



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0028530

(51)⁷ C07K 19/00; C07K 1/02

(13) B

(21) 1-2016-03798

(22) 31/03/2015

(86) PCT/KR2015/003195 31/03/2015

(87) WO2015/152618 08/10/2015

(30) 10-2014-0038032 31/03/2014 KR

(45) 25/06/2021 399

(43) 27/02/2017 347A

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

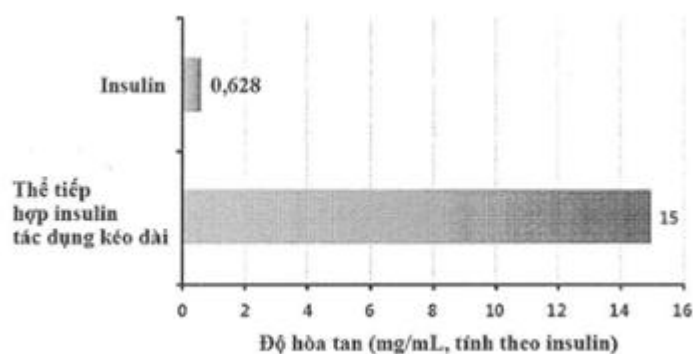
214, Muha-ro, Paltan-myeon, Hwaseong-si, Gyeonggi-do 445-958, Republic of Korea

(72) LIM, Hyung Kyu (KR); LEE, Jong Soo (KR); KIM, Dae Jin (KR); BAE, Sung Min (KR); JUNG, Sung Yonb (KR); KWON, Se Chang (KR).

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

(54) PHƯƠNG PHÁP CẢI THIỆN ĐỘ HÒA TAN CỦA PROTEIN HOẶC PEPTIT CÓ HOẠT TÍNH SINH LÝ

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp cải thiện độ hòa tan của protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý trong dung dịch nước so với độ hòa tan của protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý không được tiếp hợp với mảnh Fc globulin miễn dịch, trong đó phương pháp này bao gồm các bước sau: (1) tiếp hợp protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý với mảnh Fc globulin miễn dịch thông qua polyme không peptidyl; và (2) chọn lọc thể tiếp hợp trong đó protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý được liên kết với mảnh Fc globulin miễn dịch thông qua polyme không peptidyl, trong đó thể tiếp hợp này có độ hòa tan được cải thiện so với độ hòa tan của protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý không được tiếp hợp với mảnh Fc globulin miễn dịch.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp cải thiện độ hòa tan của protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý so với độ hòa tan của protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý không được tiếp hợp với mảnh Fc globulin miễn dịch, phương pháp này bao gồm bước tiếp hợp protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý với mảnh Fc globulin miễn dịch, và chế phẩm cải thiện độ hòa tan của protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý, chứa mảnh Fc globulin miễn dịch, trong đó chế phẩm này có khả năng cải thiện độ hòa tan tốt hơn so với chế phẩm không chứa mảnh Fc globulin miễn dịch.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Dược chất chỉ có tác dụng dược lý khi chúng được hòa tan, do đó độ hòa tan của dược chất có liên quan mật thiết đến tác dụng. Dược chất hòa tan trong nước được bào chế một cách dễ dàng dưới dạng chế phẩm dùng để tiêm, và được hòa tan trong đường dạ dày-ruột khi được uống dưới dạng viên nén. Tuy nhiên, dược chất ít hòa tan trong nước tồn tại ở các dạng kết tụ như các viên tròn trong đường dạ dày-ruột khi được uống mà không xảy ra quá trình hoà tan, và chúng không được hòa tan thành các phân tử riêng rẽ và khó hấp thu. Ngoài ra, khi dược chất ít hòa tan trong nước được sử dụng làm chế phẩm dùng để tiêm mà không xảy ra quá trình hoà tan, thì mạch máu sẽ bị bít kín, do đó tạo cục máu đông. Do đó, dược chất ít hòa tan trong nước không thể được sử dụng làm chế phẩm dùng để tiêm. Độ hòa tan của dược chất là thách thức chính trong việc bào chế thuốc.

Một trong số các phương pháp hòa tan dược chất là sử dụng chất hoạt động bề mặt làm chất hòa tan. Chất hoạt động bề mặt có cả nhóm kỵ nước lẫn nhóm ưa nước trong mỗi phân tử. Trong nước, mạch hydrocacbon kỵ nước được tách ra ở bên trong và các nhóm ưa nước được tiếp xúc với nước để tạo ra các mixen hình cầu. Dược chất có thể được hòa tan bằng cách bao gói trong mixen. Tuy nhiên, khi chất hoạt động bề mặt được sử dụng ở nồng độ cao trong phương pháp này, thì dược chất có thể là không thích hợp để dùng qua đường tĩnh mạch. Ngoài ra, việc pha loãng vi nhũ tương ở mức dưới nồng độ mixen tiêu chuẩn của chất hoạt động bề mặt có thể làm kết tủa dược chất trong các mixen

(Journal of Advanced Pharmacy Education & Research 2(1)32-67 (2012) ISSN 2249-3379). Do đó, vẫn cần có phương pháp làm tăng liên tục độ hòa tan của dược chất mà không ảnh hưởng tới nồng độ của chế phẩm khi không sử dụng chất hoạt động bề mặt.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Các tác giả sáng chế đã có nhiều nỗ lực để phát triển phương pháp cải thiện độ hòa tan của dược chất như protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý. Do đó, các tác giả sáng chế đã phát hiện thấy rằng khi mảnh Fc globulin miễn dịch được tiếp hợp với protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý, thì độ hòa tan của protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý được gia tăng hữu hiệu được gia tăng hữu hiệu để dễ dàng điều chế chế phẩm chứa protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý ở nồng độ hữu hiệu có tác dụng dược lý, và hoàn thành sáng chế này.

Mục đích của sáng chế là đề cập đến phương pháp cải thiện độ hòa tan của protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý so với độ hòa tan của protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý không được tiếp hợp với mảnh Fc globulin miễn dịch, trong đó phương pháp này bao gồm bước tiếp hợp protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý với mảnh Fc globulin miễn dịch.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến phương pháp cải thiện độ hòa tan của protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý trong dung dịch nước so với độ hòa tan của protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý không được tiếp hợp với mảnh Fc globulin miễn dịch, trong đó phương pháp này bao gồm các bước sau: (1) tiếp hợp protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý với mảnh Fc globulin miễn dịch thông qua polyme không peptidyl; và (2) chọn lọc thể tiếp hợp trong đó protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý được liên kết với mảnh Fc globulin miễn dịch thông qua polyme không peptidyl, trong đó thể tiếp hợp này có độ hòa tan được cải thiện so với độ hòa tan của protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý không được tiếp hợp với mảnh Fc globulin miễn dịch.

Sáng chế cũng đề cập đến chế phẩm cải thiện độ hòa tan của protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý, chứa mảnh Fc globulin miễn dịch, trong đó chế phẩm này có khả năng cải thiện độ hòa tan tốt hơn so với chế phẩm không chứa mảnh Fc globulin miễn dịch.

Khi protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý được tiếp hợp với mảnh Fc globulin miễn dịch theo sáng chế, thì độ hòa tan của protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý có thể

được cải thiện hữu hiệu, do đó có lợi trong bào chế các thuốc khác nhau.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 là đồ thị thể hiện đường cong chuẩn hiệu chuẩn insulin và thể tiếp hợp insulin có tác dụng kéo dài.

Fig.2 là biểu đồ thể hiện kết quả thử nghiệm độ hòa tan của insulin và thể tiếp hợp insulin có tác dụng kéo dài theo chế phẩm được thể hiện trong bảng 1, trong đó insulin có độ hòa tan bằng 0,628mg/mL và thể tiếp hợp insulin có tác dụng kéo dài có độ hòa tan bằng 15mg/mL, tính theo insulin.

Fig.3 là đồ thị thể hiện đường cong chuẩn hiệu chuẩn dẫn xuất oxyntomodulin có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.27 và thể tiếp hợp dẫn xuất oxyntomodulin-PEG-mảnh Fc globulin miễn dịch.

Fig.4 là biểu đồ thể hiện kết quả thử nghiệm độ hòa tan của dẫn xuất oxyntomodulin có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.27 và thể tiếp hợp dẫn xuất oxyntomodulin-PEG-mảnh Fc globulin miễn dịch theo chế phẩm được thể hiện trong bảng 4, trong đó dẫn xuất oxyntomodulin có độ hòa tan bằng 0,188mg/mL và thể tiếp hợp có độ hòa tan bằng 11mg/mL, tính theo oxyntomodulin.

Mô tả chi tiết sáng chế

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến phương pháp cải thiện độ hòa tan của protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý so với độ hòa tan của protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý không được tiếp hợp với mảnh Fc globulin miễn dịch, trong đó phương pháp này bao gồm bước tiếp hợp protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý với mảnh Fc globulin miễn dịch.

Theo một phương án cụ thể, mảnh Fc globulin miễn dịch được sử dụng trong phương pháp theo sáng chế là mảnh Fc có nguồn gốc từ IgG, IgA, IgD, IgE, hoặc IgM.

Theo phương án cụ thể khác, mảnh Fc globulin miễn dịch được sử dụng trong phương pháp theo sáng chế là dạng lai của các miền, trong đó mỗi miền này có nguồn gốc khác nhau từ globulin miễn dịch được chọn từ nhóm bao gồm IgG, IgA, IgD, IgE, và IgM.

Theo phương án cụ thể khác, mảnh Fc globulin miễn dịch được sử dụng trong

phương pháp theo sáng chế là dime hoặc multime cấu thành từ các globulin miễn dịch chuỗi đơn có cùng nguồn gốc.

Theo phương án cụ thể khác, mảnh Fc globulin miễn dịch được sử dụng trong phương pháp theo sáng chế là mảnh Fc IgG4 không được glycosyl hóa của người.

Theo phương án cụ thể khác, bước tiếp hợp theo sáng chế bao gồm bước cho protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý liên kết với mảnh Fc globulin miễn dịch thông qua polyme không peptidyl.

Theo phương án cụ thể khác, protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý được tiếp hợp với mảnh Fc globulin miễn dịch được điều chế bằng phương pháp theo sáng chế ở dạng protein dung hợp.

Theo phương án cụ thể khác, polyme không peptidyl được sử dụng trong phương pháp theo sáng chế là polyetylen glycol.

Theo phương án cụ thể khác, polyme không peptidyl được sử dụng trong phương pháp theo sáng chế được chọn từ nhóm bao gồm polypropylen glycol, copolyme của etylen glycol và propylen glycol, rượu đa chức được polyoxyetyl hóa, rượu polyvinyl, polysacarit, dextran, polyvinyl etyl ete, polyme có thể phân hủy sinh học như axit polylactic và axit polylactic-glycolic, polyme lipid, kitin, axit hyaluronic, và hỗn hợp của chúng.

Theo phương án cụ thể khác, phương pháp theo sáng chế là phương pháp cải thiện độ hòa tan của protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý trong dung dịch nước.

Theo phương án cụ thể khác, dung dịch nước được sử dụng trong phương pháp theo sáng chế bao gồm dung dịch đệm chứa axit xitric hoặc axit axetic, ion dung dịch nước chứa chất hoạt động bề mặt dạng không ion là polysorbat, dung dịch nước chứa rượu đường là manitol, và dung dịch nước chứa chất đẳng trương là natri clorua hoặc methionin.

Theo phương án cụ thể khác, dung dịch nước được sử dụng trong phương pháp theo sáng chế có độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 7,0.

Theo phương án cụ thể khác, protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý được sử dụng trong phương pháp theo sáng chế là exendin-4, glucagon, peptit tương tự glucagon 1,

peptit tương tự glucagon 2, hormon tuyến cận giáp, calcitonin, insulin, hoặc oxyntomodulin.

Theo phương án cụ thể khác, dung dịch nước được sử dụng trong phương pháp theo sáng chế còn bao gồm chất hoạt động bề mặt.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến chế phẩm cải thiện độ hòa tan của protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý, bao gồm mảnh Fc globulin miễn dịch, trong đó chế phẩm này có khả năng cải thiện độ hòa tan hơn so với chế phẩm không chứa mảnh Fc globulin miễn dịch.

Theo một phương án cụ thể, chế phẩm chứa thể tiếp hợp của protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý và mảnh Fc globulin miễn dịch, trong đó protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý được liên kết với mảnh Fc globulin miễn dịch thông qua gốc liên kết peptidyl hoặc gốc liên kết không peptidyl làm hoạt chất.

Sáng chế đề cập đến phương pháp cải thiện độ hòa tan của protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý so với độ hòa tan của protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý không được tiếp hợp với mảnh Fc globulin miễn dịch, trong đó phương pháp này bao gồm bước tiếp hợp protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý với mảnh Fc globulin miễn dịch. Phương pháp theo sáng chế có tác dụng cải thiện độ hòa tan của protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý thậm chí không cần bổ sung chất hoạt động bề mặt vào dung môi. Trong trường hợp protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý, cụ thể là insulin, oxyntomodulin, v.v., là thành phần của dược chất protein đã biết, thì nó có độ hòa tan thấp ở độ pH nằm trong khoảng từ 5 đến 7, là khoảng độ pH thông thường của chế phẩm dùng cho cơ thể người. Do đó, việc protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý được bào chế thành chế phẩm ở nồng độ mong muốn là khó. Cũng gặp phải một vấn đề vì chế phẩm dùng để tiêm là nó có thể làm kết tủa trong cơ thể để tạo ra các tác dụng phụ không mong muốn. Điều ngạc nhiên là, các sáng chế đã khẳng định được rằng khi protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý được tiếp hợp với mảnh Fc globulin miễn dịch, thì nó có độ hòa tan gia tăng ở độ pH trong khoảng nêu trên. Tức là, phương pháp theo sáng chế có khả năng cải thiện được độ hòa tan của peptit hoặc protein, như insulin hoặc oxyntomodulin, mà có độ hòa tan thấp ở độ pH trong khoảng pH có tính axit yếu nằm trong khoảng từ 5 đến 7.

Thuật ngữ “độ hòa tan” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ mức độ mà protein

hoặc peptit có hoạt tính sinh lý được hoà tan trong dung môi thích hợp để dùng cho cơ thể người. Một cách chi tiết, thuật ngữ này được sử dụng trong bản mô tả để chỉ mức độ bão hòa của chất hòa tan trong dung môi nhất định ở nồng độ cụ thể. Độ hòa tan có thể được đo bằng cách xác định nồng độ chất hòa tan ở thời điểm bão hòa. Ví dụ, nồng độ này có thể được đo bằng cách sử dụng thiết bị quang phổ UV hoặc HPLC sau khi bổ sung lượng dư chất hòa tan vào dung môi, và sau đó khuấy và lọc dung dịch này, nhưng không chỉ giới hạn ở cách này. Để sử dụng protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý để điều trị, thì điều quan trọng là cần hòa tan lượng hữu hiệu có tác dụng dược lý của nó trong dung môi, là yếu tố quan trọng cần được xem xét trong việc xác định nồng độ của chế phẩm đông khô nhanh trong khi hoàn nguyên hoặc nồng độ của hoạt chất của chế phẩm lỏng.

Đã xác nhận được rằng khi protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý được tiếp hợp với mảnh Fc globulin miễn dịch, thì độ hòa tan của nó được gia tăng đáng kể so với protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý mà mảnh này không được liên kết. Trên cơ sở này, sáng chế được khác biệt ở chỗ độ hòa tan của protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý được cải thiện trong dung dịch nước.

Theo một phương án của sáng chế, khi insulin hoặc oxyntomodulin được sử dụng làm peptit có hoạt tính sinh lý đại diện và Fc của globulin miễn dịch được tiếp hợp vào đó, thì độ hòa tan của insulin và oxyntomodulin được gia tăng đáng kể (Fig.2 và Fig.4).

Thuật ngữ “dung dịch nước” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ dung dịch được dự định để hòa tan protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý. Dung dịch nước bao gồm dung dịch thích hợp để dùng protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý cho người. Theo một phương án cụ thể của sáng chế, dung dịch nước có thể có độ pH có tính axit trung hòa hoặc yếu, ví dụ, độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 7,0. Dung dịch nước sử dụng trong phương pháp theo sáng chế bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở dung dịch đệm axit xitric hoặc axit axetic chứa dung dịch nước chứa chất hoạt động bề mặt dạng không ion là polysorbat, dung dịch nước chứa rượu đường là manitol, và dung dịch nước chứa chất đẳng trương là natri clorua hoặc methionin.

Trong phương pháp của sáng chế, mảnh Fc globulin miễn dịch có thể được liên kết với protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý thông qua polyme không peptidyl. Đặc biệt, mảnh Fc globulin miễn dịch có thể được liên kết với polyme không peptidyl được liên kết với protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý, hoặc mảnh Fc globulin miễn dịch-polyme

không peptidyl có thể được liên kết với protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý.

Thuật ngữ “polyme không peptidyl” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ polyme tương thích sinh học bao gồm một hoặc nhiều đơn vị lặp lại được liên kết với nhau bởi liên kết cộng hoá trị loại trừ liên kết peptit.

Polyme không peptidyl có thể được sử dụng trong sáng chế có thể được chọn từ nhóm bao gồm polyetylen glycol, polypropylen glycol, copolyme của etylen glycol và propylen glycol, rượu polyhydric được polyoxyetylat hóa, rượu polyvinyllic, polysacarit, dextran, polyvinyl etyl ete, polyme có thể phân hủy sinh học như axit polylactic và axit polylactic-glycolic, polyme lipid, kitin, axit hyaluronic, và hỗn hợp của chúng, và tốt hơn là polyetylen glycol, nhưng không chỉ giới hạn ở các loại này. Ngoài ra, các dẫn xuất của chúng đã biết trong lĩnh vực này và được điều chế dễ dàng bởi người có trình độ trung bình trong lĩnh vực này cũng nằm trong phạm vi của sáng chế.

Polyme không peptidyl bất kỳ có thể được sử dụng mà không bị giới hạn, với điều kiện nó là polyme bền với enzym phân giải protein *in vivo*, do đó không được phân giải dễ dàng bởi enzym phân giải protein, từ đó cho phép mảnh Fc globulin miễn dịch đóng vai trò làm chất mang. Polyme không peptidyl có phân tử lượng nằm trong khoảng từ 1 kDa đến 100 kDa, và cụ thể là nằm trong khoảng từ 1 kDa đến 20 kDa. Ngoài ra, polyme không peptidyl theo sáng chế, được liên kết với mảnh Fc globulin miễn dịch, có thể là một polyme hoặc hỗn hợp của các loại polyme khác nhau.

Polyme không peptidyl có thể có nhóm phản ứng có khả năng gắn kết với mảnh Fc globulin miễn dịch và được chất protein hoặc peptit, do đó đóng vai trò làm liên kết để liên kết mảnh Fc globulin miễn dịch với protein hoặc peptit.

Quá trình tạo liên kết của protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý với mảnh Fc globulin miễn dịch bằng cách sử dụng gốc liên kết polyme không peptidyl có thể thu được bằng cách thực hiện (1) phản ứng giữa polyme không peptidyl với một trong số protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý và mảnh Fc globulin miễn dịch bất kỳ; và (2) phản ứng giữa sản phẩm phản ứng thu được ở bước (1) lần lượt với một trong số protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý và mảnh Fc globulin miễn dịch còn lại.

Tuy nhiên, nếu mảnh Fc globulin miễn dịch được liên kết với polyme không peptidyl có nhóm phản ứng ở cả hai đầu ở bước (1), một phần sản phẩm thu được ở bước

(1) có thể ở dạng cầu trong đó hai đầu tận cùng N của mảnh Fc globulin miễn dịch được liên kết với cả hai đầu của polyme không peptidyl trong các điều kiện phản ứng cụ thể. Các sản phẩm thu được ở bước (1) ở dạng cầu có thể ngăn cản phản ứng cặp đôi thứ cấp để liên kết protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý vào đó hoặc có thể làm giảm mạnh hiệu suất cặp đôi. Do đó, theo một phương án, để ngăn cản việc tạo cầu giữa mảnh Fc globulin miễn dịch và mảnh Fc globulin miễn dịch, polyme không peptidyl và protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý có thể được phản ứng trước tiên, và sau đó protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý được liên kết bởi polyme không peptidyl có thể được phản ứng lần lượt với mảnh Fc globulin miễn dịch. Tuy nhiên, không cần phải thực hiện phương pháp cải thiện độ hòa tan theo sáng chế theo thứ tự này.

Ở bước (1), phản ứng hóa học để gốc liên kết polyme không peptidyl với protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý hoặc mảnh Fc globulin miễn dịch có thể được thực hiện bởi phương pháp đã biết. Ví dụ, polyme không peptidyl có nhóm phản ứng ở cả hai đầu có thể được phản ứng với protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý hoặc mảnh Fc globulin miễn dịch ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 0°C đến 25°C trong 1 giờ đến 16 giờ. Thông qua phản ứng này, protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý hoặc mảnh Fc globulin miễn dịch có thể được liên kết cộng hóa trị với một polyme không peptidyl thông qua nhóm phản ứng.

Phản ứng liên kết của protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý với polyme không peptidyl ở bước (1) có thể được thực hiện trong dung dịch phản ứng chứa dung môi hữu cơ. Về mặt này, dung môi hữu cơ có thể là dung môi hữu cơ bất kỳ thường được sử dụng trong lĩnh vực kỹ thuật này, nhưng không chỉ giới hạn ở dung môi này, cụ thể là rượu bậc một, bậc hai, hoặc bậc ba, và rượu có 1 đến 10 nguyên tử cacbon. Cụ thể hơn, rượu có thể là isopropanol, etanol, hoặc metanol. Dung môi hữu cơ có thể được chọn tùy ý từ dung môi hữu cơ thích hợp đối với loại protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý. Ngoài ra, dung môi hữu cơ có thể được sử dụng để tạo liên kết giữa protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý và polyme không peptidyl, nhưng không chỉ giới hạn ở dung môi này, cụ thể là có mặt với lượng nằm trong khoảng từ 10% đến 60%, cụ thể hơn, với lượng nằm trong khoảng từ 30% đến 55%, và cụ thể hơn nữa, với lượng nằm trong khoảng từ 45% đến 55%, tính trên tổng lượng dung dịch phản ứng. Ngoài ra, độ pH của dung dịch phản ứng có thể, nhưng không chỉ giới hạn ở, cụ thể là nằm trong khoảng từ 4,5 đến 7,0 và cụ thể hơn là

nằm trong khoảng từ 5,0 đến 6,5.

Ngoài ra, theo loại nhóm phản ứng tham gia trong phản ứng, chất khử cũng có thể có mặt để thực hiện các bước nêu trên.

Cụ thể, chất khử theo sáng chế dùng để chỉ chất khử bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này có tác dụng làm giảm liên kết đôi imin thuận nghịch được tạo ra từ liên kết giữa nhóm aldehyt của polyme không peptidyl và nhóm amin của polypeptit (protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý, mảnh Fc globulin miễn dịch) để tạo ra liên kết cộng hoá trị. Đối với mục đích của sáng chế, chất khử có thể có mặt trong dung dịch phản ứng để tạo ra liên kết cộng hoá trị giữa polyme không peptidyl và protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý hoặc mảnh Fc globulin miễn dịch. Chất khử theo sáng chế có thể là chất khử bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này, nhưng không chỉ giới hạn ở, tốt hơn là natri xyanoborohydrit, phức hợp boran pyridin, natri borohydrit, phức hợp boran dimetylamin, phức hợp boran trimetylamin, hoặc natri triaxetoxymorohydrit. Chất khử thích hợp có thể được chọn tùy thuộc vào loại polypeptit có hoạt tính sinh lý hoặc vùng ổn định của globulin miễn dịch và dung môi phản ứng.

Ngoài ra, chất khử có thể có mặt ở nồng độ cuối nằm trong khoảng từ 1 mM đến 20 mM đối với phản ứng liên kết (bước phản ứng (1)) giữa protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý và polyme không peptidyl, hoặc mảnh Fc globulin miễn dịch và polyme không peptidyl, và ở nồng độ cuối nằm trong khoảng từ 1 mM đến 100 mM đối với phản ứng cặp đôi (bước phản ứng (2)).

Đồng thời, polyme không peptidyl có thể có nhóm phản ứng ở cả hai đầu, mỗi nhóm phản ứng này có khả năng gắn kết với mảnh Fc globulin miễn dịch và protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý, cụ thể mỗi nhóm phản ứng này có khả năng gắn kết với nhóm amin của đầu tận cùng N hoặc lysin, hoặc nhóm thiol của xystein của protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý; hoặc mảnh Fc globulin miễn dịch. Nhóm phản ứng ở cả hai đầu được chọn cụ thể từ nhóm bao gồm nhóm aldehyt hoạt động, nhóm propionaldehyt, nhóm butyraldehyt, nhóm maleimit, và dẫn xuất succinimit. Về mặt này, dẫn xuất succinimit có thể là succinimidyl carboxymetyl, succinimidyl valerat, succinimidyl metylbutanoat, succinimidyl metylpropionat, succinimidyl butanoat, succinimidyl propionat, N-hydroxysuccinimit, hoặc succinimidyl cacbonat, nhưng không chỉ giới hạn ở các dẫn xuất này. Nhóm phản ứng bất kỳ có thể được sử dụng mà không bị giới hạn, với điều kiện

nó gắn kết với nhóm amin hoặc nhóm thiol của gốc axit amin của mảnh Fc globulin miễn dịch và protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý.

Cụ thể, khi polyme không peptidyl có nhóm aldehyt hoạt động ở cả hai đầu, thì nó có thể thích hợp để liên kết với protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý và globulin miễn dịch ở cả hai đầu với các phản ứng không đặc hiệu tối thiểu. Thành phẩm tạo ra bằng cách alkyl hóa khử bởi liên kết aldehyt là ổn định hơn nhiều so với khi được liên kết bởi liên kết amit. Nhóm aldehyt hoạt động gắn kết một cách chọn lọc với đầu tận cùng N ở độ pH thấp, và có thể gắn kết với gốc lysin (Lys) để tạo ra liên kết cộng hoá trị ở độ pH cao, ví dụ, ở độ pH bằng 9,0.

Các nhóm phản ứng ở cả hai đầu của liên kết là polyme không peptidyl có thể là tương tự hoặc khác nhau. Ví dụ, liên kết này có thể cùng có nhóm maleimide ở một đầu, và nhóm aldehyt, nhóm propionaldehyt, hoặc nhóm butyl aldehyt ở đầu còn lại. Khi polyetylen glycol có nhóm hydroxyl hoạt động ở cả hai đầu của nó được dùng làm polyme không peptidyl, thì nhóm hydroxyl có thể được hoạt hóa thành các nhóm phản ứng khác nhau bằng các phản ứng hóa học đã biết, hoặc polyetylen glycol đang có trên thị trường có nhóm phản ứng được cải biến có thể được sử dụng để điều chế thể tiếp hợp protein có tác dụng kéo dài theo sáng chế.

Ngoài ra, các nhóm phản ứng của polyme không peptidyl có thể gắn kết lần lượt với nhóm amin có đầu tận cùng N hoặc nhóm amin mạch bên của gốc lysin của protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý và mảnh Fc globulin miễn dịch, nhưng không chỉ giới hạn cụ thể ở các nhóm này. Về mặt này, gốc lysin trên protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý và mảnh Fc globulin miễn dịch không chỉ giới hạn ở vị trí cụ thể, và ví dụ không giới hạn về gốc lysin cũng bao gồm axit amin không có trong tự nhiên và dẫn xuất Lys, với điều kiện chúng có nhóm amin có khả năng gắn kết với nhóm phản ứng của polyme không peptidyl, cũng như lysin có trong tự nhiên.

Đồng thời, khi protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý được cho phản ứng trước tiên với polyme không peptidyl ở bước (1), thì protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý và polyme không peptidyl được cho phản ứng với nhau với tỷ lệ mol nằm trong khoảng từ 1:1 đến 1:20, và ở bước (2), thể tiếp hợp của protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý và polyme không peptidyl là sản phẩm thu được ở bước (1) được cho phản ứng với mảnh Fc globulin miễn dịch với tỷ lệ mol nằm trong khoảng từ 1:0,5 đến 1:10, nhưng không chỉ

giới hạn ở tỷ lệ này.

Ngoài ra, phương pháp theo sáng chế có thể bao gồm quy trình tách và tinh chế thể tiếp hợp polypeptit có hoạt tính sinh lý-polyme không peptidyl hoặc thể tiếp hợp mảnh Fc globulin miễn dịch-polyme không peptidyl là sản phẩm thu được ở bước (1) trước bước (2) sau bước (1). Quy trình này có thể được thực hiện bằng cách sử dụng các phương pháp tách khác nhau, như sắc ký, đã biết trong lĩnh vực này.

Ở bước (2), khi thể tiếp hợp polypeptit có hoạt tính sinh lý-polyme không peptidyl được cho phản ứng với mảnh Fc globulin miễn dịch, thì điều kiện về độ pH, nhưng không chỉ giới hạn cụ thể ở, là độ pH nằm trong khoảng từ 4,0 đến 9,0.

Đồng thời, protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý và mảnh Fc globulin miễn dịch có thể được tiếp hợp với nhau ở dạng protein dung hợp.

Thuật ngữ “protein dung hợp” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ protein được tạo ra thông qua việc nối hai hoặc nhiều gen được mã hóa trước tiên với các protein riêng rẽ. Protein dung hợp có thể được điều chế nhân tạo bằng kỹ thuật tái tổ hợp ADN. Ngoài ra, protein dung hợp có thể ở dạng trong đó protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý và mảnh Fc globulin miễn dịch được liên kết với nhau không qua liên kết hoặc qua gốc liên kết peptidyl.

Thuật ngữ “gốc gốc liên kết peptidyl” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ gốc liên kết peptit hai loại protein cấu thành nên protein dung hợp. Gốc gốc liên kết peptidyl có thể có mặt để gấp nếp độc lập hai protein cấu thành nên protein dung hợp hoặc để duy trì mỗi chức năng của hai protein này ngay khi ở dạng protein dung hợp, nhưng không chỉ giới hạn ở các loại này.

Thuật ngữ “mảnh Fc globulin miễn dịch” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ vùng ổn định của chuỗi nặng 2 (CH2) và vùng ổn định của chuỗi nặng 3 (CH3) của globulin miễn dịch, loại trừ các vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, vùng ổn định của chuỗi nặng 1 (CH1) và vùng ổn định của chuỗi nhẹ 1 (CL1) của globulin miễn dịch, và nó có thể bao gồm vùng bản lề ở vùng ổn định của chuỗi nặng. Ngoài ra, mảnh Fc globulin miễn dịch theo sáng chế có thể là mảnh Fc kéo dài của globulin miễn dịch bao gồm một phần hoặc toàn bộ vùng ổn định của chuỗi nặng 1 (CH1) và/hoặc vùng ổn định của chuỗi nhẹ 1 (CL1), ngoại trừ các vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của

globulin miễn dịch, với điều kiện nó có hiệu quả về cơ bản là tương tự với hoặc tốt hơn so với protein tự nhiên. Ngoài ra, nó có thể là vùng có đoạn khuyết ở vị trí tương đối dài của trình tự axit amin của CH2 và/hoặc CH3. Tức là, mảnh Fc globulin miễn dịch theo sáng chế có thể bao gồm (1) miền CH1, miền CH2, miền CH3 và miền CH4, (2) miền CH1 và miền CH2, (3) miền CH1 và miền CH3, (4) miền CH2 và miền CH3, (5) hỗn hợp của một hoặc nhiều miền của vùng ổn định và vùng bản lề của globulin miễn dịch (hoặc một phần của vùng bản lề), và (6) dime của mỗi miền của vùng ổn định của chuỗi nặng và vùng ổn định của chuỗi nhẹ.

Đối với các mục đích của sáng chế, mảnh Fc globulin miễn dịch được sử dụng trong bản mô tả để chỉ chất có tác dụng làm tăng độ hòa tan của dược chất gắn kết vào đó, tức là protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý, và nó cũng có thể dùng để chỉ chất mang dược chất.

Thuật ngữ “chất mang” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ chất gắn kết với cùng với một dược chất. Nói chung, chất mang gắn kết với dược chất để làm tăng hoặc loại trừ hoạt tính sinh lý của dược chất. Tuy nhiên, đối với mục đích của sáng chế, chất mang theo sáng chế được sử dụng trong bản mô tả để chỉ chất làm giảm tối thiểu mức giảm hoạt tính sinh lý của dược chất và làm tăng độ ổn định *in vivo* của dược chất và thời gian tác dụng bằng cách làm chậm quá trình phân phối dược chất từ vị trí dùng tới máu khi dùng dưới da, và đồng thời cũng làm cải thiện độ hòa tan của protein hoặc peptit. Đối với chất mang dược chất, các chất khác nhau như lipid, polyme, v.v. đã được nghiên cứu, nhưng sáng chế đề cập đến mảnh Fc globulin miễn dịch làm chất mang để cải thiện thời gian *in vivo* của dược chất tới chất mang được liên kết vào, làm giảm tối thiểu mức giảm hoạt tính *in vivo*, và cũng làm tăng tối đa độ hòa tan. Ngoài ra, mảnh Fc globulin miễn dịch là polypeptit có thể phân hủy sinh học mà có thể được chuyển hoá *in vivo*, sao cho nó có thể được sử dụng an toàn làm chất mang dược chất. Do đặc điểm, thể tiếp hợp trong đó mảnh Fc globulin miễn dịch được liên kết với protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý có thể được thiết kế làm thể tiếp hợp có tác dụng kéo dài theo sáng chế.

Ngoài ra, mảnh Fc globulin miễn dịch dùng để cải thiện độ hòa tan của protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý theo sáng chế có thể được liên kết với protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý qua liên kết hoặc trực tiếp. Về mặt này, vị trí của protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý mà mảnh Fc globulin miễn dịch được liên kết với là không bị giới hạn

cụ thể, và vị trí bất kỳ trong protein hoặc peptit hoặc ở đầu tận cùng N hoặc đầu tận cùng C có thể có mặt. Tuy nhiên, để thể tiếp hợp của protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý và mảnh Fc globulin miễn dịch được điều chế bằng phương pháp theo sáng chế có hoạt tính sinh lý khi được dùng cho người, thì tốt hơn nếu vị trí không ức chế hoạt tính sinh lý được chọn theo loại protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý cần dùng, nhưng không chỉ giới hạn ở các loại này.

Ngoài ra, mảnh Fc globulin miễn dịch hơn trong quá trình sản xuất, tinh chế, và hiệu suất của thể tiếp hợp là có lợi so với toàn bộ phân tử globulin miễn dịch, do phân tử lượng của nó tương đối nhỏ. Ngoài ra, do nó không có Fab, mà không có tính đồng nhất cao do sự khác nhau về trình tự axit amin ở kháng thể này so với kháng thể khác, nên dự định rằng nó làm tăng đáng kể tính đồng nhất và làm giảm khả năng tạo ra tính kháng nguyên trong máu.

Ngoài ra, mảnh Fc globulin miễn dịch theo sáng chế không những bao gồm trình tự axit amin có trong tự nhiên mà còn các dẫn xuất trình tự của nó. Dẫn xuất trình tự axit amin có nghĩa là nó có một hoặc nhiều gốc axit amin khác nhau so với trình tự axit amin kiểu hoang, và nó có thể xuất hiện trong tự nhiên hoặc có thể được tạo ra bằng cách nhân tạo. Mảnh Fc globulin miễn dịch bao gồm các dẫn xuất do sự khuyết, cài xen, thay thế bảo toàn hoặc không bảo toàn, hoặc hỗn hợp của chúng. Việc cài xen thường được thực hiện bằng cách bổ sung trình tự axit amin liên tục có khoảng từ 1 đến 20 axit amin, hoặc có thể được thực hiện với trình tự dài hơn. Đoạn khuyết thường nằm trong khoảng từ 1 đến 30 gốc axit amin. Kỹ thuật điều chế các dẫn xuất trình tự của mảnh Fc globulin miễn dịch được bộc lộ trong Công bố đơn sáng chế quốc tế số WO 97/34631 và WO 96/32478, được đưa vào trong bản mô tả này bằng cách viện dẫn. Việc trao đổi axit amin trong các protein và peptit, thường không làm thay đổi hoạt tính của các phân tử, là đã biết trong lĩnh vực này (H. Neurath, R.L. Hill, *Proteins*, Academic Press, New York, 1979). Các cặp trao đổi thường xuất hiện nhiều nhất là Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Thy/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu, và Asp/Gly, theo cả hai hướng. Ngoài ra, mảnh Fc globulin miễn dịch, nếu muốn, có thể được cải biến bằng cách phosphoryl hoá, sulfat hóa, acrylat hóa, glycosyl hoá, metyl hóa, farnesyl hóa, axetyl hóa, amit hóa, và quá trình tương tự.

Dẫn xuất Fc của globulin miễn dịch nêu trên có thể là dẫn xuất có hoạt tính sinh

học tương đương với hoạt tính của mảnh Fc globulin miễn dịch theo sáng chế, nhưng có độ ổn định về cấu trúc tăng lên của mảnh Fc globulin miễn dịch đối với nhiệt, độ pH, v.v..

Ngoài ra, mảnh Fc globulin miễn dịch có thể thu được từ loại có trong tự nhiên được tách ra từ người hoặc động vật như bò, dê, lợn, chuột nhắt, thỏ, chuột đồng, chuột, chuột lang, v.v., hoặc có thể là dạng tái tổ hợp hoặc các dẫn xuất của nó thu được từ tế bào của động vật chuyển gen hoặc vi sinh vật. Trong bản mô tả này, chúng có thể thu được từ globulin miễn dịch có trong tự nhiên bằng cách phân lập toàn bộ globulin miễn dịch ra khỏi cơ thể người hoặc động vật và xử lý chúng bằng enzym phân giải protein. Papain tiêu globulin miễn dịch có trong tự nhiên thành các vùng Fab và Fc, và việc xử lý pepsin làm sản sinh các mảnh pF'c và F(ab)₂. Các mảnh này có thể được dùng, ví dụ, cho sắc ký loại trừ kích cỡ để phân lập Fc hoặc pF'c. Đặc biệt, mảnh Fc globulin miễn dịch theo sáng chế có thể là mảnh Fc globulin miễn dịch tái tổ hợp có nguồn gốc từ người mà thu được từ vi sinh vật.

Ngoài ra, vùng Fc của globulin miễn dịch theo sáng chế có thể ở dạng có chuỗi đường có trong tự nhiên, chuỗi đường dài hơn so với dạng có trong tự nhiên hoặc chuỗi đường ngắn hơn so với dạng có trong tự nhiên, hoặc có thể là ở dạng được khử glycosyl hóa. Quá trình glycosyl hoá hoặc khử glycosyl hóa tăng hoặc giảm của Fc của globulin miễn dịch có thể thu được bằng các phương pháp thông thường, ví dụ, bằng cách sử dụng phương pháp hóa học, phương pháp enzym, hoặc phương pháp kỹ thuật di truyền bằng cách sử dụng vi sinh vật. Trong bản mô tả này, khi được khử glycosyl hóa, bổ thể (C1q) gắn kết với mảnh Fc globulin miễn dịch bị giảm xuống đáng kể và độc tố tế bào phụ thuộc kháng thể hoặc độc tố tế bào phụ thuộc bổ thể bị giảm hoặc loại bỏ, từ đó không tạo ra được các đáp ứng miễn dịch *in vivo* cần thiết. Trong bản mô tả này, các mảnh Fc globulin miễn dịch được khử glycosyl hóa hoặc không được glycosyl hóa là thích hợp hơn với mục đích của chất mang dược chất.

Thuật ngữ “quá trình khử glycosyl hóa” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ việc loại bỏ enzyme của các gốc đường ra khỏi mảnh Fc globulin miễn dịch, và thuật ngữ “quá trình aglycosyl hóa” có nghĩa là mảnh Fc globulin miễn dịch được tạo ra ở dạng không phải glycosyl hóa bởi sinh vật chưa có nhân điển hình, đặc biệt là *E. coli*.

Đồng thời, mảnh Fc globulin miễn dịch có thể có nguồn gốc từ người hoặc động vật khác bao gồm bò, dê, lợn, chuột nhắt, thỏ, chuột đồng, chuột, và chuột lang, và tốt

hơn là người. Ngoài ra, mảnh Fc globulin miễn dịch có thể là mảnh Fc có nguồn gốc từ IgG, IgA, IgD, IgE, và IgM, hoặc được tạo ra bằng cách kết hợp chúng hoặc các dạng lai của chúng. Cụ thể, nó có nguồn gốc từ IgG hoặc IgM, thuộc các loại protein dư thừa nhất trong máu người, và cụ thể nhất là từ IgG, là đã biết để tăng cường thời gian bán thải của protein gắn kết phôi tử.

Đồng thời, thuật ngữ “hỗn hợp” có nghĩa là polypeptit mã hóa mảnh Fc chuỗi đơn của globulin miễn dịch có cùng nguồn gốc được liên kết với polypeptit chuỗi đơn có nguồn gốc khác nhau để tạo ra dime hoặc multime. Tức là dime hoặc multime có thể được tạo ra từ hai hoặc nhiều mảnh được chọn từ nhóm bao gồm các mảnh IgG Fc, IgA Fc, IgM Fc, IgD Fc, và IgE Fc.

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

Đồng thời, IgG được chia thành các phân lớp IgG1, IgG2, IgG3, và IgG4, và sáng chế bao gồm hỗn hợp và các dạng lai của chúng. Tốt hơn nếu chúng là các phân lớp IgG2 và IgG4, và tốt nhất là mảnh Fc của IgG4 hiếm gặp có chức năng tác động như độc tố tế bào phụ thuộc bổ thể (CDC).

Mảnh Fc globulin miễn dịch theo sáng chế có thể ở dạng tái tổ hợp trong đó vùng bản lề được liên kết với đầu tận cùng N của nó. Trong trường hợp này, mảnh Fc globulin miễn dịch được biểu hiện ở các kết tụ không làm mất hoạt tính. Ngoài ra, có các mảnh Fc ở dạng dime hoặc monome hoạt tính không có gốc methionin khởi đầu được mã hóa bởi codon khởi đầu, do đó, có lợi trong việc hoà tan và gấp nếp lại.

Mảnh Fc globulin miễn dịch thích hợp theo sáng chế được mô tả chi tiết trong các Patent Hàn Quốc số 755315, 775343, và 824505, được đưa vào trong bản mô tả này bằng cách viện dẫn.

Tức là mảnh Fc globulin miễn dịch được ưu tiên nhất được dùng làm chất mang được chất cho protein dung hợp với insulin và oxyntomodulin theo sáng chế là vùng Fc

không được glycosyl hóa có nguồn gốc từ IgG4 của người. Mảnh Fc có nguồn gốc từ người được ưu tiên hơn so với mảnh Fc có nguồn gốc không phải từ người, có thể có tác dụng làm kháng nguyên ở người và tạo ra các đáp ứng miễn dịch không mong muốn như sản sinh kháng thể mới kháng kháng nguyên.

Thuật ngữ “protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ protein hoặc peptit điều hòa sự biểu hiện gen hoặc chức năng sinh lý. Đối với các mục đích của sáng chế, protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý bất kỳ có thể bao gồm nhưng không bị giới hạn, với điều kiện nó làm tăng độ hòa tan.

Đồng thời, axit amin nêu trong bản mô tả này được viết tắt theo quy tắc đặt tên của IUPAC-IUB như sau:

Alanin: Ala hoặc A	Arginin: Arg hoặc R
Asparagin: Asn hoặc N	Axit aspartic: Asp hoặc D
Xystein: Cys hoặc C	Axit glutamic: Glu hoặc E
Glutamin: Gln hoặc Q	Glyxin: Gly hoặc G
Histidin: His hoặc H	Isoleuxin: Ile hoặc I
Leuxin: Leu hoặc L	Lysin: Lys hoặc K
Methionin: Met hoặc M	Phenylalanin: Phe hoặc F
Prolin: Pro hoặc P	Serin: Ser hoặc S
Threonin: Thr hoặc T	Tryptophan: Trp hoặc W
Tyrosin: Tyr hoặc Y	Valin: Val hoặc V

Ngoài ra, trong bản mô tả này, một- và ba chữ cái có thể được sử dụng cho axit amin.

Ngoài ra, protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý là khái niệm bao hàm toàn bộ các dẫn xuất, biến thể, và đoạn của chúng, ngoài protein tự nhiên hoặc peptit có hoạt tính sinh lý.

Thuật ngữ “dẫn xuất” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ peptit có đoạn thể hóa học (ví dụ, alpha-metyl hóa, alpha-hydroxyl hóa), đoạn khuyết (ví dụ, khử amin hóa), hoặc đoạn cải biến (ví dụ, N-metyl hóa) của một số nhóm của gốc axit amin trong trình tự axit amin của protein tự nhiên hoặc peptit có hoạt tính sinh lý. Dẫn xuất có thể bao gồm chất tương tự peptit vẫn giữ được hoạt tính của peptit có hoạt tính sinh học có trong tự nhiên mà không có tính tương đồng trình tự với peptit có hoạt tính sinh học có trong tự nhiên.

Thuật ngữ “chất tương tự peptit” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ chuỗi tương tự protein được thiết kế để tương tự với peptit. Chất tương tự peptit có thể được lấy làm

ví dụ bởi chất tương tự D-peptit chứa D-axit amin, nhưng không chỉ giới hạn ở loại này. Chất tương tự peptit có thể được điều chế dễ dàng bằng cách sử dụng kỹ thuật điều chế các chất tương tự peptit đã biết trong lĩnh vực này.

Thuật ngữ “đoạn biến đổi” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ protein hoặc peptit có một hoặc nhiều trình tự axit amin khác so với trình tự axit amin của protein tự nhiên hoặc peptit, và được sử dụng trong bản mô tả để chỉ peptit vẫn có hoạt tính của protein tự nhiên. Đoạn biến đổi có thể được tạo ra bằng cách bất kỳ một trong số các cách thể, bổ sung, khuyết, và cải biến hoặc bằng cách cách kết hợp của chúng trong một phần của trình tự axit amin của protein tự nhiên hoặc peptit. Trong bản mô tả này, axit amin được bổ sung có thể là axit amin không xuất hiện trong tự nhiên (ví dụ, axit amin loại D).

Thuật ngữ “mảnh” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ mảnh có một hoặc nhiều axit amin bị khuyết ở đầu tận cùng N hoặc đầu tận cùng C của protein hoặc peptit tự nhiên, và tốt hơn, nếu mảnh có hoạt tính của protein tự nhiên.

Protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý có thể được tạo ra bằng phương pháp bất kỳ có nguồn gốc từ tự nhiên hoặc tái tổ hợp, và ví dụ, nó có thể là protein tái tổ hợp được điều chế bằng cách sử dụng tế bào không có nhân điển hình như *E. coli* làm tế bào chủ, nhưng không chỉ giới hạn ở các loại này.

Đồng thời, protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý có thể là oxyntomodulin, exendin-4, peptit tương tự glucagon 1, GLP-2, các peptit kích thích tiết insulin như peptit kích thích tiết insulin phụ thuộc glucoza (GIP), insulin, glucagon, hormon tuyến cận giáp, hoặc calcitonin, nhưng không chỉ giới hạn ở các loại này. Như được mô tả trên đây, protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý là khái niệm bao gồm toàn bộ các dẫn xuất, biến thể, và đoạn của chúng, ngoài protein tự nhiên hoặc peptit có hoạt tính sinh lý.

Thuật ngữ “insulin” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ peptit được tiết bởi tụy đáp ứng với nồng độ glucoza tăng cao trong máu để hấp thụ glucoza trong gan, cơ, hoặc mô mỡ và quay lại thành glycogen, và để ngừng sử dụng chất béo làm nguồn năng lượng, và từ đó kiểm soát nồng độ glucoza trong máu. Peptit này bao gồm insulin tự nhiên, insulin cơ bản, chất chủ vận insulin, tiền chất, dẫn xuất, đoạn của chúng, và dạng biến đổi của chúng.

Thuật ngữ “insulin tự nhiên” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ hormon được

tiết bởi tụy để thúc đẩy khả năng hấp thu glucoza và ức chế quá trình phân hủy chất béo, và từ đó có tác dụng kiểm soát nồng độ glucoza trong máu. Insulin được tạo ra từ tiền chất không có tác dụng điều hòa nồng độ glucoza trong máu, được biết là proinsulin, bằng cách xử lý. Trình tự axit amin của insulin là như sau:

Chuỗi A:

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

Chuỗi B:

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

Thuật ngữ “insulin cơ bản” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ peptit điều khiển nồng độ glucoza trong máu hằng ngày ở mức bình thường, ví dụ, levemir, lantus, deglude, v.v.

Thuật ngữ “chất chủ vận insulin” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ hợp chất gắn kết với thụ thể insulin để thể hiện hoạt tính sinh học tương đương với hoạt tính của insulin, là không liên quan với cấu trúc của insulin.

Thuật ngữ “đoạn biến đổi insulin” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ peptit có một hoặc nhiều trình tự axit amin khác nhau so với trình tự của insulin tự nhiên, và vẫn giữ được chức năng kiểm soát nồng độ glucoza trong máu trong cơ thể.

Thuật ngữ “dẫn xuất insulin” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ peptit có trình tự axit amin mức độ tương đồng với insulin tự nhiên ít nhất là 80%, mà có thể có một số nhóm trên gốc axit amin được thế, khuyết, hoặc cải biến hóa học, và có chức năng điều hòa nồng độ glucoza trong máu trong cơ thể. Thuật ngữ “mảnh insulin” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ mảnh có một hoặc nhiều axit amin bị khuyết ở đầu tận cùng N hoặc đầu tận cùng C của insulin và có chức năng điều hòa nồng độ glucoza trong máu trong cơ thể.

Mỗi phương pháp điều chế chất chủ vận, dẫn xuất, mảnh, và biến thể của insulin có thể được sử dụng riêng biệt hoặc ở dạng kết hợp. Ví dụ, sáng chế bao gồm peptit có một hoặc nhiều axit amin khác nhau so với các axit amin của peptit tự nhiên và khử amin

hóa gốc axit amin có đầu tận cùng N, và có chức năng điều hòa nồng độ glucoza trong máu trong cơ thể. Insulin được sử dụng trong sáng chế có thể được sản sinh bởi kỹ thuật tái tổ hợp, và cũng có thể được tổng hợp sử dụng phương pháp tổng hợp pha rắn.

Ngoài ra, insulin được sử dụng trong sáng chế có thể được liên kết với polyme không peptidyl. Polyme không peptidyl này có thể được sử dụng làm liên kết theo sáng chế. Polyme không peptidyl được dùng làm liên kết để liên kết mảnh Fc globulin miễn dịch, nhờ đó duy trì hoạt tính của insulin và cải thiện được độ hòa tan, và cũng cải thiện được độ ổn định. Có thể dùng liên kết peptit bằng cách sử dụng kỹ thuật tái tổ hợp di truyền.

Ngoài ra, sáng chế được khác biệt ở chỗ protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý được tiếp hợp với mảnh Fc globulin miễn dịch để cải thiện độ hòa tan của protein hoặc peptit. Không có giới hạn cụ thể về vị trí gắn kết. Tuy nhiên, việc cải biến chuỗi A của insulin có thể làm giảm hoạt tính và độ ổn định, do đó, mảnh Fc globulin miễn dịch có thể được liên kết với chuỗi B qua liên kết hoặc không qua liên kết. Cụ thể, mảnh Fc globulin miễn dịch có thể được liên kết với đầu tận cùng N của chuỗi B của insulin thông qua gốc liên kết không peptidyl hoặc không phải gốc liên kết không peptidyl, nhưng là không bị giới hạn cụ thể loại liên kết này.

Thuật ngữ “oxyntomodulin” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ peptit có nguồn gốc từ tiền chất glucagon, pre-glucagon, và bao gồm oxyntomodulin có trong tự nhiên, tiền chất, dẫn xuất, mảnh, và các dạng biến đổi của nó.

Đặc biệt, oxyntomodulin có trình tự axit amin là HSQGTFTSDYSKYLDNRRAQDFVQWLMNTRNRNNIA (SEQ ID NO.3).

Dẫn xuất oxyntomodulin bao gồm peptit, dẫn xuất peptit, hoặc chất tương tự peptit được điều chế bằng cách bổ sung, khuyết, hoặc thế một phần axit amin của trình tự oxyntomodulin để hoạt hóa cả thụ thể GLP-1 lẫn thụ thể glucagon ở mức cao hơn so với oxyntomodulin có trong tự nhiên. Theo sáng chế, dẫn xuất oxyntomodulin có thể có trình tự axit amin bất kỳ nêu trong SEQ ID NO.4 đến 36.

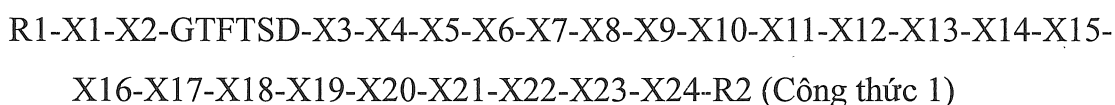
Ngoài ra, mảnh oxyntomodulin duy trì được chức năng kiểm soát nồng độ glucoza trong máu trong cơ thể.

Ngoài ra, dạng biến đổi oxyntomodulin là peptit có một hoặc nhiều gốc axit amin

khác so với trình tự axit amin của oxyntomodulin có trong tự nhiên và có chức năng hoạt hóa thụ thể GLP-1 và glucagon. Các phương pháp tạo ra dạng biến đổi oxyntomodulin, dẫn xuất, và mảnh có thể được sử dụng riêng lẻ hoặc kết hợp. Ví dụ, sáng chế bao gồm peptit có một hoặc nhiều axit amin khác so với peptit tự nhiên và quá trình khử amin hóa gốc axit amin có đầu tận cùng N, và có chức năng hoạt hóa cả thụ thể GLP-1 lẫn thụ thể glucagon.

Theo sáng chế, dẫn xuất oxyntomodulin bao hàm peptit bất kỳ được tạo ra bằng cách thế, bổ sung, khuyết, hoặc cải biến sau dịch mã (ví dụ, metyl hóa, axyl hóa, ubiquitin hóa, liên kết cộng hóa trị nội phân tử) trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO.3 để hoạt hóa đồng thời các thụ thể glucagon và GLP-1. Trong quá trình thế hoặc bổ sung axit amin, axit amin bất kỳ trong số 20 axit amin thường tìm thấy ở các protein của người, cũng như axit amin không điển hình hoặc axit amin không xuất hiện trong tự nhiên, có thể được sử dụng. Các nguồn axit amin không điển hình thương mại bao gồm Sigma-Aldrich, ChemPep Inc., và Genzyme Pharmaceuticals. Các peptit bao gồm các axit amin này và các trình tự peptit không điển hình có thể được tổng hợp và được mua từ các nhà cung cấp thương mại, ví dụ, American Peptide Company (Mỹ), Bachem (Mỹ), hoặc Anygen (Hàn Quốc).

Theo một phương án cụ thể, dẫn xuất oxyntomodulin theo sáng chế là peptit mới bao gồm trình tự axit amin có công thức sau 1:



trong đó R1 là histidin, desamino-histidyl, dimetyl-histidyl (N-dimetyl-histidyl), beta-hydroxyimidazopropionyl, 4-imidazoaxetyl, beta-carboxyimidazopropionyl, hoặc tyrosin;

X1 là AIB (axit aminoisobutyric), D-alanin, glyxin, Sar (N-metyl glyxin), serin, hoặc D-serin;

X2 là axit glutamic hoặc glutamin;

X3 là leuxin hoặc tyrosin;

X4 là serin hoặc alanin;

X5 là lysin hoặc arginin;

X6 là glutamin hoặc tyrosin;

X7 là leuxin hoặc methionin;

X8 là axit aspartic hoặc axit glutamic;

X9 là axit glutamic, serin, axit alpha-metyl-glutamic, hoặc bị khuyết;

X10 là glutamin, axit glutamic, lysin, arginin, serin, hoặc bị khuyết;

X11 là alanin, arginin, valin, hoặc bị khuyết;

X12 là alanin, arginin, serin, valin, hoặc bị khuyết;

X13 là lysin, glutamin, arginin, axit alpha-metyl-glutamic, hoặc bị khuyết;

X14 là axit aspartic, axit glutamic, leuxin, hoặc bị khuyết;

X15 là phenylalanin hoặc bị khuyết;

X16 là isoleuxin, valin, hoặc bị khuyết;

X17 là alanin, xystein, axit glutamic, lysin, glutamin, axit alpha-metyl-glutamic, hoặc bị khuyết;

X18 là tryptophan hoặc bị khuyết;

X19 là alanin, isoleuxin, leuxin, serin, valin, hoặc bị khuyết;

X20 là alanin, lysin, methionin, glutamin, arginin, hoặc bị khuyết;

X21 là asparagin hoặc bị khuyết;

X22 là alanin, glyxin, threonin, hoặc bị khuyết;

X23 là xystein, lysin, hoặc bị khuyết;

X24 là peptit có 2 đến 10 axit amin cấu thành từ hỗn hợp bao gồm alanin, glyxin, và serin, hoặc bị khuyết; và

R2 là KRNRNNIA (SEQ ID NO.37), GPSSGAPPPS (SEQ ID NO.38), GPSSGAPPPSK (SEQ ID NO.39), HSQGTFTSDYSKYLD (SEQ ID NO.40), HSQGTFTSDYSRYLDK (SEQ ID NO.41), HEGTFTSDLSKQMEEEAVK (SEQ ID NO.42), hoặc bị khuyết (ngoại trừ nếu trình tự axit amin có công thức 1 là tương tự với

trình tự như nêu trong SEQ ID NO.3).

Để tăng cường hoạt tính của oxyntomodulin kiểu hoang đối với thụ thể glucagon và thụ thể GLP-1, dẫn xuất oxyntomodulin theo sáng chế có thể được thế bằng 4-imidazoaxetyl trong đó alpha-cacbon của histidin ở vị trí 1 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO.3 bị khuyết, desamino-histidyl trong đó nhóm amin có đầu tận cùng No bị khuyết, dimethyl-histidyl (N-dimethyl-histidyl) trong đó nhóm amin có đầu tận cùng No được cải biến bằng hai nhóm methyl, beta-hydroxyimidazopropionyl trong đó nhóm amin có đầu tận cùng N được thế bằng nhóm hydroxyl, hoặc beta-carboxyimidazopropionyl trong đó nhóm amin có đầu tận cùng N được thế bằng nhóm carboxyl. Ngoài ra, vùng gắn kết với thụ thể GLP-1 có thể được thế bằng axit amin mà tăng cường liên kết kỵ nước và liên kết ion hoặc hỗn hợp của chúng. Một phần trình tự oxyntomodulin có thể được thế bằng trình tự axit amin của GLP-1 hoặc exendin-4 để tăng cường hoạt tính trên thụ thể GLP-1.

Ngoài ra, một phần trình tự oxyntomodulin có thể được thế bằng trình tự ổn định dạng xoáy alpha. Ví dụ, axit amin ở các vị trí 10, 14, 16, 20, 24, và 28 của trình tự axit amin có công thức 1 có thể được thế bằng axit amin cấu thành từ Tyr(4-Me), Phe, Phe(4-Me), Phe(4-Cl), Phe(4-CN), Phe(4-NO₂), Phe(4-NH₂), Phg, Pal, Nal, Ala(2-thienyl), và Ala(benzothienyl) là đã biết để ổn định dạng xoáy alpha, hoặc dẫn xuất axit amin.

Trong bản mô tả này, Tyr(4-Me) là dẫn xuất tyrosin trong đó hydro của nhóm hydroxyl của tyrosin được thế bằng nhóm methyl; Phe(4-Me) là dẫn xuất phenylalanin trong đó vị trí para của phenylalanin được thế bằng nhóm methyl; Phe(4-Cl) là dẫn xuất phenylalanin trong đó vị trí para của nhóm phenyl được thế bằng clorua; Phe(4-CN) là dẫn xuất phenylalanin trong đó vị trí para của nhóm phenyl được thế bằng nhóm xyanua; Phe(4-NO₂) là dẫn xuất phenylalanin trong đó vị trí para của nhóm phenyl được thế bằng nhóm nitro; và Phe(4-NH₂) là dẫn xuất phenylalanin trong đó vị trí para của nhóm phenyl được thế bằng nhóm amin.

Ngoài ra, Phg là phenylglyxin; Pal là dẫn xuất alanin trong đó nhóm beta-methyl của alanin được thế bằng nhóm pyridyl; Nal là dẫn xuất alanin trong đó nhóm beta-methyl của alanin được thế bằng nhóm naphthyl; Ala(2-thienyl) là dẫn xuất alanin trong đó nhóm beta-methyl của alanin được thế bằng nhóm 2-thienyl; và Ala(benzothienyl) là dẫn xuất alanin trong đó nhóm beta-methyl của alanin được thế bằng nhóm benzo-thienyl.

Không có giới hạn về loại và số lượng axit amin hoặc dẫn xuất axit amin được ổn định bởi dạng xoắn alpha cần được chèn vào. Theo một phương án cụ thể, các vòng nội phân tử có thể được tạo ra giữa gốc axit amin. Ví dụ, các vòng nội phân tử này có thể được tạo ra ở các vị trí 10 và 14, 12 và 16, 16 và 20, 20 và 24, và 24 và 28, và trong trường hợp này, các vị trí tương ứng có thể được thay thế bằng cặp axit glutamic và lysin. Không có giới hạn cụ thể về số lượng vòng nội phân tử được tạo ra trong dẫn xuất oxyntomodulin, mà độ hòa tan của nó có thể được cải thiện bởi phương pháp theo sáng chế.

Theo một phương án, oxyntomodulin, mà độ hòa tan của nó được cải thiện bởi phương pháp theo sáng chế, hoặc dẫn xuất của nó có thể là dẫn xuất oxyntomodulin có trình tự axit amin được chọn từ các công thức từ 2 đến 6 dưới đây. Theo một phương án cụ thể, dẫn xuất oxyntomodulin theo sáng chế là peptit có trình tự axit amin có công thức 2 dưới đây, trong đó trình tự axit amin của oxyntomodulin được thế bằng trình tự của exendin hoặc GLP-1:

R1-A'-R3 (Công thức 2)

Theo phương án cụ thể khác, dẫn xuất oxyntomodulin theo sáng chế là peptit có trình tự axit amin có công thức 3 dưới đây, trong đó một phần trình tự axit amin của oxyntomodulin được liên kết với trình tự của exendin hoặc GLP-1 bằng cách sử dụng liên kết axit amin thích hợp:

R1-B'-C'-R4 (Công thức 3)

Theo phương án cụ thể khác, dẫn xuất oxyntomodulin theo sáng chế là peptit trong đó một phần trình tự axit amin của oxyntomodulin được thế bằng axit amin có khả năng tăng cường ái lực gắn kết với thụ thể GLP-1. Ví dụ, Leu ở vị trí 26, mà gắn kết với thụ thể GLP-1 bằng tương tác kỵ nước, được thế bằng gốc kỵ nước, Ile hoặc Val, từ đó tăng cường ái lực gắn kết với thụ thể GLP-1. Cụ thể hơn, công thức 4 dưới đây là peptit bao gồm peptit oxyntomodulin có ái lực gắn kết với thụ thể được cải thiện (D6 được thế):

R1-SQGTFTSDYSKYLD-D1-D2-D3-D4-D5-LFVQW-D6-D7-N-D8-R3 (Công thức 4)

Theo phương án cụ thể khác, dẫn xuất oxyntomodulin theo sáng chế là peptit bao gồm công thức 5 dưới đây, trong đó một phần trình tự axit amin bị khuyết, bổ sung, hoặc

được thế bằng axit amin khác để tăng cường hoạt tính của oxyntomodulin có trong tự nhiên trên thụ thể GLP-1 và thụ thể glucagon:

R1-E1-QGTFTSDYSKYLD-E2-E3-RA-E4-E5-Fv-E6-WLMNT-E7-R5 (Công thức 5)

Trong Công thức 2 đến 5, R1 là tương tự như trong bản mô tả có công thức 1;

A' được chọn từ nhóm bao gồm SQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNT (SEQ ID NO.43), SQGTFTSDYSKYLDDEEAVRLFIEWLMNT (SEQ ID NO.44), SQGTFTSDYSKYLDERRAQDFVAWLKNT (SEQ ID NO.45), GQGTFTSDYSRYLEEEAVRLFIEWLKNG (SEQ ID NO.46), GQGTFTSDYSRQMEEEEAVRLFIEWLKNG (SEQ ID NO.47), GEGTFTSDLSRQMEEEEAVRLFIEWAA (SEQ ID NO.48), và SQGTFTSDYSRQMEEEEAVRLFIEWLMNG (SEQ ID NO.49);

B' được chọn từ nhóm bao gồm SQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNT (SEQ ID NO.43), SQGTFTSDYSKYLDDEEAVRLFIEWLMNT (SEQ ID NO.44), SQGTFTSDYSKYLDERRAQDFVAWLKNT (SEQ ID NO.45), GQGTFTSDYSRYLEEEAVRLFIEWLKNG (SEQ ID NO.46), GQGTFTSDYSRQMEEEEAVRLFIEWLKNG (SEQ ID NO.47), GEGTFTSDLSRQMEEEEAVRLFIEWAA (SEQ ID NO.48), SQGTFTSDYSRQMEEEEAVRLFIEWLMNG (SEQ ID NO.49), GEGTFTSDLSRQMEEEEAVRLFIEW (SEQ ID NO.50), và SQGTFTSDYSRYLD (SEQ ID NO.51);

C' là peptit có 2 đến 10 axit amin cấu thành từ hỗn hợp bao gồm alanin, glyxin, và serin;

D1 là serin, axit glutamic, hoặc arginin;

D2 là arginin, axit glutamic, hoặc serin;

D3 là arginin, alanin, hoặc Valin;

D4 là arginin, valin, hoặc serin;

D5 là glutamin, arginin, hoặc lysin;

D6 là isoleuxin, valin, hoặc serin;

D7 là methionin, arginin, hoặc glutamin;

D8 là threonin, glyxin, hoặc alanin;

E1 là serin, AIB, Sar, D-alanin, hoặc D-serin;

E2 là serin hoặc axit glutamic;

E3 là arginin hoặc lysin;

E4 là glutamin hoặc lysin;

E5 là axit aspartic hoặc axit glutamic;

E6 là glutamin, xystein, hoặc lysin;

E7 là xystein, lysin, hoặc bị khuyết;

R3 là KRNRNNIA (SEQ ID NO.37), GPSSGAPPPS (SEQ ID NO.38), hoặc GPSSGAPPPSK (SEQ ID NO.39);

R4 là HSQGTFTSDYSKYLD (SEQ ID NO.40), HSQGTFTSDYSRYLDK (SEQ ID NO.41), hoặc HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVK (SEQ ID NO.42); và

R5 là KRNRNNIA (SEQ ID NO.37), GPSSGAPPPS (SEQ ID NO.38), GPSSGAPPPSK (SEQ ID NO.39), hoặc bị khuyết (ngoại trừ nếu trình tự axit amin có công thức 2 đến 5 là tương tự với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.3).

Đặc biệt, dẫn xuất oxyntomodulin theo sáng chế có thể là peptit có công thức sau 6:

R1-X1-X2-GTFTSD-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13-X14-X15-X16-X17-X18-X19-X20-X21-X22-X23-X24-R2 (Công thức 6)

trong đó R1 là histidin, desamino-histidyl, 4-imidazoaxetyl, hoặc tyrosin;

X1 là AIB (axit aminoisobutyric), glyxin, serin, hoặc D-serin;

X2 là axit glutamic hoặc glutamin;

X3 là leuxin hoặc tyrosin;

X4 là serin hoặc alanin;

X5 là lysin hoặc arginin;

X6 là glutamin hoặc tyrosin;

X7 là leuxin hoặc methionin;

X8 là axit aspartic hoặc axit glutamic;

X9 là axit glutamic, axit alpha-metyl-glutamic, hoặc bị khuyết;

X10 là glutamin, axit glutamic, lysin, arginin, hoặc bị khuyết;

X11 là alanin, arginin, hoặc bị khuyết;

X12 là alanin, valin, hoặc bị khuyết;

X13 là lysin, glutamin, arginin, axit alpha-metyl-glutamic, hoặc bị khuyết;

X14 là axit aspartic, axit glutamic, leuxin, hoặc bị khuyết;

X15 là phenylalanin hoặc bị khuyết;

X16 là isoleuxin, valin, hoặc bị khuyết;

X17 là alanin, xystein, axit glutamic, glutamin , axit alpha-metyl-glutamic, hoặc bị khuyết;

X18 là tryptophan hoặc bị khuyết;

X19 là alanin, isoleuxin, leuxin, valin, hoặc bị khuyết;

X20 là alanin, lysin, methionin, arginin, hoặc bị khuyết;

X21 là asparagin hoặc bị khuyết;

X22 là threonin hoặc bị khuyết;

X23 là xystein, lysin, hoặc bị khuyết;

X24 là peptit có 2 đến 10 axit amin cấu thành từ glyxin hoặc bị khuyết; và R2 là KRNRNNIA (SEQ ID NO.37), GPSSGAPPPS (SEQ ID NO.38), GPSSGAPPPSK (SEQ ID NO.39), HSQGTFTSDYSKYLD (SEQ ID NO.40), HSQGTFTSDYSRYLDK (SEQ ID NO.41), HGEGTFTSDLSKQMEEEAVK (SEQ ID NO.42), hoặc bị khuyết (ngoại trừ nếu trình tự axit amin có công thức 6 là tương tự với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.3).

Cụ thể hơn, dẫn xuất oxyntomodulin theo sáng chế có thể được chọn từ nhóm bao

gồm các peptit nêu trong SEQ ID NO.4 đến 36.

Oxyntomodulin có hoạt tính của hai peptit, GLP-1 và glucagon. GLP-1 làm giảm nồng độ glucoza trong máu, làm giảm hấp thu thức ăn, và kìm hãm quá trình rỗng dạ dày, trong khi đó glucagon làm tăng nồng độ glucoza máu, tạo điều kiện thuận lợi quá trình phân giải lipid, và làm giảm thể trọng bằng cách làm tăng quá trình chuyển hóa năng lượng. Nếu hai peptit này có tác dụng sinh học khác nhau có mặt trong một peptit và một trong số các peptit này có tác dụng vượt trội hơn so với peptit khác, thì có thể xuất hiện các tác dụng không mong muốn. Nếu glucagon có tác dụng vượt trội hơn so với GLP-1, thì nồng độ glucoza trong máu có thể được gia tăng. Nếu GLP-1 có tác dụng vượt trội hơn so với glucagon, thì các tác dụng phụ như buồn nôn và nôn có thể xảy ra. Hiệu quả toàn phần có thể khác nhau tùy thuộc vào tỷ lệ hoạt tính của hai peptit này.

Thuật ngữ “peptit kích thích tiết insulin” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ peptit có chức năng kích thích tiết insulin, và peptit kích thích tiết insulin thúc đẩy quá trình tổng hợp và biểu hiện insulin ở tế bào beta của tụy. Peptit kích thích tiết insulin có thể được lấy làm ví dụ là peptit tương tự glucagon 1, peptit tương tự glucagon 2, exendin-3, exendin-4, imidazoaxetyl (CA) exendin-4, hoặc peptit kích thích tiết insulin phụ thuộc glucoza (GIP), nhưng không chỉ giới hạn ở các loại này, với điều kiện nó có chức năng kích thích tiết insulin. Peptit kích thích tiết insulin được sử dụng trong sáng chế bao gồm toàn bộ các dẫn xuất, các dạng biến đổi, và đoạn của chúng, ngoài peptit tiết insulin tự nhiên. Việc mô tả chung của chúng là tương tự như được mô tả trên đây.

Việc mô tả GLP-1, exendin-3 hoặc exendin-4, và các dẫn xuất của nó được đưa ra trong Công bố đơn Hàn quốc số 10-2012-0137271 (hoặc WO2012-169798) liên quan tới dẫn xuất oxyntomodulin và Công bố đơn Hàn quốc số 10-2009-0008151 (hoặc WO2009-011544) liên quan tới dẫn xuất peptit kích thích tiết insulin, được đưa vào trong bản mô tả này bằng cách viện dẫn, nhưng không chỉ giới hạn ở các loại này.

Thuật ngữ “glucagon” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ hormon peptit làm tăng nồng độ glucoza trong máu. Glucagon có tác dụng thoái biến glycogen thành glucoza trong gan để làm tăng nồng độ glucoza trong máu.

Đồng thời, glucagon có trong tự nhiên có thể có trình tự dưới đây.

His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-

Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr (SEQ ID NO.52)

Ngoài ra, glucagon được sử dụng trong sáng chế bao gồm toàn bộ các dẫn xuất, dạng biến đổi, và đoạn của chúng, ngoài glucagon có trong tự nhiên. Việc mô tả chung của chúng là tương tự như được mô tả trên đây.

Thuật ngữ “hormon tuyến cận giáp” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ hormone được giải phóng bởi các tuyến cận giáp, và có tác dụng làm tăng nồng độ của canxi trong máu. Thông tin về trình tự axit amin của hormone tuyến cận giáp có thể có sẵn từ dữ liệu đã biết như GenBank của Viện Sức khỏe quốc gia Hoa Kỳ (the US National Institute of Health). Hormone tuyến cận giáp bao gồm toàn bộ các dẫn xuất, các dạng biến đổi, và đoạn của chúng, ngoài hormone tuyến cận giáp tự nhiên.

Thuật ngữ “calcitonin” là hormone tuyến giáp điều hòa nồng độ của canxi trong máu, và có chức năng làm giảm nồng độ của canxi trong máu. Thông tin về trình tự axit amin của calcitonin có thể có sẵn từ dữ liệu đã biết như GenBank của Viện Sức khỏe quốc gia Hoa Kỳ. Calcitonin bao gồm toàn bộ các dẫn xuất, dạng biến đổi, và đoạn của chúng, ngoài calcitonin tự nhiên.

Phương pháp theo sáng chế được sử dụng để làm tăng độ hòa tan của protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý hữu hiệu mà không sử dụng chất hoạt động bề mặt. Tuy nhiên, chất hoạt động bề mặt có thể được sử dụng để làm tăng tiếp độ hòa tan.

Tức là, chất hoạt động bề mặt được bổ sung vào dung dịch nước, và thể tiếp hợp có tác dụng kéo dài của protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý và mảnh Fc globulin miễn dịch được bao nang trong các mixen, từ đó làm tăng tiếp độ hòa tan của thể tiếp hợp.

Ngoài ra, theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến chế phẩm cải thiện độ hòa tan của protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý, trong đó chế phẩm này bao gồm mảnh Fc globulin miễn dịch và từ đó có khả năng cải thiện độ hòa tan tốt hơn so với độ hòa tan của chế phẩm không chứa mảnh Fc globulin miễn dịch.

Trong bản mô tả này, chế phẩm chứa thể tiếp hợp của protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý và mảnh Fc globulin miễn dịch trong đó protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý được liên kết với mảnh Fc globulin miễn dịch thông qua liên kết peptit hoặc gốc liên kết không peptidyl làm hoạt chất.

Theo một phương án của sáng chế, cần thử nghiệm xem độ hòa tan của insulin

hoặc oxyntomodulin được gia tăng ở độ pH có tính axit yếu hay không bằng cách tiếp hợp peptit có hoạt tính sinh lý đại diện, insulin, hoặc oxyntomodulin với Fc của globulin miễn dịch. Do đó, dạng được tiếp hợp với mảnh Fc globulin miễn dịch làm tăng đáng kể độ hòa tan của insulin hoặc oxyntomodulin so với dạng không được tiếp hợp (các bảng 2 và 3, Fig.2; và các bảng 5 và 6; Fig.4). Kết quả này gợi ý rằng phương pháp theo sáng chế có thể được sử dụng để cải thiện độ hòa tan của peptit hoặc protein, và cụ thể là cải thiện được đáng kể độ hòa tan của peptit hoặc protein có độ hòa tan rất thấp trong điều kiện axit trung tính hoặc axit yếu, do đó, khó tạo ra được chế phẩm bao gồm nồng độ hữu hiệu có tác dụng dược lý của nó.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn thông qua các ví dụ dưới đây. Tuy nhiên, các ví dụ này chỉ để mục đích minh họa chứ không giới hạn phạm vi của sáng chế.

Ví dụ 1: Đánh giá độ hòa tan của insulin và thể tiếp hợp insulin có tác dụng kéo dài

(1) Điều chế thể tiếp hợp insulin có tác dụng kéo dài

Bột insulin được hoà tan trong HCl 10mM, và sau đó được phản ứng với 3,4 K propion-ALD₂ PEG (PEG có hai nhóm propionaldehyt, NOF, Nhật Bản) ở nhiệt độ 4°C trong khoảng 2 giờ với tỷ lệ mol insulin:PEG là 1:2 và nồng độ insulin là 5mg/mL để PEGyl hóa đầu tận cùng N của chuỗi B của insulin. Phản ứng này được thực hiện trong natri xitrat 50mM (độ pH=5,0) và isopropanol 45%, và 2 mM đến 20 mM natri xyanoborohydrit làm chất khử được bổ sung vào đó. Dung dịch phản ứng được tinh chế bằng cột SP HP (GE Healthcare) bằng cách sử dụng chất đệm chứa natri xitrat (độ pH=3,0) và gradien nồng độ KCl. Để điều chế thể tiếp hợp insulin-PEG-mảnh Fc globulin miễn dịch, insulin được mono-PEGyl hóa và mảnh Fc globulin miễn dịch được phản ứng với tỷ lệ mol khoảng 1:1,2 với nồng độ protein toàn phần bằng 20mg/mL ở nhiệt độ trong phòng trong khoảng 13 giờ. Về mặt này, dung dịch phản ứng là HEPES 100mM và kali phosphat 22mM ở độ pH là 8,2, và natri xyanoborohydrit 20mM là chất khử được bổ sung vào.

Sau khi phản ứng xảy ra hoàn toàn, dung dịch phản ứng trước tiên được cho đi qua cột Q sepharosa HP (GE Healthcare) bằng cách sử dụng chất đệm Tris-HCl (độ pH=7,5)

và gradien nồng độ NaCl, và sau đó cho đi qua cột Source 15 ISO (GE Healthcare) bằng cách sử dụng chất đệm Tris-HCl (độ pH=7,5) và gradien nồng độ amoni sulfat, từ đó cuối cùng tinh chế thể tiếp hợp insulin-PEG-Fc của globulin miễn dịch.

(2) Thử nghiệm độ hòa tan của insulin và thể tiếp hợp insulin có tác dụng kéo dài

Để kiểm tra độ hòa tan của insulin và thể tiếp hợp insulin có tác dụng kéo dài, chất chuẩn và chất thử nghiệm insulin và thể tiếp hợp insulin có tác dụng kéo dài được tạo ra lần lượt theo thành phần như được thể hiện trong bảng 1 dưới đây.

Chất thử nghiệm của insulin và thể tiếp hợp insulin có tác dụng kéo dài có thành phần là dung dịch đệm axit axetic ở độ pH bằng 6,0, dung dịch nước chứa chất hoạt động bề mặt dạng không ion là polysorbat, dung dịch nước chứa rượu đường là manitol, và natri clorua làm chất đẳng trương. Theo các trị số định lượng của các bảng 2 và 3, các chất thử nghiệm được hoà tan ở nhiệt độ trong phòng, chất thử nghiệm insulin hòa tan không hoàn toàn được ly tâm, và chỉ có dịch nổi được thu gom và được sử dụng trong thử nghiệm về độ hòa tan.

Về mặt này, vì trị số định lượng tối đa nằm trong trị số định lượng lý thuyết của chất thử nghiệm insulin, khoảng 10mg/mL được đo, là trị số định lượng thu được bằng cách chuyển đổi 100mg/mL thể tiếp hợp insulin có tác dụng kéo dài thành insulin. Chất thử nghiệm insulin được hòa tan ở trị số định lượng tối đa được pha loãng lần lượt, và mốc (0,008mg/mL) mà tại đó insulin được hoà tan hoàn toàn mà các tạp chất hoặc viên tròn được xác định làm trị số định lượng tối thiểu.

Đường cong hiệu chuẩn tương ứng của insulin và thể tiếp hợp insulin có tác dụng kéo dài trước tiên được xác nhận bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao pha đảo (RP-HPLC), như thể hiện trong Fig.1. Các trị số định lượng của insulin và thể tiếp hợp insulin có tác dụng kéo dài được tính toán bằng cách đặt lần lượt diện tích pic của các chất thử nghiệm insulin và thể tiếp hợp insulin có tác dụng kéo dài được xác nhận bằng sắc ký pha đảo vào đường cong hiệu chuẩn. Các kết quả được thể hiện trong các bảng 2 và 3, và Fig.2.

Bảng 1

Nguyên liệu	Điều kiện hòa tan
Chất chuẩn insulin	Được hòa tan trong HCl, và sau đó được điều chỉnh đến độ pH = 5,0
Chất thử nghiệm insulin	độ pH = 6,0
Chất chuẩn và chất thử nghiệm của thể tiếp hợp insulin có tác dụng kéo dài	độ pH = 6,0

Bảng 2

Insulin	
Trị số định lượng lý thuyết (mg/mL)	Trị số đo được (trị số định lượng được tính toán bằng đường cong hiệu chuẩn) (mg/mL)
0,008	0,000
0,04	0,000
0,2	0,005
1	0,047
5	0,253
10	0,628

Bảng 3

Thể tiếp hợp insulin có tác dụng kéo dài (tính theo insulin)	
Trị số định lượng lý thuyết (mg/mL)	Trị số đo được (trị số định lượng được tính toán bằng đường cong hiệu chuẩn) (mg/mL)
61,1	61,2
89	86,7
110	103,4
146	133,5

Như được thể hiện trong các bảng 2 và 3, trị số định lượng của chất thử nghiệm thể tiếp hợp insulin có tác dụng kéo dài được hòa tan trong dung dịch đệm tạo thể tiếp hợp insulin có tác dụng kéo dài có sự khác biệt rất nhỏ giữa trị số lý thuyết và trị số đo được, trong khi đó trị số định lượng của chất thử nghiệm insulin được hòa tan trong dung dịch đệm tạo thể tiếp hợp insulin có tác dụng kéo dài có sự khác biệt lớn (lên tới khoảng 16 lần) giữa trị số lý thuyết và trị số đo được. Ngoài ra, khi chất thử nghiệm insulin được hoà tan trong dung dịch đệm tạo thể tiếp hợp insulin có tác dụng kéo dài, các viên tròn được quan sát sau khi ly tâm trong toàn bộ các trường hợp, loại trừ 0,008mg/mL.

Như được thể hiện bằng kết quả, độ hòa tan được cải thiện bởi mảnh Fc globulin miễn dịch dùng làm chất mang của thể tiếp hợp insulin có tác dụng kéo dài.

Ví dụ 2: Đánh giá độ hòa tan của oxyntomodulin và thể tiếp hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài

(1) Điều chế thể tiếp hợp dẫn xuất oxyntomodulin có tác dụng kéo dài

Dẫn xuất oxyntomodulin được phản ứng với MAL-10 K-ALD PEG (NOF, Nhật Bản) ở nhiệt độ 4°C trong khoảng 1 giờ với tỷ lệ mol là 1:1 và nồng độ dẫn xuất oxyntomodulin là 3mg/mL để PEGyl hóa MAL-10K-ALD PEG ở gốc xystein ở vị trí 30 của trình tự như nêu trong SEQ ID NO.27, là trình tự axit amin của dẫn xuất oxyntomodulin. Phản ứng này được thực hiện trong 50 mM Tris (độ pH=7,5) và 60% isopropanol. Sau khi phản ứng xảy ra hoàn toàn, dung dịch phản ứng được dùng cho cột SP HP (GE healthcare, Sweden) bằng cách sử dụng chất đệm natri xitrat (độ pH=3,0) và gradien nồng độ KCl để tinh chế dẫn xuất oxyntomodulin được mono-PEGyl hóa ở xystein.

Tiếp theo, dẫn xuất oxyntomodulin được mono-PEGyl hóa được tinh chế theo đó và Fc của globulin miễn dịch được cho phản ứng với nhau với tỷ lệ mol là 1:4 với nồng độ protein toàn phần là 20mg/mL ở nhiệt độ 4°C trong khoảng 16 giờ. Về mặt này, dung dịch phản ứng là kali phosphat 100mM ở độ pH là 6,0, và natri SCB 20mM làm chất khử được bổ sung vào đó. Sau khi phản ứng xảy ra hoàn toàn, dung dịch phản ứng trước tiên được cho đi qua cột Butyl Sepharosa FF (GE Healthcare, Sweden) bằng cách sử dụng chất đệm Bis-Tris và gradien nồng độ NaCl, và sau đó cho đi qua cột Source ISO (GE Healthcare, Sweden) bằng cách sử dụng chất đệm natri xitrat và gradien nồng độ amoni sulfat, nhờ đó cuối cùng tinh chế thể tiếp hợp dẫn xuất oxyntomodulin-PEG-Fc của globulin miễn dịch.

(2) Thử nghiệm độ hòa tan của oxyntomodulin và thể tiếp hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài

Để kiểm tra độ hòa tan của dẫn xuất oxyntomodulin có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.27 và thể tiếp hợp dẫn xuất oxyntomodulin có tác dụng kéo dài, chất chuẩn và chất thử nghiệm của dẫn xuất oxyntomodulin và thể tiếp hợp dẫn xuất oxyntomodulin có tác dụng kéo dài được điều chế lần lượt theo thành phần như được thể hiện trong bảng 4 dưới đây.

Chất thử nghiệm của dẫn xuất oxyntomodulin và thể tiếp hợp dẫn xuất oxyntomodulin có tác dụng kéo dài có thành phần là dung dịch đệm xitrat ở độ pH là 5,6, dung dịch nước chứa chất hoạt động bề mặt dạng không ion là polysorbat, dung dịch nước chứa rượu đường là manitol, và methionin. Theo các trị số định lượng của Bảng 5 và 6, chất thử nghiệm được hoà tan ở nhiệt độ trong phòng, chất thử nghiệm dẫn xuất

oxyntomodulin hòa tan không hoàn toàn được ly tâm, và chỉ có dịch nổi được thu gom và được sử dụng trong thử nghiệm về độ hòa tan.

Về mặt này, vì trị số định lượng tối đa nằm trong trị số định lượng lý thuyết của dẫn xuất oxyntomodulin chất thử nghiệm, nên khoảng 5mg/mL được đo, là trị số định lượng thu được bằng cách chuyển đổi 80mg/mL thể tiếp hợp dẫn xuất oxyntomodulin có tác dụng kéo dài thành dẫn xuất oxyntomodulin. Chất thử nghiệm dẫn xuất oxyntomodulin được hòa tan ở trị số định lượng tối đa được pha loãng lần lượt, và mốc (0,008mg/mL) tại đó insulin được hòa tan hoàn toàn mà các tạp chất hoặc viên tròn không được xác định là trị số định lượng tối thiểu.

Đường cong hiệu chuẩn tương ứng của dẫn xuất oxyntomodulin và thể tiếp hợp dẫn xuất oxyntomodulin có tác dụng kéo dài trước tiên được xác nhận bằng sắc ký pha đảo, như được nêu trong Fig.3. Các trị số định lượng của dẫn xuất oxyntomodulin và thể tiếp hợp dẫn xuất oxyntomodulin có tác dụng kéo dài được tính toán bằng cách lần lượt đặt diện tích pic của chất thử nghiệm dẫn xuất oxyntomodulin và thể tiếp hợp dẫn xuất oxyntomodulin có tác dụng kéo dài đã được xác nhận bằng sắc ký pha đảo vào đường cong hiệu chuẩn.

Bảng 4

Nguyên liệu	Điều kiện hòa tan
Chất chuẩn dẫn xuất oxyntomodulin	Độ pH = 7,5, isopropanol 60%
Chất thử nghiệm dẫn xuất oxyntomodulin	Độ pH = 5,6
Chất chuẩn và chất thử nghiệm của thể tiếp hợp dẫn xuất oxyntomodulin có tác dụng kéo dài	Độ pH = 5,6

Bảng 5

Dẫn xuất oxyntomodulin	
Trị số định lượng lý thuyết (mg/mL)	Trị số đo được (trị số định lượng được tính toán bằng đường cong hiệu chuẩn) (mg/mL)
0,008	0,000
0,04	0,000
0,2	0,002
1	0,014
5	0,188

Bảng 6

Thể tiếp hợp dẫn xuất oxyntomodulin có tác dụng kéo dài	
Trị số định lượng lý thuyết (mg/mL)	Trị số đo được (trị số định lượng được tính toán bằng đường cong hiệu chuẩn) (mg/mL)
10	9,6
40	40,5
90	88,0
160	145,8

Như được thể hiện trong các bảng 5 và 6, và Fig.4, trị số định lượng của chất thử nghiệm thể tiếp hợp dẫn xuất oxyntomodulin có tác dụng kéo dài được hòa tan trong chất đệm tạo thể tiếp hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài có sự khác biệt nhỏ giữa trị số lý thuyết và trị số đo được, trong khi đó trị số định lượng của chất thử nghiệm dẫn xuất oxyntomodulin được hòa tan trong chất đệm tạo thể tiếp hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài có sự khác biệt lớn (lên tới khoảng 27 lần) giữa trị số lý thuyết và trị số đo được. Ngoài ra, khi chất thử nghiệm dẫn xuất oxyntomodulin được hoà tan trong chất đệm tạo thể tiếp hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài, các viên tròn được quan sát sau khi ly tâm trong toàn bộ các trường hợp, loại trừ 0,008mg/mL. Như được thể hiện bằng kết quả, độ hòa tan của dẫn xuất oxyntomodulin được cải thiện bởi mảnh Fc globulin miễn dịch dùng làm chất mang của thể tiếp hợp dẫn xuất oxyntomodulin có tác dụng kéo dài.

Các kết quả này chứng tỏ rằng mảnh Fc globulin miễn dịch dùng làm chất mang của protein và peptit có hoạt tính sinh lý theo sáng chế có khả năng cải thiện hữu hiệu độ hòa tan của protein và peptit.

Dựa vào phần mô tả trên đây, cần phải hiểu rằng người có trình độ trung bình trong lĩnh vực này có thể thực hiện các dạng cụ thể khác nhau mà không làm thay đổi bản chất kỹ thuật hoặc các đặc tính cơ bản của sáng chế. Do đó, cần phải hiểu rằng phương án nêu trên là không để giới hạn, mà chỉ để mục đích minh họa toàn bộ các khía cạnh. Phạm vi của sáng chế được xác định bởi bộ yêu cầu bảo hộ kèm theo chứ không phải là phần mô tả nêu trên, do đó toàn bộ các biến đổi và cải biến đều nằm trong phạm vi của bộ yêu cầu bảo hộ, hoặc dạng tương đương của các giới hạn và phạm vi này, do đó được dự định để bao hàm bởi bộ yêu cầu bảo hộ.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> HANMI PHARM. CO., LTD.
 <120> PHƯƠNG PHÁP CẢI THIẾN ĐỘ HÒA TAN CỦA PROTEIN HOẶC PEPTIT CÓ HOẠT TÍNH SINH LÝ
 <130> OPA15058
 <150> KR 10-2014-0038032
 <151> 2014-03-31
 <160> 52
 <170> KopatentIn 2.0
 <210> 1
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Chuỗi alpha insulin
 <400> 1
 Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu
 1 5 10 15
 Glu Asn Tyr Cys Asn
 20
 <210> 2
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Chuỗi beta insulin
 <400> 2
 Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr
 1 5 10 15
 Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr
 20 25 30
 <210> 3
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> Oxyntomodulin
 <400> 3
 His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser
 1 5 10 15
 Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr Lys Arg Asn
 20 25 30
 Arg Asn Asn Ile Ala
 35
 <210> 4
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> Dẫn xuất oxyntomodulin
 <220>
 <221> Biến thể
 <222> (1)
 <223> Xaa là 4-imidazoaxetyl.
 <400> 4
 Xaa Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu
 1 5 10 15
 Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Met Asn Thr Lys Arg Asn
 20 25 30
 Arg Asn Asn Ile Ala
 35
 <210> 5
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> Dẫn xuất oxyntomodulin
 <220>
 <221> Biến thể
 <222> (1)
 <223> Xaa là 4-imidazoaxetyl.
 <400> 5
 Xaa Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu
 1 5 10 15
 Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Ala Trp Leu Lys Asn Thr Gly Pro Ser
 20 25 30
 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
 35
 <210> 6
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> Dẫn xuất oxyntomodulin

```

<220>
<221>   Bién thể
<222>   (1)
<223>   Xaa là 4-imidazoaxetyl.
<400>   6
Xaa Gly Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Tyr Leu Glu Glu
 1             5             10             15
Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
      20             25             30
Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
      35
<210>   7
<211>   39
<212>   PRT
<213>   Dẫn xuất oxyntomodulin
<220>
<221>   Bién thể
<222>   (1)
<223>   Xaa là 4-imidazoaxetyl.
<400>   7
Xaa Gly Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Gln Met Glu Glu
 1             5             10             15
Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
      20             25             30
Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
      35
<210>   8
<211>   42
<212>   PRT
<213>   Dẫn xuất oxyntomodulin
<220>
<221>   Bién thể
<222>   (1)
<223>   Xaa là 4-imidazoaxetyl.
<400>   8
Xaa Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Arg Gln Met Glu Glu
 1             5             10             15
Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Ala Ala His Ser Gln Gly Thr
      20             25             30
Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp
      35             40
<210>   9
<211>   30
<212>   PRT
<213>   Dẫn xuất oxyntomodulin
<220>
<221>   Bién thể
<222>   (1)
<223>   Xaa là 4-imidazoaxetyl.
<400>   9
Xaa Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Tyr Leu Asp Glu
 1             5             10             15
Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Met Asn Thr Lys
      20             25             30
<210>   10
<211>   29
<212>   PRT
<213>   Dẫn xuất oxyntomodulin
<220>
<221>   Bién thể
<222>   (1)
<223>   Xaa là 4-imidazoaxetyl.
<400>   10
Xaa Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Arg Gln Leu Glu Glu
 1             5             10             15
Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Met Asn Lys
      20             25
<210>   11
<211>   37
<212>   PRT
<213>   Dẫn xuất oxyntomodulin
<220>
<221>   Bién thể
<222>   (1)
<223>   Xaa là 4-imidazoaxetyl.
<220>
<221>   Bién thể
<222>   (20)
<223>   Xaa = axit alpha-metyl-glutamic

```

```

<400>      11
Xaa Gly Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Tyr Leu Asp Glu
 1              5              10              15
Glu Ala Val Xaa Leu Phe Ile Glu Trp Leu Met Asn Thr Lys Arg Asn
      20              25              30
Arg Asn Asn Ile Ala
      35
<210>      12
<211>      40
<212>      PRT
<213>      Dẫn xuất oxyntomodulin
<220>
<221>      Biến thể
<222>      (1)
<223>      Xaa là 4-imidazoaxetyl.
<400>      12
Xaa Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Gln Met Glu Glu
 1              5              10              15
Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Met Asn Gly Gly Pro Ser
      20              25              30
Ser Gly Ala Pro Pro Ser Lys
      35              40
<210>      13
<211>      43
<212>      PRT
<213>      Dẫn xuất oxyntomodulin
<220>
<221>      Biến thể
<222>      (1)
<223>      Xaa là 4-imidazoaxetyl.
<400>      13
Xaa Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Arg Gln Met Glu Glu
 1              5              10              15
Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Ala Ala His Ser Gln Gly Thr
      20              25              30
Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Tyr Leu Asp Lys
      35              40
<210>      14
<211>      38
<212>      PRT
<213>      Dẫn xuất oxyntomodulin
<220>
<221>      Biến thể
<222>      (1)
<223>      Xaa là 4-imidazoaxetyl.
<400>      14
Xaa Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Tyr Leu Asp Gly
 1              5              10              15
Gly Gly His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met
      20              25              30
Glu Glu Glu Ala Val Lys
      35
<210>      15
<211>      30
<212>      PRT
<213>      Dẫn xuất oxyntomodulin
<220>
<221>      Biến thể
<222>      (1)
<223>      Xaa là 4-imidazoaxetyl.
<220>
<221>      Biến thể
<222>      (16)
<223>      Xaa = axit alpha-methyl-glutamic
<220>
<221>      Biến thể
<222>      (20)
<223>      Xaa = axit alpha-methyl-glutamic
<400>      15
Xaa Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Tyr Leu Asp Xaa
 1              5              10              15
Glu Ala Val Xaa Leu Phe Ile Glu Trp Leu Met Asn Thr Lys
      20              25              30
<210>      16
<211>      37
<212>      PRT
<213>      Dẫn xuất oxyntomodulin
<220>
<221>      Biến thể

```

```

<222>      (1)
<223>      Xaa là 4-imidazoaxetyl.
<220>
<221>      Biến thể
<222>      (20)
<223>      Xaa = axit alpha-metyl-glutamic
<220>
<221>      Biến thể
<222>      (24)
<223>      Xaa = axit alpha-metyl-glutamic
<400>      16
Xaa Gly Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Tyr Leu Asp Glu
 1             5             10             15
Glu Ala Val Xaa Leu Phe Ile Xaa Trp Leu Met Asn Thr Lys Arg Asn
 20             25             30
Arg Asn Asn Ile Ala
 35
<210>      17
<211>      37
<212>      PRT
<213>      Dẫn xuất oxyntomodulin
<220>
<221>      Biến thể
<222>      (1)
<223>      Xaa là 4-imidazoaxetyl.
<220>
<221>      Biến thể
<222>      (24)
<223>      Xaa = axit alpha-metyl-glutamic
<400>      17
Xaa Gly Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Tyr Leu Asp Glu
 1             5             10             15
Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Xaa Trp Leu Met Asn Thr Lys Arg Asn
 20             25             30
Arg Asn Asn Ile Ala
 35
<210>      18
<211>      34
<212>      PRT
<213>      Dẫn xuất oxyntomodulin
<220>
<221>      Biến thể
<222>      (1)
<223>      Xaa là 4-imidazoaxetyl.
<400>      18
Xaa Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Arg Gln Leu Glu Gly
 1             5             10             15
Gly Gly His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Arg Gln Leu
 20             25             30
Glu Lys
<210>      19
<211>      37
<212>      PRT
<213>      Dẫn xuất oxyntomodulin
<220>
<221>      Biến thể
<222>      (1)
<223>      Xaa là 4-imidazoaxetyl.
<400>      19
Xaa Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Tyr Leu Asp Glu
 1             5             10             15
Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Ile Arg Asn Thr Lys Arg Asn
 20             25             30
Arg Asn Asn Ile Ala
 35
<210>      20
<211>      40
<212>      PRT
<213>      Dẫn xuất oxyntomodulin
<220>
<221>      Biến thể
<222>      (1)
<223>      Xaa là 4-imidazoaxetyl.
<400>      20
Xaa Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Tyr Leu Asp Glu
 1             5             10             15
Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Ile Arg Asn Gly Gly Pro Ser
 20             25             30

```

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Lys
 35 40
 <210> 21
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> Dẫn xuất oxyntomodulin
 <220>
 <221> Biến thể
 <222> (1)
 <223> Xaa là 4-imidazoaxetyl.
 <400> 21
 Xaa Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Tyr Leu Asp Glu
 1 5 10 15
 Glu Ala Val Lys Leu Phe Ile Glu Trp Ile Arg Asn Thr Lys Arg Asn
 20 25 30
 Arg Asn Asn Ile Ala
 35
 <210> 22
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Dẫn xuất oxyntomodulin

 <220>
 <221> Biến thể
 <222> (1)
 <223> Xaa là 4-imidazoaxetyl.
 <400> 22
 Xaa Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Tyr Leu Asp Glu
 1 5 10 15
 Glu Ala Val Lys Leu Phe Ile Glu Trp Ile Arg Asn Gly Gly Pro Ser
 20 25 30
 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Lys
 35 40
 <210> 23
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> Dẫn xuất oxyntomodulin
 <220>
 <221> Biến thể
 <222> (1)
 <223> Xaa là 4-imidazoaxetyl.
 <400> 23
 Xaa Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Gln Leu Glu Glu
 1 5 10 15
 Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Val Arg Asn Thr Lys Arg Asn
 20 25 30
 Arg Asn Asn Ile Ala
 35
 <210> 24
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Dẫn xuất oxyntomodulin
 <220>
 <221> Biến thể
 <222> (1)
 <223> Xaa là desamino-histidyl.
 <400> 24
 Xaa Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu
 1 5 10 15
 Lys Arg Ala Lys Glu Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr Lys
 20 25 30
 <210> 25
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Dẫn xuất oxyntomodulin
 <220>
 <221> Biến thể
 <222> (2)
 <223> Xaa = axit aminoisobutyric
 <400> 25
 His Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu
 1 5 10 15
 Lys Arg Ala Lys Glu Phe Val Cys Trp Leu Met Asn Thr
 20 25
 <210> 26
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Dẫn xuất oxyntomodulin
 <220>


```

<221>      Biến thể
<222>      (2)
<223>      Xaa = axit aminoisobutyric
<400>      26
His Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu
 1              5              10              15
Lys Arg Ala Lys Glu Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr Cys
      20              25              30

<210>      27
<211>      30
<212>      PRT
<213>      Dẫn xuất oxyntomodulin
<220>
<221>      Biến thể
<222>      (2)
<223>      Xaa = axit aminoisobutyric
<400>      27
His Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu
 1              5              10              15
Lys Arg Ala Lys Glu Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr Cys
      20              25              30

<210>      28
<211>      30
<212>      PRT
<213>      Dẫn xuất oxyntomodulin
<220>
<221>      Biến thể
<222>      (2)
<223>      Xaa = axit aminoisobutyric
<400>      28
His Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu
 1              5              10              15
Lys Arg Ala Lys Glu Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr Cys
      20              25              30

<210>      29
<211>      29
<212>      PRT
<213>      Trình tự nhân tạo
<220>
<223>      Dẫn xuất oxyntomodulin
<220>
<221>      Biến thể
<222>      (2)
<223>      Xaa = axit aminoisobutyric
<400>      29
His Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu
 1              5              10              15
Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Cys Trp Leu Met Asn Thr
      20              25

<210>      30
<211>      29
<212>      PRT
<213>      Dẫn xuất oxyntomodulin
<220>
<221>      Biến thể
<222>      (2)
<223>      Xaa = axit aminoisobutyric
<400>      30
His Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu
 1              5              10              15
Lys Arg Ala Lys Glu Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
      20              25

<210>      31
<211>      37
<212>      PRT
<213>      Dẫn xuất oxyntomodulin
<220>
<221>      Biến thể
<222>      (2)
<223>      Xaa là d-serin.
<400>      31
His Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser
 1              5              10              15
Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr Lys Arg Asn
      20              25              30
Arg Asn Asn Ile Ala
      35
<210>      32
<211>      37

```

```

<212>      PRT
<213>      Dẫn xuất oxyntomodulin
<220>
<221>      Biểu thể
<222>      (1)
<223>      Xaa là 4-imidazoaxetyl.
<400>      32
Xaa Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser
 1             5             10             15
Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr Lys Arg Asn
             20             25             30
Arg Asn Asn Ile Ala
             35
<210>      33
<211>      37
<212>      PRT
<213>      Dẫn xuất oxyntomodulin
<220>
<221>      Biểu thể
<222>      (1)
<223>      Xaa là 4-imidazoaxetyl.
<220>
<221>      Biểu thể
<222>      (2)
<223>      Xaa là d-serin.
<400>      33
Xaa Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser
 1             5             10             15
Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr Lys Arg Asn
             20             25             30
Arg Asn Asn Ile Ala
             35
<210>      34
<211>      30
<212>      PRT
<213>      Trình tự nhân tạo
<220>
<223>      Dẫn xuất oxyntomodulin
<220>
<221>      Biểu thể
<222>      (1)
<223>      Xaa là 4-imidazoaxetyl.
<220>
<221>      Biểu thể
<222>      (2)
<223>      Xaa = axit aminoisobutyric
<400>      34
Xaa Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu
 1             5             10             15
Lys Arg Ala Lys Glu Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr Cys
             20             25             30
<210>      35
<211>      30
<212>      PRT
<213>      Trình tự nhân tạo
<220>
<223>      Dẫn xuất oxyntomodulin
<220>
<221>      Biểu thể
<222>      (2)
<223>      Xaa = axit aminoisobutyric
<400>      35
His Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ala Lys Tyr Leu Asp Glu
 1             5             10             15
Lys Arg Ala Lys Glu Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr Cys
             20             25             30
<210>      36
<211>      30
<212>      PRT
<213>      Trình tự nhân tạo
<220>
<223>      Dẫn xuất oxyntomodulin
<220>
<221>      Biểu thể
<222>      (2)
<223>      Xaa = axit aminoisobutyric
<400>      36
Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu
 1             5             10             15

```

```

Lys Arg Ala Lys Glu Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr Cys
      20              25              30
<210>      37
<211>      8
<212>      PRT
<213>      Trình tự nhân tạo
<220>
<223>      Nhóm R2
<400>      37
Lys Arg Asn Arg Asn Asn Ile Ala
      1              5
<210>      38
<211>      10
<212>      PRT
<213>      Trình tự nhân tạo
<220>
<223>      Nhóm R2
<400>      38
Gly Pro Ser Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
      1              5              10
<210>      39
<211>      11
<212>      PRT
<213>      Trình tự nhân tạo
<220>
<223>      Nhóm R2
<400>      39
Gly Pro Ser Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Lys
      1              5              10
<210>      40
<211>      15
<212>      PRT
<213>      Trình tự nhân tạo
<220>
<223>      Nhóm R2
<400>      40
His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp
      1              5              10              15
<210>      41
<211>      16
<212>      PRT
<213>      Trình tự nhân tạo
<220>
<223>      Nhóm R2
<400>      41
His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Tyr Leu Asp Lys
      1              5              10              15
<210>      42
<211>      20
<212>      PRT
<213>      Trình tự nhân tạo
<220>
<223>      Nhóm R2
<400>      42
His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
      1              5              10              15
Glu Ala Val Lys
      20
<210>      43
<211>      28
<212>      PRT
<213>      Trình tự nhân tạo
<220>
<223>      Nhóm A hoặc B
<400>      43
Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser Arg
      1              5              10              15
Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
      20              25
<210>      44
<211>      28
<212>      PRT
<213>      Trình tự nhân tạo
<220>
<223>      Nhóm A hoặc B
<400>      44
Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu Glu
      1              5              10              15
Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Met Asn Thr

```

20 25
 <210> 45
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Nhóm A hoặc B
 <400> 45
 Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu Arg
 1 5 10 15
 Arg Ala Gln Asp Phe Val Ala Trp Leu Lys Asn Thr
 20 25
 <210> 46
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Nhóm A hoặc B
 <400> 46
 Gly Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Tyr Leu Glu Glu Glu
 1 5 10 15
 Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly
 20 25
 <210> 47
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Nhóm A hoặc B
 <400> 47
 Gly Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Gln Met Glu Glu Glu
 1 5 10 15
 Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly
 20 25
 <210> 48
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Nhóm A hoặc B
 <400> 48
 Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Arg Gln Met Glu Glu Glu
 1 5 10 15
 Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Ala Ala
 20 25
 <210> 49
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Nhóm A hoặc B
 <400> 49
 Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Gln Met Glu Glu Glu
 1 5 10 15
 Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Met Asn Gly
 20 25
 <210> 50
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Nhóm B
 <400> 50
 Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Arg Gln Met Glu Glu Glu
 1 5 10 15
 Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp
 20
 <210> 51
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Nhóm B
 <400> 51
 Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Tyr Leu Asp
 1 5 10
 <210> 52
 <211> 29
 <212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Glucagon
<400> 52
His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser
 1 5 10 15
Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
 20 25

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp cải thiện độ hòa tan của protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý trong dung dịch nước so với độ hòa tan của protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý không được tiếp hợp với mảnh Fc globulin miễn dịch, trong đó phương pháp này bao gồm các bước sau:

(1) tiếp hợp protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý với mảnh Fc globulin miễn dịch; và

(2) chọn lọc thể tiếp hợp trong đó protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý được liên kết với mảnh Fc globulin miễn dịch thông qua polyme không peptidyl, trong đó thể tiếp hợp này có độ hòa tan được cải thiện so với độ hòa tan của protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý không được tiếp hợp với mảnh Fc globulin miễn dịch.

2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó mảnh Fc globulin miễn dịch là mảnh Fc có nguồn gốc từ IgG, IgA, IgD, IgE, hoặc IgM.

3. Phương pháp theo điểm 2, trong đó mảnh Fc globulin miễn dịch này là dạng lai của các miền, trong đó mỗi miền này có nguồn gốc khác nhau từ globulin miễn dịch được chọn từ nhóm bao gồm IgG, IgA, IgD, IgE, và IgM.

4. Phương pháp theo điểm 2, trong đó mảnh Fc globulin miễn dịch này là dime hoặc multime cấu thành từ các globulin miễn dịch chuỗi đơn có cùng nguồn gốc.

5. Phương pháp theo điểm 4, trong đó mảnh Fc globulin miễn dịch này là mảnh Fc IgG4 không được glycosyl hóa của người.

6. Phương pháp theo điểm 1, trong đó protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý được tiếp hợp với mảnh Fc globulin miễn dịch ở dạng protein dung hợp.

7. Phương pháp theo điểm 1, trong đó polyme không peptidyl là polyetylen glycol.

8. Phương pháp theo điểm 1, trong đó polyme không peptidyl được chọn từ nhóm bao gồm polypropylen glycol, copolyme của etylen glycol và propylen glycol, rượu đa chức được polyoxyetyl hóa, rượu polyvinyllic, polysacarit, dextran, polyvinyl etyl ete, polyme có thể phân hủy sinh học như axit polylactic và axit polylactic-glycolic, polyme lipid, kitin, axit hyaluronic, và hỗn hợp của chúng.

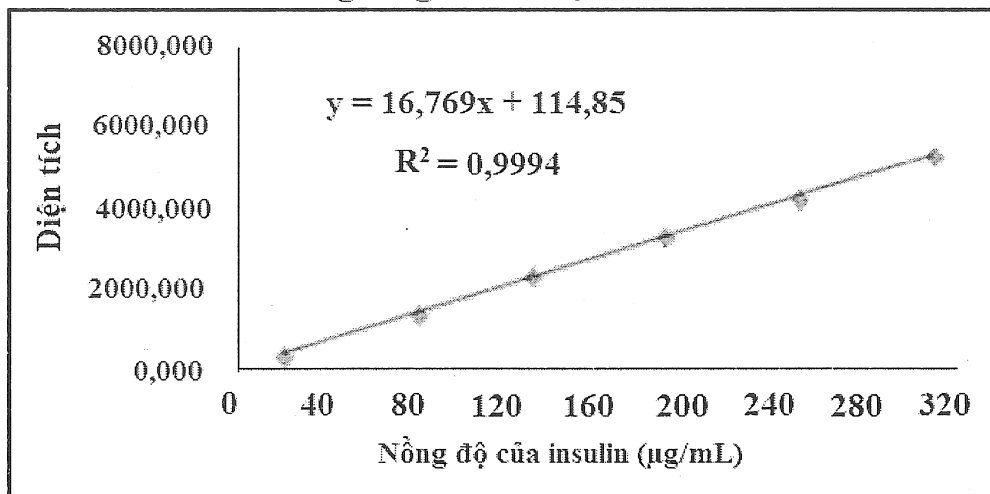
9. Phương pháp theo điểm 1, trong đó dung dịch nước bao gồm dung dịch đệm chứa axit

xitric hoặc axit axetic, dung dịch nước chứa chất hoạt động bề mặt dạng không ion là polysorbat, dung dịch nước chứa rượu đường là manitol, và dung dịch nước chứa chất đẳng trương là natri clorua hoặc methionin.

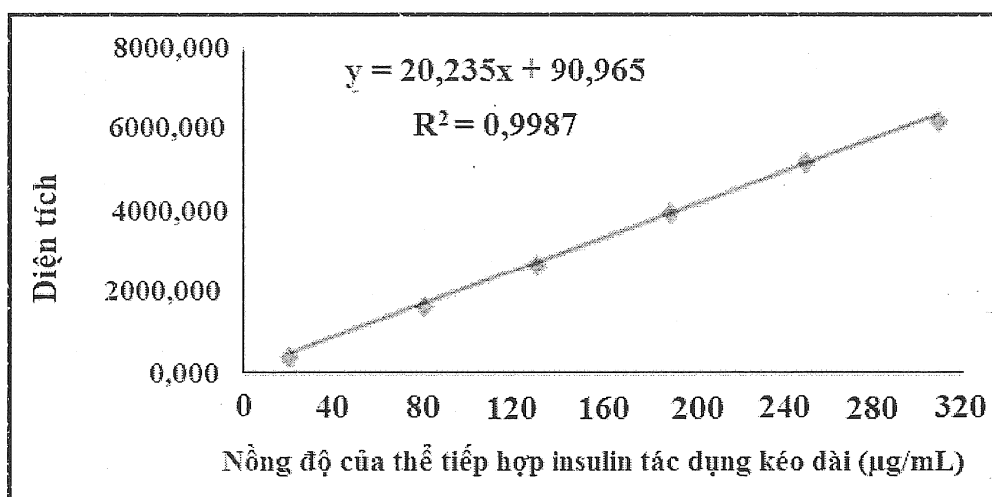
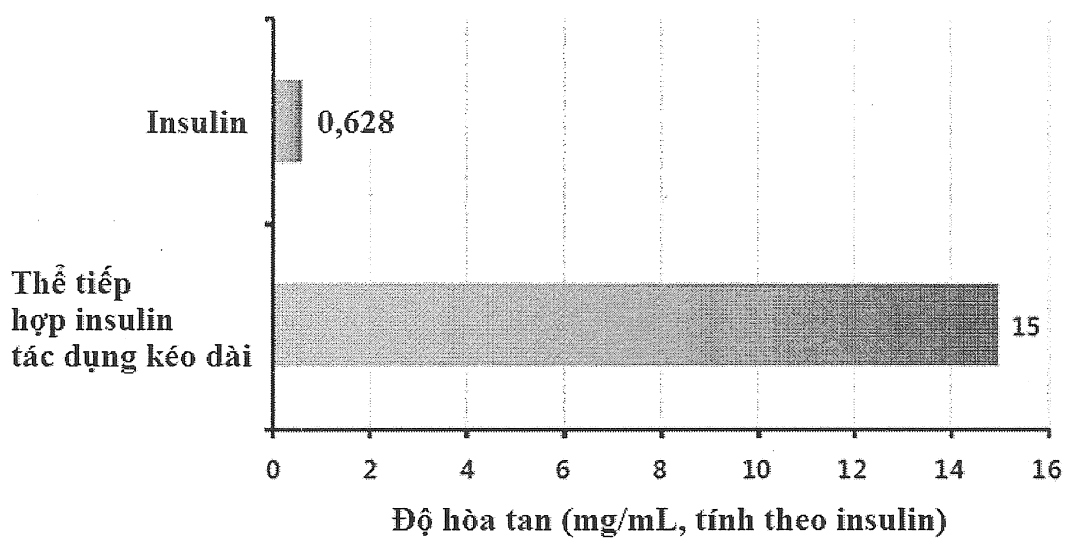
10. Phương pháp theo điểm 1, trong đó dung dịch nước có độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 7,0.

11. Phương pháp theo điểm 1, trong đó protein hoặc peptit có hoạt tính sinh lý là exendin-4, glucagon, peptit tương tự glucagon 1, peptit tương tự glucagon 2, hormon tuyến cận giáp, calcitonin, insulin, hoặc oxyntomodulin.

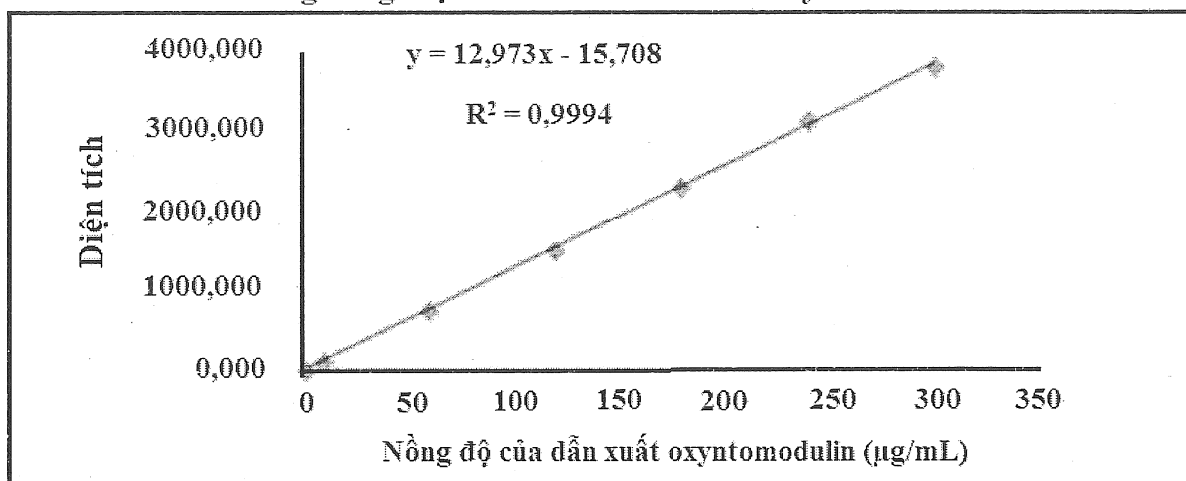
Đường cong chuẩn hiệu chuẩn insulin



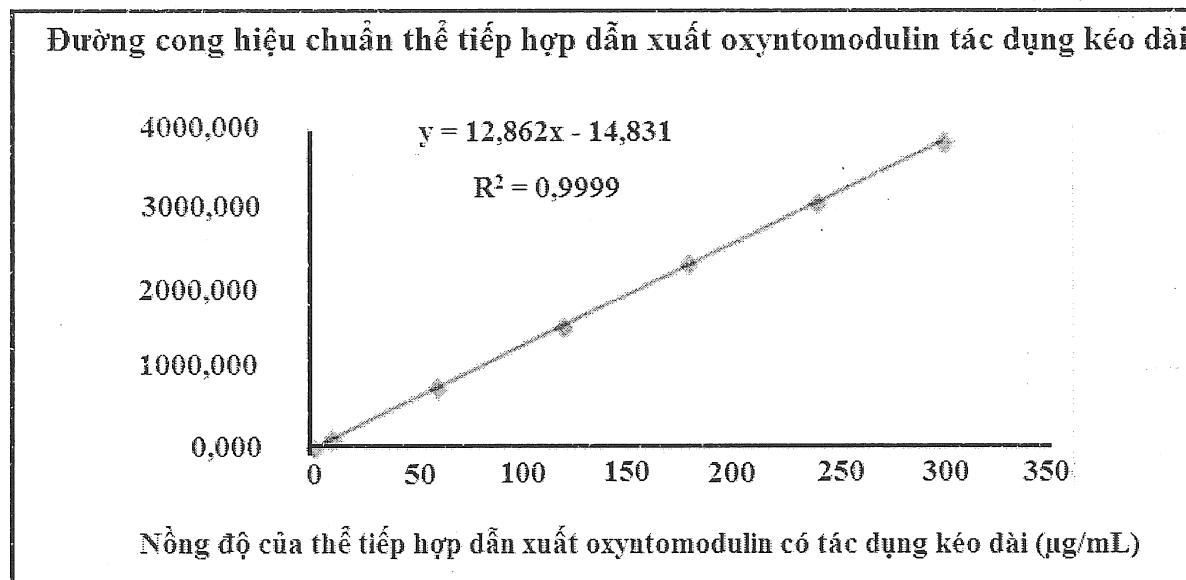
Đường cong chuẩn hiệu chuẩn thể tiếp hợp insulin tác dụng kéo dài

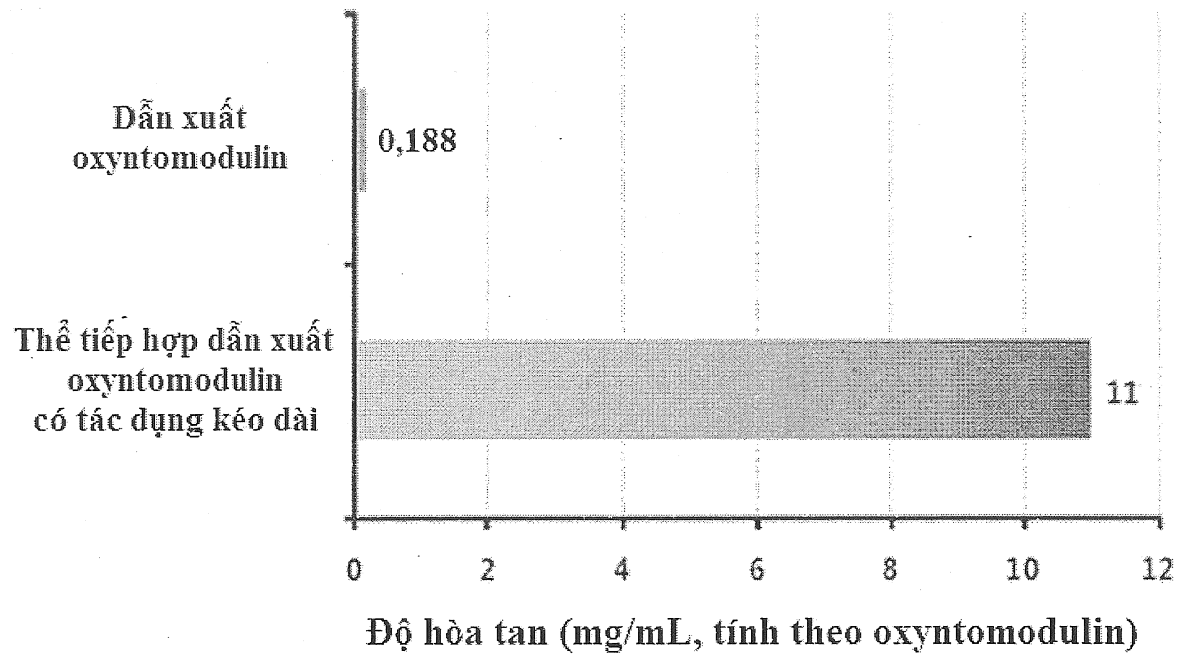
**Fig.1****Fig.2**

Đường cong hiệu chuẩn của dẫn xuất oxyntomodulin



Đường cong hiệu chuẩn thể tiếp hợp dẫn xuất oxyntomodulin tác dụng kéo dài

**Fig.3**

**Fig.4**