



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **119644** (13) **C2**  
(51) МПК (2019.01)  
**C07K 14/72** (2006.01)  
**C07K 16/46** (2006.01)  
**C07K 19/00**

МІНІСТЕРСТВО  
ЕКОНОМІЧНОГО  
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ  
УКРАЇНИ

**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД**

<b>(21)</b> Номер заявки: <b>а 2016 00304</b>	<b>(72)</b> Винахідник(и): <b>Хван Сан Юн (KR),</b> <b>Лі Чон Су (KR),</b> <b>Хон Сун Хі (KR),</b> <b>Чхой Ін Йон (KR),</b> <b>Чун Сун Юб (KR),</b> <b>Квон Се Чхан (KR)</b>
<b>(22)</b> Дата подання заявки: <b>14.07.2014</b>	<b>(73)</b> Власник(и): <b>ХАНМІ ФАРМ. КО., ЛТД.,</b> 214, Muha-ro, Paltan-myeon, Hwaseong-si, Gyeonggi-do 445-858, Republic of Korea (KR)
<b>(24)</b> Дата, з якої є чинними права на винахід: <b>25.07.2019</b>	<b>(74)</b> Представник: <b>Крилова Надія Іванівна, реєстр. №30</b>
<b>(31)</b> Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: <b>10-2013-0082509</b>	<b>(56)</b> Перелік документів, взятих до уваги експертизою: KR 1020060106486 A, 12.10.2006 WO 2005047336 A1, 26.05.2006 WO 2010011096 A2, 28.01.2010 WO 2011122921 A2, 06.10.2011 WO 2012165915 A2, 06.12.2012 WO 2008136611 A1, 13.11.2008
<b>(32)</b> Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: <b>12.07.2013</b>	
<b>(33)</b> Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: <b>KR</b>	
<b>(41)</b> Публікація відомостей про заявку: <b>11.04.2016, Бюл.№ 7</b>	
<b>(46)</b> Публікація відомостей про видачу патенту: <b>25.07.2019, Бюл.№ 14</b>	
<b>(86)</b> Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: <b>РСТ/KR2014/006328, 14.07.2014</b>	

**(54) ГРУПА КОН'ЮГАТА ФІЗІОЛОГІЧНО АКТИВНОГО ПОЛІПЕПТИДУ З Fc-ФРАГМЕНТОМ ІМУНОГЛОБУЛІНУ, ЯКИЙ ПІДТРИМУЄ АФІННІСТЬ ВНУТРІШНЬОГО ЗВ'ЯЗУВАННЯ Fc-ФРАГМЕНТА ІМУНОГЛОБУЛІНУ ДЛЯ FcRn**

**(57) Реферат:**

Винахід стосується групи кон'югата фізіологічно активного поліпептиду з Fc-фрагментом імуноглобуліну, який містить фізіологічно активний поліпептид, приєднаний через непептидильний лінкер до Fc-фрагмента імуноглобуліну, що має FcRn-зв'язуючу регіон та підтримує афінність внутрішнього зв'язування Fc-фрагмента імуноглобуліну для FcRn, способу одержання такої групи кон'югата, та до композиції, яка містить таку групу кон'югата.

UA 119644 C2



Винахід стосується кон'югату фізіологічно активного поліпептиду з Fc-фрагментом імуноглобуліну, який містить фізіологічно активний поліпептид, приєднаний через непептидильний лінкер до Fc-фрагменту імуноглобуліну з FcRn-зв'язуючою ділянкою, здатною зберігати внутрішню зв'язувальну спорідненість Fc-фрагменту імуноглобуліну, а також способу отримання кон'югату та способу зберігання внутрішньої зв'язувальної спорідненості цього кон'югату до FcRn та композиції, що містить кон'югат, здатний зберігати внутрішню зв'язувальну спорідненість Fc-фрагменту імуноглобуліну до FcRn.

З метою підвищення сироваткового часу напівжиття білка було здійснено різні дослідження білкових кон'югатів або комплексів, які містили приєднаний до білка носій, як-то поліетиленгліколевий полімер, альбумін, жирну кислоту або антитіло Fc (сталу ділянку). Головною метою відомих до появи цього винаходу досліджень цих білкових кон'югатів або комплексів було підвищення сироваткового часу напівжиття лікарського засобу для скорочення інтервалу його застосування та отримання таким часом покращеної зручності для пацієнтів. Однак, багато загальноприйнятих технологій мають певні недоліки, як-то зниження активності лікувального білка через, наприклад, просторову перешкоду, викликану неспецифічним зв'язуванням лікувального білка з білком носія. Крім того, у разі застосування кон'югатів жирної кислоти, які оборотним чином зв'язуються з сироватковим альбуміном для підвищення власного часу напівжиття у сироватці існує обмеження значного підвищення сироваткового часу напівжиття білкового лікарського засобу через його виведення нирками, яке є причиною величезних втрат цього лікарського засобу та якого неможливо уникнути через оборотне зв'язування білка з жирною кислотою.

Крім того, було здійснено спроби застосування фрагментів імуноглобуліну для підвищення часу напівжиття фізіологічно активних речовин, в тому числі білків. Ділянка CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub> Fc - фрагменту імуноглобуліну містить сайт зв'язування FcRn (захисного рецептора), який збільшує час напівжиття антитіла. FcRn є білком, який має відношення до першого класу молекул головного комплексу гістосумісності, експресія якого відбувається в судинних ендотеліальних клітинах та який зв'язується з IgG та альбуміном. Характерно те, що IgG та FcRn сильно зв'язуються між собою в умовах слабокислого pH та відокремлюються один від одного при нейтральному pH. Отже, якщо IgG проникає у судинну ендотеліальну клітину з кровоносних судин шляхом піноцитозу або ендоцитозу та потрапляє у лізосоми (pH 6,0), то завдяки FcRn він стає захищеним від руйнування. У разі злиття IgG з клітинною мембраною повторним застосуванням, він відокремлюється від FcRn з pH 7,4 та вивільнюється в кровоносні судини. Через цю процедуру, час напівжиття in vivo імуноглобулінів IgG1, IgG2 та IgG4, які містять сайт зв'язування FcRn займає в середньому три тижні та є довшим, ніж час напівжиття інших білків.

Отже, коли Fc - фрагмент імуноглобуліну є зв'язаним з фізіологічно активною речовиною, то час напівжиття цієї фізіологічно активної речовини може бути підвищено FcRn-опосередкованим повторним застосуванням. У зв'язку з цим залишається потреба щодо отримання способу, застосування якого буде здатним зберігати зв'язувальну спорідненість Fc - фрагменту імуноглобуліну до FcRn без зменшення активності фізіологічно активної речовини у разі з'єднання між собою фізіологічно активної речовини та Fc - фрагменту імуноглобуліну.

Винахідники зробили великі зусилля, спрямовані на отримання кон'югату, який може зберігати внутрішню зв'язувальну спорідненість Fc - фрагменту імуноглобуліну до FcRn без зменшення активності фізіологічно активного поліпептиду та може легко відокремлюватися від FcRn в умовах нейтрального pH. В результаті винахідники отримали кон'югат, який містив фізіологічно активний поліпептид, приєднаний через непептидильний лінкер до Fc-фрагменту імуноглобуліну, що має FcRn-зв'язуючу ділянку, яка може зберігати внутрішню зв'язувальну спорідненість Fc-фрагменту імуноглобуліну до FcRn та одночасно може легко відокремлюватися від FcRn в умовах нейтрального pH (7,4) тим часом завершуючи цей винахід.

Метою винаходу було отримання кон'югату фізіологічно активного поліпептиду з Fc-фрагментом імуноглобуліну, що містить фізіологічно активний поліпептид, приєднаний через непептидильний лінкер до Fc-фрагменту імуноглобуліну, який містить FcRn-зв'язуючу ділянку, в якому відношення кількості зв'язаного з FcRn кон'югату з pH 6,0 та кількості зв'язаного з FcRn кон'югату з pH 7,4 складає  $\pm 6\%$  коефіцієнту, визначеного вимірюванням кількостей зв'язаного з FcRn Fc-фрагменту імуноглобуліну в тих саме умовах, які було застосовано для кон'югату.

Іншою метою винаходу було отримання кон'югату фізіологічно активного поліпептиду з Fc-фрагментом імуноглобуліну, що містить фізіологічно активний поліпептид, приєднаний через непептидильний лінкер до Fc-фрагменту імуноглобуліну, який містить FcRn-зв'язуючу ділянку, в якому відношення зв'язування, визначене заміщенням кількості зв'язаного з FcRn кон'югату з pH 6,0 та кількості зв'язаного з FcRn кон'югату з pH 7,4 в наступному Рівнянні 1 складає  $\pm 6\%$

коефіцієнту зв'язування, визначеного вимірюванням кількостей зв'язаного з FcRn Fc-фрагменту імуноглобуліну в тих саме умовах, які було застосовано для кон'югату.

Рівняння 1.

Коефіцієнт зв'язування (%) = (кількість, зв'язана з pH 7,4 / кількість, зв'язану з pH 6,0) × 100.

Іншою метою винаходу було отримання кон'югату фізіологічно активного поліпептиду з Fc-фрагментом імуноглобуліну, що підтримує внутрішню зв'язувальну спорідненість Fc - фрагменту імуноглобуліну до FcRn та способу, який полягає у: (а) приєднанні фізіологічно активного поліпептиду через непептидильний лінкер до Fc-фрагменту імуноглобуліну, який має FcRn-зв'язуючу ділянку для отримання суміші фізіологічно активних кон'югатів поліпептиду з Fc-фрагментом імуноглобуліну; та (b) відокремленні від суміші кон'югату фізіологічно активного поліпептиду з Fc-фрагментом імуноглобуліну, який має відношення зв'язування ± 6% коефіцієнту зв'язування Fc-фрагменту імуноглобуліну, як було визначено заміщенням кількості, зв'язаної з FcRn з pH 6,0 та кількості, зв'язаної з FcRn з pH 7,4 у Рівнянні 1.

Іншою метою винаходу було отримання способу підтримання внутрішньої зв'язувальної спорідненості кон'югату фізіологічно активного поліпептиду з Fc-фрагментом імуноглобуліну до FcRn, який полягає у прикріпленні фізіологічно активного поліпептиду через непептидильний лінкер до Fc-фрагменту імуноглобуліну, який містить FcRn-зв'язуючу ділянку.

Іншою метою винаходу було отримання композиції, що містить фізіологічно активний кон'югат поліпептиду з Fc-фрагментом імуноглобуліну, що підтримує внутрішню зв'язувальну спорідненість Fc-фрагменту імуноглобуліну до FcRn.

Як описано вище, кон'югат винаходу зберігає внутрішню зв'язувальну спорідненість Fc-фрагменту імуноглобуліну до FcRn та водночас легко відокремлюється від FcRn в умовах нейтрального pH, як-то pH 7,4. Отже, це може бути з успіхом застосовано для підвищення сироваткового часу напівжиття фізіологічно активного поліпептиду.

Опис Фігур.

На Фіг. 1 схематично зображено спосіб повторного застосування білка, зв'язаного з FcRn.

На Фіг. 2 зображено сенсограми зв'язування імуноглобуліново-білкових кон'югатів з FcRn в умовах кислого pH.

На Фіг. 3 зображено сенсограми зв'язування імуноглобуліново-білкових кон'югатів з FcRn в умовах нейтрального pH.

На Фіг. 4 наведено результати порівняльної перевірки фармакокінетичних характеристик кон'югату агоністу GLP-1R з фрагментом імуноглобуліну *in vivo*.

Для досягнення вищенаведених цілей, в одному аспекті, винаходом передбачено фізіологічно активний кон'югат поліпептиду з Fc-фрагментом імуноглобуліну, який містить фізіологічно активний поліпептид, приєднаний через непептидильний лінкер до Fc-фрагменту імуноглобуліну, що містить FcRn-зв'язуючу ділянку, в якому коефіцієнт зв'язування кількості зв'язаного з FcRn кон'югату з pH 6,0 та кількості зв'язаного з FcRn кон'югату з pH 7,4 складає ± 6% коефіцієнту, визначеного вимірюванням кількостей Fc-фрагменту імуноглобуліну, зв'язаного з FcRn в тих саме умовах, які було застосовано для кон'югату.

У одному втіленні, кон'югат за винаходом має коефіцієнт зв'язування ± 6% коефіцієнту зв'язування Fc-фрагменту імуноглобуліну, як було визначено із застосуванням наступного рівняння:

Рівняння 1:

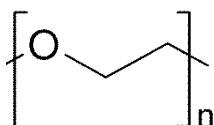
Коефіцієнт зв'язування (%) = (кількість, зв'язана з pH 7,4 / кількість, зв'язану з pH 6,0) × 100.

У іншому втіленні, кон'югат за винаходом може бути отримано реакцією фізіологічно активного поліпептиду, що має непептидильний лінкер, приєднаний до Fc - фрагменту імуноглобуліну з pH 4,0-9,0 з отриманням таким чином зв'язування фізіологічно активного поліпептиду через непептидильний лінкер з частиною, позбавленою FcRn-зв'язуючої ділянки Fc-фрагменту імуноглобуліну.

У іншому втіленні, непептидильний лінкер, який містить кон'югат за винаходом може бути вибрано з групи, яка складається з поліетиленгліколю, поліпропіленгліколю, сополімеру етиленгліколю та пропіленгліколю, поліоксietiлованого поліолу, полівінілового спирту, полісахариду, декстрану, полівінілового етилового етеру, біорозкладаного полімеру, ліпідного полімеру, хітину, гіалуронової кислоти та їх комбінацій.

У іншому втіленні, непептидильний лінкер у складі кон'югату за винаходом може бути поліетиленгліколевим полімером наступної Формули 1:

Формула 1



в якій n складає 10 - 2400.

У іншому втіленні, непептидильний лінкер у складі кон'югату за винаходом може мати реакційну групу, вибрану з групи, яка складається з альдегідної групи, пропіональдегідної групи, бутиральдегідної групи, малеїмідної групи та сукцинімідних похідних.

У іншому втіленні, фізіологічно активний поліпептид у складі кон'югату за винаходом може бути вибрано з групи, яка складається з глюкагоноподібного пептиду-1 (GLP-1), гранулоцитарного колонієстимулюючого фактора (G-CSF), гормону росту людини (hGH), еритропоєтину (ЕРО), глюкагону, окситомодуліну, інсуліну, соматореліну, пептиду, який вивільнює гормон росту, інтерферонів, рецепторів інтерферонів, серпентинного рецептора, інтерлейкінів та інтерлейкінових рецепторів, ферментів, інтерлейкін-зв'язуючих білків, цитокін-зв'язуючих білків, фактора активування макрофагів, макрофагового пептиду, В - клітинного фактора, Т- клітинного фактора, протеїну А, алергологічного пригнічувача, клітинних некротичних глікобілків, імунотоксину, лімфотоксину, фактора некрозу пухлин, пухлинних супресорів, фактора росту метастазів, альфа-1 антитрипсину, альбуміну, α-лактальбуміну, аполіпопротеїну-Е, високоглікозильованого еритропоєтину, ангіопоєтинів, гемоглобіну, тромбіну, пептиду активування тромбінового рецептора, тромбомодуліну, антигенів крові VII, VIIa, VIII, IX та XIII, фактора активування плазміногену, фібрин-зв'язуючого білка, урокінази, стрептокінази, гірудину, протеїну С, С-реактивного білка, пригнічувача реніну, пригнічувача колагенази, супероксиддисмутази, лептину, тромбодитарного фактора росту, епітеліального фактора росту, епідермального фактора росту, ангіостатину, ангіотензину, фактора росту кісток, кісткового морфогенетичного білка, кальцитоніну, атріопептину, хрящового індукуючого фактора імпульсної відповіді, елкатоніну, фактора активування сполучної тканини, пригнічувача шляху тканевого фактора, фолітропіну, лютропіну, люліберину, факторів росту нервової тканини, паратиреоїдного гормону, релаксину, секретину, соматомедину, інсуліноподібного фактора росту, гормону кори наднирникових залоз, холецистокініну, панкреатичного поліпептиду, гастрин-вивільнюючого пептиду, фактора вивільнення кортикотропіну, тиреотропного гормону, автотаксину, лактоферину, міостатину антигенів клітинної поверхні, моноклональних антитіл, поліклональних антитіл та фрагментів антитіл.

У іншому втіленні, Fc - фрагмент імуноглобуліну, що містить FcRn-зв'язуючу ділянку, яка знаходиться у кон'югаті за винаходом також може містити домен CH2, домен CH3 або обидва ці домени.

У іншому втіленні, Fc - фрагмент імуноглобуліну у складі кон'югату за винаходом може знаходитися в неглікозильованій формі.

У іншому втіленні, Fc - фрагмент імуноглобуліну у складі кон'югату за винаходом може містити петельну ділянку.

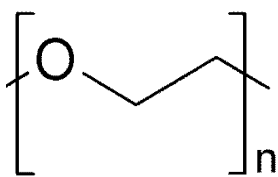
У іншому втіленні, Fc - фрагмент імуноглобуліну у складі кон'югату за винаходом може бути вибрано з групи, яка складається з IgG, IgA, IgD, IgE, IgM, їх комбінацій та гібридів.

У іншому втіленні, Fc - фрагмент імуноглобуліну у складі кон'югату за винаходом може бути Fc - фрагментом IgG4.

У іншому аспекті, винаходом передбачено спосіб отримання кон'югату фізіологічно активного поліпептиду з Fc-фрагментом імуноглобуліну, що підтримує внутрішню зв'язувальну спорідненість Fc - фрагменту імуноглобуліну до FcRn, спосіб, який полягає у: (а) прикріпленні фізіологічно активного поліпептиду через непептидильний лінкер до Fc-фрагменту імуноглобуліну, що містить FcRn-зв'язуючу ділянку до фізіологічно активного поліпептиду через непептидильний лінкер для отримання суміші фізіологічно активних кон'югатів поліпептиду з Fc-фрагментом імуноглобуліну; та (b) відокремленні від суміші кон'югату фізіологічно активного поліпептиду з Fc-фрагментом імуноглобуліну, який має відношення зв'язування  $\pm 6\%$  коефіцієнту зв'язування Fc-фрагменту імуноглобуліну, як було визначено заміщенням кількості, зв'язаної з FcRn з рН 6,0 та кількості, зв'язаної з FcRn з рН 7,4 у Рівнянні 1.

У одному втіленні, застосований у способі отримання за винаходом непептидильний лінкер може бути поліетиленгліколевим полімером наступної Формули 1:

Формула 1.



в якій  $n$  складає 10 - 2400.

У іншому втіленні, кон'югат, відокремлений на операції (b) способу отримання за винаходом може мати структуру, в якій непептидильний лінкер є приєднаним до N-кінця Fc-фрагменту імуноглобуліну.

У іншому аспекті винаходом передбачено спосіб підтримання внутрішньої зв'язувальної спорідненості кон'югату фізіологічно активного поліпептиду з Fc-фрагментом імуноглобуліну до FcRn, який полягає у прикріпленні фізіологічно активного поліпептиду через непептидильний лінкер до Fc-фрагменту імуноглобуліну, що містить FcRn-зв'язуючу ділянку.

У одному втіленні, підтримання внутрішньої зв'язувальної спорідненості може бути здійснено *in vivo*.

У іншому аспекті, винаходом передбачено композицію, що містить кон'югат фізіологічно активного поліпептиду з Fc-фрагментом імуноглобуліну, що підтримує внутрішню зв'язувальну спорідненість Fc-фрагменту імуноглобуліну до FcRn.

У одному аспекті, винаходом передбачено фізіологічно активний кон'югат поліпептиду з Fc-фрагментом імуноглобуліну, який містить фізіологічно активний поліпептид, приєднаний через непептидильний лінкер до Fc-фрагменту імуноглобуліну, що містить FcRn-зв'язуючу ділянку, в якому відношення кількості зв'язаного з FcRn кон'югату з pH 6,0 та кількості зв'язаного з FcRn кон'югату з pH 7,4 складає  $\pm 6\%$  відношення, визначеного вимірюванням кількостей Fc-фрагменту імуноглобуліну, зв'язаного з FcRn в тих саме умовах, які було застосовано для кон'югату.

Як тут застосовано, вираз «ступінь зв'язування кон'югату фізіологічно активного поліпептиду з Fc-фрагментом імуноглобуліну» означає відношення концентрації кон'югату білка, зв'язаного з FcRn до загальної концентрації кон'югату зв'язаного або незв'язаного з FcRn білка з інтересуючим значенням pH. У цьому винаході, через те, що термін «ступінь зв'язування» застосовують для обчислення відношення між величинами ступенів зв'язування в умовах застосування двох різних значень pH, відношення цих ступенів зв'язування може бути обчислено від значення абсолютного ступеню зв'язування, вимірюваному при одному значенні pH та воно також може бути визначено вимірюванням інших фізичних кількостей, пропорційних кількості зв'язаного кон'югату та легких у вимірюванні. Наприклад, відношення між ступенями зв'язування може бути визначено вимірюванням сигналів поверхневого плазмонного резонансу (SPR) та обчисленням відношення між цими сигналами з pH 6,0 та pH 7,4. Крім того, для визначення відношення між ступенями зв'язування також можна застосувати інші способи вимірювання.

Особливим чином, винаходом передбачено фізіологічно активний кон'югат поліпептиду з Fc-фрагментом імуноглобуліну, що містить фізіологічно активний поліпептид, приєднаний через непептидильний лінкер до Fc-фрагменту імуноглобуліну, який містить FcRn-зв'язуючу ділянку, в якому коефіцієнт зв'язування, визначений заміщенням кількості зв'язаного з FcRn кон'югату з pH 6,0 та кількості зв'язаного з FcRn кон'югату з pH 7,4 у наступному Рівнянні 1 є меншим, ніж діапазон коефіцієнту зв'язування у  $\pm 6\%$ , визначений вимірюванням кількостей Fc-фрагменту імуноглобуліну, зв'язаного з FcRn в тих саме умовах, які було застосовано для кон'югату.

Рівняння 1.

Коефіцієнт зв'язування (%) = (кількість, зв'язана з pH 7,4 / кількість, зв'язана з pH 6,0)  $\times 100$ .

Коефіцієнт зв'язування може бути отримано у відсотковому (%) вигляді шляхом поділу кількості зв'язаного з FcRn кон'югату (або Fc - фрагменту імуноглобуліну) з pH 7,4 на кількість шляхом зв'язаного з FcRn кон'югату (або Fc - фрагменту імуноглобуліну) з pH 6,0 з наступним множенням поділеної величини на 100.

Коефіцієнт зв'язування може бути обчислено із застосуванням способу, запропонованого Weirong Wang et al. (Drug Metabolism and Disposition 39:1469-1477, 2011) для попередньої оцінки часу напівжиття моноклональних антитіл, який не мав особливих обмежень для цієї мети. В разі застосування цього описаного у вищезазначеній науковій літературі способу, моноклональне антитіло з високим коефіцієнтом зв'язування мало невеликий час напівжиття *in vivo*.

Способом, який може бути застосовано для вимірювання коефіцієнту зв'язування є перш за

все, але без обмеження, спосіб поверхневого плазмонного резонансу.

Вимірювання коефіцієнту зв'язування також може бути здійснено, наприклад, іммобілізацією FcRn на біосенсорному чіпі (наприклад, на біосенсорному чіпі Biosense CM5) із застосуванням набору для здійснення реакції приєднання аміну тощо, з ін'єкцією FcRn-іммобілізованого біосенсорного чіпу з кислотним буфером (наприклад, буфером з pH 6,0), що містить матеріал (наприклад, кон'югат або Fc - фрагмент імуноглобуліну) ступінь зв'язування якого з FcRn потрібно виміряти та наступною ін'єкцією нейтрального буферу (наприклад, буферу з pH 7,4) на цей біосенсорний чіп. Коефіцієнт зв'язування в такому разі може бути визначено вимірюванням резонансної одиниці (RU) у рівноважному стані перед закінченням ін'єкції зразка у буфері з pH 6,0 на чіп для визначення кількості, зв'язаної з pH 6,0, вимірюванням резонансної одиниці після ін'єкції буферу з pH 7,4 для визначення кількості, зв'язаної з pH 7,4 з наступним поділом кількості, зв'язаної з pH 7,4 на кількість, зв'язану з pH 6,0. Якщо потрібно отримати коефіцієнт зв'язування у відсотковому вигляді, тоді поділену величину може бути помножено на 100.

Склад застосованого в описаному вище способі буферу з pH 6,0 особливим чином не обмежено за умови, що він зможе викликати зв'язування досліджуваного матеріалу, прийнятне для вимірювання його ступеню зв'язування до FcRn та FcRn. Наприклад, буфер з pH 6,0 може бути буфером, який містить сіль, як-то фосфат. Концентрація цієї солі у буфері може дорівнювати, але без обмеження, 50-200 мМ. Також цей буфер може бути введено ін'єкцією на FcRn-іммобілізований біосенсорний чіп з температурою приблизно 25°C, але температура вимірювання може бути зміненою в межах певного температурного діапазону, тоді як pH буферу залишається незмінним.

Буфер з pH 6,0 також може містити матеріал, призначений для вимірювання ступеню зв'язування з FcRn. Концентрація матеріалу, призначеного для вимірювання ступеню зв'язування з FcRn в буфері з pH 6,0 не є особливо обмеженою за умови, що цю величину може бути виміряно. Наприклад, концентрація матеріалу, призначеного для вимірювання ступеню зв'язування з FcRn в буфері з pH 6,0 може складати 100 - 12,5 нМ.

Склад застосованого в описаному вище способі буферу з pH 7,4 також не обмежують особливим чином за умови, що він може викликати дисоціацію між матеріалом, призначеним для вимірювання ступеню зв'язування з FcRn та FcRn. Наприклад, буфер з pH 7,4 може бути буфером, що містить фосфат. Концентрація солі в цьому буфері може дорівнювати, але без обмеження, 50-200 мМ. Також цей буфер може бути введено ін'єкцією на FcRn- іммобілізований біосенсорний чіп з температурою, яка дорівнює, але без обмеження, приблизно 25~37°C. У певному втіленні, відношення між обсягами зв'язування вимірюють з температурою 25 °C.

Крім того, ступінь зв'язування між FcRn та матеріалом, призначеним для вимірювання ступеню зв'язування до FcRn з pH 6,0 може бути величиною резонансної одиниці, виміряної за 2-60 секунд перед закінченням перед закінченням ін'єкції зразка у буфері з pH 6,0. Зв'язування між FcRn та матеріалом, призначеним для вимірювання ступеню зв'язування до FcRn в момент часу вимірювання переважним чином знаходиться в рівноважному стані.

Ступінь зв'язування між FcRn та матеріалом, призначеним для вимірювання ступеню зв'язування до FcRn з pH 7,4 також може бути величиною резонансної одиниці, виміряної за 10-20 секунд після здійснення ін'єкції буферу з pH 7,4. Момент часу такого вимірювання переважним чином знаходиться між точкою часу, в якій виникає швидке змінення величини RU та перед точкою часу, в якій ця величина досягає 0.

У порівнянні коефіцієнту зв'язування між Fc - фрагментом імуноглобуліну та кон'югатом за винаходом, коефіцієнти зв'язування переважним чином є величинами, визначеними із застосуванням однакового експериментального способу в однакових експериментальних умовах, але склад та температура буферів можуть змінюватися в залежності від типу кон'югату.

Як описано вище, спосіб поверхневого плазмонного резонансу є одним зі способів визначення коефіцієнту зв'язування. Окрім цього способу у винаході може бути застосовано будь-який спосіб, як-то спосіб ферментного-імуносорбентного аналізу (ІФА), з допомогою якого можна вимірювати кількість кон'югату, зв'язаного з FcRn. Слід додати, що одиниця кількості зв'язування може змінюватися в залежності від застосованого способу.

Якщо коефіцієнт зв'язування кон'югату фізіологічно активного поліпептиду з Fc-фрагментом імуноглобуліну, що містить фізіологічно активний поліпептид, приєднаний через непептидильний лінкер до Fc-фрагменту імуноглобуліну, що має FcRn-зв'язуючу ділянку складає  $\pm 6,0\%$  коефіцієнту зв'язування самого Fc-фрагменту імуноглобуліну, як виміряно із застосуванням описаного вище способу, то кон'югат фізіологічно активного поліпептиду з Fc-фрагментом імуноглобуліну буде мати тривалий час напівжиття *in vivo*.

У винаході було знайдено, що внутрішня зв'язувальна спорідненість Fc-фрагменту імуноглобуліну до FcRn може зберігатися навіть у разі, якщо фізіологічно активний поліпептид

було ковалентно приєднано через непептидильний лінкер до Fc-фрагменту імуноглобуліну, який має FcRn-зв'язуючу ділянку з утворенням кон'югату, що свідчить про наявність внутрішньоклітинного повторного застосування Fc-фрагменту імуноглобуліну, яка може легко виникнути, збільшуючи час напівжиття *in vivo*. Слід особливо зазначити, що якщо

непептидильний лінкер зв'язується з частиною без FcRn-зв'язуючої ділянки Fc-фрагменту імуноглобуліну, то він не зменшує зв'язувальну спорідненість Fc-фрагменту імуноглобуліну до FcRn. Коли непептидильним лінкером є поліетиленгліколь  $(-[O-CH_2-CH_2]_n-)$ , то  $n$  у формулі  $(-[O-CH_2-CH_2]_n-)$  дорівнює, але без обмеження, 10 або більше, переважно 10-2400, більш переважно 10-480 та більш переважніше 50-250.

Було відкрито, що в разі, якщо значення  $n$  у формулі  $(-[O-CH_2-CH_2]_n-)$  переважно дорівнювало 10-2400 та більш переважніше 50-2400, цей поліетиленгліколь не впливав на фізіологічну активність та FcRn-зв'язуючу активність кожного фізіологічно активного поліпептиду та Fc - фрагменту імуноглобуліну. Ці характеристики лежать в основі винаходу.

Як тут застосовано, термін «фізіологічно активний кон'югат поліпептиду з Fc-фрагментом імуноглобуліну» означає кон'югат, який містить фізіологічно активний поліпептид, ковалентно приєднаний через непептидильний лінкер до Fc-фрагменту імуноглобуліну, що має FcRn-зв'язуючу ділянку та має коефіцієнт зв'язування  $\pm 6,0\%$  від коефіцієнту зв'язування Fc-фрагменту імуноглобуліну, як було визначено заміщенням кількості зв'язування з FcRn з pH 6,0 та кількості зв'язування з FcRn з pH 7,4 у Рівнянні 1.

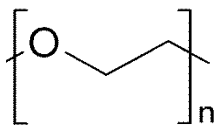
Непептидильний лінкер у кон'югаті може бути зв'язано з амінокислотними залишками на віддаленні від FcRn-зв'язуючої ділянки Fc-фрагменту імуноглобуліну, наприклад, ділянки, відповідній положенням 252-257 та 307-311 CH<sub>2</sub> та положенням 433-436 CH<sub>2</sub> відповідно за системою нумерації Kabat. Непептидильний лінкер переважним чином може бути зв'язаним з N- або C-кінцем Fc-фрагменту імуноглобуліну та більш переважніше, але без обмеження, він може бути зв'язаним з N-кінцем такого фрагменту.

Коли непептидильний лінкер є зв'язаним з N- або C-кінцем Fc-фрагменту імуноглобуліну, він суттєво не зменшує зв'язувальної спорідненості Fc-фрагменту імуноглобуліну до FcRn, отже може бути збережено внутрішню зв'язувальну спорідненість кон'югату Fc-фрагменту імуноглобуліну до FcRn.

Як тут застосовано, термін «непептидильний лінкер» означає біосумісний полімер, який складається з двох чи більше зв'язаних між собою повторюючихся одиниць, в якому ці одиниці, що повторюються є зв'язаними між собою будь-яким непептидним ковалентним зв'язком. Цей непептидильний лінкер може мати два або три кінці.

Застосований у винаході непептидильний лінкер може бути вибрано з групи, яка складається з біорозкладаних полімерів, як-то, але без обмеження, з поліетиленгліколю, поліпропіленгліколю, сополімеру етиленгліколю та пропіленгліколю, поліоксиетилованого поліолу, полівінілового спирту, полісахариду, декстрану, полівінілового етилового етеру, біорозкладаних полімерів, як-то полімолочної кислоти (PLA) та полілактид-ко-гліколіду (PLGA), ліпідних полімерів, хітинів, гіалуронової кислоти та їх комбінацій. Переважним чином, непептидильний лінкер є поліетиленгліколем, наприклад, поліетиленгліколевим полімером наступної Формули 1, але без обмеження:

Формула 1:



в якій  $n$  складає 10 - 2400, переважним чином 10 - 480 та більш переважніше 50 - 250, але без обмеження.

При цьому слід зазначити, що винаходом також передбачено інші непептидильні лінкери з молекулярною масою, яка відповідає молекулярній масі поліетиленгліколю за Формулою 1.

Крім того, в межах цього винаходу також знаходяться відомі в цій галузі їх похідні та похідні непептидильного лінкеру, які на сьогоднішній день може бути легко отримано.

Застосований в якості непептидильного лінкеру за винаходом поліетиленгліколь має перевагу, яка полягає в тому, що він не призводить до появи просторової перешкоди між фізіологічно активним поліпептидом та Fc - фрагментом імуноглобуліну, зв'язаним з обома кінцями таким чином, що може бути збереженою фізіологічна активність фізіологічно активного поліпептиду та зв'язувальна спорідненість Fc-фрагменту імуноглобуліну до FcRn.

Застосований у злитому білку, отриманому шляхом традиційного способу злиття зі підтриманням рамки зчитування пептидильний лінкер має недолік, який полягає в тому, що він

легко розщеплюється протеазою *in vivo*, що призводить до неотримання очікуваного ефекту збільшення сироваткового часу напівжиття активного лікарського засобу із застосуванням носія. Однак, кон'югат, який містить непептидильний лінкер за винаходом рішуче долає цю перешкоду. Для підтримання сироваткового часу напівжиття пептиду, подібно до властивостей носія, непептидильний лінкер також може бути стійким до дії протеази. Отже, будь-який непептидильний лінкер може бути застосовано у винаході без будь-якого обмеження, якщо він є полімером, наділеним вищезазначеною функцією, тобто полімером, стійким до дії протеази *in vivo*.

Додатково, непептидильний лінкер, який є зв'язаним з Fc - фрагментом імуноглобуліну за винаходом може бути отримано не тільки з полімерів одного типу, але й також з комбінації різних типів полімерів.

Непептидильний лінкер за винаходом має здатні до зв'язування з Fc - фрагментом імуноглобуліну реакційні групи та фізіологічно активний поліпептид.

Реакційні групи на обох кінцях непептидильного полімеру переважним чином вибрано з групи, яка складається з реакційної альдегідної групи, пропіональдегідної групи, бутиральдегідної групи, малеїмідної групи та сукцинімідної похідної, яка може бути сукцинімідилпропіонатом, гідроксисукцинімідилом, сукцинімідилкарбоксиметилом або сукцинімідилкарбонатом. Зокрема, якщо непептидильний полімер має на обох власних кінцях реакційну альдегідну групу, то фізіологічно активний поліпептид та імуноглобулін ефективно зв'язуються, відповідно, з обома кінцями непептидильного лінкеру з мінімізуванням неспецифічних реакцій. Кінцевий продукт, отриманий шляхом відновного алкілування через альдегідний зв'язок є набагато стійкішим продуктом, зв'язаного з допомогою амідного зв'язку. Альдегідна реакційна група може вибірково зв'язуватися з N-кінцем в умовах низького pH та може утворювати ковалентний зв'язок з лізиновим залишком в умовах високого pH, наприклад, pH 9,0. Непептидильний лінкер в цьому випадку може містити дві або більше альдегідні групи або мати має дві або більше спиртові групи, заміщені функціональними групами, які містять альдегід.

Реакційні групи на обох кінцях непептидильного лінкеру можуть бути однаковими або різними. Наприклад, один кінець непептидильного лінкеру може мати малеїмідну групу та інший кінець може мати альдегідну групу, пропіональдегідну групу, або алкілальдегідну групу, як-то бутиральдегід. Якщо в якості непептидильного лінкеру застосовано поліетиленгліколь, що має гідроксильні реакційні групи на обох кінцях, то ці гідроксильні групи може бути активовано з допомогою відомої хімічної реакції з отриманням різних реакційних груп. Альтернативним чином, для отримання кон'югату винаходу може бути застосовано наявний у продажу поліетиленгліколь з модифікованою реакційною групою.

Як тут застосовано, термін «фізіологічно активний поліпептид» в загальному сенсі означає поліпептид, який має будь-яку фізіологічну активність *in vivo* та звичайно має поліпептидну структуру та різні фізіологічні активні властивості. Фізіологічно активні поліпептиди охоплюють поліпептиди, які регулюють генетичну експресію та фізіологічну функцію та виправляють аномальний стан, спричинений втратою або надлишковим виділенням речовин, залучених до регулювання функцій *in vivo*. Фізіологічно активні поліпептиди також можуть містити білкові лікувальні агенти загального призначення. Крім того, термін «фізіологічно активний поліпептид» охоплює не тільки природні поліпептиди, але й також їх похідні.

Тип та розмір фізіологічно активного поліпептиду в кон'югаті за винаходом не має певного обмеження за умови, що цей фізіологічно активний поліпептид може підвищувати сироватковий час напівжиття кон'югованої структури за винаходом. У втіленні винаходу, кон'югати отримують із застосуванням різних фізіологічно активних поліпептидів, включаючи інсулін, інтерферон, гормон росту людини та агоніст GLP-1, які є характерними прикладами фізіологічно активних поліпептидів. Було відкрито, що власна внутрішня зв'язувальна спорідненість Fc-фрагменту імуноглобуліну до FcRn може бути збережена незважаючи на тип та розмір фізіологічно активного поліпептиду.

Фізіологічно активний поліпептид для включення до кон'югату за винаходом може бути вибрано з групи, яка складається, але без обмеження, з глюкагоноподібного пептиду-1 (GLP-1), гранулоцитарного колонієстимулюючого фактора (G-CSF), гормону росту людини (hGH), еритропоетину (EPO), глюкагону, окситомодуліну, інсуліну, соматореліну, пептиду, який вивільнює гормон росту, інтерферонів, рецепторів інтерферонів, серпентинового рецептора, інтерлейкінів та інтерлейкінових рецепторів, ферментів, інтерлейкін-зв'язуючих білків, цитокін-зв'язуючих білків, фактора активування макрофагів, макрофагового пептиду, B - клітинного фактора, T - клітинного фактора, протеїну A, алергологічного пригнічувача, клітинних некротичних глікобілків, імунотоксину, лімфотоксину, фактора некрозу пухлин, пухлинних

супресорів, фактора росту метастазів, альфа-1 антитрипсину, альбуміну,  $\alpha$ -лактальбуміну, аполіпопротеїну-Е, високоглікозильованого еритропоєтину, ангіопоєтинів, гемоглобіну, тромбіну, пептиду активування тромбінового рецептора, тромбомодуліну, антигенів крові VII, VIIa, VIII, IX та XIII, фактора активування плазміногену, фібрин-зв'язуючого білка, урокінази, стрептокінази, гірудину, протеїну С, С-реактивного білка, пригнічувача реніну, пригнічувача колагенази, супероксиддисмутази, лептину, тромбоцитарного фактора росту, епітеліального фактора росту, епідермального фактора росту, ангіостатину, ангіотензину, фактора росту кісток, кісткового морфогенетичного білка, кальцитоніну, атріопептину, хрящового індукуючого фактора імпульсної відповіді, елкатоніну, фактора активування сполучної тканини, пригнічувача шляху

10 тканевого фактора, фолітропіну, лютропіну, люліберину, факторів росту нервової тканини, паратироїдного гормону, релаксину, секретину, соматомедину, інсуліноподібного фактора росту, гормону кори наднирникових залоз, холецистокініну, панкреатичного поліпептиду, гастрин-вивільнюючого пептиду, фактора вивільнення кортикотропіну, тиреотропного гормону, автотаксину, лактоферину, міостатину антигенів клітинної поверхні, моноклональних антитіл,

15 поліклональних антитіл та фрагментів антитіл.

Додатково, як тут застосовано, термін «фізіологічно активний поліпептид» охоплює не тільки природні фізіологічно активні поліпептиди, але й також агоністи, прекурсори, похідні, фрагменти або варіанти кожного поліпептиду. Приклади похідних оксинтомодуліну у цій заявці охоплюють, але без обмеження, всі подібні похідні, наведені в заявці Korean Patent Application Publication № 10-2012-0137271 та приклади похідних інсулін-вивільнюючого пептиду охоплюють, але без

20 обмеження, всі подібні похідні, наведені в заявці Korean Patent Application Publication № 10-2009-0008151.

Як тут застосовано, термін «Fc - фрагмент імуноглобуліну» означає білок, який містить важколанцюгову сталу ділянку імуноглобуліну за виключенням важколанцюгової сталої ділянки 1 (CH1) та легколанцюгової сталої ділянки 1 (CL1) імуноглобуліну. Fc - фрагмент також може містити петельну ділянку у складі важколанцюгової сталої ділянки. Fc - фрагмент імуноглобуліну за винаходом переважним чином містить домен CH2, домен CH3 або обидва ці домени через необхідність підтримання зв'язувальної спорідненості Fc-фрагменту імуноглобуліну до FcRn.

25

Також Fc - фрагмент імуноглобуліну за винаходом може бути подовженим Fc - фрагментом, що містить повну важколанцюгову сталу ділянку 1 (CH1) або її частину та / або легколанцюгову сталу ділянку 1 (CL1) за виключенням важколанцюгових та легколанцюгових змінних ділянок імуноглобуліну за умови підтримання його власної внутрішньої зв'язувальної спорідненості до FcRn навіть у разі, якщо він є зв'язаним з фізіологічно активним поліпептидом та

30 не пептидильним лінкером.

Через те, що Fc - фрагмент імуноглобуліну є біорозкладаним поліпептидом, здатним до метаболізації *in vivo*, він є безпечним для застосування в якості носія лікарського засобу. Також, через те, що Fc - фрагмент імуноглобуліну має молекулярну масу, меншу, ніж молекулярна маса цілої молекули імуноглобуліну, він є корисним у приготуванні, очищенні та отриманні кон'югату. Крім того, через видалення Fab - ділянки, яка має високу гетерогенність завдяки

35 неоднаковості амінокислотної послідовності між антитілами, Fc - фрагмент отримує значне підвищення гомогенності та низьку спроможність викликати сироваткову антигенність.

Fc - фрагмент імуноглобуліну за винаходом містить не тільки природні амінокислотні послідовності, але й також їх мутантні варіанти. Як тут застосовано, термін «мутант амінокислотної послідовності» означає послідовність, що відрізняється від природної амінокислотної послідовності через делецію, вставку, неконсервативне або консервативне заміщення або через комбінацію таких змінень одного або кількох амінокислотних залишків. Наприклад, у разі Fc-фрагменту IgG, прийнятною метою для модифікації можуть бути амінокислотні залишки в положеннях 214 - 238, 297 - 299, 318 - 322 або 327 - 331, які, як відомо,

40 є важливим для зв'язування.

Додатково, можливим є також застосування й інших мутантів, включаючи мутантів з делецією ділянки, здатної утворювати дисульфідний зв'язок, з делецією деяких амінокислотних залишків на N-кінці природного Fc-фрагменту, або з додаванням метіонінового залишку до N-кінця природного Fc-фрагменту. Крім того, для усунення ефекторних функцій, може бути видалено сайт зв'язування комплементу, наприклад, сайт зв'язування C1q. Також може бути видалено сайт залежної від антитіл клітинно-опосередкованої цитотоксичності (ADCC). Способи отримання цих послідовностей, які є похідними Fc-фрагменту імуноглобуліну наведено в

45 заявках International Patent Publication №№ WO 97/34631 та WO 96/32478.

Амінокислотні заміщення білків та пептидів, які суттєво не змінюють активність молекул відомі в науковій літературі (Н. Neurath, R. L. Hill, The Proteins, Academic Press, New York, 1979).

50

Найбільш поширеними з них є заміщення Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Thy/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu, Asp/Gly, які можуть відбуватися в двох напрямках.

У деяких випадках Fc - фрагмент імуноглобуліну також може бути змінено, наприклад, шляхом фосфорилювання, сульфатування, акрилування, глікозилювання, метилування, фарнезилювання, ацетилювання або амідування.

Описані вище Fc - мутанти є мутантами, які виявляють подібну до Fc - фрагменту винаходу біологічну активність, але також ще й наділені стійкістю проти дії нагрівання, pH тощо.

Додатково, ці Fc - фрагменти може бути отримано з природних форм, виділених з людського та тваринного організму, включаючи таких тварин, як корови, кози, свині, миші, кролі, хом'яки, щурі та морські свинки або вони також можуть являти собою рекомбінантні форми або похідні, отримані з трансформованих клітин тварин або мікроорганізмів. Для цього винаходу їх можна отримати з природного імуноглобуліну шляхом виділення цілого імуноглобуліну з живого людського або тваринного організму з наступною протеазною обробкою. Якщо такий цілий імуноглобулін обробляють папаїном, то він розщеплюється на Fab- та Fc-фрагменти. Якщо ж його обробляють пепсином, то він розщеплюється на pF'- та F(ab)2- фрагменти. Для виділення Fc- або pF'- фрагментів, ці фрагменти може бути піддано, наприклад, ексклюзійній хроматографії.

Переважним чином, Fc - фрагмент імуноглобуліну за винаходом є рекомбінантним Fc - фрагментом імуноглобуліну, отриманим з мікроорганізму із застосуванням людського Fc - фрагменту.

Додатково, Fc - фрагмент імуноглобуліну може також існувати у формі, яка має природні цукрові ланцюги, цукрові ланцюги, які є збільшеними або зменшеними у порівнянні з природною формою або може знаходитися у деглікозикованій формі. Збільшення, зменшення або усунення цукрових ланцюгів Fc - фрагменту імуноглобуліну може бути здійснено із застосуванням загальноприйнятих способів, як-то із застосуванням хімічного способу, ферментативним шляхом та генно-інженерним шляхом з застосуванням мікроорганізму. Fc - фрагмент імуноглобуліну, отриманий шляхом усунення цукрових ланцюгів характеризується зменшеною зв'язувальною спорідненістю до комплементу (C1q) та має знижену залежну від антитіл клітинно-опосередковану цитотоксичність або зовсім її не має та тим самим не викликає жодних небажаних імунних відповідей in vivo. В цьому зв'язку, Fc - фрагмент імуноглобуліну у деглікозикованій або аглікозикованій формі може бути більш прийнятним для застосування в якості носія лікарського засобу.

Як тут застосовано, термін «деглікозилювання» означає ферментативне усунення цукрових функціональних груп з Fc - фрагменту та термін «аглікозилювання» означає неглікозикований Fc - фрагмент, який є продуктом експресії еукаріотів, переважним чином E. coli.

Слід зазначити, що Fc - фрагмент імуноглобуліну може мати людинне або тваринне походження, тобто походити з таких тварин, як-то великої рогатої худоби, кіз, свиней, мишей, кроликів, хом'яків, щурів або морських свинок та переважним чином він має людське походження. Крім того, Fc - фрагмент імуноглобуліну може бути Fc - фрагментом, який походить від імуноглобулінів IgG, IgA, IgD, IgE та IgM, їх комбінацій або гібридів та переважним чином він походить від імуноглобулінів IgG або IgM, які є одними серед найбільш розповсюджених білків в крові людини та найбільш переважніше він є похідною імуноглобулінів класу IgG, які, як відомо, підвищують період напіврозпаду ліганд-зв'язуючих білків.

Термін «комбінація», як тут застосовано, означає утворення зв'язку між поліпептидом, що кодує одноланцюгові Fc - фрагменти імуноглобуліну однакового походження та одноланцюговим поліпептидом іншого походження з отриманням димеру або мультимеру. Інакше кажучи, димер або мультимер може бути утворено із застосуванням двох або більше фрагментів, вибраних з групи, яка складається з фрагментів IgG Fc, IgA Fc, IgM Fc, IgD Fc та IgE Fc.

Як тут застосовано, термін «гібрид» означає наявність двох або більше послідовностей, відповідних Fc - фрагментам імуноглобуліну, які мають різне походження в одноланцюговому Fc - фрагменті імуноглобуліну. У цьому винаході можливо застосування різних типів гібридів. Інакше кажучи, доменні гібриди можуть складатися з 1 - 4 доменів, вибраних з групи, яка складається з доменів CH1, CH2, CH3 та CH4 Fc-ділянок IgG, IgM, IgA, IgE та IgD та може містити петельну ділянку.

З іншого боку, імуноглобуліни класу IgG можна розділити на підкласи IgG1, IgG2, IgG3 та IgG4 та комбінації та гібриди цих підкласів також може бути застосовано у винаході, як-то, переважним чином, підкласи IgG2 та IgG4 та більш переважніше, Fc - фрагмент підкласу IgG4, який дуже рідко має ефекторні функції, як-то CDC (функцію залежної від комплементу

цитотоксичності). Інакше кажучи, найбільш бажаним Fc - фрагментом імуноглобуліну для застосування в якості носія лікарського засобу за винаходом є неглікозилований Fc - фрагмент, який походить від людського імуноглобуліну IgG4. Людський Fc - фрагмент є більш бажаним, ніж Fc - фрагмент нелюдського походження, який може діяти, як антиген в організмі людини та викликати небажані імунні відповіді, як-то утворення нових антитіл проти антигену.

У втіленні винаходу, кожен окремо вибраний інсулін, інтерферон, гормон росту людини та агоніст GLP-1 є приєднаним через непептидильний лінкер до Fc-фрагменту імуноглобуліну, який має здатність до зв'язування з FcRn з отриманням таким чином кон'югатів, які підвищують внутрішню зв'язувальну спорідненість Fc-фрагменту імуноглобуліну до FcRn та можуть легко відокремлюватися від FcRn в умовах нейтрального pH та також можуть виявляти рівень дисоціації, подібний до рівня дисоціації Fc-фрагменту імуноглобуліну (Приклади та Фіг. 2 та 3). Крім того, було відкрито, що кон'югат винаходу має більш тривалу, ніж кон'югат в тій самій рамці зчитування, дію *in vivo* (Фіг. 4).

У іншому аспекті, винаходом передбачено спосіб отримання кон'югату фізіологічно активного поліпептиду з Fc-фрагментом імуноглобуліну, що підтримує внутрішню зв'язувальну спорідненість Fc - фрагменту імуноглобуліну до FcRn, який полягає у наступному: (a) приєднання фізіологічно активного поліпептиду через непептидильний лінкер до Fc-фрагменту імуноглобуліну, який має FcRn-зв'язуючу ділянку з отриманням суміші кон'югатів фізіологічно активного поліпептиду з Fc-фрагментом імуноглобуліну; та (b) відокремлення від цієї суміші кон'югату фізіологічно активного поліпептиду з Fc-фрагментом імуноглобуліну, який має коефіцієнт зв'язування  $\pm 6\%$  коефіцієнту зв'язування Fc-фрагменту імуноглобуліну, як було визначено заміщенням кількості, зв'язаної з FcRn з pH 6,0 та кількості, зв'язаної з FcRn з pH 7,4 у наступному Рівнянні 1.

Рівняння 1

Коефіцієнт зв'язування (%) = (кількість, зв'язана з pH 7,4 / кількість, зв'язана з pH 6,0)  $\times$  100.

Наведені тут фізіологічно активний поліпептид, Fc - фрагмент імуноглобуліну, непептидильний лінкер, кон'югат та визначення коефіцієнту зв'язування є такими, як описано вище.

Операція (a) способу за винаходом є операцією ковалентного зв'язування фізіологічно активного поліпептиду через непептидильний лінкер з Fc - фрагментом імуноглобуліну. Операція (a) може полягати у застосуванні операцій: (i) зв'язування будь-якого фізіологічно активного поліпептиду та Fc - фрагменту імуноглобуліну до реакційної групи на одному з кінців непептидильного лінкеру; та (ii) зв'язування позосталого з реакційною групою на іншому кінці непептидильного лінкеру. Крім того, Операція (a) може полягати у застосуванні між Операціями (i) та (ii) ще додаткової операції відокремлення фізіологічно активного поліпептиду або Fc - фрагменту імуноглобуліну, зв'язаного з одним кінцем непептидильного лінкеру. Для отримання цього кон'югату, зміст патенту Korean Patent № 10-0725315) може бути включено сюди шляхом посилання.

Для зв'язування фізіологічно активного поліпептиду через непептидильний лінкер з частиною Fc-фрагменту імуноглобуліну за виключенням його FcRn-зв'язуючої ділянки, цей фізіологічно активний поліпептид з приєднаним до нього непептидильним лінкером може вступити в реакцію з Fc - фрагментом імуноглобуліну з pH 4,0-9,0.

При отриманні кон'югату із застосуванням цього способу, може бути отримано побічні продукти, тобто на додачу до кон'югату, що підтримує внутрішню зв'язувальну спорідненість Fc-фрагменту імуноглобуліну до FcRn може бути отримано кон'югат, який має зменшену зв'язувальну спорідненість Fc-фрагменту імуноглобуліну до FcRn. Тому після реакції прикріплення фізіологічно активного поліпептиду через непептидильний лінкер до Fc - фрагменту імуноглобуліну, цей спосіб додатково вимагає відокремлення від суміші кон'югатів фізіологічно активного поліпептиду з Fc-фрагментом імуноглобуліну, що підтримує внутрішню зв'язувальну спорідненість Fc-фрагменту імуноглобуліну до FcRn.

Отже, спосіб винаходу полягає у (b) відокремленні від суміші кон'югатів кон'югату фізіологічно активного поліпептиду з Fc-фрагментом імуноглобуліну, який має коефіцієнт зв'язування  $\pm 6\%$  коефіцієнту зв'язування Fc-фрагменту імуноглобуліну, як було визначено заміщенням кількості, зв'язаної з FcRn з pH 6,0 та кількості, зв'язаної з FcRn з pH 7,4 у Рівнянні 1.

Операція (b) переважним чином є способом відокремлення кон'югату, в якому непептидильний лінкер є зв'язаним з амінокислотними залишками, розташованими далеко від FcRn-зв'язуючої ділянки Fc-фрагменту імуноглобуліну, як-то ділянки, що відповідає положенням 252-257 та 307-311 CH<sub>2</sub> та положенням 433-436 CH<sub>2</sub> з нумерацією відповідно до системи нумерації Kabat . Докладно кажучи, Операція (b) є вибіркоvim відокремленням лише кон'югату,

в якому непептидильний лінкер є приєднаним до N-кінця Fc-фрагменту імуноглобуліну зі підтриманням внутрішньої зв'язувальної спорідненості Fc - фрагменту до FcRn.

Умови відокремлення та очищення в Операції (b) можуть змінюватися в залежності від типу застосованого непептидильного лінкеру, фізіологічно активного поліпептиду тощо.

5 У іншому аспекті, винаходом передбачено спосіб підтримання внутрішньої зв'язувальної спорідненості кон'югату фізіологічно активного поліпептиду з Fc-фрагментом імуноглобуліну до FcRn, спосіб, який полягає у прикріпленні фізіологічно активного поліпептиду через непептидильний лінкер до Fc-фрагменту імуноглобуліну, що містить FcRn-зв'язуючу ділянку.

10 Наведені тут фізіологічно активний поліпептид, Fc - фрагмент імуноглобуліну, непептидильний лінкер та кон'югат є такими, як описано вище.

Винахід має переваги, які полягають в тому, що завдяки приєднанню фізіологічно активного поліпептиду через непептидильний лінкер до Fc - фрагменту імуноглобуліну, що містить FcRn-зв'язуючу ділянку, зберігається внутрішня зв'язувальна спорідненість Fc-фрагменту імуноглобуліну до FcRn, тоді як Fc - фрагмент імуноглобуліну може легко відокремлюватися від FcRn в умовах нейтрального pH та його може бути легко відновлено та таким чином час напівжиття Fc-фрагменту імуноглобуліну *in vivo* може бути ефективно підвищено.

Отже, в цьому винаході може бути здійснено підтримання внутрішньої зв'язувальної спорідненості *in vivo*.

20 У іншому аспекті, винаходом передбачено композицію, що містить кон'югат фізіологічно активного поліпептиду з Fc-фрагментом імуноглобуліну, що підтримує внутрішню зв'язувальну спорідненість Fc-фрагменту імуноглобуліну до FcRn.

Наведені тут фізіологічно активний поліпептид, Fc - фрагмент імуноглобуліну та кон'югат є такими, як описано вище.

25 Нижче винахід буде описано більш детально з посиланням на наступні приклади. Однак слід розуміти, що ці приклади наведено лише з ілюстративною метою та не призначені обмежувати обсяг винаходу.

Приклади: Отримання кон'югатів фізіологічно активного білка та Fc - фрагменту, який містить FcRn-зв'язуючий сайт.

(1) Отримання Fc-фрагменту імуноглобуліну.

30 Fc - фрагмент імуноглобуліну було отримано у відповідності за способом, описаним в поданій винахідниками заявці Korean Patent Application No. 10-2006-0077377 (під назвою "method for mass production of methionine residue-free immunoglobulin Fc region" («Спосіб кількісного отримання Fc - ділянки імуноглобуліну, позбавленої метіонінових залишків»).

(2) Отримання кон'югату інсуліну з Fc-фрагментом імуноглобуліну.

35 Було здійснено реакцію специфічного ПЕГілування сполукою пропіон-ALD2 ПЕГ з молекулярною масою 3,4 кДа (IDB, Korea) N-кінця інсулінового бета-ланцюга. Реакційний розчин було очищено на катіонообмінній колонці. Для отримання кон'югату інсуліну з Fc-фрагментом імуноглобуліну було здійснено реакцію очищеного моно-ПЕГілованого інсуліну з Fc-фрагментом імуноглобуліну з pH 6,0-8,2 з метою специфічного спрямовування інсуліну до N-кінця Fc - фрагменту імуноглобуліну. Після закінчення реакції, реакційний розчин спочатку очистили із застосуванням аніонообмінної колонки та потім очистили із застосуванням гідрофобної колонки з отриманням таким чином кон'югату інсуліну, наділеного пов'язаною з інсуліном сайт-специфічністю до імуноглобуліну.

(3) Отримання кон'югату інтерферону з Fc-фрагментом імуноглобуліну.

45 Пропіон-ALD2 ПЕГ з молекулярною масою 3,4 кДа (IDB, Korea) додали до буферу, який містив розчинений в ньому людський альфа-2b інтерферон (hIFN $\alpha$ -2b з молекулярною масою 19 кДа) та ця сполука вступила з буфером в реакцію. Для отримання кон'югату, в якому ПЕГ було специфічно приєднано до N-кінця альфа-інтерферону та ПЕГ та альфа-інтерферон є зв'язаними між собою у співвідношенні 1:1, реакційну суміш піддали аніонообмінній хроматографії на колонці з очищенням моно-ПЕГілованого IFN $\alpha$ -2b. Для специфічного спрямовування очищеного моно-ПЕГілованого інтерферону до N-кінця Fc - фрагменту імуноглобуліну, реакцію було здійснено з pH 5,5-6,5. Після реакції зв'язування, для очищення отриманого кон'югату інтерферону з Fc-фрагментом імуноглобуліну, реакційну суміш пропустили крізь аніонообмінну колонку з отриманням фракції кон'югату інтерферону з Fc-фрагментом імуноглобуліну. Отриману фракцію кон'югату додатково очистили із застосуванням гідрофобної колонки з отриманням таким чином кон'югату інтерферону, наділеного пов'язаною з інтерфероном сайт-специфічністю до Fc-фрагменту імуноглобуліну.

(4) Отримання кон'югату гормону росту людини з Fc-фрагментом імуноглобуліну.

60 Пропіон-ALD2 ПЕГ з молекулярною масою 3,4 кДа (IDB, Korea) додали до буферу, який містив розчинений в ньому гормон росту людини (hGH з молекулярною масою 22 кДа) та ця

сполука вступила з буфером в реакцію. Для отримання кон'югату, в якому ПЕГ було специфічно приєднано до N-кінця гормону росту людини та ПЕГ та гормон росту людини є зв'язаними між собою у співвідношенні 1:1, реакційну суміш піддали аніонообмінній хроматографії на колонці з очищенням моно- ПЕГілованого гормону росту людини (hGH). Для специфічного спрямовування очищеного моно-ПЕГілованого гормону росту людини до N-кінця Fc - фрагменту імуноглобуліну, реакцію було здійснено з pH 5,5-6,5. Після реакції зв'язування, реакційну суміш очистили на аніонообмінній колонці з отриманням фракції кон'югату гормону росту людини з Fc-фрагментом імуноглобуліну, наділеного пов'язаною з гормону росту людини сайт-специфічністю до Fc – фрагменту імуноглобуліну.

(5) Отримання кон'югату агоністу GLP-1R з Fc-фрагментом імуноглобуліну.

Було здійснено сайт-специфічну реакцію пропін-ALD2 ПЕГ з молекулярною масою 3,4 кДа (IDB, Korea) з лізиновим залишком імідазо-ацетил-ексендину-4 (CA exendin-4, Bachem, Switzerland). Для отримання кон'югату, в якому ПЕГ та агоніст GLP-1R є зв'язаними між собою у співвідношенні 1:1, реакційну суміш піддали катіонообмінній хроматографії на колонці з очищенням моно-ПЕГілованого ексендину-4. Для отримання кон'югату агоністу GLP-1R з Fc-фрагментом імуноглобуліну, який містить моно-ПЕГілований ексендин-4, специфічно приєднаний до N-кінця Fc - фрагменту імуноглобуліну, реакцію було здійснено з pH 5,0-8,2. Після реакції зв'язування було здійснено спосіб очищення, який полягав у очищенні на гідрофобній колонці (перший операція) та у наступному очищенні на аніонообмінній колонці (другий операція) з отриманням таким чином кон'югату агоністу GLP-1R з Fc-фрагментом імуноглобуліну, наділеного пов'язаною з агоністом GLP-1R сайт-специфічністю до Fc - фрагменту імуноглобуліну.

Порівняльний приклад: Отримання кон'югату, що містить агоніст GLP-1R, приєднаний до фрагменту імуноглобуліну зі підтриманням рамки зчитування.

Для порівняння з кон'югатом винаходу, шляхом генетичної рекомбінації без застосування лінкеру було отримано злитий білок агоністу GLP-1R з Fc - фрагментом імуноглобуліну, який містив сайт FcRn (молекулярною масою приблизно 50 кДа). Цей кон'югат, який містив агоніст GLP-1R приєднаний до Fc - фрагменту імуноглобуліну зі підтриманням рамки зчитування (далі позначено як «кон'югат агоністу GLP-1R з Fc-фрагментом імуноглобуліну зі підтриманням рамки зчитування») було очищено від культури із застосуванням афінної колоночної хроматографії.

Експериментальний Приклад 1: Оцінка зв'язувальної спорідненості до FcRn.

Серед білків, введених в клітину шляхом ендоцитозу, білок, який має сайт зв'язування FcRn зв'язується з FcRn в умовах кислого pH з усуванням білка, який не зв'язується з FcRn шляхом руйнування у лізосомах. У разі відокремлення від FcRn зв'язаного з ним білка в умовах нейтрального pH, цей білок вивільнюється до клітинної поверхні, тоді як зв'язаний з FcRn білок, який не відокремлюється від FcRn руйнується у лізосомах. Цей механізм зображено у Фіг.1.

Метою наступних експериментів була перевірка спроможності кон'югату за Прикладом, отриманого шляхом зв'язування фізіологічно активного білка через непептидильний лінкер до Fc-фрагменту імуноглобуліну, який містив сайт зв'язування FcRn зберігати зв'язувальну спорідненість окремого Fc - фрагменту імуноглобуліну до FcRn або його здатності до легкого відокремлення від FcRn в умовах нейтрального pH та вивільнення у кровоток.

У зв'язку з цим, для перевірки незмінності зв'язувальної спорідненості фрагменту імуноглобуліну до FcRn навіть при утворенні кон'югату винаходу, зв'язувальну спорідненість між FcRn та кон'югатом за Прикладом або Порівняльним прикладом було виміряно із застосуванням SPR (поверхневого плазмонного резонансу, BIACORE 3000) із застосуванням химерного рецептора FCGRT & B2M (Sino Biological Inc.), як FcRn. FcRn було імобілізовано на чіпі CM5 із застосуванням способу амінного зв'язування та потім для вимірювання зв'язувальної спорідненості до нього додали кон'югат з концентрацією 100 - 12,5 nM. Однак, через залежність механізму FcRn-опосередкованого підвищення часу напівжиття від значення pH, цей експеримент було здійснено при кожному значенні кислого та нейтрального pH.

(1) Вимірювання зв'язувальної спорідненості імуноглобуліно-білкового кон'югату до FcRn в умовах кислого pH.

Оскільки зв'язування введеного в клітину шляхом ендоцитозу білка з FcRn виникає в умовах кислого pH, для відтворення цього зв'язування в якості рухливого буферу-1 було застосовано фосфатний буфер (pH 6,0). Для викликання зв'язування, всі кон'югати фрагменту імуноглобуліну з білком розвели у рухливому буфері-1 та відокремлення (дисоціацію) кон'югатів також було здійснено із застосуванням цього буферу. Для викликання зв'язування, кожен з кон'югатів фрагменту імуноглобуліну з білком мав 4-хвилинний контакт з FcRn-імобілізованим чіпом та потім його було піддано 6-хвилинному операції дисоціації, після чого, для вимірювання

значень для кон'югатів фрагменту імуноглобуліну з білком з різними концентраціями, тобто ступеню зв'язування кон'югатів фрагменту імуноглобуліну з білком з різними концентраціями з чіпом, зв'язані з FcR кон'югати фрагменту імуноглобуліну з білком протягом 30 сек. інкубували в буфері Hepes (pH 7,4). Зв'язувальну спорідненість кожного з кон'югатів фрагменту імуноглобуліну з білком до FcRn в умовах кислого pH було піддано аналізу із застосуванням програмного забезпечення BIAevaluation software (1:1 зв'язування Ленгмюра з рухливою моделлю початкового рівня). Результати цього аналізу наведено на Фіг.2.

(2) Вимірювання зв'язувальної спорідненості імуноглобуліно-білкового кон'югату до FcRn в умовах нейтрального pH.

Оскільки вивільнення кон'югату з клітин після зв'язування з FcRn виникає у разі змінення pH від кислого до нейтрального, в якості рухливого буферу-2 було застосовано буфер Hepes (pH 7,4). В той же час було викликано 4-хвилинне зв'язування між FcRn та кожним з кон'югатів фрагменту імуноглобуліну з білком із застосуванням зразка, який містив кожен з таких кон'югатів, розчинений у рухливому буфері-1 з наступним викликанням відокремлення кожного з кон'югатів фрагменту імуноглобуліну з білком від FcRn, яке відбувалося впродовж 1 хв. із застосуванням рухливого буферу-2. Сенсограми кон'югатів фрагменту імуноглобуліну з білком наведено на Фіг. 3. Ступінь відокремлення кон'югату фрагменту імуноглобуліну з білком від FcRn наведено у вигляді коефіцієнту зв'язування (%) у відповідності за наступним Рівнянням 2. В цьому експерименті, одиницю резонансу, виміряну за 2 секунди перед закінченням ін'єкційного введення зразка з pH 6,0 було вибрано у вигляді фізичної кількості, пропорційної кількості, зв'язаної з pH 6,0 та одиницю резонансу, виміряну за 10 секунд після початку відокремлення з pH 7,4 було вибрано у вигляді фізичної кількості, пропорційної кількості, зв'язаної з pH 7,4. Коефіцієнт зв'язування із застосуванням вибраних одиниць резонансу було обчислено відповідно за наступним Рівнянням 2:

Рівняння 2.

Коефіцієнт зв'язування (%) = (кількість, зв'язана з pH 7,4 / кількість, зв'язану з pH 6,0) × 100

Як тут застосовано, термін «коефіцієнт зв'язування» означає обсяг, до якого кон'югат фрагменту імуноглобуліну з білком буде легко відокремлюватися від FcRn. Можна побачити, що через те, що величина коефіцієнту зв'язування стає меншою, відокремлення кон'югату в умовах нейтрального pH є кращим та більш легко відбувається його FcRn-опосередковане повторне застосування, тоді як відокремлення кон'югату в умовах нейтрального pH у разі збільшення величини коефіцієнту зв'язування стає недостатнім, отже скоріш за все, його буде усунуто шляхом лізосомального руйнування навіть у випадку ендоцитозу цього кон'югату шляхом зв'язування з FcRn.

В результаті, як показано на Фіг. 2 та 3, стає помітно, що різні кон'югати фрагменту імуноглобуліну з білком за Прикладом зв'язувалися з FcRn залежним від концентрації чином. Ці результати також наведено в Таблиці 1 нижче та значення ступеня відокремлення кон'югатів, обчислені із застосуванням Рівняння 2 наведено в Таблиці 2 нижче.

Таблиця 1:

Порівняння спорідненостей зв'язування до FcRn кон'югатів фрагменту імуноглобуліну з білком з pH 6,0.

Досліджувані матеріали	pH 6,0		
	ka (1/Ms, X105)	kd (1/s, X10-3)	KD (nM)
фрагмент імуноглобуліну	4,8	10,5	22,0± 3,0
кон'югат інсуліну з фрагментом імуноглобуліну	3,1	7,1	22,6 ± 3,9
кон'югат інтерферону з фрагментом імуноглобуліну	3,0	9,3	30,0± 4,8
кон'югат гормону росту людини з фрагментом імуноглобуліну	1,2	3,6	26,8 ± 9,0
кон'югат агоністу GLP-1R з фрагментом імуноглобуліну	3,8	9,5	24,7 ± 5,5
кон'югат агоністу GLP-1R з фрагментом імуноглобуліну зі підтриманням рамки зчитування	3,2	5,3	17,0± 3,7

\*ka - константа швидкості асоціації, kd - константа швидкості дисоціації, KD: константа афінності, коефіцієнт зв'язування: величина, отримана шляхом поділу кількості зв'язування з pH 7,4 на обсяг зв'язування з pH 6,0 та множення розділеної величини на 100.

Таблиця 2:

Порівняння рівнів відокремлення  
кон'югатів фрагменту імуноглобуліну з білком від FcRn.

Досліджувані матеріали	Концентрація (нМ)	Обсяг зв'язування (RU) з pH6,0	Обсяг зв'язування (RU) з pH7,4	Коефіцієнт зв'язування (%)	Середній коефіцієнт зв'язування (%)
фрагмент імуноглобуліну	100	163,7	4,8	2,9	5,4 ± 2,0
	50	137,4	6,5	4,7	
	25	110,9	7,4	6,6	
	12,5	88,0	6,5	7,3	
кон'югат інсуліну з фрагментом імуноглобуліну	100	214,1	4,8	2,2	5,0 ± 2,2
	50	174,3	8,0	4,6	
	25	143,9	8,4	5,9	
	12,5	106,6	7,9	7,4	
кон'югат інтерферону з фрагментом імуноглобуліну	100	196,9	6,4	3,2	5,0 ± 1,6
	50	157,2	6,7	4,3	
	25	120,3	6,7	5,6	
	12,5	91,3	6,4	7,0	
кон'югат гормону росту людини з фрагментом імуноглобуліну	100	205,7	8,2	4,0	6,6 ± 2,6
	50	153,0	7,7	5,1	
	25	111,9	8,3	7,4	
	12,5	82,9	8,1	9,8	
кон'югат агоністу GLP-1R з фрагментом імуноглобуліну	100	163,5	6,2	3,8	6,6 ± 2,6
	50	135,5	8,1	5,9	
	25	107,7	7,2	6,7	
	12,5	86,2	8,6	10,0	
кон'югат агоністу GLP-1R з фрагментом імуноглобуліну зі підтриманням рамки зчитування	100	301,7	38,2	12,7	12,7 ± 0,3
	50	249,5	31,2	12,5	
	25	197,6	25,9	13,1	
	12,5	148,7	18,6	12,5	

Як можна побачити в наведених вище Таблицях 1 та 2, спорідненість зв'язування окремого фрагменту імуноглобуліну (незалежної Fc-ділянки без приєднаного до неї лікувального білка) та кон'югатів за винаходом в умовах кислого або нейтрального pH значно не відрізняється. Інакше кажучи, було відкрито, що у випадку застосування отриманих кон'югатів імуноглобуліну з білком за винаходом, зв'язувальна спорідненість фрагменту імуноглобуліну до FcRn не змінювалася навіть у разі зв'язування імуноглобуліну з фізіологічно активним білком. Зокрема, кон'югати, які містили різні фізіологічно активні білки різного розміру показали дуже схожі результати. Однак, наведений в Порівняльному Прикладі кон'югат агоністу GLP-1R з Fc-фрагментом імуноглобуліну зі підтриманням рамки зчитування мав високий коефіцієнт зв'язування, отже не міг відповідним чином відокремлюватися від FcRn в умовах нейтрального pH, що свідчило про те, що він мав менший вплив на збільшення часу напівжиття фізіологічно активного білка, ніж кон'югат за винаходом.

Експериментальний Приклад 2: Перевірка порівняння фармакокінетичних характеристик in vivo кон'югатів агоністу GLP-1R з Fc-фрагментом імуноглобуліну.

Для порівняння фармакокінетичних характеристик in vivo кон'югату агоністу GLP-1R з Fc-фрагментом імуноглобуліну за Прикладом (5) та кон'югату агоністу GLP-1R з Fc-фрагментом імуноглобуліну зі підтриманням рамки зчитування, було досліджено зміння сироваткових концентрацій цих кон'югатів із застосуванням нормальних щурів лінії Спрег-Дуелі (SD).

Для цього кон'югат агоністу GLP-1R з Fc-фрагментом імуноглобуліну (400 мкг/кг) та кон'югат агоністу GLP-1R з Fc-фрагментом імуноглобуліну зі підтриманням рамки зчитування (400 мкг/кг) розвели фізіологічним розчином та підшкірно ввели тваринам з дозою у 2мл / кг. Відбор зразків крові щурів було здійснено з яремної вени через 4, 8, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216, 240,

288, 312 та 336 год. після введення досліджуваних матеріалів з наступним відокремленням сироватки з крові та кількісним аналізом концентрації лікарського засобу в кожному з отриманих зразків сироватки із застосуванням ІФА-аналізу. Отримані результати кількісного аналізу наведено на Фіг.4.

- 5 В результаті показники сироваткового часу напівжиття кон'югату агоністу GLP-1R з Fc-фрагментом імуноглобуліну за Прикладом (5) та кон'югату агоністу GLP-1R з Fc-фрагментом імуноглобуліну зі підтриманням рамки зчитування дорівнювали, відповідно, 40,9 год. та 28 год. та максимальні сироваткові концентрації кон'югатів становили, відповідно, 1758,6 нг/мл та 742,7 нг/мл. Інакше кажучи, в разі підшкірного введення нормальним щурам лікарського засобу з  
10 однаковою дозою було виявлено, що кон'югат агоністу GLP-1R з фрагментом імуноглобуліну за винаходом мав відмінне поглинання *in vivo* та час напівжиття у порівнянні з кон'югатом агоністу GLP-1R з Fc-фрагментом імуноглобуліну зі підтриманням рамки зчитування (Фіг.4).  
В той час, як винахід було описано з посиланням на окремі ілюстративні втілення, фахівцям в галузі, до якої він має відношення слід розуміти, що цей винахід може бути втілено також в  
15 інших специфічних формах без відходу від його технічної суті або суттєвих характеристик. Тому описані вище втілення розглянуто у всіх відношеннях лише в ілюстративному, а не в обмежувальному сенсі. Крім того, обсяг винаходу визначено не шляхом детального опису, а з допомогою доданої Формули Винаходу та слід розуміти, що всі модифікації та варіанти, отримані від розуміння та обсягу цього винаходу та їх еквіваленти є частиною обсягу доданої  
20 Формули Винаходу.

#### ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

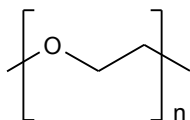
1. Група кон'югата фізіологічно активного поліпептиду з Fc-фрагментом імуноглобуліну, що  
25 містить тільки мономерні кон'югати, де кон'югат містить тільки одну молекулу фізіологічно активного поліпептиду, зв'язаного через непептидильний лінкер з Fc-фрагментом імуноглобуліну, що містить FcRn-зв'язуючий регіон, причому коефіцієнт зв'язування кон'югата знаходиться в діапазоні  $\pm 6\%$  від коефіцієнту зв'язування Fc-фрагмента імуноглобуліну, визначеного за тих самих умов, що і для кон'югата, за яких коефіцієнт зв'язування кон'югата і  
30 коефіцієнт зв'язування Fc-фрагмента імуноглобуліну визначають з використанням наступного рівняння:  
Рівняння 1  
$$\text{коефіцієнт зв'язування (\%)} = \left( \frac{\text{кількість, зв'язана з FcRn при pH 7,4}}{\text{кількість, зв'язана з FcRn при pH 6,0}} \right) \times 100,$$
  
35 де фізіологічно активний поліпептид вибрано з групи, яка складається з глюкагоноподібного пептиду-1 (GLP-1), агоніста рецептора GLP-1, гранулоцитарного колонієстимулюючого фактора (G-CSF), гормону росту людини (hGH), еритропоєтину (EPO), глюкагону, окситомодуліну, інсуліну, соматотропіну, пептиду, який вивільнює гормон росту, інтерферонів, рецепторів інтерферонів, серпентинового рецептора, інтерлейкінів та інтерлейкінових рецепторів,  
40 ферментів, інтерлейкін-зв'язуючих білків, цитокін-зв'язуючих білків, фактора активування макрофагів, макрофагового пептиду, В-клітинного фактора, Т-клітинного фактора, протеїну А, алергологічного пригнічувача, клітинних некротичних глікобілків, імунотоксину, лімфотоксину, фактора некрозу пухлин, пухлинних супресорів, фактора росту метастазів, альфа-1 антитрипсину, альбуміну,  $\alpha$ -лактальбуміну, аполіпропротеїну-Е, високоглікозилизованого  
45 еритропоєтину, ангіопоєтинів, гемоглобіну, тромбіну, пептиду активування тромбінового рецептора, тромбомодуліну, антигенів крові VII, VIIa, VIII, IX та XIII, фактора активування плазміногену, фібрин-зв'язуючого пептиду, урокінази, стрептокінази, гірудину, протеїну С, С-реактивного білка, пригнічувача реніну, пригнічувача колагенази, супероксиддисмутази, лептину, тромбоцитарного фактора росту, епітеліального фактора росту, епідермального  
50 фактора росту, ангіостатину, ангіотензину, фактора росту кісток, кісткового морфогенетичного білка, кальцитоніну, атріопептину, хрящового індукуючого фактора імпульсної відповіді, елкатоніну, фактора активування сполучної тканини, пригнічувача шляху тканинного фактора, фолітропіну, лютропіну, люліберину, факторів росту нервової тканини, паратиреоїдного гормону, релаксину, секретину, соматомедину, інсуліноподібного фактора росту, гормону кори  
55 наднирникових залоз, холецистокініну, панкреатичного поліпептиду, гастрин-вивільнюючого пептиду, фактора вивільнення кортикотропіну, тиреотропного гормону, аутотаксину, лактоферину, міостатину антигенів клітинної поверхні, вакцинних антигенів, що походять з вірусів, моноклональних антитіл, поліклональних антитіл та фрагментів антитіл.  
2. Група за п. 1, де кон'югат одержують шляхом взаємодії фізіологічно активного поліпептиду,  
60 що має непептидильний лінкер, зв'язаний з ним, з Fc-фрагментом імуноглобуліну при pH 4,0-

9,0, тим самим зв'язуючи фізіологічно активний поліпептид через непептидильний лінкер з частиною за виключенням FcRn-зв'язуючий регіон Fc-фрагмента імуноглобуліну.

3. Група за п. 1, де непептидильний лінкер вибрано з групи, яка складається з поліетиленгліколю, поліпропіленгліколю, співполімеру етиленгліколь-пропіленгліколю, поліоксіетилованого поліолу, полівінілового спирту, полісахариду, декстрану, полівінілетилефіру, біодеградуємого полімеру, ліпідного полімеру, хітину, гіалуронової кислоти та їх комбінацій.

4. Група за п. 1, де непептидильний лінкер є полімером поліетиленгліколю, представленим наступною формулою 1:

Формула 1



де n становить від 10 до 2400.

5. Група за п. 1, де непептидильний лінкер має реакційну групу, вибрану з групи, що складається з альдегідної групи, пропіональдегідної групи, бутиральдегідної групи, малеїмідної групи та сукцинімідних похідних.

6. Група за п. 1, де фізіологічно активний поліпептид вибраний з групи, що складається з інсуліну, інтерферону, людського гормону росту і агоніста рецептора GLP-1.

7. Група за п. 1, де Fc-фрагмент імуноглобуліну, що містить FcRn-зв'язуючий регіон, містить домен CH2, домен CH3 або обидва.

8. Група за п. 1, де Fc-фрагмент імуноглобуліну перебуває в неглікозилованій формі.

9. Група за п. 1, де Fc-фрагмент імуноглобуліну додатково містить шарнірний регіон.

10. Група за п. 1, де Fc-фрагмент імуноглобуліну вибраний із групи, яка складається з IgG, IgA, IgD, IgE, IgM, їх комбінацій та їх гібридів.

11. Група за п. 1, де Fc-фрагмент імуноглобуліну є Fc-фрагментом IgG4.

12. Спосіб одержання групи кон'югата фізіологічно активного поліпептиду з Fc-фрагментом імуноглобуліну за п. 1, який включає:

(а) зв'язування фізіологічно активного поліпептиду через непептидильний лінкер з Fc-фрагментом імуноглобуліну, що включає FcRn-зв'язувальний регіон, для одержання суміші кон'югатів фізіологічно активний поліпептид - Fc-фрагмент імуноглобуліну; і

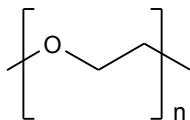
(b) відокремлення від суміші кон'югата фізіологічно активний поліпептид - Fc-фрагмент імуноглобуліну, що містить тільки одну молекулу фізіологічно активного поліпептиду, зв'язаного через непептидильний лінкер, з Fc-фрагмента імуноглобуліну, що містить FcRn-зв'язувальний регіон, і показує коефіцієнт зв'язування в діапазоні  $\pm 6$  % коефіцієнта зв'язування Fc-фрагмента імуноглобуліну, визначеного за тих самих умов, що і для кон'югата, де коефіцієнт зв'язування кон'югата і коефіцієнт зв'язування Fc-фрагмента імуноглобуліну визначається з використанням наступного рівняння 1:

Рівняння 1

коефіцієнт зв'язування (%) = (кількість, зв'язана з FcRn при pH 7,4/кількість, зв'язана з FcRn при pH 6,0) x 100.

13. Спосіб за п. 12, де непептидильний лінкер є полімером поліетиленгліколю, представленим наступною формулою 1:

Формула 1



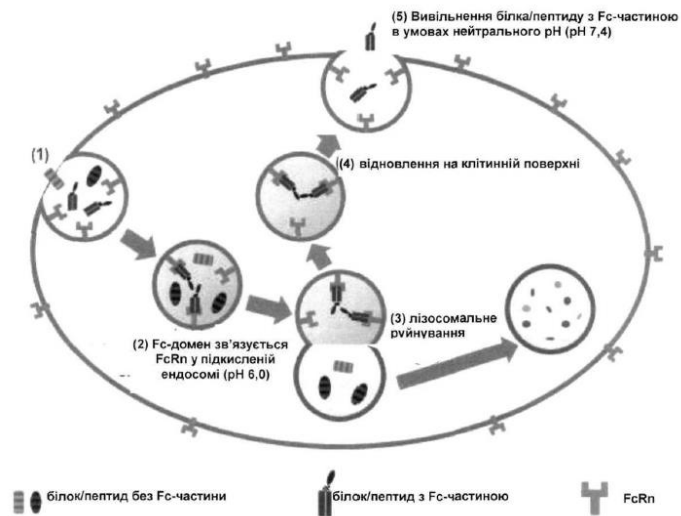
де n становить від 10 до 2400.

14. Спосіб за п. 12, де стадія (b) включає визначення коефіцієнта зв'язування кон'югата і коефіцієнта зв'язування Fc-фрагмента імуноглобуліну з використанням Рівняння 1 перед відділенням кон'югата фізіологічно активного поліпептиду з Fc-фрагментом імуноглобуліну.

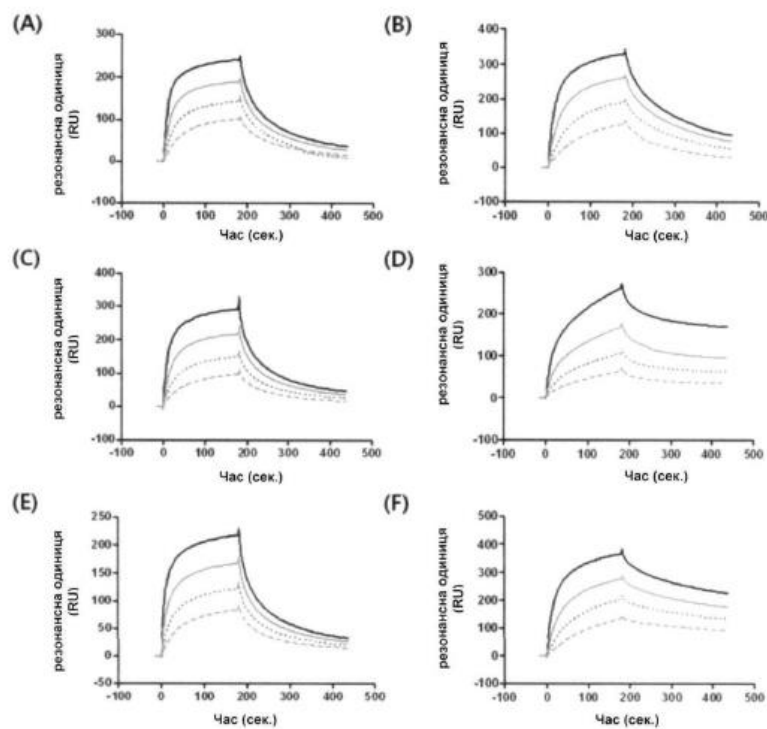
15. Спосіб за п. 12, де кон'югат, відокремлений на стадії (b), має структуру, в якій непептидальний лінкер зв'язаний з N-кінцем Fc-фрагмента імуноглобуліну.

16. Спосіб за п. 12, де фізіологічно активний поліпептид вибраний із групи, що складається з інсуліну, інтерферону, людського гормону росту і агоніста рецептора GLP-1.

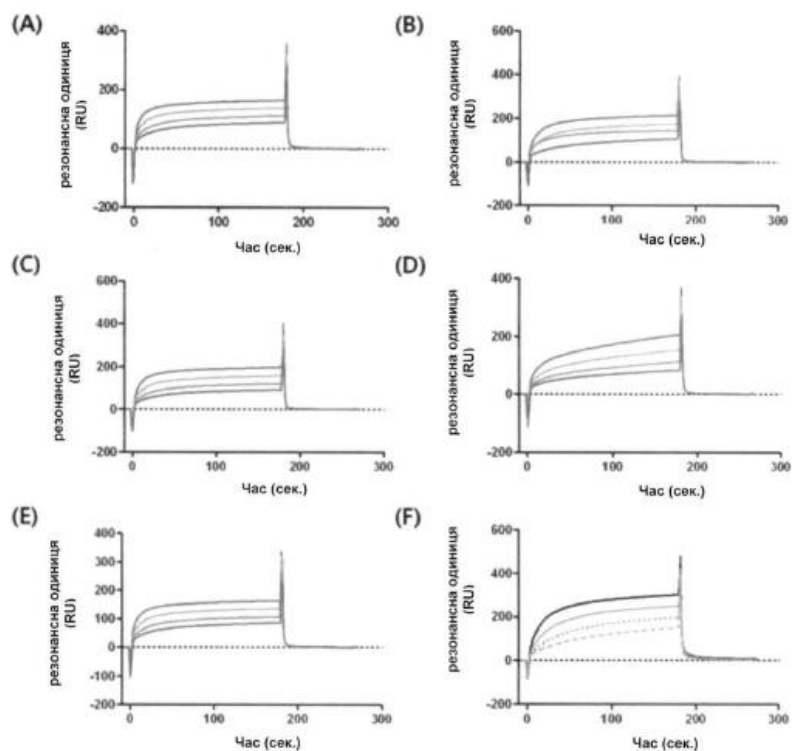
17. Композиція, що містить групу кон'югата фізіологічно активного поліпептиду з Fc-фрагментом імуноглобуліну за п. 1, що підтримує афінність внутрішнього зв'язування Fc-фрагмента імуноглобуліну для FcRn.



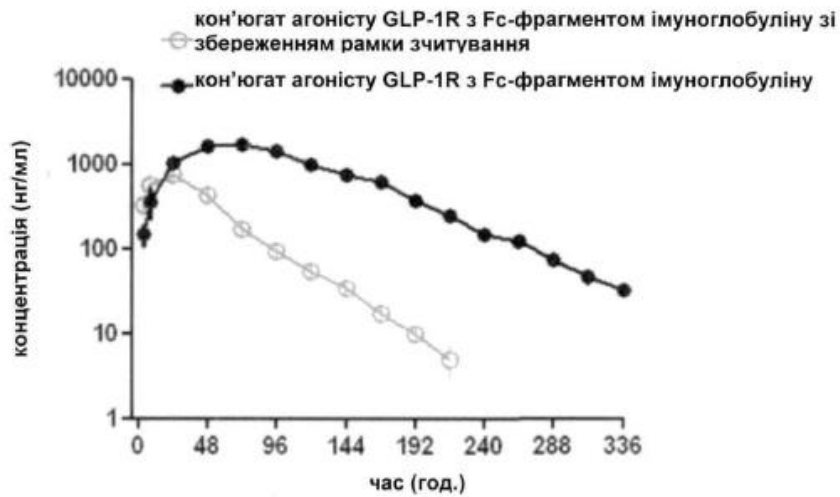
Фиг. 1



Фиг. 2



Фіг. 3



Фіг. 4

Комп'ютерна верстка Л. Бурлак

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

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