



(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)



1-0024058

(51)⁷ A61K 38/28; A61K 47/40; A61K 9/20; (13) B
A61K 47/34

(21) 1-2012-03128

(22) 04/04/2011

(86) PCT/KR2011/002331 04/04/2011

(87) WO2011/122921 06/10/2011

(30) 10-2010-0030575 02/04/2010 KR

(45) 25/06/2020 387

(43) 25/02/2013 299A

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

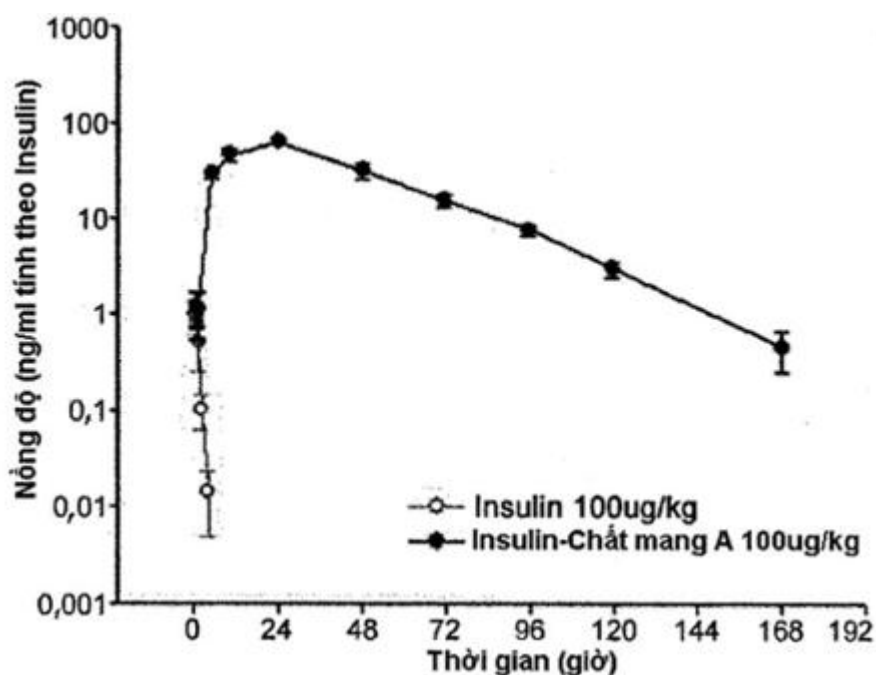
550, Dongtangiheung-ro, Dongtan-myeon, Hwaseong-si, Gyeonggi-do 445-813,
Republic of Korea

(72) SONG, Dae Hae (KR); SHIN, Jae Hee (KR); PARK, Young Jin (KR); IM, Dae
Seong (KR); BAE, Sung Min (KR); KWON, Se Chang (KR).

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

(54) THỂ TIẾP HỢP INSULIN, CHẾ PHẨM TÁC DỤNG Kéo Dài Chứa Thể Tiếp
Hợp và Phương pháp tạo ra thể tiếp hợp này

(57) Sáng chế đề cập đến thể tiếp hợp insulin có thời gian lưu in vivo và độ ổn định cải
thiện, được tạo ra bằng cách cho insulin liên kết cộng hóa trị với vùng Fc globulin miễn
dịch qua polyme không phải peptit, chế phẩm tác dụng kéo dài chứa thể tiếp hợp này, và
phương pháp tạo ra thể tiếp hợp này. Thể tiếp hợp insulin theo sáng chế duy trì hoạt tính in
vivo của peptit này ở mức độ tương đối cao và làm tăng đáng kể thời gian bán thải của nó
trong huyết thanh, từ đó cải thiện hiệu quả việc tuân thủ dùng thuốc khi điều trị bằng
insulin.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến thể tiếp hợp insulin có thời gian lưu *in vivo* và độ ổn định cải thiện, được tạo ra bằng cách cho insulin liên kết cộng hóa trị với vùng Fc globulin miễn dịch qua polyme không phải peptit, chế phẩm tác dụng kéo dài chứa thể tiếp hợp này, và phương pháp tạo ra thể tiếp hợp này. Thể tiếp hợp insulin theo sáng chế duy trì hoạt tính *in vivo* của peptit này ở mức độ tương đối cao và làm tăng đáng kể thời gian bán thải của nó trong huyết thanh, từ đó cải thiện hiệu quả việc tuân thủ dùng thuốc khi điều trị bằng insulin.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Insulin, một peptit được tiết bởi các tế bào beta của tuyến tụy, đóng vai trò trung tâm trong việc kiểm soát nồng độ glucoza máu trong cơ thể. Khi insulin không được tiết thích hợp hoặc insulin được tiết ra không tác động trong cơ thể, nồng độ glucoza máu không được điều hòa, và do đó làm xuất hiện bệnh đái tháo đường. Bệnh đái tháo đường này được gọi là bệnh đái tháo đường typ II. Bệnh đái tháo đường typ I xảy ra khi tuyến tụy không sản xuất đủ insulin gây ra tăng nồng độ glucoza máu.

Bệnh đái tháo đường typ II thường được điều trị bằng các chất tổng hợp hóa học thích hợp để dùng qua đường miệng nhằm làm giảm glucoza máu, và trong một số trường hợp, bệnh nhân được điều trị bằng insulin. Trong khi đó, bệnh đái tháo đường typ I cần được điều trị bằng insulin.

Phương pháp điều trị bằng insulin hiện được sử dụng là tiêm insulin trước/sau khi ăn. Tuy nhiên, việc tiêm insulin này cần được duy trì liên tục ba lần mỗi ngày, điều này gây ra đau hoặc khó chịu cho bệnh nhân. Có nhiều phương pháp khác nhau để khắc phục vấn đề này. Một trong các phương pháp như vậy là cấp thuốc peptit dạng hít qua đường miệng hoặc mũi bằng cách cải thiện tính thấm qua màng của nó. Không may là phương pháp này có hiệu quả phân phối rất thấp so với khi dùng chế phẩm để tiêm, và do đó rất khó duy trì hoạt tính *in vivo* của thuốc peptit ở mức cần thiết.

Trong khi đó, có phương pháp làm chậm hấp thu thuốc sau khi tiêm dưới da một lượng thuốc lớn, sao cho duy trì được nồng độ thuốc trong máu chỉ bằng một lần tiêm mỗi ngày. Một số thuốc đã qua giai đoạn nghiên cứu (Lantus, Sanofi-aventis) đã được phê chuẩn, và hiện được sử dụng cho bệnh nhân. Ngoài ra, các nghiên cứu khác đã được tiến hành để kéo dài thời gian tác động, dẫn đến sự phát triển Levemir (Novo Nordisk)

được bào chế bằng cách cải biến insulin với axit béo, trong đó tác động kéo dài này xảy ra nhờ việc tự liên kết của các phân tử insulin ở vị trí tiêm và nhờ gắn kết thuận nghịch với albumin trong máu. Tuy nhiên, các phương pháp này gây đau ở vị trí tiêm, và việc tiêm hằng ngày cũng gây khó chịu đáng kể cho bệnh nhân.

Nhiều nỗ lực đã được thực hiện để cải thiện độ ổn định trong huyết thanh của các thuốc peptit và duy trì thuốc trong máu ở nồng độ cao trong một khoảng thời gian kéo dài, từ đó tối đa hóa hiệu quả dược lý của các thuốc. Chế phẩm tác dụng kéo dài chứa các thuốc peptit này cần phải làm tăng được độ ổn định của các thuốc peptit và duy trì hàm lượng thuốc ở mức đủ cao mà không gây ra đáp ứng miễn dịch cho bệnh nhân. Để bào chế chế phẩm chứa các thuốc peptit tác dụng kéo dài, polyme có độ tan cao, chẳng hạn polyetylen glycol (PEG), thường được sử dụng để cải biến hóa học bề mặt của thuốc peptit.

PEG gắn kết không đặc hiệu với một vị trí cụ thể hoặc nhiều vị trí khác nhau trên peptit đích để giúp làm tăng khối lượng phân tử của peptit, và do đó ức chế quá trình thải bởi thận, và ngăn ngừa sự thủy phân, mà không gây ra tác dụng phụ bất kỳ. Ví dụ, WO 2006/076471 mô tả rằng peptit bài niệu natri typ B (B-type natriuretic peptide - BNP), gắn với NPR-A để hoạt hóa sự sản xuất GMP vòng và dẫn đến làm giảm huyết áp động mạch, và kết quả là, được sử dụng làm chất trị liệu suy tim sung huyết, được liên kết với PEG, từ đó duy trì được tác dụng sinh lý của nó. Patent Mỹ số 6,924,264 mô tả rằng PEG gắn với gốc lysin của exendin-4 làm tăng thời gian lưu *in vivo* của nó. Phương pháp này làm tăng trọng lượng phân tử của PEG, và do đó làm tăng thời gian lưu *in vivo* của thuốc peptit. Tuy nhiên, khi trọng lượng phân tử tăng, hàm lượng thuốc peptit bị giảm đáng kể, và khả năng phản ứng với peptit cũng giảm. Do đó, hiệu suất bị giảm một cách không mong muốn.

WO 02/46227 mô tả protein dung hợp được tạo ra bằng cách phối cặp GLP-1, một exendin-4, hoặc chất tương tự của nó với albumin huyết thanh người hoặc mảnh globulin miễn dịch (Fc) bằng cách sử dụng kỹ thuật tái tổ hợp di truyền. Patent Mỹ số 6,756,480 mô tả protein dung hợp Fc được tạo ra bằng cách phối cặp hormon tuyến cận giáp (parathyroid hormone - PTH) và chất tương tự của nó với vùng Fc. Các phương pháp này có thể khắc phục được các vấn đề như hiệu suất PEG hóa thấp và không đặc hiệu, nhưng chúng vẫn có nhược điểm là hiệu quả của việc làm tăng thời gian bán thải trong máu chưa đạt được mức mong đợi, và trong một số trường hợp, hàm lượng cũng thấp. Để tối đa hóa hiệu quả của việc làm tăng thời gian bán thải trong máu, nhiều loại cầu nối peptit khác nhau được sử dụng, nhưng có khả năng gây ra đáp ứng miễn dịch. Ngoài ra, nếu peptit chứa liên kết disulfua, chẳng hạn BNP, được sử dụng, có thể xảy ra

cuộn gấp sai với xác suất cao, và nếu peptit chứa các gốc axit amin không có trong tự nhiên được sử dụng, nó chỉ có thể được tạo ra bằng cách tái tổ hợp di truyền rất khó khăn.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề kỹ thuật

Về vấn đề này, các nghiên cứu chuyên sâu và cẩn thận về sự phát triển của phương pháp tối đa hóa đồng thời thời gian bán thải trong huyết thanh và hoạt tính *in vivo* của insulin đã được tiến hành để tạo ra sáng chế, kết quả đã phát hiện ra rằng vùng Fc globulin miễn dịch, polyme không phải peptit, và insulin được liên kết chọn lọc vị trí với nhau bằng liên kết cộng hóa trị, nhờ đó làm tăng đáng kể thời gian bán thải trong huyết thanh so với phương pháp dung hợp cùng khuôn đã biết.

Giải pháp kỹ thuật

Mục tiêu của sáng chế là đề xuất thể tiếp hợp insulin duy trì được hoạt tính *in vivo* của insulin và kéo dài đáng kể thời gian bán thải của nó trong huyết thanh, chế phẩm tác dụng kéo dài chứa thể tiếp hợp này, và phương pháp tạo ra nó.

Hiệu quả có lợi

Thể tiếp hợp insulin theo sáng chế duy trì được hoạt tính *in vivo* của peptit ở mức độ tương đối cao và làm tăng đáng kể thời gian bán thải của nó trong huyết thanh, nhờ đó cải thiện được hiệu quả việc tuân thủ dùng thuốc của bệnh nhân cần điều trị bằng insulin.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

FIG. 1 thể hiện kết quả phân tích được động học của thể tiếp hợp insulin-PEG-Fc globulin miễn dịch;

FIG. 2 thể hiện kết quả so sánh hiệu lực *in vivo* giữa thể tiếp hợp dẫn xuất insulin-PEG-Fc globulin miễn dịch; và

FIG. 3 thể hiện kết quả phân tích quá trình PEG hóa ở mức 90% hoặc lớn hơn ở phenylalanin (B1F) của chuỗi beta của thể tiếp hợp insulin-PEG-Fc globulin miễn dịch bằng cách sử dụng cột loại cỡ.

Các FIG. từ 4a đến 4c thể hiện kết quả phân tích gắn kết đặc hiệu chuỗi beta của thể tiếp hợp insulin-PEG-Fc globulin miễn dịch.

Mô tả chi tiết sáng chế

Theo một khía cạnh để đạt được các mục tiêu trên, sáng chế đề xuất thể tiếp hợp insulin được tạo ra bằng cách cho insulin liên kết với vùng Fc globulin miễn dịch qua polyme không phải peptit, trong đó polyme không phải peptit này được liên kết với đầu tận cùng amino của chuỗi beta của insulin.

Theo sáng chế, insulin là peptit do tuyến tụy tiết ra để phản ứng với nồng độ glucoza tăng trong máu để chuyển glucoza vào gan, cơ, hoặc mô mỡ và chuyển hóa nó thành glycogen, và để ngừng việc sử dụng chất béo làm nguồn năng lượng, và do đó có chức năng kiểm soát nồng độ glucoza máu. Peptit này bao gồm chất chủ vận, tiền chất, dẫn xuất, mảnh, và biến thể của nó, và tốt hơn là insulin nguyên thể, tác dụng nhanh, hoặc tác dụng kéo dài.

Insulin nguyên thể là hormon do tuyến tụy tiết ra để thúc đẩy hấp thu glucoza và ức chế phân hủy chất béo, và do đó có chức năng kiểm soát nồng độ glucoza máu. Insulin được tạo ra từ tiền chất có không có chức năng điều hòa nồng độ glucoza máu, được gọi là tiền insulin, qua quá trình chuyển hóa. Các trình tự axit amin của insulin như sau:

Chuỗi alpha:

Gly-Ile-Val-Glu-Gln-Cys-Cys-Thr-Ser-Ile-Cys-Ser-Leu-Tyr-Gln-Leu-Glu-Asn-Tyr-Cys-Asn (SEQ ID NO. 1)

Chuỗi beta:

Phe-Val-Asn-Gln-His-Leu-Cys-Gly-Ser-His-Leu-Val-Glu-Ala-Leu-Tyr-Leu-Val-Cys-Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Pro-Lys-Thr (SEQ ID NO. 2)

Chất chủ vận insulin là hợp chất gắn với thụ thể insulin để thể hiện hoạt tính sinh học tương tự như hoạt tính sinh học của insulin, mà không liên quan đến cấu trúc của insulin.

Dẫn xuất insulin là peptit có độ tương đồng trình tự axit amin bằng ít nhất 80% so với insulin nguyên thể, có thể có một số nhóm trên gốc axit amin được thể hóa học (ví dụ, alpha-metyl hóa, alpha-hydroxy hóa), được loại bỏ (ví dụ, loại amin), hoặc được cải biến (ví dụ, N-metyl hóa), và có chức năng điều hòa nồng độ glucoza máu trong cơ thể.

Mảnh insulin là mảnh có một hoặc nhiều axit amin được bổ sung hoặc loại bỏ ở đầu tận cùng N hoặc đầu tận cùng C của insulin nguyên thể, trong đó các axit amin không có trong tự nhiên (ví dụ, axit amin loại D) có thể được bổ sung, và có chức năng điều hòa

nồng độ glucoza máu trong cơ thể.

Biến thể insulin là peptit có một hoặc nhiều trình tự axit amin khác với trình tự axit amin của insulin nguyên thể, và có chức năng điều hòa nồng độ glucoza máu trong cơ thể.

Mỗi phương pháp điều chế chất chủ vận, dẫn xuất, mảnh, và biến thể của insulin có thể được sử dụng riêng rẽ hoặc kết hợp. Ví dụ, sáng chế này bao gồm peptit có một hoặc nhiều axit amin khác với axit amin của peptit nguyên thể và sự loại amin của gốc axit amin đầu tận cùng N, và có chức năng điều hòa nồng độ glucoza máu trong cơ thể.

Theo một phương án cụ thể, insulin được sử dụng theo sáng chế có thể được tạo ra bằng kỹ thuật tái tổ hợp, và cũng có thể được tổng hợp bằng cách sử dụng phương pháp tổng hợp pha rắn.

Ngoài ra, insulin được sử dụng theo sáng chế khác biệt ở chỗ polyme không phải peptit được liên kết với đầu tận cùng amino của chuỗi beta của insulin. Polyme không phải peptit này được sử dụng làm cầu nối trong sáng chế này. Việc cải biến ở chuỗi alpha của insulin dẫn đến làm giảm hoạt tính và độ an toàn. Do đó, theo sáng chế này, polyme không phải peptit làm cầu nối được liên kết với đầu tận cùng amino của chuỗi beta của insulin, sao cho duy trì được hoạt tính insulin và cải thiện độ an toàn.

Thuật ngữ “hoạt tính”, được sử dụng trong bản mô tả này, có nghĩa là khả năng gắn kết của insulin với thụ thể insulin, và có nghĩa là insulin thể hiện tác động của nó qua việc gắn kết với thụ thể insulin.

Việc gắn kết của polyme không phải peptit với đầu tận cùng amino của chuỗi beta của insulin có thể đạt được bằng cách kiểm soát độ pH, và tốt hơn là, độ pH nằm trong khoảng từ 4,5 đến 7,5.

Thuật ngữ “đầu tận cùng N”, được sử dụng trong bản mô tả này, có thể được sử dụng thay thế cho nhau với “vùng đầu N”.

Theo một ví dụ cụ thể, các tác giả sáng chế này đã tạo ra thể tiếp hợp insulin-PEG-Fc globulin miễn dịch bằng cách liên kết PEG với đầu tận cùng N của vùng Fc globulin miễn dịch, và ghép cặp chọn lọc đầu tận cùng N của chuỗi beta của insulin vào đó. Thời gian bán thải của thể tiếp hợp insulin-PEG-Fc globulin miễn dịch được tạo ra theo sáng chế trong huyết thanh tăng đáng kể đến xấp xỉ 18 giờ, và cho thấy tác dụng làm giảm glucoza máu ở mô hình động vật bị bệnh. Do đó, có thể tạo ra chế phẩm insulin tác dụng kéo dài mới duy trì được hoạt tính *in vivo* của insulin.

Vùng Fc globulin miễn dịch là an toàn để sử dụng làm chất mang thuốc bởi vì nó là polypeptit dễ phân huỷ sinh học được chuyển hóa *in vivo*. Ngoài ra, vùng Fc globulin

miễn dịch có trọng lượng phân tử tương đối thấp, so với toàn bộ phân tử globulin miễn dịch, và do đó, thuận lợi trong việc điều chế, tinh chế và thu thể tiếp hợp. Vùng Fc globulin miễn dịch không chứa mảnh Fab, là mảnh có tính không đồng nhất cao do có trình tự axit amin khác với các phân lớp kháng thể, và do đó, có thể mong muốn rằng vùng Fc globulin miễn dịch có thể làm tăng cao độ đồng nhất của các chất và làm giảm tính kháng nguyên.

Thuật ngữ “vùng Fc globulin miễn dịch”, được sử dụng trong bản mô tả này, chỉ protein chứa vùng ổn định của chuỗi nặng 2 (CH2) và vùng ổn định của chuỗi nặng 3 (CH3) của globulin miễn dịch, ngoại trừ các vùng biến đổi của chuỗi nặng và nhẹ, vùng ổn định của chuỗi nặng 1 (CH1) và vùng ổn định của chuỗi nhẹ 1 (CL1) của globulin miễn dịch. Vùng này có thể còn bao gồm vùng bản lề ở vùng ổn định của chuỗi nặng. Ngoài ra, vùng Fc globulin miễn dịch theo sáng chế có thể chứa một phần hoặc tất cả vùng Fc bao gồm vùng ổn định của chuỗi nặng 1 (CH1) và/hoặc vùng ổn định của chuỗi nhẹ 1 (CL1), ngoại trừ các vùng biến đổi của chuỗi nặng và nhẹ, miễn là nó có chức năng sinh lý học gần như tương tự hoặc tốt hơn so với protein nguyên thể. Ngoài ra, vùng này có thể là mảnh có sự mất đoạn ở phần dài tương đối của trình tự axit amin của CH2 và/hoặc CH3. Nghĩa là, vùng Fc globulin miễn dịch theo sáng chế có thể bao gồm 1) miền CH1, miền CH2, miền CH3 và miền CH4, 2) miền CH1 và miền CH2, 3) miền CH1 và miền CH3, 4) miền CH2 và miền CH3, 5) hỗn hợp một hoặc nhiều miền và vùng bản lề của globulin miễn dịch (hoặc một phần của vùng bản lề), và 6) dime của từng miền của các vùng ổn định của chuỗi nặng và vùng ổn định của chuỗi nhẹ.

Ngoài ra, vùng Fc globulin miễn dịch theo sáng chế bao gồm dẫn xuất trình tự (thể đột biến) của chúng cũng như trình tự axit amin nguyên thể. Dẫn xuất trình tự axit amin có trình tự khác so với trình tự axit amin nguyên thể do có sự mất đoạn, xen đoạn, thay thế bảo toàn hoặc không bảo toàn hoặc kết hợp các yếu tố này của một hoặc nhiều gốc axit amin. Ví dụ, trong IgG Fc, các gốc axit amin đã biết là có vai trò quan trọng trong việc gắn kết, ở các vị trí từ 214 đến 238, từ 297 đến 299, từ 318 đến 322, hoặc từ 327 đến 331, có thể được sử dụng làm đích thích hợp để cải biến. Ngoài ra, cũng có thể có các dẫn xuất khác nhau khác, như dẫn xuất có sự mất đoạn ở vùng có khả năng tạo thành liên kết disulfua, sự mất đoạn của một số gốc axit amin ở đầu tận cùng N của dạng Fc nguyên thể, hoặc sự bổ sung gốc metionin vào đầu tận cùng N của dạng Fc nguyên thể. Ngoài ra, để làm mất chức năng đáp ứng lại kích thích, thì sự mất đoạn có thể xảy ra ở vị trí gắn kết bổ thể, như vị trí gắn kết C1q và vị trí ADCC. Các kỹ thuật điều chế các dẫn xuất trình tự của vùng Fc globulin miễn dịch này đã được bộc lộ trong WO 97/34631 và WO 96/32478.

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

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

Các dẫn xuất Fc nêu trên là các dẫn xuất có hoạt tính sinh học giống như hoạt tính sinh học của vùng Fc của sáng chế này hoặc có độ ổn định cấu trúc tăng, ví dụ, kháng nhiệt, độ pH, hoặc các điều kiện tương tự.

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

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

Ngoài ra, vùng Fc globulin miễn dịch theo sáng chế này có thể ở dạng có các chuỗi đường nguyên thể, các chuỗi đường kéo dài so với dạng nguyên thể hoặc các chuỗi đường rút ngắn so với dạng nguyên thể, hoặc có thể ở dạng loại glycosyl. Việc kéo dài, rút ngắn hoặc loại bỏ các chuỗi đường Fc globulin miễn dịch có thể thực hiện được bằng các phương pháp thông thường trong lĩnh vực, như phương pháp hóa học, phương pháp enzym và phương pháp dùng kỹ thuật di truyền bằng cách sử dụng vi sinh vật. Việc loại bỏ các chuỗi đường khỏi vùng Fc dẫn đến sự giảm rõ rệt ái lực gắn kết với bề mặt (c1q) và giảm hoặc mất tính độc qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể hoặc tính độc tế bào phụ thuộc bề mặt, từ đó không gây ra đáp ứng miễn dịch không cần thiết trên in-vivo. Về vấn đề này, vùng Fc globulin miễn dịch ở dạng loại glycosyl hoặc không glycosyl hóa có thể thích hợp làm chất mang thuốc hơn đối với mục tiêu của sáng chế này.

Thuật ngữ "loại glycosyl" được sử dụng trong bản mô tả này có nghĩa là việc loại

bỏ bằng enzym các gốc đường khỏi vùng Fc, và thuật ngữ "không glycosyl hóa" có nghĩa là vùng Fc được tạo ra ở dạng không được glycosyl hóa bằng sinh vật chưa có nhân điển hình, tốt hơn là *E. coli*.

Ngoài ra, vùng Fc globulin miễn dịch có thể là vùng Fc có nguồn gốc từ IgG, IgA, IgD, IgE và IgM, hoặc được tạo ra nhờ sự kết hợp của chúng hoặc các thể lai của chúng. Tốt hơn là, vùng này có nguồn gốc từ IgG hoặc IgM, là một trong số các protein có nhiều nhất trong máu người, và tốt nhất là từ IgG, đã được biết là làm tăng thời gian bán thải của các protein gắn kết phối tử.

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

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

Mặt khác, IgG được phân chia thành các phân lớp IgG1, IgG2, IgG3 và IgG4, và sáng chế này bao gồm các kết hợp hoặc các thể lai của chúng. Ưu tiên phân lớp IgG2 và IgG4, và ưu tiên hơn là vùng Fc của IgG4 có rất ít chức năng đáp ứng lại kích thích như CDC (complement dependent cytotoxicity - tính độc tế bào phụ thuộc bổ thể).

Để làm chất mang thuốc theo sáng chế, vùng Fc globulin miễn dịch được ưu tiên nhất là vùng Fc không glycosyl hóa có nguồn gốc từ IgG4 của người. Vùng Fc có nguồn gốc từ người có thể được ưu tiên hơn so với vùng Fc có nguồn gốc không phải từ người, vùng này có thể tác động như là kháng nguyên trong cơ thể người và gây ra đáp ứng miễn dịch không mong muốn như tạo ra kháng thể mới kháng lại kháng nguyên.

Thuật ngữ "polyme không phải peptit", được sử dụng trong bản mô tả này, chỉ polyme có thể tương hợp sinh học chứa hai hoặc nhiều đơn vị lặp lại được liên kết với nhau bằng liên kết cộng hóa trị bất kỳ ngoại trừ liên kết peptit.

Polyme không phải peptit có thể được sử dụng trong sáng chế này có thể được chọn từ nhóm gồm polyetylen glycol, polypropylen glycol, copolyme của etylen glycol

và propylen glycol, rượu polyhydric được polyoxyetyl hóa, rượu polyvinyllic, polysacarit, dextran, ete polyvinyl etyl, polyme dễ phân hủy sinh học, chẳng hạn PLA (poly(axit lactic)) và PLGA (axit polylactic-glycolic), polyme lipit, chitin, axit hyaluronic, và hỗn hợp của chúng, và tốt hơn là, polyetylen glycol. Các dẫn xuất của chúng đã được biết trong lĩnh vực và được chuyên gia trong lĩnh vực điều chế dễ dàng cũng được bao gồm trong phạm vi của sáng chế này.

Cầu nối peptit được sử dụng trong protein dung hợp thu được bằng phương pháp dung hợp cùng khuôn thông thường có hạn chế là nó dễ dàng bị tách trên *in vivo* bằng enzym phân giải protein, và do đó không thể đạt được hiệu quả tăng thời gian bán thải của hoạt chất trong huyết thanh một cách đầy đủ bằng chất mang như mong đợi. Tuy nhiên, trong sáng chế này, polyme có tính kháng với enzym phân giải protein có thể được sử dụng để duy trì thời gian bán thải của peptit trong huyết thanh tương tự như với chất mang. Do đó, polyme không phải peptit bất kỳ có thể được sử dụng mà không có giới hạn bất kỳ, chỉ cần nó là polyme có chức năng nêu trên, cụ thể là polyme có tính kháng enzym phân giải protein trên *in-vivo*. Polyme không phải peptit có trọng lượng phân tử nằm trong khoảng từ 1 đến 100 kDa, và tốt hơn là từ 1 đến 20 kDa. Polyme không phải peptit theo sáng chế này, được liên kết với vùng Fc globulin miễn dịch, có thể là một polyme hoặc hỗn hợp của các loại polyme khác nhau.

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

Polyme không phải peptit này có nhóm phản ứng ở cả hai đầu, tốt hơn là được chọn từ nhóm gồm nhóm aldehyt phản ứng, nhóm propionaldehyt, nhóm butyraldehyt, nhóm maleimit và dẫn xuất suxinimit. Dẫn xuất suxinimit có thể là suxinimidyl propionat, hydroxy suxinimidyl, suxinimidyl carboxymetyl, hoặc suxinimidyl cacbonat. Đặc biệt là khi polyme không phải peptit có nhóm aldehyt phản ứng ở cả hai đầu của chúng, nó có hiệu quả trong việc liên kết ở cả hai đầu với polypeptit có hoạt tính sinh lý và globulin miễn dịch bằng các phản ứng không đặc hiệu tối thiểu. Sản phẩm cuối cùng được tạo ra bằng cách alkyl hóa khử bằng liên kết aldehyt là ổn định hơn nhiều so với khi được liên kết bằng liên kết amit. Nhóm phản ứng aldehyt gắn kết chọn lọc với đầu tận cùng N ở độ pH thấp, và gắn với gốc lysin để tạo thành liên kết cộng hóa trị ở độ pH cao, như độ pH=9,0.

Các nhóm phản ứng ở cả hai đầu của polyme không phải peptit có thể giống nhau hoặc khác nhau. Ví dụ, polyme không phải peptit có thể có nhóm maleimit ở một đầu và ở đầu kia là nhóm aldehyt, nhóm propionaldehyt hoặc nhóm butyraldehyt. Khi polyetylen glycol có nhóm hydroxy phản ứng ở cả hai đầu của nó được sử dụng làm polyme không

phải peptit, thì nhóm hydroxy này có thể được hoạt hóa thành các nhóm phản ứng khác nhau bằng các phản ứng hóa học đã biết, hoặc polyetylen glycol có nhóm phản ứng cải biến có trên thị trường có thể được sử dụng để tạo ra thể tiếp hợp protein theo sáng chế này.

Theo một khía cạnh khác của sáng chế, sáng chế đề xuất chế phẩm insulin tác dụng kéo dài chứa thể tiếp hợp insulin theo sáng chế.

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

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

Ví dụ về chất mang, tá dược, và chất pha loãng thích hợp đối với chế phẩm này bao gồm lactoza, đextroza, sucroza, sorbitol, manitol, xylitol, erythritol, maltitol, tinh bột, gôm cây keo, alginat, gelatin, canxi phosphat, canxi silicat, xenluloza, metylxenluloza,

xenluloza vi tinh thể, polyvinylpyrrolidon, nước, metylhydroxybenzoat, propylhydroxybenzoat, talc, magie stearat và dầu khoáng. Ngoài ra, chế phẩm này có thể còn bao gồm chất độn, chất chống kết tụ, chất làm trơn chảy, chất giữ ẩm, chất tạo hương, và chất kháng khuẩn.

Chế phẩm tác dụng kéo dài theo sáng chế này có thể được xác định bởi một số các yếu tố liên quan bao gồm loại bệnh cần điều trị, đường dùng, tuổi, giới tính, thể trọng của bệnh nhân và mức độ nghiêm trọng của bệnh, cũng như bởi loại hoạt chất thuốc. Do chế phẩm theo sáng chế này có thời gian lưu in-vivo và hàm lượng cao, nên nó có thể làm giảm đáng kể tần suất và liều lượng dùng các thuốc theo sáng chế.

Chế phẩm tác dụng kéo dài theo sáng chế duy trì thời gian lưu *in vivo* và độ ổn định của insulin ở mức rất cao, và do đó được sử dụng hiệu quả để điều trị bệnh đái tháo đường phụ thuộc insulin.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất phương pháp tạo ra thể tiếp hợp insulin, bao gồm các bước:

(1) cho polyme không phải peptit có nhóm phản ứng aldehyt, maleimit, hoặc dẫn xuất suxinimit ở mỗi đầu của nó, liên kết cộng hóa trị với nhóm amin hoặc nhóm thiol của vùng Fc globulin miễn dịch;

(2) phân tách thể tiếp hợp khỏi hỗn hợp phản ứng (1), trong đó thể tiếp hợp này chứa vùng Fc globulin miễn dịch được liên kết cộng hóa trị với polyme không phải peptit; và

(3) cho insulin liên kết cộng hóa trị với đầu kia của polyme không phải peptit của thể tiếp hợp phân tách được để tạo ra thể tiếp hợp peptit chứa vùng Fc globulin miễn dịch và insulin, được liên kết với mỗi đầu của polyme không phải peptit.

Tốt hơn là, polyme không phải peptit ở bước (1) có dẫn xuất aldehyt phản ứng, và tốt hơn nữa là, ba nhóm aldehyt phản ứng ở đầu của nó.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất phương pháp tạo ra thể tiếp hợp insulin, bao gồm các bước:

(1) cho polyme không phải peptit có nhóm phản ứng aldehyt ở mỗi đầu của nó liên kết cộng hóa trị với đầu tận cùng N của Fc globulin miễn dịch ở độ pH=6,0;

(2) phân tách thể tiếp hợp khỏi hỗn hợp phản ứng (1), trong đó thể tiếp hợp này chứa vùng Fc globulin miễn dịch được liên kết cộng hóa trị với polyme không phải peptit ở đầu tận cùng N của nó; và

(3) cho insulin liên kết cộng hóa trị với đầu kia của polyme không phải peptit của

thể tiếp hợp phân tách được để tạo ra thể tiếp hợp peptit chứa vùng Fc globulin miễn dịch và insulin, được liên kết với mỗi đầu của polyme không phải peptit.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất phương pháp tạo ra thể tiếp hợp insulin, bao gồm các bước:

(1) cho polyme không phải peptit có nhóm phản ứng aldehyt, maleimit, hoặc dẫn xuất succinimit ở mỗi đầu của nó, liên kết cộng hóa trị với nhóm amin hoặc nhóm thiol của insulin;

(2) phân tách thể tiếp hợp khỏi hỗn hợp phản ứng (1), trong đó thể tiếp hợp này chứa insulin được liên kết cộng hóa trị với polyme không phải peptit; và

(3) cho vùng Fc globulin miễn dịch liên kết cộng hóa trị với đầu kia của polyme không phải peptit của thể tiếp hợp phân tách được để tạo ra thể tiếp hợp peptit chứa vùng Fc globulin miễn dịch và insulin, được liên kết với mỗi đầu của polyme không phải peptit.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất phương pháp tạo ra thể tiếp hợp insulin, bao gồm các bước:

(1) cho polyme không phải peptit có nhóm phản ứng aldehyt ở mỗi đầu của nó liên kết cộng hóa trị với nhóm amin của insulin;

(2) phân tách thể tiếp hợp khỏi hỗn hợp phản ứng (1), trong đó thể tiếp hợp này chứa insulin được liên kết cộng hóa trị với polyme không phải peptit; và

(3) cho vùng Fc globulin miễn dịch liên kết cộng hóa trị với đầu kia của polyme không phải peptit của thể tiếp hợp phân tách được để tạo ra thể tiếp hợp peptit chứa vùng Fc globulin miễn dịch và insulin, được liên kết với mỗi đầu của polyme không phải peptit.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế mô tả phương pháp điều trị cho đối tượng bị rối loạn thiếu hụt insulin, bao gồm bước cho đối tượng này dùng lượng hữu hiệu chế phẩm tác dụng kéo dài. Tốt hơn là, rối loạn thiếu hụt insulin là bệnh đái tháo đường.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, đối tượng có thể là động vật có vú, ví dụ, người, động vật linh trưởng không phải người, ngựa, cừu, mèo, chó, bò hoặc lợn.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế có thể được hiểu rõ hơn qua các ví dụ dưới đây, các ví dụ này được dùng để minh họa chứ không được coi là giới hạn sáng chế này.

Ví dụ 1. Tinh chế vùng Fc globulin miễn dịch được PEG hóa

Để PEG hóa Fc globulin miễn dịch ở đầu tận cùng N của nó, 5K PropionALD(3) PEG (PEG có ba nhóm propylaldehyt, NOF, Japan) được sử dụng để tiến hành PEG hóa bằng cách cho Fc globulin miễn dịch phản ứng với PEG ở nhiệt độ 4°C trong 4,5 giờ và ở tỷ lệ mol bằng 1:2, với nồng độ Fc globulin miễn dịch bằng 10 mg/ml. Lúc này, phản ứng được thực hiện trong dung dịch đệm kali phosphat 100 mM ở độ pH=6,0, và bổ sung vào đó SCB 20 mM (NaCNBH₃) làm chất khử. Tinh chế Fc globulin miễn dịch được PEG hóa một lần từ dung dịch phản ứng bằng cách sử dụng cột Source 15Q (GE Healthcare).

Ví dụ 2. Tạo thể tiếp hợp insulin-PEG-Fc globulin miễn dịch

Để tạo ra thể tiếp hợp insulin-PEG-Fc globulin miễn dịch có mức độ PEG hóa 90% hoặc lớn hơn ở phenylalanin (B1F) của chuỗi beta của insulin, cho Fc globulin miễn dịch được PEG hóa một lần thu được trong ví dụ 1 phản ứng với insulin ở tỷ lệ mol bằng 4:1 và ở nhiệt độ 4°C trong 20 giờ, với tổng nồng độ protein bằng 20 mg/ml. Lúc này, phản ứng được thực hiện trong dung dịch đệm kali phosphat 100 mM ở độ pH=6,0, và bổ sung vào đó SCB 20 mM làm chất khử. Sau khi phản ứng kết thúc, dung dịch phản ứng được đem tinh chế sơ bộ bằng cách sử dụng cột Source 15Q. Sau đó, tinh chế lần hai được thực hiện bằng cách sử dụng cột Source 15ISO để thu được thể tiếp hợp insulin-PEG-Fc globulin miễn dịch. Cột loại cỡ được sử dụng để phân tích mức độ PEG hóa 90% hoặc lớn hơn ở B1F của thể tiếp hợp insulin-PEG-Fc globulin miễn dịch thu được, và kết quả được thể hiện trên FIG. 3.

Ví dụ 3. Tạo thể tiếp hợp Insulin lispro (Humalog®)-PEG-Fc globulin miễn dịch

Cho Fc globulin miễn dịch được PEG hóa một lần thu được trong ví dụ 1 và insulin lispro phản ứng ở tỷ lệ mol bằng 4:1 và ở nhiệt độ 4°C trong 20 giờ, với tổng nồng độ protein bằng 20 mg/ml. Lúc này, phản ứng được thực hiện trong dung dịch đệm kali phosphat 100 mM ở độ pH=6,0, và bổ sung vào đó SCB 20 mM làm chất khử. Sau khi phản ứng kết thúc, tiến hành tinh chế theo cách giống như trong ví dụ 2.

Ví dụ 4. Tạo thể tiếp hợp Insulin glargine (Lantus®)-PEG-Fc globulin miễn dịch

Cho Fc globulin miễn dịch được PEG hóa một lần thu được trong ví dụ 1 và

insulin glargine phản ứng ở tỷ lệ mol bằng 4:1 và ở nhiệt độ 4°C trong 20 giờ, với tổng nồng độ protein bằng 20 mg/ml. Lúc này, phản ứng được thực hiện trong dung dịch đệm kali phosphat 100 mM ở độ pH=6,0, và bổ sung vào đó SCB 20 mM làm chất khử. Sau khi phản ứng kết thúc, tiến hành tinh chế theo cách giống như trong ví dụ 2.

Ví dụ 5. Tạo thể tiếp hợp Insulin detemir (Levemir®)-PEG-Fc globulin miễn dịch

Cho Fc globulin miễn dịch được PEG hóa một lần thu được trong ví dụ 1 và insulin detemir phản ứng ở tỷ lệ mol bằng 4:1 và ở nhiệt độ 4°C trong 20 giờ, với tổng nồng độ protein bằng 20 mg/ml. Lúc này, phản ứng được thực hiện trong dung dịch đệm kali phosphat 100 mM ở độ pH=6,0, và bổ sung vào đó SCB 20 mM làm chất khử. Sau khi phản ứng kết thúc, tiến hành tinh chế theo cách giống như trong ví dụ 2.

Ví dụ 6. Đánh giá thời gian bán thải *in vivo* của thể tiếp hợp insulin tác dụng kéo dài

Để phân tích thời gian lưu *in vivo* của thể tiếp hợp insulin tác dụng kéo dài, sử dụng chuột SD đực bình thường để tiến hành phân tích dược động học. Chuột SD đực bình thường được tiêm dưới da insulin nguyên thể và thể tiếp hợp insulin tác dụng kéo dài ở liều 100 µg/kg (tính theo insulin) một lần, và sau đó đánh giá các thay đổi về nồng độ huyết thanh theo thời gian bằng cách sử dụng bộ kit ELISA, và tính các thông số dược động học từ các giá trị đo được bằng phần mềm Winnolin 5.2. Thời gian bán thải *in vivo* của thể tiếp hợp insulin tác dụng kéo dài là 17,67 giờ, dài hơn khoảng 30 lần so với thời gian bán thải của insulin nguyên thể là 0,58 giờ (FIG. 1).

Ví dụ 7. Thử nghiệm về hiệu lực *in vivo* của thể tiếp hợp của dẫn xuất insulin

Để so sánh hiệu lực *in vivo* giữa các thể tiếp hợp của dẫn xuất insulin, sử dụng chuột bị bệnh đái tháo đường do streptozotocin gây ra để phân tích tác dụng làm giảm glucoza máu. Chuột bình thường bị bỏ đói trong 16 giờ, và tiêm trong màng bụng streptozotocin trong dung dịch đệm axit xitric 10 mM (pH=4,5) ở liều 60 mg/kg để gây ra bệnh đái tháo đường. Khi nồng độ glucoza máu của chuột đạt tới 500 mg/dL hoặc cao hơn, tiêm dưới da cho chuột thể tiếp hợp insulin, thể tiếp hợp insulin detemir, hoặc thể tiếp hợp insulin lispro ở liều 0,5 mg/kg một lần, và sau đó so sánh tác dụng làm giảm glucoza máu. Tác dụng làm giảm glucoza máu của thể tiếp hợp insulin và thể tiếp hợp insulin lispro được duy trì trong khoảng 4 ngày sau khi tiêm, và 5 ngày sau khi tiêm, nồng độ glucoza máu tăng lên. Thể tiếp hợp insulin detemir cũng cho thấy tác dụng làm giảm glucoza máu, nhưng tác dụng này kém hơn so với tác dụng của thể tiếp hợp insulin hoặc thể tiếp hợp insulin lispro ở liều tương đương (FIG. 2).

Ví dụ 8. Xác định vị trí gắn kết của thể tiếp hợp Insulin-5 K PEG-Fc globulin miễn dịch

Để xác định vị trí gắn kết của insulin với 5 K PEG-Fc globulin, tiến hành lập bản đồ Glu-C. Bổ sung 20 µg endoproteinaza Glu-C (1 mg/ml) vào 100 µg insulin-5 K PEG-Fc globulin miễn dịch (1 mg/ml). Dung dịch phản ứng là HEPES 50 mM ở độ pH=7,5, và cho hỗn hợp này phản ứng ở nhiệt độ 25°C trong 8 giờ. Sau đó, bổ sung 10 µl HCL 1 N để kết thúc phản ứng. Việc lập bản đồ được thực hiện bởi sắc ký HPLC pha đảo. Các kết quả cho thấy sự thay đổi của pic ở đầu tận cùng N của chuỗi beta của insulin, chứng tỏ rằng 5 K PEG-Fc globulin miễn dịch gắn với đầu tận cùng N của chuỗi beta của insulin (FIGs. 4a-c).

Cột: Jupiter C18 4,6x250mm, 5 µm □ Phenomenex □

Pha động A: 20% NaSO₄ 0,1 M (pH=2,0), 10% CAN

Pha động B: 20% NaSO₄ 0,1 M (pH=2,0), 40% CAN

Gradient 0%B trong 10 phút > 0-10%B trong 5 phút > 10-70%B trong 60 phút

Yêu cầu bảo hộ

1. Thở tiếp hợp insulin được tạo ra bằng cách cho insulin liên kết với vùng Fc globulin miễn dịch qua polyetylen glycol trong đó polyetylen glycol này được liên kết với đầu tận cùng amino của chuỗi beta của insulin.
2. Thở tiếp hợp insulin theo điểm 1, trong đó insulin này là insulin nguyên thể, insulin lispro, insulin detemir hoặc insulin glargine.
3. Thở tiếp hợp insulin theo điểm 1, trong đó một đầu của polyetylen glycol được liên kết với nhóm amin của đầu tận cùng amino của chuỗi beta của insulin, và đầu kia của polyetylen glycol được liên kết với nhóm amin hoặc nhóm thiol của vùng Fc globulin miễn dịch.
4. Thở tiếp hợp insulin theo điểm 1, trong đó vùng Fc globulin miễn dịch là không được glycosyl hóa.
5. Thở tiếp hợp insulin theo điểm 1, trong đó vùng Fc globulin miễn dịch được cấu thành từ một đến bốn miền được chọn từ nhóm gồm các miền CH1, CH2, CH3 và CH4.
6. Thở tiếp hợp insulin theo điểm 5, trong đó vùng Fc globulin miễn dịch còn bao gồm vùng bản lề.
7. Thở tiếp hợp insulin theo điểm 1, trong đó vùng Fc globulin miễn dịch là vùng Fc có nguồn gốc từ IgG, IgA, IgD, IgE, hoặc IgM.
8. Thở tiếp hợp insulin theo điểm 7, trong đó mỗi miền của vùng Fc globulin miễn dịch là miền lai có nguồn gốc khác từ globulin miễn dịch được chọn từ nhóm bao gồm IgG, IgA, IgD, IgE, và IgM.
9. Thở tiếp hợp insulin theo điểm 7, trong đó vùng Fc globulin miễn dịch là đime hoặc multime được cấu thành từ globulin miễn dịch chuỗi đơn có cùng nguồn gốc.
10. Thở tiếp hợp insulin theo điểm 7, trong đó vùng Fc globulin miễn dịch là vùng Fc

IgG4.

11. Thể tiếp hợp insulin theo điểm 10, trong đó vùng Fc globulin miễn dịch là vùng Fc IgG4 không glycosyl hóa của người.

12. Thể tiếp hợp insulin theo điểm 1, trong đó nhóm phản ứng của polyetylen glycol được chọn từ nhóm gồm nhóm aldehyt, nhóm propionaldehyt, nhóm butyraldehyt, nhóm maleimit, và dẫn xuất succinimit.

13. Thể tiếp hợp insulin theo điểm 12, trong đó dẫn xuất succinimit là succinimidyl propionat, succinimidyl carboxymetyl, hydroxy succinimidyl, hoặc succinimidyl cacbonat.

14. Thể tiếp hợp insulin theo điểm 12, trong đó polyetylen glycol có nhóm aldehyt phản ứng ở cả hai đầu.

15. Chế phẩm insulin tác dụng kéo dài có thời gian lưu *in vivo* và độ ổn định cải thiện, chứa thể tiếp hợp insulin theo điểm bất kì trong số các điểm từ 1 đến 14.

16. Phương pháp tạo ra thể tiếp hợp insulin theo điểm 1, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

- (1) cho polyetylen glycol có nhóm phản ứng là aldehyt, maleimit, hoặc dẫn xuất succinimit ở mỗi đầu của nó liên kết cộng hóa trị với nhóm amin hoặc nhóm thiol của vùng Fc globulin miễn dịch;
- (2) phân tách thể tiếp hợp khỏi hỗn hợp phản ứng (1), trong đó thể tiếp hợp này chứa vùng Fc globulin miễn dịch được liên kết cộng hóa trị với polyetylen glycol; và
- (3) cho insulin liên kết cộng hóa trị với đầu kia của polyetylen glycol của thể tiếp hợp đã được phân tách để tạo ra thể tiếp hợp peptit chứa vùng Fc globulin miễn dịch và insulin được liên kết với mỗi đầu của polyetylen glycol.

17. Phương pháp theo điểm 16, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

- (1) cho polyetylen glycol có nhóm phản ứng aldehyt ở mỗi đầu của nó liên kết cộng hóa trị với đầu tận cùng N của Fc globulin miễn dịch ở độ pH bằng 6,0;
- (2) phân tách thể tiếp hợp khỏi hỗn hợp phản ứng (1), trong đó thể tiếp hợp này chứa vùng Fc globulin miễn dịch được liên kết cộng hóa trị với polyetylen glycol

ở đầu tận cùng N của nó; và

(3) cho insulin liên kết cộng hóa trị với đầu kia của polyetylen glycol của thể tiếp hợp đã được phân tách để tạo ra thể tiếp hợp peptit chứa vùng Fc globulin miễn dịch và insulin được liên kết với mỗi đầu của polyetylen glycol.

18. Phương pháp tạo ra thể tiếp hợp insulin theo điểm 1, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

(1) cho polyetylen glycol có nhóm phản ứng là aldehyt, maleimit, hoặc dẫn xuất succinimit ở mỗi đầu của nó liên kết cộng hóa trị với nhóm amin hoặc nhóm thiol của insulin;

(2) phân tách thể tiếp hợp ra khỏi hỗn hợp phản ứng (1), trong đó thể tiếp hợp này chứa insulin được liên kết cộng hóa trị với polyetylen glycol; và

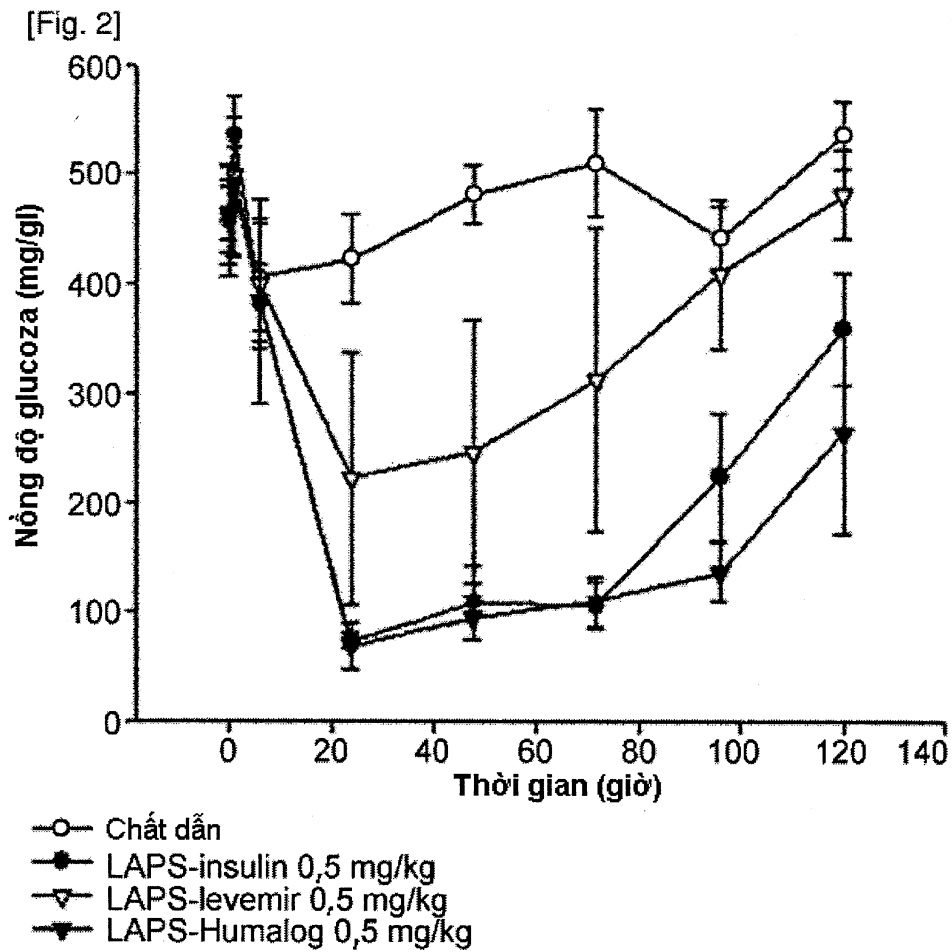
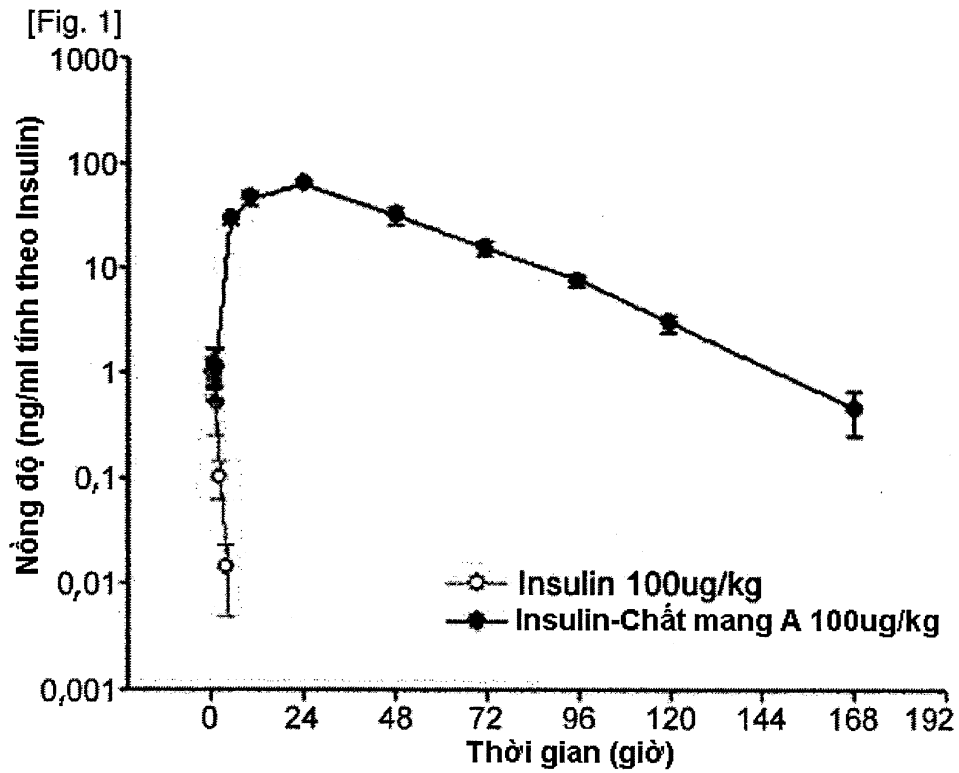
(3) cho vùng Fc globulin miễn dịch liên kết cộng hóa trị với đầu kia của polyetylen glycol của thể tiếp hợp đã được phân tách để tạo ra thể tiếp hợp peptit có vùng Fc globulin miễn dịch và insulin được liên kết với mỗi đầu của polyetylen glycol.

19. Phương pháp theo điểm 18, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

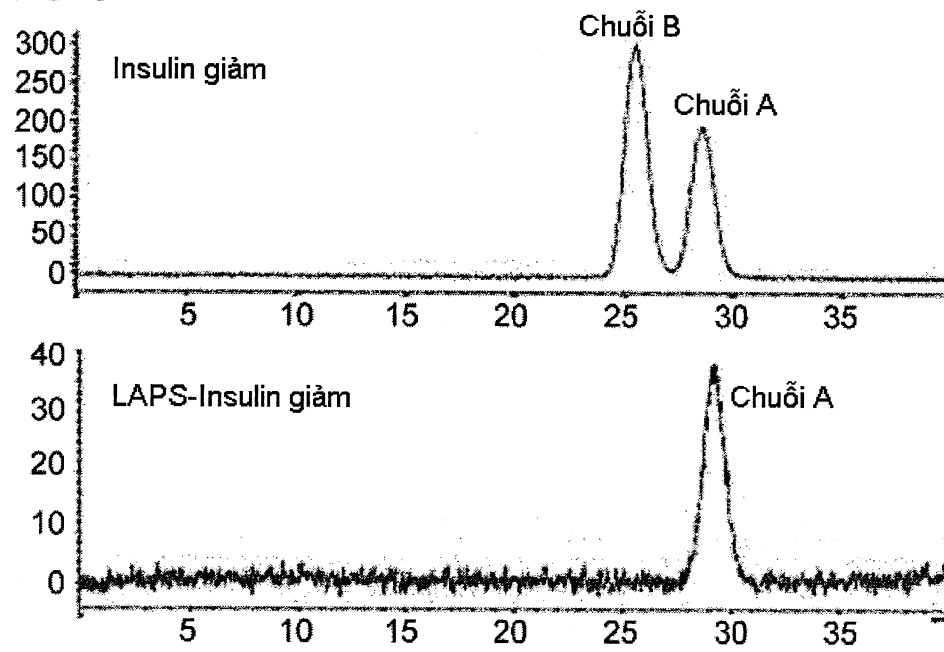
(1) cho polyetylen glycol có nhóm phản ứng aldehyt ở mỗi đầu của nó liên kết cộng hóa trị với nhóm amin của insulin;

(2) phân tách thể tiếp hợp ra khỏi hỗn hợp phản ứng (1), trong đó thể tiếp hợp này chứa insulin được liên kết cộng hóa trị với polyetylen glycol; và

(3) cho vùng Fc globulin miễn dịch liên kết cộng hóa trị với đầu kia của polyetylen glycol của thể tiếp hợp đã được phân tách để tạo ra thể tiếp hợp peptit chứa vùng Fc globulin miễn dịch và insulin được liên kết với mỗi đầu của polyetylen glycol.

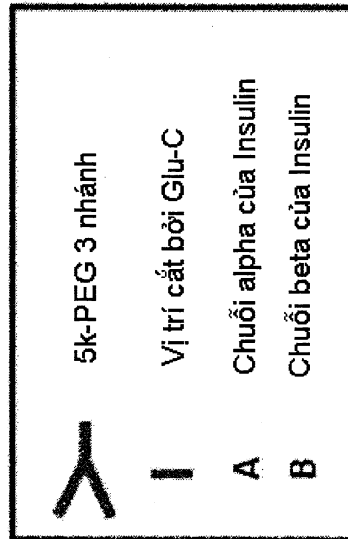
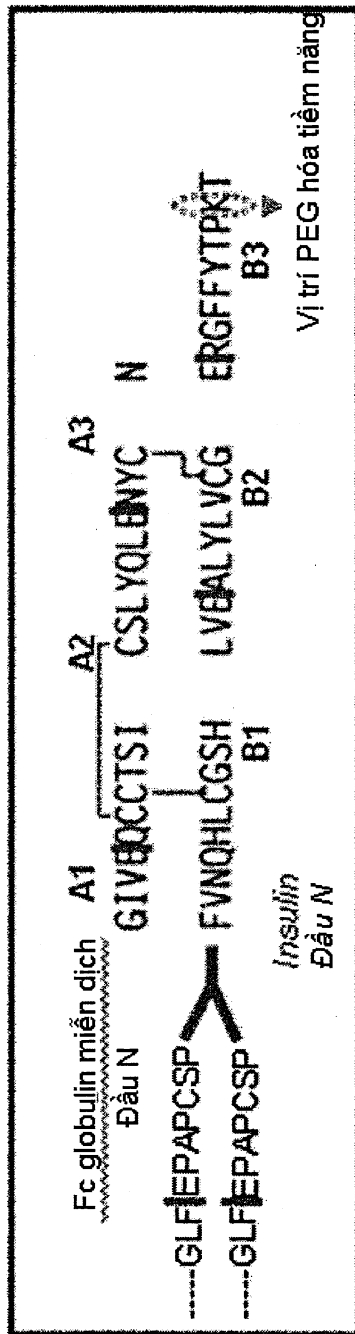


[Fig. 3]

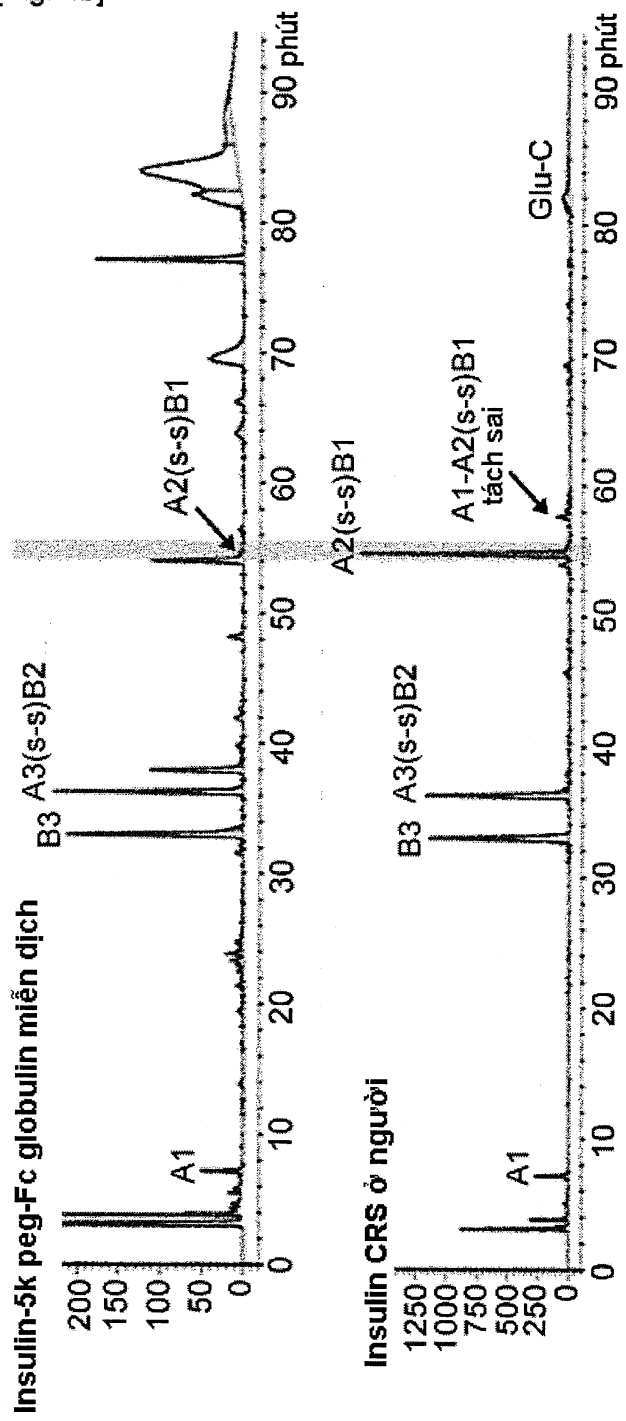


[Fig. 4a]

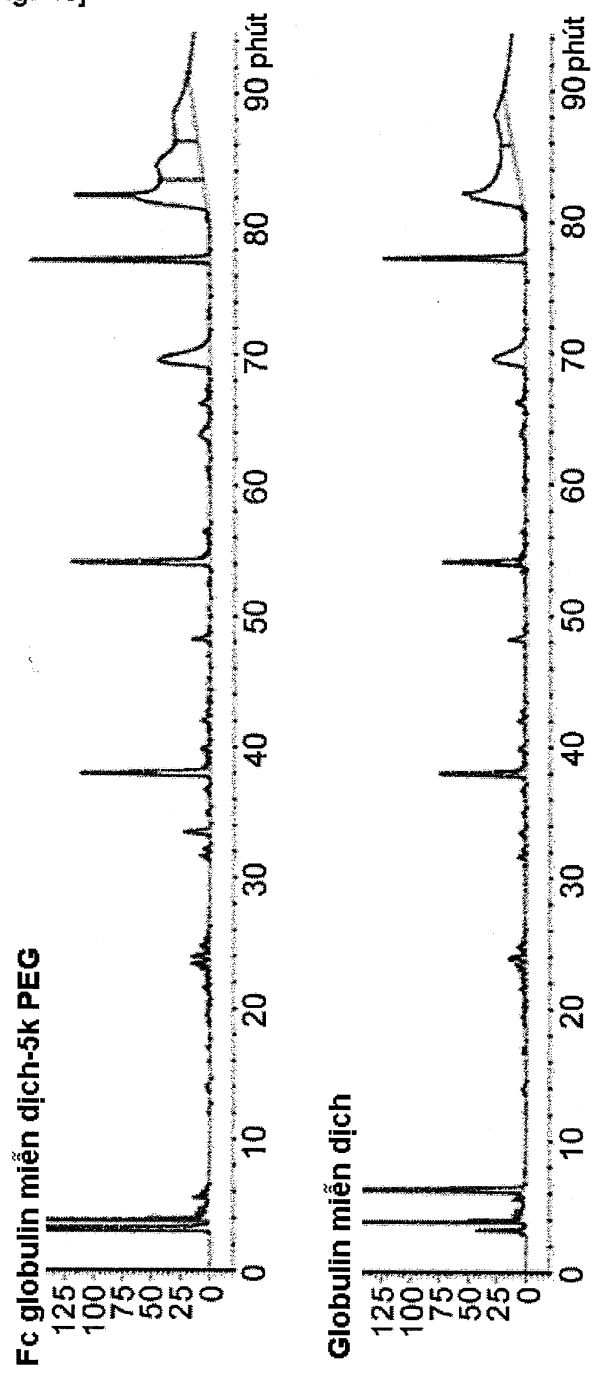
Sự phân mảnh dự đoán của LAPS-Insulin bị phân cắt bởi Glu-C



[Fig. 4b]



[Fig. 4c]



DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Hanmi Science Co., Ltd.

<120> Thẻ tiếp hợp insulin, chế phẩm tác dụng kéo dài chứa thẻ tiếp hợp và phương pháp tạo ra thẻ tiếp hợp này

<130> OPA11024

<150> KR10-2010-0030575

<151> 2010-04-02

<160> 2

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 21

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Gly	Ile	Val	Glu	Gln	Cys	Cys	Thr	Ser	Ile	Cys	Ser	Leu	Tyr	Gln	Leu
1				5					10					15	

Glu	Asn	Tyr	Cys	Asn
			20	

<210> 2

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

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

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