



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

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

(11)



1-0030810

(51)⁸ A61K 9/08; C07K 14/605; A61K 38/26; (13) B
A61K 39/395

(21) 1-2017-04232

(22) 06/11/2013

(62) 1-2015-01971

(86) PCT/KR2013/009986 06/11/2013

(87) WO2014/073842 15/05/2014

(30) 10-2012-0124725 06/11/2012 KR

(45) 25/01/2022 406

(43) 25/01/2018 358A

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

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

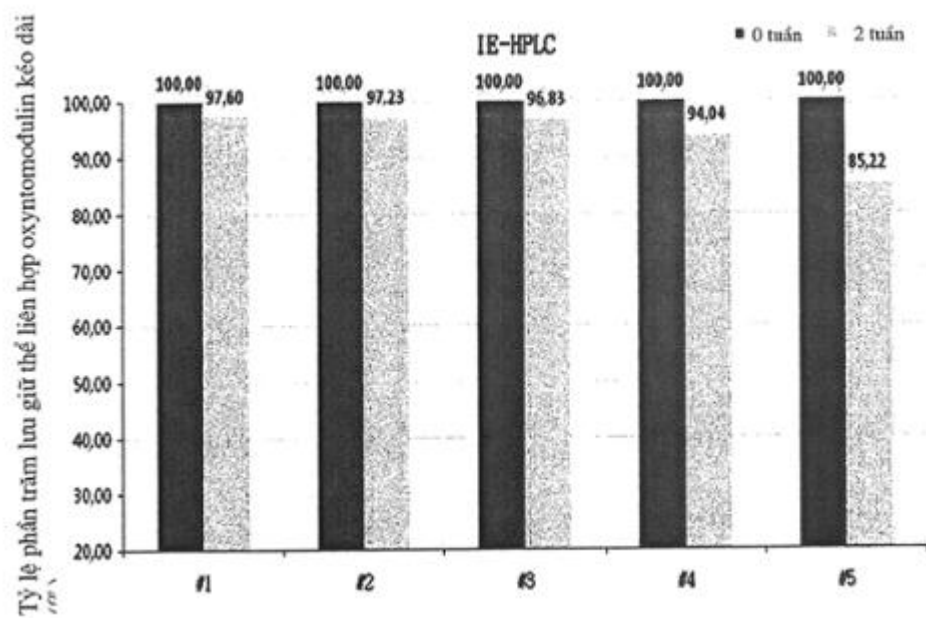
(72) KIM Hyun Uk (KR); LIM Hyung Kyu (KR); JANG Myung Hyun (KR); KIM Sang Yun (KR); BAE Sung Min (KR); KWON Se Chang (KR).

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

(54) DƯỢC PHẨM DẠNG LÔNG CHỨA THỂ LIÊN HỢP OXYNTOMODULIN CÓ TÁC DỤNG KÉO DÀI VÀ PHƯƠNG PHÁP BẢO CHẾ CHỨNG

(57) Sáng chế đề cập đến dược phẩm dạng lông không chứa albumin chứa thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài trong đó peptit oxyntomodulin bao gồm dẫn xuất, biến thể, tiền chất hoặc mảnh chứa oxyntomodulin được liên kết với vùng Fc của globulin miễn dịch, có thể làm tăng thời gian của tác động sinh lý của thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài và duy trì sự ổn định *in vivo* của nó trong khoảng thời gian dài, so với oxyntomodulin tự nhiên, cũng như phương pháp bào chế dược phẩm dạng lông này. Dược phẩm dạng lông này còn chứa dung dịch đệm, rượu đường và chất hoạt động bề mặt không ion và không chứa albumin huyết thanh người và các yếu tố có khả năng có hại cho người, và do đó không miễn cảm với nhiễm khuẩn virut. Ngoài ra, thể liên hợp oxyntomodulin theo sáng chế bao gồm oxyntomodulin được liên kết với vùng Fc của globulin miễn dịch, và do đó có phân tử lượng lớn, tác động sinh lý kéo dài, và độ ổn định cất giữ rất tốt, so với oxyntomodulin tự nhiên.

Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp bào chế dược phẩm dạng lông này.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến được phẩm dạng lỏng không chứa albumin bao gồm thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài trong đó peptit oxyntomodulin bao gồm dẫn xuất, biến thể, tiền chất hoặc mảnh chứa oxyntomodulin được liên kết với vùng Fc của globulin miễn dịch, có thể làm tăng thời gian của tác động sinh lý của thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài và duy trì sự ổn định *in vivo* của nó trong khoảng thời gian dài, so với oxyntomodulin tự nhiên. Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp bào chế được phẩm dạng lỏng này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Béo phì được định nghĩa là bệnh lý liên quan đến sự tích tụ mỡ quá mức hoặc bất thường có thể làm giảm sức khỏe và là hậu quả của sự mất cân bằng năng lượng, trong đó mức năng lượng nạp vào vượt quá mức năng lượng tiêu hao. Trước đây, béo phì không phải là một vấn đề sức khỏe nghiêm trọng, tuy nhiên, với tốc độ tăng trưởng kinh tế thì số người béo phì đang gia tăng cùng với mức độ sung túc về kinh tế, và số lượng các bệnh khác nhau liên quan đến béo phì cũng đang gia tăng. Theo báo cáo của Tổ chức Y tế Thế giới (WHO - the World Health Organization), hơn 1,5 tỷ người trưởng thành trên toàn thế giới đang thừa cân, trên 500 triệu người trong số đó là bị béo phì, và dân số béo phì tăng gấp đôi từ năm 1980 đến năm 2008 (WHO, Fact sheet on obesity and overweight, 2011). Không chỉ ở các nước có thu nhập cao, mà ngay cả ở các nước có thu nhập thấp, hiện tỷ lệ người béo phì đang gia tăng. Thừa cân và béo phì làm tăng huyết áp và mức cholesterol và gây ra hoặc làm trầm trọng thêm các bệnh khác nhau. Ngoài ra, vấn đề béo phì còn nghiêm trọng hơn ở trẻ em hoặc thanh thiếu niên, làm tăng tỷ lệ mắc bệnh tiểu đường, bệnh tim, cao huyết áp hoặc tăng lipid máu, và còn có thể gây tử vong hoặc tàn tật.

Như nêu trên, béo phì là một bệnh toàn cầu và là vấn đề xã hội, nhưng trong quá khứ, người ta tin rằng béo phì có thể khắc phục được bởi nỗ lực cá nhân, và do đó tầm quan trọng của việc điều trị bệnh béo phì không được chú trọng. Tuy nhiên, việc điều trị bệnh béo phì không phải là dễ dàng bởi vì nó là một căn bệnh phức tạp liên quan đến các cơ chế kiểm soát sự thèm ăn và chuyển hóa năng lượng. Theo đó, việc điều trị bệnh béo phì không chỉ đòi hỏi nỗ lực của chính bệnh nhân, mà còn

cần có độ pH ương pháp điều trị các cơ chế bất thường liên quan đến việc kiểm soát sự thèm ăn và chuyển hóa năng lượng. Do đó, đã có nhiều nỗ lực phát triển các thuốc điều trị bệnh béo phì. Kết quả là đã phát triển được các loại thuốc như Rimonabant (Sanofi-Aventis), Sibutramine (Abbott), Contrave (Takeda), Orlistat (Roche) và các thuốc tương tự, nhưng những loại thuốc này có nhược điểm là chúng có tác dụng phụ đối với thai nhi hoặc có hiệu quả không đủ trong điều trị bệnh béo phì. Đã có báo cáo rằng Rimonabant (Sanofi-Aventis) có tác dụng phụ là gây rối loạn hệ thần kinh trung ương, Sibutramin (Abbott) và Contrave (Takeda) có tác dụng phụ đối với tim mạch, và Orlistat (Roche) chỉ làm giảm trọng lượng được 4 kg khi cho dùng thuốc này trong 1 năm. Như vậy, hiện nay có rất ít hoặc không có thuốc điều trị bệnh béo phì có thể được kê đơn một cách an toàn cho bệnh nhân béo phì.

Gần đây, các dẫn xuất glucagon đã nhận được nhiều sự chú ý. Glucagon được tuyến tụy tiết ra khi nồng độ glucoza trong máu bắt đầu giảm do thuốc, bệnh, thiếu hụt hormon hoặc enzym, hoặc các yếu tố tương tự. Glucagon thực hiện chức năng kích thích các tế bào gan làm phá vỡ glycogen tích lũy thành glucoza và sau đó giải phóng nó vào máu để làm tăng mức glucoza huyết đến mức bình thường. Ngoài tác dụng làm tăng mức glucoza huyết, đã có báo cáo glucagon ức chế được sự thèm ăn và hoạt hóa lipaza nhạy hormon (HSL) của tế bào mỡ để tạo điều kiện thuận lợi cho quá trình phân giải lipid, nhờ đó có tác dụng chống béo phì. Trong số các dẫn xuất glucagon, peptit giống glucagon-1 (GLP-1) đang được phát triển làm tác nhân điều trị để làm giảm đường huyết ở bệnh nhân đái tháo đường và có chức năng kích thích quá trình tổng hợp và bài tiết insulin, ức chế quá trình tiết glucagon, kìm hãm quá trình làm rỗng dạ dày, làm tăng mức sử dụng glucoza và ức chế sự hấp thụ thức ăn. Đã biết rằng exendin-4 được phân lập từ nọc độc của rắn lùn có mức tương đồng axit amin với GLP-1 là khoảng 50% và hoạt hóa thụ thể GLP-1 để làm giảm đường huyết ở bệnh nhân đái tháo đường. Tuy nhiên, đã có báo cáo rằng các loại thuốc điều trị bệnh béo phì, bao gồm GLP-1, gây ra các tác dụng phụ như nôn và buồn nôn.

Vì vậy, như một giải pháp thay thế cho GLP-1, oxyntomodulin có khả năng liên kết với thụ thể của cả hai peptit (GLP-1 và glucagon) đang nhận được sự chú ý. Oxyntomodulin là peptit được điều chế từ pre-glucagon, một tiền chất của glucagon, và là một chất chống béo phì mạnh, vì nó ức sự hấp thụ thức ăn, như GLP-1, thúc đẩy cảm giác no, và có hoạt tính phân giải lipid như glucagon.

Dựa vào chức năng kép của peptit oxyntomodulin, các nghiên cứu về việc phát triển thuốc điều trị bệnh béo phì đã được tiến hành tích cực. Ví dụ, patent Hàn

Quốc với số đăng ký 925017 đề cập đến dược phẩm dùng qua đường miệng, ngoài đường tiêu hóa, niêm mạc, trực tràng, dưới da hoặc qua da để điều trị bệnh béo phì của người, trong đó dược phẩm này chứa hoạt chất là oxyntomodulin. Tuy nhiên, đã có báo cáo rằng tác nhân điều trị bệnh béo phì chứa oxyntomodulin có chu kỳ bán rã *in vivo* ngắn và có hiệu quả thấp đối với điều trị bệnh béo phì, ngay cả khi chúng được dùng với liều cao gấp ba lần một ngày. Do đó, đã có nhiều nỗ lực để làm tăng chu kỳ bán rã *in vivo* hoặc tác dụng điều trị bệnh béo phì của oxyntomodulin bằng cách cải biến oxyntomodulin.

Ví dụ, oxyntomodulin chủ vận kép (Merck) được điều chế bằng cách thay thế L-serin bằng D-serin ở axit amin 2 của oxyntomodulin để tăng tính kháng dipeptidyl peptidaza-IV (DPP-IV) và bằng cách gắn gốc cholesterol với đầu tận cùng C để làm chu kỳ bán rã máu. ZP2929 (Zealand) được điều chế bằng cách thay thế L-serin bằng D-serin ở axit amin 2 của oxyntomodulin để làm tăng tính kháng DPP-IV, thay thế arginin bằng alanin ở axit amin 17 để làm tăng tính kháng proteaza, thay thế metionin bằng lysin ở axit amin 27 để tăng độ ổn định oxy hóa, và thay thế glutamin ở các axit amin 20 và 24 và asparagin ở axit amin 28 lần lượt bằng axit aspartic, alanin và serin để tăng tính ổn định quá trình khử amin hóa. Oxyntomodulin chủ vận kép (Merck) có chu kỳ bán rã *in vivo* tăng 1,7 giờ, dài hơn so với chu kỳ bán rã (8-12 phút) của oxyntomodulin tự nhiên, nhưng nó vẫn có chu kỳ bán rã *in vivo* này vẫn là ngắn và phải dùng liều rất cao đến một vài mg/kg. Do đó, oxyntomodulin hoặc dẫn xuất của chúng có hai nhược điểm lớn đó là chu kỳ bán rã ngắn và hiệu quả của thuốc thấp. Do những nhược điểm này mà chúng phải được dùng hàng ngày với liều cao. Để khắc phục những nhược điểm này, một phương pháp đã được nghiên cứu để làm tăng chu kỳ bán rã của oxyntomodulin trong máu trong khi vẫn duy trì được các hoạt động *in vivo* của chúng, và kết quả là đã phát triển được dẫn xuất oxyntomodulin. Ngoài ra, bằng cách sử dụng công nghệ này, polyme không peptidyl đã được điều chế bằng cách liên hợp chất mang với dẫn xuất oxyntomodulin, và đã phát hiện ra rằng thể liên hợp thu được có tác dụng chống béo phì tốt hơn do làm tăng được chu kỳ bán rã máu trong khi vẫn duy trì được hoạt tính *in vivo* (patent Hàn Quốc số 10-2012-0064110).

Nói chung, protein và peptit có chu kỳ bán rã rất ngắn, và bị biến tính như tạo kết tủa khi kết tụ các monome, và hấp phụ trên bề mặt của bình, khi tiếp xúc với các yếu tố khác nhau như nhiệt độ bất lợi, giao diện nước-không khí, áp suất cao, áp lực vật lý/cơ học, dung môi hữu cơ và nhiễm vi sinh vật. Sự biến tính này không có tính nghịch đảo, và do đó các protein và peptit đã biến tính bị mất các đặc tính hóa lý nội tại và hiệu quả tác động sinh lý. Ngoài ra, protein và peptit thường không

ổn định và dễ bị tác động bởi các yếu tố bên ngoài như nhiệt độ, độ ẩm, oxy, tia UV hoặc các yếu tố tương tự làm thay đổi về vật lý hoặc hóa học bao gồm kết hợp, polyme hóa hoặc oxy hóa, dẫn đến việc bị mất đáng kể hoạt tính (patent Hàn Quốc số 10-0389726).

Hơn nữa, các protein và peptit đã hấp thụ bị kết tụ một cách dễ dàng trong quá trình biến tính, và các protein và peptit đã biến tính này, khi được đưa vào cơ thể người, sẽ gây ra sự hình thành kháng thể trong cơ thể người, và vì lý do này, các protein và peptit phải được dùng dưới dạng đủ ổn định. Theo đó, các phương pháp khác nhau để ngăn ngừa sự biến tính của protein và peptit trong giải pháp đã được nghiên cứu (John Geigert, J. Parenteral Sci Tech, 43, No 5, 220-224, 1989; David Wong, Pharm Tech. October, 34- 48, 1997; Wang Wei, Int J. Pharm, 185, 129-188, 1999; Willem Norde, Adv Colloid Interface Sci, 25, 267-340, 1986; Michelle et al, J. Int. Pharm. 120, 179-188, 1995).

Quá trình đông khô được áp dụng với một số loại thuốc protein và peptit để đạt được sự ổn định. Tuy nhiên, các sản phẩm đông khô bất tiện ở chỗ để sử dụng thì chúng phải được hòa tan lại trong nước tiêm. Ngoài ra, trong trường hợp đông khô, đòi hỏi phải có đầu tư lớn về máy đông khô thể tích lớn hoặc những thiết bị tương tự, bởi vì quá trình đông khô nằm trong quy trình sản xuất. Mặt khác, phương pháp sản xuất bột protein và peptit bằng cách sử dụng máy sấy phun cũng đang được áp dụng, nhưng trong trường hợp này, hiệu quả kinh tế bị giảm do hiệu suất thấp, và việc tiếp xúc với nhiệt độ cao có thể ảnh hưởng bất lợi đến sự ổn định của protein.

Để khắc phục các hạn chế như vậy, người ta đã nghiên cứu việc bổ sung chất làm ổn định vào protein và peptit trong dung dịch để ngăn chặn những thay đổi hóa lý của protein và peptit trong khi vẫn duy trì được hiệu quả *in vivo* của chúng ngay cả khi lưu giữ lâu dài. Albumin huyết thanh người, một loại protein, đã được sử dụng rộng rãi làm chất ổn định cho các loại thuốc protein khác nhau, và hiệu quả của chúng đã được chứng minh (Edward Tarelli et al., Biologicals (1998) 26, 331-346).

Quá trình tinh chế albumin huyết thanh người bao gồm bước làm bất hoạt chất gây ô nhiễm sinh học như mycoplasma, prion, vi khuẩn và vi rút và bước sàng lọc hoặc kiểm tra một hoặc nhiều chất gây ô nhiễm sinh học hoặc các mầm bệnh. Tuy nhiên, luôn có rủi ro là bệnh nhân sẽ bị tiếp xúc với các chất gây ô nhiễm sinh học vẫn chưa được loại bỏ hoặc làm bất hoạt hoàn toàn. Ví dụ, quá trình sàng lọc bao gồm việc kiểm tra xem máu lấy từ những người cho máu có chứa loại virut nhất định không, nhưng quá trình này không phải luôn luôn đáng tin cậy. Đặc biệt,

có thể không phát hiện được virus cụ thể tồn tại với một lượng rất nhỏ trong máu của người cho.

Các protein khác nhau có thể được làm bất hoạt từ từ với các mức độ khác nhau trong các điều kiện khác nhau trong quá trình lưu giữ do sự khác biệt hóa học của chúng. Nghĩa là, việc kéo dài thời hạn lưu giữ bằng chất làm ổn định là không giống nhau đối với các protein khác nhau. Vì lý do này, tỷ lệ, nồng độ và loại chất ổn định thích hợp được sử dụng để tạo ra độ ổn định lưu giữ khác nhau sẽ phụ thuộc vào đặc tính hóa sinh của protein đích. Khi chất làm ổn định được sử dụng kết hợp, chúng có thể gây ra các tác dụng phụ khác với hiệu quả mong muốn do sự cạnh tranh và tương tác giữa chúng. Hơn nữa, do bản chất hoặc nồng độ của protein có thể thay đổi trong quá trình lưu giữ, chất ổn định được sử dụng có thể có hiệu quả khác với hiệu quả được dự định. Do đó, cần rất nhiều nỗ lực và biện pháp phòng ngừa để làm ổn định protein trong dung dịch.

Đặc biệt, thể liên hợp của oxyntomodulin và Fc immunoglobulin là thể liên hợp trong đó oxyntomodulin là một peptit có tác động sinh lý được liên kết với vùng Fc của globulin miễn dịch. Như vậy, do khối lượng phân tử và thể tích của thể liên hợp chắc chắn khác với oxyntomodulin tự nhiên, nên cần phải có thành phần đặc biệt để làm ổn định protein.

Hơn nữa, do oxyntomodulin (là một peptit có tác động sinh lý) và vùng Fc của globulin miễn dịch là peptit hoặc protein có đặc tính hóa lý khác nhau, chúng phải được làm ổn định đồng thời. Tuy nhiên, như đã nêu trên, protein hoặc các protein khác nhau có thể được làm bất hoạt từ từ với các mức tốc độ khác nhau trong các điều kiện khác nhau trong quá trình lưu giữ, do sự khác biệt hóa học của chúng, và khi chất làm ổn định phù hợp với các protein hay peptit được sử dụng kết hợp, chúng có thể gây ra các tác dụng phụ khác với hiệu quả mong muốn do sự cạnh tranh và tương tác giữa chúng. Như vậy, trong trường hợp của thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài, rất khó tìm được thành phần để làm ổn định đồng thời oxyntomodulin, là một peptit có tác động sinh lý, và vùng Fc của globulin miễn dịch.

Trong hoàn cảnh như vậy, các tác giả sáng chế đã nỗ lực tạo ra dược phẩm dạng lỏng ổn định có thể lưu giữ được trong một thời gian dài mà không lo bị ô nhiễm bởi virus, và kết quả là đã tìm chất ổn định, bao gồm dung dịch đệm, rượu đường và chất hoạt động bề mặt không ion và có thể còn bao gồm chất phụ gia, như chất đẳng trương hoặc axit amin, và chất bảo quản để sử dụng lại, có thể làm tăng độ ổn định của dẫn xuất oxyntomodulin có tác dụng kéo dài, và dược phẩm dạng

lông ổn định và hiệu quả về giá thành có thể được điều chế bằng cách sử dụng chất ổn định này, nhờ đó hoàn thành được sáng chế.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vì các lý do nêu trên, mục đích của sáng chế là đề xuất được phẩm dạng lông chứa thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài, chứa lượng hữu hiệu có tác dụng dược lý của thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài trong đó oxyntomodulin, là peptit có tác động sinh lý, được liên kết với vùng Fc của globulin miễn dịch; và chất làm ổn định không chứa albumin.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp bào chế được phẩm dạng lông nêu trên.

Theo khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất chế phẩm dùng để ngăn ngừa hoặc điều trị chế phẩm ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh béo phì hoặc đái tháo đường, bao gồm được phẩm dạng lông chứa thể liên hợp oxyntomodulin bao gồm peptit oxyntomodulin có tác động sinh lý được liên kết với vùng Fc của globulin miễn dịch.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh béo phì hoặc đái tháo đường, bao gồm bước cho đối tượng dùng được phẩm dạng lông nêu trên.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

FIG. 1a là đồ thị thể hiện kết quả thu được bằng cách tinh chế dẫn xuất oxyntomodulin được PEGyl hóa một lần (SEQ ID NO: 25) qua cột tinh chế SOURCE S.

FIG. 1b là đồ thị thể hiện kết quả thu được bằng cách tinh chế thể liên hợp của dẫn xuất oxyntomodulin được PEGyl hóa một lần (SEQ ID NO: 25) và Fc globulin miễn dịch qua cột tinh chế SOURCE 15Q.

FIG. 1c là đồ thị thể hiện kết quả thu được bằng cách tinh chế thể liên hợp của dẫn xuất oxyntomodulin được PEGyl hóa một lần (SEQ ID NO: 25) và Fc globulin miễn dịch qua cột tinh chế SOURCE ISO.

FIG. 2a là biểu đồ thể hiện kết quả thu được bằng cách đánh giá độ ổn định của thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài theo độ pH bằng IE-HPLC trong Ví dụ 3 sau 0-2 tuần cất giữ ở 25°C. Mỗi cột trong FIG. 2a thể hiện tỷ lệ phần trăm lưu giữ của thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài so với giá trị ban đầu.

FIG. 2b là biểu đồ thể hiện kết quả thu được bằng cách đánh giá độ ổn định của thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài theo độ pH bằng SE-HPLC

trong Ví dụ 3 sau 0-2 tuần cất giữ ở 25°C. Mỗi cột trong FIG. 2b thể hiện tỷ lệ phần trăm lưu giữ của thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài so với giá trị ban đầu.

FIG. 2c là biểu đồ thể hiện kết quả thu được bằng cách đánh giá độ ổn định của thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài theo độ pH bằng RP-HPLC trong Ví dụ 3 sau 0-2 tuần cất giữ ở 25°C. Mỗi cột trong FIG. 2c thể hiện tỷ lệ phần trăm lưu giữ của thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài so với giá trị ban đầu.

FIG. 3a là biểu đồ thể hiện kết quả thu được bằng cách đánh giá độ ổn định của thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài theo loại rượu đường và có mặt hoặc không có mặt của chất đẳng trương bằng IE-HPLC trong Ví dụ 4 sau 0-4 tuần cất giữ ở 25°C. Mỗi cột trong FIG. 3a thể hiện tỷ lệ phần trăm lưu giữ của thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài so với giá trị ban đầu.

FIG. 3b là biểu đồ thể hiện kết quả thu được bằng cách đánh giá độ ổn định của thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài theo loại rượu đường và có mặt hoặc không có mặt của chất đẳng trương bằng SE-HPLC trong Ví dụ 4 sau 0-4 tuần cất giữ ở 25°C. Mỗi cột trong FIG. 3b thể hiện tỷ lệ phần trăm lưu giữ của thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài so với giá trị ban đầu.

FIG. 3c là biểu đồ thể hiện kết quả thu được bằng cách đánh giá độ ổn định của thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài theo loại rượu đường và có mặt hoặc không có mặt của chất đẳng trương bằng RP-HPLC trong Ví dụ 4 sau 0-4 tuần cất giữ ở 25°C. Mỗi cột trong FIG. 3c thể hiện tỷ lệ phần trăm lưu giữ của thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài so với giá trị ban đầu.

FIG. 4a là biểu đồ thể hiện kết quả thu được bằng cách đánh giá độ ổn định của thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài theo nồng độ của rượu đường bằng IE-HPLC trong Ví dụ 5 sau 0-4 tuần cất giữ ở 25°C. Mỗi cột trong FIG. 4a thể hiện tỷ lệ phần trăm lưu giữ của thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài so với giá trị ban đầu.

FIG. 4b là biểu đồ thể hiện kết quả thu được bằng cách đánh giá độ ổn định của thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài theo nồng độ của rượu đường bằng SE-HPLC trong Ví dụ 5 sau 0-4 tuần cất giữ ở 25°C. Mỗi cột trong FIG. 4b thể hiện tỷ lệ phần trăm lưu giữ của thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài so với giá trị ban đầu.

FIG. 4c là biểu đồ thể hiện kết quả thu được bằng cách đánh giá độ ổn định của thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài theo nồng độ của rượu đường bằng RP-HPLC trong Ví dụ 5 sau 0-4 tuần cất giữ ở 25°C. Mỗi cột trong FIG. 4c

thể hiện tỷ lệ phần trăm lưu giữ của thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài so với giá trị ban đầu.

FIG. 5a là biểu đồ thể hiện kết quả thu được bằng cách đánh giá độ ổn định của thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài theo nồng độ của chất hoạt động bề mặt và có mặt hoặc không có mặt của axit amin bằng IE-HPLC trong Ví dụ 6 sau 0-4 tuần cất giữ ở 25°C. Mỗi cột trong FIG. 5a thể hiện tỷ lệ phần trăm lưu giữ của thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài so với giá trị ban đầu.

FIG. 5b là biểu đồ thể hiện kết quả thu được bằng cách đánh giá độ ổn định của thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài theo nồng độ của chất hoạt động bề mặt và có mặt hoặc không có mặt của axit amin bằng SE-HPLC trong Ví dụ 6 sau 0-4 tuần cất giữ ở 25°C. Mỗi cột trong FIG. 5b thể hiện tỷ lệ phần trăm lưu giữ của thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài so với giá trị ban đầu.

FIG. 5c là biểu đồ thể hiện kết quả thu được bằng cách đánh giá độ ổn định của thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài theo nồng độ của chất hoạt động bề mặt và có mặt hoặc không có mặt của axit amin bằng RP-HPLC trong Ví dụ 6 sau 0-4 tuần cất giữ ở 25°C. Mỗi cột trong FIG. 5c thể hiện tỷ lệ phần trăm lưu giữ của thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài so với giá trị ban đầu.

FIG. 6a là biểu đồ thể hiện kết quả thu được bằng cách đánh giá độ ổn định của thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài theo độ pH và nồng độ của rượu đường bằng IE-HPLC trong Ví dụ 7 sau 0-4 tuần cất giữ ở 25°C. Mỗi cột trong FIG. 6a thể hiện tỷ lệ phần trăm lưu giữ của thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài so với giá trị ban đầu.

FIG. 6b là biểu đồ thể hiện kết quả thu được bằng cách đánh giá độ ổn định của thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài theo độ pH và nồng độ của rượu đường bằng SE-HPLC trong Ví dụ 7 sau 0-4 tuần cất giữ ở 25°C. Mỗi cột trong FIG. 6b thể hiện tỷ lệ phần trăm lưu giữ của thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài so với giá trị ban đầu.

FIG. 6c là biểu đồ thể hiện kết quả thu được bằng cách đánh giá độ ổn định của thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài theo độ pH và nồng độ của rượu đường bằng RP-HPLC trong Ví dụ 7 sau 0-4 tuần cất giữ ở 25°C. Mỗi cột trong FIG. 6c thể hiện tỷ lệ phần trăm lưu giữ của thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài so với giá trị ban đầu.

FIG. 7a là biểu đồ thể hiện kết quả thu được bằng cách đánh giá độ ổn định của thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài theo độ pH và loại dung dịch đệm rượu bằng IE-HPLC trong Ví dụ 8 sau 0-4 tuần cất giữ ở 25°C. Mỗi cột trong

FIG. 7a thể hiện tỷ lệ phần trăm lưu giữ của thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài so với giá trị ban đầu.

FIG. 7b là biểu đồ thể hiện kết quả thu được bằng cách đánh giá độ ổn định của thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài theo độ pH và loại dung dịch đệm rượu bằng SE-HPLC trong Ví dụ 8 sau 0-4 tuần cất giữ ở 25°C. Mỗi cột trong FIG. 7b thể hiện tỷ lệ phần trăm lưu giữ của thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài so với giá trị ban đầu.

FIG. 7c là biểu đồ thể hiện kết quả thu được bằng cách đánh giá độ ổn định của thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài theo độ pH và loại dung dịch đệm rượu bằng RP-HPLC trong Ví dụ 8 sau 0-4 tuần cất giữ ở 25°C. Mỗi cột trong FIG. 7c thể hiện tỷ lệ phần trăm lưu giữ của thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài so với giá trị ban đầu.

FIG. 8a là biểu đồ thể hiện kết quả thu được bằng cách đánh giá độ ổn định của thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài theo có mặt hoặc không có mặt của chất bảo quản và nồng độ của oxyntomodulin có tác dụng kéo dài bằng IE-HPLC trong Ví dụ 9 sau 0-4 tuần cất giữ ở 25°C. Mỗi cột trong FIG. 8a thể hiện tỷ lệ phần trăm lưu giữ của thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài so với giá trị ban đầu.

FIG. 8b là biểu đồ thể hiện kết quả thu được bằng cách đánh giá độ ổn định của thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài theo có mặt hoặc không có mặt của chất bảo quản và nồng độ của oxyntomodulin có tác dụng kéo dài bằng SE-HPLC trong Ví dụ 9 sau 0-4 tuần cất giữ ở 25°C. Mỗi cột trong FIG. 8b thể hiện tỷ lệ phần trăm lưu giữ của thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài so với giá trị ban đầu.

FIG. 8c là biểu đồ thể hiện kết quả thu được bằng cách đánh giá độ ổn định của thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài theo có mặt hoặc không có mặt của chất bảo quản và nồng độ của oxyntomodulin có tác dụng kéo dài bằng RP-HPLC trong Ví dụ 9 sau 0-4 tuần cất giữ ở 25°C. Mỗi cột trong FIG. 8c thể hiện tỷ lệ phần trăm lưu giữ của thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài so với giá trị ban đầu.

Mô tả chi tiết sáng chế

Để đạt được các mục đích nêu trên, theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất được phẩm dạng lỏng chứa thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài, chứa lượng hữu hiệu có tác dụng được lý của thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài trong đó peptit oxyntomodulin có tác động sinh lý được liên kết với vùng

Fc của globulin miễn dịch; và chất làm ổn định không chứa albumin, trong đó chất làm ổn định chứa dung dịch đệm, rượu đường và chất hoạt động bề mặt không ion.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "dược phẩm dạng lỏng" dùng để chỉ chế phẩm thuốc được bào chế thành dạng lỏng và được dự định bao hàm tất cả các dược phẩm dạng lỏng để dùng bên trong và để dùng bên ngoài. Trong tình trạng kỹ thuật chưa biết đến dược phẩm dạng lỏng theo sáng chế chứa lượng hữu hiệu có tác dụng dược lý của thể liên hợp oxyntomodulin bao gồm oxyntomodulin được liên kết với miễn Fc globulin miễn dịch theo sáng chế. Do vậy, dược phẩm dạng lỏng theo sáng chế có thể chứa lượng hữu hiệu có tác dụng dược lý của thể liên hợp oxyntomodulin bao gồm oxyntomodulin được liên kết với miễn Fc globulin miễn dịch, và chất làm ổn định không chứa albumin, trong đó chất làm ổn định chứa dung dịch đệm, rượu đường và chất hoạt động bề mặt không ion. Ngoài ra, dược phẩm dạng lỏng theo sáng chế có thể còn chứa chất bảo quản.

Theo sáng chế, chất làm ổn định có thể còn chứa một hoặc nhiều hợp phần được chọn từ nhóm bao gồm chất đẳng trương, đường, rượu polyhydric, và axit amin. Rượu đường có thể là một hoặc nhiều chất được chọn từ nhóm bao gồm mannitol, sorbitol và glyxerol, và nồng độ của rượu đường trong dược phẩm dạng lỏng này có thể là 2-15% (khối lượng/thể tích). Ngoài ra, dung dịch đệm có thể là một hoặc nhiều dung dịch được chọn từ nhóm bao gồm xitrat, axetat, histidin và dung dịch đệm phosphat và có thể có độ pH nằm trong khoảng từ 4,5 đến 7,0. Chất đẳng trương có thể là natri clorua, và chất hoạt động bề mặt không ion có thể là polysorbat hoặc poloxame và có mặt ở nồng độ là 0,001%-0,1% (khối lượng/thể tích). Axit amin có thể là metionin. Do vậy, dược phẩm dạng lỏng theo sáng chế có thể chứa chất làm ổn định chứa dung dịch đệm có độ pH nằm trong khoảng từ 4,8 đến 6,0, một hoặc nhiều rượu đường được chọn từ nhóm bao gồm mannitol và sorbitol, và polysorbat 20.

Ngoài ra, dược phẩm dạng lỏng theo sáng chế có thể còn chứa một hoặc nhiều chất bảo quản được chọn từ nhóm bao gồm m-cresol, phenol và rượu benzylic. Nồng độ của chất bảo quản trong dược phẩm dạng lỏng này có thể là 0,001%-1% (khối lượng/thể tích).

Đặc biệt là, dược phẩm dạng lỏng theo sáng chế có thể chứa lượng hữu hiệu có tác dụng dược lý của thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài, 5-50 mM histidin, 2-15% (khối lượng/thể tích) mannitol, 0,01-1 mg/mL metionin và 0,001%-0,1% (khối lượng/thể tích) polysorbat 20. Ngoài các hợp phần này, dược phẩm dạng lỏng này có thể còn chứa 0,001%-1% (khối lượng/thể tích) m-cresol.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "chất làm ổn định" dùng để chỉ chất duy trì ổn định của các thành phần như hoạt chất trong khoảng thời gian cụ thể. Nhằm mục đích sáng chế, thuật ngữ này dùng để chỉ chất có thể làm cho thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài được lưu giữ ổn định. Độ ổn định cất giữ của các protein như thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài quan trọng là không những đảm bảo liều lượng chính xác, mà còn ức chế được việc tạo ra tiềm năng chất kháng nguyên cho thể liên hợp oxyntomodulin.

Tốt hơn là, chất làm ổn định theo sáng chế chứa dung dịch đệm, rượu đường và chất hoạt động bề mặt không ion để tạo ra độ ổn định cho thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài. Ngoài ra, tốt hơn là chất làm ổn định có thể còn chứa một hoặc nhiều hợp phần được chọn từ nhóm bao gồm chất đẳng trương, đường, rượu polyhydric và axit amin.

Dung dịch đệm hoạt động chức năng để duy trì độ pH của dược phẩm dạng lỏng này sao cho độ pH của dược phẩm dạng lỏng này không thay đổi một cách nhanh chóng sao cho tạo ra thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài ổn định. Ví dụ về dung dịch đệm có thể bao gồm dung dịch đệm có độ pH chấp nhận được trong dược phẩm, bao gồm muối kiềm (natri phosphat, kali phosphat, hoặc muối hydro hoặc dihydro của chúng), natri xitrat, axit xitric, natri axetat, axetic axit, và histidin, hoặc hỗn hợp của các dung dịch đệm này cũng có thể được sử dụng. Tốt hơn, nếu dung dịch đệm là dung dịch đệm xitrat hoặc histidin, và tốt hơn nữa nếu là dung dịch đệm histidin. Tốt hơn, nếu nồng độ của dung dịch đệm là 5-100 mM, và tốt hơn nữa là 5-50 mM. Tốt hơn, nếu pH của dung dịch đệm là 4,0-8,0, tốt hơn nữa là 4,5-7,0, và còn tốt hơn nữa là 5,0-6,0.

Theo một ví dụ của sáng chế, độ ổn định của thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài theo độ pH của dung dịch đệm của dược phẩm dạng lỏng này được đo. Tức là, sau khi thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài được lưu giữ ở 25°C trong 0-4 tuần trong khi làm thay đổi pH của dung dịch đệm, lượng còn lại của thể liên hợp được phân tích, và do đó đã cho thấy rằng thể liên hợp oxyntomodulin ổn định hơn ở độ pH 5,6, độ pH 5,8 và độ pH 6,0 (Ví dụ 3, các Bảng 2 đến 5, Ví dụ 7, các Bảng 18 đến 21, Ví dụ 8 và các Bảng 22 đến 25). Do vậy, đã thấy rằng độ pH của dung dịch đệm ổn định nhất theo sáng chế nằm trong khoảng từ 5,0 đến 6,0. Theo một ví dụ của sáng chế, độ ổn định của thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài theo loại dung dịch đệm của dược phẩm dạng lỏng này được đo. Cụ thể, sau khi thể liên hợp oxyntomodulin được lưu giữ bằng polysorbat 20 0,02%, 0,1 mg/mL metionin và Mannitol 5% ở 25°C trong 0-4 tuần, lượng còn lại của thể liên hợp được phân tích. Các kết quả của phân tích SE-HPLC

đã chỉ ra rằng lượng còn lại của thể liên hợp không khác đáng kể giữa các dung dịch đệm ở cùng độ pH. Các kết quả của phân tích IE-HPLC hoặc RP-HPLC đã chỉ ra rằng histidin ổn định nhất ở cùng độ pH (Ví dụ 8 và các Bảng 22 đến 25).

Rượu đường hoạt động chức năng để làm tăng độ ổn định của thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài. Theo sáng chế, rượu đường có thể là một hoặc nhiều rượu đường được chọn từ nhóm bao gồm mannitol, sorbitol và glyxerol. Tốt hơn, nếu rượu đường có thể là mannitol. Tốt hơn, nếu nồng độ của rượu đường trong dược phẩm dạng lỏng này 1-20% (khối lượng/thể tích), và tốt hơn nữa là 2-15% (khối lượng/thể tích).

Theo một ví dụ của sáng chế, sự ảnh hưởng của loại rượu đường dưới dạng chất làm ổn định đối với độ ổn định của thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài được phân tích. Cụ thể, thể liên hợp oxyntomodulin được lưu giữ trong dung dịch đệm xitrat (độ pH 5,6) ở 25°C trong 0-4 tuần, và sau đó được phân tích bằng IE-HPLC, SE-HPLC và RP-HPLC. Do đó, thể liên hợp ổn định hơn với sự có mặt của mannitol hoặc sorbitol so với sự có mặt của glyxerol ở cùng nồng độ. Các kết quả của phân tích RP-HPLC đã chỉ ra rằng với sự có mặt của mannitol thì thể liên hợp ổn định hơn một chút so với sự có mặt của sorbitol (Ví dụ 4 và các Bảng 6 đến 9). Nói cách khác, đã cho thấy rằng việc bổ sung mannitol hoặc sorbitol có độ ổn định tuyệt vời, nhưng thể liên hợp là ổn định nhất với sự có mặt của mannitol.

Theo một ví dụ của sáng chế, sự ảnh hưởng của nồng độ của rượu đường khi làm chất làm ổn định đối với độ ổn định của thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài được thử nghiệm. Cụ thể, thể liên hợp oxyntomodulin được lưu giữ ở 25°C trong 0-4 tuần, và sau đó được phân tích bằng IE-HPLC, SE-HPLC và RP-HPLC. Do đó, với sự có mặt của Mannitol 2% hoặc Mannitol 15%, tạo ra protein kết tủa, và với sự có mặt của Mannitol 5% hoặc Mannitol 10%, thể liên hợp là ổn định (Ví dụ 5, các Bảng 10 đến 13, Ví dụ 7 và các Bảng 18 đến 21).

Chất hoạt động bề mặt không ion hoạt động chức năng để làm giảm sức căng bề mặt của dung dịch protein nhằm ngăn ngừa protein tránh bị hấp phụ vào bề mặt kỵ nước hoặc tránh bị kết tụ. Ví dụ được ưu tiên về chất hoạt động bề mặt không ion có thể được sử dụng theo sáng chế bao gồm chất hoạt động bề mặt không ion nền polysorbat và chất hoạt động bề mặt không ion nền poloxame, có thể được sử dụng riêng rẽ hoặc kết hợp của hai hoặc nhiều chất hoạt động bề mặt. Không phải hoàn toàn chất hoạt động bề mặt không ion được sử dụng trong dược phẩm dạng lỏng này ở các nồng độ cao. Dược phẩm dạng lỏng theo sáng chế chứa chất hoạt động bề mặt không ion ở nồng độ là 0,2% (khối lượng/thể tích) hoặc nhỏ hơn, và tốt hơn là 0,001%-0,1% (khối lượng/thể tích).

Chất làm ổn định theo sáng chế có thể chứa axit amin như metionin. Metionin hoạt động chức năng để làm ổn định thêm protein bằng cách ức chế việc tạo ra các tạp chất có thể do, ví dụ, phản ứng oxy hóa protein gây ra.

Theo một ví dụ của sáng chế, sự ảnh hưởng của nồng độ của chất hoạt động bề mặt không ion khi làm chất làm ổn định và có mặt hoặc không có mặt của axit amin đến độ ổn định của thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài được thử nghiệm. Cụ thể, thể liên hợp oxyntomodulin được lưu giữ trong dung dịch đệm xitrat (pH 5,6) và Mannitol 10% ở 25°C trong 0-4 tuần, và sau đó được phân tích bằng IE-HPLC, SE-HPLC và RP-HPLC. Do đó, thể liên hợp oxyntomodulin là ổn định nhất với sự có mặt của polysorbat 20 0,02% và 0,1 mg/mL metionin (Ví dụ 6 và các Bảng 14 đến 17).

Chất đẳng trương hoạt động chức năng để duy trì áp suất thẩm thấu ở mức thích hợp khi dùng thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài trong dung dịch *in vivo* và có thể hoạt động chức năng khác nữa để làm ổn định tiếp thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài trong dung dịch. Ví dụ tiêu biểu về chất đẳng trương bao gồm muối vô cơ dễ hòa tan trong nước như natri clorua, natri sulfat, natri xitrat và các muối tương tự. Tốt hơn là, nồng độ của chất đẳng trương là 0-200 mM, và hàm lượng của chúng có thể được kiểm soát một cách phù hợp.

Tốt hơn là, chất làm ổn định theo sáng chế không chứa albumin. Albumin huyết thanh người có thể được sử dụng làm chất làm ổn định protein được điều chế từ máu người, và do đó có thể bị nhiễm virus gây bệnh cho người, và gelatin hoặc albumin huyết thanh bò có thể gây ra các bệnh lý hoặc có thể gây ra phản ứng dị ứng ở một số bệnh nhân. Chất làm ổn định không chứa albumin theo sáng chế không chứa protein ngoại lai như albumin huyết thanh người hoặc động vật hoặc gelatin tinh chế, và do đó không miễn cảm với sự nhiễm khuẩn virus.

Ví dụ được ưu tiên về đường trong số các đường và rượu polyhydric có thể được sử dụng bổ sung để làm tăng độ ổn định cất giữ của thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài bao gồm monosaccarit như mannoza, glucoza, fucoza và xyloza, và polysaccarit như lactoza, maltoza, sucroza, rafinoza và dextran, và ví dụ được ưu tiên về rượu polyhydric bao gồm polypropylen, polyetylen glycol có khối lượng phân tử thấp, glyxerol, polypropylen glycol có khối lượng phân tử thấp và các hợp chất tương tự. Các đường và rượu polyhydric này có thể được sử dụng riêng rẽ hoặc kết hợp của hai hoặc nhiều đường và rượu.

Ngoài dung dịch đệm, chất đẳng trương, rượu đường, axit amin và chất hoạt động bề mặt không ion nêu trên, được phẩm dạng lỏng theo sáng chế có thể còn

chứa các hợp phần khác hoặc các chất đã biết trong lĩnh vực này với lượng không làm ảnh hưởng đến hiệu quả của sáng chế.

Dược phẩm dạng lỏng theo sáng chế chứa thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài chứa lượng hữu hiệu có tác dụng dược lý của thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài bao gồm peptit oxyntomodulin có tác động sinh lý được liên kết với vùng Fc của globulin miễn dịch, và chất làm ổn định không chứa albumin, trong đó chất làm ổn định có thể chứa dung dịch đệm có độ pH nằm trong khoảng từ 4,8 đến 7,0, một hoặc nhiều rượu đường được chọn từ nhóm bao gồm mannitol và sorbitol, và polysorbat 20. Đặc biệt hơn, chất làm ổn định có thể chứa dung dịch đệm có độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 6,0, mannitol và polysorbat 20. Ngoài ra, chất làm ổn định có thể còn chứa một hoặc nhiều hợp phần được chọn từ nhóm bao gồm chất đẳng trương, đường, rượu polyhydric và axit amin.

Dược phẩm dạng lỏng theo sáng chế không chứa albumin chứa nồng độ cao của thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài, mang lại độ ổn định cho thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài, không miễn cảm với nhiễm khuẩn virus, là đơn giản và có độ ổn định cất giữ rất tốt, và do đó có thể được tạo ra theo cách hiệu quả về kinh tế so với các chất làm ổn định khác hoặc chế phẩm đông khô nhanh.

Ngoài ra, do dược phẩm dạng lỏng theo sáng chế chứa thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài có tác động sinh lý trong khoảng thời gian dài so với oxyntomodulin tự nhiên, nó có thể duy trì protein hoạt tính ở người trong khoảng thời gian dài so với chế phẩm oxyntomodulin thông thường, và do đó có thể được sử dụng làm chế phẩm thuốc hiệu quả. Ngoài ra, dược phẩm dạng lỏng theo sáng chế mang lại độ ổn định rất tốt ngay cả ở nồng độ cao của thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "oxyntomodulin" dùng để chỉ peptit được tạo ra từ pre-glucagon là tiền chất của glucagon. Theo sáng chế, oxyntomodulin nghĩa là bao gồm oxyntomodulin tự nhiên và tiền chất, dẫn xuất, mảnh và biến thể của nó. Tốt hơn là, oxyntomodulin có trình tự axit amin là SEQ ID NO: 1 (HSQGTFTSDYSKYLDSSRAQDFVQWLMNTRNRNIA).

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "dẫn xuất oxyntomodulin" nghĩa là bao hàm peptit, dẫn xuất peptit hoặc chất giả peptit thu được bằng cách bổ sung, làm khuyết đoạn hoặc thay thế axit amin trong trình tự axit amin là oxyntomodulin và có thể hoạt hóa glucagon và các thụ thể GLP-1 ở mức cao hơn so với mức được hoạt hóa bởi oxyntomodulin tự nhiên. Theo sáng chế, dẫn xuất oxyntomodulin có thể có một

trong các trình tự axit amin bất kỳ là SEQ ID NOS: 2 đến 34. Tốt hơn là, dẫn xuất oxyntomodulin có thể có trình tự axit amin là SEQ ID NO: 23 hoặc 25. Tốt hơn nữa là, nó có thể có trình tự axit amin là SEQ ID NO: 25.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "mảnh oxyntomodulin" dùng để chỉ mảnh có một hoặc nhiều axit amin ở đầu tận cùng amino hoặc carboxyl của oxyntomodulin tự nhiên, trong đó axit amin bổ sung cũng có thể là axit amin không tự nhiên (ví dụ, axit amin dạng D). Mảnh oxyntomodulin này có chức năng điều hòa mức glucoza huyết *in vivo*.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "biến thể oxyntomodulin" dùng để chỉ peptit có một hoặc nhiều gốc axit amin khác với các gốc trình tự axit amin là oxyntomodulin tự nhiên và có chức năng hoạt hóa thụ thể GLP-1 và glucagon. Biến thể oxyntomodulin có thể được điều chế bằng một trong số các cách thay thế, bổ sung, làm khuyết đoạn, cải biến, hoặc kết hợp các cách này một số axit amin trong trình tự axit amin là oxyntomodulin tự nhiên.

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

Axit amin được nêu trong bản mô tả được viết tắt theo quy định về danh pháp của IUPAC-IUB như sau:

Alanin A;	Arginin R;
Asparagin N;	Axit spartic D;
Xystein C;	Axit glutamic E;
Glutamin Q;	Glyxin G;
Histidin H;	Isoleuxin I;
Leuxin L;	Lysin K;
Metionin M;	Phenylalanin F
Prolin P;	Serin S;
Threonin T;	Tryptophan W;
Tyrosin Y;	Valin V.

Theo sáng chế, dẫn xuất oxyntomodulin bao hàm peptit bất kỳ, được tạo ra bằng cách cải biến thay thế, bổ sung, làm khuyết đoạn hoặc sau phiên mã (ví dụ, metyl hóa, axyl hóa, ubiquitin hóa, hoặc liên kết cộng hóa trị nội phân tử) axit amin trong trình tự axit amin là SEQ ID NO: 1 và có thể hoạt hóa cả thụ thể glucagon và thụ thể GLP-1. Đối với sự thay thế hoặc bổ sung axit amin, không những 20 axit

amin thường được phát hiện ở protein người, mà còn có thể sử dụng cả axit amin không điển hình hoặc axit amin không tự nhiên. Nguồn axit amin không điển hình thương mại bao gồm Sigma-Aldrich, ChemPep Inc., và Genzyme Pharmaceuticals. Peptit, bao gồm các axit amin này, và trình tự peptit không điển hình có thể được tổng hợp và mua từ các nhà cung cấp thương phẩm, ví dụ, American Peptide Company hoặc Bachem (Mỹ) hoặc Anygen (Hàn quốc).

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

Công thức 1

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

trong đó:

R1 là histidin, desamino-histidyl, dimetyl-histidyl (N-dimetyl-histidyl), beta-hydroxyimidazopropionyl, 4-imidazoaxetyl, beta-carboxy imidazopropionyl hoặc tyrosin;

X1 là Aib (axit aminosioibutyric), d-alanin, glyxin, Sar (N-metylglyxin), 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 metionin;

X8 là axit spartic hoặc axit glutamic;

X9 là axit glutamic, serin hoặc axit alpha-metyl-glutamic hoặc được tìm thấy;

X10 là glutamin, axit glutamic, lysin, arginin hoặc serin hoặc được tìm thấy;

X11 là alanin, arginin hoặc valin hoặc được tìm thấy;

X12 là alanin, arginin, serin hoặc valin hoặc được tìm thấy;

X13 là lysin, glutamin, arginin hoặc axit alpha-metyl-glutamic hoặc được tìm thấy;

X14 là axit spartic, axit glutamic hoặc leuxin hoặc được tìm thấy;

X15 là phenylalanin hoặc được tìm thấy;

X16 là isoleuxin hoặc valin hoặc được tìm thấy;

X17 là alanin, xystein, axit glutamic, lysin, glutamin hoặc axit alpha-metyl-glutamic hoặc được tìm thấy;

X18 là tryptophan hoặc được tìm thấy;

X19 là alanin, isoleuxin, leuxin, serin hoặc valin hoặc được tìm thấy;

X20 là alanin, lysin, metionin, glutamin hoặc arginin hoặc được tìm thấy;

X21 là asparagin hoặc được tìm thấy;

X22 là alanin, glyxin hoặc threonin hoặc được tìm thấy;

X23 là xystein hoặc lysin hoặc được tìm thấy;

X24 là peptit có 2 đến 10 axit amin chứa hỗn hợp của alanin, glyxin và serin hoặc được tìm thấy; và

R2 là KRNRRNNIA (SEQ ID NO: 35), GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 36), GPSSGAPPPSK (SEQ ID NO: 37), HSQGTFTSDYSKYLD (SEQ ID NO: 38), HSQGTFTSDYSRYLDK (SEQ ID NO: 39), HGEGTFTSDLSKQMEEEA VK (SEQ ID NO: 40) hoặc được tìm thấy (ngoại trừ trường hợp trong đó trình tự axit amin có công thức 1 giống với trình tự được nêu trong SEQ ID NO: 1).

Để làm tăng hoạt tính của oxyntomodulin dạng đại for thụ thể glucagon và thụ thể GLP-1, dẫn xuất oxyntomodulin theo sáng chế có thể được thể bằng 4-imidazoaxetyl thu được bằng cách làm khuyết đoạn cacbon alpha của histidin ở vị trí 1 của trình tự axit amin có trình tự SEQ ID NO: 1, desamino-histidyl thu được bằng cách khuyết đoạn nhóm amino đầu tận cùng N, dimetyl-histidyl (N-dimetyl-histidyl) thu được bằng cách cải biến nhóm amino đầu tận cùng N bằng hai nhóm methyl, beta-hydroxy imidazopropionyl thu được bằng cách thay thế nhóm amino đầu tận cùng N bằng nhóm hydroxyl, hoặc beta-carboxy imidazopropionyl thu được bằng cách thay thế nhóm amino đầu tận cùng N bằng nhóm carboxyl. Ngoài ra, vùng gắn kết thụ thể GLP-1 có thể được thể bằng axit amin làm tăng cường các liên kết ion và kỵ nước hoặc kết hợp của chúng. Ngoài ra, phần trình tự oxyntomodulin có thể được thể bằng trình tự axit amin là GLP-1 hoặc exendin-4 để làm tăng hoạt tính của thụ thể GLP-1.

Ngoài ra, phần trình tự oxyntomodulin có thể được thể bằng trình tự làm tăng cường dạng xoắn ốc alpha. Tốt hơn là, 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 thể bằng axit amin hoặc dẫn xuất của axit amin chứa 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) đã biết làm ổn định dạng xoắn ốc alpha, và dạng và số lượng axit amin làm ổn định dạng xoắn ốc alpha hoặc dẫn xuất của axit amin được cài xen là không giới hạn. Tốt hơn là, axit amin ở các vị trí 10 và 14, 12 và 16, 16 và 20, 20 và 24, và 24 và 28 của trình tự axit amin cũng có thể được thể bằng axit glutamic hoặc lysin sao cho tạo ra vòng, và số lượng vòng được cài xen là không giới hạn. Tốt nhất là, dẫn xuất

oxyntomodulin có thể có trình tự axit amin được chọn từ các trình tự trong số các công thức 2 đến 6 sau.

Theo phương án cụ thể, dẫn xuất oxyntomodulin theo sáng chế là peptit mới bao gồm trình tự axit amin có công thức 2 sau, thu được bằng cách thay thế trình tự axit amin là oxyntomodulin bằng trình tự của exendin hoặc GLP-1:

Công thức 2

R1-A-R3

Theo phương án cụ thể khác, dẫn xuất oxyntomodulin theo sáng chế là peptit mới bao gồm trình tự axit amin có công thức 3 sau, được điều chế bằng cách liên kết phần trình tự axit amin là oxyntomodulin và phần trình tự axit amin là exendin hoặc GLP-1 qua cầu nối axit amin phù hợp:

Công thức 3

R1-B-C-R4

Theo phương án cụ thể khác nữa, dẫn xuất oxyntomodulin theo sáng chế là peptit mới bao gồm trình tự axit amin có công thức 4 sau, trong đó phần trình tự axit amin là oxyntomodulin được thế bằng axit amin làm tăng cường sự gắn kết kỵ nước với thụ thể GLP-1. Ví dụ, chính peptit có Leu ở vị trí 26 được thế bằng axit amin Ile hoặc Val làm tăng tính kỵ nước.

Công thức 4

R1-SQGTFTSDYSKYLD-D1-D2-D3-D4-D5-LFVQW-D6-D7-N-D8-R3

Theo phương án cụ thể khác nữa, dẫn xuất oxyntomodulin theo sáng chế là peptit mới bao gồm trình tự axit amin có công thức 5 sau, trong đó phần trình tự axit amin là oxyntomodulin tự nhiên được phát hiện, được bổ sung, hoặc được thế bằng axit amin khác để làm tăng khả năng của oxyntomodulin tự nhiên để hoạt hóa thụ thể GLP-1 và thụ thể glucagon:

Công thức 5

R1-E1-QGTFTSDYSKYLD-E2-E3-RA-E4-E5-FV-E6-WLMNT-E7-R5

Trong các công thức 2 đến 5, R1 là như được mô tả trong công thức 1;

A được chọn từ nhóm bao gồm:

SQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNT	(SEQ ID NO: 41),
SQGTFTSDYSKYLDDEEAVRLFIEWLMNT	(SEQ ID NO: 42),
SQGTFTSDYSKYLDERRAQDFVAWLKNT	(SEQ ID NO: 43),
GQGTFTSDYSRYLEEEAVRLFIEWLKNG	(SEQ ID NO: 44),
GQGTFTSDYSRQMEEAVRLFIEWLKNG	(SEQ ID NO: 45),
GEGTFTSDLSRQMEEAVRLFIEWAA	(SEQ ID NO: 46), và
SQGTFTSDYSRQMEEAVRLFIEWLMNG	(SEQ ID NO: 47);

B được chọn từ nhóm bao gồm:

SQGTFTSDYSKYLD	SRRAQDFVQWLMNT	(SEQ ID NO: 41),
SQGTFTSDYSKYLD	DEEAVRLFIEWLMNT	(SEQ ID NO: 42),
SQGTFTSDYSKYLD	ERRAQDFVAWLKNT	(SEQ ID NO: 43),
GQGTFTSDYSRYL	EEEEAVRLFIEWLKNG	(SEQ ID NO: 44),
GQGTFTSDYSRQM	EEEEAVRLFIEWLKNG	(SEQ ID NO: 45),
GEGTFTSDLSRQM	EEEEAVRLFIEWAA	(SEQ ID NO: 46),
SQGTFTSDYSRQM	EEEEAVRLFIEWLMNG	(SEQ ID NO: 47),
GEGTFTSDLSRQM	EEEEAVRLFIEW	(SEQ ID NO: 48), và
SQGTFTSDYSRYLD		(SEQ ID NO: 49);

C là peptit có 2 đến 10 axit amin chứa hỗn hợp của 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 metionin, 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 spartic hoặc axit glutamic;

E6 là glutamin, xystein hoặc lysin;

E7 là xystein hoặc lysin hoặc được tìm thấy;

R3 là KRNRNNIA (SEQ ID NO: 35), GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 36) hoặc GPSSGAPPPSK (SEQ ID NO: 37);

R4 là HSQGTFTSDYSKYLD (SEQ ID NO: 38), HSQGTFTSDYSRYLDK (SEQ ID NO: 39) hoặc HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVK (SEQ ID NO: 40); và,

R5 là KRNRNNIA (SEQ ID NO: 35), GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 36) hoặc GPSSGAPPPSK (SEQ ID NO: 37) hoặc được phát hiện (ngoại trừ trường hợp trong đó trình tự axit amin có các công thức 2 đến 5 là giống với trình tự SEQ ID NO: 1).

Tốt hơn là, dẫn xuất oxyntomodulin theo sáng chế có thể là peptit mới có công thức 6 sau:

Công thức 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

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

X1 là Aib(axit aminosobutyric), glyxin hoặc 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 metionin;

X8 là axit spartic hoặc axit glutamic;

X9 là axit glutamic hoặc axit alpha-metyl-glutamic hoặc được tìm thấy;

X10 là glutamin, axit glutamic, lysin hoặc arginin hoặc được tìm thấy;

X11 là alanin hoặc arginin hoặc được tìm thấy;

X12 là alanin hoặc valin hoặc được tìm thấy;

X13 là lysin, glutamin, arginin hoặc axit alpha-metyl-glutamic hoặc được tìm thấy;

X14 là axit spartic, axit glutamic hoặc leuxin hoặc được tìm thấy;

X15 là phenylalanin hoặc được tìm thấy;

X16 là isoleuxin hoặc valin hoặc được tìm thấy;

X17 là alanin, xystein, axit glutamic, glutamin hoặc axit alpha-metyl-glutamic hoặc được tìm thấy;

X18 là tryptophan hoặc được tìm thấy;

X19 là alanin, isoleuxin, leuxin hoặc valin hoặc được tìm thấy;

X20 là alanin, lysin, metionin hoặc arginin hoặc được tìm thấy;

X21 là asparagin hoặc được tìm thấy;

X22 là threonin hoặc được tìm thấy;

X23 là xystein, lysin hoặc được tìm thấy;

X24 là peptit có 2 đến 10 axit amin chứa glyxin hoặc được tìm thấy; và

R2 là KRNRNNIA (SEQ ID NO: 35), GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 36), GPSSGAPPPSK (SEQ ID NO: 37), HSQGTFTSDYSKYLD (SEQ ID NO: 38), HSQGTFTSDYSRYLDK (SEQ ID NO: 39) hoặc HGEGTFTSDLSKQMEEAVK (SEQ ID NO: 40) hoặc được phát hiện (ngoại trừ trường hợp trong đó trình tự axit amin có công thức 6 là giống với trình tự SEQ ID NO: 1).

Tốt hơn nữa là, dẫn xuất oxyntomodulin theo sáng chế có thể được chọn từ nhóm bao gồm peptit có các SEQ ID NO: 2 đến 34. Còn tốt hơn nữa là, dẫn xuất oxyntomodulin theo sáng chế có thể là dẫn xuất oxyntomodulin được mô tả trong Bảng 1 của Ví dụ 1.

Oxyntomodulin có hoạt tính của hai peptit, GLP-1 và glucagon. GLP-1 có tác dụng làm giảm mức glucoza huyết bằng cách tiết insulin, nhưng glucagon có tác dụng làm tăng mức glucoza huyết. Ngoài ra, GLP-1 ức chế hấp thụ thức ăn và kìm hãm sự rỗng của dạ dày, và glucagon có tác dụng làm giảm trọng lượng cơ thể bằng cách tạo điều kiện thuận lợi quá trình phân giải lipid và làm tăng trao đổi năng lượng. Do vậy, GLP-1 và glucagon có hiệu quả sinh học khác nhau. Do vậy, trong trường hợp trong đó hai peptit có mặt dưới dạng thể liên hợp, nếu hiệu quả của một trong hai peptit bất kỳ là lớn hơn hiệu quả của peptit kia, tác dụng bất lợi có thể xảy ra. Ví dụ, nếu hiệu quả của glucagon là lớn hơn so với hiệu quả của GLP-1, mức glucoza huyết có thể tăng, và nếu hiệu quả của GLP-1 là lớn hơn so với hiệu quả của glucagon, tác dụng phụ như buồn nôn và nôn có thể xảy ra. Ngoài ra, hiệu quả của hai peptit có thể thay đổi tùy thuộc vào tỷ lệ của hoạt tính của hai peptit. Do vậy, dẫn xuất oxyntomodulin và thể liên hợp của chúng không chỉ giới hạn ở các dẫn xuất có hoạt tính tăng.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "thể liên hợp oxyntomodulin" dùng để chỉ thể liên hợp bao gồm oxyntomodulin và yếu tố khác. Yếu tố khác này có thể là chất bất kỳ có các chức năng có lợi, bao gồm làm tăng chu kỳ bán rã máu của oxyntomodulin hoặc làm trì hoãn quá trình giải phóng oxyntomodulin vào thận. Thể liên hợp theo sáng chế có thể gắn kết cộng hóa trị với oxyntomodulin hoặc tạo ra các vi cầu để làm tăng độ ổn định của huyết tương của oxyntomodulin hoặc làm trì hoãn quá trình giải phóng oxyntomodulin vào thận hoặc làm thay đổi hoạt tính gắn kết của oxyntomodulin với thụ thể của nó. Chất mang có thể tạo ra thể liên hợp bao gồm oxyntomodulin có thể được chọn từ nhóm bao gồm albumin, transferin, kháng thể, mảnh kháng thể, elastin, heparin, polysaccharit như kitin, fibronectin, và các chất mang tương tự, có thể gắn kết với oxyntomodulin để làm tăng độ ổn định của huyết tương của oxyntomodulin. Tốt hơn là, chất mang là vùng Fc của globulin miễn dịch.

Fc globulin miễn dịch có thể được sử dụng theo sáng chế có thể là Fc globulin miễn dịch của người, Fc globulin miễn dịch có trình tự của chất tương tự của chúng, hoặc Fc globulin miễn dịch có nguồn gốc từ động vật, bao gồm bò, dê, lợn, chuột nhắt, thỏ, chuột đồng, chuột nhắt và chuột lang. Ngoài ra, vùng Fc của globulin miễn dịch có thể có nguồn gốc từ IgG, IgA, IgD, IgE, IgM, hoặc hỗn hợp

hoặc thể lai của chúng. Ngoài ra, mỗi miền của vùng Fc của globulin miễn dịch theo sáng chế có thể là thể lai của miền có nguồn gốc từ các globulin miễn dịch khác nhau được chọn từ nhóm bao gồm IgG, IgA, IgD, IgE, và IgM. Theo cách khác, vùng Fc của globulin miễn dịch là dimer hoặc multimer chứa globulin miễn dịch mạch đơn bao gồm các miền có nguồn gốc giống nhau. Tốt hơn là, vùng Fc của globulin miễn dịch là vùng có nguồn gốc từ IgG hoặc IgM, là giàu nhất trong máu người. Tốt nhất là, chính Fc globulin miễn dịch có nguồn gốc từ IgG đã biết là làm tăng chu kỳ bán rã của liên kết phối tử-protein. Fc globulin miễn dịch có thể được điều chế bằng cách xử lý IgG tự nhiên bằng proteaza đặc hiệu hoặc từ các tế bào biến nạp bằng cách sử dụng công nghệ tái tổ hợp. Tốt hơn là, chính Fc globulin miễn dịch tái tổ hợp của người được điều chế trong *E. coli*.

Trong khi đó, IgG cũng có thể được phân loại tiếp thành IgG1, IgG2, IgG3 và IgG4, và theo sáng chế, hỗn hợp hoặc thể lai của các lớp phụ này cũng có thể được phân loại tiếp. Tốt hơn là, IgG là lớp phụ IgG2 và IgG4, và tốt nhất là, chính vùng Fc của IgG4 về cơ bản là thiếu chức năng hiệu ứng như tính gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể (CDC). Nói cách khác, vùng Fc của globulin miễn dịch được ưu tiên nhất được dùng làm chất mang thuốc theo sáng chế là vùng Fc không được glycosyl hóa có nguồn gốc từ IgG4 người. Vùng Fc có nguồn gốc từ người được ưu tiên hơn so với vùng Fc có nguồn gốc không phải từ người, có thể tác động như kháng nguyên ở người và gây ra các đáp ứng miễn dịch không mong muốn như tạo ra kháng thể mới chống lại kháng nguyên.

Theo sáng chế, thể liên hợp oxyntomodulin có thể được điều chế bằng cách sử dụng polyme không peptidyl hoặc bằng công nghệ tái tổ hợp gen. Tốt hơn là, thể liên hợp có thể được điều chế bằng cách liên kết oxyntomodulin với vùng Fc của globulin miễn dịch bằng polyme không peptidyl.

Polyme không peptidyl có thể được liên kết với mỗi oxyntomodulin và vùng Fc của globulin miễn dịch. Mỗi đầu kết thúc của polyme không peptidyl có thể được liên kết với vùng Fc của globulin miễn dịch và lần lượt nhóm amin hoặc thiol của dẫn xuất oxyntomodulin.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "thể liên hợp oxyntomodulin" dùng để chỉ thể liên hợp có hiệu quả kéo dài tăng so với oxyntomodulin tự nhiên. Ví dụ về thể liên hợp kéo dài bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, thể liên hợp trong đó dẫn xuất oxyntomodulin do sự cải biến, thay thế, bổ sung hoặc khuyết đoạn axit amin trong trình tự axit amin là oxyntomodulin tự nhiên được liên kết với polyme dễ phân hủy sinh học như polyetylen glycol (PEG), thể liên hợp trong đó protein có đặc tính kéo dài rất tốt, như albumin hoặc globulin miễn dịch, được liên kết với

oxyntomodulin, thể liên hợp trong đó axit béo có khả năng gắn kết với albumin *in vivo* được liên kết với oxyntomodulin, hoặc thể liên hợp trong đó oxyntomodulin được tạo nang trong các hạt nano để phân hủy sinh học.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “polyme không peptidyl” dùng để chỉ polyme tương hợp sinh học bao gồm hai hoặc nhiều đơn vị lặp lại được liên kết với với nhau bằng liên kết cộng hóa trị bất kỳ thay cho peptit liên kết. Theo sáng chế, polyme không peptidyl có thể được sử dụng hoán đổi cho nhau với cầu nối không peptidyl.

Cầu nối peptit được sử dụng trong protein dung hợp thu được bằng phương pháp dung hợp trong khung thông thường có nhược điểm là nó bị phân cắt một cách dễ dàng bởi proteinaza *in vivo*, và do đó không thể thu được hiệu quả mong muốn là làm tăng chu kỳ bán rã huyết thanh của hoạt được bằng chất mang. Tuy nhiên, theo sáng chế, polyme có tính kháng proteinaza có thể được sử dụng để duy trì chu kỳ bán rã huyết thanh của peptit, tương tự với chất mang. Vì vậy, polyme không peptidyl bất kỳ có thể được sử dụng mà không giới hạn phạm vi của sáng chế, chừng nào nó là polyme có chức năng nêu trên, tức là polyme có tính kháng proteinaza *in vivo*. Polyme không peptidyl có phân tử lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 100 kDa, và tốt hơn là nằm trong khoảng từ 1 đến 20 kDa. Polyme không peptidyl theo sáng chế, được liên kết với vùng Fc của globulin miễn dịch, có thể là một polyme hoặc hỗn hợp của các polyme khác nhau.

Polyme không peptidyl được sử dụng trong sáng chế có thể có nhóm phản ứng có khả năng gắn kết với vùng Fc của globulin miễn dịch và thuốc protein. Tốt hơn là, nhóm phản ứng ở cả hai đầu của polyme không peptidyl được chọn từ nhóm bao gồm nhóm aldehyt phản ứng, nhóm propionaldehyt, nhóm butyraldehyt, nhóm maleimit và dẫn xuất succinimit.

Dẫn xuất succinimit có thể là succinimidyl propionat, hydroxy succinimidyl, succinimidyl carboxymetyl, hoặc succinimidyl cacbonat. Đặc biệt là, khi polyme không peptidyl có nhóm aldehyt phản ứng ở cả hai đầu của nó, các phản ứng không đặc hiệu có thể được giảm đến mức tối thiểu, và polypeptit có tác động sinh lý và globulin miễn dịch có thể được gắn kết một cách hiệu quả lần lượt với cả hai đầu của polyme không peptidyl. Sản phẩm cuối được tạo ra bằng cách alkyl hóa khử bằng aldehyt liên kết ổn định hơn nhiều so với sản phẩm được liên kết bằng amit liên kết. Nhóm phản ứng aldehyt gắn kết chọn lọc với đầu tận cùng N ở độ pH thấp và có thể tạo ra liên kết cộng hóa trị với gốc lysin ở độ pH cao như độ pH 9,0.

Các nhóm phản ứng ở cả hai đầu của polyme không peptidyl có thể là giống nhau hoặc khác nhau. Ví dụ, polyme không peptidyl có thể có nhóm maleimit ở một đầu, và nhóm aldehyt, nhóm propionaldehyt hoặc nhóm butyraldehyt ở đầu kia. Khi polyetylen glycol có nhóm hydroxy phản ứng ở cả hai đầu của nó được dùng làm polyme không peptidyl, nhóm hydroxy có thể được hoạt hóa thành nhiều nhóm phản ứng khác nhau bằng các phản ứng hóa học đã biết, hoặc polyetylen glycol có nhóm phản ứng cải biến đang có trên thị trường có thể được sử dụng sao cho điều chế được thể liên hợp tác động kéo dài theo sáng chế.

Thể liên hợp theo sáng chế có thể là thể liên hợp trong đó mỗi đầu kết thúc của polyme không peptidyl được liên kết với lần lượt các vùng Fc của globulin miễn dịch và nhóm amin hoặc thiol của dẫn xuất oxyntomodulin.

Trong khi đó, theo sáng chế, cả hai đầu của polyme không peptidyl bao gồm nhóm phản ứng với vùng Fc của globulin miễn dịch và thuốc protein có thể gắn kết. Ví dụ về các nhóm phản ứng bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, nhóm aldehyt, nhóm propionaldehyt hoặc nhóm butyraldehyt, nhóm maleimit, dẫn xuất succinimit (succinimidyl propionat, succinimidyl hydroxyl, succinimidyl carboxymetyl hoặc succinimidyl cacbonat) và các nhóm phản ứng tương tự.

Các nhóm phản ứng ở cả hai đầu của cầu nối là polyme không peptidyl có thể là giống nhau hoặc khác nhau. Ví dụ, polyme không peptidyl có thể có nhóm maleimit ở một đầu và nhóm aldehyt, nhóm propionaldehyt hoặc nhóm butyraldehyt ở đầu kia. Ví dụ, khi polyme không peptidyl có nhóm aldehyt phản ứng ở một đầu và nhóm maleimit phản ứng ở đầu kia, các phản ứng không đặc hiệu có thể được giảm đến mức tối thiểu, và polypeptit có tác động sinh lý và globulin miễn dịch có thể được gắn kết hiệu quả với cả hai đầu của polyme không peptidyl. Polyme không peptidyl có thể được sử dụng theo sáng chế có thể được chọn từ nhóm bao gồm polyetylen glycol, polypropylen glycol, copolyme etylen glycol/propylen glycol, polyol được polyoxyetyl hóa, rượu polyvinyl, polysaccarit, dextran, polyvinyl etyl ete, polyme dễ phân hủy sinh học như PLA (poly(axit lactic)) và PLGA (axit polylactic-glycolic), polyme lipid, kitin, axit hyaluronic, và hỗn hợp của chúng. Tốt hơn, nếu, polyme không peptidyl là polyetylen glycol. Ngoài ra, các dẫn xuất của chúng là đã biết trong lĩnh vực này và các dẫn xuất có thể được điều chế một cách dễ dàng bằng cách phương pháp đã biết trong lĩnh vực này nằm trong phạm vi của sáng chế.

Theo một ví dụ của sáng chế, thể liên hợp được tổng hợp bằng cách liên kết oxyntomodulin hoặc dẫn xuất của nó với vùng Fc của globulin miễn dịch qua liên

kết cộng hóa trị bằng cách sử dụng polyme không peptidyl PEG bao gồm một nhóm propionaldehyt hoặc cải hai nhóm maleimide và nhóm aldehyt.

Thế liên hợp theo sáng chế có hoạt tính thụ thể GLP-1 và thụ thể glucagon rất tốt so với oxyntomodulin tự nhiên. Ngoài ra, đã ràng buộc rằng vùng Fc làm tăng chu kỳ bán rã máu *in vivo* của chúng để duy trì hoạt tính *in vivo* của chúng trong khoảng thời gian dài.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "chất bảo quản" dùng để chỉ chất được sử dụng để ngăn ngừa phản ứng bất thường hoặc phân hủy gây ra bởi sự nhiễm khuẩn. Dược phẩm dạng lỏng theo sáng chế có thể còn chứa chất bảo quản. Chất bảo quản thường được sử dụng trong chế phẩm đa liều có nhiều khả năng bị nhiễm vi sinh vật, nhưng không chỉ giới hạn ở đó và cũng có thể được sử dụng trong chế phẩm đông khô nhanh hoặc chế phẩm đơn liều để ngăn ngừa sự nhiễm khuẩn. Dược phẩm dạng lỏng theo sáng chế có thể chứa một hoặc nhiều chất bảo quản được chọn từ m-cresol, phenol và rượu benzylic. Nồng độ của chất bảo quản trong dược phẩm dạng lỏng này có thể là 0,001%-1% (khối lượng/thể tích). Đặc biệt là, tốt hơn nếu chất bảo quản chứa trong dược phẩm dạng lỏng theo sáng chế là m-cresol. Dược phẩm dạng lỏng theo sáng chế có thể là chế phẩm đa liều.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp bào chế dược phẩm dạng lỏng chứa thế liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài.

Cụ thể, theo một phương án theo sáng chế, phương pháp bào chế dược phẩm dạng lỏng này có thể bao gồm bước: a) điều chế thế liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài; và b) phối trộn thế liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài điều chế được với chất làm ổn định chứa dung dịch đệm, rượu đường và chất hoạt động bề mặt không ion.

Theo phương án khác của sáng chế, phương pháp bào chế dược phẩm dạng lỏng này có thể bao gồm các bước: a) điều chế thế liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài; và b) phối trộn thế liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài điều chế được với chất làm ổn định, chứa dung dịch đệm, rượu đường và chất hoạt động bề mặt không ion, và chất bảo quản.

Tốt hơn là, chất làm ổn định ở bước b) có thể còn chứa một hoặc nhiều chất được chọn từ nhóm bao gồm chất đẳng trương, đường, rượu polyhydric và axit amin.

Theo khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất dược phẩm ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh béo phì hoặc đái tháo đường, bao gồm dược phẩm dạng lỏng nêu trên.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "ngăn ngừa" dùng để chỉ tất cả các tác động nhằm làm ức chế hoặc trì hoãn sự phát triển của bệnh cần điều trị. Trong bản mô tả

này, thuật ngữ "ngăn ngừa" dùng để chỉ việc dùng thể liên hợp theo sáng chế để ức chế hoặc trì hoãn sự phát triển của bệnh đái tháo đường như mức glucoza huyết bất thường hoặc quá trình tiết insulin bất thường, hoặc bệnh béo phì như tăng thể trọng hoặc chất béo của cơ thể.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "điều trị" dùng để chỉ tất cả các tác động nhằm làm thuyên giảm, cải thiện hoặc làm dịu các triệu chứng bệnh lý được tiến triển. Trong bản mô tả này, thuật ngữ "điều trị" dùng để chỉ việc dùng thể liên hợp theo sáng chế để làm thuyên giảm, cải thiện hoặc làm dịu bệnh lý đái tháo đường hoặc bệnh lý béo phì nêu trên về mức glucoza huyết và tiết insulin bình thường và làm giảm thể trọng hoặc chất béo của cơ thể.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "bệnh béo phì" dùng để chỉ lượng dư thừa của chất béo của cơ thể. Chỉ số khối lượng cơ thể (= trọng lượng (kg) chia cho chiều cao (m)) bằng hoặc lớn hơn 25 được xác định là bệnh béo phì. Bệnh béo phì nói chung do bởi sự mất cân bằng năng lượng trong đó mức hấp thụ năng lượng vượt quá tiêu hao năng lượng. Bệnh béo phì là bệnh chuyển hóa ảnh hưởng đến toàn bộ cơ thể và có khả năng cao dẫn đến bệnh đái đường và chứng tăng lipit huyết. Ngoài ra, bệnh béo phì liên quan đến rối loạn chức năng giới tính, bệnh khớp, và nguy cơ tăng sự phát triển của bệnh tim mạch, và cũng liên quan đến sự phát triển của ung thư trong một số trường hợp.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "bệnh đái đường" là loại bệnh chuyển hóa trong đó mức tiết insulin là không đủ hoặc các chức năng không hoạt động bình thường. Bệnh đái tháo đường được đặc trưng bởi mức glucoza huyết tăng và gây ra nhiều vấn đề sức khỏe khác nhau. Trong trường hợp của bệnh đái đường, glucoza được đào thải qua nước tiểu.

Dược phẩm theo sáng chế có thể còn chứa chất mang, tá dược hoặc chất pha loãng dược dụng. Trong bản mô tả này, thuật ngữ "dược dụng" nghĩa là lượng đủ để có tác dụng điều trị và không gây ra tác dụng phụ. Liều lượng hoạt chất của dược phẩm theo sáng chế có thể được xác định dễ dàng bởi chuyên gia trong lĩnh vực này tùy thuộc vào loại bệnh, tuổi của bệnh nhân, trọng lượng, tình trạng sức khỏe, giới tính, và độ nhạy của thuốc, đường dùng thuốc, kiểu dùng, tần suất dùng, thời gian điều trị, thuốc được sử dụng kết hợp hoặc đồng thời với dược phẩm theo sáng chế này, và các yếu tố khác đã biết trong lĩnh vực dược phẩm.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh béo phì hoặc đái tháo đường, bao gồm bước cho đối tượng dùng dược phẩm dạng lỏng này.

Trong bản mô tả này, dược phẩm dạng lỏng, bệnh béo phì và bệnh đái đường là như được mô tả trên đây.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "đối tượng" dùng để chỉ đối tượng bị nghi ngờ mắc bệnh béo phì hoặc đái tháo đường. Cụ thể, thuật ngữ này dùng để chỉ động vật có vú, bao gồm người, chuột nhắt và động vật nuôi trong nhà, có hoặc đang có nguy cơ phát triển bệnh lý nêu trên. Ngoài ra, đối tượng có thể là đối tượng bất kỳ có thể được điều trị bằng dẫn xuất dược phẩm dạng lỏng theo sáng chế.

Phương pháp điều trị theo sáng chế có thể bao gồm bước dùng lượng hữu hiệu của dược phẩm bao gồm dược phẩm dạng lỏng này. Tổng liều hàng ngày của dược phẩm có thể được xác định bằng đánh giá y học thích hợp của bác sỹ điều trị, và dược phẩm có thể được dùng một lần hoặc vài lần. Tuy nhiên, xét theo mục đích của sáng chế, liều lượng hữu hiệu có tác dụng điều trị cụ thể của dược phẩm cho bệnh nhân cụ thể bất kỳ có thể thay đổi tùy thuộc vào các yếu tố khác nhau đã biết trong lĩnh vực y tế, bao gồm loại và mức độ đáp ứng đạt được, phân phối dược phẩm theo các tác nhân khác có được sử dụng hợp cùng hay không, tuổi của bệnh nhân, thể trọng, tình trạng sức khỏe, giới tính và chế độ ăn uống, thời gian và đường dùng thuốc, tốc độ tiết của dược phẩm, thời gian điều trị, khác thuốc được sử dụng kết hợp hoặc đồng thời với dược phẩm theo sáng chế, và các yếu tố khác đã biết trong lĩnh vực y tế.

Hiệu quả có lợi

Dược phẩm dạng lỏng theo sáng chế chứa thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài bao gồm dung dịch đệm, rượu đường và chất hoạt động bề mặt không ion và không chứa albumin huyết thanh người và các yếu tố có khả năng có hại cho người, và do đó không miễn cảm với nhiễm khuẩn virus. Ngoài ra, thể liên hợp oxyntomodulin theo sáng chế bao gồm oxyntomodulin được liên kết với vùng Fc của globulin miễn dịch, và do đó có khối lượng phân tử cao, tác động sinh lý kéo dài, và độ ổn định cất giữ rất tốt, so với oxyntomodulin tự nhiên.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Dưới đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn có tham khảo đến các Ví dụ. Cần hiểu rằng, tuy nhiên, các Ví dụ này chỉ nhằm minh họa sáng chế và không dự định giới hạn phạm vi của sáng chế.

Ví dụ 1: Tổng hợp oxyntomodulin và dẫn xuất oxyntomodulin

Để đánh giá độ ổn định của oxyntomodulin và dẫn xuất oxyntomodulin trong dạng phẩm lỏng theo sáng chế, dẫn xuất oxyntomodulin có trình tự axit amin được thể hiện trong Bảng 1 dưới đây được tổng hợp.

Bảng 1

Oxyntomodulin và dẫn xuất oxyntomodulin

SEQ ID NO	Trình tự	Lưu ý
SEQ ID NO: 1	HSQGTFTSDYSKYLD S RRRAQDFVQWLMNTKRNRRNNIA	
SEQ ID NO: 2	CA-SQGTFTSDYSKYLD E EAVRLFIEWLMNTKRNRRNNIA	
SEQ ID NO: 3	CA-SQGTFTSDYSKYLD E RRRAQDFVAWLKNTGPSSGAPPPS	
SEQ ID NO: 4	CA-GQGTFTSDYSRYL E EEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS	
SEQ ID NO: 5	CA-GQGTFTSDYSRQ M EEEA V RLFIEWLKNGGPSSGAPPPS	
SEQ ID NO: 6	CA-GEGTFTSDLSRQ M EEEA V RLFIEWAAHSQGTFTSDYSKYLD	
SEQ ID NO: 7	CA-SQGTFTSDYSRYL E EAVRLFIEWLMNTK	
SEQ ID NO: 8	CA-SQGTFTSDLSRQ L EEEA V RLFIEWLMNK	
SEQ ID NO: 9	CA-GQGTFTSDYSRYL E EAVXLFIEWLMNTKRNRRNNIA	
SEQ ID NO: 10	CA-SQGTFTSDYSRQ M EEEA V RLFIEWLMNGGPSSGAPPPSK	
SEQ ID NO: 11	CA-GEGTFTSDLSRQ M EEEA V RLFIEWAAHSQGTFTSDYSRYL D K	
SEQ ID NO: 12	CA-SQGTFTSDYSRYL D G G GHGEGTFTSDLSKQ M EEEA V K	
SEQ ID NO: 13	CA-SQGTFTSDYSRYL D XEA V XLFIEWLMNTK	
SEQ ID NO: 14	CA-GQGTFTSDYSRYL E EAVXLFIXWLMNTKRNRRNNIA	
SEQ ID NO: 15	CA-GQGTFTSDYSRYL E EAVRLFIXWLMNTKRNRRNNIA	
SEQ ID NO: 16	CA-SQGTFTSDLSRQ L EGGGHSQGTFTSDLSRQ L EK	
SEQ ID NO: 17	CA-SQGTFTSDYSRYL E EAVRLFIEWIRNTKRNRRNNIA	
SEQ ID NO: 18	CA-SQGTFTSDYSRYL E EAVRLFIEWIRNGGPSSGAPPPSK	
SEQ ID NO: 19	CA-SQGTFTSDYSRYL D E E AV K LFI EWIRNTKRNRRNNIA	Tạo thành vòng
SEQ ID NO: 20	CA-SQGTFTSDYSRYL D E E AV K LFI EWIRNGGPSSGAPPPSK	Tạo thành vòng
SEQ ID NO: 21	CA-SQGTFTSDYSRQ L EEEA V RLFIEWVRNTKRNRRNNIA	
SEQ ID NO: 22	DA-SQGTFTSDYSKYLD E KRA K EFVQWLMNTK	Tạo thành vòng
SEQ ID NO: 23	HAibQGTFTSDYSKYLD E KRA K EFVCWLMNT	
SEQ ID NO: 24	HAibQGTFTSDY SKYL E KRA K EFVQWLMNTC	
SEQ ID NO: 25	HAibQGTFTSDYSKYLD E KRA K EFVQWLMNTC	Tạo thành vòng
SEQ ID NO: 26	HAibQGTFTSDYSKYLD E KRA K EFVQWLMNTC	Tạo thành vòng
SEQ ID NO: 27	HAibQGTFTSDYSKYLD E QA A K E FCWLMNT	Tạo thành vòng
SEQ ID NO: 28	HAibQGTFTSDY SKYL E KRA K EFVQWLMNT	
SEQ ID NO: 29	H(d)SQGTFTSDYSKYLD S RRRAQDFVQWLMNTKRNRRNNIA	
SEQ ID NO: 30	CA-SQGTFTSDYSKYLD S RRRAQDFVQWLMNTKRNRRNNIA	
SEQ ID NO: 31	CA-(d)SQGTFTSDYSKYLD S RRRAQDFVQWLMNTKRNRRNNIA	
SEQ ID NO: 32	CA-AibQGTFTSDYSKYLD E KRA K EFVQWLMNTC	Tạo thành vòng
SEQ ID NO: 33	HAibQGTFTSDYAKYL D E K RA K EFVQWLMNTC	Tạo thành vòng
SEQ ID NO: 34	YAibQGTFTSDYSKYLD E KRA K EFVQWLMNTC	Tạo thành vòng

Trong Bảng nêu trên, gốc axit amin được chỉ ra bằng các chữ cái in đậm trong mỗi trình tự SEQ ID NO: 19, 20, 22, 25, 26, 27, 32, 33 và 34, cùng nhau tạo thành vòng, và các gốc axit amin được chỉ ra bởi X nghĩa là axit alpha-metyl-

glutamic là axit amin không tự nhiên. Ngoài ra, CA để chỉ 4-imidazoaxetyl, DA để chỉ desamino-histidyl, và (d)S để chỉ D-serin.

Ví dụ 2: Điều chế thể liên hợp bao gồm dẫn xuất oxyntomodulin (SEQ ID NO: 25) và Fc globulin miễn dịch (dẫn xuất oxyntomodulin (SEQ ID NO: 25) được liên kết với vùng Fc của globulin miễn dịch)

Trước tiên, để PEGyl hóa MAL-10K-ALD PEG ở gốc xystein ở vị trí axit amin 30 của dẫn xuất oxyntomodulin (SEQ ID NO: 25), dẫn xuất oxyntomodulin (SEQ ID NO: 25) và MAL-10K-ALD PEG được cho phản ứng với nhau ở tỷ lệ mol là 1:3 và nồng độ protein là 3 mg/ml ở nhiệt độ trong phòng trong 3 giờ. Trong bản mô tả này, phản ứng được thực hiện trong dung dịch đệm Tris 50 mM (pH 8,0) với sự có mặt của 1M guanidin. Sau khi hoàn thành phản ứng, dung dịch phản ứng được đưa vào cột SOURCE S để tinh chế dẫn xuất oxyntomodulin được PEGyl hóa một lần ở xystein (cột: SOURCE S, tốc độ chảy: 2,0 ml/phút, gradien: A 0 → 100% 50 min B (A: 20 mM Na-xitrat, pH 3,0 + 45% etanol, B: A + 1M KCl)) (FIG. 1a). FIG. 1a là đồ thị thể hiện kết quả thu được bằng cách tinh chế dẫn xuất oxyntomodulin được PEGyl hóa một lần (SEQ ID NO: 25) qua cột tinh chế SOURCE S.

Tiếp theo, dẫn xuất oxyntomodulin tinh chế được PEGyl hóa một lần (SEQ ID NO: 25) và Fc globulin miễn dịch được phản ứng với với nhau ở tỷ lệ mol là 1:5 và nồng độ protein là 20 mg/ml ở 4°C trong 16 giờ. Phản ứng được thực hiện trong dung dịch đệm kali phosphat 100mM (pH 6,0) với sự có mặt của SCB 20 mM làm tác nhân khử. Sau khi hoàn thành phản ứng, phản ứng được đưa vào a cột tinh chế SOURCE 15Q (cột: SOURCE 15Q, tốc độ dòng: 2,0ml/phút, gradien: A 0 → 4% 1 min B → 20% 80 min B (A: 20mM Tris-HCl, pH 7,5, B: A + 1M NaCl)) (FIG. 1b) và cột tinh chế SOURCE ISO (cột: SOURCE ISO, tốc độ dòng: 2,0 ml/phút, gradien: B 0 → 100% 100 min A (A: 20mM Tris-HCl, pH 7,5, B: A + 1,1M AS)) (FIG. 1c) để tinh chế thể liên hợp bao gồm dẫn xuất oxyntomodulin (SEQ ID NO: 25) và Fc globulin miễn dịch. FIG. 1b là đồ thị thể hiện kết quả thu được bằng cách tinh chế thể liên hợp, bao gồm dẫn xuất oxyntomodulin (SEQ ID NO: 25) và Fc globulin miễn dịch, qua cột tinh chế SOURCE 15Q, và FIG. 1c là đồ thị thể hiện kết quả thu được bằng cách tinh chế thể liên hợp, bao gồm dẫn xuất oxyntomodulin (SEQ ID NO: 25) và Fc globulin miễn dịch, qua cột tinh chế SOURCE ISO.

Thể liên hợp oxyntomodulin được điều chế như nêu trên được phát triển để làm tăng chu kỳ bán rã máu của oxyntomodulin. Nó bao gồm vùng Fc của globulin miễn dịch, polyme không peptidyl và oxyntomodulin, được liên kết cộng hóa trị với nhau theo cách đặc hiệu vị trí, và có chu kỳ bán rã máu tăng đáng kể.

Ví dụ 3: Đánh giá độ ổn định của thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài theo độ pH

Để đánh giá độ ổn định của thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài (được điều chế trong Ví dụ 2) trong dược phẩm dạng lỏng, thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài được lưu giữ trong dược phẩm được thể hiện trong Bảng 2 ở 25°C trong 0-2 tuần, và tiếp theo được phân tích bằng sắc ký lỏng cao áp trao đổi ion (IE-HPLC), sắc ký lỏng cao áp loại trừ kích cỡ (SE-HPLC) và sắc ký lỏng cao áp pha đảo (RP-HPLC). Để cất giữ thể liên hợp oxyntomodulin, sử dụng dung dịch đệm là dung dịch đệm xitrat, mannitol làm rượu đường, và polysorbat 20 làm chất hoạt động bề mặt không ion được sử dụng. Trong các Bảng 3, 4 và 5 dưới đây, IE-HPLC (%), SE-HPLC (%) và RP-HPLC (%) chỉ ra % diện tích/% diện tích ban đầu, chỉ ra phần trăm lưu giữ của thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài so với giá trị ban đầu. Bảng 3 thể hiện diện tích IE-HPLC (%) của thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài sau khi cất giữ, Bảng 4 thể hiện diện tích SE-HPLC (%) của thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài sau khi cất giữ, và Bảng 5 thể hiện diện tích RP-HPLC (%) của thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài sau khi cất giữ.

Bảng 2

	pH	Dung dịch đệm	Chất đẳng trương	Rượu đường	Chất hoạt động bề mặt	Thành phần khác	Oxyntomodulin có tác dụng kéo dài
#1	4,8	20mM Na-Xitrat	-	Mannitol 10%	0,005% Polysorbat 20	0,1mg/mL Metionin	10mg/mL
#2	5,2	20mM Na-Xitrat	-	Mannitol 10%	0,005% Polysorbat 20	0,1mg/mL Metionin	10mg/mL
#3	5,6	20mM Na-Xitrat	-	Mannitol 10%	0,005% Polysorbat 20	0,1mg/mL Metionin	10mg/mL
#4	6,0	20mM Na-Xitrat	-	Mannitol 10%	0,005% Polysorbat 20	0,1mg/mL Metionin	10mg/mL
#5	6,4	20mM Na-Xitrat	-	Mannitol 10%	0,005% Polysorbat 20	0,1mg/mL Metionin	10mg/mL

Bảng 3

	IE-HPLC (%)				
	#1	#2	#3	#4	#5
0 tuần	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
2 tuần	97,6	97,2	96,8	94,0	85,2

Bảng 4

	SE-HPLC (%)				
	#1	#2	#3	#4	#5
0 tuần	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
2 tuần	99,7	99,8	99,8	99,3	99,4

Bảng 5

	RP-HPLC (%)				
	#1	#2	#3	#4	#5
0 tuần	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
2 tuần	83,0	84,4	86,7	65,5	74,0

Có thể thấy từ các kết quả của IE-HPLC (%) trong Bảng 3 nêu trên, thể liên hợp oxyntomodulin ổn định hơn ở độ pH nhỏ hơn. Theo các kết quả của SE-HPLC trong Bảng 4, thể liên hợp oxyntomodulin là ổn định nhất ở độ pH là 5,2, và theo các kết quả của RP-HPLC trong Bảng 5, thể liên hợp oxyntomodulin là ổn định nhất ở độ pH là 5,6. Mặc dù độ ổn định ở độ pH khác nhau là khác nhau giữa các phương pháp phân tích, sự khác nhau về mức lưu giữ giữa các pH là lớn nhất trong phương pháp phân tích RP-HPLC. Điều này gợi ý rằng thể liên hợp oxyntomodulin là ổn định nhất ở độ pH là 5,6.

Ví dụ 4: Đánh giá độ ổn định của thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài theo loại rượu đường và khi có mặt hoặc không có mặt của chất đẳng trương

Các tác giả sáng chế đã thử nghiệm tác động của loại rượu đường làm chất làm ổn định và khi có mặt hoặc không có mặt của natri clorua làm chất đẳng trương đối với độ ổn định của thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài. Cụ thể, bằng cách sử dụng dung dịch đậm xitrat (độ pH 5,6) được chọn trong Ví dụ 3, thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài được lưu giữ trong dược phẩm được thể hiện trong Bảng 6 dưới đây ở 25°C trong 0-4 tuần, và tiếp theo được phân tích bằng IE-HPLC, SE-HPLC và RP-HPLC. Trong các Bảng 7, 8 và 9 dưới đây, IE-HPLC (%), SE-HPLC (%) và RP-HPLC (%) chỉ ra % diện tích/% diện tích ban đầu, chỉ ra phần trăm lưu giữ của thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài so với giá trị ban đầu. Bảng 7 cho thấy diện tích IE-HPLC (%) của thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài sau khi cất giữ, Bảng 8 thể hiện diện tích SE-HPLC (%) của thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài sau khi cất giữ, và

Bảng 9 cho thấy diện tích RP-HPLC (%) của thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài sau khi cất giữ.

Bảng 6

	pH	Dung dịch đệm	Chất đẳng trương	Rượu đường	Chất hoạt động bề mặt	Thành phần khác	Oxyntomodulin có tác dụng kéo dài
#1	5,6	20mM Na-Xitrat	-	Mannitol 10%	0,005% Polysorbat 20	-	10mg/mL
#2	5,6	20mM Na-Xitrat	-	10% Sorbitol	0,005% Polysorbat 20	-	10mg/mL
#3	5,6	20mM Na-Xitrat	-	10% Glyxerol	0,005% Polysorbat 20	-	10mg/mL
#4	5,6	20mM Na-Xitrat	150mM NaCl	Mannitol 10%	0,005% Polysorbat 20	-	10mg/mL

Bảng 7

	IE-HPLC (%)			
	#1	#2	#3	#4
0 tuần	100,0	100,0	100,0	100,0
1 tuần	98,8	98,8	88,3	98,3
2 tuần	97,2	96,9	79,0	95,0
3 tuần	94,4	94,5	63,0	93,8
4 tuần	91,6	91,8	55,8	91,6

Bảng 8

	SE-HPLC (%)			
	#1	#2	#3	#4
0 tuần	100,0	100,0	100,0	100,0
1 tuần	99,9	100,0	92,0	100,0
2 tuần	99,7	99,8	84,7	99,9
3 tuần	99,2	99,4	79,2	99,5
4 tuần	98,4	98,6	76,0	98,8

Bảng 9

	RP-HPLC (%)			
	#1	#2	#3	#4
0 tuần	100,0	100,0	100,0	100,0
1 tuần	98,9	98,7	90,0	98,4
2 tuần	96,0	95,6	80,6	95,0
3 tuần	94,0	93,6	75,2	92,9
4 tuần	92,6	91,1	70,0	90,1

Có thể quan sát thấy trong các Bảng từ 6 đến 9 trên đây, thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài ổn định hơn ở mannitol hoặc sorbitol so với ở glyxerol ở cùng nồng độ. Các kết quả của RP-HPLC đã chỉ ra rằng thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài ổn định không đáng kể ở mannitol so với ở sorbitol. Ngoài ra, độ ổn định của thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài không khác đáng kể giữa khi có mặt và không có mặt của natri clorua làm chất đẳng trương.

Ví dụ 5: Đánh giá độ ổn định của thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài theo nồng độ của rượu đường

Các tác giả sáng chế đã thử nghiệm sự ảnh hưởng của nồng độ của rượu đường làm chất làm ổn định đối với độ ổn định của thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài. Cụ thể, bằng cách sử dụng dung dịch đệm xitrat (độ pH 5,6 và mannitol được chọn trong các Ví dụ nêu trên, thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài được lưu giữ trong dược phẩm được thể hiện trong Bảng 10 dưới đây ở 25°C trong 0-4 tuần, và tiếp theo được phân tích bằng IE-HPLC, SE-HPLC và RP-HPLC. Trong các Bảng 11, 12 và 13 dưới đây, IE-HPLC (%), SE-HPLC (%) và RP-HPLC (%) chỉ ra % diện tích/% diện tích ban đầu, chỉ ra phần trăm lưu giữ của thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài so với giá trị ban đầu. Bảng 11 cho thấy diện tích IE-HPLC (%) của thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài sau khi cất giữ, Bảng 12 thể hiện diện tích SE-HPLC (%) của thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài sau khi cất giữ, và Bảng 13 cho thấy diện tích RP-HPLC (%) của thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài sau khi cất giữ.

Bảng 10

	pH	Dung dịch đệm	Chất đẳng trương	Rượu đường	Chất hoạt động bề mặt	Thành phần khác	Oxyntomodulin có tác dụng kéo dài
#1	5,6	20mM Na-Xitrat	-	Mannitol 2%	0,005% Polysorbat 20	-	10mg/mL
#2	5,6	20mM Na-Xitrat	-	Mannitol 5%	0,005% Polysorbat 20	-	10mg/mL
#3	5,6	20mM Na-Xitrat	-	Mannitol 10%	0,005% Polysorbat 20	-	10mg/mL
#4	5,6	20mM Na-Xitrat	-	Mannitol 15%	0,005% Polysorbat 20	-	10mg/mL

Bảng 11

	IE-HPLC (%)			
	#1	#2	#3	#4
0 tuần	100,0	100,0	100,0	100,0
1 tuần	79,7	98,7	98,8	79,0
2 tuần	57,6	97,6	97,9	61,0
3 tuần	39,8	97,1	97,2	49,2
4 tuần	34,9	95,5	95,5	43,4

Bảng 12

	SE-HPLC (%)			
	#1	#2	#3	#4
0 tuần	100,0	100,0	100,0	100,0
1 tuần	97,3	99,4	100,0	99,5
2 tuần	89,0	99,4	99,8	95,4
3 tuần	79,4	99,3	99,4	90,5
4 tuần	74,7	98,4	99,1	83,5

Bảng 13

	RP-HPLC (%)			
	#1	#2	#3	#4
0 tuần	100,0	100,0	100,0	100,0
1 tuần	89,8	93,2	98,2	95,2
2 tuần	80,3	85,3	94,7	90,9
3 tuần	71,9	78,5	91,1	84,1
4 tuần	66,0	71,0	89,1	76,5

Có thể quan sát thấy trong các Bảng từ 10 đến 13, thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài là ổn định với sự có mặt của Mannitol 5% hoặc Mannitol 10%. Tuy nhiên, kết tủa protein được tạo ra với sự có mặt của Mannitol 2% hoặc Mannitol 15%. Các kết quả của IE-HPLC hoặc SE-HPLC đã chỉ ra rằng độ ổn định của thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài là tương tự giữa Mannitol 10% và Mannitol 5%. Các kết quả của RP-HPLC đã chỉ ra rằng độ ổn định của thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài ổn định hơn ở Mannitol 10% so với ở Mannitol 5%.

Ví dụ 6: Đánh giá độ ổn định của thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài theo nồng độ của chất hoạt động bề mặt và khi có mặt hoặc không có mặt của axit amin.

Các tác giả sáng chế đã thử nghiệm các tác động của nồng độ của chất hoạt động bề mặt làm chất làm ổn định và có mặt hoặc không có mặt của axit amin đối

với độ ổn định của thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài. Bằng cách sử dụng dung dịch đệm xitrat (độ pH 5,6) và dung dịch đệm xitrat và Mannitol 10% được chọn trong các Ví dụ nêu trên, thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài được lưu giữ trong được phẩm được thể hiện trong Bảng 14 dưới đây ở 25°C trong 0-4 tuần, và tiếp theo được phân tích bằng IE-HPLC, SE-HPLC và RP-HPLC. Trong các Bảng 15, 16 và 17 dưới đây, IE-HPLC (%), SE-HPLC (%) và RP-HPLC (%) chỉ ra % diện tích/% diện tích ban đầu, chỉ ra phần trăm lưu giữ của thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài so với giá trị ban đầu. Bảng 15 cho thấy diện tích IE-HPLC (%) của thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài sau khi cất giữ, Bảng 16 thể hiện diện tích SE-HPLC (%) của thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài sau khi cất giữ, và Bảng 17 cho thấy diện tích RP-HPLC (%) của thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài sau khi cất giữ.

Bảng 14

	Độ pH	Dung dịch đệm	Chất đẳng trương	Rượu đường	Chất hoạt động bề mặt	Thành phần khác	Oxyntomodulin có tác dụng kéo dài
#1	5,6	20mM Na-Xitrat	-	Mannitol 10%	0,005% Polysorbat 20	-	10mg/mL
#2	5,6	20mM Na-Xitrat	-	Mannitol 10%	0,02% Polysorbat 20	-	10mg/mL
#3	5,6	20mM Na-Xitrat	-	Mannitol 10%	0,05% Polysorbat 20	-	10mg/mL
#4	5,6	20mM Na-Xitrat	-	Mannitol 10%	0,02% Polysorbat 20	0,1mg/ml Metionin	10mg/mL

Bảng 15

	IE-HPLC (%)			
	#1	#2	#3	#4
0 tuần	100,0	100,0	100,0	100,0
1 tuần	96,0	96,5	96,4	96,2
2 tuần	95,1	94,7	95,1	95,3
3 tuần	92,7	92,0	92,2	92,7
4 tuần	89,7	89,1	89,2	89,7

Bảng 16

	SE-HPLC (%)			
	#1	#2	#3	#4
0 tuần	100,0	100,0	100,0	100,0
1 tuần	99,4	99,7	99,7	99,6
2 tuần	99,3	99,5	99,2	99,3
3 tuần	98,3	98,1	98,3	99,1
4 tuần	97,3	97,1	97,3	97,9

Bảng 17

	RP-HPLC (%)			
	#1	#2	#3	#4
0 tuần	100,0	100,0	100,0	100,0
1 tuần	97,3	97,8	98,1	97,4
2 tuần	79,2	79,2	77,5	79,7
3 tuần	71,5	71,6	69,5	73,3
4 tuần	65,1	65,0	65,0	67,8

Có thể thấy từ các kết quả trong các Bảng từ 14 đến 17, thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài ổn định nhất ở dược phẩm chứa polysorbat 20 0,02% và 0,1 mg/mL metionin.

Ví dụ 7: Đánh giá độ ổn định của thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài theo độ pH và nồng độ của rượu đường

Các tác giả sáng chế đã thử nghiệm các tác động của pH và nồng độ của rượu đường làm chất làm ổn định đối với độ ổn định của thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài. Cụ thể, bằng cách sử dụng polysorbat 20 0,02% và 0,1 mg/mL metionin được chọn trong các Ví dụ nêu trên, thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài được lưu giữ trong dược phẩm được thể hiện trong Bảng 18 dưới đây ở 25°C trong 0-4 tuần, và tiếp theo được phân tích bằng IE-HPLC, SE-HPLC và RP-HPLC. Trong các Bảng 19, 20 và 21 dưới đây, IE-HPLC (%), SE-HPLC (%) và RP-HPLC (%) chỉ ra % diện tích/% diện tích ban đầu, chỉ ra phần trăm lưu giữ của thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài so với giá trị ban đầu. Bảng 19 cho thấy diện tích IE-HPLC (%) của thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài sau khi cất giữ, Bảng 20 thể hiện diện tích SE-HPLC (%) của thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài sau khi cất giữ, và Bảng 21 cho thấy diện tích RP-HPLC (%) của thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài sau khi cất giữ.

Bảng 18

	Độ pH	Dung dịch đệm	Chất đẳng trương	Rượu đường	Chất hoạt động bề mặt	Thành phần khác	Oxyntomodulin có tác dụng kéo dài
#1	5,2	20mM Na-Xitrat	-	Mannitol 5%	0,02% Polysorbat 20	0,1mg/ml Metionin	10mg/mL
#2	5,2	20mM Na-Xitrat	-	Mannitol 10%	0,02% Polysorbat 20	0,1mg/ml Metionin	10mg/mL
#3	5,2	20mM Na-Xitrat	-	Mannitol 15%	0,02% Polysorbat 20	0,1mg/ml Metionin	10mg/mL
#4	5,6	20mM Na-Xitrat	-	Mannitol 5%	0,02% Polysorbat 20	0,1mg/ml Metionin	10mg/mL
#5	5,6	20mM Na-Xitrat	-	Mannitol 10%	0,02% Polysorbat 20	0,1mg/ml Metionin	10mg/mL
#6	5,6	20mM Na-Xitrat	-	Mannitol 15%	0,02% Polysorbat 20	0,1mg/ml Metionin	10mg/mL
#7	6,0	20mM Na-Xitrat	-	Mannitol 5%	0,02% Polysorbat 20	0,1mg/ml Metionin	10mg/mL
#8	6,0	20mM Na-Xitrat	-	Mannitol 10%	0,02% Polysorbat 20	0,1mg/ml Metionin	10mg/mL
#9	6,0	20mM Na-Xitrat	-	Mannitol 15%	0,02% Polysorbat 20	0,1mg/ml Metionin	10mg/mL

Bảng 19

	IE-HPLC (%)								
	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9
0 tuần	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
1 tuần	99,4	99,6	97,1	97,2	97,6	98,0	90,6	92,9	93,4
2 tuần	97,5	97,8	90,5	93,8	94,1	93,2	81,5	83,6	85,6
3 tuần	93,0	93,6	82,6	86,0	86,9	87,1	71,2	74,6	77,0
4 tuần	90,0	90,5	71,1	85,0	85,6	85,7	62,7	66,3	68,9

Bảng 20

	SE-HPLC (%)								
	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9
0 tuần	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
1 tuần	98,8	99,5	98,8	99,5	99,3	98,5	99,6	100,0	100,7
2 tuần	98,8	99,1	91,1	98,4	97,1	96,9	97,3	98,3	97,9
3 tuần	97,7	98,3	96,4	98,1	98,4	98,2	98,1	99,1	100,8
4 tuần	98,0	98,5	94,9	97,9	98,3	98,3	97,6	98,2	99,0

Bảng 21

	RP-HPLC (%)								
	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9
0 tuần	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
1 tuần	78,2	78,2	42,1	88,2	90,7	89,4	99,9	99,1	100,7
2 tuần	60,7	58,6	-	80,4	80,2	80,6	96,8	93,4	92,0
3 tuần	47,5	41,9	-	79,4	77,3	69,8	97,6	92,8	93,6
4 tuần	34,8	28,0	-	72,8	65,0	62,6	96,9	91,1	88,9

Từ các kết quả trong các Bảng trên đây có thể thấy rằng các kết quả của IE-HPLC đã chỉ ra rằng độ ổn định của thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài là cao hơn ở độ pH 5,2, độ pH 5,6 và độ pH 6,0. Các kết quả của RP-HPLC đã chỉ ra rằng độ ổn định của thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài là cao hơn ở độ pH 6,0, độ pH 5,6 và độ pH 5,2. Các kết quả của SE-HPLC đã chỉ ra rằng độ ổn định của thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài không khác đáng kể giữa độ pH 5,2, độ pH 5,6 và độ pH 6,0. Nói cách khác, các kết quả của IE-HPLC, RP-HPLC và SE-HPLC đã chỉ ra rằng thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài là ổn định ở độ pH 5,6.

Trong khi đó, các kết quả của IE-HPLC và SE-HPLC đã chỉ ra rằng thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài không khác đáng kể giữa các nồng độ mannitol ở độ pH 5,6. Tuy nhiên, theo các kết quả của RP-HPLC, thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài ổn định hơn ở Mannitol 5% so với ở Mannitol 10% hoặc Mannitol 15% ở độ pH 5,6.

Ví dụ 8: Đánh giá độ ổn định của thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài theo độ pH và loại dung dịch đệm

Các tác giả sáng chế đã thử nghiệm các tác động của độ pH và loại dung dịch đệm làm chất làm ổn định đối với độ ổn định của thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài. Cụ thể, bằng cách sử dụng polysorbat 20 0,02%, 0,1 mg/mL metionin và Mannitol 5% được chọn trong các ví dụ nêu trên, thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài được lưu giữ trong dược phẩm được thể hiện trong Bảng 22 dưới đây ở 25°C trong 0-4 tuần, và tiếp theo được phân tích bằng IE-HPLC, SE-HPLC và RP-HPLC.

Trong các Bảng 23, 24 và 25 dưới đây, IE-HPLC (%), SE-HPLC (%) và RP-HPLC (%) chỉ ra % diện tích/% diện tích ban đầu, chỉ ra phần trăm lưu giữ của

thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài so với giá trị ban đầu. Bảng 23 cho thấy diện tích IE-HPLC (%) của thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài sau khi cất giữ, Bảng 24 thể hiện diện tích SE-HPLC (%) của thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài sau khi cất giữ, và Bảng 25 cho thấy diện tích RP-HPLC (%) của thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài sau khi cất giữ.

Bảng 22

	Độ pH	Dung dịch đậm	Chất đẳng trương	Rượu đường	Chất hoạt động bề mặt	Thành phần khác	Oxyntomodulin có tác dụng kéo dài
#1	5,6	20mM Na-Xitrat	-	Mannitol 5%	Polysorbat 20 0,02%	0,1mg/ml Metionin	10mg/mL
#2	5,8	20mM Na-Xitrat	-	Mannitol 5%	Polysorbat 20 0,02%	0,1mg/ml Metionin	10mg/mL
#3	5,8	20mM Na-Axetat	-	Mannitol 5%	Polysorbat 20 0,02%	0,1mg/ml Metionin	10mg/mL
#4	5,8	10mM Histidin	-	Mannitol 5%	Polysorbat 20 0,02%	0,1mg/ml Metionin	10mg/mL
#5	5,8	10mM Na-Phosphat	-	Mannitol 5%	0,02% Polysorbat 20	0,1mg/ml Metionin	10mg/mL

Bảng 23

	IE-HPLC (%)				
	#1	#2	#3	#4	#5
0 tuần	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
1 tuần	97,6	96,8	96,5	97,2	96,1
2 tuần	93,9	91,4	90,6	92,6	89,6
3 tuần	90,4	88,1	86,9	89,2	84,4
4 tuần	90,1	87,0	84,8	87,4	81,7

Bảng 24

	SE-HPLC (%)				
	#1	#2	#3	#4	#5
0 tuần	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
1 tuần	99,4	99,8	99,8	99,7	99,7
2 tuần	100,5	100,2	100,0	100,0	99,3
3 tuần	100,4	100,2	99,1	99,6	98,2
4 tuần	100,1	99,2	99,0	98,8	97,7

Bảng 25

	RP-HPLC (%)				
	#1	#2	#3	#4	#5
0 tuần	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
1 tuần	99,1	97,2	99,4	99,5	99,0
2 tuần	97,6	97,7	99,4	99,8	99,3
3 tuần	96,1	98,7	97,2	98,9	97,4
4 tuần	98,0	96,6	97,6	98,3	98,1

Từ các kết quả trong các Bảng từ 23 đến 25 có thể thấy rằng các kết quả của SE-HPLC hoặc RP-HPLC đã chỉ ra rằng độ ổn định của thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài không khác đáng kể ở độ pH 5,6 và độ pH 5,8. Các kết quả của IE-HPLC đã chỉ ra rằng thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài ổn định hơn ở độ pH 5,6 so với ở độ pH 5,8. Các kết quả của SE-HPLC cho thấy độ ổn định của thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài không khác đáng kể giữa các dung dịch đệm ở cùng độ pH. Ngoài ra, các kết quả của IE-HPLC hoặc RP-HPLC đã chỉ ra rằng thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài là ổn định nhất ở histidin ở cùng độ pH.

Ví dụ 9: Đánh giá tác động của việc có mặt hoặc không có mặt của chất bảo quản và nồng độ của thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài đối với độ ổn định của thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài

Các tác giả sáng chế đã thử nghiệm các tác động của có mặt hoặc không có mặt của chất bảo quản làm chất làm ổn định và nồng độ của thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài đối với độ ổn định của thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài. Cụ thể, bằng cách sử dụng dung dịch đệm histidin (độ pH 5,6), polysorbat 20 0,02%, 0,1mg/mL metionin và Mannitol 5%, được chọn trong các ví dụ nêu trên, thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài được lưu giữ trong dược phẩm được thể hiện trong Bảng 26 dưới đây ở 25°C trong 0-4 tuần, và tiếp theo được phân tích bằng IE-HPLC, SE-HPLC và RP-HPLC. Trong các Bảng 27, 28 và 29 dưới đây, IE-HPLC (%), SE-HPLC (%) và RP-HPLC (%) chỉ ra % diện tích/% diện tích ban đầu, chỉ ra phần trăm lưu giữ của thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài so với giá trị ban đầu. Bảng 27 cho thấy diện tích IE-HPLC (%) của thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài sau khi cất giữ, Bảng 28 thể hiện diện tích SE-HPLC (%) của thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài sau khi cất giữ, và Bảng 29 cho thấy diện tích RP-HPLC (%) của thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài sau khi cất giữ.

Bảng 26

	Độ pH	Dung dịch đệm	Chất đẳng trương	Rượu đường	Chất hoạt động bề mặt	Thành phần khác	Oxyntomodulin có tác dụng kéo dài
#1	5,6	10mM Histidin	-	Mannitol 5%	0,02% Polysorbat 20	0,1mg/ml Metionin	10mg/mL
#2	5,6	10mM Histidin	-	Mannitol 5%	0,02% Polysorbat 20	0,1mg/ml Metionin 0,27% m-cresol	10mg/mL
#3	5,6	10mM Histidin	-	Mannitol 5%	0,02% Polysorbat 20	0,1mg/ml Metionin	40mg/mL
#4	5,6	10mM Histidin	-	Mannitol 5%	0,02% Polysorbat 20	0,1mg/ml Metionin 0,27% m-cresol	40mg/mL

Bảng 27

	IE-HPLC (%)			
	#1	#2	#3	#4
0 tuần	100,0	100,0	100,0	100,0
1 tuần	97,9	98,2	97,7	97,1
2 tuần	95,3	95,7	95,1	94,3
3 tuần	93,6	92,9	93,4	91,8
4 tuần	91,3	90,4	90,2	88,4

Bảng 28

	SE-HPLC (%)			
	#1	#2	#3	#4
0 tuần	100,0	100,0	100,0	100,0
1 tuần	99,7	99,6	99,5	99,4
2 tuần	99,3	99,1	99,0	97,9
3 tuần	99,1	98,9	98,7	97,0
4 tuần	98,8	98,0	98,0	95,4

Bảng 29

	RP-HPLC (%)			
	#1	#2	#3	#4
0 tuần	100,0	100,0	100,0	100,0
1 tuần	100,1	100,0	99,8	99,7
2 tuần	99,4	99,5	99,2	99,1
3 tuần	98,3	98,3	98,8	98,5
4 tuần	98,8	97,9	97,7	97,4

Có thể quan sát thấy trong các Bảng từ 26 đến 29, các kết quả của IE-HPLC, SE-HPLC hoặc RP-HPLC đã chỉ ra rằng độ ổn định của thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài không làm thay đổi ngay cả khi có mặt của chất bảo quản và không khác biệt theo nồng độ của chúng.

Mặc dù các phương án được ưu tiên theo sáng chế đã được mô tả nhằm mục đích minh họa, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rằng các cải biến, các bổ sung và các thay thế khác nhau có thể được thực hiện mà không tách rời khỏi phạm vi và nội dung của sáng chế như được bộc lộ trong yêu cầu bảo hộ kèm theo.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Dược phẩm lỏng chứa thể liên hợp dẫn xuất oxyntomodulin có tác dụng kéo dài, trong đó dược phẩm này chứa:
 lượng hoạt dược của thể liên hợp dẫn xuất oxyntomodulin có tác dụng kéo dài, trong đó thể liên hợp dẫn xuất oxyntomodulin chứa:
 dẫn xuất oxyntomodulin, là peptit có tác động sinh lý, bao gồm trình tự axit amin bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 32, 33, hoặc 34;
 vùng Fc của globulin miễn dịch;
 và polyme không peptidyl, trong đó polyme không peptidyl liên kết cộng hóa trị dẫn xuất oxyntomodulin và vùng Fc của globulin miễn dịch; và
 chất làm ổn định không chứa albumin, trong đó chất làm ổn định chứa chất đệm, rượu đường và chất hoạt động bề mặt không ion.
2. Dược phẩm lỏng chứa thể liên hợp dẫn xuất oxyntomodulin có tác dụng kéo dài theo điểm 1, trong đó chất làm ổn định còn chứa một hoặc nhiều chất được chọn từ nhóm bao gồm tác nhân đẳng trương, đường, rượu polyhydric và axit amin.
3. Dược phẩm lỏng chứa thể liên hợp dẫn xuất oxyntomodulin có tác dụng kéo dài theo điểm 1 hoặc 2, trong đó dẫn xuất oxyntomodulin bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 32.
4. Dược phẩm lỏng chứa thể liên hợp dẫn xuất oxyntomodulin có tác dụng kéo dài theo điểm 1 hoặc 2, trong đó dẫn xuất oxyntomodulin bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 33.
5. Dược phẩm lỏng chứa thể liên hợp dẫn xuất oxyntomodulin có tác dụng kéo dài theo điểm 1 hoặc 2, trong đó dẫn xuất oxyntomodulin bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 34.
6. Dược phẩm lỏng chứa thể liên hợp dẫn xuất oxyntomodulin có tác dụng kéo dài theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó vùng Fc của globulin miễn dịch là vùng Fc có nguồn gốc từ IgG, IgA, IgD, IgE or IgM.
7. Dược phẩm lỏng chứa thể liên hợp dẫn xuất oxyntomodulin có tác dụng kéo

dài theo điểm 6, trong đó mỗi miền của vùng Fc của globulin miễn dịch là thể lai của miền có nguồn gốc từ các globulin miễn dịch khác nhau được chọn từ nhóm bao gồm IgG, IgA, IgD, IgE và IgM.

8. Dược phẩm lỏng chứa thể liên hợp dẫn xuất oxyntomodulin có tác dụng kéo dài theo điểm 6, trong đó vùng Fc của globulin miễn dịch là đime hoặc multime chứa globulin miễn dịch mạch đơn bao gồm các miền có nguồn gốc giống nhau.

9. Dược phẩm lỏng chứa thể liên hợp dẫn xuất oxyntomodulin có tác dụng kéo dài theo điểm 6, trong đó vùng Fc của globulin miễn dịch là vùng Fc của IgG4.

10. Dược phẩm lỏng chứa thể liên hợp dẫn xuất oxyntomodulin có tác dụng kéo dài theo điểm 9, trong đó vùng Fc của globulin miễn dịch là vùng Fc của IgG4 của người được glycosyl hóa.

11. Dược phẩm lỏng chứa thể liên hợp dẫn xuất oxyntomodulin có tác dụng kéo dài theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó polyme không peptidyl được chọn từ nhóm bao gồm polyetylen glycol, polypropylen glycol, copolyme etylen glycol/propylen glycol, polyol được polyoxyetyl hóa, rượu polyvinyl, polysaccarit, dextran, polyvinyl etyl ete, polyme dễ phân hủy sinh học, bao gồm axit polylactic (PLA) và axit polylactic-glycolic (PLGA); polyme lipid; kitin; axit hyaluronic; và hỗn hợp của chúng.

12. Dược phẩm lỏng chứa thể liên hợp dẫn xuất oxyntomodulin có tác dụng kéo dài theo điểm 11, trong đó polysaccarit bao gồm dextran, kitin, hoặc hỗn hợp của chúng.

13. Dược phẩm lỏng chứa thể liên hợp dẫn xuất oxyntomodulin có tác dụng kéo dài theo điểm 11, trong đó polyme không peptidyl là polyetylen glycol.

14. Dược phẩm lỏng chứa thể liên hợp dẫn xuất oxyntomodulin có tác dụng kéo dài theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó rượu đường là một hoặc nhiều chất được chọn từ nhóm bao gồm mannitol, sorbitol và glyxerol.

15. Dược phẩm lỏng chứa thể liên hợp dẫn xuất oxyntomodulin có tác dụng kéo dài theo điểm 14, trong đó nồng độ của rượu đường trong dược phẩm lỏng nằm

trong khoảng 2-15% (khối lượng/thể tích).

16. Dược phẩm lỏng chứa thể liên hợp dẫn xuất oxyntomodulin có tác dụng kéo dài theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó chất đệm là một hoặc nhiều chất được chọn từ nhóm bao gồm chất đệm xitrat, axetat, histidin và phosphat.

17. Dược phẩm lỏng chứa thể liên hợp dẫn xuất oxyntomodulin có tác dụng kéo dài theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó chất đệm có độ pH nằm trong khoảng từ 4,5 đến 7,0.

18. Dược phẩm lỏng chứa thể liên hợp dẫn xuất oxyntomodulin có tác dụng kéo dài theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 2 đến 17, trong đó tác nhân đẳng trương là natri clorua.

19. Dược phẩm lỏng chứa thể liên hợp dẫn xuất oxyntomodulin có tác dụng kéo dài theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó chất hoạt động bề mặt không ion là polysorbat hoặc poloxame.

20. Dược phẩm lỏng chứa thể liên hợp dẫn xuất oxyntomodulin có tác dụng kéo dài theo điểm 19, trong đó nồng độ của chất hoạt động bề mặt không ion trong dược phẩm lỏng nằm trong khoảng 0,001- 0,1% (khối lượng/thể tích).

21. Dược phẩm lỏng chứa thể liên hợp dẫn xuất oxyntomodulin có tác dụng kéo dài theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 2 đến 20, trong đó axit amin là methionin.

22. Dược phẩm lỏng chứa thể liên hợp dẫn xuất oxyntomodulin có tác dụng kéo dài theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó chất làm ổn định chứa chất đệm có độ pH nằm trong khoảng từ 4,8 đến 6,0, một hoặc nhiều rượu đường được chọn từ nhóm bao gồm mannitol và sorbitol, và polysorbat 20.

23. Dược phẩm lỏng chứa thể liên hợp dẫn xuất oxyntomodulin có tác dụng kéo dài theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó dược phẩm này còn bao gồm một hoặc nhiều chất bảo quản được chọn từ nhóm bao gồm m-cresol, phenol và rượu benzylic.

24. Dược phẩm lỏng chứa thể liên hợp dẫn xuất oxyntomodulin có tác dụng kéo dài theo điểm 23, trong đó nồng độ của chất bảo quản trong dược phẩm lỏng nằm trong khoảng 0,001-1% (khối lượng/thể tích).

25. Dược phẩm lỏng chứa thể liên hợp dẫn xuất oxyntomodulin có tác dụng kéo dài theo điểm 23, trong đó chất bảo quản là m-cresol.

26. Dược phẩm lỏng chứa thể liên hợp dẫn xuất oxyntomodulin có tác dụng kéo dài theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó dược phẩm là để dùng dưới dạng đa liều.

27. Dược phẩm lỏng chứa thể liên hợp dẫn xuất oxyntomodulin có tác dụng kéo dài theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó dược phẩm này chứa:

5-50 mM histidin;
2-15% (khối lượng/thể tích) mannitol;
0,01-1 mg/mL methionin; và
0,001- 0,1% (khối lượng/thể tích) polysorbat 20.

28. Dược phẩm lỏng chứa thể liên hợp dẫn xuất oxyntomodulin có tác dụng kéo dài theo điểm 27, trong đó dẫn xuất oxyntomodulin bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 32.

29. Dược phẩm lỏng chứa thể liên hợp dẫn xuất oxyntomodulin có tác dụng kéo dài theo điểm 27, trong đó dẫn xuất oxyntomodulin bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 33.

30. Dược phẩm lỏng chứa thể liên hợp dẫn xuất oxyntomodulin có tác dụng kéo dài theo điểm 27, trong đó dẫn xuất oxyntomodulin bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 34.

31. Dược phẩm lỏng chứa thể liên hợp dẫn xuất oxyntomodulin có tác dụng kéo dài theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 27 đến 30, trong đó dược phẩm này còn bao gồm 0,001-1% (khối lượng/thể tích) m-cresol.

32. Phương pháp bào chế dược phẩm lỏng theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 22 và từ 27 đến 30, phương pháp này bao gồm các bước:

- a) điều chế thể liên hợp dẫn xuất oxyntomodulin có tác dụng kéo dài; và
- b) phối trộn thể liên hợp dẫn xuất oxyntomodulin có tác dụng kéo dài, điều chế được ở bước a), với chất làm ổn định chứa chất đệm, rượu đường và chất hoạt động bề mặt không ion.

33. Phương pháp bào chế dược phẩm lỏng theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 23 đến 26 và 31, phương pháp này bao gồm bước:

- a) điều chế thể liên hợp dẫn xuất oxyntomodulin có tác dụng kéo dài; và
- b) phối trộn thể liên hợp dẫn xuất oxyntomodulin có tác dụng kéo dài, điều chế được ở bước a), với chất làm ổn định, chứa chất đệm, rượu đường và chất hoạt động bề mặt không ion, và chất bảo quản.

34. Phương pháp theo điểm 32 hoặc 33, trong đó chất làm ổn định còn chứa một hoặc nhiều chất được chọn từ nhóm bao gồm tác nhân đẳng trương, đường, rượu polyhydric và axit amin.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> HANMI PHARM. CO., LTD.
 <120> Dược phẩm dạng lỏng chứa thể liên hợp oxyntomodulin có tác dụng kéo dài và phương pháp bào chế chúng
 <130> OPA13128
 <150> 10-2012-0124725
 <151> 2012-11-06
 <160> 49
 <170> KopatentIn 2.0
 <210> 1
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> oxyntomodulin
 <400> 1
 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> 2
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Dẫn xuất oxyntomodulin
 <220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (1)
 <223> Xaa = 4-imidazoaxetyl
 <400> 2
 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> 3
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Dẫn xuất oxyntomodulin

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (1)
 <223> Xaa = 4-imidazoaxetyl

<400> 3
 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> 4
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Dẫn xuất oxyntomodulin
 <220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (1)
 <223> Xaa = 4-imidazoaxetyl

<400> 4
 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> 5
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Dẫn xuất oxyntomodulin
 <220>
 <221> BIẾN THỂ

<222> (1)
 <223> Xaa = 4-imidazoaxetyl

<400> 5
 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> 6
 <211> 42
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Dẫn xuất oxyntomodulin

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (1)
 <223> Xaa = 4-imidazoaxetyl

<400> 6
 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> 7
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Dẫn xuất oxyntomodulin

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (1)
 <223> Xaa = 4-imidazoaxetyl

<400> 7
 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> 8
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Dẫn xuất oxyntomodulin

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (1)
 <223> Xaa = 4-imidazoaxetyl

<400> 8
 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> 9
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Dẫn xuất oxyntomodulin

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (1)
 <223> Xaa = 4-imidazoaxetyl

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (20)
 <223> Xaa = alpha-metyl-axit glutamic

<400> 9
 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> 10
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Dẫn xuất oxyntomodulin

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (1)
 <223> Xaa = 4-imidazoaxetyl

<400> 10
 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 Pro Ser Lys
 35 40

<210> 11
 <211> 43
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Dẫn xuất oxyntomodulin

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (1)
 <223> Xaa = 4-imidazoaxetyl

<400> 11
 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> 12
 <211> 38
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Dẫn xuất oxyntomodulin

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (1)
 <223> Xaa = 4-imidazoaxetyl

<400> 12
 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> 13
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Dẫn xuất oxyntomodulin

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (1)
 <223> Xaa = 4-imidazoaxetyl

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (16)
 <223> Xaa = alpha-metyl-axit glutamic

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (20)
 <223> Xaa = alpha-metyl-axit glutamic

<400> 13
 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> 14
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Dẫn xuất oxyntomodulin

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (1)
 <223> Xaa = 4-imidazoaxetyl

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (20)
 <223> Xaa = alpha-metyl-axit glutamic

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (24)
 <223> Xaa = alpha-metyl-axit glutamic

<400> 14
 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> 15
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Dẫn xuất oxyntomodulin

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (1)
 <223> Xaa = 4-imidazoaxetyl

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (24)
 <223> Xaa = alpha-metyl-axit glutamic

<400> 15
 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> 16
 <211> 34
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Dẫn xuất oxyntomodulin

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (1)
 <223> Xaa = 4-imidazoaxetyl

<400> 16
 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> 17
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Dẫn xuất oxyntomodulin

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (1)
 <223> Xaa = 4-imidazoaxetyl

<400> 17
 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> 18
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Dẫn xuất oxyntomodulin

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (1)
 <223> Xaa = 4-imidazoaxetyl

<400> 18
 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> 19
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Dẫn xuất oxyntomodulin

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (1)
 <223> Xaa = 4-imidazoaxetyl

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (16), (20)
 <223> axit amin ở vị trí 16 và vị trí 20 tạo thành vòng

<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 Lys 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> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Dẫn xuất oxyntomodulin

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (1)
 <223> Xaa = 4-imidazoaxetyl

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (16), (20)
 <223> axit amin ở vị trí 16 và vị trí 20 tạo thành vòng

<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 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> 21
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Dẫn xuất oxyntomodulin

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (1)
 <223> Xaa = 4-imidazoaxetyl

<400> 21
 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> 22
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Dẫn xuất oxyntomodulin

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (1)
 <223> Xaa = desamino-histidyl

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (16), (20)
 <223> axit amin ở vị trí 16 và vị trí 20 tạo thành vòng

<400> 22
 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> 23
 <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> 23
 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> 24
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Dẫn xuất oxyntomodulin

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (2)
 <223> Xaa = axit aminoisobutyric

<400> 24
 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> 25
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Dẫn xuất oxyntomodulin

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (2)
 <223> Xaa = axit aminoisobutyric

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (16), (20)
 <223> axit amin ở vị trí 16 và vị trí 20 tạo thành vòng

<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 Gln Trp Leu Met Asn Thr Cys
 20 25 30

```

<210>      26
<211>      30
<212>      PRT
<213>      Trình tự nhân tạo

<220>
<223>      Dẫn xuất oxyntomodulin

<220>
<221>      BIẾN THỂ
<222>      (2)
<223>      Xaa = axit aminoisobutyric

<220>
<221>      BIẾN THỂ
<222>      (12), (16)
<223>      axit amin ở vị trí 12 và vị trí 16 tạo thành vòng

<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>      29
<212>      PRT
<213>      Trình tự nhân tạo

<220>
<223>      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

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Cys Trp Leu Met Asn Thr
      20                      25

<210>      28
<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> 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
20 25

<210> 29

<211> 37

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Dẫn xuất oxyntomodulin

<220>

<221> BIẾN THỂ

<222> (2)

<223> Xaa = d-serin.

<400> 29

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> 30

<211> 37

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Dẫn xuất oxyntomodulin

<220>

<221> BIẾN THỂ

<222> (1)

<223> Xaa = 4-imidazoaxetyl

<400> 30

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> 31
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Dẫn xuất oxyntomodulin

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (1)
 <223> Xaa = 4-imidazoaxetyl

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (2)
 <223> Xaa = d-serin.

<400> 31
 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> 32
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Dẫn xuất oxyntomodulin

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (1)
 <223> Xaa = 4-imidazoaxetyl

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (2)
 <223> Xaa = axit aminoisobutyric

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (16), (20)
 <223> axit amin ở vị trí 16 và vị trí 20 tạo thành vòng

<400> 32

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> 33
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Dẫn xuất oxyntomodulin

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (2)
 <223> Xaa = axit aminoisobutyric

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (16), (20)
 <223> axit amin ở vị trí 16 và vị trí 20 tạo thành vòng

<400> 33
 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> 34
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Dẫn xuất oxyntomodulin

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (2)
 <223> Xaa = axit aminoisobutyric

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (16), (20)
 <223> axit amin ở vị trí 16 và vị trí 20 tạo thành vòng

<400> 34
 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> 35
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Nhóm R2

<400> 35
 Lys Arg Asn Arg Asn Asn Ile Ala
 1 5

<210> 36
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Nhóm R2

<400> 36
 Gly Pro Ser Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
 1 5 10

<210> 37
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Nhóm R2

<400> 37
 Gly Pro Ser Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Lys
 1 5 10

<210> 38
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Nhóm R2

<400> 38
 His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp
 1 5 10 15

<210> 39
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Nhóm R2

<400> 39

His	Ser	Gln	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Tyr	Ser	Arg	Tyr	Leu	Asp	Lys
1				5					10					15	

<210>

40

<211>

20

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Nhóm R2

<400> 40

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>

41

<211>

28

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Nhóm A hoặc B

<400> 41

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>

42

<211>

28

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Nhóm A hoặc B

<400> 42

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> 43
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Nhóm A hoặc B o

<400> 43
 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> 44
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Nhóm A hoặc B

<400> 44
 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> 45
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Nhóm A hoặc B

<400> 45
 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> 46
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Nhóm A hoặc B

<400> 46
 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> 47
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Nhóm A hoặc B

<400> 47
 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> 48
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Nhóm B

<400> 48
 Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Arg Gln Met Glu Glu Glu
 1 5 10 15

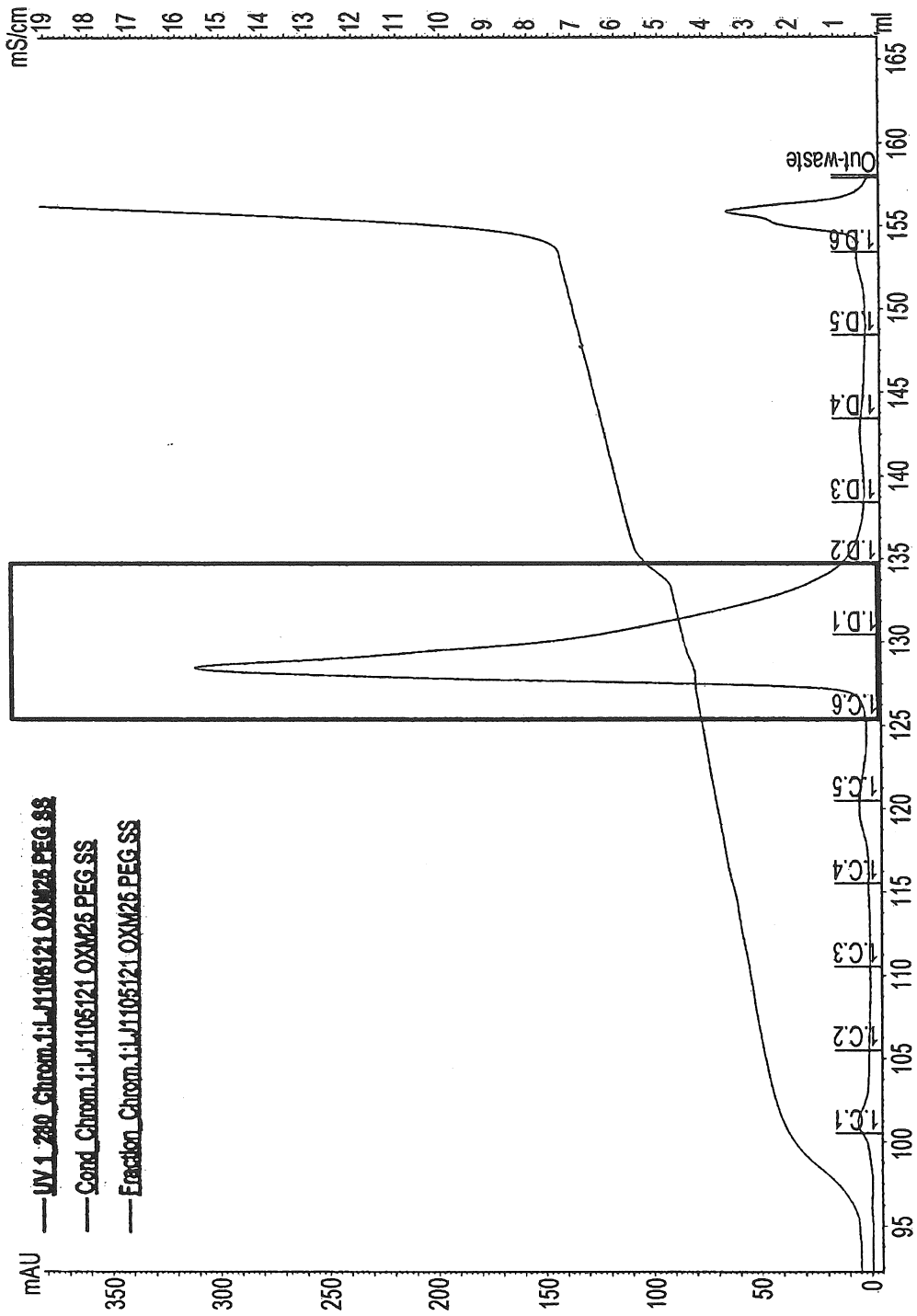
Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp
 20

<210> 49
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

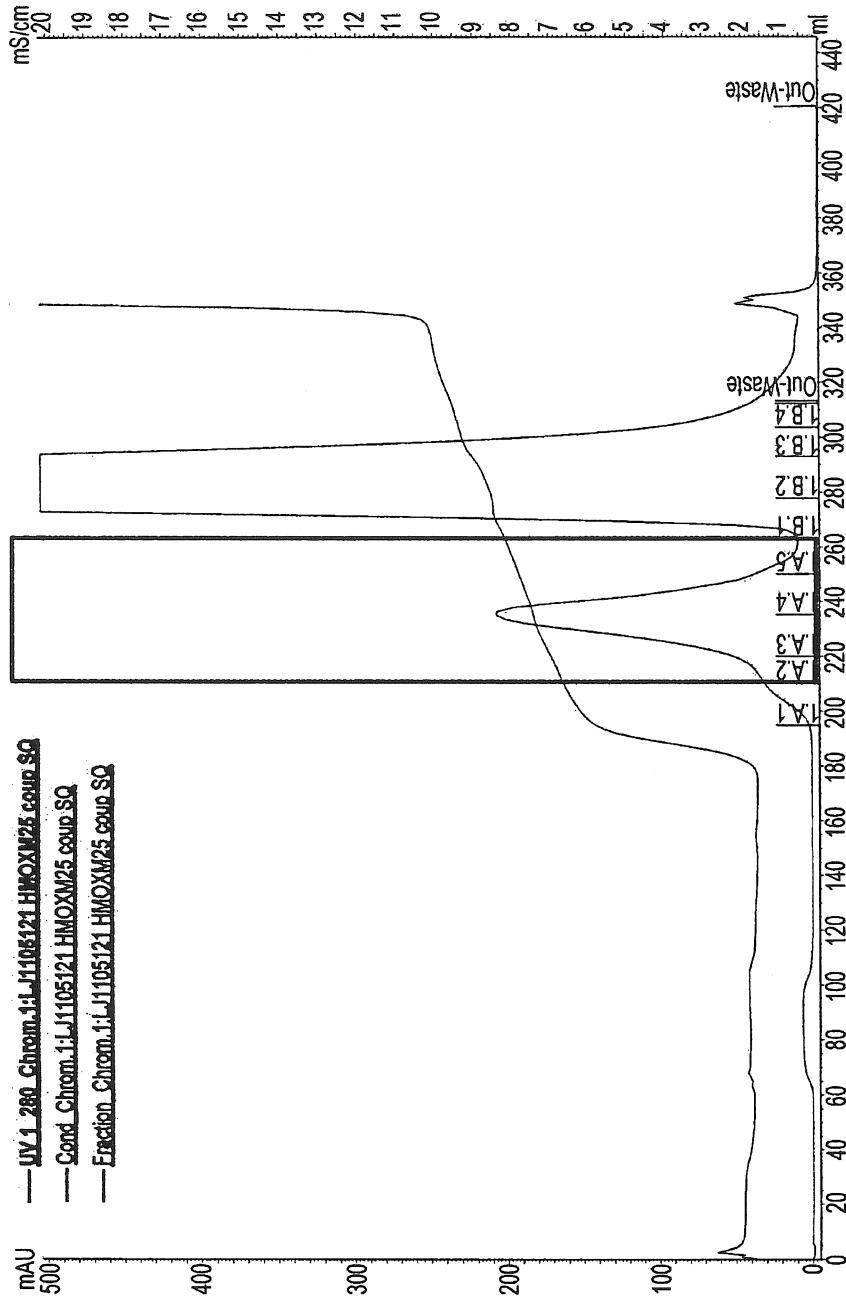
<220>
 <223> Nhóm B

<400> 49
 Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Tyr Leu Asp
 1 5 10

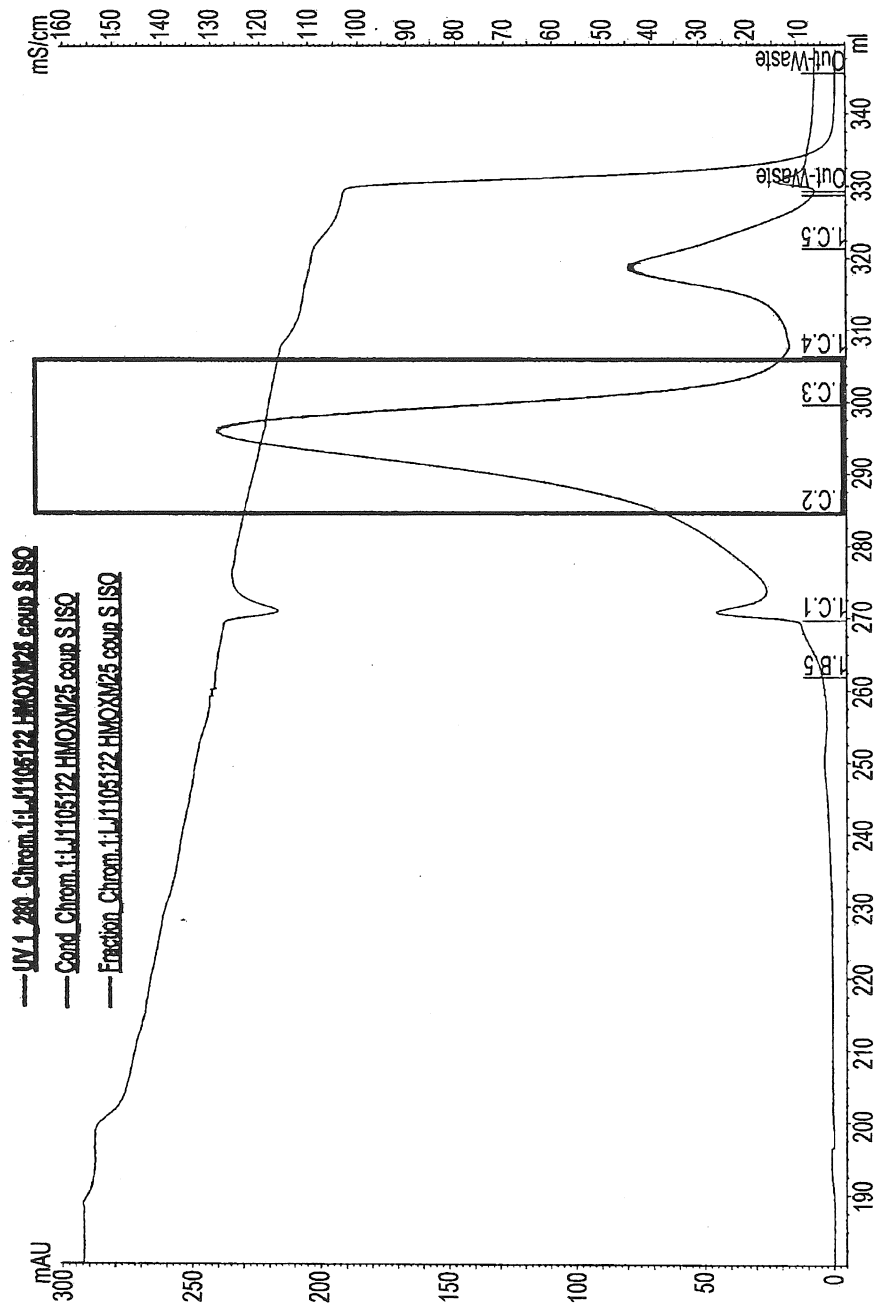
【Fig. 1a】



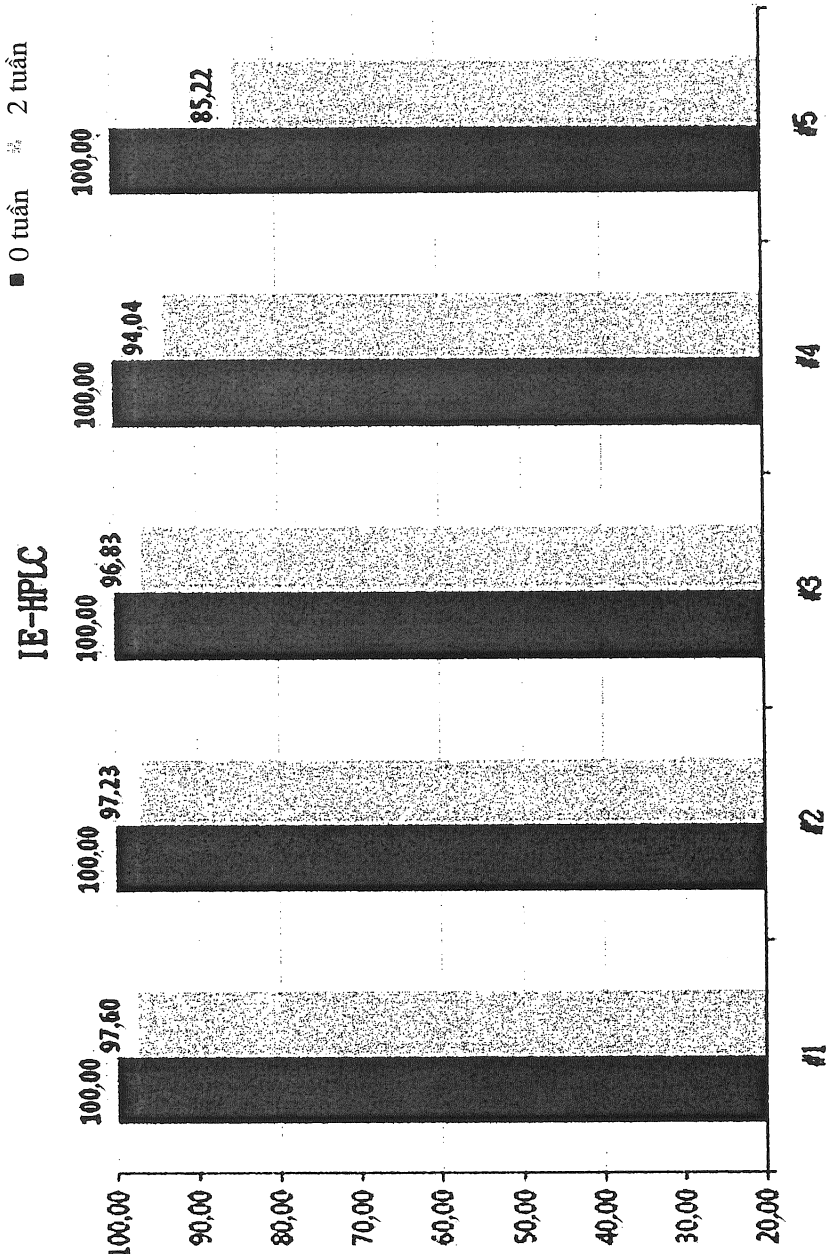
【Fig. 1b】



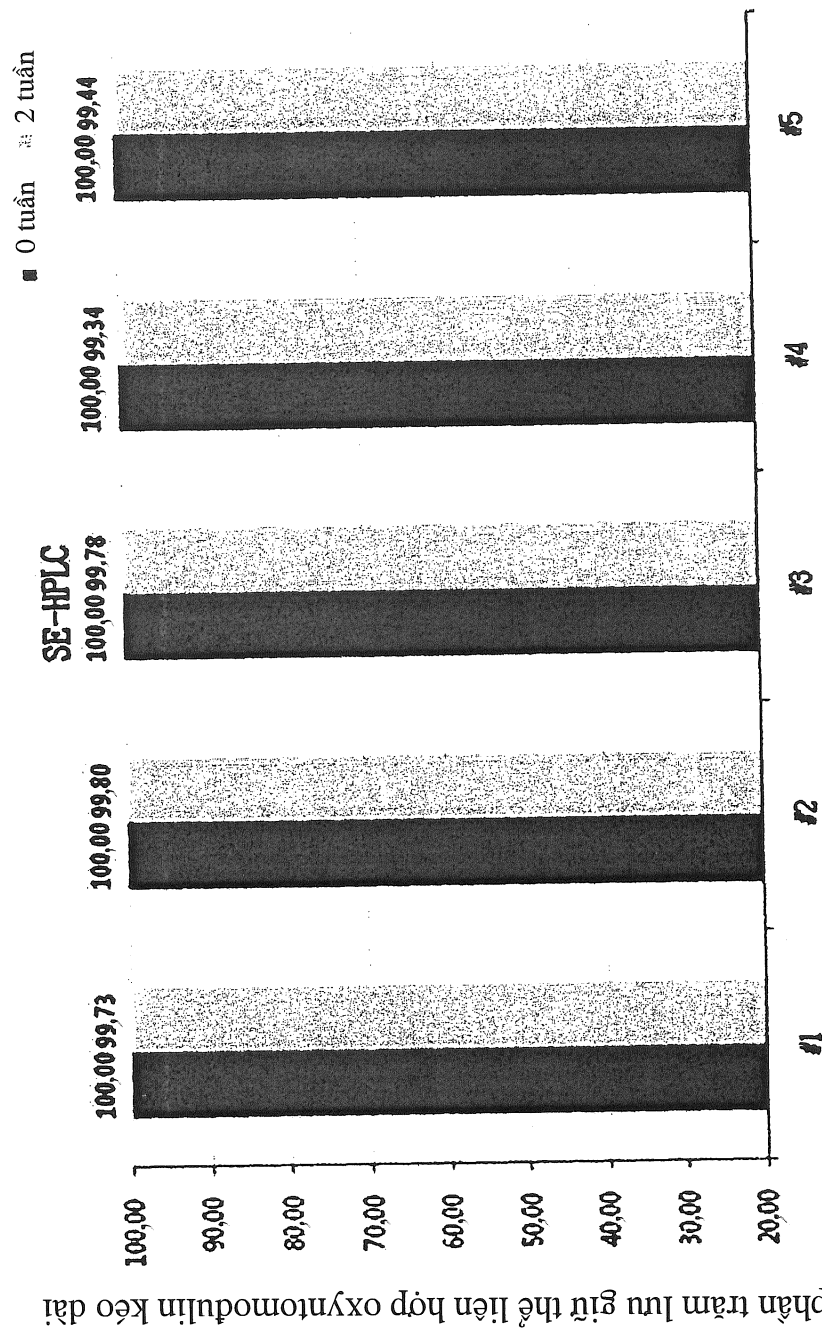
【Fig. 1c】



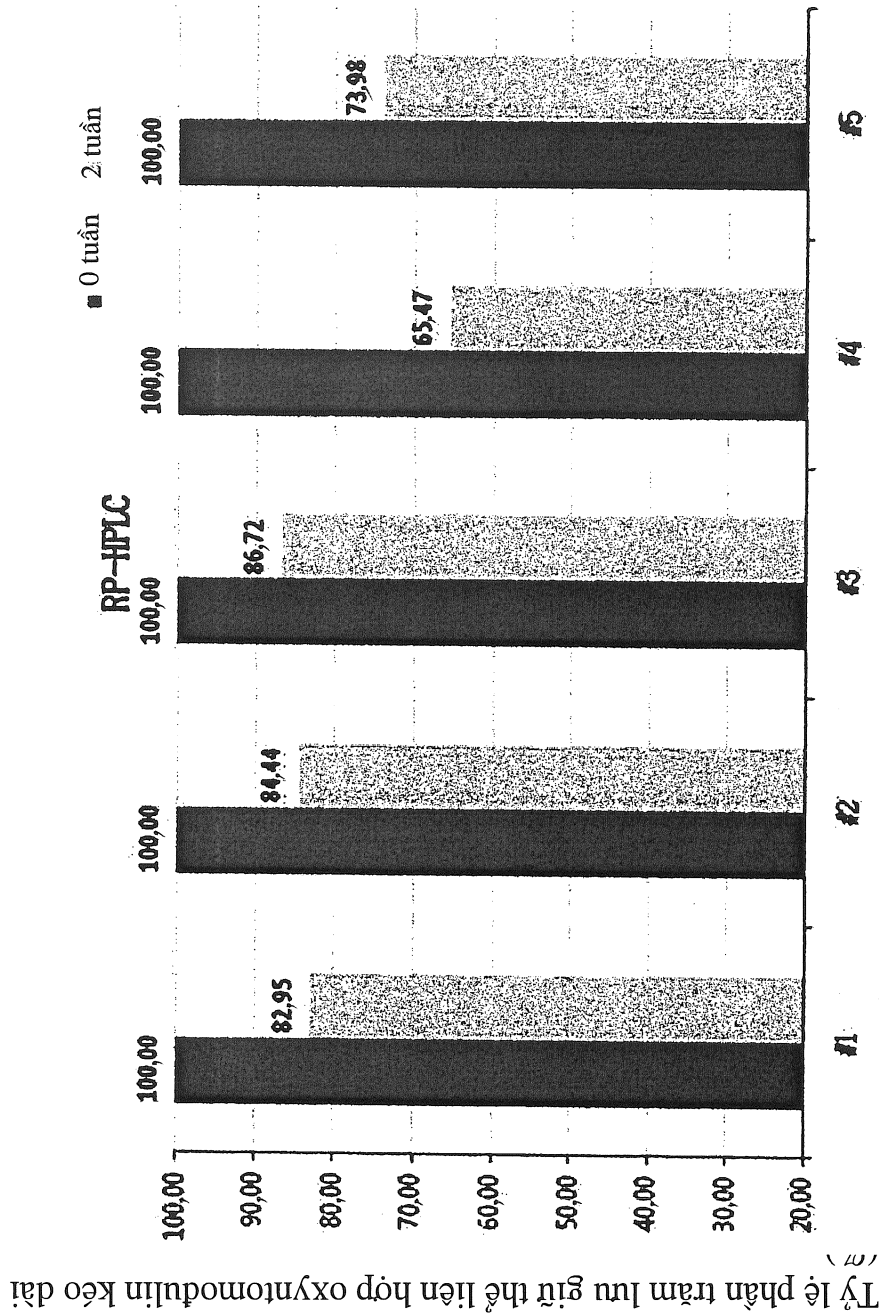
【Fig. 2a】



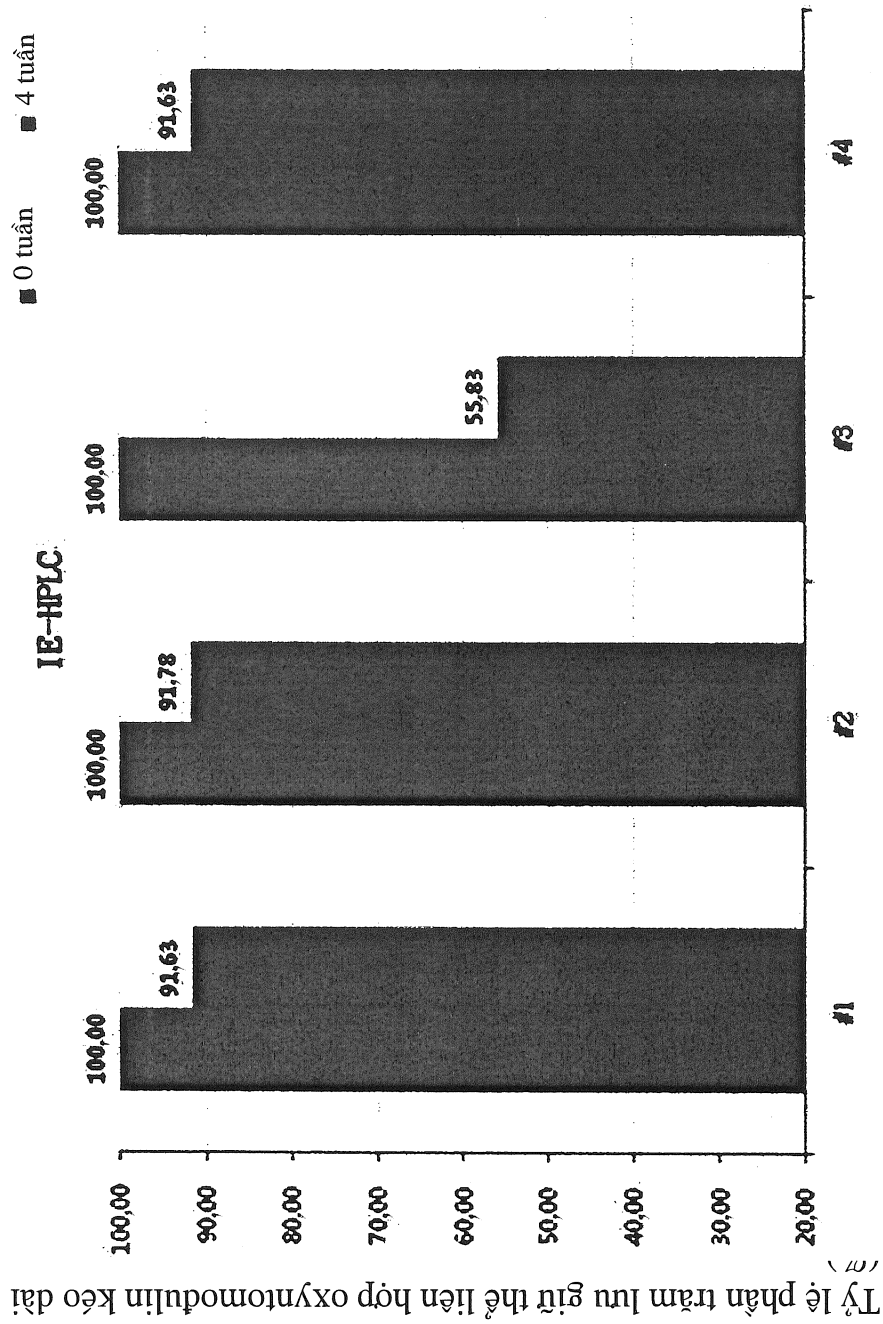
Tỷ lệ phần trăm lưu giữ thể liên hợp oxytocin kéo dài



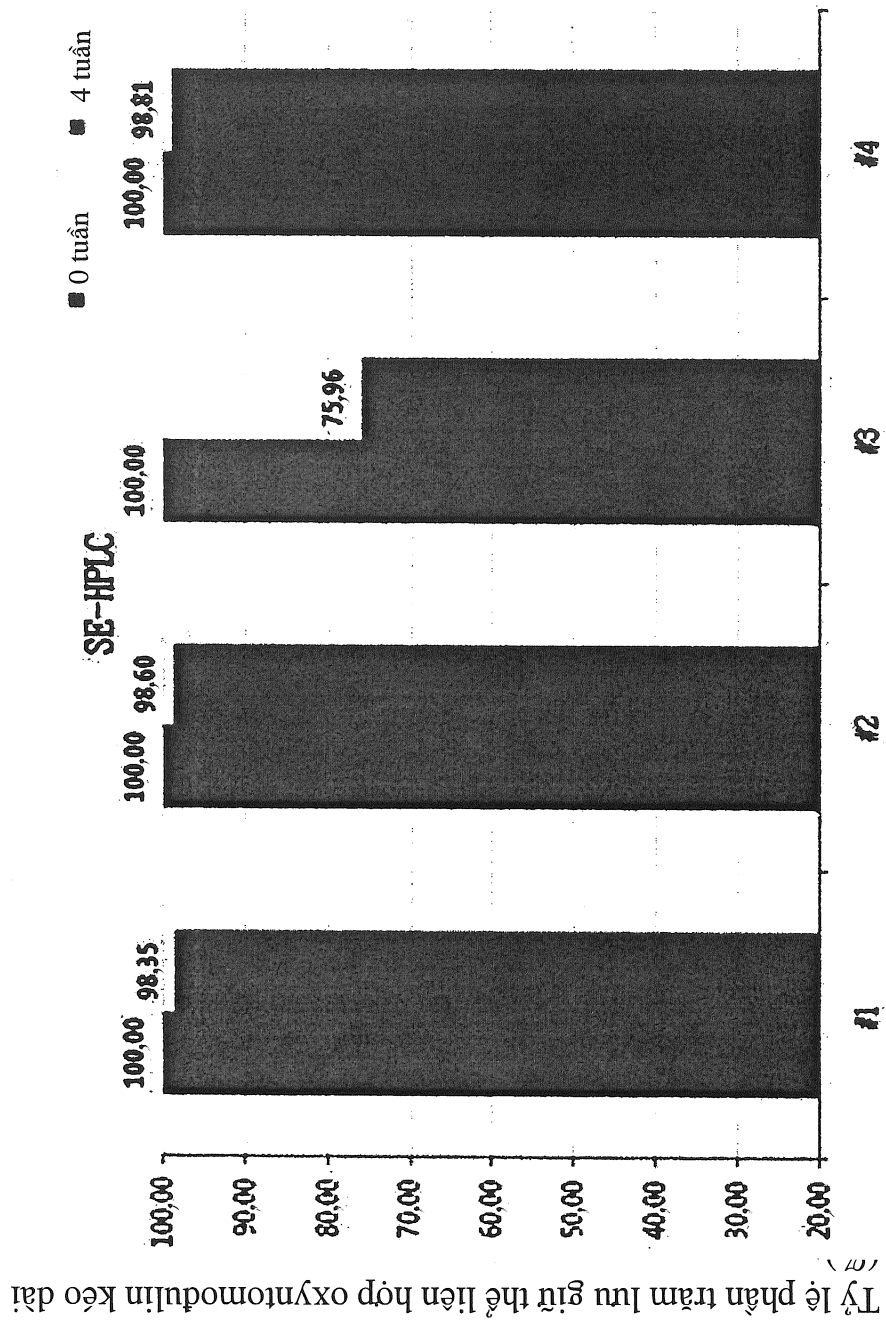
【Fig. 2c】



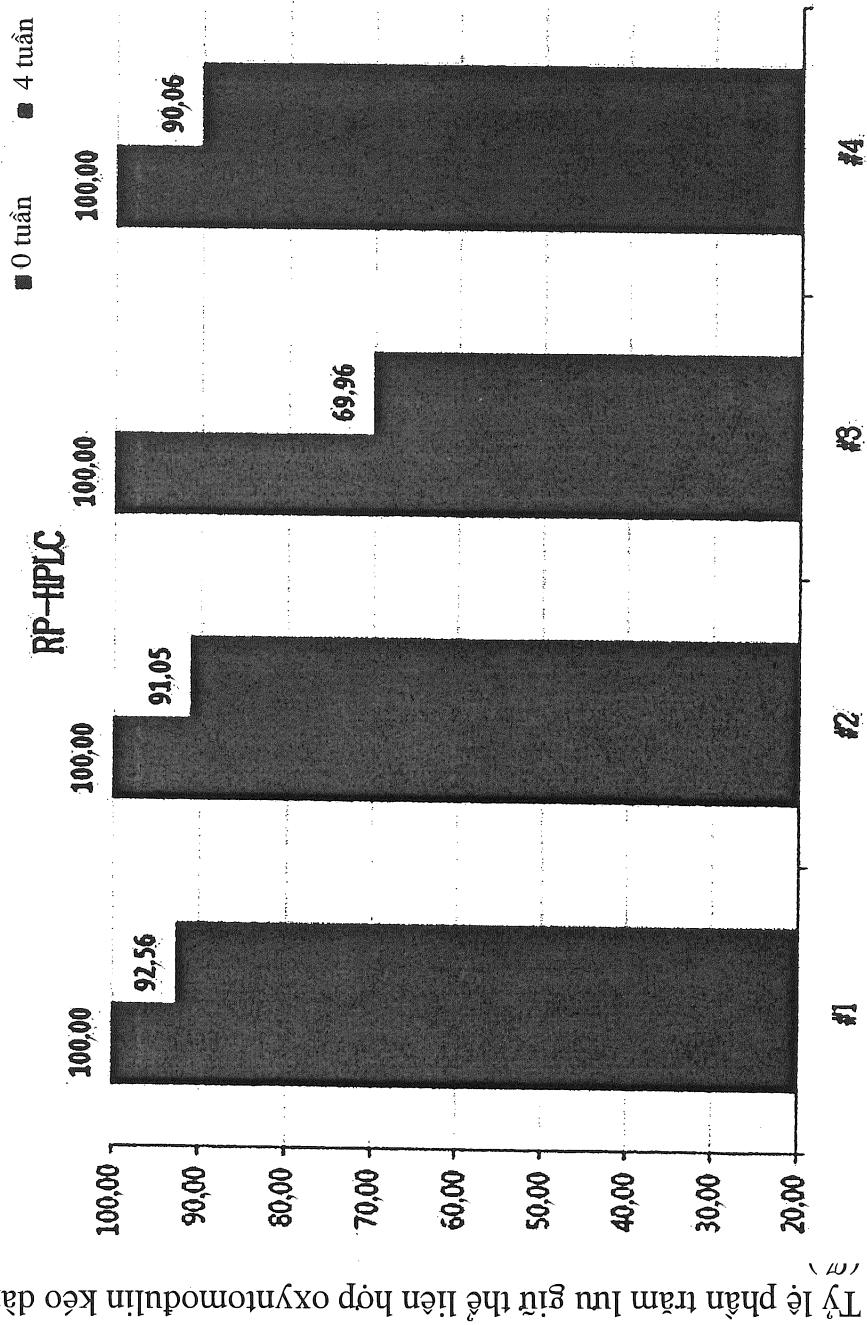
【Fig. 3a】



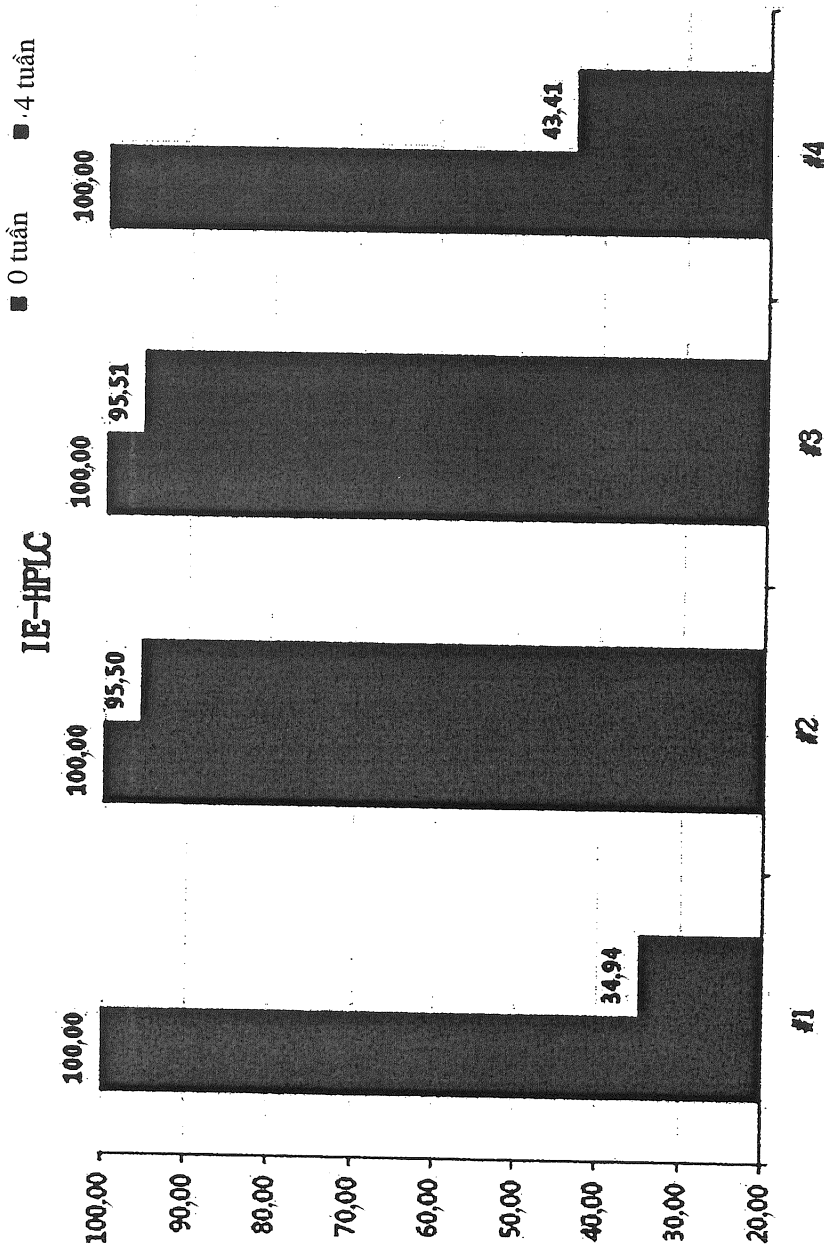
【Fig. 3b】



【Fig. 3c】

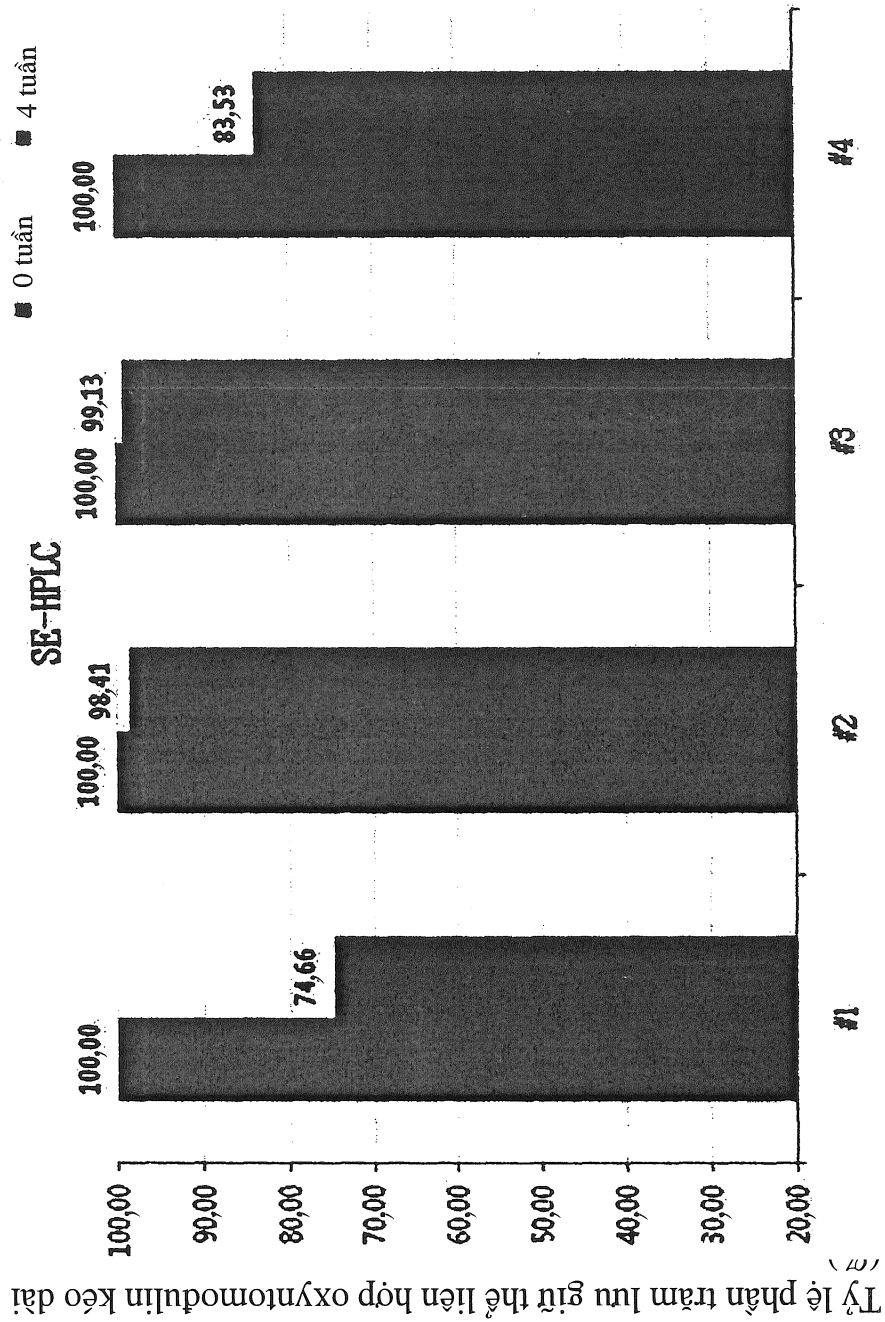


【Fig. 4a】

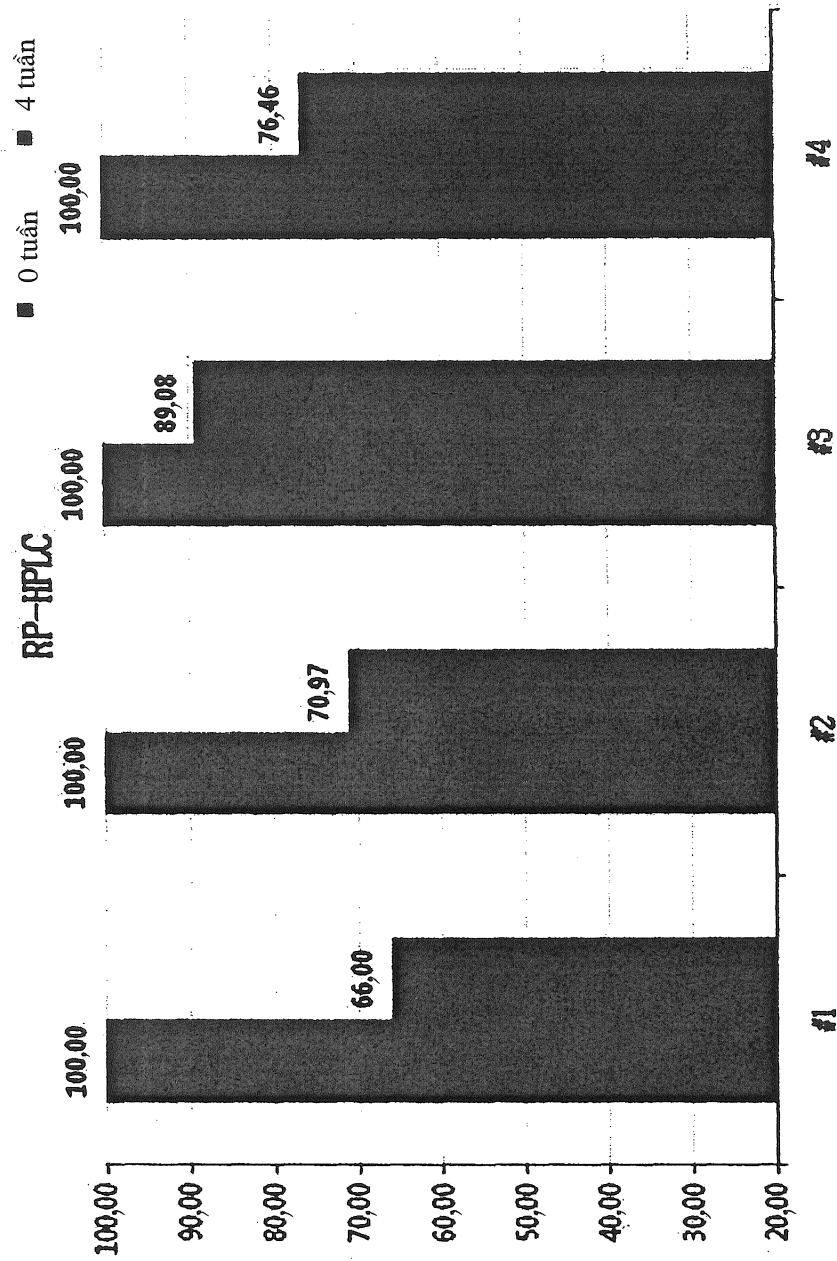


Tỷ lệ phần trăm lưu giữ thể liên hợp oxytocin kéo dài

【Fig. 4b】

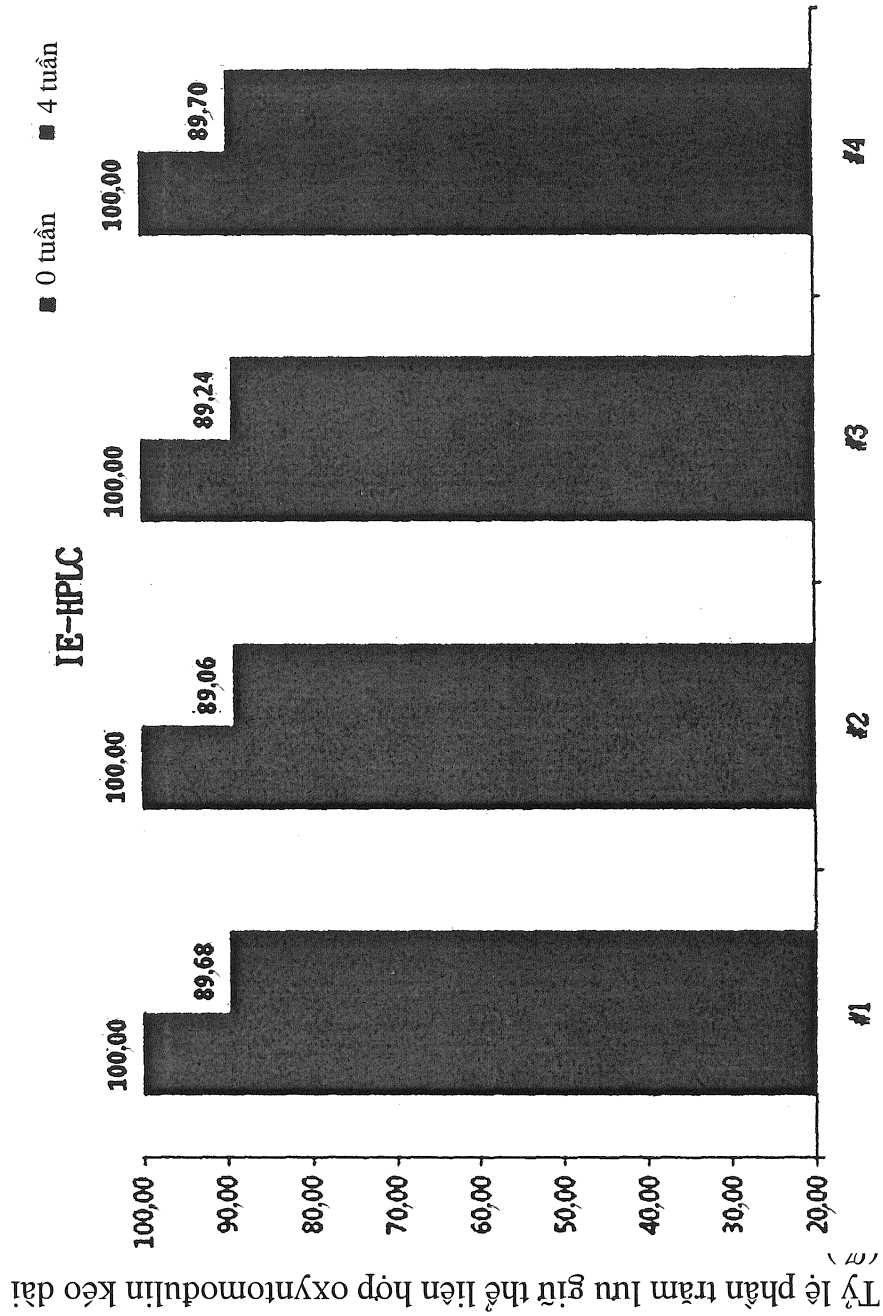


【Fig. 4c】

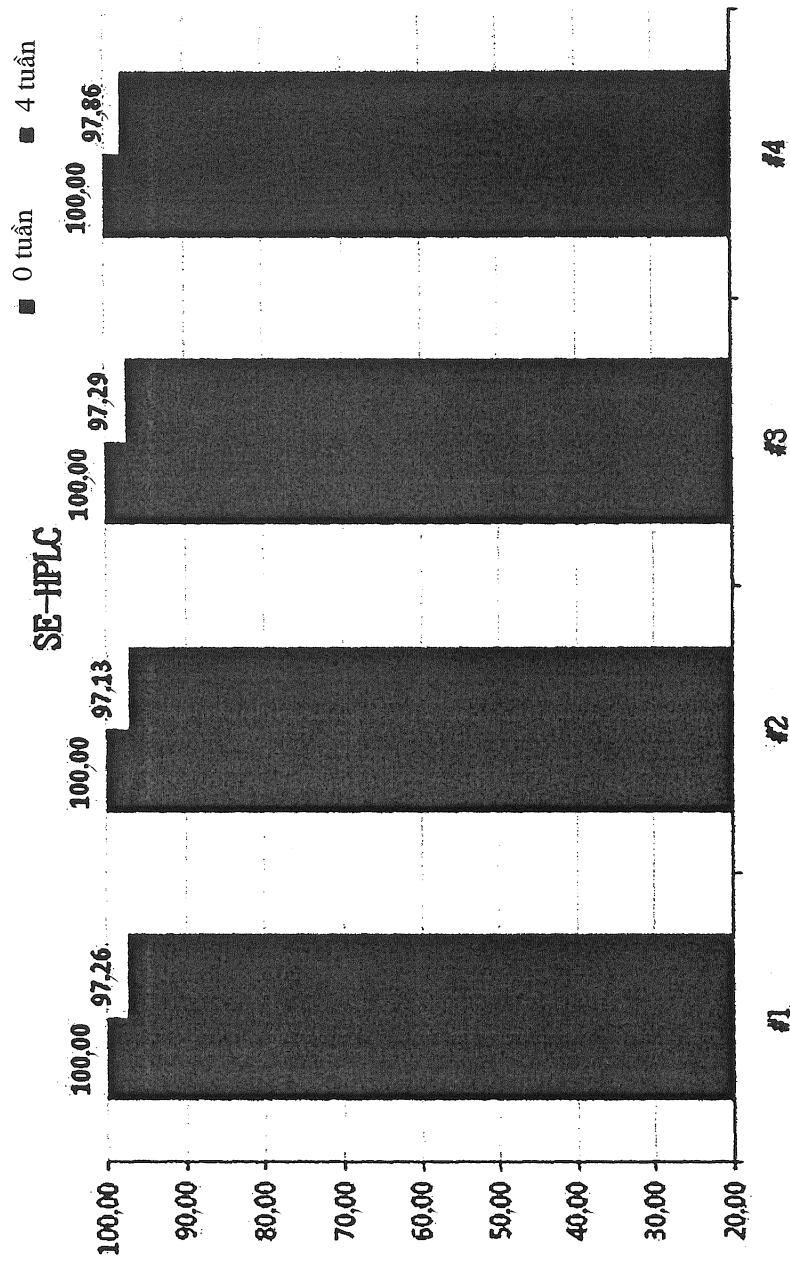


Tỷ lệ phần trăm lưu giữ thể liên hợp oxytocin kéo dài

【Fig. 5a】

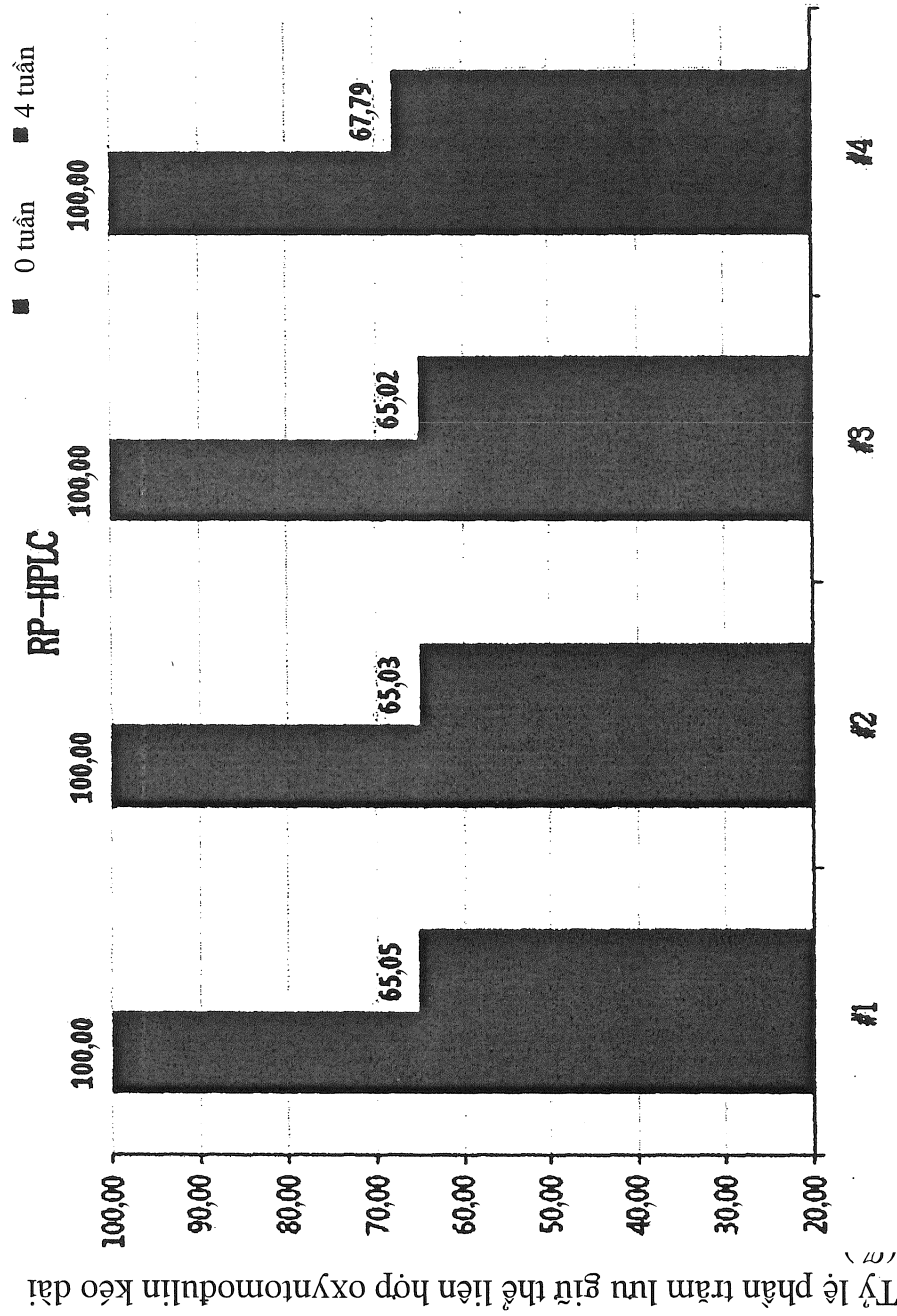


【Fig. 5b】

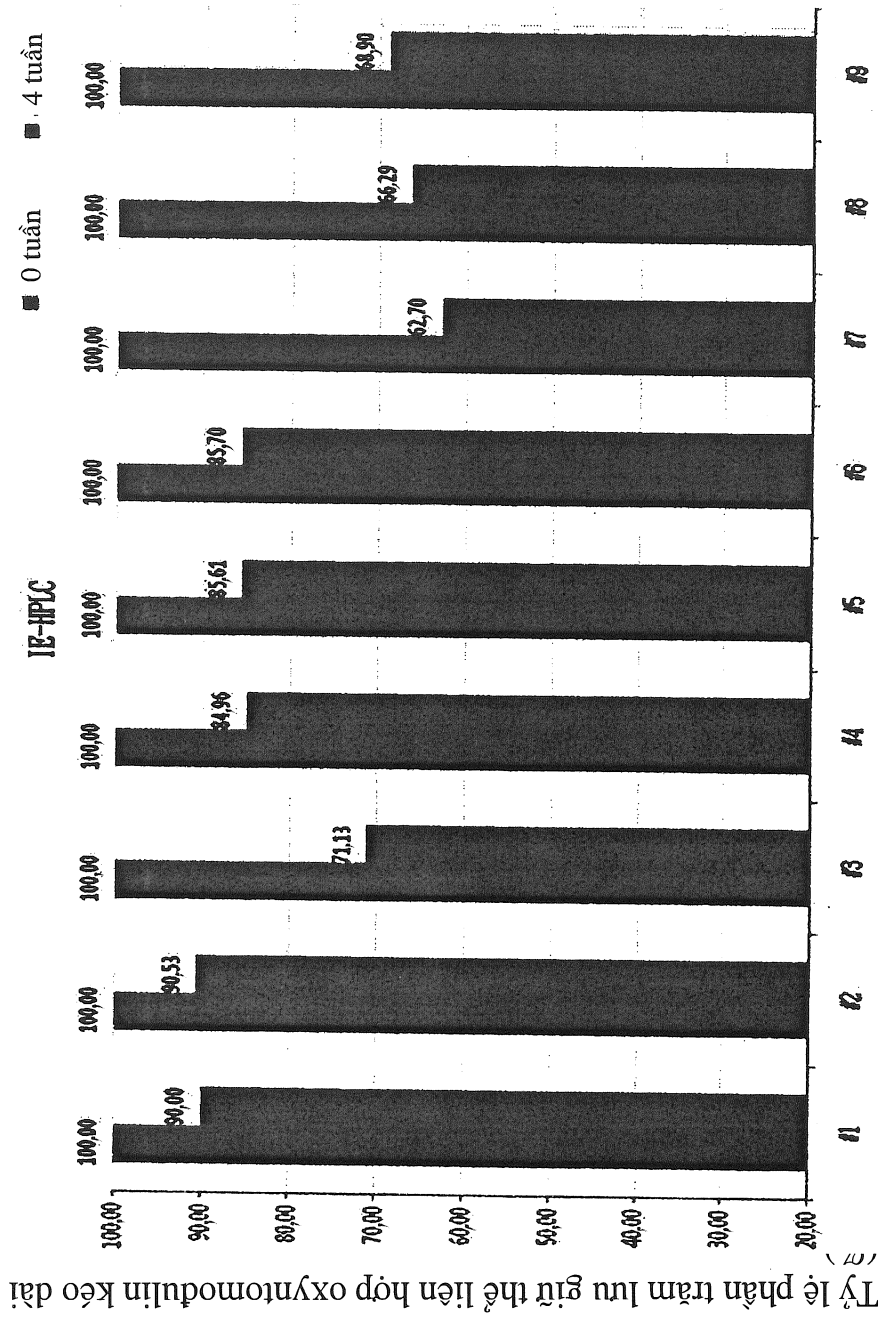


Tỷ lệ phần trăm lưu giữ thể liên hợp oxyntomodulin kéo dài (%)

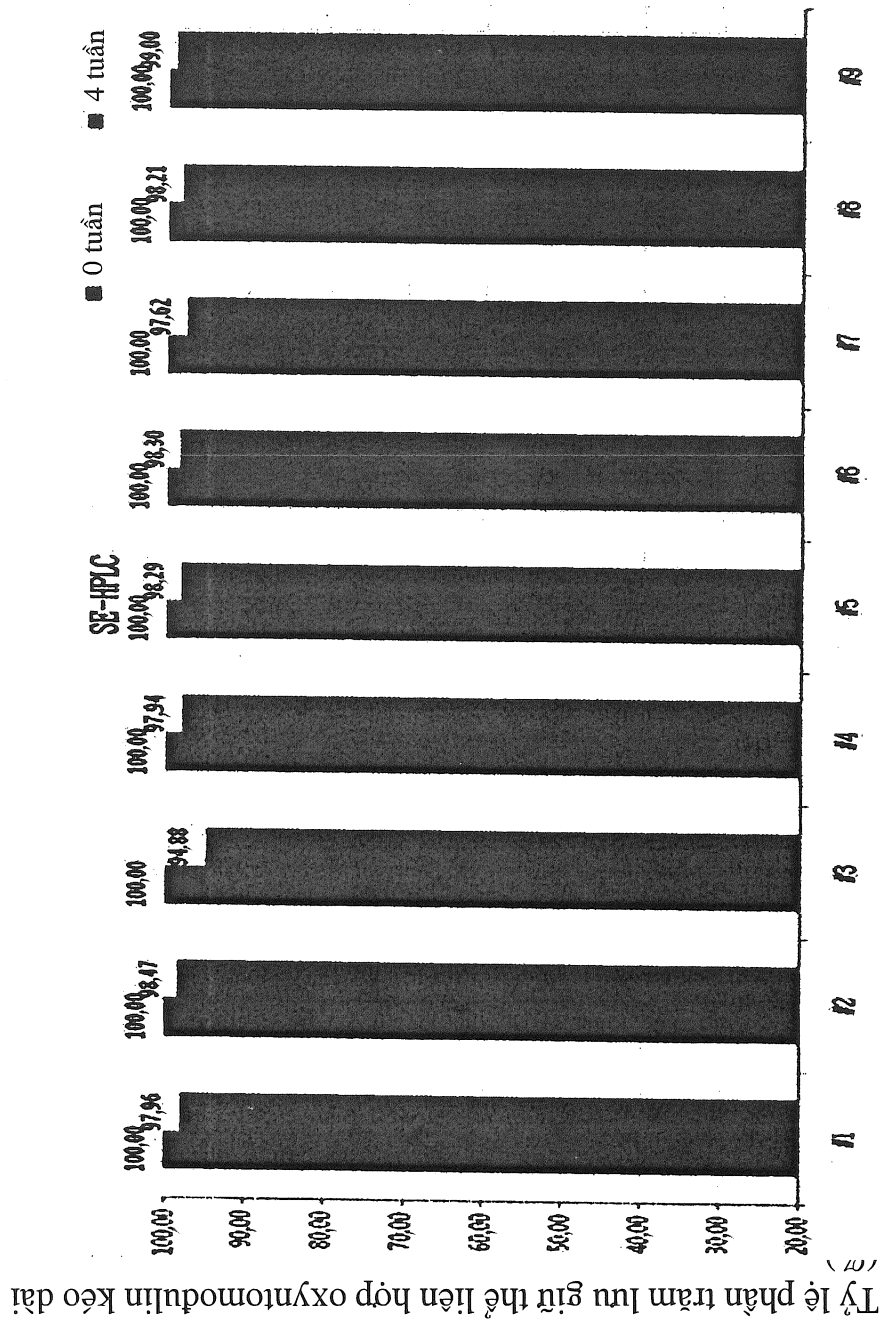
【Fig. 5c】



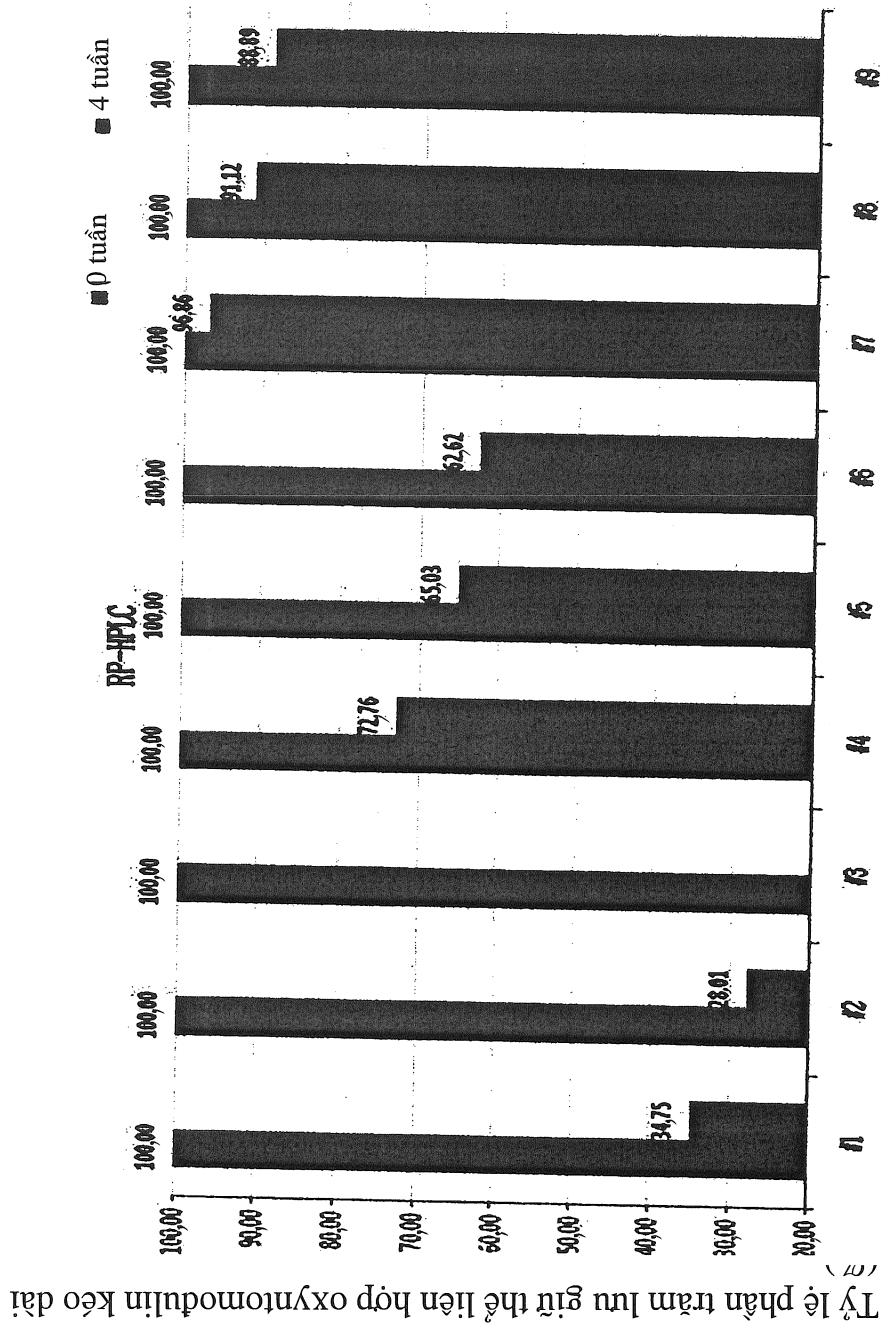
【Fig. 6a】



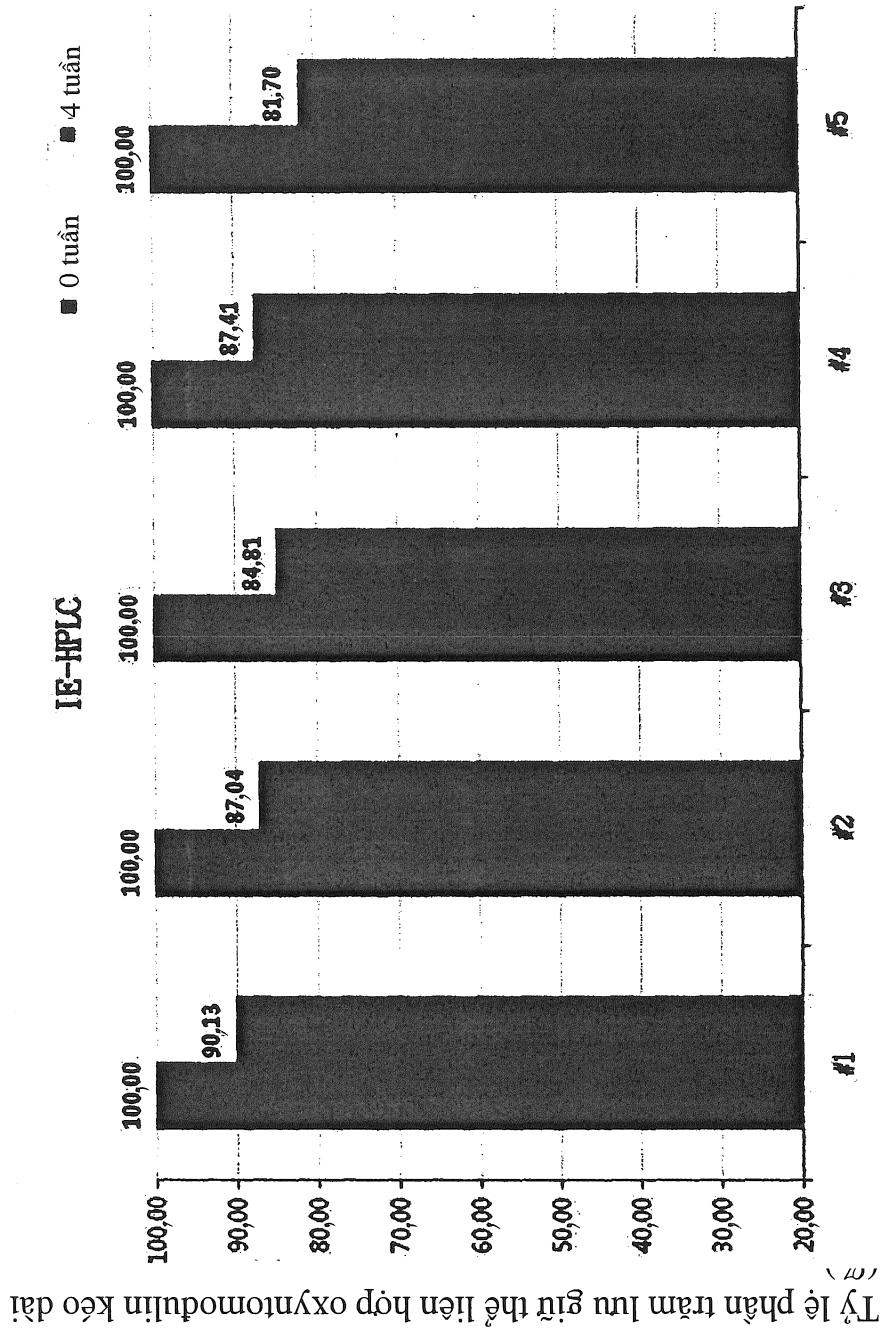
【Fig. 6b】



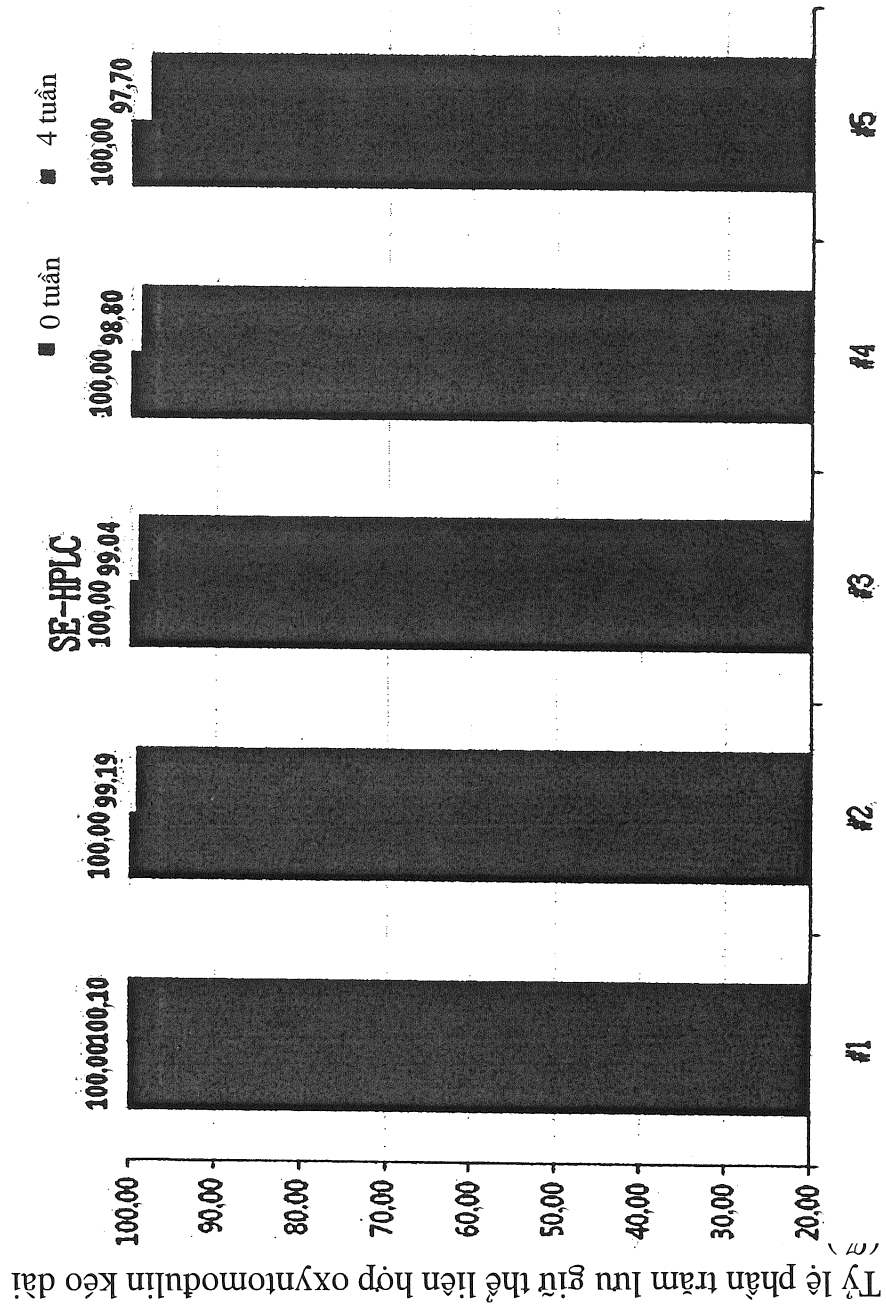
【Fig. 6c】



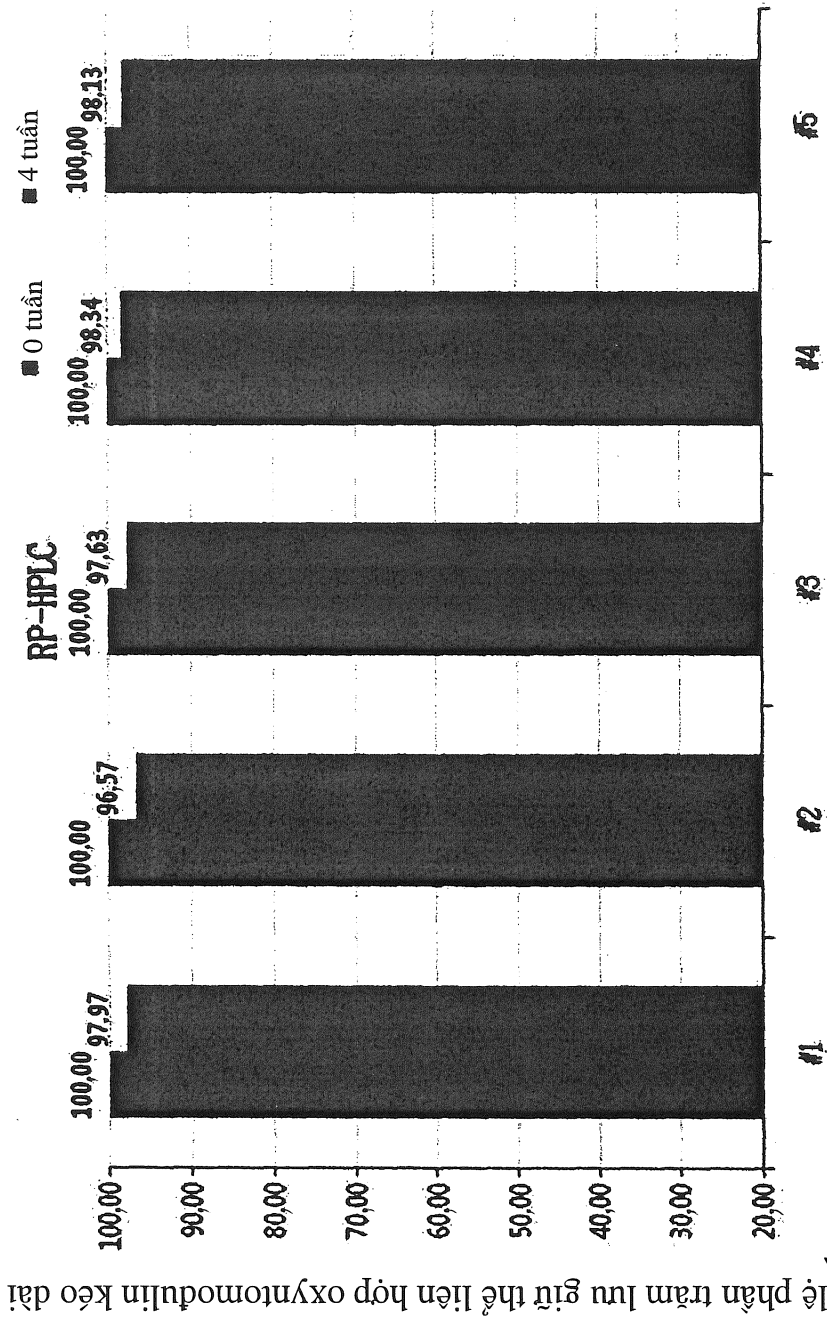
【Fig. 7a】



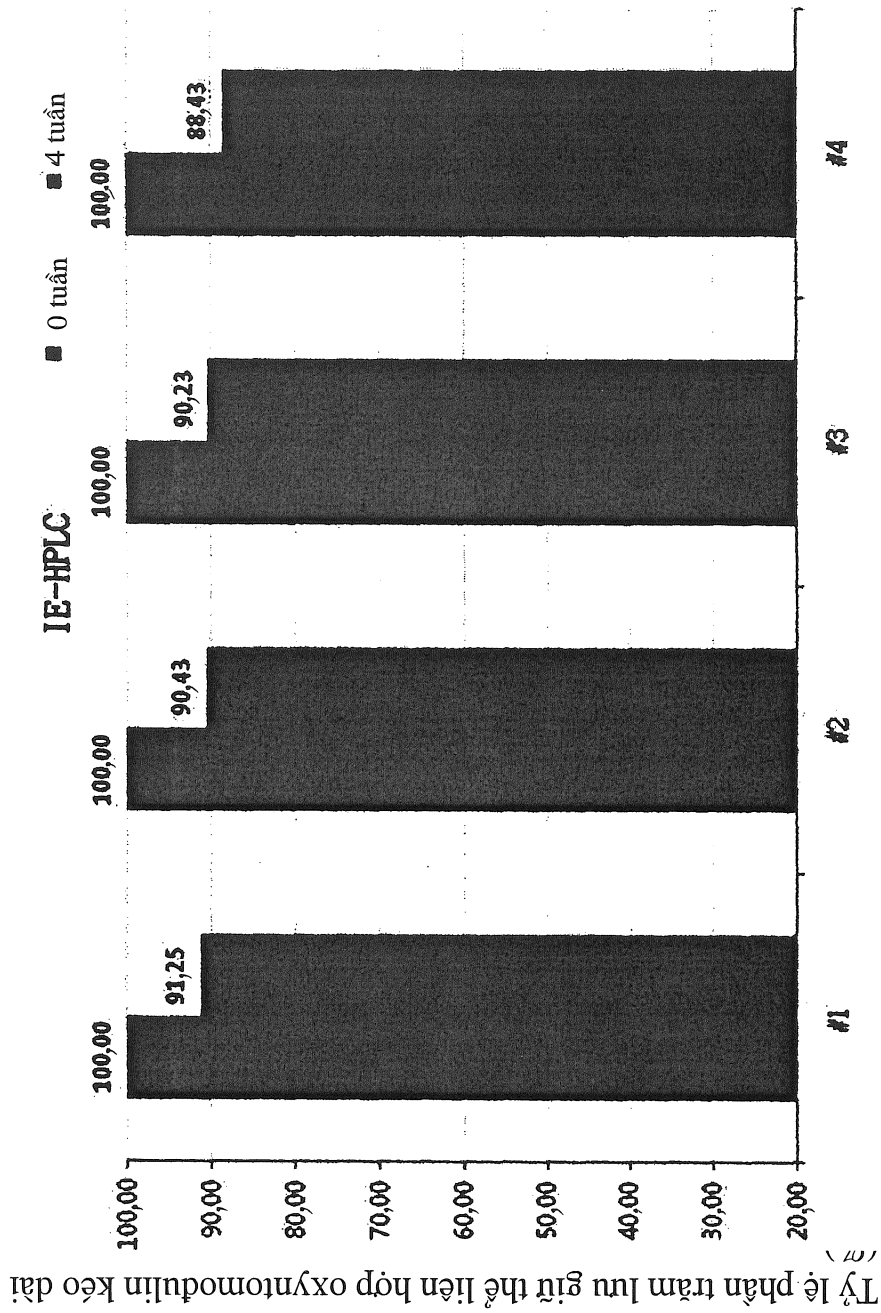
【Fig. 7b】



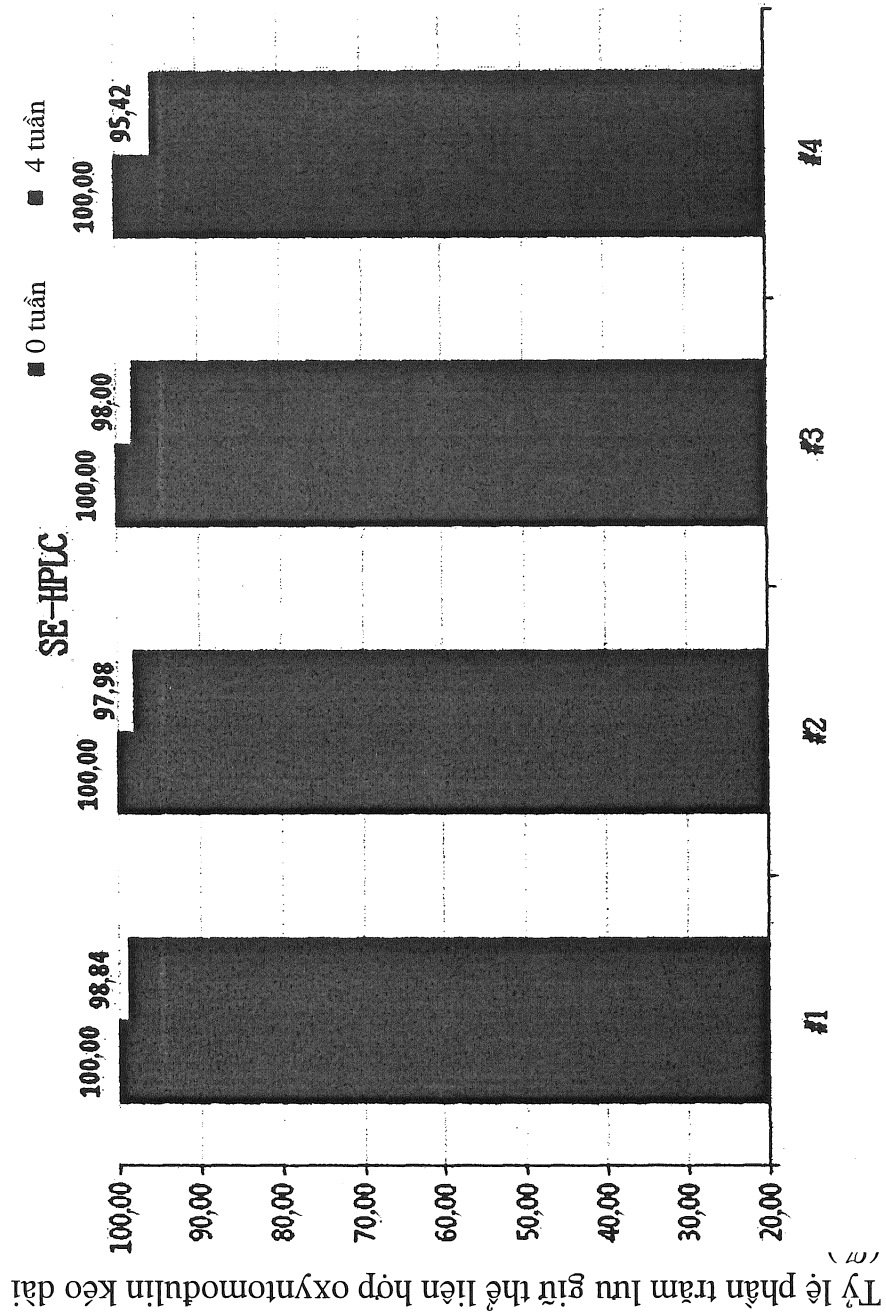
【Fig. 7c】



【Fig. 8a】



【Fig. 8b】



【Fig. 8c】

