



(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)



1-0037734

(51)^{2020.01} C07K 14/575; A61K 47/60; C08G
65/325; C07K 14/605; A61K 38/00;
A61K 47/68

(13) B

(21) 1-2022-00442

(22) 18/07/2019

(86) PCT/KR2019/008912 18/07/2019

(87) WO2021/010532 21/01/2021

(45) 25/12/2023 429

(43) 25/04/2022 409

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

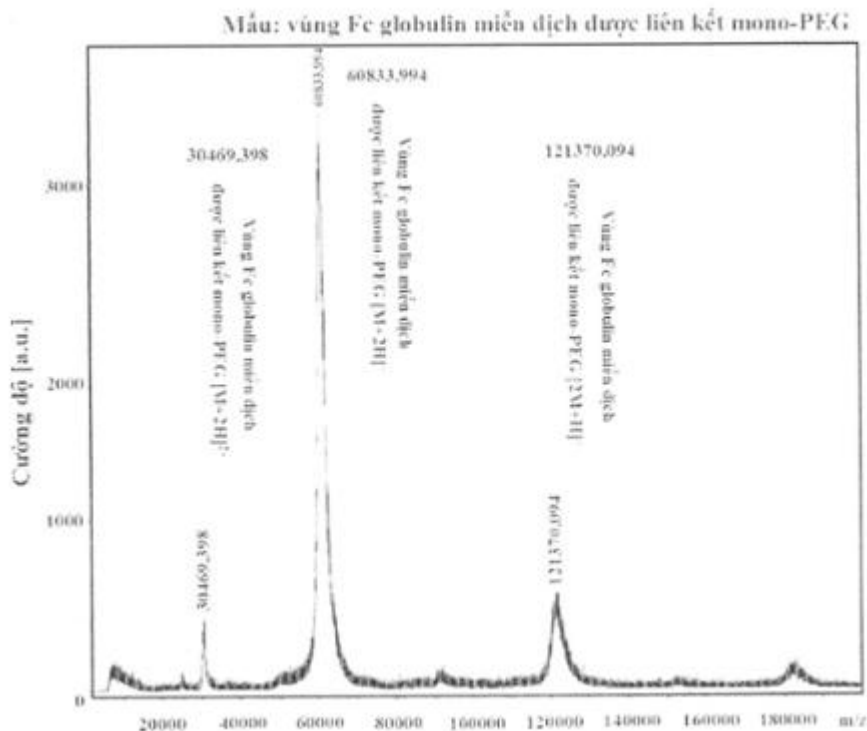
214, Muha-ro, Paltan-myeon, Hwaseong-si, Gyeonggi-do 18536, Republic of Korea

(72) SHIN, Cheongbyeol (KR); JANG, Dooseo (KR); MOON, Ji Hye (KR); KIM, Dong Hyun (KR); LEE, Ji Eun (KR).

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

(54) HỢP CHẤT TRUNG GIAN ĐỀ BẢO CHẾ THỂ TIẾP HỢP DƯỢC CHẤT TÁC DỤNG KÉO DÀI VÀ CHẾ PHẨM BẢO CHẾ THỂ TIẾP HỢP DƯỢC CHẤT TÁC DỤNG KÉO DÀI CHỨA HỢP CHẤT NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến hợp chất trung gian đề bào chế thể tiếp hợp dược chất tác dụng kéo dài và chế phẩm bào chế thể tiếp hợp dược chất tác dụng kéo dài chứa hợp chất này.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến hợp chất trung gian để bào chế thể tiếp hợp dược chất tác dụng kéo dài, chế phẩm chứa hợp chất này, và phương pháp bào chế thể tiếp hợp dược chất tác dụng kéo dài bằng cách sử dụng hợp chất này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Polypeptit có hoạt tính sinh lý dễ bị biến tính do độ ổn định thấp, bị phân hủy bởi proteaza trong máu, và dễ bị thải trừ bởi thận hoặc gan. Do đó, để duy trì nồng độ trong máu và nồng độ chuẩn của dược chất protein chứa polypeptit có hoạt tính sinh lý là thành phần dược lý, dược chất protein cần được sử dụng thường xuyên cho đối tượng bị bệnh.

Tuy nhiên, do hầu hết các loại dược chất protein được sử dụng cho đối tượng bị bệnh dưới dạng thuốc tiêm, nên việc sử dụng thường xuyên qua đường tiêm để duy trì nồng độ trong máu của polypeptit có hoạt tính sinh lý gây đau nghiêm trọng cho đối tượng bị bệnh và tăng chi phí điều trị. Để giải quyết các vấn đề này, các nỗ lực đã được thực hiện để tối đa hóa hiệu lực của dược chất protein bằng cách tăng độ ổn định trong máu của các dược chất protein và duy trì nồng độ trong máu của chúng ở mức cao trong thời gian dài.

Tuy nhiên, các công thức bào chế tác dụng kéo dài chứa dược chất protein này không được gây ra các đáp ứng miễn dịch ở đối tượng bị bệnh trong khi tăng độ ổn định của dược chất protein và duy trì nồng độ chuẩn của dược chất ở mức đủ cao. Phương pháp bổ sung polyme có độ hòa tan cao, như polyetylen glycol (sau đây được gọi tắt là “PEG”) vào bề mặt của dược chất protein đã được sử dụng làm phương pháp làm ổn định protein, ức chế tiếp xúc với proteaza, và ngăn ngừa thải trừ qua thận. Tuy nhiên, trong khi phương pháp sử dụng PEG có thể kéo dài thời gian *in vivo* của dược chất peptit bằng cách tăng khối lượng phân tử của PEG, thì nồng độ chuẩn của dược chất protein giảm đáng kể khi khối lượng phân tử tăng, và hiệu suất có thể giảm do khả năng phản ứng thấp với peptit.

Do đó, thể tiếp hợp của mảnh globulin miễn dịch và polypeptit có hoạt tính sinh lý đã được sử dụng làm phương pháp làm tăng thời gian bán thải trong huyết thanh, và các

nghiên cứu khác nhau đã được thực hiện để cải tiến phương pháp bào chế thể tiếp hợp này (Công bố đơn Patent Hàn Quốc số 10-2014-0109342).

Cụ thể, có nhu cầu ngày càng tăng đối với việc phát triển các phương pháp bào chế thể tiếp hợp được chất tác dụng kéo dài một cách hữu hiệu bằng cách đơn giản hóa phương pháp bào chế đã biết.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề cập đến hợp chất trung gian để bào chế thể tiếp hợp được chất tác dụng kéo dài.

Sáng chế cũng đề cập đến chế phẩm bào chế thể tiếp hợp được chất tác dụng kéo dài chứa hợp chất trung gian này.

Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp bào chế thể tiếp hợp được chất tác dụng kéo dài bằng cách sử dụng hợp chất trung gian này.

Sáng chế cũng đề cập đến thể tiếp hợp được chất tác dụng kéo dài được bào chế bằng phương pháp bào chế này.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến hợp chất trung gian mới.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến hợp chất có công thức 1 hoặc chất đồng phân lập thể, solvat, hoặc muối được dụng của nó:

Công thức 1



trong đó trong công thức 1,

X là vùng Fc globulin miễn dịch;

L1 là C₁-C₆ alkylen mạch thẳng hoặc mạch nhánh;

L2 là -a1-CONH-, -a1-NHCO-, -a1-NHCO-a2-, -COO-, -b1-COO-, -COO-b2-, hoặc -b1-COO-b2-, và a1, a2, b1, và b2 độc lập với nhau là C₁-C₆ alkylen mạch thẳng hoặc mạch nhánh;

n nằm trong khoảng từ 10 đến 2400; và

R là gốc bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm 2,5-dioxopyrolidinyl, 2,5-dioxopyrolyl, aldehyt, maleimit, C₆-C₂₀ aryl disulfua, C₅-C₂₀ heteroaryl disulfua, vinyl

sulfon, thiol, halogen-axetamit, succinimit, *p*-nitrophenyl carbonat, thioeste, và dẫn xuất của chúng.

Trong hợp chất hoặc chất đồng phân lập thể, solvat, hoặc muối được dụng của nó theo phương án nêu trên, trong đó trong công thức 1, L1 là C₁-C₆ alkylen mạch thẳng hoặc mạch nhánh; L2 là -a1-NHCO- hoặc -a1-NHCO-a2-; a1 và a2 độc lập với nhau là C1-C6 alkylen mạch thẳng hoặc mạch nhánh; n nằm trong khoảng từ 200 đến 250; và R là maleimit.

Trong hợp chất hoặc chất đồng phân lập thể, solvat, hoặc muối được dụng của nó theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên, X là vùng Fc globulin miễn dịch chứa trình tự bản lề ở đầu tận cùng N.

Trong hợp chất hoặc chất đồng phân lập thể, solvat, hoặc muối được dụng của nó theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên, X bao gồm trình tự bản lề được cải biến để bao gồm chỉ một gốc cystein bằng cách loại bỏ một phần của trình tự axit amin chứa các axit amin dưới đây:

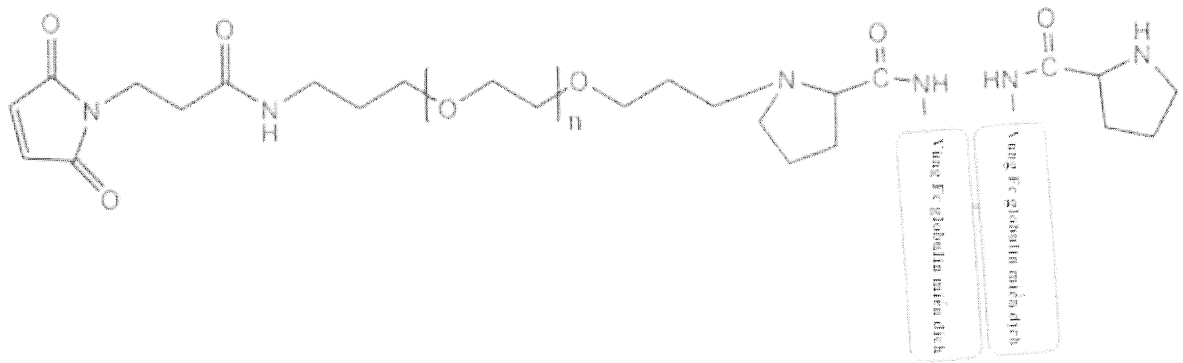
Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro-Ser-Cys-Pro (SEQ ID NO.7).

Trong hợp chất hoặc chất đồng phân lập thể, solvat, hoặc muối được dụng của nó theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên, trình tự bản lề bao gồm trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.8 (Ser-Cys-Pro) hoặc trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.9 (Pro-Ser-Cys-Pro).

Trong hợp chất hoặc chất đồng phân lập thể, solvat, hoặc muối được dụng của nó theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên, L1 được liên kết với nhóm phản ứng amin hoặc nhóm phản ứng thiol nằm ở một đầu của X.

Trong hợp chất hoặc chất đồng phân lập thể, solvat, hoặc muối được dụng của nó theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên, hợp chất này có công thức 2:

Công thức 2



trong đó trong công thức 2, n nằm trong khoảng từ 200 đến 250.

Trong hợp chất hoặc chất đồng phân lập thể, solvat, hoặc muối được dụng của nó theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên, X là vùng Fc globulin miễn dịch có nguồn gốc từ IgG, IgA, IgD, IgE, hoặc IgM.

Trong hợp chất hoặc chất đồng phân lập thể, solvat, hoặc muối được dụng của nó theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên, X là vùng Fc globulin miễn dịch có nguồn gốc từ IgG1, IgG2, IgG3, hoặc IgG4.

Trong hợp chất hoặc chất đồng phân lập thể, solvat, hoặc muối được dụng của nó theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên, X là vùng Fc globulin miễn dịch ở dạng dime.

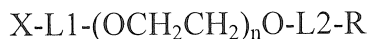
Trong hợp chất hoặc chất đồng phân lập thể, solvat, hoặc muối được dụng của nó theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên, X là vùng Fc globulin miễn dịch chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.10.

Trong hợp chất hoặc chất đồng phân lập thể, solvat, hoặc muối được dụng của nó theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên, hợp chất này có kích cỡ nằm trong khoảng từ 40 kDa đến 250 kDa.

Sáng chế cũng đề cập đến chế phẩm bào chế thể tiếp hợp được chất tác dụng kéo dài chứa hợp chất nêu trên, hoặc chất đồng phân lập thể, solvat, hoặc muối được dụng của nó.

Theo một phương án, chế phẩm bao gồm hợp chất có công thức 1 hoặc chất đồng phân lập thể, solvat, hoặc muối được dụng của nó, trong đó được chất là polypeptit có hoạt tính sinh lý:

Công thức 1



trong công thức 1,

X là vùng Fc globulin miễn dịch;

L1 là C₁-C₆ alkylen mạch thẳng hoặc mạch nhánh;

L2 là -a1-CONH-, -a1-NHCO-, -a1-NHCO-a2-, -COO-, -b1-COO-, -COO-b2-, hoặc -b1-COO-b2-, và a1, a2, b1, và b2 độc lập với nhau là C₁-C₆ alkylen mạch thẳng hoặc mạch nhánh;

n nằm trong khoảng từ 10 đến 2400; và

R là gốc bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm 2,5-dioxypyrolidinyl, 2,5-dioxopyrolyl, aldehyt, maleimit, C₆-C₂₀ aryl disulfua, C₅-C₂₀ heteroaryl disulfua, vinyl sulfon, thiol, halogen-axetamit, succinimit, *p*-nitrophenyl carbonat, thioeste, và dẫn xuất của chúng.

Trong chế phẩm theo phương án nêu trên, L1 là C₁-C₆ alkylen mạch thẳng hoặc mạch nhánh; L2 là -a1-NHCO- hoặc -a1-NHCO-a2-; a1 và a2 độc lập với nhau là C₁-C₆ alkylen mạch thẳng hoặc mạch nhánh; n nằm trong khoảng từ 200 đến 250; và R là maleimit.

Trong chế phẩm theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên, polypeptit có hoạt tính sinh lý được chọn từ nhóm bao gồm peptit tương tự glucagon-1 (GLP-1), yếu tố kích thích tăng sinh bạch cầu hạt (G-CSF), hormon sinh trưởng của người (hGH), erythropoietin (EPO), glucagon, insulin, hormon giải phóng hormon sinh trưởng, peptit giải phóng hormon sinh trưởng, interferon, thụ thể interferon, thụ thể liên hợp với protein G, interleukin, thụ thể interleukin, enzym, protein gắn kết interleukin, protein gắn kết xytokin, yếu tố hoạt hóa đại thực bào, peptit đại thực bào, yếu tố tế bào B, yếu tố tế bào T, protein A, chất ức chế dị ứng, glycoprotein hoại tử tế bào, immunotoxin, lymphotoxin, yếu tố hoại tử khối u, chất kìm hãm khối u, yếu tố phát triển sự di căn, α -1 antitrypsin, albumin, α -lactalbumin, apolipoprotein-E, erythropoietin được glycosyl hóa ở mức cao, angiopoietin, hemoglobin, thrombin, peptit hoạt hóa thụ thể thrombin, thrombomodulin, yếu tố đông máu VII, yếu tố đông máu VIIa, yếu tố đông máu VIII, yếu tố đông máu IX, yếu tố đông máu XIII, yếu tố hoạt hóa plasminogen, peptit gắn kết

fibrin, urokinaza, streptokinaza, hirudin, protein C, protein phản ứng C, chất ức chế lenin, chất ức chế collagenaza, superoxit dismutaza, leptin, yếu tố sinh trưởng có nguồn gốc từ tiểu cầu, yếu tố sinh trưởng biểu mô, yếu tố sinh trưởng biểu bì, angiostatin, angiotensin, yếu tố sinh trưởng xương, protein kích thích tạo xương, calcitonin, atriopeptin, yếu tố tạo sụn, elcatonin, yếu tố hoạt hóa mô liên kết, chất ức chế quá trình của yếu tố mô, hormon kích thích nang, hormon tạo hoàng thể, hormon giải phóng hormon tạo hoàng thể, yếu tố sinh trưởng dây thần kinh, hormon tuyến cận giáp, relaxin, secretin, somatomedin, yếu tố sinh trưởng tương tự insulin, hormon vỏ tuyến thượng thận, cholecystokinin, polypeptit tuyến tụy, peptit giải phóng gastrin, yếu tố giải phóng corticotropin, hormon kích thích tuyến giáp, autotaxin, lactoferrin, myostatin, incretins, polypeptit ức chế dạ dày (GIP), chất chủ vận đặc hiệu kép GLP-1/GIP, chất chủ vận đặc hiệu đồng thời GLP-1/GIP/Glucagon, kháng nguyên bề mặt tế bào, kháng nguyên vacxin có nguồn gốc từ virus, kháng thể đơn dòng, kháng thể đa dòng, và mảnh kháng thể.

Trong chế phẩm theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên, R của hợp chất của chế phẩm được liên kết với cystein của dược chất.

Trong chế phẩm theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên, X là vùng Fc globulin miễn dịch có nguồn gốc từ IgG1, IgG2, IgG3, hoặc IgG4.

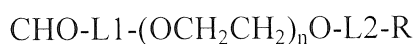
Trong chế phẩm theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên, X là vùng Fc globulin miễn dịch chứa trình tự bản lề được cải biến để bao gồm chỉ một gốc cystein bằng cách loại bỏ một phần của trình tự axit amin chứa các axit amin dưới đây:

Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro-Ser-Cys-Pro (SEQ ID NO.7).

Still sáng chế cũng đề cập đến phương pháp bào chế thể tiếp hợp tác dụng kéo dài của polypeptit có hoạt tính sinh lý.

Theo một phương án, phương pháp bào chế này bao gồm bước bào chế thể tiếp hợp bằng cách liên kết vùng Fc globulin miễn dịch được liên kết mono-PEG, được bào chế bằng cách liên kết gốc liên kết có công thức 3 với đầu tận cùng N của vùng Fc globulin miễn dịch chứa trình tự bản lề, với polypeptit có hoạt tính sinh lý:

Công thức 3



trong đó trong công thức 3,

L1 là C₁-C₆ alkylen mạch thẳng hoặc mạch nhánh;

L2 là -a1-CONH-, -a1-NHCO-, -a1-NHCO-a2-, -COO-, -b1-COO-, -COO-b2-, hoặc -b1-COO-b2-, và a1, a2, b1, và b2 độc lập với nhau là C₁-C₆ alkylen mạch thẳng hoặc mạch nhánh;

n nằm trong khoảng từ 10 đến 2400; và

R là gốc bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm 2,5-dioxopyrrolidinyl, 2,5-dioxopyrolyl, aldehyt, maleimit, C₆-C₂₀ aryl disulfua, C₅-C₂₀ heteroaryl disulfua, vinyl sulfon, thiol, halogen-axetamit, succinimit, *p*-nitrophenyl carbonat, thioeste, và dẫn xuất của chúng.

Trong phương pháp bào chế theo phương án nêu trên, vùng Fc globulin miễn dịch được liên kết mono-PEG được bào chế bằng cách liên kết gốc liên kết có công thức 3 với đầu tận cùng N của vùng Fc globulin miễn dịch ở độ pH nằm trong khoảng từ 4,0 đến 8,0 trong sự có mặt của chất khử.

Trong phương pháp bào chế theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên, thể tiếp hợp được bào chế bằng liên kết gốc liên kết của vùng Fc globulin miễn dịch được liên kết mono-PEG với polypeptit có hoạt tính sinh lý ở độ pH nằm trong khoảng từ 5,5 đến 8,0.

Trong phương pháp bào chế theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên, bước bào chế thể tiếp hợp được thực hiện bằng cách cho vùng Fc globulin miễn dịch được liên kết mono-PEG phản ứng với polypeptit có hoạt tính sinh lý ở tỷ lệ mol nằm trong khoảng từ 1:1 đến 1:3.

Trong phương pháp bào chế theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên, phương pháp này bao gồm: bước bào chế vùng Fc globulin miễn dịch được liên kết mono-PEG bằng cách liên kết gốc liên kết có công thức 3 với đầu tận cùng N của vùng Fc globulin miễn dịch; và bước bào chế thể tiếp hợp bằng cách liên kết gốc liên kết của vùng Fc globulin miễn dịch được liên kết mono-PEG được bào chế trong bước trước đó với polypeptit có hoạt tính sinh lý.

Trong phương pháp bào chế theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên, gốc liên kết của vùng Fc globulin miễn dịch được liên kết mono-PEG được liên kết với cystein của polypeptit có hoạt tính sinh lý.

Trong phương pháp bào chế theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên, phương pháp này bao gồm: bước bào chế vùng Fc globulin miễn dịch được liên kết mono-PEG bằng cách liên kết gốc liên kết có công thức 3 với đầu tận cùng N của vùng Fc globulin miễn dịch; bước tinh chế vùng Fc globulin miễn dịch được liên kết mono-PEG được bào chế trong bước trước đó bằng phương pháp sắc ký trao đổi anion trong dung dịch đệm có độ pH nằm trong khoảng từ 6,0 đến 8,5; và bước bào chế thể tiếp hợp bằng cách liên kết gốc liên kết của vùng Fc globulin miễn dịch được liên kết mono-PEG được tinh chế trong bước trước đó với polypeptit có hoạt tính sinh lý.

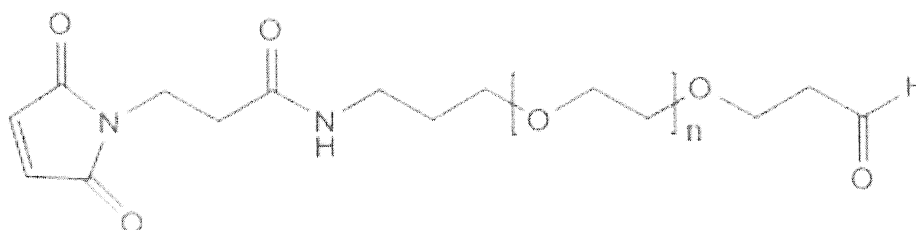
Trong phương pháp bào chế theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên, phương pháp này được thực hiện mà không cần thực hiện bước siêu lọc/lọc tuần hoàn có pha loãng sau khi bào chế vùng Fc globulin miễn dịch được liên kết mono-PEG.

Trong phương pháp bào chế theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên, phương pháp này còn bao gồm bước tinh chế thể tiếp hợp bằng phương pháp sắc ký tương tác kỵ nước.

Trong phương pháp bào chế theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên, trong công thức 3, L1 là C₁-C₆ alkylen mạch thẳng hoặc mạch nhánh; L2 là -a1-NHCO- hoặc -a1-NHCO-a2-; a1 và a2 độc lập với nhau là C₁-C₆ alkylen mạch thẳng hoặc mạch nhánh; n nằm trong khoảng từ 200 đến 250; và R là maleimit.

Trong phương pháp bào chế theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên, gốc liên kết có công thức 4:

Công thức 4



trong đó trong công thức 4, n nằm trong khoảng từ 200 đến 250.

Trong phương pháp bào chế theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên, gốc liên kết có kích cỡ nằm trong khoảng từ 1 kDa đến 100 kDa.

Trong phương pháp bào chế theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên, polypeptit có hoạt tính sinh lý được chọn từ nhóm bao gồm peptit tương tự glucagon-1 (GLP-1), yếu tố kích thích tăng sinh bạch cầu hạt (G-CSF), hormon sinh trưởng của người (hGH), erythropoietin (EPO), glucagon, insulin, hormon giải phóng hormon sinh trưởng, peptit giải phóng hormon sinh trưởng, interferon, thụ thể interferon, thụ thể liên hợp với protein G, interleukin, thụ thể interleukin, enzym, protein gắn kết interleukin, protein gắn kết xytokin, yếu tố hoạt hóa đại thực bào, peptit đại thực bào, yếu tố tế bào B, yếu tố tế bào T, protein A, chất ức chế dị ứng, glycoprotein hoại tử tế bào, immunotoxin, lymphotoxin, yếu tố hoại tử khối u, chất kìm hãm khối u, yếu tố phát triển sự di căn, α -1 antitrypsin, albumin, α -lactalbumin, apolipoprotein-E, erythropoietin được glycosyl hóa ở mức cao, angiopoietin, hemoglobin, thrombin, peptit hoạt hóa thụ thể thrombin, thrombomodulin, yếu tố đông máu VII, yếu tố đông máu VIIa, yếu tố đông máu VIII, yếu tố đông máu IX, yếu tố đông máu XIII, yếu tố hoạt hóa plasminogen, peptit gắn kết fibrin, urokinaza, streptokinaza, hirudin, protein C, protein phản ứng C, chất ức chế lenin, chất ức chế collagenaza, superoxit dismutaza, leptin, yếu tố sinh trưởng có nguồn gốc từ tiểu cầu, yếu tố sinh trưởng biểu mô, yếu tố sinh trưởng biểu bì, angiostatin, angiotensin, yếu tố sinh trưởng xương, protein kích thích tạo xương, calcitonin, atriopeptin, yếu tố tạo sụn, elcatonin, yếu tố hoạt hóa mô liên kết, chất ức chế quá trình của yếu tố mô, hormon kích thích nang, hormon tạo hoàng thể, hormon giải phóng hormon tạo hoàng thể, yếu tố sinh trưởng dây thần kinh, hormon tuyến cận giáp, relaxin, secretin, somatomedin, yếu tố sinh trưởng tương tự insulin, hormon vỏ tuyến thượng thận, cholecystokinin, polypeptit tuyến tụy, peptit giải phóng gastrin, yếu tố giải phóng corticotropin, hormon kích thích tuyến giáp, autotaxin, lactoferrin, myostatin, incretins, polypeptit ức chế dạ dày (GIP), chất chủ vận đặc hiệu kép GLP-1/GIP, chất chủ vận đặc hiệu đồng thời GLP-1/GIP/Glucagon, kháng nguyên bề mặt tế bào, kháng nguyên vacxin có nguồn gốc từ virus, kháng thể đơn dòng, kháng thể đa dòng, và mảnh kháng thể.

Trong phương pháp bào chế theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên, polypeptit có hoạt tính sinh lý là chất chủ vận đặc hiệu đồng thời GLP-1/GIP/Glucagon, glucagon, hoặc chất tương tự của chúng.

Trong phương pháp bào chế theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên, polypeptit có hoạt tính sinh lý chứa trình tự axit amin bất kỳ như nêu trong SEQ ID NO.1 đến SEQ ID NO.6.

Trong phương pháp bào chế theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên, trình tự bản lề được cải biến để bao gồm chỉ một gốc cystein bằng cách loại bỏ một phần của trình tự bản lề có trình tự axit amin dưới đây:

Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro-Ser-Cys-Pro (SEQ ID NO.7).

Trong phương pháp bào chế theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên, trình tự bản lề bao gồm trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.8 (Ser-Cys-Pro) hoặc trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.9 (Pro-Ser-Cys-Pro).

Trong phương pháp bào chế theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên, vùng Fc globulin miễn dịch có nguồn gốc từ IgG1, IgG2, IgG3, hoặc IgG4.

Still sáng chế cũng đề cập đến thể tiếp hợp được chất tác dụng kéo dài được bào chế bằng chế phẩm or phương pháp.

Theo phương pháp bào chế thể tiếp hợp được chất tác dụng kéo dài bằng cách sử dụng hợp chất trung gian mới theo sáng chế, thể tiếp hợp được chất tác dụng kéo dài có thể được bào chế với hiệu suất cao mặc dù một số bước tinh chế thông thường được bỏ qua, do đó năng suất của thể tiếp hợp được chất tác dụng kéo dài có thể được gia tăng.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 là đồ thị thể hiện kết quả phân tích cấu trúc của vùng Fc globulin miễn dịch được liên kết mono-PEG bằng thử nghiệm MALDI-TOF.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn thông qua phần mô tả dưới đây. Trong khi đó, mỗi phần mô tả và phương án được bộc lộ trong sáng chế có thể được áp dụng trong sáng chế để mô tả các phần mô tả và phương án khác nhau. Nói cách khác, toàn bộ các tổ hợp của các thành phần khác nhau được bộc lộ trong sáng chế nằm trong phạm vi của sáng chế. Hơn nữa, phạm vi của sáng chế không chỉ giới hạn ở phần mô tả chi tiết dưới đây. Ngoài ra, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ nhận ra hoặc có thể xác định chắc chắn, không cần sử dụng nhiều hơn các thử nghiệm thông thường, nhiều

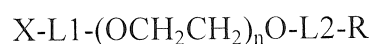
phương án tương đương với các phương án cụ thể của sáng chế. Các phương án tương đương như vậy nằm trong phạm vi của bộ yêu cầu bảo hộ kèm theo.

Trong toàn bộ bản mô tả này, không chỉ các mã một chữ cái và ba chữ cái thông thường được sử dụng để ký hiệu các axit amin có trong tự nhiên, mà các mã ba chữ cái này cũng được sử dụng để ký hiệu các axit amin khác, như α -axit aminoisobutyric (Aib), N-methylglycin (Sar), và axit α -methyl-glutamic. Ngoài ra, các axit amin được bộc lộ trong bản mô tả này được viết tắt theo quy tắc danh pháp IUPAC-IUB như sau:

alanin (Ala, A)	arginin (Arg, R)
asparagin (Asn, N)	axit aspartic (Asp, D)
cystein (Cys, C)	axit glutamic (Glu, E)
glutamin (Gln, Q)	glycin (Gly, G)
histidin (His, H)	isoleucin (Ile, I)
leucin (Leu, L)	lysin (Lys, K)
metionin (Met, M)	phenylalanin (Phe, F)
prolin (Pro, P)	serin (Ser, S)
threonin (Thr, T)	tryptophan (Trp, W)
tyrosin (Tyr, Y)	valin (Val, V)

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến hợp chất có công thức 1, hoặc chất đồng phân lập thể, solvat, hoặc muối được dụng của nó:

Công thức 1



Trong công thức 1,

X là vùng Fc globulin miễn dịch;

L1 là C₁-C₆ alkylen mạch thẳng hoặc mạch nhánh;

L2 là -a1-CONH-, -a1-NHCO-, -a1-NHCO-a2-, -COO-, -b1-COO-, -COO-b2-, hoặc -b1-COO-b2-, và a1, a2, b1, và b2 độc lập với nhau là C₁-C₆ alkylen mạch thẳng hoặc mạch nhánh;

n nằm trong khoảng từ 10 đến 2400; và

R là gốc bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm 2,5-dioxopyrolidinyl, 2,5-dioxopyrolyl, aldehyt, maleimit, C₆-C₂₀ aryl disulfua, C₅-C₂₀ heteroaryl disulfua, vinyl sulfon, thiol, halogen-axetamit, succinimit, *p*-nitrophenyl carbonat, thioeste, và dẫn xuất của chúng.

Theo sáng chế, hợp chất có công thức 1, hoặc chất đồng phân lập thể, solvat, hoặc muối được dùng của nó là hợp chất mới được bào chế để bào chế thể tiếp hợp tác dụng kéo dài và có thể được gọi là “hợp chất trung gian” hoặc “chất trung gian” trong sáng chế.

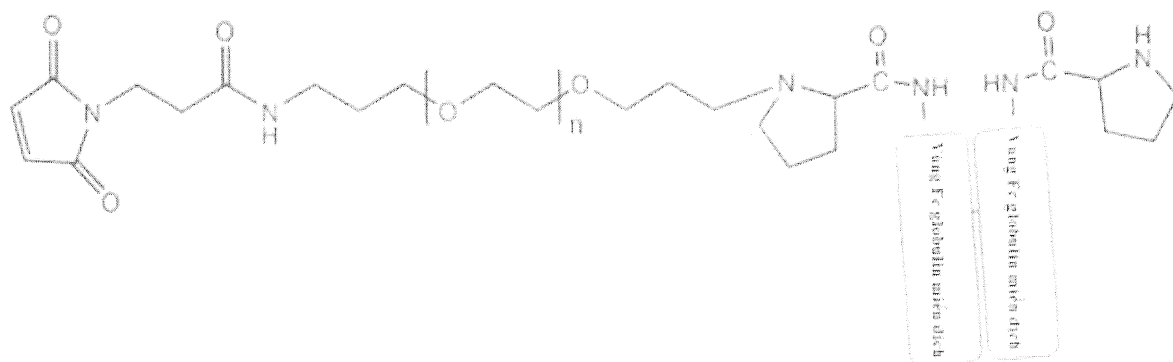
Trong phương pháp bào chế thể tiếp hợp được chất tác dụng kéo dài bằng cách sử dụng hợp chất trung gian theo sáng chế, các bước tinh chế bằng phương pháp siêu lọc/lọc tuần hoàn có pha loãng và phương pháp sắc ký tương tác kỵ nước có thể được bỏ qua, và các tác dụng đến bước bào chế thể tiếp hợp được chất tác dụng kéo dài với hiệu suất cao có thể thu được mặc dù các bước tinh chế này được bỏ qua.

Cụ thể, hợp chất trung gian này ở dạng trong đó vùng Fc globulin miễn dịch được liên kết với gốc liên kết. Trong hợp chất trung gian có công thức 1, X có thể là vùng Fc globulin miễn dịch, và $L1-(OCH_2CH_2)_nO-L2-R$ có thể là gốc liên kết. Cụ thể, trong công thức 1, L1 là C_1-C_6 alkylen mạch thẳng hoặc mạch nhánh; L2 là $-a1-NHCO-$ hoặc $-a1-NHCO-a2-$; a1 và a2 độc lập với nhau là C_1-C_6 alkylen mạch thẳng hoặc mạch nhánh; n nằm trong khoảng từ 200 đến 250; và R là maleimit, không chỉ giới hạn ở các phương án này.

L1 là vị trí gắn kết với vùng Fc globulin miễn dịch và có thể là C_1-C_6 alkylen mạch thẳng hoặc mạch nhánh, không chỉ giới hạn ở các phương án này. L1 có thể được liên kết với nhóm phản ứng amin nằm ở một đầu hoặc gốc lysin của X hoặc nhóm phản ứng thiol, không chỉ giới hạn ở các phương án này. R là vị trí để liên kết hợp chất trung gian này với polypeptit có hoạt tính sinh lý, có thể bao gồm nhóm phản ứng (ví dụ thiol, maleimit, aldehyt, và succinimidyl) có khả năng gắn kết với cystein, hoặc nhóm amin của đầu tận cùng N, hoặc gốc lysin của polypeptit có hoạt tính sinh lý, không chỉ giới hạn ở các phương án này.

Theo sáng chế, hợp chất trung gian này có thể có công thức 2, không chỉ giới hạn ở các phương án này:

Công thức 2



Trong công thức 2, n nằm trong khoảng từ 1 đến 3000, nằm trong khoảng từ 10 đến 2000, nằm trong khoảng từ 50 đến 1000, nằm trong khoảng từ 100 đến 700, nằm trong khoảng từ 150 đến 300, hoặc nằm trong khoảng từ 200 đến 250.

Cụ thể, hợp chất trung gian này có thể có kích nằm trong khoảng từ 40 kDa đến 250 kDa, 80 kDa đến 200 kDa, nằm trong khoảng từ 100 kDa đến 150 kDa, không chỉ giới hạn ở các phương án này.

Theo sáng chế, X có thể là vùng Fc globulin miễn dịch có trình tự bản lề ở đầu tận cùng N, và cụ thể, trình tự bản lề có thể được cải biến để bao gồm chỉ một gốc cystein bằng cách loại bỏ một phần của trình tự axit amin chứa các axit amin dưới đây, không chỉ giới hạn ở các phương án này:

Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro-Ser-Cys-Pro (SEQ ID NO.7).

Thuật ngữ “vùng Fc globulin miễn dịch” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ vùng bao gồm miền hằng định chuỗi nặng 2 (CH₂) và/hoặc miền hằng định chuỗi nặng 3 (CH₃) không bao gồm miền biến đổi chuỗi nặng và miền biến đổi chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch. Vùng Fc globulin miễn dịch có thể là thành phần cấu thành gốc của thể tiếp hợp được chất tác dụng kéo dài theo sáng chế.

Cụ thể, X có thể là vùng Fc globulin miễn dịch có nguồn gốc từ IgG, IgA, IgD, IgE, hoặc IgM, cụ thể hơn, vùng Fc globulin miễn dịch có nguồn gốc từ IgG1, IgG2, IgG3, hoặc IgG4, không chỉ giới hạn ở các phương án này.

Theo sáng chế, vùng Fc globulin miễn dịch có thể bao gồm trình tự bản lề cụ thể ở đầu tận cùng N.

Thuật ngữ “trình tự bản lề” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ vị trí nằm ở chuỗi nặng và tạo ra dime của vùng Fc globulin miễn dịch thông qua liên kết disulfua liên phân tử.

Thuật ngữ “đầu tận cùng N” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ đầu tận cùng amino của protein hoặc polypeptit và có thể bao gồm gốc axit amin nằm ở một đầu của đầu tận cùng amin hoặc 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 hoặc nhiều axit amin từ một đầu của đầu tận cùng amin. Vùng Fc globulin miễn dịch theo sáng chế có thể bao gồm trình tự bản lề ở đầu tận cùng N, không chỉ giới hạn ở các phương án này.

Theo các mục đích của sáng chế, trình tự bản lề có thể bao gồm chỉ một gốc cystein là gốc cystein nằm ở vị trí thứ 8 hoặc vị trí thứ 11 của trình tự bản lề của trình tự SEQ ID NO.7 được loại bỏ. Trình tự bản lề theo sáng chế có thể cấu thành từ 3 đến 12 axit amin chỉ bao gồm một gốc cystein, không chỉ giới hạn ở các phương án này. Cụ thể hơn, trình tự bản lề theo sáng chế có thể có trình tự như sau: Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Pro-Ser-Cys-Pro, Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro-Ser-Pro, Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro-Ser, Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro-Pro, Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro-Ser, Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys, Glu-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys, Glu-Ser-Pro-Ser-Cys-Pro, Glu-Pro-Ser-Cys-Pro, Pro-Ser-Cys-Pro, Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Ser-Cys-Pro, Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Pro-Ser-Cys-Pro, Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Ser-Cys-Pro, Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys, Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro, Glu-Ser-Lys-Pro-Ser-Cys-Pro, Glu-Ser-Pro-Ser-Cys-Pro, hoặc Glu-Pro-Ser-Cys. Cụ thể hơn, trình tự bản lề có thể bao gồm trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.8 (Ser-Cys-Pro) hoặc trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.9 (Pro-Ser-Cys-Pro), không chỉ giới hạn ở các phương án này.

X có thể là dime được tạo ra từ hai phân tử chuỗi của vùng Fc globulin miễn dịch trong sự có mặt của trình tự bản lề, và hợp chất trung gian theo sáng chế có thể ở dạng trong đó một đầu của gốc liên kết được liên kết với một chuỗi của vùng Fc globulin miễn dịch ở dạng dime, không chỉ giới hạn ở các phương án này. Theo sáng chế, X có thể là dime của vùng Fc globulin miễn dịch, không chỉ giới hạn ở các phương án này.

Ngoài ra, X theo sáng chế có thể là vùng Fc globulin miễn dịch chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.10, không chỉ giới hạn ở các phương án này.

Trong khi đó, vùng Fc globulin miễn dịch theo sáng chế có thể là vùng Fc kéo dài bao gồm một phần hoặc toàn bộ miền hằng định chuỗi nặng 1 (CH1) và/hoặc miền hằng định chuỗi nhẹ 1 (CL1) không bao gồm miền biến đổi chuỗi nặng và miền biến đổi chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch, miễn là vùng Fc globulin miễn dịch có tác dụng gần như tương đương hoặc được tăng cường so với dạng nguyên thể. Hơn nữa, vùng Fc globulin miễn dịch có thể là vùng mà từ đó một phần dài đáng kể của trình tự axit amin tương ứng với CH2 và/hoặc CH3 được loại bỏ.

Ví dụ, 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) tổ hợp của một hoặc nhiều miền được chọn từ miền CH1, miền CH2, miền CH3, và miền CH4 và miền bản lề globulin miễn dịch (hoặc một phần của vùng bản lề), hoặc 6) dime của mỗi miền trong số miền hằng định chuỗi nặng và miền hằng định chuỗi nhẹ. Tuy nhiên, sáng chế không chỉ giới hạn ở các phương án này.

Hơn nữa, vùng Fc globulin miễn dịch theo sáng chế bao gồm không chỉ trình tự axit amin có trong tự nhiên mà cả dẫn xuất trình tự của nó. Dẫn xuất trình tự axit amin là trình tự khác với trình tự axit amin có trong tự nhiên do đột biến loại bỏ, chèn thêm, thay thế không bảo thủ hoặc bảo thủ, hoặc tổ hợp bất kỳ của một hoặc nhiều axit amin của trình tự axit amin có trong tự nhiên.

Ví dụ, trong trường hợp của IgG Fc, các gốc axit amin được biết là quan trọng trong liên kết ở các vị trí 214 đến 238, 297 đến 299, 318 đến 322, hoặc 327 đến 331 có thể được sử dụng làm đích thích hợp để cải biến.

Hơn nữa, các dẫn xuất khác nhau khác bao gồm các dẫn xuất trong đó vị trí có thể tạo ra liên kết disulfua được loại bỏ hoặc một số gốc axit amin được loại bỏ ra khỏi đầu tận cùng N của dạng Fc nguyên thể, và gốc methionin được bổ sung vào đầu tận cùng N của dạng Fc nguyên thể có thể được sử dụng. Ngoài ra, để loại bỏ chức năng tác động, vị trí gắn kết bổ thể, như vị trí gắn kết C1q, có thể được loại bỏ, và vị trí có hoạt tính gây độc tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể có thể được loại bỏ. Các phương pháp bào chế các dẫn xuất trình tự như vậy của vùng Fc globulin miễn dịch được bộc lộ trong WO97/34631 và WO96/32478.

Các gốc trao đổi axit amin trong protein và peptit, không làm biến đổi hoạt tính của các phân tử, đã biết trong lĩnh vực này (H. Neurath, R. L. Hill, *The Proteins*, Academic Press, New York, 1979). Các gốc trao đổi axit amin thường xuất hiện nhất bao gồm Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Thy/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu, và Asp/Gly. Khi cần, vùng Fc có thể được cải biến bằng phương pháp phosphoryl hóa, sulfat hóa, acryl hóa, glycosyl hóa, metyl hóa, farnesyl hóa, axetyl hóa, và amit hóa.

Các dẫn xuất trình tự nêu trên của vùng Fc là các dẫn xuất có hoạt tính sinh học tương đương với vùng Fc globulin miễn dịch theo sáng chế hoặc độ ổn định cấu trúc được cải thiện chống lại nhiệt, pH, hoặc các điều kiện tương tự.

Ngoài ra, các vùng Fc globulin miễn dịch này có thể có thể được thu nhận từ dạng tự nhiên được phân lập từ người và các động vật khác bao gồm như bò, dê, lợn, chuột nhắt, thỏ, chuột đồng, chuột cống, và chuột lang, hoặc có thể là vùng Fc globulin miễn dịch tái tổ hợp hoặc dẫn xuất của nó, được thu nhận từ tế bào động vật được chuyển gen hoặc vi sinh vật. Về vấn đề này, các vùng Fc này có thể được thu nhận từ globulin miễn dịch tự nhiên bằng cách phân lập globulin miễn dịch toàn phần từ cơ thể người hoặc động vật sống và xử lý globulin miễn dịch được phân lập bằng proteaza. Khi được xử lý bằng papain, thì globulin miễn dịch toàn phần được phân cắt thành vùng Fab và vùng Fc, trong khi đó khi được xử lý bằng pepsin, thì globulin miễn dịch toàn phần tự nhiên được phân cắt thành mảnh pF'c và mảnh F(ab)₂. Các mảnh này có thể được xử lý bằng phương pháp sắc ký loại cỡ để phân lập Fc hoặc pF'c.. Theo một phương án cụ thể hơn, vùng Fc có nguồn gốc từ người là vùng Fc globulin miễn dịch tái tổ hợp được thu nhận từ vi sinh vật.

Ngoài ra, vùng Fc globulin miễn dịch theo sáng chế có thể có dạng glycan tự nhiên, glycan được kéo dài hoặc cắt ngắn so với thể tự nhiên, hoặc ở dạng được khử glycosyl hóa. Các glycan của vùng Fc globulin miễn dịch có thể được kéo dài, cắt ngắn hoặc loại bỏ bằng các phương pháp thông thường được sử dụng trong lĩnh vực này, như phương pháp hóa học, phương pháp enzym, và phương pháp thiết kế di truyền bằng cách sử dụng vi sinh vật. Về vấn đề này, vùng Fc globulin miễn dịch được thu nhận bằng cách loại bỏ các glycan có ái lực gắn kết với bổ thể C1q giảm đáng kể và làm giảm hoặc làm mất hoạt tính gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể hoặc hoạt tính gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể, do đó không gây đáp ứng miễn dịch không mong *muốn* trong các sinh vật sống.

Trên cơ sở vấn đề này, vùng Fc globulin miễn dịch được khử glycosyl hóa hoặc chưa được glycosyl hóa có thể thích hợp hơn để sử dụng làm chất mang được chất đáp ứng tiêu chuẩn của sáng chế.

Thuật ngữ “khử glycosyl hóa” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ vùng Fc từ đó glycan được loại bỏ bằng cách sử dụng enzym và thuật ngữ “không glycosyl hóa” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ vùng Fc chưa được glycosyl hóa được sản sinh trong sinh vật nhân sơ, cụ thể hơn là, *E. coli*.

Trong khi đó, vùng Fc globulin miễn dịch có thể có nguồn gốc từ người hoặc động vật, như bò, dê, lợn, chuột nhắt, thỏ, chuột đồng, chuột cống, hoặc chuột lang. Theo một phương án cụ thể hơn, vùng Fc globulin miễn dịch có nguồn gốc từ người.

Ngoài ra, vùng Fc globulin miễn dịch có thể là có nguồn gốc từ IgG, IgA, IgD, IgE, hoặc IgM, hoặc tổ hợp hoặc thể lai bất kỳ của chúng. Theo một phương án cụ thể hơn, vùng Fc globulin miễn dịch có nguồn gốc từ IgG hoặc IgM là các protein có nhiều nhất trong máu người, và theo một phương án cụ thể hơn, vùng Fc globulin miễn dịch có nguồn gốc từ IgG, được biết là tăng cường thời gian bán thải của các protein gắn kết phối tử. Theo một phương án cụ thể hơn, vùng Fc globulin miễn dịch là vùng Fc của IgG4, và theo một phương án cụ thể nhất, vùng Fc của IgG4 là vùng Fc chưa được glycosyl hóa có nguồn gốc từ IgG4 của người, nhưng không chỉ giới hạn ở các phương án này.

Trong khi đó, liên quan đến vùng Fc globulin miễn dịch, thuật ngữ “tổ hợp” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ quá trình hình thành liên kết giữa polypeptit mã hóa vùng Fc globulin miễn dịch chuỗi đơn có cùng nguồn gốc và polypeptit chuỗi đơn có nguồn gốc khác khi dime hoặc multimer được tạo ra. Tức là, dime hoặc multimer có thể được tạo ra từ hai hoặc nhiều mảnh Fc được chọn từ nhóm bao gồm mảnh Fc IgG, mảnh Fc IgA, mảnh Fc IgM, mảnh Fc IgD, và mảnh Fc IgE.

Thuật ngữ “thể lai” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ các trình tự tương ứng với hai hoặc nhiều vùng Fc globulin miễn dịch có nguồn gốc khác nhau có mặt trong chuỗi đơn của miền hằng định globulin miễn dịch. Theo sáng chế, các dạng thể lai khác nhau có thể được tạo ra. Tức là, thể lai miền có thể cấu thành từ 1 đến 4 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 còn bao gồm vùng bản lề.

Trong khi đó, IgG cũng có thể được phân loại thành các phân nhóm IgG1, IgG2, IgG3 và IgG4, có thể được tổ hợp hoặc lai hóa theo sáng chế. Phân nhóm IgG2 và IgG4 được ưu tiên, và mảnh Fc của IgG4 hiếm khi có chức năng tác động, như hoạt tính gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể (CDC) được ưu tiên nhất.

Thuật ngữ “gốc liên kết” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ gốc liên kết được chất (ví dụ polypeptit có hoạt tính sinh lý) với vùng Fc globulin miễn dịch trong thể tiếp hợp được chất tác dụng kéo dài, và gốc liên kết có thể là gốc liên kết peptidyl hoặc gốc liên kết không peptidyl. Cụ thể, gốc liên kết có thể có công thức 3, không chỉ giới hạn ở các phương án này:

Công thức 3



Trong công thức 3,

L1 là C₁-C₆ alkylen mạch thẳng hoặc mạch nhánh;

L2 là -a1-CONH-, -a1-NHCO-, -a1-NHCO-a2-, -COO-, -b1-COO-, -COO-b2-, hoặc -b1-COO-b2-, và a1, a2, b1, và b2 độc lập với nhau là C₁-C₆ alkylen mạch thẳng hoặc mạch nhánh;

n nằm trong khoảng từ 1 đến 3000, nằm trong khoảng từ 10 đến 2000, nằm trong khoảng từ 50 đến 1000, nằm trong khoảng từ 100 đến 700, nằm trong khoảng từ 150 đến 300, hoặc nằm trong khoảng từ 200 đến 250; và

R là gốc bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm 2,5-dioxopyrrolidinyl, 2,5-dioxopyrrolyl, aldehyt, maleimit, C₆-C₂₀ aryl disulfua, C₅-C₂₀ heteroaryl disulfua, vinyl sulfon, thiol, halogen-axetamit, succinimit, *p*-nitrophenyl carbonat, thioeste, và dẫn xuất của chúng.

Gốc liên kết có thể bao gồm polyetylen glycol và có các cấu trúc hóa học cụ thể ở cả hai đầu của polyetylen glycol, không chỉ giới hạn ở các phương án này.

Cụ thể, trong công thức 3, L1 có thể là C₁-C₆ alkylen mạch thẳng hoặc mạch nhánh; L2 có thể là -a1-NHCO- hoặc -a1-NHCO-a2-; a1 và a2 có thể độc lập với nhau là C₁-C₆ alkylen mạch thẳng hoặc mạch nhánh; n có thể nằm trong khoảng từ 200 đến 250; và R có thể là maleimit, và gốc liên kết có thể có kích thước nằm trong khoảng từ 1 kDa đến

Hơn nữa, gốc liên kết có thể có công thức 4, không chỉ giới hạn ở các phương án này:

O=C1C=CC(=O)N1CC(=O)NCCCC(OCCO)nOCC(=O)O

Một đầu của gốc liên kết có thể được liên kết với vùng Fc globulin miễn dịch, cụ thể, đầu tận cùng N của vùng Fc globulin miễn dịch, cụ thể hơn, trình tự bản lề nằm ở đầu tận cùng N của vùng Fc globulin miễn dịch, thậm chí cụ thể hơn, gốc prolin của trình tự bản lề, để tạo ra hợp chất trung gian này, không chỉ giới hạn ở các phương án này.

Thuật ngữ “muối được dụng” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ muối có nguồn gốc từ axit hoặc bazơ vô cơ, hữu cơ được dụng. Ví dụ về axit thích hợp có thể bao gồm axit hydrocloric, axit bromic, axit sulfuric, axit nitric, axit perchloric, axit fumaric, axit maleic, axit phosphoric, axit glycolic, axit lactic, axit salixylic, axit succinic, axit toluen-p-sulfonic, axit tartaric, axit axetic, axit xitric, axit metansulfonic, axit formic, axit benzoic, axit malonic, axit naphtalen-2-sulfonic, và axit benzensulfonic. Ví dụ về muối có nguồn gốc từ bazơ thích hợp có thể bao gồm kim loại kiềm, như natri và kali, kim loại kiềm thổ, như magie và amoni.

Sáng chế bao gồm không chỉ hợp chất hoặc muối được dụng của nó, mà cả solvat được bào chế từ đó.

Ngoài ra, hợp chất có thể có mặt ở dạng chất đồng phân đối ảnh (chất đồng phân R hoặc chất đồng phân S), raxemat, hoặc chất đồng phân không đối quang, hoặc hỗn hợp bất kỳ của chúng trong trường hợp có tâm cacbon bất đối (carbon vắng mặt) trong phần tử thể của nó. Ngoài ra, hợp chất có thể có mặt ở dạng chất đồng phân *exo* hoặc chất đồng phân *endo* trong trường hợp có vòng được tạo cầu, không chỉ giới hạn ở các phương án này.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến chế phẩm chứa hợp chất có công thức 1, hoặc chất đồng phân lập thể, solvat, hoặc muối được dụng của nó, trong đó được chất là polypeptit có hoạt tính sinh lý:

Công thức 1



Trong công thức 1,

X là vùng Fc globulin miễn dịch;

L1 là C₁-C₆ alkylen mạch thẳng hoặc mạch nhánh;

L2 là -a1-CONH-, -a1-NHCO-, -a1-NHCO-a2-, -COO-, -b1-COO-, -COO-b2-, hoặc -b1-COO-b2-, và a1, a2, b1, và b2 độc lập với nhau là C₁-C₆ alkylen mạch thẳng hoặc mạch nhánh;

n nằm trong khoảng từ 1 đến 3000, nằm trong khoảng từ 10 đến 2000, nằm trong khoảng từ 50 đến 1000, nằm trong khoảng từ 100 đến 700, nằm trong khoảng từ 150 đến 300, hoặc nằm trong khoảng từ 200 đến 250; và

R là gốc bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm 2,5-dioxopyrolidinyl, 2,5-dioxopyrolyl, aldehyt, maleimit, C₆-C₂₀ aryl disulfua, C₅-C₂₀ heteroaryl disulfua, vinyl sulfon, thiol, halogen-axetamit, succinimit, *p*-nitrophenyl carbonat, thioeste, và dẫn xuất của chúng.

Cụ thể, trong công thức 1, L1 là C₁-C₆ alkylen mạch thẳng hoặc mạch nhánh; L2 là -a1-NHCO- hoặc -a1-NHCO-a2-; a1 và a2 độc lập với nhau là C₁-C₆ alkylen mạch

thẳng hoặc mạch nhánh; n nằm trong khoảng từ 200 đến 250; và R là maleimit, không chỉ giới hạn ở các phương án này.

Chế phẩm theo sáng chế bao gồm hợp chất trung gian này và được sử dụng để bào chế thể tiếp hợp được chất tác dụng kéo dài.

Cụ thể, do chế phẩm theo sáng chế chứa hợp chất trung gian theo sáng chế trong đó gốc liên kết được liên kết với vùng Fc globulin miễn dịch, chế phẩm theo sáng chế có thể được phản ứng với polypeptit có hoạt tính sinh lý sao cho gốc liên kết của hợp chất trung gian này được liên kết với polypeptit có hoạt tính sinh lý, thereby bước bào chế thể tiếp hợp được chất tác dụng kéo dài. Cụ thể hơn, thể tiếp hợp được chất tác dụng kéo dài có thể bào chế thông qua liên kết giữa R của công thức 1 tương ứng với một đầu của gốc liên kết và cystein, hoặc nhóm amin, như đầu tận cùng N, hoặc gốc lysin của polypeptit có hoạt tính sinh lý, không chỉ giới hạn ở các phương án này.

Theo sáng chế, polypeptit có hoạt tính sinh lý bất kỳ của thể tiếp hợp được chất tác dụng kéo dài có thể được bào chế bằng chế phẩm có thể nằm trong phạm vi của sáng chế không phụ thuộc vào loại, kích cỡ, nguồn gốc, và các yếu tố tương tự miễn là polypeptit có hoạt tính sinh lý có tác dụng được lý đối với bệnh. Ví dụ về polypeptit có hoạt tính sinh lý có thể bao gồm peptit tương tự glucagon-1 (GLP-1), yếu tố kích thích tăng sinh bạch cầu hạt (G-CSF), hormon sinh trưởng của người (hGH), erythropoietin (EPO), glucagon, insulin, hormon giải phóng hormon sinh trưởng, peptit giải phóng hormon sinh trưởng, interferon, thụ thể interferon, thụ thể liên hợp với protein G, interleukin, thụ thể interleukin, enzym, protein gắn kết interleukin, protein gắn kết xytokin, yếu tố hoạt hóa đại thực bào, peptit đại thực bào, yếu tố tế bào B, yếu tố tế bào T, protein A, chất ức chế dị ứng, glycoprotein hoại tử tế bào, immunotoxin, lymphotoxin, yếu tố hoại tử khối u, chất kìm hãm khối u, yếu tố phát triển sự di căn, α -1 antitrypsin, albumin, α -lactalbumin, apolipoprotein-E, erythropoietin được glycosyl hóa ở mức cao, angiopoietin, hemoglobin, thrombin, peptit hoạt hóa thụ thể thrombin, thrombomodulin, yếu tố đông máu VII, yếu tố đông máu VIIa, yếu tố đông máu VIII, yếu tố đông máu IX, yếu tố đông máu XIII, yếu tố hoạt hóa plasminogen, peptit gắn kết fibrin, urokinaza, streptokinaza, hirudin, protein C, protein phản ứng C, chất ức chế lenin, chất ức chế collagenaza, superoxid dismutaza, leptin, yếu tố sinh trưởng có nguồn gốc từ tiểu cầu, yếu tố sinh trưởng biểu mô, yếu tố sinh trưởng biểu bì, angiostatin, angiotensin, yếu tố sinh trưởng

xương, protein kích thích tạo xương, calcitonin, atriopeptin, yếu tố tạo sụn, elcatonin, yếu tố hoạt hóa mô liên kết, chất ức chế quá trình của yếu tố mô, hormon kích thích nang, hormon tạo hoàng thể, hormon giải phóng hormon tạo hoàng thể, yếu tố sinh trưởng dây thần kinh, hormon tuyến cận giáp, relaxin, secretin, somatomedin, yếu tố sinh trưởng tương tự insulin, hormon vỏ tuyến thượng thận, cholecystokinin, polypeptit tuyến tụy, peptit giải phóng gastrin, yếu tố giải phóng corticotropin, hormon kích thích tuyến giáp, autotaxin, lactoferrin, myostatin, incretins, polypeptit ức chế dạ dày (GIP), chất chủ vận đặc hiệu kép GLP-1/GIP, chất chủ vận đặc hiệu đồng thời GLP-1/GIP/Glucagon, kháng nguyên bề mặt tế bào, kháng nguyên vaccin có nguồn gốc từ virus, kháng thể đơn dòng, kháng thể đa dòng, và mảnh kháng thể, nhưng không chỉ giới hạn ở các phương án này.

Cụ thể hơn, polypeptit có hoạt tính sinh lý có thể là peptit tương tự glucagon-1 (GLP-1), glucagon, insulin, enzym, incretin, polypeptit ức chế dạ dày (GIP), chất chủ vận đặc hiệu kép GLP-1/GIP, hoặc chất chủ vận đặc hiệu đồng thời GLP-1/GIP/Glucagon, không chỉ giới hạn ở các phương án này.

Do phương pháp bào chế thể tiếp hợp được chất tác dụng kéo dài bằng cách sử dụng hợp chất trung gian theo sáng chế hoặc chế phẩm chứa hợp chất này được thực hiện bằng cách liên kết hợp chất trung gian này, trong đó gốc liên kết được liên kết với vùng Fc globulin miễn dịch, với polypeptit có hoạt tính sinh lý, nên polypeptit có hoạt tính sinh lý bất kỳ chứa gốc axit amin hoặc nhóm phản ứng có khả năng gắn kết với hợp chất trung gian này có thể được sử dụng không phụ thuộc vào loại của chúng để bào chế thể tiếp hợp được chất tác dụng kéo dài bằng cách sử dụng hợp chất trung gian theo sáng chế hoặc chế phẩm chứa hợp chất này.

Theo sáng chế, X có thể là vùng Fc globulin miễn dịch có nguồn gốc từ IgG1, IgG2, IgG3, hoặc IgG4, không chỉ giới hạn ở các phương án này.

Ngoài ra, X có thể là vùng Fc globulin miễn dịch chứa trình tự bản lề được cải biến để bao gồm chỉ một gốc cystein bằng cách loại bỏ một phần của trình tự axit amin chứa các axit amin dưới đây, không chỉ giới hạn ở các phương án này:

Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro-Ser-Cys-Pro (SEQ ID NO.7).

Trong trường hợp sử dụng chế phẩm theo sáng chế, thể tiếp hợp được chất tác dụng kéo dài có thể được bào chế mà không cần thực hiện phương pháp siêu lọc/lọc tuần

hoàn có pha loãng và một chu kỳ của phương pháp sắc ký tương tác kỵ nước có thể tùy ý được bỏ qua.

Cụ thể, khi thể tiếp hợp được chất tác dụng kéo dài được bào chế bằng cách cho hợp chất trung gian theo sáng chế hoặc chế phẩm chứa hợp chất này phản ứng với được chất, thì độ tinh khiết của thể tiếp hợp được chất tác dụng kéo dài có thể bằng 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% hoặc cao hơn, không chỉ giới hạn ở các phương án này. Độ tinh khiết có thể được đo bằng phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này, cụ thể bằng phương pháp SE-HPLC, RP-HPLC, và IE-HPLC, và phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này. Cụ thể hơn, độ tinh khiết của thể tiếp hợp được chất tác dụng kéo dài được bào chế bằng chế phẩm theo sáng chế có thể bằng 90% hoặc cao hơn trong phương pháp SE-HPLC, 80% hoặc cao hơn trong phương pháp RP-HPLC, và 85% hoặc cao hơn trong phương pháp IE-HPLC, không chỉ giới hạn ở các phương án này.

Hơn nữa, chế phẩm theo sáng chế có thể còn chứa chất đệm, chất ổn định, chất bảo quản, muối, và các chất tương tự cần thiết để làm ổn định hợp chất trung gian này và bào chế thể tiếp hợp được chất tác dụng kéo dài, không chỉ giới hạn ở các phương án này.

Sáng chế cũng đề cập đến kit bào chế thể tiếp hợp được chất tác dụng kéo dài bao gồm chế phẩm. Kit này có thể bao gồm chất phản ứng, hướng dẫn sử dụng và thông tin tương tự để bào chế thể tiếp hợp được chất tác dụng kéo dài, không chỉ giới hạn ở các phương án này.

Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp bào chế thể tiếp hợp được chất tác dụng kéo dài.

Phương pháp bào chế theo sáng chế là phương pháp bào chế thể tiếp hợp được chất tác dụng kéo dài trong đó được chất được liên kết với vùng Fc globulin miễn dịch thông qua gốc liên kết, cụ thể, phương pháp bào chế thể tiếp hợp được chất tác dụng kéo dài bằng cách liên kết hợp chất trung gian với được chất, không chỉ giới hạn ở các phương án này.

Cụ thể, phương pháp bào chế này được đặc trưng bởi việc thực hiện tuần tự các bước sau i) liên kết gốc liên kết bao gồm polyetylen glycol (PEG) với vùng Fc globulin miễn dịch, và ii) liên kết gốc liên kết, được liên kết với vùng Fc globulin miễn dịch, với

được chất (ví dụ polypeptit hoặc protein có hoạt tính sinh lý). Tức là, phương pháp bào chế này được đặc trưng bằng cách thực hiện các bước theo thứ tự cụ thể, tức là thực hiện bước thứ nhất là bước bào chế hợp chất trung gian bằng cách liên kết gốc liên kết bao gồm PEG với vùng Fc globulin miễn dịch, sau đó thực hiện bước thứ hai là bước liên kết được chất với hợp chất trung gian này. Theo cách khác, phương pháp bào chế theo sáng chế cũng có thể được thực hiện chỉ bằng bước thứ hai là bước bào chế thể tiếp hợp được chất tác dụng kéo dài thông qua phản ứng giữa hợp chất trung gian này hoặc chế phẩm bào chế thể tiếp hợp được chất tác dụng kéo dài chứa hợp chất này và được chất, mà không thực hiện bước thứ nhất, không chỉ giới hạn ở các phương án này. Phương pháp bào chế này có thể được gọi là “phương pháp bào chế theo thứ tự ngược” trong sáng chế.

Theo sáng chế, trong trường hợp của phương pháp bào chế thể tiếp hợp được chất tác dụng kéo dài được thực hiện bằng bước bào chế hợp chất trung gian thứ nhất, sau đó liên kết hợp chất trung gian với được chất, thì các bước tinh chế bằng phương pháp siêu lọc/lọc tuần hoàn có pha loãng và phương pháp sắc ký tương tác kỵ nước có thể được bỏ qua và đã kiểm chứng được rằng thể tiếp hợp được chất tác dụng kéo dài có thể được bào chế với hiệu suất cao mặc dù các bước tinh chế này được bỏ qua.

Theo phương pháp bào chế thông thường trong đó gốc liên kết trước tiên được liên kết với polypeptit có hoạt tính sinh lý, sau đó liên kết với vùng Fc globulin miễn dịch mà không bào chế hợp chất trung gian, khi gốc liên kết được liên kết với polypeptit có hoạt tính sinh lý (ví dụ polyetylen glycol) được liên kết với vùng Fc globulin miễn dịch, thì bước siêu lọc/lọc tuần hoàn có pha loãng là cần thiết dưới dạng bước phân tách sau khi gốc liên kết được liên kết với polypeptit có hoạt tính sinh lý và trước khi hợp chất được liên kết này được liên kết với vùng Fc globulin miễn dịch để giảm nguy cơ kết tụ có thể xuất hiện do các điều kiện độ pH thấp (độ pH khoảng 3,0) của dung dịch đệm cân bằng và dung dịch đệm rửa giải được sử dụng để tinh chế gốc liên kết được liên kết với polypeptit có hoạt tính sinh lý và điều chỉnh các điều kiện độ pH cho phản ứng sử dụng dung dịch đệm thích hợp. Ngược lại, trong phương pháp bào chế theo sáng chế trong đó hợp chất trung gian này được bào chế bằng cách liên kết gốc liên kết với vùng Fc globulin miễn dịch trước tiên, độ pH của dung dịch đệm được sử dụng để tinh chế gốc liên kết được liên kết với vùng Fc globulin miễn dịch là tương đối cao, do đó bước siêu lọc/lọc tuần hoàn có pha loãng có thể được bỏ qua, sau đó bước liên kết gốc liên kết được

liên kết với vùng Fc globulin miễn dịch với polypeptit có hoạt tính sinh lý có thể được thực hiện.

Do đó, trong phương pháp bào chế theo sáng chế, bước siêu lọc/lọc tuần hoàn có pha loãng có thể không được thực hiện sau bước bào chế vùng Fc globulin miễn dịch được liên kết mono-PEG, nhưng sáng chế không chỉ giới hạn ở các phương án này. Trong phương pháp bào chế thể tiếp hợp được chất tác dụng kéo dài theo sáng chế, độ pH của dung dịch được sử dụng để tinh chế vùng Fc globulin miễn dịch được liên kết mono-PEG không khác biệt đáng kể với độ pH của dung dịch được sử dụng để phản ứng tiếp theo khiến cho bước liên kết với được chất có thể được thực hiện mà không cần thực hiện bước siêu lọc/lọc tuần hoàn có pha loãng. Bằng cách bỏ qua bước siêu lọc/lọc tuần hoàn có pha loãng, nguy cơ hình thành các tạp chất kết tụ trong bước cô có thể được giảm và phương pháp bào chế có thể được đơn giản hóa để giảm chi phí trong trường hợp phương pháp này được thương mại hóa.

Hơn nữa, phương pháp bào chế theo sáng chế có thể còn bao gồm bước tinh chế thể tiếp hợp bằng phương pháp sắc ký tương tác kỵ nước, không chỉ giới hạn ở các phương án này.

Cụ thể, bước sắc ký tương tác kỵ nước có thể được thực hiện chỉ một lần hoặc nhiều hơn một lần theo đặc tính của được chất của thể tiếp hợp được chất tác dụng kéo dài và loại và kích cỡ của gốc liên kết.

Theo phương pháp bào chế theo sáng chế, không chỉ lượng của được chất đắt tiền có thể được giảm mà cả lượng của các vùng Fc globulin miễn dịch chưa phản ứng cũng có thể được giảm, sao cho toàn bộ hoặc một phần bước tinh chế bằng phương pháp sắc ký tương tác kỵ nước có thể được bỏ qua để thu được các tác dụng giảm nguyên liệu thô cần thiết để bào chế thể tiếp hợp được chất tác dụng kéo dài và chi phí để thực hiện phương pháp này so với phương pháp thông thường.

Trong khi đó, mặc dù bước siêu lọc/lọc tuần hoàn có pha loãng và bước sắc ký tương tác kỵ nước, được thực hiện trong phương pháp thông thường để bào chế thể tiếp hợp được chất tác dụng kéo dài, được bỏ qua chỉ một bước tinh chế cuối cùng (ví dụ một chu kỳ của phương pháp sắc ký tương tác kỵ nước) được thực hiện trong phương pháp bào chế theo sáng chế, có lợi là độ tinh khiết của thể tiếp hợp cuối cùng được bào chế bằng phương pháp theo sáng chế được duy trì tương đương với độ tinh khiết của thể tiếp

hợp cuối cùng được bào chế bằng phương pháp bào chế thông thường. Tức là, theo phương pháp bào chế theo sáng chế, độ tinh khiết cuối cùng có thể được duy trì mặc dù một số bước tinh chế được bỏ qua sao cho năng suất của thể tiếp hợp được chất tác dụng kéo dài có thể được cải thiện.

Độ tinh khiết của thể tiếp hợp được chất tác dụng kéo dài theo sáng chế có thể được đo bằng phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này và ví dụ về phương pháp này có thể là phương pháp SE-HPLC, phương pháp RP-HPLC, và phương pháp IE-HPLC, không chỉ giới hạn ở các phương án này.

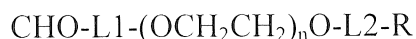
Theo phương pháp bào chế theo sáng chế, độ tinh khiết cuối cùng của thể tiếp hợp được chất tác dụng kéo dài có thể bằng 90% hoặc cao hơn, cụ thể, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% hoặc cao hơn, không chỉ giới hạn ở các phương án này.

Trong khi đó, trong phương pháp bào chế theo sáng chế, vùng Fc globulin miễn dịch được liên kết mono-PEG được bào chế trước tiên, sau đó liên kết với polypeptit có hoạt tính sinh lý, sao cho thể tiếp hợp được chất tác dụng kéo dài có thể được bào chế với hiệu suất cao hơn so với phương pháp thông thường dưới góc độ không chỉ polypeptit có hoạt tính sinh lý mà cả vùng Fc globulin miễn dịch.

Theo một phương án của sáng chế, đã kiểm chứng được rằng hiệu suất của thể tiếp hợp được chất tác dụng kéo dài được bào chế bằng phương pháp bào chế theo sáng chế cao gấp hai lần hoặc cao hơn so với hiệu suất của thể tiếp hợp được chất tác dụng kéo dài được bào chế bằng phương pháp thông thường.

Cụ thể, phương pháp bào chế theo sáng chế đề cập đến phương pháp bào chế thể tiếp hợp được chất tác dụng kéo dài bao gồm bước bào chế thể tiếp hợp bằng cách liên kết vùng Fc globulin miễn dịch được liên kết mono-PEG, được bào chế bằng cách liên kết gốc liên kết có công thức 3 với đầu tận cùng N của vùng Fc globulin miễn dịch chứa trình tự bản lề, với được chất (polypeptit có hoạt tính sinh lý:

Công thức 3



Trong công thức 3,

L1 là C₁-C₆ alkylen mạch thẳng hoặc mạch nhánh;

L2 là -a1-CONH-, -a1-NHCO-, -a1-NHCO-a2-, -COO-, -b1-COO-, -COO-b2-, hoặc -b1-COO-b2-, và a1, a2, b1, và b2 độc lập với nhau là C₁-C₆ alkylen mạch thẳng hoặc mạch nhánh;

n nằm trong khoảng từ 10 đến 2400; và

R là gốc bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm 2,5-dioxopyrrolidinyl, 2,5-dioxopyrrolyl, aldehyt, maleimit, C₆-C₂₀ aryl disulfua, C₅-C₂₀ heteroaryl disulfua, vinyl sulfon, thiol, halogen-axetamit, succinimit, *p*-nitrophenyl carbonat, thioeste, và dẫn xuất của chúng, không chỉ giới hạn ở các phương án này.

Cụ thể hơn,

phương pháp bào chế này có thể bao gồm: bước bào chế vùng Fc globulin miễn dịch được liên kết mono-PEG bằng cách liên kết gốc liên kết có công thức 3 với đầu tận cùng N của vùng Fc globulin miễn dịch; và bước bào chế thể tiếp hợp bằng cách liên kết gốc liên kết của vùng Fc globulin miễn dịch được liên kết mono-PEG được bào chế trong bước mô tả nêu trên với polypeptit có hoạt tính sinh lý, hoặc

phương pháp bào chế này có thể bao gồm: bước bào chế vùng Fc globulin miễn dịch được liên kết mono-PEG bằng cách liên kết gốc liên kết có công thức 3 với đầu tận cùng N của vùng Fc globulin miễn dịch; bước tinh chế vùng Fc globulin miễn dịch được liên kết mono-PEG được bào chế trong bước mô tả nêu trên bằng phương pháp sắc ký trao đổi anion trong dung dịch đệm có độ pH nằm trong khoảng từ 6,0 đến 8,5, độ pH nằm trong khoảng từ 6,0 đến 8,0, độ pH nằm trong khoảng từ 6,0 đến 7,5, độ pH nằm trong khoảng từ 6,0 đến 7,0, độ pH nằm trong khoảng từ 6,1 đến 6,9, độ pH nằm trong khoảng từ 6,2 đến 6,8, hoặc độ pH nằm trong khoảng từ 6,3 đến 6,7; và bước bào chế thể tiếp hợp bằng cách liên kết gốc liên kết của vùng Fc globulin miễn dịch được liên kết mono-PEG được tinh chế trong bước mô tả nêu trên với polypeptit có hoạt tính sinh lý, không chỉ giới hạn ở các phương án này.

Ngoài ra, trong phương pháp bào chế theo sáng chế,

(i) vùng Fc globulin miễn dịch được liên kết mono-PEG có thể được bào chế bằng cách liên kết gốc liên kết của công thức 3 với đầu tận cùng N của vùng Fc globulin miễn dịch trong sự có mặt của chất khử ở độ pH nằm trong khoảng từ 4,0 đến 8,0, độ pH nằm trong khoảng từ 4,5 đến 7,5, độ pH nằm trong khoảng từ 5,5 đến 7,5, độ pH nằm trong

khoảng từ 5,6 đến 7,4, độ pH nằm trong khoảng từ 5,7 đến 7,3 hoặc độ pH nằm trong khoảng từ 5,8 đến 7,2; và/hoặc

(ii) thể tiếp hợp có thể được bào chế bằng cách liên kết gốc liên kết của vùng Fc globulin miễn dịch được liên kết mono-PEG với polypeptit có hoạt tính sinh lý ở độ pH nằm trong khoảng từ 5,5 đến 8,0, độ pH nằm trong khoảng từ 6,0 đến 7,5, hoặc độ pH nằm trong khoảng từ 6,5 đến 7,5, không chỉ giới hạn ở các phương án này.

Ngoài ra, bước bào chế thể tiếp hợp theo phương pháp bào chế theo sáng chế có thể được thực hiện bằng cách cho polypeptit có hoạt tính sinh lý phản ứng ở lượng tương đương hoặc cao hơn lượng của vùng Fc globulin miễn dịch được liên kết mono-PEG, và cụ thể, tỷ lệ mol của vùng Fc globulin miễn dịch được liên kết mono-PEG : polypeptit có hoạt tính sinh lý có thể nằm trong khoảng từ 1:1 đến 1:10, nằm trong khoảng từ 1:1 đến 1:7, nằm trong khoảng từ 1:1 đến 1:5, hoặc nằm trong khoảng từ 1:1 đến 1:3, không chỉ giới hạn ở các phương án này.

Thuật ngữ “vùng Fc globulin miễn dịch được liên kết mono-PEG” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ chất trung gian được bào chế ở thời điểm giữa của phương pháp bào chế thể tiếp hợp được chất tác dụng kéo dài theo sáng chế trong đó một gốc liên kết bao gồm một polyetylen glycol được liên kết với vùng Fc globulin miễn dịch. Tức là, theo sáng chế, thuật ngữ “vùng Fc globulin miễn dịch được liên kết mono-PEG”, “hợp chất trung gian” hoặc “chất trung gian” có thể được sử dụng thay thế cho nhau.

Theo sáng chế, vùng Fc globulin miễn dịch có thể là vùng Fc globulin miễn dịch có nguồn gốc từ IgG1, IgG2, IgG3, hoặc IgG4, không chỉ giới hạn ở các phương án này.

Ngoài ra, vùng Fc globulin miễn dịch có thể là vùng Fc globulin miễn dịch chứa trình tự bản lề được cải biến để bao gồm chỉ một gốc cystein bằng cách loại bỏ một phần của trình tự axit amin dưới đây, và cụ thể, trình tự bản lề có thể bao gồm trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.8 (Ser-Cys-Pro) or SEQ ID NO.9 (Pro-Ser-Cys-Pro), không chỉ giới hạn ở các phương án này.

Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro-Ser-Cys-Pro (SEQ ID NO.7).

Thuật ngữ “thể tiếp hợp được chất tác dụng kéo dài” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ thể tiếp hợp được chất có cấu trúc trong đó được chất (polypeptit có hoạt tính sinh lý) có hoạt tính được lý trong cơ thể được liên kết với vùng Fc globulin miễn dịch

thông qua gốc liên kết và thời gian bán thải được gia tăng. Theo các mục đích của sáng chế, thể tiếp hợp được chất tác dụng kéo dài có thể là thể tiếp hợp trong đó hợp chất trung gian hoặc vùng Fc globulin miễn dịch được liên kết mono-PEG được liên kết với được chất, không chỉ giới hạn ở các phương án này.

Cụ thể, được chất không bị giới hạn ở các hợp chất cụ thể miễn là được chất có tác dụng phòng ngừa, điều trị, hoặc làm giảm bệnh nhất định và có thể là protein, enzym, kháng thể, hợp chất, hoặc các được chất tương tự có trong tự nhiên hoặc không có trong tự nhiên. Cụ thể hơn, được chất có thể là polypeptit hoặc protein có hoạt tính sinh lý, thậm chí cụ thể hơn, polypeptit có hoạt tính sinh lý có thể là peptit tương tự glucagon-1 (GLP-1), yếu tố kích thích tăng sinh bạch cầu hạt (G-CSF), hormon sinh trưởng của người (hGH), erythropoietin (EPO), glucagon, insulin, hormon giải phóng hormon sinh trưởng, peptit giải phóng hormon sinh trưởng, interferon, thụ thể interferon, thụ thể liên hợp với protein G, interleukin, thụ thể interleukin, enzym, protein gắn kết interleukin, protein gắn kết xytokin, yếu tố hoạt hóa đại thực bào, peptit đại thực bào, yếu tố tế bào B, yếu tố tế bào T, protein A, chất ức chế dị ứng, glycoprotein hoại tử tế bào, immunotoxin, lymphotoxin, yếu tố hoại tử khối u, chất kìm hãm khối u, yếu tố phát triển sự di căn, α -1 antitrypsin, albumin, α -lactalbumin, apolipoprotein-E, erythropoietin được glycosyl hóa ở mức cao, angiopoietin, hemoglobin, thrombin, peptit hoạt hóa thụ thể thrombin, thrombomodulin, yếu tố đông máu VII, yếu tố đông máu VIIa, yếu tố đông máu VIII, yếu tố đông máu IX, yếu tố đông máu XIII, yếu tố hoạt hóa plasminogen, peptit gắn kết fibrin, urokinaza, streptokinaza, hirudin, protein C, protein phản ứng C, chất ức chế lenin, chất ức chế collagenaza, superoxit dismutaza, leptin, yếu tố sinh trưởng có nguồn gốc từ tiểu cầu, yếu tố sinh trưởng biểu mô, yếu tố sinh trưởng biểu bì, angiostatin, angiotensin, yếu tố sinh trưởng xương, protein kích thích tạo xương, calcitonin, atriopeptin, yếu tố tạo sụn, elcatonin, yếu tố hoạt hóa mô liên kết, chất ức chế quá trình của yếu tố mô, hormon kích thích nang, hormon tạo hoàng thể, hormon giải phóng hormon tạo hoàng thể, yếu tố sinh trưởng dây thần kinh, hormon tuyến cận giáp, relaxin, secretin, somatomedin, yếu tố sinh trưởng tương tự insulin, hormon vỏ tuyến thượng thận, cholecystokinin, polypeptit tuyến tụy, peptit giải phóng gastrin, yếu tố giải phóng corticotropin, hormon kích thích tuyến giáp, autotaxin, lactoferrin, myostatin, incretins, polypeptit ức chế dạ dày (GIP), chất chủ vận đặc hiệu kép GLP-1/GIP, chất chủ vận đặc hiệu đồng thời GLP-1/GIP/Glucagon, kháng nguyên bề mặt tế bào, kháng nguyên vacxin có nguồn gốc từ

virut, kháng thể đơn dòng, kháng thể đa dòng, và mảnh kháng thể, nhưng không chỉ giới hạn ở các phương án này. Cụ thể hơn, polypeptit có hoạt tính sinh lý có thể là or a analog của nó, glucagon, hoặc chất tương tự của chúng, không chỉ giới hạn ở các phương án này. Thậm chí cụ thể hơn, polypeptit có hoạt tính sinh lý có thể bao gồm, cấu thành chủ yếu từ, hoặc cấu thành từ một trong số các trình tự axit amin SEQ ID NO.1 đến SEQ ID NO.6, không chỉ giới hạn ở các phương án này.

Ngoài ra, biến thể, dẫn xuất, và mảnh bất kỳ của polypeptit có hoạt tính sinh lý cũng nằm trong phạm vi của sáng chế.

Thuật ngữ “biến thể” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ peptit có trình tự axit amin trong đó một hoặc nhiều axit amin khác với một hoặc nhiều axit amin của polypeptit nguyên thể có hoạt tính sinh lý trong khi vẫn có chức năng tương tự như chức năng của polypeptit nguyên thể có hoạt tính sinh lý, và biến thể có thể được bào chế bằng đột biến thay thế, bổ sung, loại bỏ, cải biến hoặc tổ hợp bất kỳ của một số axit amin của trình tự axit amin của polypeptit nguyên thể có hoạt tính sinh lý.

Thuật ngữ “dẫn xuất” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ peptit, chất tương tự peptit, hoặc peptidomimetic được bào chế bằng cải biến một hoặc nhiều axit amin của polypeptit nguyên thể có hoạt tính sinh lý bằng cách bổ sung, loại bỏ, hoặc thay thế để có hoạt tính tương tự như hoạt tính của polypeptit nguyên thể có hoạt tính sinh lý.

Thuật ngữ “mảnh” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ dạng được bào chế bằng cách bổ sung/loại bỏ một hoặc nhiều axit amin vào/ra khỏi đầu tận cùng N hoặc đầu tận cùng C, và axit amin được bổ sung vào có thể là axit amin bất kỳ không có trong tự nhiên (ví dụ D-axit amin).

Phương pháp bào chế biến thể, dẫn xuất và mảnh của polypeptit có hoạt tính sinh lý có thể được sử dụng riêng hoặc kết hợp. Ví dụ, polypeptit có hoạt tính sinh lý bất kỳ có một hoặc nhiều axit amin khác trong trình tự axit amin và quá trình khử amin hóa của gốc axit amin ở đầu tận cùng N có thể được bao gồm trong đó.

Dẫn xuất của polypeptit có hoạt tính sinh lý bao gồm dạng tương đương sinh học và dạng sinh học tốt hơn. Ví dụ, liên quan đến dạng tương đương sinh học, dạng tương đương sinh học có thể là enzym tương đương sinh học bất kỳ có sẵn trong thể tiếp hợp được chất tác dụng kéo dài theo sáng chế mặc dù có sự khác biệt giữa enzym đã biết và

vật chủ để biểu hiện nó, sự khác biệt về đặc tính glycosyl hóa và mức độ của nó, và sự khác biệt về mức độ thay thế trong gốc axit amin cụ thể của enzym tương ứng theo trình tự chuẩn trong đó mức độ thay thế không phải là thay thế 100%. Polypeptit có hoạt tính sinh lý và biến thể, dẫn xuất và mảnh của nó có thể được sản xuất từ tế bào động vật, *E. coli*, nấm men, tế bào côn trùng, tế bào thực vật, động vật sống, và các sinh vật tương tự bằng phương pháp tái tổ hợp gen, các phương pháp sản xuất không bị giới hạn cụ thể, và polypeptit có hoạt tính sinh lý bất kỳ có bán trên thị trường, và biến thể, dẫn xuất, và mảnh của nó cũng có thể được sử dụng.

Ngoài ra, polypeptit có hoạt tính sinh lý, và biến thể, dẫn xuất và mảnh của nó có thể bao gồm trình tự axit amin có độ tương đồng ít nhất bằng 80%, cụ thể, ít nhất bằng 90%, cụ thể hơn, ít nhất bằng 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%, và polypeptit có hoạt tính sinh lý, và biến thể, dẫn xuất và mảnh của nó có thể được thu nhận từ vi sinh vật bằng phương pháp tái tổ hợp gen hoặc có bán trên thị trường, không chỉ giới hạn ở các phương án này.

Thuật ngữ “độ tương đồng” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ độ tương đồng giữa các trình tự axit amin của protein thể đại hoặc các trình tự nucleotit mã hóa chúng và bao gồm độ tương đồng trình tự với trình tự axit amin hoặc trình tự nucleotit theo sáng chế theo tỷ lệ phần trăm mô tả nêu trên hoặc cao hơn. Độ tương đồng có thể được xác định bằng cách so sánh các trình tự thông qua quan sát bằng mắt thường nhưng cũng có thể được xác định bằng cách sử dụng thuật toán tin sinh học, để thu được kết quả phân tích về mức độ tương đồng bằng cách sắp thẳng hàng các trình tự được so sánh. Độ tương đồng giữa hai trình tự axit amin có thể biểu diễn theo tỷ lệ phần trăm. Các thuật toán tự động hữu ích có thể được sử dụng trong GAP, BESTFIT, FASTA, và mô-đun phần mềm máy tính TFASTA của Wisconsin Genetics Software Package (Genetics Computer Group, Madison, WI, USA). Các thuật toán sắp thẳng hàng trình tự tự động trong mô-đun bao gồm thuật toán Needleman & Wunsch, thuật toán Pearson & Lipman, và thuật toán Smith & Waterman. Các thuật toán hữu ích khác và phương pháp xác định độ tương đồng trên cơ sở sắp thẳng hàng trình tự được tự động hóa trong phần mềm, như FASTP, BLAST, BLAST2, PSIBLAST, và CLUSTAL W.

Thông tin về trình tự của polypeptit có hoạt tính sinh lý, và biến thể, dẫn xuất và mảnh của nó, và các trình tự nucleotit mã hóa chúng có thể thu được từ cơ sở dữ liệu đã biết của Ngân hàng gen NCBI, hoặc các cơ sở dữ liệu tương tự.

Các axit amin được thế hoặc được bổ sung vào có thể không chỉ là 20 axit amin thường có trong protein của người mà còn cả các axit amin không có trong tự nhiên hoặc không điển hình. Các axit amin không điển hình có thể được mua từ các nhà cung cấp thương mại bao gồm Sigma-Aldrich, ChemPep Inc. và Genzym pharmaceuticals. Các peptit bao gồm các axit amin này và các trình tự peptit điển hình có thể được tổng hợp và mua từ các nhà cung cấp thương mại, ví dụ American Peptide Company, Bachem (USA) hoặc Anygen (Korea).

Ngoài ra, polypeptit có hoạt tính sinh lý, và biến thể, dẫn xuất và mảnh của nó theo sáng chế có thể ở dạng biến đổi trong đó đầu tận cùng N và/hoặc đầu tận cùng C được cải biến hóa học hoặc bảo vệ bằng các nhóm hữu cơ, hoặc các axit amin có thể được bổ sung vào các đầu tận cùng của peptit, để bảo vệ khỏi proteaza *in vivo* trong khi làm tăng độ ổn định của nó.

Cụ thể, do đầu tận cùng N và đầu tận cùng C của các peptit tổng hợp hóa học mang điện, nên đầu tận cùng N có thể được axetyl hóa và/hoặc đầu tận cùng C có thể được amit hóa để loại bỏ điện tích, nhưng sáng chế không chỉ giới hạn ở các phương án này.

Ngoài ra, peptit theo sáng chế bao gồm toàn bộ các dạng của chính peptit, muối của nó (ví dụ muối được dụng của peptit), hoặc solvat của nó. Hơn nữa, peptit có thể ở dạng được dụng bất kỳ.

Loại của muối không bị giới hạn cụ thể. Tuy nhiên, tốt hơn nếu muối ở dạng an toàn và hữu hiệu cho đối tượng, ví dụ động vật có vú, không chỉ giới hạn ở các phương án này.

Thuật ngữ “solvat” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ phức hợp của peptit theo sáng chế hoặc muối của nó và phân tử dung môi.

Mặc dù được mô tả là “peptit cấu thành từ SEQ ID NO cụ thể” theo sáng chế, nhưng thuật ngữ này không loại trừ đột biến có thể xuất hiện tự nhiên hoặc bằng cách bổ sung trình tự vô nghĩa vào phía trước hoặc phía sau trình tự axit amin như nêu trong SEQ

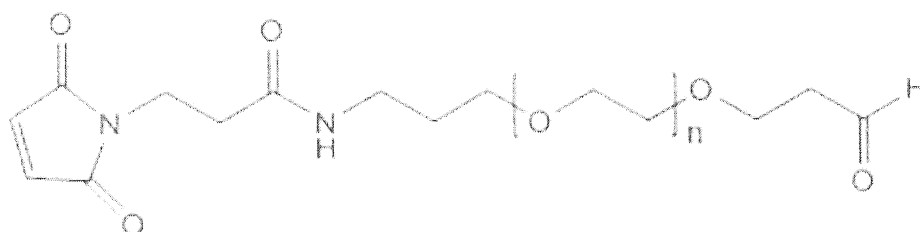
ID NO. hoặc đột biến lặn của nó, miễn là peptit này có hoạt tính tương tự hoặc tương đương với hoạt tính của peptit cấu thành từ trình tự axit amin này, và thậm chí khi đột biến hoặc đột biến bổ sung trình tự như vậy có mặt, rõ ràng nằm trong phạm vi của sáng chế.

Phương pháp bào chế thể tiếp hợp được chất tác dụng kéo dài theo sáng chế có thể là phương pháp bào chế thể tiếp hợp trong đó polypeptit có hoạt tính sinh lý được liên kết với vùng Fc globulin miễn dịch thông qua gốc liên kết, không chỉ giới hạn ở các phương án này.

Theo sáng chế, liên kết giữa gốc liên kết và vùng Fc globulin miễn dịch có thể được tạo ra bởi liên kết cộng hóa trị hoặc liên kết không cộng hóa trị giữa một đầu của gốc liên kết và đầu tận cùng N của vùng Fc globulin miễn dịch, nhưng vị trí liên kết hoặc phương pháp liên kết không bị giới hạn cụ thể. Cụ thể, vùng Fc globulin miễn dịch được liên kết mono-PEG có thể được bào chế bằng cách liên kết prolin ở đầu tận cùng N của vùng Fc globulin miễn dịch với nhóm -CHO của gốc liên kết, không chỉ giới hạn ở các phương án này.

Theo sáng chế, gốc liên kết có thể có công thức 4, không chỉ giới hạn ở các phương án này:

Công thức 4

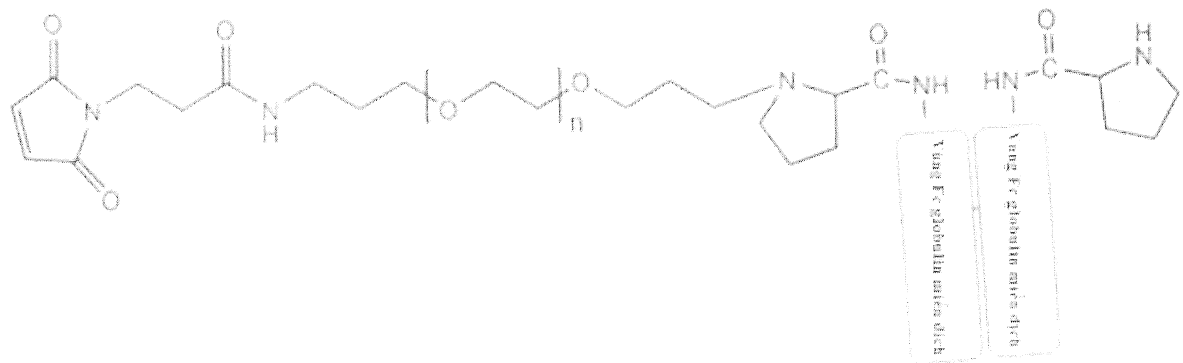


Trong công thức 4, n nằm trong khoảng từ 200 đến 250.

Ngoài ra, gốc liên kết có thể có kích thước nằm trong khoảng từ 1 kDa đến 200 kDa, nằm trong khoảng từ 1 kDa đến 150 kDa, nằm trong khoảng từ 1 kDa đến 100 kDa, nằm trong khoảng từ 1 kDa đến 50 kDa, hoặc nằm trong khoảng từ 1 kDa đến 10 kDa, không chỉ giới hạn ở các phương án này.

Vùng Fc globulin miễn dịch được liên kết mono-PEG có thể có công thức 2, không chỉ giới hạn ở các phương án này.

Công thức 2

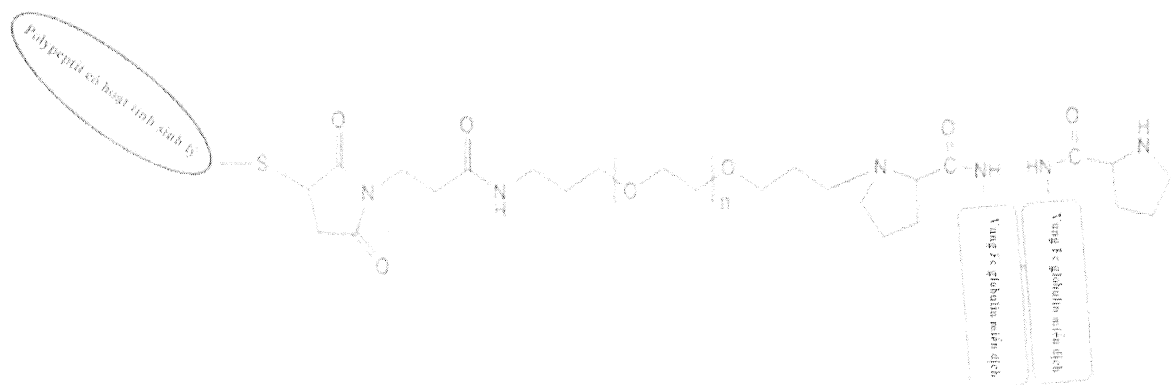


Phương pháp bào chế theo sáng chế có thể được thực hiện bằng cách liên kết polypeptit có hoạt tính sinh lý với một đầu của vùng Fc globulin miễn dịch được liên kết mono-PEG có công thức 2, không chỉ giới hạn ở các phương án này.

Ngoài ra, đầu còn lại của gốc liên kết không được liên kết với vùng Fc globulin miễn dịch có thể được liên kết với polypeptit có hoạt tính sinh lý, cụ thể, nhóm -SH hoặc axit amin chứa nhóm -SH, hoặc cystein của polypeptit có hoạt tính sinh lý, không chỉ giới hạn ở các phương án này.

Theo sáng chế, thể tiếp hợp được chất tác dụng kéo dài có thể có công thức 5 below, không chỉ giới hạn ở các phương án này.

Công thức 5



Công thức 5 thể hiện cấu trúc trong đó polypeptit có hoạt tính sinh lý, gốc liên kết, và vùng Fc globulin miễn dịch được liên kết tuần tự từ bên trái, không chỉ giới hạn ở các phương án này.

Khi thể tiếp hợp được chất tác dụng kéo dài được bào chế theo phương pháp bào chế theo sáng chế trong đó vùng Fc globulin miễn dịch được liên kết mono-PEG được bào chế trước tiên và liên kết với polypeptit có hoạt tính sinh lý, đã kiểm chứng được rằng độ tinh khiết của thể tiếp hợp cuối cùng có thể được duy trì với hiệu suất cao hơn so với phương pháp bào chế thông thường mặc dù bước siêu lọc/lọc tuần hoàn có pha loãng và bước sắc ký tương tác kỵ nước được bỏ qua chỉ một bước tinh chế cuối cùng (ví dụ một chu kỳ của phương pháp sắc ký tương tác kỵ nước) được thực hiện trong phương pháp bào chế theo sáng chế.

Sáng chế cũng đề cập đến thể tiếp hợp được chất tác dụng kéo dài được bào chế bằng phương pháp mô tả nêu trên.

Do thể tiếp hợp được chất tác dụng kéo dài được bào chế bằng phương pháp bào chế theo sáng chế có thời gian bán thải dài hơn so với polypeptit có hoạt tính sinh lý không được liên kết với gốc liên kết hoặc vùng Fc globulin miễn dịch, nên có thể thu được các tác dụng có lợi liên quan đến bào chế được chất.

Thể tiếp hợp được chất tác dụng kéo dài được bào chế bằng phương pháp bào chế theo sáng chế có thể được sử dụng trong bào chế được chất hoặc chế phẩm để phòng ngừa, điều trị, và làm giảm bệnh.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn thông qua các ví dụ sau. Tuy nhiên, các ví dụ này chỉ nhằm mục đích minh họa chứ không giới hạn phạm vi của sáng chế.

Ví dụ so sánh: Bào chế thể tiếp hợp bằng cách liên kết PEGylated Polypeptit có hoạt tính sinh lý với vùng Fc globulin miễn dịch

Polypeptit có hoạt tính sinh lý được liên kết PEG được liên kết với vùng Fc globulin miễn dịch để bào chế thể tiếp hợp tác dụng kéo dài.

Ví dụ so sánh 1: Bào chế thể tiếp hợp bằng cách liên kết chất tương tự chất chủ vận đặc hiệu đồng thời GLP-1/GIP/Glucagon 1 được liên kết PEG với vùng Fc globulin miễn dịch

Để liên kết PEG polypeptit có hoạt tính sinh lý (chất tương tự chất chủ vận đặc hiệu đồng thời GLP-1/GIP/Glucagon 1, SEQ ID NO.1) ở gốc cystein (nhóm -SH), chất tương tự chất chủ vận đặc hiệu đồng thời GLP-1/GIP/Glucagon 1 được cho phản ứng với

gốc liên kết chứa PEG (maleimide-10 kDa-PEG-aldehyde) (công thức 4) trong khoảng 1 giờ ở tỷ lệ mol nằm trong khoảng từ 1:1,0 đến 1:1,3 với nồng độ chất tương tự chất chủ vận đặc hiệu đồng thời GLP-1/GIP/Glucagon 1 khoảng 3g/L. Cụ thể, phản ứng được thực hiện trong dung dịch đệm Tris 50mM chứa isopropanol (độ pH bằng 7,5, $6^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$). Để thu được chất tương tự chất chủ vận đặc hiệu đồng thời GLP-1/GIP/Glucagon 1 được liên kết mono-PEG, dung dịch phản ứng được pha loãng bằng dung dịch đệm cân bằng chứa natri xitrat và etanol đến tổng thể tích bằng 20 lần và tinh chế. Về vấn đề này, chất tương tự chất chủ vận đặc hiệu đồng thời GLP-1/GIP/Glucagon 1 được liên kết mono-PEG được tinh chế bằng cột hiệu năng cao SP (GE Healthcare, sắc ký trao đổi cation) bằng cách sử dụng dung dịch chứa natri xitrat và etanol và gradien nồng độ kali clorua. Sau khi dung dịch tinh chế chứa chất tương tự chất chủ vận đặc hiệu đồng thời GLP-1/GIP/Glucagon 1 được liên kết PEG được pha loãng bằng nước, dung dịch đệm được thay bằng dung dịch kali phosphat 0,1M thông qua siêu lọc/lọc tuần hoàn có pha loãng (UF/DF), sau đó cô để thu hồi hợp chất thu được ở nồng độ cuối cùng khoảng 3g/L hoặc cao hơn.

Chất tương tự chất chủ vận đặc hiệu đồng thời GLP-1/GIP/Glucagon 1 được liên kết mono-PEG được bào chế như mô tả nêu trên được liên kết với vùng Fc globulin miễn dịch để bào chế thể tiếp hợp tác dụng kéo dài như sau.

Để liên kết nhóm aldehyde của PEG của chất tương tự chất chủ vận đặc hiệu đồng thời GLP-1/GIP/Glucagon 1 được liên kết mono-PEG với đầu tận cùng amin của vùng Fc globulin miễn dịch, chất tương tự chất chủ vận đặc hiệu đồng thời GLP-1/GIP/Glucagon 1 được liên kết mono-PEG được cho phản ứng với vùng Fc globulin miễn dịch ở tỷ lệ mol nằm trong khoảng từ 1:2 ở nhiệt độ $6^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$ trong khoảng 12 giờ với nồng độ protein tổng số (chất tương tự chất chủ vận đặc hiệu đồng thời GLP-1/GIP/Glucagon 1 và vùng Fc globulin miễn dịch) bằng 30g/L.

Để phân lập và loại bỏ các vùng Fc globulin miễn dịch chưa phản ứng sau phản ứng liên kết, dung dịch phản ứng được tinh chế bằng cách sử dụng cột Butyl 4 Fast Flow (GE Healthcare, phương pháp sắc ký tương tác kỵ nước). Trong trường hợp này, dung dịch đệm Tris và natri clorua được bổ sung vào dung dịch phản ứng, và dung dịch phản ứng được tinh chế bằng cách sử dụng dung dịch chứa Bis-Tris và gradien nồng độ natri clorua.

Sau đó, bằng cách sử dụng cột Source 15ISO (GE Healthcare), phương pháp sắc ký tương tác kỵ nước được thực hiện. Các sản phẩm phụ được loại bỏ bằng quy trình này, và thể tiếp hợp vùng Fc globulin miễn dịch-PEG-chứa gốc liên kết-chất tương tự chất chủ vận đặc hiệu đồng thời GLP-1/GIP/Glucagon 1 được bào chế. Trong trường hợp này, bước tinh chế được thực hiện bằng cách sử dụng dung dịch đệm chứa natri xitrat và gradien nồng độ amonin sulfat.

Ví dụ so sánh 2: Bào chế thể tiếp hợp bằng cách liên kết chất tương tự glucagon 1 được liên kết PEG với vùng Fc globulin miễn dịch

Để liên kết PEG polypeptit có hoạt tính sinh lý (chất tương tự glucagon 1, SEQ ID NO.4) ở gốc cystein (nhóm -SH), chất tương tự glucagon 1 được cho phản ứng với gốc liên kết chứa PEG (maleimide-10 kDa-PEG-aldehyt) (công thức 1) trong khoảng 1 giờ ở tỷ lệ mol nằm trong khoảng từ 1:1,3 với nồng độ chất tương tự glucagon 1 bằng 3g/L. Cụ thể, phản ứng được thực hiện trong dung dịch đệm Tris 50mM chứa isopropanol (độ pH bằng 7,3). Để thu được chất tương tự glucagon 1 được liên kết mono-PEG, dung dịch phản ứng được pha loãng bằng dung dịch đệm cân bằng chứa natri xitrat và etanol đến tổng thể tích bằng 20 lần và tinh chế. Về vấn đề này, chất tương tự glucagon 1 được liên kết mono-PEG được tinh chế bằng cột hiệu năng cao SP (GE Healthcare, sắc ký trao đổi cation) bằng cách sử dụng dung dịch chứa natri xitrat và etanol và gradien nồng độ kali clorua. Sau khi dung dịch tinh chế chứa chất tương tự glucagon 1 được liên kết PEG được pha loãng bằng nước, dung dịch đệm được thay bằng dung dịch kali phosphat 0,1M thông qua siêu lọc/lọc tuần hoàn có pha loãng (UF/DF), sau đó cô để thu hồi hợp chất thu được ở nồng độ cuối cùng bằng 3g/L hoặc cao hơn.

Chất tương tự glucagon 1 được liên kết mono-PEG được bào chế như mô tả nêu trên được liên kết với vùng Fc globulin miễn dịch để bào chế thể tiếp hợp tác dụng kéo dài như sau.

Để liên kết nhóm aldehyt của PEG của chất tương tự glucagon 1 được liên kết mono-PEG với đầu tận cùng amin của vùng Fc globulin miễn dịch, chất tương tự glucagon 1 được liên kết mono-PEG được cho phản ứng với vùng Fc globulin miễn dịch ở tỷ lệ mol nằm trong khoảng từ 1:5 ở nhiệt độ $6^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$ trong khoảng 12 giờ với nồng độ protein tổng số (chất tương tự glucagon 1 và vùng Fc globulin miễn dịch) bằng 20g/L.

Để phân lập và loại bỏ các vùng Fc globulin miễn dịch chưa phản ứng sau phản ứng liên kết, dung dịch phản ứng được tinh chế bằng cách sử dụng cột Butyl 4 Fast Flow (GE Healthcare, phương pháp sắc ký tương tác kỵ nước). Trong trường hợp này, dung dịch đệm Tris và natri clorua được bổ sung vào dung dịch phản ứng, và dung dịch phản ứng được tinh chế bằng cách sử dụng dung dịch chứa Bis-Tris và gradien nồng độ natri clorua.

Sau đó, bằng cách sử dụng cột Source 15ISO (GE Healthcare), phương pháp sắc ký tương tác kỵ nước được thực hiện. Các sản phẩm phụ được loại bỏ bằng quy trình này, và thể tiếp hợp vùng Fc globulin miễn dịch-PEG-chứa gốc liên kết-chất tương tự glucagon 1 được bào chế. Trong trường hợp này, bước tinh chế được thực hiện bằng cách sử dụng dung dịch đệm chứa natri xitrat và gradien nồng độ amonin sulfat.

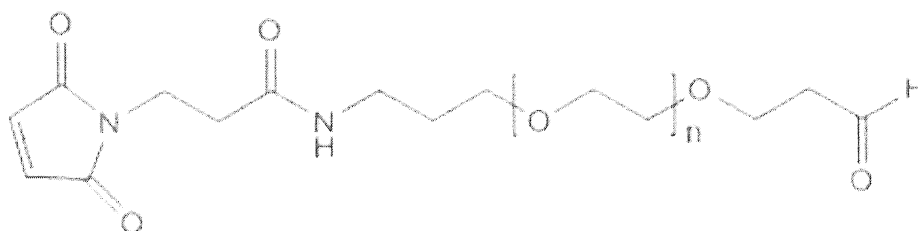
Các tác giả sáng chế đã phát triển phương pháp có thể bào chế hữu hiệu thể tiếp hợp có độ tinh khiết cao bằng cách bỏ qua bước lọc màng và bước tinh chế (phương pháp sắc ký tương tác kỵ nước, Butyl 4 Fast Flow) ra khỏi quy trình bào chế thể tiếp hợp theo ví dụ so sánh 1 và ví dụ so sánh 2 nêu trên như sau.

Ví dụ 1: Bào chế vùng Fc globulin miễn dịch được liên kết mono-PEG

Ví dụ 1-1. Bào chế vùng Fc globulin miễn dịch được liên kết mono-PEG

Để liên kết PEG đầu tận cùng N của vùng Fc globulin miễn dịch (49,8 kDa) có vùng bản lề có trình tự Pro-Ser-Cys-Pro ở đầu tận cùng N, vùng Fc globulin miễn dịch được cho phản ứng với gốc liên kết chứa PEG (cấu trúc có công thức 4, 10 kDa) ở tỷ lệ molar (vùng Fc globulin miễn dịch : PEG-chứa gốc liên kết) bằng 1:1 với nồng độ vùng Fc globulin miễn dịch bằng 50g/L ở nhiệt độ $6^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$ trong khoảng 4 giờ.

Công thức 4



Cụ thể, phản ứng được thực hiện trong chế phẩm chứa dung dịch đệm Bis-Tris 5mM (độ pH = 6,5) và kali phosphat, và 10mM NaCNBH₃ (natri xyanobohydrua) được

bổ sung vào chế phẩm này dưới dạng chất khử. Để thu được vùng Fc globulin miễn dịch được liên kết mono-PEG, dung dịch phản ứng được pha loãng bằng dung dịch đệm Bis-Tris và tinh chế.

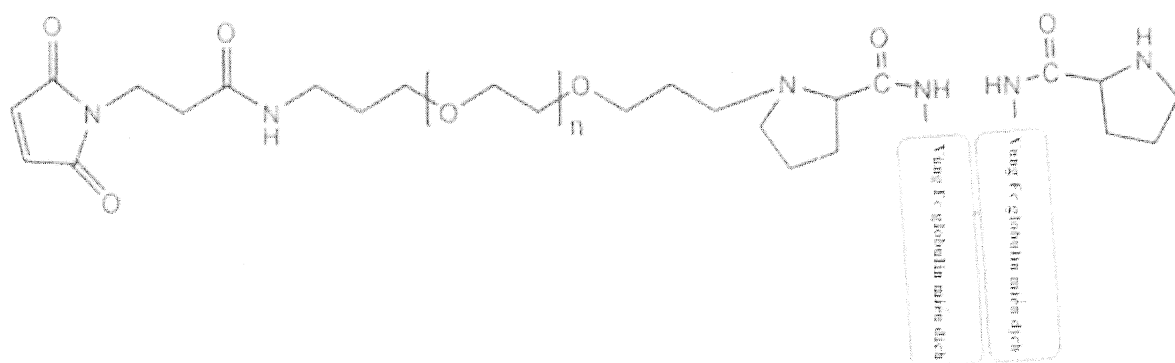
Không giống như phương pháp bào chế theo các ví dụ so sánh mô tả nêu trên trong đó chất tương tự chất chủ vận đặc hiệu đồng thời GLP-1/GIP/Glucagon và chất tương tự glucagon được liên kết mono-PEG được tinh chế bằng sắc ký trao đổi cation, vùng Fc globulin miễn dịch được liên kết mono-PEG được tinh chế bằng cách sử dụng cột CaptoQ ImpRes (GE Healthcare, sắc ký trao đổi anion) bằng cách sử dụng dung dịch đệm Bis-Tris và gradien nồng độ natri clorua.

Ví dụ 1-2. Phân tích cấu trúc của vùng Fc globulin miễn dịch được liên kết mono-PEG

Vùng Fc globulin miễn dịch được liên kết mono-PEG được bào chế theo ví dụ 1-1 được phân tích cấu trúc bằng thử nghiệm MALDI-TOF và lập bản đồ peptit. Theo kết quả của thử nghiệm MALDI-TOF, hợp chất thu được giống hệt như khối lượng phân tử dự kiến của vùng Fc globulin miễn dịch được liên kết mono-PEG (Fig.1), và theo kết quả của lập bản đồ peptit, đã kiểm chứng được rằng trên 90% PEG was PEGylated ở đầu tận cùng N của vùng Fc globulin miễn dịch.

Trong khi đó, theo kết quả của thử nghiệm phân tích vùng Fc globulin miễn dịch được liên kết mono-PEG (công thức 2) được bào chế theo ví dụ 1-1 bằng cách sử dụng các thử nghiệm SE-HPLC, RP-HPLC, và IE-HPLC, độ tinh khiết được kiểm chứng bằng 90% hoặc cao hơn trong thử nghiệm SE-HPLC, 90% hoặc cao hơn trong thử nghiệm RP-HPLC, và 80% hoặc cao hơn trong thử nghiệm IE-HPLC.

Công thức 2



Ví dụ 2: Bào chế thể tiếp hợp bằng cách liên kết vùng Fc globulin miễn dịch được liên kết PEG với polypeptit có hoạt tính sinh lý

Các thể tiếp hợp tác dụng kéo dài được bào chế như sau bằng cách liên kết vùng Fc globulin miễn dịch được liên kết mono-PEG được bào chế theo ví dụ 1-1 với các peptit có hoạt tính sinh lý khác nhau.

Không giống như phương pháp bào chế theo các ví dụ so sánh trong đó polypeptit có hoạt tính sinh lý được liên kết PEG được tinh chế bằng sắc ký trao đổi cation, sau đó trao đổi dung dịch đậm và cô bằng bước siêu lọc/lọc tuần hoàn có pha loãng (UF/DF), vùng Fc globulin miễn dịch được liên kết mono-PEG được cho phản ứng với polypeptit có hoạt tính sinh lý thông qua phản ứng tiếp hợp peptit mà không thực hiện bước siêu lọc/lọc tuần hoàn có pha loãng. Các thể tiếp hợp tác dụng kéo dài được bào chế như mô tả nêu trên có độ tinh khiết cao, do đó một trong hai chu kỳ của phương pháp sắc ký tương tác kỵ nước có thể được bỏ qua không giống như phương pháp bào chế theo các ví dụ so sánh.

Ví dụ 2-1. Bào chế thể tiếp hợp của chất tương tự chất chủ vận đặc hiệu đồng thời GLP-1/GIP/Glucagon 1

Thể tiếp hợp tác dụng kéo dài (vùng Fc globulin miễn dịch-PEG-chứa gốc liên kết-chất tương tự chất chủ vận đặc hiệu đồng thời GLP-1/GIP/Glucagon 1) được bào chế thông qua phản ứng tiếp hợp peptit của chất tương tự chất chủ vận đặc hiệu đồng thời GLP-1/GIP/Glucagon 1 (SEQ ID NO.1), sau khi sắc ký trao đổi anion theo ví dụ 1-1, mà không thực hiện bước siêu lọc/lọc tuần hoàn có pha loãng.

SEQ ID NO.1

Y-Aib-QGTFTSDY SKYLD EKRAK EFVQWLLDHH PSSGQ PPPSC


Aib = axit 2-aminoisobutyric

Glu16 (màu đỏ) và Lys20 (màu đỏ) được liên kết bằng vòng Lactam

Về vấn đề này, để liên kết nhóm phản ứng maleimit ở một đầu tận cùng của PEG của vùng Fc globulin miễn dịch được liên kết mono-PEG với chất tương tự chất chủ vận đặc hiệu đồng thời GLP-1/GIP/Glucagon 1, vùng Fc globulin miễn dịch được liên kết mono-PEG được cho phản ứng với chất tương tự chất chủ vận đặc hiệu đồng thời GLP-

1/GIP/Glucagon 1 ở tỷ lệ mol nằm trong khoảng từ 1:1 với nồng độ chất tương tự chất chủ vận đặc hiệu đồng thời GLP-1/GIP/Glucagon 1 bằng 0,2g/L ở nhiệt độ $6^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$ trong khoảng 2 giờ. Phản ứng được thực hiện trong dung dịch đệm Tris-Cl ($6^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$) chứa isopropanol. Theo kết quả của thử nghiệm phân tích hợp chất thu được sau phản ứng bằng cách sử dụng các thử nghiệm SE-HPLC, RP-HPLC, và IE-HPLC, độ tinh khiết được kiểm chứng bằng 90% hoặc cao hơn trong thử nghiệm SE-HPLC, 80% hoặc cao hơn trong thử nghiệm RP-HPLC, và 70% hoặc cao hơn trong thử nghiệm IE-HPLC.

Sau đó, hợp chất thu được sau phản ứng được xử lý bằng phương pháp sắc ký tương tác kỵ nước một lần bằng cách sử dụng cột Source 15ISO (GE Healthcare). Các sản phẩm phụ được loại bỏ bằng quy trình này, và thể tiếp hợp vùng Fc globulin miễn dịch-PEG-chứa gốc liên kết-chất tương tự chất chủ vận đặc hiệu đồng thời GLP-1/GIP/Glucagon 1 được bào chế. Trong trường hợp này, bước tinh chế được thực hiện bằng cách sử dụng dung dịch đệm chứa natri xitrat và gradien nồng độ amonin sulfat. Đã kiểm chứng được rằng hiệu suất thu được theo ví dụ này được gia tăng gấp khoảng 2 lần hoặc cao hơn so với hiệu suất theo ví dụ so sánh 1 với cùng lượng của chất tương tự chất chủ vận đặc hiệu đồng thời GLP-1/GIP/Glucagon 1.

Thể tiếp hợp vùng Fc globulin miễn dịch-PEG-chứa gốc liên kết-chất tương tự chất chủ vận đặc hiệu đồng thời GLP-1/GIP/Glucagon 1 được rửa giải được phân tích bằng các thử nghiệm SE-HPLC, RP-HPLC, và IE-HPLC, và độ tinh khiết cao được kiểm chứng do độ tinh khiết bằng 90% hoặc cao hơn trong thử nghiệm SE-HPLC, 90% hoặc cao hơn trong thử nghiệm RP-HPLC, và 90% hoặc cao hơn trong thử nghiệm IE-HPLC.

Ví dụ 2-2. Bào chế thể tiếp hợp của chất tương tự chất chủ vận đặc hiệu đồng thời GLP-1/GIP/Glucagon 2

Thể tiếp hợp tác dụng kéo dài (vùng Fc globulin miễn dịch-PEG-chứa gốc liên kết-chất tương tự chất chủ vận đặc hiệu đồng thời GLP-1/GIP/Glucagon 2) được bào chế thông qua phản ứng tiếp hợp peptit của chất tương tự chất chủ vận đặc hiệu đồng thời GLP-1/GIP/Glucagon 2 (SEQ ID NO.2), sau khi sắc ký trao đổi anion theo ví dụ 1-1, mà không thực hiện bước siêu lọc/lọc tuần hoàn có pha loãng.

SEQ ID NO.2

YXQGTFTSDYSKYLDEKRAKEFVQWLLDHHCSSGQPPPS

Glu16 (màu đỏ) và Lys20 (màu đỏ) được liên kết bằng vòng Lactam

Về vấn đề này, để liên kết nhóm phản ứng maleimide ở một đầu tận cùng của PEG của vùng Fc globulin miễn dịch được liên kết mono-PEG với chất tương tự chất chủ vận đặc hiệu đồng thời GLP-1/GIP/Glucagon 2, vùng Fc globulin miễn dịch được liên kết mono-PEG được cho phản ứng với chất tương tự chất chủ vận đặc hiệu đồng thời GLP-1/GIP/Glucagon 2 ở tỷ lệ mol nằm trong khoảng từ 1:1 với nồng độ chất tương tự chất chủ vận đặc hiệu đồng thời GLP-1/GIP/Glucagon 2 bằng 0,2g/L ở nhiệt độ $6^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$ trong khoảng 2 giờ. Phản ứng được thực hiện trong dung dịch đệm Tris-Cl ($6^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$) chứa isopropanol. Theo kết quả của thử nghiệm phân tích hợp chất thu được sau phản ứng bằng cách sử dụng các thử nghiệm SE-HPLC, RP-HPLC, và IE-HPLC, độ tinh khiết của thể tiếp hợp tác dụng kéo dài bao gồm chất tương tự chất chủ vận đặc hiệu đồng thời GLP-1/GIP/Glucagon 2 được kiểm chứng bằng 90% hoặc cao hơn trong thử nghiệm SE-HPLC, 80% hoặc cao hơn trong thử nghiệm RP-HPLC, và 70% hoặc cao hơn trong thử nghiệm IE-HPLC.

Sau đó, hợp chất thu được sau phản ứng được xử lý bằng phương pháp sắc ký tương tác kỵ nước một lần bằng cách sử dụng cột Source 15ISO (GE Healthcare). Các sản phẩm phụ được loại bỏ bằng quy trình này, và vùng Fc globulin miễn dịch-PEG-chứa gốc liên kết-chất tương tự chất chủ vận đặc hiệu đồng thời GLP-1/GIP/Glucagon 2 conjugate được bào chế. Trong trường hợp này, bước tinh chế được thực hiện bằng cách sử dụng dung dịch đệm chứa natri xitrat và gradien nồng độ amonin sulfat. Đã kiểm chứng được rằng hiệu suất thu được theo ví dụ này được gia tăng gấp khoảng 2 lần hoặc cao hơn so với hiệu suất theo ví dụ so sánh 1 với cùng lượng của chất tương tự chất chủ vận đặc hiệu đồng thời GLP-1/GIP/Glucagon 2.

Thể tiếp hợp vùng Fc globulin miễn dịch-PEG-chứa gốc liên kết-chất tương tự chất chủ vận đặc hiệu đồng thời GLP-1/GIP/Glucagon 2 được rửa giải được phân tích bằng các thử nghiệm SE-HPLC, RP-HPLC, và IE-HPLC, và độ tinh khiết cao được kiểm chứng do độ tinh khiết bằng 90% hoặc cao hơn trong thử nghiệm SE-HPLC, 90% hoặc cao hơn trong thử nghiệm RP-HPLC, và 80% hoặc cao hơn trong thử nghiệm IE-HPLC.

Ví dụ 2-3. Bào chế thể tiếp hợp của chất tương tự chất chủ vận đặc hiệu đồng thời GLP-1/GIP/Glucagon 3

Thể tiếp hợp tác dụng kéo dài (vùng Fc globulin miễn dịch-PEG-chứa gốc liên kết-chất tương tự chất chủ vận đặc hiệu đồng thời GLP-1/GIP/Glucagon 3) được bào chế thông qua phản ứng tiếp hợp peptit của chất tương tự chất chủ vận đặc hiệu đồng thời GLP-1/GIP/Glucagon 3 (SEQ ID NO.3), sau khi sắc ký trao đổi anion theo ví dụ 1-1, mà không thực hiện bước siêu lọc/lọc tuần hoàn có pha loãng.

SEQ ID NO.3

HXQGTFTSDYSKYLDEKRAKEFVQWLLDHHHPSSGQPPPS



Glu16 (màu đỏ) và Lys20 (màu đỏ) được liên kết bằng vòng Lactam

Về vấn đề này, để liên kết nhóm phản ứng maleimide ở một đầu tận cùng của PEG của vùng Fc globulin miễn dịch được liên kết mono-PEG to cysteine của chất tương tự chất chủ vận đặc hiệu đồng thời GLP-1/GIP/Glucagon 3, vùng Fc globulin miễn dịch được liên kết mono-PEG được cho phản ứng với chất tương tự chất chủ vận đặc hiệu đồng thời GLP-1/GIP/Glucagon 3 ở tỷ lệ mol nằm trong khoảng từ 1:1 với nồng độ chất tương tự chất chủ vận đặc hiệu đồng thời GLP-1/GIP/Glucagon 3 bằng 0,2g/L ở nhiệt độ $6^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$ trong khoảng 2 giờ. Phản ứng được thực hiện trong dung dịch đệm Tris-Cl ($6^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$) chứa isopropanol. Theo kết quả của thử nghiệm phân tích hợp chất thu được sau phản ứng bằng cách sử dụng các thử nghiệm SE-HPLC, RP-HPLC, và IE-HPLC, độ tinh khiết được kiểm chứng bằng 90% hoặc cao hơn trong thử nghiệm SE-HPLC, 80% hoặc cao hơn trong thử nghiệm RP-HPLC, và 70% hoặc cao hơn trong thử nghiệm IE-HPLC.

Sau đó, hợp chất thu được sau phản ứng được xử lý bằng phương pháp sắc ký tương tác kỵ nước một lần bằng cách sử dụng cột Source 15ISO (GE Healthcare). Các sản phẩm phụ được loại bỏ bằng quy trình này, và vùng Fc globulin miễn dịch-PEG-chứa gốc liên kết-chất tương tự chất chủ vận đặc hiệu đồng thời GLP-1/GIP/Glucagon 3 conjugate được bào chế. Trong trường hợp này, bước tinh chế được thực hiện bằng cách sử dụng dung dịch đệm chứa natri xitrat và gradien nồng độ amonin sulfat. Đã kiểm chứng được rằng hiệu suất thu được theo ví dụ này được gia tăng gấp khoảng 2 lần hoặc

cao hơn so với hiệu suất theo ví dụ so sánh 1 với cùng lượng của chất tương tự chất chủ vận đặc hiệu đồng thời GLP-1/GIP/Glucagon 3.

Thể tiếp hợp vùng Fc globulin miễn dịch-PEG-chứa gốc liên kết-chất tương tự chất chủ vận đặc hiệu đồng thời GLP-1/GIP/Glucagon 3 được rửa giải được phân tích bằng các thử nghiệm SE-HPLC, RP-HPLC, và IE-HPLC, và độ tinh khiết cao được kiểm chứng do độ tinh khiết bằng 90% hoặc cao hơn trong thử nghiệm SE-HPLC, 90% hoặc cao hơn trong thử nghiệm RP-HPLC, và 90% hoặc cao hơn trong thử nghiệm IE-HPLC.

Ví dụ 2-4. Bào chế thể tiếp hợp của chất tương tự glucagon 1

Thể tiếp hợp tác dụng kéo dài (vùng Fc globulin miễn dịch-PEG-chứa gốc liên kết-chất tương tự glucagon 1) được bào chế thông qua phản ứng tiếp hợp peptit của chất tương tự glucagon 1 (SEQ ID NO.4), sau khi sắc ký trao đổi anion theo ví dụ 1-1, mà không thực hiện bước siêu lọc/lọc tuần hoàn có pha loãng.

SEQ ID NO.4



Aib = axit 2-aminoisobutyric

Glu16 (màu đỏ) và Lys20 (màu đỏ) được liên kết bằng vòng Lactam

Về vấn đề này, để liên kết nhóm phản ứng maleimide ở một đầu tận cùng của PEG của vùng Fc globulin miễn dịch được liên kết mono-PEG với chất tương tự glucagon 1, vùng Fc globulin miễn dịch được liên kết mono-PEG được cho phản ứng với chất tương tự glucagon 1 ở tỷ lệ mol nằm trong khoảng từ 1:1 với nồng độ chất tương tự glucagon 1 bằng 0,2g/L ở nhiệt độ $6^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$ trong khoảng 2 giờ. Phản ứng được thực hiện trong dung dịch đệm Tris-Cl ($6^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$) chứa isopropanol. Theo kết quả của thử nghiệm phân tích hợp chất thu được sau phản ứng bằng cách sử dụng các thử nghiệm SE-HPLC, RP-HPLC, và IE-HPLC, độ tinh khiết của vùng Fc globulin miễn dịch-PEG-chứa gốc liên kết-chất tương tự glucagon 1 được kiểm chứng bằng 90% hoặc cao hơn trong thử nghiệm SE-HPLC, 70% hoặc cao hơn trong thử nghiệm RP-HPLC, và 70% hoặc cao hơn trong thử nghiệm IE-HPLC.

Sau đó, hợp chất thu được sau phản ứng được xử lý bằng phương pháp sắc ký tương tác kỵ nước một lần bằng cách sử dụng cột Source 15ISO (GE Healthcare). Các sản phẩm phụ được loại bỏ bằng quy trình này, và thể tiếp hợp vùng Fc globulin miễn dịch-PEG-chứa gốc liên kết-chất tương tự glucagon 1 được bào chế. Trong trường hợp này, bước tinh chế được thực hiện bằng cách sử dụng dung dịch đệm chứa natri xitrat và gradien nồng độ amonin sulfat. Đã kiểm chứng được rằng hiệu suất thu được theo ví dụ này được gia tăng gấp khoảng 1,5 lần hoặc cao hơn so với hiệu suất theo ví dụ so sánh 2 với cùng lượng của chất tương tự glucagon 1.

Thể tiếp hợp vùng Fc globulin miễn dịch-PEG-chứa gốc liên kết-chất tương tự glucagon 1 được rửa giải được phân tích bằng các thử nghiệm SE-HPLC, RP-HPLC, và IE-HPLC, và độ tinh khiết cao được kiểm chứng do độ tinh khiết bằng 90% hoặc cao hơn trong thử nghiệm SE-HPLC, 90% hoặc cao hơn trong thử nghiệm RP-HPLC, và 90% hoặc cao hơn trong thử nghiệm IE-HPLC.

Ví dụ 2-5. Bào chế thể tiếp hợp của chất tương tự glucagon 2

Thể tiếp hợp tác dụng kéo dài (vùng Fc globulin miễn dịch-PEG-chứa gốc liên kết-chất tương tự glucagon 2) được bào chế thông qua phản ứng tiếp hợp peptit của chất tương tự glucagon 2 (SEQ ID NO.5), sau khi sắc ký trao đổi anion theo ví dụ 1-1, mà không thực hiện bước siêu lọc/lọc tuần hoàn có pha loãng.

SEQ ID NO.5

YXQGTFTSDYSKYLDECR AKEFVQWLMNT



Glu16 (màu đỏ) và Lys20 (màu đỏ) được liên kết bằng vòng Lactam

Về vấn đề này, để liên kết nhóm phản ứng maleimit ở một đầu tận cùng của PEG của vùng Fc globulin miễn dịch được liên kết mono-PEG với chất tương tự glucagon 2, vùng Fc globulin miễn dịch được liên kết mono-PEG được cho phản ứng với chất tương tự glucagon 2 ở tỷ lệ mol nằm trong khoảng từ 1:1 với nồng độ chất tương tự glucagon 2 bằng 0,2g/L ở nhiệt độ $6^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$ trong khoảng 2 giờ. Phản ứng được thực hiện trong dung dịch đệm Tris-Cl ($6^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$) chứa isopropanol. Theo kết quả của thử nghiệm phân tích hợp chất thu được sau phản ứng bằng cách sử dụng các thử nghiệm SE-HPLC, RP-HPLC, và IE-HPLC, độ tinh khiết của vùng Fc globulin miễn dịch-PEG-chứa gốc liên

kết-chất tương tự glucagon 2 được kiểm chứng bằng 90% hoặc cao hơn trong thử nghiệm SE-HPLC, 70% hoặc cao hơn trong thử nghiệm RP-HPLC, và 70% hoặc cao hơn trong thử nghiệm IE-HPLC.

Sau đó, hợp chất thu được sau phản ứng được xử lý bằng phương pháp sắc ký tương tác kỵ nước một lần bằng cách sử dụng cột Source 15ISO (GE Healthcare). Các sản phẩm phụ được loại bỏ bằng quy trình này, và thể tiếp hợp vùng Fc globulin miễn dịch-PEG-chứa gốc liên kết-chất tương tự glucagon 2 được bào chế. Trong trường hợp này, bước tinh chế được thực hiện bằng cách sử dụng dung dịch đệm chứa natri xitrat và gradien nồng độ amonin sulfat. Đã kiểm chứng được rằng hiệu suất thu được theo ví dụ này được gia tăng gấp khoảng 1,5 lần hoặc cao hơn so với hiệu suất theo ví dụ so sánh 2 với cùng lượng của chất tương tự glucagon 2.

Thể tiếp hợp vùng Fc globulin miễn dịch-PEG-chứa gốc liên kết-chất tương tự glucagon 2 được rửa giải được phân tích bằng các thử nghiệm SE-HPLC, RP-HPLC, và IE-HPLC, và độ tinh khiết cao được kiểm chứng do độ tinh khiết bằng 90% hoặc cao hơn trong thử nghiệm SE-HPLC, 90% hoặc cao hơn trong thử nghiệm RP-HPLC, và 90% hoặc cao hơn trong thử nghiệm IE-HPLC.

Ví dụ 2-6. Bào chế thể tiếp hợp của chất tương tự glucagon 3

Thể tiếp hợp tác dụng kéo dài (vùng Fc globulin miễn dịch-PEG-chứa gốc liên kết-chất tương tự glucagon 3) được bào chế thông qua phản ứng tiếp hợp peptit của chất tương tự glucagon 3 (SEQ ID NO.6), sau khi sắc ký trao đổi anion theo ví dụ 1-1, mà không thực hiện bước siêu lọc/lọc tuần hoàn có pha loãng.

SEQ ID NO.6

YXQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNTC

Về vấn đề này, để liên kết nhóm phản ứng maleimide ở một đầu tận cùng của PEG của vùng Fc globulin miễn dịch được liên kết mono-PEG to cysteine của chất tương tự glucagon 3, vùng Fc globulin miễn dịch được liên kết mono-PEG được cho phản ứng với chất tương tự glucagon 3 ở tỷ lệ mol nằm trong khoảng từ 1:1 với nồng độ chất tương tự glucagon 3 bằng 0,2g/L ở nhiệt độ $6^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$ trong khoảng 2 giờ. Phản ứng được thực hiện trong dung dịch đệm Tris-Cl ($6^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$) chứa isopropanol. Theo kết quả của thử nghiệm phân tích hợp chất thu được sau phản ứng bằng cách sử dụng các thử nghiệm SE-

HPLC, RP-HPLC, và IE-HPLC, độ tinh khiết của vùng Fc globulin miễn dịch-PEG-chứa gốc liên kết-chất tương tự glucagon 3 được kiểm chứng bằng 90% hoặc cao hơn trong thử nghiệm SE-HPLC, 70% hoặc cao hơn trong thử nghiệm RP-HPLC, và 70% hoặc cao hơn trong thử nghiệm IE-HPLC.

Sau đó, hợp chất thu được sau phản ứng được xử lý bằng phương pháp sắc ký tương tác kỵ nước một lần bằng cách sử dụng cột Source 15ISO (GE Healthcare). Các sản phẩm phụ được loại bỏ bằng quy trình này, và thể tiếp hợp vùng Fc globulin miễn dịch-PEG-chứa gốc liên kết-chất tương tự glucagon 3 được bào chế. Trong trường hợp này, bước tinh chế được thực hiện bằng cách sử dụng dung dịch đệm chứa natri xitrat và gradien nồng độ amonin sulfat. Đã kiểm chứng được rằng hiệu suất thu được theo ví dụ này được gia tăng gấp khoảng 1,5 lần hoặc cao hơn so với hiệu suất đã biết với cùng lượng của chất tương tự glucagon 3.

Thể tiếp hợp vùng Fc globulin miễn dịch-PEG-chứa gốc liên kết-chất tương tự glucagon 3 được rửa giải được phân tích bằng các thử nghiệm SE-HPLC, RP-HPLC, và IE-HPLC, và độ tinh khiết cao được kiểm chứng do độ tinh khiết bằng 90% hoặc cao hơn trong thử nghiệm SE-HPLC, 90% hoặc cao hơn trong thử nghiệm RP-HPLC, và 90% hoặc cao hơn trong thử nghiệm IE-HPLC.

Bảng 1 và Bảng 2 thể hiện các kết quả so sánh giữa các phương pháp của các ví dụ so sánh và các ví dụ.

Bảng 1 So sánh giữa các phương pháp bào chế chất tương tự chất chủ vận đặc hiệu đồng thời GLP-1/GIP/Glucagon

	Ví dụ so sánh	Ví dụ (phương pháp bào chế thông thường)		
	Chất chủ vận đặc hiệu đồng thời GLP-1/GIP/Glucagon 1	Chất chủ vận đặc hiệu đồng thời GLP-1/GIP/Glucagon 1	Chất chủ vận đặc hiệu đồng thời GLP-1/GIP/Glucagon 2	Chất chủ vận đặc hiệu đồng thời GLP-1/GIP/Glucagon 3
Điều kiện phản ứng	Phản ứng 1] Peptit:PEG = 1:1,3 Phản ứng 2] PEG-Peptit:vùng Fc globulin miễn dịch = 1:2	Phản ứng 1] Fc:PEG = 1:1 Phản ứng 2] PEG-Fc: Peptit = 1:1		
Độ tinh khiết SE-HPLC	90% hoặc cao hơn	90% hoặc cao hơn	90% hoặc cao hơn	90% hoặc cao hơn
RP-HPLC	90% hoặc cao hơn	90% hoặc cao hơn	90% hoặc cao hơn	90% hoặc cao hơn
IE-HPLC	90% hoặc cao hơn	90% hoặc cao hơn	80% hoặc cao hơn	90% hoặc cao hơn
Hiệu suất (liên quan đến peptit)	-	2 lần hoặc cao hơn so với ví dụ so	2 lần hoặc cao hơn so với ví dụ so	2 lần hoặc cao hơn so với ví dụ so

		sánh	sánh	sánh
Hiệu suất (liên quan đến Fc)		cao gấp khoảng 1,3 lần so với ví dụ so sánh	cao gấp khoảng 1,3 lần so với ví dụ so sánh	cao gấp khoảng 1,3 lần so với ví dụ so sánh

Bảng 2 So sánh giữa các phương pháp bào chế chất tương tự glucagon

	Ví dụ so sánh	Ví dụ (phương pháp bào chế thông thường)		
	Chất tương tự glucagon 1	Chất tương tự glucagon 1	Chất tương tự glucagon 2	Chất tương tự glucagon 3
Điều kiện phản ứng	Phản ứng 1] Peptit:PEG = 1:1,3 Phản ứng 2] PEG-Peptit:vùng Fc globulin miễn dịch = 1:5	Phản ứng 1] Fc:PEG = 1:1 Phản ứng 2] PEG-Fc: Peptit = 1:1		
Độ tinh khiết SE-HPLC	90% hoặc cao hơn	90% hoặc cao hơn	90% hoặc cao hơn	90% hoặc cao hơn
RP-HPLC	90% hoặc cao hơn	90% hoặc cao hơn	90% hoặc cao hơn	90% hoặc cao hơn
IE-HPLC	90% hoặc cao hơn	90% hoặc cao hơn	90% hoặc cao hơn	90% hoặc cao hơn
Hiệu suất (liên quan đến peptit)	-	1,5 lần hoặc cao hơn so với ví dụ so sánh	1,5 lần hoặc cao hơn so với ví dụ so sánh	1,5 lần hoặc cao hơn so với ví dụ so sánh
Hiệu suất (liên quan đến Fc)		1 lần hoặc cao hơn so với ví dụ so sánh	1 lần hoặc cao hơn so với ví dụ so sánh	1 lần hoặc cao hơn so với ví dụ so sánh

Phần mô tả nêu trên chỉ nhằm mục đích minh họa sáng chế, và người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rằng các thay đổi và cải biến khác nhau có thể được tạo ra mà không làm thay đổi các dấu hiệu kỹ thuật cơ bản của sáng chế. Do đó, rõ ràng là các phương án mô tả nêu trên chỉ nhằm mục đích minh họa chứ không giới hạn phạm vi của sáng chế. Do đó, phạm vi của sáng chế không được xác định bởi phần mô tả chi tiết nêu trên, mà bởi bộ yêu cầu bảo hộ và các phản tương đương của nó, và toàn bộ các thay đổi nằm trong phạm vi của bộ yêu cầu bảo hộ và các phản tương đương của nó cũng nằm trong phạm vi của sáng chế.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Hợp chất có công thức 1 hoặc chất đồng phân lập thể, solvat, hoặc muối được dụng của nó:

Công thức 1



trong đó trong công thức 1,

X chứa, ở đầu tận cùng N, trình tự bản lề chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.9 (Pro-Ser-Cys-Pro);

L1 là C₁-C₆ alkylen mạch thẳng hoặc mạch nhánh;

L2 là -a1-CONH-, -a1-NHCO-, -a1-NHCO-a2-, -COO-, -b1-COO-, -COO-b2-, hoặc -b1-COO-b2-, trong đó a1, a2, b1, và b2 độc lập với nhau là C₁-C₆ alkylen mạch thẳng hoặc mạch nhánh;

n nằm trong khoảng từ 10 đến 2400; và;

R là gốc bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm 2,5-dioxopyrrolidinyl, 2,5-dioxopyrrolyl, aldehyt, maleimit, C₆-C₂₀ aryl disulfua, C₅-C₂₀ heteroaryl disulfua, vinyl sulfon, thiol, halogen-axetamit, succinimit, *p*-nitrophenyl carbonat, và thioeste.

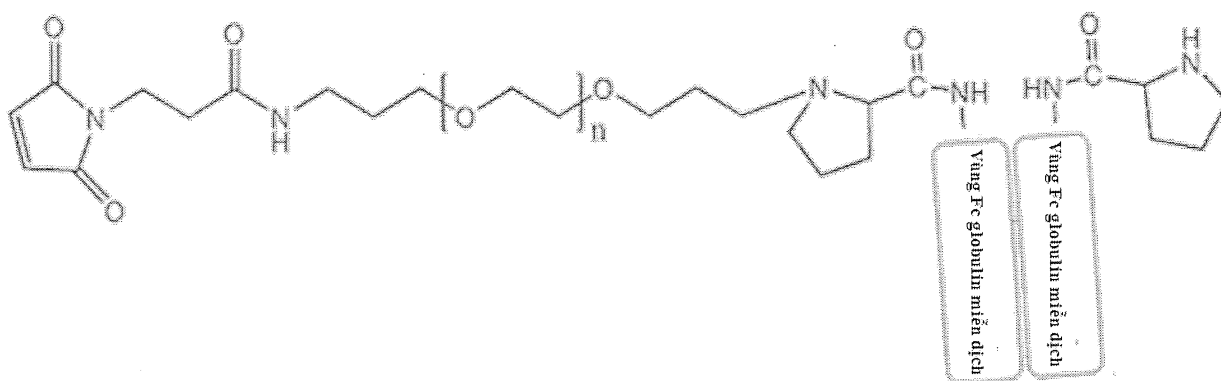
2. Hợp chất hoặc chất đồng phân lập thể, solvat, hoặc muối được dụng của nó theo điểm 1, trong đó trong công thức 1, L1 là C₁-C₆ alkylen mạch thẳng hoặc mạch nhánh; L2 là -a1-NHCO- hoặc -a1-NHCO-a2-, trong đó a1 và a2 độc lập với nhau là C₁-C₆ alkylen mạch thẳng hoặc mạch nhánh; n nằm trong khoảng từ 200 đến 250; và R là maleimit.

3. Hợp chất hoặc chất đồng phân lập thể, solvat, hoặc muối được dụng của nó theo điểm 1, trong đó L1 được liên kết với gốc prolin (Pro) của trình tự SEQ ID NO.9.

4. Hợp chất hoặc chất đồng phân lập thể, solvat, hoặc muối được dụng của nó theo điểm 1, trong đó L1 được liên kết với nhóm phản ứng amin nằm ở một đầu của X.

5. Hợp chất có công thức 2 hoặc chất đồng phân lập thể, solvat, hoặc muối được dụng của nó:

Công thức 2



trong đó trong công thức 2, n nằm trong khoảng từ 200 đến 250.

6. Hợp chất hoặc chất đồng phân lập thể, solvat, hoặc muối được dụng của nó theo điểm 1, trong đó X là vùng Fc globulin miễn dịch có nguồn gốc từ IgG, IgA, IgD, IgE, hoặc IgM.
7. Hợp chất hoặc chất đồng phân lập thể, solvat, hoặc muối được dụng của nó theo điểm 6, trong đó X là vùng Fc globulin miễn dịch có nguồn gốc từ IgG1, IgG2, IgG3, hoặc IgG4.
8. Hợp chất hoặc chất đồng phân lập thể, solvat, hoặc muối được dụng của nó theo điểm 1, trong đó X là vùng Fc globulin miễn dịch ở dạng dime.
9. Hợp chất hoặc chất đồng phân lập thể, solvat, hoặc muối được dụng của nó theo điểm 1, trong đó X là vùng Fc globulin miễn dịch chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.10.
10. Hợp chất hoặc chất đồng phân lập thể, solvat, hoặc muối được dụng của nó theo điểm 1, trong đó hợp chất này có kích cỡ nằm trong khoảng từ 40 kDa đến 250 kDa.
11. Chế phẩm bào chế thể tiếp hợp được chất tác dụng kéo dài chứa hợp chất có công thức 1, hoặc chất đồng phân lập thể, solvat, hoặc muối được dụng của nó,

trong đó được chất là polypeptit có hoạt tính sinh lý:

Công thức 1



trong công thức 1,

X chứa, ở đầu tận cùng N, trình tự bản lề chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.9 (Pro-Ser-Cys-Pro);

L1 là C₁-C₆ alkylen mạch thẳng hoặc mạch nhánh;

L2 là -a1-CONH-, -a1-NHCO-, -a1-NHCO-a2-, -COO-, -b1-COO-, -COO-b2-, hoặc -b1-COO-b2-, trong đó a1, a2, b1, và b2 độc lập với nhau là C1-C6 alkylen mạch thẳng hoặc mạch nhánh;

n nằm trong khoảng từ 10 đến 2400; và

R là gốc bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm 2,5-dioxopyrrolidinyl, 2,5-dioxopyrrolyl, aldehyt, maleimit, C₆-C₂₀ aryl disulfua, C₅-C₂₀ heteroaryl disulfua, vinyl sulfon, thiol, halogen-axetamit, succinimit, *p*-nitrophenyl carbonat, và thioeste.

12. Chế phẩm theo điểm 11, trong đó trong công thức 1, L1 là C₁-C₆ alkylen mạch thẳng hoặc mạch nhánh; L2 là -a1-NHCO- hoặc -a1-NHCO-a2-, trong đó a1 và a2 độc lập với nhau là C1-C6 alkylen mạch thẳng hoặc mạch nhánh; n nằm trong khoảng từ 200 đến 250; và R là maleimit.

13. Chế phẩm theo điểm 11, trong đó polypeptit có hoạt tính sinh lý được chọn từ nhóm bao gồm peptit tương tự glucagon-1 (glucagon-like peptide-1-GLP-1), yếu tố kích thích tăng sinh bạch cầu hạt (G-CSF), hormon sinh trưởng của người (hGH), erythropoietin (EPO), glucagon, insulin, hormon giải phóng hormon sinh trưởng, peptit giải phóng hormon sinh trưởng, interferon, thụ thể interferon, thụ thể liên hợp với protein G, interleukin, thụ thể interleukin, enzym, protein gắn kết interleukin, protein gắn kết xytokin, yếu tố hoạt hóa đại thực bào, peptit đại thực bào, yếu tố tế bào B, yếu tố tế bào T, protein A, chất ức chế dị ứng, glycoprotein hoại tử tế bào, immunotoxin, lymphotoxin, yếu tố hoại tử khối u, chất kìm hãm khối u, yếu tố phát triển sự di căn, α -1 antitrypsin, albumin, α -lactalbumin, apolipoprotein-E, erythropoietin được glycosyl hóa ở mức cao, angiopoietin, hemoglobin, thrombin, peptit hoạt hóa thụ thể thrombin, thrombomodulin, yếu tố đông máu VII, yếu tố đông máu VIIa, yếu tố đông máu VIII, yếu tố đông máu IX, yếu tố đông máu XIII, yếu tố hoạt hóa plasminogen, peptit gắn kết fibrin, urokinaza, streptokinaza, hirudin, protein C, protein phản ứng C, chất ức chế lenin, chất ức chế collagenaza, superoxit dismutaza, leptin, yếu tố sinh trưởng có nguồn gốc từ tiểu cầu, yếu tố sinh trưởng biểu mô, yếu tố sinh trưởng biểu bì, angiostatin, angiotensin, yếu tố sinh

trường xương, protein kích thích tạo xương, calcitonin, atriopeptin, yếu tố tạo sụn, elcatonin, yếu tố hoạt hóa mô liên kết, chất ức chế quá trình của yếu tố mô, hormon kích thích nang, hormon tạo hoàng thể, hormon giải phóng hormon tạo hoàng thể, yếu tố sinh trưởng dây thần kinh, hormon tuyến cận giáp, relaxin, secretin, somatomedin, yếu tố sinh trưởng tương tự insulin, hormon vỏ tuyến thượng thận, cholecystokinin, polypeptit tuyến tụy, peptit giải phóng gastrin, yếu tố giải phóng corticotropin, hormon kích thích tuyến giáp, autotaxin, lactoferrin, myostatin, incretins, polypeptit ức chế dạ dày (gastric inhibitory polypeptide-GIP), chất chủ vận đặc hiệu kép GLP-1/GIP, chất chủ vận đặc hiệu đồng thời GLP-1/GIP/Glucagon, kháng nguyên bề mặt tế bào, kháng nguyên vacxin có nguồn gốc từ virus, kháng thể đơn dòng, kháng thể đa dòng, và mảnh kháng thể.

14. Chế phẩm theo điểm 11, trong đó R của hợp chất của chế phẩm được liên kết với cystein của dược chất.

15. Chế phẩm theo điểm 11, trong đó X là vùng Fc globulin miễn dịch có nguồn gốc từ IgG1, IgG2, IgG3, hoặc IgG4.

16. Chế phẩm theo điểm 11, trong đó chế phẩm này được sử dụng để bào chế thể tiếp hợp dược chất tác dụng kéo dài mà không cần thực hiện bước siêu lọc/lọc tuần hoàn có pha loãng trong phương pháp bào chế thể tiếp hợp dược chất tác dụng kéo dài.

17. Phương pháp bào chế thể tiếp hợp tác dụng kéo dài của polypeptit có hoạt tính sinh lý, bao gồm

bước bào chế thể tiếp hợp bằng cách liên kết vùng Fc globulin miễn dịch được liên kết mono-PEG, được bào chế bằng cách liên kết gốc liên kết có công thức 3 với đầu tận cùng N của vùng Fc globulin miễn dịch chứa trình tự bản lề chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.9 (Pro-Ser-Cys-Pro), với polypeptit có hoạt tính sinh lý:

Công thức 3



trong đó trong công thức 3,

L1 là C₁-C₆ alkylen mạch thẳng hoặc mạch nhánh;

L2 là -a1-CONH-, -a1-NHCO-, -a1-NHCO-a2-, -COO-, -b1-COO-, -COO-b2-, hoặc -b1-COO-b2-, trong đó a1, a2, b1, và b2 độc lập với nhau là C₁-C₆ alkylen mạch thẳng hoặc mạch nhánh;

n nằm trong khoảng từ 10 đến 2400; và;

R là gốc bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm 2,5-dioxopyrolidinyl, 2,5-dioxopyrolyl, aldehyt, maleimit, C₆-C₂₀ aryl disulfua, C₅-C₂₀ heteroaryl disulfua, vinyl sulfon, thiol, halogen-axetamit, succinimit, *p*-nitrophenyl carbonat, và thioeste.

18. Phương pháp theo điểm 17, trong đó vùng Fc globulin miễn dịch được liên kết mono-PEG được bào chế bằng cách liên kết gốc liên kết có công thức 3 với đầu tận cùng N của vùng Fc globulin miễn dịch ở độ pH nằm trong khoảng từ 4,0 đến 8,0 trong sự có mặt của chất khử.

19. Phương pháp theo điểm 17, trong đó thể tiếp hợp được bào chế bằng liên kết gốc liên kết của vùng Fc globulin miễn dịch được liên kết mono-PEG với polypeptit có hoạt tính sinh lý ở độ pH nằm trong khoảng từ 5,5 đến 8,0.

20. Phương pháp theo điểm 17, trong đó bước bào chế thể tiếp hợp được thực hiện bằng cách cho vùng Fc globulin miễn dịch được liên kết mono-PEG phản ứng với polypeptit có hoạt tính sinh lý ở tỷ lệ mol nằm trong khoảng từ 1:1 đến 1:3.

21. Phương pháp theo điểm 17, trong đó phương pháp này bao gồm bước bào chế vùng Fc globulin miễn dịch được liên kết mono-PEG bằng cách liên kết gốc liên kết có công thức 3 với đầu tận cùng N của vùng Fc globulin miễn dịch; và bước bào chế thể tiếp hợp bằng cách liên kết gốc liên kết của vùng Fc globulin miễn dịch được liên kết mono-PEG được bào chế trong bước trước đó với polypeptit có hoạt tính sinh lý.

22. Phương pháp theo điểm 21, trong đó gốc liên kết của vùng Fc globulin miễn dịch được liên kết mono-PEG được liên kết với gốc cystein của polypeptit có hoạt tính sinh lý.

23. Phương pháp theo điểm 21, trong đó phương pháp này bao gồm bước bào chế vùng Fc globulin miễn dịch được liên kết mono-PEG bằng cách liên kết gốc liên kết có công thức 3 với đầu tận cùng N của vùng Fc globulin miễn dịch; bước tinh chế vùng Fc globulin miễn dịch được liên kết mono-PEG được bào chế trong bước trước đó bằng phương pháp sắc ký trao đổi anion trong dung dịch đệm có độ pH nằm trong khoảng từ 6,0 đến 8,5; và bước bào chế thể tiếp hợp bằng cách liên kết gốc liên kết của vùng Fc

globulin miễn dịch được liên kết mono-PEG được tinh chế trong bước trước đó với polypeptit có hoạt tính sinh lý.

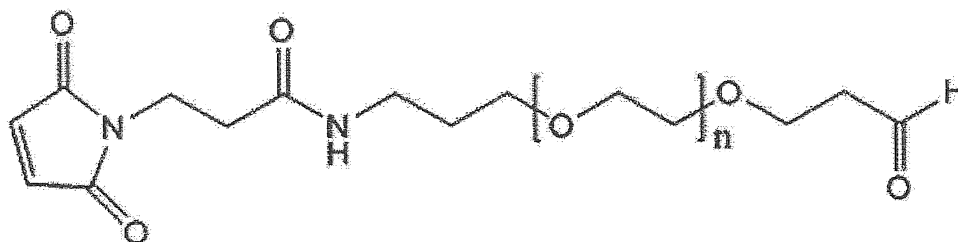
24. Phương pháp theo điểm 21, trong đó phương pháp này được thực hiện mà không cần thực hiện bước siêu lọc/lọc tuần hoàn có pha loãng sau khi bào chế vùng Fc globulin miễn dịch được liên kết mono-PEG.

25. Phương pháp theo điểm 17, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước tinh chế thể tiếp hợp bằng phương pháp sắc ký tương tác kỵ nước.

26. Phương pháp theo điểm 17, trong đó, trong công thức 3, L1 là C₁-C₆ alkylen mạch thẳng hoặc mạch nhánh; L2 là -a1-NHCO- hoặc -a1-NHCO-a2-, trong đó a1 và a2 độc lập với nhau là C₁-C₆ alkylen mạch thẳng hoặc mạch nhánh; n nằm trong khoảng từ 200 đến 250; và R là maleimit.

27. Phương pháp theo điểm 17, trong đó gốc liên kết có công thức 4:

Công thức 4



trong đó trong công thức 4, n nằm trong khoảng từ 200 đến 250.

28. Phương pháp theo điểm 17, trong đó gốc liên kết có kích cỡ nằm trong khoảng từ 1 kDa đến 100 kDa.

29. Phương pháp theo điểm 17, trong đó polypeptit có hoạt tính sinh lý được chọn từ nhóm bao gồm peptit tương tự glucagon-1 (GLP-1), yếu tố kích thích tăng sinh bạch cầu hạt (G-CSF), hormon sinh trưởng của người (hGH), erythropoietin (EPO), glucagon, insulin, hormon giải phóng hormon sinh trưởng, peptit giải phóng hormon sinh trưởng, interferon, thụ thể interferon, thụ thể liên hợp với protein G, interleukin, thụ thể interleukin, enzym, protein gắn kết interleukin, protein gắn kết xytokin, yếu tố hoạt hóa đại thực bào, peptit đại thực bào, yếu tố tế bào B, yếu tố tế bào T, protein A, chất ức chế dị ứng, glycoprotein hoại tử tế bào, immunotoxin, lymphotoxin, yếu tố hoại tử khối u, chất kìm hãm khối u, yếu tố phát triển sự di căn, α -1 antitrypsin, albumin, α -lactalbumin,

apolipoprotein-E, erythropoietin được glycosyl hóa ở mức cao, angiopoietin, hemoglobin, thrombin, peptit hoạt hóa thụ thể thrombin, thrombomodulin, yếu tố đông máu VII, yếu tố đông máu VIIa, yếu tố đông máu VIII, yếu tố đông máu IX, yếu tố đông máu XIII, yếu tố hoạt hóa plasminogen, peptit gắn kết fibrin, urokinaza, streptokinaza, hirudin, protein C, protein phản ứng C, chất ức chế lenin, chất ức chế collagenaza, superoxit dismutaza, leptin, yếu tố sinh trưởng có nguồn gốc từ tiểu cầu, yếu tố sinh trưởng biểu mô, yếu tố sinh trưởng biểu bì, angiostatin, angiotensin, yếu tố sinh trưởng xương, protein kích thích tạo xương, calcitonin, atriopeptin, yếu tố tạo sụn, elcatonin, yếu tố hoạt hóa mô liên kết, chất ức chế quá trình của yếu tố mô, hormon kích thích nang, hormon tạo hoàng thể, hormon giải phóng hormon tạo hoàng thể, yếu tố sinh trưởng dây thần kinh, hormon tuyến cận giáp, relaxin, secretin, somatomedin, yếu tố sinh trưởng tương tự insulin, hormon vỏ tuyến thượng thận, cholecystokinin, polypeptit tuyến tụy, peptit giải phóng gastrin, yếu tố giải phóng corticotropin, hormon kích thích tuyến giáp, autotaxin, lactoferrin, myostatin, incretins, chất chủ vận đặc hiệu kép GLP-1/GIP, polypeptit ức chế dạ dày (GIP), chất chủ vận đặc hiệu đồng thời GLP-1/GIP/Glucagon, kháng nguyên bề mặt tế bào, kháng nguyên vacxin có nguồn gốc từ virus, kháng thể đơn dòng, kháng thể đa dòng, và mảnh kháng thể.

30. Phương pháp theo điểm 29, trong đó polypeptit có hoạt tính sinh lý là chất chủ vận đặc hiệu đồng thời GLP-1/GIP/Glucagon, glucagon, hoặc chất tương tự của chúng.

31. Phương pháp theo điểm 30, trong đó polypeptit có hoạt tính sinh lý chứa trình tự axit amin bất kỳ như nêu trong SEQ ID NO.1 đến SEQ ID NO.6.

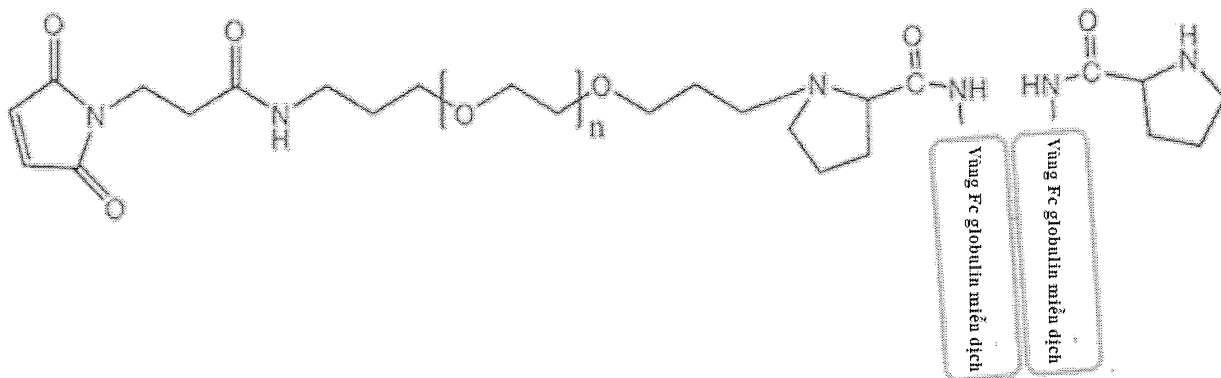
32. Phương pháp theo điểm 17, trong đó vùng Fc globulin miễn dịch có nguồn gốc từ IgG1, IgG2, IgG3, hoặc IgG4.

33. Thở tiếp hợp được chất tác dụng kéo dài được bào chế bằng phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 17 đến 32. 5

34. Thở tiếp hợp được chất tác dụng kéo dài được bào chế bằng cách cho chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 11 đến 16 phản ứng với polypeptit có hoạt tính sinh lý. 6

35. Chế phẩm bào chế thở tiếp hợp được chất tác dụng kéo dài hợp chất có công thức 2 hoặc chất đồng phân lập thể, solvat, hoặc muối được dụng của nó, trong đó được chất là polypeptit có hoạt tính sinh lý: 7

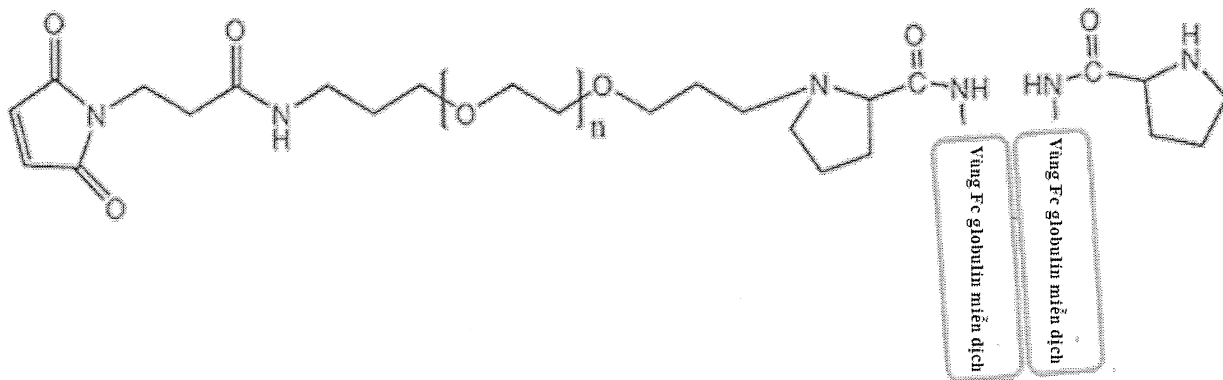
Công thức 2



trong đó trong công thức 2, n nằm trong khoảng từ 200 đến 250.

36. Phương pháp bào chế thể tiếp hợp tác dụng kéo dài của polypeptit có hoạt tính sinh lý, bao gồm bước bào chế thể tiếp hợp bằng cách liên kết hợp chất có công thức 2 hoặc chất đồng phân lập thể, solvat, hoặc muối được dụng của nó, với polypeptit có hoạt tính sinh lý:

Công thức 2



trong đó trong công thức 2, n nằm trong khoảng từ 200 đến 250.

37. Thể tiếp hợp được chất tác dụng kéo dài được bào chế bằng cách cho chế phẩm theo điểm 35 phản ứng với polypeptit có hoạt tính sinh lý.
38. Thể tiếp hợp được chất tác dụng kéo dài được bào chế bằng phương pháp theo điểm 36.

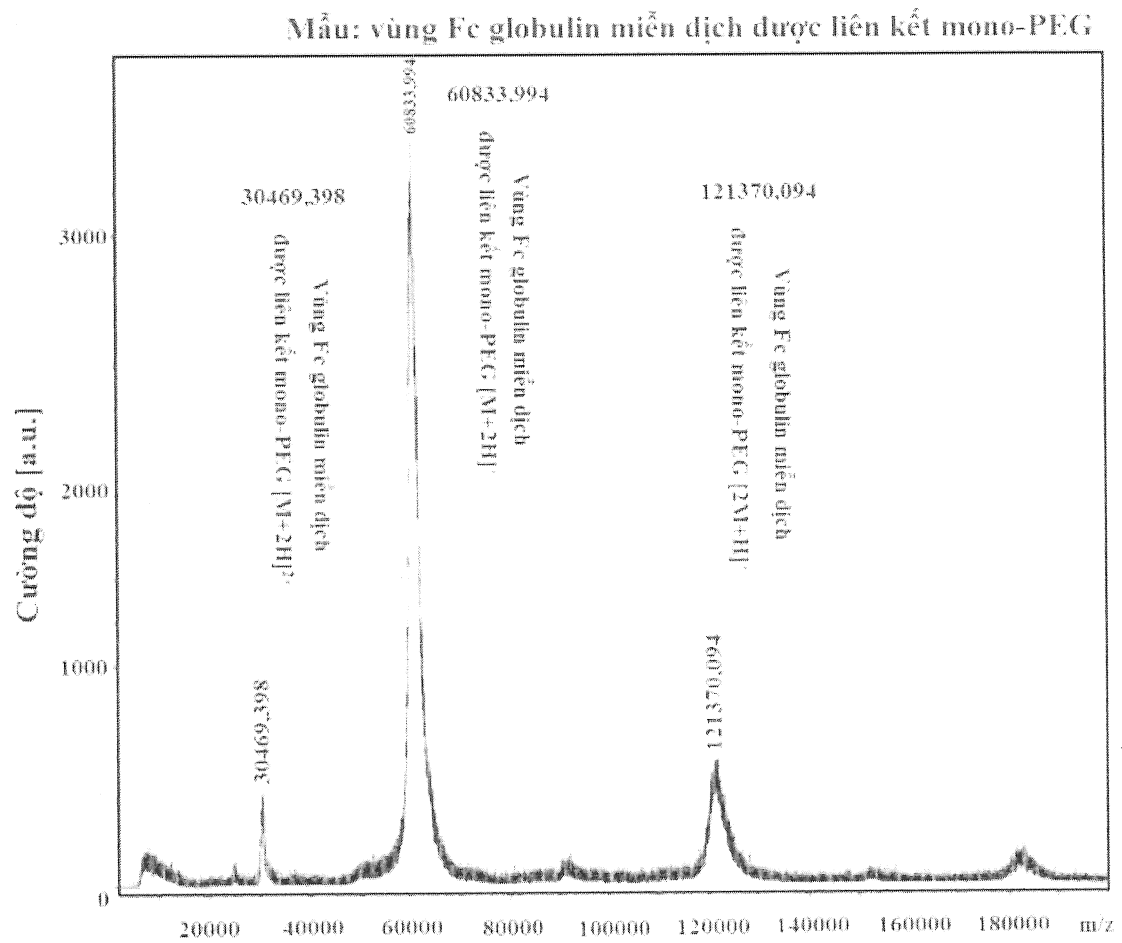


Fig.1

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> HANMI PHARM. CO., LTD.
 <120> HỢP CHẤT TRUNG GIAN ĐỂ BẢO CHẾ THỂ TIẾP HỢP DƯỢC CHẤT TẮC DỤNG KÉO DÀI VÀ CHẾ PHẨM BẢO CHẾ THỂ TIẾP HỢP DƯỢC CHẤT TẮC DỤNG KÉO DÀI CHỨA HỢP CHẤT NÀY
 <130> OPA19170
 <160> 10
 <170> KoPatentIn 3.0
 <210> 1
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Chất tương tự chất chủ vận đặc hiệu đồng thời GLP-1/GIP/Glucagon 1
 <220>
 <221> Biền thể
 <222> (2)
 <223> Xaa = axit aminoisobutyric
 <400> 1
 Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu
 1 5 10 15
 Lys Arg Ala Lys Glu Phe Val Gln Trp Leu Leu Asp His His Pro Ser
 20 25 30
 Ser Gly Gln Pro Pro Pro Ser Cys
 35 40
 <210> 2
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Chất tương tự chất chủ vận đặc hiệu đồng thời GLP-1/GIP/Glucagon 2
 <220>
 <221> Biền thể
 <222> (2)
 <223> Xaa = axit aminoisobutyric
 <400> 2
 Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu
 1 5 10 15
 Lys Arg Ala Lys Glu Phe Val Gln Trp Leu Leu Asp His His Cys Ser
 20 25 30
 Ser Gly Gln Pro Pro Pro Ser
 35
 <210> 3
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Chất tương tự chất chủ vận đặc hiệu đồng thời GLP-1/GIP/Glucagon 3
 <220>
 <221> Biền thể
 <222> (2)
 <223> Xaa = axit aminoisobutyric
 <400> 3
 His Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu
 1 5 10 15
 Lys Arg Ala Lys Glu Phe Val Gln Trp Leu Leu Asp His His Pro Ser
 20 25 30
 Ser Gly Gln Pro Pro Pro Ser Cys
 35 40
 <210> 4
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Chất tương tự glucagon 1
 <220>
 <221> Biền thể
 <222> (2)
 <223> Xaa = axit aminoisobutyric
 <400> 4
 Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu
 1 5 10 15
 Lys Arg Ala Lys Glu Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr Cys
 20 25 30
 <210> 5
 <211> 29

```

<212>      PRT
<213>      Trình tự nhân tạo
<220>
<223>      Chất tương tự glucagon 2
<220>
<221>      Biên thể
<222>      (2)
<223>      Xaa = axit aminoisobutyric
<400>      5
Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu
 1             5             10             15
Cys Arg Ala Lys Glu Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
          20             25

<210>      6
<211>      30
<212>      PRT
<213>      Trình tự nhân tạo
<220>
<223>      Chất tương tự glucagon 3
<220>
<221>      Biên thể
<222>      (2)
<223>      Xaa = axit aminoisobutyric
<400>      6
Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser
 1             5             10             15
Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr Cys
          20             25             30

<210>      7
<211>      12
<212>      PRT
<213>      Homo sapiens
<400>      7
Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro
 1             5             10

<210>      8
<211>      3
<212>      PRT
<213>      Trình tự nhân tạo
<220>
<223>      Biên thể của vùng bản lề
<400>      8
Ser Cys Pro
 1

<210>      9
<211>      4
<212>      PRT
<213>      Trình tự nhân tạo
<220>
<223>      Biên thể của vùng bản lề
<400>      9
Pro Ser Cys Pro
 1

<210>      10
<211>      221
<212>      PRT
<213>      Homo sapiens
<400>      10
Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
 1             5             10             15
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
          20             25             30
Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln
          35             40             45
Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
          50             55             60
Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
          65             70             75             80
Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
          85             90             95
Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
          100             105             110
Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
          115             120             125
Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
          130             135             140
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
          145             150             155             160
Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly

```

37734

				165					170					175		
Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	
			180					185					190			
Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	
		195					200					205				
His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Leu	Gly	Lys				
	210					215					220					