



(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)



1-0032580

(51)⁷ C07K 14/62; A61K 47/48

(13) B

(21) 1-2015-03486

(22) 26/02/2014

(86) PCT/KR2014/001593 26/02/2014

(87) WO2014/133324 04/09/2014

(30) 10-2013-0020703 26/02/2013 KR; 10-2013-0082511 12/07/2013 KR; 10-2014-0006937 20/01/2014 KR

(45) 25/07/2022 412

(43) 25/03/2016 336A

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

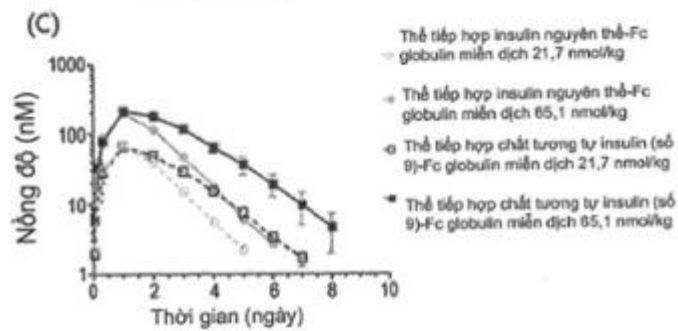
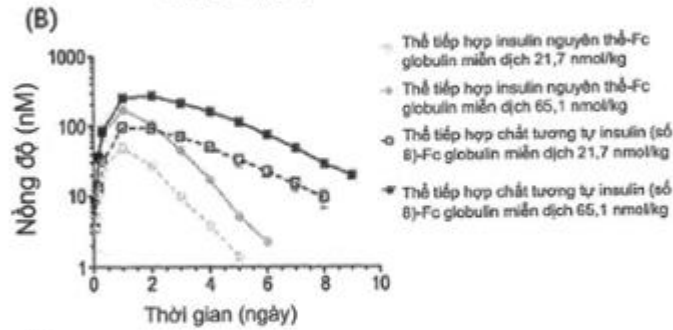
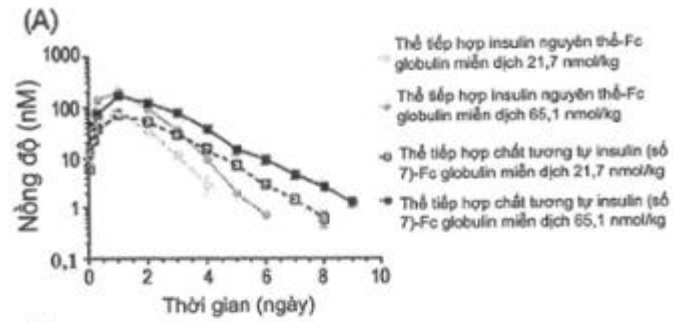
214, Muha-ro, Paltan-myeon, Hwaseong-si, Gyeonggi-do 445-958, Republic of Korea

(72) HWANG, Sang Youn (KR); HUH, Yong Ho (KR); KIM, Jin Young (KR); HONG, Sung Hee (KR); CHOI, In Young (KR); JUNG, Sung Youb (KR); KWON, Se Chang (KR); KIM, Dae Jin (KR); KIM, Hyun Uk (KR); JANG, Myung Hyun (KR); KIM, Seung Su (KR).

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

(54) CHẤT TƯƠNG TỰ INSULIN, THỂ TIẾP HỢP CHỨA NÓ, CHẾ PHẨM INSULIN TÁC DỤNG KÉO DÀI CHỨA THỂ TIẾP HỢP NÀY VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT THỂ TIẾP HỢP NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến chất tương tự insulin có chuẩn độ insulin giảm và ái lực gắn kết với thụ thể insulin giảm so với dạng nguyên thể nhằm tăng thời gian bán thải trong máu của insulin, thể tiếp hợp được tạo ra bằng cách liên kết chất tương tự insulin và chất mang, chế phẩm insulin tác dụng kéo dài chứa thể tiếp hợp này và phương pháp tạo ra thể tiếp hợp này.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến chất tương tự insulin có chuẩn độ insulin giảm và ái lực gắn kết với thụ thể insulin giảm so với dạng nguyên thể nhằm mục đích làm tăng thời gian bán thải trong máu của insulin, thể tiếp hợp được tạo ra bằng cách liên kết chất tương tự insulin và chất mang, chế phẩm tác dụng kéo dài chứa thể tiếp hợp này, và phương pháp tạo ra thể tiếp hợp này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Đã biết rằng các protein in vivo được thải ra qua nhiều đường khác nhau, như phân giải bởi các enzym phân giải protein trong máu, bài tiết qua thận, hoặc thanh thải bởi các thụ thể. Do đó, nhiều nỗ lực đã được thực hiện để cải thiện hiệu lực trị liệu bằng cách tránh cơ chế thanh thải protein và làm tăng thời gian bán thải của các protein có hoạt tính sinh lý.

Insulin là hormon được tiết bởi tuyến tụy trong cơ thể người, điều hòa nồng độ glucoza máu, và có vai trò trong việc duy trì nồng độ glucoza máu bình thường đồng thời vận chuyển glucoza thừa trong máu đến các tế bào để cung cấp năng lượng cho tế bào. Tuy nhiên, ở bệnh nhân bị đái tháo đường, insulin không thực hiện chức năng một cách chính xác do thiếu insulin, kháng insulin, và suy giảm chức năng tế bào beta, và do đó, glucoza trong máu không thể được dùng dưới dạng nguồn năng lượng và nồng độ glucoza máu bị tăng lên, dẫn đến chứng tăng glucoza máu. Cuối cùng, nó được bài tiết qua đường nước tiểu góp phần làm phát triển các biến chứng khác nhau. Do đó, phép trị liệu bằng insulin là cần thiết đối với các bệnh nhân có sự tiết insulin bất thường (typ I) hoặc kháng insulin (typ II), và nồng độ glucoza máu có thể được điều hòa bình thường bằng cách dùng insulin. Tuy nhiên, giống như các hormon protein và peptit khác, insulin có thời gian bán thải in vivo rất ngắn, và do

đó, có nhược điểm là phải dùng lặp lại. Việc dùng thường xuyên như vậy gây đau đớn và khó chịu cho bệnh nhân. Vì lý do này, để cải thiện chất lượng cuộc sống bằng cách làm tăng thời gian bán thải in vivo của protein và làm giảm tần suất dùng, nhiều nghiên cứu về chế phẩm chứa protein và tiếp hợp hóa học (thể tiếp hợp axit béo, thể tiếp hợp polyetylen polyme) đã được thực hiện. Insulin tác dụng kéo dài có trên thị trường bao gồm insulin glargin do Sanofi Aventis sản xuất (lantus, kéo dài trong khoảng 20-22 giờ), và insulin detemir (levemir, kéo dài trong khoảng 18-22 giờ) và tresiba (degludec, kéo dài trong khoảng 40 giờ) do Novo Nordisk sản xuất. Các sản phẩm insulin tác dụng kéo dài này không tạo ra đỉnh nồng độ insulin trong máu, và do đó, chúng thích hợp để giữ mức insulin nền. Tuy nhiên, do các sản phẩm này có thời gian bán thải không đủ dài, nên vẫn chưa khắc phục được nhược điểm là phải tiêm một hoặc hai lần mỗi ngày. Do đó, các sản phẩm này có hạn chế trong việc đạt được mục tiêu dự định là làm giảm đáng kể tần suất dùng để cải thiện sự thuận tiện cho các bệnh nhân bị bệnh đái tháo đường cần dùng thuốc trong thời gian dài.

Một nghiên cứu trước đây đã mô tả quy trình thanh thải insulin in vivo cụ thể; 50% insulin hoặc nhiều hơn được loại ra trong thận và phần còn lại được loại bỏ bằng quá trình thanh thải qua trung gian thụ thể (receptor mediated clearance - RMC) ở các vị trí đích như cơ, chất béo, gan, v.v..

Về vấn đề này, nhiều nghiên cứu, bao gồm J Pharmacol Exp Ther (1998) 286: 959, Diabetes Care (1990) 13: 923, Diabetes (1990) 39: 1033, đã báo cáo rằng hoạt tính in vitro được làm giảm để tránh RMC của insulin, từ đó làm tăng hàm lượng trong máu. Tuy nhiên, các chất tương tự insulin có ái lực gắn kết với thụ thể giảm này không thể tránh khỏi thanh thải qua đường thận là cơ chế thanh thải chủ yếu, mặc dù RMC được giảm. Do đó, vẫn có hạn chế trong việc làm tăng đáng kể thời gian bán thải trong máu.

Trong bối cảnh này, các tác giả sáng chế đã rất nỗ lực tìm cách làm tăng thời gian bán thải trong máu của insulin. Kết quả là, các tác giả sáng chế đã phát hiện ra chất tương tự insulin mới không có trình tự insulin nguyên thể mà có trình tự insulin không phải nguyên thể có độ chuẩn in-vitro giảm và ái lực gắn kết với thụ thể insulin giảm, và do đó, mức độ thanh thải qua thận của nó có thể được giảm. Các tác giả sáng chế còn phát hiện ra rằng thời gian bán thải trong máu của insulin có thể được tăng thêm nữa bằng cách cho chất tương tự insulin liên kết với chất mang điển hình là mảnh Fc globulin miễn dịch có hiệu quả để cải thiện thời gian bán thải, từ đó thực hiện được sáng chế này.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề kỹ thuật

Mục đích của sáng chế là đề xuất chất tương tự insulin có độ chuẩn in-vitro giảm nhằm mục đích kéo dài thời gian bán thải in vivo của insulin, và thể tiếp hợp được tạo ra bằng cách liên kết chất mang vào đó.

Cụ thể là, một mục đích của sáng chế là đề xuất chất tương tự insulin có chuẩn độ insulin giảm so với dạng nguyên thể.

Một mục đích khác của sáng chế là đề xuất thể tiếp hợp chứa chất tương tự insulin được tạo ra bằng cách cho chất tương tự insulin liên kết với chất mang.

Một mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất chế phẩm insulin tác dụng kéo dài chứa thể tiếp hợp chứa chất tương tự insulin.

Một mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất phương pháp tạo ra thể tiếp hợp chứa chất tương tự insulin.

Sáng chế còn mô tả phương pháp làm tăng thời gian bán thải in vivo bằng cách sử dụng chất tương tự insulin hoặc thể tiếp hợp chứa chất tương tự insulin tạo ra được bằng cách cho chất tương tự insulin liên kết với chất mang.

Sáng chế còn mô tả phương pháp điều trị bệnh liên quan đến insulin, bao gồm bước cho đối tượng cần điều trị dùng chất tương tự insulin hoặc thể tiếp hợp chứa

chất tương tự insulin.

Giải pháp kỹ thuật

Theo một khía cạnh để đạt được các mục đích trên, sáng chế đề xuất chất tương tự insulin có chuẩn độ insulin giảm so với dạng nguyên thể, trong đó axit amin trên chuỗi B hoặc chuỗi A được biến đổi.

Theo một phương án cụ thể, sáng chế đề xuất chất tương tự insulin có ái lực gắn kết với thụ thể insulin giảm.

Theo một phương án cụ thể khác, sáng chế đề xuất chất tương tự insulin không phải nguyên thể, trong đó một axit amin được chọn từ nhóm bao gồm axit amin thứ 8, axit amin thứ 23, axit amin thứ 24, và axit amin thứ 25 trên chuỗi B và axit amin thứ 1, axit amin thứ 2, và axit amin thứ 19 trên chuỗi A trong chất tương tự insulin theo sáng chế được thay thế bằng alanin, hoặc trong đó axit amin thứ 14 trên chuỗi A được thay thế bằng axit glutamic hoặc asparagin.

Theo một phương án cụ thể khác nữa, sáng chế đề xuất chất tương tự insulin, trong đó chất tương tự insulin theo sáng chế được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO. 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34 và 36.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất thể tiếp hợp chứa chất tương tự insulin được tạo ra bằng cách cho chất tương tự insulin nêu trên liên kết với chất mang có khả năng kéo dài thời gian bán thải.

Theo một phương án cụ thể, sáng chế đề xuất thể tiếp hợp chứa chất tương tự insulin, trong đó thể tiếp hợp chứa chất tương tự insulin được tạo ra bằng cách cho (i) chất tương tự insulin nêu trên liên kết với (ii) vùng Fc globulin miễn dịch thông qua (iii) cầu nối peptit hoặc cầu nối không phải peptit được chọn từ nhóm bao gồm polyetylen glycol, polypropylen glycol, copolyme của etylen glycol-propylen glycol, rượu polyhydric được polyoxyetyl hóa, rượu polyvinyllic, polysacarit, dextran, polyvinyl etyl ete, polyme dễ phân hủy sinh học, các polyme lipid, kitin, axit hyaluronic, và hỗn hợp của chúng.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất chế phẩm insulin tác dụng

kéo dài chứa thể tiếp hợp chứa chất tương tự insulin nêu trên, trong đó thời gian lưu và độ ổn định in vivo được tăng lên.

Theo một phương án cụ thể, sáng chế đề xuất chế phẩm tác dụng kéo dài được sử dụng để điều trị bệnh đái tháo đường.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất phương pháp tạo ra thể tiếp hợp chứa chất tương tự insulin nêu trên.

Sáng chế còn mô tả phương pháp làm tăng thời gian bán thải in vivo bằng cách sử dụng chất tương tự insulin hoặc thể tiếp hợp chứa chất tương tự insulin tạo ra được bằng cách cho chất tương tự insulin liên kết với chất mang.

Sáng chế còn mô tả phương pháp điều trị bệnh liên quan đến insulin, bao gồm bước cho đối tượng cần điều trị dùng chất tương tự insulin hoặc thể tiếp hợp chứa chất tương tự insulin.

Các ưu điểm của sáng chế

Chất tương tự insulin không phải nguyên thể theo sáng chế có chuẩn độ insulin giảm và ái lực gắn kết với thụ thể insulin giảm so với dạng nguyên thể, và do đó, tránh được các cơ chế thanh thải in vivo. Do đó, chất tương tự insulin có thời gian bán thải trong máu in vivo tăng, và thể tiếp hợp chứa chất tương tự insulin-Fc globulin miễn dịch được tạo ra bằng cách tương tự có thời gian bán thải trong máu tăng đáng kể, từ đó cải thiện sự thuận tiện cho bệnh nhân cần dùng insulin.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1 thể hiện kết quả phân tích độ tinh khiết của chất tương tự insulin bằng cách điện di protein, đây là kết quả phân tích một chất tương tự insulin đại diện, cụ thể là chất tương tự số 7 (dải 1: thang đo chỉ kích thước, dải 2: insulin nguyên thể, dải 3: chất tương tự insulin (số 7));

Fig. 2 thể hiện kết quả phân tích độ tinh khiết của chất tương tự insulin bằng cách sắc ký cao áp, đây là kết quả phân tích một chất tương tự insulin đại diện, cụ

thể là chất tương tự số 7 ((A) RP-HPLC, (B) SE-HPLC);

Fig. 3 thể hiện kết quả lập bản đồ peptit của chất tương tự insulin, đây là kết quả thu được từ một chất tương tự insulin đại diện, cụ thể là chất tương tự số 7 ((A) insulin nguyên thể, (B) chất tương tự insulin (số 7));

Fig. 4 thể hiện kết quả phân tích độ tinh khiết của thể tiếp hợp chứa chất tương tự insulin-Fc globulin miễn dịch bằng cách điện di protein, đây là kết quả phân tích một chất tương tự insulin đại diện, cụ thể là chất tương tự số 7 (dải 1: chất đánh dấu kích thước, dải 2: thể tiếp hợp chứa chất tương tự insulin (số 7)-Fc globulin miễn dịch);

Fig. 5 thể hiện kết quả phân tích độ tinh khiết của thể tiếp hợp chứa chất tương tự insulin-Fc globulin miễn dịch bằng cách sắc ký cao áp, đây là kết quả phân tích một chất tương tự insulin đại diện, cụ thể là chất tương tự số 7 ((A) RP-HPLC, (B) SE-HPLC, (C) IE-HPLC); và

Fig. 6 thể hiện kết quả phân tích dược động học của thể tiếp hợp insulin nguyên thể-Fc globulin miễn dịch và thể tiếp hợp chứa chất tương tự insulin-Fc globulin miễn dịch ở chuột cống bình thường, đây là kết quả phân tích một chất tương tự insulin đại diện, cụ thể là chất tương tự số 7 (○: thể tiếp hợp insulin nguyên thể-Fc globulin miễn dịch (21,7 nmol/kg), ●: thể tiếp hợp insulin nguyên thể-Fc globulin miễn dịch (65,1 nmol/kg), □: thể tiếp hợp chứa chất tương tự insulin-Fc globulin miễn dịch (21,7 nmol/kg), ■: thể tiếp hợp chứa chất tương tự insulin-Fc globulin miễn dịch (65,1 nmol/kg). (A) thể tiếp hợp insulin nguyên thể-Fc globulin miễn dịch và thể tiếp hợp chứa chất tương tự insulin (số 7)-Fc globulin miễn dịch, (B) thể tiếp hợp insulin nguyên thể-Fc globulin miễn dịch và thể tiếp hợp chứa chất tương tự insulin (số 8)-Fc globulin miễn dịch, (C) thể tiếp hợp insulin nguyên thể-Fc globulin miễn dịch và thể tiếp hợp chứa chất tương tự insulin (số 9)-Fc globulin miễn dịch).

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề cập đến chất tương tự insulin có độ chuẩn in-vitro giảm. Chất tương tự insulin này khác biệt ở chỗ nó có trình tự insulin không phải nguyên thể và do đó, có ái lực gắn kết với thụ thể insulin giảm so với insulin nguyên thể, và nhờ đó, độ thanh thải qua trung gian thụ thể được giảm đáng kể do hằng số phân ly tăng, dẫn đến làm tăng thời gian bán thải trong máu.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “chất tương tự insulin” bao gồm các chất tương tự khác nhau có chuẩn độ insulin giảm so với dạng nguyên thể.

Chất tương tự insulin có thể là chất tương tự insulin có chuẩn độ insulin giảm so với dạng nguyên thể, trong đó axit amin trên chuỗi B hoặc chuỗi A của insulin được biến đổi. Các trình tự axit amin của insulin nguyên thể là như sau.

- Chuỗi A:

Gly-Ile-Val-Glu-Gln-Cys-Cys-Thr-Ser-Ile-Cys-Ser-Leu-Tyr-Gln-Leu-Glu-Asn-Tyr-Cys-Asn (SEQ ID NO. 37)

- Chuỗi B:

Phe-Val-Asn-Gln-His-Leu-Cys-Gly-Ser-His-Leu-Val-Glu-Ala-Leu-Tyr-Leu-Val-Cys-Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Pro-Lys-Thr (SEQ ID NO. 38)

Chất tương tự insulin được sử dụng trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế là chất tương tự insulin được tạo ra bằng kỹ thuật tái tổ hợp di truyền. Tuy nhiên, sáng chế không chỉ giới hạn ở đó, mà bao gồm tất cả các insulin có độ chuẩn in-vitro giảm. Tốt hơn là, chất tương tự insulin có thể bao gồm insulin đảo ngược, biến thể insulin, mảnh insulin hoặc các dạng tương tự, và phương pháp điều chế có thể bao gồm phương pháp pha rắn cũng như kỹ thuật tái tổ hợp di truyền, nhưng không chỉ giới hạn ở các phương pháp này.

Chất tương tự insulin là peptit giữ được chức năng kiểm soát glucoza máu trong cơ thể, giống như chức năng của insulin, và peptit này bao gồm chất chủ vận insulin, dẫn xuất, mảnh, biến thể của nó hoặc các chất tương tự.

Chất chủ vận insulin theo sáng chế được dùng để chỉ chất được gắn kết với thụ thể của insulin in vivo để biểu hiện hoạt tính sinh học giống như insulin, không phụ thuộc vào cấu trúc của insulin.

Chất tương tự insulin theo sáng chế là peptit có độ đồng nhất trình tự axit amin bằng ít nhất 80% so với chuỗi A hoặc chuỗi B của insulin nguyên thể, có một số nhóm các gốc axit amin được biến đổi ở dạng thay thế hóa học (ví dụ, alpha-methyl hóa, alpha-hydroxyl hóa), loại bỏ (ví dụ, khử amin hóa) hoặc biến đổi (ví dụ, N-methyl hóa), và có chức năng kiểm soát glucoza máu trong cơ thể. Đối với các mục đích của sáng chế, chất tương tự insulin là chất tương tự insulin có ái lực gắn kết với thụ thể insulin giảm so với dạng nguyên thể, và các chất tương tự insulin có chuẩn độ insulin giảm so với dạng nguyên thể được bao gồm mà không có giới hạn.

Miễn là chất tương tự insulin này có thể biểu hiện mức độ nội hóa qua trung gian thụ thể hoặc độ thanh thải qua trung gian thụ thể thấp, loại và kích thước của nó không bị giới hạn đặc biệt. Chất tương tự insulin, mà cơ chế thanh thải in vivo chủ yếu của nó là sự nội hóa qua trung gian thụ thể hoặc sự thanh thải qua trung gian thụ thể, là thích hợp cho các mục đích của sáng chế.

Mảnh insulin theo sáng chế là loại insulin trong đó một hoặc nhiều axit amin được bổ sung hoặc được loại bỏ, và các axit amin bổ sung có thể là axit amin không phải nguyên thể (ví dụ, axit amin loại D). Mảnh insulin này giữ được chức năng kiểm soát glucoza máu trong cơ thể.

Biến thể insulin theo sáng chế là peptit khác với insulin ở một hoặc nhiều trình tự axit amin, và giữ được chức năng kiểm soát glucoza máu trong cơ thể.

Các phương pháp tương ứng điều chế chất chủ vận, dẫn xuất, mảnh và biến thể của insulin theo sáng chế có thể được sử dụng độc lập hoặc kết hợp. Ví dụ, các peptit mà một hoặc nhiều trình tự axit amin của nó khác với trình tự axit amin của insulin và có sự khử amin hóa ở gốc axit amin đầu amino và cũng có chức năng kiểm soát glucoza máu trong cơ thể được bao gồm trong sáng chế.

Cụ thể là, chất tương tự insulin có thể là chất tương tự insulin trong đó một

hoặc nhiều axit amin được chọn từ nhóm bao gồm axit amin thứ 8, axit amin thứ 23, axit amin thứ 24, và axit amin thứ 25 trên chuỗi B và axit amin thứ 1, axit amin thứ 2, axit amin thứ 14 và axit amin thứ 19 trên chuỗi A được thay thế bằng axit amin khác, và tốt hơn là, trong đó một hoặc nhiều axit amin được chọn từ nhóm bao gồm axit amin thứ 8, axit amin thứ 23, axit amin thứ 24, và axit amin thứ 25 trên chuỗi B và axit amin thứ 1, axit amin thứ 2, và axit amin thứ 19 trên chuỗi A được thay thế bằng alanin hoặc trong đó axit amin thứ 14 trên chuỗi A được thay thế bằng axit glutamic hoặc asparagin. Ngoài ra, chất tương tự insulin có thể được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO. 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34 và 36, nhưng có thể bao gồm chất tương tự insulin bất kỳ có ái lực gắn kết với thụ thể insulin giảm mà không có giới hạn.

Theo một phương án của sáng chế, chất tương tự insulin có các trình tự SEQ ID NO. 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34 và 36, đặc biệt là, chất tương tự insulin đại diện, 7, 8, và 9 (SEQ ID NO. 32, 34, và 36) được thấy là có ái lực gắn kết với thụ thể insulin in vitro giảm so với dạng nguyên thể (Bảng 4).

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất thể tiếp hợp chứa chất tương tự insulin được tạo ra bằng cách cho chất tương tự insulin liên kết với chất mang.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “chất mang” chỉ chất có khả năng làm tăng thời gian bán thải in vivo của chất tương tự insulin được liên kết. Chất tương tự insulin theo sáng chế khác biệt ở chỗ nó có ái lực gắn kết với thụ thể insulin giảm đáng kể so với dạng nguyên thể, và tránh được việc thanh thải qua trung gian thụ thể hoặc thanh thải bởi thận. Do đó, nếu chất mang đã biết là làm tăng thời gian bán thải in vivo khi được liên kết với các polypeptit có hoạt tính sinh lý khác nhau đã biết được liên kết với chất tương tự insulin, thì hiển nhiên là thời gian bán thải in vivo có thể được cải thiện và thể tiếp hợp thu được có thể được sử dụng dưới dạng chế phẩm tác dụng kéo dài.

Ví dụ, do việc cải thiện thời gian bán thải là ưu tiên thứ nhất, nên chất mang được liên kết với insulin mới có độ chuẩn giảm không bị giới hạn ở vùng Fc globulin

miễn dịch. Chất mang bao gồm nguyên liệu tương hợp sinh học có thể kéo dài thời gian bán thải in vivo bằng cách liên kết nó với nguyên liệu tương hợp sinh học bất kỳ, có khả năng làm giảm độ thanh thải của thận, được chọn từ nhóm bao gồm các polyme khác nhau (ví dụ, polyetylen glycol và axit béo, albumin và mảnh của nó, trình tự axit amin cụ thể, v.v.), albumin và mảnh của nó, nguyên liệu gắn kết albumin, và polyme gồm các đơn vị lặp có trình tự axit amin cụ thể, kháng thể, mảnh kháng thể, nguyên liệu gắn kết FcRn, mô liên kết in vivo hoặc dẫn xuất của nó, nucleotit, fibronectin, transferin, sacarit, và polyme, nhưng không chỉ giới hạn ở các nguyên liệu này. Ngoài ra, phương pháp liên kết nguyên liệu tương hợp sinh học có khả năng kéo dài thời gian bán thải in vivo với chất tương tự insulin có độ chuẩn giảm bao gồm tái tổ hợp di truyền, tiếp hợp in vitro hoặc các phương pháp tương tự. Ví dụ về nguyên liệu tương hợp sinh học có thể bao gồm nguyên liệu gắn kết FcRn, axit béo, polyetylen glycol, mảnh axit amin, hoặc albumin. Nguyên liệu gắn kết FcRn có thể là vùng Fc globulin miễn dịch.

Chất tương tự insulin và nguyên liệu tương hợp sinh học làm chất mang có thể được liên kết với nhau thông qua cầu nối là peptit hoặc polyme không phải peptit.

Thể tiếp hợp insulin có thể là thể tiếp hợp chứa chất tương tự insulin được tạo ra bằng cách cho (i) chất tương tự insulin liên kết với (ii) vùng Fc globulin miễn dịch thông qua (iii) cầu nối peptit hoặc cầu nối không phải peptit được chọn từ nhóm bao gồm polyetylen glycol, polypropylen glycol, copolyme của etylen glycol-propylen glycol, rượu polyhydric được polyoxyetyl hóa, rượu polyvinyllic, polysacarit, dextran, polyvinyl etyl ete, polyme dễ phân huỷ sinh học, polyme lipid, kitin, axit hyaluronit và hỗn hợp của chúng.

Theo một phương án cụ thể về thể tiếp hợp chứa chất tương tự insulin theo sáng chế, cầu nối polyme không phải peptit được liên kết với đầu amino trên chuỗi B của chất tương tự insulin. Theo một phương án cụ thể khác về thể tiếp hợp theo sáng chế, cầu nối polyme không phải peptit được liên kết với gốc trên chuỗi B của chất

tương tự insulin. Việc biến đổi ở chuỗi A của insulin dẫn đến làm giảm hoạt tính và độ an toàn. Do đó, trong các phương án này, cầu nối polyme không phải peptit được liên kết với chuỗi B của insulin, từ đó duy trì được hoạt tính insulin và cải thiện độ an toàn.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “hoạt tính” có nghĩa là khả năng của insulin gắn kết với thụ thể insulin, và có nghĩa là insulin gắn kết với thụ thể của nó để biểu hiện tác dụng. Việc gắn kết của polyme không phải peptit với đầu amino trên chuỗi B của insulin theo sáng chế có thể đạt được bằng cách kiểm soát độ pH, và khoảng độ pH được ưu tiên nằm trong khoảng từ 4,5 đến 7,5.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “đầu N” có thể được sử dụng thay thế cho “vùng đầu N”.

Theo một ví dụ cụ thể, các tác giả sáng chế đã tạo ra thể tiếp hợp chứa chất tương tự insulin-PEG-Fc globulin miễn dịch bằng cách liên kết PEG với đầu N của vùng Fc globulin miễn dịch, và ghép cặp chọn lọc đầu N trên chuỗi B của insulin vào đó. Thời gian bán thải trong huyết thanh của thể tiếp hợp chứa chất tương tự insulin-PEG-Fc globulin miễn dịch này được tăng lên so với dạng không phải thể tiếp hợp, và cho thấy tác dụng làm giảm glucoza máu trong mô hình động vật bị bệnh. Do đó, hiển nhiên là có thể bào chế được chế phẩm insulin tác dụng kéo dài mới duy trì được hoạt tính in vivo.

Vùng Fc globulin miễn dịch là an toàn để sử dụng làm chất mang thuốc bởi vì nó là polypeptit dễ phân huỷ sinh học được chuyển hóa in vivo. Ngoài ra, vùng Fc globulin miễn dịch có khối lượng phân tử tương đối thấp so với toàn bộ phân tử globulin miễn dịch, và do đó, thuận lợi trong việc điều chế, tinh chế và thu thể tiếp hợp. Vùng Fc globulin miễn dịch không chứa mảnh Fab, là mảnh có tính không đồng nhất cao do có trình tự axit amin khác với các phân lớp kháng thể, và do đó, có thể mong muốn rằng vùng Fc globulin miễn dịch có thể làm tăng cao độ đồng nhất của

các chất và làm giảm tính kháng nguyên trong máu.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “vùng Fc globulin miễn dịch” chỉ protein chứa vùng ổn định của chuỗi nặng 2 (CH2) và vùng ổn định của chuỗi nặng 3 (CH3) của globulin miễn dịch, ngoại trừ các vùng biến đổi của chuỗi nặng và nhẹ, vùng ổn định của chuỗi nặng 1 (CH1) và vùng ổn định của chuỗi nhẹ 1 (CL1) của globulin miễn dịch. Vùng này có thể còn bao gồm vùng bản lề ở vùng ổn định của chuỗi nặng. Ngoài ra, vùng Fc globulin miễn dịch theo sáng chế có thể chứa một phần hoặc tất cả vùng Fc bao gồm vùng ổn định của chuỗi nặng 1 (CH1) và/hoặc vùng ổn định của chuỗi nhẹ 1 (CL1), ngoại trừ các vùng biến đổi của chuỗi nặng và nhẹ, miễn là nó có tác dụng gần như tương tự hoặc tốt hơn so với tác dụng của dạng nguyên thể. Ngoài ra, vùng này có thể là mảnh có sự mất đoạn ở phần dài tương đối của trình tự axit amin của CH2 và/hoặc CH3.

Cụ thể là, vùng Fc globulin miễn dịch theo sáng chế có thể bao gồm 1) miền CH1, miền CH2, miền CH3, và miền CH4, 2) miền CH1 và miền CH2, 3) miền CH1 và miền CH3, 4) miền CH2 và miền CH3, 5) kết hợp một hoặc nhiều miền và vùng bản lề (hoặc một phần vùng bản lề) của globulin miễn dịch, và 6) dime của mỗi miền của vùng ổn định của chuỗi nặng và vùng ổn định của chuỗi nhẹ.

Ngoài ra, vùng Fc globulin miễn dịch theo sáng chế bao gồm dẫn xuất trình tự (thể đột biến) của chúng cũng như trình tự axit amin nguyên thể. Dẫn xuất trình tự axit amin có trình tự khác so với trình tự axit amin nguyên thể do có sự mất đoạn, xen đoạn, thay thế bảo toàn hoặc không bảo toàn hoặc kết hợp các yếu tố này của một hoặc nhiều gốc axit amin. Ví dụ, trong Fc IgG, các gốc axit amin đã biết là có vai trò quan trọng trong việc gắn kết, ở các vị trí từ 214 đến 238, từ 297 đến 299, từ 318 đến 322, hoặc từ 327 đến 331, có thể được sử dụng làm đích thích hợp để biến đổi.

Ngoài ra, cũng có thể có các dẫn xuất khác nhau khác, như dẫn xuất có sự mất đoạn ở vùng có khả năng tạo thành liên kết disulfua, sự mất đoạn của một số gốc axit amin ở đầu N của dạng Fc nguyên thể, hoặc sự bổ sung gốc metionin vào đầu N của

dạng Fc nguyên thể. Ngoài ra, để làm mất chức năng hiệu ứng, thì sự mất đoạn có thể xảy ra ở vị trí gắn kết bổ thể, như vị trí gắn kết C1q và vị trí ADCC (tính độc qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể - antibody dependent cell mediated cytotoxicity). Các kỹ thuật điều chế các dẫn xuất trình tự của vùng Fc globulin miễn dịch này đã được bộc lộ trong WO 97/34631 và WO 96/32478.

Sự trao đổi axit amin trong các protein và peptit, thường không làm thay đổi hoạt tính của phân tử, là đã biết trong tình trạng kỹ thuật (H.Neurath, R.L.Hill, The Proteins, Academic Press, New York, 1979). Sự trao đổi xảy ra thường xuyên nhất là Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Thy/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu, Asp/Gly, theo cả hai hướng.

Vùng Fc, nếu cần, có thể được biến đổi bằng cách phosphoryl hóa, sulfat hóa, acrylat hóa, glycosyl hóa, metyl hóa, farnesyl hóa, axetyl hóa, amit hóa, hoặc các cách tương tự.

Các dẫn xuất Fc nêu trên là các dẫn xuất có hoạt tính sinh học giống như hoạt tính sinh học của vùng Fc theo sáng chế hoặc có độ ổn định cấu trúc cải thiện đối với nhiệt, độ pH, hoặc các yếu tố tương tự.

Ngoài ra, các vùng Fc này có thể thu được từ các dạng nguyên thể được phân lập từ người và các động vật khác bao gồm bò, dê, lợn, chuột nhắt, thỏ, chuột hamster, chuột cống và chuột lang, hoặc có thể là các thể tái tổ hợp hoặc dẫn xuất của chúng, thu được từ các tế bào động vật hoặc vi sinh vật được biến nạp. Trong bản mô tả này, chúng có thể thu được từ globulin miễn dịch nguyên thể bằng cách tách toàn bộ globulin miễn dịch khỏi cơ thể người hoặc động vật và xử lý chúng bằng enzym phân giải protein. Papain phân cắt globulin miễn dịch nguyên thể thành vùng Fab và Fc, và việc xử lý bằng pepsin dẫn đến tạo ra pF'c và F(ab)₂. Các mảnh này có thể được đưa vào sắc ký loại cỡ để tách Fc hoặc pF'c.

Tốt hơn là, vùng Fc có nguồn gốc từ người là vùng Fc globulin miễn dịch tái tổ hợp thu được từ vi sinh vật.

Ngoài ra, vùng Fc globulin miễn dịch có thể ở dạng có các chuỗi đường nguyên thể, các chuỗi đường kéo dài so với dạng nguyên thể hoặc các chuỗi đường rút ngắn so với dạng nguyên thể, hoặc có thể ở dạng loại glycosyl. Việc kéo dài, rút ngắn hoặc loại bỏ các chuỗi đường của Fc globulin miễn dịch có thể thực hiện được bằng các phương pháp thông thường trong lĩnh vực, như phương pháp hóa học, phương pháp enzym và phương pháp dùng kỹ thuật di truyền bằng cách sử dụng vi sinh vật. Trong bản mô tả này, việc loại bỏ các chuỗi đường khỏi vùng Fc dẫn đến sự giảm rõ rệt ái lực gắn kết với bổ thể (C1q) và giảm hoặc mất tính độc qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể hoặc tính độc tế bào phụ thuộc bổ thể, từ đó không gây ra đáp ứng miễn dịch không cần thiết trên in-vivo. Về vấn đề này, vùng Fc globulin miễn dịch ở dạng loại glycosyl hoặc không glycosyl hóa có thể thích hợp làm chất mang thuốc hơn nhằm mục đích của sáng chế.

Thuật ngữ "loại glycosyl", được sử dụng trong bản mô tả này, có nghĩa là việc loại bỏ bằng enzym các gốc đường khỏi vùng Fc, và thuật ngữ "không glycosyl hóa" có nghĩa là vùng Fc được tạo ra ở dạng không được glycosyl hóa bằng sinh vật chưa có nhân điển hình, tốt hơn là *E. coli*.

Mặt khác, vùng Fc globulin miễn dịch có thể có nguồn gốc từ người hoặc các động vật khác bao gồm bò, dê, lợn, chuột nhắt, thỏ, chuột hamster, chuột cống và chuột lang, và tốt hơn là người. Ngoài ra, vùng Fc globulin miễn dịch có thể là vùng Fc có nguồn gốc từ IgG, IgA, IgD, IgE và IgM, hoặc được tạo ra nhờ sự kết hợp của chúng hoặc các thể lai của chúng. Tốt hơn là, vùng này có nguồn gốc từ IgG hoặc IgM, là một trong số các protein có nhiều nhất trong máu người, và tốt nhất là từ IgG, đã được biết là làm tăng thời gian bán thải của các protein gắn kết phối tử.

Mặt khác, thuật ngữ "kết hợp", được sử dụng trong bản mô tả này, có nghĩa là các polypeptit mã hóa vùng Fc globulin miễn dịch đơn chuỗi có cùng nguồn gốc được liên kết với polypeptit đơn chuỗi có nguồn gốc khác để tạo thành dime hoặc multime. Cụ thể, dime hoặc multime có thể được tạo ra từ hai hoặc nhiều mảnh được chọn từ nhóm bao gồm các mảnh IgG Fc, IgA Fc, IgM Fc, IgD Fc, và IgE Fc.

Thuật ngữ "thể lai", được sử dụng trong bản mô tả này, có nghĩa là các trình tự mã hóa hai hoặc nhiều vùng Fc globulin miễn dịch có nguồn gốc khác nhau có mặt trong vùng Fc globulin miễn dịch đơn chuỗi. Theo sáng chế, nhiều loại thể lai có thể được sử dụng. Cụ thể là, các miền lai có thể được cấu thành từ một đến bốn miền được chọn từ nhóm bao gồm CH1, CH2, CH3 và CH4 của IgG Fc, IgM Fc, IgA Fc, IgE Fc và IgD Fc, và có thể bao gồm vùng bản lề.

Mặt khác, IgG được chia thành các phân lớp IgG1, IgG2, IgG3 và IgG4, và sáng chế bao gồm các kết hợp và các thể lai của chúng. Ưu tiên phân lớp IgG2 và IgG4, và ưu tiên hơn là vùng Fc của IgG4 có rất ít chức năng hiệu ứng như CDC (complement dependent cytotoxicity - tính độc tế bào phụ thuộc bổ thể). Cụ thể, khi làm chất mang thuốc theo sáng chế, vùng Fc globulin miễn dịch được ưu tiên hơn cả là vùng Fc không được glycosyl hóa có nguồn gốc từ IgG4 của người. Vùng Fc có nguồn gốc từ người có thể được ưu tiên hơn so với vùng Fc có nguồn gốc không phải từ người, vùng này có thể tác động như là kháng nguyên trong cơ thể người và gây ra đáp ứng miễn dịch không mong muốn như tạo ra kháng thể mới kháng lại kháng nguyên.

Theo phương án cụ thể về thể tiếp hợp chứa chất tương tự insulin, cả hai đầu của polyme không phải peptit có thể được liên kết lần lượt với đầu N của vùng Fc globulin miễn dịch và nhóm amin của đầu N trên chuỗi B của chất tương tự insulin hoặc nhóm ϵ -amino hoặc nhóm thiol của gốc lysin nội trên chuỗi B.

Vùng Fc-cầu nối-chất tương tự insulin theo sáng chế được tạo ra ở các tỷ lệ mol khác nhau. Tức là, số lượng mảnh Fc và/hoặc cầu nối được liên kết với một chất tương tự insulin không bị giới hạn.

Ngoài ra, liên kết của vùng Fc, cầu nối nhất định, và chất tương tự insulin theo sáng chế có thể bao gồm tất cả các loại liên kết đồng hóa trị và tất cả các loại liên kết không đồng hóa trị như liên kết hydro, tương tác ion, lực van der Waals và các tương tác kỵ nước khi vùng Fc và chất tương tự insulin được biểu hiện dưới dạng

protein dung hợp bằng cách tái tổ hợp di truyền. Tuy nhiên, đối với hoạt tính sinh lý của chất tương tự insulin, liên kết này tốt hơn là được tạo ra bằng liên kết đồng hóa trị, nhưng không chỉ giới hạn ở đó.

Mặt khác, vùng Fc theo sáng chế, cầu nối nhất định và chất tương tự insulin có thể được liên kết với nhau ở đầu N hoặc đầu C, và tốt hơn là ở nhóm tự do, và đặc biệt là, liên kết cộng hóa trị có thể được tạo ra ở đầu amino, gốc axit amin của lysin, gốc axit amin của histidin, hoặc gốc cystein tự do.

Ngoài ra, liên kết của vùng Fc theo sáng chế, cầu nối nhất định, và chất tương tự insulin có thể được tạo ra theo hướng nhất định. Tức là, cầu nối này có thể được liên kết với đầu N, đầu C hoặc nhóm tự do của vùng Fc globulin miễn dịch, và cũng có thể được liên kết với đầu N, đầu C hoặc nhóm tự do của chất tương tự insulin.

Cầu nối không phải peptit có thể được liên kết với nhóm amin đầu N của mảnh globulin miễn dịch, và không chỉ giới hạn ở gốc lysin hoặc gốc cystein bất kỳ của trình tự mảnh globulin miễn dịch.

Ngoài ra, theo phương án cụ thể về thể tiếp hợp chứa chất tương tự insulin, đầu của polyme không phải peptit có thể được liên kết với gốc axit amin nội hoặc nhóm phản ứng tự do có khả năng gắn kết với nhóm phản ứng ở đầu của polyme không phải peptit, ngoài đầu N của vùng Fc globulin miễn dịch, nhưng không chỉ giới hạn ở đó.

Theo sáng chế, polyme không phải peptit có nghĩa là polyme tương hợp sinh học bao gồm hai hoặc nhiều đơn vị lặp được liên kết với nhau, trong đó các đơn vị lặp được liên kết bằng liên kết cộng hóa trị bất kỳ ngoại trừ liên kết peptit. Polyme không phải peptit như vậy có thể có hai đầu hoặc ba đầu.

Polyme không phải peptit có thể được sử dụng trong sáng chế này có thể được chọn từ nhóm bao gồm polyetylen glycol, polypropylen glycol, copolyme của etylen glycol và propylen glycol, rượu polyhydric được polyoxyetyl hóa, rượu polyvinyl, polysacarit, dextran, ete polyvinyl etyl, polyme dễ phân hủy sinh học, chẳng hạn

PLA (poly(axit lactic)) và PLGA (axit polylactic-glycolic), polyme lipit, chitin, axit hyaluronic, và hỗn hợp của chúng, và tốt hơn là, polyetylen glycol. Các dẫn xuất của chúng đã được biết trong lĩnh vực và được chuyên gia trong lĩnh vực điều chế dễ dàng cũng được bao gồm trong phạm vi của sáng chế này.

Cầu nối peptit được sử dụng trong protein dung hợp thu được bằng phương pháp dung hợp cùng khuôn thông thường có hạn chế là nó dễ dàng bị tách trên in-vivo bằng enzym phân giải protein, và do đó không thể đạt được hiệu quả tăng thời gian bán thải của hoạt chất trong máu một cách đầy đủ bằng chất mang như mong đợi. Tuy nhiên, theo sáng chế, thể tiếp hợp có thể được tạo ra bằng cách sử dụng cầu nối không phải peptit cũng như cầu nối peptit. Đối với cầu nối không phải peptit, polyme có tính chống chịu enzym phân giải protein có thể được sử dụng để duy trì thời gian bán thải của peptit trong máu tương tự như với chất mang. Do đó, polyme không phải peptit bất kỳ có thể được sử dụng mà không có giới hạn, chỉ cần nó là polyme có chức năng nêu trên, cụ thể là polyme có tính chống chịu enzym phân giải protein in-vivo. Polyme không phải peptit có khối lượng phân tử nằm trong khoảng từ 1 đến 100 kDa, và tốt hơn là, nằm trong khoảng từ 1 đến 20 kDa.

Polyme không phải peptit theo sáng chế, được liên kết với vùng Fc globulin miễn dịch, có thể là một polyme hoặc hỗn hợp các loại polyme khác nhau.

Polyme không phải peptit được sử dụng theo sáng chế có nhóm phản ứng có khả năng gắn kết với vùng Fc globulin miễn dịch và thuốc chứa protein.

Polyme không phải peptit này có nhóm phản ứng ở cả hai đầu, tốt hơn là được chọn từ nhóm bao gồm nhóm aldehyt phản ứng, nhóm propionaldehyt, nhóm butyraldehyt, nhóm maleimit và dẫn xuất succinimit. Dẫn xuất succinimit có thể là succinimidyl propionat, hydroxy succinimidyl, succinimidyl carboxymetyl, hoặc succinimidyl cacbonat. Đặc biệt là khi polyme không phải peptit có nhóm aldehyt phản ứng ở cả hai đầu của chúng, nó có hiệu quả trong việc liên kết ở cả hai đầu với polypeptit có hoạt tính sinh lý và globulin miễn dịch bằng các phản ứng không đặc hiệu tối thiểu. Sản phẩm cuối cùng được tạo ra bằng cách alkyl hóa khử bằng liên kết

aldehyt là ổn định hơn nhiều so với khi được liên kết bằng liên kết amit. Nhóm phản ứng aldehyt gắn kết chọn lọc với đầu N ở độ pH thấp, và gắn với gốc lysin để tạo thành liên kết cộng hóa trị ở độ pH cao, ví dụ như độ pH=9,0.

Các nhóm phản ứng ở cả hai đầu của polyme không phải peptit có thể giống nhau hoặc khác nhau. Ví dụ, polyme không phải peptit có thể có nhóm maleimide ở một đầu và ở đầu kia là nhóm aldehyt, nhóm propionaldehyt hoặc nhóm butyraldehyt. Khi polyetylen glycol có nhóm hydroxy phản ứng ở cả hai đầu của nó được sử dụng làm polyme không phải peptit, thì nhóm hydroxy này có thể được hoạt hóa thành các nhóm phản ứng khác nhau bằng các phản ứng hóa học đã biết, hoặc polyetylen glycol có nhóm phản ứng cải biến có trên thị trường có thể được sử dụng để tạo ra thể tiếp hợp chứa chất tương tự insulin đơn chuỗi theo sáng chế.

Thể tiếp hợp chứa chất tương tự insulin theo sáng chế duy trì hoạt tính in vivo của insulin thông thường như chuyển hóa năng lượng và chuyển hóa đường, và còn làm tăng thời gian bán thải trong máu của chất tương tự insulin và tăng rõ rệt thời gian hiệu lực in-vivo của peptit, và do đó, thể tiếp hợp này là hữu ích trong việc điều trị bệnh đái tháo đường.

Trong một ví dụ của sáng chế, đã xác nhận rằng chất tương tự insulin có ái lực gắn kết với thụ thể insulin giảm thể hiện thời gian bán thải in vivo cao hơn nhiều so với thể tiếp hợp insulin nguyên thể, khi được liên kết với chất mang có khả năng kéo dài thời gian bán thải in vivo (Fig. 6).

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất chế phẩm insulin tác dụng kéo dài chứa thể tiếp hợp chứa chất tương tự insulin. Chế phẩm insulin tác dụng kéo dài này có thể là chế phẩm insulin tác dụng kéo dài có thời gian lưu và độ ổn định in vivo tăng. Chế phẩm tác dụng kéo dài này có thể là dược phẩm để điều trị bệnh đái tháo đường.

Dược phẩm chứa thể tiếp hợp theo sáng chế có thể chứa chất mang dược dụng. Để dùng qua đường miệng, chất mang dược dụng có thể bao gồm chất kết dính, chất làm trơn chảy, chất phân rã, tá dược, chất làm tăng độ tan, chất phân tán, chất ổn định, chất tạo hỗn dịch, chất màu, chất tạo hương hoặc các chất tương tự. Đối với chế phẩm để tiêm, chất mang dược dụng có thể bao gồm chất đệm, chất bảo quản, chất giảm đau, chất làm tăng độ tan, chất đẳng trương, và chất ổn định. Đối với chế phẩm để dùng tại chỗ, chất mang dược dụng có thể bao gồm chất nền, tá dược, chất làm trơn chảy, chất bảo quản hoặc các chất tương tự. Dược phẩm theo sáng chế này có thể được bào chế thành nhiều dạng liều cùng với các chất mang dược dụng nêu trên. Ví dụ, để dùng qua đường miệng, dược phẩm này có thể được bào chế thành viên nén, viên ngậm dẹt, viên nang, cồn thuốc, hỗn dịch, xirô hoặc viên nhện. Đối với chế phẩm để tiêm, dược phẩm này có thể được bào chế thành ống đơn liều hoặc vật chứa nhiều liều. Dược phẩm này cũng có thể được bào chế thành dạng dung dịch, hỗn dịch, viên nén, viên tròn, viên nang và chế phẩm giải phóng duy trì.

Mặt khác, các ví dụ về chất mang, tá dược và chất pha loãng thích hợp đối với chế phẩm này bao gồm lactoza, dextroza, sucroza, sorbitol, manitol, xylitol, erythritol, maltitol, tinh bột, acaxia, alginat, gelatin, canxi phosphat, canxi silicat, xenluloza, metylxenluloza, xenluloza vi tinh thể, polyvinylpyrrolidon, nước, metylhydroxybenzoat, propylhydroxybenzoat, talc, magie stearat, dầu khoáng hoặc các chất tương tự.

Ngoài ra, dược phẩm này có thể còn chứa chất độn, chất chống kết tụ, chất làm trơn chảy, chất giữ ẩm, chất tạo hương, chất kháng khuẩn hoặc các chất tương tự.

Sáng chế còn mô tả phương pháp điều trị bệnh liên quan đến insulin, bao gồm bước cho đối tượng cần điều trị dùng chất tương tự insulin hoặc thể tiếp hợp chứa chất tương tự insulin.

Thể tiếp hợp theo sáng chế là hữu ích trong việc điều trị bệnh đái tháo đường, và do đó, bệnh này có thể được điều trị bằng cách dùng dược phẩm chứa thể tiếp

hợp này.

Thuật ngữ "dùng", được sử dụng trong bản mô tả này, có nghĩa là việc cho bệnh nhân dùng chất đã định trước bằng phương pháp thích hợp nhất định. Thẻ tiếp hợp theo sáng chế có thể được dùng qua các đường thông thường bất kỳ, miễn là nó có thể đến được mô mong muốn. Việc dùng trong màng bụng, trong tĩnh mạch, trong cơ, dưới da, trong da, qua đường miệng, tại chỗ, trong mũi, trong phổi và trong trực tràng có thể được thực hiện, nhưng sáng chế không chỉ giới hạn ở các đường này. Tuy nhiên, do các peptit bị phân cắt khi dùng qua đường miệng, hoạt chất trong chế phẩm để dùng qua đường miệng cần được bao hoặc được bào chế để bảo vệ chống lại sự phân hủy trong dạ dày. Tốt hơn là, dược phẩm này có thể được dùng ở dạng đề tiêm. Ngoài ra, dược phẩm này có thể được dùng bằng cách sử dụng một số thiết bị có khả năng vận chuyển hoạt chất vào trong tế bào đích.

Ngoài ra, dược phẩm theo sáng chế có thể được xác định bởi một số yếu tố liên quan bao gồm loại bệnh cần điều trị, đường dùng, tuổi, giới tính, thể trọng của bệnh nhân và mức độ nghiêm trọng của bệnh, cũng như bởi loại hoạt chất thuốc. Do dược phẩm theo sáng chế có thời gian lưu in vivo và độ chuẩn tuyệt vời, nên nó có ưu điểm là làm giảm đáng kể tần suất dùng dược phẩm theo sáng chế.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất phương pháp tạo ra thẻ tiếp hợp chứa chất tương tự insulin, bao gồm bước điều chế chất tương tự insulin; điều chế chất mang; và cho chất tương tự insulin liên kết với chất mang.

Sáng chế còn mô tả phương pháp làm tăng thời gian bán thải in vivo bằng cách sử dụng chất tương tự insulin hoặc thẻ tiếp hợp chứa chất tương tự insulin tạo ra được bằng cách cho chất tương tự insulin liên kết với chất mang.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Dưới đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn bằng các ví dụ. Tuy nhiên, các ví dụ này chỉ nhằm mục đích minh họa, và sáng chế không bị giới hạn ở các ví dụ này.

Ví dụ 1: Tạo vector biểu hiện chất tương tự insulin đơn chuỗi

Để tạo ra các chất tương tự insulin, mỗi trong số chúng có axit amin biến đổi ở chuỗi A hoặc chuỗi B, bằng cách sử dụng vector biểu hiện insulin nguyên thể làm khuôn mẫu, các oligonucleotit xuôi và ngược được tổng hợp (Bảng 2), và sau đó, PCR được thực hiện để khuếch đại mỗi gen của chất tương tự.

Trong Bảng 1 sau đây, các trình tự axit amin được biến đổi ở chuỗi A hoặc chuỗi B và tên chất tương tự được đưa ra. Tức là, chất tương tự 1 thể hiện rằng glyxin thứ 1 trên chuỗi A được thế bằng alanin, và chất tương tự 4 thể hiện rằng glyxin thứ 8 trên chuỗi B được thế bằng alanin.

Bảng 1

Chất tương tự	Trình tự được biến đổi
Chất tương tự 1	A ¹ G → A
Chất tương tự 2	A ² I → A
Chất tương tự 3	A ¹⁹ Y → A
Chất tương tự 4	B ⁸ G → A
Chất tương tự 5	B ²³ G → A
Chất tương tự 6	B ²⁴ F → A
Chất tương tự 7	B ²⁵ F → A
Chất tương tự 8	A ¹⁴ Y → E
Chất tương tự 9	A ¹⁴ Y → N

Các đoạn mã để khuếch đại chất tương tự insulin được đưa ra trong Bảng 2 sau.

Bảng 2

Chất tương tự	Trình tự	SEQ ID NO.
Chất tương tự 1	5' GGGTCCCTGCAGAAGCGTGCGATTGTGGAACAATGCTGT 3'	SEQ ID NO.1
	5' ACAGCATTGTTCCACAATCGCACGCTTCTGCAGGGACCC 3'	SEQ ID NO.2
Chất tương tự 2	5' TCCCTGCAGAAGCGTGGCGCGGTGGAACAATGCTGTACC 3'	SEQ ID NO.3
	5' GGTACAGCATTGTTCCACCGCGCCACGCTTCTGCAGGGA 3'	SEQ ID NO.4
Chất tương tự 3	5' CTCTACCAGCTGGAAAACGCGTGTAAGTGAAGATCC 3'	SEQ ID NO.5
	5' GGATCCTCAGTTACACGCGTTTTCCAGCTGGTAGAG 3'	SEQ ID NO.6
Chất tương tự 4	5' GTTAACCAACACTTGTGTGCGTCACACCTGGTGGAAAGCT 3'	SEQ ID NO.7
	5' AGCTTCCACCAGGTGTGACGCACACAAGTGTGGTTAAC 3'	SEQ ID NO.8
Chất tương tự 5	5' CTAGTGTGCGGGGAACGAGCGTTCTTCTACACACCCAAG 3'	SEQ ID NO.9
	5' CTTGGGTGTGTAGAAGAAGCGCTCGTTCCCCGCACACTAG 3'	SEQ ID NO.10
Chất tương tự 6	5' GTGTGCGGGGAACGAGGCGCGTTCTACACACCCAAGACC 3'	SEQ ID NO.11
	5' GGTCTTGGGTGTGTAGAAGCGCCTCGTTCCCCGCACAC 3'	SEQ ID NO.12
Chất tương tự 7	5' TGCAGGGGAACGAGGCTTCGCGTACACACCCAAGACCCGC 3'	SEQ ID NO.13
	5' GCGGGTCTTGGGTGTGTACGCGAAGCCTCGTTCCCCGCA 3'	SEQ ID NO.14
Chất tương tự 8	5'-CCAGCATCTGCTCCCTCGAACAGCTGGAGAACTACTG-3'	SEQ ID NO.15
	5'-Cagtagttctccagctgttcgagggagcagatgctgg-3'	SEQ ID NO.16
Chất tương tự 9	5'-CAGCATCTGCTCCCTCAACCAGCTGGAGAACTAC-3'	SEQ ID NO.17
	5'-Gtagttctccagctggttgagggagcagatgctg-3'	SEQ ID NO.18

PCR để khuếch đại chất tương tự insulin được thực hiện dưới các điều kiện là 95°C trong 30 giây, 55°C trong 30 giây, 68°C trong 6 phút trong 18 chu kỳ. Các mảnh chất tương tự insulin thu được dưới các điều kiện được cài xen vào vector pET22b để được biểu hiện dưới dạng thể vùi nội bào, và vector biểu hiện thu được được gọi là các chất tương tự insulin pET22b 1 đến 9. Các vector biểu hiện chứa axit nucleic mã hóa trình tự axit amin của các chất tương tự insulin 1 đến 9 dưới sự kiểm

soát của trình tự khởi động T7, và các protein chất tương tự insulin được biểu hiện dưới dạng thể vùi trong các tế bào chủ.

Trình tự ADN và trình tự protein của các chất tương tự insulin 1 đến 9 được đưa ra trong Bảng 3 sau.

Bảng 3

Chất tương tự	Trình tự		SEQ ID NO.
Chất tương tự 1	ADN	TTC GTT AAC CAA CAC TTG TGT GGC TCA CAC CTG GTG GAA GCT CTC TAC CTA GTG TGC GGG GAA CGA GGC TTC TTC TAC ACA CCC AAG ACC CGC CGG GAG GCA GAG GAC CTG CAG GTG GGG CAG GTG GAG CTG GGC GGG GGC CCT GGT GCA GGC AGC CTG CAG CCC TTG GCC CTG GAG GGG TCC CTG CAG AAG CGT GCG ATT GTG GAA CAA TGC TGT ACC AGC ATC TGC TCC CTC TAC CAG CTG GAG AAC TAC TGC AAC	19
	Protein	Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Ala Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn	20
Chất tương tự 2	ADN	TTC GTT AAC CAA CAC TTG TGT GGC TCA CAC CTG GTG GAA GCT CTC TAC CTA GTG TGC GGG GAA CGA GGC TTC TTC TAC ACA CCC AAG ACC CGC CGG GAG GCA GAG GAC CTG CAG GTG GGG CAG GTG GAG CTG GGC GGG GGC CCT GGT GCA GGC AGC CTG CAG CCC TTG GCC CTG GAG GGG TCC CTG CAG AAG CGT GGC GCG GTG GAA CAA TGC TGT ACC AGC ATC TGC TCC CTC TAC CAG CTG GAG AAC TAC TGC AAC	21
	Protein	Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ala Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn	22
Chất tương tự 3	ADN	TTC GTT AAC CAA CAC TTG TGT GGC TCA CAC CTG GTG GAA GCT CTC TAC CTA GTG TGC GGG GAA CGA GGC TTC TTC TAC ACA CCC AAG ACC CGC CGG GAG GCA GAG GAC CTG CAG GTG GGG CAG GTG GAG CTG GGC GGG GGC CCT GGT GCA GGC AGC CTG CAG CCC TTG GCC CTG GAG GGG TCC CTG CAG AAG CGT GGC ATT GTG GAA CAA TGC TGT ACC AGC ATC TGC TCC CTC TAC CAG CTG GAG AAC GCG TGC AAC	23
	Protein	Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Ala Cys Asn	24

Chất tương tự 4	ADN	TTC GTT AAC CAA CAC TTG TGT GCG TCA CAC CTG GTG GAA GCT CTC TAC CTA GTG TGC GGG GAA CGA GGC TTC TTC TAC ACA CCC AAG ACC CGC CGG GAG GCA GAG GAC CTG CAG GTG GGG CAG GTG GAG CTG GGC GGG GGC CCT GGT GCA GGC AGC CTG CAG CCC TTG GCC CTG GAG GGG TCC CTG CAG AAG CGT GGC ATT GTG GAA CAA TGC TGT ACC AGC ATC TGC TCC CTC TAC CAG CTG GAG AAC TAC TGC AAC	25
	Protein	Phe Val Asn Gln His Leu Cys Ala Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn	26
Chất tương tự 5	ADN	TTC GTT AAC CAA CAC TTG TGT GGC TCA CAC CTG GTG GAA GCT CTC TAC CTA GTG TGC GGG GAA CGA GCG TTC TTC TAC ACA CCC AAG ACC CGC CGG GAG GCA GAG GAC CTG CAG GTG GGG CAG GTG GAG CTG GGC GGG GGC CCT GGT GCA GGC AGC CTG CAG CCC TTG GCC CTG GAG GGG TCC CTG CAG AAG CGT GGC ATT GTG GAA CAA TGC TGT ACC AGC ATC TGC TCC CTC TAC CAG CTG GAG AAC TAC TGC AAC	27
	Protein	Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Ala Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn	28
Chất tương tự 6	ADN	TTC GTT AAC CAA CAC TTG TGT GGC TCA CAC CTG GTG GAA GCT CTC TAC CTA GTG TGC GGG GAA CGA GGC GCG TTC TAC ACA CCC AAG ACC CGC CGG GAG GCA GAG GAC CTG CAG GTG GGG CAG GTG GAG CTG GGC GGG GGC CCT GGT GCA GGC AGC CTG CAG CCC TTG GCC CTG GAG GGG TCC CTG CAG AAG CGT GGC ATT GTG GAA CAA TGC TGT ACC AGC ATC TGC TCC CTC TAC CAG CTG GAG AAC TAC TGC AAC	29
	Protein	Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Ala Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn	30

Chất tương tự 7	ADN	TTC GTT AAC CAA CAC TTG TGT GGC TCA CAC CTG GTG GAA GCT CTC TAC CTA GTG TGC GGG GAA CGA GGC TTC GCG TAC ACA CCC AAG ACC CGC CGG GAG GCA GAG GAC CTG CAG GTG GGG CAG GTG GAG CTG GGC GGG GGC CCT GGT GCA GGC AGC CTG CAG CCC TTG GCC CTG GAG GGG TCC CTG CAG AAG CGT GGC ATT GTG GAA CAA TGC TGT ACC AGC ATC TGC TCC CTC TAC CAG CTG GAG AAC TAC TGC AAC	31
	Protein	Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Ala Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn	32
Chất tương tự 8	ADN	TTC GTT AAC CAA CAC TTG TGT GGC TCA CAC CTG GTG GAA GCT CTC TAC CTA GTG TGC GGG GAA CGA GGC TTC TTC TAC ACA CCC AAG ACC CGC CGG GAG GCA GAG GAC CTG CAG GTG GGG CAG GTG GAG CTG GGC GGG GGC CCT GGT GCA GGC AGC CTG CAG CCC TTG GCC CTG GAG GGG TCC CTG CAG AAG CGT GGC ATT GTG GAA CAA TGC TGT ACC AGC ATC TGC TCC CTC GAA CAG CTG GAG AAC TAC TGC AAC TGA	33
	Protein	Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Glu Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn	34
Chất tương tự 9	ADN	TTC GTT AAC CAA CAC TTG TGT GGC TCA CAC CTG GTG GAA GCT CTC TAC CTA GTG TGC GGG GAA CGA GGC TTC TTC TAC ACA CCC AAG ACC CGC CGG GAG GCA GAG GAC CTG CAG GTG GGG CAG GTG GAG CTG GGC GGG GGC CCT GGT GCA GGC AGC CTG CAG CCC TTG GCC CTG GAG GGG TCC CTG CAG AAG CGT GGC ATT GTG GAA CAA TGC TGT ACC AGC ATC TGC TCC CTC AAC CAG CTG GAG AAC TAC TGC AAC TGA	35
	Protein	Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Asn Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn	36

Ví dụ 2: Biểu hiện peptit dung hợp chất tương tự insulin tái tổ hợp

Việc biểu hiện các chất tương tự insulin tái tổ hợp được thực hiện dưới sự kiểm soát của trình tự khởi động T7. E.coli BL21-DE3 (E. coli B F-dcm ompT hsdS(rB-mB-) gal λDE3); Novagen) được biến đổi bằng mỗi trong số các vector biểu

hiện chất tương tự insulin tái tổ hợp. Việc biến đổi được thực hiện theo quy trình thực hiện được khuyến cáo (Novagen). Các khuẩn lạc đơn được biến đổi bằng mỗi vector biểu hiện tái tổ hợp được thu lại và gây nhiễm trong canh 2X Luria Broth (LB) chứa ampicillin (50 µg/ml) và được nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C trong 15 giờ. Môi trường canh nuôi cấy chủng tái tổ hợp và môi trường 2X LB chứa 30% glyxerol được trộn ở tỷ lệ 1:1 (thể tích/thể tích). Mỗi 1 ml được phân phối vào ống cryo và được bảo quản ở nhiệt độ -140°C, các ống này được sử dụng làm nguồn dự trữ tế bào để sản xuất protein dung hợp tái tổ hợp.

Để biểu hiện chất tương tự insulin tái tổ hợp, 1 lọ của mỗi nguồn dự trữ tế bào được làm tan đá và được gây nhiễm trong 500 ml canh 2X Luria Broth, và được nuôi cấy kết hợp lắc ở nhiệt độ 37°C trong 14~16 giờ. Việc nuôi cấy được ngừng lại khi OD600 đạt tới 5,0 hoặc cao hơn. Canh nuôi cấy được sử dụng làm canh nuôi cấy mầm. Canh nuôi cấy mầm này được gây nhiễm vào thùng lên men dung tích 50 l (MSJ-U2, B.E.MARUBISHI, Nhật Bản) chứa 17 l môi trường lên men, và quá trình lên men thùng đầu tiên được khởi động. Các điều kiện nuôi cấy được duy trì ở nhiệt độ 37°C, tốc độ luồng khí là 20 l/phút (1 vvm), tốc độ khuấy là 500 vòng/phút, và ở độ pH 6,70 bằng cách sử dụng dung dịch amoniac 30%. Quá trình lên men được thực hiện ở chế độ mẻ có cấp dinh dưỡng bằng cách bổ sung dung dịch nuôi dưỡng, khi chất dinh dưỡng bị cạn kiệt trong canh nuôi cấy. Sự sinh trưởng của chủng được giám sát bằng giá trị OD. IPTG được đưa vào với nồng độ cuối là 500 µM, khi giá trị OD cao hơn 100. Sau khi đưa vào, việc nuôi cấy được thực hiện tiếp trong khoảng 23~25 giờ. Sau khi kết thúc việc nuôi cấy, các chủng tái tổ hợp được thu lại bằng cách ly tâm và được bảo quản ở nhiệt độ -80°C cho đến khi sử dụng.

Ví dụ 3: Thu hồi và tái gấp cuộn chất tương tự insulin tái tổ hợp

Để thay đổi các chất tương tự insulin tái tổ hợp được biểu hiện trong ví dụ 2 thành các dạng hòa tan, các tế bào được phá vỡ, sau đó tái gấp cuộn. 100 g (khối lượng ẩm) của hạt tế bào được tạo hỗn dịch lại trong 1 l dung dịch đệm gây tan (50

mM Tris-HCl (độ pH 9,0), 1 mM EDTA (độ pH 8,0), 0,2 M NaCl và 0,5% Triton X-100). Các tế bào được phá vỡ bằng cách sử dụng thiết bị xử lý vi lỏng hóa M-110EH (AC Technology Corp. Model M1475C) ở áp suất vận hành là 15.000 psi. Sau đó, dịch tan tế bào đã bị phá vỡ được ly tâm ở 7.000 vòng/phút và 4°C trong 20 phút. Loại bỏ dịch nổi và tạo hỗn dịch lại các hạt trong 3 l dung dịch đệm rửa (0,5% Triton X-100 và 50 mM Tris-HCl (độ pH 8,0), 0,2 M NaCl, 1 mM EDTA). Sau khi ly tâm ở 7.000 vòng/phút và 4°C trong 20 phút, tạo hỗn dịch lại các hạt tế bào trong nước cất, tiếp theo ly tâm theo cách giống như trên. Hạt thu được từ đó được tạo hỗn dịch lại trong 400 ml dung dịch đệm (1 M Glyxin, 3,78 g Xystein-HCl, độ pH 10,6) và khuấy ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ. Để thu lại chất tương tự insulin tái tổ hợp đã tạo hỗn dịch lại, 400 ml ure 8M được bổ sung và khuấy ở nhiệt độ 40°C trong 1 giờ. Để tái gấp cuộn chất tương tự insulin tái tổ hợp hoà tan, tiến hành ly tâm ở 7.000 vòng/phút và 4°C trong 30 phút, và thu dịch nổi. 2 l nước cất được bổ sung vào đó bằng cách sử dụng bơm nhu động ở tốc độ dòng là 1000 ml/giờ đồng thời khuấy ở nhiệt độ 4°C trong 16 giờ.

Ví dụ 4: Tinh chế bằng sắc ký gắn kết cation

Mẫu được tái gấp cuộn được nạp lên trên cột Source S (GE healthcare) được làm cân bằng bằng dung dịch đệm natri xitrat 20 mM (độ pH 2,0) chứa etanol 45%, và sau đó, rửa giải protein tương tự insulin trong 10 thể tích cột với gradient tuyến tính từ 0% đến 100% dung dịch đệm natri xitrat 20 mM (độ pH 2,0) chứa kali clorua 0,5 M và etanol 45%.

Ví dụ 5: Xử lý bằng trypsin và carboxypeptidaza B

Các muối được loại bỏ khỏi các mẫu rửa giải bằng cách sử dụng cột tách muối, và dung dịch đệm này được trao đổi bằng dung dịch đệm (10 mM Tris-HCl, độ pH 8,0). Đối với protein mẫu thu được, trypsin tương ứng với 1000 tỷ lệ mol và carboxypeptidaza B tương ứng với 2000 tỷ lệ mol được bổ sung, và sau đó, khuấy ở

nhệt độ 16°C trong 16 giờ. Để kết thúc phản ứng, natri xitrat 1 M (độ pH 2,0) được sử dụng để làm giảm độ pH xuống 3,5.

Ví dụ 6: Tinh chế bằng sắc ký gắn kết cation

Mẫu đã phản ứng được nạp lên trên cột Source S (GE healthcare) được làm cân bằng bằng dung dịch đệm natri xitrat 20 mM (độ pH 2,0) chứa etanol 45%, và sau đó, rửa giải protein tương tự insulin trong 10 thể tích cột với gradient tuyến tính từ 0% đến 100% dung dịch đệm natri xitrat 20 mM (độ pH 2,0) chứa kali clorua 0,5 M và etanol 45%.

Ví dụ 7: Tinh chế bằng sắc ký gắn kết anion

Các muối được loại bỏ khỏi mẫu rửa giải bằng cách sử dụng cột tách muối, và dung dịch đệm này được trao đổi bằng dung dịch đệm (10 mM Tris-HCl, độ pH 7,5). Để tách chất tương tự insulin tinh khiết khỏi mẫu thu được trong ví dụ 6, mẫu này được nạp lên trên cột trao đổi anion (Source Q: GE healthcare) được làm cân bằng bằng dung dịch đệm Tris 10 mM (độ pH 7,5), và protein tương tự insulin được rửa giải trong 10 thể tích cột với gradient tuyến tính từ 0% đến 100% dung dịch đệm Tris 10 mM (độ pH 7,5) chứa natri clorua 0,5 M.

Độ tinh khiết của chất tương tự insulin tinh chế được phân tích bằng cách điện di protein (SDS-PAGE, Fig. 1) và sắc ký cao áp (HPLC) (Fig. 2), và các biến đổi axit amin được nhận diện bằng cách lập bản đồ peptit (Fig. 3) và phân tích khối lượng phân tử của mỗi pic.

Kết quả là, mỗi chất tương tự insulin được tìm thấy có sự biến đổi mong muốn trong trình tự axit amin của nó.

Ví dụ 8: Tạo thể tiếp hợp chứa chất tương tự insulin (số 7)-Fc globulin miễn dịch

Để PEG hóa đầu N trên chuỗi beta của chất tương tự insulin bằng cách sử dụng 3.4 K ALD2 PEG (NOF, Nhật Bản), chất tương tự insulin và PEG được cho phản ứng ở tỷ lệ mol là 1:4 với nồng độ chất tương tự insulin là 5 mg/ml ở nhiệt độ 4°C trong khoảng 2 giờ. Lúc này, phản ứng được thực hiện trong natri xitrat 50 mM ở độ pH bằng 6,0 và isopropanol 45%. Natri xyanoborohydrua 3,0 mM được bổ sung làm chất khử và được để cho phản ứng. Dung dịch phản ứng được tinh chế bằng cột SP-HP (GE Healthcare, USA) bằng cách sử dụng dung dịch đệm chứa natri xitrat (độ pH 3,0) và etanol 45%, và gradient nồng độ KCl.

Để tạo ra thể tiếp hợp chứa chất tương tự insulin-mảnh Fc globulin miễn dịch, chất tương tự insulin được PEG hóa một lần đã tinh chế và mảnh Fc globulin miễn dịch được cho phản ứng ở tỷ lệ mol nằm trong khoảng từ 1:1 đến 1:2 và ở nhiệt độ 25°C trong 13 giờ, với tổng nồng độ protein khoảng 20 mg/ml. Lúc này, điều kiện dung dịch đệm phản ứng là HEPES 100 mM ở độ pH 8,2, và natri xyanoborohydrua 20 mM làm chất khử được bổ sung vào đó. Do đó, PEG được gắn kết với đầu N của mảnh Fc.

Sau khi phản ứng kết thúc, dung dịch phản ứng được nạp lên trên cột Q HP (GE Healthcare, USA) cùng với dung dịch đệm Tris-HCl (độ pH 7,5) và gradient nồng độ NaCl để tách và tinh chế mảnh Fc globulin miễn dịch và chất tương tự insulin được PEG hóa một lần không phản ứng.

Sau đó, Source 15ISO (GE Healthcare, USA) được sử dụng làm cột thứ hai để loại mảnh Fc globulin miễn dịch còn lại và thể tiếp hợp, trong đó hai hoặc nhiều chất tương tự insulin được liên kết với mảnh Fc globulin miễn dịch, từ đó thu được thể tiếp hợp chứa chất tương tự insulin-mảnh Fc globulin miễn dịch. Lúc này, việc rửa giải được thực hiện bằng cách sử dụng gradient nồng độ của Tris-HCl chứa amoni sulfat (độ pH 7,5), và thể tiếp hợp chứa chất tương tự insulin-Fc globulin miễn dịch rửa giải được được phân tích bằng cách điện di protein (SDS-PAGE, Fig. 4) và sắc

ký cao áp (HPLC) (Fig. 5). Kết quả là, thể tiếp hợp tìm được có độ tinh khiết gần 99%.

Ví dụ 9: So sánh ái lực gắn kết với thụ thể insulin giữa insulin nguyên thể, chất tương tự insulin, thể tiếp hợp insulin nguyên thể-Fc globulin miễn dịch, và thể tiếp hợp chứa chất tương tự insulin-Fc globulin miễn dịch

Để đo ái lực gắn kết với thụ thể insulin của thể tiếp hợp chứa chất tương tự insulin-Fc globulin miễn dịch, sử dụng cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR, BIACORE 3000, GE healthcare) để phân tích. Các thụ thể insulin được giữ cố định trên chip CM5 bằng cách ghép cặp amin, và đưa một cách độc lập các dịch pha loãng 5 lần hoặc nhiều hơn của insulin nguyên thể, chất tương tự insulin, thể tiếp hợp insulin nguyên thể-Fc globulin miễn dịch, và thể tiếp hợp chứa chất tương tự insulin-Fc globulin miễn dịch vào. Sau đó, ái lực gắn kết với thụ thể insulin của mỗi chất được kiểm tra. Ái lực gắn kết của mỗi chất được tính bằng cách sử dụng phần mềm BIAevaluation. Lúc này, mô hình được sử dụng là gắn kết Langmuir 1:1 với độ lệch so với đường nền.

Kết quả là, so với insulin của người, chất tương tự insulin (số 6) có ái lực gắn kết với thụ thể là 14,8%, chất tương tự insulin (số 7) có ái lực gắn kết với thụ thể là 9,9%, chất tương tự insulin (số 8) có ái lực gắn kết với thụ thể là 57,1%, chất tương tự insulin (số 9) có ái lực gắn kết với thụ thể là 78,8%, thể tiếp hợp insulin nguyên thể-Fc globulin miễn dịch có ái lực gắn kết với thụ thể là 3,7-5,9% tùy thuộc vào việc chạy thử nghiệm, thể tiếp hợp chứa chất tương tự insulin (số 6)-Fc globulin miễn dịch có ái lực gắn kết với thụ thể là 0,9% hoặc nhỏ hơn, thể tiếp hợp chứa chất tương tự insulin (số 7)-Fc globulin miễn dịch có ái lực gắn kết với thụ thể là 1,9%, thể tiếp hợp chứa chất tương tự insulin (số 8)-Fc globulin miễn dịch có ái lực gắn kết với thụ thể là 1,8%, và thể tiếp hợp chứa chất tương tự insulin (số 9)-Fc globulin miễn dịch có ái lực gắn kết với thụ thể là 3,3% (Bảng 4). Như vậy, quan sát thấy rằng các chất tương tự insulin theo sáng chế có ái lực gắn kết với thụ thể insulin giảm so

với insulin nguyên thể, và thể tiếp hợp chứa chất tương tự insulin-Fc globulin miễn dịch cũng có ái lực gắn kết với thụ thể insulin được giảm đáng kể.

Bảng 4

So sánh ái lực gắn kết với thụ thể insulin

Thử nghiệm số	Tên chất	k_a (1/Ms, $\times 10^5$)	k_d (1/s, $\times 10^{-3}$)	K_D (nM)
Thử nghiệm	Insulin của người nguyên thể	2,21 (100%)	7,47 (100%)	35,05 (100%)
	Chất tương tự insulin (số 6)	0,28 (12,6%)	6,60 (88,4%)	237,0 (14,8%)
Thử nghiệm 2	Insulin của người nguyên thể	2,29 (100%)	10,1 (100%)	46,1 (100%)
	Thể tiếp hợp insulin nguyên thể-Fc globulin miễn dịch	0,09 (3,9%)	7,8 (77,2%)	781,3 (5,9%)
	Thể tiếp hợp chứa chất tương tự insulin (số 6)-Fc globulin	0,02 (0,9%)	10,1 (100%)	5260,0 (0,9%)
Thử nghiệm 3	Insulin của người nguyên thể	1,76 (100%)	10,73 (100%)	63,47 (100%)
	Chất tương tự insulin (số 7)	0,14 (7,8%)	8,34 (77,7%)	642,0 (9,9%)
	Thể tiếp hợp insulin nguyên thể-Fc globulin miễn dịch	0,05 (2,7%)	5,85 (54,5%)	1236,67 (5,1%)
	Thể tiếp hợp chứa chất tương tự insulin (số 7)-Fc globulin	0,02 (1,3%)	7,20 (67,1%)	3270,0 (1,9%)
Thử nghiệm 4	Insulin của người nguyên thể	2,9 (100%)	12,4 (100%)	42,0 (100%)
	Chất tương tự insulin (số 8)	1,78 (60,0%)	12,9 (104,6%)	73,4 (57,1%)
	Thể tiếp hợp insulin nguyên thể-Fc globulin miễn dịch	0,06 (2,1%)	6,9 (56,1%)	1140,0 (3,7%)
	Thể tiếp hợp chứa chất tương tự insulin (số 8)-Fc globulin	0,03 (0,9%)	6,4 (51,6%)	2320,0 (1,8%)
Thử nghiệm 5	Insulin của người nguyên thể	2,0 (100%)	9,7 (100%)	50,4 (100%)
	Chất tương tự insulin (số 9)	1,85 (92,5%)	11,9 (122,5%)	64,0 (78,8%)
	Thể tiếp hợp insulin nguyên thể-Fc globulin miễn dịch	0,09 (4,3%)	7,4 (76,5%)	862,0 (5,9%)
	Thể tiếp hợp chứa chất tương tự insulin (số 9)-Fc globulin	0,05 (2,4%)	7,3 (75,0%)	1536,7 (3,3%)

Ví dụ 10: So sánh hiệu lực in-vitro giữa thể tiếp hợp insulin nguyên thể-Fc globulin miễn dịch, và thể tiếp hợp chứa chất tương tự insulin-Fc globulin miễn dịch

Để đánh giá hiệu lực in vitro của thể tiếp hợp chứa chất tương tự insulin-Fc globulin miễn dịch, tế bào tạo mỡ 3T3-L1 biệt hóa có nguồn gốc từ chuột nhắt được

sử dụng để thử nghiệm sự hấp thu glucoza hoặc sự tổng hợp lipit. Các tế bào 3T3-L1 được nuôi cấy cấp hai trong DMEM (môi trường Eagle biến đổi của Dulbeco, Gibco, Cat.No, 12430) chứa NBCS (huyết thanh bê mới sinh) 10% hai lần hoặc ba lần một tuần, và được duy trì. Các tế bào 3T3-L1 được tạo huyền phù trong môi trường biệt hóa (DMEM chứa FBS 10%), và sau đó, được gây nhiễm ở mật độ 5×10^4 mỗi lỗ trong đĩa 48 lỗ, và được nuôi cấy trong 48 giờ. Để biệt hóa tế bào tạo mỡ, 1 $\mu\text{g/ml}$ insulin của người (Sigma, Cat. No. I9278), 0,5 mM IBMX (3-isobutyl-1-methylxanthin, Sigma, Cat. No.I5879), và 1 μM dexametason (Sigma, Cat. No. D4902) được trộn với môi trường biệt hóa, và 250 μl hỗn hợp được bổ sung vào mỗi lỗ, sau khi môi trường trước đó được loại bỏ. Sau 48 giờ, môi trường này được thay thế bằng môi trường biệt hóa chỉ được bổ sung 1 $\mu\text{g/ml}$ insulin của người. Sau đó, trong khi môi trường này được thay thế bằng môi trường biệt hóa được bổ sung 1 $\mu\text{g/ml}$ insulin của người mỗi 48 giờ, kiểm tra quá trình biệt hóa tế bào tạo mỡ trong 7-9 ngày. Để thử nghiệm sự hấp thu glucoza, các tế bào biệt hóa được rửa bằng môi trường DMEM không chứa huyết thanh một lần, và sau đó, bổ sung 250 μl để gây ra sự giảm huyết thanh trong 4 giờ. Môi trường DMEM không chứa huyết thanh được sử dụng để tiến hành pha loãng liên tiếp 10 lần đối với insulin người từ 2 μM đến 0,01 μM , và đối với thể tiếp hợp insulin nguyên thể-Fc globulin miễn dịch và thể tiếp hợp chứa chất tương tự insulin-Fc globulin miễn dịch từ 20 μM đến 0,02 μM . Mỗi 250 μl mẫu điều chế được được bổ sung vào các tế bào, và được nuôi cấy trong tủ ủ 5% CO_2 ở nhiệt độ 37°C trong 24 giờ. Để đo lượng glucoza dư trong môi trường sau khi ủ, 200 μl môi trường được lấy và được pha loãng 5 lần bằng D-PBS, tiếp theo bằng thử nghiệm GOPOD (GOPOD Assay Kit, Megazyme, Cat. No. K-GLUC). Dựa trên hệ số hấp thụ của dung dịch chuẩn glucoza, nồng độ glucoza còn lại trong môi trường được chuyển đổi, và các giá trị EC_{50} đối với sự hấp thu glucoza của thể tiếp hợp insulin nguyên thể-Fc globulin miễn dịch và thể tiếp hợp chứa chất tương tự insulin-Fc globulin miễn dịch lần lượt được tính.

Kết quả là, so với insulin của người, thể tiếp hợp insulin nguyên thể-Fc

globulin miễn dịch có mức độ hấp thu glucoza là 11,6%, thể tiếp hợp chứa chất tương tự insulin (số 6)-Fc globulin miễn dịch có mức độ hấp thu glucoza là 0,43%, thể tiếp hợp chứa chất tương tự insulin (số 7)-Fc globulin miễn dịch có mức độ hấp thu glucoza là 1,84%, thể tiếp hợp chứa chất tương tự insulin (số 8)-Fc globulin miễn dịch có mức độ hấp thu glucoza là 16,0%, thể tiếp hợp chứa chất tương tự insulin (số 9)-Fc globulin miễn dịch có mức độ hấp thu glucoza là 15,1% (Bảng 5). Như vậy, quan sát thấy rằng thể tiếp hợp chứa chất tương tự insulin (số 6)-Fc globulin miễn dịch và thể tiếp hợp chứa chất tương tự insulin (số 7)-Fc globulin miễn dịch theo sáng chế có độ chuẩn in vitro giảm đáng kể so với thể tiếp hợp insulin nguyên thể-Fc globulin miễn dịch, và thể tiếp hợp chứa chất tương tự insulin (số 8)-Fc globulin miễn dịch và thể tiếp hợp chứa chất tương tự insulin (số 9)-Fc globulin miễn dịch có độ chuẩn in vitro tương tự như của thể tiếp hợp insulin nguyên thể-Fc globulin miễn dịch.

Bảng 5

Thử nghiệm	Tên chất	Mức độ hấp thu glucoza (so với insulin nguyên thể)
Thử nghiệm 1	Insulin của người nguyên thể	100%
	Thể tiếp hợp insulin nguyên thể-Fc globulin miễn	11,6%
	Thể tiếp hợp chứa chất tương tự insulin số 6-Fc	0,43%
	Thể tiếp hợp chứa chất tương tự insulin số 7-Fc	1,84%
Thử nghiệm 2	Insulin của người nguyên thể	100%
	Thể tiếp hợp insulin nguyên thể-Fc globulin miễn	15,2%
	Thể tiếp hợp chứa chất tương tự insulin số 8-Fc	16,0%
Thử nghiệm	Insulin của người nguyên thể	100%

3	Thể tiếp hợp insulin nguyên thể-Fc globulin miễn	11,7%
	Thể tiếp hợp chứa chất tương tự insulin số 9-Fc	15,1%

Ví dụ 11: Dược động học của thể tiếp hợp chứa chất tương tự insulin-Fc globulin miễn dịch

Để kiểm tra dược động học của thể tiếp hợp chứa chất tương tự insulin-Fc globulin miễn dịch, nồng độ trong máu của chúng theo thời gian được so sánh ở chuột cống bình thường (chuột cống SD, đực, 6 tuần tuổi) được làm thích ứng trong 5 ngày với thử nghiệm. 21,7 nmol/kg thể tiếp hợp insulin nguyên thể-Fc globulin miễn dịch và 65,1 nmol/kg thể tiếp hợp chứa chất tương tự insulin-Fc globulin miễn dịch lần lượt được tiêm dưới da. Máu được lấy ở các thời điểm 0, 1, 4, 8, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, và 216 giờ. Ở mỗi thời điểm, nồng độ trong máu của thể tiếp hợp insulin nguyên thể-Fc globulin miễn dịch và thể tiếp hợp chứa chất tương tự insulin-Fc globulin miễn dịch được đo bằng thử nghiệm hấp thụ miễn dịch được liên kết với enzym (ELISA), và Insulin ELISA (ALPCO, USA) được sử dụng làm bộ kit. Tuy nhiên, thể tiếp hợp IgG4 HRP của chuột nhắt kháng người (Alpha Diagnostic Intl, Inc, USA) được sử dụng làm kháng thể phát hiện.

Các kết quả đánh giá dược động học của thể tiếp hợp insulin nguyên thể-Fc globulin miễn dịch và thể tiếp hợp chứa chất tương tự insulin-Fc globulin miễn dịch chứng tỏ rằng nồng độ trong máu của chúng tăng tỷ lệ với nồng độ dùng của chúng, và thể tiếp hợp chứa chất tương tự insulin-Fc globulin miễn dịch có ái lực gắn kết với thụ thể insulin thấp thể hiện thời gian bán thải tăng cao so với thể tiếp hợp insulin nguyên thể-Fc (Fig. 6).

Các kết quả này gợi ý rằng khi các chất tương tự insulin theo sáng chế được biến đổi để có ái lực gắn kết với thụ thể insulin giảm được liên kết với vùng Fc globulin miễn dịch để tạo ra thể tiếp hợp, thì thể tiếp hợp này có thể được cung cấp

dưới dạng chế phẩm insulin ổn định do thời gian bán thải trong máu in vivo tăng đáng kể, và do đó, được sử dụng một cách hiệu quả làm chất trị liệu cho bệnh đái tháo đường. Ngoài ra, do bản thân các chất tương tự insulin theo sáng chế cũng có ái lực gắn kết với thụ thể insulin giảm và độ chuẩn giảm, nên các chất tương tự insulin này cũng thể hiện tác dụng tương tự mặc dù chúng được liên kết với nhiều chất mang khác.

Dựa vào phần mô tả nêu trên, các chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ biết rõ rằng các cải biến và thay đổi khác nhau có thể được thực hiện mà không vượt quá phạm vi và ý tưởng của sáng chế. Do đó, cần hiểu rằng phương án nêu trên không mang tính giới hạn, mà minh họa ở tất cả các khía cạnh. Phạm vi của sáng chế được xác định bởi yêu cầu bảo hộ kèm theo chứ không phải bởi phần mô tả trước nó, và do đó, tất cả các thay đổi và cải biến nằm trong giới hạn và phạm vi của yêu cầu bảo hộ, hoặc các phương án có giới hạn và phạm vi tương đương được dự định bao gồm trong yêu cầu bảo hộ.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chất tương tự insulin có chuẩn độ insulin giảm so với dạng nguyên thể, trong đó chất tương tự insulin này có chuỗi A là SEQ ID NO: 37 và chuỗi B là SEQ ID NO: 38 ngoại trừ thay thế axit amin thứ 14 (tyrosin) trên chuỗi A bằng axit glutamic hoặc asparagin.
2. Chất tương tự insulin theo điểm 1, trong đó chuẩn độ insulin giảm là do ái lực gắn kết với thụ thể insulin giảm.
3. Chất tương tự insulin, trong đó chất tương tự insulin này có trình tự là SEQ ID NO: 34 hoặc 36.
4. Thở tiếp hợp chứa chất tương tự insulin, trong đó (i) chất tương tự insulin theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3 được liên kết với (ii) một nguyên liệu tương hợp sinh học được chọn từ nhóm bao gồm polyetylen glycol, axit béo, cholesterol, albumin và mảnh của nó, nguyên liệu gắn kết albumin, polyme gồm các đơn vị lặp có trình tự axit amin cụ thể, kháng thể, mảnh kháng thể, nguyên liệu gắn kết FcRn, mô liên kết in vivo hoặc dẫn xuất của nó, nucleotit, fibronectin, transferin, sacarit, và polyme làm chất mang có khả năng kéo dài thời gian bán thải in vivo của chất tương tự insulin.
5. Thở tiếp hợp chứa chất tương tự insulin theo điểm 4, trong đó chất tương tự insulin và nguyên liệu tương hợp sinh học được liên kết với nhau thông qua cầu nối là peptit hoặc polyme không phải peptit.
6. Thở tiếp hợp chứa chất tương tự insulin theo điểm 4, trong đó nguyên liệu gắn kết FcRn là vùng Fc globulin miễn dịch.

7. Thẻ tiếp hợp chứa chất tương tự insulin theo điểm 5, trong đó (i) chất tương tự insulin theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3 được liên kết với (ii) vùng Fc globulin miễn dịch thông qua (iii) cầu nối peptit hoặc cầu nối không phải peptit được chọn từ nhóm bao gồm polyetylen glycol, polypropylen glycol, copolyme của etylen glycol-propylen glycol, rượu polyhydric được polyoxyetyl hóa, rượu polyvinyl, polysacarit, dextran, polyvinyl etyl ete, polyme dễ phân hủy sinh học, các polyme lipid, kitin, axit hyaluronic, và hỗn hợp của chúng.

8. Thẻ tiếp hợp chứa chất tương tự insulin theo điểm 7, trong đó cầu nối không phải peptit được liên kết với đầu N trên chuỗi B của chất tương tự insulin.

9. Thẻ tiếp hợp chứa chất tương tự insulin theo điểm 7, trong đó cả hai đầu của polyme không phải peptit lần lượt được liên kết với đầu N của vùng Fc globulin miễn dịch và nhóm amin đầu N của chất tương tự insulin hoặc nhóm ϵ -amino hoặc nhóm thiol của gốc lysin nội trên chuỗi B.

10. Thẻ tiếp hợp chứa chất tương tự insulin theo điểm 7, trong đó vùng Fc globulin miễn dịch không được glycosyl hóa.

11. Thẻ tiếp hợp chứa chất tương tự insulin theo điểm 7, trong đó vùng Fc globulin miễn dịch được cấu thành từ 1 miền đến 4 miền được chọn từ nhóm bao gồm các miền CH1, CH2, CH3 và CH4.

12. Thẻ tiếp hợp chứa chất tương tự insulin theo điểm 7, trong đó vùng Fc globulin miễn dịch là vùng Fc có nguồn gốc từ IgG, IgA, IgD, IgE hoặc IgM.

13. Thẻ tiếp hợp chứa chất tương tự insulin theo điểm 12, trong đó mỗi miền của vùng Fc globulin miễn dịch là miền thể lai của các miền có nguồn gốc khác nhau và

có nguồn gốc từ globulin miễn dịch được chọn từ nhóm bao gồm IgG, IgA, IgD, IgE và IgM.

14. Thở tiếp hợp chứa chất tương tự insulin theo điểm 7, trong đó vùng Fc globulin miễn dịch còn bao gồm vùng bản lề.

15. Thở tiếp hợp chứa chất tương tự insulin theo điểm 12, trong đó vùng Fc globulin miễn dịch là dime hoặc multime được cấu thành từ globulin miễn dịch đơn chuỗi bao gồm các miền có cùng nguồn gốc.

16. Thở tiếp hợp chứa chất tương tự insulin theo điểm 12, trong đó vùng Fc globulin miễn dịch là vùng Fc IgG4:

17. Thở tiếp hợp chứa chất tương tự insulin theo điểm 16, trong đó vùng Fc globulin miễn dịch là vùng Fc không được glycosyl hóa có nguồn gốc từ IgG4 của người.

18. Thở tiếp hợp chứa chất tương tự insulin theo điểm 7, trong đó nhóm phản ứng của cầu nối không phải peptit được chọn từ nhóm bao gồm nhóm aldehyt, nhóm propionaldehyt, nhóm butyraldehyt, nhóm maleimit, và dẫn xuất succinimit.

19. Thở tiếp hợp chứa chất tương tự insulin theo điểm 18, trong đó dẫn xuất succinimit là succinimidyl propionat, succinimidyl carboxymetyl, hydroxy succinimidyl, hoặc succinimidyl cacbonat.

20. Thở tiếp hợp chứa chất tương tự insulin theo điểm 7, trong đó cầu nối không phải peptit có nhóm aldehyt phản ứng ở cả hai đầu của nó.

21. Chế phẩm insulin tác dụng kéo dài có thời gian lưu và độ ổn định in vivo cải

thiện, chứa thể tiếp hợp chứa chất tương tự insulin theo điểm 4.

22. Phương pháp tạo ra thể tiếp hợp chứa chất tương tự insulin theo điểm 4, bao gồm bước: liên kết chất tương tự insulin với nguyên liệu tương hợp sinh học được chọn từ nhóm bao gồm polyetylen glycol, axit béo, cholesterol, albumin và mảnh của nó, nguyên liệu gắn kết albumin, polyme gồm các đơn vị lặp có trình tự axit amin cụ thể, kháng thể, mảnh kháng thể, nguyên liệu gắn kết FcRn, mô liên kết in vivo hoặc dẫn xuất của nó, nucleotit, fibronectin, transferin, sacarit, và polyme làm chất mang có khả năng kéo dài thời gian bán thải in vivo của chất tương tự insulin.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

- <110> HANMI PHARM. CO., LTD.
- <120> Chất tương tự insulin, thể tiếp hợp chứa nó, chế phẩm tác dụng kéo dài chứa thể tiếp hợp này và phương pháp tạo ra thể tiếp hợp này
- <130> OPA14031-PCT
- <150> KR 10-2013-0020703
<151> 2013-02-26
- <150> KR 10-2013-0082511
<151> 2013-07-12
- <150> KR 10-2014-0006937
<151> 2014-01-20
- <160> 38
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1
<211> 39
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
- <220>
<223> Đoạn mỗi
- <400> 1
gggtccctgc agaagcgtgc gattgtggaa caatgctgt
39
- <210> 2
<211> 39
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
- <220>
<223> Đoạn mỗi
- <400> 2
acagcattgt tccacaatcg cacgcttctg cagggaccc
39
- <210> 3
<211> 39
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
- <220>
<223> Đoạn mỗi

<400> 3
 tccctgcaga agcgtggcgc ggtggaacaa tgctgtacc
 39

<210> 4
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi

<400> 4
 ggtacagcat tgttccaccg cgccacgctt ctgcaggga
 39

<210> 5
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi

<400> 5
 ctctaccagc tggaaaacgc gtgtaactga ggatcc
 36

<210> 6
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi

<400> 6
 ggatcctcag ttacacgcgt tttccagctg gtagag
 36

<210> 7
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi

<400> 7
 gttaaccaac acttgtgtgc gtcacacctg gtggaagct
 39

<210> 8
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi

<400> 8
 agcttccacc aggtgtgacg cacacaagtg ttggttaac
 39

<210> 9
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi

<400> 9
 ctagtgtgcg gggaacgagc gttcttctac acaccgaag
 39

<210> 10
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi

<400> 10
 cttgggtgtg tagaagaacg ctggttcccc gcacactag
 39

<210> 11
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi

<400> 11
 gtgtgctggg aacgaggcgc gttctacaca cccaagacc
 39

<210> 12
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi

<400> 12
 ggtcttgggt gtgtagaacg cgcctcggtc cccgcacac
 39

<210> 13
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi

<400> 13
 tgcggggaac gaggttcgc gtacacaccc aagaccgc
 39

<210> 14
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi

<400> 14
 gcgggtcttg ggtgtgtacg cgaagcctcg ttccccgca
 39

<210> 15
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi

<400> 15
 ccagcatctg ctccctcgaa cagctggaga actactg
 37

<210> 16
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi

<400> 16

cagtagttct ccagctgttc gagggagcag atgctgg
37

<210> 17
<211> 34
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mỗi

<400> 17
cagcatctgc tccctcaacc agctggagaa ctac
34

<210> 18
<211> 34
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mỗi

<400> 18
gtagttctcc agctgggtga gggagcagat gctg
34

<210> 19
<211> 258
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chất tương tự 1

<400> 19
ttcgtaacc aacacttgtg tggctcacac ctggtggaag ctctctacct agtgtgcggg
60

gaacgaggct tcttctacac acccaagacc cgccgggagg cagaggacct gcaggtgggg
120

caggtggagc tgggcggggg cctggtgca ggcagcctgc agcccttggc cctggagggg
180

tccctgcaga agcgtgcgat tgtggaacaa tgctgtacca gcattctgtc cctctaccag
240

ctggagaact actgcaac
258

<210> 20
<211> 86
<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chất tương tự 1

<400> 20

Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr
1 5 10 15

Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg
20 25 30

Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro
35 40 45

Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys
50 55 60

Arg Ala Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln
65 70 75 80

Leu Glu Asn Tyr Cys Asn
85

<210> 21

<211> 258

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chất tương tự 2

<400> 21

ttcgttaacc aacacttggtg tggctcacac ctggtggaag ctctctacct agtgtgctggg
60

gaacgaggct tcttctacac acccaagacc cgccgggagg cagaggacct gcaggtgggg
120

caggtggagc tgggcggggg ccctggtgca ggcagcctgc agcccttggc cctggagggg
180

tccctgcaga agcgtggcgc ggtggaacaa tgctgtacca gcctctgctc cctctaccag
240

ctggagaact actgcaac
258

<210> 22

<211> 86

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chất tương tự 2

<400> 22

Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr
 1 5 10 15

Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg
 20 25 30

Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro
 35 40 45

Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys
 50 55 60

Arg Gly Ala Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln
 65 70 75 80

Leu Glu Asn Tyr Cys Asn
 85

<210> 23

<211> 258

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chất tương tự 3

<400> 23

ttcgttaacc aacacttggtg tggctcacac ctggtggaag ctctctacct agtgtgcggg
 60

gaacgaggct tcttctacac acccaagacc cgccgggagg cagaggacct gcagggtgggg
 120

cagggtggagc tgggcggggg ccctgggtgca ggcagcctgc agcccttggc cctggagggg
 180

tccctgcaga agcgtggcat tgtggaacaa tgctgtacca gcctctgctc cctctaccag
 240

ctggagaacg cgtgcaac
 258

<210> 24

<211> 86

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chất tương tự 3

<400> 24

Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr
 1 5 10 15

Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg
 20 25 30

Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro
35 40 45

Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys
50 55 60

Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln
65 70 75 80

Leu Glu Asn Ala Cys Asn
85

<210> 25
<211> 258
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chất tương tự 4

<400> 25
ttcgttaacc aacacttggtg tgcgtcacac ctggtggaag ctctctacct agtgtgctggg
60

gaacgaggct tcttctacac acccaagacc cgccgggagg cagaggacct gcaggtgggg
120

caggtggagc tgggcggggg ccctggtgca ggcagcctgc agcccttggc cctggagggg
180

tcctgcaga agcgtggcat tgtggaacaa tgctgtacca gcctctgctc cctctaccag
240

ctggagaact actgcaac
258

<210> 26
<211> 86
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chất tương tự 4

<400> 26
Phe Val Asn Gln His Leu Cys Ala Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr
1 5 10 15

Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg
20 25 30

Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro
35 40 45

Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys
50 55 60

Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln
65 70 75 80

Leu Glu Asn Tyr Cys Asn
85

<210> 27
<211> 258
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chất tương tự 5

<400> 27
ttcgttaacc aacacttggtg tggctcacac ctggtggaag ctctctacct agtgtgcggg
60

gaacgagcgt tcttctacac acccaagacc cgccgggagg cagaggacct gcaggtgggg
120

caggtggagc tgggcggggg ccttggtgca ggcagcctgc agcccttggc cctggagggg
180

tcctgcaga agcgtggcat tgtggaacaa tgctgtacca gcattctgctc cctctaccag
240

ctggagaact actgcaac
258

<210> 28
<211> 86
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chất tương tự 5

<400> 28
Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr
1 5 10 15

Leu Val Cys Gly Glu Arg Ala Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg
20 25 30

Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro
35 40 45

Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys
50 55 60

Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln
65 70 75 80

Leu Glu Asn Tyr Cys Asn
85

<210> 29
 <211> 258
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Chất tương tự 6

<400> 29
 ttctgtaacc aacacttggtg tggctcacac ctggtggaag ctctctacct agtgtgcggg
 60
 gaacgaggcg cgttctacac acccaagacc cgccgggagg cagaggacct gcaggtgggg
 120
 caggtggagc tgggcggggg ccctggtgca ggcagcctgc agcccttggc cctggagggg
 180
 tccctgcaga agcgtggcat tgtggaacaa tgctgtacca gcctctgctc cctctaccag
 240
 ctggagaact actgcaac
 258

<210> 30
 <211> 86
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Chất tương tự 6

<400> 30
 Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr
 1 5 10 15
 Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Ala Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg
 20 25 30
 Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro
 35 40 45
 Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys
 50 55 60
 Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln
 65 70 75 80
 Leu Glu Asn Tyr Cys Asn
 85

<210> 31
 <211> 258
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

$\langle 220 \rangle$

<223> Chất tương tự 7

<400> 31

ttcgtaacc aacactgtg tggctcacac ctggtggaag ctctctacct agtgtgcggg
60

gaacgaggct tcgctacac acccaagacc cgccgggagg cagaggacct gcaggtgggg
120

caggtggagc tgggcggggg ccctggtgca ggcagcctgc agcccttggc cctggagggg
180

tcctgcaga agcgtggcât tgtggaacaa tgctgtacca gcâtctgctc cctctaccag
240

ctggagaact actgcaac
258

$\langle 210 \rangle$ 32

<211> 86

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

 $\langle 220 \rangle$

<223> Chất tương tự 7

<400> 32

Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr
1 5 10 15

Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Ala Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg
20 25 30

Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro
35 40 45

Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys
50 55 60

Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln
65 70 75 80

Leu Glu Asn Tyr Cys Asn
85

<210> 33

<211> 261

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

 $\langle 220 \rangle$

<223> Chất tương tự 8

<400> 33

ttcgttaacc aacacttggtg tggctcacac ctggtggaag ctctctacct agtgtgcggg
60

gaacgaggct tcttctacac acccaagacc cgccgggagg cagaggacct gcaggtgggg
120

caggtggagc tgggcggggg ccttggtgca ggcagcctgc agcccttggc cctggagggg
180

tccctgcaga agcgtggcat tgtggaacaa tgctgtacca gcctctgctc cctcgaacag
240

ctggagaact actgcaactg a
261

<210> 34
<211> 86
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chất tương tự 8

<400> 34
Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr
1 5 10 15
Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg
20 25 30
Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro
35 40 45
Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys
50 55 60
Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Glu Gln
65 70 75 80
Leu Glu Asn Tyr Cys Asn
85

<210> 35
<211> 261
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chất tương tự 9

<400> 35
ttcgttaacc aacacttggtg tggctcacac ctggtggaag ctctctacct agtgtgcggg
60
gaacgaggct tcttctacac acccaagacc cgccgggagg cagaggacct gcaggtgggg
120

caggtggagc tgggcggggg ccctggtgca ggcagcctgc agcccttggc cctggagggg
180

tccctgcaga agcgtggcat tgtggaacaa tgctgtacca gcattctgtc cctcaaccag
240

ctggagaact actgcaactg a
261

<210> 36
<211> 86
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chất tương tự 9

<400> 36
Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr
1 5 10 15

Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg
20 25 30

Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro
35 40 45

Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys
50 55 60

Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Asn Gln
65 70 75 80

Leu Glu Asn Tyr Cys Asn
85

<210> 37
<211> 21
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi A của insulin

<400> 37
Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu
1 5 10 15

Glu Asn Tyr Cys Asn
20

<210> 38
<211> 30
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

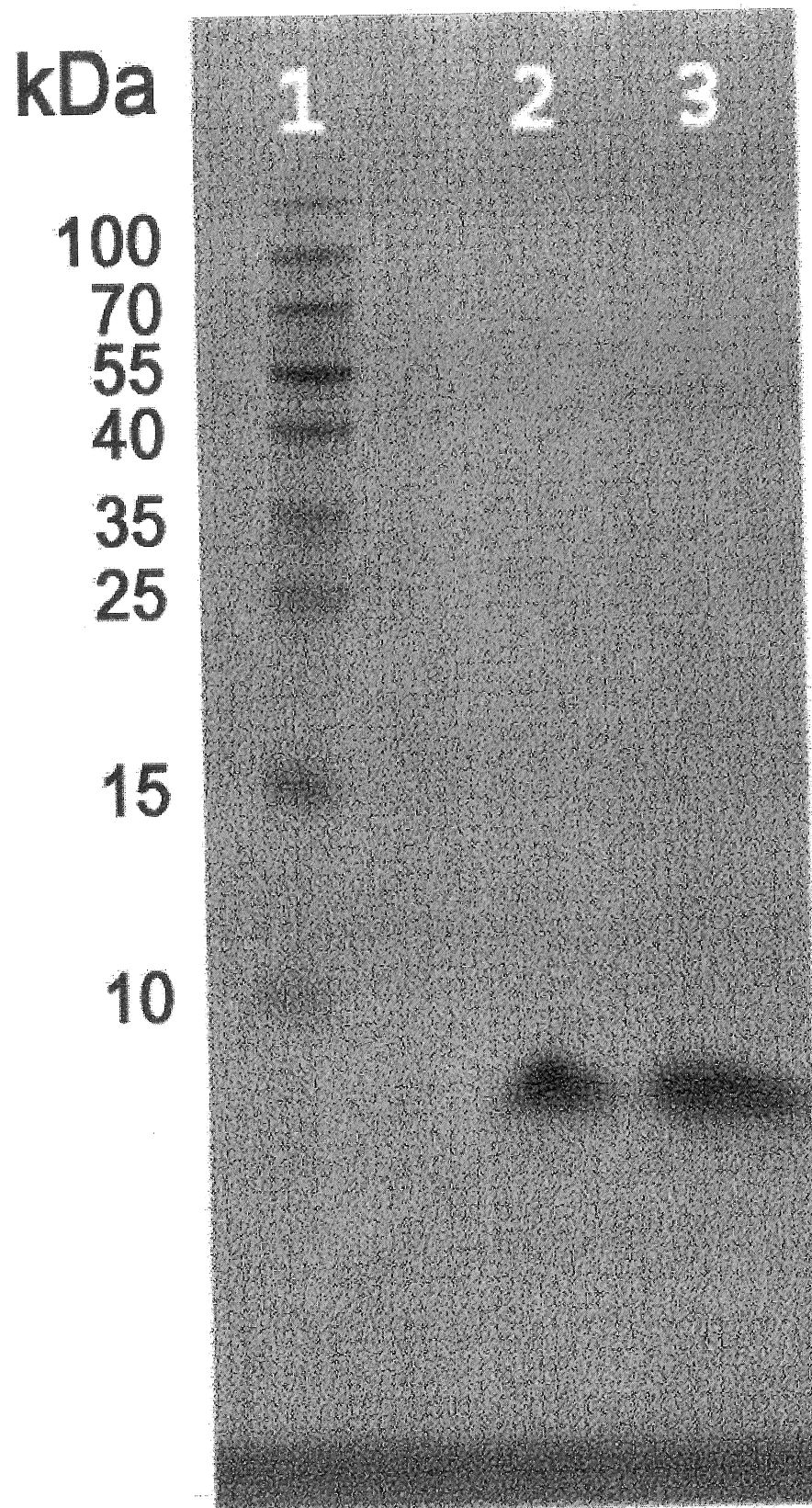
<220>

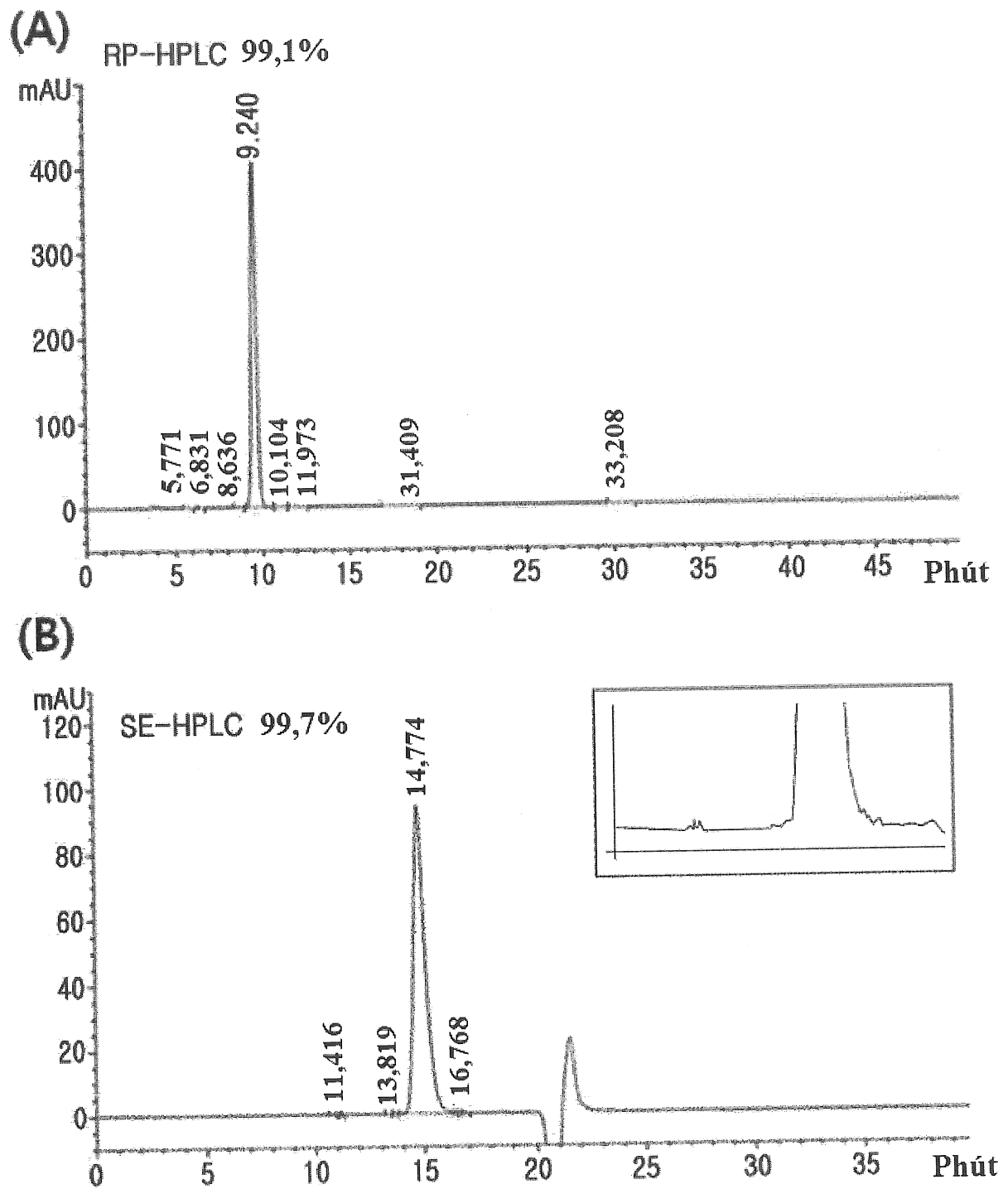
<223> Chuỗi B của insulin

<400> 38

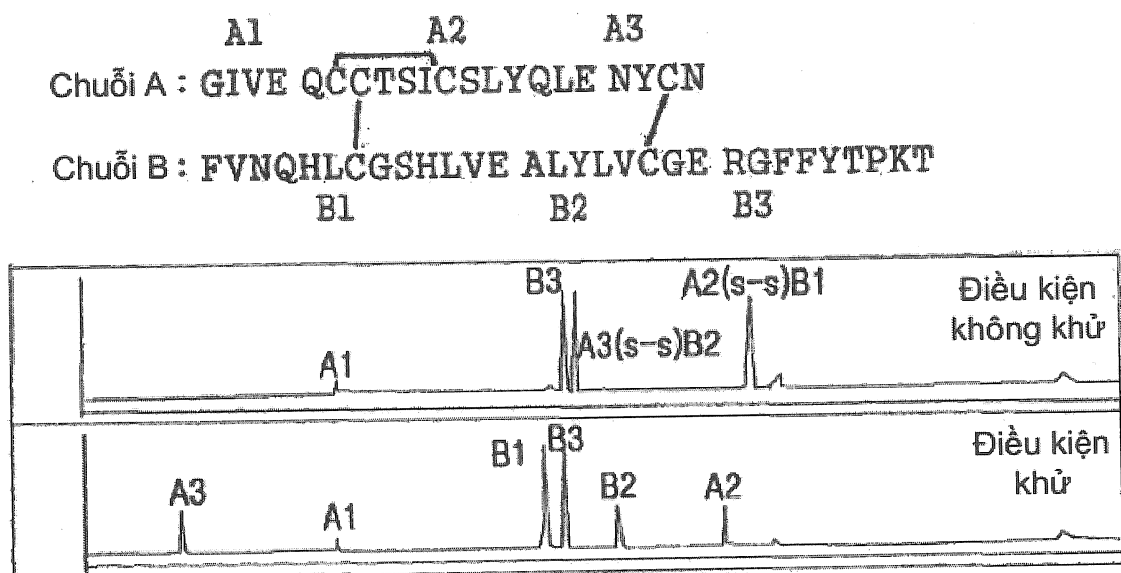
Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr
1 5 10 15

Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr
20 25 30

**Fig.1**

**Fig.2**

(A) Mảnh phân cắt Glu-C của trình tự insulin nguyên thể



(B) Mảnh phân cắt Glu-C của trình tự của chất tương tự insulin (số 7)

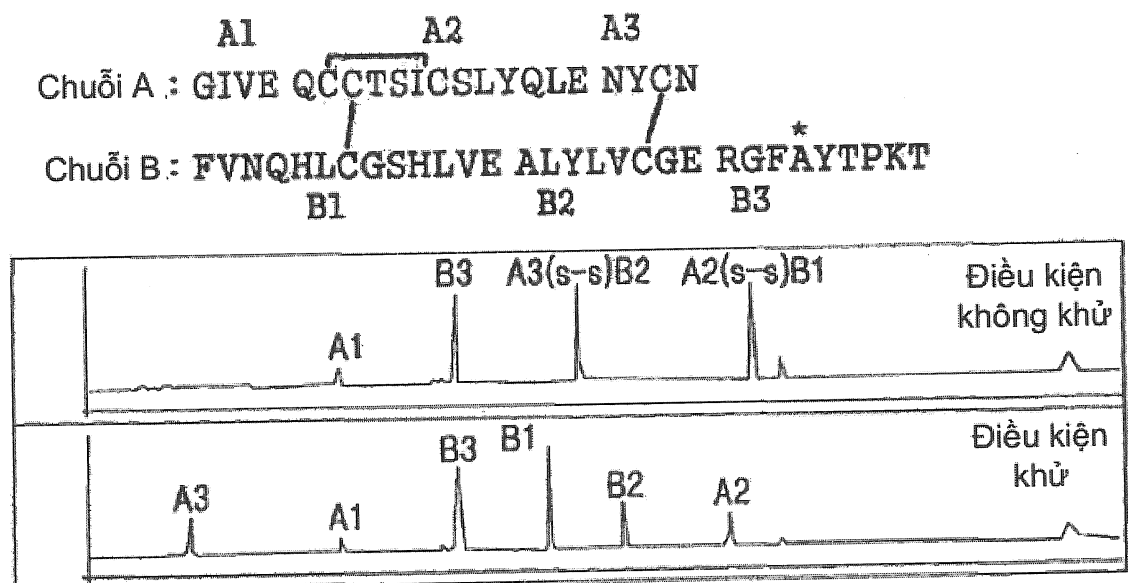
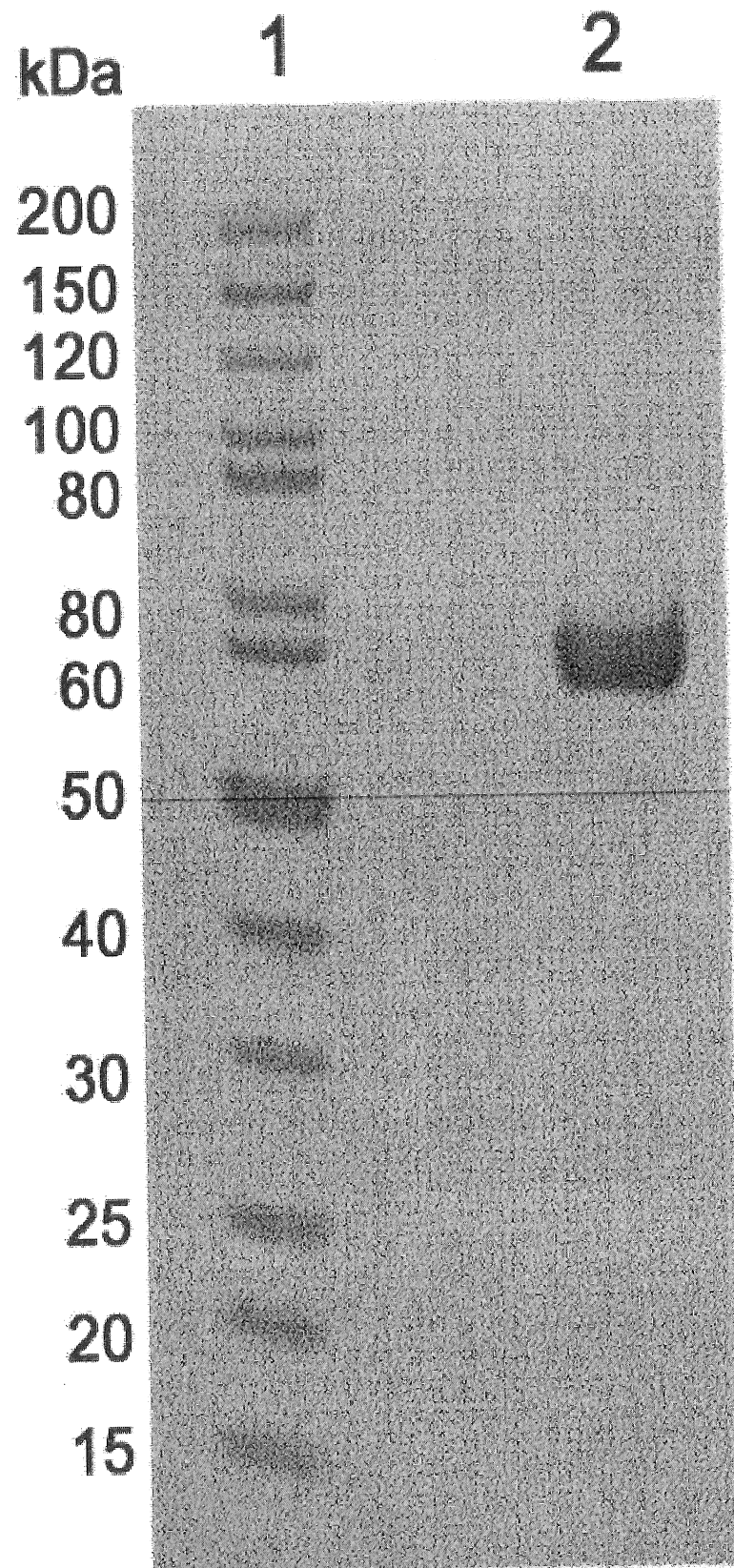
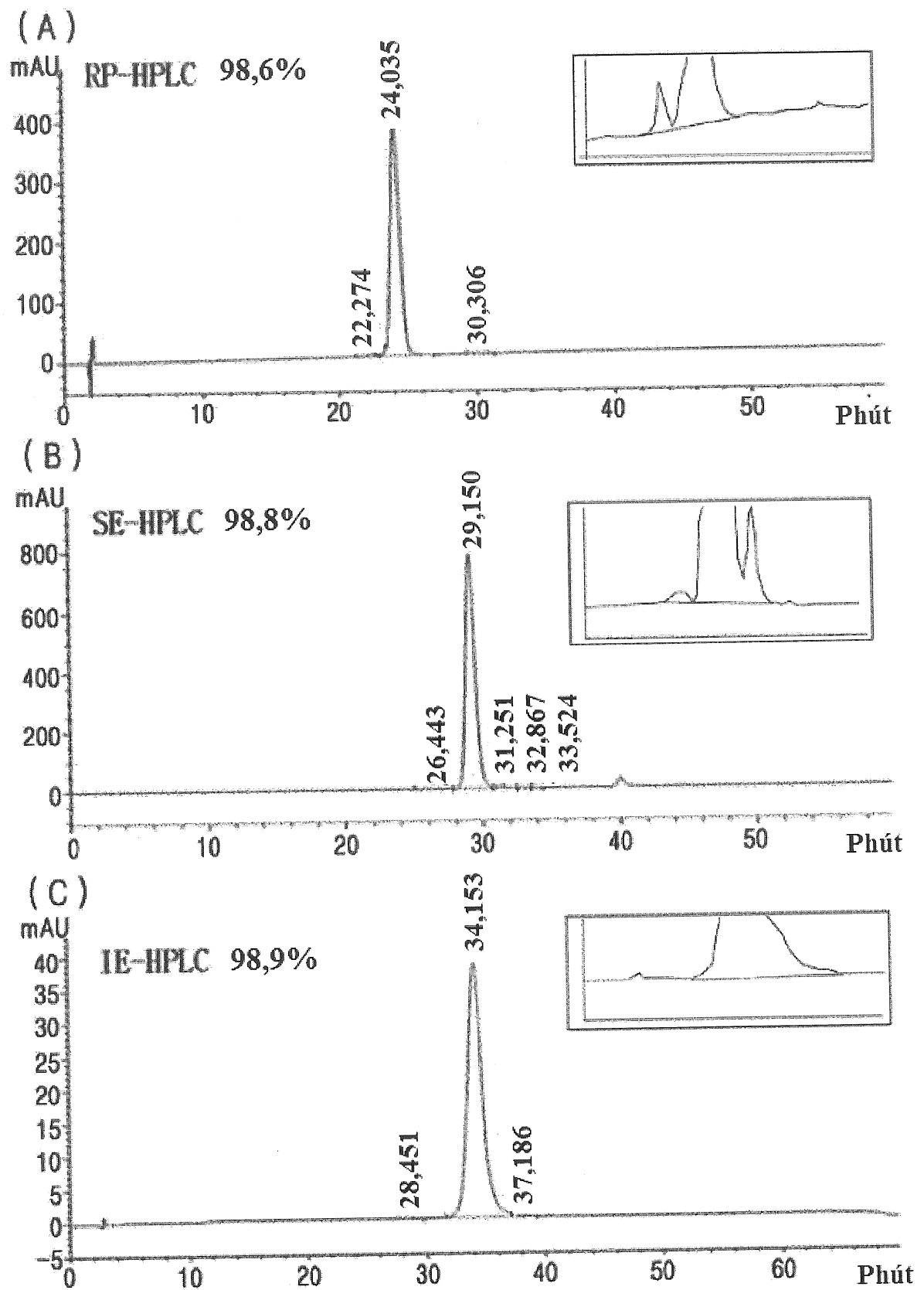


Fig.3

**Fig.4**

**Fig.5**

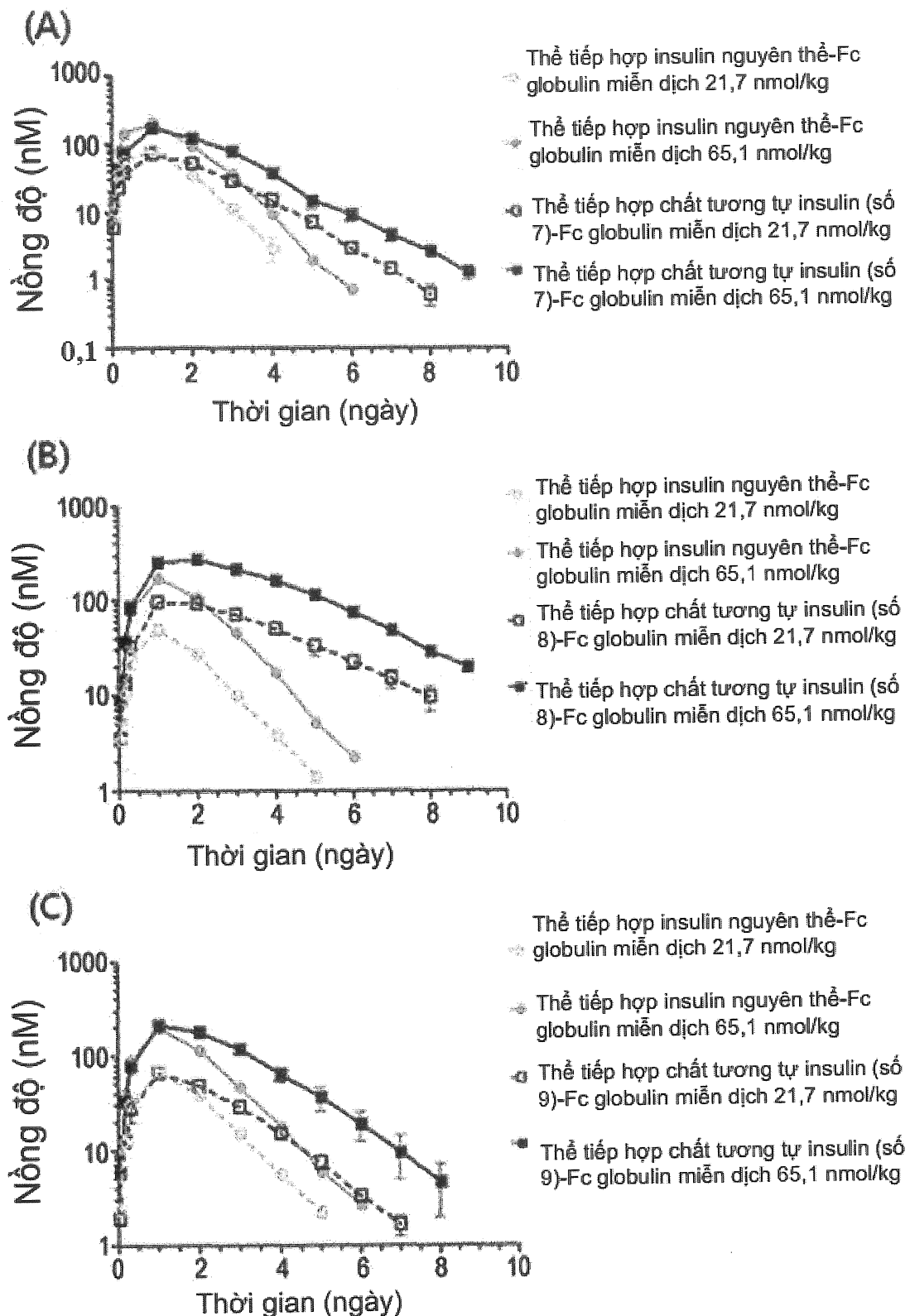


Fig.6