



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **119850** (13) **C2**  
(51) МПК (2019.01)**A61K 38/26** (2006.01)**A61K 39/395** (2006.01)**A61K 47/50** (2017.01)

A61P 43/00

МІНІСТЕРСТВО  
ЕКОНОМІЧНОГО  
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ  
УКРАЇНИ**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД**

(21) Номер заявки: **а 2016 00685**  
(22) Дата подання заявки: **14.07.2014**  
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: **27.08.2019**  
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **10-2013-0082511**  
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **12.07.2013**  
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: **KR**  
(41) Публікація відомостей про заявку: **11.04.2016, Бюл.№ 7**  
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: **27.08.2019, Бюл.№ 16**  
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: **РСТ/KR2014/006329, 14.07.2014**

(72) Винахідник(и):  
**Парк Сон Хі (KR),**  
**Кім Мін Юн (KR),**  
**Лім Х'юн К'ю (KR),**  
**Пе Сун Мін (KR),**  
**Чун Сун Йоуп (KR),**  
**Квон Се Чхан (KR)**  
(73) Власник(и):  
**ХАНМІ ФАРМ. КО., ЛТД.,**  
214, Muha-ro, Paltan-myeon, Hwaseong-si,  
Gyeonggi-do 445-858, Republic of Korea (KR)  
(74) Представник:  
**Крилова Надія Іванівна, реєстр. №30**  
(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:  
WO 2010/011096 A2, 28.01.2010  
WO 2011/122921 A2, 06.10.2011  
WO 2005/047334 A1, 26.05.2005  
PICHIA KRISTEN M ET AL, "Protein engineering strategies for sustained glucagon-like peptide-1 receptor-dependent control of glucose homeostasis", DIABETES, AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, US, vol. 57, no. 7, doi:10.2337/DB07-1775, ISSN 0012-1797, (20080701), pages 1926 - 1934  
WOLFGANG GLAESNER ET AL, "Engineering and characterization of the long-acting glucagon-like peptide-1 analogue LY2189265, an Fc fusion protein", DIABETES/METABOLISM RESEARCH AND REVIEWS, (20100430), vol. 26, no. 4, doi:10.1002/dmrr.1080, ISSN 1520-7552, pages 287 - 296  
KR 10-2006-0106486 A, 12.10.2006  
KR 10-2005-0047032 A, 19.05.2005  
US 2005/0202538 A1, 15.09.2005  
US 8 431 132 B2, 30.04.2013  
US 2012/0244578 A1, 27.09.2012

**(54) КОН'ЮГАТ БІОЛОГІЧНО АКТИВНОГО ПОЛІПЕПТИДНОГО МОНОМЕРА ТА Fc-ФРАГМЕНТА ІМУНОГЛОБУЛІНУ ЗІ ЗНИЖЕНИМ РЕЦЕПТОРОПОСЕРЕДКОВАНИМ КЛІРЕНСОМ ТА СПОСІБ ЙОГО ОДЕРЖАННЯ****(57) Реферат:**

UA 119850 C2

Винахід стосується фармацевтичної композиції тривалої дії, яка містить кон'югат, що включає фізіологічно активний поліпептид, зв'язаний з Fc-фрагментом імуноглобуліну, де композиція включає мономерний кон'югат, що містить одну молекулу фізіологічно активного поліпептиду, приєднану до одного Fc-ланцюга одиничного Fc-фрагмента імуноглобуліну, що містить два Fc-ланцюги імуноглобуліну, за допомогою непептидильного лінкера, що має обидва кінці, та димерний кон'югат, що містить дві молекули такого самого фізіологічно активного поліпептиду, приєднаного до одиничного Fc-фрагмента імуноглобуліну, що містить два Fc-ланцюги імуноглобуліну, за умови, що молярне співвідношення мономерного кон'югата і димерного кон'югата в композиції складає принаймні 19, де кожний з двох Fc-ланцюгів імуноглобуліну в димерному кон'югаті є зв'язаним з однією молекулою фізіологічно активного поліпептиду за допомогою непептидильного лінкера, що має обидва кінці; та непептидильний лінкер є вибраним з групи, яка складається з поліетиленгліколю, поліпропіленгліколю, співполімеру етиленгліколю та пропіленгліколю, поліоксietилованого поліолу, полівінілового спирту, полісахариду, декстрану, полівінілового етилового етеру, полімеру, що є здатним до біодеградації, ліпідного полімеру, хітину, гіалуронової кислоти та їх комбінацій.

Винахід стосується фармацевтичної композиції тривалої дії, що містить кон'югат, який містить фізіологічно активний поліпептид, приєднаний до Fc-фрагменту імуноглобуліну, причому містить мономерний кон'югат, що містить одну молекулу фізіологічно активного поліпептиду, приєднану до одиничного Fc-фрагменту імуноглобуліну та необов'язково містить

5 мультимерний кон'югат, який містить дві або більше молекул такого ж саме фізіологічно активного поліпептиду, приєданого до одиничного Fc-фрагменту імуноглобуліну за умови, що молярне відношення мономерного кон'югату до мультимерного кон'югату в композиції складає принаймні 19; кон'югату мономеру фізіологічно активного поліпептиду з Fc-фрагментом імуноглобуліну, що містить мономер фізіологічно активного поліпептиду, приєднаний

10 непептидильним лінкером до Fc-фрагменту імуноглобуліну, в якому цей фізіологічно активний поліпептид приєднано непептидильним лінкером до Fc-фрагменту імуноглобуліну в мономерній формі, кон'югату, який характеризується зниженою рецепторопосередкованою інтерналізацією або рецепторопосередкованим кліренсом порівняно з будь-яким димерним кон'югатом, що містить дві молекули фізіологічно активного поліпептиду, приєднані непептидильним лінкером

15 до одиничного Fc-фрагменту імуноглобуліну або кон'югату, що містить фізіологічно активний поліпептидний димер, приєднаний всередині рамки зчитування до Fc-фрагменту імуноглобуліну; та способу одержання цієї фармацевтичної композиції тривалої дії.

Відомо, що кліренсу білків *in vivo* відбувається з допомогою різних механізмів, в тому числі руйнуванням сироватковими протеазами, кліренсу білків нирками або з допомогою рецепторів,

20 тому було досліджено різні спроби уникнення дії цих механізмів кліренсу білків з організму, метою яких було покращення часу напівжиття фізіологічно активних білків з посиленням таким чином їх терапевтичної ефективності. Зокрема було проведено дослідження білкових кон'югатів, які містили полімер поліетиленгліколю (ПЕГ), альбумін, жирну кислоту або Fc-фрагмент антитіла (сталу ділянку), зв'язану з білком з метою збільшення часу напівжиття білка.

25 Для отримання ковалентного зв'язування цього матеріалу з фізіологічно активним білком з метою збільшення часу напівжиття сироватки фізіологічно активного білка та скорочення інтервалу введення лікарського засобу покращуючи зручність його застосування для пацієнтів. Зокрема, з метою надання білкам стійкості та зменшення їх контакту з протеазами та їх кліренсу нирками, було застосовано спосіб хімічного прикріплення високорозчинних полімерів, як-то ПЕГ

30 до поверхні білкових лікарських засобів. У разі застосування цього способу, відомо, що полімер неспецифічно зв'язується з білком-мішенню у специфічному сайті або сайтах, що покращує розчинність білка, робить його більш стійким, запобігає виникненню білкового гідролізу та, крім того, не викликає певних побічних проявів (Sada et al., J. Fermentation Bioengineering 71: 137-139, 1991). Однак, цей спосіб має певні недоліки, які полягають в тому, що навіть, якщо ПЕГ, приєднаний до фізіологічно активного білка зможе збільшити його стійкість, він значно зменшує його титр, та зі зростанням молекулярної маси ПЕГ знижується його реакційна здатність до взаємодії з білком, що призводить до зменшення виходу. На додачу до цього, в разі змінення певного амінокислотного залишку білка жирними кислотами, ця зміна жирна кислота

35 оборотним чином зв'язується з сироватковим альбуміном зі збільшенням часу напівжиття білка сироватки, але цей час напівжиття дорівнює приблизно від одного дня до одного тижня, що свідчить про його незначне збільшення. Крім того, іншим недоліком є те, що фізіологічно активний білок, який оборотним чином відокремлюється від альбуміну легко виводиться з організму через нирки.

З цих причин були здійснені спроби застосування фрагментів імуноглобуліну для покращення часу напівжиття фізіологічно активних матеріалів, в тому числі білків. Зокрема, активні дослідження проводять з метою покращення стійкості лікувальних білків їх злиттям з подібними Fc-фрагментами імуноглобуліну.

В науковій літературі відомо про досягнення експресії інтерферону (опублікована Заявка на Патент Кореї №. 2003-9464), рецепторів інтерлейкіну-4, інтерлейкіну-7 або еритропоєтину

50 (Патент Кореї №. 249572) у ссавців із застосуванням способу генетичної рекомбінації, в якій продукт експресії мав вигляд молекули, злитої з Fc-фрагментом імуноглобуліну. Також, у Міжнародній патентній публікації №. WO 01/03737 описано злитий білок, що містить цитокін або фактор росту, приєднаний до Fc-фрагменту імуноглобуліну через олігопептидний лінкер. Крім того, у Патенті США №. 5 116 964 описано злитий білок, що містить білок LHR (глікобілок

55 поверхні лімфоцитарної клітини) або білок CD4, злитий з N- або C-кінцем Fc-фрагменту імуноглобуліну із застосуванням способу генетичної рекомбінації та у Патенті США № 5 349 053 описано злитий білок IL-2 з Fc-фрагментом імуноглобуліну. Крім того, приклади Fc - злитих білків, отриманих із застосуванням способу генетичної рекомбінації, охоплюють злитий білок бета-інтерферону або його похідну з Fc-фрагментом імуноглобуліну (Міжнародна патентна

60 публікація №. WO 00/23472), злитий білок IL-5 рецептора з Fc-фрагментом імуноглобуліну

(Патент США № 5 712 121), злитий білок альфа-інтерферону з Fc-фрагментом імуноглобуліну G4 (Патент США № 5 723 125) та злитий білок CD4 з Fc-фрагментом імуноглобуліну G2 (Патент США № 6 451 313). Додатково слід зазначити Патент США №. 5 605 690, який стосується модифікації амінокислотних залишків у Fc-фрагменті імуноглобуліну та в якому описано злитий білок TNFR-IgG1 Fc, отриманий з допомогою способу генетичної рекомбінації із застосуванням Fc-фрагменту, отриманого модифікацією амінокислотних залишків особливого сайту зв'язування комплементу або сайту зв'язування рецептора в Fc-фрагменті імуноглобуліну. Окрім цього, способи одержання злитих білків з допомогою способу генетичної рекомбінації із застосуванням Fc - ділянки імуноглобуліну, модифікованої, як зазначено вище також наведено у Патентах США № № 6 277 375, 6 410 008 та 6 444 792. Однак, для застосування біомедичних засобів зі злитим з ними Fc-фрагментом імуноглобуліну необхідно подолати цитотоксичні проблеми, викликані ефекторною функцією, яка притаманна Fc-фрагменту.

Винахідники зробили великі зусилля, щоб отримати кон'югат, який має збільшений час напівжиття in vivo сироватки приєднанням Fc-фрагменту імуноглобуліну до фізіологічно активного поліпептиду. В результаті винахідники відкрили, тим самим завершуючи винахід, що в разі прикріплення фізіологічно активного поліпептиду до Fc-фрагменту імуноглобуліну в мономерній формі, він буде відрізнятися значно зниженим рецепторопосередкованим кліренсом порівняно до фізіологічно активного поліпептиду в мультимерній формі та також має подовжений час напівжиття навіть в тваринній моделі щурів.

Для одержання фармацевтичної композиції тривалої дії, що містить кон'югат, який містить фізіологічно активний поліпептид, приєднаний до Fc-фрагменту імуноглобуліну, тобто композиції, яка містить мономерний кон'югат, що містить одну молекулу фізіологічно активного поліпептиду, приєднану до одиничного Fc-фрагменту імуноглобуліну та необов'язково містить мультимерний кон'югат, який містить дві або більше молекул такого ж саме фізіологічно активного поліпептиду, приєданого до одиничного Fc-фрагменту імуноглобуліну, отриманого за умови, що молярне відношення мономерного кон'югату до мультимерного кон'югату в композиції складає принаймні 19.

Іншою метою винаходу є одержання кон'югату мономеру фізіологічно активного поліпептиду з Fc-фрагментом імуноглобуліну, що містить мономер фізіологічно активного поліпептиду, приєднаний непептидильним лінкером до Fc-фрагменту імуноглобуліну, в якому фізіологічно активний поліпептид приєднано непептидильним лінкером до Fc-фрагменту імуноглобуліну в мономерній формі, кон'югату, який характеризується зменшенням рецепторопосередкованої інтерналізації або рецепторопосередкованого кліренсу порівняно до кон'югату, який містить фізіологічно активний поліпептид, приєднаний до Fc-фрагменту імуноглобуліну всередині рамки читування.

Іншою метою винаходу є надання способу одержання фармацевтичної композиції тривалої дії, способу, який полягає у: (а) прикріпленні фізіологічно активного поліпептиду до Fc-фрагменту імуноглобуліну з одержанням суміші кон'югатів фізіологічно активного поліпептиду з Fc-фрагментом імуноглобуліну; та (b) у відокремленні від суміші кон'югату мономеру фізіологічно активного поліпептиду з Fc-фрагментом імуноглобуліну, який містить одну молекулу фізіологічно активного поліпептиду, приєднану до одиничного Fc-фрагменту імуноглобуліну.

Як описано вище, кон'югат за винаходом, який містить фізіологічно активний поліпептидний мономер, приєднаний до кон'югату Fc-фрагменту імуноглобуліну характеризується суттєво зниженою рецепторопосередкованою інтерналізацією або рецепторопосередкованим кліренсом, отже має збільшений час напівжиття сироватки. Відповідно, кон'югат винаходу може забезпечити надання лікарського засобу, який має збільшений час напівжиття сироватки та терапевтичну перевагу.

Опис Фігур.

На Фіг. 1 схематично зображено характерну структуру кон'югату мономеру фізіологічно активного поліпептиду з Fc-фрагментом (Фіг. 1A) та найбільш поширену конфігурацію кон'югату димеру фізіологічно активного поліпептиду з Fc-фрагментом (Фіг. 1B).

На Фіг. 2 зображено порівняння рівня інтерналізації рецептора між кон'югатом агоністу GLP-1 з Fc-фрагментом імуноглобуліну (Приклад винаходу) та злитого білка агоністу GLP-1 з Fc-фрагментом імуноглобуліну, в якому агоніст GLP-1 існує в димерній формі (Порівняльний приклад).

На Фіг. 3 зображено порівняння фармакокінетичних характеристик in vivo між кон'югатом агоністу GLP-1 за Прикладом винаходу та кон'югатом агоністу GLP-1 за Порівняльним прикладом.

Для досягнення вищезазначених цілей, винаходом передбачено фармацевтичну композицію тривалої дії, яка містить кон'югат, який містить фізіологічно активний поліпептид, приєднаний до Fc-фрагменту імуноглобуліну, композицію, яка містить мономерний кон'югат, що містить одну молекулу фізіологічно активного поліпептиду, приєднану до одиничного Fc-фрагменту імуноглобуліну та необов'язково містить мультимерний кон'югат, який містить дві або більше молекул такого ж саме фізіологічно активного поліпептиду, приєданого до одиничного Fc-фрагменту імуноглобуліну за умови, що молярне відношення мономерного кон'югату до мультимерного кон'югату в композиції дорівнює принаймні 19.

У одному втіленні, кон'югат, який є складовою частиною фармацевтичної композиції тривалої дії може містити непептидильний лінкер, розташований між фізіологічно активним поліпептидом та Fc-фрагментом імуноглобуліну для прикріплення фізіологічно активного поліпептиду до Fc-фрагменту імуноглобуліну.

У іншому втіленні, мономерний кон'югат може відрізнятися зниженою рецепторопосередкованою інтерналізацією або зниженим рецепторопосередкованим кліренсом порівняно з будь-яким димерним кон'югатом, який містить дві молекули фізіологічно активного поліпептиду, приєднані непептидильним лінкером до одиничного Fc-фрагменту імуноглобуліну або кон'югату, який містить фізіологічно активний поліпептидний димер, приєднаний всередині рамки зчитування до Fc-фрагменту імуноглобуліну.

У іншому втіленні, фізіологічно активний поліпептид може бути вибрано з групи, яка складається з глюкагоноподібного пептиду-1 (GLP-1), гранулоцитарного колонієстимулюючого фактора (G-CSF), людського гормону росту (hGH), еритропоєтину (EPO), глюкагону, окситомодуліну, інсуліну, гормону, що звільняє гормон росту, , пептиду, який звільняє гормон росту, інтерферонів, рецепторів інтерферонів, рецептора, зв'язаного з G білком, інтерлейкінів та інтерлейкінових рецепторів, ферментів, інтерлейкін-зв'язуючих білків, цитокін-зв'язуючих білків, фактора активування макрофагів, макрофагового пептиду, В - клітинного фактора, Т - клітинного фактора, білка А, алергологічного пригнічувача, клітинних некротичних глікобілків, імунотоксину, лімфотоксину, фактора некрозу пухлин, пухлинних супресорів, фактора росту метастазів, альфа-1 антитрипсину, альбуміну,  $\alpha$ -лактальбуміну, аполіпопротеїну-Е, високоглікозилизованого 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, білка С, С-реактивного білка, пригнічувача реніну, пригнічувача колагенази, супероксид дисмутази, 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 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, поліклональних антитіл та фрагментів антитіл.

У іншому втіленні, фізіологічно активний поліпептид може бути вибрано з групи, яка складається з глюкагоноподібного пептиду-1 (GLP-1), гранулоцитарного колонієстимулюючого фактора (G-CSF), людського гормону росту (hGH), еритропоєтину (EPO), глюкагону, окситомодуліну, інсуліну та їх похідних.

У іншому втіленні, непептидильний лінкер може бути вибрано з групи, яка складається з поліетиленгліколю, поліпропіленгліколю, сополімеру етиленгліколю та пропіленгліколю, поліоксиетилованого поліолу, полівінілового спирту, полісахариду, декстрану, полівінілового етилового етеру, полімеру, що дезінтегрується під дією біологічних факторів, ліпідного полімеру, хітину, гіалуронової кислоти та їх комбінацій.

У іншому втіленні, непептидильний лінкер може мати молекулярну масу в межах 1-100 кДа.

У іншому втіленні, Fc-фрагмент імуноглобуліну може складатися з 1-4 доменів, вибраних з групи, яка складається з доменів CH1, CH2, CH3 та CH4.

У іншому втіленні, Fc-фрагмент імуноглобуліну може додатково містити шарнір.

У іншому втіленні, Fc-фрагмент імуноглобуліну може бути вибрано з групи, яка складається з IgG, IgA, IgD, IgE, IgM, їх комбінацій та гібридів.

У іншому втіленні, Fc-фрагмент імуноглобуліну може бути Fc-фрагментом IgG4.

У іншому втіленні, Fc-фрагмент імуноглобуліну може бути в неглікозилованій формі.

У іншому аспекті, винаходом передбачено кон'югат мономеру фізіологічно активного поліпептиду з Fc-фрагментом імуноглобуліну, що містить мономер фізіологічно активного поліпептиду, приєднаний непептидильним лінкером до Fc-фрагменту імуноглобуліну, в якому фізіологічно активний поліпептид приєднано непептидильним лінкером до Fc-фрагменту імуноглобуліну в мономерній формі; кон'югат, який характеризується зниженою рецепторопосередкованою інтерналізацією або зниженим рецепторопосередкованим кліренсом порівняно з будь-яким димерним кон'югатом, який містить дві молекули фізіологічно активного поліпептиду, приєднані непептидильним лінкером до одичного Fc-фрагменту імуноглобуліну або кон'югату, який містить фізіологічно активний поліпептидний димер, приєднаний всередині рамки зчитування до Fc-фрагменту імуноглобуліну.

У іншому аспекті, винаходом передбачено спосіб одержання фармацевтичної композиції тривалої дії, який полягає у: (а) прикріпленні фізіологічно активного поліпептиду до Fc-фрагменту імуноглобуліну з одержанням суміші кон'югатів фізіологічно активного поліпептиду з Fc-фрагментом імуноглобуліну; та (b) відокремленні від суміші кон'югату мономеру фізіологічно активного поліпептиду з Fc-фрагментом імуноглобуліну, який містить одну молекулу фізіологічно активного поліпептиду, приєднану до одичного Fc-фрагменту імуноглобуліну.

У одному втіленні, фізіологічно активний поліпептид та Fc-фрагмент імуноглобуліну, які включено в цьому способі до складу кон'югату, може бути з'єднано між собою непептидильним лінкером.

У іншому втіленні, кон'югат, який містить одну молекулу фізіологічно активного поліпептиду, приєднану до одичного Fc-фрагменту імуноглобуліну в цьому способі може відрізнятися зниженою рецепторопосередкованою інтерналізацією або рецепторопосередкованим кліренсом порівняно з будь-яким димерним кон'югатом, що містить дві молекули фізіологічно активного поліпептиду, приєднані непептидильним лінкером до одичного Fc-фрагменту імуноглобуліну, або кон'югату, що містить фізіологічно активний поліпептидний димер, приєднаний всередині рамки зчитування до Fc-фрагменту імуноглобуліну.

У одному аспекті, винаходом передбачено фармацевтичну композицію тривалої дії, що містить кон'югат, який містить фізіологічно активний поліпептид, приєднаний до Fc-фрагменту імуноглобуліну, композиції, яка містить мономерний кон'югат, який містить одну молекулу фізіологічно активного поліпептиду, приєданого до одичного Fc-фрагменту імуноглобуліну та необов'язково містить мультимерний кон'югат, що містить дві або більше молекул такого ж фізіологічно активного поліпептиду, приєданого до одичного Fc-фрагменту імуноглобуліну за умови, що молярне відношення мономерного кон'югату до мультимерного кон'югату в композиції складає принаймні 19.

У втіленні винаходу було відкрито, що кон'югат, який містить мономер фізіологічно активного поліпептиду, приєднаний до Fc-фрагменту імуноглобуліну характеризується зниженою рецепторопосередкованою інтерналізацією та рецепторопосередкованим кліренсом порівняно до кон'югату, що містить фізіологічно активний поліпептидний мультимер, зокрема фізіологічно активний поліпептидний димер, приєднаний до Fc-фрагменту імуноглобуліну, отже може мати збільшений час напівжиття сироватки. Таким чином було відкрито, що лікарський засіб, що містить кон'югат, який містить мономер фізіологічно активного поліпептиду, приєднаний до Fc-фрагменту імуноглобуліну для одержання зменшеного рецепторопосередкованого кліренсу може бути застосовано, як лікарський засіб тривалої дії, оскільки він характеризується зниженою рецепторопосередкованою інтерналізацією та рецепторопосередкованим кліренсом. Інакше кажучи, основою винаходу є відкриття того, що кон'югат мономеру фізіологічно активного поліпептиду з Fc-фрагментом імуноглобуліну характеризується зниженою рецепторопосередкованою інтерналізацією та зниженим рецепторопосередкованим кліренсом в порівнянні з мультимерним кон'югатом, зокрема з димерним кон'югатом.

Як тут застосовано, термін "фармацевтична композиція тривалої дії" має відношення до фармацевтичної композиції, що містить кон'югат мономеру фізіологічно активного поліпептиду з Fc-фрагментом імуноглобуліну, який характеризується зниженою рецепторопосередкованою інтерналізацією та рецепторопосередкованим кліренсом порівняно до окремого фізіологічно активного поліпептиду або до мультимеру фізіологічно активного поліпептиду з Fc-фрагментом імуноглобуліну. Інакше кажучи, цей термін має відношення до фармацевтичної композиції, що містить мономерний кон'югат, який містить одну молекулу фізіологічно активного поліпептиду, приєдану до одичного Fc-фрагменту імуноглобуліну. Крім того, термін "фармацевтична композиція" може бути застосовано взаємозамінне з терміном "препарат".

У фармацевтичній композиції винаходу, мономерний кон'югат, який містить одну молекулу фізіологічно активного поліпептиду, приєдану до одичного Fc-фрагменту імуноглобуліну може бути присутнім з молярним відношенням принаймні 19:1, переважно принаймні 99:1,

більш переважно принаймні 500:1 по відношенню до мультимерного кон'югату, який містить дві або більше молекул такого ж саме фізіологічно активного поліпептиду, приєднаного до Fc-фрагменту імуноглобуліну. Інакше кажучи, фармацевтична композиція тривалої дії характеризується тим, що її молярне відношення мономерного кон'югату до мультимерного кон'югату ([мономерний кон'югат] / [мультимерний кон'югат]) складає принаймні 19.

Відповідно до втілення винаходу, фізіологічно активний поліпептид у складі кон'югату фізіологічно активного поліпептиду-непептидильного полімеру- Fc-фрагменту імуноглобуліну є присутнім в мономерній формі та, в такому разі, цей кон'югат має більшу тривалість дії *in vivo* порівняно до випадку, в якому фізіологічно активний поліпептид є присутнім в димерній формі. Отже, в разі композиції, в якій є присутнім тільки мономерний кон'югат без наявності мультимерного кон'югату або в якій молярне відношення мономерного кон'югату до мультимерного кон'югату, зокрема димерного кон'югату складає принаймні 19, ця композиція має відмінну дію, яка полягає у збільшенні, порівняно до інших композицій, часу напівжиття фізіологічно активного поліпептиду сироватки.

Мономерний кон'югат за винаходом має довгу тривалість дії *in vivo* через те, що інтерналізація, опосередкована рецептором фізіологічно активного поліпептиду є зниженою порівняно до мультимерного кон'югату, який містить дві або більше молекул фізіологічно активного поліпептиду, приєднані до Fc-фрагменту імуноглобуліну. Зокрема відомо, що кліренсу через нирки, яке є іншим механізмом, який визначає час напівжиття молекули в організмі залежить від молекулярної маси самої молекули. Отже, якщо ниркове кліренсу є важливою змінною, яка визначає час напівжиття, то час напівжиття буде зростати зі зростанням відношення мультимерного кон'югату, який має більшу молекулярну масу. Однак, в цьому винаході було відкрито мономерний кон'югат, який характеризується збільшеною тривалістю дії *in vivo* та в цьому зв'язку може бути помітно, що опосередкована рецептором інтерналізація є важливим фактором збільшення часу напівжиття *in vivo* кон'югату за винаходом. Ці результати можуть бути наслідками корисного впливу (наприклад, зменшення стеричної перешкоди) мономерного кон'югату, якого не було спостережено в мультимерному кон'югаті.

Отже, фармацевтична композиція тривалої дії за винаходом може відрізнитися більшою тривалістю дії *in vivo* у порівнянні з фармацевтичною композицією, що містить або кон'югат мультимеру фізіологічно активного поліпептиду з Fc-фрагментом імуноглобуліну або кон'югат, який містить димер фізіологічно активного поліпептиду, приєднаний всередині рамки читування до Fc-фрагменту імуноглобуліну. Зокрема, мономерний кон'югат, який містить одну молекулу фізіологічно активного поліпептиду, приєднану до одиничного Fc-фрагменту імуноглобуліну може бути присутнім в фармацевтичній композиції за винаходом в молярному відношенні принаймні 19:1, переважно принаймні 99:1, більш переважно принаймні 500:1 відносно мультимерного кон'югату, до складу якого входять дві або більше молекул такого ж саме фізіологічно активного поліпептиду, приєднаного до Fc-фрагменту імуноглобуліну та, в цьому разі, композиція, яка містить мономерний кон'югат та мультимерний кон'югат забезпечує одержання відмінного препарату тривалої дії, тому що час напівжиття цієї композиції *in vivo* не знижується.

Як тут застосовано, термін "кон'югат фізіологічно активного поліпептиду з Fc-фрагментом імуноглобуліну" має відношення до кон'югату, який містить фізіологічно активний поліпептид, приєднаний до Fc-фрагменту імуноглобуліну. Переважним чином цей кон'югат може містити непептидильний лінкер, розміщений між фізіологічно активним поліпептидом та Fc-фрагментом імуноглобуліну для приєднання фізіологічно активного поліпептиду до Fc-фрагменту імуноглобуліну.

Як тут застосовано, термін "кон'югат мономеру фізіологічно активного поліпептиду з Fc-фрагментом імуноглобуліну" має відношення до кон'югату, який містить мономер фізіологічно активного поліпептиду, приєднаний до Fc-фрагменту імуноглобуліну. Цей кон'югат охоплює форму, в якій одиничний фізіологічно активний поліпептид приєднано до одиничного Fc-фрагменту імуноглобуліну. В цьому випадку одиничний Fc - фрагмент імуноглобуліну існує переважно в формі, в якій два Fc-ланцюги зв'язано між собою, наприклад, але без обмеження, дисульфідним зв'язком. Структуру цього кон'югату мономеру фізіологічно активного поліпептиду з Fc-фрагментом імуноглобуліну зображено, але без обмеження цим зображенням, на Фіг.1. Термін "кон'югат мономеру фізіологічно активного поліпептиду з Fc-фрагментом імуноглобуліну" в цьому описі застосовано взаємозамінне з терміном "мономерний кон'югат".

Кон'югат мономеру фізіологічно активного поліпептиду з Fc-фрагментом імуноглобуліну характеризується зниженою рецепторопосередкованою інтерналізацією або рецепторопосередкованим кліренсом порівняно до подібних характеристик мультимерного кон'югату, який містить дві або більше молекул фізіологічно активного поліпептиду, приєднані

до одиничного Fc-фрагменту імуноглобуліну або кон'югату, який містить мультимер фізіологічно активного поліпептиду, приєднаний всередині рамки зчитування до Fc-фрагменту імуноглобуліну. Отже, лікарський засіб, який містить тільки один кон'югат мономеру фізіологічно активного поліпептиду з Fc-фрагментом імуноглобуліну або містить велику кількість кон'югату, характеризується довгою тривалістю дії *in vivo* та відмінною терапевтичною ефективністю.

Тим часом мультимерний кон'югат, який містить дві або більше молекули фізіологічно активного поліпептиду, приєднані до Fc-фрагменту імуноглобуліну також охоплює форму, в якій дві або більше молекул фізіологічно активного поліпептиду приєднано до одиничного Fc-фрагменту імуноглобуліну (наприклад, яка містить два Fc - ланцюги, зв'язані між собою дисульфідним зв'язком тощо).

Зокрема, кон'югат димеру фізіологічно активного поліпептиду з Fc-фрагментом імуноглобуліну охоплює форму, в якій дві молекули фізіологічно активного поліпептиду приєднано до одиничного Fc-фрагменту імуноглобуліну (наприклад, яка містить два Fc - ланцюги, зв'язані між собою дисульфідним зв'язком тощо). В такому разі фізіологічно активний поліпептид може бути приєднано непеptидильним лінкером до кожного з двох ланцюгів, що складають Fc-фрагмент імуноглобуліну, але не обмежуючись цим. Цю конфігурацію наведено на Фіг. 1(B).

Крім того, кон'югат всередині рамки зчитування також охоплює форму з одержанням мультимеру фізіологічно активного поліпептиду, зокрема димеру фізіологічно активного поліпептиду, приєданого всередині рамки зчитування до одиничного Fc-фрагменту імуноглобуліну, а також мультимеру, в якому два або більше злитих поліпептидів містять фізіологічно активний поліпептид, злитий з Fc-фрагментом імуноглобуліну.

В той же час, фізіологічно активний поліпептидний мономер у складі конструкції мономерного фізіологічно активного поліпептиду, зв'язаного з Fc-фрагментом імуноглобуліну за винаходом є ковалентно зв'язаним з Fc-фрагментом імуноглобуліну через непеptидильний лінкер.

Як тут застосовано, термін "непеptидильний лінкер" має відношення до біосумісного полімеру, який складається з двох або більше зв'язаних між собою повторюючихся одиниць та в якому ці одиниці є зв'язаними між собою із застосуванням будь-якого непеptидного ковалентного зв'язку. Цей непеptидильний лінкер може мати два або три кінці.

Застосований у винаході непеptидильний лінкер може бути вибрано з групи, яка складається, але без обмеження, з поліетиленгліколю, поліпропіленгліколю, сополімеру етиленгліколю та пропіленгліколю, поліоксietiлованого поліолу, полівінілового спирту, полісахариду, декстрану, полівінілового етилового етеру, полімерів, що дезінтегруються під дією біологічних факторів, як-то полімолочної кислоти (PLA) та полілактид-ко-гліколіду (PLGA), ліпідних полімерів, хітинів, гіалуронової кислоти та їх комбінацій, але не обмежуючись цим. Переважним чином він є поліетиленгліколем.

Крім того, обсяг винаходу також охоплює їх відомі в цій галузі похідні та похідні, які може бути легко отримано на сучасному етапі розвитку.

Пептидильний лінкер, який застосовують у злитому білку, отриманому традиційним способом злиття всередині рамки має недолік, пов'язаний з тим, що його *in vivo* легко розщеплює протеаза та таким чином неможливо отримати очікуваний ефект збільшення часу напівжиття сироватки активного лікарського засобу з допомогою носія. З тієї причини, на додачу до пептидильного лінкеру, для одержання кон'югату у винаході може бути застосовано й непеptидильний лінкер. Для збереження часу напівжиття сироватки пептиду цей непеptидильний лінкер може бути стійким до дії протеази полімером, подібним до полімеру носія. Отже, у винаході може бути застосовано будь-який непеptидильний лінкер без жодного обмеження за умови, що він буде складатися з полімеру, який має вищезазначену функцію, тобто складатися з полімеру, який є стійким до дії протеази *in vivo*. Цей непеptидильний лінкер має молекулярну масу 1-100 кДа, переважно 1-20 кДа, але не обмежуючись цим.

Крім того, цей непеptидильний лінкер, який за винаходом приєднано до Fc-фрагменту імуноглобуліну може бути отримано не тільки з одного типу полімеру, але й також із поєднанням різних типів полімерів.

Непеptидильний лінкер за винаходом має здатні до зв'язування з Fc-фрагментом імуноглобуліну реакційні групи та білковий лікарський засіб.

Реакційні групи на обох кінцях непеptидильного 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 непеptидильний 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 відновним алкілуванням через альдегідний зв'язок є набагато стійкішим, ніж продукт, зв'язаний з допомогою амідного зв'язку.

5 Альдегідна реакційна група може необов'язково зв'язуватися з N-кінцем в умовах низького рН та може утворювати ковалентний зв'язок з лізиновим залишком в умовах високого рН, наприклад, з рН 9,0.

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 бутілальдегід. Якщо як непептидильний лінкер застосовано поліетиленгліколь, що має гідроксильні реакційні групи на обох кінцях, то ці гідроксильні групи може бути активовано з допомогою відомою хімічної реакції з одержанням різних реакційних груп. Альтернативним чином, для одержання кон'югату винаходу може бути застосовано наявний у продажу поліетиленгліколь з модифікованою реакційною групою.

15 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.

Тип та розмір фізіологічно активного поліпептиду у кон'югаті за винаходом не має певного обмеження за умови, що його може бути приєднано до Fc-фрагменту імуноглобуліну в мономерній формі з виявленням зменшеної рецепторопосередкованої інтерналізації або рецепторопосередкованого кліренсу порівняно до подібних характеристик в разі його приєднання до Fc-фрагменту імуноглобуліну в мультимерній формі. Крім того, більш бажаним є фізіологічно активний поліпептид, опосередкована рецептором інтерналізація та опосередковане рецептором кліренсу якого є головним серед механізмів кліренсу білка *in vivo*.

30 Фізіологічно активний поліпептид може бути вибрано з групи, яка складається, але без обмеження, з глюкагоноподібного пептиду-1 (GLP-1), гранулоцитарного колонієстимулюючого фактора (G-CSF), людського гормону росту (hGH), еритропоєтину (EPO), глюкагону, окситомодуліну, інсуліну, гормону, що звільняє гормон росту, , пептиду, який звільняє гормон росту, інтерферонів, рецепторів інтерферонів, рецептора, зв'язаного з G білком, інтерлейкінів та інтерлейкінових рецепторів, ферментів, інтерлейкін-зв'язуючих білків, цитокін-зв'язуючих білків, фактора активування макрофагів, макрофагового пептиду, B - клітинного фактора, T - клітинного фактора, білка A, алергологічного пригнічувача, клітинних некротичних глікобілків, імунотоксину, лімфотоксину, фактора некрозу пухлин, пухлинних супресорів, фактора росту метастазів, альфа-1 антирипсину, альбуміну,  $\alpha$ -лактальбуміну, аполіпопротеїну-E, високоглікозилизованого 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, білка C, C-реактивного білка, пригнічувача реніну, пригнічувача колагенази, супероксид дисмутази, 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 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, поліклональних антитіл та фрагментів антитіл. Переважно фізіологічно активний поліпептид може бути вибрано з групи, яка складається, але без обмеження, з глюкагоноподібного пептиду-1 (GLP-1), гранулоцитарного колонієстимулюючого фактора (G-CSF), людського гормону росту (hGH), еритропоєтину (EPO), глюкагону, окситомодуліну, інсуліну та їх похідних.

Крім того, термін "фізіологічно активний поліпептид" охоплює не тільки природні фізіологічно активні поліпептиди, але й також агоністи, прекурсори, похідні, фрагменти або варіанти кожного поліпептиду.

Застосований у винаході фізіологічно активний поліпептид може бути агоністом GLP-1 та прикладом його може бути, але без особливого обмеження, (1H-імідазол-4-іл)-ацетил-1 (GEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 1) (Bachem) або HEGTFTSDVSSYLEEQAQKEFIWLVKG (SEQ ID NO: 2) (Bachem)). Напрямок амінокислотної послідовності вважають напрямом від N-кінця до C-кінця.

Сполуку (1H-імідазол-4-іл)-ацетил-1 (GEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSG APPPS (Bachem)) було застосовано для одержання агоністу GLP-1 з Fc-фрагментом імуноглобуліну у Прикладі за винаходом.

Зазначені тут приклади похідних оксинтомодуліну охоплюють, але без обмеження, всі похідні оксинтомодуліну, наведені в Заявці на Патент Кореї №. 10-2012-0137271 та приклади похідних білка вивільнення інсуліну охоплюють, але без обмеження, похідні цього білка, наведені в Заявці на Патент Кореї №. 10-2009-0008151.

Оскільки Fc - ділянка імуноглобуліну є поліпептидом, що дезінтегрується під дією біологічних факторів, який метаболізується *in vivo*, вона з безпечною для застосування в якості носія лікарського засобу. Також, через те, що Fc - ділянка імуноглобуліну має молекулярну масу, яка є меншою, ніж молекулярна маса всієї молекули імуноглобуліну, вона є корисною з точки зору одержання, очищення та виходу кон'югату. Крім того, через усунення Fab - ділянки, яка характеризується високим рівнем гетерогенності, обумовленої різницею амінокислотної послідовності між антитілами, позостала Fc - ділянка має значно збільшену гомогенність та низьку здатність до викликання сироваткової антигенності.

Термін "Fc - ділянка імуноглобуліну", як тут застосовано, має відношення до білка, який містить важколанцюгову сталу ділянку 2 (CH2) та важколанцюгову сталу ділянку 3 (CH3) імуноглобуліну за виключенням важколанцюгової та легколанцюгової змінних ділянок, важколанцюгової сталої ділянки 1 (CH1) та легколанцюгової сталої ділянки 1 (CL1) імуноглобуліну. Fc - ділянка імуноглобуліну може додатково містити шарнір у важколанцюговій сталій ділянці. Також Fc - ділянка імуноглобуліну за винаходом може бути подовженою Fc - ділянкою, що містить повну важколанцюгову сталу ділянку 1 (CH1) та / або легколанцюгову сталу ділянку 1 (CL1) або її частину, за виключенням важколанцюгових та легколанцюгових змінних ділянок за умови, що вона буде мати суттєво таку ж саме або кращу, ніж її природна форма, фізіологічну функцію. Крім того, вона також може бути фрагментом, що має делецію відносно великої частини амінокислотної послідовності CH2 та / або CH3.

Інакше кажучи, Fc - ділянка імуноглобуліну за винаходом може містити 1) домен CH1, домен CH2, домен CH3 та домен CH4, 2) домен CH1 та домен CH2, 3) домен CH1 та домен CH3, 4) домен CH2 та домен CH3, 5) комбінацію одного або більше доменів та імуноглобулінову шарнір (або частину цієї петельної ділянки) та 6) димер кожного домену важколанцюгових та легколанцюгових сталих ділянок.

Fc-фрагмент імуноглобуліну за винаходом може містити не тільки природну амінокислотну послідовність, але й також її мутантну послідовність. Як тут застосовано, термін "мутант амінокислотної послідовності" означає послідовність, що характеризується від природної амінокислотної послідовності через делецію, вставку, неконсервативне або консервативне заміщення або комбінації 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, 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 одержання цих послідовностей, які є похідними Fc-фрагменту імуноглобуліну наведено у Міжнародних патентних публікаціях №№. WO 97/34631 та WO 96/32478.

Амінокислотні заміщення білків та пептидів, які суттєво не змінюють активність молекул відомі в науковій літературі (H. Neurath, R. L. Hill, The Proteins, Academic Press, New York, 1979). 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, фосфорилуванням, сульфатуванням, аcriлуванням, глікозилюванням, метилуванням, фарнезилюванням, ацетилюванням або амідуванням.

Описані вище Fc-мутанти є мутантами, які виявляють подібну до Fc-фрагменту винаходу біологічну активність, але також ще 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 виділенням 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'c- та F(ab)<sub>2</sub>- фрагменти. Для виділення Fc- або pF'c-фрагментів, ці фрагменти може бути піддано, наприклад, ексклюзійній хроматографії.

Переважає чиним, 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 деглікозильованій 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 із застосуванням мікроорганізму. Fc-фрагмент імуноглобуліну, отриманий усуненням цукрових ланцюгів виявляє зменшену зв'язувальну спорідненість 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 деглікозильованій або аглікозильованій 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 неглікозилюваний Fc-фрагмент, який є продуктом експресії еукаріотів, переважним чиним *E. coli*.

Слід зазначити, що Fc-фрагмент імуноглобуліну може мати людське 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 чиним, 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 чиним, 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 одержанням 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 °F IgG Fc, IgM Fc, IgA Fc, IgE Fc та IgD Fc та може містити шарнір.

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 чиним, 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 неглікозилюваний 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.

В одному прикладі винаходу було отримано кон'югат прикріпленням мономеру фізіологічно активного поліпептиду через непептидильний полімер до Fc-фрагменту імуноглобуліну (Приклад) та було відкрито, що отриманий кон'югат характеризується зниженою

рецепторопосередкованою інтерналізацією, отже має збільшений, порівняно до кон'югату з фізіологічно активним поліпептидом в димерній формі, час напівжиття *in vivo* (Фіг. 2 та 3).

У іншому аспекті, винаходом передбачено кон'югат мономеру фізіологічно активного поліпептиду з Fc-фрагментом імуноглобуліну, що містить мономер фізіологічно активного поліпептиду, приєднаний непептидильним лінкером до Fc-фрагменту імуноглобуліну, в якому фізіологічно активний поліпептид приєднано непептидильним лінкером до Fc-фрагменту імуноглобуліну в мономерній формі; кон'югат, який характеризується зниженою рецепторопосередкованою інтерналізацією або рецепторопосередкованим кліренсом порівняно з будь-яким димерним кон'югатом, до складу якого входять дві молекули фізіологічно активного поліпептиду, приєднані непептидильним лінкером до одичного Fc-фрагменту імуноглобуліну; або кон'югату, який містить димер фізіологічно активного поліпептиду, приєднаний всередині рамки зчитування до Fc-фрагменту імуноглобуліну.

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

У іншому аспекті, винаходом передбачено спосіб одержання фармацевтичної композиції тривалої дії, спосіб, який полягає у: (a) прикріпленні фізіологічно активного поліпептиду до Fc-фрагменту імуноглобуліну з одержанням суміші кон'югатів фізіологічно активного поліпептиду з Fc-фрагментом імуноглобуліну; та (b) відокремленні від суміші кон'югату мономеру фізіологічно активного поліпептиду з Fc-фрагментом імуноглобуліну, який містить одну молекулу фізіологічно активного поліпептиду, приєднану до одичного Fc-фрагменту імуноглобуліну.

Наведені тут фізіологічно активний поліпептид, Fc-фрагмент імуноглобуліну, непептидильний лінкер та фармацевтична композиція тривалої дії 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: (i) зв'язуванні будь-якого фізіологічно активного поліпептиду та Fc-фрагменту імуноглобуліну до реакційної групи на одному з кінців непептидильного лінкера; та (ii) зв'язуванні позосталого компоненту з реакційною групою на іншому кінці непептидильного лінкера. Крім того, операція (a) може полягати у застосуванні між (i) та (ii) ще додаткового етапу відокремлення фізіологічно активного поліпептиду або Fc-фрагменту імуноглобуліну, зв'язаного з одним кінцем непептидильного лінкера. Для одержання цього кон'югату, зміст Патенту Кореї № 10-0725315 може бути включено сюди за посиланням.

У разі одержання кон'югату із застосуванням цього процесу на додачу до кон'югату, який містить фізіологічно активний мономер, приєднаний до Fc-фрагменту імуноглобуліну, у вигляді побічних продуктів може бути отримано кон'югати, які містять фізіологічно активний поліпептид в димерній або мультимерній формі.

Отже, спосіб винаходу після операції (a) одержання суміші кон'югатів, може додатково полягати у здійсненні операції (b) відокремлення від суміші кон'югату мономеру фізіологічно активного поліпептиду з Fc-фрагментом імуноглобуліну, який містить мономер фізіологічно активного поліпептиду, приєднаного до Fc-фрагменту імуноглобуліну.

Умови відокремлення в операції (b) можуть відрізнятися в залежності від типу застосованого непептидильного лінкера та фізіологічно активного поліпептиду тощо.

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

Приклад: Одержання кон'югату агоністу GLP-1R з Fc-фрагментом імуноглобуліну.

Було здійснено сайт-специфічну реакцію пропіон-ALD2 ПЕГ з молекулярною масою 3,4 кДа (IDB, Korea) з лізиновим залишком агоністу GLP-1. Для одержання кон'югату, в якому ПЕГ та агоніст GLP-1R є зв'язаними між собою у відношенні 1:1, реакційну суміш піддали катіонообмінній хроматографії на колонці з очищенням моно-ПЕГізованого агоністу GLP-1. Для одержання кон'югату агоністу GLP-1R з Fc-фрагментом імуноглобуліну, який містить моно-ПЕГізований агоніст GLP-1, специфічно приєднаний до N-кінця Fc-фрагменту імуноглобуліну, реакцію було здійснено в умовах pH 5,0-8,2. Після реакції зв'язування було здійснено процес очищення із застосуванням гідрофобної колонки та аніонообмінної колонки з одержанням таким чином кон'югату агоністу GLP-1R з Fc-фрагментом імуноглобуліну, наділеного пов'язаною з агоністом GLP-1R сайт-специфічністю до Fc-фрагменту імуноглобуліну.

Після проведення аналізу отриманого в результаті цього процесу кон'югату агоністу GLP-1R з Fc-фрагментом імуноглобуліну було виявлено, що отримана сполука являла собою або виключно кон'югат мономера агоністу GLP-1 з Fc-фрагментом імуноглобуліну або мультимерний кон'югат, в тому числі сліди кон'югату димера агоністу GLP-1 з Fc-фрагментом

імуноглобуліну був присутнім у відсотковій кількості 5 % (за масою) або ще менше, якщо брати за основу загальну масу отриманого кон'югату.

Порівняльний приклад: Одержання кон'югату димера агоністу GLP-1 з Fc-фрагментом імуноглобуліну.

Послідовність ДНК, яка містила агоніст GLP-1, приєднаний до Fc-фрагменту імуноглобуліну клонували у векторі експресії для тваринних клітин. Було здійснено трансфекцію тваринної клітинної лінії 293-F (Freestyle 293-F cell, Invitrogen) із застосуванням ДНК, в якій було закодовано цей рекомбінантний білок та розчину для трансфекції (FreeStyle™ MAX Reagent, Invitrogen), після чого клітини культивували протягом 48 год. та культуру було зібрано. Отриманий в результаті експресії кон'югат димера агоністу GLP-1 з Fc-фрагментом імуноглобуліну очистили з культури із застосуванням афінної колоночної хроматографії.

Експериментальний Приклад 1: Оцінка рецепторної інтерналізації.

Для оцінки рецепторної інтерналізації в цих дослідженнях було застосовано набір для аналізу PathHunter® eXpress Activated GPCR Internalization Assay. Для цього клітини U2OS, в яких відбувалася експресія людського рецептора GLP-1 засіяли у білий 96-луночний планшет та культивували протягом 24-48 год. Кон'югат агоністу GLP-1 з Fc-фрагментом імуноглобуліну за Прикладом піддали чотириразовому серійному розведенню з концентрації 3 мкМ, кон'югат агоністу GLP-1 з Fc-фрагментом імуноглобуліну всередині рамки зчитування за Порівняльним Прикладом піддали чотириразовому серійному розведенню з концентрації 15 мкМ та кожне з цих розведень додали в лунку планшету. Потім було здійснено індукцію рецепторної інтерналізації кожного з кон'югатів їх трьохгодинним інкубуванням в інкубаторі в середовищі CO<sub>2</sub> з температурою 37 °C. Потім до лунок планшету додали субстрат, призначений для визначення підданих ендоцитозу рецепторів, реакція з яким тривала протягом години з кімнатною температурою та люмінесценцію лунок було виміряно із застосуванням скануючого спектрофотометру для читання мікропланшетів. Результати цих вимірювань наведено на Фіг. 2.

В результаті, як зображено на Фіг. 2, кон'югат за Прикладом відрізнявся показником EC<sub>50</sub> у 377 нМ та кон'югат за Порівняльним Прикладом відрізнявся показником EC<sub>50</sub> у 14.59 нМ, що свідчить про те, що кон'югат агоністу GLP-1 з Fc-фрагментом імуноглобуліну винаходу має суттєво зменшену рецепторну інтерналізацію порівняно до кон'югату агоністу GLP-1 з Fc-фрагментом імуноглобуліну за Порівняльним Прикладом. Ці результати вказують на те, що кон'югат, який містить мономер фізіологічно активного поліпептиду, приєднаний до Fc-фрагменту імуноглобуліну може мати зменшену опосередковану рецептором інтерналізацію та кліренсу порівняно до кон'югату, в якому фізіологічно активний поліпептид є присутнім в димерній формі.

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 та кон'югату агоністу GLP-1R з Fc-фрагментом імуноглобуліну було досліджено змінення 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 всередині рамки зчитування (400 мкг/кг) розвели фізіологічним розчином та підшкірно ввели тваринам з дозою у 2мл / кг. Відбір 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.

Для цього кожен з досліджуваних кон'югатів агоністу GLP-1 з Fc-фрагментом імуноглобуліну (концентрація обох кон'югатів дорівнювала 400 мкг / кг) розвели фізіологічним розчином та підшкірно ввели тваринам з дозою у 2мл / кг. Відбір 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.3.

В результаті показники часу напівжиття сироватки кон'югату агоністу GLP-1R з Fc-фрагментом імуноглобуліну за Прикладом та кон'югату агоністу GLP-1R з Fc-фрагментом імуноглобуліну за Порівняльним Прикладом 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

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 димерного агоністу GLP-1R з Fc-фрагментом імуноглобуліну (Фіг.3).

5 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 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 детальним описом, а з допомогою доданої Формули Винаходу та слід розуміти, що всі модифікації та варіанти, 10 отримані від значення та обсягу винаходу та їх еквіваленти є частиною обсягу доданої Формули Винаходу.

<110> ХАНМІ ФАРМ. КО., ЛТД.

<120> Кон'югат біологічно активного поліпептидного мономеру та Fc –  
фрагменту імуноглобуліну зі зниженим рецепторопосередкованим кліренсом та  
спосіб його одержання.

<130> OPA14111

<150> KR 10-2013-0082511

<151> 2013-07-12

<160> 2

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 38

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Агоніст GLP-1

<400> 1

Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu Glu

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Ala Pro Pro Pro Ser

35

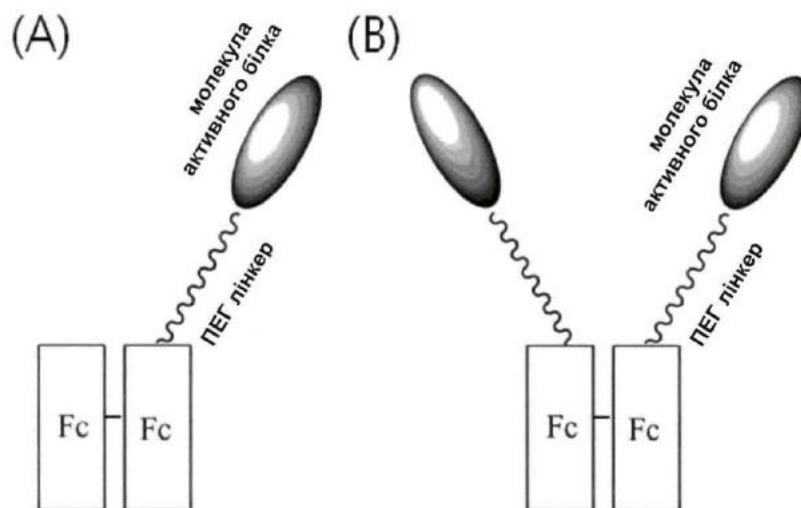
<210> 2

<211> 29  
 <212> Білок  
 <213> Штучна послідовність  
 <220>  
 <223> Агоніст GLP-1  
  
 <400> 2  
 His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Glu  
 1 5 10 15  
  
 Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly  
 20 25

### ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

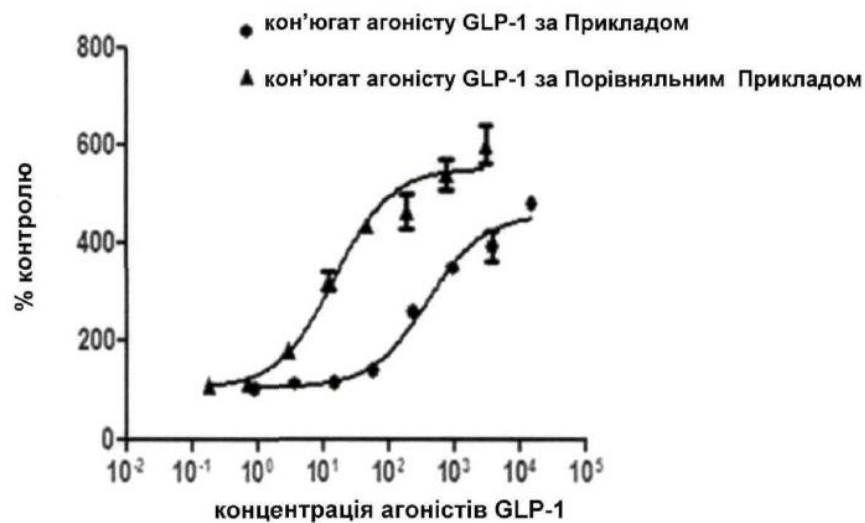
- 5 1. Фармацевтична композиція тривалої дії, яка містить кон'югат, що включає фізіологічно активний поліпептид, зв'язаний з Fc-фрагментом імуноглобуліну, де композиція включає мономерний кон'югат, що містить одну молекулу фізіологічно активного поліпептиду, приєднану до одного Fc-ланцюга одиничного Fc-фрагмента імуноглобуліну, що містить два Fc-ланцюги імуноглобуліну, за допомогою непептидильного лінкера, що має обидва кінці, та димерний кон'югат, що містить дві молекули такого самого фізіологічно активного поліпептиду, приєданого до одиничного Fc-фрагмента імуноглобуліну, що містить два Fc-ланцюги імуноглобуліну, за умови, що молярне співвідношення мономерного кон'югата і димерного кон'югата в композиції складає принаймні 19, де кожний з двох Fc-ланцюгів імуноглобуліну в димерному кон'югаті є зв'язаним з однією молекулою фізіологічно активного поліпептиду за допомогою непептидильного лінкера, що має обидва кінці; та непептидильний лінкер є
- 10 вибраним з групи, яка складається з поліетиленгліколю, поліпропіленгліколю, співполімеру етиленгліколю та пропіленгліколю, поліоксіетилованого поліолу, полівінілового спирту, полісахариду, декстрану, полівінілового етилового етеру, полімеру, що є здатним до біодеградації, ліпідного полімеру, хітину, гіалуронової кислоти та їх комбінацій.
- 15 2. Композиція за п. 1, в якій мономерний кон'югат характеризується зниженою опосередкованою рецептором інтерналізацією або опосередкованим рецептором кліренсом у порівнянні з будь-яким димерним кон'югатом, що містить дві молекули фізіологічно активного поліпептиду, що є приєднаним за допомогою непептидильного лінкера до одиничного Fc-фрагмента імуноглобуліну, або кон'югата, що містить фізіологічно активний поліпептидний димер, приєднаний у рамці зчитування до Fc-фрагмента імуноглобуліну.
- 20 3. Композиція за п. 1, в якій фізіологічно активний поліпептид є вибраним з групи, яка складається з глюкагоноподібного пептиду-1 (GLP-1), гранулоцитарного колонієстимулювального фактора (G-CSF), людського гормону росту (hGH), еритропоєтину (ЕРО), глюкагону, окситомодуліну, інсуліну, релізінг-гормону гормону росту, релізінг-пептиду
- 25 гормону росту, інтерферонів, рецепторів інтерферонів, рецептора, зв'язаного з G-білком, інтерлейкінів, інтерлейкінових рецепторів, ферментів, інтерлейкінзв'язувальних білків, цитокінзв'язувальних білків, фактора активації макрофагів, пептиду макрофагів, фактора В-клітин, фактора Т-клітин, білка А, інгібітора алергії, клітинних некротичних глікопротеїнів, імунотоксину, лімфотоксину, фактора некрозу пухлин, пухлинних супресорів, метастатичного
- 30 фактора росту, альфа-1 антитрипсину, альбуміну,  $\alpha$ -лактальбуміну, аполіпопротеїну-Е, високоглікозилизованого еритропоєтину, ангіопоєтинів, гемоглобіну, тромбіну, пептиду активування тромбінового рецептора, тромбомодуліну, антигенів крові VII, VIIa, VIII, IX та XIII, фактора активування плазміногену, фібринзв'язувального білка, урокінази, стрептокінази, гірудину, білка С, С-реактивного білка, інгібітора реніну, інгібітора колагенази, супероксид
- 35 дисмутази, лептину, тромбоцитарного фактора росту, епітеліального фактора росту, епідермального фактора росту, ангіостатину, ангіотензину, фактора росту кісток, кісткового морфогенетичного білка, кальцитоніну, атріопептину, хрящового індукуючого фактора
- 40

- імпульсної відповіді, елкатоніну, фактора активування сполучної тканини, інгібітора шляху  
тканинного фактора, фолікулостимулюючого гормону, лютеїнізуючого гормону, люліберину,  
факторів росту нервової тканини, паратироїдного гормону, релаксину, секретину,  
соматомедину, інсуліноподібного фактора росту, гормону кори наднирникових залоз,  
5 холецистокініну, панкреатичного поліпептиду, релізінг-пептиду гастрину, фактора вивільнення  
кортикотропіну, тиреотропного гормону, аутоаксину, лактоферину, міостатину, антигенів  
клітинної поверхні, вакцинних антигенів вірусного походження, моноклональних антитіл,  
поліклональних антитіл та фрагментів антитіл.
4. Композиція за п. 1, в якій фізіологічно активний поліпептид є вибраним з групи, яка  
10 складається з глюкагоноподібного пептиду-1 (GLP-1), гранулоцитарного колонієстимулюючого  
фактора (G-CSF), гормону росту людини (hGH), еритропоєтину (EPO), глюкагону,  
окситомодуліну, інсуліну та їх похідних.
5. Композиція за п. 1, в якій непептидильний лінкер має молекулярну масу 1-100 кДа.
6. Композиція за п. 1, в якій Fc-фрагмент імуноглобуліну містить 1-4 домени, вибрані з групи, яка  
15 складається з доменів CH1, CH2, CH3 та CH4.
7. Композиція за п. 1, в якій Fc-фрагмент імуноглобуліну додатково включає шарнірну ділянку.
8. Композиція за п. 1, в якій Fc-фрагмент імуноглобуліну являє собою такий, що походить від  
групи, що включає IgG, IgA, IgD, IgE, IgM, їх комбінації та їх гібриди.
9. Композиція за п. 1, в якій Fc-фрагмент імуноглобуліну є Fc-фрагментом IgG4.
- 20 10. Композиція за п. 1, в якій Fc-фрагмент імуноглобуліну є неглікозилованим.
11. Спосіб отримання фармацевтичної композиції тривалої дії за п. 1, який полягає у:  
(а) зв'язуванні фізіологічно активного поліпептиду з Fc-фрагментом імуноглобуліну, що має два  
Fc-ланцюги імуноглобуліну, за допомогою непептидильного лінкера, що має обидва кінці, з  
отриманням суміші кон'югатів фізіологічно активного поліпептиду з Fc-фрагментом  
25 імуноглобуліну; та  
(b) відокремленні із суміші кон'югата мономеру фізіологічно активного поліпептиду з Fc-  
фрагментом імуноглобуліну, який містить одну молекулу фізіологічно активного поліпептиду,  
зв'язану з одним Fc-ланцюгом імуноглобуліну одиничного Fc-фрагмента імуноглобуліну, що  
містить два Fc-ланцюги імуноглобуліну, за допомогою непептидильного лінкера.
- 30 12. Спосіб за п. 11, в якому кон'югат фармацевтичної композиції тривалої дії, що містить одну  
молекулу фізіологічно активного поліпептиду, приєднану до одиничного Fc-фрагмента  
імуноглобуліну, характеризується зниженою опосередкованою рецептором інтерналізацією або  
опосередкованим рецептором кліренсом у порівнянні з будь-яким димерним кон'югатом, що  
містить дві молекули фізіологічно активного поліпептиду, приєднані за допомогою  
35 непептидильного лінкера до одиничного Fc-фрагмента імуноглобуліну, або димеру фізіологічно  
активного поліпептиду, приєданого у рамці зчитування до Fc-фрагмента імуноглобуліну.

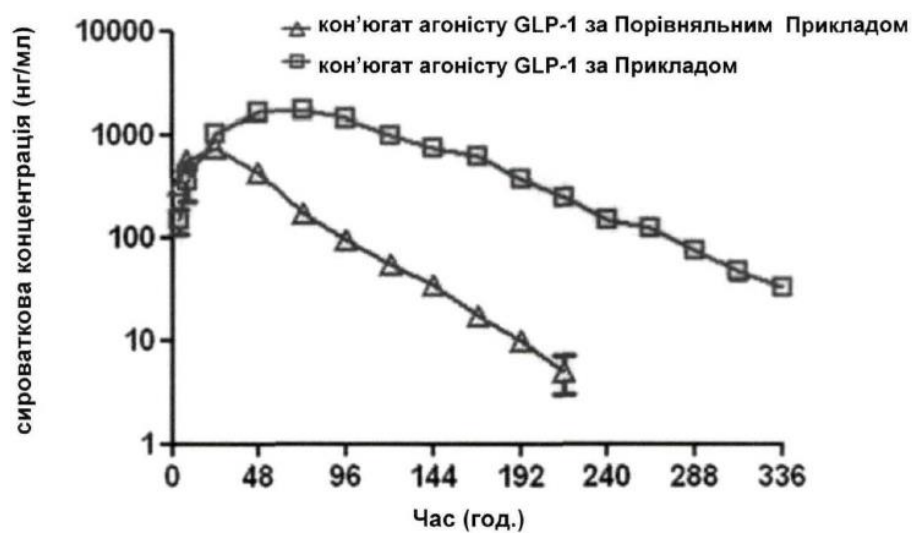


Фіг. 1





Фіг. 2



Фіг. 3

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