



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

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

(11)



1-0034863

(51)⁸ A61K 38/26; A61K 38/28

(13) B

(21) 1-2018-00444

(22) 29/06/2016

(86) PCT/KR2016/006984 29/06/2016

(87) WO 2017/003191 05/01/2017

(30) 10-2015-0093265 30/06/2015 KR

(45) 27/02/2023 419

(43) 26/03/2018 360A

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

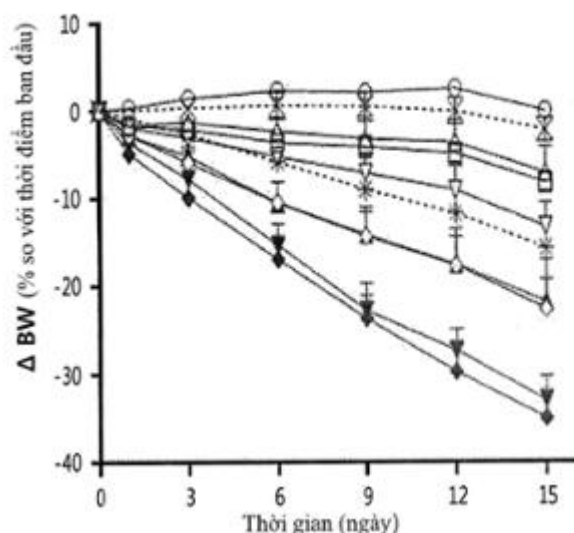
214, Muha-ro, Paltan-myeon, Hwaseong-si, Gyeonggi-do 18536, Republic of Korea

(72) KIM, Jung Kuk (KR); PARK, Young Jin (KR); CHOI, In Young (KR); JUNG, Sung Youb (KR).

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

(54) PEPTIT LÀ DẪN XUẤT GLUCAGON VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA THỂ TIẾP HỢP CÓ TÁC DỤNG KÉO DÀI CỦA NÓ

(57) Sáng chế đề cập đến peptit là dẫn xuất glucagon, thể tiếp hợp có tác dụng kéo dài của peptit này, và dược phẩm dùng để điều trị hoặc phòng các hội chứng chuyển hóa chứa thể tiếp hợp này.



○- tá được

□- dẫn xuất exendin-4 có tác dụng kéo dài (3,3 nmol/kg)

△- dẫn xuất có tác dụng kéo dài của trình tự nêu trong SEQ ID NO: 12 (1,6 nmol/kg)

▽- dẫn xuất có tác dụng kéo dài của trình tự nêu trong SEQ ID NO: 12 (3,3 nmol/kg)

◇- dẫn xuất có tác dụng kéo dài của trình tự nêu trong SEQ ID NO: 12 (6,6 nmol/kg)

▲- dẫn xuất exendin-4 có tác dụng kéo dài (3,3 nmol/kg) +
dẫn xuất có tác dụng kéo dài của trình tự nêu trong SEQ ID NO: 12 (1,6 nmol/kg)

▼- dẫn xuất exendin-4 có tác dụng kéo dài (3,3 nmol/kg) +
dẫn xuất có tác dụng kéo dài của trình tự nêu trong SEQ ID NO: 12 (3,3 nmol/kg)

◆- dẫn xuất exendin-4 có tác dụng kéo dài (3,3 nmol/kg) +
dẫn xuất có tác dụng kéo dài của trình tự nêu trong SEQ ID NO: 12 (6,6 nmol/kg)

×- ăn theo cặp (với dẫn xuất có tác dụng kéo dài của trình tự nêu trong SEQ ID NO: 12 (3,3 nmol/kg))

⊕- ăn theo cặp (với dẫn xuất exendin-4 có tác dụng kéo dài (3,3 nmol/kg) +
dẫn xuất có tác dụng kéo dài của trình tự nêu trong SEQ ID NO: 12 (3,3 nmol/kg))

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến dẫn xuất glucagon, thể tiếp hợp có tác dụng kéo dài của dẫn xuất glucagon này, và được phẩm dùng để điều trị hoặc phòng các hội chứng chuyển hóa chứa thể tiếp hợp này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Do sự tăng trưởng kinh tế gần đây và các thay đổi trong thói quen ăn uống, v.v., tỷ lệ mắc các bệnh liên quan đến hội chứng chuyển hóa bao gồm các bệnh khác nhau như bệnh béo phì, chứng tăng lipit máu, bệnh tăng huyết áp, bệnh xơ cứng động mạch, chứng tăng insulin huyết, bệnh đái tháo đường, và bệnh gan gia tăng nhanh chóng. Các bệnh này có thể xảy ra một cách độc lập nhưng nói chung chúng hầu hết xảy ra trong mối quan hệ gần với nhau, kèm theo các triệu chứng khác nhau.

Cụ thể, theo Tổ chức Y tế thế giới (World Health Organization - WHO), nhiều hơn một tỷ người trưởng thành thừa cân trên toàn thế giới, trong số đó trên 3 triệu người béo phì lâm sàng, và 250.000 người chết mỗi năm ở châu Âu và hơn 2,5 triệu người trên toàn thế giới chết mỗi năm do các bệnh liên quan đến sự thừa cân.

Tình trạng thừa cân và béo phì là nguyên nhân làm tăng huyết áp và tăng hàm lượng cholesterol và gây ra hoặc làm xấu hơn các bệnh khác, như bệnh tim, bệnh đái tháo đường, bệnh viêm khớp, v.v.. Ngoài ra, vấn đề của bệnh béo phì cũng trở thành nguyên nhân chính trong việc tăng tỷ lệ mắc bệnh xơ cứng động mạch, bệnh tăng huyết áp, chứng tăng lipit máu, hoặc bệnh tim ở trẻ em hoặc thanh thiếu niên cũng như người trưởng thành.

Mặc dù bệnh béo phì là tình trạng bệnh nghiêm trọng mà gây ra nhiều bệnh khác nhau trên toàn thế giới như nêu trên, nhưng để khắc phục được nó cần có nỗ lực của cá nhân, trong khi các bệnh nhân béo phì thường thiếu sự tự kiểm soát. Tuy nhiên, bệnh béo phì không dễ được điều trị, do nó là bệnh phức tạp liên quan đến các cơ chế kiểm soát sự thèm ăn và chuyển hóa năng lượng. Do đó, việc điều trị bệnh béo phì đòi hỏi không chỉ là nỗ lực của các bệnh nhân béo phì, mà còn cần có phương pháp có khả năng điều trị các cơ chế bất thường liên quan đến việc kiểm soát sự thèm ăn và sự chuyển hóa năng lượng. Do đó, đã có các nỗ lực phát triển các thuốc điều trị các cơ chế bất thường đó.

Kết quả của các nỗ lực này, các thuốc như Rimonabant[®] (Sanofi-Aventis), Sibutramin[®] (Abbott), Contrave[®] (Takeda), Orlistat[®] (Roche), v.v. đã được phát triển, nhưng chúng có các nhược điểm là tác dụng bất lợi nghiêm trọng hoặc tác dụng chống béo phì rất yếu. Ví dụ, theo báo cáo, Rimonabant[®] thể hiện tác dụng phụ là rối loạn hệ

thần kinh trung ương, Sibutramine® và Contrave® thể hiện các tác dụng phụ lên tim mạch, và Orlistat® thể hiện mức độ giảm cân chỉ khoảng 4 kg khi được dùng trong một năm. Do đó, không có chất trị liệu nào để điều trị bệnh béo phì mà có thể được kê đơn một cách an toàn cho các bệnh nhân béo phì.

Nhiều nghiên cứu sâu rộng đã được thực hiện để phát triển các chất trị liệu mới nhằm điều trị bệnh béo phì mà có thể giải quyết các vấn đề của các thuốc chống béo phì thông thường. Gần đây, các dẫn xuất glucagon đã nhận được nhiều sự quan tâm. Glucagon được sản sinh bởi tuyến tụy khi nồng độ glucoza máu hạ xuống do các thuốc hoặc các bệnh khác, hoặc sự thiếu hụt hormon hoặc enzym. Glucagon gửi tín hiệu để phân hủy glycogen trong gan và tiếp theo là sự giải phóng glucoza và đóng vai trò trong việc làm tăng nồng độ glucoza máu đến khoảng bình thường. Ngoài tác dụng làm tăng nồng độ glucoza máu, glucagon hạn chế sự thèm ăn và hoạt hóa lipaza miễn cảm với hormon của tế bào tạo mỡ để tạo điều kiện thuận lợi cho việc phân giải lipid, nhờ đó thể hiện tác dụng chống béo phì. Tuy nhiên, việc sử dụng glucagon làm chất trị liệu bị hạn chế do nó có độ hòa tan thấp và nó bị kết tủa ở độ pH trung tính.

Do đó, một mình glucagon có các đặc tính cải thiện có thể được sử dụng một cách có hiệu quả để điều trị chứng giảm glucoza máu nặng, bệnh viêm gan nhiễm mỡ không do rượu (nonalcoholic steatohepatitis - NASH), chứng rối loạn lipid máu, v.v., do hoạt tính phân hủy chất béo và sự oxy hóa ở vị trí β của nó trong gan.

Một trong số các dẫn xuất glucagon, peptit giống glucagon-1 (glucagon-like peptide-1 - GLP-1), đang được nghiên cứu làm chất trị liệu để điều trị chứng tăng glucoza máu ở bệnh nhân bị bệnh đái tháo đường. GLP-1 có chức năng kích thích sự tổng hợp và tiết insulin, ức chế sự tiết glucagon, làm chậm quá trình làm rỗng dạ dày, tăng mức độ sử dụng glucoza, và ức chế sự hấp thu thức ăn.

Exendin-4, đã được tạo ra từ nọc độc của thằn lằn và có mức độ tương đồng axit amin khoảng 50% so với GLP-1, cũng được báo cáo là hoạt hóa thụ thể GLP-1, nhờ đó cải thiện chứng tăng glucoza máu ở các bệnh nhân bị bệnh đái tháo đường (*J Biol Chem.* 1992 Apr 15; 267 (11): 7402 - 5). Tuy nhiên, các thuốc chống béo phì chứa GLP-1 được báo cáo là có các tác dụng phụ như gây buồn nôn và nôn.

Do đó, để thay thế GLP-1, nhiều sự quan tâm đã được tập trung vào oxyntomodulin, mà có thể gắn kết với cả hai thụ thể của hai peptit, GLP-1 và glucagon. Oxyntomodulin là peptit đã được tạo ra từ tiền chất của glucagon, tiền glucagon, và có chức năng ức chế sự hấp thu thức ăn và làm tăng sự no của GLP-1, và có hoạt tính tiêu mỡ giống glucagon, do đó, làm tăng hiệu quả của nó trong phép trị liệu chống béo phì.

Tuy nhiên, oxyntomodulin hoặc các dẫn xuất của nó có nhược điểm nghiêm trọng vì một lượng dư thừa của thuốc cần phải được dùng hằng ngày do chúng có hiệu lực thấp và thời gian bán thải *in vivo* ngắn.

Ngoài ra, khi cả hoạt tính của GLP-1 và glucagon đều có mặt trong một peptit, tỷ lệ hoạt tính của nó trở nên cố định, và do đó, khó sử dụng chất chủ vận kép với các tỷ lệ khác nhau. Do đó, phép trị liệu kết hợp có khả năng sử dụng các tỷ lệ hoạt tính khác nhau bằng cách điều chỉnh các hàm lượng của GLP-1 và glucagon có thể có hiệu quả hơn. Tuy nhiên, đối với phép trị liệu kết hợp, cần phải cải thiện các đặc điểm vật lý của glucagon, mà kết tụ ở độ pH trung tính và kết tủa theo thời gian, do đó, thể hiện độ hòa tan kém.

Trong các trường hợp này, các tác giả sáng chế đã phát triển các dẫn xuất glucagon có các cải biến một phần của trình tự axit amin của glucagon để cải thiện các tác dụng trị liệu của glucagon đến chứng giảm glucoza máu và bệnh béo phì bằng cách cải thiện các đặc tính vật lý của glucagon, và đã phát hiện ra rằng các dẫn xuất glucagon này, do các trị số pI được thay đổi khác với các trị số pI của glucagon nguyên thể, có độ hòa tan được cải thiện và độ ổn định cao hơn ở độ pH trung tính và đã xác nhận rằng dẫn xuất glucagon đã phát triển hoạt hóa các thụ thể của nó trong thử nghiệm *in vitro*, nhờ đó hoàn thành sáng chế.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề kỹ thuật

Mục đích của sáng chế là đề xuất được phẩm dùng để điều trị hoặc phòng hội chứng chuyển hóa, chứa dẫn xuất glucagon và ít nhất một hợp chất hoặc nguyên liệu có hoạt tính trị liệu đối với hội chứng chuyển hóa.

Một mục đích khác của sáng chế là đề xuất dẫn xuất glucagon mới.

Một mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất polynucleotit phân lập mã hóa dẫn xuất glucagon, vectơ chứa polynucleotit này, và tế bào phân lập chứa polynucleotit hoặc vectơ này.

Một mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất thể tiếp hợp phân lập trong đó dẫn xuất glucagon và nguyên liệu tương hợp sinh học mà có khả năng làm tăng thời gian bán thải *in vivo* được liên kết với nó.

Một mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất chế phẩm chứa dẫn xuất glucagon và thể tiếp hợp phân lập.

Một mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất được phẩm dùng để điều trị hoặc phòng chứng giảm glucoza máu hoặc hội chứng chuyển hóa, chứa dẫn xuất glucagon hoặc thể tiếp hợp phân lập.

Một mục đích khác nữa của sáng chế là mô tả phương pháp để phòng hoặc điều trị chứng giảm glucoza máu hoặc hội chứng chuyển hóa bao gồm việc cho đối tượng cần phòng hoặc điều trị bệnh dùng chế phẩm nêu trên.

Một mục đích khác nữa của sáng chế là mô tả việc sử dụng dẫn xuất glucagon

hoặc thể tiếp hợp phân lập hoặc chế phẩm để bào chế thuốc (hoặc dược phẩm) dùng để phòng hoặc điều trị chứng giảm glucoza máu hoặc hội chứng chuyển hóa.

Giải pháp kỹ thuật

Để đạt được các mục đích nêu trên, sáng chế theo một khía cạnh đề xuất được phẩm dùng để điều trị hoặc phòng hội chứng chuyển hóa chứa dẫn xuất glucagon và ít nhất một hợp chất hoặc nguyên liệu mà có hoạt tính trị liệu đối với hội chứng chuyển hóa.

Cụ thể hơn, sáng chế theo một khía cạnh đề xuất được phẩm dùng để điều trị hoặc phòng hội chứng chuyển hóa, mà chứa: i) peptit có trình tự axit amin có công thức chung 1 sau, và ii) ít nhất một hợp chất hoặc nguyên liệu có hoạt tính trị liệu đối với hội chứng chuyển hóa:

X1-X2-QGTF-X7-SD-X10-S-X12-X13-X14-X15-X16-X17-X18-X19-X20-X21-F-X23-X24-W-L-X27-X28-X29-X30 (Công thức chung 1, SEQ ID NO: 45)

Trong công thức chung 1:

X1 là histidin, desamino-histidyl, N-dimetyl-histidyl, β -hydroxy imidazopropionyl, 4-imidazoaxetyl, β -carboxy imidazopropionyl, tryptophan, hoặc tyrosin, hoặc không có mặt;

X2 là axit α -metyl-glutamic, axit aminoisobutyric (Aib), D-alanin, glyxin, Sar(N-metylglyxin), serin, hoặc D-serin;

X7 là threonin, valin, hoặc xystein;

X10 là tyrosin hoặc xystein;

X12 là lysin hoặc xystein;

X13 là tyrosin hoặc xystein;

X14 là leuxin hoặc xystein;

X15 là axit aspartic, axit glutamic, hoặc xystein;

X16 là axit glutamic, axit aspartic, serin, axit α -metyl-glutamic, hoặc xystein, hoặc không có mặt;

X17 là axit aspartic, glutamin, axit glutamic, lysin, arginin, serin, xystein, hoặc valin, hoặc không có mặt;

X18 là alanin, axit aspartic, axit glutamic, arginin, valin, hoặc xystein, hoặc không có mặt;

X19 là alanin, arginin, serin, valin, hoặc xystein, hoặc không có mặt;

X20 là lysin, histidin, glutamin, axit aspartic, lysin, arginin, axit α -metyl-glutamic, hoặc xystein, hoặc không có mặt;

X21 là axit aspartic, axit glutamic, leuxin, valin, hoặc xystein, hoặc không có

mặt;

X23 là isoleuxin, valin, hoặc arginin, hoặc không có mặt;

X24 là valin, arginin, alanin, xystein, axit glutamic, lysin, glutamin, axit α -metyl-glutamic, hoặc leuxin, hoặc không có mặt;

X27 là isoleuxin, valin, alanin, lysin, metionin, glutamin, hoặc arginin, hoặc không có mặt;

X28 là glutamin, lysin, asparagin, hoặc arginin, hoặc không có mặt;

X29 là lysin, alanin, glyxin, hoặc threonin, hoặc không có mặt; và

X30 là xystein, hoặc không có mặt;

với điều kiện khi trình tự axit amin có công thức chung 1 giống với trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1, thì nó bị loại trừ.

Theo một phương án cụ thể khác,

trong công thức chung 1:

X1 là histidin, tryptophan, hoặc tyrosin, hoặc không có mặt;

X2 là serin hoặc axit aminoisobutyric (Aib);

X7 là threonin, valin, hoặc xystein;

X10 là tyrosin hoặc xystein;

X12 là lysin hoặc xystein;

X13 là tyrosin hoặc xystein;

X14 là leuxin hoặc xystein;

X15 là axit aspartic hoặc xystein;

X16 là axit glutamic, serin, hoặc xystein;

X17 là axit aspartic, axit glutamic, lysin, arginin, serin, xystein, hoặc valin;

X18 là axit aspartic, axit glutamic, arginin, hoặc xystein;

X19 là alanin hoặc xystein;

X20 là glutamin, axit aspartic, lysin, hoặc xystein;

X21 là axit aspartic, axit glutamic, leuxin, valin, hoặc xystein;

X23 là isoleuxin, valin, hoặc arginin;

X24 là valin, arginin, alanin, axit glutamic, lysin, glutamin, hoặc leuxin;

X27 là isoleuxin, valin, alanin, metionin, glutamin, hoặc arginin;

X28 là glutamin, lysin, asparagin, hoặc arginin;

X29 là threonin; và

X30 là xystein hoặc không có mặt.

Theo một phương án cụ thể khác nữa, trong công thức chung 1:

X1 là histidin, tryptophan, hoặc tyrosin, hoặc không có mặt;

X2 là serin hoặc axit aminoisobutyric (Aib);

X7 là threonin, valin, hoặc xystein;
 X10 là tyrosin hoặc xystein;
 X12 là lysin hoặc xystein;
 X13 là tyrosin hoặc xystein;
 X14 là leuxin hoặc xystein;
 X15 là axit aspartic hoặc xystein;
 X16 là axit glutamic, serin, hoặc xystein;
 X17 là axit aspartic, axit glutamic, lysin, arginin, serin, xystein, hoặc valin;
 X18 là axit aspartic, axit glutamic, arginin, hoặc xystein;
 X19 là alanin hoặc xystein;
 X20 là glutamin, axit aspartic, hoặc lysin;
 X21 là axit aspartic hoặc axit glutamic;
 X23 là valin;
 X24 là valin hoặc glutamin;
 X27 là isoleuxin hoặc metionin;
 X28 là asparagin hoặc arginin;
 X29 là threonin; và
 X30 là xystein hoặc không có mặt.

Theo một phương án cụ thể khác nữa, trong công thức chung 1:

X1 là tyrosin, X2 là axit aminoisobutyric (Aib);
 X7 là threonin;
 X10 là tyrosin;
 X12 là lysin;
 X13 là tyrosin;
 X14 là leuxin;
 X15 là axit aspartic hoặc xystein;
 X16 là axit glutamic, serin, hoặc xystein;
 X17 là lysin hoặc arginin;
 X18 là arginin;
 X19 là alanin;
 X20 là glutamin, xystein, hoặc lysin;
 X21 là axit aspartic, xystein, valin, hoặc axit glutamic;
 X23 là valin;
 X24 là valin hoặc arginin;
 X27 là metionin;
 X28 là asparagin hoặc arginin;
 X29 là threonin; và

X30 không có mặt.

Theo một phương án cụ thể khác nữa, peptit nêu trên khác biệt ở chỗ nó là peptit có trình tự axit amin có công thức chung 2 sau:

Y-Aib-QGTF-X7-SD-X10-S-X12-Y-L-X15-X16-X17-R-A-X20-X21-F-V-X24-W-L-M-N-T-X30 (công thức chung 2, SEQ ID NO: 46)

Trong công thức chung 2,
 X7 là threonin, valin, hoặc xystein;
 X10 là tyrosin hoặc xystein;
 X12 là lysin hoặc xystein;
 X15 là axit aspartic hoặc xystein;
 X16 là axit glutamic hoặc serin;
 X17 là lysin hoặc arginin;
 X20 là glutamin hoặc lysin;
 X21 là axit aspartic hoặc axit glutamic;
 X24 là valin hoặc glutamin; và
 X30 là xystein hoặc không có mặt,

trong đó, trong các peptit có trình tự axit amin có công thức chung 2, các peptit tương ứng với các SEQ ID NO: 14, 19, 20, 25, 27, 31, và 33 có thể bị loại trừ.

Theo một phương án cụ thể khác nữa, peptit có trình tự axit amin có công thức chung 1 khác biệt ở chỗ nó có trị số pI khác với trị số pI của glucagon nguyên thể, ví dụ, pI bằng 6,5 hoặc nhỏ hơn, hoặc pI bằng 7,0 hoặc lớn hơn.

Theo một phương án cụ thể khác nữa, peptit có trình tự axit amin có công thức chung 1 khác biệt ở chỗ ít nhất một cặp axit amin trong số các cặp axit amin X10 và X14, X12 và X16, X16 và X20, X17 và X21, X20 và X24, và X24 và X28 trong công thức chung 1 lần lượt được thay thế bằng axit glutamic hoặc lysin, mà có khả năng tạo ra vòng.

Theo một phương án cụ thể khác nữa, peptit có trình tự axit amin có công thức chung 1 khác biệt ở chỗ cặp axit amin X12 và X16 hoặc cặp axit amin X16 và X20 lần lượt được thay thế bằng axit glutamic hoặc lysin, mà có khả năng tạo ra vòng.

Theo một phương án cụ thể khác nữa, peptit có trình tự axit amin có công thức chung 1 khác biệt ở chỗ ít nhất một cặp axit amin trong số các cặp axit amin X10 và X14, X12 và X16, X16 và X20, X17 và X21, X20 và X24, và X24 và X28 trong công thức chung 1 tạo ra vòng (ví dụ, vòng lactam).

Theo một phương án cụ thể khác nữa, peptit có trình tự axit amin có công thức

chung 1 khác biệt ở chỗ đầu tận cùng C của peptit này được amit hóa.

Theo một phương án cụ thể khác nữa, peptit có trình tự axit amin có công thức chung 1 khác biệt ở chỗ nó là dẫn xuất glucagon có khả năng hoạt hóa thụ thể glucagon.

Theo một phương án cụ thể khác nữa, peptit này khác biệt ở chỗ nó có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 2 đến 44.

Theo một phương án cụ thể khác nữa, peptit này khác biệt ở chỗ nó có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 2 đến 13, 15, 17, 20 đến 24, 26 đến 30, và 32 đến 44.

Theo một phương án cụ thể khác nữa, peptit này khác biệt ở chỗ nó có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 12 hoặc SEQ ID NO: 20.

Theo một phương án cụ thể khác nữa, hợp chất hoặc nguyên liệu có hoạt tính trị liệu đối với hội chứng chuyển hóa khác biệt ở chỗ nó được chọn từ nhóm bao gồm peptit kích thích insulin, chất chủ vận thụ thể peptit giống glucagon-1 (GLP-1), chất chủ vận thụ thể leptin, chất ức chế dipeptidyl peptidaza-IV (DPP-IV), chất đối kháng thụ thể Y5, chất đối kháng thụ thể hormon tập trung melanin (melanin-concentrating hormone - MCH), chất chủ vận thụ thể Y2/4, chất chủ vận thụ thể melanocortin 3/4 (MC 3/4), chất ức chế lipaza dạ dày/tụy, chất chủ vận của thụ thể 5-hydroxytryptamin 2C (5-hydroxytryptamine 2C - 5HT2C), chất chủ vận thụ thể β 3A, chất chủ vận thụ thể amylin, chất đối kháng ghrelin, chất đối kháng thụ thể ghrelin, chất chủ vận thụ thể alpha được hoạt hóa bởi chất tăng sinh thể peroxi (peroxisome proliferator-activated receptor alpha - PPAR α), chất chủ vận thụ thể delta được hoạt hóa bởi chất tăng sinh thể peroxi (peroxisome proliferator-activated receptor delta - PPAR δ), chất chủ vận thụ thể Farnesoid X (Farnesoid X receptor - FXR), chất ức chế axetyl-CoA carboxylaza, peptit YY, cholecystokinin (CCK), xenin, glicentin, obestatin, secretin, nesfatin, insulin, và peptit kích thích insulin phụ thuộc glucoza (glucose-dependent insulintropic peptide - GIP).

Theo một phương án cụ thể khác nữa, peptit kích thích insulin này khác biệt ở chỗ nó được chọn từ nhóm bao gồm GLP-1, exendin-3, exendin-4, chất chủ vận của chúng, dẫn xuất của chúng, mảnh của chúng, biến thể của chúng, và kết hợp của chúng.

Theo một phương án cụ thể khác nữa, peptit kích thích insulin này khác biệt ở chỗ nó là dẫn xuất peptit kích thích insulin trong đó gốc histidin đầu tận cùng N của peptit kích thích insulin này được thay thế bằng gốc được chọn từ nhóm bao gồm desamino-histidyl, N-dimetyl-histidyl, β -hydroxy imidazopropionyl, 4-imidazoaxetyl, và β -carboxy imidazopropionyl.

Theo một phương án cụ thể khác nữa, peptit kích thích insulin khác biệt ở chỗ nó được chọn từ nhóm bao gồm exendin-4 nguyên thể, dẫn xuất exendin-4 trong đó

nhóm amin đầu tận cùng N của exendin-4 được loại bỏ; dẫn xuất exendin-4 trong đó nhóm amin đầu tận cùng N của exendin-4 được thay thế bằng nhóm hydroxyl; dẫn xuất exendin-4 trong đó nhóm amin đầu tận cùng N của exendin-4 được cải biến bằng nhóm dimetyl; dẫn xuất exendin-4 trong đó nguyên tử cacbon α của axit amin thứ nhất của exendin-4, histidin, được loại bỏ; dẫn xuất exendin-4 trong đó axit amin thứ 12 của exendin-4, lysin, được thay thế bằng serin, và dẫn xuất exendin-4 trong đó axit amin thứ 12 của exendin-4, lysin, được thay thế bằng arginin.

Theo một phương án cụ thể khác nữa, peptit này có trình tự axit amin có công thức chung 1 khác biệt ở chỗ peptit có trình tự axit amin có công thức chung 1 ở dạng thể tiếp hợp có tác dụng kéo dài mà nguyên liệu tương hợp sinh học có khả năng làm tăng thời gian bán thải *in vivo* của peptit này được liên kết với nó; và peptit kích thích insulin ở dạng thể tiếp hợp có tác dụng kéo dài mà nguyên liệu tương hợp sinh học có khả năng làm tăng thời gian bán thải *in vivo* của peptit kích thích insulin này được liên kết với nó.

Theo một phương án cụ thể khác nữa, nguyên liệu tương hợp sinh học khác biệt ở chỗ nó được chọn từ nhóm bao gồm polyetylen glycol, axit béo, cholesterol, albumin và mảnh của nó, nguyên liệu gắn kết với albumin, polyme gồm các đơn vị lặp có trình tự axit amin cụ thể, kháng thể, mảnh kháng thể, nguyên liệu gắn kết với FcRn, mô liên kết *in vivo* hoặc dẫn xuất của nó, nucleotit, fibronectin, transferrin, sacarit, và polyme.

Theo một phương án cụ thể khác nữa, peptit có trình tự axit amin có công thức chung 1 và peptit kích thích insulin khác biệt ở chỗ chúng lần lượt được liên kết với nguyên liệu tương hợp sinh học bằng cầu nối được chọn từ nhóm bao gồm polyetylen glycol, polypropylen glycol, copolyme etylen glycol-propylen glycol, rượu polyhydric được polyoxyetyl hóa, rượu polyvinyl, polysacarit, dextran, polyvinyl etyl ete, polyme dễ phân huỷ sinh học như axit polylactic (PLA) và axit polylactic-glycolic (PLGA), polyme lipid, chitin, axit hyaluronic, axit béo, polyme, hợp chất có khối lượng phân tử thấp, nucleotit, và kết hợp của chúng.

Theo một phương án cụ thể khác nữa, nguyên liệu tương hợp sinh học khác biệt ở chỗ nó là nguyên liệu gắn kết với FcRn, và peptit có trình tự axit amin có công thức chung 1 và peptit kích thích insulin lần lượt được liên kết với nguyên liệu tương hợp sinh học bằng cầu nối peptit hoặc cầu nối không phải peptit được chọn từ nhóm bao gồm polyetylen glycol, polypropylen glycol, copolyme etylen glycol-propylen glycol, rượu polyhydric được polyoxyetyl hóa, rượu polyvinyl, polysacarit, polyvinyl etyl ete, dextran, polyme dễ phân huỷ sinh học như axit polylactic (PLA) và axit polylactic-glycolic (PLGA), polyme lipid, chitin, axit hyaluronic, và kết hợp của chúng.

Theo một phương án cụ thể khác nữa, nguyên liệu gắn kết với FcRn khác biệt

ở chỗ nó là polypeptit chứa vùng Fc globulin miễn dịch.

Theo một phương án cụ thể khác nữa, vùng Fc globulin miễn dịch này khác biệt ở chỗ nó không được glycosyl hóa.

Theo một phương án cụ thể khác nữa, vùng Fc globulin miễn dịch này khác biệt ở chỗ nó được chọn từ nhóm bao gồm:

(a) miền CH1, miền CH2, miền CH3, và miền CH4;

(b) miền CH1 và miền CH2;

(c) miền CH1 và miền CH3;

(d) miền CH2 và miền CH3;

(e) kết hợp giữa một hoặc hai hoặc nhiều miền trong số miền CH1, miền CH2, miền CH3, và miền CH4, và vùng bản lề của globulin miễn dịch hoặc một phần của vùng bản lề này; và

(f) dime giữa mỗi miền của vùng ổn định của chuỗi nặng và vùng ổn định của chuỗi nhẹ.

Theo một phương án cụ thể khác nữa, polypeptit chứa vùng Fc globulin miễn dịch là ở dạng dime.

Theo một phương án cụ thể khác nữa, vùng Fc globulin miễn dịch khác biệt ở chỗ nó là dẫn xuất Fc nguyên thể trong đó vùng có khả năng tạo ra liên kết disulfua được loại bỏ, dẫn xuất Fc nguyên thể trong đó một phần của (các) axit amin trong đầu tận cùng N được loại bỏ, dẫn xuất Fc nguyên thể trong đó metionin được bổ sung vào đầu tận cùng N, dẫn xuất Fc nguyên thể trong đó vị trí gắn kết bổ thể được loại bỏ, hoặc dẫn xuất Fc nguyên thể trong đó vị trí tính độc tế bào gián tiếp qua tế bào phụ thuộc kháng thể (antibody dependent cell mediated cytotoxicity - ADCC) được loại bỏ.

Theo một phương án cụ thể khác nữa, vùng Fc globulin miễn dịch khác biệt ở chỗ nó là vùng Fc có nguồn gốc từ globulin miễn dịch được chọn từ nhóm bao gồm IgG, IgA, IgD, IgE, và IgM.

Theo một phương án cụ thể khác nữa, vùng Fc globulin miễn dịch khác biệt ở chỗ nó là vùng Fc IgG4.

Theo một phương án cụ thể khác nữa, vùng Fc globulin miễn dịch khác biệt ở chỗ nó là vùng Fc không được glycosyl hóa có nguồn gốc từ IgG4 của người.

Theo một phương án cụ thể khác nữa, cầu nối không phải peptit khác biệt ở chỗ nó được liên kết với gốc xystein của peptit có trình tự axit amin có công thức chung 1.

Theo một phương án cụ thể khác nữa, cầu nối không phải peptit khác biệt ở chỗ cả hai đầu của cầu nối không phải peptit lần lượt được liên kết với nhóm amin hoặc nhóm thiol của peptit, mà có trình tự axit amin có công thức chung 1, hoặc peptit kích thích insulin, và nguyên liệu tương hợp sinh học.

Theo một phương án cụ thể khác nữa, hội chứng chuyển hóa khác biệt ở chỗ, nó được chọn từ nhóm bao gồm rối loạn dung nạp glucoza, chứng tăng cholesterol máu, rối loạn lipid máu, bệnh béo phì, bệnh đái tháo đường, bệnh tăng huyết áp, bệnh viêm gan nhiễm mỡ không do rượu (nonalcoholic steatohepatitis - NASH), bệnh xơ vữa động mạch do rối loạn lipid máu gây ra, bệnh xơ vữa động mạch, bệnh xơ cứng động mạch, bệnh mạch vành tim, và bệnh đột quỵ.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất dẫn xuất glucagon mới.

Theo một phương án cụ thể, dẫn xuất glucagon này khác biệt ở chỗ nó là peptit phân lập có trình tự axit amin có công thức chung 2 sau:

Y-Aib-QGTF-X7-SD-X10-S-X12-Y-L-X15-X16-X17-R-A-X20-X21-F-V-X24-W-L-M-N-T-X30 (công thức chung 2, SEQ ID NO: 46)

Trong công thức chung 2,
 X7 là threonin, valin, hoặc xystein;
 X10 là tyrosin hoặc xystein;
 X12 là lysin hoặc xystein;
 X15 là axit aspartic hoặc xystein;
 X16 là axit glutamic hoặc serin;
 X17 là lysin hoặc arginin;
 X20 là glutamin hoặc lysin;
 X21 là axit aspartic hoặc axit glutamic;
 X24 là valin hoặc glutamin; và
 X30 là xystein hoặc không có mặt,

trong đó, trong các peptit có trình tự axit amin có công thức chung 2, các peptit tương ứng với các SEQ ID NO: 14, 19, 20, 25, 27, 31, và 33 có thể bị loại trừ.

Theo một phương án cụ thể khác nữa, peptit có trình tự axit amin có công thức chung 2 khác biệt ở chỗ cặp axit amin X16 và X20 được thay thế bằng axit glutamic hoặc lysin, mà có khả năng tạo ra vòng.

Theo một phương án cụ thể khác nữa, peptit có trình tự axit amin có công thức chung 2 khác biệt ở chỗ đầu tận cùng C của peptit này được amit hóa.

Theo một phương án cụ thể khác nữa, peptit này khác biệt ở chỗ nó là dẫn xuất glucagon có khả năng hoạt hóa thụ thể glucagon.

Theo một phương án cụ thể khác nữa, peptit này khác biệt ở chỗ nó có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 12, 13, 15,

và 36 đến 44.

Theo một phương án cụ thể khác nữa, peptit này khác biệt ở chỗ nó có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 12.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất polynucleotit phân lập mã hóa dẫn xuất glucagon, vector chứa polynucleotit này, và tế bào phân lập chứa polynucleotit hoặc vector này.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất thể tiếp hợp phân lập trong đó dẫn xuất glucagon và nguyên liệu tương hợp sinh học có khả năng làm tăng thời gian bán thải *in vivo* được liên kết với nó.

Theo một phương án cụ thể, nguyên liệu tương hợp sinh học khác biệt ở chỗ nguyên liệu tương hợp sinh học này được chọn từ nhóm bao gồm polyetylen glycol, axit béo, cholesterol, albumin và mảnh của nó, nguyên liệu gắn kết với albumin, polyme gồm các đơn vị lặp có trình tự axit amin cụ thể, kháng thể, mảnh kháng thể, nguyên liệu gắn kết với FcRn, mô liên kết *in vivo* hoặc dẫn xuất của nó, nucleotit, fibronectin, transferrin, sacarit, và polyme.

Theo một phương án cụ thể, peptit phân lập khác biệt ở chỗ nó được liên kết với nguyên liệu tương hợp sinh học bằng cầu nối được chọn từ nhóm bao gồm polyetylen glycol, polypropylen glycol, copolyme etylen glycol-propylen glycol, rượu polyhydric được polyoxyetyl hóa, rượu polyvinyl, polysacarit, dextran, polyvinyl etyl ete, polyme dễ phân huỷ sinh học như axit polylactic (PLA) và axit polylactic-glycolic (PLGA), polyme lipid, chitin, axit hyaluronic, axit béo, polyme, hợp chất có khối lượng phân tử thấp, nucleotit, và kết hợp của chúng.

Theo một phương án cụ thể, nguyên liệu tương hợp sinh học khác biệt ở chỗ nó là nguyên liệu gắn kết với FcRn, và

peptit phân lập và peptit kích thích insulin lần lượt được liên kết với nguyên liệu tương hợp sinh học bằng cầu nối peptit hoặc cầu nối không phải peptit được chọn từ nhóm bao gồm polyetylen glycol, polypropylen glycol, copolyme etylen glycol-propylen glycol, rượu polyhydric được polyoxyetyl hóa, rượu polyvinyl, polysacarit, polyvinyl etyl ete, dextran, polyme dễ phân huỷ sinh học như axit polylactic (PLA) hoặc axit polylactic-glycolic (PLGA), polyme lipid, chitin, axit hyaluronic, và kết hợp của chúng.

Theo một phương án cụ thể,

nguyên liệu gắn kết với FcRn khác biệt ở chỗ nó là polypeptit chứa vùng Fc globulin miễn dịch.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất chế phẩm chứa dẫn xuất

glucagon hoặc thể tiếp hợp phân lập.

Theo một phương án cụ thể, chế phẩm này khác biệt ở chỗ nó là được phẩm dùng để điều trị hoặc phòng ngừa chứng giảm glucoza máu hoặc hội chứng chuyển hóa.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế mô tả phương pháp phòng hoặc điều trị chứng giảm glucoza máu hoặc hội chứng chuyển hóa bao gồm việc cho đối tượng cần điều trị dùng chế phẩm này.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế mô tả việc sử dụng dẫn xuất glucagon hoặc thể tiếp hợp phân lập hoặc chế phẩm để bào chế thuốc (hoặc được phẩm) dùng để phòng hoặc điều trị chứng giảm glucoza máu hoặc hội chứng chuyển hóa.

Các ưu điểm của sáng chế

Các dẫn xuất glucagon theo sáng chế có các đặc tính vật lý được cải thiện so với các đặc tính vật lý của glucagon nguyên thể và do đó, có thể được sử dụng một cách có hiệu quả làm chất trị liệu để điều trị chứng giảm glucoza máu nhờ cải thiện việc tuân thủ của bệnh nhân. Ngoài ra, các dẫn xuất glucagon theo sáng chế có thể được sử dụng một cách có hiệu quả để phòng và điều trị chứng giảm glucoza máu và hội chứng chuyển hóa như bệnh béo phì, bệnh đái tháo đường, và bệnh viêm gan nhiễm mỡ không do rượu (NASH).

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1 là đồ thị thể hiện sự thay đổi về thể trọng của các mẫu động vật bị bệnh béo phì (chuột cống), mà được gây ra bằng chế độ ăn có lượng chất béo cao, trong quá trình dùng riêng lẻ hoặc kết hợp giữa thể tiếp hợp peptit kích thích insulin có tác dụng kéo dài (có tên là dẫn xuất exendin-4 có tác dụng kéo dài) và thể tiếp hợp dẫn xuất glucagon có tác dụng kéo dài (có tên là dẫn xuất có tác dụng kéo dài có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 12) với liều đã được điều chỉnh cho chuột cống, ở các khoảng cách 3 ngày trong 15 ngày.

Fig. 2 thể hiện kết quả minh họa lượng chất béo trong mạc treo ruột của các mẫu động vật bị bệnh béo phì (chuột cống), mà được gây ra bằng chế độ ăn có lượng chất béo cao, được đo sau khi dùng riêng lẻ hoặc kết hợp giữa thể tiếp hợp peptit kích thích insulin có tác dụng kéo dài (có tên là dẫn xuất exendin-4 có tác dụng kéo dài) và thể tiếp hợp dẫn xuất glucagon có tác dụng kéo dài (có tên là dẫn xuất có tác dụng kéo dài có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 12) với liều đã được điều chỉnh cho chuột cống trong 15 ngày (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ so với chất dẫn bằng thử nghiệm ANOVA).

Fig. 3 thể hiện kết quả minh họa sự khác biệt về khối lượng gan của các mẫu động vật bị bệnh béo phì (chuột cống), mà được gây ra bằng chế độ ăn có lượng chất

béo cao, được đo sau khi dùng riêng lẻ hoặc kết hợp giữa thể tiếp hợp peptit kích thích insulin có tác dụng kéo dài (có tên là dẫn xuất exendin-4 có tác dụng kéo dài) và thể tiếp hợp dẫn xuất glucagon có tác dụng kéo dài (có tên là dẫn xuất có tác dụng kéo dài có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 12) với liều đã được điều chỉnh cho chuột cống trong 15 ngày (**p<0,01, ***p<0,001 so với chất dẫn bằng thử nghiệm ANOVA).

Fig. 4 là đồ thị thể hiện sự thay đổi về thể trọng (body weight - BW) của các mẫu động vật bị bệnh béo phì (chuột nhắt), mà được gây ra bằng chế độ ăn có lượng chất béo cao, sau khi dùng riêng lẻ hoặc kết hợp giữa thể tiếp hợp peptit kích thích insulin có tác dụng kéo dài (có tên là dẫn xuất exendin-4 có tác dụng kéo dài) và thể tiếp hợp dẫn xuất glucagon có tác dụng kéo dài (có tên là dẫn xuất có tác dụng kéo dài có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 20) với liều đã được điều chỉnh cho chuột cống trong 22 ngày.

Fig. 5 thể hiện kết quả minh họa sự thay đổi về hàm lượng cholesterol trong máu của các mẫu động vật bị bệnh béo phì (chuột nhắt), mà được gây ra bằng chế độ ăn có lượng chất béo cao, sau khi dùng riêng lẻ hoặc kết hợp giữa thể tiếp hợp peptit kích thích insulin có tác dụng kéo dài (có tên là dẫn xuất exendin-4 có tác dụng kéo dài) và thể tiếp hợp dẫn xuất glucagon có tác dụng kéo dài (có tên là dẫn xuất có tác dụng kéo dài có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 20) với liều đã được điều chỉnh cho chuột cống trong 22 ngày.

Mô tả chi tiết sáng chế

Các chi tiết cụ thể của sáng chế có thể được giải thích như sau. Cụ thể, các giải thích và các phương án được bộc lộ trong sáng chế lần lượt có thể được áp dụng cho các giải thích và các phương án khác. Tức là tất cả các tổ hợp của các yếu tố khác nhau được bộc lộ trong sáng chế là nằm trong phạm vi của sáng chế. Ngoài ra, phạm vi của sáng chế không bị giới hạn bởi các mô tả cụ thể được nêu dưới đây trong bản mô tả này.

Trong toàn bộ bản mô tả của sáng chế, không chỉ sử dụng các mã 1 chữ cái và các mã 3 chữ cái thông thường đối với các axit amin có trong tự nhiên mà còn sử dụng các mã 3 chữ cái, như Aib (axit α -aminoisobutyric), Sar(N-metylglyxin) thường được sử dụng cho các axit amin khác. Ngoài ra, các axit amin được viết tắt trong bản mô tả này được mô tả theo danh pháp IUPAC-IUB.

alanin A	arginin R
asparagin N	axit aspartic D
cystein 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

Sáng chế theo một khía cạnh đề xuất chế phẩm chứa dẫn xuất glucagon và ít nhất một hợp chất hoặc nguyên liệu có hoạt tính trị liệu đối với hội chứng chuyển hóa, và cụ thể hơn, đề xuất được phẩm dùng để điều trị hoặc phòng hội chứng chuyển hóa chứa dẫn xuất glucagon và ít nhất một hợp chất hoặc nguyên liệu có hoạt tính trị liệu đối với hội chứng chuyển hóa.

Dẫn xuất glucagon theo sáng chế bao gồm peptit có ít nhất một khác biệt về trình tự axit amin so với glucagon nguyên thể, peptit trong đó trình tự của glucagon nguyên thể được cải biến bằng cách cải biến glucagon nguyên thể, và chất giả glucagon nguyên thể mà có thể hoạt hóa các thụ thể glucagon giống glucagon nguyên thể.

Dẫn xuất glucagon như vậy có thể là dẫn xuất có các đặc tính vật lý được cải thiện nhờ có pI được thay đổi so với glucagon nguyên thể. Ngoài ra, dẫn xuất glucagon có thể là dẫn xuất có độ hòa tan cải thiện đồng thời duy trì hoạt tính hoạt hóa các thụ thể glucagon, nhưng không chỉ giới hạn ở trường hợp đó.

Ngoài ra, dẫn xuất glucagon có thể là glucagon không có trong tự nhiên.

Cụ thể, glucagon nguyên thể có thể có trình tự axit amin sau:

His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr (SEQ ID NO: 1)

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "pI" hoặc "điểm đẳng điện" chỉ trị số độ pH mà ở đó đại phân tử như polypeptit không có điện tích toàn phần (0). Trong trường hợp polypeptit có các nhóm chức được tích điện khác nhau, thì điện tích toàn phần của toàn bộ polypeptit là "0" ở điểm trong đó trị số độ pH giống như trị số của pI. Điện tích toàn phần của polypeptit ở độ pH cao hơn pI sẽ âm trong khi điện tích toàn phần của polypeptit ở độ pH thấp hơn pI sẽ dương.

Các trị số pI có thể được xác định trên gel gradien độ pH được giữ cố định được cấu thành từ polyacrylamit, tinh bột, hoặc agarosa bằng cách điện di đẳng điện, hoặc có thể được ước tính, ví dụ, từ trình tự axit amin bằng cách sử dụng công cụ pI/MW (http://expasy.org/tools/pi_tool.html; Gasteiger et al., 2003) trong máy chủ ExPASy.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "pI được thay đổi" chỉ pI mà khác

với pI của glucagon nguyên thể do sự thay thế một phần của trình tự axit amin của glucagon nguyên thể bằng gốc axit amin có điện tích âm hoặc điện tích dương, tức là trị số pI giảm hoặc tăng. Peptit có pI được thay đổi như vậy có thể biểu hiện là dẫn xuất glucagon có độ hòa tan cải thiện và độ ổn định cao ở độ pH trung tính.

Cụ thể hơn, dẫn xuất glucagon có thể có trị số pI được thay đổi, không phải trị số pI (6,8) của glucagon nguyên thể, và cụ thể hơn nữa, trị số pI nhỏ hơn 6,8, cụ thể hơn, là 6,7 hoặc nhỏ hơn, cụ thể hơn, là 6,5 hoặc nhỏ hơn, và ngoài ra, trị số pI vượt quá 6,8, 7 hoặc cao hơn, cụ thể hơn, là 7,5 hoặc cao hơn, nhưng không chỉ giới hạn ở các khoảng đó, và trị số pI bất kỳ khác với trị số pI của glucagon nguyên thể sẽ nằm trong phạm vi của sáng chế. Đặc biệt, khi trị số pI khác với trị số pI của glucagon nguyên thể và do đó, thể hiện độ hòa tan được cải thiện ở độ pH trung tính so với độ hòa tan ở độ pH trung tính của glucagon nguyên thể, do đó thể hiện mức độ kết tụ thấp, sẽ đặc biệt nằm trong phạm vi của sáng chế.

Cụ thể hơn, dẫn xuất glucagon có thể có trị số pI nằm trong khoảng từ 4 đến 6,5 và/hoặc nằm trong khoảng từ 7 đến 9,5, cụ thể là nằm trong khoảng từ 7,5 đến 9,5, và cụ thể hơn nếu nằm trong khoảng từ 8,0 đến 9,3, nhưng trị số pI không chỉ giới hạn ở các khoảng đó. Trong trường hợp này, do trị số pI thấp hơn hoặc cao hơn trị số pI của glucagon nguyên thể, nên có thể thể hiện độ hòa tan cải thiện và độ ổn định cao ở độ pH trung tính so với độ hòa tan và độ ổn định của glucagon nguyên thể.

Đặc biệt, dẫn xuất của glucagon nguyên thể có thể được cải biến một phần axit amin của glucagon nguyên thể bằng phương pháp thay thế, bổ sung, làm mất đoạn, và cải biến bất kỳ, hoặc kết hợp của chúng.

Ví dụ về các dẫn xuất glucagon được tạo ra bằng tổ hợp các phương pháp trên đây bao gồm peptit mà khác ở ít nhất một gốc axit amin của trình tự axit amin so với trình tự axit amin của glucagon nguyên thể và trong đó gốc axit amin đầu tận cùng N được loại nhóm amin, có chức năng hoạt hóa thụ thể glucagon, nhưng không chỉ giới hạn ở các dẫn xuất đó, và các dẫn xuất glucagon nguyên thể có thể được điều chế bằng tổ hợp các phương pháp khác nhau để điều chế các dẫn xuất này.

Ngoài ra, cải biến như vậy để điều chế các dẫn xuất glucagon nguyên thể có thể bao gồm tất cả các cải biến bằng cách sử dụng các axit amin loại L hoặc loại D, và/hoặc các axit amin loại không nguyên thể; và/hoặc cải biến của trình tự nguyên thể, ví dụ, cải biến của nhóm chức, liên kết đồng hóa trị nội phân tử (ví dụ, tạo ra vòng giữa các mạch bên), sự metyl hóa, sự axyl hóa, sự ubiquitin hóa, sự phosphoryl hóa, sự aminohexan hóa, sự biotinyl hóa, v.v..

Ngoài ra, cải biến này cũng có thể bao gồm tất cả các cải biến trong đó một hoặc nhiều axit amin được bổ sung vào đầu tận cùng amino và/hoặc carboxy của glucagon nguyên thể.

Trong quá trình thay thế hoặc bổ sung axit amin, không chỉ 20 axit amin thường được tìm thấy trong các protein của người, mà còn các axit amin không điển hình hoặc không có trong tự nhiên có thể được sử dụng. Các nguồn thương mại của các axit amin không điển hình có thể bao gồm Sigma-Aldrich, ChemPep Inc., và Genzyme Pharmaceuticals. Các peptit bao gồm các axit amin này và các trình tự peptit không điển hình có thể được tổng hợp và được mua từ các nhà cung cấp thương mại, ví dụ, American Peptide Company, Bachem (Hoa Kỳ), hoặc Anygen (Hàn Quốc).

Vì glucagon có độ pH khoảng 7, nó không tan trong dung dịch có độ pH sinh lý (độ pH từ 4 đến 8) và có xu hướng kết tủa ở độ pH trung tính. Trong dung dịch nước có độ pH bằng hoặc dưới 3, glucagon được hòa tan ở giai đoạn ban đầu nhưng kết tủa trong vòng một giờ do tạo ra gel. Do glucagon được tạo gel chủ yếu được cấu thành từ các sợi dạng tấm β , việc dùng glucagon đã kết tủa như vậy thông qua kim tiêm hoặc tiêm trong tĩnh mạch sẽ cản trở mạch máu, và do đó, không thích hợp để sử dụng làm hoạt chất để tiêm. Để làm chậm quá trình kết tủa, các sản phẩm axit (độ pH nằm trong khoảng từ 2 đến 4) thường được sử dụng, và bằng cách làm như vậy, glucagon có thể được duy trì ở trạng thái không kết tụ một cách tương đối trong một khoảng thời gian ngắn. Tuy nhiên, glucagon có thể tạo ra các sợi rất nhanh chóng ở độ pH thấp, và do đó, các sản phẩm axit này phải được tiêm khi bào chế.

Về vấn đề này, các tác giả sáng chế đã phát triển các dẫn xuất glucagon có kiểu tác động kéo dài bằng cách thay đổi pI của glucagon nguyên thể thông qua sự thay thế các gốc axit amin có điện tích âm và điện tích dương. Các dẫn xuất glucagon theo sáng chế, nhờ có pI được thay đổi so với pI của glucagon nguyên thể, được mô tả là có độ hòa tan cải thiện và/hoặc độ ổn định cao ở độ pH trung tính, so với độ hòa tan và độ ổn định của glucagon nguyên thể.

Theo một phương án cụ thể của sáng chế, dẫn xuất glucagon có thể là peptit mà có trình tự axit amin có công thức chung 1 sau:

X1-X2-QGTF-X7-SD-X10-S-X12-X13-X14-X15-X16-X17-X18-X19-X20-X21-F-X23-X24-W-L-X27-X28-X29-X30 (công thức chung 1, SEQ ID NO: 45)

Trong công thức trên:

X1 là histidin, desamino-histidyl, N-dimetyl-histidyl, β -hydroxy imidazopropionyl, 4-imidazoaxetyl, β -carboxy imidazopropionyl, tryptophan, hoặc tyrosin, hoặc không có mặt;

X2 là axit α -metyl-glutamic, axit aminoisobutyric (Aib), D-alanin, glyxin,

Sar(N-metylglyxin), serin, hoặc D-serin;

X7 là threonin, valin, hoặc xystein;

X10 là tyrosin hoặc xystein;

X12 là lysin hoặc xystein;

*273X13 là tyrosin hoặc xystein;

X14 là leuxin hoặc xystein;

X15 là axit aspartic, axit glutamic, hoặc xystein;

X16 là axit glutamic, axit aspartic, serin, axit α -metyl-glutamic, hoặc xystein, hoặc không có mặt;

X17 là axit aspartic, glutamin, axit glutamic, lysin, arginin, serin, xystein, hoặc valin, hoặc không có mặt;

X18 là alanin, axit aspartic, axit glutamic, arginin, valin, hoặc xystein, hoặc không có mặt;

X19 là alanin, arginin, serin, valin, hoặc xystein, hoặc không có mặt;

X20 là lysin, histidin, glutamin, axit aspartic, lysin, arginin, axit α -metyl-glutamic, hoặc xystein, hoặc không có mặt;

X21 là axit aspartic, axit glutamic, leuxin, valin, hoặc xystein, hoặc không có mặt;

X23 là isoleuxin, valin, hoặc arginin, hoặc không có mặt;

X24 là valin, arginin, alanin, xystein, axit glutamic, lysin, glutamin, axit α -metyl-glutamic, hoặc leuxin, hoặc không có mặt;

X27 là isoleuxin, valin, alanin, lysin, metionin, glutamin, hoặc arginin, hoặc không có mặt;

X28 là glutamin, lysin, asparagin, hoặc arginin, hoặc không có mặt;

X29 là lysin, alanin, glyxin, hoặc threonin, hoặc không có mặt; và

X30 là xystein hoặc không có mặt;

với điều kiện khi trình tự axit amin có công thức chung 1 giống với trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1, thì nó bị loại trừ.

Trong phần trên, khi trình tự axit amin có công thức chung 1 giống với trình tự axit amin bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 12, 13, 15, và 36 đến 44, và đặc biệt là, với trình tự axit amin bất kỳ của các trình tự axit amin nêu trong các SEQ ID NO: 13, 15, 36, và 38 đến 43, thì có khả năng là peptit này có thể bị loại trừ khỏi phạm vi của các peptit mà có trình tự axit amin có công thức chung 1, nhưng không chỉ giới hạn ở các trường hợp đó.

Cụ thể hơn,

trong công thức chung 1:

X1 là histidin, tryptophan, hoặc tyrosin, hoặc không có mặt;
 X2 là serin hoặc axit aminoisobutyric (Aib);
 X7 là threonin, valin, hoặc xystein;
 X10 là tyrosin hoặc xystein;
 X12 là lysin hoặc xystein;
 X13 là tyrosin hoặc xystein;
 X14 là leuxin hoặc xystein;
 X15 là axit aspartic hoặc xystein;
 X16 là axit glutamic, serin, hoặc xystein;
 X17 là axit aspartic, axit glutamic, lysin, arginin, serin, xystein, hoặc valin;
 X18 là axit aspartic, axit glutamic, arginin, hoặc xystein;
 X19 là alanin hoặc xystein;
 X20 là glutamin, axit aspartic, lysin, hoặc xystein;
 X21 là axit aspartic, axit glutamic, leuxin, valin, hoặc xystein;
 X23 là isoleuxin, valin, hoặc arginin;
 X24 là valin, arginin, alanin, axit glutamic, lysin, glutamin, hoặc leuxin;
 X27 là isoleuxin, valin, alanin, metionin, glutamin, hoặc arginin;
 X28 là glutamin, lysin, asparagin, hoặc arginin;
 X29 là threonin; và
 X30 là xystein hoặc không có mặt

với điều kiện khi trình tự axit amin có công thức chung 1 giống với trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1, thì nó bị loại trừ.

Ví dụ, peptit này có thể là peptit mà có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong các SEQ ID NO: 2 đến 44, và đặc biệt, là peptit mà (về cơ bản) được cấu thành từ trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong các SEQ ID NO: 2 đến 44, nhưng không chỉ giới hạn ở các peptit đó.

Ngoài ra, mặc dù được mô tả là "peptit được cấu thành từ trình tự SEQ ID NO cụ thể" trong sáng chế, sự biểu hiện như vậy không loại trừ đột biến trong peptit mà có thể xảy ra bởi sự bổ sung trình tự vô nghĩa phía trước hoặc phía sau của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO tương ứng, hoặc đột biến có trong tự nhiên trong đó, hoặc đột biến im lặng trong đó, miễn là peptit có đột biến như vậy có hoạt tính giống như hoặc tương ứng với hoạt tính của peptit đã được cấu thành từ trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO tương ứng. Ngay cả khi bổ sung trình tự hoặc đột biến có mặt, hiển nhiên là nó nằm trong phạm vi của sáng chế.

Ngược lại, theo một khía cạnh khác, khi trình tự axit amin có công thức chung 1 giống với trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong các SEQ ID NO: 12, 13, 15, và 36 đến 44, và đặc biệt là, với các trình tự axit amin bất kỳ

nêu trong các SEQ ID NO: 13, 15, 36, và 38 đến 43, peptit này có khả năng bị loại trừ khỏi phạm vi của các peptit mà có trình tự axit amin có công thức chung 1, nhưng không chỉ giới hạn ở các trường hợp đó. Các peptit được mô tả trên đây có thể cũng được áp dụng cho các phương án hoặc các khía cạnh cụ thể khác, nhưng không chỉ giới hạn ở các trường hợp đó.

Đặc biệt, trong công thức chung 1:

X1 là histidin, tryptophan, hoặc tyrosin, hoặc không có mặt;

X2 là serin hoặc axit aminoisobutyric (Aib);

X7 là threonin, valin, hoặc xystein;

X10 là tyrosin hoặc xystein;

X12 là lysin hoặc xystein;

X13 là tyrosin hoặc xystein;

X14 là leuxin hoặc xystein;

X15 là axit aspartic hoặc xystein;

X16 là axit glutamic, serin hoặc xystein;

X17 là axit aspartic, axit glutamic, lysin, arginin, serin, xystein, hoặc valin;

X18 là axit aspartic, axit glutamic, arginin, hoặc xystein;

X19 là alanin hoặc xystein;

*332X20 là glutamin, axit aspartic, hoặc lysin;

X21 là axit aspartic hoặc axit glutamic;

X23 là valin;

X24 là valin hoặc glutamin;

X27 là isoleuxin hoặc metionin;

X28 là asparagin hoặc arginin;

X29 là threonin; và

X30 là xystein hoặc không có mặt

với điều kiện khi trình tự axit amin có công thức chung 1 giống với trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1, thì nó bị loại trừ.

Ví dụ, peptit này có thể là peptit mà có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong các SEQ ID NO: 2 đến 13, 15, 17, 20 đến 24, 26 đến 30, và 32 đến 44, và đặc biệt, là peptit mà (về cơ bản) được cấu thành từ trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong các SEQ ID NO: 2 đến 13, 15, 17, 20 đến 24, 26 đến 30, và 32 đến 44, nhưng không chỉ giới hạn ở các peptit đó.

Đặc biệt, trong công thức chung 1:

X1 là tyrosin;

X2 là axit aminoisobutyric;

X7 là threonin;

X10 là tyrosin;

X12 là lysin;

*349X13 là tyrosin;

X14 là leuxin;

X15 là axit aspartic hoặc xystein;

X16 là axit glutamic, serin, hoặc xystein;

X17 là lysin hoặc arginin;

X18 là arginin;

X19 là alanin;

X20 là glutamin, xystein, hoặc lysin;

X21 là axit aspartic, xystein, valin, hoặc axit glutamic;

X23 là valin;

X24 là valin hoặc arginin;

X27 là metionin;

X28 là asparagin hoặc arginin;

X29 là threonin; và

X30 không có mặt.

Ví dụ, peptit này có thể là peptit mà có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong các SEQ ID NO: 14, 16, 18, 19, 25 và 31, và đặc biệt, là peptit mà (về cơ bản) được cấu thành từ trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong các SEQ ID NO: 14, 16, 18, 19, 25 và 31, nhưng không chỉ giới hạn ở các peptit đó.

Cụ thể hơn, peptit này có thể là peptit mà có trình tự axit amin có công thức chung 2 sau:

Y-Aib-QGTF-X7-SD-X10-S-X12-Y-L-X15-X16-X17-R-A-X20-X21-F-V-X24-W-L-M-N-T-X30 (công thức chung 2, SEQ ID NO: 46)

Trong công thức chung 2,

X7 là threonin, valin, hoặc xystein;

X10 là tyrosin hoặc xystein;

X12 là lysin hoặc xystein;

X15 là axit aspartic hoặc xystein;

X16 là axit glutamic hoặc serin;
 X17 là lysin hoặc arginin;
 X20 là glutamin hoặc lysin;
 X21 là axit aspartic hoặc axit glutamic;
 X24 là valin hoặc glutamin; và
 X30 là xystein hoặc không có mặt,

với điều kiện khi trình tự axit amin có công thức chung 2 giống với trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong các SEQ ID NO: 14, 19, 20, 25, 27, 31, và 33, nó có thể bị loại trừ, nhưng không chỉ giới hạn ở các trường hợp đó.

Ví dụ, peptit này có thể là peptit mà có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong các SEQ ID NO: 12, 13, 15, và 36 đến 44, và đặc biệt, là peptit mà (về cơ bản) được cấu thành từ trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong các SEQ ID NO: 12, 13, 15, và 36 đến 44, nhưng không chỉ giới hạn ở các peptit đó. Cụ thể hơn, peptit này có thể là peptit mà có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 12 hoặc SEQ ID NO: 20, hoặc (về cơ bản) được cấu thành từ trình tự axit amin tương ứng, nhưng không chỉ giới hạn ở các peptit đó.

Ngoài ra, peptit có trình tự axit amin có công thức chung 1 hoặc công thức chung 2 có thể là peptit trong đó ít nhất một cặp axit amin trong số các cặp axit amin X10 và X14, X12 và X16, X16 và X20, X17 và X21, X20 và X24, và X24 và X28 trong công thức chung 1 hoặc công thức chung 2 lần lượt có thể được thay thế bằng axit glutamic hoặc lysin, mà có khả năng tạo ra vòng, nhưng không chỉ giới hạn ở các peptit đó.

Cụ thể hơn, peptit có trình tự axit amin có công thức chung 1 hoặc công thức chung 2 có thể là peptit trong đó cặp axit amin X12 và X16 hoặc cặp axit amin X16 và X20 lần lượt được thay thế bằng axit glutamic hoặc lysin, mà có khả năng tạo ra vòng.

Cụ thể hơn, ít nhất một cặp axit amin trong số các cặp axit amin X10 và X14, X12 và X16, X16 và X20, X17 và X21, X20 và X24, và X24 và X28 có thể là cặp axit amin tạo ra vòng (ví dụ, vòng lactam), nhưng không chỉ giới hạn ở các cặp đó.

Đặc biệt là, peptit có thể được cải biến ở đầu tận amino hoặc đầu tận cùng carboxy của nó hoặc được bảo vệ bằng các nhóm hữu cơ khác nhau dùng để bảo vệ peptit khỏi các enzym phân cắt protein *in vivo* trong khi làm tăng độ ổn định của nó, ví dụ, peptit trong đó đầu tận cùng C của nó được amit hóa.

Ngoài ra, peptit theo sáng chế có thể được tổng hợp bằng phương pháp đã biết trong lĩnh vực này, theo chiều dài của nó, ví dụ, bằng thiết bị tổng hợp peptit tự động, và có thể được tạo ra bằng công nghệ xử lý kỹ thuật di truyền.

Đặc biệt, peptit theo sáng chế có thể được tạo ra bằng phương pháp tổng hợp chuẩn, hệ biểu hiện tái tổ hợp, hoặc phương pháp bất kỳ khác đã biết trong lĩnh vực này. Do đó, dẫn xuất glucagon theo sáng chế có thể được tổng hợp bằng các phương pháp khác nhau bao gồm, ví dụ, các phương pháp được mô tả dưới đây:

(a) phương pháp tổng hợp peptit bằng phương pháp pha rắn hoặc pha lỏng từng bước hoặc bằng cách lắp ráp mảnh, tiếp theo tách và tinh chế sản phẩm peptit cuối; hoặc

(b) phương pháp biểu hiện cấu trúc axit nucleic mã hóa peptit trong tế bào vật chủ và thu sản phẩm biểu hiện từ môi trường nuôi cấy tế bào vật chủ; hoặc

(c) phương pháp thực hiện sự biểu hiện không tế bào *in vitro* của cấu trúc axit nucleic mã hóa peptit và thu sản phẩm biểu hiện từ đó; hoặc

phương pháp tạo ra các mảnh peptit bằng tổ hợp bất kỳ của các phương pháp (a), (b), và (c), tạo ra peptit bằng cách liên kết các mảnh peptit, và sau đó, thu peptit này.

Theo một ví dụ cụ thể hơn, dẫn xuất glucagon mong muốn có thể được tạo ra bằng thao tác di truyền, mà bao gồm việc tạo ra gen dung hợp mã hóa protein dung hợp, bao gồm đối tác dung hợp và dẫn xuất glucagon, biến nạp sản phẩm thu được vào trong tế bào vật chủ, biểu hiện ở dạng protein dung hợp, và phân tách dẫn xuất glucagon khỏi protein dung hợp bằng cách sử dụng proteaza hoặc hợp chất mà có khả năng phân cắt protein, tiếp theo tách ra. Nhằm mục đích này, ví dụ, trình tự ADN mã hóa gốc axit amin mà có thể được phân cắt bởi proteaza như Yếu tố Xa hoặc enterokinaza, CNBr, hoặc hợp chất như hydroxylamin, có thể được cài xen giữa đối tác dung hợp và polynucleotit mã hóa dẫn xuất glucagon.

Theo một phương án cụ thể của sáng chế, đã xác nhận rằng peptit theo sáng chế có pI khác so với pI của glucagon nguyên thể (xem bảng 1). Kết quả là, peptit theo sáng chế có độ hòa tan cải thiện và độ ổn định cao hơn ở độ pH trung tính. Do đó, peptit theo sáng chế có thể làm tăng sự tuân thủ của bệnh nhân khi được dùng làm chất làm giảm glucoza máu và cũng thích hợp để dùng kết hợp peptit này với các chất chống béo phì khác, và do đó, có thể được sử dụng một cách có hiệu quả để phòng và điều trị chứng giảm glucoza máu và bệnh béo phì.

Về vấn đề này, peptit theo sáng chế có thể cung cấp sự lựa chọn trị liệu hấp dẫn đối với chứng giảm glucoza máu, bệnh béo phì, hoặc các bệnh liên quan của chúng.

Ví dụ, peptit theo sáng chế là hormon kiểm soát đáp ứng insulin chủ yếu, và có thể được sử dụng một cách có hiệu quả để điều trị chứng giảm glucoza máu nặng ở các bệnh nhân bị bệnh đái tháo đường.

Ngoài ra, peptit theo sáng chế có thể được sử dụng làm thuốc không chỉ để ngăn ngừa sự tăng thể trọng, thúc đẩy sự làm giảm thể trọng, làm giảm sự thừa cân, và bệnh béo phì kể cả béo phì dạng bệnh (ví dụ, bằng cách kiểm soát sự thèm ăn, sự tiêu hóa, sự hấp thu thức ăn, sự hấp thu calo, và/hoặc sự tiêu thụ năng lượng), mà còn để điều trị chứng viêm liên quan đến béo phì, bệnh túi mật liên quan đến béo phì, và chứng ngưng thở khi ngủ do béo phì gây ra, nhưng không chỉ giới hạn ở các công dụng đó, và có thể được sử dụng để điều trị các bệnh hoặc các tình trạng sức khỏe liên quan của chúng.

Peptit theo sáng chế cũng có thể được sử dụng để điều trị hội chứng chuyển hóa không phải bệnh béo phì, tức là bệnh liên quan đến béo phì như rối loạn dung nạp glucoza, chứng tăng cholesterol máu, rối loạn lipid máu, bệnh béo phì, bệnh đái tháo đường, bệnh tăng huyết áp, bệnh viêm gan nhiễm mỡ không do rượu (nonalcoholic steatohepatitis - NASH), bệnh xơ vữa động mạch do rối loạn lipid máu gây ra, bệnh xơ vữa động mạch, bệnh xơ cứng động mạch, bệnh mạch vành tim, bệnh đột quỵ, chứng giảm glucoza máu, v.v.. Tuy nhiên, các tác dụng của peptit theo sáng chế có thể qua trung gian toàn bộ hoặc một phần bởi tác dụng liên quan đến thể trọng được mô tả trên đây hoặc có thể độc lập với tác dụng này.

Ví dụ về hợp chất hoặc nguyên liệu có hoạt tính trị liệu đối với hội chứng chuyển hóa được bao gồm trong việc dùng kết hợp hoặc chế phẩm theo sáng chế có thể chứa peptit kích thích insulin, chất chủ vận thụ thể peptit giống glucagon-1 (GLP-1), chất chủ vận thụ thể leptin, chất ức chế dipeptidyl peptidaza-IV (DPP-IV), chất đối kháng thụ thể Y5, chất đối kháng thụ thể hormon tập trung melanin (melanin-concentrating hormone - MCH), chất chủ vận thụ thể Y2/4, chất chủ vận thụ thể melanocortin 3/4 (MC 3/4), chất ức chế lipaza dạ dày/tụy, chất chủ vận của thụ thể 5-hydroxytryptamin 2C (5-hydroxytryptamine 2C - 5HT2C), chất chủ vận thụ thể β 3A, chất chủ vận thụ thể amylin, chất đối kháng ghrelin, chất đối kháng thụ thể ghrelin, chất chủ vận thụ thể alpha được hoạt hóa bởi chất tăng sinh thể peroxi (peroxisome proliferator-activated receptor alpha - PPAR α), chất chủ vận thụ thể delta được hoạt hóa bởi chất tăng sinh thể peroxi (peroxisome proliferator-activated receptor delta - PPAR δ), chất chủ vận thụ thể Farnesoid X (Farnesoid X receptor - FXR), chất ức chế acetyl-CoA carboxylaza, peptit YY, cholecystokinin (CCK), xenin, glicentin, obestatin, secretin, nesfatin, insulin, và peptit kích thích insulin phụ thuộc glucoza (glucose-dependent insulinotropic peptide - GIP), nhưng không chỉ giới hạn ở các chất đó. Ngoài ra, tất cả các thuốc mà có hiệu quả để điều trị bệnh béo phì và các thuốc có khả năng ức chế chứng viêm gan và chứng xơ hóa có thể được bao gồm.

Cụ thể, peptit kích thích insulin có thể được chọn từ nhóm bao gồm GLP-1, exendin-3, exendin-4, chất chủ vận của chúng, dẫn xuất của chúng, mảnh của chúng,

biến thể của chúng, và kết hợp của chúng.

Cụ thể hơn, peptit kích thích insulin có thể là dẫn xuất peptit kích thích insulin trong đó histidin đầu tận cùng N của peptit kích thích insulin này được thay thế bằng gốc được chọn từ nhóm bao gồm desamino-histidyl, N-dimetyl-histidyl, β -hydroxy imidazopropionyl, 4-imidazoaxetyl, và β -carboxy imidazopropionyl, nhưng không chỉ giới hạn ở các chất đó.

Cụ thể hơn, peptit kích thích insulin có thể được chọn từ nhóm bao gồm exendin-4 nguyên thể; dẫn xuất exendin-4 trong đó nhóm amin đầu tận cùng N của exendin-4 được loại bỏ; dẫn xuất exendin-4 trong đó nhóm amin đầu tận cùng N của exendin-4 được thay thế bằng nhóm hydroxyl; dẫn xuất exendin-4 trong đó nhóm amin đầu tận cùng N của exendin-4 được cải biến bằng nhóm dimetyl; dẫn xuất exendin-4 trong đó nguyên tử cacbon α của axit amin thứ nhất của exendin-4, histidin, được loại bỏ; dẫn xuất exendin-4 trong đó axit amin thứ 12 của exendin-4, lysin, được thay thế bằng serin, và dẫn xuất exendin-4 trong đó axit amin thứ 12 của exendin-4, lysin, được thay thế bằng arginin, nhưng không chỉ giới hạn ở các chất đó.

Trong khi đó, để làm ví dụ về peptit kích thích insulin hoặc thể tiếp hợp có tác dụng kéo dài của nó, toàn bộ nội dung của đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 2010-0105877 được bao gồm trong bản mô tả này dưới dạng viện dẫn.

Theo một phương án cụ thể hơn, dẫn xuất glucagon, ví dụ, peptit có trình tự axit amin có công thức chung 1 hoặc công thức chung 2, có thể ở dạng thể tiếp hợp có tác dụng kéo dài mà nguyên liệu tương hợp sinh học có khả năng làm tăng thời gian bán thải *in vivo* được liên kết với nó, nhưng không chỉ giới hạn ở trường hợp đó. Nguyên liệu tương hợp sinh học có thể được sử dụng thay thế với chất mang.

Ngoài ra, peptit kích thích insulin cũng có thể ở dạng thể tiếp hợp có tác dụng kéo dài mà nguyên liệu tương hợp sinh học có khả năng làm tăng thời gian bán thải *in vivo* được liên kết với nó, nhưng không chỉ giới hạn ở trường hợp đó.

Theo một phương án cụ thể của sáng chế, thời gian hiệu lực của thể tiếp hợp nêu trên tăng so với glucagon nguyên thể hoặc dẫn xuất glucagon của nó, mà chất mang không được liên kết vào. Theo sáng chế, thể tiếp hợp protein được gọi là "thể tiếp hợp có tác dụng kéo dài".

Ví dụ về nguyên liệu tương hợp sinh học có thể bao gồm polyetylen glycol, axit béo, cholesterol, albumin và mảnh của nó, nguyên liệu gắn kết với albumin, polyme gồm các đơn vị lặp có trình tự axit amin cụ thể, kháng thể, mảnh kháng thể, nguyên liệu gắn kết với FcRn, mô liên kết *in vivo* hoặc dẫn xuất của nó, nucleotit, fibronectin, transferrin, sacarit, và polyme, nhưng không chỉ giới hạn ở các chất đó. Ví dụ, ít nhất một mạch bên axit amin trong peptit theo sáng chế có thể được gắn với nguyên liệu tương hợp sinh học để làm tăng độ hòa tan và/hoặc thời gian bán thải *in vivo*, và/hoặc làm tăng độ sinh khả dụng của nó. Các cải biến này đã biết là làm giảm

độ thanh thải của các protein và các peptit trị liệu.

Đối với polyme tương hợp sinh học, các polyme hòa tan (lưỡng tính hoặc ưa nước), không độc, và trơ về mặt dược học là thích hợp, và ví dụ, chúng có thể bao gồm PEG, homopolyme hoặc copolyme của PEG, các polyme được thế monomethyl (monomethyl-substituted polymer - mPEG), và các poly axit amin như poly-lysine, axit poly-aspartic, và axit poly-glutamic, nhưng không chỉ giới hạn ở các chất đó.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này đã biết rằng dẫn xuất glucagon được cải biến theo cách đó sẽ có tác dụng điều trị bệnh nổi trội so với glucagon nguyên thể. Do đó, các biến thể của dẫn xuất glucagon như đã được mô tả trên đây cũng nằm trong phạm vi của sáng chế.

Theo một phương án cụ thể hơn, dẫn xuất glucagon, ví dụ, peptit mà có trình tự axit amin có công thức chung 1 hoặc công thức chung 2, và peptit kích thích insulin có thể lần lượt được liên kết với nguyên liệu tương hợp sinh học bằng cầu nối được chọn từ nhóm bao gồm polyetylen glycol, polypropylen glycol, copolyme etylen glycol-propylen glycol, rượu polyhydric được polyoxyetyl hóa, rượu polyvinyl, polysaccharit, dextran, polyvinyl etyl ete, polyme dễ phân hủy sinh học như axit polylactic (PLA) và axit polylactic-glycolic (PLGA), polyme lipid, chitin, axit hyaluronic, axit béo, polyme, hợp chất có khối lượng phân tử thấp, nucleotit, và kết hợp của chúng, nhưng không chỉ giới hạn ở các chất đó.

Theo phương án cụ thể hơn nữa, nguyên liệu tương hợp sinh học có thể là nguyên liệu gắn kết với FcRn, và dẫn xuất glucagon, ví dụ, peptit mà có trình tự axit amin có công thức chung 1 hoặc công thức chung 2, và peptit kích thích insulin có thể lần lượt được liên kết với nguyên liệu tương hợp sinh học bằng cầu nối peptit hoặc cầu nối không phải peptit, nhưng không chỉ giới hạn ở trường hợp đó.

Theo một ví dụ cụ thể, nguyên liệu gắn kết với FcRn có thể là polypeptit chứa vùng Fc globulin miễn dịch.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, "cầu nối không phải peptit" bao gồm polyme tương hợp sinh học mà ít nhất hai đơn vị lặp được liên kết với nó. Các đơn vị lặp được liên kết với nhau bằng liên kết cộng hóa trị ngẫu nhiên thay vì liên kết peptit. Cầu nối không phải peptit có thể là một thành phần mà thiết lập gốc của thể tiếp hợp có tác dụng kéo dài theo sáng chế.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "cầu nối không phải peptit" có thể được sử dụng thay thế nhau với "polyme không phải peptit".

Ngoài ra, theo một phương án cụ thể, thể tiếp hợp này có thể là thể tiếp hợp trong đó được chất protein được liên kết cộng hóa trị với vùng Fc globulin miễn dịch bằng cầu nối không phải peptit chứa nhóm phản ứng, mà có thể được liên kết với vùng Fc globulin miễn dịch và được chất protein ở cả hai đầu của thể tiếp hợp.

Mặc dù không bị giới hạn đặc biệt, cầu nối không phải peptit có thể là cầu nối

được chọn từ nhóm bao gồm polyetylen glycol, polypropylen glycol, copolyme etylen glycol-propylen glycol, rượu polyhydric được polyoxyetyl hóa, rượu polyvinyllic, polysacarit, dextran, polyvinyl etyl ete, polyme dễ phân huỷ sinh học như axit polylactic (PLA) và axit polylactic-glycolic (PLGA), polyme lipid, chitin, axit hyaluronic, polysacarit, và kết hợp của chúng. Theo một phương án cụ thể hơn, polyme không phải peptit có thể là polyetylen glycol, nhưng không chỉ giới hạn ở chất đó. Ngoài ra, các dẫn xuất mà đã biết trong lĩnh vực này và các dẫn xuất mà có thể được tạo ra một cách dễ dàng bằng công nghệ trong lĩnh vực này là nằm trong phạm vi của sáng chế.

Cần nói không phải peptit được sử dụng trong sáng chế có thể là polyme bất kỳ mà có tính kháng với proteaza *in vivo*, nhưng không chỉ giới hạn ở trường hợp đó. Khối lượng phân tử của polyme không phải peptit có thể nằm trong khoảng từ 1 kDa đến 100 kDa, và đặc biệt là nằm trong khoảng từ 1 kDa đến 20 kDa, nhưng không chỉ giới hạn ở khoảng đó. Ngoài ra, cần nói không phải peptit theo sáng chế, mà được liên kết với polypeptit chứa vùng Fc globulin miễn dịch, có thể bao gồm không chỉ một loại polyme mà còn tổ hợp các loại polyme khác nhau.

Theo một phương án cụ thể, cả hai đầu của cầu nối không phải peptit có thể lần lượt được liên kết với nhóm amin hoặc nhóm thiol của peptit, mà có trình tự axit amin có công thức chung 1, hoặc peptit kích thích insulin, và nguyên liệu tương hợp sinh học.

Đặc biệt, polyme không phải peptit có thể chứa nhóm phản ứng ở cả hai đầu, mà có thể lần lượt được liên kết với mảnh Fc globulin miễn dịch và, dẫn xuất glucagon hoặc peptit kích thích insulin; và đặc biệt, chứa nhóm phản ứng mà có thể được liên kết với nhóm amin của đầu tận cùng N hoặc lysin, hoặc nhóm thiol của cystein của dẫn xuất glucagon hoặc peptit kích thích insulin, hoặc mảnh Fc globulin miễn dịch.

Ngoài ra, nhóm phản ứng của polyme không phải peptit mà có thể được liên kết với vùng Fc globulin miễn dịch, dẫn xuất glucagon, và peptit kích thích insulin có thể được chọn từ nhóm bao gồm nhóm aldehyt, nhóm maleimit, và dẫn xuất succinimit, nhưng không chỉ giới hạn ở các nhóm đó.

Ở phần trên, ví dụ về nhóm aldehyt có thể bao gồm nhóm propionaldehyt hoặc nhóm butyraldehyt, nhưng không chỉ giới hạn ở các nhóm đó.

Ở phần trên, để làm dẫn xuất succinimit, có thể sử dụng succinimidyl valerat, succinimidyl metylbutanoat, succinimidyl metylpropionat, succinimidyl butanoat, succinimidyl propionat, N-hydroxysuccinimit, hydroxy succinimidyl, succinimidyl carboxymetyl, hoặc succinimidyl cacbonat, nhưng không chỉ giới hạn ở các chất đó.

Ngoài ra, sản phẩm cuối được tạo ra bằng cách alkyl hóa khử thông qua liên

kết aldehyt là ổn định hơn so với sản phẩm được liên kết bằng liên kết amit. Nhóm phản ứng aldehyt phản ứng một cách chọn lọc với đầu tận cùng N trong điều kiện độ pH thấp đồng thời nó có thể tạo ra liên kết cộng hóa trị với gốc lysin ở độ pH cao, ví dụ, độ pH bằng 9,0.

Các nhóm phản ứng ở cả hai đầu của cầu nối không phải peptit có thể giống nhau hoặc khác nhau, ví dụ, nhóm phản ứng maleimit có thể được tạo ra ở một đầu và nhóm aldehyt, nhóm propionaldehyt, hoặc nhóm butyraldehyt có thể được tạo ra ở đầu còn lại. Tuy nhiên, nếu vùng Fc globulin miễn dịch và dẫn xuất glucagon hoặc peptit kích thích insulin có thể được tiếp hợp ở mỗi đầu của cầu nối không phải peptit, thì nó không bị giới hạn đặc biệt.

Ví dụ, polyme không phải peptit có thể có nhóm maleimit ở một đầu và nhóm aldehyt, nhóm propionaldehyt, hoặc nhóm butyraldehyt ở đầu còn lại.

Khi polyetylen glycol có nhóm hydroxy phản ứng ở cả hai đầu của nó được sử dụng làm polyme không phải peptit, thì nhóm hydroxy này có thể được hoạt hóa thành các nhóm phản ứng khác nhau bằng các phản ứng hóa học đã biết, hoặc polyetylen glycol có nhóm phản ứng được cải biến có trên thị trường có thể được sử dụng để tạo ra thể tiếp hợp protein có tác dụng kéo dài theo sáng chế.

Theo một phương án cụ thể, polyme không phải peptit có thể là polyme mà có thể được liên kết với gốc xystein của dẫn xuất glucagon, và cụ thể hơn, với nhóm -SH của xystein, nhưng không chỉ giới hạn ở trường hợp đó.

Theo một phương án cụ thể, thể tiếp hợp này có thể là thể tiếp hợp trong đó peptit có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 12 hoặc SEQ ID NO: 20 được liên kết với vùng Fc globulin miễn dịch bằng polyme không phải peptit, và đặc biệt, polyme không phải peptit có thể là polyme mà được liên kết với gốc xystein nằm ở số 30 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 12 hoặc gốc xystein nằm ở số 17 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 20, nhưng không chỉ giới hạn ở trường hợp đó.

Khi maleimit-PEG-aldehyt được sử dụng, nhóm maleimit có thể được liên kết với nhóm -SH của dẫn xuất glucagon bằng liên kết thioete và nhóm aldehyt có thể được liên kết với -NH₂ của Fc globulin miễn dịch thông qua sự alkyl hóa khử, nhưng không chỉ giới hạn ở trường hợp đó và phần mô tả trên chỉ là một phương án.

Theo sáng chế, "vùng Fc globulin miễn dịch" được dùng để chỉ vùng bao gồm vùng ổn định của chuỗi nặng 2 (CH₂) và/hoặc vùng ổn định của chuỗi nặng 3 (CH₃), ngoại trừ các vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch. Vùng Fc globulin miễn dịch có thể là một thành phần mà thiết lập gốc của thể tiếp hợp protein theo sáng chế.

Vùng Fc globulin miễn dịch có thể chứa vùng bản lề trong vùng ổn định của

chuỗi nặng, nhưng không chỉ giới hạn ở trường hợp đó. Ngoài ra, vùng Fc globulin miễn dịch theo sáng chế có thể là vùng Fc mở rộng bao gồm một phần hoặc toàn bộ vùng ổn định của chuỗi nặng 1 (CH1) và/hoặc vùng ổn định của chuỗi nhẹ 1 (CL1), ngoại trừ các vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch, miễn là vùng Fc globulin miễn dịch này có tác dụng gần giống như hoặc được cải thiện so với loại nguyên thể. Ngoài ra, vùng Fc globulin miễn dịch theo sáng chế có thể là vùng trong đó một phần khá dài của trình tự axit amin tương ứng với CH2 và/hoặc CH3 được loại bỏ.

Ví dụ, vùng Fc globulin miễn dịch theo sáng chế có thể là 1) miền CH1, miền CH2, miền CH3, và miền CH4; 2) miền CH1 và miền CH2; 3) miền CH1 và miền CH3; 4) miền CH2 và miền CH3; 5) tổ hợp giữa một hoặc hai hoặc nhiều miền trong số miền CH1, miền CH2, miền CH3, và miền CH4 và vùng bản lề (hoặc một phần của vùng bản lề) của globulin miễn dịch; và 6) dime giữa mỗi miền của vùng ổn định của chuỗi nặng và vùng ổn định của chuỗi nhẹ, nhưng không chỉ giới hạn ở các miền đó.

Ngoài ra, theo một phương án cụ thể, vùng Fc globulin miễn dịch có thể ở dạng dime, và một phân tử của dẫn xuất glucagon hoặc peptit kích thích insulin có thể được liên kết cộng hóa trị với vùng Fc ở dạng dime, và cụ thể, Fc globulin miễn dịch và dẫn xuất glucagon hoặc peptit kích thích insulin có thể được liên kết với nhau bằng polyme không phải peptit. Hơn thế nữa, hai phân tử của dẫn xuất glucagon hoặc peptit kích thích insulin có thể có khả năng được tiếp hợp theo cách đối xứng với một vùng Fc ở dạng dime. Cụ thể, Fc globulin miễn dịch và dẫn xuất glucagon hoặc peptit kích thích insulin có thể được liên kết với nhau bằng cầu nối không phải peptit, nhưng không chỉ giới hạn ở phương án được mô tả trên đây.

Ngoài ra, vùng Fc globulin miễn dịch theo sáng chế không chỉ bao gồm trình tự axit amin nguyên thể mà còn bao gồm dẫn xuất trình tự của nó. Dẫn xuất trình tự axit amin được dùng để chỉ trình tự axit amin mà có khác biệt ở ít nhất một gốc axit amin do sự mất đoạn, cài xen, thay thế không bảo toàn hoặc bảo toàn, hoặc kết hợp của chúng.

Ví dụ, các gốc axit amin ở các vị trí 214 đến 238, 297 đến 299, 318 đến 322, hoặc 327 đến 331, mà đã biết là tham gia trong việc gắn kết của Fc globulin miễn dịch, có thể được sử dụng làm vị trí thích hợp để cải biến.

Ngoài ra, các dẫn xuất khác nhau khác là có thể, bao gồm dẫn xuất mà có sự mất đoạn của vùng có khả năng tạo ra liên kết disulfua, hoặc sự mất đoạn của một số gốc axit amin ở đầu tận cùng N của Fc nguyên thể hoặc bổ sung gốc metionin ở đầu tận cùng N của Fc nguyên thể. Ngoài ra, để làm mất chức năng hiệu ứng, thì sự mất đoạn có thể xảy ra ở vị trí gắn kết bổ thể, như vị trí gắn kết C1q và vị trí tính độc qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể (antibody dependent cell mediated cytotoxicity - ADCC). Các kỹ thuật tạo ra các dẫn xuất trình tự như vậy của vùng Fc globulin miễn

dịch được bộc lộ trong công bố sáng chế quốc tế các số WO 97/34631, WO 96/32478, v.v..

Sự trao đổi axit amin trong các protein và peptit, thường không làm thay đổi hoạt tính của các protein hoặc peptit này đã biết trong lĩnh vực (H. Neurath, R. L. Hill, *The Proteins*, Academic Press, New York, 1979). Sự trao đổi xảy ra thường xuyên nhất là Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Thy/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu, và Asp/Gly, theo cả hai hướng. Ngoài ra, vùng Fc có thể, nếu cần, được cải biến bằng cách phosphoryl hóa, sulfat hóa, acrylat hóa, glycosyl hóa, metyl hóa, farnesyl hóa, axetyl hóa, amit hóa, v.v.

Các dẫn xuất Fc được mô tả trên đây thể hiện hoạt tính sinh học giống với hoạt tính sinh học của vùng Fc theo sáng chế và có độ ổn định về cấu trúc với nhiệt, độ pH, v.v. được cải thiện.

Hơn nữa, vùng Fc globulin miễn dịch có thể được tạo ra từ các dạng nguyên thể được tách *in vivo* từ người hoặc các động vật như bò, dê, lợn, chuột nhắt, thỏ, chuột hamster, chuột cống, chuột lang, v.v., hoặc có thể là các thể tái tổ hợp hoặc các dẫn xuất của chúng, thu được từ các tế bào động vật hoặc các vi sinh vật được biến nạp. Trong bản mô tả này, vùng Fc có thể được tạo ra từ globulin miễn dịch nguyên thể bằng cách tách globulin miễn dịch nguyên vẹn khỏi cơ thể sống của người hoặc động vật và xử lý globulin miễn dịch tách được bằng proteaza. Khi globulin miễn dịch nguyên vẹn được xử lý bằng papain, nó được phân cắt thành các vùng Fab và Fc, còn khi globulin miễn dịch nguyên vẹn được xử lý bằng pepsin, nó được phân cắt thành các mảnh pF'c và F(ab)₂. Fc hoặc pF'c có thể được tách bằng cách sử dụng sắc ký loại cở, v.v.. Theo một phương án cụ thể hơn, vùng Fc có nguồn gốc từ người là vùng Fc globulin miễn dịch tái tổ hợp thu được từ vi sinh vật.

Ngoài ra, vùng Fc globulin miễn dịch có thể có các glycan tự nhiên, các glycan được kéo dài hoặc rút ngắn so với loại tự nhiên, hoặc ở dạng được loại glycosyl. Việc kéo dài, rút ngắn, hoặc loại bỏ các glycan của Fc globulin miễn dịch có thể được thực hiện bằng các phương pháp thông thường như phương pháp hóa học, phương pháp enzym, và phương pháp dùng kỹ thuật di truyền bằng cách sử dụng vi sinh vật. Vùng Fc globulin miễn dịch thu được bằng cách loại bỏ các glycan khỏi vùng Fc thể hiện sự giảm đáng kể ái lực gắn kết với phần C1q và sự giảm hoặc mất tính độc tế bào phụ thuộc kháng thể hoặc tính độc tế bào phụ thuộc bổ thể, và do đó, nó không gây ra đáp ứng miễn dịch không cần thiết *in vivo*. Về vấn đề này, vùng Fc globulin miễn dịch ở dạng vùng Fc globulin miễn dịch được loại glycosyl hoặc không glycosyl hóa có thể là dạng thích hợp hơn để đáp ứng mục đích ban đầu của sáng chế làm chất mang được chất.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "sự loại glycosyl" chỉ việc

loại bỏ bằng enzym các gốc đường khỏi vùng Fc, và thuật ngữ "không glycosyl hóa" chỉ vùng Fc không được glycosyl hóa được tạo ra trong sinh vật chưa có nhân điển hình, cụ thể hơn là *E. coli*.

Trong khi đó, vùng Fc globulin miễn dịch có thể có nguồn gốc từ người hoặc các động vật khác bao gồm bò, dê, lợn, chuột nhắt, thỏ, chuột hamster, chuột cống, và chuột lang. Theo một phương án cụ thể hơn, vùng này có nguồn gốc từ người.

Ngoài ra, vùng Fc globulin miễn dịch (Ig) có thể có nguồn gốc từ IgG, IgA, IgD, IgE, IgM, hoặc tổ hợp hoặc thể lai của chúng. Theo một phương án cụ thể hơn, vùng này có nguồn gốc từ IgG hoặc IgM, là các protein có nhiều nhất trong máu của người, và theo phương án cụ thể hơn nữa, vùng này có nguồn gốc từ IgG, đã biết là làm tăng thời gian bán thải của các protein gắn kết phối tử. Theo một phương án cụ thể hơn nữa, vùng Fc globulin miễn dịch là vùng Fc IgG4, và theo phương án cụ thể nhất, vùng Fc IgG4 là vùng Fc không glycosyl hóa có nguồn gốc từ IgG4 của người, nhưng không chỉ giới hạn ở các vùng đó.

Đặc biệt là, khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "kết hợp" có nghĩa là các polypeptit mã hóa vùng Fc globulin miễn dịch chuỗi đơn có cùng nguồn gốc được liên kết với polypeptit chuỗi đơn có nguồn gốc khác để tạo thành dime hoặc multime. Cụ thể, dime hoặc multime có thể được tạo ra từ hai hoặc nhiều mảnh được chọn từ nhóm bao gồm các mảnh Fc IgG, Fc IgA, Fc IgM, Fc IgD, và Fc IgE.

Chế phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng để phòng hoặc điều trị chứng giảm glucoza máu hoặc hội chứng chuyển hóa.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "phòng" chỉ tất cả các loại hoạt động liên quan đến sự ức chế hoặc làm chậm sự xuất hiện của chứng giảm glucoza máu hoặc hội chứng chuyển hóa bằng cách dùng peptit hoặc chế phẩm, và thuật ngữ "điều trị" chỉ tất cả các loại hoạt động liên quan đến sự cải thiện hoặc thay đổi có lợi của các triệu chứng của chứng giảm glucoza máu hoặc hội chứng chuyển hóa bằng cách dùng peptit hoặc chế phẩm.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "dùng" chỉ việc đưa nguyên liệu cụ thể vào bệnh nhân bằng cách thích hợp. Chế phẩm này có thể được dùng qua đường thông thường mà cho phép phân phối chế phẩm đến mô đích *in vivo*, ví dụ, dùng trong màng bụng, trong tĩnh mạch, trong cơ, dưới da, trong da, qua đường miệng, tại chỗ, trong mũi, trong phổi, và trong trực tràng, nhưng không chỉ giới hạn cụ thể ở các đường đó.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "hội chứng chuyển hóa" chỉ triệu chứng của sự xuất hiện riêng lẻ hoặc phức hợp của các bệnh khác nhau do rối loạn chuyển hóa mạn tính, và cụ thể, ví dụ về hội chứng chuyển hóa có thể bao gồm rối loạn dung nạp glucoza, chứng tăng cholesterol máu, rối loạn lipid máu, bệnh béo

phì, bệnh đái tháo đường, bệnh tăng huyết áp, bệnh viêm gan nhiễm mỡ không do rượu (NASH), bệnh xơ vữa động mạch do rối loạn lipid máu gây ra, bệnh xơ vữa động mạch, bệnh xơ cứng động mạch, bệnh mạch vành tim, bệnh đột quỵ, v.v., nhưng không chỉ giới hạn ở các bệnh đó.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "bệnh béo phì" được dùng để chỉ tình trạng bệnh có sự dư thừa chất béo trong cơ thể, và người có chỉ số cân nặng cơ thể (body mass index - BMI; thể trọng (kg) chia cho bình phương chiều cao cơ thể (m)) là 25 hoặc cao hơn được chẩn đoán là có bệnh béo phì. Bệnh béo phì thường xảy ra do sự mất cân bằng năng lượng trong thời gian dài trong đó năng lượng nhận vào vượt quá mức năng lượng tiêu hao. Bệnh béo phì là bệnh chuyển hóa mà ảnh hưởng đến toàn bộ cơ thể, bệnh này làm tăng nguy cơ của bệnh đái tháo đường, chứng tăng lipid máu, rối loạn chức năng giới tính, bệnh viêm khớp, và bệnh tim mạch, và trong một số trường hợp, nó còn có liên quan đến sự xuất hiện của bệnh ung thư.

Bệnh đái tháo đường có thể tương ứng với "chứng giảm glucoza máu" dưới dạng triệu chứng cấp tính.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "chứng giảm glucoza máu" chỉ triệu chứng cấp tính của bệnh đái tháo đường, trong đó nồng độ glucoza máu là thấp hơn nồng độ glucoza máu của những người bình thường, và nói chung, chỉ trạng thái khi nồng độ glucoza máu là 50 mg/dl hoặc nhỏ hơn. Chứng giảm glucoza máu thường được gây ra khi một người dùng chất làm giảm glucoza máu hoặc insulin qua đường miệng ăn ít hơn bình thường hoặc thực hiện các hoạt động hoặc tập luyện nhiều hơn bình thường. Ngoài ra, chứng giảm glucoza máu có thể xảy ra do việc sử dụng các thuốc làm giảm hàm lượng glucoza, các bệnh lý nặng, sự thiếu hụt hormone như hormone vỏ tuyến thượng thận-thận và glucagon, khối u trong tuyến tụy sản xuất insulin, hội chứng insulin tự miễn, các bệnh nhân cắt bỏ dạ dày, rối loạn chuyển hóa hydrat cacbon di truyền, v.v..

Các triệu chứng của chứng giảm glucoza máu bao gồm yếu, run, da nhợt nhạt, đổ mồ hôi lạnh, chóng mặt, kích động, lo âu, tim đập thành thịch, dạ dày rỗng, đau đầu, mệt mỏi, v.v.. Trong trường hợp chứng giảm glucoza máu dai dẳng, có thể dẫn đến chứng co giật hoặc cơn động kinh, và có thể gây ra sốc và sau đó, ngất.

Dược phẩm theo sáng chế có thể chứa chất mang, tá dược, hoặc chất pha loãng được dùng. Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "dược dụng" chỉ đặc tính là có lượng vừa đủ để biểu hiện tác dụng điều trị bệnh và không gây ra tác dụng bất lợi, và có thể dễ dàng được xác định bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này dựa trên các yếu tố đã biết trong lĩnh vực y học, như loại bệnh, tuổi, thể trọng, tình trạng sức khỏe, giới tính, tính miễn cảm với dược chất của bệnh nhân, đường dùng, cách dùng, tần suất dùng, thời gian điều trị, dược chất cần được trộn hoặc được dùng đồng thời trong kết hợp, v.v..

Dược phẩm theo sáng chế chứa peptit theo sáng chế có thể còn chứa chất mang dược dụng. Chất mang dược dụng có thể bao gồm, để dùng qua đường miệng, chất kết dính, chất trơn chảy, chất gây rã, tá dược, chất làm hòa tan, chất phân tán, chất làm ổn định, chất tạo huyền phù, chất màu, chất tạo hương vị, v.v.; để tiêm, chất đệm, chất bảo quản, chất giảm đau, chất làm hòa tan, chất đẳng trương, chất làm ổn định, v.v., mà có thể được kết hợp để dùng; và để dùng tại chỗ, cốt, tá dược, chất làm trơn chảy, chất bảo quản, v.v., mặc dù không chỉ giới hạn ở các chất đó.

Loại chế phẩm của dược phẩm theo sáng chế có thể được bào chế một cách khác nhau bằng cách kết hợp với chất mang dược dụng như đã được mô tả trên đây. Ví dụ, để dùng qua đường miệng, dược phẩm này có thể được bào chế thành viên nén, viên ngậm dẹt, viên nang, cồn thuốc, huyền phù, xirô, viên nhện, v.v.. Để tiêm, dược phẩm này có thể được bào chế thành ống đơn liều hoặc vật chứa nhiều liều. Dược phẩm này cũng có thể được bào chế thành dạng dung dịch, huyền phù, viên nén, viên nang và chế phẩm giải phóng kéo dài.

Trong khi đó, ví dụ về chất mang, tá dược, và chất pha loãng thích hợp có thể bao gồm lactoza, dextroza, sucroza, sorbitol, manitol, xylitol, erythritol, maltitol, tinh bột, gôm cây keo, alginat, gelatin, canxi phosphat, canxi silicat, xenluloza, metyl xenluloza, xenluloza vi tinh thể, polyvinylpyrrolidon, nước, metyl hydroxybenzoat, propyl hydroxybenzoate, talc, magie stearat, dầu khoáng, v.v.. Ngoài ra, dược phẩm này có thể còn chứa chất độn, chất chống đông, chất làm trơn chảy, chất làm ẩm, chất tạo hương vị, chất bảo quản, v.v..

Ngoài ra, dược phẩm theo sáng chế có thể được bào chế thành loại chế phẩm bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm viên nén, viên tròn, bột, thuốc cốm, viên nang, huyền phù, thuốc lỏng để dùng bên trong, nhũ tương, xirô, dung dịch vô trùng để tiêm, dung môi không phải nước, chế phẩm đông khô, và thuốc đặt.

Ngoài ra, dược phẩm này có thể được bào chế thành dược phẩm dạng liều đơn thích hợp đối với cơ thể của bệnh nhân, và tốt hơn là được bào chế thành chế phẩm hữu ích đối với các thuốc chứa peptit theo phương pháp điển hình được dùng trong lĩnh vực dược phẩm để dùng qua miệng hoặc ngoài đường tiêu hóa, như qua da, trong tĩnh mạch, trong cơ, trong động mạch, trong tủy sống, nội tủy mạc, trong tâm thất, trong phổi, qua da, dưới da, trong màng bụng, trong mũi, trong dạ dày, tại chỗ, dưới lưỡi, qua âm đạo, hoặc qua trực tràng, nhưng không chỉ giới hạn ở các đường đó.

Ngoài ra, peptit này có thể được sử dụng bằng cách trộn với các chất mang dược dụng khác nhau như nước muối sinh lý hoặc dung môi hữu cơ. Để làm tăng độ ổn định hoặc khả năng hấp thu, các hydrat cacbon như glucoza, sucroza, hoặc dextran; các chất chống oxy hóa như axit ascorbic hoặc glutathion; các chất tạo chelat; các protein có khối lượng phân tử thấp; hoặc các chất làm ổn định khác có thể được sử dụng.

Liều dùng và tần suất dùng được phẩm theo sáng chế được xác định bởi loại của (các) hoạt chất, cùng với các yếu tố khác nhau, như bệnh cần điều trị, đường dùng, tuổi, giới tính, và thể trọng của bệnh nhân, và mức độ nghiêm trọng của bệnh.

Tổng liều có hiệu quả của chế phẩm theo sáng chế có thể được dùng cho bệnh nhân theo liều đơn, hoặc có thể được dùng trong một khoảng thời gian dài theo nhiều liều theo quy trình điều trị phân đoạn. Trong dược phẩm theo sáng chế, hàm lượng của (các) hoạt chất có thể thay đổi tùy thuộc vào mức độ nghiêm trọng của bệnh. Cụ thể, tổng liều hàng ngày được ưu tiên sử dụng của peptit theo sáng chế có thể nằm trong khoảng 0,0001 μg đến 500 mg trên 1 kg thể trọng của bệnh nhân. Tuy nhiên, liều có hiệu quả của peptit được xác định có tính đến các yếu tố khác nhau bao gồm tuổi, thể trọng, tình trạng sức khỏe, giới tính, mức độ nghiêm trọng của bệnh, chế độ ăn, và mức độ bài tiết của bệnh nhân, ngoài đường dùng và tần suất điều trị của dược phẩm. Về vấn đề này, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể dễ dàng xác định liều có hiệu quả thích hợp đối với việc sử dụng cụ thể của dược phẩm theo sáng chế. Dược phẩm theo sáng chế không bị giới hạn đặc biệt vào dạng chế phẩm và đường dùng và chế độ dùng, miễn là nó thể hiện tác dụng theo sáng chế.

Dược phẩm theo sáng chế thể hiện thời gian hiệu lực và độ chuẩn *in vivo* tuyệt vời, và do đó, số lượng và tần suất dùng được phẩm theo sáng chế có thể được giảm một cách đáng kể.

Đặc biệt, do dược phẩm theo sáng chế chứa hoạt chất là dẫn xuất glucagon có pI được thay đổi khác với pI của glucagon nguyên thể, nó thể hiện độ hòa tan cải thiện và độ ổn định cao theo độ pH của dung dịch nhất định, và do đó, dược phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng một cách có hiệu quả trong việc bào chế sản phẩm glucagon ổn định để điều trị chứng giảm glucoza máu hoặc bệnh béo phì.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất dẫn xuất glucagon mới.

Dẫn xuất glucagon này giống như được giải thích trên đây.

Cụ thể hơn, dẫn xuất này khác biệt ở chỗ nó là peptit phân lập có trình tự axit amin có công thức chung 2 sau:

Y-Aib-QGTF-X7-SD-X10-S-X12-Y-L-X15-X16-X17-R-A-X20-X21-F-V-X24-W-L-M-N-T-X30 (công thức chung 2, SEQ ID NO: 46)

Trong công thức chung 2,

X7 là threonin, valin, hoặc xystein;

X10 là tyrosin hoặc xystein;

X12 là lysin hoặc xystein;

X15 là axit aspartic hoặc xystein;
 X16 là axit glutamic hoặc serin;
 X17 là lysin hoặc arginin;
 X20 là glutamin hoặc lysin;
 X21 là axit aspartic hoặc axit glutamic;
 X24 là valin hoặc glutamin; và
 X30 là xystein, hoặc không có mặt,

với điều kiện khi trình tự axit amin có công thức chung 2 giống với trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong các SEQ ID NO: 14, 19, 20, 25, 27, 31, và 33, thì nó có thể bị loại trừ.

Cụ thể hơn, cặp axit amin X16 và X20 của công thức chung 2 có thể là cặp lần lượt được thay thế bằng axit glutamic hoặc lysin, mà có khả năng tạo ra vòng, nhờ đó tạo ra vòng (ví dụ, vòng lactam) bằng cặp axit amin X16 và X20, nhưng không chỉ giới hạn ở cặp axit amin đó.

Ngoài ra, đầu tận cùng C của peptit có trình tự axit amin có công thức chung 2 có thể được amit hóa, nhưng không chỉ giới hạn ở trường hợp đó.

Ngoài ra, peptit này có thể là dẫn xuất glucagon có khả năng hoạt hóa thụ thể glucagon, nhưng không chỉ giới hạn ở trường hợp đó.

Cụ thể hơn, peptit này có thể có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong các SEQ ID NO: 12, 13, 15, và 36 đến 44, nhưng không chỉ giới hạn ở các pepti đó.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất polynucleotit phân lập mã hóa dẫn xuất glucagon, vector chứa polynucleotit này, và tế bào phân lập chứa polynucleotit hoặc vector này.

Dẫn xuất glucagon này giống như được giải thích trên đây.

Ngoài ra, polynucleotit phân lập mã hóa dẫn xuất glucagon bao gồm trong phạm vi của sáng chế trình tự polynucleotit có mức độ tương đồng là 75% hoặc cao hơn, cụ thể, là 85% hoặc cao hơn, cụ thể hơn, là 90% hoặc cao hơn, và cụ thể hơn nữa, là 95% hoặc cao hơn, so với trình tự tương ứng.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "mức độ tương đồng" chỉ mức độ tương tự trình tự với trình tự axit amin kiểu đại hoặc trình tự nucleotit kiểu đại, và sự so sánh mức độ tương đồng có thể được thực hiện bằng mắt thường hoặc bằng cách sử dụng chương trình so sánh có bán trên thị trường. Bằng cách sử dụng chương trình máy tính có bán trên thị trường, mức độ tương đồng giữa hai hoặc nhiều trình tự có thể được tính theo tỷ lệ phần trăm (%), và mức độ tương đồng (%) giữa các trình tự liên kế có thể được tính.

*507As được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "vector tái tổ hợp" được dùng để chỉ cấu trúc ADN bao gồm trình tự của polynucleotit mã hóa peptit đích, ví dụ, dẫn xuất glucagon, mà được liên kết hoạt động với trình tự điều hòa thích hợp để cho phép sự biểu hiện của peptit đích, ví dụ, dẫn xuất glucagon, trong tế bào vật chủ.

Trình tự điều hòa bao gồm trình tự khởi động có khả năng khởi đầu sự phiên mã, trình tự điều khiển bất kỳ để điều hòa sự phiên mã, trình tự mã hóa miền gắn kết ribosom mARN thích hợp, và trình tự điều hòa sự kết thúc phiên mã và dịch mã. Vector tái tổ hợp, sau khi được biến nạp vào trong tế bào vật chủ thích hợp, có thể được sao chép hoặc có chức năng không phụ thuộc vào hệ gen của vật chủ, hoặc có thể được hợp nhất vào chính hệ gen của vật chủ.

Vector tái tổ hợp được sử dụng trong sáng chế có thể không bị giới hạn đặc biệt miễn là vector này có thể sao chép trong tế bào vật chủ, và nó có thể được cấu trúc bằng cách sử dụng vector bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này. Ví dụ về vector thường được dùng có thể bao gồm các plasmid tự nhiên hoặc tái tổ hợp, cosmit, virus, và thể thực khuẩn. Các vector được dùng trong sáng chế có thể là vector biểu hiện bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này.

Vector tái tổ hợp được sử dụng để biến nạp tế bào vật chủ để sản xuất các dẫn xuất glucagon theo sáng chế. Ngoài ra, các tế bào biến nạp này, như một phần của sáng chế, có thể được sử dụng để khuếch đại các mảnh axit nucleic và các vector, hoặc có thể là các tế bào hoặc các dòng tế bào được nuôi cấy được dùng trong việc sản xuất tái tổ hợp các dẫn xuất glucagon theo sáng chế.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "sự biến nạp" chỉ quá trình đưa vector tái tổ hợp bao gồm polynucleotit mã hóa protein đích vào trong tế bào vật chủ, nhờ đó cho phép sự biểu hiện của protein được mã hóa bởi polynucleotit này trong tế bào vật chủ. Đối với polynucleotit được biến nạp, không có vấn đề dù nó được cài xen vào trong nhiễm sắc thể của tế bào vật chủ và nằm trên đó hoặc nằm bên ngoài nhiễm sắc thể, miễn là nó có thể được biểu hiện trong tế bào vật chủ, và cả hai trường hợp đều được bao gồm trong sáng chế.

Ngoài ra, polynucleotit bao gồm ADN và ARN mà mã hóa protein đích. Polynucleotit này có thể được cài xen ở dạng bất kỳ miễn là nó có thể được đưa vào tế bào vật chủ và được biểu hiện trong đó. Ví dụ, polynucleotit này có thể được đưa vào tế bào vật chủ ở dạng băng biểu hiện, là cấu trúc gen chứa tất cả các yếu tố thiết yếu cần thiết để tự biểu hiện. Băng biểu hiện có thể thường bao gồm trình tự khởi động được liên kết hoạt động với polynucleotit, tín hiệu kết thúc sự phiên mã, miền gắn kết ribosom, và tín hiệu kết thúc sự dịch mã. Băng biểu hiện có thể ở dạng vector biểu hiện có khả năng tự sao chép. Ngoài ra, polynucleotit này có thể được đưa vào tế bào vật chủ như vốn có và được liên kết hoạt động với trình tự thiết yếu cho sự biểu hiện của

nó trong tế bào vật chủ, nhưng không chỉ giới hạn ở trường hợp đó.

Ngoài ra, khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "được liên kết hoạt động" chỉ sự kết nối chức năng giữa trình tự khởi động, mà khởi đầu và điều phối sự phiên mã của polynucleotit mã hóa peptit đích theo sáng chế, và trình tự gen nêu trên.

Vật chủ thích hợp được dùng trong sáng chế có thể không bị giới hạn đặc biệt miễn là nó có thể biểu hiện polynucleotit theo sáng chế. Ví dụ về vật chủ thích hợp có thể bao gồm vi khuẩn thuộc giống *Escherichia* như *E. coli*; vi khuẩn thuộc giống *Bacillus* như *Bacillus subtilis*; vi khuẩn thuộc giống *Pseudomonas* như *Pseudomonas putida*; nấm men như *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, và *Schizosaccharomyces pombe*; các tế bào côn trùng như *Spodoptera frugiperda* (Sf9), và các tế bào động vật như CHO, COS, và BSC.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất thể tiếp hợp phân lập trong đó dẫn xuất glucagon và nguyên liệu tương hợp sinh học mà có khả năng làm tăng thời gian bán thải *in vivo* được liên kết với nó. Thể tiếp hợp này có thể là thể tiếp hợp có tác dụng kéo dài.

Đối với dẫn xuất glucagon, nguyên liệu tương hợp sinh học, và thành phần của thể tiếp hợp, tất cả các thành phần được mô tả trên đây được áp dụng.

Cụ thể, nguyên liệu tương hợp sinh học có thể được chọn từ nhóm bao gồm polyetylen glycol, axit béo, cholesterol, albumin và mảnh của nó, nguyên liệu gắn kết với albumin, polyme gồm các đơn vị lặp có trình tự axit amin cụ thể, kháng thể, mảnh kháng thể, nguyên liệu gắn kết với FcRn, mô liên kết *in vivo* hoặc dẫn xuất của nó, nucleotit, fibronectin, transferrin, sacarit, và polyme, nhưng không chỉ giới hạn ở các chất này.

Ngoài ra, peptit phân lập có thể được liên kết với nguyên liệu tương hợp sinh học bằng cầu nối được chọn từ nhóm bao gồm polyetylen glycol, polypropylen glycol, copolyme etylen glycol-propylen glycol, rượu polyhydric được polyoxyetyl hóa, rượu polyvinyllic, polysacarit, dextran, polyvinyl etyl ete, polyme dễ phân huỷ sinh học như axit polylactic (PLA) và axit polylactic-glycolic (PLGA), polyme lipid, chitin, axit hyaluronic, axit béo, polyme, hợp chất có khối lượng phân tử thấp, nucleotit, và kết hợp của chúng, nhưng không chỉ giới hạn ở các chất đó.

Ngoài ra, nguyên liệu tương hợp sinh học có thể là nguyên liệu gắn kết với FcRn, và peptit phân lập có thể được liên kết với nguyên liệu tương hợp sinh học bằng cầu nối peptit hoặc cầu nối không phải peptit được chọn từ nhóm bao gồm polyetylen glycol, polypropylen glycol, copolyme etylen glycol-propylen glycol, rượu polyhydric được polyoxyetyl hóa, rượu polyvinyllic, polysacarit, dextran, polyvinyl etyl ete, polyme dễ phân huỷ sinh học như axit polylactic (PLA) và axit polylactic-glycolic (PLGA), polyme lipid, chitin, axit hyaluronic, và kết hợp của chúng, nhưng không chỉ

giới hạn ở các chất đó.

Ngoài ra, nguyên liệu gắn kết với FcRn có thể là polypeptit chứa vùng Fc globulin miễn dịch, nhưng không chỉ giới hạn ở trường hợp đó.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất chế phẩm chứa dẫn xuất glucagon hoặc thể tiếp hợp phân lập.

Dẫn xuất glucagon và thể tiếp hợp phân lập là như được giải thích trên đây.

Đặc biệt, chế phẩm này có thể là dược phẩm để điều trị hoặc phòng chứng giảm glucoza máu hoặc hội chứng chuyển hóa, nhưng không chỉ giới hạn ở trường hợp đó. Dược phẩm là giống như đã được mô tả trên đây.

Ngoài ra, chế phẩm này có thể là chế phẩm chứa peptit có trình tự axit amin có công thức chung 2 sau.

Y-Aib-QGTF-X7-SD-X10-S-X12-Y-L-X15-X16-X17-R-A-X20-X21-F-V-X24-W-L-M-N-T-X30 (công thức chung 2, SEQ ID NO: 46)

Trong công thức chung 2,
 X7 là threonin, valin, hoặc xystein;
 X10 là tyrosin hoặc xystein;
 X12 là lysin hoặc xystein;
 X15 là axit aspartic hoặc xystein;
 X16 là axit glutamic hoặc serin;
 X17 là lysin hoặc arginin;
 X20 là glutamin hoặc lysin;
 X21 là axit aspartic hoặc axit glutamic;
 X24 là valin hoặc glutamin; và
 X30 là xystein hoặc không có mặt,

với điều kiện khi trình tự axit amin có công thức chung 2 giống với trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong các SEQ ID NO: 14, 19, 20, 25, 27, 31, và 33, thì nó có thể bị loại trừ.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế mô tả phương pháp phòng hoặc điều trị chứng giảm glucoza máu hoặc hội chứng chuyển hóa bao gồm việc cho đối tượng dùng chế phẩm trên.

Chế phẩm, chứng giảm glucoza máu, hội chứng chuyển hóa, phòng, và điều trị bệnh là giống như được giải thích trên đây.

Theo sáng chế, thuật ngữ "đối tượng" được dùng để chỉ đối tượng bị nghi ngờ

là có chứng giảm glucoza máu hoặc hội chứng chuyển hóa, mà có nghĩa là động vật có vú kể cả người, chuột nhắt, và vật nuôi có chứng giảm glucoza máu hoặc hội chứng chuyển hóa hoặc có nguy cơ bị chứng giảm glucoza máu hoặc hội chứng chuyển hóa. Tuy nhiên, đối tượng bất kỳ cần được điều trị bằng dẫn xuất glucagon theo sáng chế hoặc chế phẩm chứa dẫn xuất này được bao gồm và không bị giới hạn. Hơn nữa, đối tượng bị nghi ngờ là có chứng giảm glucoza máu hoặc bệnh béo phì có thể được điều trị một cách có hiệu quả bằng cách dùng được phẩm chứa dẫn xuất glucagon theo sáng chế. Chứng giảm glucoza máu và bệnh béo phì là giống như được giải thích trên đây.

Phương pháp theo sáng chế có thể bao gồm việc dùng được phẩm chứa peptit với lượng có hiệu quả được dùng. Tổng liều hằng ngày cần phải được xác định trong phạm vi đánh giá y học thích hợp bởi thầy thuốc, và được dùng một lần hoặc vài lần theo các liều chia. Về các mục đích của sáng chế, liệu có hiệu quả điều trị bệnh cụ thể cho bệnh nhân cụ thể bất kỳ tốt hơn là có thể được áp dụng khác nhau, tùy thuộc vào các yếu tố khác nhau đã biết trong lĩnh vực y học, bao gồm loại và mức độ của đáp ứng cần đạt được, chế phẩm cụ thể có chứa các chất khác thường được dùng cùng với nó hay không, tuổi, thể trọng, tình trạng sức khỏe tổng quát, giới tính và chế độ ăn của bệnh nhân, thời gian và đường dùng, mức độ bài tiết của chế phẩm, thời gian điều trị, các được chất khác được dùng kết hợp hoặc đồng thời với chế phẩm theo sáng chế, và các yếu tố tương tự đã biết trong lĩnh vực y học.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế mô tả việc sử dụng dẫn xuất glucagon hoặc thể tiếp hợp phân lập hoặc chế phẩm để bào chế thuốc (hoặc được phẩm) dùng để phòng hoặc điều trị chứng giảm glucoza máu hoặc hội chứng chuyển hóa.

Dẫn xuất glucagon, thể tiếp hợp phân lập, chế phẩm, chứng giảm glucoza máu, và hội chứng chuyển hóa là giống như được giải thích trên đây.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Dưới đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn có dựa vào các ví dụ và các ví dụ thử nghiệm sau. Tuy nhiên, các ví dụ và các ví dụ thử nghiệm sau chỉ được đưa ra nhằm mục đích minh họa, và phạm vi của sáng chế không bị giới hạn ở các ví dụ đó theo cách bất kỳ.

Ví dụ 1: Sản xuất dòng tế bào thể hiện đáp ứng AMP vòng với glucagon

PCR được thực hiện bằng cách sử dụng vùng tương ứng với khung đọc mở (Open Reading Frame - ORF) trong cADN (OriGene Technologies, Inc., USA) của gen thụ thể glucagon của người làm khuôn mẫu cùng với các đoạn mồi xuôi và ngược sau (lần lượt các SEQ ID NO: 47 và 48), mà chứa mỗi trong số các vị trí cắt giới hạn

EcoRI và *XhoI*.

Cụ thể, PCR được thực hiện trong tổng số 30 chu kỳ trong các điều kiện sau: làm biến tính ở nhiệt độ 95°C trong 60 giây, gắn mồi ở nhiệt độ 55°C trong 60 giây, và polyme hóa ở nhiệt độ 68°C trong 30 giây. Các sản phẩm PCR đã được khuếch đại được đem điện di trên gel agarosa 1,0% và dải 450 bp thu được bằng cách rửa giải.

Đoạn mồi xuôi (SEQ ID NO: 47):
5'-CAGCGACACCGACCGTCCCCCGTACTTAAGGCC-3'

Đoạn mồi ngược (SEQ ID NO: 48):
5'-CTAACCGACTCTCGGGGAAGACTGAGCTCGCC-3'

Sản phẩm PCR được tách dòng vào vector biểu hiện của tế bào động vật đã biết, x0GC/dhfr, để tạo ra vector tái tổ hợp x0GC/GCGR.

Dòng tế bào CHO DG44 được nuôi cấy trong môi trường DMEM/F12 (FBS 10%) được chuyển nạp bằng vector tái tổ hợp x0GC/GCGR bằng cách sử dụng Lipofectamine®, và được nuôi cấy trong môi trường chọn lọc chứa G418 (1 mg/ml) và metotraxat (10 nM). Các dòng tế bào vô tính đơn được chọn từ đó bằng kỹ thuật pha loãng giới hạn, và dòng tế bào thể hiện đáp ứng AMP vòng tuyệt vời với glucagon theo cách phụ thuộc nồng độ cuối cùng được chọn từ đó.

Ví dụ 2: Tổng hợp dẫn xuất glucagon

Để tạo ra các dẫn xuất glucagon có các đặc tính vật lý được cải thiện, trình tự axit amin của glucagon nguyên thể nêu trong SEQ ID NO: 1 được thay thế bằng các gốc axit amin có điện tích dương và âm, và từ đó các dẫn xuất glucagon đã được tổng hợp như được thể hiện trong bảng 1 dưới đây. Các hoạt tính *in vitro* tương đối được mô tả dưới đây được đo bằng phương pháp được mô tả trong ví dụ 4.

Bảng 1

Các trình tự axit amin của glucagon nguyên thể và các dẫn xuất glucagon

SEQ ID NO	Trình tự peptit	Sự tạo vòng	pI	Hoạt tính <i>in vitro</i> (hoạt tính tương đối so với SEQ ID NO: 1, %)
SEQ ID NO: 1	HSQGTFTSDYSKYLDLRRAQ DFVQWLMNT	-	6,8	100
SEQ ID NO: 2	HSQGTFTSDYSKYLDLDRRAQ DFVQWLMNT	-	4,56	0,6

SEQ ID NO: 3	HSQGTFTSDYSKYLDCERAQ DFVQWLMNT	-	4,66	6,1
SEQ ID NO: 4	HSQGTFTSDYSKYLDSCDAQ DFVQWLMNT	-	4,13	< 0,1
SEQ ID NO: 5	HSQGTFTSDYSKYLDSCEAQD FVQWLMNT	-	4,22	0,3
SEQ ID NO: 6	HSQGTFTSDYSKYLDSCEADD FVQWLMNT	-	4,03	< 0,1
SEQ ID NO: 7	YSQGTFTSDYSKYLDSCEADD FVQWLMNT	-	3,71	< 0,1
SEQ ID NO: 8	YXQGTFTSDYSKYLDSCDAQ DFVQWLINT	-	3,77	< 0,1
SEQ ID NO: 9	YXQGTFTSDYSKYLDSCDAQ DFVVWLINT	-	3,77	< 0,1
SEQ ID NO: 10	YXQGTFTSDYSKYLDSCDAD DFVVWLINT	-	3,66	< 0,1
SEQ ID NO: 11	YXQGTFTSDYSKYLDEKCAK EFVQWLMNT	-	4,78	4,6
SEQ ID NO: 12	YXQGTFTSDYSKYLDE <u>E</u> KRA <u>K</u> EFVQWLMNTC	vòng được tạo ra	6,20	56,3
SEQ ID NO: 13	YXQGTFTSDYSCYLDSTRRAQ DFVQWLMNT	-	4,43	5,2
SEQ ID NO: 14	YXQGTFTSDYSKYLDCKRAK EFVQWLMNT	-	8,12	18,1
SEQ ID NO: 15	YXQGTFTSDYSKYLCEKRAQ DFVVWLMNT	-	6,11	1,1
SEQ ID NO: 16	YXQGTFTSDYSKYLDCRRAQ VFVQWLMRT	-	9,11	4,2
SEQ ID NO: 17	YXQGTFTSDYSKYLDCVRAQ DFVQWLMRT	-	6,03	23,2
SEQ ID NO: 18	YXQGTFTSDYSKYLDSRRAC DFRLWLMNT	-	8,15	< 0,1
SEQ ID NO: 19	YXQGTFTSDYSKYLCE <u>E</u> KRA <u>K</u> EFVQWLMNT	vòng được tạo ra	8,12	12,1
SEQ ID NO: 20	YXQGTFTSDYSKYLDE <u>E</u> CRA <u>K</u> EFVQWLMNT	vòng được tạo ra	4,78	299,7
SEQ ID	YXQGTFTSDYSKYLDE <u>E</u> KCA <u>K</u>	vòng được tạo	4,78	57,8

NO: 21	EFVQWLMNT	ra		
SEQ ID NO: 22	YXQGTFTSDYSKYLD <u>E</u> KRCK	vòng được tạo ra	6,20	147,8
SEQ ID NO: 23	YXQGTFTSDYSKYCD <u>E</u> KRAK	vòng được tạo ra	6,20	76,8
SEQ ID NO: 24	YXQGTFTSDYSKCLD <u>E</u> KRAK	vòng được tạo ra	6,21	58,0
SEQ ID NO: 25	YXQGTFTSDYSKYLD <u>E</u> KRAK	vòng được tạo ra	8,12	46,9
SEQ ID NO: 26	WXQGTFTSDYSKYLD <u>E</u> CRAK	vòng được tạo ra	4,68	1,0
SEQ ID NO: 27	YXQGTFTSDYSKYLD <u>E</u> CRAK	vòng được tạo ra	4,68	93,6
SEQ ID NO: 28	WXQGTFTSDYSKYLD <u>E</u> CRAK	vòng được tạo ra	4,68	< 0,1
SEQ ID NO: 29	YXQGTFTSDYSKCLD <u>E</u> ERRAK	vòng được tạo ra	6,15	61,3
SEQ ID NO: 30	WXQGTFTSDYSKCLD <u>E</u> ERRAK	vòng được tạo ra	4,44	0,3
SEQ ID NO: 31	YXQGTFTSDYSKYLD <u>C</u> KRAK <u>E</u> EFVQWLMNT	vòng được tạo ra	8,12	6,3
SEQ ID NO: 32	-SQGTFTSDYSKYLD <u>E</u> CRA <u>K</u> E FVQWLMNT	vòng được tạo ra	4,78	0,7
SEQ ID NO: 33	YXQGTFTSDYSKYLD <u>S</u> RRAQ DFVQWLMNT	-	6,04	108,2
SEQ ID NO: 34	WXQGTFTSDYSKYCD <u>E</u> ERRAK	vòng được tạo ra	6,21	0,2
SEQ ID NO: 35	YXQGTFTSDYSKYCD <u>E</u> ERRAK	vòng được tạo ra	6,2	17,7
SEQ ID NO: 36	YXQGTFTSDCSKYLD <u>E</u> ERRAK	vòng được tạo ra	6,21	9,9
SEQ ID NO: 37	YXQGTFTSDYSKYLD <u>E</u> ERRAK	vòng được tạo ra	6,21	225,5
SEQ ID NO: 38	YXQGTFCSDYSKYLD <u>E</u> ERRAK	vòng được tạo ra	6,15	167,3
SEQ ID NO: 39	YXQGTFTVSDCSKYLD <u>E</u> ERRAK	vòng được tạo ra	6,15	3,7

SEQ ID NO: 40	YXQGTFSVSDYSKYLDERRAK DFVQWLMNTC	vòng được tạo ra	6,15	40,8
SEQ ID NO: 41	YXQGTFCSDYSKYLDERRAK DFVQWLMNT	vòng được tạo ra	6,03	45,2
SEQ ID NO: 42	YXQGTFCSDYSKYLDSRRAQ DFVQWLMNT	-	6,03	37,9
SEQ ID NO: 43	YXQGTFTSDCSKYLDSRRAQ DFVQWLMNT	-	6,03	1,6
SEQ ID NO: 44	YXQGTFTSDYSKYLDSRRAQ DFVQWLMNTC	-	6,21	75,4

Trong các trình tự axit amin được mô tả trong bảng 1, axit amin được biểu thị bởi X là axit amin không nguyên thể, axit aminoisobutyric (Aib), các gốc axit amin được gạch chân biểu thị sự tạo ra vòng, và "-" trong trình tự axit amin biểu thị rằng không có gốc axit amin nào có mặt ở vị trí tương ứng.

Ví dụ 3: Đo pI của các dẫn xuất glucagon

Để đo các đặc tính vật lý được cải thiện của các dẫn xuất glucagon tổng hợp được trong ví dụ 2, các trị số pI được tính dựa trên các trình tự axit amin bằng cách sử dụng công cụ pI/Mw (http://expasy.org/tools/pi_tool.html; Gasteiger *et al.*, 2003) trong máy chủ ExPASy.

Như được thể hiện trong bảng 1 trên đây, trong khi glucagon nguyên thể có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1 có pI là 6,8, thì một số dẫn xuất glucagon theo sáng chế có các trị số pI nằm trong khoảng từ 4 đến 6. Do các dẫn xuất glucagon theo sáng chế có các trị số pI thấp hơn hoặc cao hơn so với trị số pI của glucagon nguyên thể, chúng có thể thể hiện độ hòa tan cải thiện và độ ổn định cao hơn trong điều kiện độ pH trung tính so với glucagon nguyên thể.

Do đó, khi các dẫn xuất glucagon theo sáng chế được sử dụng làm chất trị liệu để điều trị chứng giảm glucoza máu, chúng có thể cải thiện sự tuân thủ của bệnh nhân, và còn thích hợp để dùng kết hợp với các chất chống béo phì hoặc các chất chống đái tháo đường khác, và vì vậy, các dẫn xuất glucagon theo sáng chế có thể được sử dụng một cách có hiệu quả làm chất trị liệu để điều trị chứng giảm glucoza máu và các hội chứng chuyển hóa bao gồm bệnh béo phì, bệnh đái tháo đường, bệnh viêm gan nhiễm mỡ không do rượu (NASH), rối loạn lipid máu, và bệnh mạch vành tim.

Ví dụ 4: Đo hoạt tính AMP vòng của các dẫn xuất glucagon

Các hoạt tính của các dẫn xuất glucagon tổng hợp được trong ví dụ 2 được đo trong các dòng tế bào có các thụ thể glucagon của người sản xuất được trong ví dụ 1.

Cụ thể, dòng tế bào đã được chuyển nạp được cấy truyền 3 đến 4 lần một tuần, được chia phần phân ước vào đĩa 384 lỗ với lượng 6×10^3 dòng tế bào/lỗ, và được nuôi cấy trong 24 giờ. Glucagon nguyên thể và các dẫn xuất glucagon được tạo huyền phù trong chất đệm là dung dịch muối cân bằng của Hank (Hank's balanced salt solution - HBSS) chứa 0,5 mM 3-isobutyl-1-metyl-xantin (IBMX), 0,1% albumin huyết thanh bò (bovine serum albumin - BSA), và 5 mM axit 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazin-ethanesulfonic (HEPES) với các tế bào của môi trường nuôi cấy, ở các nồng độ lần lượt là 200 nM và 1600 nM, rồi được pha loãng 4 lần liên tục trong 10 lần, được áp dụng kit thử nghiệm AMP vòng (LANCER cAMP 384 kit, PerkinElmer), và được bổ sung vào các tế bào được nuôi cấy, và trị số huỳnh quang của chúng được đo. Khi đo, trị số huỳnh quang cao nhất được thiết đặt ở 100% và sau đó, các trị số EC_{50} của dẫn xuất glucagon lần lượt được tính dựa trên trị số EC_{50} và so sánh với trị số EC_{50} của glucagon nguyên thể. Các kết quả được thể hiện trong bảng 1 trên đây.

Ví dụ 5: Tạo thể tiếp hợp bao gồm dẫn xuất glucagon và Fc globulin miễn dịch (thể tiếp hợp SEQ ID NO: 12 hoặc 20-vùng Fc globulin miễn dịch)

Để PEG hóa PEG 10kDa có nhóm maleimide và nhóm aldehyde lần lượt ở cả hai đầu (có tên là "maleimide-PEG-aldehyde", 10 kDa, NOF, Nhật Bản) vào trong gốc cysteine của dẫn xuất glucagon (các SEQ ID NO: 12 và 20), các dẫn xuất glucagon và maleimide-PEG-aldehyde được cho phản ứng ở tỷ lệ mol 1 : 1 đến 5, ở nồng độ protein nằm trong khoảng từ 3 mg/ml đến 10 mg/ml ở nhiệt độ thấp trong 1 đến 3 giờ. Đặc biệt, phản ứng này được thực hiện trong môi trường trong đó 20% đến 60% isopropanol được bổ sung vào. Khi hoàn tất phản ứng, các chất phản ứng được đưa vào SP sepharose HP (GE healthcare, USA) để tinh chế các dẫn xuất glucagon được PEG hóa một lần trên cysteine.

Sau đó, các dẫn xuất glucagon được PEG hóa một lần đã được tinh chế và Fc globulin miễn dịch được cho phản ứng ở tỷ lệ mol 1 : 2 đến 10, ở nồng độ protein nằm trong khoảng từ 10 mg/ml đến 50 mg/ml ở nhiệt độ 4°C đến 8°C trong 12 giờ đến 18 giờ. Phản ứng này được thực hiện trong môi trường trong đó natri xyanoborohydride ($NaCNBH_3$) và 10% đến 20% isopropanol được bổ sung vào 100mM dung dịch đệm canxi phosphate (độ pH=6,0). Khi hoàn tất phản ứng, các chất phản ứng được đưa vào cột tinh chế Butyl sepharose FF (GE healthcare, USA) và cột tinh chế Source ISO (GE healthcare, USA) để tinh chế thể tiếp hợp bao gồm các dẫn xuất glucagon và Fc globulin miễn dịch.

Sau khi tạo ra được, độ tinh khiết được phân tích bằng sắc ký pha đảo, sắc ký loại cỡ, và sắc ký trao đổi ion được thể hiện là 95% hoặc cao hơn.

Cụ thể, thể tiếp hợp trong đó dẫn xuất glucagon có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 12 và Fc globulin miễn dịch được liên kết bằng PEG có tên là "thể tiếp hợp bao gồm dẫn xuất glucagon có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 12 và Fc globulin miễn dịch" hoặc "dẫn xuất có tác dụng kéo dài có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 12", và chúng có thể được sử dụng thay thế nhau trong bản mô tả này.

Cụ thể, thể tiếp hợp trong đó dẫn xuất glucagon có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 20 và Fc globulin miễn dịch được liên kết bằng PEG có tên là "thể tiếp hợp bao gồm dẫn xuất glucagon có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 20 và Fc globulin miễn dịch" hoặc "dẫn xuất có tác dụng kéo dài có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 20", và chúng có thể được sử dụng thay thế nhau trong bản mô tả này.

Ví dụ 6: Tạo thể tiếp hợp bao gồm dẫn xuất exendin-4 và Fc globulin miễn dịch

PEG 3,4 kDa có nhóm propionaldehyt ở cả hai đầu, tức là 3.4k PropionALD (2) PEG, được cho phản ứng với Lys của CA exendin-4 bằng cách sử dụng imidazo-axetyl exendin-4 trong đó nguyên tử cacbon alpha của histidin đầu tận cùng N được loại bỏ (CA exendin-4, AP, USA), và sau đó, việc ghép cặp được thực hiện dựa trên đỉnh chất đồng phân ở phần cuối cùng (Lys27) giữa hai đỉnh Lys, mà có tính phản ứng khá và được phân biệt rõ với chất đồng phân đầu tận cùng N.

Peptit và Fc globulin miễn dịch được cho phản ứng ở tỷ lệ mol là 1 : 8, ở nồng độ protein toàn phần là 60 mg/ml ở nhiệt độ 4°C trong 20 giờ. Chất phản ứng là 100 mM K-P (độ pH=6,0) và 20 mM SCB, chất khử, được bổ sung vào. Các chất phản ứng ghép cặp được tinh chế bằng cách cho đi qua hai cột tinh chế. Thứ nhất, một lượng lớn Fc globulin miễn dịch không tham gia vào phản ứng ghép cặp được loại bỏ bằng cách sử dụng SOURCE Q (XK-16mL, Amersham Biosciences). Khi dùng gradien của muối bằng cách sử dụng NaCl 1 M ở 20 mM Tris (độ pH=7,5) dẫn đến sự rửa giải ngay lập tức của Fc globulin miễn dịch, mà có ái lực gắn kết tương đối yếu, ngay tiếp theo là sự rửa giải của exendin-4-Fc globulin miễn dịch. Fc globulin miễn dịch được loại bỏ đến mức độ nào đó bằng cách tinh chế sơ bộ, tuy nhiên, sự tách hoàn toàn không đạt được bằng cột trao đổi ion vì sự chênh lệch nhỏ về ái lực gắn kết giữa Fc globulin miễn dịch và exendin-4-Fc globulin miễn dịch. Do đó, sự tinh chế thứ cấp được thực hiện bằng cách sử dụng tính kỵ nước của hai vật liệu khác nhau. Mẫu, mà đi qua quá trình tinh chế sơ bộ, được gắn kết với SOURCE ISO (HR16 ml, Amersham Biosciences) bằng cách sử dụng 20 mM Tris (độ pH=7,5) và 1,5 M amoni sulfat, và sau đó, được rửa giải trong khi nồng độ của amoni sulfat giảm dần. Kết quả là, Fc globulin miễn dịch, mà có ái lực gắn kết yếu đối với cột HIC, được rửa giải trước, tiếp theo rửa giải mẫu exendin-4-Fc globulin miễn dịch, mà có ái lực gắn kết mạnh, vào phần sau. Việc tách được thực hiện dễ dàng hơn so với cột trao đổi ion do sự chênh lệch lớn hơn về tính kỵ nước.

Cột: SOURCE Q (XK 16 ml, Amersham Biosciences)

Tốc độ dòng: 2,0 ml/phút

Gradient: A0 → 25% 70 phút B (A: 20 mM Tris, độ pH=7,5, B: A + 1 M NaCl)

Cột: SOURCE ISO (HR 16 ml, Amersham Biosciences)

Tốc độ dòng: 7,0 ml/phút

Gradient: B 100 → 0% 60 phút B [A: 20 mM Tris (độ pH=7,5), B: A + 1,5 M amoni sulfat ((NH₄)₂SO₄)]

Thể tiếp hợp được tạo ra từ đó, trong đó dẫn xuất exendin-4 và vùng Fc globulin miễn dịch được liên kết bằng PEG, có tên là "dẫn xuất exendin-4 có tác dụng kéo dài". Ngoài ra, thuật ngữ này có thể được sử dụng thay thế cho "dẫn xuất exendin có tác dụng kéo dài" theo sáng chế.

Ví dụ thử nghiệm 1: Tác dụng làm giảm thể trọng ở chuột cống bị bệnh béo phì do chế độ ăn có lượng chất béo cao gây ra

Trong thử nghiệm này, chuột cống bị bệnh béo phì do chế độ ăn có lượng chất béo cao gây ra, mà được sử dụng rộng rãi làm mô hình bệnh béo phì trên động vật, được sử dụng. Thể trọng của chuột cống trước khi dùng là khoảng 600 g. Chuột cống được nhốt riêng trong khi thử nghiệm và được cho tiếp cận với nước *tùy thích*. Việc chiếu sáng không được cung cấp trong thời gian từ 6 AM đến 6 PM.

Các nhóm thử nghiệm được cho ăn chế độ ăn có lượng chất béo cao bao gồm: Nhóm 1, với tá dược (mỗi 3 ngày tiêm một lần) - nhóm đối chứng; nhóm 2, dẫn xuất exendin có tác dụng kéo dài của ví dụ 6 ở 3,3 nmol/kg (mỗi 3 ngày tiêm một lần); nhóm 3, dẫn xuất có tác dụng kéo dài của trình tự nêu trong SEQ ID NO: 12 ở 1,6 nmol/kg (mỗi 3 ngày tiêm một lần); nhóm 4, dẫn xuất có tác dụng kéo dài của trình tự nêu trong SEQ ID NO: 12 ở 3,3 nmol/kg (mỗi 3 ngày tiêm một lần); nhóm 5, dẫn xuất có tác dụng kéo dài của trình tự nêu trong SEQ ID NO: 12 ở 6,6 nmol/kg (mỗi 3 ngày tiêm một lần); nhóm 6, dẫn xuất exendin có tác dụng kéo dài của ví dụ 6 ở 3,3 nmol/kg + dẫn xuất có tác dụng kéo dài của trình tự nêu trong SEQ ID NO: 12 ở 1,6 nmol/kg (lần lượt mỗi 3 ngày tiêm một lần); nhóm 7, dẫn xuất exendin có tác dụng kéo dài của ví dụ 6 ở 3,3 nmol/kg + dẫn xuất có tác dụng kéo dài của trình tự nêu trong SEQ ID NO: 12 ở 3,3 nmol/kg (lần lượt mỗi 3 ngày tiêm một lần); nhóm 8, dẫn xuất exendin có tác dụng kéo dài của ví dụ 6 ở 3,3 nmol/kg + dẫn xuất có tác dụng kéo dài của trình tự nêu trong SEQ ID NO: 12 ở 6,6 nmol/kg (lần lượt mỗi 3 ngày tiêm một lần); nhóm 9, ăn theo cặp với nhóm 4; và nhóm 10, ăn theo cặp với nhóm 7. Thử nghiệm được kết thúc vào ngày 15, và các thay đổi về thể trọng của chuột cống

trong mỗi nhóm được đo ở các khoảng cách 3 ngày trong suốt quá trình thử nghiệm. Khi kết thúc thử nghiệm, lượng chất béo trong mạc treo ruột và khối lượng gan được đo bằng cách mổ xác để khám nghiệm. Phân tích thống kê được thực hiện để so sánh giữa nhóm tá dược (nhóm đối chứng) và các nhóm thử nghiệm bằng ANOVA 1 chiều.

Kết quả của phép đo mức độ thay đổi về thể trọng, như có thể được xác nhận trên Fig. 1, các nhóm được dùng mỗi dẫn xuất exendin có tác dụng kéo dài hoặc dẫn xuất có tác dụng kéo dài của trình tự nêu trong SEQ ID NO: 12 riêng rẽ cho thấy mức độ giảm thể trọng xuống -8% và -7% đến -22%, so với thể trọng trước khi dùng, còn trong các nhóm có dùng kết hợp dẫn xuất exendin có tác dụng kéo dài và dẫn xuất có tác dụng kéo dài của trình tự nêu trong SEQ ID NO: 12, thì tác dụng làm giảm thể trọng được cải thiện hơn từ -22% đến -35%.

Ngoài ra, khi tác dụng làm giảm thể trọng trong nhóm được dùng dẫn xuất có tác dụng kéo dài của trình tự nêu trong SEQ ID NO: 12 riêng rẽ và nhóm được dùng kết hợp của dẫn xuất exendin có tác dụng kéo dài và dẫn xuất có tác dụng kéo dài của trình tự nêu trong SEQ ID NO: 12 được so sánh lần lượt với tác dụng làm giảm thể trọng của nhóm ăn theo cặp, mức độ chênh lệch lần lượt là khoảng -11% và khoảng -17% được biểu thị, do đó, xác nhận rằng tác dụng làm giảm thể trọng được thể hiện khi được dùng dẫn xuất glucagon riêng rẽ hoặc dùng kết hợp, nhờ tác động chứ không phải việc nạp thức ăn.

Tức là xác nhận rằng dẫn xuất glucagon có tác dụng kéo dài theo sáng chế có thể đóng vai trò bổ sung trong việc làm giảm thể trọng ngoài tác dụng gây biếng ăn.

Ngoài ra, kết quả của phép đo lượng chất béo trong mạc treo ruột và khối lượng gan, như có thể được xác nhận trên các Fig. 2 và 3, việc dùng kết hợp dẫn xuất exendin có tác dụng kéo dài và dẫn xuất có tác dụng kéo dài của trình tự nêu trong SEQ ID NO: 12 cho thấy sự giảm đáng kể chất béo trong cơ thể và còn giảm khối lượng của gan so với lượng chất béo và khối lượng gan của nhóm được dùng tá dược. Cụ thể, sự tăng/giảm khối lượng của gan nói chung gây ra do sự tăng/giảm chất béo có mặt trong gan, và tác dụng làm giảm khối lượng gan nêu trên cho thấy tác dụng làm giảm chất béo trong gan. Do đó, mức độ giảm chất béo trong gan có thể được đo dưới dạng phương pháp đánh giá tác dụng điều trị bệnh của hội chứng chuyển hóa như bệnh béo phì, bệnh đái tháo đường, bệnh viêm gan nhiễm mỡ không do rượu, v.v..

Ví dụ thử nghiệm 2: Tác dụng làm giảm thể trọng ở chuột nhắt bị bệnh béo phì do chế độ ăn có lượng chất béo cao gây ra

Trong thử nghiệm này, chuột nhắt bị bệnh béo phì do chế độ ăn có lượng chất béo cao gây ra, mà được sử dụng rộng rãi làm mô hình bệnh béo phì trên động vật,

được sử dụng. Thể trọng của chuột nhất trước khi dùng là khoảng 55 g. Chuột nhất được nhốt 7 con mỗi nhóm trong khi thử nghiệm và được cho tiếp cận với nước *tùy thích*. Việc chiếu sáng không được cung cấp trong thời gian từ 6 AM đến 6 PM.

Các nhóm thử nghiệm được cho ăn chế độ ăn có lượng chất béo cao bao gồm: Nhóm 1, với tá dược (mỗi 2 ngày tiêm một lần) - nhóm đối chứng; nhóm 2, dẫn xuất exendin có tác dụng kéo dài của ví dụ 6 ở 4,3 nmol/kg (mỗi 2 ngày tiêm một lần); nhóm 3, dẫn xuất có tác dụng kéo dài của trình tự nêu trong SEQ ID NO: 20 ở 4,4 nmol/kg (mỗi 2 ngày tiêm một lần); nhóm 4, dẫn xuất có tác dụng kéo dài của trình tự nêu trong SEQ ID NO: 20 ở 8,8 nmol/kg (mỗi 2 ngày tiêm một lần); nhóm 5, dẫn xuất exendin có tác dụng kéo dài của ví dụ 6 ở 4,3 nmol/kg + dẫn xuất có tác dụng kéo dài của trình tự nêu trong SEQ ID NO: 20 ở 4,4 nmol/kg (mỗi 2 ngày tiêm một lần); nhóm 6, dẫn xuất exendin có tác dụng kéo dài của ví dụ 6 ở 2,1 nmol/kg + dẫn xuất có tác dụng kéo dài của trình tự nêu trong SEQ ID NO: 20 ở 6,6 nmol/kg (mỗi 2 ngày tiêm một lần); và nhóm 7, dẫn xuất exendin có tác dụng kéo dài của ví dụ 6 ở 0,8 nmol/kg + dẫn xuất có tác dụng kéo dài của trình tự nêu trong SEQ ID NO: 20 ở 8,0 nmol/kg (mỗi 2 ngày tiêm một lần). Thử nghiệm được kết thúc vào ngày 22, và các thay đổi về thể trọng của chuột nhất trong mỗi nhóm được đo ở các khoảng cách 2 ngày trong suốt quá trình thử nghiệm. Khi kết thúc thử nghiệm, khối lượng của gan chuột được đo bằng cách mổ xác để khám nghiệm.

Kết quả của phép đo mức độ thay đổi về thể trọng, như có thể được xác nhận trên Fig. 4, mỗi nhóm trong số các nhóm được dùng dẫn xuất có tác dụng kéo dài của trình tự nêu trong SEQ ID NO: 20 (8,8 nmol/kg, mỗi 2 ngày tiêm một lần) riêng rẽ cho thấy mức độ giảm thể trọng lần lượt xuống -25% và -29%, so với thể trọng trước khi dùng. Ngoài ra, tác dụng làm giảm thể trọng được thể hiện là tăng hơn nữa khi được dùng kết hợp với dẫn xuất exendin có tác dụng kéo dài. Cũng được xác nhận rằng việc dùng kết hợp giữa dẫn xuất exendin có tác dụng kéo dài và dẫn xuất có tác dụng kéo dài của trình tự nêu trong SEQ ID NO: 20 với tỷ lệ là 1:1, 1:3, và 1:10 còn làm tăng hơn nữa tác dụng làm giảm thể trọng xuống -50% hoặc cao hơn. Ngoài ra, tác dụng làm giảm thể trọng theo tỷ lệ giữa dẫn xuất exendin có tác dụng kéo dài và dẫn xuất có tác dụng kéo dài của trình tự nêu trong SEQ ID NO: 20 là không đáng kể, tuy nhiên, tác dụng gây biếng ăn trở nên cao hơn cùng với sự tăng tỷ lệ phần trăm của dẫn xuất exendin có tác dụng kéo dài, do đó, xác nhận rằng dẫn xuất glucagon có tác dụng kéo dài theo sáng chế có thể đóng vai trò bổ sung trong việc làm giảm thể trọng ngoài tác dụng gây biếng ăn.

Ngoài ra, kết quả của phép đo cholesterol toàn phần trong máu, như có thể được xác nhận trên Fig. 5, mỗi nhóm trong số các nhóm được dùng dẫn xuất exendin có tác dụng kéo dài (4,4 nmol/kg, mỗi 2 ngày tiêm một lần) và dẫn xuất có tác dụng kéo dài của trình tự nêu trong SEQ ID NO: 20 (8,8 nmol/kg, mỗi 2 ngày tiêm một lần)

cho thấy mức độ giảm cholesterol lần lượt xuống -35% và -71%. Từ bàn luận trên, xác nhận rằng dẫn xuất glucagon có tác dụng kéo dài theo sáng chế có thể đóng vai trò bổ sung trong việc làm giảm cholesterol máu ngoài tác dụng gây biếng ăn. Phân tích thống kê được thực hiện để so sánh giữa nhóm tá dược (nhóm đối chứng) và các nhóm thử nghiệm bằng ANOVA 1 chiều.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này cần phải nhận thấy rằng sáng chế có thể được thực hiện ở các dạng cụ thể khác mà không vượt quá các dấu hiệu cơ bản của nó. Các phương án được mô tả cần phải được xem xét theo tất cả các khía cạnh như minh họa và không giới hạn phạm vi của sáng chế. Do đó, phạm vi của sáng chế được biểu thị bởi yêu cầu bảo hộ kèm theo chứ không phải bởi phần mô tả trên đây. Tất cả các thay đổi nằm trong phạm vi của các phương án tương đương của yêu cầu bảo hộ đều nằm trong phạm vi của sáng chế.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Peptit phân lập bao gồm trình tự axit amin có Công thức chung 2 sau:

(Công thức chung 2, SEQ ID NO: 46)

Y-Aib-QGTF-X7-SD-X10-S-X12-Y-L-X15-X16-X17-R-A-X20-X21-F-V-X24-W-L-M-N-T-X30

trong đó,

X7 là threonin, valin, hoặc xystein;

X10 là tyrosin hoặc xystein;

X12 là lysin hoặc xystein;

X15 là axit aspartic hoặc xystein;

X16 là axit glutamic hoặc serin;

X17 là lysin hoặc arginin;

X20 là glutamin hoặc lysin;

X21 là axit aspartic hoặc axit glutamic;

X24 là valin hoặc glutamin; và

X30 là xystein hoặc không có mặt,

với điều kiện khi peptit của trình tự axit amin nêu trên SEQ ID NO: 12 bị loại trừ.

2. Peptit theo điểm 1, trong đó, cặp axit amin X16 và X20 lần lượt là axit glutamic và lysin, mà có khả năng tạo ra vòng.

3. Peptit theo điểm 1, trong đó đầu tận cùng C của peptit này được amit hóa.

4. Peptit theo điểm 1, trong đó peptit là dẫn xuất glucagon có khả năng hoạt hóa thụ thể glucagon.

5. Peptit theo điểm 1, trong đó peptit bao gồm trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 13, 15, 19, 33, và 36 đến 44.

6. Thử tiếp hợp phân lập, trong đó peptit phân lập theo điểm 1 và nguyên liệu tương hợp sinh học có khả năng làm tăng thời gian bán thải *in vivo* được liên kết với nó.

7. Thử tiếp hợp phân lập theo điểm 6, trong đó nguyên liệu tương hợp sinh học được

chọn từ nhóm bao gồm polyetylen glycol, axit béo, cholesterol, albumin và mảnh của nó, nguyên liệu gắn kết với albumin, polyme gồm các đơn vị lặp lại có trình tự axit amin cụ thể, kháng thể, mảnh kháng thể, nguyên liệu FcRn-binding, mô liên kết *in vivo* hoặc dẫn xuất của nó, nucleotit, fibronectin, transferin, và polysaccarit.

8. Thẻ tiếp hợp phân lập theo điểm 6, trong đó peptit được liên kết với nguyên liệu tương hợp sinh học bằng cầu nối được chọn từ nhóm bao gồm polyetylen glycol, polypropylen glycol, copolyme etylen glycol-propylen glycol, polyol được polyoxyetyl hóa, rượu polyvinyllic, polysaccarit, polyvinyl etyl ete, axit polylactic (PLA), axit polylactic-glycolic (PLGA), lipid polyme, chitin, axit hyaluronic, axit béo, nucleotit, và kết hợp của chúng.

9. Thẻ tiếp hợp phân lập theo điểm 6, trong đó nguyên liệu tương hợp sinh học là nguyên liệu FcRn-binding, và peptit phân lập được liên kết với nguyên liệu tương hợp sinh học bằng cầu nối peptit hoặc cầu nối không phải peptit được chọn từ nhóm bao gồm polyetylen glycol, polypropylen glycol, copolyme etylen glycol-propylen glycol, polyol được polyoxyetyl hóa, rượu polyvinyllic, polysaccarit, polyvinyl etyl ete, axit polylactic (PLA), axit polylactic-glycolic (PLGA), lipid polyme, chitin, axit hyaluronic, và kết hợp của chúng.

10. Thẻ tiếp hợp phân lập theo điểm 9, trong đó nguyên liệu FcRn-binding là polypeptit bao gồm vùng Fc globulin miễn dịch.

11. Chế phẩm bao gồm (i) peptit phân lập theo điểm 1 hoặc (ii) thẻ tiếp hợp phân lập trong đó peptit phân lập theo điểm 1 được liên kết với nguyên liệu tương hợp sinh học có khả năng làm tăng thời gian bán thải *in vivo*.

12. Chế phẩm theo điểm 11, trong đó chế phẩm này là dược phẩm bao gồm chất mang dược dụng.

13. Dược phẩm bao gồm:

(i-a) peptit phân lập theo điểm 1 hoặc (i-b) thẻ tiếp hợp phân lập trong đó peptit phân lập theo điểm 1 được liên kết với nguyên liệu tương hợp sinh học có khả năng làm tăng thời gian bán thải *in vivo*; và

(ii) ít nhất một hợp chất hoặc nguyên liệu có hoạt tính trị liệu đối với hội chứng

chuyển hóa.

14. Dược phẩm theo điểm 13, trong đó peptit phân lập bao gồm trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 13, 15, 19, 33, và 36 đến 44.

15. Dược phẩm theo điểm 13, trong đó (ii) hợp chất hoặc nguyên liệu có hoạt tính trị liệu đối với hội chứng chuyển hóa được chọn từ nhóm bao gồm peptit kích thích insulin, chất chủ vận thụ thể peptit giống glucagon-1 (GLP-1), chất chủ vận thụ thể leptin, chất ức chế dipeptidyl peptidaza-IV (DPP-IV), chất đối kháng thụ thể Y5, chất đối kháng thụ thể hormon tập trung melanin (melanin-concentrating hormone - MCH), chất chủ vận thụ thể Y2/4, chất chủ vận thụ thể melanocortin 3/4 (MC 3/4), chất ức chế lipaza dạ dày/tụy, chất chủ vận của thụ thể 5-hydroxytryptamin 2C (5-hydroxytryptamine 2C - 5HT2C), chất chủ vận thụ thể β 3A, chất chủ vận thụ thể amylin, chất đối kháng ghrelin, chất đối kháng thụ thể ghrelin, chất chủ vận thụ thể alpha được hoạt hóa bởi chất tăng sinh thể peroxi (peroxisome proliferator-activated receptor alpha - PPAR α), chất chủ vận thụ thể delta được hoạt hóa bởi chất tăng sinh thể peroxi (peroxisome proliferator-activated receptor delta - PPAR δ), chất chủ vận thụ thể Farnesoid X (Farnesoid X receptor - FXR), chất ức chế axetyl-CoA carboxylaza, peptit YY, cholecystokinin (CCK), xenin, glicentin, obestatin, secretin, nesfatin, insulin, và peptit kích thích insulin phụ thuộc glucoza (glucose-dependent insulinotropic peptide - GIP).

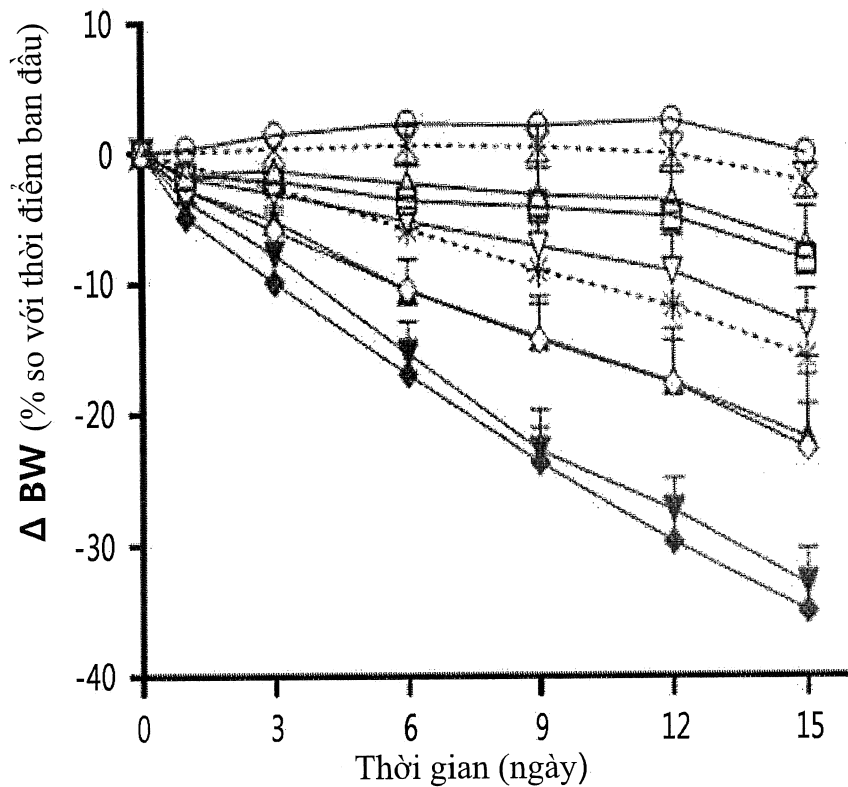
16. Dược phẩm theo điểm 15, trong đó peptit kích thích insulin này được chọn từ nhóm bao gồm GLP-1, exendin-3, exendin-4, chất chủ vận của chúng, dẫn xuất của chúng, mảnh của chúng, biến thể của chúng, và kết hợp của chúng.

17. Dược phẩm theo điểm 16, trong đó peptit kích thích insulin này là dẫn xuất peptit kích thích insulin trong đó gốc histidin đầu tận cùng N của peptit kích thích insulin này được thay thế bằng gốc được chọn từ nhóm bao gồm desamino-histidyl, N-dimetyl-histidyl, β -hydroxy imidazopropionyl, 4-imidazoaxetyl, và β -carboxy imidazopropionyl.

18. Dược phẩm theo điểm 16, trong đó peptit kích thích insulin được chọn từ nhóm bao gồm exendin-4 nguyên thể; dẫn xuất exendin-4 trong đó nhóm amin đầu tận cùng

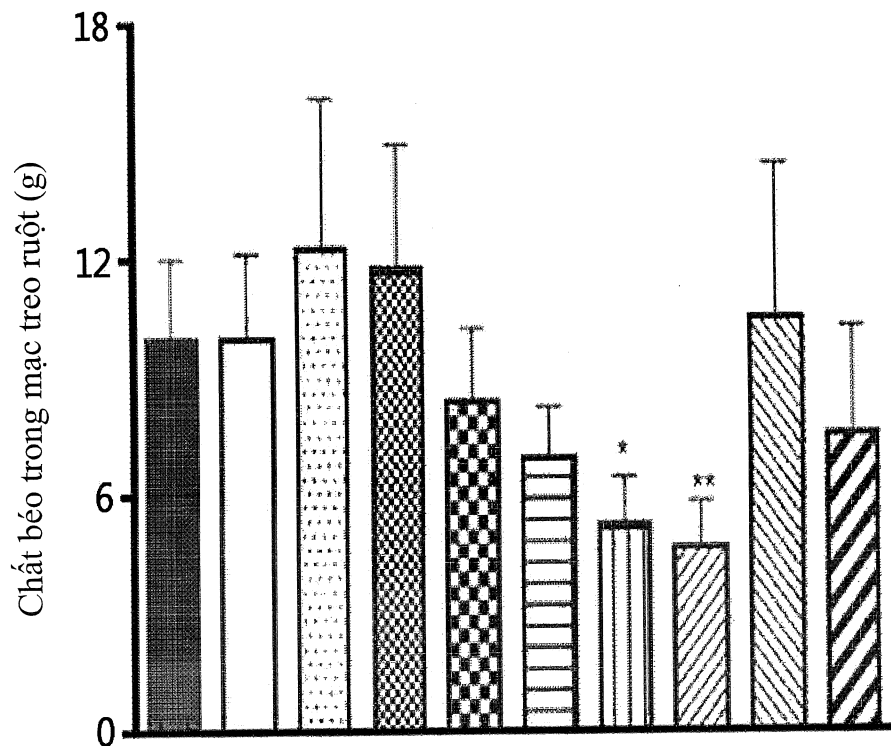
N của exendin-4 được loại bỏ; dẫn xuất exendin-4 trong đó nhóm amin đầu tận cùng N của exendin-4 được thay thế bằng nhóm hydroxyl; dẫn xuất exendin-4 trong đó nhóm amin đầu tận cùng N của exendin-4 được cải biến bằng nhóm dimetyl; dẫn xuất exendin-4 trong đó nguyên tử cacbon α của axit amin thứ nhất của exendin-4, histidin, được loại bỏ; dẫn xuất exendin-4 trong đó axit amin thứ 12 của exendin-4, lysin, được thay thế bằng serin, và dẫn xuất exendin-4 trong đó axit amin thứ 12 của exendin-4, lysin, được thay thế bằng arginin.

【Fig. 1】



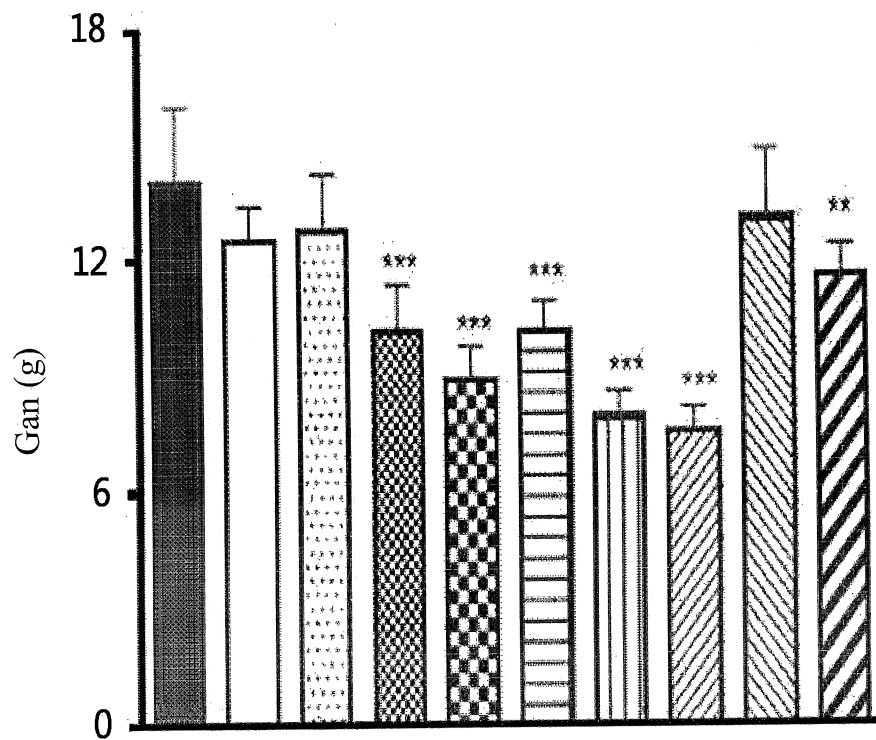
- tá dược
- dẫn xuất exendin-4 có tác dụng kéo dài (3,3 nmol/kg)
- △ dẫn xuất có tác dụng kéo dài của trình tự nêu trong SEQ ID NO: 12 (1,6 nmol/kg)
- ▽ dẫn xuất có tác dụng kéo dài của trình tự nêu trong SEQ ID NO: 12 (3,3 nmol/kg)
- ◇ dẫn xuất có tác dụng kéo dài của trình tự nêu trong SEQ ID NO: 12 (6,6 nmol/kg)
- ▲ dẫn xuất exendin-4 có tác dụng kéo dài (3,3 nmol/kg) +
dẫn xuất có tác dụng kéo dài của trình tự nêu trong SEQ ID NO: 12 (1,6 nmol/kg)
- ▼ dẫn xuất exendin-4 có tác dụng kéo dài (3,3 nmol/kg) +
dẫn xuất có tác dụng kéo dài của trình tự nêu trong SEQ ID NO: 12 (3,3 nmol/kg)
- ◆ dẫn xuất exendin-4 có tác dụng kéo dài (3,3 nmol/kg) +
dẫn xuất có tác dụng kéo dài của trình tự nêu trong SEQ ID NO: 12 (6,6 nmol/kg)
- ✕ ăn theo cặp (với dẫn xuất có tác dụng kéo dài của trình tự nêu trong SEQ ID NO: 12 (3,3 nmol/kg)
- ✱ ăn theo cặp (với dẫn xuất exendin-4 có tác dụng kéo dài (3,3 nmol/kg) +
dẫn xuất có tác dụng kéo dài của trình tự nêu trong SEQ ID NO: 12 (3,3 nmol/kg)

【Fig. 2】



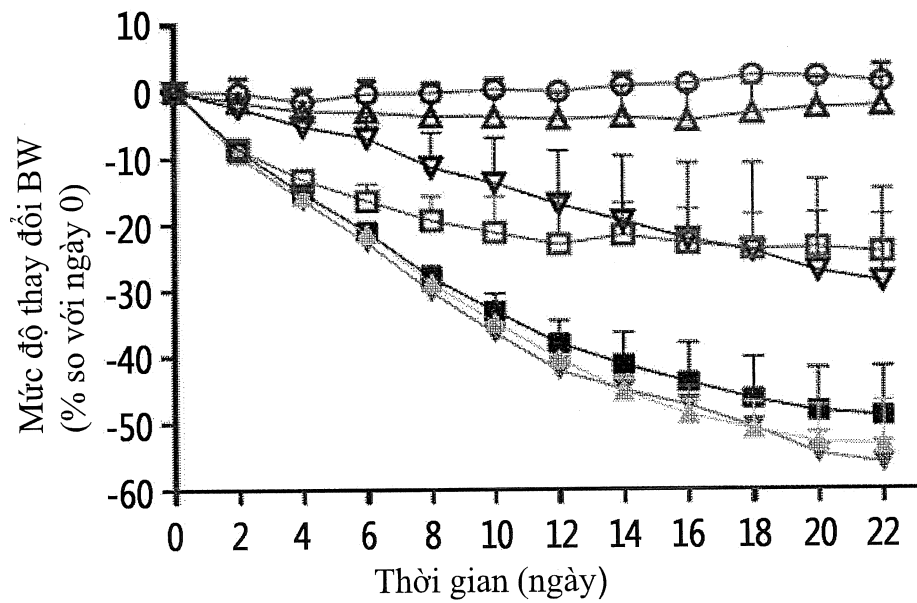
-  tá dược
-  dẫn xuất exendin-4 có tác dụng kéo dài (3,3 nmol/kg)
-  dẫn xuất có tác dụng kéo dài của trình tự nêu trong SEQ ID NO: 12 (1,6 nmol/kg)
-  dẫn xuất có tác dụng kéo dài của trình tự nêu trong SEQ ID NO: 12 (3,3 nmol/kg)
-  dẫn xuất có tác dụng kéo dài của trình tự nêu trong SEQ ID NO: 12 (6,6 nmol/kg)
-  dẫn xuất exendin-4 có tác dụng kéo dài (3,3 nmol/kg) +
dẫn xuất có tác dụng kéo dài của trình tự nêu trong SEQ ID NO: 12 (1,6 nmol/kg)
-  dẫn xuất exendin-4 có tác dụng kéo dài (3,3 nmol/kg) +
dẫn xuất có tác dụng kéo dài của trình tự nêu trong SEQ ID NO: 12 (3,3 nmol/kg)
-  dẫn xuất exendin-4 có tác dụng kéo dài (3,3 nmol/kg) +
dẫn xuất có tác dụng kéo dài của trình tự nêu trong SEQ ID NO: 12 (6,6 nmol/kg)
-  ăn theo cặp (với dẫn xuất có tác dụng kéo dài của trình tự nêu trong SEQ ID NO: 12 (3,3 nmol/kg))
-  ăn theo cặp (với dẫn xuất exendin-4 có tác dụng kéo dài (3,3 nmol/kg) +
dẫn xuất có tác dụng kéo dài của trình tự nêu trong SEQ ID NO: 12 (3,3 nmol/kg))

【Fig. 3】



- tá dược
- dẫn xuất exendin-4 có tác dụng kéo dài (3,3 nmol/kg)
- ▨ dẫn xuất có tác dụng kéo dài của trình tự nêu trong SEQ ID NO: 12 (1,6 nmol/kg)
- ▩ dẫn xuất có tác dụng kéo dài của trình tự nêu trong SEQ ID NO: 12 (3,3 nmol/kg)
- ▧ dẫn xuất có tác dụng kéo dài của trình tự nêu trong SEQ ID NO: 12 (6,6 nmol/kg)
- ▦ dẫn xuất exendin-4 có tác dụng kéo dài (3,3 nmol/kg) +
dẫn xuất có tác dụng kéo dài của trình tự nêu trong SEQ ID NO: 12 (1,6 nmol/kg)
- ▤ dẫn xuất exendin-4 có tác dụng kéo dài (3,3 nmol/kg) +
dẫn xuất có tác dụng kéo dài của trình tự nêu trong SEQ ID NO: 12 (3,3 nmol/kg)
- ▥ dẫn xuất exendin-4 có tác dụng kéo dài (3,3 nmol/kg) +
dẫn xuất có tác dụng kéo dài của trình tự nêu trong SEQ ID NO: 12 (6,6 nmol/kg)
- ▧ ăn theo cặp (với dẫn xuất có tác dụng kéo dài của trình tự nêu trong SEQ ID NO: 12 (3,3 nmol/kg))
- ▨ ăn theo cặp (với dẫn xuất exendin-4 có tác dụng kéo dài (3,3 nmol/kg) +
dẫn xuất có tác dụng kéo dài của trình tự nêu trong SEQ ID NO: 12 (3,3 nmol/kg))

【Fig. 4】



○ tá dược

□ dẫn xuất exendin-4 có tác dụng kéo dài (4,3 nmol/kg)

△ dẫn xuất có tác dụng kéo dài của trình tự nêu trong SEQ ID NO: 20 (4,4 nmol/kg)

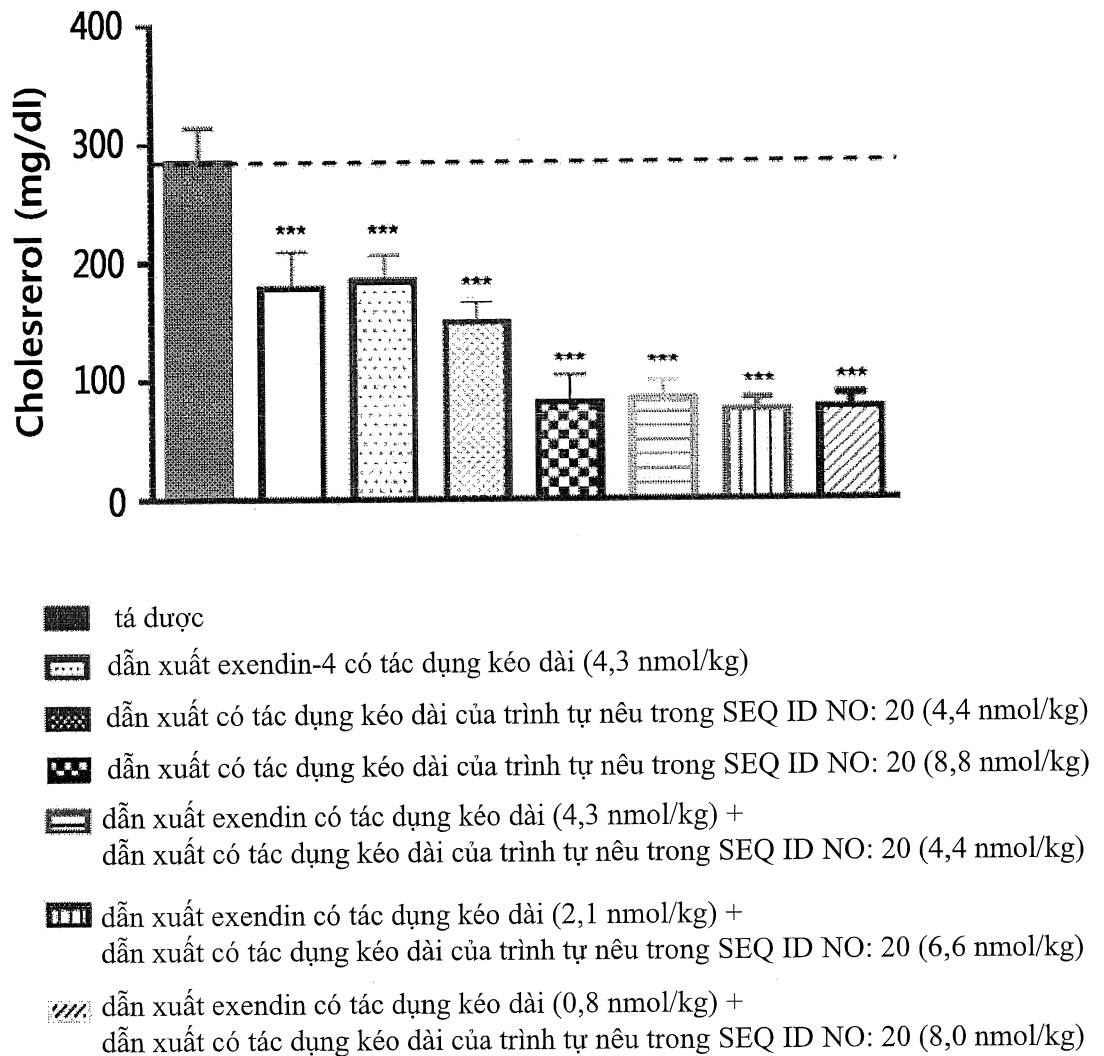
▽ dẫn xuất có tác dụng kéo dài của trình tự nêu trong SEQ ID NO: 20 (8,8 nmol/kg)

* dẫn xuất exendin có tác dụng kéo dài (4,3 nmol/kg) +
dẫn xuất có tác dụng kéo dài của trình tự nêu trong SEQ ID NO: 20 (4,4 nmol/kg)

▼ dẫn xuất exendin có tác dụng kéo dài (2,1 nmol/kg) +
dẫn xuất có tác dụng kéo dài của trình tự nêu trong SEQ ID NO: 20 (6,6 nmol/kg)

■ dẫn xuất exendin có tác dụng kéo dài (0,8 nmol/kg) +
dẫn xuất có tác dụng kéo dài của trình tự nêu trong SEQ ID NO: 20 (8,0 nmol/kg)

【Fig. 5】



DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> HANMI PHARM. CO., LTD.

<120> PEPTIT LÀ DẪN XUẤT GLUCAGON VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA THỂ TIẾP HỢP CÓ TÁC DỤNG KÉO DÀI CỦA NÓ

<130> OPA16104

<150> KR 10-2015-0093265

<151> 2015-06-30

<160> 48

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 29

<212> PRT

<213> homo sapiens

<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
		20					25					

<210> 2

<211> 29

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> dẫn xuất glucagon

<400> 2

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

Asp	Arg	Ala	Gln	Asp	Phe	Val	Gln	Trp	Leu	Met	Asn	Thr
		20					25					

<210> 3

<211> 29

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> dẫn xuất glucagon

<400> 3

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

Glu	Arg	Ala	Gln	Asp	Phe	Val	Gln	Trp	Leu	Met	Asn	Thr
			20				25					

<210> 4

<211> 29

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> dẫn xuất glucagon

<400> 4

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

Cys	Asp	Ala	Gln	Asp	Phe	Val	Gln	Trp	Leu	Met	Asn	Thr
			20				25					

<210> 5

<211> 29

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> dẫn xuất glucagon

<400> 5

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

Cys	Glu	Ala	Gln	Asp	Phe	Val	Gln	Trp	Leu	Met	Asn	Thr
			20				25					

<210> 6

<211> 29
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> dẫn xuất glucagon

<400> 6
 His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser
 1 5 10 15

Cys Glu Ala Asp Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
 20 25

<210> 7
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> dẫn xuất glucagon

<400> 7
 Tyr Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser
 1 5 10 15

Cys Glu Ala Asp Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
 20 25

<210> 8
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> dẫn xuất glucagon

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)
 <223> Xaa là axit aminoisobutyric (Aib)

<400> 8

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

Cys Asp Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Ile Asn Thr
 20 25

<210> 9
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> dẫn xuất glucagon

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)
 <223> Xaa là axit aminoisobutyric (Aib)

<400> 9
 Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser
 1 5 10 15

Cys Asp Ala Gln Asp Phe Val Val Trp Leu Ile Asn Thr
 20 25

<210> 10
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> dẫn xuất glucagon

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)
 <223> Xaa là axit aminoisobutyric (Aib)

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

Cys Asp Ala Asp Asp Phe Val Val Trp Leu Ile Asn Thr
 20 25

<210> 11
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> dẫn xuất glucagon

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)
 <223> Xaa là axit aminoisobutyric (Aib)

<400> 11
 Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu
 1 5 10 15

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

<210> 12
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> dẫn xuất glucagon

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)
 <223> Xaa là axit aminoisobutyric (Aib)

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (16)..(20)
 <223> các axit amin ở vị trí 16 và 20 tạo ra vòng

<400> 12

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> 13
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> dẫn xuất glucagon

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)
 <223> Xaa là axit aminoisobutyric (Aib)

<400> 13
 Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Cys Tyr Leu Asp Ser
 1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
 20 25

<210> 14
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> dẫn xuất glucagon

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)
 <223> Xaa là axit aminoisobutyric (Aib)

<400> 14
 Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Cys
 1 5 10 15

Lys Arg Ala Lys Glu Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
 20 25

<210> 15
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> dẫn xuất glucagon

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)
 <223> Xaa là axit aminoisobutyric (Aib)

<400> 15
 Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Cys Glu
 1 5 10 15

Lys Arg Ala Gln Asp Phe Val Val Trp Leu Met Asn Thr
 20 25

<210> 16
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> dẫn xuất glucagon

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)
 <223> Xaa là axit aminoisobutyric (Aib)

<400> 16
 Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Cys
 1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Val Phe Val Gln Trp Leu Met Arg Thr
 20 25

<210> 17
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> dẫn xuất glucagon

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)
 <223> Xaa là axit aminoisobutyric (Aib)

<400> 17
 Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Cys
 1 5 10 15

Val Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Arg Thr
 20 25

<210> 18
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> dẫn xuất glucagon

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)
 <223> Xaa là axit aminoisobutyric (Aib)

<400> 18
 Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser
 1 5 10 15

Arg Arg Ala Cys Asp Phe Arg Leu Trp Leu Met Asn Thr
 20 25

<210> 19
 <211> 29

<212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> dẫn xuất glucagon

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)
 <223> Xaa là axit aminoisobutyric (Aib)

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (16)..(20)
 <223> các axit amin ở vị trí 16 và 20 tạo ra vòng

<400> 19
 Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Cys Glu
 1 5 10 15
 Lys Arg Ala Lys Glu Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
 20 25

<210> 20
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> dẫn xuất glucagon

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)
 <223> Xaa là axit aminoisobutyric (Aib)

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (16)..(20)
 <223> các axit amin ở vị trí 16 và 20 tạo ra vòng

<400> 20

Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu
 1 5 10 15

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

<210> 21
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> dẫn xuất glucagon

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)
 <223> Xaa là axit aminoisobutyric (Aib)

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (16)..(20)
 <223> các axit amin ở vị trí 16 và 20 tạo ra vòng

<400> 21
 Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu
 1 5 10 15

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

<210> 22
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> dẫn xuất glucagon

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)
 <223> Xaa là axit aminoisobutyric (Aib)

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (16)..(20)
 <223> các axit amin ở vị trí 16 và 20 tạo ra vòng

<400> 22
 Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu
 1 5 10 15
 Lys Arg Cys Lys Glu Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
 20 25

<210> 23
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> dẫn xuất glucagon

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)
 <223> Xaa là axit aminoisobutyric (Aib)

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (16)..(20)
 <223> các axit amin ở vị trí 16 và 20 tạo ra vòng

<400> 23
 Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Cys Asp Glu
 1 5 10 15
 Lys Arg Ala Lys Glu Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
 20 25

<210> 24
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> dẫn xuất glucagon

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2)

<223> Xaa là axit aminoisobutyric (Aib)

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (16)..(20)

<223> các axit amin ở vị trí 16 và 20 tạo ra vòng

<400> 24

Tyr	Xaa	Gln	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Tyr	Ser	Lys	Cys	Leu	Asp	Glu
1				5				10				15			

Lys	Arg	Ala	Lys	Glu	Phe	Val	Gln	Trp	Leu	Met	Asn	Thr
			20				25					

<210> 25

<211> 29

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> dẫn xuất glucagon

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2)

<223> Xaa là axit aminoisobutyric (Aib)

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (16)..(20)

<223> các axit amin ở vị trí 16 và 20 tạo ra vòng

<400> 25

Tyr	Xaa	Gln	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Tyr	Ser	Lys	Tyr	Leu	Asp	Glu
1				5				10				15			

Lys Arg Ala Lys Cys Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
 20 25

<210> 26
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> dẫn xuất glucagon

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)
 <223> Xaa là axit aminoisobutyric (Aib)

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (16)..(20)
 <223> các axit amin ở vị trí 16 và 20 tạo ra vòng

<400> 26
 Trp Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu
 1 5 10 15

Cys Arg Ala Lys Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
 20 25

<210> 27
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> dẫn xuất glucagon

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)
 <223> Xaa là axit aminoisobutyric (Aib)

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (16)..(20)
 <223> các axit amin ở vị trí 16 và 20 tạo ra vòng

<400> 27
 Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Val Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu
 1 5 10 15
 Cys Arg Ala Lys Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
 20 25

<210> 28
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> dẫn xuất glucagon

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)
 <223> Xaa là axit aminoisobutyric (Aib)

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (16)..(20)
 <223> các axit amin ở vị trí 16 và 20 tạo ra vòng

<400> 28
 Trp Xaa Gln Gly Thr Phe Val Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu
 1 5 10 15
 Cys Arg Ala Lys Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
 20 25

<210> 29
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> dẫn xuất glucagon

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2)

<223> Xaa là axit aminoisobutyric (Aib)

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (16)..(20)

<223> các axit amin ở vị trí 16 và 20 tạo ra vòng

<400> 29

Tyr	Xaa	Gln	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Tyr	Ser	Lys	Cys	Leu	Asp	Glu
1				5				10				15			

Arg	Arg	Ala	Lys	Asp	Phe	Val	Gln	Trp	Leu	Met	Asn	Thr
		20					25					

<210> 30

<211> 29

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> dẫn xuất glucagon

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2)

<223> Xaa là axit aminoisobutyric (Aib)

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (16)..(20)

<223> các axit amin ở vị trí 16 và 20 tạo ra vòng

<400> 30

Trp	Xaa	Gln	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Tyr	Ser	Lys	Cys	Leu	Asp	Glu
1				5				10				15			

Arg	Arg	Ala	Lys	Asp	Phe	Val	Gln	Trp	Leu	Met	Asn	Thr
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

20

25

<210> 31
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> dẫn xuất glucagon

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)
 <223> Xaa là axit aminoisobutyric (Aib)

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (17)..(21)
 <223> các axit amin ở vị trí 17 và 21 tạo ra vòng

<400> 31
 Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Cys
 1 5 10 15

Lys Arg Ala Lys Glu Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
 20 25

<210> 32
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> dẫn xuất glucagon

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (15)..(19)
 <223> các axit amin ở vị trí 15 và 19 tạo ra vòng

<400> 32
 Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu Cys

1 5 10 15
 Arg Ala Lys Glu Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
 20 25

<210> 33
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> dẫn xuất glucagon

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)
 <223> Xaa là axit aminoisobutyric (Aib)

<400> 33
 Tyr 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
 20 25

<210> 34
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> dẫn xuất glucagon

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)
 <223> Xaa là axit aminoisobutyric (Aib)

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (16)..(20)
 <223> các axit amin ở vị trí 16 và 20 tạo ra vòng

<400> 34

Trp Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Cys Asp Glu
 1 5 10 15

Arg Arg Ala Lys Glu Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
 20 25

<210> 35

<211> 29

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> dẫn xuất glucagon

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2)

<223> Xaa là axit aminoisobutyric (Aib)

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (16)..(20)

<223> các axit amin ở vị trí 16 và 20 tạo ra vòng

<400> 35

Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Cys Asp Glu
 1 5 10 15

Arg Arg Ala Lys Glu Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
 20 25

<210> 36

<211> 29

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> dẫn xuất glucagon

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2)
 <223> Xaa là axit aminoisobutyric (Aib)

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (16)..(20)
 <223> các axit amin ở vị trí 16 và 20 tạo ra vòng

<400> 36
 Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Cys Ser Lys Tyr Leu Asp Glu
 1 5 10 15
 Arg Arg Ala Lys Glu Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
 20 25

<210> 37
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> dẫn xuất glucagon

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)
 <223> Xaa là axit aminoisobutyric (Aib)

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (16)..(20)
 <223> các axit amin ở vị trí 16 và 20 tạo ra vòng

<400> 37
 Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu
 1 5 10 15
 Arg Arg Ala Lys Glu Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr Cys
 20 25 30

<210> 38
 <211> 29

<212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> dẫn xuất glucagon

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)
 <223> Xaa là axit aminoisobutyric (Aib)

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (16)..(20)
 <223> các axit amin ở vị trí 16 và 20 tạo ra vòng

<400> 38
 Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Cys Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu
 1 5 10 15
 Arg Arg Ala Lys Glu Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
 20 25

<210> 39
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> dẫn xuất glucagon

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)
 <223> Xaa là axit aminoisobutyric (Aib)

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (16)..(20)
 <223> các axit amin ở vị trí 16 và 20 tạo ra vòng

<400> 39

Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Val Ser Asp Cys Ser Lys Tyr Leu Asp Glu
 1 5 10 15

Arg Arg Ala Lys Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
 20 25

<210> 40
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> dẫn xuất glucagon

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)
 <223> Xaa là axit aminoisobutyric (Aib)

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (16)..(20)
 <223> các axit amin ở vị trí 16 và 20 tạo ra vòng

<400> 40
 Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Val Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu
 1 5 10 15

Arg Arg Ala Lys Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr Cys
 20 25 30

<210> 41
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> dẫn xuất glucagon

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)
 <223> Xaa là axit aminoisobutyric (Aib)

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (16)..(20)
 <223> các axit amin ở vị trí 16 và 20 tạo ra vòng

<400> 41
 Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Cys Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu
 1 5 10 15
 Arg Arg Ala Lys Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
 20 25

<210> 42
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> dẫn xuất glucagon

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)
 <223> Xaa là axit aminoisobutyric (Aib)

<400> 42
 Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Cys Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser
 1 5 10 15
 Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
 20 25

<210> 43
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> dẫn xuất glucagon

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2)

<223> Xaa là axit aminoisobutyric (Aib)

<400> 43

Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Cys Ser Lys Tyr Leu Asp Ser
1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
20 25

<210> 44

<211> 30

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> dẫn xuất glucagon

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2)

<223> Xaa là axit aminoisobutyric (Aib)

<400> 44

Tyr 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 Cys
20 25 30

<210> 45

<211> 30

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> dẫn xuất glucagon

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)

<223> Xaa là histidin, desamino-histidyl, N-dimetyl-histidyl,

beta-hydroxy imidazopropionyl, 4-imidazoaxetyl, beta-carboxy imidazopropionyl, tryptophan, hoặc tyrosin, hoặc không có mặt

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2)

<223> Xaa là axit alpha-metyl-glutamic, axit aminoisobutyric (Aib), D-alanin, glyxin, Sar (N-metylglyxin), serin, hoặc D-serin

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (7)

<223> Xaa là threonin, valin, hoặc xystein

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (10)

<223> Xaa là tyrosin hoặc xystein

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (12)

<223> Xaa là lysin hoặc xystein

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (13)

<223> Xaa là tyrosin hoặc xystein

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (14)

<223> Xaa là leuxin hoặc xystein

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (15)

<223> Xaa là axit aspartic, axit glutamic, hoặc xystein

<220>

<221> MISC_FEATURE

- <222> (16)
 <223> Xaa là axit glutamic, axit aspartic, serin, axit alpha-metyl-glutamic, hoặc xystein, hoặc không có mặt;
- <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (17)
 <223> Xaa là axit aspartic, glutamin, axit glutamic, lysin, arginin, serin, xystein, hoặc valin, hoặc không có mặt
- <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (18)
 <223> Xaa là alanin, axit aspartic, axit glutamic, arginin, valin, hoặc xystein, hoặc không có mặt
- <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (19)
 <223> Xaa là alanin, arginin, serin, valin, hoặc xystein, hoặc không có mặt
- <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (20)
 <223> Xaa là lysin, histidin, glutamin, axit aspartic, lysin, arginin, axit alpha-metyl-glutamic, hoặc xystein, hoặc không có mặt
- <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (21)
 <223> Xaa là axit aspartic, axit glutamic, leuxin, valin, hoặc xystein, hoặc không có mặt
- <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (23)
 <223> Xaa là isoleuxin, valin, hoặc arginin, hoặc không có mặt
- <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (24)
 <223> Xaa là valin, arginin, alanin, xystein, axit glutamic, lysin, glutamin, axit alpha-metyl-glutamic, hoặc leuxin, hoặc không có

mặt;

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (27)

<223> Xaa là isoleuxin, valin, alanin, lysin, metionin, glutamin, hoặc arginin, hoặc không có mặt

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (28)

<223> Xaa là glutamin, lysin, asparagin, hoặc arginin, hoặc không có mặt

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (29)

<223> Xaa là lysin, alanin, glyxin, hoặc threonin, hoặc không có mặt

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (30)

<223> Xaa là xystein, hoặc không có mặt

<400> 45

Xaa Xaa Gln Gly Thr Phe Xaa Ser Asp Xaa Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Phe Xaa Xaa Trp Leu Xaa Xaa Xaa Xaa
20 25 30

<210> 46

<211> 30

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> dẫn xuất glucagon

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2)

<223> Xaa là axit aminoisobutyric (Aib)

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)
<223> Xaa là threonin, valin, hoặc xystein

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (10)
<223> Xaa là tyrosin hoặc xystein

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (12)
<223> Xaa là lysin hoặc xystein

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (15)
<223> Xaa là axit aspartic hoặc xystein

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (16)
<223> Xaa là axit glutamic hoặc serin

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (17)
<223> Xaa là lysin hoặc arginin

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (20)
<223> Xaa là glutamin hoặc lysin

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (21)
<223> Xaa là axit aspartic hoặc axit glutamic

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (24)

<223> Xaa là valin hoặc glutamin

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (30)

<223> Xaa là xystein hoặc không có mặt

<400> 46

Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Xaa Ser Asp Xaa Ser Xaa Tyr Leu Xaa Xaa
 1 5 10 15

Xaa Arg Ala Xaa Xaa Phe Val Xaa Trp Leu Met Asn Thr Xaa
 20 25 30

<210> 47

<211> 34

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi xuôi

<400> 47

cagcgacacc gaccgtcccc ccgtacttaa ggcc

34

<210> 48

<211> 32

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi ngược

<400> 48

ctaaccgact ctcggggaag actgagctcg cc

32