong đó PEG được liên kết với Lys34 hoặc Lys30.

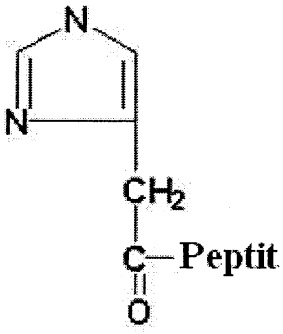
Theo khía cạnh được ưu tiên của sáng chế, dẫn xuất peptit (hoặc chất tương tự) có thể được sử dụng để tạo điều kiện thuận lợi liên kết đặc hiệu vị trí giữa polyme không peptiđyl và polypeptit có hoạt tính sinh lý học. Dẫn xuất này là peptit có vị trí axit amin không phải đích bất kỳ khác được khuyết đoạn hoặc được bảo vệ để ngăn ngừa liên kết không mong muốn. Ví dụ, trong trường hợp peptit hướng insulin như exenđin, các dẫn xuất exenđin khác nhau có thể được sử dụng, như đes-amino-histiđyl (DA)-exenđin-4 có công thức (I), Beta-hyđroxy-imiđazopropionyl(HY)-exenđin-4 có công thức (II), Imiđazoaxetyl(CA)-exenđin-4 có công thức (III), và đimetyl-histiđyl(DM)-exenđin-4 có công thức (IV), được điều chế bằng cách sử dụng các phương pháp trong đó nhóm alpha amin của axit amin đầu tận cùng N, histiđin bị khuyết đoạn, nhóm amin đầu tận cùng N được thế bằng nhóm hyđroxyl, nhóm alpha amin đầu tận cùng N của histiđin được cải biến với hai nhóm metyl, hoặc alpha cacbon của histiđin đầu tận cùng N và nhóm amin gắn kết vào đó được khuyết đoạn để loại bỏ nhóm imiđazoaxetyl, nhưng không giới hạn ở đó. Các cấu trúc của dẫn xuất exenđin được lấy làm ví dụ và phương pháp điều chế chúng được mô tả trong Công bố đơn patent Hàn quốc chưa được xét nghiệm số 2009-0008151, cũng nằm trong phạm vi của sáng chế.



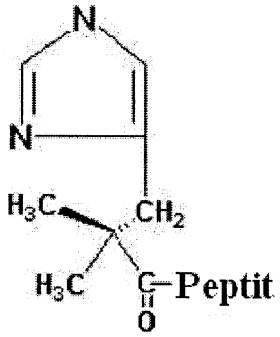
Công thức I



Công thức II



Công thức III



Công thức IV

Tương tự, oxyntomođulin, GLP-1 và GLP-2 có histiđin ở dạng axit amin thứ 1 có thể cũng được sử dụng ở dạng dẫn xuất có cấu trúc bất kỳ được chọn từ các Công thức từ (I) đến (IV).

Theo phương án cụ thể của sáng chế, các tác giả sáng chế đã nghiên cứu ảnh hưởng của độ pH và hàm lượng rượu (%) của môi trường phản ứng đến khía cạnh gắn kết đặc hiệu vị trí của polyme không peptiđyl, và đã khẳng định rằng tỷ lệ của the peptit hướng insulin thể tiếp hợp có polyme được liên kết với lysin thứ 12/lysin thứ 27 thay đổi tuỳ thuộc vào mức thay đổi của độ pH và lượng etanol hoặc isopropanol cụ thể. Cụ thể, chất đồng phân được ưu tiên hơn nữa có polyme không peptiđyl gắn kết với gốc lysin thứ 27 thu được với lượng lớn, khi từ 35% đến 55%, tốt hơn là 45% etanol hoặc isopropanol được sử dụng ở độ pH 7,5.

Sau khi làm tăng tỷ lệ của thể tiếp hợp polyme không peptiđyl-polypeptit có hoạt tính sinh lý học mong muốn bằng cách điều chỉnh độ pH đặc hiệu và hàm lượng rượu ở bước (i), thể tiếp hợp mong muốn có thể được tách và được tinh chế bằng trao đổi ion sắc ký bằng cách sử dụng rượu ở bước (ii).

Rượu được sử dụng trong bước (ii) có mặt trong dung dịch tinh khiết, và các ví dụ đặc biệt của nó là giống như được xác định ở bước (i). Tuy nhiên, rượu của bước (i) được sử dụng nhằm mục đích làm tăng tính phản ứng của polypeptit và tính đặc hiệu vị trí bằng cách cải biến cấu trúc bậc hai hoặc bậc ba của nó, trong khi đó rượu của bước (ii) được sử dụng nhằm mục đích tạo điều kiện thuận lợi việc tách và tinh chế với hiệu suất cao của thể tiếp hợp polypeptit có hoạt tính sinh lý học đặc hiệu vị trí bằng cách làm giảm liên kết không đặc hiệu giữa cột trao đổi ion và thể tiếp hợp. Việc tách và tinh chế có thể được tiến hành bằng cách sử dụng các phương pháp khác nhau đã biết đối với người có hiểu biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, tốt hơn là bằng sắc ký trao đổi ion, tốt hơn nữa là bằng sắc ký trao đổi ion áp suất cao.

Trong khi đó, để tạo điều kiện thuận lợi việc tách và tinh chế của chất đồng phân vị trí, sắc ký trao đổi ion có thể được tiến hành ở độ pH đặc hiệu. Độ pH được điều chỉnh thích hợp để làm tăng tính đặc hiệu vị trí của thể tiếp hợp ở bước (i), trong khi đó nó được điều chỉnh lại để gắn thể tiếp hợp và để gỡ nó ra khỏi cột trao đổi ion trong dung dịch tinh khiết chứa rượu ở bước (ii). Độ pH thích hợp được sử dụng ở bước (ii) có thể nằm trong khoảng từ 2,0 đến 6,0.

Hơn thế nữa, polypeptit có hoạt tính sinh lý học theo sáng chế có thể còn được liên kết với chất mang có hoạt tính sinh lý học. Trong trường hợp này,

polyme không peptiđyl phải là polyme không peptiđyl với cả hai đầu để gắn kết với chất mang có hoạt tính sinh lý học. Nghĩa là, chất mang có hoạt tính sinh lý học gắn kết cộng hóa trị với một đầu của polyme không peptiđyl không được liên kết cộng hóa trị với polypeptit có hoạt tính sinh lý học, và do đó có thể điều chế thể tiếp hợp trong đó cả hai đầu của polyme không peptiđyl được liên kết với polypeptit có hoạt tính sinh lý học và chất mang có hoạt tính sinh lý học.

Như được mô tả trên đây, thể tiếp hợp polypeptit có hoạt tính sinh lý học được điều chế ở bước (ii) có thể còn gắn kết với chất mang có hoạt tính sinh lý học, và thể tiếp hợp polypeptit-polyme-chất mang thu được có hoạt tính khác hoàn toàn so với thể tiếp hợp polypeptit-polyme, tức là hoạt tính sinh lý học nổi bật như khoảng thời gian tác dụng dược lý kéo dài mỹ mãn của polypeptit có hoạt tính sinh lý học, hướng đích đến vị trí đặc hiệu như thương tổn cần được điều trị, hoặc gây cảm ứng gây hoại tử.

Thuật ngữ "chất mang có hoạt tính sinh lý học" sử dụng trong bản mô tả này dùng để chỉ chất có hoạt tính sinh lý học có hoạt tính bổ sung khác biệt với hoạt tính tự nhiên của polypeptit sinh lý học, có thể duy trì hoạt tính sinh lý học của polypeptit như tác dụng dược lý, hoặc gây cảm ứng hướng đích đến vị trí đặc hiệu hoặc gây hoại tử, bằng cách gắn kết với polypeptit không peptiđyl cùng với polypeptit có hoạt tính sinh lý học.

Chất mang có hoạt tính sinh lý học được sử dụng trong sáng chế bao gồm chất có các hoạt tính trên đây mà không cần giới hạn bất kỳ, ví dụ, albumin, vùng Fc globulin miễn dịch, transferrin, aptamer, toxin, colagen, đextran, polysaccarit, axit béo, fibrinogen, và các chất tương tự. Tốt hơn là, chất mang có hoạt tính sinh lý học có thể được chọn từ albumin, vùng Fc globulin miễn dịch, và transferrrin, tốt hơn nữa là vùng Fc globulin miễn dịch.

Vùng Fc globulin miễn dịch theo sáng chế dùng để chỉ vùng ổn định chuỗi nặng 2 (CH2) và vùng ổn định chuỗi nặng 3 (CH3) của globulin miễn dịch, loại trừ vùng thay đổi của các chuỗi nặng và các chuỗi nhẹ, vùng ổn định chuỗi nặng 1 (CH1) và vùng ổn định chuỗi nhẹ 1 (CL1). Nó có thể còn bao gồm vùng bản lề ở vùng ổn định chuỗi nặng. Ngoài ra, vùng Fc globulin miễn dịch theo sáng chế có thể là dạng mở rộng chứa một phần hoặc toàn bộ vùng Fc bao gồm vùng ổn định

chuỗi nặng 1 (CH1) và/hoặc vùng ổn định chuỗi nhẹ 1 (CL1), chỉ khác là vùng thay đổi của các chuỗi nhẹ và chuỗi nặng, chừng nào mà nó có chức năng sinh lý học về cơ bản là tương tự với hoặc tốt hơn so với Fc globulin miễn dịch tự nhiên, và có thể bao gồm vùng Fc globulin miễn dịch được cải biến bằng cách phosphoryl hoá, sulfat hóa, acrylat hóa, glycosyl hoá, metyl hóa, farnesyl hóa, axetyl hóa, amit hóa, và phương pháp tương tự. Khoảng Fc globulin miễn dịch, phương pháp điều chế chúng, và phương pháp liên kết cộng hóa trị Fc globulin miễn dịch với thể tiếp hợp polyme không peptiđyl-polypeptit có hoạt tính sinh lý học được mô tả trong các patent Hàn quốc số 775343, 725314, 725315, và 824505, nằm trong phạm vi của sáng chế.

Theo phương pháp của sáng chế, thể tiếp hợp polypeptit mong muốn có hoạt tính sinh lý học mỹ mãn có thể được điều chế với hiệu suất cao bằng cách liên kết đặc hiệu vị trí polyme không peptiđyl với axit amin đặc hiệu của polypeptit có hoạt tính sinh lý học, trong khi làm giảm đến mức tối thiểu mức tạo thành của thể tiếp hợp bổ sung.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các Ví dụ sau được dự định để minh họa rõ hơn sáng chế mà không giới hạn phạm vi của nó.

Ví dụ 1: Điều chế và tinh chế thể tiếp hợp DA-exenđin-4 (Lys27) được peg hóa

<1-1> Điều chế thể tiếp hợp DA-exenđin-4 (Lys27) được peg hóa

Để điều chế thể tiếp hợp peptit được peg hóa bằng cách liên kết cộng hóa trị Lys trong peptit với PEG, đes-amino-histiđyl-exenđin-4 (DA-exenđin-4, AP, Mỹ) và 3,4K PropionALD(2) PEG (PEG có hai nhóm propionalđehyt, IDB Inc., Hàn Quốc) được đưa vào phản ứng ở 4°C trong 12 giờ ở tỷ lệ mol là 1:30, với nồng độ peptit là 3 mg/mL. Tại thời điểm này, dung dịch đệm 100 mM HEPES (pH 7,5) chứa 45% isopropanol được sử dụng làm môi trường phản ứng, và 20 mM $NaCNBH_3$ làm chất khử được bổ sung vào đó.

<1-2> Tách chất đồng phân vị trí

Peptit được peg hóa một lần chủ yếu được tinh chế từ hỗn hợp phản ứng chứa Ví dụ <1-1> bằng cách sử dụng sắc ký trao đổi ion SOURCE Q (XK 16mL,

GE healthcare, Hàn Quốc) trong điều kiện sau, và các chất đồng phân vị trí được tách bằng cách sử dụng sắc ký trao đổi ion SOURCE S (XK 16mL, GE healthcare, Hàn Quốc) trong điều kiện sau. Theo quy trình này, etanol được sử dụng để tạo điều kiện thuận lợi việc tách các chất đồng phân, bằng cách chứa nó trong dung dịch tinh khiết. Các vị trí được peg hóa được xác nhận từ các đỉnh đã được rửa giải bằng phương pháp lập bản đồ peptit.

Cột: SOURCE Q
Tốc độ dòng: 2,0mL/phút
Dung dịch rửa giải: A (20 mM Tris, độ pH 8,5) và B (A+0,5M NaCl);
Cột: SOURCE S
Tốc độ dòng: 2,0mL/phút
Dung dịch rửa giải: A (20 mM xitric axit, độ pH 3,0 + 45% etanol) và B (A+45% etanol+0,5M KCl); Građien A 0→100%, 45 phút

Từ phân tích của profin tinh chế của các chất đồng phân vị trí, đã thấy rằng đỉnh cho DA-exenđin-4 được peg hóa Lys12 được rửa giải sớm, và sau đó đỉnh được peg hóa Lys27 được rửa giải trong phần cuối (Fig. 1).

Ví dụ 2: Điều chế và tinh chế thể tiếp hợp CA-exenđin-4 (Lys27) được peg hóa

Thao tác của Ví dụ 1 được lặp lại chỉ khác là sử dụng imiđazo-axetyl-exenđin-4 (CA-exenđin-4, Bachem, Mỹ) thay vì DA-exenđin-4 trong Ví dụ 1 để thu được thể tiếp hợp CA-exenđin-4 (Lys27) được peg hóa. Từ phân tích của profin tinh chế của các chất đồng phân vị trí, đã thấy rằng đỉnh cho CA-exenđin-4 được peg hóa Lys12 được rửa giải sớm, và sau đó đỉnh được peg hóa Lys27 được rửa giải trong phần cuối (Fig. 2).

Ví dụ 3: Thay đổi tỷ lệ thể tiếp hợp CA-exenđin-4 (Lys27) được peg hóa theo độ pH của môi trường phản ứng

Để nghiên cứu mức thay đổi tỷ lệ polypeptit được peg hóa ở vị trí đặc hiệu bởi độ pH, CA-exenđin-4 và 3,4K PropionALD(2) PEG được đưa vào peg hóa bằng cách cho peptit phản ứng với PEG ở 4°C trong 12 giờ ở tỷ lệ mol là 1:30, với nồng độ peptit là 3 mg/mL. Tại thời điểm này, 100 mM xitric axit (pH 3,0), 100 mM NaOAc (pH 4,5), 100 mM Na-P (pH 7,5), 100 mM Na-P (pH 8,5), 100

mM HEPES (pH 8,0), và 100 mM dung dịch đệm Na-Borat (pH 9,2) lần lượt được sử dụng làm môi trường phản ứng, và 20 mM $NaCNBH_3$ làm chất khử được bổ sung vào đó. Mỗi hỗn hợp phản ứng được tinh chế bằng phương pháp được mô tả trong Ví dụ 1, tiếp đó là phân tích tỷ lệ của thể tiếp hợp được peg hóa Lys27. Như được thể hiện trên Fig. 3, tỷ lệ của thể tiếp hợp được peg hóa Lys27 tăng lên dựa trên cơ sở mức tăng của độ pH, và độ pH tối ưu được xác nhận là nằm trong khoảng từ 7,0 đến 10,0.

Ví dụ 4: Thay đổi tỷ lệ thể tiếp hợp CA-exenđin-4 (Lys27) được peg hóa theo độ pH của môi trường phản ứng chứa etanol

Để nghiên cứu mức thay đổi tỷ lệ của polypeptit được peg hóa ở vị trí đặc hiệu bởi etanol và độ pH, CA-exenđin-4 và 3,4K PropionALD(2) PEG được đưa vào peg hóa bằng cách cho peptit phản ứng với PEG ở 4°C trong 12 giờ ở tỷ lệ mol là 1:30, với nồng độ peptit là 3 mg/mL. Tại thời điểm này, 100 mM xitric axit (pH 3,0)/45% etanol, 100 mM NaOAc (pH 4,5)/45% etanol, 100 mM Na-P (pH 7,5)/45% etanol, 100 mM HEPES (pH 8,0)/45% etanol, và dung dịch đệm 100 mM Na-P (pH 8,5)/etanol 45% lần lượt được sử dụng làm môi trường phản ứng, và 20 mM $NaCNBH_3$ làm chất khử được bổ sung vào đó. Mỗi hỗn hợp phản ứng được tinh chế bằng phương pháp được mô tả trong Ví dụ 1, tiếp đó là phân tích tỷ lệ của thể tiếp hợp được peg hóa Lys27. Như được thể hiện trên Fig. 4, tỷ lệ của thể tiếp hợp được peg hóa Lys27 tăng lên tính theo mức tăng của độ pH trong môi trường phản ứng chứa EtOH 45%, và độ pH tối ưu xác nhận là nằm trong khoảng từ 7,0 đến 9,0.

Ví dụ 5: Thay đổi tỷ lệ thể tiếp hợp CA-exenđin-4 (Lys27) được peg hóa theo nồng độ etanol trong môi trường phản ứng

Để nghiên cứu mức thay đổi tỷ lệ polypeptit được peg hóa ở vị trí đặc hiệu bởi nồng độ etanol trong môi trường phản ứng, CA-exenđin-4 và 3,4K PropionALD(2) PEG được đưa vào peg hóa bằng cách cho peptit phản ứng với PEG ở 4°C trong 12 giờ ở tỷ lệ mol là 1:30, với nồng độ peptit là 3 mg/mL. Tại thời điểm này, dung dịch đệm 100 mM HEPES (pH 7,5)/0% etanol, 100 mM HEPES (pH 7,5)/25% etanol, 100 mM HEPES (pH 7,5)/35% etanol, 100 mM HEPES (pH 7,5)/45% etanol, 100 mM HEPES (pH 7,5)/55% etanol, 100 mM HEPES (pH 7,5)/75% etanol và 100 mM HEPES (pH 7,5)/90% etanol lần lượt được sử dụng làm môi trường phản ứng, và 20 mM $NaCNBH_3$ làm chất khử được

bổ sung vào đó. Mỗi hỗn hợp phản ứng được tinh chế bằng phương pháp được mô tả trong Ví dụ 1, tiếp đó là phân tích tỷ lệ của thể tiếp hợp được peg hóa Lys27. Như được thể hiện trên Fig. 5, tỷ lệ của thể tiếp hợp được peg hóa Lys27 được tăng lên cho đến khi lượng etanol đạt khoảng 50%, trong khi đó làm giảm hơn 50% etanol, và lượng etanol tối ưu được xác nhận là nằm trong khoảng từ 35% đến 60%.

Ví dụ 6: Thay đổi tỷ lệ thể tiếp hợp CA-exenđin-4 (Lys27) được peg hóa theo nồng độ isopropanol trong môi trường phản ứng

Để nghiên cứu mức thay đổi tỷ lệ polypeptit được peg hóa ở vị trí đặc hiệu bằng cách sử dụng isopropanol thay vì etanol, trong môi trường phản ứng, CA-exenđin-4 và 3,4K PropionALD(2) PEG được đưa vào peg hóa bằng cách cho peptit phản ứng với PEG ở 4°C trong 12 giờ ở tỷ lệ mol là 1:30, với nồng độ peptit là 3 mg/mL. Tại thời điểm này, dung dịch đệm 100 mM HEPES (pH 7,5)/0% isopropanol, 100 mM HEPES (pH 7,5)/30% isopropanol, 100 mM HEPES (pH 7,5)/45% isopropanol, và 100 mM HEPES (pH 7,5)/60% isopropanol lần lượt được sử dụng làm môi trường phản ứng, và 20 mM $NaCNBH_3$ làm chất khử được bổ sung vào đó. Mỗi hỗn hợp phản ứng được tinh chế bằng phương pháp được mô tả trong Ví dụ 1, tiếp đó là phân tích tỷ lệ của thể tiếp hợp được peg hóa Lys27. Như được thể hiện trên Fig. 6, tỷ lệ của thể tiếp hợp được peg hóa Lys27 được tăng lên cho đến khi lượng etanol đạt khoảng 50%, trong khi đó làm giảm hơn 50% etanol, và lượng etanol tối ưu được xác nhận là nằm trong khoảng từ 35% đến 60%.

Ví dụ 7: Điều chế thể tiếp hợp của CA-exenđin-4 (Lys27)-PEG và Fc globulin miễn dịch

Thể tiếp hợp CA-exenđin-4 (Lys27)-PEG được liên hợp với mảnh Fc globulin miễn dịch (Hanmi Pharm. Co. Ltd., Hàn Quốc), bằng cách đưa vào phản ứng thể tiếp hợp và mảnh ở 4°C trong 16 giờ ở tỷ lệ mol của 1:8, với nồng độ peptit 20 mg/mL. Tại thời điểm này, dung dịch đệm 100 mM K-P (pH 6,0) được sử dụng làm môi trường phản ứng, và 20 mM NaCNBH3 làm chất khử được bổ sung vào đó. Sau phản ứng ngẫu hợp, việc tinh chế hai bước được thực hiện bằng cách sử dụng cột SOURCE phe và cột SOURCE Q, trong các điều kiện sau.

Cột: SOURCE Phe (XK 16mL, GE healthcare)

Tốc độ dòng: 2,0mL/phút
Dung dịch rửa giải: A (20 mM Tris, độ pH 7,5) và B (A+1,5M NaCl);
Građien A 0→40%, 80 phút
Cột: SOURCE Q (XK 16mL, GE healthcare)
Tốc độ dòng: 2,0mL/phút
Dung dịch rửa giải: A (20 mM Tris, độ pH 7,5) và B (A+1M NaCl);
Građien A 0→40%, 80 phút

Thể tiếp hợp được điều chế trên đây được phân tích bằng cách sử dụng SDS-PAGE. Như được thể hiện trên Fig. 7, quan sát được băng tần đơn 60K trong điều kiện không được khử, trong khi đó quan sát được hai băng tần 35K và 25K trong điều kiện được khử.

Ví dụ 8: Nhận biết vị trí được peg hóa của thể tiếp hợp CA-exenđin-4 (Lys27)-PEG

Để xác định vị trí gắn kết của PEG với CA-exenđin-4, thể tiếp hợp CA-exenđin-4 (Lys27)-PEG được cắt bằng enzym proteaza, lysin-C, và được phân tích bằng cách sử dụng sắc ký đảo.

Đặc biệt, các chất đồng phân CA-exenđin-4-PEG được phân tích bằng SDS-PAGE (Fig. 8), và sau đó thể tiếp hợp CA-exenđin-4-PEG đã được tinh chế và CA-exenđin-4 được hoà tan trong dung dịch đệm trietylamin-axit clohyđric (10mmol/L; pH 7,5), 10 uL enzym (0,1 mg/mL) được bổ sung vào đó, và được phản ứng ở 37°C trong 4 giờ. Sau khi phản ứng kết thúc, hỗn hợp phản ứng được phân tích bằng sắc ký đảo (HPLC (Agilent), Jupiter C18 (Phenomenex)). Kết quả phân tích được thể hiện trên các Fig. 9 và 10. Chất đồng phân CA-exenđin-4 được peg hóa Lys12 được xác nhận bằng sự biến mất đồng thời của #1 và #2 như được thể hiện trên Fig. 9, và chất đồng phân CA-exenđin-4 được peg hóa Lys27 được xác nhận bằng sự biến mất đồng thời của #2 và #3 như được thể hiện trên Fig. 10.

Ví dụ 9: Nhận biết hiệu suất peg hóa bằng nồng độ isopropanol khi peg hóa đầu tận cùng N

Để peg hóa metoxy polyetylen glycol 5K ALD (NOF Inc., Nhật Bản) với đầu tận cùng N của canxitonin salmon (Bachem, Mỹ), canxitonin salmon và PEG được peg hóa bằng cách cho peptit phản ứng với PEG ở 4°C trong 1 giờ ở tỷ lệ mol là 1:1, với nồng độ peptit là 1 mg/mL. Tại thời điểm này, dung dịch đệm 100

mM NaAc pH 5,2/0% isopropanol, 100 mM NaAc pH 5,2/45% isopropanol lần lượt được sử dụng làm môi trường phản ứng, và 20 mM $NaCNBH_3$ làm chất khử được bổ sung vào đó. Peptit được peg hóa một lần được tinh chế từ mỗi hỗn hợp phản ứng bằng cột SOURCE S (XK 16mL, GE healthcare, Hàn Quốc) trong điều kiện sau. Các kết quả được thể hiện trong Bảng 1 dưới đây.

Cột: SOURCE S
Tốc độ dòng: 2,5mL/phút
Dung dịch rửa giải: A (20 mM Axetat, độ pH 5,2) và B (A+1M NaCl);
Gradien A 0→40%, 60 phút

<Bảng 1>

Dung dịch đệm phản ứng	Hiệu suất của canxitonin-5K được peg hóa một lần (%)
0,1M NaAc pH 5,2	36
0,1M NaAc pH 5,2/45% IPA	51,3

Như được thể hiện trong bảng 1, hiệu suất của canxitonin được peg hóa được tăng lên bằng cách bổ sung iospropanol.

Ví dụ 10: Đo hoạt tính *in-vitro* của exenđin-4 bằng cách peg hóa và vị trí được peg hóa

Để đo hiệu quả của chế phẩm có tác dụng lâu dài chứa exenđin-4 bằng cách peg hóa và vị trí peg hóa, sử dụng phương pháp đo hoạt tính *in-vitro*. Đo hoạt tính *in-vitro* của GLP-1 là phương pháp đo trong đó cAMP trong tế bào tăng lên sau khi xử lý GLP-1 ở các dòng tế bào CHO mà thụ thể GLP-1 được tách dòng vô tính.

Đặc biệt, CHO/GLP-1R, dòng tế bào trong đó GLP-1 được tách dòng vô tính, được xử lý bằng GLP-1, exenđin-4 và các nguyên liệu thử nghiệm được mô tả trong Bảng 1 ở các nồng độ khác nhau. Đo sự xuất hiện của cAMP, và do đó các giá trị EC50 được so sánh với nhau. Mẫu đối chứng là Byetta (Eli Lilly) có bán trên thị trường được sử dụng. Hoạt tính *in-vitro* (%) theo xử lý các nguyên liệu thử nghiệm được thể hiện trong Bảng 2.

<Bảng 2>

Nguyên liệu thử nghiệm	Hoạt tính *in-vitro* (%)
Byetta	100
CA-exenđin-4	77
CA-exenđin-4-PEG (Lys12)	2,1
CA-exenđin-4-PEG (Lys27)	8,5

Như được thể hiện trong Bảng 2, hoạt tính sinh lý học của peptit bị tác động tương đối ít khi PEG được cải biến ở Lys27 so với Lys12.

Ví dụ 11: Điều chế và tinh chế thể tiếp hợp oxyntomođulin (Lys30) được peg hóa

<11-1> Điều chế thể tiếp hợp oxyntomođulin được peg hóa (Lys30)

Để điều chế thể tiếp hợp oxyntomođulin được peg hóa, 3,4K PropionALD(2) PEG và oxyntomođulin (Anygen, Hàn Quốc) được đưa vào peg hóa bằng cách cho peptit phản ứng với PEG ở 4°C trong 4,5 giờ ở tỷ lệ mol là 1:15, với nồng độ peptit là 3 mg/mL. Tại thời điểm này, dung dịch đệm 100 mM Na-Borat (pH 9,0) chứa 45% isopropanol được sử dụng làm môi trường phản ứng, và 20 mM $NaCNBH_3$ làm chất khử được bổ sung vào đó.

<11-2> Tách chất đồng phân vị trí

Các chất đồng phân vị trí được peg hóa Lys30 được tinh chế từ hỗn hợp phản ứng bằng cách sử dụng cột SOURCE 15S (XK 16mL, Amersham Bioscience). Theo quy trình này, etanol được sử dụng trong dung dịch tinh chế để tạo điều kiện thuận lợi việc tách các chất đồng phân (Fig. 11).

Cột: SOURCE S

Tốc độ dòng: 2,0mL/phút

Dung dịch rửa giải: A (20 mM Na-xitrat, độ pH 3,0 + 45% etanol) và B (A+1M KCl); Građien A 0→3%, 1 phút, Građien B 0→40%, 222 phút

Ví dụ 12: Điều chế và tinh chế thể tiếp hợp imiđazo-axetyl oxyntomođulin (Lys30) được peg hóa

Thao tác của Ví dụ 11 được lặp lại chỉ khác là sử dụng imiđazo-axetyl-

oxyntomođulin (Anygen, Hàn Quốc) thay vì oxyntomođulin và sử dụng dung dịch đệm 100 mM HEPES (pH 7,5) chứa 45% isoparopanol trong Ví dụ 11 để thu được thể tiếp hợp imiđazo-axetyl oxyntomođulin (Lys30) được peg hóa.

Các chất đồng phân được tinh chế bằng cách sử dụng cột SOURCE Q được thể hiện trên Fig. 12, và lập bản đồ peptit bằng cách sử dụng Asp-N proteaza được thể hiện trên Fig. 13. Như được thể hiện Fig. 13, một phần #4:Asp(22)-(37) đã biến mất bởi PEG-cải biến ở Lys30.

Ví dụ 13: Điều chế thể tiếp hợp của imiđazo-axetyl oxyntomođulin (Lys30)-PEG và Fc globulin miễn dịch

Thể tiếp hợp imiđazo-axetyl oxyntomođulin-PEG (Lys30) và Fc globulin miễn dịch (Hanmi Pharm. Co. Ltd., Hàn Quốc) được cho phản ứng ở 4°C trong 16 giờ ở tỷ lệ mol là 1:10, với nồng độ protein tổng là 20 mg/mL. Tại thời điểm này, 100 mM kali phosphat (pH 6,0) được sử dụng làm môi trường phản ứng, và 20 mM $NaCNBH_3$ làm chất khử được bổ sung vào đó. Sau khi phản ứng kết thúc, hỗn hợp phản ứng được tinh chế bằng cách sử dụng SOURCE 15Q cột, trong điều kiện sau.

Cột: SOURCE Q
Tốc độ dòng: 2,0mL/phút
Dung dịch rửa giải: A (20 mM Tris-HCl, độ pH 7,5) và B (A+1M NaCl);
Građien A 0→20%, 100 phút

Sắc phổ thu được bằng cách liên kết CA-oxyntomođulin được peg hóa Lys30 với Fc globulin miễn dịch và tinh chế thể tiếp hợp bằng cách sử dụng SOURCE Q được thể hiện trên Fig. 14, và các kết quả SDS-PAGE của thể tiếp hợp của CA-oxyntomođulin (Lys30)-PEG và Fc globulin miễn dịch được thể hiện trong Fig. 15. Như được thể hiện trên Fig. 15, quan sát được băng tần đơn 60K trong điều kiện không được khử, và quan sát được hai băng tần 35K và 25K trong điều kiện được khử.

Ví dụ 14: Điều chế và tinh chế thể tiếp hợp chất tương tự oxyntomođulin được peg hóa (Lys27)

<14-1> Điều chế thể tiếp hợp chất tương tự oxyntomođulin được peg hóa (Lys27)

Để peg hóa 3,4K PropionALD(2) PEG thành lysin của chất tương tự oxnytomođulin ([20Asp, 24Ala, 28Ser]-oxyntomođulin-[Khuyết đoạn 30-37]), PEG và chất tương tự oxyntomođulin (Anygen, Hàn Quốc) được cho phản ứng ở 4°C trong 3,5 giờ ở tỷ lệ mol là 1:15, với nồng độ peptit là 3 mg/mL. Tại thời điểm này, 100 mM dung dịch đệm Na-Borat (pH 9,0) chứa 45% isopropanol được sử dụng làm môi trường phản ứng, và 20 mM $NaCNBH_3$ làm chất khử được bổ sung vào đó.

<14-2> Tách chất đồng phân vị trí

Các chất đồng phân vị trí được peg hóa Lys27 được tinh chế từ hỗn hợp phản ứng bằng cách sử dụng cột SOURCE 15S (XK 16mL, Amersham Bioscience). Các điều kiện tinh chế và tách giống với các điều kiện được mô tả trong Ví dụ 11. Theo quy trình này, etanol được sử dụng trong dung dịch tinh chế để tạo điều kiện thuận lợi việc tách các chất đồng phân (Fig. 16). Việc chọn lọc lysin của các chất tương tự oxyntomođulin được peg hóa một lần được tinh chế được xác nhận bằng phương pháp lập bản đồ peptit bằng cách sử dụng Lys-C proteaza (Fig. 17). Như được thể hiện trên Fig. 17, phần #2 đã biến mất nhờ cải biến PEG ở Lys27.

Ví dụ 15: Điều chế và tinh chế thể tiếp hợp của chất tương tự imiđazo-axetyl oxyntomođulin được peg hóa (Lys27)

<15-1> Điều chế thể tiếp hợp của chất tương tự imiđazo-axetyl oxyntomođulin được peg hóa (Lys27)

Để peg hóa 3,4K PropionALD(2) PEG thành Lys27 của chất tương tự imiđazo-axetyl oxyntomođulin ([20Asp, 24Ala, 28Ser])-oxyntomođulin-[Khuyết đoạn 30-37]), chất tương tự imiđazo-axetyl oxyntomođulin (Anygen, Hàn Quốc) và PEG được cho phản ứng ở 4°C trong 2,5 giờ ở tỷ lệ mol là 1:10, với nồng độ protein tổng là 3 mg/mL. Tại thời điểm này, 100 mM HEPES (pH 7,5) chứa 45% isopropanol được sử dụng làm môi trường phản ứng, và 20 mM $NaCNBH_3$ làm chất khử được bổ sung vào đó.

<15-2> Tách chất đồng phân vị trí

Các chất đồng phân vị trí được peg hóa Lys27 được tinh chế từ hỗn hợp phản ứng bằng cách sử dụng cột SOURCE 15S (XK 16mL, Amersham Bioscience). Các điều kiện tinh chế và tách giống với các điều kiện được mô tả

trong Ví dụ 11. Theo quy trình này, etanol được sử dụng trong dung dịch tinh chế để tạo điều kiện thuận lợi việc tách các chất đồng phân (Fig. 18). Độ chọn lọc lysin của các chất tương tự oxyntomođulin được tinh chế được peg hóa một lần được xác nhận bằng phương pháp lập bản đồ peptit bằng cách sử dụng Lys-C proteaza (Fig. 19). Như được thể hiện trên Fig. 19, phần #2 đã biến mất nhờ cải biến PEG ở Lys27.

Ví dụ 16: Điều chế và tinh chế thể tiếp hợp của chất tương tự imiđazo-axetyl oxyntomođulin (Lys27) được peg hóa và Fc globulin miễn dịch

PEG tương tự imiđazo-axetyl oxyntomođulin được peg hóa Lys27 được điều chế trong Ví dụ 15 và Fc globulin miễn dịch được cho phản ứng ở 4°C trong 16 giờ ở tỷ lệ mol là 1:10, với nồng độ peptit 20 mg/mL. Tại thời điểm này, 100 mM kali phosphat (pH 6,0) làm môi trường phản ứng, và 20 mM $NaCNBH_3$ làm chất khử được bổ sung vào đó. Sau khi phản ứng kết thúc, hỗn hợp phản ứng được tinh chế bằng cách sử dụng cột SOURCE 15Q, trong điều kiện sau.

Cột: SOURCE Q
Tốc độ dòng: 2,0mL/phút
Dung dịch rửa giải: A (20 mM Tris-HCl, độ pH 7,5) và B (A+1M NaCl);
Građien A 0→20%, 100 phút

Sắc phổ thu được bằng cách liên kết chất tương tự CA-oxyntomođulin được peg hóa Lys27 với Fc globulin miễn dịch và tinh chế thể tiếp hợp bằng cách sử dụng SOURCE Q được thể hiện trên Fig. 20, và các kết quả SDS-PAGE của thể tiếp hợp của chất tương tự CA-oxyntomođulin (Lys27)-PEG và Fc globulin miễn dịch được thể hiện trong Fig. 21. Như được thể hiện trên Fig. 21, băng tần đơn 60K quan sát được trong điều kiện không được khử, và hai băng tần 35K và 25K quan sát được trong điều kiện được khử.

Ví dụ 17: Điều chế và tinh chế thể tiếp hợp GLP-1 (Lys34) được peg hóa

<17-1> Điều chế thể tiếp hợp GLP-1 (Lys34) được peg hóa

Để peg hóa 3,4K PropionALD(2) PEG thành gốc lysin của GLP-1, GLP-1 và PEG được cho phản ứng ở 4°C trong 3,5 giờ ở tỷ lệ mol là 1:15, với nồng độ protein tổng là 3 mg/mL. Tại thời điểm này, 100 mM Na-Borat (pH 9,0) chứa

45% isopropanol được sử dụng làm môi trường phản ứng, và 20 mM $NaCNBH_3$ làm chất khử được bổ sung vào đó.

<17-2> Tách chất đồng phân vị trí

Các chất đồng phân vị trí được peg hóa Lys34 được tinh chế từ hỗn hợp phản ứng bằng cách sử dụng cột SOURCE 15S (XK 16mL, Amersham Bioscience). Theo quy trình này, etanol được sử dụng trong dung dịch tinh chế để tạo điều kiện thuận lợi việc tách các chất đồng phân (Fig. 22). Độ chọn lọc lysin của các chất tương tự oxyntomođulin được peg hóa một lần được tinh chế được xác nhận bằng phương pháp lập bản đồ peptit bằng cách sử dụng Lys-C proteaza (Fig. 23).

Cột: SOURCE S
Tốc độ dòng: 2,0mL/phút
Dung dịch rửa giải: A (20 mM Na-xitrat, độ pH 3,0 + 45% etanol) và B (A+1M KCl); Građien A 0→3%, 1 phút, Građien B 3→40%, 150 phút.

Như được thể hiện trên Fig. 23, phần #2 đã biến mất nhờ cải biến PEG ở Lys34.

Ví dụ 18: Điều chế và tinh chế được peg hóa imiđazo-axetyl GLP-1 (Lys34) thể tiếp hợp

<18-1> Điều chế được peg hóa imiđazo-axetyl GLP-1 (Lys34) thể tiếp hợp

Để peg hóa 3,4K PropionALD(2) PEG thành gốc lysin của imiđazo-axetyl GLP-1, imiđazo-axetyl GLP-1 và PEG được cho phản ứng ở 4°C trong 4 giờ ở tỷ lệ mol là 1:10, với nồng độ protein tổng là 3 mg/mL. Tại thời điểm này, 100 mM HEPES (pH 7,5) chứa 45% isopropanol được sử dụng làm môi trường phản ứng, và 20 mM $NaCNBH_3$ làm chất khử được bổ sung vào đó.

<18-2> Tách chất đồng phân vị trí

Các chất đồng phân vị trí được peg hóa Lys34 được tinh chế từ hỗn hợp phản ứng bằng cách sử dụng cột SOURCE 15S (XK 16mL, Amersham Bioscience). Theo quy trình này, etanol được sử dụng trong dung dịch tinh chế để tạo điều kiện thuận lợi việc tách các chất đồng phân (Fig. 24). Độ chọn lọc lysin của các chất tương tự oxyntomođulin được peg hóa một lần được tinh chế được

xác nhận bằng phương pháp lập bản đồ peptit bằng cách sử dụng Glu-C proteaza (Fig. 25).

Cột: SOURCE S
Tốc độ dòng: 2,0mL/phút
Dung dịch rửa giải: A (20 mM Na-xitrat, độ pH 3,0 + 45% etanol) và B (A+1M KCl); Građien A 0→3%, 1 phút, Građien B 3→40%, 150 phút.

Như được thể hiện trên Fig. 25, phần #4 đã biến mất nhờ cải biến PEG ở Lys34.

Ví dụ 19: Điều chế và tinh chế thể tiếp hợp của imiđazo-axetyl GLP-1 được peg hóa (Lys34) và Fc globulin miễn dịch

Imiđazo-axetyl GLP-1-PEG được peg hóa Lys34 được điều chế trong Ví dụ 18 và Fc globulin miễn dịch được cho phản ứng ở 4°C trong 17 giờ ở tỷ lệ mol của 1:8, với nồng độ peptit 50 mg/mL. Tại thời điểm này, 100 mM kali phosphat (pH 6,0) làm môi trường phản ứng, và 20 mM $NaCNBH_3$ làm chất khử được bổ sung vào đó. Sau khi phản ứng kết thúc, hỗn hợp phản ứng được tinh chế bằng cách sử dụng cột SOURCE Phe, trong điều kiện sau.

Cột: SOURCE Phe
Tốc độ dòng: 2,0mL/phút
Dung dịch rửa giải: A (20 mM Tris-HCl, độ pH 7,5) và B (A+2M NaCl); Građien A 100→0%, 100 phút.

Sắc phổ thu được bằng cách liên kết chất đồng phân CA-GLP-1 được peg hóa Lys34 với Fc globulin miễn dịch và tinh chế thể tiếp hợp bằng cách sử dụng SOURCE Phe được thể hiện trên Fig. 26, và các kết quả SDS-PAGE của thể tiếp hợp của CA-GLP-1 (Lys34)-PEG và Fc globulin miễn dịch được thể hiện trong Fig. 27. Như được thể hiện trên Fig. 27, băng tần đơn 60K quan sát được trong điều kiện không được khử, và hai băng tần 35K và 25K quan sát được trong điều kiện được khử.

Ví dụ 20: Điều chế và tinh chế thể tiếp hợp GLP-2 được peg hóa (Lys30)

<20-1> Điều chế thể tiếp hợp GLP-2 được peg hóa (Lys30)

Để peg hóa 3,4K PropionALD(2) PEG thành gốc lysin của GLP-2 (Anygen, Hàn Quốc), GLP-2 và PEG được cho phản ứng ở 4°C trong 3 giờ ở tỷ lệ mol là 1:12, với nồng độ protein tổng là 5 mg/mL. Tại thời điểm này, 100 mM Na-Borat (pH 9,0) chứa 45% isopropanol được sử dụng làm môi trường phản ứng, và 20 mM $NaCNBH_3$ làm chất khử được bổ sung vào đó.

<20-2> Tách chất đồng phân vị trí

Các chất đồng phân vị trí được peg hóa Lys30 được tinh chế từ hỗn hợp phản ứng bằng cách sử dụng cột SOURCE 15S (XK 16mL, Amersham Bioscience). Theo quy trình này, etanol được sử dụng trong dung dịch tinh chế để tạo điều kiện thuận lợi việc tách các chất đồng phân (Fig. 28). Độ chọn lọc lysin được xác nhận bằng phương pháp lập bản đồ peptit bằng cách sử dụng trypsin proteaza (Fig. 29).

Cột: SOURCE S
Tốc độ dòng: 2,0mL/phút
Dung dịch rửa giải: A (20 mM Na-xitrat, độ pH 3,0 + 45% etanol) và B (A+1M KCl); Građien A 0→3%, 1 phút, Građien B 3→40%, 150 phút.

Như được thể hiện trên Fig. 29, phần #2 đã biến mất nhờ cải biến PEG ở Lys30.

Ví dụ 21: Điều chế và tinh chế thể tiếp hợp imiđazo-axetyl GLP-2 (Lys30) được peg hóa

<21-1> Điều chế thể tiếp hợp imiđazo-axetyl GLP-2 (Lys30) được peg hóa

Để peg hóa 3,4K PropionALD(2) PEG thành gốc lysin 30 của imiđazo-axetyl GLP-2 (Anygen, Hàn Quốc), imiđazo-axetyl GLP-2 và PEG được cho phản ứng ở 4°C trong 6 giờ ở tỷ lệ mol của 1:20, với nồng độ protein tổng là 3 mg/mL. Tại thời điểm này, 100 mM HEPES (pH 7,5) chứa 45% isopropanol được sử dụng làm môi trường phản ứng, và 20 mM $NaCNBH_3$ làm chất khử được bổ sung vào đó.

<21-2> Tách chất đồng phân vị trí

Các chất đồng phân vị trí được peg hóa Lys30 được tinh chế từ hỗn hợp phản ứng bằng cách sử dụng cột SOURCE 15S (XK 16mL, Amersham

Bioscience). Theo quy trình này, etanol được sử dụng trong dung dịch tinh chế để tạo điều kiện thuận lợi việc tách các chất đồng phân (Fig. 30).

Cột: SOURCE S
Tốc độ dòng: 2,0mL/phút
Dung dịch rửa giải: A (20 mM Na-xitrat, độ pH 3,0 + 45% etanol) và B (A+1M KCl); Građien A 0→3%, 1 phút, Građien B 3→40%, 150 phút

Ví dụ 22: Điều chế và tinh chế thể tiếp hợp của imiđazo-axetyl GLP-2 (Lys30) được peg hóa và Fc globulin miễn dịch

Imiđazo-axetyl GLP-2-PEG được peg hóa Lys30 được điều chế trong Ví dụ 21 và Fc globulin miễn dịch được cho phản ứng ở 4°C trong 16 giờ ở tỷ lệ mol là 1:15, với nồng độ peptit 20 mg/mL. Tại thời điểm này, 100 mM kali phosphat (pH 6,0) làm môi trường phản ứng, và 20 mM $NaCNBH_3$ làm chất khử được bổ sung vào đó. Sau khi phản ứng kết thúc, hỗn hợp phản ứng được tinh chế bằng cách sử dụng cột SOURCE Phe, trong điều kiện sau.

Cột: SOURCE Phe
Tốc độ dòng: 2,0mL/phút
Dung dịch rửa giải: A (20 mM Tris-HCl, độ pH 7,5) và B (A+2M NaCl); Građien A 100→0%, 100 phút.

Sắc phổ thu được bằng cách liên kết chất đồng phân CA-GLP-2 được peg hóa Lys30 với Fc globulin miễn dịch và tinh chế thể tiếp hợp bằng cách sử dụng SOURCE Phe được thể hiện trên Fig. 31, và các kết quả SDS-PAGE của thể tiếp hợp của CA-GLP-2 (Lys30)-PEG và Fc globulin miễn dịch được thể hiện trong Fig. 32. Như được thể hiện trên Fig. 32, băng tần đơn 60K quan sát được trong điều kiện không được khử, và hai băng tần 35K và 25K quan sát được trong điều kiện được khử.

Ví dụ 23: Điều chế và tinh chế thể tiếp hợp insulin của người được peg hóa (B1Phe)

<23-1> Điều chế thể tiếp hợp insulin của người được peg hóa (B1Phe)

Để peg hóa 5K PropionALD(1) metoxyPEG (PEG có một nhóm propionalđehyt, NOF., Nhật Bản) thành đầu tận cùng N của phenylalanin là axit

amin thứ nhất của chuỗi B trong insulin của người (Sigma), PEG và insulin của người được cho phản ứng ở 4°C trong 12 giờ ở tỷ lệ mol là 1:2, với nồng độ peptit 2,3 mg/mL. Tại thời điểm này, 100 mM dung dịch đệm kali phophat (pH 6,0) được sử dụng làm môi trường phản ứng, và 20 mM $NaCNBH_3$ làm chất khử được bổ sung vào đó.

<23-2> Tách chất đồng phân vị trí

Các chất đồng phân vị trí được tinh chế từ hỗn hợp phản ứng bằng cách sử dụng cột SOURCE 15S (XK 16mL, Amersham Bioscience). Theo quy trình này, etanol được sử dụng trong dung dịch tinh chế để tạo điều kiện thuận lợi việc tách các chất đồng phân (Fig. 33). Peg hóa một lần các đỉnh đã được rửa giải được xác nhận bằng phân tích SDS-PAGE, và độ chọn lọc lysin được xác nhận bằng phương pháp lập bản đồ peptit bằng cách sử dụng Glu-C proteaza (Fig. 36).

Cột: SOURCE S
Tốc độ dòng: 2,0mL/phút
Dung dịch rửa giải: A (20 mM Na-xitrat, độ pH 2,0 + 60% etanol) và B (A+0,5M KCl); Građien A 0→3%, 1 phút, Građien B 0→50%, 80 phút.

Như được thể hiện trên Fig. 36, phần #2 đã biến mất nhờ cải biến PEG ở B1F.

Ví dụ 24: Điều chế và tinh chế thể tiếp hợp insulin của người (A1Gly) được peg hóa

<24-1> Điều chế thể tiếp hợp insulin của người (A1Gly) được peg hóa

Để peg hóa 5K metoxyPEG-Sucxinimiđyl Butanoat(1) (PEG có một nhóm phản ứng SBA, NOF., Nhật Bản) thành đầu tận cùng N của glyxin là axit amin thứ nhất của chuỗi A trong insulin của người (Sigma), PEG và insulin của người được cho phản ứng ở 25°C trong 3 giờ ở tỷ lệ mol là 1:4, với nồng độ peptit 2 mg/mL. Tại thời điểm này, 100 mM dung dịch đệm Na-Borat (pH 9,0) chứa 35% isopropanol được sử dụng làm môi trường phản ứng.

<24-2> Tách chất đồng phân vị trí

Các chất đồng phân vị trí được tinh chế từ hỗn hợp phản ứng bằng cách sử dụng cột SOURCE 15S (XK 16mL, Amersham Bioscience). Quy trình tinh chế

giống với quy trình được mô tả trong Ví dụ 23. Theo quy trình này, etanol được sử dụng trong dung dịch tinh chế để tạo điều kiện thuận lợi việc tách các chất đồng phân (Fig. 34). Peg hóa một lần các đỉnh đã được rửa giải được xác nhận bằng phân tích SDS-PAGE, và độ chọn lọc lysin được xác nhận bằng phương pháp lập bản đồ peptit bằng cách sử dụng Glu-C proteaza (Fig. 36).

Như được thể hiện trên Fig. 36, phần #1 đã biến mất nhờ cải biến PEG ở A1G.

Ví dụ 25: Điều chế và tinh chế thể tiếp hợp insulin của người (B29Lys) được peg hóa

<25-1> Điều chế thể tiếp hợp insulin của người (B29Lys) được peg hóa

Để peg hóa 5K metoxyPEG-Sucxinimiđyl Butanoat(1) thành gốc lysin là axit amin thứ 29 của chuỗi B trong insulin của người (Sigma), PEG và insulin của người được cho phản ứng ở 25°C trong 1 giờ ở tỷ lệ mol là 1:2, với nồng độ peptit 2 mg/mL. Tại thời điểm này, 100 mM dung dịch đệm Na-Borat (pH 9,0) chứa 45% isopropanol được sử dụng làm môi trường phản ứng.

<25-2> Tách chất đồng phân vị trí

Các chất đồng phân vị trí được tinh chế từ hỗn hợp phản ứng bằng cách sử dụng cột SOURCE 15S (XK 16mL, Amersham Bioscience). Quy trình tinh chế giống với quy trình được mô tả trong Ví dụ 23. Theo quy trình này, etanol được sử dụng trong dung dịch tinh chế để tạo điều kiện thuận lợi việc tách các chất đồng phân (Fig. 35). Peg hóa một lần các đỉnh đã được rửa giải được xác nhận bằng phân tích SDS-PAGE, và độ chọn lọc lysin được xác nhận bằng phương pháp lập bản đồ peptit bằng cách sử dụng Glu-C proteaza (Fig. 36).

Như được thể hiện trên Fig. 36, phần #4 đã biến mất nhờ cải biến PEG ở B29K.

Mặc dù sáng chế được mô tả bằng các phương án đặc biệt trên đây, cần phải hiểu rằng các cải biến và các thay đổi khác nhau có thể được thực hiện bởi các người có hiểu biết trong lĩnh vực cũng nằm trong phạm vi của sáng chế như được xác định bởi các yêu cầu bảo hộ kèm theo.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp điều chế thể tiếp hợp polypeptit có hoạt tính sinh lý học đặc hiệu vị trí, bao gồm các bước:

i) xác định loại và lượng rượu và khoảng pH tại đó tồn tại các chất đồng phân vị trí mong muốn hơn so với các chất đồng phân vị trí không mong muốn bằng cách xác định tỷ lệ của các chất đồng phân vị trí mong muốn và không mong muốn của thể tiếp hợp của polypeptit có hoạt tính sinh lý học và polyme không peptiđyl, phụ thuộc vào sự thay đổi của loại và lượng rượu và độ pH trong môi trường phản ứng;

ii) cho polypeptit có hoạt tính sinh lý học phản ứng với polyme không peptiđyl trong môi trường phản ứng có loại và lượng rượu và khoảng pH như được xác định trong bước (i); và

iii) tách và tinh chế thể tiếp hợp polypeptit có hoạt tính sinh lý học ra khỏi hỗn hợp phản ứng của bước (i) bằng sắc ký trao đổi ion có sử dụng rượu.

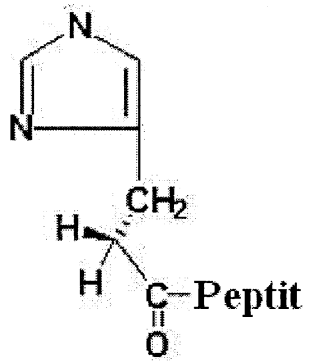
2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó polypeptit có hoạt tính sinh lý học được chọn từ nhóm bao gồm peptit hướng insulin, yếu tố máu, hormon tiêu hóa, hormon hướng vỏ thượng thận, hormon tuyến giáp, hormon ruột, xytokin, enzym, yếu tố sinh trưởng, peptit thần kinh, hormon hypophyseotropic, hormon kích thích tuyến yên, peptit chống béo phì, peptit kháng virut và dẫn xuất peptit không tự nhiên có hoạt tính sinh lý học.

3. Phương pháp theo điểm 1, trong đó polypeptit có hoạt tính sinh lý học được chọn từ nhóm bao gồm erythropoietin, GM-CSF (yếu tố kích thích quần thể bạch cầu hạt-đại thực bào), amylin, glucagon, insulin, somatostatin, PYY (peptit YY), NPY (peptit thần kinh Y), GLP-1, GLP-2, exenđin-4, oxyntomođulin, ghrelin, angiotensin, brađykinin, canxitonin, corticotropin, eledoisin, gastrin, leptin, oxytoxin, vasopressin, LH (hormon lutein hóa), prolactin, FSH (hormon kích thích nang trứng), PTH (hormon tuyến cận giáp), secretin, sermorelin, hGH (hormon tăng trưởng của người), peptit giải phóng hormon sinh trưởng, G-CSF (yếu tố kích thích quần thể bạch cầu hạt), interferon, interleukin, peptit giải phóng prolactin, orexin, peptit giải phóng tuyến giáp, cholecystokinin, peptit ức chế gaxtrin, calmodulin, peptit giải phóng gaxtrin, motilin, peptit ruột vận mạch, ANP (peptit lợi niệu natri tâm nhĩ), BNP (peptit lợi niệu barin), CNP (peptit lợi niệu

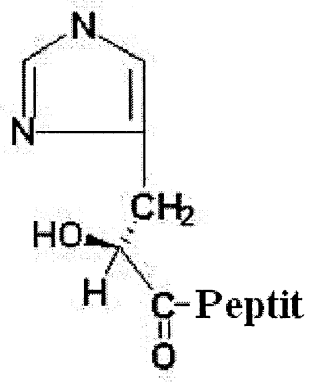
natri typ C), neurokinin A, neuromedin, renin, endothelin, peptit sarafotoxin, peptit carsomorphin, dermorphin, dynorphin, endorphin, enkepalin, yếu tố tế bào T, yếu tố gây hoại tử khối u, thụ thể yếu tố gây hoại tử khối u, thụ thể urokinaza, yếu tố ức chế khối u, chất ức chế colagenaza, thymopoietin, thymulin, thymopentin, tymosin, yếu tố thể dịch tuyến ức, ađrenomođulin, allatostatin, mảnh beta-protein amyloit, peptit diệt khuẩn, peptit chống oxy hoá, bombesin, osteocalcin, CART peptit, E-selectin, ICAM-1, VCAM-1, leucokin, kringle-5, laminin, inhibin, galanin, fibronectin, pancreastatin và fuzeon.

4. Phương pháp theo điểm 1, trong đó polypeptit có hoạt tính sinh lý học là exenđin, insulin, GLP-1, GLP-2, oxyntomođulin, ghrelin, canxitonin hoặc một trong số các dẫn xuất của chúng.

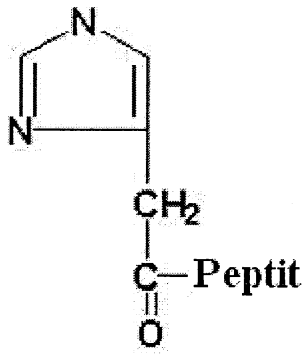
5. Phương pháp theo điểm 4, trong đó dẫn xuất là exenđin, oxyntomođulin, dẫn xuất GLP-1 hoặc GLP-2 có cấu trúc bất kỳ được chọn từ các công thức từ (I) đến (IV):



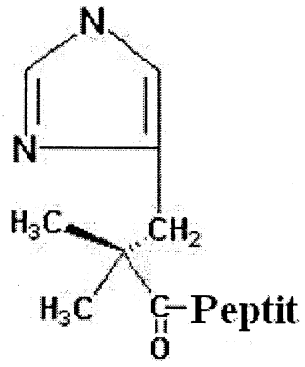
Công thức I



Công thức II



Công thức III



Công thức IV

6. Phương pháp theo điểm 1, trong đó polyme không peptiđyl được chọn từ nhóm bao gồm polyetylen glycol, polypropylen glycol, copolyme của etylen glycol và propylen glycol, polyol được polyoxyetyl hóa, rượu polyvinylic, polysaccarit, đextran, polyvinyl etyl ete, PLA (poly(axit lactic)), PLGA (axit polylactic-glycolic), polyme lipit, kitin, axit hyaluronic, và tổ hợp của chúng.

7. Phương pháp theo điểm 1, trong đó rượu được sử dụng trong bước (i) và (ii) là rượu bậc một, bậc hai, hoặc bậc ba có số nguyên tử cacbon nằm trong khoảng từ một đến mười.

8. Phương pháp theo điểm 7, trong đó rượu là etanol hoặc isopropanol.

9. Phương pháp theo điểm 1, trong đó rượu có mặt trong môi trường phản ứng với lượng nằm trong khoảng từ 35% đến 60% thể tích tính theo tổng thể tích môi trường phản ứng.

10. Phương pháp theo điểm 1, trong đó độ pH đã sử dụng ở bước (i) nằm trong khoảng từ 7,0 đến 10,0, khi polypeptit có hoạt tính sinh lý học là exenđin hoặc dẫn xuất của chúng.

11. Phương pháp theo điểm 1, trong đó độ pH đã sử dụng ở bước (i) nằm trong khoảng từ 7,0 đến 10,0, khi polypeptit có hoạt tính sinh lý học là oxyntomođulin hoặc dẫn xuất của chúng.

12. Phương pháp theo điểm 1, trong đó độ pH đã sử dụng ở bước (i) nằm trong khoảng từ 4,0 đến 10,0, khi polypeptit có hoạt tính sinh lý học là insulin của người hoặc dẫn xuất của chúng.

13. Phương pháp theo điểm 1, trong đó độ pH đã sử dụng ở bước (i) nằm trong khoảng từ 7,0 đến 10,0, khi polypeptit có hoạt tính sinh lý học là GLP-1 hoặc dẫn xuất của chúng.

14. Phương pháp theo điểm 1, trong đó độ pH đã sử dụng ở bước (i) nằm trong khoảng từ 7,0 đến 10,0, khi polypeptit có hoạt tính sinh lý học là GLP-2 hoặc dẫn xuất của chúng.

15. Phương pháp theo điểm 1, trong đó thể tiếp hợp polypeptit có hoạt tính sinh lý học đặc hiệu vị trí là thể tiếp hợp exenđin-4 trong đó PEG được liên kết với Lys27, thể tiếp hợp canxitonin trong đó PEG được liên kết với đầu tận cùng N, thể tiếp hợp oxyntomođulin trong đó PEG được liên kết với Lys27 hoặc Lys30, thể tiếp hợp insulin của người trong đó PEG được liên kết với đầu tận cùng N của Gly1 trong mạch A hoặc được liên kết với Lys29 trong mạch B, thể tiếp hợp GLP-1 hoặc GLP-2 trong đó PEG được liên kết với Lys34 hoặc Lys30, hoặc các chất tương tự của chúng.

1/33

FIG. 1

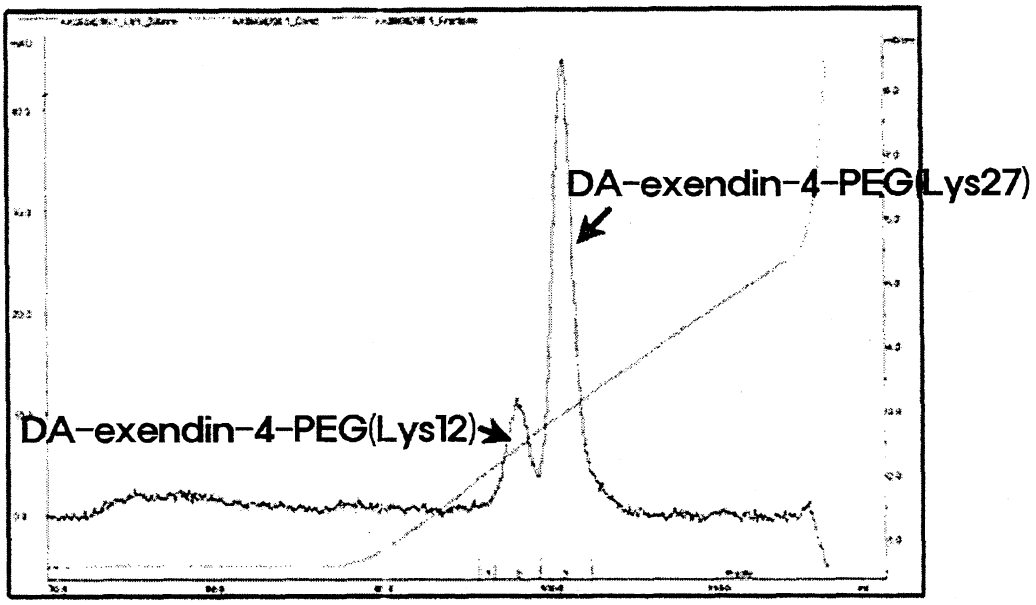
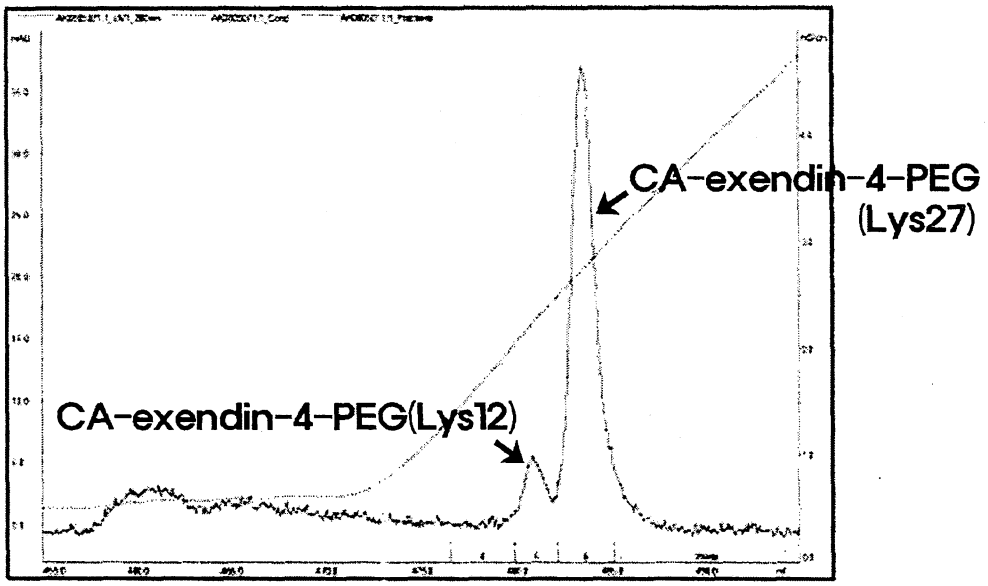


FIG. 2



2/33

FIG. 3

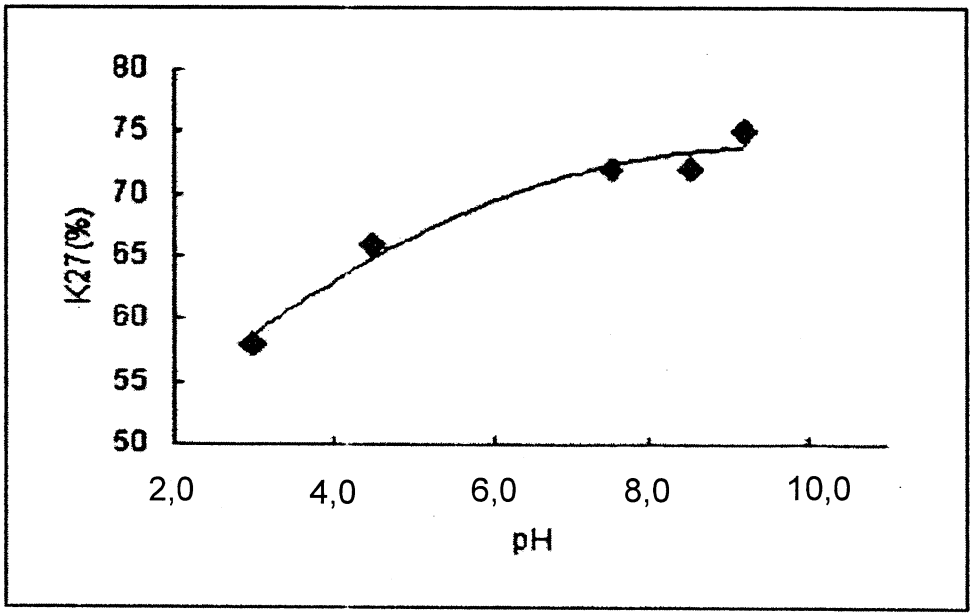


FIG. 4

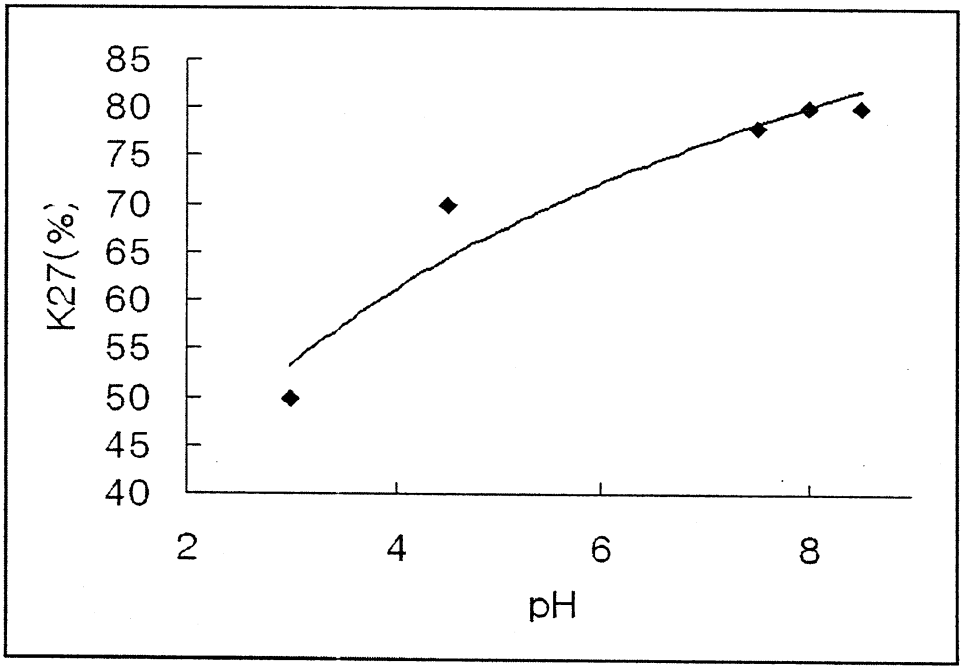


FIG. 5

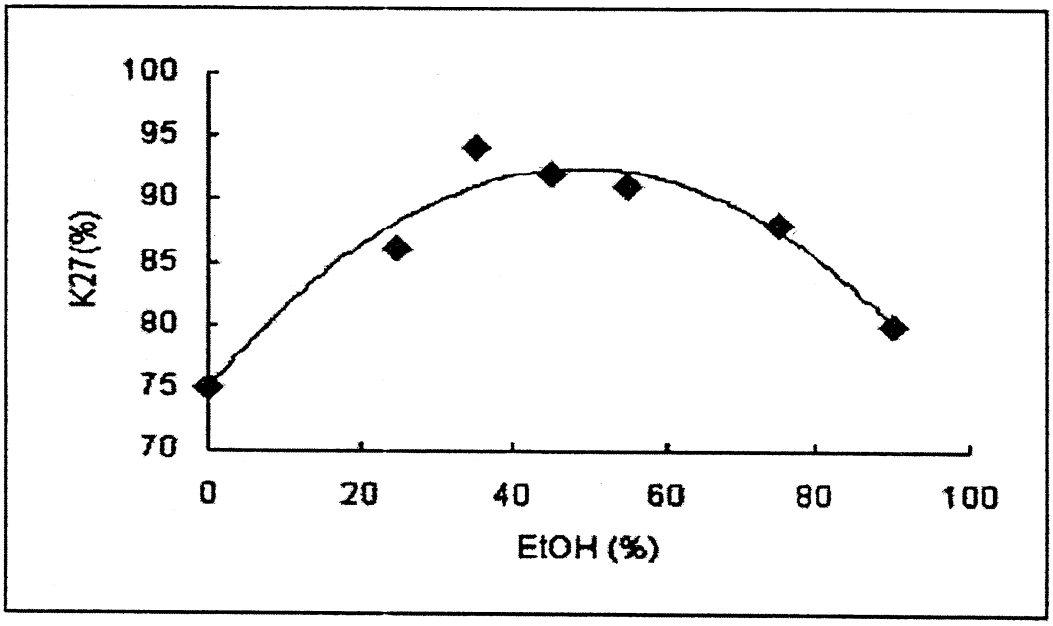
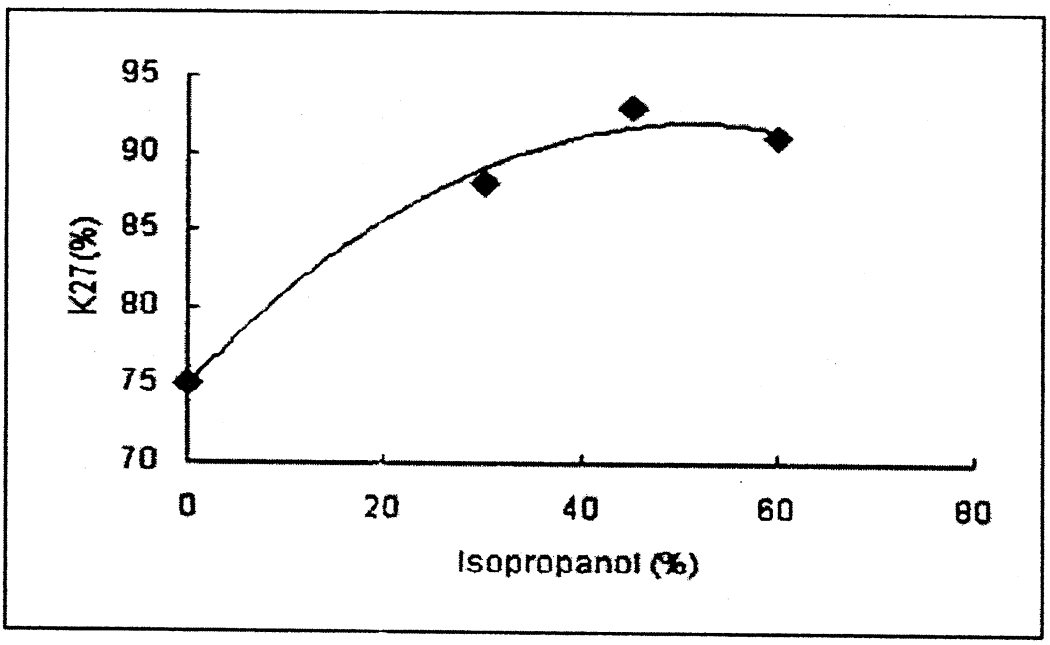
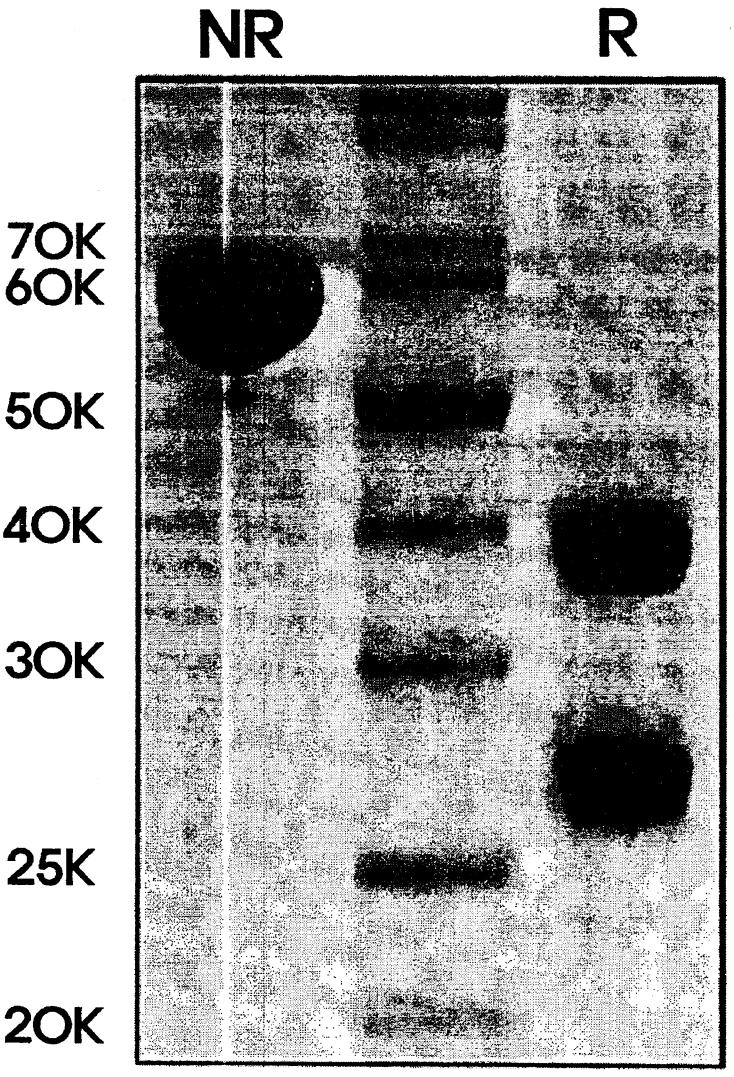

100
95
90
85
80
75
70
K27(%)
0
20
40
60
80
100
EtOH (%)

FIG. 6


95
90
85
80
75
70
K27(%)
0
20
40
60
80
Isopropanol (%)

4/33

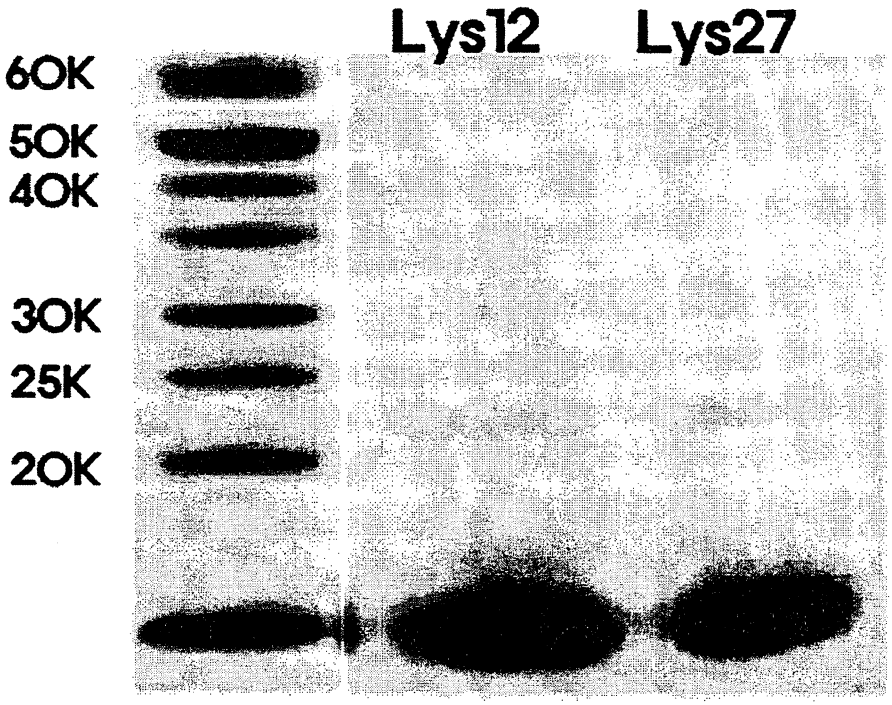
FIG. 7



NR: điều kiện không khử
R: điều kiện khử

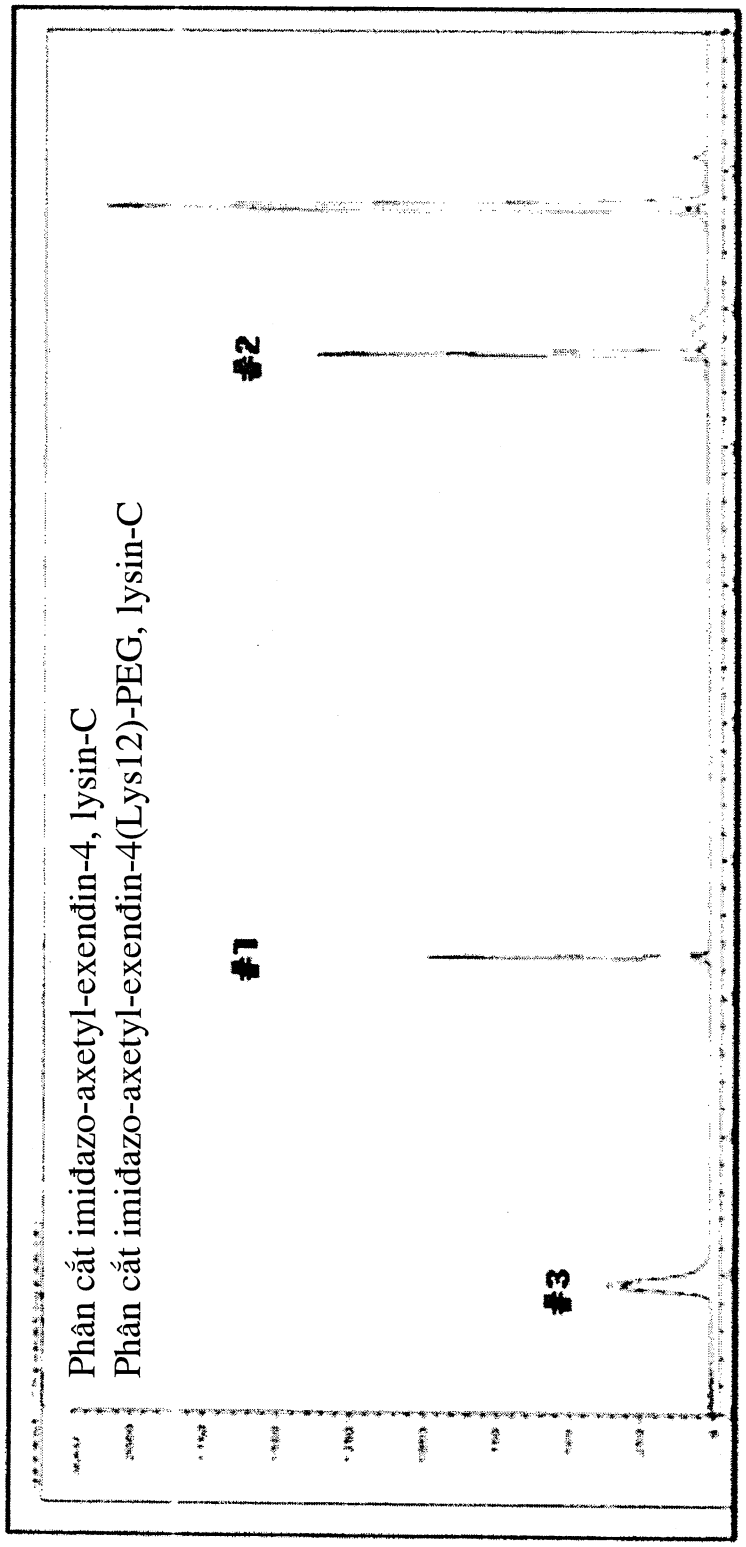
5/33

FIG. 8



Lys12:CA-exendin-4-PEG (Lys12)
Lys27:CA-exendin-4-PEG (Lys27)

FIG. 9



Phân cắt imiđazo-axetyl-exenđin-4, lysin-C

Phân cắt imiđazo-axetyl-exenđin-4(Lys12)-PEG, lysin-C

FIG. 10

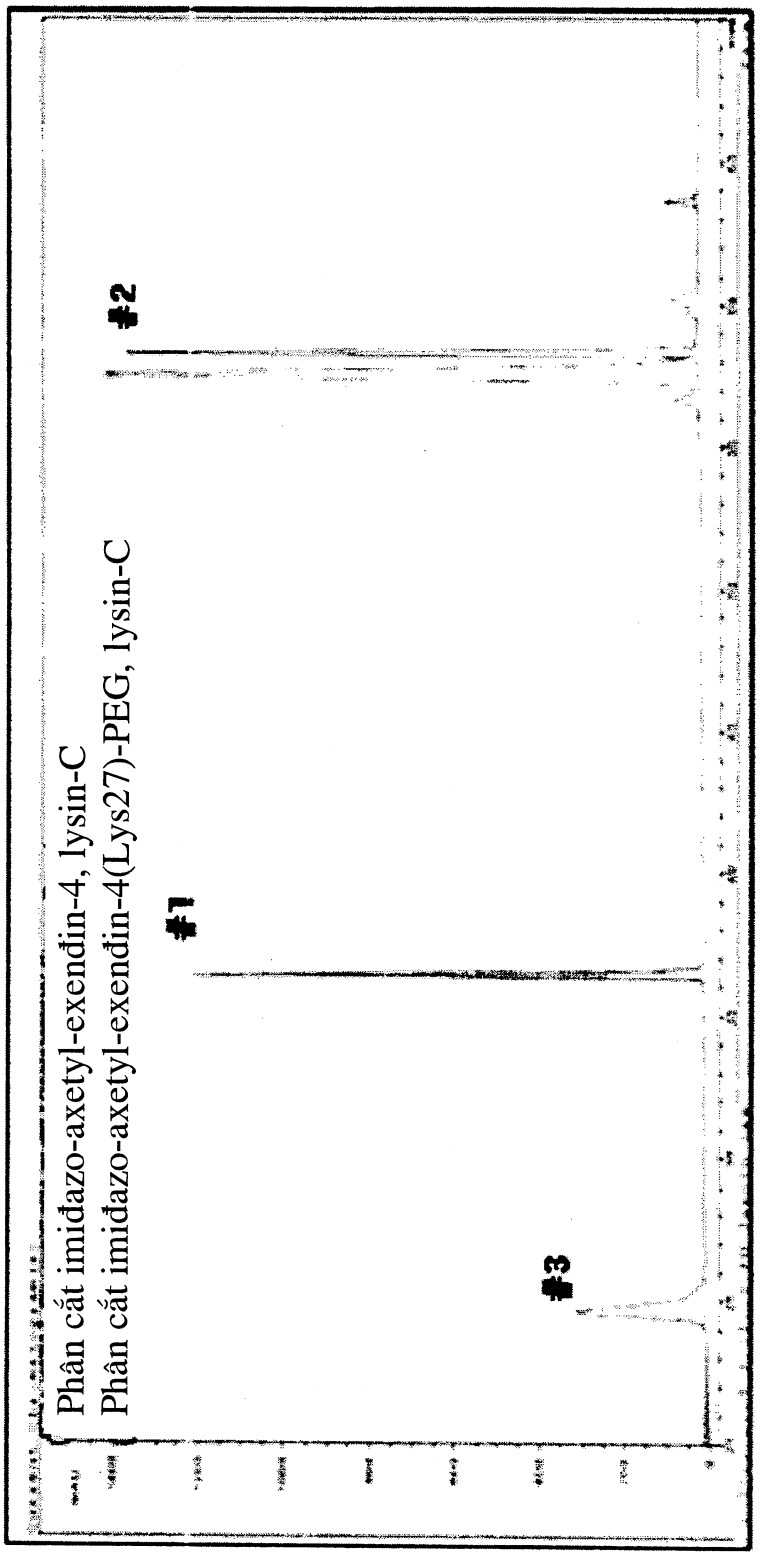

#1
#2
#3
Exendin-4
HGEGTFTSDL SKQMEEEAVR LFIEWLKNGG PSSGAPPPS
Phân cắt imiđazo-axetyl-exendin-4, lysin-C
Phân cắt imiđazo-axetyl-exendin-4(Lys27)-PEG, lysin-C
#1
#2
#3

FIG. 11

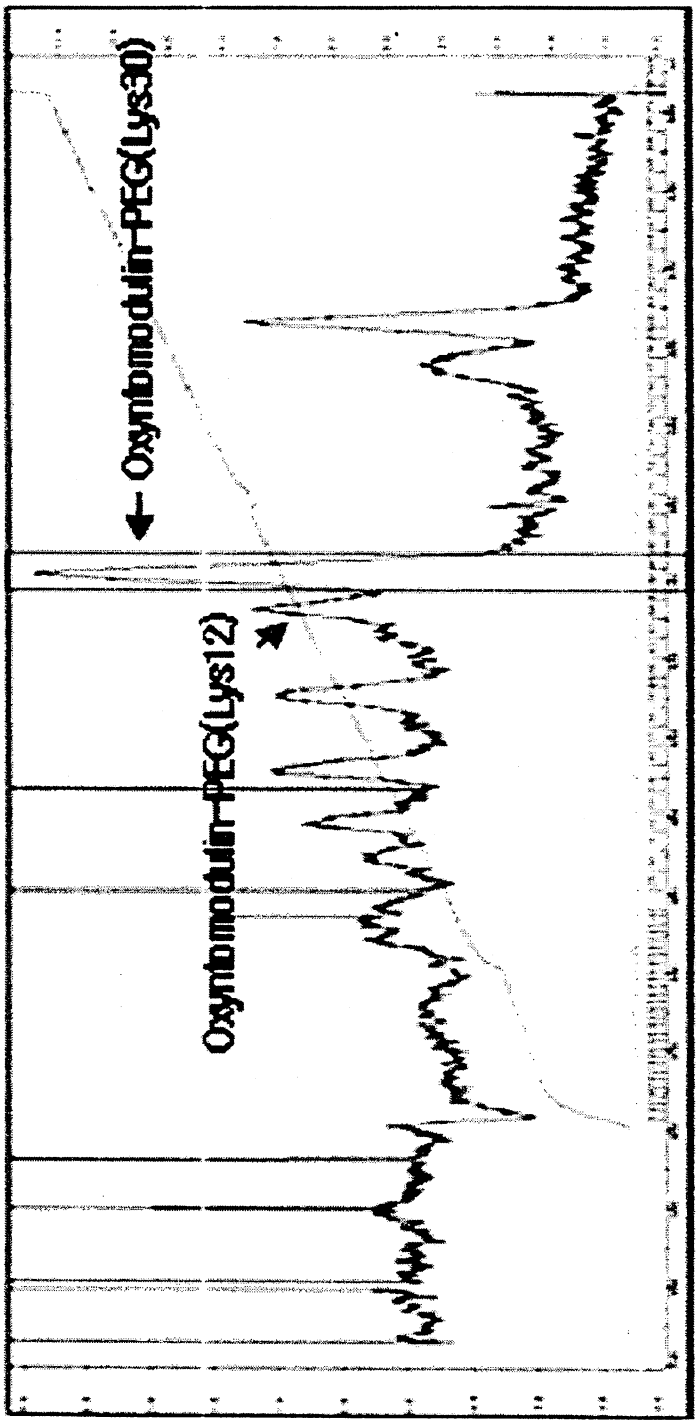


FIG. 12

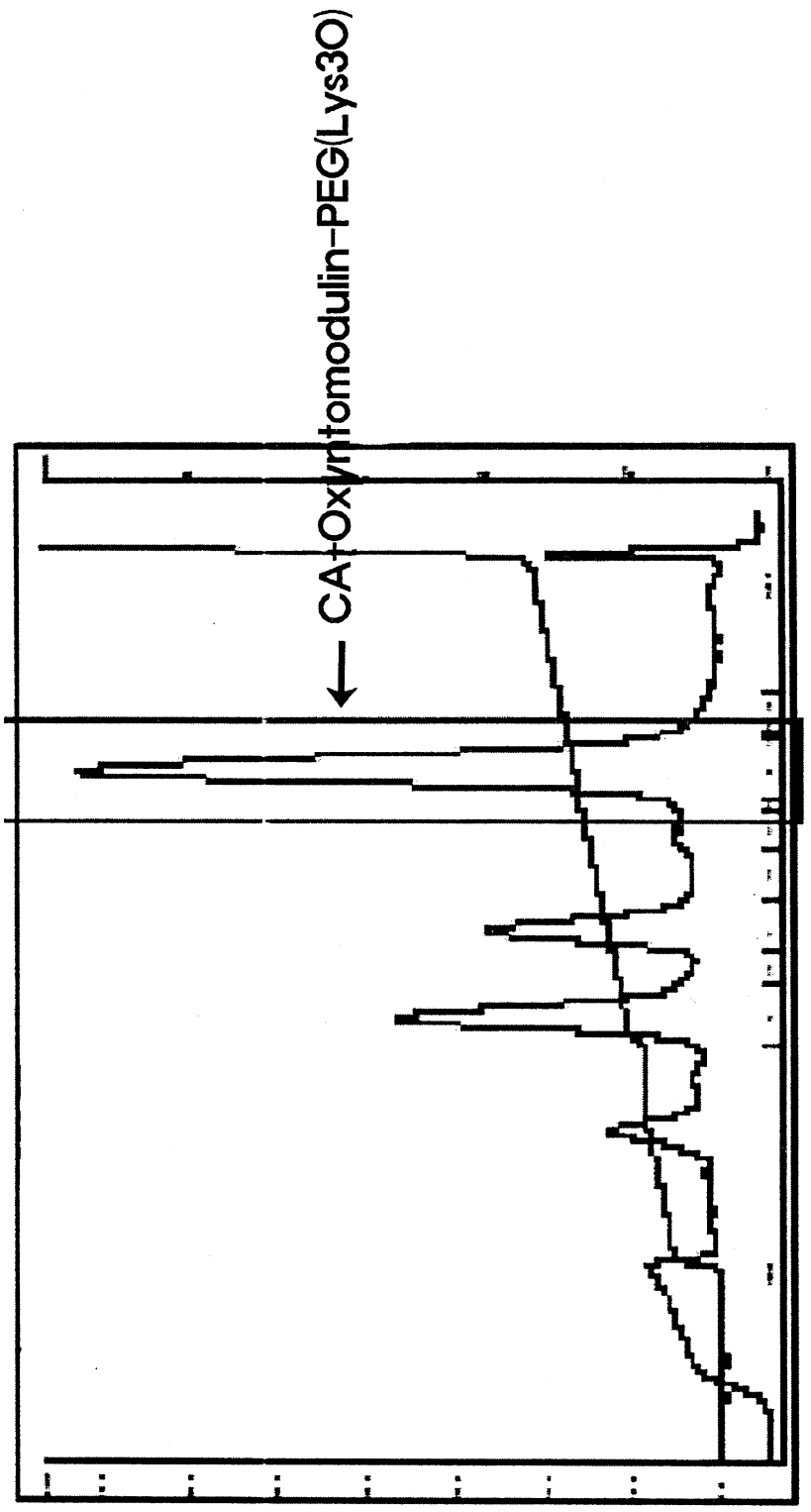


FIG. 13

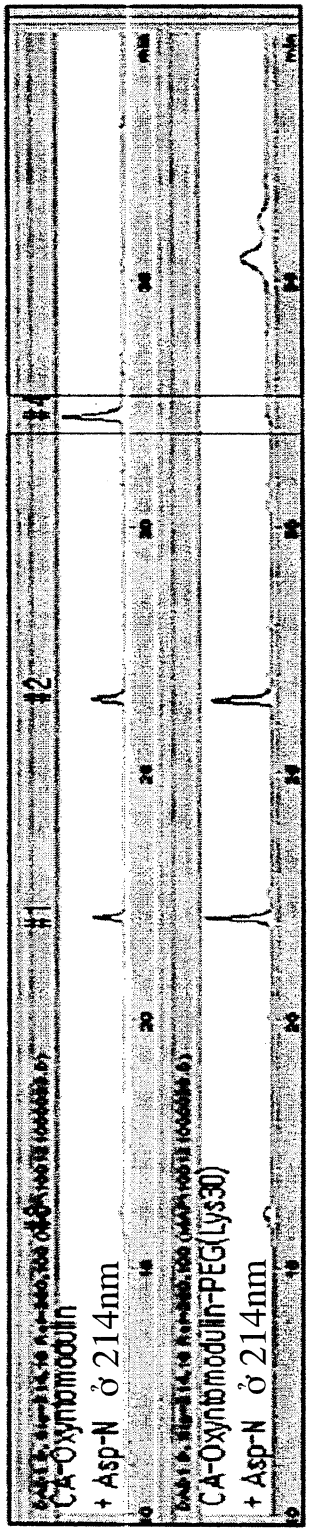
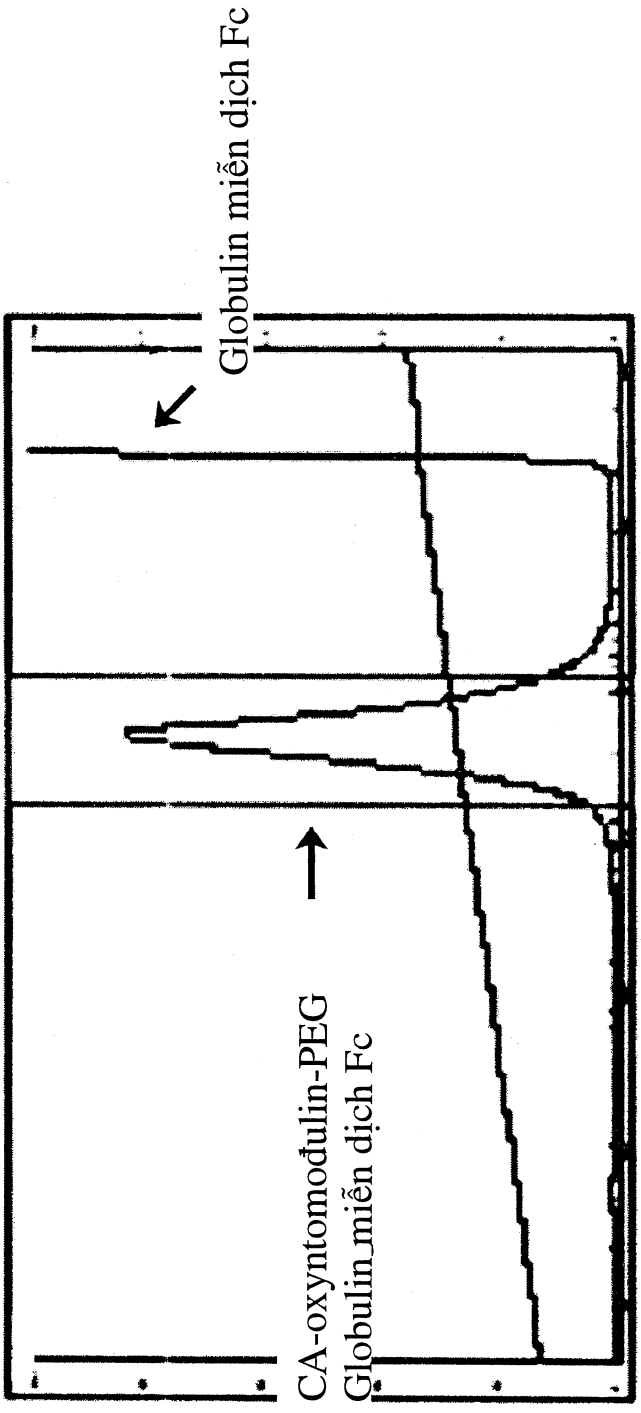
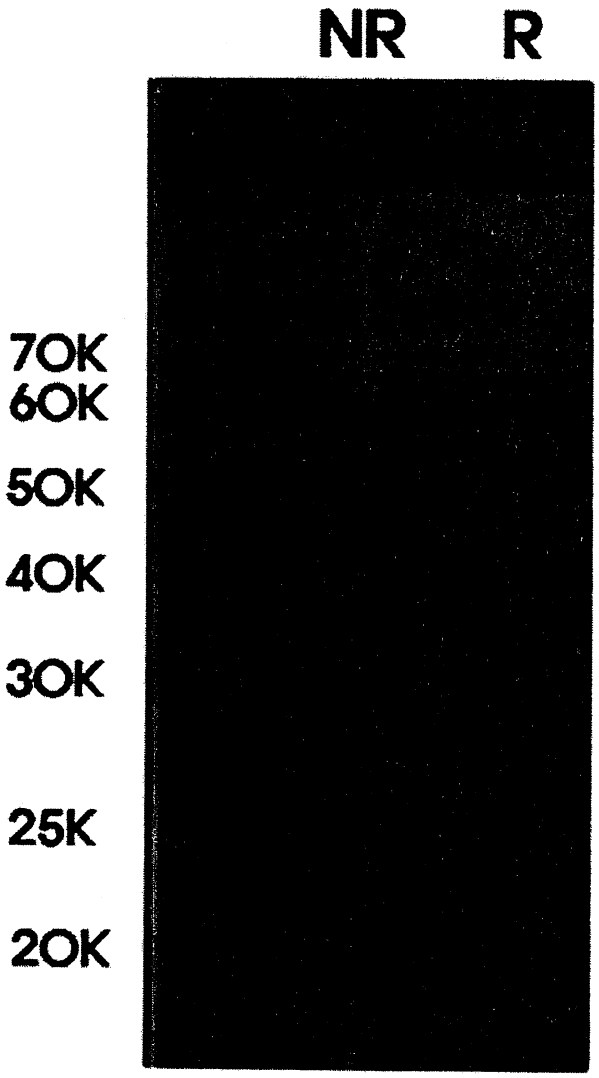

CA-Oxyntomodulin
+ Asp-N ở 214nm
CA-Oxyntomodulin-PEG(Lys30)
+ Asp-N ở 214nm
#1 : His(1)-Ser(8)
#2 : Asp(9)-Leu(14)
#3 : Asp(16)-Gln(20)
#4 : Asp(22)-(37)

FIG. 14


Globulin miễn dịch Fc
CA-oxyntomođulin-PEG
Globulin miễn dịch Fc

12/33

FIG. 15



NR: điều kiện không khử
R: điều kiện khử

FIG. 16

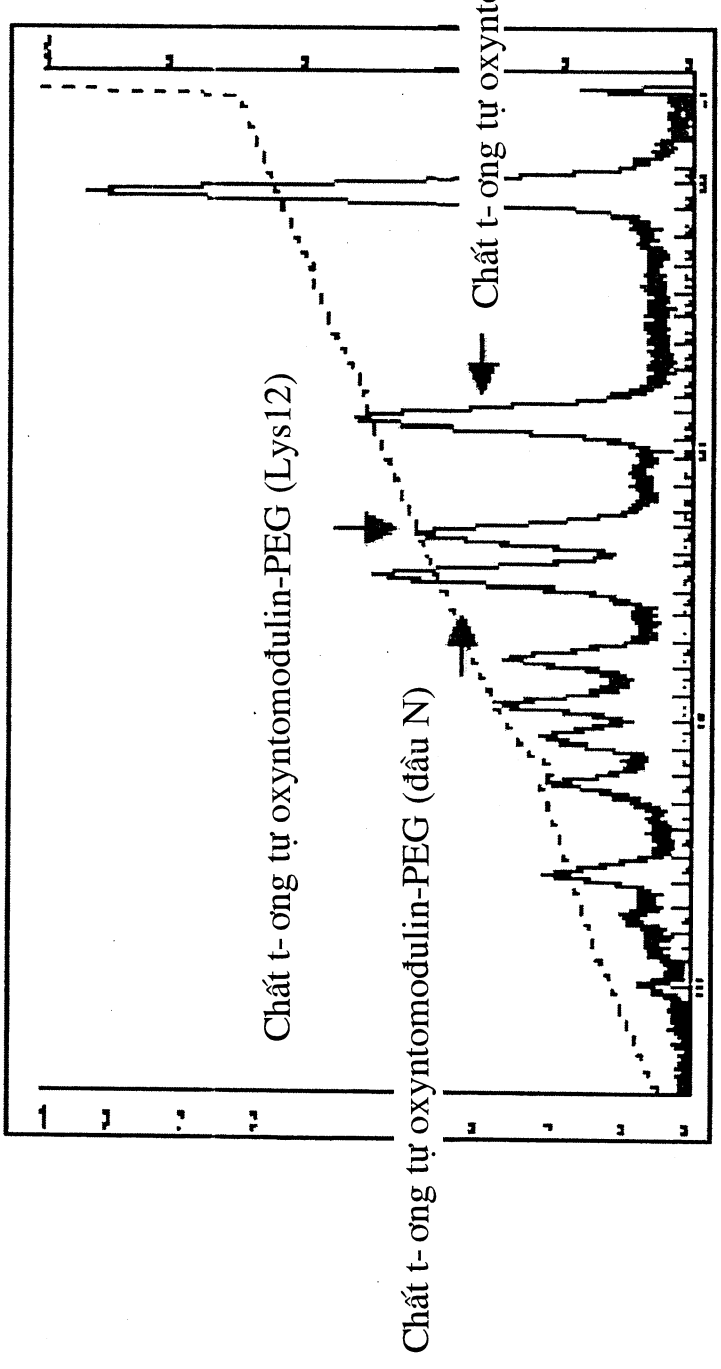

Chất t- ơng tự oxyntomođulin-PEG (Lys27)
Chất t- ơng tự oxyntomođulin-PEG (Lys12)
Chất t- ơng tự oxyntomođulin-PEG (đầu N)

FIG. 17

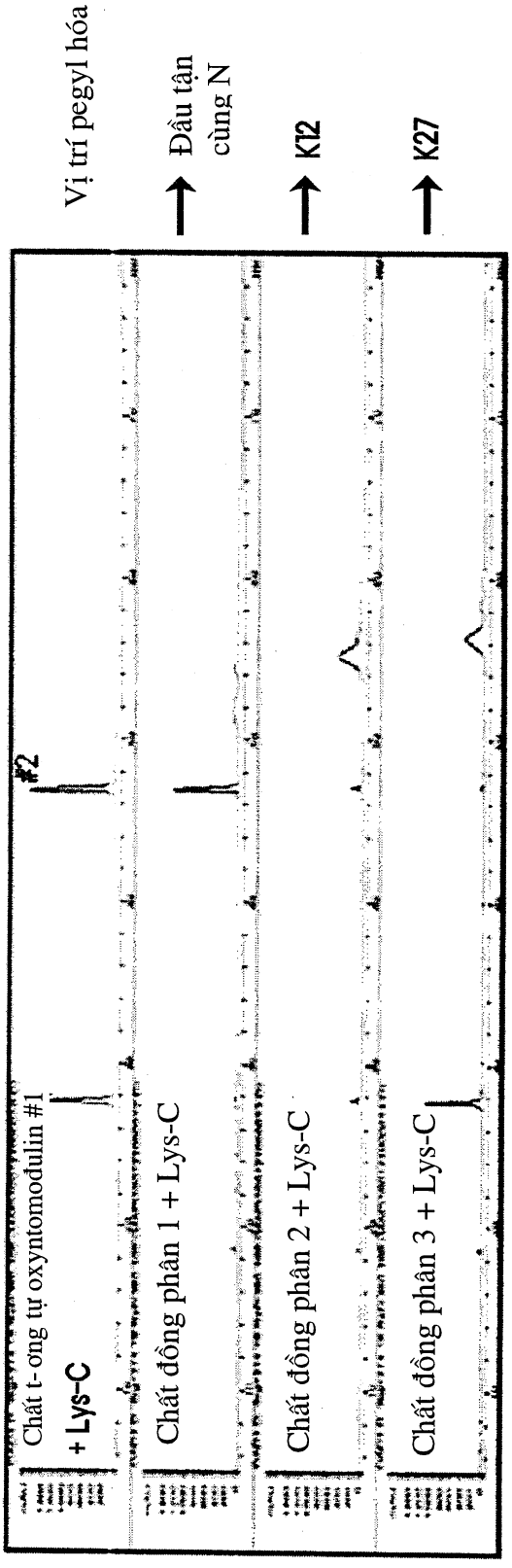

Vị trí pegyl hóa
Đầu tận cùng N
K12
K27
#2
Chất t- ơng tự oxyntomodulin #1
+ Lys-C
Chất đồng phân 1 + Lys-C
Chất đồng phân 2 + Lys-C
Chất đồng phân 3 + Lys-C

FIG. 18

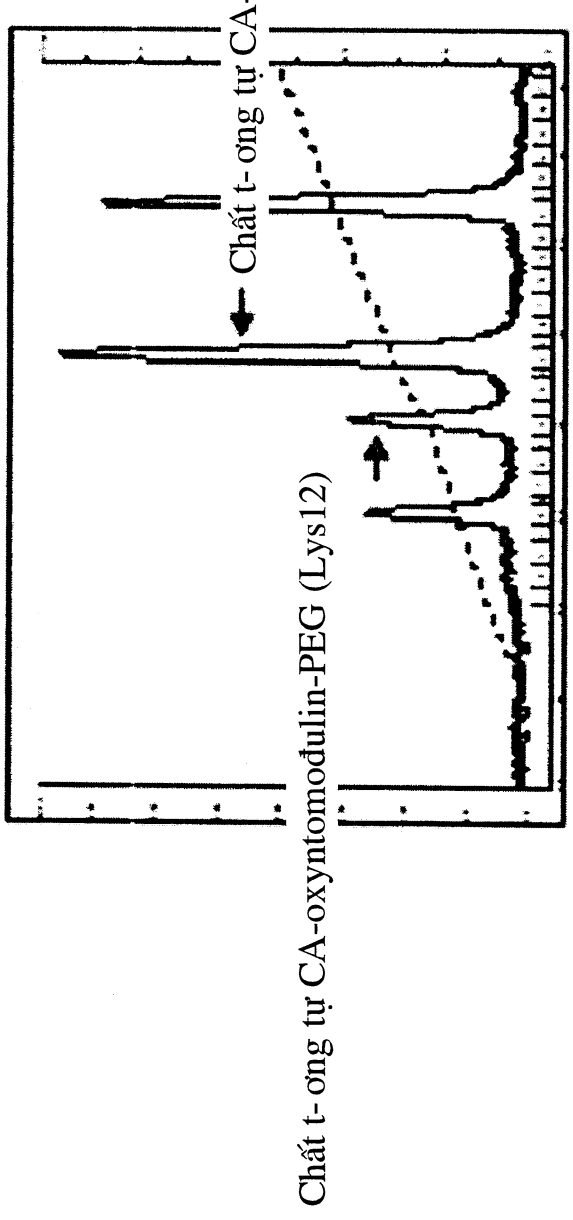

Chất t- ơng tự CA-oxyntomođulin-PEG (Lys27)
Chất t- ơng tự CA-oxyntomođulin-PEG (Lys12)

FIG. 19

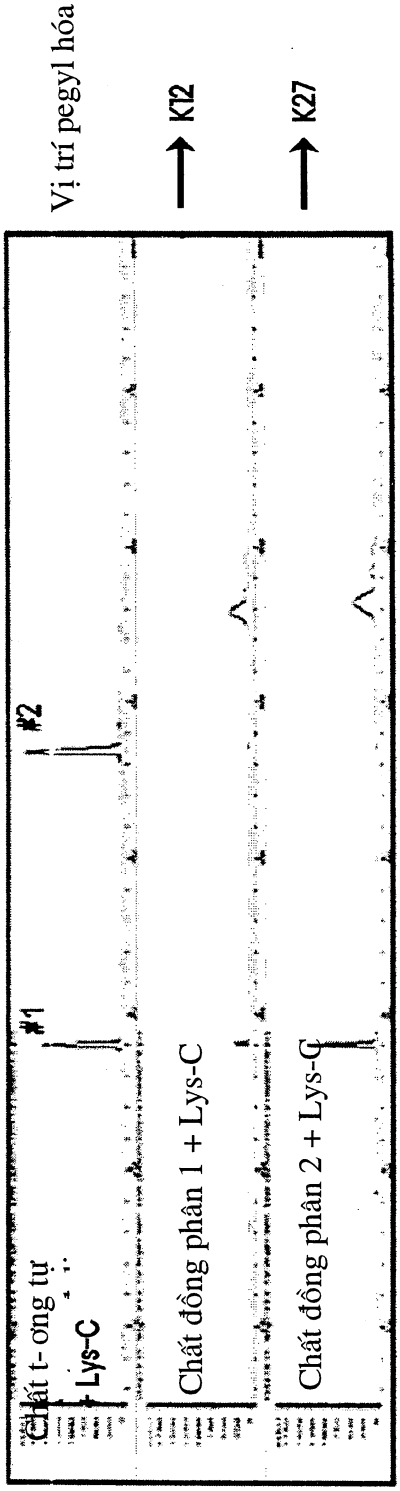
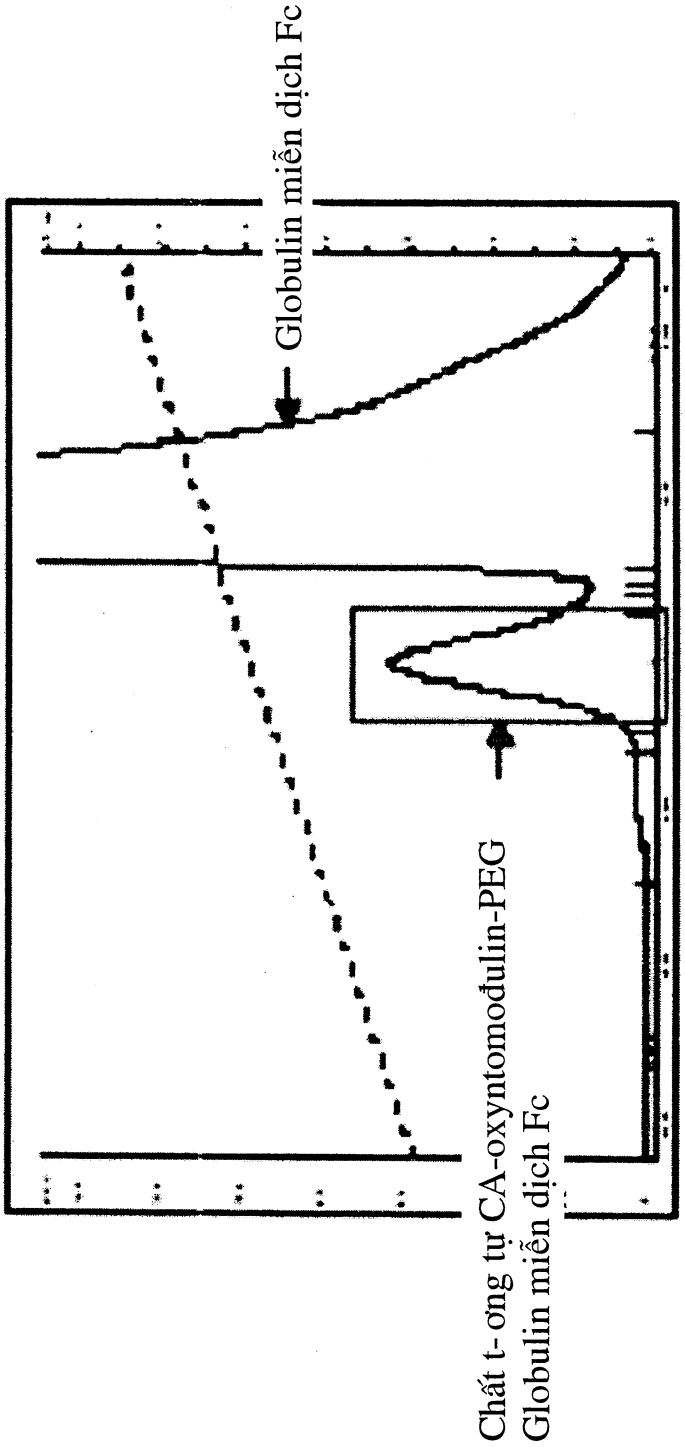
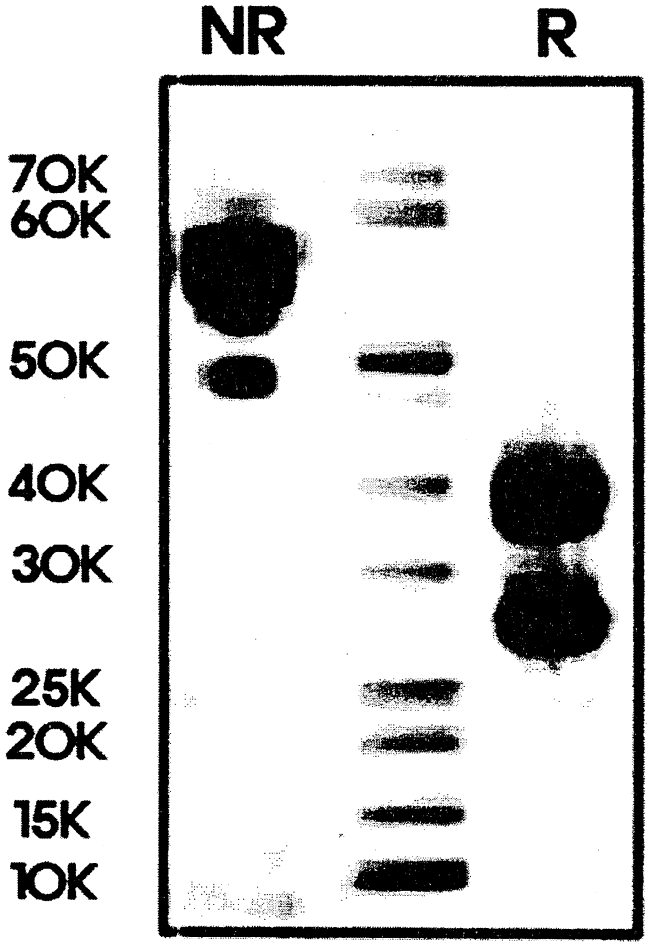

Vị trí pegyl hóa
K12
K27
#1
#2
Chất đồng phân 1 + Lys-C
Chất đồng phân 2 + Lys-C

FIG. 20


Globulin miễn dịch Fc
Chất t- ơng tự CA-oxyntomodulin-PEG
Globulin miễn dịch Fc

18/33

FIG. 21



NR: điều kiện không khử
R: điều kiện khử

FIG. 22

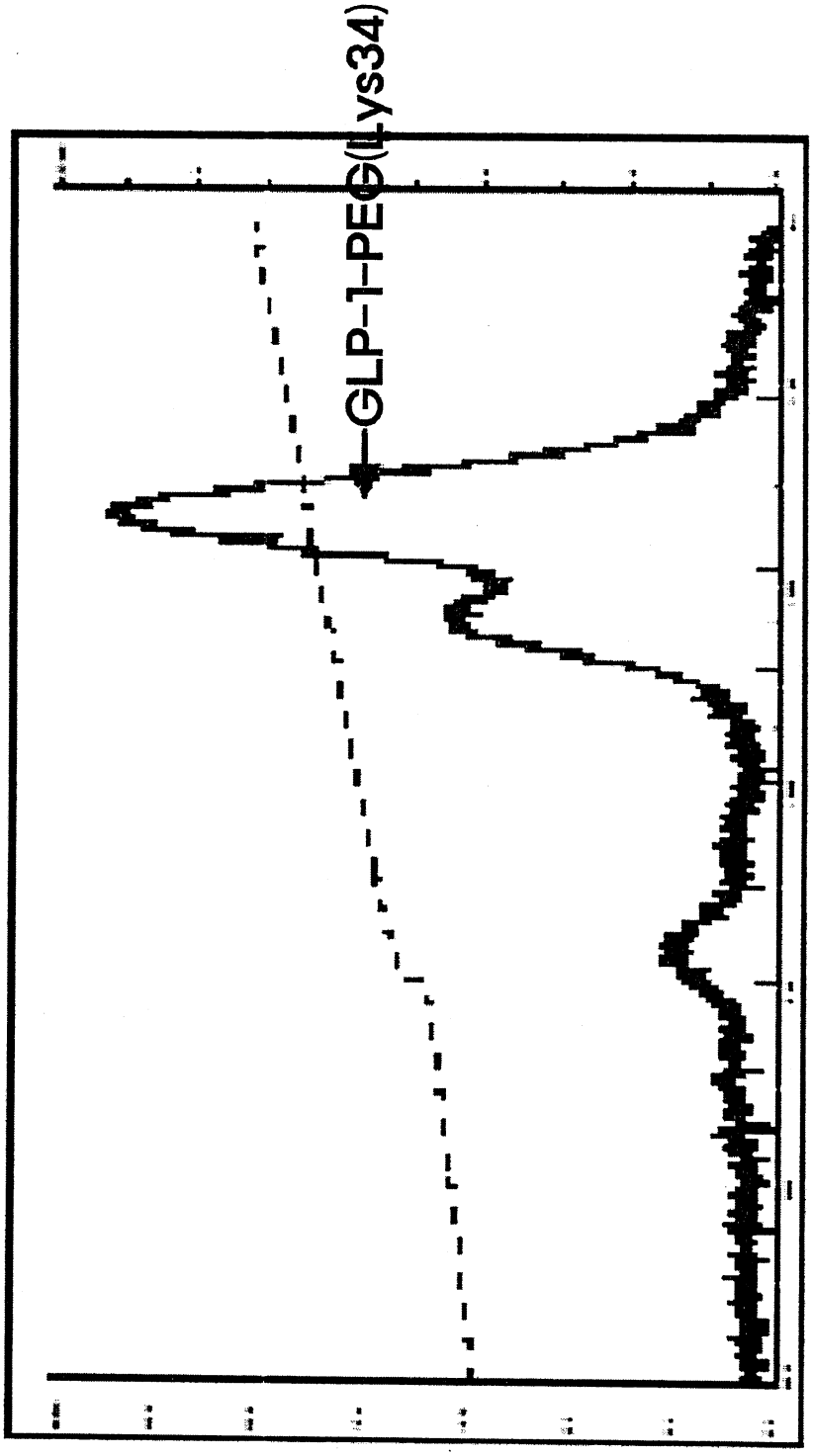


FIG. 23

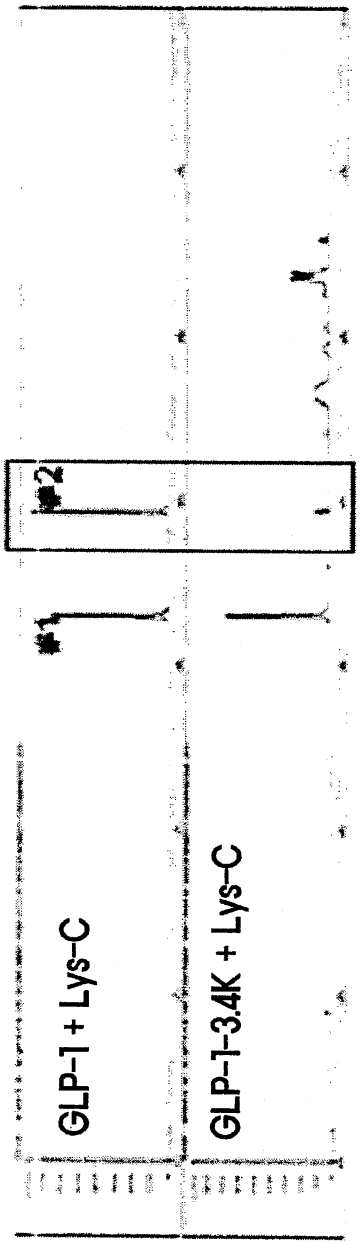


FIG. 24

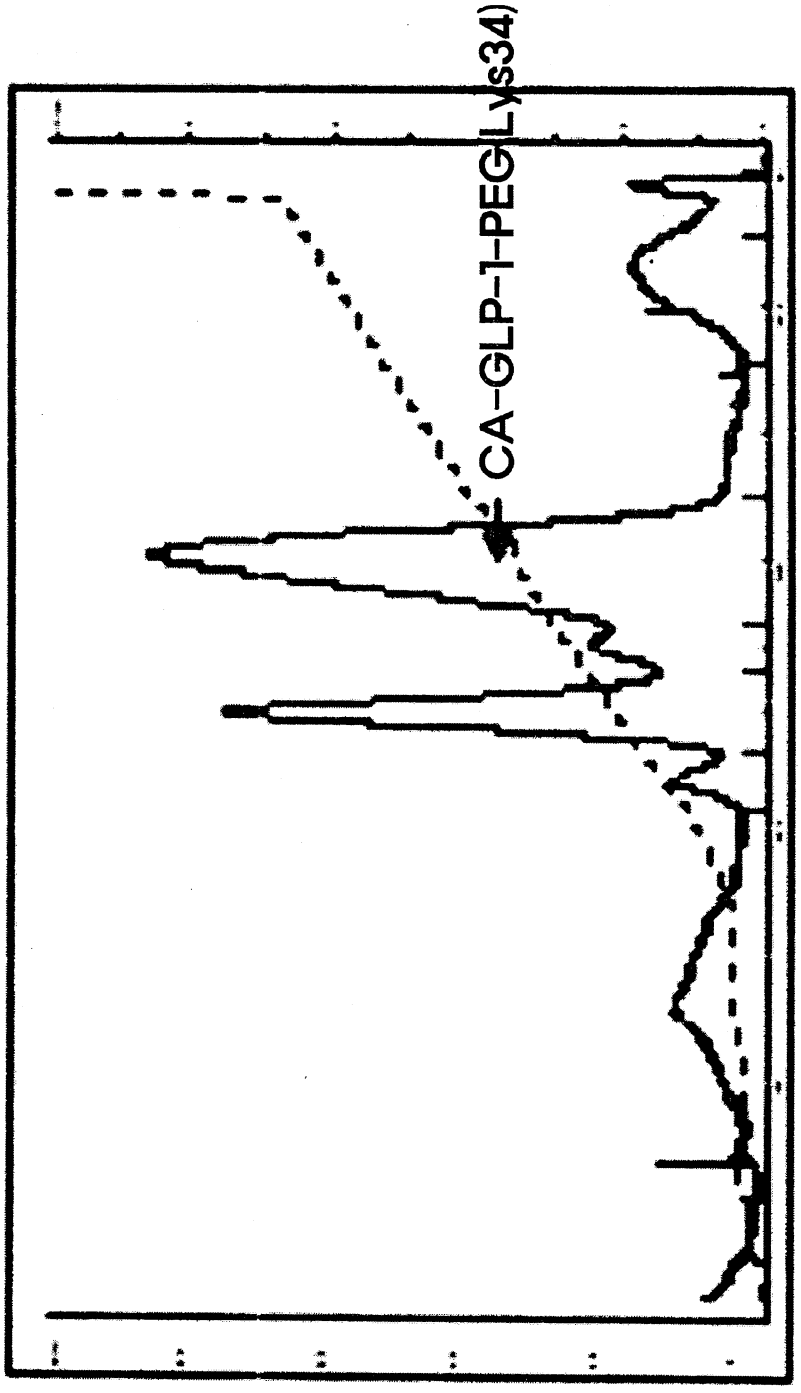


FIG. 25

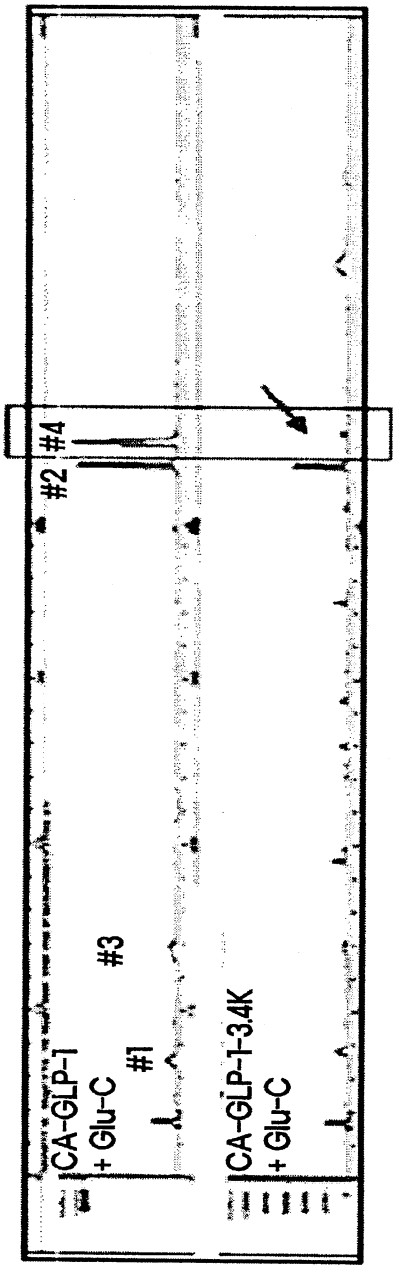
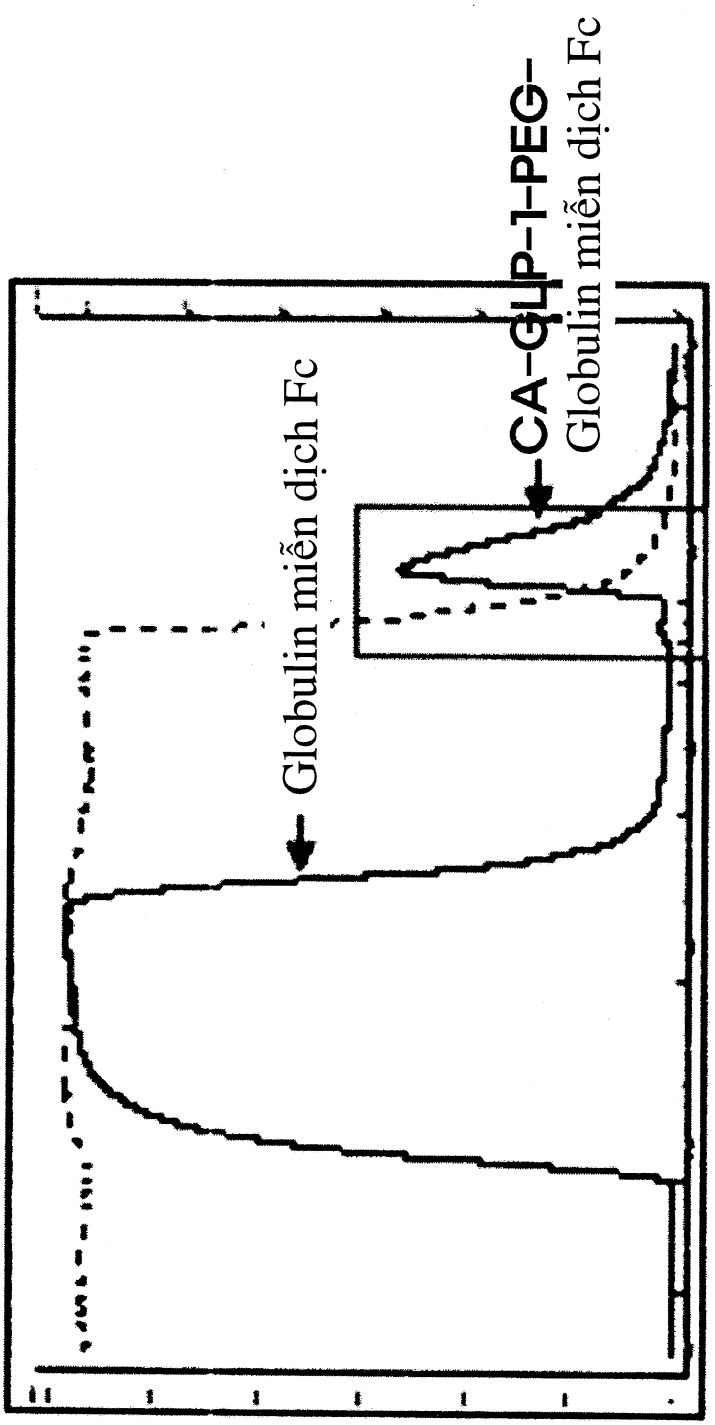
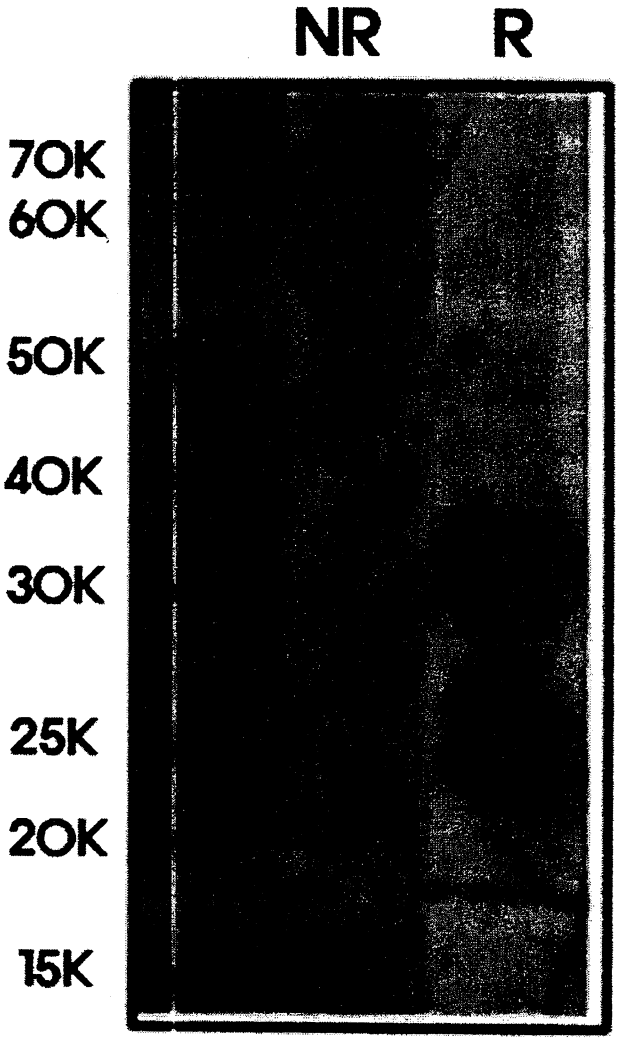


FIG. 26



24/33

FIG. 27



NR: điều kiện không khử
R: điều kiện khử

FIG. 28

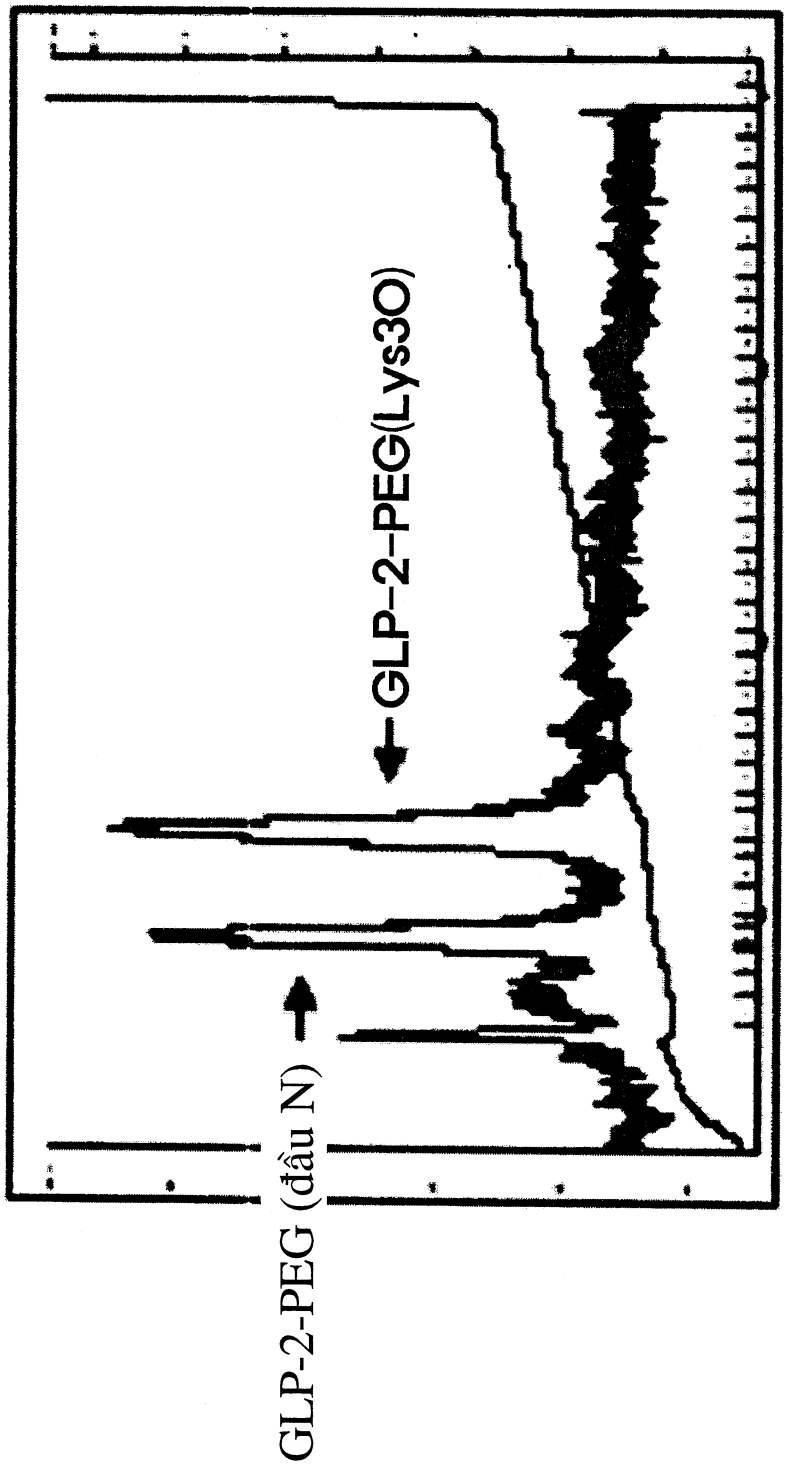


FIG. 29

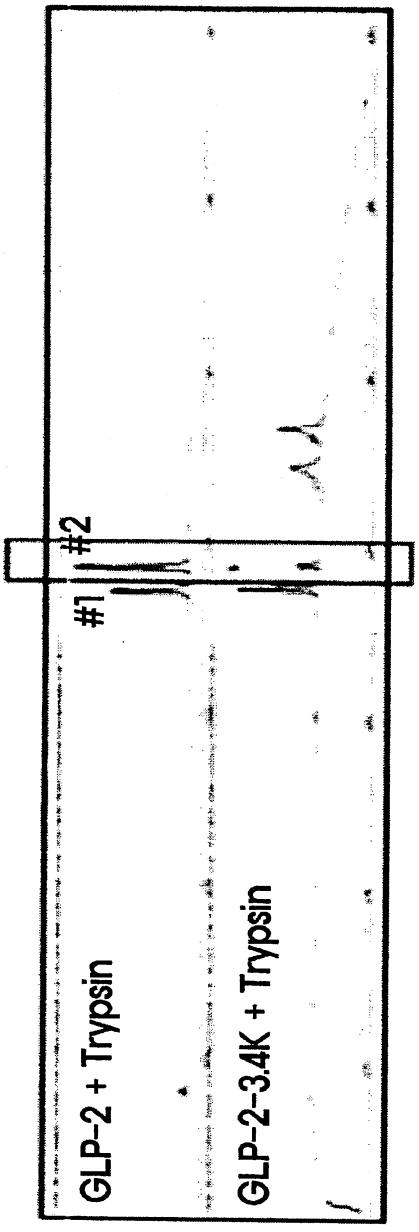


FIG. 30

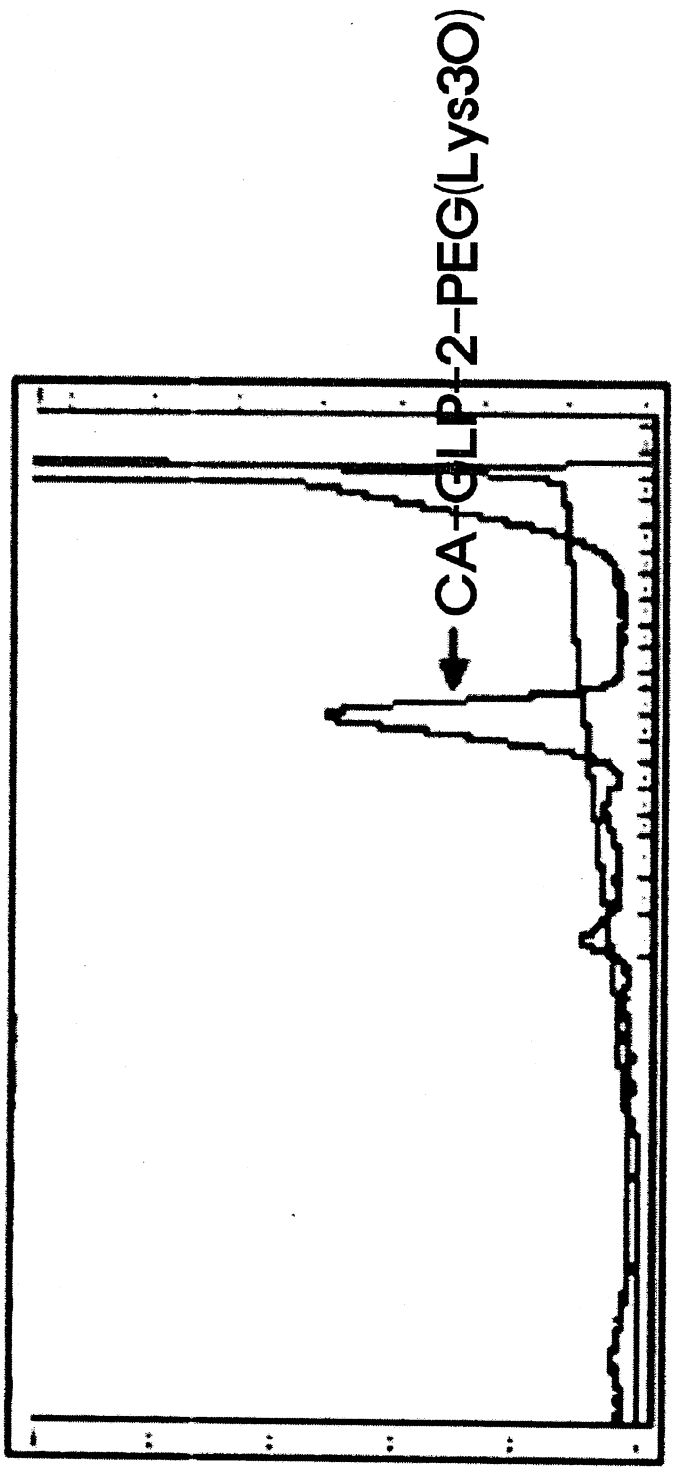
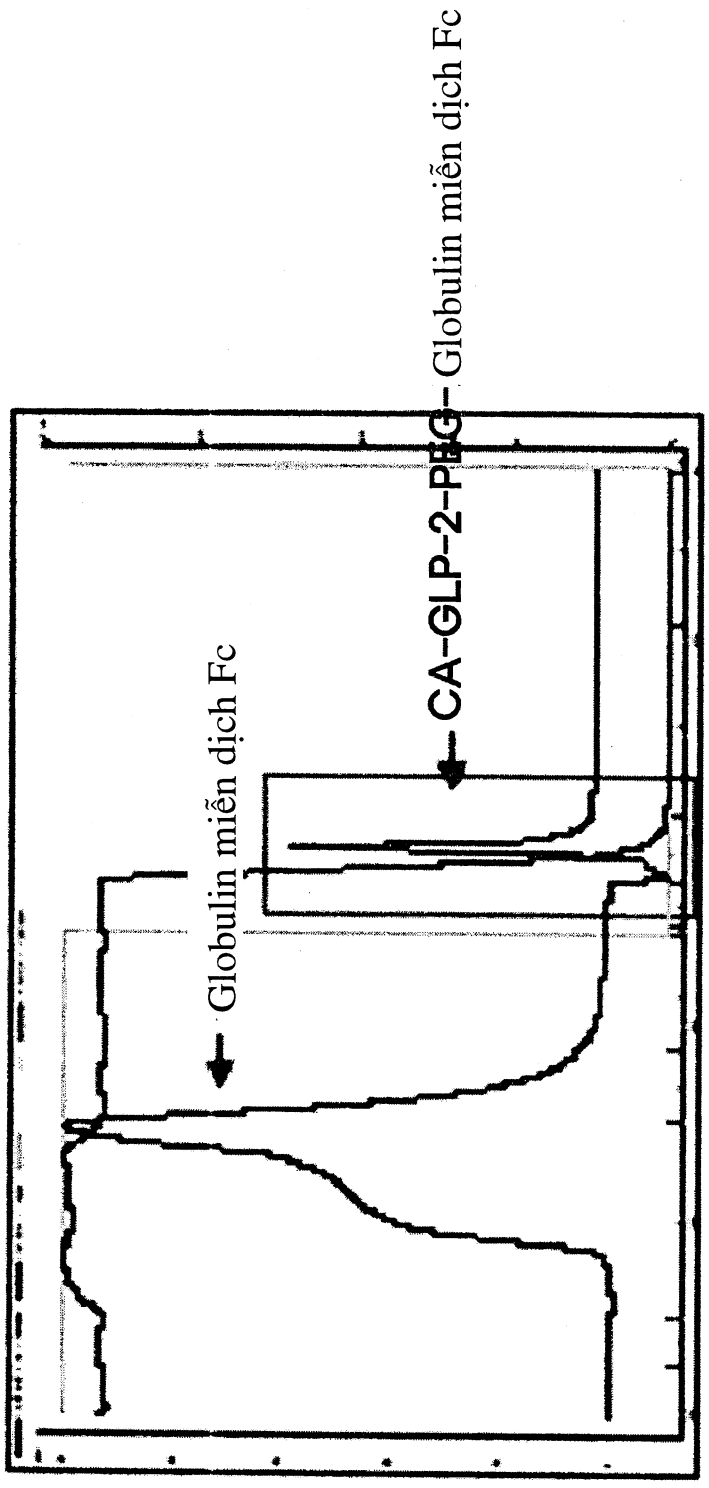
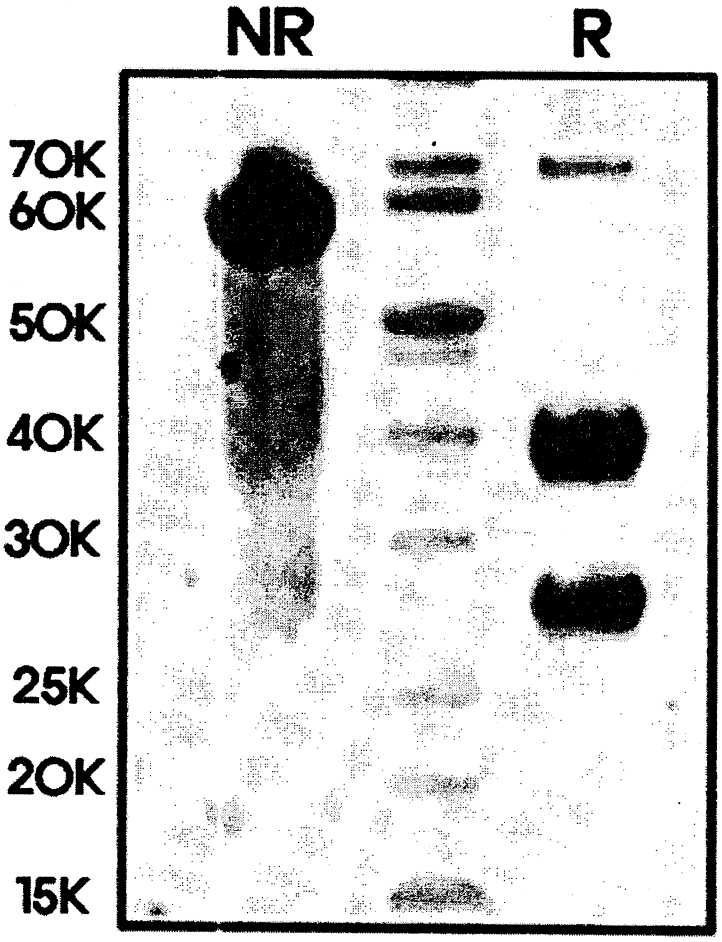


FIG. 31



29/33

FIG. 32



NR: điều kiện không khử
R: điều kiện khử

FIG. 33

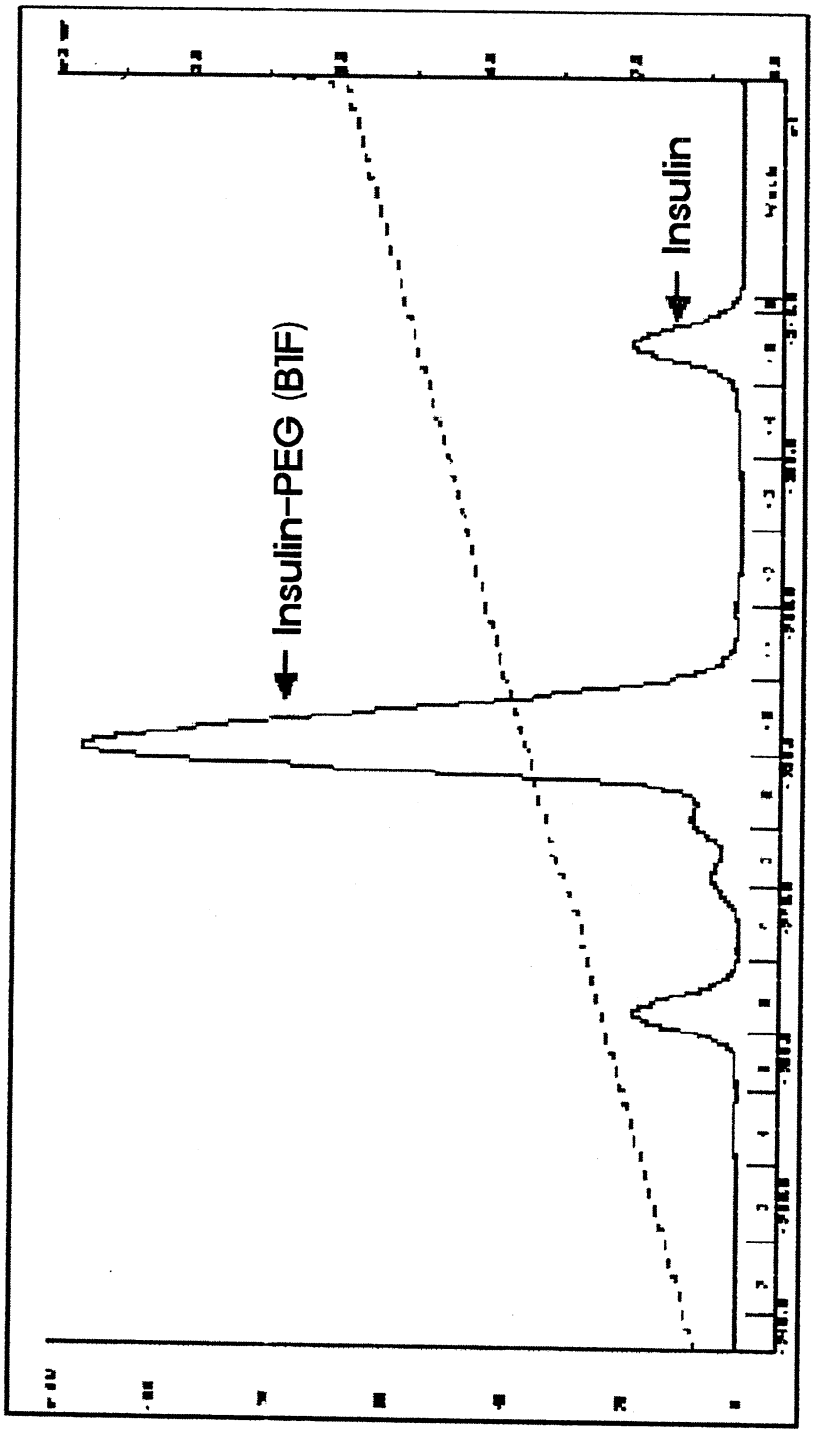


FIG. 34

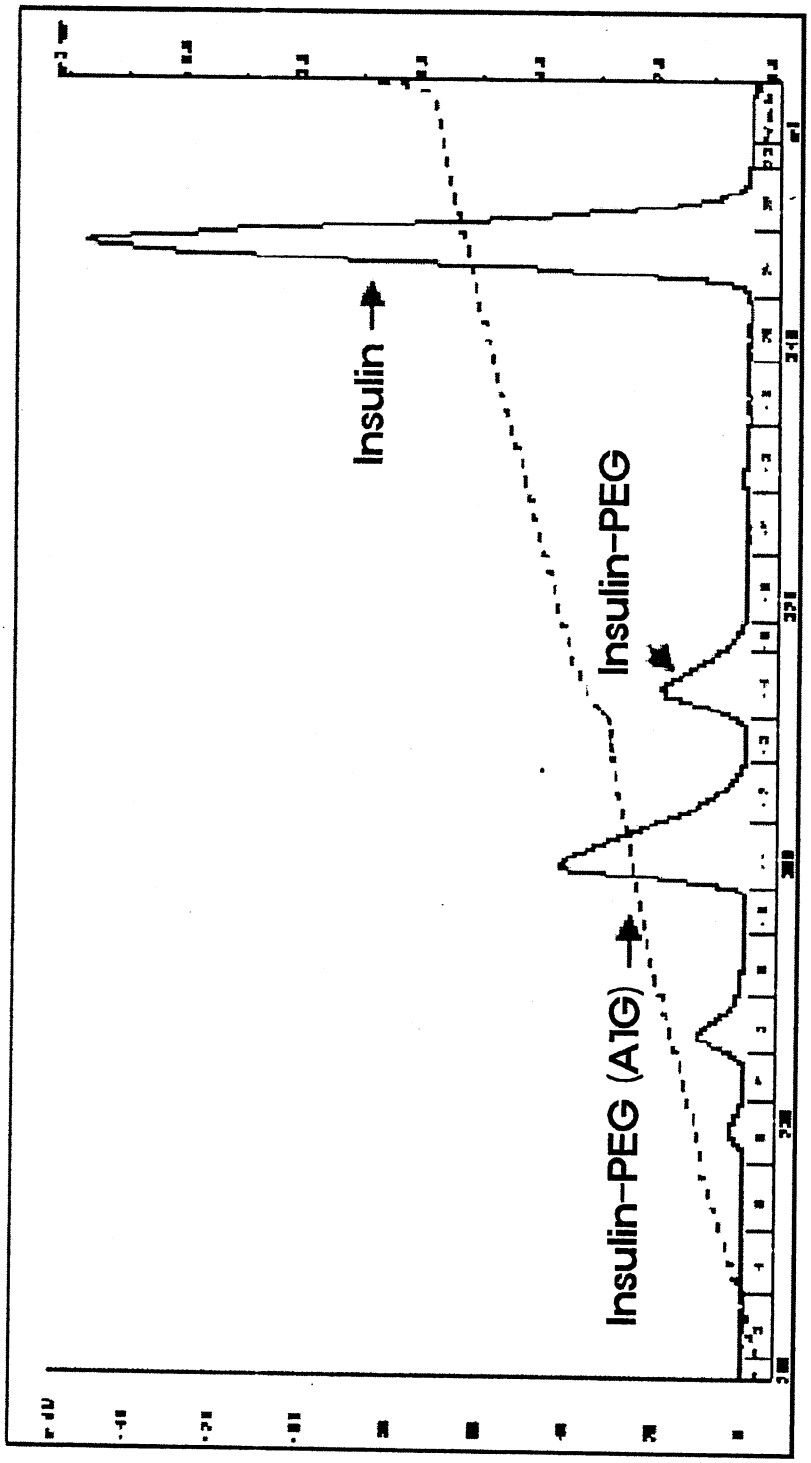


FIG. 35

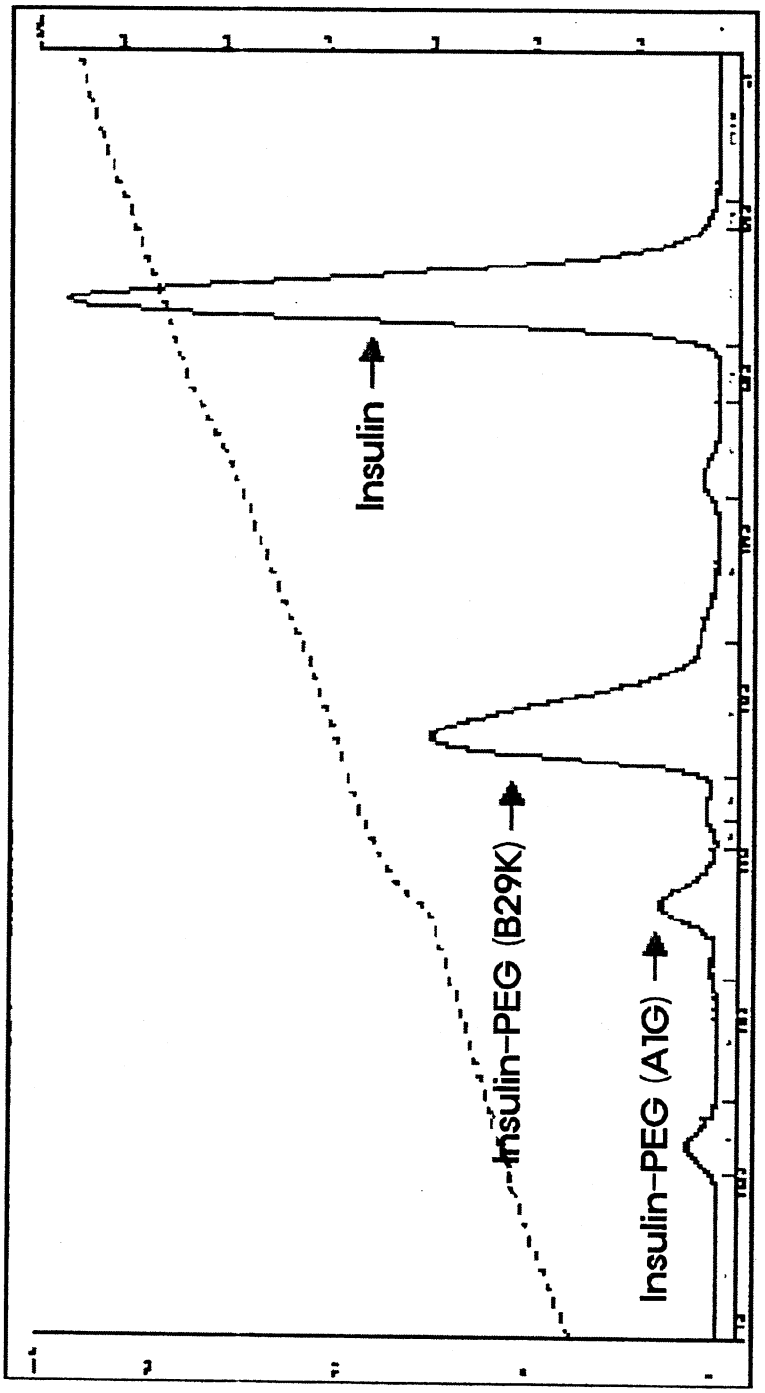
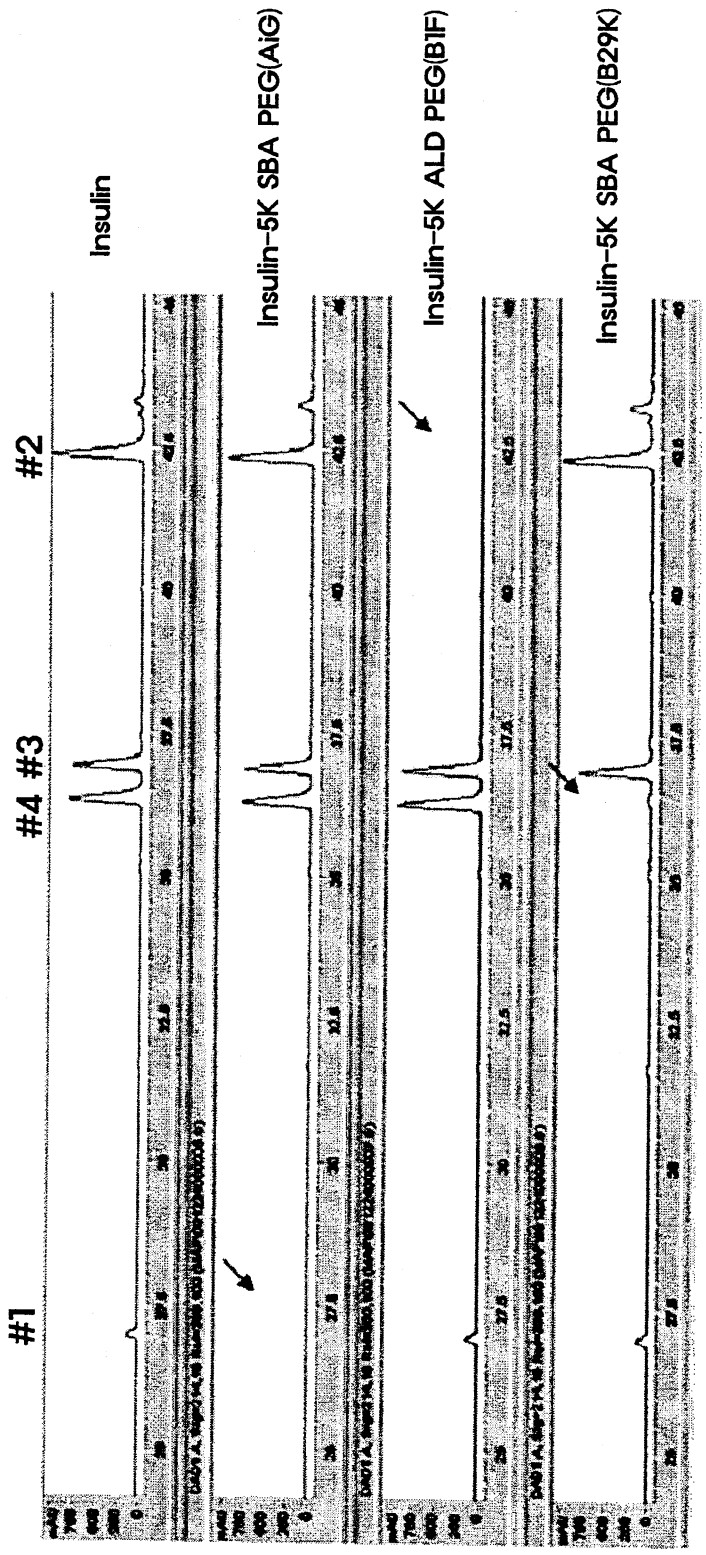


FIG. 36


Insulin
Insulin-5K SBA PEG(AiG)
Insulin-5K ALD PEG(B1F)
Insulin-5K SBA PEG(B29K)
#1
#2
#3
#4