



(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)



1-0025781

(51)⁷ A61K 47/48; A61K 38/26; A61K 47/68; (13) B
A61K 38/00; A61K 38/28

(21) 1-2013-03730

(22) 01/06/2012

(86) PCT/KR2012/004367 01/06/2012

(87) WO2012/165915 06/12/2012

(30) 10-2011-0053488 02/06/2011 KR

(45) 26/10/2020 391

(43) 26/05/2014 314A

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

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

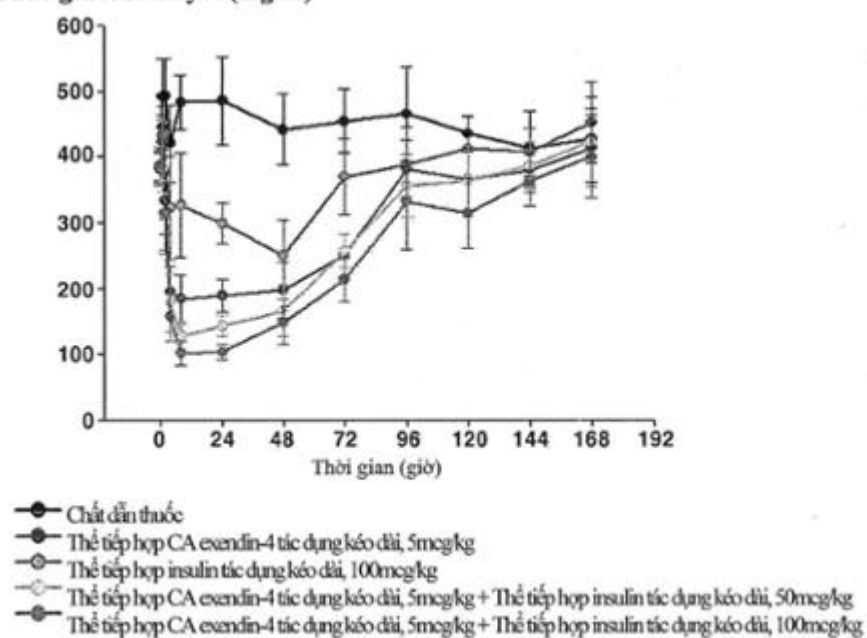
(72) WOO Young Eun (KR); JANG Myung Hyun (KR); PARK Young Jin (KR); PARK
Young Kyung (KR); LIM Chang Ki (KR); KWON Se Chang (KR).

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

(54) DƯỢC PHẨM CHỨA THỂ TIẾP HỢP INSULIN TÁC DỤNG KÉO DÀI VÀ THỂ
TIẾP HỢP PEPTIT KÍCH THÍCH INSULIN TÁC DỤNG KÉO DÀI ĐỂ PHÒNG
NGỪA HOẶC ĐIỀU TRỊ BỆNH ĐÁI THÁO ĐƯỜNG

(57) Sáng chế đề cập đến dược phẩm chứa thể tiếp hợp insulin tác dụng kéo dài và thể tiếp
hợp peptit kích thích insulin tác dụng kéo dài dùng để phòng ngừa hoặc điều trị bệnh đái
tháo đường, và cụ thể hơn là, việc dùng đồng thời thể tiếp hợp insulin tác dụng kéo dài và
thể tiếp hợp peptit kích thích insulin tác dụng kéo dài ức chế sự tăng cân do việc điều trị
bằng insulin, và ói mửa và buồn nôn do việc điều trị bằng peptit kích thích insulin, và làm
giảm liều lượng insulin cần thiết, nhờ đó cải thiện một cách đáng kể hiệu quả tuân thủ dùng
thuốc. Hơn nữa, mỗi thể tiếp hợp insulin tác dụng kéo dài và thể tiếp hợp peptit kích thích
insulin tác dụng kéo dài theo sáng chế được tạo ra bằng cách liên kết insulin hoặc peptit
kích thích insulin với một vùng globulin miễn dịch Fc qua một cầu nối không phải peptit,
nhờ đó cải thiện độ bền lâu *in vivo* về hiệu quả và độ ổn định.

Mức glucoza huyết (mg/dl)



Sáng chế đề cập đến được phẩm để phòng ngừa hoặc điều trị bệnh đái tháo đường chứa thể tiếp hợp insulin tác dụng kéo dài và thể tiếp hợp peptit kích thích insulin tác dụng kéo dài để dùng trong phương pháp điều trị bệnh đái tháo đường.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Insulin là một peptit được tiết ra bởi các tế bào beta của tuyến tụy, và đóng vai trò quan trọng trong việc kiểm soát nồng độ glucoza huyết trong cơ thể. Bệnh trao đổi chất, bệnh đái tháo đường có liên quan đến các mức glucoza huyết cao gây ra bởi sự bất bình thường về sự tiết hoặc chức năng của insulin. Bệnh đái tháo đường I xảy ra khi tuyến tụy không sản xuất đủ insulin gây ra tăng mức glucoza huyết, và bệnh đái tháo đường týp II xuất hiện khi có sự bất bình thường về sự tiết hoặc chức năng của insulin dẫn đến các mức glucoza huyết cao. Bệnh nhân mắc bệnh đái tháo đường týp II thường được điều trị bằng các thuốc hạ glucoza huyết có thành phần chính là một chất hóa học, và trong một số trường hợp, cũng được cho dùng insulin, trong khi đó bệnh nhân mắc bệnh đái tháo đường týp I đòi hỏi việc phải điều trị bằng insulin.

Phương pháp trị liệu bằng insulin phổ biến nhất là tiêm insulin trước và/hoặc sau khi ăn. Hiện nay, thuốc tiêm insulin là sẵn có, và như một tiêu chuẩn chung nó được tiêm dưới da. Phương pháp dùng thuốc thay đổi tùy thuộc vào tiến trình tác động của nó. Việc tiêm insulin cho thấy có hiệu quả hạ glucoza huyết nhanh hơn so với việc dùng qua đường uống, và có thể sử dụng được một cách an toàn khi việc dùng qua đường uống là không thể. Ngoài ra, không có giới hạn đối với việc dùng insulin. Tuy nhiên, việc dùng insulin ba lần mỗi ngày trong khoảng thời gian kéo dài có thể dẫn đến các bất lợi như sợ tiêm, khó khăn trong việc thao tác dụng cụ tiêm, hạ glucoza huyết, và tăng cân. Sự tăng cân do việc dùng insulin kéo dài có thể dẫn đến nguy cơ mắc bệnh tim

mạch và chứng kháng insulin. Trong khi đó, có nhiều giải pháp được đưa ra nhằm tối đa hóa hiệu quả bằng cách duy trì các mức cao, kéo dài tác dụng của thuốc insulin peptit sau khi được hấp thu bởi cơ thể. Ví dụ, các chế phẩm insulin tác dụng kéo dài như Lantus (Insulin glargine; Sanofi Aventis) và Levemir (Insulin detemir; Novo Nordisk) đã được phê chuẩn và có bán sẵn. Không giống như insulin NPH (Neutral Protamine Hagedorn), các thuốc có tác dụng kéo dài này làm giảm nguy cơ hạ glucoza huyết trong khi ngủ, và việc dùng Levemir đặc biệt có ưu điểm là ít tăng cân hơn. Tuy nhiên, các chế phẩm thuốc này cũng có nhược điểm là phải dùng chúng một hoặc hai lần mỗi ngày.

Trong khi đó, một peptit kích thích insulin, là peptit tương tự glucagon-1 (GLP-1), là một hormon incretin được tiết ra bởi các tế bào L của hồi tràng và đại tràng. Peptit tương tự glucagon-1 có chức năng tăng cường giải phóng insulin theo phương thức phụ thuộc glucoza để ngăn ngừa các cơn hạ glucoza huyết. Nhờ có đặc tính này, nên nó đã được quan tâm như một trị liệu tiềm năng cho bệnh đái tháo đường týp II. Tuy nhiên, một trở ngại chính đối với việc dùng GLP-1 làm tác nhân trị liệu đó là nó có thời gian bán thải cực kỳ ngắn dưới 2 phút trong huyết tương. Hiện nay, exendin-4 là một thương phẩm của chất chủ vận thụ thể peptit tương tự glucagon-1, và nó là một chất tương tự peptit tương tự glucagon-1 được tinh chế từ tuyến nước bọt của thằn lằn gila monster. Exendin-4 có tính kháng đối với DPP IV (Dipeptidyl peptidase-4), và có hoạt tính sinh lý học cao hơn so với peptit tương tự glucagon-1. Do đó, nó có thời gian bán thải *in vivo* nằm trong khoảng từ 2 đến 4 giờ, là dài hơn so với peptit tương tự glucagon-1 (US 5,424,286). Tuy nhiên, chỉ bằng phương pháp nâng cao tính kháng đối với DPP IV, thì hoạt tính sinh lý học là không kéo dài thỏa đáng, và ví dụ, trong trường hợp thương phẩm exendin-4 (exenatit), sẽ đòi hỏi phải tiêm cho người bệnh hai lần mỗi ngày, và bệnh nhân được điều trị bằng exenatit vẫn gặp phải các tác dụng phụ như buồn nôn và ói mửa.

Nhằm giải quyết các vấn đề nêu trên, các tác giả sáng chế đã đề xuất thể tiếp hợp peptit tác dụng kéo dài, nó được tạo ra bằng cách tạo liên kết giữa polypeptit sinh khả dụng và một vùng globulin miễn dịch Fc qua một cầu nối là

polyme không phải peptit bởi một cầu nối cộng hóa trị, nhờ đó đồng thời lưu giữ hoạt tính và cải thiện tính ổn định của thuốc protein (Patent Hàn Quốc số 10-0725315). Đặc biệt, họ đã thấy rằng một trong số các thể tiếp hợp insulin tác dụng kéo dài và thể tiếp hợp exendin-4 tác dụng kéo dài tạo ra hiệu quả *in vivo* tăng lên một cách đáng kể (các Đơn yêu cầu cấp patent Hàn quốc số 10-2008-0001479 và 10-2010-0054068).

Tuy nhiên, vẫn còn các vấn đề về sự tăng cân, hoặc buồn nôn và ói mửa, khi insulin hoặc exendin-4 được tiêm với lượng đủ để duy trì mức glucoza huyết ổn định. Do vậy, có nhu cầu cấp thiết về việc phát triển một phương pháp trị liệu có hiệu quả điều trị mỹ mãn cho bệnh đái tháo đường với các liều lượng dùng thấp và tần suất dùng thuốc thấp.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Các tác giả sáng chế đã có nhiều nỗ lực nhằm phát triển một chất trị liệu cho bệnh đái tháo đường có hiệu quả trị liệu tác dụng kéo dài và đồng thời giảm bớt các tác dụng phụ như buồn nôn và ói mửa. Họ đã nghiên cứu việc dùng đồng thời thể tiếp hợp exendin-4 tác dụng kéo dài và thể tiếp hợp insulin tác dụng kéo dài kích thích một cách đồng thời thụ thể peptit tương tự glucagon-1 và thụ thể insulin. Kết quả là, họ đã thấy rằng việc dùng đồng thời thể tiếp hợp insulin tác dụng kéo dài và thể tiếp hợp exendin-4 tác dụng kéo dài sẽ cải thiện cho độ bền lâu hiệu quả *in vivo* và tính ổn định, và giảm bớt một cách đáng kể các liều lượng dùng thuốc, tạo ra một mức glucoza huyết ổn định. Ngoài ra, họ đã thấy rằng nó cải thiện các tác dụng phụ như ói mửa và buồn nôn do chất chủ vận peptit tương tự glucagon-1 và exendin-4 hoặc các dẫn xuất của chúng gây ra, và việc dùng thể tiếp hợp exendin-4 tác dụng kéo dài làm giảm sự tăng cân gây ra bởi việc dùng insulin, nhờ đó hoàn thành sáng chế này.

Một mục đích của sáng chế là đề xuất được phẩm để phòng ngừa hoặc điều trị bệnh đái tháo đường, chứa thể tiếp hợp insulin tác dụng kéo dài và thể tiếp hợp peptit kích thích insulin tác dụng kéo dài.

Một mục đích khác của sáng chế là mô tả phương pháp để phòng ngừa hoặc điều trị bệnh đái tháo đường, bao gồm việc cho đối tượng có bệnh đái tháo

đường hoặc nguy cơ có bệnh đái tháo đường dùng được phẩm này.

Một mục đích khác của sáng chế là đề xuất được phẩm để phòng ngừa hoặc điều trị bệnh đái tháo đường chứa thể tiếp hợp insulin tác dụng kéo dài và peptit kích thích insulin.

Một mục đích khác của sáng chế là đề xuất được phẩm để phòng ngừa hoặc điều trị bệnh đái tháo đường chứa insulin và thể tiếp hợp peptit kích thích insulin tác dụng kéo dài.

Thể tiếp hợp insulin tác dụng kéo dài và thể tiếp hợp exendin-4 tác dụng kéo dài theo sáng chế cho các tác dụng điều trị mỹ mãn cho bệnh đái tháo đường, và cụ thể là, việc dùng chúng đồng thời sẽ kích thích thụ thể insulin đồng thời với thụ thể peptit tương tự glucagon-1 để cải thiện độ bền lâu hiệu quả *in vivo* và độ ổn định của chúng, và làm giảm một cách đáng kể các liều lượng cần thiết của thuốc và kiểm soát một cách ổn định glucoza huyết ở mức độ ổn định, dẫn đến cải thiện về nguy cơ hạ glucoza huyết và tăng cân. Ngoài ra, nó ức chế sự buồn nôn và sự ói mửa và cải thiện hiệu quả tuân thủ dùng thuốc làm chất trị liệu cho bệnh đái tháo đường. Đặc biệt, việc cải thiện một cách đáng kể tính ổn định và độ bền lâu *in vivo* của hiệu quả cho phép làm giảm tần suất điều trị, góp phần thuận tiện cho bệnh nhân.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

FIG.1 là đồ thị thể hiện các biến đổi về mức glucoza huyết trong khoảng thời gian 7 ngày sau khi cho chuột nhất bị đái tháo đường do STZ (Streptozotocin) gây ra dùng đồng thời thể tiếp hợp insulin tác dụng kéo dài và thể tiếp hợp exendin-4 tác dụng kéo dài;

FIG.2 là đồ thị thể hiện các biến đổi về glucoza huyết lúc đói (Δ FBG) sau khi cho chuột nhất db/db (db/db: *bị béo phì, đái tháo đường và rối loạn lipid huyết*) (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ của thử nghiệm MC của Dunnet) dùng đồng thời thể tiếp hợp insulin tác dụng kéo dài và thể tiếp hợp exendin-4 tác dụng kéo dài; và

FIG.3 là đồ thị thể hiện các biến đổi về thể trọng (Δ BW) sau khi cho chuột nhất db/db (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ của thử nghiệm MC của

Dunnet) dùng đồng thời thể tiếp hợp insulin tác dụng kéo dài và thể tiếp hợp exendin-4 tác dụng kéo dài.

Mô tả chi tiết sáng chế

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất được phẩm để phòng ngừa hoặc điều trị bệnh đái tháo đường, chứa thể tiếp hợp insulin tác dụng kéo dài và thể tiếp hợp peptit kích thích insulin tác dụng kéo dài. Dược phẩm theo sáng chế được đặc tả bởi việc dùng đồng thời thể tiếp hợp insulin tác dụng kéo dài và thể tiếp hợp peptit kích thích insulin tác dụng kéo dài.

Khi được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ "thể tiếp hợp insulin tác dụng kéo dài" chỉ insulin được liên kết với một vùng globulin miễn dịch Fc qua một cầu nối không phải peptit.

Thể tiếp hợp insulin tác dụng kéo dài theo sáng chế có độ bền lâu hiệu quả *in vivo* cải thiện so với insulin nguyên thể, và thể tiếp hợp insulin tác dụng kéo dài này có thể bao gồm insulin được điều chế bằng cách cải biến, thay thế, cộng, hoặc khuyết đoạn của các trình tự axit amin của insulin nguyên thể, insulin được tiếp hợp với polyme dễ bị phân hủy sinh học như polyetylen glycol (PEG), insulin được tiếp hợp với protein tác dụng kéo dài như albumin hoặc globulin miễn dịch, insulin được tiếp hợp với axit béo axit có khả năng gắn kết với albumin trong cơ thể, hoặc insulin được bao nang trong các hạt nano để bị phân hủy vi sinh, mặc dù loại thể tiếp hợp insulin tác dụng kéo dài là không chỉ giới hạn trong số này.

Khi được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ "insulin" chỉ peptit được tiết ra bởi tuyến tụy để phản ứng với các mức glucoza cao 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 vậy kiểm soát nồng độ glucoza huyết. Peptit này bao gồm insulin nguyên thể, insulin gốc, chất chủ vận insulin, các tiền chất, các dẫn xuất, các mảnh của chúng, và các biến thể của nó.

Thuật ngữ, "insulin nguyên thể" chỉ hormon được tiết ra bởi tuyến tụy để thúc đẩy sự hấp thu glucoza và ức chế sự phân hủy chất béo, và do vậy có chức

năng kiểm soát nồng độ glucoza huyết. Insulin được tạo ra từ tiền chất không có chức năng điều hòa nồng độ glucoza huyết, được gọi là tiền insulin, qua quá trình chuyển hóa. Các trình tự axit amin của insulin là 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)

Thuật ngữ, “insulin gốc” chỉ peptit quản lý các biến động glucoza huyết hằng ngày bình thường, ví dụ Levemir, Glagline, Deglude v.v...

Thuật ngữ, “chất chủ vận insulin” chỉ hợp chất gắn kết với thụ thể insulin để thể hiện hoạt tính sinh học giống như insulin, không phụ thuộc vào cấu trúc của insulin.

Thuật ngữ, “biến thể insulin” chỉ peptit có một hoặc nhiều trình tự axit amin khác với trình tự của insulin nguyên thể, và chỉ peptit lưu giữ chức năng kiểm soát nồng độ glucoza huyết trong cơ thể, và có thể điều chế được bởi bất kỳ trong số thay thế, bổ sung, khuyết đoạn, và sự cải biến hoặc bởi sự kết hợp của chúng trong một phần của các trình tự axit amin của insulin nguyên thể.

Thuật ngữ, “dẫn xuất insulin” chỉ peptit có độ tương đồng trình tự axit amin so với insulin nguyên thể ít nhất 80%, nó có thể có một số nhóm trên gốc axit amin được thể hóa học (ví dụ, alpha-metyl hóa, alpha-hydroxy hóa), khuyết đoạn (ví dụ, loại amin), hoặc được cải biến (ví dụ, N-metyl hóa), và có chức năng điều hòa nồng độ glucoza huyết trong cơ thể.

Thuật ngữ, “mảnh insulin” chỉ đoạn có một hoặc nhiều axit amin được bổ sung hoặc khuyết đoạn ở đầu cuối N hoặc đầu cuối 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 huyết trong cơ thể.

Mỗi phương pháp điều chế các chất chủ vận, dẫn xuất, mảnh, và biến thể

của insulin có thể được sử dụng riêng rẽ hoặc ở dạng 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 cuối N, và có chức năng điều hòa nồng độ glucoza huyết 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 trong pha rắn.

Hơn thế, insulin được sử dụng theo sáng chế được đặc tả bởi việc polyme không phải peptit được liên kết với đầu cuối amino của chuỗi beta của insulin. Polyme không phải peptit này có thể được sử dụng làm cầu nối theo sáng chế này. Polyme không phải peptit được liên kết dưới dạng một cầu nối, nhờ đó duy trì hoạt tính và cải thiện tính ổn định của insulin.

Thuật ngữ “polyme không phải peptit”, khi được sử dụng trong Bản mô tả, để chỉ polyme tương hợp sinh học chứa hai hoặc nhiều đến vị lặp lại được liên kết với nhau bởi liên kết cộng hóa trị bất kỳ ngoại trừ gắn kết peptit. Trong sáng chế này, thuật ngữ "polyme không phải peptit" có thể được sử dụng hoán đổi với thuật ngữ "cầu nối không phải peptit".

Polyme không phải peptit hữu ích theo sáng chế có thể được chọn từ nhóm gồm polyme dễ bị phân hủy sinh học, polyme lipid, chitin, axit hyaluronic, và hỗn hợp của chúng, và tốt hơn là, polyme dễ bị phân hủy sinh học có thể là polyetylen glycol, polypropylen glycol, copolyme etylen glycol-propylen glycol, polyol đã polyoxyetyl hóa, rượu polyvinyl, polysacarit, dextran, polyvinyl etyl ete, axit polylactic (PLA) hoặc axit polylactic-glycolic (PLGA), và hơn tốt hơn là, polyetylen glycol (PEG). Ngoài ra, các dẫn xuất của chúng là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và các dẫn xuất có thể điều chế được một cách dễ dàng bằng phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể được bao gồm trong phạm vi của sáng chế.

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 100kDa, và tốt hơn là từ 1 đến 20kDa. 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 điều chế thể tiếp hợp protein theo sáng chế này. Tốt hơn là, polyme không phải peptit có thể được liên kết ở đầu cuối N của chuỗi beta của insulin.

Insulin theo sáng chế có thể được cải biến bằng polyme không phải peptit.

Thực tế là, sự cải biến PEG (polyetylen glycol) để phòng ngừa sự hạ glucoza huyết và cải thiện độ bền lâu hiệu quả làm cho hiệu giá của peptit có hoạt tính sinh lý học thấp đáng kể. Tuy nhiên, nhược điểm này trở thành một lợi thế cho sự phát triển của thể tiếp hợp insulin tác dụng kéo dài bằng cách sử dụng các vùng globulin miễn dịch. Do vậy, insulin đã cải biến PEG có thể được liên kết với vùng globulin miễn dịch Fc qua polyme không phải peptit. Polyme không phải peptit được sử dụng để cải biến insulin có thể được chọn từ nhóm gồm polyetylen glycol, polypropylen glycol, copolyme etylen glycol-propylen glycol, polyol đã polyoxyetyl hóa, rượu polyvinyl, polysacarit, dextran, polyvinyl etyl ete, polyme dễ bị phân hủy sinh học, polyme lipid, chitin, axit hyaluronic, và hỗn hợp của chúng, và tốt hơn là, polyetylen glycol. Sự cải biến PEG trong insulin đã cải biến PEG được đặc tả bởi việc PEG gắn kết một cách có chọn lọc với đầu cuối N của chuỗi alpha hoặc với một gốc lysin cụ thể của chuỗi beta của insulin. Insulin đã cải biến PEG tốt hơn là bao gồm các nhóm andehit và succinyl có hoạt tính phản ứng ở các đầu cuối của nó, và hơn tốt hơn là, nhóm succinyl có hoạt tính phản ứng.

Phương pháp điều chế và hiệu quả của thể tiếp hợp insulin tác dụng kéo dài theo sáng chế đã được mô tả chi tiết trong các Đơn yêu cầu cấp patent Hàn quốc số 2010-0054068, 2010-0054067, và 2011-0030868. Theo một ví dụ của sáng chế, quá trình cải biến mono-PEG hóa được tiến hành ở đầu cuối N của vùng globulin miễn dịch Fc, và phenylalanin ở vị trí 1 của chuỗi beta của insulin được cải biến tại đó để điều chế thể tiếp hợp insulin tác dụng kéo dài (Ví dụ 1).

Khi được sử dụng trong Bản mô tả, thuật ngữ "thể tiếp hợp peptit kích thích insulin tác dụng kéo dài" chỉ peptit kích thích insulin được liên kết với

vùng globulin miễn dịch Fc qua cầu nối không phải peptit.

Trong sáng chế này, thuật ngữ "peptit kích thích insulin" chỉ peptit lưu giữ chức năng giải phóng insulin, và kích thích sự tổng hợp hoặc biểu hiện của insulin trong các tế bào beta của tuyến tụy. Tốt hơn là, peptit kích thích insulin là GLP (Peptit tương tự glucagon)-1, exendin-3, hoặc exendin-4, nhưng không chỉ giới hạn trong số này. Peptit kích thích insulin bao gồm các peptit kích thích insulin nguyên thể, các tiền chất của chúng, các chất chủ vận của chúng, các dẫn xuất của chúng, các mảnh của chúng, và các biến thể của chúng.

Peptit kích thích dẫn xuất insulin theo sáng chế có thể bao gồm dẫn xuất desamino-histidyl trong đó nhóm amino đầu cuối N của peptit kích thích insulin được khuyết đoạn, dẫn xuất beta-hydroxy imidazopropionyl trong đó nhóm amino được thế bằng nhóm hydroxyl, dẫn xuất dimethyl-histidyl trong đó nhóm amino được cải biến bằng hai nhóm methyl, dẫn xuất beta-carboxyimidazopropionyl trong đó nhóm amino đầu cuối N được thế bằng nhóm cacboxyl, hoặc dẫn xuất imidazoaxetyl trong đó cacbon ở vị trí alpha của gốc histidin đầu cuối N được khuyết đoạn để còn lại duy nhất nhóm imidazoaxetyl và do vậy điện tích dương của nhóm amino được loại bỏ, và các dẫn xuất được cải biến bằng nhóm amino đầu cuối N khác cũng được bao gồm trong phạm vi của sáng chế này.

Tốt hơn, nếu peptit kích thích dẫn xuất insulin theo sáng chế là dẫn xuất exendin-4 có nhóm amino (hoặc amin) đầu cuối N đã cải biến hóa học hoặc gốc axit amin, tốt hơn nữa nếu là dẫn xuất exendin-4 được điều chế bằng cách loại bỏ hoặc thế nhóm amino ở vị trí alpha có mặt ở cacbon ở vị trí alpha của gốc His1 đầu cuối N của exendin-4 hoặc bằng cách loại bỏ hoặc thế cacbon ở vị trí alpha. Cũng tốt hơn nữa là, desamino-histidyl-exendin-4 (DA-Exendin-4) cùng với việc loại bỏ nhóm amino đầu cuối N, beta-hydroxy imidazopropyl-exendin-4 (HY-exendin-4) được điều chế bằng cách thay thế nhóm amino bằng nhóm hydroxyl, beta-carboxy imidazopropyl-exendin-4 (CX-exendin-4) được điều chế bằng cách thay thế nhóm amino bằng nhóm cacboxyl, dimethyl-histidyl-exendin-4 (DM-exendin-4) được điều chế bằng cách cải biến nhóm amino bằng

hai gốc methyl, hoặc imidazoaxetyl-exendin-4 (CA-exendin-4) cùng với việc loại bỏ cacbon ở vị trí alpha của gốc histidin đầu cuối N.

GLP-1 là một hormon được tiết ra bởi ruột non, và thường thúc đẩy sinh tổng hợp và tiết insulin, ức chế tiết glucagon, và thúc đẩy sự hấp thu glucoza của các tế bào. Trong ruột non, tiền chất glucagon bị phân thành ba peptit, cụ thể là, glucagon, GLP-1, và GLP-2. Trong bản mô tả này, GLP-1 chỉ GLP-1 (1-37), ban đầu nó ở dạng không có chức năng kích thích insulin, nhưng sau đó được xử lý và chuyển hóa thành dạng GLP-1 (7-37) đã hoạt hóa. Trình tự axit amin của GLP-1 (7-37) là như sau:

GLP-1(7-37)

HAEGT FTSDV SSYLE GQAAK EFIAW LVKGR G (SEQ ID NO. 3)

Thuật ngữ, “dẫn xuất GLP-1” chỉ peptit có độ tương đồng trình tự axit amin với trình tự của GLP-1 ít nhất 80%, có thể là ở dạng đã cải biến hoá học, và biểu hiện chức năng kích thích insulin ít nhất là tương đương hoặc hơn chức năng chức năng kích thích insulin của GLP-1.

Thuật ngữ, “mảnh GLP-1” chỉ mảnh ở dạng mà trong đó một hoặc nhiều axit amin được bổ sung hoặc khuyết đoạn ở đầu cuối N hoặc đầu cuối C của GLP-1 nguyên thể, trong đó axit amin được bổ sung có thể là một axit amin không có trong tự nhiên (ví dụ, axit amin loại D).

Thuật ngữ, “biến thể GLP-1” chỉ peptit có chức năng kích thích insulin, có một hoặc nhiều trình tự axit amin khác với các trình tự axit amin của GLP-1 nguyên thể.

Exendin-3 và exendin-4 là các peptit kích thích insulin gồm 39 axit amin, chúng có độ tương đồng trình tự axit amin với GLP-1 là 53%. Các trình tự axit amin của exendin-3 và exendin-4 là như sau:

Exendin-3

HSDGT FTSDL SKQME EEAVR LFIEW LKNNG PSSGA PPPS (SEQ ID NO. 4)

Exendin-4

HGEGT FTSDL SKQME EEAVR LFIEW LKNNG PSSGA PPPS (SEQ ID

NO. 5)

Thuật ngữ, “chất chủ vận exendin” chỉ hợp chất có phản ứng với các thụ thể *in vivo* và có hoạt tính sinh học tương đương với hoạt tính sinh học của exendin.

Thuật ngữ, “dẫn xuất exendin” chỉ peptit có độ tương đồng trình tự axit amin với exendin nguyên thể ít nhất 80%, chúng có thể có một số nhóm trên gốc axit amin được thể hóa học (ví dụ, alpha-metyl hóa, alpha-hydroxy hóa), khuyết đoạn (ví dụ, loại amin), hoặc được cải biến (ví dụ, N-metyl hóa), và có chức năng kích thích insulin.

Thuật ngữ, “mảnh exendin” chỉ đoạn có một hoặc nhiều axit amin được bổ sung hoặc khuyết đoạn ở đầu cuối N hoặc đầu cuối C của exendin 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 kích thích insulin.

Thuật ngữ, “biến thể exendin” chỉ peptit có ít nhất một trình tự axit amin khác với trình tự axit amin của exendin nguyên thể, có chức năng kích thích insulin, và biến thể exendin bao gồm các peptit được điều chế bằng cách thay thế lysin ở vị trí 12 của exendin-4 bằng serin hoặc arginin.

Mỗi phương pháp để điều chế chất chủ vận, dẫn xuất, mảnh, và biến thể exendin có thể được sử dụng riêng rẽ hoặc ở dạng kết hợp. Ví dụ, sáng chế này bao gồm peptit kích thích insulin có một trình tự axit amin có ít nhất một axit amin khác với trình tự của peptit kích thích insulin nguyên thể, và có gốc axit amin ở đầu cuối N đã bị khử amin.

Theo một phương án cụ thể, peptit kích thích insulin nguyên thể và peptit kích thích insulin đã cải biến được sử dụng theo sáng chế có thể được tổng hợp bằng cách sử dụng phương pháp tổng hợp trong pha rắn, và hầu hết các peptit nguyên thể bao gồm peptit kích thích insulin nguyên thể có thể được tạo ra bằng kỹ thuật tái tổ hợp.

Thể tiếp hợp peptit kích thích insulin tác dụng kéo dài được sử dụng theo sáng chế chỉ peptit kích thích insulin được liên kết với đoạn globulin miễn dịch như globulin miễn dịch Fc qua một cầu nối không phải peptit. Cầu nối

không phải peptit là giống như đã mô tả ở trên. Thở tiếp hợp peptit kích thích insulin tác dụng kéo dài là một thở tiếp hợp sử dụng đoạn globulin miễn dịch giống như trong thở tiếp hợp insulin tác dụng kéo dài, và duy trì các hoạt độ *in vivo* bình thường của peptit kích thích insulin, như thúc đẩy tổng hợp và tiết insulin, kiểm soát sự thèm ăn, giảm cân, làm tăng tính miễn cảm của tế bào beta với glucoza trong máu, thúc đẩy sự tăng sinh tế bào beta, trì hoãn sự trống dạ dày, và ức chế glucagon, và còn làm tăng một cách đáng kể thời gian bán thải của máu của peptit kích thích insulin, và kết quả là duy trì hiệu quả *in vivo* của peptit. Nhờ vậy, nó hữu ích cho việc điều trị bệnh đái tháo đường và bệnh béo phì.

Loại và phương pháp để điều chế thở tiếp hợp peptit kích thích insulin tác dụng kéo dài đã được mô tả chi tiết trong các đơn yêu cầu cấp patent Hàn quốc số 2008-001479, 2008-0069234, và 2010-0047019.

Theo một ví dụ của sáng chế, lysin (Lys) của imidazo-axetyl exendin-4 (CA exendin-4) được cải biến bằng PEG, và exendin-4 đã cải biến bằng PEG được liên kết với globulin miễn dịch Fc để tạo ra thở tiếp hợp exendin-4 tác dụng kéo dài (Ví dụ 2).

Insulin và peptit kích thích insulin được sử dụng theo sáng chế được liên kết với một chất mang bằng cách sử dụng polyme không phải peptit làm cầu nối. Chất mang hữu ích theo sáng chế có thể được chọn từ nhóm gồm vùng globulin miễn dịch Fc, albumin, transferrin, và PEG, và tốt hơn là vùng globulin miễn dịch Fc.

Mỗi thở tiếp hợp insulin tác dụng kéo dài và thở tiếp hợp peptit kích thích insulin theo sáng chế được điều chế bằng cách liên kết insulin hoặc peptit kích thích insulin với vùng globulin miễn dịch Fc qua cầu nối không phải peptit, nhờ đó thể hiện khả năng lưu giữ và độ ổn định. Trong bản mô tả, thuật ngữ "globulin miễn dịch Fc" có thể được sử dụng hoán đổi với thuật ngữ "vùng globulin miễn dịch".

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 khuyết 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.

Vùng Fc globulin miễn dịch theo sáng chế bao gồm trình tự axit amin nguyên thể, và dẫn xuất trình tự (thể đột biến) của chúng. Dẫn xuất trình tự axit amin có trình tự khác so với trình tự axit amin nguyên thể do có khuyết 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 khuyết đoạn ở vùng có khả năng tạo thành liên kết disulfua, khuyết đoạn của một số gốc axit amin ở đầu cuối N của dạng Fc nguyên thể, hoặc sự bổ sung gốc metionin vào đầu cuối N của dạng Fc nguyên thể. Ngoài ra, để làm mất chức năng đáp ứng lại kích thích, thì khuyết 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 mô tả trong WO 97/34631 và WO 96/32478.

Sự trao đổi axit amin trong các protein và peptit, thường không làm thay đổi hoạt tính của các phân tử, là đã biết trong tình trạng kỹ thuật (H.Neurath, R.L.Hill, The Proteins, Academic Press, New York, 1979). Sự trao đổi xảy ra thường xuyên nhất là Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Thy/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu, và Asp/Gly, theo cả hai hướng. Ngoài ra, vùng Fc, nOù 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 lập từ người và các động vật khác bao gồm bò, dê, lợn, chuột nhắt, thỏ, chuột hamster, chuột cống và chuột lang, hoặc có thể là các thể tái tổ hợp hoặc dẫn xuất của chúng, thu được từ các tế bào động vật hoặc vi sinh vật được biến nạp. Trong bản mô tả này, chúng có thể thu được từ globulin miễn dịch nguyên thể bằng cách phân lập 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 cung cấp cho, ví dụ, sắc ký loại trừ để phân lập 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 phần C1q của thành phần bổ thể thứ nhất C1 và giảm hoặc mất tính độc qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể hoặc tính độc tế bào phụ thuộc bổ thể, do 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*.

Trong khi đó, vùng globulin miễn dịch Fc có thể có nguồn gốc từ người hoặc khác các động vật bao gồm bò, dê, lợn, chuột nhắt, thỏ, chuột túi má, chuột và chuột lang, và tốt hơn là từ người.

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

Mặt khác, thuật ngữ "kết hợp", được sử dụng trong bản mô tả này, chỉ các polypeptit mã hóa vùng Fc globulin miễn dịch chuỗi đến có cùng nguồn gốc được liên kết với polypeptit chuỗi đến có nguồn gốc khác để tạo thành

đime hoặc multime. Cụ thể, đime 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, chỉ 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 đến. 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).

Tức là, 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.

Dược phẩm theo sáng chế được đặc tả bởi việc dùng đồng thời thể tiếp hợp insulin tác dụng kéo dài và thể tiếp hợp peptit kích thích insulin tác dụng kéo dài.

Khi việc dùng đồng thời thể tiếp hợp insulin tác dụng kéo dài và thể tiếp hợp peptit kích thích insulin tác dụng kéo dài theo sáng chế được tiến hành, thể tiếp hợp insulin tác dụng kéo dài tác động lên thụ thể insulin và thể tiếp hợp peptit kích thích insulin tác dụng kéo dài tác động lên thụ thể peptit tương tự glucagon-1 một cách đồng thời, nhờ vậy nồng độ glucoza huyết giảm và mức glucoza huyết ổn định được duy trì, so với việc dùng thể tiếp hợp đến của chúng. Việc dùng đồng thời thể tiếp hợp có các hiệu quả làm giảm nguy cơ hạ

glucoza huyết và tăng cân có thể do việc dùng duy nhất insulin, và cũng làm giảm liều lượng tổng cộng insulin do tác động của peptit kích thích insulin. Việc dùng đồng thời cũng có lợi ở chỗ liều lượng của peptit kích thích insulin như exendin-4 có thể cũng được giảm để tránh các tác dụng phụ như buồn nôn và ói mửa do việc dùng một mình exendin-4. Việc dùng thể tiếp hợp insulin tác dụng kéo dài và thể tiếp hợp peptit kích thích insulin tác dụng kéo dài làm tăng một một cách đáng kể thời gian bán thải của máu và độ bền lâu *in vivo* của hiệu quả, nhờ vậy tần suất điều trị được giảm để cải thiện chất lượng cuộc sống cho bệnh nhân mãn tính phải tiêm hằng ngày. Do vậy, nó rất hữu ích cho việc điều trị bệnh đái tháo đường. Hơn thế, dược phẩm theo sáng chế thể hiện độ bền lâu mỹ mãn về hiệu quả *in vivo* và độ chuẩn, và liều lượng có thể được giảm đáng kể khi dùng đồng thời.

Thể tiếp hợp insulin tác dụng kéo dài và thể tiếp hợp peptit kích thích insulin tác dụng kéo dài có thể được cung cấp đồng thời, lần lượt hoặc xen kẽ, và có thể được cung cấp đồng thời với sự kết hợp thích hợp của các liều lượng hiệu quả. Tốt hơn là, thể tiếp hợp insulin tác dụng kéo dài và thể tiếp hợp peptit kích thích insulin tác dụng kéo dài có thể được lưu giữ tách biệt trong các vật chứa riêng, và sau đó được cung cấp đồng thời, lần lượt hoặc xen kẽ.

Hơn thế, dược phẩm cho việc dùng đồng thời theo sáng chế có thể ở dạng bộ kit trị liệu cho bệnh đái tháo đường bao gồm thể tiếp hợp insulin tác dụng kéo dài và thể tiếp hợp peptit kích thích insulin tác dụng kéo dài trong một vật chứa duy nhất hoặc tách biệt trong các vật chứa riêng. Bộ kit này có thể bao gồm chất mang dược dụng và hướng dẫn sử dụng.

Theo một ví dụ cụ thể của sáng chế, các biến đổi về các mức glucoza huyết được đánh giá sau khi dùng đồng thời thể tiếp hợp insulin tác dụng kéo dài và thể tiếp hợp exendin-4 tác dụng kéo dài cho cho chuột nhất bị đái tháo đường do STZ (Streptozotocin) gây ra. Kết quả là, việc dùng đồng thời thể tiếp hợp này cho thấy một mẫu hình ổn định về các mức glucoza huyết, so với khi dùng đơn lẻ (FIG.1). Các mức glucoza huyết lúc đói được so sánh trước và sau khi dùng đồng thời thể tiếp hợp insulin tác dụng kéo dài và thể tiếp hợp

exendin-4 tác dụng kéo dài trên các mô hình chuột đái tháo đường tít II một lần mỗi tuần. Kết quả là, việc dùng đồng thời thể hiện sự cải thiện mỹ mãn về các mức glucoza huyết, so với việc dùng đơn lẻ (FIG. 2). Ngoài ra, sự tăng cân do việc điều trị bằng insulin không thấy có, chứng tỏ rằng việc dùng đồng thời này làm giảm tác dụng phụ tăng cân do dùng insulin (FIG.3).

Khi được sử dụng trong Bản mô tả, thuật ngữ "bệnh đái tháo đường" chỉ bệnh trao đổi chất gây ra bởi sự bất bình thường về sự tiết hoặc chức năng của insulin. Việc dùng đồng thời được phẩm theo sáng chế cho đối tượng được tiến hành để kiểm soát nồng độ glucoza huyết, nhờ đó điều trị cho bệnh đái tháo đường.

Khi được sử dụng trong Bản mô tả, thuật ngữ "phòng ngừa" chỉ tất cả các tác động mà sự xuất hiện của bệnh đái tháo đường bị hạn chế hoặc làm chậm lại bởi việc dùng đồng thời được phẩm theo sáng chế, và thuật ngữ "điều trị" chỉ tất cả các tác động mà các triệu chứng của bệnh đái tháo đường đã được cải thiện tốt hơn hoặc đã được làm thay đổi theo chiều hướng có lợi bởi việc dùng đồng thời được phẩm theo sáng chế. Việc điều trị bệnh đái tháo đường này có thể áp dụng được cho động vật có vú bất kỳ có thể có bệnh đái tháo đường, và các ví dụ về chúng bao gồm người và các động vật linh trưởng cũng như vật nuôi như trâu bò, lợn, cừu, ngựa, chó, và mèo, nhưng không chỉ giới hạn trong số này, và tốt hơn là người.

Thuật ngữ "dùng", được sử dụng trong bản mô tả này, chỉ việc cho bệnh nhân dùng một lượng chất đã định trước bằng phương pháp thích hợp nhất định. Được phẩm có thể được cung cấp qua các đường thông thường bất kỳ, miễn là nó có thể đến được mô mong muốn. Nhiều đường dùng thuốc 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 uống, hoạt chất của chế phẩm để dùng qua đường uống 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 cung cấp ở

dạng để tiêm. Ngoài ra, chế phẩm tác dụng kéo dài này có thể được cung cấp bằng cách sử dụng thiết bị có khả năng vận chuyển hoạt chất vào trong tế bào đích.

Ngoài ra, dược phẩm theo sáng chế có thể được xác định bởi một số 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 được sử dụng.

Hơn thế, dược phẩm theo sáng chế có thể bao gồm chất mang dược dụng. Thuật ngữ "chất mang dược dụng", được sử dụng trong bản mô tả này, chỉ chất mang hoặc chất pha loãng không gây ra sự kích thích đáng kể tới cơ thể và không làm mất đi hoạt tính sinh học và các đặc tính của hợp chất được cung cấp. Để dùng qua đường uống, chất mang dược dụng có thể bao gồm chất kết dính, chất làm trơn chảy, chất phân rã, tá dược, chất làm tăng độ tan, chất phân tán, chất ổn định, chất tạo huỷ phù, chất màu, và chất tạo hương. Đối với chế phẩm để tiêm, chất mang dược dụng có thể bao gồm chất đệm, chất bảo quản, chất giảm đau, chất làm tăng độ tan, chất đẳng trương, và chất ổn định. Đối với chế phẩm để dùng tại chỗ, chất mang dược dụng có thể bao gồm chất nền, tá dược, 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 liú cùng với các chất mang dược dụng nêu trên. Ví dụ, để dùng qua đường uống, chế phẩm tác dụng kéo dài này có thể được bào chế thành viên nén, viên ngậm dẹt, viên nang, còn ngọt, huỷ 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 này cũng có thể được bào chế thành dạng dung dịch, hỗn dịch, viên nén, thuốc viên, viên nang và chế phẩm tác dụng kéo dài.

Mặt khác, 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.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế mô tả phương pháp để phòng ngừa hoặc điều trị bệnh đái tháo đường, bao gồm việc cho đối tượng có bệnh đái tháo đường hoặc có nguy cơ mắc bệnh đái tháo đường dùng được phẩm chứa thể tiếp hợp insulin tác dụng kéo dài và thể tiếp hợp peptit kích thích insulin tác dụng kéo dài.

Việc dùng có thể được tiến hành bằng cách cho dùng đồng thời thể tiếp hợp insulin tác dụng kéo dài và thể tiếp hợp peptit kích thích insulin tác dụng kéo dài, nhưng không chỉ giới hạn ở, việc dùng đồng thời, lần lượt hoặc xen kẽ, và thể tiếp hợp insulin tác dụng kéo dài và thể tiếp hợp peptit kích thích insulin tác dụng kéo dài được cung cấp đồng thời với sự kết hợp thích hợp của các liều lượng hiệu quả.

Ngay cả khi được cung cấp một lần mỗi tuần, chế phẩm chứa thể tiếp hợp insulin tác dụng kéo dài và thể tiếp hợp peptit kích thích insulin tác dụng kéo dài theo sáng chế vẫn thể hiện sự cải thiện mỹ mãn về các mức glucoza huyết và không gây ra tác dụng phụ tăng cân, và do vậy có thể sử dụng được để phòng ngừa hoặc điều trị bệnh đái tháo đường.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất được phẩm để phòng ngừa hoặc điều trị bệnh đái tháo đường chứa thể tiếp hợp insulin tác dụng kéo dài và peptit kích thích insulin.

Thể tiếp hợp insulin tác dụng kéo dài và peptit kích thích insulin là giống như đã mô tả ở trên. Thể tiếp hợp insulin tác dụng kéo dài có thể được cung cấp đồng thời với peptit kích thích insulin như các chất chủ vận GLP-1 (ví dụ, Exenatide, Liraglutide hoặc Lixisenatide).

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất được phẩm để phòng ngừa hoặc điều trị bệnh đái tháo đường chứa insulin và thể tiếp hợp peptit kích thích insulin tác dụng kéo dài.

Insulin và thể tiếp hợp peptit kích thích insulin tác dụng kéo dài là giống

như đã mô tả ở trên. Thễ tiếp hợp peptit kích thích insulin tác dụng kéo dài có thể được cung cấp đồng thời với insulin như insulin nguyên thể, dẫn xuất insulin hoặc insulin gốc.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Tiếp theo, sáng chế có thể được hiểu rõ hơn qua các ví dụ dưới đây. Các ví dụ này được cung cấp để minh họa chứ không được coi là giới hạn sáng chế này.

Ví dụ 1: điều chế thể tiếp hợp insulin tác dụng kéo dài

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

Để điều chế thể tiếp hợp insulin-PEG-Fc globulin miễn dịch có mức độ cải biến phenylalanin (B1F) ở vị trí 1 của chuỗi beta của insulin lớn hơn hoặc bằng 90%, Fc globulin miễn dịch đã PEG hóa đến và insulin đã được điều chế với tỷ lệ mol bằng 4:1 và với tổng nồng độ protein bằng 20 mg/ml, và được cho phản ứng với nhau ở nhiệt độ 4°C trong 20 giờ. Dung dịch kali phosphat 100 mM (độ pH=6,0) được sử dụng làm dung dịch phản ứng và SCB 20 mM được bổ sung vào đã làm chất khử. Sau khi phản ứng kết thúc, dung dịch phản ứng được đem tinh chế sơ bộ bằng cách sử dụng cột tinh chế Source 15Q. Sau đó, việc tinh chế lần hai được thực hiện bằng cách sử dụng cột tinh chế Source 15ISO để tạo ra thể tiếp hợp insulin-PEG-Fc globulin miễn dịch.

Ví dụ 2: điều chế thể tiếp hợp exendin-4 tác dụng kéo dài

3.4k PropionALD (2) PEG được cho phản ứng với lysin (Lys) của CA exendin-4 bằng cách sử dụng imidazo-axetyl exendin-4 (CA exendin-4, AP, USA). Trong số hai pic đồng phân Lys, pic đồng phân cuối (đồng phân vị trí của Lys27), phản ứng nhiều hơn và dễ dàng phân biệt với các pic đồng phân ở

đầu cuối N, được sử dụng cho phản ứng ngẫu hợp.

Phản ứng này được tiến hành với tỷ lệ mol của peptit:globulin miễn dịch Fc là 1:8, và tổng nồng độ của các protein là 60mg/mL ở 4°C trong 20 giờ. Phản ứng này được tiến hành trong dung dịch gồm 100 mM K-P (độ pH = 6,0), và dung dịch SCB 20mM được bổ sung vào làm chất khử. Dung dịch phản ứng ngẫu hợp này được tinh chế qua hai cột tinh chế. Đầu tiên, là cột SOURCE Q (XK 16 mL, Amersham Biosciences) được sử dụng để loại bỏ một lượng lớn globulin miễn dịch Fc không tham gia vào phản ứng ngẫu hợp. Bằng cách sử dụng 20 mM Tris (pH 7,5) và 1M NaCl cùng với các gradien muối, globulin miễn dịch Fc có độ gắn kết tương đối yếu được rửa giải sớm nhất, và sau đó exendin-4-globulin miễn dịch Fc được rửa giải. Sau quá trình tinh chế đầu tiên, mặc dù globulin miễn dịch Fc được loại bỏ tới một mức nhất định, nhưng do globulin miễn dịch Fc và exendin-4-globulin miễn dịch Fc có các độ gắn kết tương đương nhau trong các cột trao đổi ion, nên khó có thể tách chúng ra khỏi nhau một cách hoàn toàn. Do đó, việc tinh chế lần hai được tiến hành bằng cách sử dụng tính kỵ nước của mỗi chất liệu này. Sử dụng 20 mM Tris (pH 7,5) và 1,5M amoni sulfat trong cột SOURCE ISO (HR 16 mL, Amersham Biosciences), các mẫu tinh chế đầu tiên được kết hợp, và mẫu này được rửa giải bằng nồng độ giảm dần của amoni sulfat. Trong cột HIC, globulin miễn dịch Fc có độ gắn kết yếu hơn được rửa giải sớm nhất, và sau đó mẫu exendin-4-globulin miễn dịch Fc có độ gắn kết mạnh được rửa giải. Do có tính kỵ nước khác nhau rõ rệt, nên chúng có thể dễ dàng được tách ra khỏi nhau hơn so với ở trong cột trao đổi ion.

Cột: SOURCE Q (XK 16 mL, Amersham Biosciences)

Lưu lượng: 2,0 mL/phút

Gradien: A0 →25% trong 70 phút B (A: 20mM Tris, độ pH = 7,5, B: A+ NaCl 1M)

Cột: SOURCE ISO (HR 16 mL, Amersham Biosciences)

Lưu lượng: 7,0 mL/phút

Gradien: B 100 →0% trong 60 phút B (A: 20 mM Tris, độ pH = 7,5, B: A +

amoni sulfat 1,5M)

Ví dụ 3: Thử nghiệm hiệu quả của việc dùng đồng thời thể tiếp hợp insulin tác dụng kéo dài và thể tiếp hợp exendin-4 tác dụng kéo dài trên bệnh đái tháo đường do STZ (Streptozotoxin) gây ra

Để thực hiện thử nghiệm hiệu quả *in vivo* của việc dùng chế phẩm chứa thể tiếp hợp insulin tác dụng kéo dài và thể tiếp hợp exendin-4 tác dụng kéo dài đã điều chế ở các Ví dụ 1 và 2 hoặc việc dùng đồng thời thể tiếp hợp insulin tác dụng kéo dài và thể tiếp hợp exendin-4 tác dụng kéo dài, các biến đổi về các mức glucoza huyết được đánh giá bằng cách sử dụng chuột nhắt bị đái tháo đường do STZ (Streptozotoxin) gây ra.

Bệnh đái tháo đường được tạo ra ở chuột nhắt C57BL/6 bảy tuần tuổi đã cho nhịn đói trong 16 giờ bằng cách tiêm trong màng bụng dung dịch STZ (50mg/kg, 1mg/mL) trong 10mM chất đệm xitrat (độ pH = 4,5) trong 5 ngày liên tiếp. Sau 2 ngày, 1-2 giọt máu được rút ra từ tĩnh mạch đuôi bằng cách sử dụng xi lanh 26 G, và mức glucoza huyết được xác định bằng cách dùng kế (OneTouch Ultra, LifeScan, Inc., USA). Sự sinh bệnh học đái tháo đường được xác định bởi glucoza huyết đo được (350-600 mg/dL).

Các con chuột nhắt đã bị gây bệnh đái tháo đường được chia thành năm nhóm mỗi nhóm 5 con: G1, G2, G3, G4 và G5.

Các nhóm này được chia thành nhóm đối chứng không được xử lý (chỉ dùng chất dẫn thuốc), nhóm được xử lý bằng thể tiếp hợp exendin-4 tác dụng kéo dài (5mcg/kg), nhóm được xử lý bằng thể tiếp hợp insulin tác dụng kéo dài (100mcg/kg), nhóm được xử lý bằng thể tiếp hợp exendin-4 tác dụng kéo dài (5 mcg/kg) và thể tiếp hợp insulin tác dụng kéo dài (50 mcg/kg), và nhóm được xử lý bằng thể tiếp hợp exendin-4 tác dụng kéo dài (5mcg/kg) và thể tiếp hợp insulin tác dụng kéo dài (100mcg/kg). Sau khi được xử lý bằng các chất thử nghiệm trên, các biến đổi về các mức glucoza huyết hằng ngày được xác định cho mỗi nhóm.

Kết quả là, việc xử lý đồng thời thể tiếp hợp insulin tác dụng kéo dài và thể tiếp hợp exendin-4 tác dụng kéo dài cho mức glucoza huyết ổn định và hiệu

quả hạ glucoza huyết kéo dài (FIG.1), và tạo ra các mức glucoza huyết thấp một cách đáng kể, khi so với việc dùng đơn lẻ thể tiếp hợp exendin-4 tác dụng kéo dài hoặc thể tiếp hợp insulin tác dụng kéo dài.

Những kết quả này chứng tỏ rằng việc dùng đồng thời thể tiếp hợp insulin tác dụng kéo dài và thể tiếp hợp exendin-4 tác dụng kéo dài theo sáng chế tạo ra hiệu quả hạ glucoza huyết ổn định và kéo dài, và do vậy làm giảm một cách đáng kể liều lượng dùng thuốc, dẫn đến sự giảm bớt các tác dụng phụ của exendin-4 như ói mửa và buồn nôn và phòng ngừa sự tăng cân do việc điều trị bằng insulin.

Ví dụ 4: các biến đổi về mức glucoza huyết lúc đói (Δ FBG) và thể trọng (Δ BW) bởi việc dùng đồng thời thể tiếp hợp insulin tác dụng kéo dài và thể tiếp hợp exendin-4 tác dụng kéo dài

Để thực hiện thử nghiệm hiệu quả *in vivo* của việc dùng chế phẩm chứa thể tiếp hợp insulin tác dụng kéo dài và thể tiếp hợp exendin-4 tác dụng kéo dài đã điều chế ở các Ví dụ 1 và 2 hoặc việc dùng đồng thời thể tiếp hợp insulin tác dụng kéo dài và thể tiếp hợp exendin-4 tác dụng kéo dài, sự cải thiện về các nồng độ glucoza huyết và ức chế sự tăng cân được đánh giá bằng cách sử dụng chuột db/db đái tháo đường type II.

Các chuột nhất db/db đái tháo đường type II được chia thành nhóm dùng đơn lẻ và nhóm dùng đồng thời thể tiếp hợp insulin tác dụng kéo dài và thể tiếp hợp exendin-4 tác dụng kéo dài. Các nhóm dùng đơn lẻ được xử lý lần lượt bằng 430nmol/kg thể tiếp hợp insulin tác dụng kéo dài và 2,3nmol/kg thể tiếp hợp exendin-4 tác dụng kéo dài bằng cách tiêm dưới da một lần mỗi tuần. Các nhóm dùng đồng thời được xử lý bằng 108nmol/kg và 216nmol/kg thể tiếp hợp insulin tác dụng kéo dài và 2,3 nmol/kg thể tiếp hợp exendin-4 tác dụng kéo dài. Thử nghiệm này được tiến hành trong 28 ngày, và các con chuột thử nghiệm này bị để nhịn đói trong 8 giờ trước khi xử lý bằng thuốc lần đầu và vào ngày cuối cùng của thử nghiệm, và sau đó các biến đổi về mức glucoza huyết lúc đói (Δ FBG) và thể trọng (Δ BW) trước khi xử lý bằng thuốc và vào ngày cuối cùng của thử nghiệm được kiểm tra và được tính toán là các thông số

thử nghiệm cuối.

Các kết quả đo Δ FBG và Δ BW cho thấy rằng việc dùng đồng thời thể tiếp hợp insulin tác dụng kéo dài và thể tiếp hợp exendin-4 tác dụng kéo dài sau một tuần cho các hiệu quả mỹ mãn về sự cải thiện nồng độ glucoza huyết (FIG.2) và việc ức chế sự tăng cân (FIG.3) với liều lượng một phần tư của insulin (108 nmol/kg), so với việc dùng đơn lẻ thể tiếp hợp insulin tác dụng kéo dài. Những kết quả này cho thấy rằng việc dùng đồng thời thể tiếp hợp insulin tác dụng kéo dài và thể tiếp hợp CA exendin-4 tác dụng kéo dài có ưu điểm là giảm bớt nguy cơ hạ glucoza huyết và ức chế sự tăng cân nhờ việc giảm bớt liều lượng dùng insulin, chứng tỏ rằng ngay cả khi việc dùng đồng thời được tiến hành một lần mỗi tuần, thì vẫn có kết quả mỹ mãn về hiệu quả hạ glucoza huyết, so với việc tiêm hằng ngày insulin và chất chủ vận GLP-1, và cũng tạo ra sự kiểm soát glucoza huyết mỹ mãn so với việc dùng đơn lẻ, và cho phép giảm bớt nhu cầu insulin, nhờ đó giảm bớt nguy cơ hạ glucoza huyết và sự tăng cân gây ra bởi insulin.

Những kết quả này chứng tỏ rằng, ngay cả khi dùng một lần mỗi tuần, thì được phẩm chứa thể tiếp hợp insulin tác dụng kéo dài và thể tiếp hợp exendin-4 tác dụng kéo dài theo sáng chế vẫn tạo sự kiểm soát glucoza huyết mỹ mãn và không gây ra sự tăng cân do việc điều trị bằng insulin, đồng thời giảm bớt một cách đáng kể các tác dụng phụ do việc dùng đơn lẻ đã biết peptit insulin và exendin-4.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Dược phẩm chứa thể tiếp hợp insulin tác dụng kéo dài và thể tiếp hợp peptit kích thích insulin tác dụng kéo dài, trong đó mỗi thể tiếp hợp trong số thể tiếp hợp insulin tác dụng kéo dài và thể tiếp hợp peptit kích thích insulin tác dụng kéo dài được tạo ra bằng cách liên kết insulin hoặc peptit kích thích insulin với một vùng globulin miễn dịch Fc qua một cầu nối không phải peptit được chọn từ nhóm bao gồm polyetylen glycol, polypropylen glycol, copolyme etylen glycol-propylen glycol, polyol đã polyoxyetyl hóa, rượu polyvinyl, dextran, polyvinyl etyl ete, polyme dễ bị phân hủy sinh học, polyme lipid, chitin, axit hyaluronic, và hỗn hợp của chúng;

trong đó peptit kích thích insulin được chọn từ nhóm bao gồm peptit tương tự glucagon-1, exendin-3, exendin-4, dẫn xuất exendin-4 được tạo ra bằng cách làm khuyết đoạn nhóm amin đầu cuối N, dẫn xuất exendin-4 được tạo ra bằng cách thay thế nhóm amin đầu cuối N bằng nhóm hydroxyl, dẫn xuất exendin-4 được tạo ra bằng cách cải biến nhóm amin đầu cuối N bằng nhóm dimetyl, và dẫn xuất exendin-4 được tạo ra bằng cách làm khuyết đoạn α -cacbon của axit amin đầu tiên của exendin-4;

trong đó insulin của thể tiếp hợp insulin tác dụng kéo dài được chọn từ nhóm bao gồm các nhóm (i)-(v) sau đây:

(i) insulin nguyên thể chứa peptit thứ nhất có trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO: 1 và peptit thứ hai có trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO: 2;

(ii) insulin gốc;

(iii) biến thể insulin chứa peptit thứ nhất có trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO: 1 và peptit thứ hai có trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO: 2, trong đó một hoặc nhiều gốc axit amin có trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO: 1 và/hoặc SEQ ID NO: 2 là khác với trình tự axit amin của insulin nguyên thể (i) bởi việc thay thế, làm khuyết đoạn, cải biến, và/hoặc bổ sung, trong đó biến thể insulin này lưu giữ chức năng kiểm soát nồng độ

glucoza huyết trong cơ thể của đối tượng mà được cung cấp biến thể insulin này;

(iv) peptit dẫn xuất insulin có trình tự axit amin tương đồng so với insulin nguyên thể (i) ít nhất 80%, trong đó nhóm hóa học của một hoặc nhiều gốc axit amin có trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO: 1 và/hoặc SEQ ID NO: 2 được cải biến hóa học, và trong đó peptit dẫn xuất insulin lưu giữ chức năng kiểm soát nồng độ glucoza huyết trong cơ thể của đối tượng mà được cung cấp peptit dẫn xuất insulin; hoặc

(v) mảnh insulin nguyên thể (i), mảnh này có một hoặc nhiều axit amin đã bị khuyết đoạn ở đầu cuối N hoặc đầu cuối C của insulin nguyên thể (i) hoặc có các axit amin không có trong tự nhiên, trong đó mảnh này lưu giữ chức năng kiểm soát nồng độ glucoza huyết trong cơ thể của đối tượng mà được cung cấp mảnh này; và

trong đó câu nói không phải peptit có trọng lượng phân tử nằm trong khoảng từ 1kDa đến 100kDa.

2. Dược phẩm theo điểm 1, trong đó insulin được cải biến bằng polyme không phải peptidyl.

3. Dược phẩm theo điểm 2, trong đó polyme không phải peptidyl được chọn từ nhóm bao gồm polyetylen glycol, polypropylen glycol, copolyme etylen glycol-propylen glycol, polyol đã polyoxyetyl hóa, rượu polyvinyl, polysacarit, đextran, polyvinyl etyl ete, polyme dễ bị phân hủy sinh học, polyme lipid, chitin, axit hyaluronic, và hỗn hợp của chúng.

4. Dược phẩm theo điểm 1, trong đó vùng globulin miễn dịch Fc không được glycosyl hóa.

5. Dược phẩm theo điểm 1, trong đó vùng globulin miễn dịch Fc chứa từ một đến bốn miền được chọn từ nhóm bao gồm CH1, CH2, CH3 và CH4.

6. Dược phẩm theo điểm 1, trong đó vùng globulin miễn dịch Fc còn chứa vùng bản lề.

7. Dược phẩm theo điểm 1, trong đó vùng globulin miễn dịch Fc là vùng Fc có nguồn gốc từ IgG, IgA, IgD, IgE, hoặc IgM.

8. Dược phẩm theo điểm 1, trong đó vùng globulin miễn dịch Fc bao gồm các miễn có nguồn gốc khác nhau, trong đó nguồn gốc này được chọn từ nhóm bao gồm IgG, IgA, IgD, IgE, và IgM.
9. Dược phẩm theo điểm 1, trong đó vùng globulin miễn dịch Fc là một dime hoặc multimer chứa các globulin miễn dịch chuỗi đơn có cùng nguồn gốc.
10. Dược phẩm theo điểm 1, trong đó dược phẩm này còn chứa chất mang dược dụng.
11. Dược phẩm theo điểm 1, trong đó trong đó thể tiếp hợp insulin tác dụng kéo dài và thể tiếp hợp peptit kích thích insulin tác dụng kéo dài được cung cấp đồng thời, lần lượt, hoặc xen kẽ.
12. Dược phẩm theo điểm 1, trong đó insulin gốc là insulin detemir, insulin glargin, hoặc insulin deglude.

Mức glucoza huyết (mg/dl)

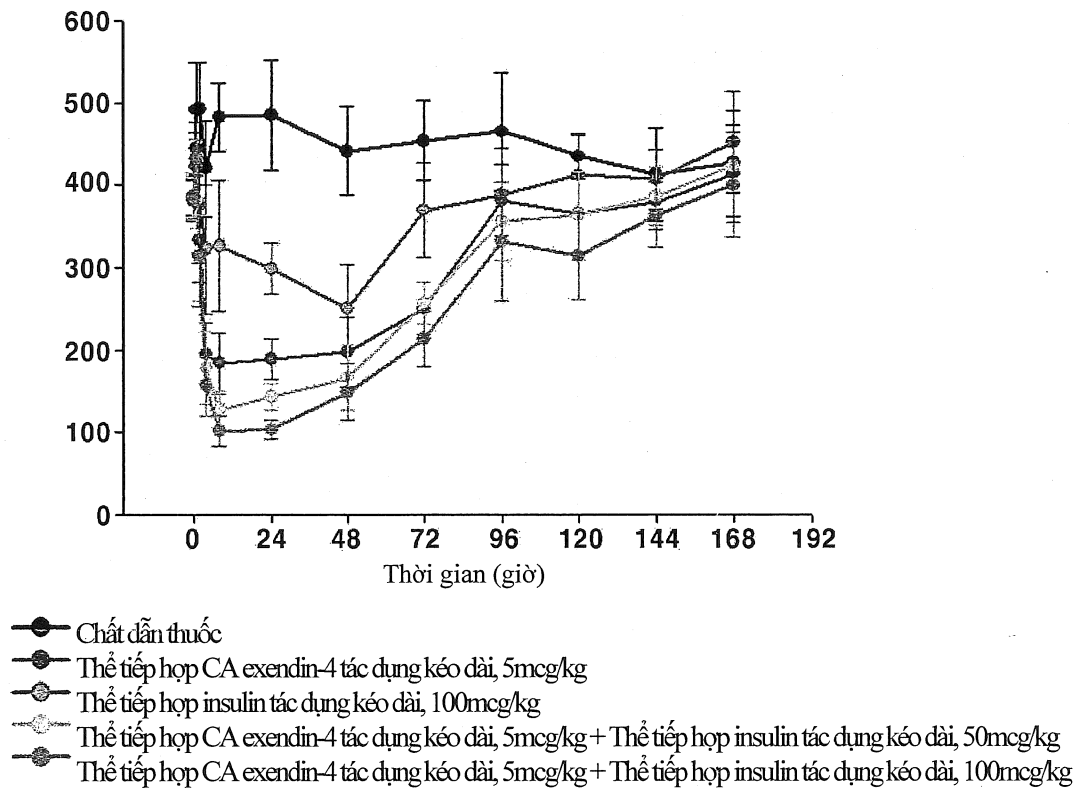


FIG.1

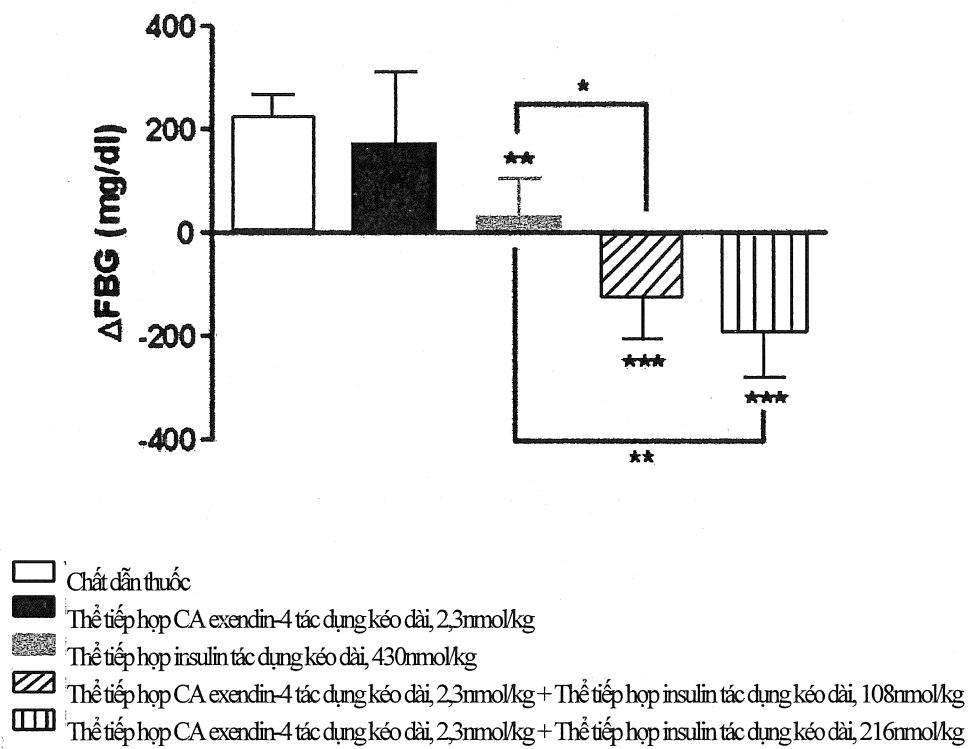


FIG.2

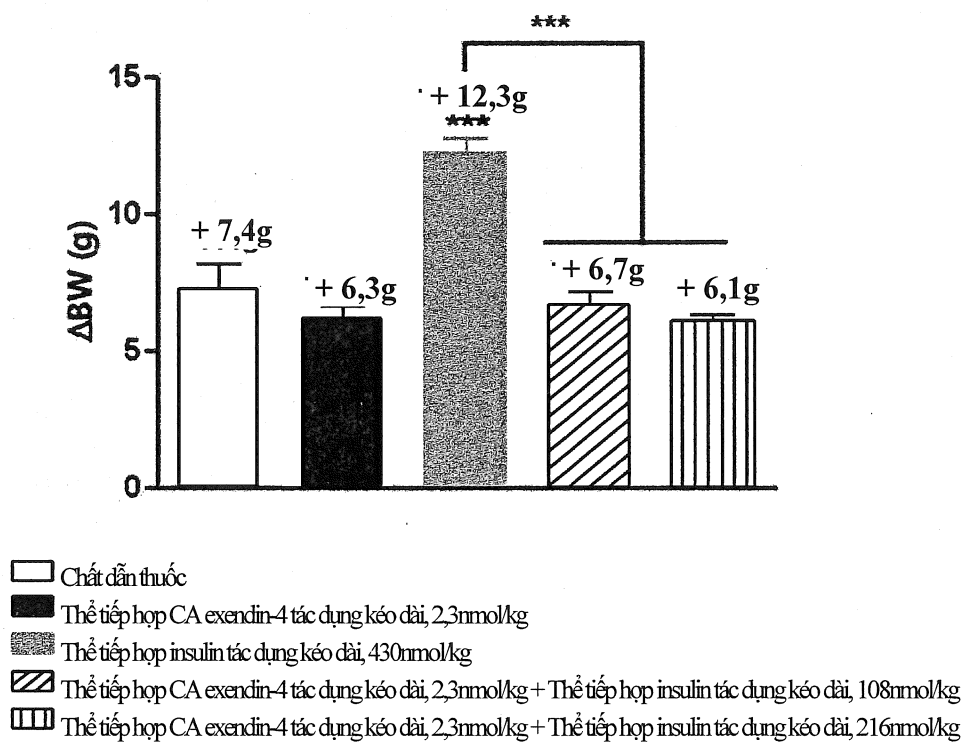


FIG.3

DANH MỤC TRÌNH TỰ

- <110> Hanmi Science Co., Ltd.
- <120> Dược phẩm chứa thể tiếp hợp insulin tác dụng kéo dài và thể tiếp hợp peptit kích thích insulin tác dụng kéo dài để phòng ngừa hoặc điều trị bệnh đái tháo đường
- <130> OPA12061
- <150> KR10-2011-0053488
- <151> 2011-06-02
- <160> 5
- <170> KopatentIn 1.71
- <210> 1
- <211> 21
- <212> PRT
- <213> Trình tự nhân tạo
- <220>
- <223> Chuỗi alpha của insulin
- <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> Trình tự nhân tạo
- <220>
- <223> Chuỗi beta của insulin
- <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
- <210> 3
- <211> 31
- <212> PRT
- <213> Trình tự nhân tạo
- <220>
- <223> GLP-1(7-37)
- <400> 3

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
 1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly
 20 25 30

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

<220>
 <223> Exendin-3

<400> 4
 His Ser Asp Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
 1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
 20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
 35

<210> 5
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Exendin-4

<400> 5
 His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
 1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
 20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
 35