



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **114192** (13) **C2**
(51) МПК (2017.01)
C07K 19/00
C07K 1/10 (2006.01)
A61K 47/50 (2017.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(21) Номер заявки: а 2014 10250	(72) Винахідник(и): Чан М'юн Х'юн (KR), Кім Мін Юн (KR), Лі Чон-Су (KR), Кім Те Чін (KR), Пе Сун Мін (KR), Квон Се Чхан (KR)
(22) Дата подання заявки: 08.03.2013	(73) Власник(и): ХАНМІ САЙЕНС КО., ЛТД., 550, Dongtangiheung-ro, Dongtan-myeon, Hwaseong-si, Gyeonggi-do 445-813, Republic of Korea (KR)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: 10.05.2017	(74) Представник: Крилова Надія Іванівна, реєстр. №30
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Парижської конвенції: 10-2012-0024136	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: WO 2010011096 A2, 28.01.2010 WO 2011122921 A2, 06.10.2011 WO 2009069983 A2, 04.06.2009 KR 1020090056796 A, 03.06.2009 US 20040180054 A1, 16.09.2004 WO 2012011752 A2, 26.01.2012 Phase I Evaluation of CDP791, a PEGylated Di-Fab' Conjugate that Binds Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2 / Ton N.C., Parker G.J.M., Jackson A. et al.// Clin Cancer Res. - 2007. - Vol.13. - P. 7113-7118
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Парижської конвенції: 08.03.2012	
(33) Код держави-учасниці Парижської конвенції, до якої подано попередню заяву: KR	
(41) Публікація відомостей про заяву: 25.11.2014, Бюл.№ 22	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.05.2017, Бюл.№ 9	
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: PCT/KR2013/001885, 08.03.2013	

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ФІЗІОЛОГІЧНО АКТИВНОГО ПОЛІПЕПТИДНОГО КОМПЛЕКСУ

(57) Реферат:

Винахід належить до способу одержання комплексу фізіологічно активний поліпептид-непептидильний полімер-константна ділянка імуноглобуліну, за яким фізіологічно активний поліпептид ковалентно зв'язується з константною ділянкою імуноглобуліну через непептидильний лінкер, причому концентрація відновлюючого агента в першій реакції становить від 1 мМ до менш ніж 20 мМ.

UA 114192 C2

Галузь техніки

Представлений винахід стосується способу одержання комплексу, в якому фізіологічно активний поліпептид є ковалентно зв'язаним з константною ділянкою імуноглобуліну через непептидильний полімерний лінкер, що містить два або більше альдегідів, як функціональні групи. Більш конкретно, представлений винахід стосується способу ефективного одержання фізіологічно активного поліпептидного комплексу, що характеризується покращенням стану проблем низького виходу одержання та реагентної поліпептидної деформації шляхом регулювання застосування відновлюючого агента при його одержанні.

Рівень техніки

Загалом, фізіологічно активні поліпептиди є такими, що легко денатурують завдяки їх низькій стабільності, та легко піддаються протеолітичній деградації в крові та подальшому нирковому або печінковому кліренсу. Тому, існує необхідність частого введення пацієнту протеїнових лікарських засобів, що містять фізіологічно активні поліпептиди, як фармацевтичні інгредієнти, для того, щоб підтримувати відповідні рівні та титри сироватки. Однак, така частота введення протеїнових лікарських засобів, більшість з яких знаходиться в формі ін'єкцій, викликає біль у пацієнтів та має високу вартість лікування. Для вирішення даних проблем, багато зусиль було вкладено в покращення стабільності в сироватці протеїнових лікарських засобів та підтримання лікарських засобів в крові на високих рівнях протягом тривалого періоду часу, щоб максимізувати фармацевтичну ефективність лікарських засобів. Згідно з вимогами щодо застосування препаратів пролонгованої дії, протеїнові лікарські засоби повинні бути сформульовані таким чином, щоб мати високу стабільність, та їх титр повинен підтримуватися на достатньо високому рівні без спричинення імунних реакцій у пацієнтів.

Традиційний підхід до стабілізації протеїнів, та запобігання ферментативному розщепленню, та нирковому кліренсу є хімічне модифікування поверхні протеїнового лікарського засобу полімером, що має високу розчинність, таким як поліетиленгліколь (далі в даному документі зазначається як "ПЕГ"). За рахунок зв'язування з конкретними або різними ділянками протеїну-мішені, ПЕГ робить розчинність протеїну вищою, тим самим стабілізуючи протеїн та запобігаючи гідролізу, не викликаючи серйозні побічні ефекти (Sada et al., J. Fermentation Bioengineering 71: 137-139).

Наприклад, WO 2006/076471 розкриває спосіб виробництва натрійуретичного пептиду В-типу (BNP) тривалої дії шляхом кон'югування його з ПЕГами, який зв'язується з рецептором А натрійуретичного пептиду (NPR-A), щоб ініціювати синтез цГМФ, тим самим зменшуючи артеріальний тиск. Таким чином, це застосовують в лікуванні застійної серцевої недостатності. Патент США № 6,924,264 описує спосіб вдосконалення тривалості *in vivo* ексендину-4 шляхом ПЕГілювання його лізиновим залишком. Однак, в такому способі, незважаючи на його здатність збільшувати час циркуляції пептидного лікарського засобу шляхом збільшення молекулярної маси ПЕГ, ПЕГілювання має проблеми, такі як значне зниження титрів пептидного лікарського засобу та зниження виходу завдяки зниженій реактивності пептиду, так як молекулярна маса ПЕГ збільшується.

WO 02/46227 розкриває злиті протеїни, в яких ГПП-1 та ексендин-4 або їх аналоги є кон'югованими з сироватковим альбуміном людини або імуноглобуліновим фрагментом (Fc), одержаним шляхом генетичної рекомбінації. Патент США № 6,756,480 описує злитий протеїн, в якому паратиреоїдний гормон (ПТГ) або його аналог є зв'язаним з Fc. Хоча дані способи можуть оцінювати як такі, що вирішують проблеми ПЕГілювання, такі як низький вихід та не специфічність, їх дія на підвищення *in vivo* періоду напіввиведення, як показано, не є значною, всупереч очікуванню, та надалі в деяких випадках злиті протеїни мають низькі титри. В той час, як застосовують різноманітність пептидильних лінкерів так, щоб максимізувати ефект збільшення серологічного періоду напіввиведення, вони мають здатність викликати імунні відповіді. Крім того, пептид, що має дисульфідний зв'язок, такий як BNP, має труднощі в практичному застосуванні, тому що є високо прийнятним, щоб викликати неправильне згортання. Більш того, пептидильний лінкер з неприродним амінокислотним залишком є неможливим для одержання за допомогою генетичної рекомбінації.

Інсулін є пептидом, який секретується бета-клітинами підшлункової залози у людей, та займає центральне місце щодо регулювання рівня глюкози в крові в організмі. Коли інсулін не секретується належним чином або секретований інсулін адекватно не функціонує в організмі, рівні глюкози крові не можуть контролюватися та підвищуються, в результаті призводячи до цукрового діабету. Останній випадок називають діабетом типу 2. Випадок, коли інсулін не може секретуватись підшлунковою залозою та спричиняє підвищені рівні глюкози крові, з іншого боку, в результаті призводить до діабету типу 1. Пацієнтів з діабетом типу 2 лікують пероральними

гіпоглікемічними агентами, та деяких з них лікують інсуліном. В той же час, ін'єкція інсуліну, переважно, є потрібною для пацієнтів з діабетом типу 1.

Як правило, інсулінову терапію проводять шляхом введення інсуліну за допомогою ін'єкції тричі на день кожен раз після або до споживання їжі. Однак, постійне введення інсуліну тричі на день є болісним та спричиняє незручності для пацієнтів. Багато спроб зроблено, щоб вирішити дані проблеми. Однією стратегією, що призначена для підвищення проникності протейнових лікарських засобів крізь біомембрану, є доставка їх пероральною або назальною інгаляцією. Однак, введення пероральною або назальною інгаляцією є суттєво низьким щодо ефективності доставки в порівнянні з ін'єкцією, та має труднощі в утриманні пептидних лікарських засобів на рівні, необхідному для активності *in vivo*.

Як альтернативна стратегія, надмірну кількість лікарського засобу можуть ін'єкційно вводити підшкірно та може всмоктуватися в організм уповільненим способом так, щоб підтримувати постійний рівень в крові навіть при ін'єкції один раз на день. Деякі з лікарських засобів (наприклад, Лантус, Sanofi-aventis) є схваленими щодо комерційного застосування, та їх на даний момент вводять пацієнтам. Зокрема, дослідження проводять в напрямку модифікації інсуліну з жирними кислотами, щоб зробити зв'язування кон'югатів інсуліну більш сильним та розширити тривалість шляхом комбінування з альбуміном в місці ін'єкції або в крові. Деякі з лікарських засобів (наприклад, Левемір, NovoNordisk) є схваленими щодо комерційного застосування. Однак, дані лікарські засоби викликають біль в місці ін'єкції та повинні ін'єкційно вводитись один раз в день, які є все ще великим тягарем для пацієнтів.

Для подолання проблем, що виникають в попередньому рівні техніки, представлені винахідники одержали комплекс, що містить фізіологічно активний поліпептид та константну ділянку імуноглобуліну, які з'єднані із застосуванням непептидильного полімеру, як лінкера, як стратегію одночасного збільшення плазмового періоду напіввиведення та тривалості дії *in vivo* фізіологічно активного поліпептиду, такого як, інсулін. Однак, крім того, існує потреба в способі одержання комплексу з високим виходом та з високим ступенем чистоти, тому що компоненти комплексу є дуже дорогими. Маючи це на увазі, представлені винахідники розробили спосіб одержання комплексів фізіологічно активного поліпептиду зі зниженою вартістю, високим виходом та високим ступенем чистоти за рахунок застосування відповідних видів відновлюючих агентів з оптимальною концентрацією в розчині під час реакції одержання комплексу, таким чином, завершуючи представлений винахід.

Розкриття

Технічна проблема

Об'єктом за представленим винаходом є здійснення ефективного способу одержання комплексу, в якому фізіологічно активний поліпептид є ковалентно зв'язаним з константною ділянкою імуноглобуліну через непептидильний полімерний лінкер, що містить два або більше альдегіди, як функціональні групи, який характеризується тим, що проблеми щодо низького виходу одержання та реагентної поліпептидидної деформації зменшуються шляхом застосування прийнятних видів відновлюючих агентів з оптимальною концентрацією в реакційному розчині під час реакції.

Технічне рішення

В одному аспекті для здійснення зазначеного вище об'єкту, представлений винахід передбачає спосіб одержання комплексу фізіологічно активний поліпептид-непептидильний полімер-константна ділянка імуноглобуліну, який включає (1) реагування непептидильного полімеру, що має два або більше альдегіди, як функціональні групи, з одним з фізіологічно активних поліпептидів або константною ділянкою імуноглобуліну в присутності відновлюючого агента в концентрації 1-20 мМ; та (2) реагування реакційної суміші (1) з іншим фізіологічно активним поліпептидом або константною ділянкою імуноглобуліну в присутності відновлюючого агента в концентрації 1-100 мМ.

Реакційна суміш може містити кон'югат непептидильного полімеру та фізіологічно активного поліпептиду або кон'югат непептидильного полімеру та константної ділянки імуноглобуліну, та/або реагенти, що залишилися незмінними. Таким чином, спосіб за представленим винаходом може додатково включати відокремлення кон'югату фізіологічно активного поліпептиду-непептидильного полімеру або кон'югату імуноглобуліну-непептидильного полімеру від реакційної суміші після стадії (1).

Термін "непептидильний полімер", який застосовується в даному документі, стосується біосумісного полімеру, що складається з, щонайменше, двох повторюваних ланок, які утримуються разом за рахунок довільного ковалентного зв'язку, крім пептидного зв'язку. Приклади непептидильного полімеру, прийнятного в представленому винаході включають поліетиленгліколі, поліпропіленгліколі, співполімери етиленгліколю та пропіленгліколю,

поліоксіетильовані поліолі, полівінільні спирти, полісахариди, декстрини, полівінілетилові етери, полімери, що біорозкладаються, такі як полімолочна кислота (PLA) та полімолочна-гліколева кислота (PLGA), ліпідні полімери, хітини, гілауронова кислота та їх комбінації, де перевага надається поліетилєнглїколю (ПЕГ). Його похідні, що є добре відомими в даній галузі з рівня техніки, та похідні, які можуть бути легко одержані, застосовуючи способи, відомі в даній галузі з рівня техніки, також знаходяться в межах обсягу представленого винаходу.

Як описано вище, непептидильний полімер може мати два або більше альдегіди, як функціональні групи. Таким чином, непептидильний полімер, зазначений вище, може бути в бі- або мульти-функціональній альдегідній формі сам по собі або містить замісник, що має альдегідну групу, переважно, при його двох або більше спиртових групах. замісник, що має альдегідну групу може бути алкілальдегідом, таким як пропіональдегід або бутілальдегід. В одному переважному втіленні, непептидильним полімером може бути ПЕГ з пропіональдегідним замісником на кожному з його кінців.

Недоліком загальноприйнятих пептидильних лінкерів, які застосовують в злитих протеїнах, сконструйованих за способом злиття в середині рамки, є те, що вони легко розщеплюються *in vivo* протеїназами та, таким чином, не можуть гарантувати тривалість сироваткового періоду напіввиведення носієм, всупереч очікуванню. Однак, в представленому винаході застосовують полімер, який є стійким до протеази, та, таким чином, період напіввиведення пептиду з плазми може підтримуватись на рівні подібному до того, що у носія. Внаслідок цього, оскільки він є стійким до протеїназ *in vivo*, будь-який непептидильний полімер можуть застосовувати в представленому винаході, без обмеження. Молекулярна маса непептидильного полімеру знаходиться в діапазоні від 1 до 100 кДа та переважно від 1 до 20 кДа. До того ж, непептидильний полімер, який зв'язують з фізіологічно активним поліпептидом, може бути індивідуальним полімером або комбінацією різних полімерів. Крім того, непептидильний полімер прийнятний в представленому винаході може мати функціональні групи на його двох або трьох кінцях, які можуть бути сполученими з фізіологічно активним поліпептидом та константною ділянкою імуноглобуліну. Переважно, функціональні групи можуть бути альдегідними.

Кон'югація з ПЕГ, яку, як правило, застосовують, щоб отримати пролонгованої дії композиції з протеїновими лікарськими засобами, підвищує стабільність протеїнів, в той же час більші молекулярні маси ПЕГ демонструють меншу реакційну здатність з протеїнами та, таким чином, знижують вихід одержання. Оскільки вихід одержання повністю корелює з вартістю одержання та можливістю впровадження в промисловості, дуже важливим є підвищення виходу одержання. ПЕГ з альдегідами, як функціональними групами, можуть сполучати з аміногрупою, яка є присутньою на N-кінці або на бічному ланцюгу Lys залишку фізіологічно активного поліпептиду або константної ділянки імуноглобуліну. В зв'язку з цим, вихід ПЕГілювання може варіювати в залежності від різних чинників, включаючи молярне співвідношення ПЕГ до протеїнів, концентрацію реакційних розчинів, час реакції, pH, температуру, тощо. Chem. Biol. Drug Des. 2007; 69; 132-138 описує ПЕГілювання інсуліну, яке виконують з 5 K альдегідом mПЕГ з виходом понад 90 % шляхом регулювання різних чинників, включаючи молярні співвідношення, час реакції, pH, тощо. В US 2009/0252703A1, доповідається, що додавання органічного розчинника до реакційного розчину підвищує вихід ПЕГілювання пептиду. WO 2010/089756A2 розкриває покращення виходу ПЕГілювання шляхом взаємодії r-metHuG-CSF з ПЕГ в присутності карбогідрату.

Однак, коли непептидильний полімер, що містить ПЕГ з двома або більше функціональними групами, застосовують як лінкер між двома різними поліпептидами, то необхідним є здійснення двох або більше стадій в реакції, що, таким чином, знижує загальний вихід. Зокрема, спостерігалось, що стадію другої реакції (на якій фізіологічно активний поліпептид або константна ділянка імуноглобуліну є кон'югованими з непептидильним полімером, що має дві або більше функціональні групи, піддають взаємодії з константною ділянкою імуноглобуліну або фізіологічно активним поліпептидом, відповідно, далі в даному документі називають "реакцією сполучення") проводять з суттєво нижчим виходом, в порівнянні зі стадією першої реакції, в якій фізіологічно активний поліпептид або константна ділянка імуноглобуліну піддають взаємодії з непептидильним полімером, що має дві або більше функціональні групи.

В представленому винаході, продемонстровано, що концентрація відновлюючого агента в першій реакції корелює з виходом другої реакції сполучення. Більш високі виходи реакції сполучення спостерігали з більш низькими концентраціями відновлюючого агенту, меншим часом реакції та нижчими температурами реакції в першій реакції.

Як застосовується в даному документі, термін "відновлюючий агент" стосується сполуки, яка функціонує для зниження оборотного подвійно утвореного іміну в реакції між альдегідною групою непептидильного полімеру та аміногрупою поліпептидів (фізіологічно активний

поліпептид, константна ділянка імуноглобуліну), де внаслідок цього утворюється ковалентний зв'язок, та є призначеним для охоплення всіх відновлюючих агентів, відомих в даній галузі з рівня техніки. В межах представленого винаходу, відновлюючий агент можуть додавати до реакційного розчину, в якому непептидильний полімер утворює ковалентний зв'язок з фізіологічно активним поліпептидом або константною ділянкою імуноглобуліну. За умови, що його, як правило, застосовують в даній галузі, будь-який відновлюючий агент можуть застосовувати в представленому винаході. Приклади відновлюючого агента можуть включати, але не обмежуються цим, натрію ціаноборгідрид, боран-піридиновий комплекс, натрію боргідрид, боран-диметиламіновий комплекс, боран-триметиламіновий комплекс та натрію триацетоксидборгідрид. Відповідний відновлюючий агент може бути вибраний в залежності від видів фізіологічно активного поліпептиду або константної ділянки імуноглобуліну та розчинника реакції.

Відновлюючий агент застосовують для кон'югації фізіологічно активного поліпептиду або константної ділянки імуноглобуліну з непептидильним полімером. Реакційний розчин може містити відновлюючий агент в концентрації 1-20 мМ для реакції між фізіологічно активним поліпептидом або константною ділянкою імуноглобуліну та непептидильним полімером, та в концентрації 1-100 мМ для реакції сполучення. Більш переважно, відновлюючий агент можуть застосовувати в концентрації 1-20 мМ для кон'югації між фізіологічно активним поліпептидом або константною ділянкою імуноглобуліну, та непептидильним полімером, та в концентрації 1-40 мМ для реакції сполучення.

Реакцію кон'югації між фізіологічно активним поліпептидом або константною ділянкою імуноглобуліну та непептидильним полімером (реакція стадії (1)) можуть проводити протягом від 1 до 16 годин та при температурі від 0 до 25 °С. Разом з тим, реакцію сполучення (реакція стадії (2)) можуть проводити протягом від 1 до 48 годин.

Переважно, реакцію стадії (1) можуть проводити протягом від 1 до 16 годин при 0-25 °С в присутності відновлюючого агента в концентрації від 1 до 20 мМ, тоді як реакцію стадії (2) можуть проводити протягом від 1 до 48 годин в присутності відновлюючого агента в концентрації від 1 до 40 мМ.

В одному переважному втіленні, натрію ціаноборгідрид застосовували як відновлюючий агент за різних умов, для того, щоб підвищити вихід одержання комплексу, в якому інсулін, ПЕГ-лінкер, що має два або більше альдегіди як функціональні групи, та константну ділянку імуноглобуліну з'єднують разом. Виявлено, що вихід реакції сполучення збільшується, коли перша реакція, яку виконують, щоб з'єднати фізіологічно активний поліпептид або константну ділянку імуноглобуліну та непептидильний полімер, проводять протягом короткого часу при низькій температурі в присутності низької концентрації відновлюючого агента (таблиця 1).

В іншому переважному втіленні, реакцію здійснювали з різними концентраціями відновлюючого агента боран-піридинового комплексу, та більш високі виходи другої реакції, реакції сполучення, виявляли після того, як застосовували більш низькі концентрації відновлюючого агента в першій реакції між фізіологічно активним поліпептидом або константною ділянкою імуноглобуліну та непептидильним полімером. Випадок, коли як відновлюючий агент застосовували натрію ціаноборгідрид, показує більш високі виходи в порівнянні з випадком, коли застосовували боран-піридиновий комплекс (таблиця 2).

Разом з тим, підтверджено, що вихід другої, реакції сполучення, підвищувався, коли концентрація відновлюючого агента підвищувалась.

В одному переважному втіленні, реакцію сполучення здійснювали при різних концентраціях відновлюючого агента натрію ціаноборгідриду, та одержували покращені виходи реакції сполучення в присутності високої концентрації відновлюючого агента. Однак, дуже висока концентрація відновлюючого агента обумовлювала здійснення аберації константної ділянки імуноглобуліну. Для того, щоб уникнути цього, реакцію сполучення здійснювали протягом 13 годин в присутності 20 мМ натрію ціаноборгідриду, та спостерігали, що її вихід утримували на високому рівні, та аберацію константної ділянки імуноглобуліну відповідно мінімізували (таблиці 3 та 4).

Як застосовується в даному документі, термін "фізіологічно активний поліпептид" стосується поліпептиду, що має певну фізіологічну функцію *in vivo* як загальну концепцію. Він має загалом поліпептидильну структуру та показує різні біологічні активності. Коли організм стає біологічно ненормальним в результаті нестачі або надлишку матеріалу, що бере участь в певній функції, фізіологічно активний поліпептид може регулювати експресію генів або фізіологічну функцію, тим самим корегуючи відхилення. Типовим прикладом є протеїновий лікарський засіб.

Приклади фізіологічно активних поліпептидів, що застосовують в представленому винаході включають гормон росту людини, гормони, що вивільняють гормон росту, пептиди, що

вивільняють гормон росту, інтерферон, рецептори інтерферону, колонієстимулюючі чинники, глюкагон-подібні пептиди (GLP-1, тощо), окситомодулін, G протеїн-сполучені рецептори, інтерлейкіни, рецептори інтерлейкіну, ферменти, інтерлейкін-зв'язуючі протеїни, цитокін-зв'язуючі протеїни, макрофаг-активуєчі фактори, пептиди макрофагу, фактори В-клітин, фактори Т-клітин, протеїн А, інгібітори алергії, глікопротеїни некрозу клітин, імунотоксини, лімфотоксини, фактор некрозу пухлини, супресори пухлини, трансформуючий фактор росту, альфа-1 анти-трипсин, альбумін, α-лактальбумін, аполіпопротеїн-Е, еритропоетин, глікозилований еритропоетин, ангіопоетини, гемоглобін, тромбін, пептиди, що активують рецептор тромбіну, тромбомодулін, фактор крові VII, VIIa, VIII, IX та XIII, активатори плазміногену, фібрин-зв'язуючі пептиди, урокіназу, стрептокіназу, гірудин, протеїн С, С-реактивний протеїн, інгібітор реніну, інгібітор колагенази, супероксиддисмутаза, лептин, фактор росту тромбоцитів, фактор росту епітелію, фактор росту епідермісу, ангіостатин, ангіотензин, фактор росту кістки, кістково-стимулюючий протеїн, кальцитонін, інсулін, атріопептин, хрящевий індукуючий фактор імпульсної відповіді, елкатонін, активуючий фактор сполучної тканини, інгібітор шляху тканинного фактору, фолікулостимулюючий гормон, лютеїнізуючий гормон, гормон, що вивільняє лютеїнізуючий гормон, фактори росту нервів, паратироїдний гормон, релаксин, секретин, соматомедин, інсуліноподібний фактор росту, гормон наднирників, глюкагон, холецистокінін, панкреатичний поліпептид, гастрин-вивільняючий пептид, кортикотропін-вивільняючий фактор, тиреостимулюючий гормон, аутоксин, лактоферин, міостатин, антигени клітинної поверхні, вакцинні антигени вірусного походження, моноклональні антитіла, поліклональні антитіла та антитільні фрагменти.

Інсулін, який застосовують у втіленні за представленим винаходом, є видом фізіологічно активних пептидів, секретованих підшлунковою залозою, коли рівень глюкози крові стає високим, який функціонує, щоб контролювати рівні глюкози в крові, спричиняючи прийняття глюкози печінкою, скелетними м'язами та жировою тканиною з крові та накопичення її як глікогену, та пригнічуючи ліполіз, метаболізм застосування жиру як джерела енергії. Фізіологічно активні пептиди включають агоністи, прекурсори, похідні, фрагменти та варіанти інсулін. Переважними є нативний інсулін, швидко діючий інсулін та інсулін тривалої дії.

Нативний інсулін є гормоном, секретованим підшлунковою залозою, та відіграє вирішальну роль в контролі рівнів глюккри в крові, шляхом стимулювання клітинного поглинання глюкози та інгібування ліполізу. Інсулін, який має функцію регулювання рівнів глюкози в крові, продукується з проінсулінового прекурсору без функції регулювання рівнів глюкози в крові, через серію процесів. Амінокислотна послідовність є наступною:

-Альфа ланцюг:

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)

-Бета ланцюг:

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)

Термін "агоніст інсуліну", як застосовується в даному документі, стосується речовини, яка може зв'язуватись *in vivo* з інсуліновим рецептором та демонструє таку саму біологічну активність що й інсулін незалежно від структури інсуліну.

Термін "похідна інсуліну", як застосовується в даному документі, стосується пептиду, який функціонує, щоб контролювати рівні глюкози в крові *in vivo* та має амінокислотну послідовність, яка має, щонайменше, 80 % гомологічності з нативним інсуліном. В деяких амінокислотних залишках може відбуватися хімічне заміщення (наприклад, альфа-метилування, альфа-гідроксилування), делеція (наприклад, деамінування) або модифікування (наприклад, N-метилування, глікозилювання, жирні кислоти).

Як застосовується в даному документі, термін "фрагмент інсуліну" стосується пептиду, що має функцію контролювання рівнів глюкози в крові *in vivo*, одержану шляхом додавання щонайменше однієї амінокислоти до або видаленням, щонайменше, однієї амінокислоти з амінного або карбоксильного кінця інсуліну. Додана амінокислота може бути амінокислотою, що не зустрічається в природі (наприклад, D-амінокислотою).

Як застосовується в даному документі, термін "варіант інсуліну" стосується пептиду, що має амінокислотну послідовність, яка відрізняється від тієї, що у нативного інсуліну одним або більше амінокислотним залишком, але має функцію контролювання рівнів глюкози в крові *in vivo*.

На додаток, способи, які застосовують, відповідно, для одержання агоністів, фрагментів та варіантів, інсулін можуть використовувати незалежно або в комбінації. Наприклад, пептид інсуліну, прийнятний в представленому винаході, може включати пептид, який має

амінокислотну послідовність, яка відрізняється від тієї, що у нативного інсуліну одним або більше амінокислотним залишком, з деамінуванням в N-термінальному залишку, але, який функціонує, щоб контролювати рівні глюкози в крові *in vivo*.

Як застосовується в даному документі, термін "константна ділянка імуноглобуліну" стосується фрагменту імуноглобуліну, який є вільним від варіабельних ділянок легкого та важкого ланцюгів, константної ділянки 1 важкого ланцюга (C_{H1}) та константної ділянки легкого ланцюга (C_L), іншими словами, є Fc ділянкою, що складається з константних ділянок 2 та 3 важкого ланцюга (C_{H2} та C_{H3}) (або який містить константну ділянку важкого ланцюга (C_{H4})). Необов'язково, Fc ділянка імуноглобуліну може додатково включати шарнірну ділянку. Крім того, константна ділянка імуноглобуліну за представленим винаходом може бути розширеною Fc ділянкою імуноглобуліну, яка містить частину або повністю константну ділянку 1 важкого ланцюга (C_{H1}) та/або константну ділянку легкого ланцюга (C_L), за виключенням тільки варіабельних ділянок важких та легких ланцюгів імуноглобуліну за умови, що він демонструє ефекти в значній мірі ідентичні або переважаючі ті, що у нативної константної ділянки імуноглобуліну. Крім того, у константної ділянки імуноглобуліну за представленим винаходом може бути відсутня значна частина амінокислотної послідовності, яка відповідає C_{H2} та/або C_{H3} . Як наслідок, константна ділянка імуноглобуліну за представленим винаходом може містити (1) C_{H1} домен, C_{H2} домен, C_{H3} домен та C_{H4} домен, (2) C_{H1} домен та C_{H2} домен, (3) C_{H1} домен та C_{H3} домен, (4) C_{H2} домен та C_{H3} домен, (5) комбінацію одного або більше константних доменів та шарнірної ділянки імуноглобуліну (або частину шарнірної ділянки), або (6) димер кожного константного домену важкого ланцюга та константної ділянки легкого ланцюга.

Константна ділянка імуноглобуліну, яка включає Fc ділянку, є здатною до біорозкладання поліпептидом, який може бути метаболізований *in vivo*, таким чином, що його можуть безпечно застосовувати як носій лікарського засобу. До того ж, Fc ділянка імуноглобуліну є більш вигідною з точки зору одержання, очистки та виходу одержання комплексу, ніж всієї молекули імуноглобуліну завдяки її відносно меншій молекулярній масі. Крім того, оскільки вона є вільною від Fab, яка демонструє високу неоднорідність завдяки різниці в амінокислотній послідовності від одного антитіла до іншого, Fc імуноглобулін сам по собі забезпечує комплекс, в значній мірі, з підвищеною гомогенністю, та знижує можливість індукування антигенності крові.

Константна ділянка імуноглобуліну може походити від людей або тварин, таких як корови, кози, свині, миші, кролики, хом'ячки, щури, морські свинки, тощо, і може бути переважно людського походження. До того ж, константну ділянку імуноглобуліну можуть вибирати з Fc фрагментів, похідних IgG, IgA, IgD, IgE, IgM або їх комбінацій, або гібридів. Переважно, константна ділянка є похідною IgG або IgM, які є найбільш поширеними серед них в крові, та найбільш переважно IgG, який, як відомо, покращує сироватковий період напіввиведення ліганд-зв'язуючих протеїнів.

Як застосовується в даному документі, термін "комбінація" означає, що поліпептиди, які кодують однокланцову константну ділянку імуноглобулінів (переважно Fc ділянки) однакового походження, є зв'язаними з однокланцовим поліпептидом відмінного походження, утворюючи димер або мультимер. Іншими словами, димер або мультимер можуть одержувати комбінацією двох або більше фрагментів, вибраних з групи, яка складається з фрагментів IgG Fc, IgA Fc, IgM Fc, IgD Fc та IgE Fc.

Як застосовується в даному документі, термін "гібрид" означає, що послідовності, які кодують два або більше фрагментів Fc імуноглобуліну різних походжень є присутніми в одинарному ланцюгу константної ділянки імуноглобуліну (переважно, Fc ділянки). В представленому винаході можливими є різні гібридні форми. Наприклад, гібридний домен може містити від одного до чотирьох доменів, вибраних з групи, яка складається з C_{H1} , C_{H2} , C_{H3} та C_{H4} з IgG Fc, IgM Fc, IgA Fc, IgE Fc та IgD Fc, та може містити шарнірну ділянку.

IgG підрозділяють на IgG1, IgG2, IgG3 та IgG4 підкласи, та представлений винахід може включати їх комбінації або гібриди. Переважними є IgG2 та IgG4 підкласи, та найбільш переважно є Fc ділянка IgG4, яка рідко має ефекторні функції, такі як комплемент залежна цитотоксичність (CDC).

Константна ділянка імуноглобуліну може мати глікозильовану форму в такій самій мірі як, або в більш високій мірі, або меншій мірі, ніж нативна форма, або може бути в деглікозильованій формі. Підвищене або знижене глікозилювання або деглікозилювання ділянки імуноглобуліну може бути досягнуте, використовуючи типові способи, наприклад, із застосуванням хімічного способу, ферментного способу або генно-інженерного способу, використовуючи мікроорганізми. В даному випадку, при деглікозилюванні, комплемент (C1q) зв'язуючись з ділянкою Fc імуноглобуліну стає значно зменшеним, та залежна від антитіла цитотоксичність або залежна від комплементу цитотоксичність знижується або зникає, тим

самим не викликаючи непотрібних імунних відповідей *in vivo*. В даному контексті, деглікозильовані або аглікозильовані ділянки Fc імуноглобуліну є більш відповідними з метою носіїв лікарського засобу. Відповідно, ділянка Fc імуноглобуліну, яка є найбільш прийнятною як носій лікарського засобу за представленим винаходом, є людською IgG4-похідною

аглікозильованої ділянки Fc. Fc ділянка людського походження є більш переважною, ніж Fc ділянка нелюдського походження, яка може діяти як антиген в організмі людини та викликати небажані імунні відповіді, такі як продукування нового антитіла проти антигену.

Крім того, не тільки константна ділянка імуноглобуліну з нативною амінокислотою послідовністю, але також її мутантна амінокислота послідовність можуть бути включеними в межах константної ділянки імуноглобуліну за представленим винаходом. Термін "мутантна амінокислота послідовність", як застосовується в даному документі, стосується поліпептидів, що мають амінокислотну послідовність, яка є відмінною від не мутантного типу, як результат делеції, вставки, консервативного або неконсервативного заміщення одного або більше амінокислотних залишків, або їх комбінації. Наприклад, відомо, що амінокислотні залишки в положеннях 214-238, 297-299, 318-322 або 327-331 в IgG Fc, є важливими для зчеплення, можуть застосовувати як сайти прийнятні для модифікації. Різні похідні, такі як ті, що одержані шляхом видалення сайтів, здатних до утворення дисульфідних зв'язків, видалення декількох N-термінальних амінокислот з нативної Fc, або додавання метіоніну до N-кінця нативної Fc, можуть застосовувати в представленому винаході. До того ж, сайти фіксації комплементу, наприклад, C1q сайти фіксації, або ADCC сайти можуть бути видаленими з нативної Fc ділянки, щоб усунути ефекторну функцію. Способи одержання мутантних амінокислотних послідовностей константної ділянки імуноглобуліну є розкритими в міжнародних публікаціях патенту №№ WO 97/34631 та WO 96/32478.

Амінокислотні заміщення в молекулі протеїну або пептиду, які не змінюють активність молекули, є добре відомими в даній галузі з рівня техніки (H.Neurath, R.L.Hill, The Proteins, Academic Press, New York, 1979). Найбільш поширені заміщення здійснюють між амінокислотними залишками Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Thr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu та Asp/Gly. Необов'язково, амінокислоти можуть модифікувати шляхом фосфорилування, сульфатування, аcriлювання, глікозилювання, метилювання, фарнесилування, ацетилювання та амідування.

Описані вище похідні константної ділянки імуноглобуліну демонструють таку саму біологічну активність, як та, що у константної ділянки імуноглобуліну за представленим винаходом, але мають покращену структурну стабільність щодо нагрівання, pH і тому подібному. Дані константні ділянки імуноглобулінів можуть одержувати з нативного типу, виділеного з людей або тварин, таких як корова, кози, свині, миші, кролі, хом'ячки, щури, морські свинки, тощо, або можуть бути їх рекомбінантами або похідними, одержаними з трансформованих тваринних клітин або мікроорганізмів. Нативні константні ділянки можуть одержувати шляхом протеазного розщеплення всього діапазону імуноглобулінів, виділених зі зразків людини або тварини. Імуноглобуліни є розщепленими в Fab та Fc за допомогою папаїну та в rF'c та F(ab)₂ за допомогою пепсину, з наступною гель-проникаючою хроматографією, щоб відокремити Fc або rF'c на основі цього.

Переважною є рекомбінантна людська константна ділянка імуноглобуліну, одержана з мікроорганізму.

Корисні ефекти

Як описано вище, комплекс фізіологічно активний поліпептид - непептидильний полімер - константна ділянка імуноглобуліну можуть одержувати з високим ступенем чистоти та високим виходом, а також з низькою вартістю, застосовуючи спосіб за представленим винаходом. Таким чином, спосіб за представленим винаходом є промислово прийнятним. Більш того, його можуть застосовувати для розробки композицій фізіологічно активних поліпептидів з тривалою дією, які мають вдосконалену комплаєнтність лікарського засобу.

Приклади здійснення винаходу

Краще розуміння представленого винаходу може бути отримане завдяки наступним прикладам, які представлені для ілюстрації, але їх не слід розглядати як обмежуючі для представленого винаходу.

ПРИКЛАД 1: ПЕГилування інсуліну, застосовуючи натрію ціаноборгідрид як відновлюючий агент та очистка моно-ПЕГильованого інсуліну

Порошкоподібний інсулін розчиняли в 10 mM HCl, та ПЕГилували в N-кінці бета ланцюга з 3.4K пропіон-ALD2 ПЕГ (ПЕГ з двома пропіональдегідними групами, IDB, Korea). В цьому відношенні, 5 мг/мл інсуліну реагували з ПЕГ в молярному співвідношенні 1:2 при температурі від 4 °C до кімнатної температури протягом 2 годин. Реакцію здійснювали в 50 mM буферному

розчині цитрату натрію при pH 6,0 в 45 % ізопропанолі в присутності 2-20 мМ натрію ціаноборгідриду як відновлюючого агента. Реакційну суміш завантажували в SP-HP (GE Healthcare) колонку, з наступним елюванням буфером, що містить цитрат натрію (pH 3,0), та 45 % EtOH, та застосовуючи градієнт концентрації KCl, щоб очистити моно-ПЕГильований інсулін.

Виходи ПЕГильовання інсуліну відповідно до умов відновлюючого агента натрію ціаноборгідриду при одержанні комплексу, що містить інсулін та ділянку Fc імуноглобуліну, є підсумованими в таблиці 1, нижче.

ПРИКЛАД 2: Зміни у виходах одержання комплексу моно-ПЕГильований інсулін - ділянка Fc імуноглобуліну відповідно до умов натрію ціаноборгідриду як відновлюючого агента, який застосовували в ПЕГильованні

Для аналізу виходу одержання комплексу інсулін - ПЕГ - ділянка Fc імуноглобуліну, моно-ПЕГильований інсулін, одержаний в прикладі 1, реагував у молярному співвідношенні 1:1 з Fc імуноглобуліном при 25 °C протягом 13 годин, із загальною концентрацією протеїну, що становить 20 мг/мл. Дану реакцію сполучення здійснювали в 100 мМ HEPES буфері, який містить 22 мМ фосфату калію та 10 % етанолу при pH 8,2, в присутності 20 мМ натрію ціаноборгідриду як відновлюючого агента.

Реакційну суміш завантажували в колонку Source 15Q (GE Healthcare), з наступним елюванням Tris-HCl (pH 7,5) буфером та застосовуючи градієнт концентрації NaCl щоб відокремити та почистити непрореагувавший інсулін, непрореагувавшу ділянку Fc імуноглобуліну, комплекс інсулін - ПЕГ - ділянка Fc імуноглобуліну, та ділянку Fc імуноглобуліну, сполучену з двома або більше моно-ПЕГильованими фрагментами інсуліну (інсулін-ПЕГ). Виходи одержання комплексу інсулін - ПЕГ - ділянка Fc імуноглобулін визначали, застосовуючи УФ поглинання на 280 нм після очистки хроматографією.

В таблиці 1 підсумовано виходи реакції сполучення з ділянкою Fc імуноглобуліну відповідно до умов застосування натрію ціаноборгідриду як відновлюючого агента в ПЕГильованні інсуліну.

Таблиця 1

Концентрація натрію ціаноборгідриду	Час реакції	Темпер. реакції	Вихід ПЕГильовання (%)	Вихід сполучення (%)	Загальний вихід (%)
2 мМ	2 год.	4 °C	23,3	31,7	7,39
4 мМ	2 год.	4 °C	37,6	31	11,66
4 мМ	2 год.	к.т.	39,2	28,8	11,29
8 мМ	2 год.	к.т.	40,4	27,1	10,95
8 мМ	4 год.	4 °C	40,4	27	10,9
20 мМ	2 год.	4 °C	42,2	26,8	11,3

ПРИКЛАД 3: ПЕГильовання інсуліну, застосовуючи боран-піридиновий комплекс як відновлюючий агент та очистка моно-ПЕГильованого інсуліну

Порошкоподібний інсулін розчиняли в 10 мМ HCl та ПЕГильовали на N-кінці бета ланцюга з 3.4K пропійон-ALD2 ПЕГ (ПЕГ з двома пропійональдегідними групами, IDB, Korea). В цьому відношенні, 5 мг/мл інсулін реагували з ПЕГ в молярному співвідношенні 1:2 при 4 °C протягом 2 годин. Реакцію здійснювали в 50 мМ буферному розчині цитрату натрію при pH 6,0 в 45 % ізопропанолі в присутності 3-20 мМ боран-піридинового комплексу як відновлюючого агента. Реакційну суміш завантажували в SP-HP (GE Healthcare) колонку, з наступним елюванням буфером, що містить цитрат натрію (pH 3,0) та 45 % EtOH, та застосовуючи градієнт концентрації KCl, щоб очистити моно-ПЕГильований інсулін.

Виходи ПЕГильовання інсуліну відповідно до умов застосування відновлюючого агента боран-піридинового комплексу під час одержання комплексу, що містить інсулін та ділянку Fc імуноглобуліну, підсумовані в таблиці 2, нижче.

ПРИКЛАД 4: Зміни у виходах одержання комплексу моно-ПЕГильований інсулін - ділянка Fc імуноглобуліну відповідно до умов боран-піридинового комплексу як відновлюючого агента, який застосовували в ПЕГильованні

Для аналізу виходу одержання комплексу інсулін - ПЕГ - ділянка Fc імуноглобуліну, моно-ПЕГильований інсулін, одержаний в прикладі 3, реагував у молярному співвідношенні 1:1 з Fc імуноглобуліном при 25 °C протягом 13 годин, із загальною концентрацією протеїну, що становить 20 мг/мл. Дану реакцію сполучення здійснювали в 100 мМ HEPES буфері, що містить 22 мМ фосфату калію та 10 % етанолу при pH 8,2, в присутності 20 мМ натрію ціаноборгідриду як відновлюючого агента.

Реакційну суміш завантажували в Source 15Q (GE Healthcare) колонку, з наступним елюванням буфером Tris-HCl (pH 7,5) та застосовуючи градієнт концентрації NaCl, щоб відокремити та почистити непрореагувавший інсулін, непрореагувавшу ділянку Fc імуноглобуліну, комплекс інсулін - ПЕГ - ділянку Fc імуноглобуліну та ділянку Fc імуноглобуліну, сполучену з двома або більше фрагментами моно-ПЕГильованого інсуліну (інсулін-ПЕГ). Виходи одержання комплексу інсулін - ПЕГ - ділянку Fc імуноглобуліну визначали, застосовуючи УФ поглинання на 280 нм після очистки хроматографією.

В таблиці 2 підсумовано виходи реакції сполучення з ділянкою Fc імуноглобуліну відповідно до умов застосування боран-піридинового комплексу як відновлюючого агента в ПЕГильованні інсуліну.

Таблиця 2

Концентрація боран-піридинового комплексу	Вихід ПЕГильовання (%)	Вихід сполучення(%)	Загальний вихід (%)
3 мМ	25,4	35,1	8,92
10 мМ	47,6	34,8	16,6
20 мМ	50,8	34,2	17,4

ПРИКЛАД 5: Виходи реакції сполучення та утворення аберанту імуноглобуліну Fc в залежності від концентрації натрію ціаноборгідриду та часу реакції

Для аналізу утворення аберанту імуноглобуліну Fc в залежності від концентрацій відновлюючого агента та часу реакції в реакції сполучення, моно-ПЕГильований інсулін реагував в молярному співвідношенні 1:1 з Fc імуноглобуліном при 25 °C протягом 13-43 годин, із загальною концентрацією протеїну, що становить 20 мг/мл. Дану реакцію сполучення здійснювали в 100 мМ HEPES буфері, який містить 22 мМ фосфату калію та 10 % етанолу, pH 8,2, в присутності 5-40 мМ натрію ціаноборгідриду.

Реакційну суміш завантажували в Source 15Q (GE Healthcare) колонку, з наступним елюванням буфером Tris-HCl (pH 7,5), та застосовували градієнт концентрації NaCl, щоб відокремити та почистити непрореагувавший інсулін, непрореагувавшу ділянку Fc імуноглобуліну, комплекс інсулін - ПЕГ - ділянку Fc імуноглобуліну та ділянку Fc імуноглобуліну, сполучену з двома або більше фрагментами моно-ПЕГильованого інсуліну (інсулін-ПЕГ). Виходи одержання комплексу інсулін - ПЕГ - ділянку Fc імуноглобуліну визначали, застосовуючи УФ поглинання на 280 нм після очистки хроматографією.

В таблиці 3 підсумовано виходи реакції сполучення, за якою одержували комплекс, що містить інсулін та ділянку Fc імуноглобуліну в залежності від концентрацій натрію ціаноборгідриду, який застосовували, як відновлюючий агент, та часу реакції в реакції сполучення.

Таблиця 3

Час реакції	5 мМ SCB	20 мМ SCB	40 мМ SCB
13 годин	35,2 %	37,5 %	37,5 %
18 годин	36,1 %	37,7 %	37,7 %
37 годин	36,7 %	37,3 %	37,5 %
43 годин	36,8 %	37,2 %	36,8 %

Утворення аберантів імуноглобуліну Fc в залежності від концентрацій відновлюючого агента в реакції сполучення відслідковували, використовуючи PX на ProPac SAX-10 (DIONEX) колонці, елюючи буфером Tris-HCl (pH 8,0) та застосовуючи градієнт концентрації NaCl.

В таблиці 4, представлені виходи одержання аберантів Fc імуноглобуліну в залежності від концентрацій натрію ціаноборгідриду та часу реакції в реакції сполучення, за якою одержують комплекс, що містить інсулін та ділянку Fc імуноглобуліну.

Таблиця 4

Час реакції	5 мМ SCB	20 мМ SCB	40 мМ SCB
13 годин	4,6 %	7,0 %	7,8 %
18 годин	6,2 %	9,0 %	9,8 %
37 годин	11,7 %	14,5 %	15,3 %

Таблиця 4

Час реакції	5 mM SCB	20 mM SCB	40 mM SCB
43 годин	12,7 %	15,5 %	16,8 %

ПРИКЛАД 6: ПЕГилування Fc імуноглобуліну, застосовуючи натрію ціаноборгідрид як відновлюючий агент, та очистка моно-ПЕГильованого Fc імуноглобуліну.

5 N-кінець імуноглобуліну Fc ПЕГилували 5K пропіон-ALD2 ПЕГ (ПЕГ з трьома пропіональдегідними групами, NOF, Japan). В даному сенсі, 10 мг/мл імуноглобуліну Fc реагували з ПЕГ в молярному співвідношенні 1:2 при температурі від 4 °C до кімнатної температури протягом 4,5 годин. Реакцію здійснювали в 100 mM буферному розчині фосфату калію з pH 6,0 в присутності 20 mM натрію ціаноборгідриду як відновлюючого агента. Реакційну суміш завантажували в колонку Source 15Q, з наступним елюванням буфером Tris-HCl (pH 10 7,5) та застосуванням градієнту концентрації NaCl для очистки моно-ПЕГильованого інсуліну.

ПРИКЛАД 7: Одержання комплексу моно-ПЕГильованої ділянки Fc імуноглобуліну-інсуліну, застосовуючи натрію ціаноборгідрид як відновлюючий агент

15 Для одержання комплексу інсулін - ПЕГ - ділянка Fc імуноглобуліну, моно-ПЕГильований імуноглобулін Fc, одержаний в прикладі 6, взаємодіяв у молярному співвідношенні 1:4 з інсуліном при 4 °C протягом 13 годин, із загальною концентрацією протеїну, що становила 20 мг/мл. Дану реакцію сполучення здійснювали в 100 mM буферному розчині фосфату калію з pH 6,0 в присутності 20 mM натрію ціаноборгідриду як відновлюючого агента.

20 Реакційна суміш завантажували в Source 15Q (GE Healthcare) колонку для первинної очистки. Та другу очистку додатково проводили, використовуючи Source 15ISO (GE Healthcare) колонку, щоб одержати комплекс інсулін - ПЕГ - ділянка Fc імуноглобуліну.

Перелік послідовностей

110> Ханмі Сайенс КО., ЛТД.

<120> Вдосконалений спосіб одержання фізіологічно активного поліпептидного
комплекса

<130> ОРА13018

<150> KR 10-2012-0024136

<151> 2012-03-08

<160> 2

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 21

<212> PRT

<213> Людини

<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> Людини

<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

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Спосіб одержання комплексу фізіологічно активний поліпептид-непептидильний полімер-
5 константна ділянка імуноглобуліну, за яким:
(1) непептидильний полімер, що має два або більше альдегідів як функціональні групи, піддають взаємодії з одним фізіологічно активним поліпептидом або константною ділянкою імуноглобуліну в присутності відновлюючого агента в концентрації від 1мМ до менш ніж 20 мМ; та
10 (2) реакційну суміш зі стадії (1) піддають взаємодії з іншим фізіологічно активним поліпептидом або константною ділянкою імуноглобуліну для того, щоб отримати комплекс фізіологічно активний поліпептид-непептидильний полімер-константна ділянка імуноглобуліну, в присутності відновлюючого агента в концентрації 1-100 мМ;
де непептидильний полімер реагує з обома фізіологічно активними поліпептидами та
15 константними ділянками імуноглобуліну на стадіях (1) і (2).
2. Спосіб за п. 1, який додатково включає відокремлення кон'югату фізіологічно активного поліпептиду-непептидильного полімеру або кон'югату константної ділянки імуноглобуліну-непептидильного полімеру від реакційної суміші після стадії (1).
3. Спосіб за п. 1, де відновлюючий агент функціонує для того, щоб знизити оборотний імінний
20 подвійний зв'язок, що виникає при сполученні між альдегідною групою непептидильного полімеру та аміногрупою фізіологічно активного поліпептиду або константної ділянки імуноглобуліну при утворенні ковалентного зв'язку.
4. Спосіб за п. 1, в якому відновлюючий агент вибирають з групи, яка складається з натрію ціаноборгідриду, боран-піридинового комплексу, натрію боргідриду, боран-диметиламінового
25 комплексу, боран-триметиламінового комплексу та натрію триацетоксиборгідриду.
5. Спосіб за п. 1, в якому відновлюючий агент застосовують в концентраціях від 1 до 40 мМ на стадії (2).
6. Спосіб за п. 1, в якому реакцію на стадії (1) здійснюють протягом від 1 до 16 годин.
7. Спосіб за п. 1, в якому реакцію на стадії (2) здійснюють протягом від 1 до 48 годин.
- 30 8. Спосіб за п. 1, в якому реакцію на стадії (1) здійснюють при температурі від 0 до 25 °С.
9. Спосіб за п. 1, в якому реакцію на стадії (1) здійснюють протягом від 1 до 16 годин при 0-25 °С в присутності відновлюючого агента в концентрації від 1 до менш ніж 20 мМ, та реакцію на стадії (2) здійснюють протягом від 1 до 48 годин в присутності відновлюючого агента в концентрації від 1 до 40 мМ.
- 35 10. Спосіб за п. 1, в якому непептидильний полімер ковалентно зв'язується з кожним фізіологічно активним поліпептидом та константною ділянкою імуноглобуліну за рахунок двох або більше їх альдегідних функціональних груп.
11. Спосіб за п. 1, в якому функціональні групи непептидильного полімеру зв'язуються з кожною аміногрупою фізіологічно активного поліпептиду та константної ділянки імуноглобуліну, де
40 аміногрупа є присутньою в N-кінці або в бічному ланцюзі Lys залишку.
12. Спосіб за п. 1, в якому непептидильний полімер вибирають з групи, яка складається з поліетиленгліколів, поліпропіленгліколів, співполімерів етиленгліколю та пропіленгліколю, поліоксіетильованих поліолів, полівінільних спиртів, полісахаридів, декстранів, полівінілетилових етерів, полімолочної кислоти (PLA), полімолочної-гліколевої кислоти (PLGA),
45 ліпідних полімерів, хітинів, гіалуронової кислоти та їх комбінації.
13. Спосіб за п. 1, в якому непептидильний полімер являє поліетиленгліколь.
14. Спосіб за п. 1, в якому молекулярна маса непептидильного полімеру знаходиться в діапазоні від 1 до 100 кДа.
15. Спосіб за п. 1, в якому константна ділянка імуноглобуліну є аглікозильованою.
- 50 16. Спосіб за п. 1, в якому константна ділянка імуноглобуліну містить від одного до чотирьох доменів, вибраних з групи, яка складається з C_{H1}, C_{H2}, C_{H3} та C_{H4} доменів.
17. Спосіб за п. 1, в якому константна ділянка імуноглобуліну додатково містить шарнірну ділянку.
18. Спосіб за п. 1, в якому константну ділянку імуноглобуліну вибирають з групи, яка
55 складається з константних ділянок, що походять з IgG, IgA, IgD, IgE, IgM або їх комбінацій, або гібридів.
19. Спосіб за п. 1, в якому константну ділянку імуноглобуліну вибирають з групи, яка складається з константних ділянок IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, їх комбінації, та їх гібриду.
20. Спосіб за п. 1, в якому константна ділянка імуноглобуліну є IgG4 Fc ділянкою.

21. Спосіб за п. 20, в якому константна ділянка імуноглобуліну є аглікозильованою IgG4 Fc ділянкою людини.

22. Спосіб за п. 1, в якому фізіологічно активний поліпептид вибирають з групи, яка складається з гормону росту людини, гормонів, що вивільняють гормон росту, пептидів, що вивільняють
 5 гормон росту, інтерферону, рецепторів інтерферону, колонієстимулюючих факторів, глюкагонподібних пептидів (GLP-1, тощо), оксинтомодуліну, зв'язуючих G протеїн рецепторів, інтерлейкінів, рецепторів інтерлейкіну, ферментів, зв'язуючих інтерлейкін протеїнів, зв'язуючих цитокін протеїнів, макрофаг активуючих факторів, пептидів макрофагу, факторів В-клітин, факторів Т-клітин, протеїну А, інгібіторів алергії, глікопротеїнів некрозу клітин, імунотоксинів,
 10 лімфотоксинів, фактора некрозу пухлини, супресорів пухлини, трансформуючого фактора росту, альфа-1 антитрипсину, альбуміну, α -лактальбуміну, аполіпопротеїну-Е, еритропоєтину, глікозильованого еритропоєтину, ангіопоєтинів, гемоглобіну, тромбіну, активуючих пептидів рецептора тромбіну, тромбомодуліну, фактора крові VII, VIIa, VIII, IX та XIII, активаторів плазміногену, фібринзв'язуючих пептидів, урокінази, стрептокінази, гірудину, протеїну С, С-
 15 реактивного протеїну, інгібітору реніну, інгібітору колагенази, супероксиддисмутази, лептину, фактора росту тромбоцитів, фактора росту епітелію, фактора росту епідермісу, ангіостатину, ангіотензину, фактора росту кістки, кістковостимулюючого протеїну, кальцитоніну, інсуліну, атріопептину, хрящового індукуючого фактора імпульсної відповіді, елкатоніну, активуючого фактора сполучної тканини, інгібітору шляху тканинного фактора, фолікулостимулюючого
 20 гормону, лютеїнізуючого гормону, гормону, що вивільняє лютеїнізуючий гормон, факторів росту нервів, паратироїдного гормону, релаксину, секретину, соматомедину, інсулінподібного фактора росту, гормону наднирників, глюкагону, холецистокініну, панкреатичного поліпептиду, гастрин-вивільняючого пептиду, кортикотропінвивільняючого фактора, тиреостимулюючого гормону, аутотаксину, лактоферину, міостатину, антигенів клітинної поверхні, вакцинних антигенів
 25 вірусного походження, моноклональних антитіл, поліклональних антитіл та антитільних фрагментів.

23. Спосіб за п. 1, в якому фізіологічно активним поліпептидом є інсулін.

24. Спосіб за п. 1, де стадію (1) проводять в присутності відновлюючого агента в концентрації від 1 мМ до 10 мМ.

30 25. Спосіб за п. 1, де стадію (1) проводять в присутності відновлюючого агента в концентрації від 1 мМ до 8 мМ.

Комп'ютерна верстка Т. Вахричева

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601