



(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)



1-0035810

(51)<sup>7</sup>

**C07K 14/575; A61K 47/48; C07K**  
**17/00; A61K 38/26; A61P 3/04**

(13) **B**

(21) 1-2019-04546

(22) 15/06/2012

(62) 1-2013-03976

(86) PCT/KR2012/004722 15/06/2012

(87) WO2012/173422 20/12/2012

(30) 10-2011-0058852 17/06/2011 KR

(45) 25/05/2023 422

(43) 25/10/2019 379A

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

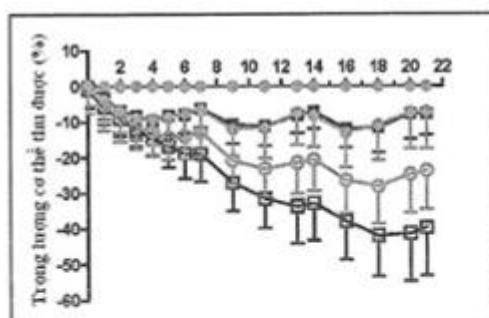
550, Dongtangiheung-ro, Dongtan-myeon, Hwaseong-si, Gyeonggi-do 445-813,  
Republic of Korea

(72) JUNG, Sung Youb (KR); KIM, Dae Jin (KR); PARK, Sung Hee (KR); WOO, Young Eun (KR); CHOI, In Young (KR); KWON, Se Chang (KR).

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

(54) THỂ TIẾP HỢP CHỨA DẪN XUẤT OXYNTOMODULIN VÀ VÙNG FC CỦA GLOBULIN MIỄN DỊCH VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA THỂ TIẾP HỢP NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến thể tiếp hợp chứa dẫn xuất oxyntomodulin chứa trình tự axit amin như nêu trong trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO.2-23, SEQ ID NO.27-31, hoặc SEQ ID NO.32-34, vùng Fc của globulin miễn dịch, và polyme không peptidyl, trong đó polyme không peptidyl liên kết cộng hóa trị dẫn xuất oxyntomodulin với vùng Fc của globulin miễn dịch, và dược phẩm chứa thể tiếp hợp này dùng để phòng ngừa hoặc điều trị chứng béo phì.



- Đối chứng
- Thể tiếp hợp chứa vùng Fc của globulin miễn dịch và dẫn xuất Oxyntomodulin 23 (0,03mg/kg)
- Thể tiếp hợp chứa vùng Fc của globulin miễn dịch và dẫn xuất Oxyntomodulin 23 (0,03mg/kg)
- Thể tiếp hợp chứa vùng Fc của globulin miễn dịch và dẫn xuất Oxyntomodulin 24 (0,03mg/kg)
- ◇— Thể tiếp hợp chứa vùng Fc của globulin miễn dịch và dẫn xuất Oxyntomodulin 24 (0,03mg/kg)

### **Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập**

Sáng chế đề cập đến thể tiếp hợp chứa oxyntomodulin và mảnh kháng thể của globulin miễn dịch. Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến thể tiếp hợp chứa oxyntomodulin, vùng Fc của globulin miễn dịch, và polyme không peptidyl, trong đó thể tiếp hợp này được bào chế bằng cách cho oxyntomodulin liên kết cộng hóa trị với vùng Fc của globulin miễn dịch thông qua polyme không peptidyl, và được phẩm chứa thể tiếp hợp này dùng để phòng ngừa hoặc điều trị chứng béo phì.

### **Tình trạng kỹ thuật của sáng chế**

Gần đây, quá trình phát triển kinh tế và thay đổi lối sống đã làm thay đổi thói quen ăn uống. Nguyên nhân chính gây thừa cân và béo phì là do xu hướng sử dụng thực phẩm giàu năng lượng như là đồ ăn nhanh và lối sống tĩnh tại. Theo Tổ chức Y tế Thế giới (World Health Organization-WHO) trên thế giới ước tính có hơn 1 tỷ người bị thừa cân và ít nhất 300 triệu người trong số đó bị béo phì. Cụ thể, do hậu quả của tình trạng thừa cân nên hàng năm có khoảng 250.000 người Châu Âu tử vong và hơn 2,5 triệu người tử vong trên toàn thế giới (World Health Organization, Global Strategy on Diet, Physical Activity and Health, 2004).

Tình trạng thừa cân và béo phì làm tăng huyết áp và nồng độ cholesterol dẫn đến làm trầm trọng hoặc tăng nguy cơ mắc các bệnh lý khác nhau như là bệnh tim mạch, đái tháo đường, và viêm khớp, và cũng là nguyên nhân chính làm tăng tỷ lệ mắc chứng xơ cứng động mạch, cao huyết áp, tăng lipit máu hoặc bệnh tim mạch ở trẻ em hoặc trẻ vị thành niên cũng như ở người lớn.

Chứng béo phì là một tình trạng sức khỏe xấu gây ra nhiều bệnh lý khác nhau trên toàn thế giới. Để khắc phục được chứng béo phì thì cần có nỗ lực của bản thân người bệnh, tuy nhiên nhiều người bệnh lại không có khả năng kiểm soát. Hơn nữa, việc điều trị chứng béo phì là hết sức khó khăn, do chứng béo phì là rối loạn phức tạp liên quan đến thói quen thèm ăn và chuyển hóa năng lượng. Để điều trị chứng béo phì, các rối loạn bất

thường liên quan đến thói quen thèm ăn và chuyển hóa năng lượng cũng cần được điều trị cùng với nỗ lực của bản thân người bệnh. Đã có nhiều cố gắng trong phát triển dược phẩm điều trị các rối loạn bất thường này. Kết quả là, các dược phẩm Rimonabant (Sanofi-Aventis), Sibutramin (Abbott), Contrave (Takeda), và Orlistat (Roche) đã được nghiên cứu phát triển, nhưng các dược phẩm này có nhược điểm là gây ra tác dụng không mong muốn nghiêm trọng và hiệu lực chống béo phì rất thấp. Cụ thể, tác dụng không mong muốn của Rimonabant (Sanofi-Aventis) đã được ghi nhận là gây rối loạn hệ thần kinh trung ương, Sibutramin (Abbott) và Contrave (Takeda) gây ra tác dụng không mong muốn đối với hệ tim mạch, và Orlistat (Roche) chỉ giảm được 4kg cân nặng khi sử dụng trong 1 năm. Thật đáng tiếc, hiện nay vẫn chưa có hoạt chất điều trị nào có thể được sử dụng để kê đơn một cách an toàn cho người bệnh bị béo phì.

Nhiều nghiên cứu đã được thực hiện để phát triển hoạt chất chống béo phì không gây tác dụng không mong muốn như dược phẩm chống béo phì thông thường. Gần đây, các dẫn xuất của glucagon đã thu hút được nhiều sự chú ý. Glucagon được sản sinh bởi tuyến tụy khi nồng độ glucoza trong máu giảm do hậu quả của việc sử dụng dược phẩm khác hoặc bệnh lý khác, sự thiếu hụt enzym hoặc hormon. Glucagon kích thích quá trình chuyển hóa glycogen ở gan, thúc đẩy giải phóng glucoza và làm tăng nồng độ glucoza trong máu đến giới hạn bình thường. Ngoài tác dụng làm tăng nồng độ glucoza trong máu, glucagon còn có tác dụng ức chế sự thèm ăn và hoạt hóa lipaza nhạy hormon (hormone-sensitive lipase-HSL) của tế bào mỡ để làm tăng chuyển hóa lipid, do đó có tác dụng chống béo phì. Một trong số các dẫn xuất của glucagon là peptit tương tự glucagon 1 (GLP-1 - glucagon like peptide-1) đã được nghiên cứu làm hoạt chất điều trị chứng tăng đường huyết cho người bệnh bị đái tháo đường, và hoạt chất này có tác dụng kích thích quá trình tổng hợp và bài tiết insulin, ức chế quá trình bài tiết glucagon, làm chậm trình trạng rỗng của dạ dày, tăng tiêu thụ glucoza, và ức chế quá trình hấp thu thức ăn. Exendin-4 được phân lập từ nọc độc của rắn có độ tương đồng về trình tự axit amin so với GLP-1 là khoảng 50% cũng được ghi nhận là có tác dụng hoạt hóa thụ thể GLP-1, do đó có tác dụng phòng ngừa chứng tăng đường huyết cho người bệnh bị đái tháo đường. Tuy nhiên, dược phẩm chống béo phì chứa GLP-1 gây ra các tác dụng không mong muốn nôn và buồn nôn.

Do đó, để thay thế GLP-1, người ta đã tập trung sự chú ý vào peptit

oxyntomodulin thu được từ tiền chất glucagon, tiền dược phẩm glucagon liên kết với các thụ thể GLP-1 và glucagon. Do có tác dụng ức chế quá trình hấp thu thức ăn tương tự GLP-1, làm tăng cảm giác no, và có hoạt tính phân hủy lipid tương tự glucagon, nên oxyntomodulin được xem là hoạt chất chống béo phì tiềm năng.

Dựa trên hoạt tính kép của peptit oxyntomodulin, hoạt chất này đã được nghiên cứu làm dược phẩm chống béo phì. Ví dụ, Patent Hàn Quốc số. 925017 đề cập đến dược phẩm chứa hoạt chất oxyntomodulin dùng để điều trị tình trạng thừa cân ở người, được sử dụng qua đường miệng, tiêm truyền, niêm mạc, trực tràng, tiêm dưới da hoặc qua da. WO2007/100535 A2 đề cập đến biến thể oxyntomodulin để điều trị bệnh béo phì.

Tuy nhiên, ngay cả khi sử dụng ở liều cao ba lần một ngày, thì dược phẩm này vẫn có thời gian bán thải *in vivo* ngắn và hiệu lực điều trị thấp. Do đó, nhiều nỗ lực đã được thực hiện để làm tăng thời gian bán thải *in vivo* hoặc hiệu lực chống béo phì của oxyntomodulin bằng cách biến đổi cấu trúc của hoạt chất này.

Cụ thể, hoạt chất chủ vận oxyntomodulin kép (Merck) được bào chế bằng cách thay thế L-serin ở vị trí số 2 của oxyntomodulin bằng D-serin để làm tăng khả năng kháng dipeptidyl peptidaza-IV (DPP-IV-dipeptidyl peptidase-IV) và gắn thêm gốc cholesterol ở đầu C để đồng thời làm tăng thời gian bán thải trong máu của oxyntomodulin. ZP2929 (Zealand) được bào chế bằng cách thay thế L-serin ở vị trí số 2 bằng D-serin để làm tăng khả năng kháng DPP-IV, thay thế arginin ở vị trí số 17 bằng alanin để làm tăng khả năng kháng proteaza, thay thế methionin ở vị trí số 27 bằng lysin để làm tăng độ ổn định oxy hóa, và thay thế glutamin ở các vị trí số 20 và 24 bằng axit aspartic và alanin và asparagin ở vị trí số 28 bằng serin để làm tăng độ ổn định khử amit hóa. Tuy nhiên, mặc dù thời gian bán thải của hoạt chất chủ vận oxyntomodulin kép này đã dài hơn thời gian bán thải của oxyntomodulin tự nhiên từ 8 đến 12 phút, nhưng trị số này vẫn rất thấp chỉ bằng 1,7 giờ và cũng phải sử dụng ở liều cao lên đến vài mg/kg. Thật đáng tiếc, do thời gian bán thải ngắn và hiệu lực thấp, nên oxyntomodulin hoặc dẫn xuất của nó vẫn có nhiều hạn chế khi phải sử dụng ở liều cao hàng ngày.

### **Bản chất kỹ thuật của sáng chế**

Các tác giả sáng chế đã thực hiện nhiều nghiên cứu để phát triển phương pháp làm

tăng thời gian bán thải trong máu của oxyntomodulin mà vẫn duy trì được hoạt tính *in vivo* của nó. Kết quả là, các tác giả sáng chế đã nghiên cứu thành công thể tiếp hợp chứa oxyntomodulin và chất mang liên kết bằng cách sử dụng polyme không peptidyl, thể tiếp hợp này có thể làm tăng thời gian bán thải trong máu của oxyntomodulin mà vẫn duy trì được hoạt tính *in vivo* của nó nên đã tạo ra tác dụng chống béo phì rất hiệu quả, và hoàn thành sáng chế này.

Theo một mục đích, sáng chế đề xuất thể tiếp hợp chứa dẫn xuất oxyntomodulin chứa trình tự axit amin như nêu trong trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO.2-23, SEQ ID NO.27-31, hoặc SEQ ID NO.32-34, vùng Fc của globulin miễn dịch, và polyme không peptidyl, trong đó polyme không peptidyl liên kết cộng hóa trị dẫn xuất oxyntomodulin với vùng Fc của globulin miễn dịch.

Theo một mục đích khác, sáng chế đề xuất được phẩm chứa thể tiếp hợp này để phòng ngừa hoặc điều trị chứng béo phì.

Khác với oxyntomodulin tự nhiên, thể tiếp hợp chứa oxyntomodulin và vùng Fc của globulin miễn dịch theo sáng chế có tác dụng làm giảm quá trình hấp thu thức ăn, ức chế tình trạng rỗng của dạ dày, và tăng chuyển hóa lipit mà không gây ra tác dụng không mong muốn, và so với oxyntomodulin thì thể tiếp hợp theo sáng chế có tác dụng hoạt hóa thụ thể mạnh hơn và độ ổn định kéo dài. Do đó, thể tiếp hợp này có thể được sử dụng để điều trị chứng béo phì với độ an toàn và hiệu quả cao. Khác với oxyntomodulin tự nhiên, peptit oxyntomodulin theo sáng chế có tác dụng làm giảm quá trình hấp thu thức ăn, ức chế tình trạng rỗng của dạ dày, và tăng chuyển hóa lipit mà không gây ra tác dụng không mong muốn, và cũng có tác dụng hoạt hóa thụ thể mạnh hơn. Do đó, peptit oxyntomodulin theo sáng chế có thể được sử dụng để điều trị chứng béo phì với độ an toàn và hiệu quả cao. Thể tiếp hợp theo sáng chế là thể tiếp hợp chứa dẫn xuất oxyntomodulin chứa trình tự axit amin như nêu trong trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO.2-23, SEQ ID NO.27-31, hoặc SEQ ID NO.32-34. Các dẫn xuất hoặc biến thể oxyntomodulin khác được bộc lộ trong bản mô tả này chỉ nhằm mục đích đối chiếu.

### **Mô tả vắn tắt các hình vẽ**

Fig.1 là biểu đồ thể hiện sự biến thiên lượng thức ăn hấp thu theo liều lượng sử

dùng oxyntomodulin hoặc dẫn xuất oxyntomodulin.

Fig.2a là đồ thị thể hiện kết quả tinh chế oxyntomodulin-mono-PEG bằng cột tinh chế SOURCE S.

Fig.2b là bản đồ peptit của oxyntomodulin-mono-PEG tinh khiết.

Fig.2c là đồ thị thể hiện kết quả tinh chế thể tiếp hợp chứa oxyntomodulin và vùng Fc của globulin miễn dịch bằng cột tinh chế SOURCE 15Q.

Fig.3a là đồ thị thể hiện kết quả tinh chế dẫn xuất oxyntomodulin-mono-PEG (SEQ ID NO.29) bằng cột tinh chế SOURCE S.

Fig.3b là đồ thị thể hiện kết quả tinh chế thể tiếp hợp chứa dẫn xuất oxyntomodulin (SEQ ID NO.29) và vùng Fc của globulin miễn dịch bằng cột tinh chế SOURCE 15Q.

Fig.4a là đồ thị thể hiện kết quả tinh chế dẫn xuất oxyntomodulin-mono-PEG (SEQ ID NO.30) bằng cột tinh chế SOURCE S.

Fig.4b là bản đồ peptit của dẫn xuất oxyntomodulin-mono-PEG tinh khiết (SEQ ID NO.30).

Fig.4c là đồ thị thể hiện kết quả tinh chế thể tiếp hợp chứa dẫn xuất oxyntomodulin (SEQ ID NO.30) và vùng Fc của globulin miễn dịch bằng cột tinh chế SOURCE 15Q.

Fig.5a là đồ thị thể hiện kết quả tinh chế dẫn xuất oxyntomodulin-mono-PEG (SEQ ID NO.31) bằng cột tinh chế SOURCE S.

Fig.5b là đồ thị thể hiện kết quả tinh chế thể tiếp hợp chứa dẫn xuất oxyntomodulin (SEQ ID NO.31) và vùng Fc của globulin miễn dịch bằng cột tinh chế SOURCE 15Q.

Fig.6a là đồ thị thể hiện kết quả tinh chế dẫn xuất oxyntomodulin-mono-PEG (SEQ ID NO.2) bằng cột tinh chế SOURCE S.

Fig.6b là bản đồ peptit của dẫn xuất oxyntomodulin-mono-PEG tinh khiết (SEQ ID NO.2).

Fig.6c là đồ thị thể hiện kết quả tinh chế thể tiếp hợp chứa dẫn xuất oxyntomodulin (SEQ ID NO.2) và vùng Fc của globulin miễn dịch bằng cột tinh chế SOURCE 15Q.

Fig.6d là đồ thị thể hiện kết quả tinh chế thể tiếp hợp chứa dẫn xuất oxyntomodulin (SEQ ID NO.2) và vùng Fc của globulin miễn dịch bằng cột tinh chế Source ISO.

Fig.7a là đồ thị thể hiện kết quả tinh chế dẫn xuất oxyntomodulin-mono-PEG (SEQ ID NO.3) bằng cột tinh chế SOURCE S.

Fig.7b là bản đồ peptit của dẫn xuất oxyntomodulin-mono-PEG tinh khiết (SEQ ID NO.3).

Fig.7c là đồ thị thể hiện kết quả tinh chế thể tiếp hợp chứa dẫn xuất oxyntomodulin (SEQ ID NO.3) và vùng Fc của globulin miễn dịch bằng cột tinh chế Butyl FF.

Fig.7d là đồ thị thể hiện kết quả tinh chế thể tiếp hợp chứa dẫn xuất oxyntomodulin (SEQ ID NO.3) và vùng Fc của globulin miễn dịch bằng cột tinh chế SOURCE 15Q.

Fig.8a là đồ thị thể hiện kết quả tinh chế dẫn xuất oxyntomodulin-mono-PEG (SEQ ID NO.23) bằng cột tinh chế SOURCE S;

Fig.8b là đồ thị thể hiện kết quả tinh chế thể tiếp hợp chứa dẫn xuất oxyntomodulin (SEQ ID NO.23) và vùng Fc của globulin miễn dịch bằng cột tinh chế SOURCE 15Q;

Fig.8c là đồ thị thể hiện kết quả tinh chế thể tiếp hợp chứa dẫn xuất oxyntomodulin (SEQ ID NO.23) và vùng Fc của globulin miễn dịch bằng cột tinh chế Source ISO;

Fig.9a là đồ thị thể hiện kết quả tinh chế dẫn xuất oxyntomodulin-mono-PEG

(SEQ ID NO.24) bằng cột tinh chế SOURCE S;

Fig.9b là đồ thị thể hiện kết quả tinh chế thể tiếp hợp chứa dẫn xuất oxyntomodulin (SEQ ID NO.24) và vùng Fc của globulin miễn dịch bằng cột tinh chế SOURCE 15Q;

Fig.9c là đồ thị thể hiện kết quả tinh chế thể tiếp hợp chứa dẫn xuất oxyntomodulin (SEQ ID NO.24) và vùng Fc của globulin miễn dịch bằng cột tinh chế Source ISO;

Fig.10a là đồ thị thể hiện kết quả tinh chế dẫn xuất oxyntomodulin-mono-PEG (SEQ ID NO.25) bằng cột tinh chế SOURCE S;

Fig.10b là đồ thị thể hiện kết quả tinh chế thể tiếp hợp chứa dẫn xuất oxyntomodulin (SEQ ID NO.25) và vùng Fc của globulin miễn dịch bằng cột tinh chế SOURCE 15Q;

Fig.10c là đồ thị thể hiện kết quả tinh chế thể tiếp hợp chứa dẫn xuất oxyntomodulin (SEQ ID NO.25) và vùng Fc của globulin miễn dịch bằng cột tinh chế Source ISO;

Fig.11a là đồ thị thể hiện kết quả tinh chế dẫn xuất oxyntomodulin-mono-PEG (SEQ ID NO.28) bằng cột tinh chế SOURCE S;

Fig.11b là đồ thị thể hiện kết quả tinh chế thể tiếp hợp chứa dẫn xuất oxyntomodulin (SEQ ID NO.28) và vùng Fc của globulin miễn dịch bằng cột tinh chế SOURCE 15Q;

Fig.11c là đồ thị thể hiện kết quả tinh chế thể tiếp hợp chứa dẫn xuất oxyntomodulin (SEQ ID NO.28) và vùng Fc của globulin miễn dịch bằng cột tinh chế Source ISO;

Fig.12 là biểu đồ thể hiện sự biến đổi về trọng lượng cơ thể của chuột theo dạng và liều lượng của các thể tiếp hợp chứa dẫn xuất oxyntomodulin (SEQ ID NO.23 và SEQ ID NO.24) và vùng Fc của globulin miễn dịch.

Fig.13 là biểu đồ thể hiện sự biến đổi về trọng lượng cơ thể của chuột theo dạng và

liều lượng của các thể tiếp hợp chứa dẫn xuất oxyntomodulin (SEQ ID NO.23 và SEQ ID NO.25) và vùng Fc của globulin miễn dịch.

### **Mô tả chi tiết sáng chế**

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất thể tiếp hợp chứa oxyntomodulin, vùng Fc của globulin miễn dịch, và polyme không peptidyl, trong đó thể tiếp hợp này được bào chế bằng cách cho oxyntomodulin liên kết cộng hóa trị với vùng Fc của globulin miễn dịch thông qua polyme không peptidyl.

Thuật ngữ “thể tiếp hợp” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ thể tiếp hợp chứa oxyntomodulin và các thành phần khác. Các thành phần khác có thể là hợp chất bất kỳ có tác dụng làm tăng độ ổn định trong máu, làm chậm quá trình thải trừ qua thận, hoặc có tác dụng hữu ích khác. Theo sáng chế, các thành phần này có thể là vùng Fc của globulin miễn dịch. Tốt hơn nếu, thể tiếp hợp theo sáng chế gồm oxyntomodulin, và vùng Fc của globulin miễn dịch, được liên kết với nhau thông qua polyme không peptidyl. Polyme không peptidyl này có thể liên kết với oxyntomodulin và vùng Fc của globulin miễn dịch bằng liên kết cộng hóa trị. Hai đầu của polyme không peptidyl này có thể liên kết tương ứng với nhóm amin hoặc nhóm thiol trên vùng Fc của globulin miễn dịch và dẫn xuất oxyntomodulin.

Thuật ngữ “thể tiếp hợp” theo sáng chế còn được sử dụng để chỉ thể tiếp hợp có hiệu lực *in vivo* cao hơn so với oxyntomodulin tự nhiên, và thể tiếp hợp có tác dụng kéo dài này có thể gồm oxyntomodulin được bào chế bằng cách biến đổi, thay thế, bổ sung, hoặc loại bỏ các trình tự axit amin của oxyntomodulin tự nhiên, oxyntomodulin được tiếp hợp với polyme có thể phân hủy sinh học như là polyetylen glycol (polyethylene glycol-PEG), oxyntomodulin được tiếp hợp với protein có tác dụng kéo dài như là albumin hoặc globulin miễn dịch, oxyntomodulin được tiếp hợp với axit béo có khả năng gắn kết với albumin trong cơ thể, hoặc oxyntomodulin được bao nang trong các hạt có kích cỡ nano có thể phân hủy sinh học, nhưng không chỉ giới hạn ở các thể tiếp hợp có tác dụng kéo dài này.

Thuật ngữ “oxyntomodulin” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ peptit thu được từ tiền chất glucagon, tiền được phẩm glucagon, và bao gồm cả oxyntomodulin tự nhiên,

tiền chất, dẫn xuất, mảnh peptit, và biến thể của nó. Tốt hơn nếu, oxyntomodulin theo sáng chế có trình tự axit amin là SEQ ID NO.1 như sau:

HSQGTFTSDYSKYLDSSRAQDFVQWLMNTKRNRNNIA

Thuật ngữ “biến thể oxyntomodulin” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ peptit chứa một hoặc nhiều trình tự axit amin khác biệt so với trình tự axit amin của oxyntomodulin tự nhiên, peptit này vẫn có chức năng hoạt hóa các thụ thể GLP-1 và thụ thể glucagon, và biến thể oxyntomodulin có thể được bào chế bằng cách thay thế, bổ sung, loại bỏ, biến đổi một phần trình tự axit amin của oxyntomodulin tự nhiên hoặc kết hợp các phương pháp này.

Thuật ngữ “dẫn xuất oxyntomodulin” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ peptit, dẫn xuất peptit hoặc peptit mô phỏng được bào chế bằng cách bổ sung, loại bỏ hoặc thay thế các axit amin của oxyntomodulin để hoạt hóa được cả thụ thể GLP-1 lẫn thụ thể glucagon ở mức độ cao hơn so với oxyntomodulin tự nhiên.

Thuật ngữ “mảnh oxyntomodulin” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ mảnh peptit chứa một hoặc nhiều axit amin ở đầu N hoặc đầu C của oxyntomodulin tự nhiên được bổ sung hoặc loại bỏ, trong đó các axit amin không có trong tự nhiên (ví dụ, D-axit amin) có thể được bổ sung, và mảnh peptit này có chức năng hoạt hóa cả thụ thể GLP-1 lẫn thụ thể glucagon. Các phương pháp điều chế biến thể, dẫn xuất, và mảnh peptit của oxyntomodulin có thể được sử dụng riêng rẽ hoặc kết hợp. Ví dụ, sáng chế bao gồm cả peptit chứa một hoặc nhiều axit amin khác biệt so với các axit amin của peptit tự nhiên và khử amin hóa gốc axit amin ở đầu N, và có chức năng hoạt hóa cả thụ thể GLP-1 lẫn thụ thể glucagon.

Các axit amin được đề cập trong bản mô tả có danh pháp viết tắt theo IUPAC-IUB như sau:

|           |   |               |   |
|-----------|---|---------------|---|
| Alanin    | A | Arginin       | R |
| Asparagin | N | Axit apartic  | D |
| Xystein   | C | Axit glutamic | E |
| Glutamin  | Q | Glyxin        | G |
| Histidin  | H | Isoleuxin     | I |
| Leuxin    | L | Lysin         | K |
| Methionin | M | Phenylalanin  | F |
| Prolin    | P | Serin         | S |

|          |   |            |   |
|----------|---|------------|---|
| Threonin | T | Tryptophan | W |
| Tyrosin  | Y | Valin      | V |

Theo sáng chế, dẫn xuất oxyntomodulin bao gồm peptit bất kỳ được bào chế bằng cách thay thế, bổ sung, loại bỏ hoặc biến đổi sau dịch mã (ví dụ, metyl hóa, axyl hóa, ubiquitin hóa, tạo liên kết cộng hóa trị nội nguyên tử) trên trình tự axit amin của oxyntomodulin (HSQGTFTSDYSKYLDSSRAQDFVQWLMNTKRNRRNNIA, SEQ ID NO.1) để đồng thời hoạt hóa cả thụ thể GLP-1 lẫn thụ thể glucagon. Khi thay thế hoặc bổ sung các axit amin, thì axit amin bất kỳ trong số 20 axit amin thông thường có trong protein của người, cũng như các axit amin không có trong tự nhiên hoặc không điển hình có thể được sử dụng. Các nhà cung cấp axit amin không điển hình bao gồm Sigma-Aldrich, ChemPep Inc., và Genzyme Pharmaceuticals. Peptit chứa các axit amin này và trình tự peptit không điển hình có thể được tổng hợp và mua từ các nhà cung cấp, ví dụ, American Peptit Company hoặc Bachem (USA) hoặc Anygen (Korea).

Theo một phương án ưu tiên, dẫn xuất oxyntomodulin theo sáng chế là peptit chứa trình tự axit amin có công thức 1.

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

(Công thức 1, SEQ ID NO.54)

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

X1 là Aib(axit aminosobutyric), d-alanin, glyxin, Sar(N-metylglyxin), serin, hoặc d-serin;

X2 là axit glutamic hoặc glutamin;

X3 là leuxin hoặc tyrosin;

X4 là serin hoặc alanin;

X5 là lysin hoặc arginin;

X6 là glutamin hoặc tyrosin;

X7 là leuxin hoặc methionin;

X8 là axit apartic hoặc axit glutamic;

X9 là axit glutamic, serin, axit alpha-metyl-glutamic hoặc được loại bỏ;

X10 là glutamin, axit glutamic, lysin, arginin, serin hoặc được loại bỏ;

X11 là alanin, arginin, valin hoặc được loại bỏ;

X12 là alanin, arginin, serin, valin hoặc được loại bỏ;

X13 là lysin, glutamin, arginin, axit alpha-metyl-glutamic hoặc được loại bỏ;

X14 là axit apartic, axit glutamic, leuxin hoặc được loại bỏ;

X15 là phenylalanin hoặc được loại bỏ;

X16 là isoleuxin, valin hoặc được loại bỏ;

X17 là alanin, xystein, axit glutamic, lysin, glutamin, axit alpha-metyl-glutamic hoặc được loại bỏ;

X18 là tryptophan hoặc được loại bỏ;

X19 là alanin, isoleuxin, leuxin, serin, valin hoặc được loại bỏ;

X20 là alanin, lysin, methionin, glutamin, arginin hoặc được loại bỏ;

X21 là asparagin hoặc được loại bỏ;

X22 là alanin, glyxin, threonin hoặc được loại bỏ;

X23 là xystein, lysin hoặc được loại bỏ;

X24 là peptit có từ 2 đến 10 axit amin chứa tổ hợp bộ ba alanin, glyxin và serin, hoặc được loại bỏ; và

R2 là KRNRNNIA (SEQ ID NO.35), GPSSGAPPPS (SEQ ID NO.36), GPSSGAPPPSK (SEQ ID NO.37), HSQGTFTSDYSKYLD (SEQ ID NO.38),

HSQGTFTSDYSRYLDK (SEQ ID NO.39), HEGTFTSDLSKQMEEEEAVK (SEQ ID NO.40) hoặc được loại bỏ (trừ khi trình tự axit amin trong công thức 1 giống với trình tự axit amin SEQ ID NO.1).

Để làm tăng hoạt tính đối với thụ thể glucagon và thụ thể GLP-1 của oxyntomodulin tự nhiên, theo sáng chế peptit nêu trên có thể được thay thế bằng 4-imidazoaxetyl khi carbon alpha của histidin ở vị trí số 1 trên trình tự axit amin SEQ ID NO.1 được loại bỏ, desamino-histidyl khi nhóm amin ở đầu N được loại bỏ, dimetyl-histidyl (N-dimetyl-histidyl) khi nhóm amin ở đầu N được biến đổi bằng hai nhóm methyl, beta-hydroxy imidazopropionyl khi nhóm amin ở đầu N được thay thế bằng nhóm hydroxyl, hoặc beta-carboxy imidazopropionyl khi nhóm amin ở đầu N được thay thế bằng nhóm carboxyl. Ngoài ra, vùng gắn kết với thụ thể GLP-1 có thể được thay thế bằng các axit amin làm tăng liên kết ion và kỵ nước hoặc tổ hợp của các liên kết này. Một phần trình tự axit amin của oxyntomodulin có thể được thay thế bằng trình tự axit amin của GLP-1 hoặc Exendin-4 để làm tăng hoạt tính đối với thụ thể GLP-1.

Hơn nữa, một phần trình tự axit amin của oxyntomodulin có thể được thay thế bằng trình tự làm ổn định cấu trúc xoắn alpha. Tốt hơn nữa, các axit amin ở vị trí số 10, 14, 16, 20, 24 và 28 trên trình tự axit amin của công thức 1 được thay thế bằng các axit amin hoặc dẫn xuất axit amin bao gồm Tyr(4-Me), Phe, Phe(4-Me), Phe(4-Cl), Phe(4-CN), Phe(4-NO<sub>2</sub>), Phe(4-NH<sub>2</sub>), Phg, Pal, Nal, Ala(2-thienyl) và Ala(benzothiienyl) có khả năng làm ổn định cấu trúc xoắn alpha, và không chỉ giới hạn ở số lượng và chủng loại axit amin hoặc dẫn xuất axit amin có tác dụng làm ổn định cấu trúc xoắn alpha được bổ sung vào. Tốt hơn nữa, các axit amin ở vị trí số 10 và 14, 12 và 16, 16 và 20, 20 và 24, và 24 và 28 cũng được thay thế tương ứng bằng axit glutamic hoặc lysin để tạo thành cấu trúc mạch vòng, và không giới hạn số lượng mạch vòng được bổ sung vào. Tốt nhất nếu, peptit oxyntomodulin theo sáng chế có trình tự axit amin được chọn từ công thức 1 đến công thức 6.

Theo một phương án ưu tiên, khi trình tự axit amin của oxyntomodulin được thay thế bằng trình tự axit amin của exendin hoặc GLP-1, thì dẫn xuất oxyntomodulin theo sáng chế là peptit chứa trình tự axit amin có công thức 2.

(Công thức 2, SEQ ID NO.55)

Theo phương án ưu tiên khác, dẫn xuất oxyntomodulin theo sáng chế là peptit chứa trình tự axit amin có công thức 3, được bào chế bằng cách cho một phần trình tự axit amin của oxyntomodulin liên kết với một phần trình tự axit amin của exendin hoặc GLP-1 thông qua môi liên kết axit amin thích hợp.

R1-B-C-R4

(Công thức 3, SEQ ID NO.56)

Theo phương án ưu tiên khác nữa, dẫn xuất oxyntomodulin theo sáng chế là peptit chứa trình tự axit amin có công thức 4, trong đó một phần trình tự axit amin của oxyntomodulin được thay thế bằng axit amin có khả năng làm tăng ái lực gắn kết với thụ thể GLP-1, ví dụ, gốc Leu ở vị trí số 26 gắn kết với thụ thể GLP-1 bằng tương tác kỵ nước được thay thế bằng gốc kỵ nước Ile hoặc Val.

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

(Công thức 4, SEQ ID NO.57)

Theo phương án ưu tiên khác nữa, dẫn xuất oxyntomodulin theo sáng chế là peptit chứa trình tự axit amin có công thức 5, trong đó một phần trình tự axit amin của oxyntomodulin được loại bỏ, bổ sung, hoặc thay thế bằng axit amin khác để làm tăng hoạt tính đối với thụ thể GLP-1 và thụ thể glucagon của oxyntomodulin tự nhiên.

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

(Công thức 5, SEQ ID NO.58)

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

A được chọn từ nhóm bao gồm SQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNT (SEQ ID NO.41), SQGTFTSDYSKYLDDEEAVRLFIEWLMNT (SEQ ID NO.42), SQGTFTSDYSKYLDERRAQDFVAWLKNT (SEQ ID NO.43), GQGTFTSDYSRYLEEEAVRLFIEWLKNG (SEQ ID NO.44), GQGTFTSDYSRQMEEEEAVRLFIEWLKNG (SEQ ID NO.45),

GEGTFTSDLSRQMEEEEAVRLFIEWAA (SEQ ID NO.46), và  
 SQGTFTSDYSRQMEEEEAVRLFIEWLMNG (SEQ ID NO.47);

B được chọn từ nhóm bao gồm SQGTFTSDYSKYLDERRAQDFVQWLMNT (SEQ ID NO.41), SQGTFTSDYSKYLDDEEAVRLFIEWLMNT (SEQ ID NO.42), SQGTFTSDYSKYLDERRAQDFVAWLKNT (SEQ ID NO.43), GQGTFTSDYSRYLEEEAVRLFIEWLKNG (SEQ ID NO.44), GQGTFTSDYSRQMEEEEAVRLFIEWLKNG (SEQ ID NO.45), GEGTFTSDLSRQMEEEEAVRLFIEWAA (SEQ ID NO.46), SQGTFTSDYSRQMEEEEAVRLFIEWLMNG (SEQ ID NO.47), GEGTFTSDLSRQMEEEEAVRLFIEW (SEQ ID NO.48), và SQGTFTSDYSRYLD (SEQ ID NO.49);

C là peptit có từ 2 đến 10 axit amin chứa tổ hợp bộ ba alanin, glyxin và serin;

D1 là serin, axit glutamic hoặc arginin;

D2 là arginin, axit glutamic hoặc serin;

D3 là arginin, alanin hoặc valin;

D4 là arginin, valin hoặc serin;

D5 là glutamin, arginin hoặc lysin;

D6 là isoleuxin, valin hoặc serin;

D7 là methionin, arginin hoặc glutamin;

D8 là threonin, glyxin hoặc alanin;

E1 là serin, axit aminosioibutyric, Sar, d-alanin hoặc d-serin;

E2 là serin hoặc axit glutamic;

E3 là arginin hoặc lysin;

E4 là glutamin hoặc lysin;

E5 là axit aspartic hoặc axit glutamic;

E6 là glutamin, cystein hoặc lysin;

E7 là cystein, lysin hoặc được loại bỏ;

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

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

R5 là KRNRNNIA (SEQ ID NO.35), GPSSGAPPPS (SEQ ID NO.36), GPSSGAPPPSK (SEQ ID NO.37) hoặc được loại bỏ (trừ khi các trình tự axit amin trong các công thức từ 2 đến 5 giống với trình tự axit amin SEQ ID NO.1).

Tốt hơn nếu, dẫn xuất oxyntomodulin theo sáng chế là peptit có công thức 6.

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

(Công thức 6, SEQ ID NO.59)

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

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

X2 là axit glutamic hoặc glutamin;

X3 là leuxin hoặc tyrosin;

X4 là serin hoặc alanin;

X5 là lysin hoặc arginin;

X6 là glutamin hoặc tyrosin;

X7 là leuxin hoặc methionin;

X8 là axit aspartic hoặc axit glutamic;

X9 là axit glutamic, axit alpha-methyl-glutamic hoặc được loại bỏ;

X10 là glutamin, axit glutamic, lysin, arginin hoặc được loại bỏ;

X11 là alanin, arginin hoặc được loại bỏ;

X12 là alanin, valin hoặc được loại bỏ;

X13 là lysin, glutamin, arginin, axit alpha-methyl-glutamic hoặc được loại bỏ;

X14 là axit aspartic, axit glutamic, leuxin hoặc được loại bỏ;

X15 là phenylalanin hoặc được loại bỏ;

X16 là isoleuxin, valin hoặc được loại bỏ;

X17 là alanin, xystein, axit glutamic, glutamin, axit alpha-methyl-glutamic hoặc được loại bỏ;

X18 là tryptophan hoặc được loại bỏ;

X19 là alanin, isoleuxin, leuxin, valin hoặc được loại bỏ;

X20 là alanin, lysin, methionin, arginin hoặc được loại bỏ;

X21 là asparagin hoặc được loại bỏ;

X22 là threonin hoặc được loại bỏ;

X23 là xystein, lysin hoặc được loại bỏ;

X24 là peptit có từ 2 đến 10 axit amin chứa glyxin hoặc được loại bỏ; và

R2 là KRNRNNIA (SEQ ID NO.35), GPSSGAPPPS (SEQ ID NO.36), GPSSGAPPPSK (SEQ ID NO.37), HSQGTFTSDYSKYLD (SEQ ID NO.38), HSQGTFTSDYSRYLDK (SEQ ID NO.39), HGEGTFTSDLSKQMEEEAVK (SEQ ID NO.40) hoặc được loại bỏ (trừ khi trình tự axit amin trong công thức 6 giống với trình tự axit amin SEQ ID NO.1)

Tốt hơn nữa nếu, dẫn xuất oxyntomodulin theo sáng chế được chọn từ nhóm bao

gồm các peptit có trình tự từ SEQ ID NO.2 đến SEQ ID NO.34. Tốt nhất nếu, dẫn xuất oxyntomodulin theo sáng chế là peptit được mô tả trong Bảng 1 của ví dụ 2-1.

Oxyntomodulin có hoạt tính của cả GLP-1 lẫn glucagon. GLP-1 có tác dụng làm giảm nồng độ glucoza trong máu, làm giảm quá trình hấp thu thức ăn, và ức chế tình trạng rỗng của dạ dày, còn glucagon có tác dụng làm tăng nồng độ glucoza trong máu, tăng chuyển hóa lipid và làm giảm trọng lượng cơ thể do làm tăng quá trình chuyển hóa năng lượng. Tác dụng sinh học khác biệt của hai peptit này có thể gây ra các tác dụng không mong muốn như làm tăng nồng độ glucoza trong máu nếu tác dụng của glucagon chiếm ưu thế hơn tác dụng của GLP-1, hoặc gây nôn và buồn nôn nếu tác dụng của GLP-1 chiếm ưu thế hơn tác dụng của glucagon. Ví dụ, thể tiếp hợp được bào chế theo Ví dụ 10 có ái lực với thụ thể GLP-1 mạnh hơn thể tiếp hợp được bào chế theo Ví dụ 12, nhưng hiệu lực của thể tiếp này thấp hơn hiệu lực của thể tiếp hợp được bào chế theo Ví dụ 12 như được thể hiện trên thử nghiệm *in vivo* trong Ví dụ 18. Điều này có thể do thể tiếp hợp theo Ví dụ 12 có hoạt tính đối với thụ thể glucagon mạnh hơn so với thụ thể GLP-1. Do đó, các dẫn xuất oxyntomodulin và thể tiếp hợp theo sáng chế không chỉ giới hạn ở các dẫn xuất có hoạt tính tăng tối đa. Ví dụ, các axit amin ở vị trí số 1 và 11 của oxyntomodulin có thể được biến đổi, để ức chế hoạt tính của glucagon, và kiểm soát tỷ lệ hoạt tính giữa glucagon và GLP-1.

Thể tiếp hợp theo sáng chế có thể làm tăng độ ổn định trong máu, làm chậm quá trình thải trừ qua thận, và biến đổi ái lực với các thụ thể bằng cách cho chất mang liên kết cộng hóa trị với oxyntomodulin hoặc tạo thành dạng vi thể. Chất mang được sử dụng để điều chế thể tiếp hợp chứa oxyntomodulin theo sáng chế có thể được chọn từ nhóm bao gồm albumin, transferin, kháng thể, mảnh kháng thể, elastin, heparin, polysacarit như kitin, fibronectin và tốt nhất nếu chất mang theo sáng chế là vùng Fc của globulin miễn dịch, tất cả các chất mang này có thể làm tăng thời gian bán thải trong máu của thể tiếp hợp khi liên kết với oxyntomodulin.

Thuật ngữ “vùng Fc của globulin miễn dịch” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ protein chứa vùng hằng định chuỗi nặng 2 (CH2) và vùng hằng định chuỗi nặng 3 (CH3) của globulin miễn dịch, và không chứa vùng biến thiên chuỗi nặng và vùng biến thiên chuỗi nhẹ, vùng hằng định chuỗi nặng 1 (CH1) và vùng hằng định chuỗi nhẹ 1 (CL1) của

globulin miễn dịch. Vùng Fc của globulin miễn dịch có thể cũng chứa vùng bản lề của vùng hằng định chuỗi nặng. Hơn nữa, vùng Fc của globulin miễn dịch theo sáng chế có thể chứa một phần hoặc toàn bộ vùng Fc bao gồm vùng hằng định chuỗi nặng 1 (CH1) và/hoặc vùng hằng định chuỗi nhẹ 1 (CL1), và không chứa vùng biến thiên chuỗi nặng và vùng biến thiên chuỗi nhẹ, để tạo ra chức năng sinh lý gần bằng hoặc mạnh hơn protein Fc tự nhiên. Hơn nữa, vùng Fc của globulin miễn dịch có thể là mảnh peptit mà phần trình tự axit amin mạch dài của CH2 và/hoặc CH3 được loại bỏ. Do đó, vùng Fc của globulin miễn dịch theo sáng chế có thể chứa 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 của một hoặc nhiều miền và vùng bản lề của globulin miễn dịch (hoặc một phần của vùng bản lề), và 6) dime của mỗi miền của vùng hằng định chuỗi nặng và vùng hằng định chuỗi nhẹ.

Vùng Fc của globulin miễn dịch theo sáng chế chứa trình tự axit amin tự nhiên, và trình tự biến thể của nó. Trình tự axit amin biến thể là trình tự khác biệt so với trình tự axit amin tự nhiên ở chỗ một hoặc nhiều gốc axit amin đã được loại bỏ, bổ sung, thay thế bảo thủ hoặc không bảo thủ hoặc tổ hợp của các phương pháp này. Ví dụ, trong vùng Fc của IgG, các gốc axit amin thiết yếu cho quá trình gắn kết là các axit amin ở vị trí số từ 214 đến 238, từ 297 đến 299, từ 318 đến 322, hoặc từ 327 đến 331, có thể được sử dụng làm đích thích hợp cho quá trình biến đổi.

Hơn nữa, các dẫn xuất khác có thể được sử dụng bao gồm dẫn xuất trong đó vùng có khả năng tạo liên kết disulfua được loại bỏ, hoặc một số gốc axit amin ở đầu N của vùng Fc tự nhiên được loại bỏ hoặc gốc methionin được bổ sung vào. Ngoài ra, để loại bỏ các chức năng hiệu ứng, thì vị trí gắn kết bổ thể có thể được loại bỏ, như là vị trí gắn kết C1q và vị trí có hoạt tính gây độc tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC-antibody dependent cell mediated cytotoxicity). Kỹ thuật để điều chế các trình tự biến thể của vùng Fc của globulin miễn dịch được bộc lộ trong WO97/34631 và WO96/32478.

Sự hoán đổi axit amin ở protein và peptit, thường không làm biến đổi hoạt tính của protein hoặc peptit này, đã được biết đến trong lĩnh vực y dược (H. Neurath, R. L. Hill, *The Proteins*, Academic Press, New York, 1979). Sự hoán đổi thường xuất hiện 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 and Asp/Gly, theo cả hai chiều. Ngoài ra, nếu muốn, vùng Fc có thể được biến đổi bằng phương pháp phosphoryl hóa, sulfat hóa, aryl hóa, glycosyl hóa, metyl hóa, farnesyl hóa, axetyl hóa, amit hóa và các phương pháp tương tự.

Dẫn xuất Fc nêu trên có hoạt tính sinh học giống như vùng Fc theo sáng chế hoặc có độ ổn định cấu trúc được cải thiện, ví dụ, kháng nhiệt, pH, hoặc các điều kiện tương tự.

Ngoài ra, các vùng Fc này có thể có nguồn gốc tự nhiên được phân lập từ cơ thể người và động vật bao gồm bò, dê, lợn, chuột, thỏ, chuột đồng, chuột cống và chuột lang, hoặc có thể ở dạng tái tổ hợp hoặc dẫn xuất của chúng, thu được từ vi sinh vật hoặc tế bào động vật đã được chuyển gen. Theo sáng chế, các vùng Fc này có thể thu được từ globulin miễn dịch tự nhiên bằng cách phân lập toàn bộ các globulin miễn dịch từ cơ thể người hoặc động vật và xử lý bằng enzym phân hủy protein. Papain phân cắt globulin miễn dịch tự nhiên này thành vùng Fab và vùng Fc, xử lý hỗn hợp này bằng pepsin sẽ thu được các mảnh pF'c và F(ab)2. Xử lý các mảnh này bằng phương pháp sắc ký loại cở để phân lập được vùng Fc hoặc pF'c. Tốt hơn nếu, vùng Fc có nguồn gốc từ người là vùng Fc của globulin miễn dịch tái tổ hợp thu được từ vi sinh vật.

Ngoài ra, vùng Fc của globulin miễn dịch theo sáng chế có thể chứa các chuỗi đường tự nhiên, số lượng các chuỗi đường có thể tăng hoặc giảm so với vùng Fc tự nhiên, hoặc có thể được khử glycosyl hóa. Có thể tăng, giảm hoặc loại bỏ các chuỗi đường ở vùng Fc của globulin miễn dịch bằng các phương pháp thông thường trong lĩnh vực này, như là phương pháp hóa học, phương pháp enzym và công nghệ di truyền bằng cách sử dụng vi sinh vật. Việc loại bỏ các chuỗi đường khỏi vùng Fc sẽ làm giảm mạnh ái lực gắn kết với phần C1q của thành phần bổ thể thứ nhất C1 và làm giảm hoặc làm mất độc tính gây độc qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể hoặc độc tính gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể, do đó không gây ra các đáp ứng miễn dịch không mong muốn *in vivo*. Liên quan đến vấn đề này, để sử dụng làm chất mang dược phẩm, tốt hơn nếu vùng Fc của globulin miễn dịch theo sáng chế là ở dạng được khử glycosyl hóa hoặc không được glycosyl hóa.

Thuật ngữ “khử glycosyl hóa” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ quá trình loại bỏ các gốc đường khỏi vùng Fc bằng phản ứng enzym, và thuật ngữ “không được glycosyl hóa” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ vùng Fc được tạo ra ở dạng không được glycosyl hóa bởi sinh vật chưa có nhân điển hình, tốt hơn nếu vi sinh vật này là *E. coli*.

Vùng Fc của globulin miễn dịch theo sáng chế có thể có nguồn gốc từ người hoặc động vật bao gồm bò, dê, lợn, chuột, thỏ, chuột đồng, chuột cống và chuột lang, và tốt hơn nếu vùng Fc của globulin miễn dịch theo sáng chế có nguồn gốc từ người.

Ngoài ra, vùng Fc của globulin miễn dịch theo sáng chế có thể là vùng Fc thu được từ IgG, IgA, IgD, IgE and IgM, hoặc được tạo ra bằng cách tiếp hợp hoặc liên hợp các vùng Fc này. Tốt hơn nếu, vùng Fc của globulin miễn dịch theo sáng chế là vùng Fc thu được từ IgG hoặc IgM, là một trong số các protein có nhiều nhất trong máu người, và tốt nhất nếu vùng Fc của globulin miễn dịch là vùng Fc thu được từ IgG, để làm tăng thời gian bán thải của protein gắn kết phối tử.

Mặt khác, thuật ngữ “tổ hợp” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ các polypeptit mã hóa vùng Fc mạch đơn của các globulin miễn dịch của cùng một loài được liên kết với peptit mạch đơn của loài khác để tạo thành dime hoặc multime. Dime hoặc multime này có thể được tạo thành từ hai hoặc nhiều mảnh kháng thể được chọn từ nhóm bao gồm các mảnh IgG Fc, IgA Fc, IgM Fc, IgD Fc, và IgE Fc.

Thuật ngữ “polyme không peptidyl” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ polyme tương thích sinh học chứa hai hoặc nhiều đơn vị lặp được liên kết với nhau bằng liên kết cộng hóa trị chứ không phải liên kết peptit. Theo sáng chế, thuật ngữ “polyme không peptidyl” và thuật ngữ “mỗi liên kết không phải dạng peptit” có thể được sử dụng thay thế cho nhau.

Polyme không peptidyl hữu ích theo sáng chế có thể được chọn từ nhóm bao gồm polyme có thể phân hủy sinh học, polyme lipid, kitin, axit hyaluronic, và hỗn hợp của chúng, và tốt hơn nếu polyme có thể phân hủy sinh học theo sáng chế là polyetylen glycol, polypropylen glycol, copolyme của etylen glycol và propylen glycol, polyoxyetylpolyol, rượu polyvinyl, polysacarit, dextran, polyvinyl etyl ete, axit

polylactic hoặc axit polylactic-glycolic, và tốt hơn nữa nếu, polyme có thể phân hủy sinh học là polyetylen glycol. Ngoài ra, các dẫn xuất polyme đã biết hoặc dễ dàng điều chế được theo phương pháp đã biết trong lĩnh vực này có thể được sử dụng trong sáng chế.

Gốc liên kết peptit được sử dụng trong protein dung hợp thu được bằng phương pháp dung hợp trong khung gen thông thường, có nhược điểm là dễ dàng bị phân cắt *in vivo* bởi enzym phân hủy protein, do đó không có tác dụng làm tăng thời gian bán thải trong huyết thanh của hoạt chất theo sáng chế như mong đợi. Tuy nhiên, theo sáng chế, polyme không peptidyl có khả năng kháng enzym phân hủy protein có thể được sử dụng để duy trì thời gian bán thải trong huyết thanh của peptit oxyntomodulin bằng với thời gian bán thải của chất mang này. Do đó, polyme không peptidyl bất kỳ có thể được sử dụng không hạn chế, miễn là polyme này có khả năng kháng enzym phân hủy protein *in vivo*. Polyme không peptidyl theo sáng chế có trọng lượng phân tử nằm trong khoảng từ 1 kDa đến 100 kDa, và tốt hơn nếu polyme này có trọng lượng phân tử nằm trong khoảng từ 1 kDa đến 20 kDa. Polyme không peptidyl theo sáng chế được liên kết với vùng Fc của globulin miễn dịch có thể là một polyme hoặc hỗn hợp của các polyme khác nhau.

Polyme không peptidyl được sử dụng theo sáng chế chứa nhóm chức phản ứng có thể liên kết với vùng Fc của globulin miễn dịch và protein được phẩm oxyntomodulin. Polyme không peptidyl theo sáng chế chứa nhóm chức phản ứng ở cả hai đầu, tốt hơn nếu các nhóm chức này được chọn từ nhóm bao gồm aldehyt, propionaldehyt, butyraldehyt, maleimit và succinimit. Nhóm chức phản ứng succinimit có thể là succinimidyl propionat, hydroxy succinimidyl, succinimidyl carboxymetyl, hoặc succinimidyl carbonat. Cụ thể, khi polyme không peptidyl chứa nhóm aldehyt ở cả hai đầu, thì polyme này liên kết đặc hiệu ở cả hai đầu với polypeptit có hoạt tính sinh lý và globulin miễn dịch bằng các phản ứng không đặc hiệu cơ bản. Sản phẩm cuối cùng được tạo ra từ quá trình alkyl hóa khử bằng liên kết aldehyt có độ ổn định cao hơn so với sản phẩm được tạo ra bởi liên kết amit. Nhóm chức phản ứng aldehyt liên kết đặc hiệu với đầu N ở pH thấp, và liên kết cộng hóa trị với gốc lysin ở pH cao, ví dụ pH = 9,0. Các nhóm chức phản ứng ở cả hai đầu của polyme không peptidyl theo sáng chế có thể giống hoặc khác nhau. Ví dụ, polyme không peptidyl theo sáng chế có thể chứa nhóm maleimit ở một đầu, và nhóm aldehyt, propionaldehyt hoặc butyraldehyt ở đầu còn lại. Khi polyetylen glycol chứa nhóm chức phản ứng hydroxy ở cả hai đầu được sử dụng làm

polyme không peptidyl, nhóm hydroxy này có thể được hoạt hóa với các nhóm chức phản ứng khác nhau bằng các phản ứng hóa học đã biết, hoặc polyetylen glycol chứa nhóm chức phản ứng đã được biến đổi có bán trên thị trường có thể được sử dụng để điều chế thể tiếp hợp có tác dụng kéo dài theo sáng chế.

Thể tiếp hợp theo sáng chế có thể chứa polyme không peptidyl có hai nhóm chức phản ứng tận cùng ở cả hai đầu được liên kết tương ứng với nhóm amin hoặc thiol của vùng Fc của globulin miễn dịch và dẫn xuất oxyntomodulin.

Polyme không peptidyl theo sáng chế chứa nhóm chức phản ứng ở cả hai đầu, tốt hơn nếu các nhóm chức này được chọn từ nhóm bao gồm aldehyt, propionaldehyt, butyraldehyt, maleimit và succinimit. Nhóm chức phản ứng succinimit có thể là succinimidyl propionat, hydroxy succinimidyl, succinimidyl carboxymetyl, hoặc succinimidyl carbonat.

Hai nhóm chức phản ứng tận cùng của polyme không peptidyl theo sáng chế có thể giống hoặc khác nhau. Ví dụ, polyme không peptidyl theo sáng chế có thể chứa nhóm maleimit ở một đầu, và nhóm aldehyt, propionaldehyt hoặc butyraldehyt ở đầu còn lại. Ví dụ, khi polyme không peptidyl chứa nhóm aldehyt ở một đầu tận cùng, và nhóm maleimit ở đầu còn lại, thì polyme này liên kết đặc hiệu ở cả hai đầu với polypeptit có hoạt tính sinh lý và globulin miễn dịch bằng các phản ứng không đặc hiệu cơ bản. Theo phần *Ví dụ thực hiện sáng chế*, các thể tiếp hợp theo sáng chế được bào chế bằng cách cho oxyntomodulin hoặc dẫn xuất của nó liên kết cộng hóa trị với vùng Fc của globulin miễn dịch bằng cách sử dụng polyme không peptidyl PEG chỉ chứa nhóm propionaldehyt hoặc chứa cả nhóm maleimit lẫn nhóm aldehyt.

So với oxyntomodulin tự nhiên, thể tiếp hợp theo sáng chế có hoạt tính đối với thụ thể GLP-1 và thụ thể glucagon mạnh hơn rất nhiều, và có thời gian bán thải trong máu dài hơn do liên kết với vùng Fc để duy trì hoạt tính *in vivo* trong thời gian dài.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất được phẩm chứa thể tiếp hợp peptit nêu trên để phòng ngừa hoặc điều trị chứng béo phì.

Thuật ngữ “phòng ngừa” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ tất cả các liệu pháp được sử dụng để làm chậm hoặc hạn chế sự xuất hiện của bệnh. Theo sáng chế, thuật ngữ

“phòng ngừa” được sử dụng để chỉ liệu pháp để làm chậm hoặc hạn chế sự xuất hiện chứng béo phì khỏi các yếu tố nguy cơ như tăng trọng lượng hoặc lượng mỡ của cơ thể bằng cách sử dụng thể tiếp hợp theo sáng chế.

Thuật ngữ “điều trị” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ tất cả các liệu pháp được sử dụng để làm giảm, cải thiện hoặc phòng ngừa các triệu chứng của bệnh. Theo sáng chế, thuật ngữ “điều trị” được sử dụng để chỉ các liệu pháp để làm giảm, cải thiện hoặc phòng ngừa các triệu chứng của chứng béo phì bằng cách sử dụng thể tiếp hợp theo sáng chế, dẫn đến làm giảm trọng lượng hoặc lượng mỡ của cơ thể.

Thuật ngữ “chứng béo phì” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ tình trạng tích tụ dư thừa lượng mô mỡ trong cơ thể, và chỉ số khối lượng cơ thể (khối lượng cơ thể (kg) chia cho bình phương chiều cao (m)) lớn hơn 25. Nguyên nhân gây chứng béo phì thường là do sự mất cân bằng năng lượng, khi năng lượng nạp vào cơ thể vượt quá năng lượng được tiêu thụ trong thời gian dài. Chứng béo phì là bệnh chuyển hóa ảnh hưởng đến toàn bộ cơ thể, và làm tăng nguy cơ mắc đái tháo đường, chứng tăng lipit máu, rối loạn chức năng tình dục, viêm khớp, bệnh tim mạch, và trong một số trường hợp còn làm tăng nguy cơ mắc ung thư.

Thể tiếp hợp theo sáng chế được bào chế bằng cách liên kết dẫn xuất oxyntomodulin chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.24, SEQ ID NO.25 và SEQ ID NO.26 với vùng Fc của globulin miễn dịch, có ái lực gắn kết với các thụ thể glucagon và thụ thể GLP-1 (Bảng 3) và khả năng kháng enzym phân hủy protein *in vivo* rất mạnh để có hoạt tính *in vivo* trong thời gian dài, do đó có tác dụng chống béo phì rất hiệu quả ví dụ làm giảm trọng lượng cơ thể (Fig.12).

Dược phẩm theo sáng chế có thể còn chứa chất mang, tá dược, hoặc tá dược pha loãng dược dụng. Thuật ngữ “dược dụng” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ thành phần bất kỳ có khả năng tạo ra tác dụng điều trị mà không gây ra tác dụng không mong muốn, và có thể dễ dàng xác định được theo bệnh cần điều trị, tuổi, cân nặng, tình trạng sức khỏe, giới tính của người bệnh, và độ miễn cảm với dược phẩm, đường đưa dược phẩm, cách dùng, tần suất sử dụng, thời gian điều trị, dược phẩm được sử dụng phối hợp hoặc đồng thời với dược phẩm theo sáng chế, và các yếu tố khác đã biết trong lĩnh vực y dược.

Dược phẩm chứa dẫn xuất oxyntomodulin theo sáng chế có thể còn chứa chất mang dược dụng. Để sử dụng qua đường miệng, chất mang dược dụng này có thể bao gồm tá dược dính, tá dược trơn, tá dược rã, tá dược, tá dược hòa tan, tá dược phân tán, tá dược ổn định, chất gây thấm ổn định, chất màu, và chất thơm nhưng không chỉ giới hạn ở các chất mang này. Để sử dụng qua đường tiêm, chất mang theo sáng chế có thể bao gồm chất đệm, chất bảo quản, chất giảm đau, tá dược hòa tan, chất làm đẳng trương, và tá dược ổn định. Để sử dụng qua đường khu trú, chất mang theo sáng chế có thể bao gồm chất nền, tá dược, tá dược trơn, và chất bảo quản.

Dược phẩm theo sáng chế có thể được bào chế thành nhiều dạng thuốc khác nhau kết hợp với các chất mang dược dụng nêu trên. Ví dụ, để sử dụng qua đường miệng, dược phẩm theo sáng chế có thể được bào chế ở dạng viên nén, viên ngậm, viên nang, viên ngọt, hỗn dịch, sirô hoặc viên nhện. Để sử dụng qua đường tiêm, dược phẩm theo sáng chế có thể được bào chế ở dạng thuốc đơn liều ví dụ, ống thuốc tiêm hoặc bình chứa thuốc tiêm đa liều. Dược phẩm theo sáng chế cũng có thể được bào chế ở dạng dung dịch, hỗn dịch, viên nén, viên tròn, viên nang và dược phẩm tác dụng kéo dài.

Ví dụ về các chất mang, tá dược, và tá dược pha loãng thích hợp khác cho dược phẩm theo sáng chế bao gồm lactoza, dextroza, sucroza, sorbitol, manitol, xylitol, erythritol, maltitol, tinh bột, cao su acacia, alginat, gelatin, canxi phosphat, canxi silicat, xenluloza, metylxenluloza, xenluloza vi tinh thể, polyvinylpyrrolidon, nước, metylhydroxybenzoat, propylhydroxybenzoat, talc, magiê stearat và dầu khoáng. Ngoài ra, dược phẩm theo sáng chế có thể còn chứa tá dược độn, tá dược chống đông tụ, tá dược trơn, chất làm ẩm, chất thơm và chất diệt khuẩn.

Hơn nữa, dược phẩm theo sáng chế có thể còn được bào chế ở dạng viên nén, viên tròn, bột, cốm, viên nang, hỗn dịch, dung dịch để dùng ngoài, nhũ tương, sirô, dung dịch nước vô khuẩn, chế phẩm đông khô, dung dịch không chứa nước và thuốc đạn.

Ngoài ra, dược phẩm theo sáng chế có thể được bào chế ở dạng thuốc đơn liều thích hợp để tạo ra tác dụng toàn thân, và tốt hơn nếu dược phẩm theo sáng chế được bào chế ở dạng thuốc peptit theo phương pháp bào chế dược phẩm thông thường để có thể sử dụng được qua đường miệng hoặc đường tiêm như là tiêm qua da, tĩnh mạch, tiêm bắp, tiêm động mạch, tiêm vào tủy sống, tiêm vào hành não, tiêm vào não thất, qua phổi, qua

biểu bì, tiêm dưới da, tiêm màng bụng, qua mũi, qua đại tràng, khu trú, dưới lưỡi, âm đạo hoặc trực tràng, nhưng không chỉ giới hạn ở các đường đưa thuốc này.

Dược phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng bằng cách trộn với các chất mang được dụng khác nhau ví dụ, dung dịch nước muối sinh lý hoặc dung môi hữu cơ. Để làm tăng độ ổn định hoặc khả năng hấp thu, các carbohydrat như là glucoza, sucroza hoặc dextran, các chất chống oxy hóa như là axit ascorbic hoặc glutathion, tác nhân tạo phức chelat, protein trọng lượng phân tử thấp hoặc các tá dược làm ổn định khác có thể được sử dụng.

Liều lượng và tần suất sử dụng dược phẩm theo sáng chế được xác định theo hoạt chất, cùng với các yếu tố khác nhau như là bệnh cần điều trị, đường đưa thuốc, tuổi, giới tính, cân nặng của người bệnh, và mức độ nghiêm trọng của bệnh.

Tổng liều lượng của dược phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng cho người bệnh theo chế độ đơn liều, hoặc đa liều trong khoảng thời gian kéo dài theo phác đồ điều trị nhắc lại. Dược phẩm theo sáng chế có thể chứa hoạt chất với hàm lượng thay đổi phụ thuộc vào mức độ nghiêm trọng của bệnh. Tốt hơn nếu, tổng liều hàng ngày của peptit theo sáng chế nằm trong khoảng từ 0,0001 $\mu$ g đến 500mg/kg cân nặng của người bệnh. Tuy nhiên, liều có hiệu quả của peptit theo sáng chế được xác định theo nhiều yếu tố khác nhau bao gồm tuổi, cân nặng, tình trạng sức khỏe, giới tính của người bệnh, mức độ nghiêm trọng của bệnh, chế độ dinh dưỡng, tốc độ thải trừ, cùng với đường đưa thuốc và tần suất điều trị của dược phẩm theo sáng chế. Theo quan điểm này, chuyên gia trung bình trong lĩnh vực dược phẩm có thể dễ dàng xác định được liều có hiệu quả thích hợp để sử dụng của dược phẩm theo sáng chế. Dược phẩm theo sáng chế không bị giới hạn ở công thức bào chế, đường đưa thuốc và cách dùng cụ thể, miễn là dược phẩm này có tác dụng điều trị chứng béo phì.

Dược phẩm theo sáng chế có hiệu lực và nồng độ *in vivo* rất cao, do đó giảm đáng kể được số lượng và tần suất sử dụng.

Hơn nữa, dược phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng riêng, kết hợp hoặc đồng thời với các dược phẩm có tác dụng điều trị hoặc phòng ngừa chứng béo phì khác. Các dược phẩm này bao gồm dược phẩm chủ vận thụ thể peptit tương tự glucagon-1, được

phẩm chủ vận thụ thể leptin, được phẩm ức chế dipeptidyl peptidaza-IV, được phẩm đối kháng thụ thể peptit thần kinh Y tít 5 (Y5), được phẩm đối kháng thụ thể hormon làm dày melanin, được phẩm chủ vận thụ thể peptit thần kinh Y tít 2 và peptit thần kinh Y tít 3 (Y2/3), được phẩm chủ vận thụ thể melanocortin 3 và melanocortin 4 (MC3/4), được phẩm ức chế lipaza ở dạ dày và tụy, được phẩm chủ vận 5-hydroxytryptamin 2c (5HT2c), được phẩm chủ vận thụ thể tiểu đơn vị  $\beta 3A$ , được phẩm chủ vận thụ thể amylin, được phẩm đối kháng ghrelin, và/hoặc được phẩm đối kháng thụ thể ghrelin, nhưng không chỉ giới hạn ở các được phẩm này.

Ngoài ra, phương pháp phòng ngừa hoặc điều trị chứng béo phì cũng được mô tả trong sáng chế, phương pháp này bao gồm việc cho đối tượng sử dụng thể tiếp hợp theo sáng chế hoặc được phẩm chứa thể tiếp hợp này.

Thuật ngữ “sử dụng” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ các biện pháp đưa một lượng hoạt chất xác định trước vào cơ thể người bệnh bằng các phương pháp thích hợp đã biết. Được phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng theo các đường đưa được phẩm thông thường, ví dụ, tiêm màng bụng, tiêm tĩnh mạch, tiêm bắp, tiêm dưới da, tiêm trong da, đường miệng, khu trú, đường mũi, qua đường hô hấp hoặc trực tràng, miễn là được phẩm này được phân bố tới mô đích, nhưng không chỉ giới hạn ở các đường đưa được phẩm này. Tuy nhiên, do các peptit bị phân hủy khi sử dụng qua đường miệng, nên các hoạt chất chứa trong được phẩm để sử dụng qua đường miệng cần được bao hoặc bào chế ở dạng thích hợp để ngăn ngừa sự phân hủy ở dạ dày.

Thuật ngữ “đối tượng” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ toàn bộ các đối tượng bị mắc chứng béo phì, tức là các động vật có vú bao gồm người, chuột và gia súc bị mắc chứng béo phì hoặc có nguy cơ mắc béo phì. Tuy nhiên, đối tượng bất kỳ cần điều trị bằng peptit hoặc được phẩm theo sáng chế không chỉ giới hạn ở những đối tượng nêu trên. Được phẩm chứa peptit theo sáng chế được sử dụng cho đối tượng bị mắc chứng béo phì, nhờ đó đối tượng được điều trị một cách hiệu quả. Chứng béo phì là bệnh như được mô tả nêu trên.

Phương pháp điều trị theo sáng chế có thể bao gồm giai đoạn sử dụng được phẩm chứa peptit nêu trên ở lượng có hoạt tính được học. Tổng liều hàng ngày cần được xác định thông qua đánh giá lâm sàng bởi nhân viên y tế, và được sử dụng một hoặc nhiều lần.

Liên quan đến các mục đích của sáng chế, liều lượng có hiệu quả điều trị cho người bệnh bất kỳ có thể phụ thuộc vào nhiều yếu tố đã biết trong lĩnh vực y dược, bao gồm loại và mức độ đáp ứng điều trị cần đạt được, dược phẩm cụ thể có chứa các hoạt chất khác hay không, tuổi, cân nặng, tình trạng sức khỏe, giới tính, và chế độ dinh dưỡng của người bệnh, thời gian và đường đưa dược phẩm, tốc độ thải trừ của dược phẩm, thời gian điều trị, dược phẩm được sử dụng phối hợp hoặc đồng thời với dược phẩm theo sáng chế, và các yếu tố tương tự đã biết trong lĩnh vực y dược.

Ngoài ra, phương pháp sử dụng thể tiếp hợp theo sáng chế hoặc dược phẩm chứa thể tiếp hợp này để bào chế thuốc phòng ngừa hoặc điều trị chứng béo phì cũng được mô tả trong sáng chế.

### Ví dụ thực hiện sáng chế

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

#### Ví dụ 1

Quy trình sản xuất dòng tế bào được hoạt hóa *in vitro*

#### Ví dụ 1-1

Quy trình sản xuất dòng tế bào biểu hiện AMP mạch vòng đáp ứng với GLP-1

Thực hiện quy trình phân tích PCR bằng cách sử dụng vùng khung đọc mở (ORF-Open Reading Frame) trên ADN bổ sung (OriGene Technologies, Inc. USA) của gen mã hóa thụ thể GLP-1 ở người làm khuôn, các đoạn môi xuôi và đoạn môi ngược chứa vị trí cắt hạn chế HindIII và EcoRI để thu được sản phẩm PCR.

Đoạn môi xuôi: 5'-CCCGGCCCCCGCGGCCGCTATTCGAAATAC-3' (SEQ ID NO.47)

Đoạn môi ngược: 5'-GAACGGTCCGGAGGACGTCTGACTCTTAAGATAG-3' (SEQ ID NO.48)

Tách dòng sản phẩm PCR này vào vector biểu hiện tế bào động vật x0GC/dhfr để

thu được vector tái tổ hợp x0GC/GLP1R.

Chuyển nhiễm dòng tế bào CHO DG44 đã được nuôi cấy trên môi trường DMEM/F12 (10% FBS) bằng vector tái tổ hợp x0GC/GLP1R nêu trên bằng cách sử dụng Lipofectamin (Invitrogen, USA), và nuôi cấy trên môi trường chọn lọc chứa 1mg/mL G418 và 10nM methotraxat. Các dòng tế bào tạo khuẩn lạc riêng rẽ được chọn bằng kỹ thuật pha loãng tới hạn, và dòng tế bào biểu hiện mạnh AMP mạch vòng đáp ứng với GLP-1 theo phương thức phụ thuộc nồng độ được chọn sau cùng.

#### Ví dụ 1-2

Quy trình sản xuất dòng tế bào biểu hiện AMP mạch vòng đáp ứng với glucagon

Thực hiện quy trình phân tích PCR bằng cách sử dụng vùng khung đọc mở (ORF-Open Reading Frame) trên ADN bổ sung (OriGene Technologies, Inc. USA) của gen mã hóa thụ thể GLP-1 ở người làm khuôn, các đoạn môi xuôi và đoạn môi ngược chứa vị trí cắt hạn chế EcoRI và XhoI để thu được sản phẩm PCR.

Đoạn môi xuôi:

5'-CAGCGACACCGACCGTCCCCCGTACTTAAGGCC-3' (SEQ ID NO.49)

Đoạn môi ngược 5'-CTAACCGACTCTCGGGGAAGACTGAGCTCGCC-3' (SEQ ID NO.50)

Tách dòng sản phẩm PCR này vào vector biểu hiện tế bào động vật x0GC/dhfr để thu được vector tái tổ hợp x0GC/GCGR.

Chuyển nhiễm dòng tế bào CHO DG44 đã được nuôi cấy trên môi trường DMEM/F12 (10% FBS) bằng vector tái tổ hợp x0GC/GCGR nêu trên bằng cách sử dụng Lipofectamin, và nuôi cấy trên môi trường chọn lọc chứa 1mg/mL G418 và 10nM methotraxat. Các dòng tế bào tạo khuẩn lạc riêng rẽ được chọn bằng kỹ thuật pha loãng tới hạn, và dòng tế bào biểu hiện mạnh AMP mạch vòng đáp ứng với glucagon theo phương thức phụ thuộc nồng độ được chọn sau cùng.

#### Ví dụ 2

Thử nghiệm đánh giá hoạt tính *in vitro* của dẫn xuất oxyntomodulin

Ví dụ 2-1

Quy trình bào chế dẫn xuất oxyntomodulin

Để đánh giá hoạt tính *in vitro*, các dẫn xuất oxyntomodulin có trình tự axit amin như sau được tổng hợp.

Bảng 1

Oxyntomodulin và dẫn xuất oxyntomodulin

| SEQ ID NO.   | Trình tự axit amin                                                              | Lưu ý    |
|--------------|---------------------------------------------------------------------------------|----------|
| SEQ ID NO.1  | HSQGTFTSDYSKYLD <del>SR</del> RAQDFVQWLMNTKRN <del>R</del> NNIA                 |          |
| SEQ ID NO.2  | CA-SQGTFTSDYSKYLD <del>EE</del> AVRLFIEWLMNTKRN <del>R</del> NNIA               |          |
| SEQ ID NO.3  | CA-SQGTFTSDYSKYLD <del>ERR</del> AQDFVAWLKNTGPSSGAPPPS                          |          |
| SEQ ID NO.4  | CA-GQGTFTSDYSRYL <del>EEE</del> AVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS                          |          |
| SEQ ID NO.5  | CA-GQGTFTSDYSRQ <del>MEEE</del> AVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS                          |          |
| SEQ ID NO.6  | CA-GEGTFTSDLSRQ <del>MEEE</del> AVRLFIEWAAHSQGTFTSDYSKYLD                       |          |
| SEQ ID NO.7  | CA-SQGTFTSDYSRYL <del>DEE</del> AVRLFIEWLMNTK                                   |          |
| SEQ ID NO.8  | CA-SQGTFTSDLSRQ <del>LEEE</del> AVRLFIEWLMNK                                    |          |
| SEQ ID NO.9  | CA-GQGTFTSDYSRYL <del>DEE</del> AVXLFIEWLMNTKRN <del>R</del> NNIA               |          |
| SEQ ID NO.10 | CA-SQGTFTSDYSRQ <del>MEEE</del> AVRLFIEWLMNGGPSSGAPPPSK                         |          |
| SEQ ID NO.11 | CA-GEGTFTSDLSRQ <del>MEEE</del> AVRLFIEWAAHSQGTFTSDYSRYL <del>DK</del>          |          |
| SEQ ID NO.12 | CA-SQGTFTSDYSRYL <del>DG</del> GGHGEGTFTSDLSKQ <del>MEEE</del> AVK              |          |
| SEQ ID NO.13 | CA-SQGTFTSDYSRYL <del>D</del> XEAVXLFIEWLMNTK                                   |          |
| SEQ ID NO.14 | CA-GQGTFTSDYSRYL <del>DEE</del> AVXLFIXWLMNTKRN <del>R</del> NNIA               |          |
| SEQ ID NO.15 | CA-GQGTFTSDYSRYL <del>DEE</del> AVRLFIXWLMNTKRN <del>R</del> NNIA               |          |
| SEQ ID NO.16 | CA-SQGTFTSDLSRQ <del>LE</del> GGGHSQGTFTSDLSRQ <del>LE</del> K                  |          |
| SEQ ID NO.17 | CA-SQGTFTSDYSRYL <del>DEE</del> AVRLFIEWIRNTKRN <del>R</del> NNIA               |          |
| SEQ ID NO.18 | CA-SQGTFTSDYSRYL <del>DEE</del> AVRLFIEWIRNGGPSSGAPPPSK                         |          |
| SEQ ID NO.19 | CA-SQGTFTSDYSRYL <del>DEE</del> AV <del>K</del> LFIIEWIRNTKRN <del>R</del> NNIA | Tạo vòng |
| SEQ ID NO.20 | CA-SQGTFTSDYSRYL <del>DEE</del> AV <del>K</del> LFIIEWIRNGGPSSGAPPPSK           | Tạo vòng |
| SEQ ID NO.21 | CA-SQGTFTSDYSRQ <del>LEEE</del> AVRLFIEWVRNTKRN <del>R</del> NNIA               |          |
| SEQ ID NO.22 | DA-SQGTFTSDYSKYLD <del>E</del> KRA <del>K</del> EFVQWLMNTK                      | Tạo vòng |
| SEQ ID NO.23 | HAibQGTFTSDYSKYLD <del>E</del> KRAKEFVCWLMNT                                    |          |
| SEQ ID NO.24 | HAibQGTFTSDYSKYLD <del>E</del> KRAKEFVQWLMNTC                                   |          |
| SEQ ID NO.25 | HAibQGTFTSDYSKYLD <del>E</del> KRA <del>K</del> EFVQWLMNTC                      | Tạo vòng |
| SEQ ID NO.26 | HAibQGTFTSDYS <del>K</del> YL <del>E</del> KRAKEFVQWLMNTC                       | Tạo vòng |
| SEQ ID NO.27 | HAibQGTFTSDYSKYLD <del>E</del> QA <del>A</del> K <del>E</del> FCWLMNT           | Tạo vòng |
| SEQ ID NO.28 | HAibQGTFTSDYSKYLD <del>E</del> KRAKEFVQWLMNT                                    |          |
| SEQ ID NO.29 | H(d)SQGTFTSDYSKYLD <del>SR</del> RAQDFVQWLMNTKRN <del>R</del> NNIA              |          |
| SEQ ID NO.30 | CA-SQGTFTSDYSKYLD <del>SR</del> RAQDFVQWLMNTKRN <del>R</del> NNIA               |          |
| SEQ ID NO.31 | CA-(d)SQGTFTSDYSKYLD <del>SR</del> RAQDFVQWLMNTKRN <del>R</del> NNIA            |          |
| SEQ ID NO.32 | CA-AibQGTFTSDYSKYLD <del>E</del> KRA <del>K</del> EFVQWLMNTC                    | Tạo vòng |
| SEQ ID NO.33 | HAibQGTFTSDYAKYL <del>E</del> KRA <del>K</del> EFVQWLMNTC                       | Tạo vòng |
| SEQ ID NO.34 | YAibQGTFTSDYSKYLD <del>E</del> KRA <del>K</del> EFVQWLMNTC                      | Tạo vòng |

Trong Bảng 1, các axit amin được in đậm và gạch chân trong mỗi trình tự SEQ ID

NO.19, SEQ ID NO.20, SEQ ID NO.22, SEQ ID NO.25, SEQ ID NO.26, SEQ ID NO.27, SEQ ID NO.32, SEQ ID NO.33, và SEQ ID NO.34, cùng với nhau tạo ra vòng, và X là axit amin không có trong tự nhiên, axit alpha-metyl-glutamic. Ngoài ra, CA là 4-imidazoaxetyl, và DA là desamino-histidyl.

## Ví dụ 2-2

### Thử nghiệm đánh giá hoạt tính *in vitro* của dẫn xuất oxyntomodulin

Để đánh giá hiệu lực chống béo phì của các dẫn xuất oxyntomodulin được tổng hợp theo Ví dụ 2-1, thì hoạt tính tế bào *in vitro* đã được đánh giá bằng cách sử dụng các dòng tế bào được bào chế theo Ví dụ 1-1 và Ví dụ 1-2.

Các dòng tế bào thử nghiệm đã được bào chế bằng cách chuyển nhiễm tế bào trứng của chuột đồng Trung Quốc (CHO-Chinese Hamster Ovary) để biểu hiện tương ứng gen mã hóa thụ thể GLP-1 và gen mã hóa thụ thể glucagon. Do đó, các dòng tế bào này thích hợp để đánh giá hoạt tính của GLP-1 và glucagon và hoạt tính của các dẫn xuất oxyntomodulin đã được đánh giá bằng cách sử dụng các dòng tế bào đã được chuyển nhiễm này.

Cụ thể, nuôi cấy cấp hai từng dòng tế bào nêu trên hai hoặc ba lần trong thời gian một tuần, và cấy chuyển vào đĩa 96-giếng ở mật độ bằng  $1 \times 10^5$ , sau đó nuôi cấy trong 24 giờ.

Rửa các tế bào đã được nuôi cấy bằng dung dịch đệm KRB, tạo hỗn dịch trong 40mL dung dịch đệm KRB chứa 1mM IBMX, và để ở nhiệt độ phòng trong 5 phút. Pha loãng liên tiếp theo tỷ lệ 5 lần oxyntomodulin (SEQ ID NO.1) và các dẫn xuất oxyntomodulin (có trình tự là SEQ ID NO.2-6, 8, 10-13, 17, 18, 23-25, 27, 28 và 32-34) từ nồng độ 1000nM đến nồng độ 0,02nM, và bổ sung 40ml từng dịch pha loãng này vào các tế bào nêu trên, và nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C trong 1 giờ trong tủ nuôi cấy CO<sub>2</sub>. Sau đó, bổ sung 20ml dung dịch đệm ly giải tế bào, và sử dụng dịch ly giải tế bào để định lượng nồng độ AMP mạch vòng bằng kit định lượng cAMP (Molecular Device, USA). Định lượng trị số EC<sub>50</sub>, và so sánh với nhau. Trị số EC<sub>50</sub> được thể hiện trong Bảng 2.

Bảng 2

So sánh hoạt tính *in vitro* đối với thụ thể GLP-1 và thụ thể glucagon của oxyntomodulin và các dẫn xuất oxyntomodulin.

| SEQ ID NO.   | EC <sub>50</sub> (nM) |          |
|--------------|-----------------------|----------|
|              | CHO/GLP-1R            | CHO/GCGR |
| SEQ ID NO.1  | 50 - 210              | 10 - 43  |
| SEQ ID NO.2  | 51,8                  | 12,8     |
| SEQ ID NO.3  | >1000                 | 637,7    |
| SEQ ID NO.4  | 5,5                   | >1000    |
| SEQ ID NO.5  | 5,9                   | >1000    |
| SEQ ID NO.6  | 500,1                 | >1000    |
| SEQ ID NO.8  | 419,6                 | >1000    |
| SEQ ID NO.10 | >1000                 | >1000    |
| SEQ ID NO.11 | >1000                 | >1000    |
| SEQ ID NO.12 | >1000                 | >1000    |
| SEQ ID NO.13 | >1000                 | >1000    |
| SEQ ID NO.17 | 97,9                  | >1000    |
| SEQ ID NO.18 | 96,3                  | >1000    |
| SEQ ID NO.23 | 2,46                  | 5,8      |
| SEQ ID NO.24 | 1,43                  | 6,95     |
| SEQ ID NO.25 | 1,9                   | 1,3      |
| SEQ ID NO.27 | 2,8-5,5               | 3,1-5,6  |
| SEQ ID NO.28 | 3,1                   | 0,3      |
| SEQ ID NO.32 | 14,25                 | 17,3     |
| SEQ ID NO.33 | 2,20                  | 87,3     |
| SEQ ID NO.34 | 12,5                  | 1,0      |

Như được thể hiện trên Bảng 2, so với oxyntomodulin tự nhiên có trình tự SEQ ID NO.1, một số dẫn xuất oxyntomodulin có hoạt *in vitro* mạnh hơn rất nhiều và tỷ lệ hoạt tính đối với thụ thể GLP-1 và thụ thể glucagon rất khác biệt.

Đã biết rằng, oxyntomodulin hoạt hóa cả thụ thể GLP-1 lẫn thụ thể glucagon để ngăn ngừa sự thèm ăn, tăng chuyển hóa lipid, làm tăng cảm giác no, do đó có tác dụng chống béo phì. Trong khi đó, các dẫn xuất oxyntomodulin theo sáng chế có hoạt tính *in vitro* đối với cả thụ thể GLP-1 lẫn thụ thể glucagon mạnh hơn rất nhiều so với oxyntomodulin tự nhiên, do đó có thể được sử dụng làm hoạt chất chống béo phì có hiệu lực mạnh hơn oxyntomodulin tự nhiên.

Ví dụ 3

### Thử nghiệm đánh giá hoạt tính *in vivo* của các dẫn xuất oxyntomodulin

Để đánh giá hoạt tính *in vivo* của các dẫn xuất oxyntomodulin, sự biến đổi quá trình hấp thu thức ăn khi sử dụng các dẫn xuất oxyntomodulin đã được đánh giá trên chuột béo phì và oxyntomodulin tự nhiên được sử dụng làm mẫu đối chứng.

Cụ thể, chuột béo phì bị đái tháo đường được sử dụng để đánh giá hoạt lực của các hoạt chất chống béo phì và đái tháo đường, được cho nhịn ăn trong 16 giờ, và sử dụng 1mg/kg hoặc 10mg/kg oxyntomodulin, hoặc 0,02 mg/kg, 0,1 mg/kg, 1 mg/kg hoặc 10mg/kg dẫn xuất oxyntomodulin có trình tự là SEQ ID NO.2. Sau đó, quá trình hấp thu thức ăn được đánh giá trong 2 giờ. Fig.1 là biểu đồ thể hiện sự biến đổi quá trình hấp thu thức ăn khi sử dụng oxyntomodulin hoặc dẫn xuất oxyntomodulin. Như được thể hiện trên Fig.1, khi cho chuột béo phì bị đái tháo đường sử dụng 1mg/kg dẫn xuất oxyntomodulin SEQ ID NO.2 thì tác dụng ức chế quá trình hấp thu thức ăn mạnh hơn rất nhiều so với khi cho chuột sử dụng 10mg/kg oxyntomodulin.

Ngoài ra, các dẫn xuất oxyntomodulin theo sáng chế có tác dụng chống béo phì mạnh hơn rất nhiều so với oxyntomodulin tự nhiên, thậm chí khi được sử dụng ở liều thấp, các dẫn xuất này đã khắc phục được các nhược điểm về hiệu lực chống béo phì yếu của oxyntomodulin tự nhiên và nên được sử dụng ở liều cao ba lần một ngày.

#### Ví dụ 4

Quy trình bào chế thể tiếp hợp chứa oxyntomodulin và vùng Fc của globulin miễn dịch

Trước tiên, để gắn PEG vào gốc lysin ở vị trí số 30 trên trình tự axit amin của oxyntomodulin tự nhiên (SEQ ID NO.1) bằng PEG PropionALD(2) 3,4 K (PEG chứa hai nhóm propylaldehyt, NOF, Japan), cho oxyntomodulin tự nhiên này phản ứng với PEG PropionALD(2) 3,4 K theo tỷ lệ mol bằng 1:12 với nồng độ protein bằng 5mg/mL ở nhiệt độ 4°C trong 4,5 giờ. Tại cùng thời điểm, thực hiện phản ứng này trong hỗn hợp dung môi chứa dung dịch đệm Na-Borat 100mM (pH = 9,0), isopropanol 45%, và bổ sung chất khử natri xyanobohydrit 20mM (xyanobohydrit (SCB, NaCNBH<sub>3</sub>), NaCNBH<sub>3</sub>) vào hỗn hợp phản ứng. Sau khi kết thúc phản ứng, tiêm hỗn hợp phản ứng vào hệ thống SOURCE S (XK16, Amersham Biosciences) để tinh chế oxyntomodulin chứa gốc Lysin đã được

mono-pegyl hóa này (cột: SOURCE S (XK16, Amersham Biosciences), tốc độ dòng: 2,0mL/phút, gradient: A 0 → 3% 1 phút B → 40% 222 phút B (A: Na-xitrat 20mM, pH = 3,0 + etanol 45%, B: A + KCl 1M)). Fig.2a là đồ thị thể hiện kết quả tinh chế oxyntomodulin-mono-PEG bằng cột tinh chế SOURCE S. Quá trình mono-pegyl hóa của các pic đã được rửa giải được xác định bằng SDS-PAGE, và độ chọn lọc lysin được xác định bằng bản đồ peptit bằng cách sử dụng Asp-N proteaza. Fig.2b là bản đồ peptit của oxyntomodulin-mono-PEG tinh khiết.

Tiếp theo, cho oxyntomodulin-mono-PEG tinh khiết nêu trên phản ứng với vùng Fc của globulin miễn dịch theo tỷ lệ mol bằng 1 : 10 với nồng độ protein bằng 20mg/mL ở nhiệt độ 4°C trong 16 giờ. Tại cùng thời điểm, thực hiện phản ứng này trong dung dịch đệm kali phosphat 100mM (pH = 6,0) và bổ sung chất khử SCB 20mM vào hỗn hợp phản ứng. Sau khi kết thúc phản ứng, tiêm hỗn hợp phản ứng vào hệ thống SOURCE 15Q để tinh chế thể tiếp hợp chứa oxyntomodulin và vùng Fc của globulin miễn dịch này (cột: SOURCE 15Q (XK16, Amersham Biosciences), tốc độ dòng: 2,0mL/phút, gradient: A 0 → 20% 100 phút B (A: Tris-HCl 20mM, pH = 7,5, B: A + NaCl 1M)). Fig.2c là đồ thị thể hiện kết quả tinh chế thể tiếp hợp chứa oxyntomodulin và vùng Fc của globulin miễn dịch.

#### Ví dụ 5

Quy trình bào chế thể tiếp hợp chứa dẫn xuất oxyntomodulin (SEQ ID NO.29) và vùng Fc của globulin miễn dịch

Trước tiên, để gắn PEG vào gốc lysin ở vị trí số 30 trên trình tự axit amin của dẫn xuất oxyntomodulin (SEQ ID NO.29) bằng PEG PropionALD(2) 3,4 K, cho dẫn xuất oxyntomodulin (SEQ ID NO.29) phản ứng với PEG PropionALD(2) 3,4 K theo tỷ lệ mol bằng 1 : 12 với nồng độ protein bằng 5mg/mL ở nhiệt độ 4°C trong 4,5 giờ. Tại cùng thời điểm, thực hiện phản ứng này trong hỗn hợp dung môi chứa dung dịch đệm Na-Borat 100mM (pH = 9,0), isopropanol 45%, và bổ sung chất khử SCB 20mM vào hỗn hợp phản ứng. Sau khi kết thúc phản ứng, tiêm hỗn hợp phản ứng vào hệ thống SOURCE S để tinh chế dẫn xuất oxyntomodulin chứa gốc lysin đã được mono-pegyl hóa này (Cột: SOURCE S, tốc độ dòng: 2,0mL/phút, gradient: A 0 → 3% 1 phút B → 40% 222 phút B (A: Na-xitrat 20mM, pH = 3,0 + etanol 45%, B: A + KCl 1M)). Fig.3a là đồ thị thể hiện kết

quả tinh chế dẫn xuất oxyntomodulin-mono-PEG (SEQ ID NO.29) bằng cột tinh chế SOURCE S.

Tiếp theo, cho dẫn xuất oxyntomodulin-mono-PEG tinh khiết (SEQ ID NO.29) phản ứng với vùng Fc của globulin miễn dịch theo tỷ lệ mol bằng 1 : 10 với nồng độ protein bằng 20mg/mL ở nhiệt độ 4°C trong 16 giờ. Tại cùng thời điểm, thực hiện phản ứng này trong dung dịch đệm kali phosphat 100mM (pH = 6,0) và bổ sung chất khử SCB 20mM vào hỗn hợp phản ứng. Sau khi kết thúc phản ứng, tiêm hỗn hợp phản ứng vào hệ thống SOURCE 15Q để tinh chế thể tiếp hợp chứa dẫn xuất oxyntomodulin (SEQ ID NO.29) và vùng Fc của globulin miễn dịch này (cột: SOURCE 15Q, tốc độ dòng: 2,0mL/phút, gradient: A 0 → 20% 100 phút B (A: Tris-HCl 20mM, pH = 7,5, B: A + NaCl 1M)). Fig.3b là đồ thị thể hiện kết quả tinh chế thể tiếp hợp chứa dẫn xuất oxyntomodulin (SEQ ID NO.29) và vùng Fc của globulin miễn dịch.

#### Ví dụ 6

Quy trình bào chế thể tiếp hợp chứa dẫn xuất oxyntomodulin (SEQ ID NO.30) và vùng Fc của globulin miễn dịch

Trước tiên, để gắn PEG vào gốc lysin ở vị trí số 30 trên trình tự axit amin của dẫn xuất oxyntomodulin (SEQ ID NO.30) bằng PEG PropionALD(2) 3,4 K, cho dẫn xuất oxyntomodulin (SEQ ID NO.30) phản ứng với PEG PropionALD(2) 3,4 K theo tỷ lệ mol bằng 1 : 15 với nồng độ protein bằng 3mg/mL ở nhiệt độ 4°C trong 4,5 giờ. Tại cùng thời điểm, thực hiện phản ứng này trong hỗn hợp dung môi chứa dung dịch đệm HEPES 100mM (pH = 7,5), isopropanol 45%, và bổ sung chất khử SCB 20mM vào hỗn hợp phản ứng. Sau khi kết thúc phản ứng, tiêm hỗn hợp phản ứng vào hệ thống SOURCE S để tinh chế dẫn xuất oxyntomodulin chứa gốc lysin đã được mono-pegyl hóa này (Cột: SOURCE S, tốc độ dòng: 2,0mL/phút, gradient: A 0 → 3% 1 phút B → 40% 222 phút B (A: Na-xitrat 20mM, pH = 3,0 + etanol 45%, B: A + KCl 1M)). Fig.4a là đồ thị thể hiện kết quả tinh chế dẫn xuất oxyntomodulin-mono-PEG (SEQ ID NO.30) bằng cột tinh chế SOURCE S. Quá trình mono-pegyl hóa của các píc đã được rửa giải được xác định bằng SDS-PAGE, và độ chọn lọc lysin được xác định bằng bản đồ peptit bằng cách sử dụng Asp-N proteaza. Fig.4b là bản đồ peptit của dẫn xuất oxyntomodulin-mono-PEG tinh khiết (SEQ ID NO.30).

Tiếp theo, cho dẫn xuất oxyntomodulin-mono-PEG tinh khiết (SEQ ID NO.30) phản ứng với vùng Fc của globulin miễn dịch theo tỷ lệ mol bằng 1 : 10 với nồng độ protein bằng 20mg/mL ở nhiệt độ 4°C trong 16 giờ. Tại cùng thời điểm, thực hiện phản ứng này trong dung dịch đệm kali phosphat 100mM (pH = 6,0) và bổ sung chất khử SCB 20mM vào hỗn hợp phản ứng. Sau khi kết thúc phản ứng, tiêm hỗn hợp phản ứng vào hệ thống SOURCE 15Q để tinh chế thể tiếp hợp chứa dẫn xuất oxyntomodulin (SEQ ID NO.30) và vùng Fc của globulin miễn dịch này (cột: SOURCE 15Q, tốc độ dòng: 2,0mL/phút, gradient: A 0 → 20% 100 phút B (A: Tris-HCl 20mM, pH = 7,5, B: A + NaCl 1M)). Fig.4c là đồ thị thể hiện kết quả tinh chế thể tiếp hợp chứa dẫn xuất oxyntomodulin (SEQ ID NO.30) và vùng Fc của globulin miễn dịch.

#### Ví dụ 7

Quy trình bào chế thể tiếp hợp chứa dẫn xuất oxyntomodulin (SEQ ID NO.31) và vùng Fc của globulin miễn dịch

Trước tiên, để gắn PEG vào gốc lysin ở vị trí số 30 trên trình tự axit amin của dẫn xuất oxyntomodulin (SEQ ID NO.31) bằng PEG PropionALD(2) 3,4 K, cho dẫn xuất oxyntomodulin (SEQ ID NO.31) phản ứng với PEG PropionALD(2) 3,4 K theo tỷ lệ mol bằng 1 : 15 với nồng độ protein bằng 3mg/mL ở nhiệt độ 4°C trong 4,5 giờ. Tại cùng thời điểm, thực hiện phản ứng này trong hỗn hợp dung môi chứa dung dịch đệm HEPES 100mM (pH = 7,5), isopropanol 45%, và bổ sung chất khử SCB 20mM vào hỗn hợp phản ứng. Sau khi kết thúc phản ứng, tiêm hỗn hợp phản ứng vào hệ thống SOURCE S để tinh chế dẫn xuất oxyntomodulin chứa gốc lysin đã được mono-pegyl hóa này (Cột: SOURCE S, tốc độ dòng: 2,0mL/phút, gradient: A 0 → 3% 1 phút B → 40% 222 phút B (A: Na-xitrat 20mM, pH = 3,0 + etanol 45%, B: A + KCl 1M)). Fig.5a là đồ thị thể hiện kết quả tinh chế dẫn xuất oxyntomodulin-mono-PEG (SEQ ID NO.31) bằng cột tinh chế SOURCE S.

Tiếp theo, cho dẫn xuất oxyntomodulin-mono-PEG tinh khiết (SEQ ID NO.31) phản ứng với vùng Fc của globulin miễn dịch theo tỷ lệ mol bằng 1 : 10 với nồng độ protein bằng 20mg/mL ở nhiệt độ 4°C trong 16 giờ. Tại cùng thời điểm, thực hiện phản ứng này trong dung dịch đệm kali phosphat 100mM (pH = 6,0) và bổ sung chất khử SCB 20mM vào hỗn hợp phản ứng. Sau khi kết thúc phản ứng, tiêm hỗn hợp phản ứng vào hệ

thống SOURCE 15Q để tinh chế thể tiếp hợp chứa dẫn xuất oxyntomodulin (SEQ ID NO.31) và vùng Fc của globulin miễn dịch này (cột: SOURCE 15Q, tốc độ dòng: 2,0mL/phút, gradient: A 0 → 20% 100 phút B (A: Tris-HCl 20mM, pH = 7,5, B: A + NaCl 1M)). Fig.5b là đồ thị thể hiện kết quả tinh chế thể tiếp hợp chứa dẫn xuất oxyntomodulin (SEQ ID NO.31) và vùng Fc của globulin miễn dịch.

#### Ví dụ 8

Quy trình bào chế thể tiếp hợp chứa dẫn xuất oxyntomodulin (SEQ ID NO.2) và vùng Fc của globulin miễn dịch

Trước tiên, để gắn PEG vào gốc lysin ở vị trí số 30 trên trình tự axit amin của dẫn xuất oxyntomodulin (SEQ ID NO.2) bằng PEG PropionALD(2) 3,4 K, cho dẫn xuất oxyntomodulin (SEQ ID NO.2) phản ứng với PEG PropionALD(2) 3,4 K theo tỷ lệ mol bằng 1 : 10 với nồng độ protein bằng 3mg/mL ở nhiệt độ 4°C trong 4 giờ. Tại cùng thời điểm, thực hiện phản ứng này trong hỗn hợp dung môi chứa dung dịch đệm HEPES 100mM (pH = 7,5), isopropanol 45%, và bổ sung chất khử SCB 20mM vào hỗn hợp phản ứng. Sau khi kết thúc phản ứng, tiêm hỗn hợp phản ứng vào hệ thống SOURCE S để tinh chế dẫn xuất oxyntomodulin chứa gốc lysin đã được mono-pegyl hóa này (Cột: SOURCE S, tốc độ dòng: 2,0mL/phút, gradient: A 0 → 3% 1 phút B → 40% 222 phút B (A: Na-xitrat 20mM, pH = 3,0 + etanol 45%, B: A + KCl 1M)). Fig.6a là đồ thị thể hiện kết quả tinh chế dẫn xuất oxyntomodulin-mono-PEG (SEQ ID NO.2) bằng cột tinh chế SOURCE S. Quá trình mono-pegyl hóa của các píc đã được rửa giải được xác định bằng SDS-PAGE, và độ chọn lọc lysin được xác định bằng bản đồ peptit bằng cách sử dụng Asp-N proteaza. Fig.6b là bản đồ peptit của dẫn xuất oxyntomodulin-mono-PEG tinh khiết (SEQ ID NO.2).

Tiếp theo, cho dẫn xuất oxyntomodulin-mono-PEG tinh khiết (SEQ ID NO.2) phản ứng với vùng Fc của globulin miễn dịch theo tỷ lệ mol bằng 1 : 8 với nồng độ protein bằng 20mg/mL ở nhiệt độ 4°C trong 16 giờ. Tại cùng thời điểm, thực hiện phản ứng này trong dung dịch đệm kali phosphat 100mM (pH = 6,0) và bổ sung chất khử SCB 20mM vào hỗn hợp phản ứng. Sau khi kết thúc phản ứng, tiêm hỗn hợp phản ứng vào hệ thống SOURCE 15Q (Cột: SOURCE 15Q, tốc độ dòng: 2,0mL/phút, gradient : A 0 → 4% 1 phút B → 20% 80 phút B (A: Tris-HCl 20mM, pH = 7,5, B: A + NaCl 1M))

(Fig.6c) và hệ thống Source ISO (Cột: SOURCE ISO (XK16, Amersham Biosciences), tốc độ dòng: 2,0mL/phút, gradient: A 0 → 100% 100 phút B, (A: Tris-HCl 20mM, pH = 7,5, B: A + 1,3M AS)) (Fig.6d) để tinh chế thể tiếp hợp chứa dẫn xuất oxyntomodulin (SEQ ID NO.2) và vùng Fc của globulin miễn dịch. Fig.6c là đồ thị thể hiện kết quả tinh chế thể tiếp hợp chứa dẫn xuất oxyntomodulin (SEQ ID NO.2) và vùng Fc của globulin miễn dịch bằng cột tinh chế SOURCE 15Q, và Fig.6d là đồ thị thể hiện kết quả tinh chế thể tiếp hợp chứa dẫn xuất oxyntomodulin (SEQ ID NO.2) và vùng Fc của globulin miễn dịch bằng cột tinh chế Source ISO.

#### Ví dụ 9

Quy trình bào chế thể tiếp hợp chứa dẫn xuất oxyntomodulin (SEQ ID NO.3) và vùng Fc của globulin miễn dịch

Trước tiên, để gắn PEG vào gốc lysin ở vị trí số 27 trên trình tự axit amin của dẫn xuất oxyntomodulin (SEQ ID NO.3) bằng PEG PropionALD(2) 3,4 K, cho dẫn xuất oxyntomodulin (SEQ ID NO.3) phản ứng với PEG PropionALD(2) 3,4 K theo tỷ lệ mol bằng 1 : 10 với nồng độ protein bằng 3mg/mL ở nhiệt độ 4°C trong 4 giờ. Tại cùng thời điểm, thực hiện phản ứng này trong hỗn hợp dung môi chứa dung dịch đệm HEPES 100mM (pH = 7,5), isopropanol 45%, và bổ sung chất khử SCB 20mM vào hỗn hợp phản ứng. Sau khi kết thúc phản ứng, tiêm hỗn hợp phản ứng vào hệ thống SOURCE S để tinh chế dẫn xuất oxyntomodulin chứa gốc lysin đã được mono-pegyl hóa này (Cột: SOURCE S, tốc độ dòng: 2,0mL/phút, gradient: A 0 → 3% 1 phút B → 40% 222 phút B (A: Na-xitrat 20mM, pH = 3,0 + etanol 45%, B: A + KCl 1M)). Fig.7a là đồ thị thể hiện kết quả tinh chế dẫn xuất oxyntomodulin-mono-PEG (SEQ ID NO.3) bằng cột tinh chế SOURCE S. Quá trình mono-pegyl hóa của các píc đã được rửa giải được xác định bằng SDS-PAGE, và độ chọn lọc lysin được xác định bằng bản đồ peptit bằng cách sử dụng Asp-N proteaza. Fig.7b là bản đồ peptit của dẫn xuất oxyntomodulin-mono-PEG tinh khiết (SEQ ID NO.3).

Tiếp theo, cho dẫn xuất oxyntomodulin-mono-PEG tinh khiết (SEQ ID NO.3) phản ứng với vùng Fc của globulin miễn dịch theo tỷ lệ mol bằng 1 : 8 với nồng độ protein bằng 20mg/mL ở nhiệt độ 4°C trong 16 giờ. Tại cùng thời điểm, thực hiện phản ứng này trong dung dịch đệm kali phosphat 100mM (pH = 6,0) và bổ sung chất khử SCB

20mM vào hỗn hợp phản ứng. Sau khi kết thúc phản ứng, tiêm hỗn hợp phản ứng vào hệ thống Butyl FF (Cột: Butyl FF (XK16, Amersham Biosciences), tốc độ dòng: 2,0mL/phút, gradient : B 0 → 100% 5 phút A(A: Tris-HCl 20mM, pH = 7,5, B: A + NaCl 1,5M)) (Fig.7c) và cột SOURCE 15Q (Cột: SOURCE 15Q, tốc độ dòng: 2,0mL/phút, gradient : A 0 → 4% 1 phút B → 20% 80 phút B(A: Tris-HCl 20mM, pH = 7,5, B: A + NaCl 1M)) (Fig.7d) để tinh chế thể tiếp hợp chứa dẫn xuất oxyntomodulin (SEQ ID NO.3) và vùng Fc của globulin miễn dịch. Fig.7c là đồ thị thể hiện kết quả tinh chế thể tiếp hợp chứa dẫn xuất oxyntomodulin (SEQ ID NO.3) và vùng Fc của globulin miễn dịch bằng cột tinh chế Butyl FF, và Fig.7d là đồ thị thể hiện kết quả tinh chế thể tiếp hợp chứa dẫn xuất oxyntomodulin (SEQ ID NO.3) và vùng Fc của globulin miễn dịch bằng cột tinh chế SOURCE 15Q.

#### Ví dụ 10

Quy trình bào chế thể tiếp hợp chứa dẫn xuất oxyntomodulin (SEQ ID NO.23) và vùng Fc của globulin miễn dịch

Trước tiên, để gắn PEG vào gốc xystein ở vị trí số 24 trên trình tự axit amin của dẫn xuất oxyntomodulin (SEQ ID NO.23) bằng PEG MAL-10K-ALD (NOF., Japan), cho dẫn xuất oxyntomodulin (SEQ ID NO.23) phản ứng với MAL-10K-ALD PEG theo tỷ lệ mol bằng 1 : 3 với nồng độ protein bằng 3mg/mL ở nhiệt phòng trong 3 giờ. Tại cùng thời điểm, thực hiện phản ứng này trong dung dịch đệm Tris 50mM (pH = 8,0), isopropanol 45%, và bổ sung guanidini 1M vào. Sau khi kết thúc phản ứng, tiêm hỗn hợp phản ứng vào hệ thống SOURCE S để tinh chế dẫn xuất oxyntomodulin chứa gốc xystein đã được mono-pegyl hóa này (cột: SOURCE S, tốc độ dòng: 2,0mL/phút, gradient: A 0 → 100% 50 phút B (A: Na-xitrat 20mM, pH = 3,0 + etanol 45%, B: A + KCl 1M)) (Fig.8a). Fig.8a là đồ thị thể hiện kết quả tinh chế dẫn xuất oxyntomodulin-mono-PEG (SEQ ID NO.23) bằng cột tinh chế SOURCE S.

Tiếp theo, cho dẫn xuất oxyntomodulin-mono-PEG tinh khiết (SEQ ID NO.23) phản ứng với vùng Fc của globulin miễn dịch theo tỷ lệ mol bằng 1 : 5 với nồng độ protein bằng 20mg/mL ở nhiệt độ 4°C trong 16 giờ. Tại cùng thời điểm, thực hiện phản ứng này trong dung dịch đệm kali phosphat 100mM (pH = 6,0) và bổ sung chất khử SCB 20mM vào hỗn hợp phản ứng. Sau khi kết thúc phản ứng, tiêm hỗn hợp phản ứng vào hệ

thống SOURCE 15Q (cột: SOURCE 15Q, tốc độ dòng: 2,0mL/phút, gradient: A 0 → 4% 1 phút B → 20% 80 phút B (A: Tris-HCl 20mM, pH = 7,5, B: A + NaCl 1M)) (Fig.8b) và hệ thống Source ISO (cột: SOURCE ISO, tốc độ dòng: 2,0mL/phút, gradient: B 0 → 100% 100 phút A, (A: Tris-HCl 20mM, pH = 7,5, B: A + AS 1,1M)) (Fig.8c) để tinh chế thể tiếp hợp chứa dẫn xuất oxyntomodulin (SEQ ID NO.23) và vùng Fc của globulin miễn dịch. Fig.8b là đồ thị thể hiện kết quả tinh chế thể tiếp hợp chứa dẫn xuất oxyntomodulin (SEQ ID NO.23) và vùng Fc của globulin miễn dịch bằng cột tinh chế SOURCE 15Q, và Fig.8c là đồ thị thể hiện kết quả tinh chế thể tiếp hợp chứa dẫn xuất oxyntomodulin (SEQ ID NO.23) và vùng Fc của globulin miễn dịch bằng cột tinh chế Source ISO.

#### Ví dụ 11

Quy trình bào chế thể tiếp hợp chứa dẫn xuất oxyntomodulin (SEQ ID NO.24) và vùng Fc của globulin miễn dịch

Trước tiên, để gắn PEG vào gốc xystein ở vị trí số 30 trên trình tự axit amin của dẫn xuất oxyntomodulin (SEQ ID NO.24) bằng PEG MAL-10K-ALD, cho dẫn xuất oxyntomodulin (SEQ ID NO.24) phản ứng với PEG MAL-10K-ALD theo tỷ lệ mol bằng 1 : 3 với nồng độ protein bằng 3mg/mL ở nhiệt phòng trong 3 giờ. Tại cùng thời điểm, thực hiện phản ứng này trong dung dịch đệm Tris 50mM (pH = 8,0), isopropanol 45%, và bổ sung guanidin 1M vào. Sau khi kết thúc phản ứng, tiêm hỗn hợp phản ứng vào hệ thống SOURCE S để tinh chế dẫn xuất oxyntomodulin chứa gốc xystein đã được mono-pegyl hóa này (cột: SOURCE S, tốc độ dòng: 2,0mL/phút, gradient: A 0 → 100% 50 phút B (A: Na-xitrat 20mM, pH = 3,0 + etanol 45%, B: A + KCl 1M)). Fig.9a là đồ thị thể hiện kết quả tinh chế dẫn xuất oxyntomodulin-mono-PEG (SEQ ID NO.24) bằng cột tinh chế SOURCE S.

Tiếp theo, cho dẫn xuất oxyntomodulin-mono-PEG tinh khiết (SEQ ID NO.24) phản ứng với vùng Fc của globulin miễn dịch theo tỷ lệ mol bằng 1 : 5 với nồng độ protein bằng 20mg/mL ở nhiệt độ 4°C trong 16 giờ. Tại cùng thời điểm, thực hiện phản ứng này trong dung dịch đệm kali phosphat 100mM (pH = 6,0) và bổ sung chất khử SCB 20mM vào hỗn hợp phản ứng. Sau khi kết thúc phản ứng, tiêm hỗn hợp phản ứng vào hệ thống SOURCE 15Q (cột: SOURCE 15Q, tốc độ dòng: 2,0mL/phút, gradient: A 0 → 4%

1 phút B → 20% 80 phút B(A: Tris-HCl 20mM, pH = 7,5, B: A + NaCl 1M)) (Fig.9b) và hệ thống Source ISO (cột: SOURCE ISO, tốc độ dòng: 2,0mL/phút, gradient: B 0 → 100% 100 phút A, (A: Tris-HCl 20mM, pH = 7,5, B: A + AS 1,1M)) (Fig.9c) để tinh chế thể tiếp hợp chứa dẫn xuất oxyntomodulin (SEQ ID NO.24) và vùng Fc của globulin miễn dịch. Fig.9b là đồ thị thể hiện kết quả tinh chế thể tiếp hợp chứa dẫn xuất oxyntomodulin (SEQ ID NO.24) và vùng Fc của globulin miễn dịch bằng cột tinh chế SOURCE 15Q, và Fig.9c là đồ thị thể hiện kết quả tinh chế thể tiếp hợp chứa dẫn xuất oxyntomodulin (SEQ ID NO.24) và vùng Fc của globulin miễn dịch bằng cột tinh chế Source ISO.

#### Ví dụ 12

Quy trình bào chế thể tiếp hợp chứa dẫn xuất oxyntomodulin (SEQ ID NO.25) và vùng Fc của globulin miễn dịch

Trước tiên, để gắn PEG vào gốc xystein ở vị trí số 30 trên trình tự axit amin của dẫn xuất oxyntomodulin (SEQ ID NO.25) bằng PEG MAL-10K-ALD, cho dẫn xuất oxyntomodulin (SEQ ID NO.25) phản ứng với PEG MAL-10K-ALD theo tỷ lệ mol bằng 1 : 3 với nồng độ protein bằng 3mg/mL ở nhiệt phòng trong 3 giờ. Tại cùng thời điểm, thực hiện phản ứng này trong dung dịch đệm Tris 50mM (pH = 8,0) và bổ sung guanidin 1M vào. Sau khi kết thúc phản ứng, tiêm hỗn hợp phản ứng vào hệ thống SOURCE S để tinh chế dẫn xuất oxyntomodulin chứa gốc xystein đã được mono-pegyl hóa này (cột: SOURCE S, tốc độ dòng: 2,0mL/phút, gradient: A 0 → 100% 50 phút B (A: Na-xitrat 20mM, pH = 3,0 + etanol 45%, B: A + KCl 1M)). Fig.10a là đồ thị thể hiện kết quả tinh chế dẫn xuất oxyntomodulin-mono-PEG (SEQ ID NO.25) bằng cột tinh chế SOURCE S.

Tiếp theo, cho dẫn xuất oxyntomodulin-mono-PEG tinh khiết (SEQ ID NO.25) phản ứng với vùng Fc của globulin miễn dịch theo tỷ lệ mol bằng 1 : 5 với nồng độ protein bằng 20mg/mL ở nhiệt độ 4°C trong 16 giờ. Tại cùng thời điểm, thực hiện phản ứng này trong dung dịch đệm kali phosphat 100mM (pH = 6,0) và bổ sung chất khử SCB 20mM vào hỗn hợp phản ứng. Sau khi kết thúc phản ứng, tiêm hỗn hợp phản ứng vào hệ thống SOURCE 15Q (cột: SOURCE 15Q, tốc độ dòng: 2,0mL/phút, gradient: A 0 → 4% 1 phút B → 20% 80 phút B(A: Tris-HCl 20mM, pH = 7,5, B: A + NaCl 1M)) (Fig.10b) và hệ thống Source ISO (cột: SOURCE ISO, tốc độ dòng: 2,0mL/phút, gradient: B 0 →

100% 100 phút A, (A: Tris-HCl 20mM, pH = 7,5, B: A + AS 1,1M)) (Fig.10c) để tinh chế thể tiếp hợp chứa dẫn xuất oxyntomodulin (SEQ ID NO.25) và vùng Fc của globulin miễn dịch. Fig.10b là đồ thị thể hiện kết quả tinh chế thể tiếp hợp chứa dẫn xuất oxyntomodulin (SEQ ID NO.25) và vùng Fc của globulin miễn dịch bằng cột tinh chế SOURCE 15Q, và Fig.10c là đồ thị thể hiện kết quả tinh chế thể tiếp hợp chứa dẫn xuất oxyntomodulin (SEQ ID NO.25) và vùng Fc của globulin miễn dịch bằng cột tinh chế Source ISO.

### Ví dụ 13

Quy trình bào chế thể tiếp hợp chứa dẫn xuất oxyntomodulin (SEQ ID NO.28) và vùng Fc của globulin miễn dịch

Trước tiên, để gắn PEG vào gốc lysin ở vị trí số 20 trên trình tự axit amin của dẫn xuất oxyntomodulin (SEQ ID NO.28) bằng PEG MAL-10K-ALD, cho dẫn xuất oxyntomodulin (SEQ ID NO.28) phản ứng với PEG MAL-10K-ALD theo tỷ lệ mol bằng 1 : 5 với nồng độ protein bằng 3mg/mL ở nhiệt độ 4°C trong 3 giờ. Tại cùng thời điểm, thực hiện phản ứng này trong dung dịch đệm Na-Borat 50mM (pH = 9,0) và bổ sung guanidini 2M vào. Sau khi kết thúc phản ứng, tiêm hỗn hợp phản ứng vào hệ thống SOURCE S để tinh chế dẫn xuất oxyntomodulin chứa gốc lysin đã được mono-pegyl hóa này (cột: SOURCE S, tốc độ dòng: 2,0mL/phút, gradient: A 0 → 3% 1 phút B → 40% 222 phút B (A: Na-xitrat 20mM, pH = 3,0 + etanol 45%, B: A + KCl 1M)). Fig.11a là đồ thị thể hiện kết quả tinh chế dẫn xuất oxyntomodulin-mono-PEG (SEQ ID NO.28) bằng cột tinh chế SOURCE S.

Tiếp theo, cho dẫn xuất oxyntomodulin-mono-PEG tinh khiết (SEQ ID NO.28) phản ứng với vùng Fc của globulin miễn dịch theo tỷ lệ mol bằng 1 : 10 với nồng độ protein bằng 20mg/mL ở nhiệt độ 4°C trong 16 giờ. Tại cùng thời điểm, thực hiện phản ứng này trong dung dịch đệm kali phosphat 100mM (pH = 6,0) và bổ sung chất khử SCB 20mM vào hỗn hợp phản ứng. Sau khi kết thúc phản ứng, tiêm hỗn hợp phản ứng vào hệ thống SOURCE 15Q (cột: SOURCE 15Q, tốc độ dòng: 2,0mL/phút, gradient: A 0 → 4% 1 phút B → 20% 80 phút B (A: Tris-HCl 20mM, pH = 7,5, B: A + NaCl 1M)) (FIG.11b) và hệ thống Source ISO (cột: SOURCE ISO, tốc độ dòng: 2,0mL/phút, gradient: B 0 → 100% 100 phút A, (A: Tris-HCl 20mM, pH = 7,5, B: A + AS 1,1M)) (FIG.11c) để tinh

chế thể tiếp hợp chứa dẫn xuất oxyntomodulin (SEQ ID NO.28) và vùng Fc của globulin miễn dịch. Fig.11b là đồ thị thể hiện kết quả tinh chế thể tiếp hợp chứa dẫn xuất oxyntomodulin (SEQ ID NO.28) và vùng Fc của globulin miễn dịch bằng cột tinh chế SOURCE 15Q, và Fig.11c là đồ thị thể hiện kết quả tinh chế thể tiếp hợp chứa dẫn xuất oxyntomodulin (SEQ ID NO.28) và vùng Fc của globulin miễn dịch bằng cột tinh chế Source ISO.

#### Ví dụ 14

Quy trình bào chế thể tiếp hợp chứa dẫn xuất oxyntomodulin (SEQ ID NO.32) và vùng Fc của globulin miễn dịch

Trước tiên, để gắn PEG vào gốc xystein ở vị trí số 30 trên trình tự axit amin của dẫn xuất oxyntomodulin (SEQ ID NO.32) bằng PEG MAL-10K-ALD, cho dẫn xuất oxyntomodulin (SEQ ID NO.32) phản ứng với PEG MAL-10K-ALD theo tỷ lệ mol bằng 1 : 3 với nồng độ protein bằng 1mg/mL ở nhiệt phòng trong 3 giờ. Tại cùng thời điểm, thực hiện phản ứng này trong dung dịch đệm Tris 50mM (pH = 8,0) và bổ sung guanidin 2M vào. Sau khi kết thúc phản ứng, tiêm hỗn hợp phản ứng vào hệ thống SOURCE S để tinh chế dẫn xuất oxyntomodulin chứa gốc xystein đã được mono-pegyl hóa này (cột: SOURCE S, tốc độ dòng: 2,0mL/phút, gradient: A 0 → 100% 50 phút B (A: Na-xitrat 20mM, pH = 3,0 + etanol 45%, B: A + KCl 1M)).

Tiếp theo, cho dẫn xuất oxyntomodulin-mono-PEG tinh khiết (SEQ ID NO.32) phản ứng với vùng Fc của globulin miễn dịch theo tỷ lệ mol bằng 1 : 8 với nồng độ protein bằng 20mg/mL ở nhiệt độ 4°C trong 16 giờ. Tại cùng thời điểm, thực hiện phản ứng này trong dung dịch đệm kali phosphat 100mM (pH = 6,0) và bổ sung chất khử SCB 20mM vào hỗn hợp phản ứng. Sau khi kết thúc phản ứng, tiêm hỗn hợp phản ứng vào hệ thống SOURCE 15Q (cột: SOURCE 15Q, tốc độ dòng: 2,0mL/phút, gradient: A 0 → 4% 1 phút B → 20% 80 phút B(A: Tris-HCl 20mM, pH = 7,5, B: A + NaCl 1M)) và hệ thống Source ISO (cột: SOURCE ISO, tốc độ dòng: 2,0mL/phút, gradient: B 0 → 100% 100 phút A, (A: Tris-HCl 20mM, pH = 7,5, B: A + AS 1,1M)) để tinh chế thể tiếp hợp chứa dẫn xuất oxyntomodulin (SEQ ID NO.32) và vùng Fc của globulin miễn dịch.

#### Ví dụ 15

Quy trình bào chế thể tiếp hợp chứa dẫn xuất oxyntomodulin (SEQ ID NO.33) và vùng Fc của globulin miễn dịch

Trước tiên, để gắn PEG vào gốc xystein ở vị trí số 30 trên trình tự axit amin của dẫn xuất oxyntomodulin (SEQ ID NO.33) bằng PEG MAL-10K-ALD, cho dẫn xuất oxyntomodulin (SEQ ID NO.33) phản ứng với PEG MAL-10K-ALD theo tỷ lệ mol bằng 1 : 1 với nồng độ protein bằng 1mg/mL ở nhiệt phòng trong 3 giờ. Tại cùng thời điểm, thực hiện phản ứng này trong dung dịch đệm Tris 50mM (pH = 8,0) và bổ sung guanidin 2M vào. Sau khi kết thúc phản ứng, tiêm hỗn hợp phản ứng vào hệ thống SOURCE S để tinh chế dẫn xuất oxyntomodulin chứa gốc xystein đã được mono-pegyl hóa này (cột: SOURCE S, tốc độ dòng: 2,0mL/phút, gradient: A 0 → 100% 50 phút B (A: Na-xitrat 20mM, pH = 3,0 + etanol 45%, B: A + KCl 1M)).

Tiếp theo, cho dẫn xuất oxyntomodulin-mono-PEG tinh khiết (SEQ ID NO.33) phản ứng với vùng Fc của globulin miễn dịch theo tỷ lệ mol bằng 1 : 5 với nồng độ protein bằng 20mg/mL ở nhiệt độ 4°C trong 16 giờ. Tại cùng thời điểm, thực hiện phản ứng này trong dung dịch đệm kali phosphat 100mM (pH = 6,0) và bổ sung chất khử SCB 20mM vào hỗn hợp phản ứng. Sau khi kết thúc phản ứng, tiêm hỗn hợp phản ứng vào hệ thống SOURCE 15Q (cột: SOURCE 15Q, tốc độ dòng: 2,0mL/phút, gradient: A 0 → 4% 1 phút B → 20% 80 phút B(A: Tris-HCl 20mM, pH = 7,5, B: A + NaCl 1M)) và hệ thống Source ISO (cột: SOURCE ISO, tốc độ dòng: 2,0mL/phút, gradient: B 0 → 100% 100 phút A, (A: Tris-HCl 20mM, pH = 7,5, B: A + AS 1,1M)) để tinh chế thể tiếp hợp chứa dẫn xuất oxyntomodulin (SEQ ID NO.33) và vùng Fc của globulin miễn dịch.

#### Ví dụ 16

Quy trình bào chế thể tiếp hợp chứa dẫn xuất oxyntomodulin (SEQ ID NO.34) và vùng Fc của globulin miễn dịch

Trước tiên, để gắn PEG vào gốc xystein ở vị trí số 30 trên trình tự axit amin của dẫn xuất oxyntomodulin (SEQ ID NO.34) bằng PEG MAL-10K-ALD, cho dẫn xuất oxyntomodulin (SEQ ID NO.34) phản ứng với PEG MAL-10K-ALD theo tỷ lệ mol bằng 1 : 1 với nồng độ protein bằng 3mg/mL ở nhiệt phòng trong 3 giờ. Tại cùng thời điểm, thực hiện phản ứng này trong dung dịch đệm Tris 50mM (pH = 8,0) và bổ sung guanidin

1M vào. Sau khi kết thúc phản ứng, tiêm hỗn hợp phản ứng vào hệ thống SOURCE S để tinh chế dẫn xuất oxyntomodulin chứa gốc cystein đã được mono-pegyl hóa này (cột: SOURCE S, tốc độ dòng: 2,0mL/phút, gradient: A 0 → 100% 50 phút B (A: Na-xitrat 20mM, pH = 3,0 + etanol 45%, B: A + KCl 1M)).

Tiếp theo, cho dẫn xuất oxyntomodulin-mono-PEG tinh khiết (SEQ ID NO.34) phản ứng với vùng Fc của globulin miễn dịch theo tỷ lệ mol bằng 1 : 5 với nồng độ protein bằng 20mg/mL ở nhiệt độ 4°C trong 16 giờ. Tại cùng thời điểm, thực hiện phản ứng này trong dung dịch đệm kali phosphat 100mM (pH = 6,0) và bổ sung chất khử SCB 20mM vào hỗn hợp phản ứng. Sau khi kết thúc phản ứng, tiêm hỗn hợp phản ứng vào hệ thống SOURCE 15Q (cột: SOURCE 15Q, tốc độ dòng: 2,0mL/phút, gradient: A 0 → 4% 1 phút B → 20% 80 phút B(A: Tris-HCl 20mM, pH = 7,5, B: A + NaCl 1M)) và hệ thống Source ISO (cột: SOURCE ISO, tốc độ dòng: 2,0mL/phút, gradient: B 0 → 100% 100 phút A, (A: Tris-HCl 20mM, pH = 7,5, B: A + AS 1,1M)) để tinh chế thể tiếp hợp chứa dẫn xuất oxyntomodulin (SEQ ID NO.34) và vùng Fc của globulin miễn dịch.

#### Ví dụ 17

Hoạt tính in vitro của thể tiếp hợp chứa dẫn xuất oxyntomodulin và vùng Fc của globulin miễn dịch

Để đánh giá hiệu lực chống béo phì của các thể tiếp hợp chứa oxyntomodulin hoặc dẫn xuất oxyntomodulin và vùng Fc của globulin miễn dịch được bào chế theo các ví dụ nêu trên, thực hiện các thử nghiệm đánh giá theo phương pháp như được mô tả trong Ví dụ 2-2.

Cụ thể, nuôi cấy cấp hai từng dòng tế bào đã được chuyển nạp được bào chế theo ví dụ 1-1 và ví dụ 1-2 hai hoặc ba lần trong thời gian một tuần, và cấy chuyển vào đĩa 96-giếng ở mật độ bằng  $1 \times 10^5$ , sau đó nuôi cấy trong 24 giờ. Rửa từng dòng tế bào đã được chuyển nạp và nuôi cấy này bằng dung dịch đệm KRB, tạo hỗn dịch trong 40mL dung dịch đệm KRB chứa 1mM IBMX, và để ở nhiệt độ phòng trong 5 phút. Pha loãng liên tiếp theo tỷ lệ 5 lần GLP-1, glucagon, và các thể tiếp hợp chứa dẫn xuất oxyntomodulin (SEQ ID NO.23, 24, 25, 32, 33 hoặc 34) và vùng Fc của globulin miễn dịch từ nồng độ 1000nM đến nồng độ 0,02nM, và bổ sung 40mL từng dịch pha loãng này

vào từng dòng tế bào đã được chuyển nạp, và nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C trong 1 giờ trong tủ nuôi cấy CO<sub>2</sub>. Sau đó, bổ sung 20ml dung dịch đệm ly giải tế bào, và sử dụng dịch ly giải tế bào để định lượng nồng độ AMP mạch vòng bằng kit định lượng cAMP (Molecular Device, USA) bằng cách sử dụng Victor (Perkin Elmer, USA). Trị số EC<sub>50</sub> được định lượng, và so sánh với nhau (Bảng 3).

Bảng 3

Hoạt tính *in vitro* của các thể tiếp hợp chứa dẫn xuất oxyntomodulin và vùng Fc của globulin miễn dịch

| SEQ ID NO.                                                                                                                  | EC <sub>50</sub> (nM) |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|-----------|
|                                                                                                                             | CHO/GLP-1R            | CHO/GCGR  |
| GLP-1                                                                                                                       | 1,7±0,82              | > 1000    |
| Glucagon                                                                                                                    | >1000                 | 1,7 ±1,69 |
| Thể tiếp hợp chứa dẫn xuất oxyntomodulin có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.23 và vùng Fc của globulin miễn dịch | 5,4                   | 15,8      |
| Thể tiếp hợp chứa dẫn xuất oxyntomodulin có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.24 và vùng Fc của globulin miễn dịch | 8,4                   | 76,8      |
| Thể tiếp hợp chứa dẫn xuất oxyntomodulin có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.25 và vùng Fc của globulin miễn dịch | 5,5                   | 9,4       |
| Thể tiếp hợp chứa dẫn xuất oxyntomodulin có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.32 và vùng Fc của globulin miễn dịch | 68,7                  | 11,9      |
| Thể tiếp hợp chứa dẫn xuất oxyntomodulin có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.33 và vùng Fc của globulin miễn dịch | 11,7                  | 85,9      |
| Thể tiếp hợp chứa dẫn xuất oxyntomodulin có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.34 và vùng Fc của globulin miễn dịch | 168,0                 | 8,0       |

Như được thể hiện trên Bảng 3, các thể tiếp hợp chứa dẫn xuất oxyntomodulin và vùng Fc của globulin miễn dịch có hoạt tính *in vitro* đối với cả thụ thể GLP-1 lẫn thụ thể glucagon.

#### Ví dụ 18

Hoạt tính *in vivo* của các thể tiếp hợp chứa dẫn xuất oxyntomodulin và vùng Fc của globulin miễn dịch

Thử nghiệm này được thực hiện để kiểm chứng liệu các thể tiếp hợp chứa dẫn xuất oxyntomodulin và vùng Fc của globulin miễn dịch có tác dụng làm giảm trọng lượng cơ

thể *in vivo* hay không.

Cụ thể, chuột C57BL/6 6 tuần tuổi thông thường được cho ăn theo chế độ dinh dưỡng giàu chất béo năng lượng cao (60kcal) trong 24 tuần để tăng trọng lượng cơ thể trung bình lên đến khoảng 50g, và tiêm dưới da bằng các thể tiếp hợp chứa dẫn xuất oxyntomodulin (SEQ ID NO.23, SEQ ID NO.24 hoặc SEQ ID NO.25) và vùng Fc của globulin miễn dịch ở liều bằng 0,03 hoặc 0,06 mg/kg/tuần trong 3 tuần. Sau đó, sự biến đổi về trọng lượng cơ thể của chuột đã được đánh giá. Fig.12 và Fig.13 là biểu đồ thể hiện sự biến đổi về trọng lượng cơ thể của chuột theo dạng và liều lượng của các thể tiếp hợp chứa dẫn xuất oxyntomodulin và vùng Fc của globulin miễn dịch. Như được thể hiện trên Fig.12 và Fig.13, khi liều lượng của các thể tiếp hợp chứa dẫn xuất oxyntomodulin và vùng Fc của globulin miễn dịch tăng, trọng lượng cơ thể của chuột đã giảm theo tỷ lệ thuận, mặc dù có sự khác biệt giữa các thể tiếp hợp chứa dẫn xuất oxyntomodulin và vùng Fc của globulin miễn dịch, nhưng kết quả thử nghiệm này cho thấy các thể tiếp hợp chứa dẫn xuất oxyntomodulin và vùng Fc của globulin miễn dịch theo sáng chế có tác dụng làm giảm trọng lượng cơ thể theo phương thức phụ thuộc liều.

## YÊU CẦU BẢO HỘ

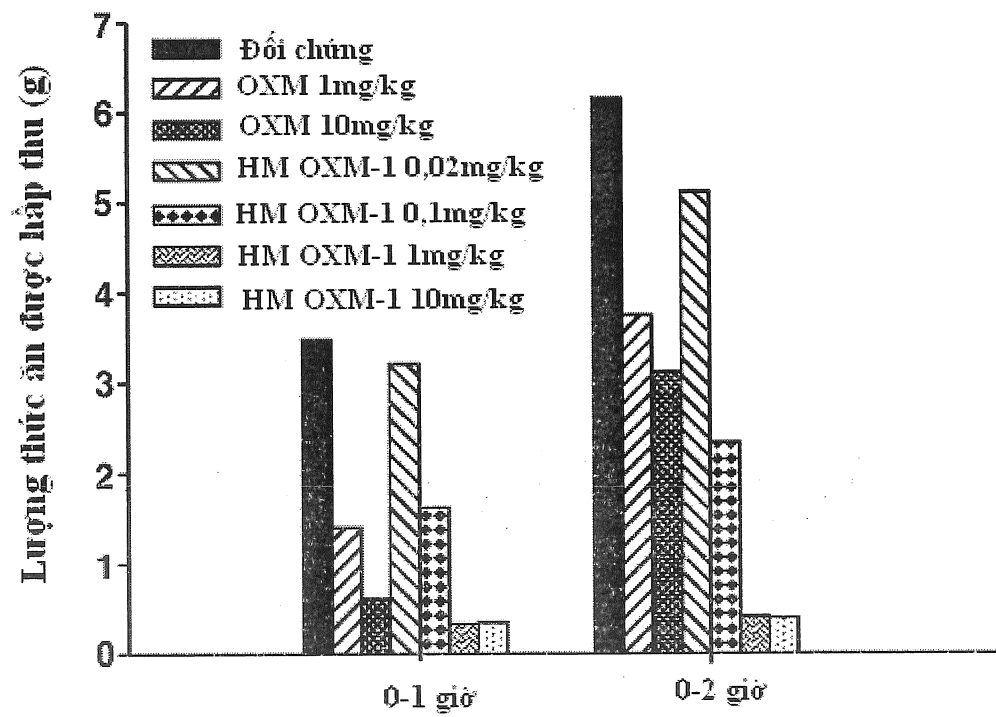
1. Thở tiếp hợp chứa dẫn xuất oxyntomodulin chứa trình tự axit amin như nêu trong trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO.32-34, SEQ ID NO.2-23, hoặc SEQ ID NO.27-31, vùng Fc của globulin miễn dịch, và polyme không peptidyl, trong đó polyme không peptidyl liên kết cộng hóa trị dẫn xuất oxyntomodulin với vùng Fc của globulin miễn dịch.
2. Thở tiếp hợp theo điểm 1, trong đó dẫn xuất oxyntomodulin có khả năng hoạt hóa thụ thể peptit tương tự glucagon-1 (GLP-1) và thụ thể glucagon.
3. Thở tiếp hợp theo điểm 1 hoặc 2, trong đó thở tiếp hợp này có tác dụng chống béo phì.
4. Thở tiếp hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó các axit amin ở vị trí 10 và vị trí 14, vị trí 12 và vị trí 16, vị trí 16 và vị trí 20, vị trí 20 và vị trí 24, hoặc vị trí 24 và vị trí 28 của dẫn xuất oxyntomodulin tạo thành cấu trúc mạch vòng.
5. Thở tiếp hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó polyme không peptidyl bao gồm polyetylen glycol, polypropylen glycol, copolyme của etylen glycol và propylen glycol, polyoxyetylpolyol, rượu polyvinyl, polysacarit, polyvinyl etyl ete, axit polylactic, axit polylactic-glycolic, polyme lipid, axit hyaluronic, hoặc hỗn hợp của chúng.
6. Thở tiếp hợp theo điểm 5, trong đó polyme không peptidyl là polyetylen glycol.
7. Thở tiếp hợp theo điểm 5, trong đó polysacarit là dextran, kitin hoặc hỗn hợp của chúng.
8. Thở tiếp hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó một đầu của polyme không peptidyl được liên kết với nhóm amin hoặc nhóm thiol của vùng Fc của globulin miễn dịch và đầu còn lại của polyme không peptidyl được liên kết với nhóm amin hoặc nhóm thiol của dẫn xuất oxyntomodulin.
9. Thở tiếp hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó polyme không peptidyl chứa nhóm chức phản ứng có khả năng liên kết với vùng Fc của globulin miễn dịch và dẫn xuất oxyntomodulin ở cả hai đầu.

10. Thẻ tiếp hợp theo điểm 9, trong đó nhóm chức phản ứng được chọn từ nhóm bao gồm aldehyt, propionaldehyt, butyraldehyt, maleimit, và succinimit.
11. Thẻ tiếp hợp theo điểm 9, trong đó các nhóm chức phản ứng ở cả hai đầu của polyme không peptidyl là giống hoặc khác nhau.
12. Thẻ tiếp hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó vùng Fc của globulin miễn dịch là vùng Fc không được glycosyl hóa.
13. Thẻ tiếp hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó vùng Fc của globulin miễn dịch được chọn từ nhóm bao gồm miền hằng định chuỗi nặng 1 (CH1), miền hằng định chuỗi nặng 2 (CH2), miền hằng định chuỗi nặng 3 (CH3) và miền hằng định chuỗi nặng 4 (CH4); miền hằng định chuỗi nặng 1 (CH1) và miền hằng định chuỗi nặng 2 (CH2); miền hằng định chuỗi nặng 1 (CH1) và miền hằng định chuỗi nặng 3 (CH3); miền hằng định chuỗi nặng 2 (CH2) và miền hằng định chuỗi nặng 3 (CH3); tổ hợp của một hoặc nhiều miền và vùng bản lề của globulin miễn dịch hoặc một phần của chúng; và dime của mỗi miền của vùng hằng định chuỗi nặng và vùng hằng định chuỗi nhẹ.
14. Thẻ tiếp hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó vùng Fc của globulin miễn dịch là dẫn xuất trong đó vùng có khả năng tạo liên kết disulfua được loại bỏ, một số gốc axit amin ở đầu N của vùng Fc tự nhiên được loại bỏ, gốc methionin được bổ sung vào ở đầu N của vùng Fc tự nhiên, vị trí gắn kết bổ thể được loại bỏ, hoặc vị trí có hoạt tính gây độc tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể được loại bỏ.
15. Thẻ tiếp hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó vùng Fc của globulin miễn dịch là vùng Fc có nguồn gốc từ globulin miễn dịch được chọn từ nhóm bao gồm globulin miễn dịch G (IgG), globulin miễn dịch A (IgA), globulin miễn dịch D (IgD), globulin miễn dịch E (IgE), và globulin miễn dịch M (IgM).
16. Thẻ tiếp hợp theo điểm 15, trong đó vùng Fc của globulin miễn dịch là vùng Fc của globulin miễn dịch G4 (IgG4).
17. Thẻ tiếp hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó vùng Fc của globulin miễn dịch là vùng Fc không được glycosyl hóa có nguồn gốc từ globulin miễn

dịch G4 của người (IgG4).

18. Dược phẩm chứa thể tiếp hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 17 để phòng ngừa hoặc điều trị chứng béo phì.

19. Dược phẩm theo điểm 18, trong đó dược phẩm này còn chứa chất mang dược dụng.



**Fig.1**

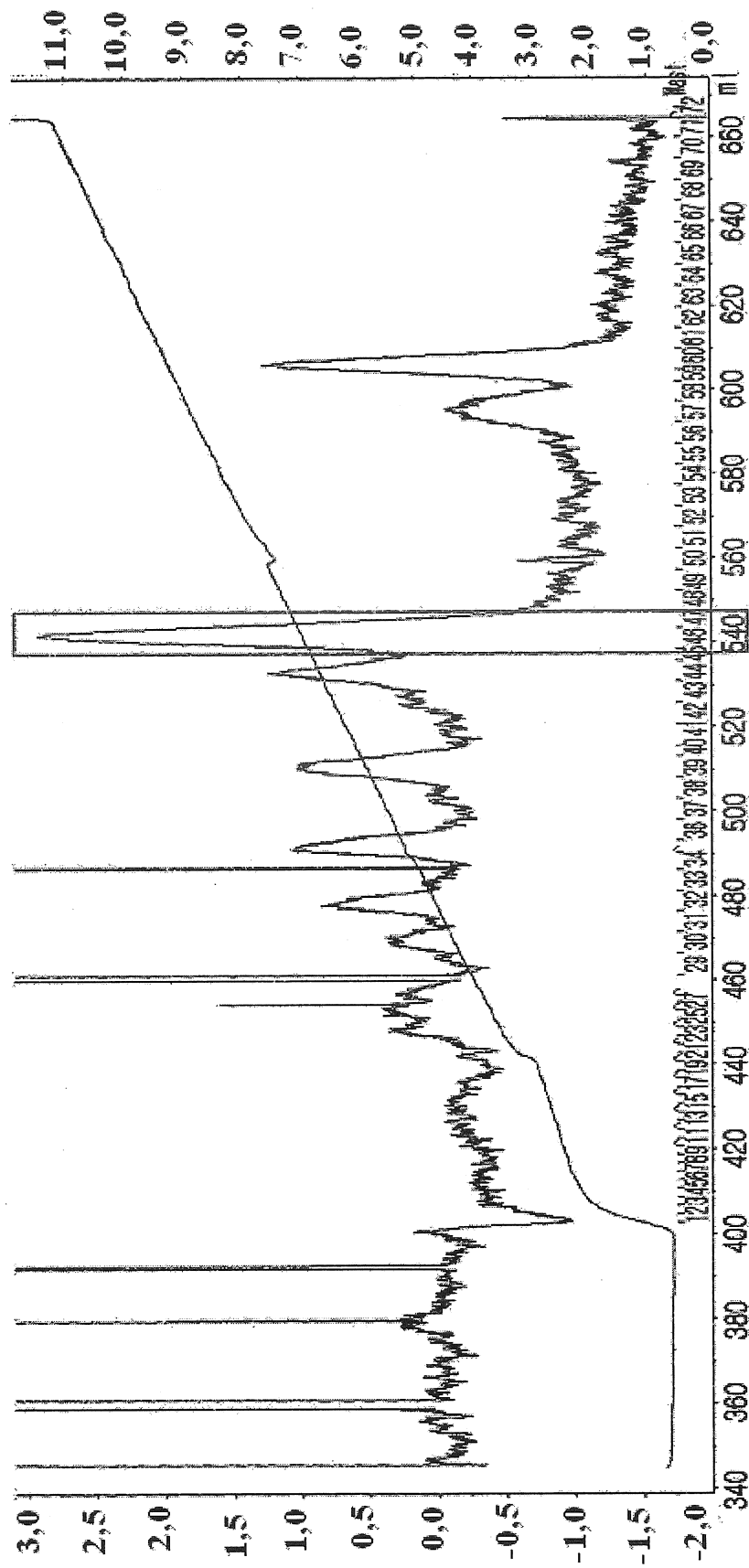


Fig. 2a

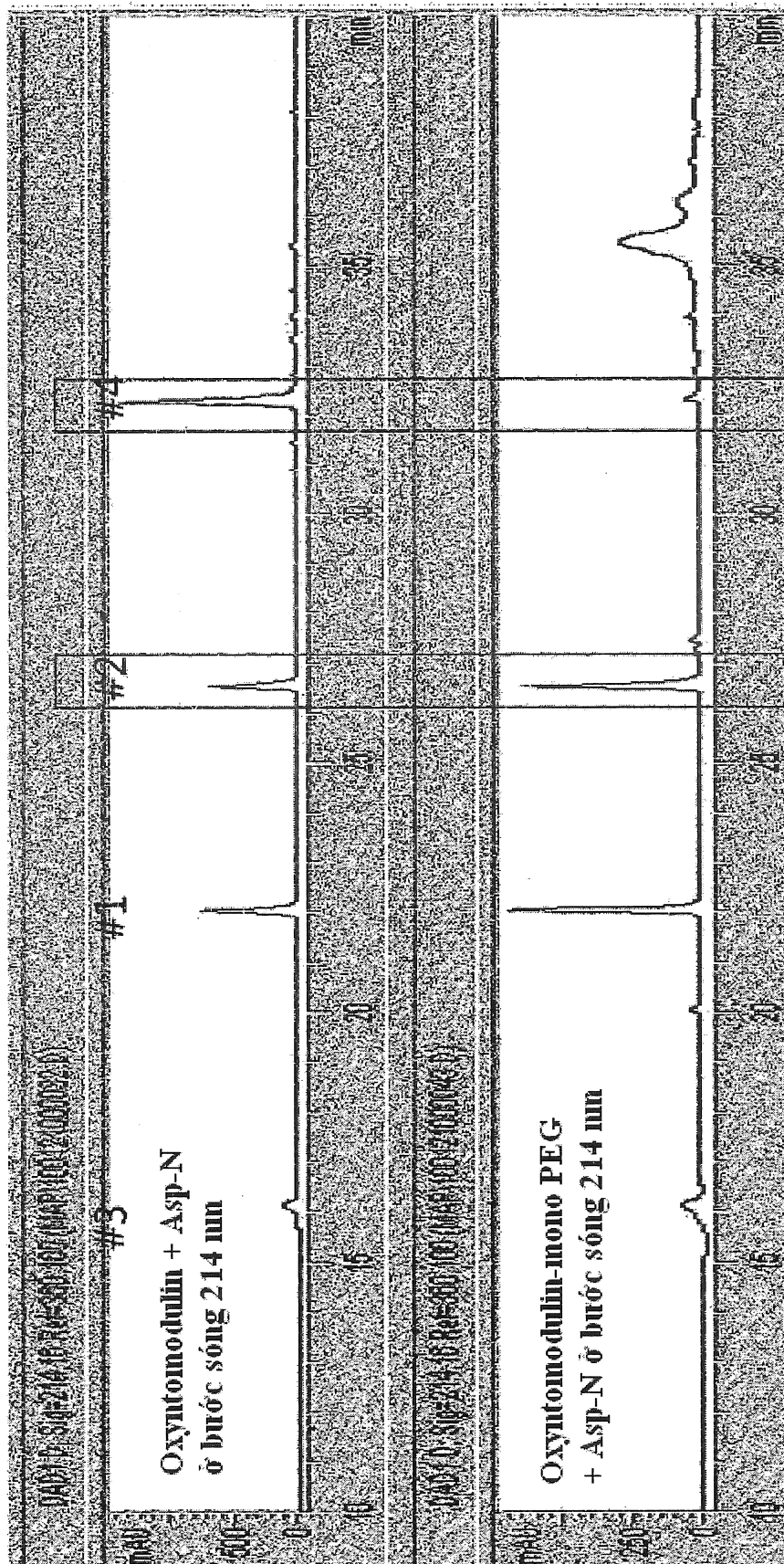


Fig.2b

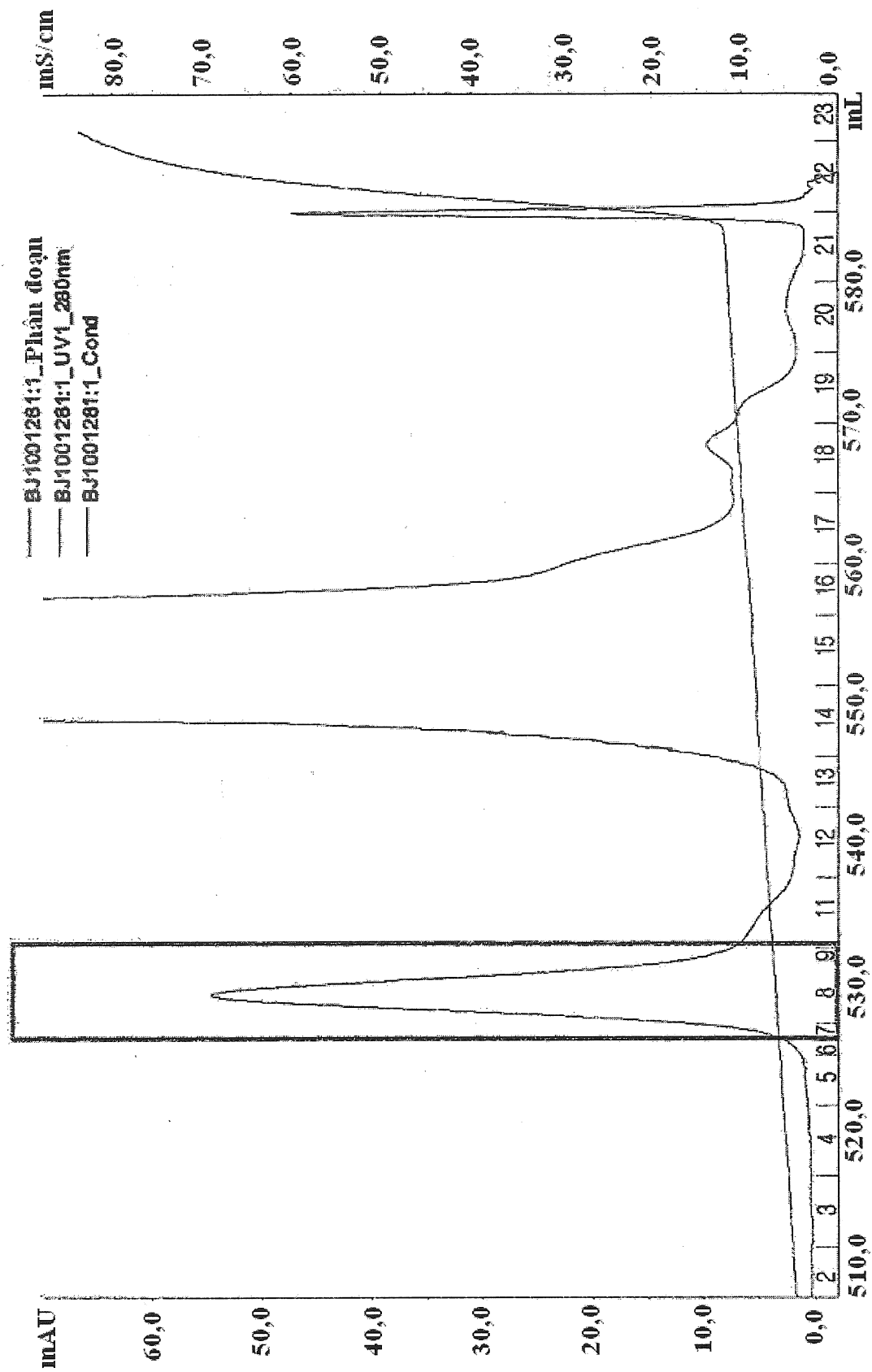


Fig.2c

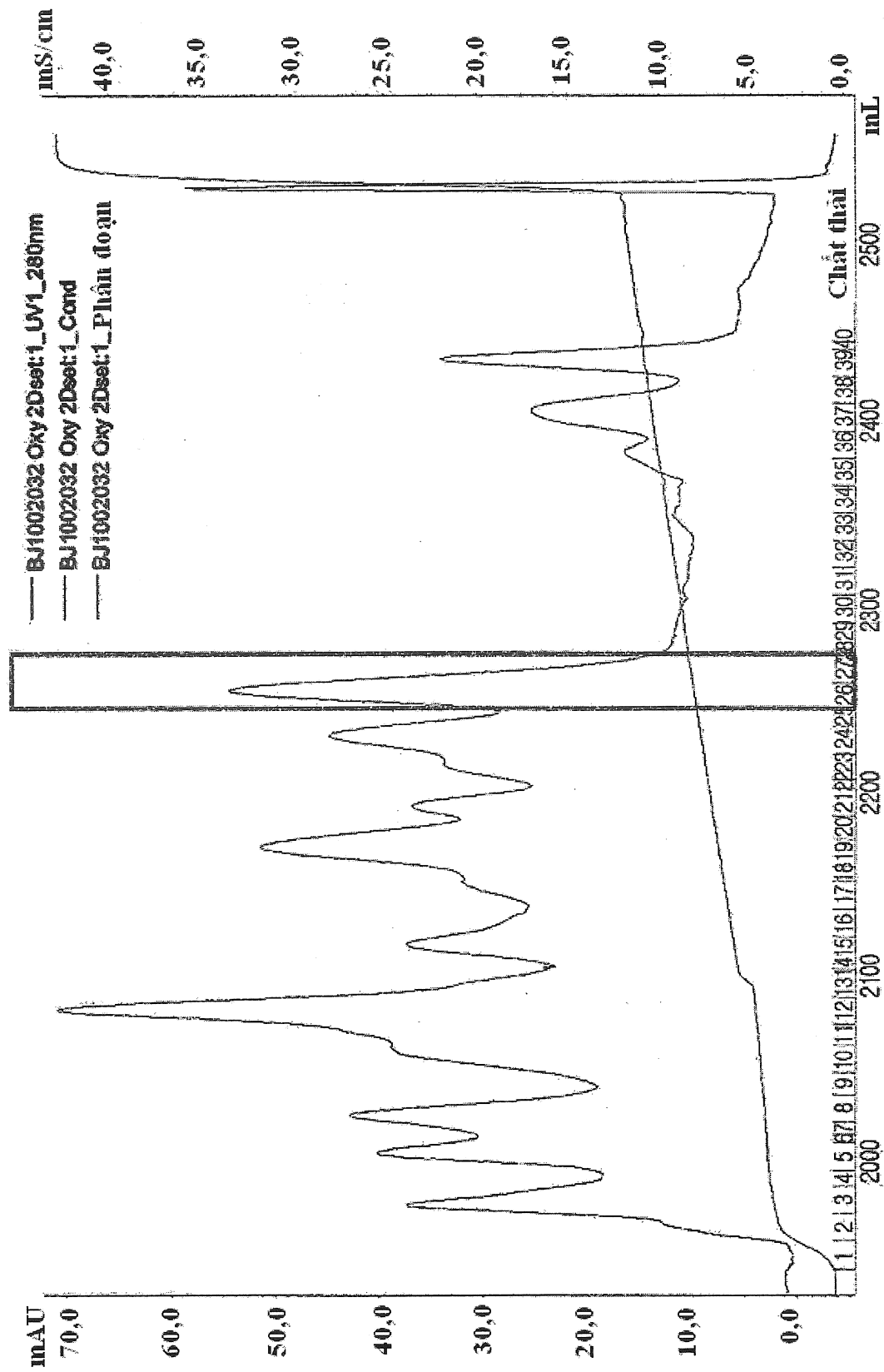


Fig.3a

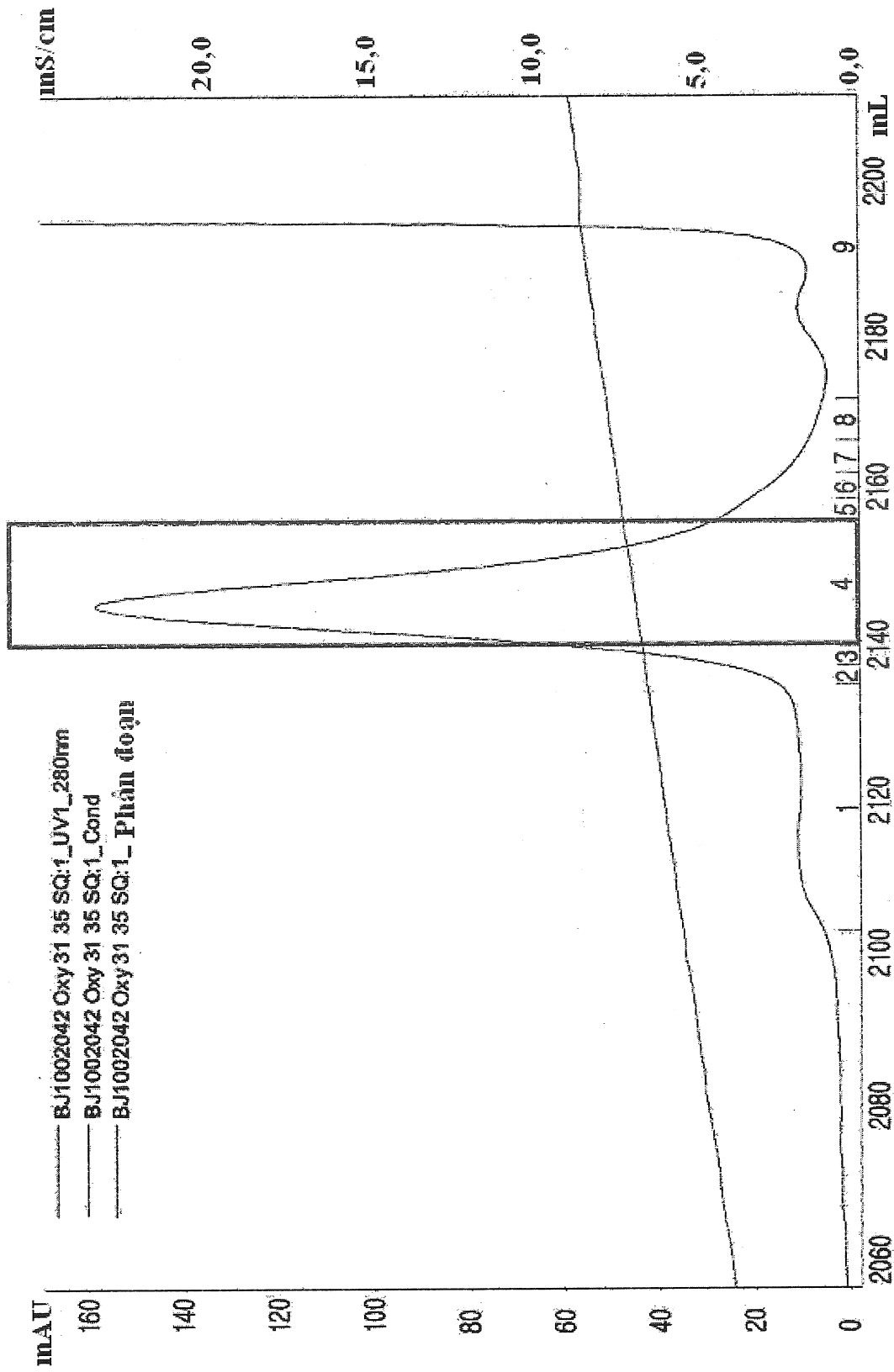
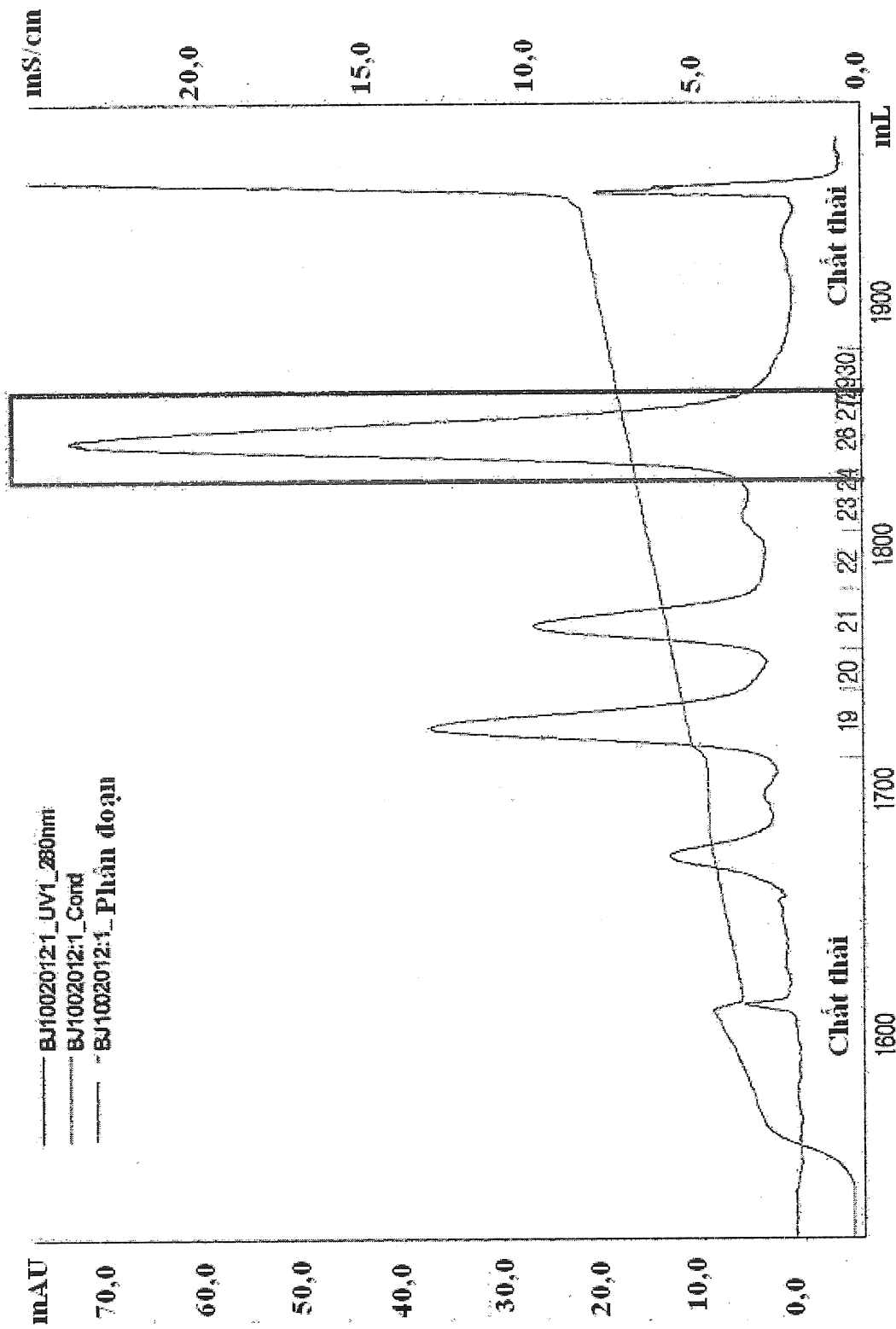
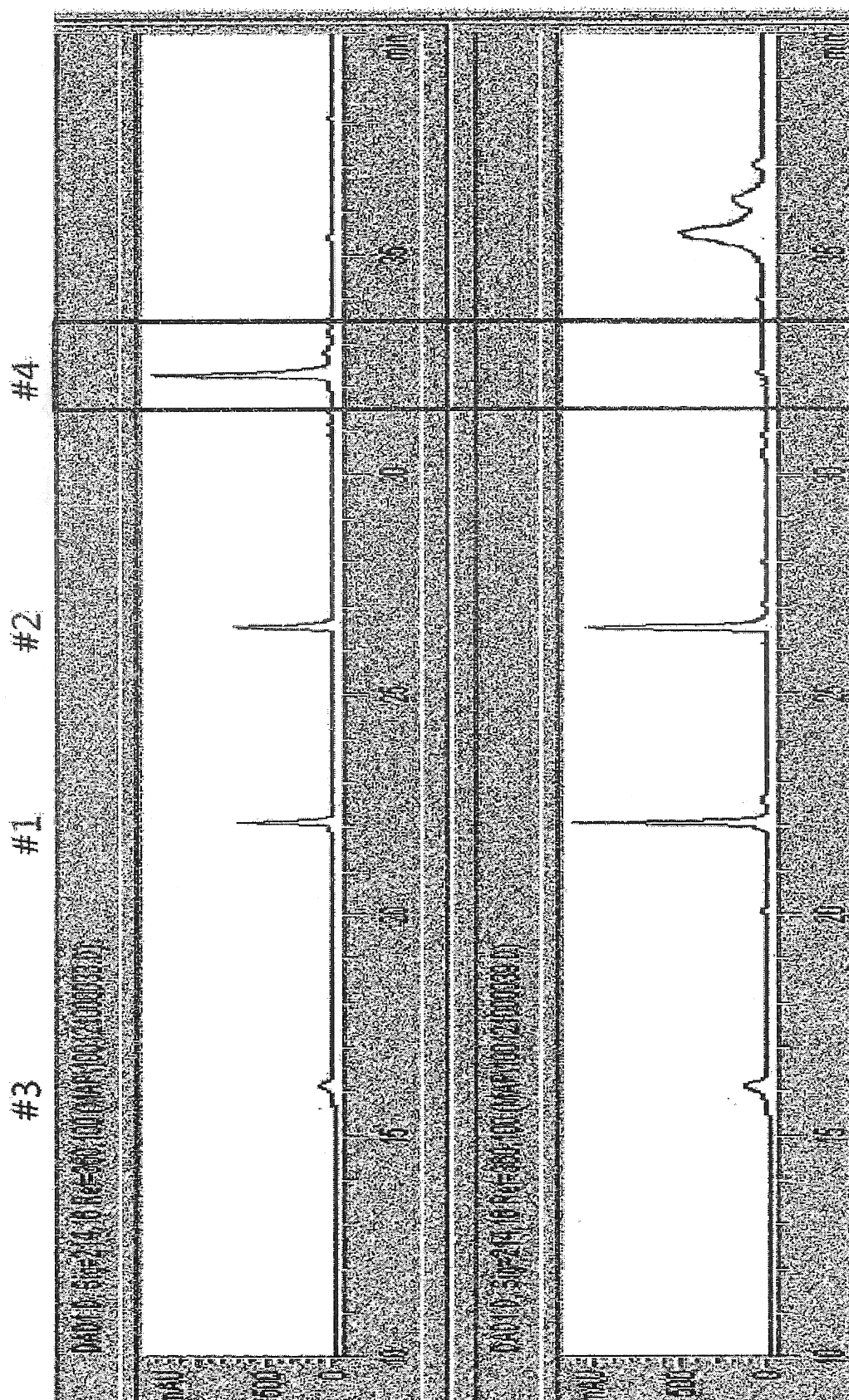


Fig.3b

**Fig.4a**

**Fig.4b**

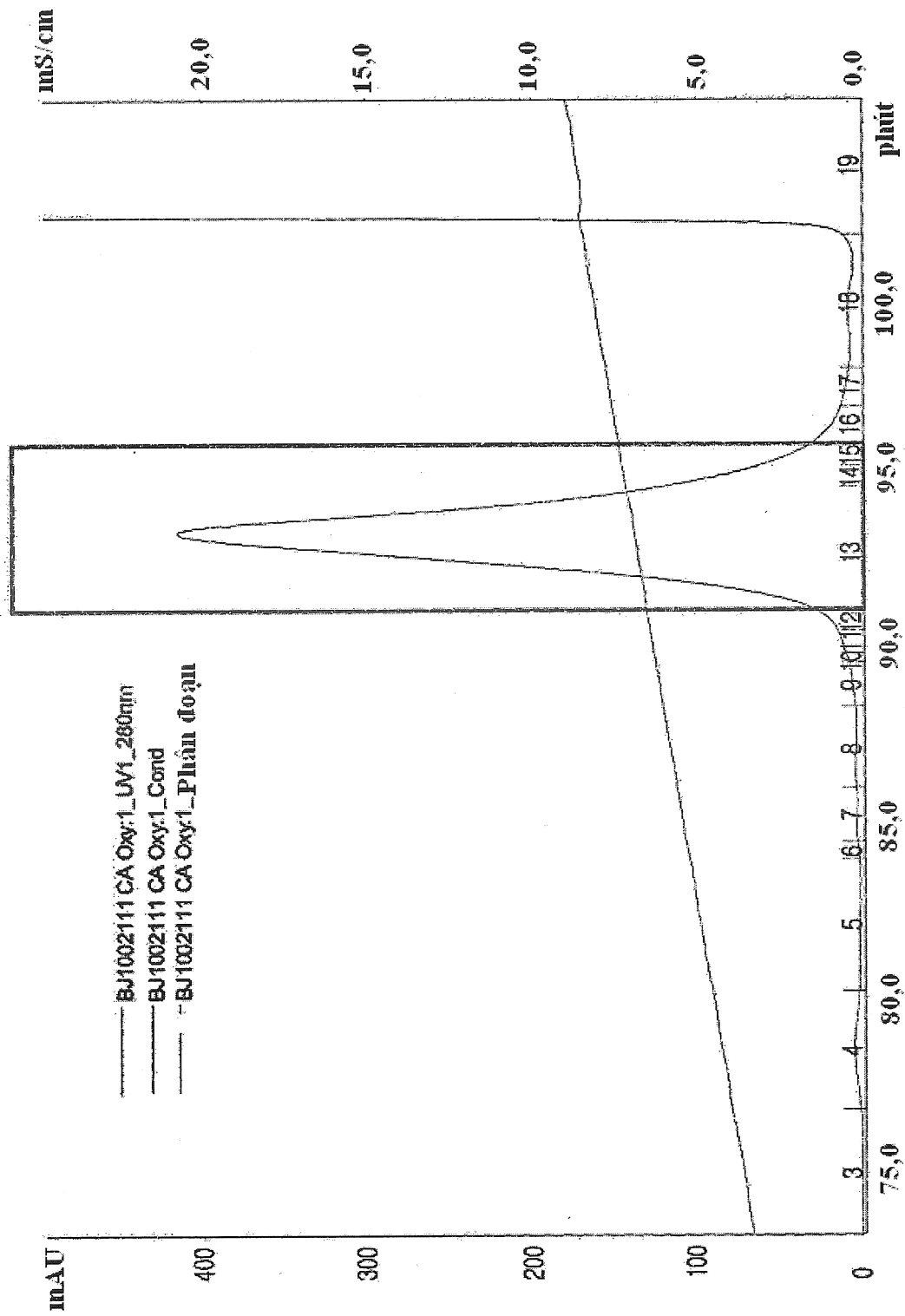


Fig.4c

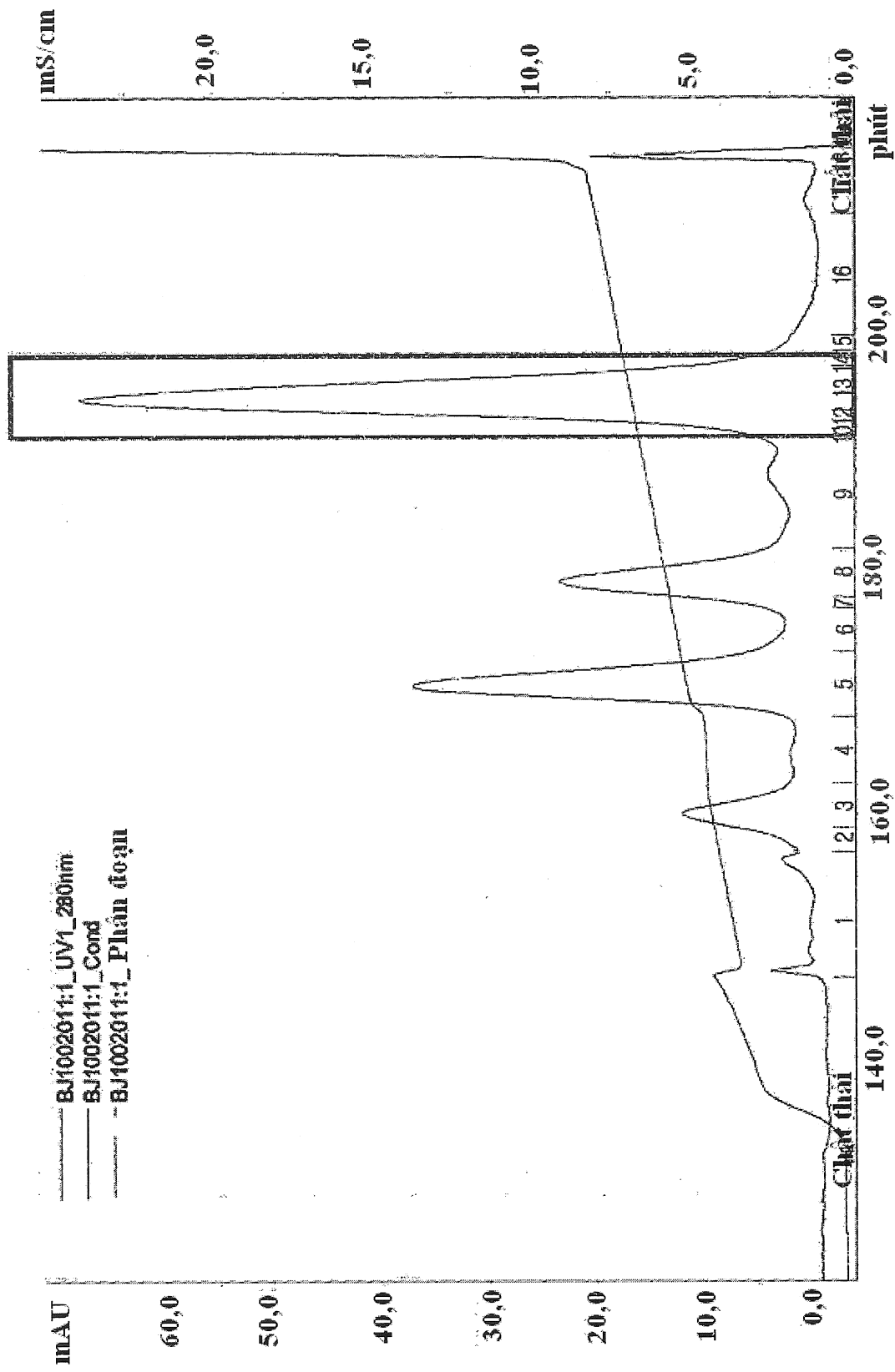


Fig.5a

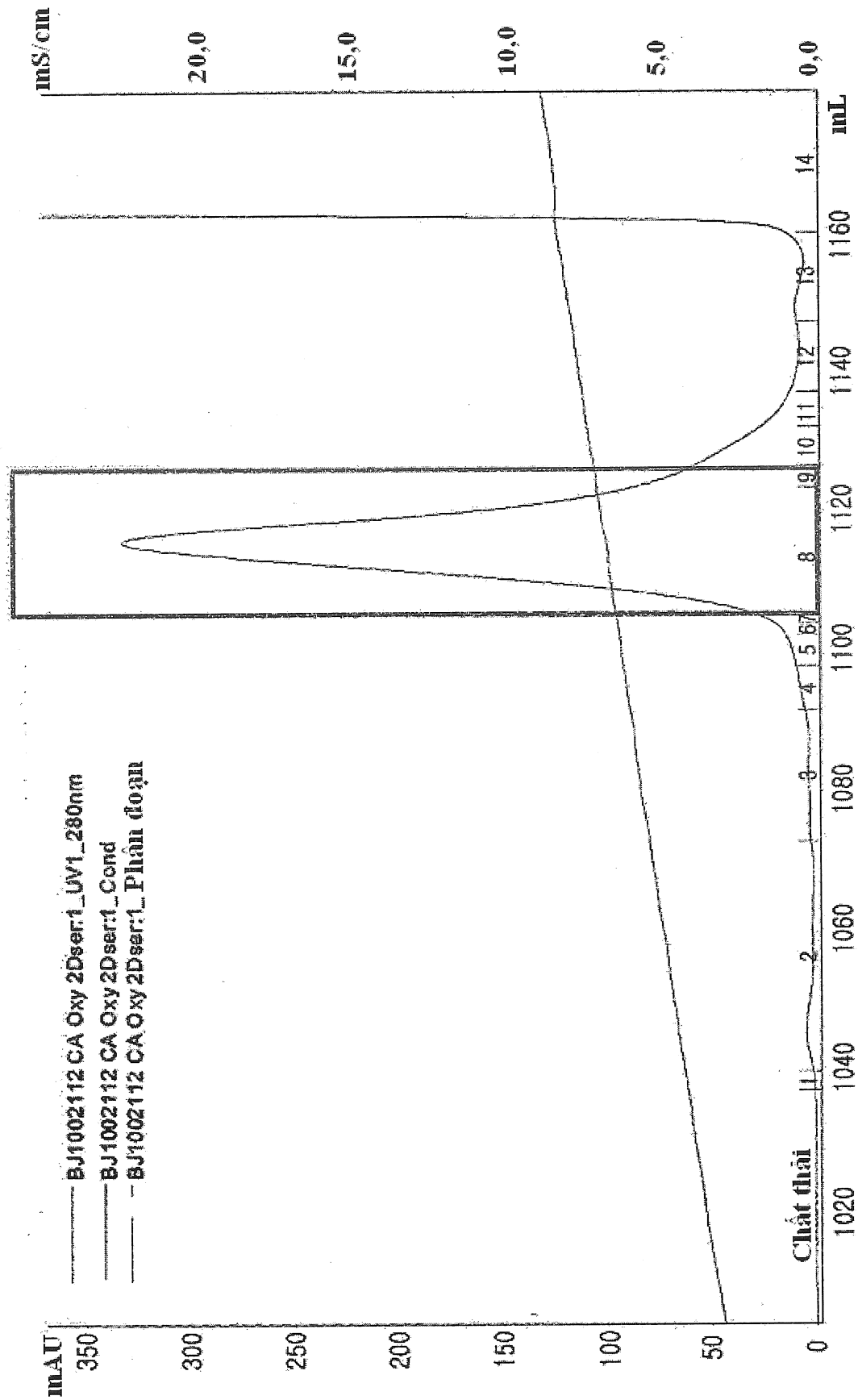


Fig.5b

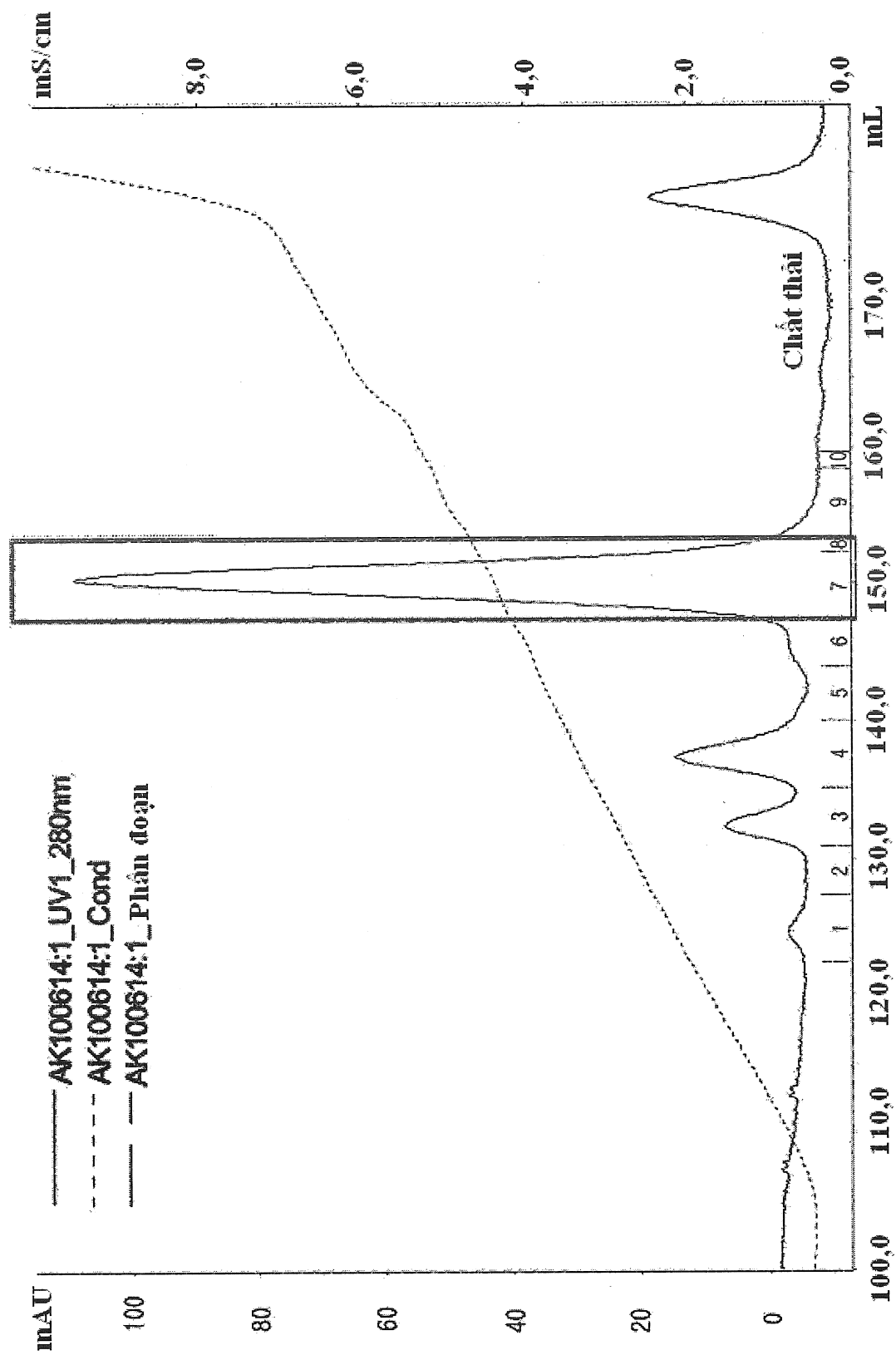
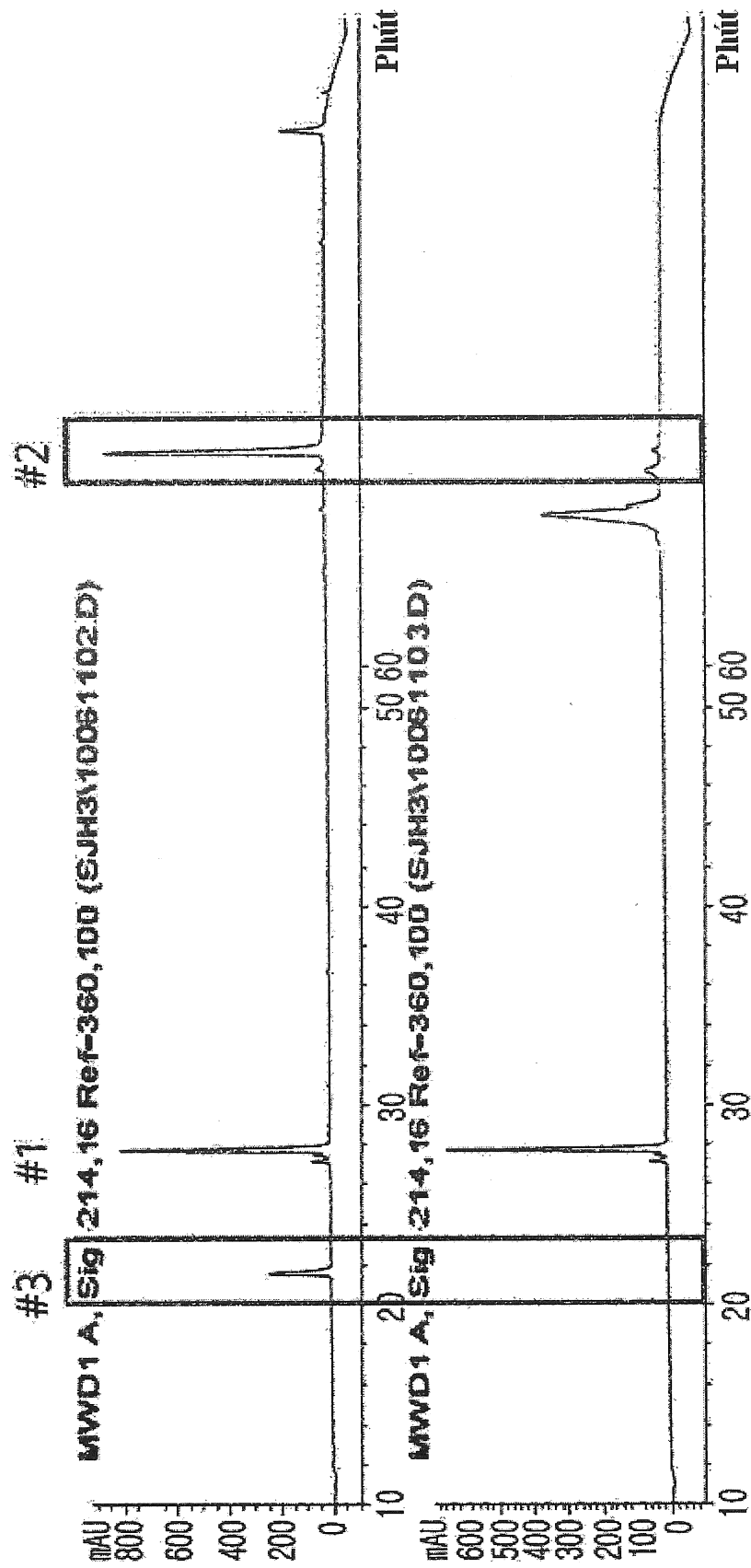


Fig.6a

**Fig.6b**

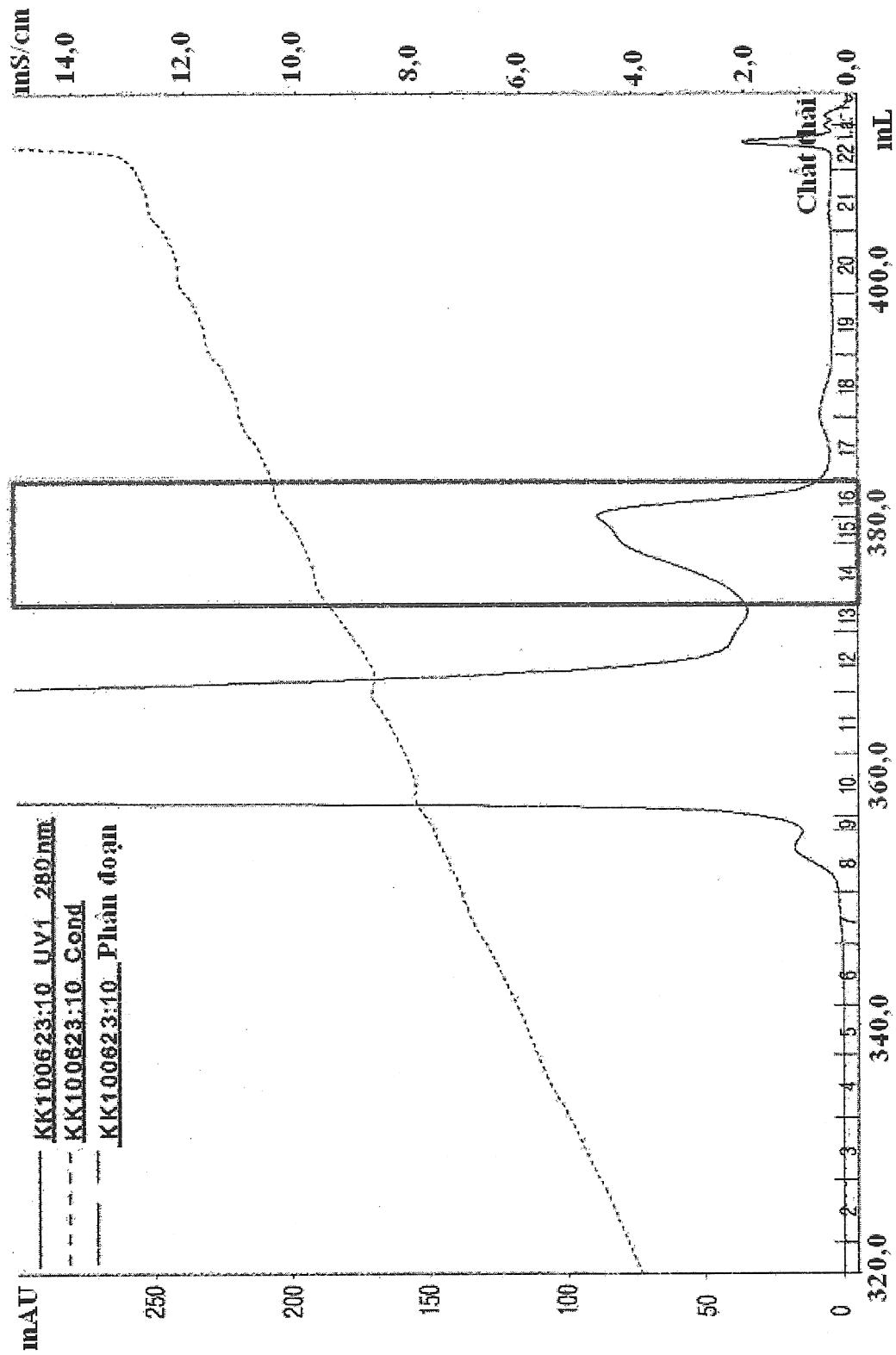


Fig.6c

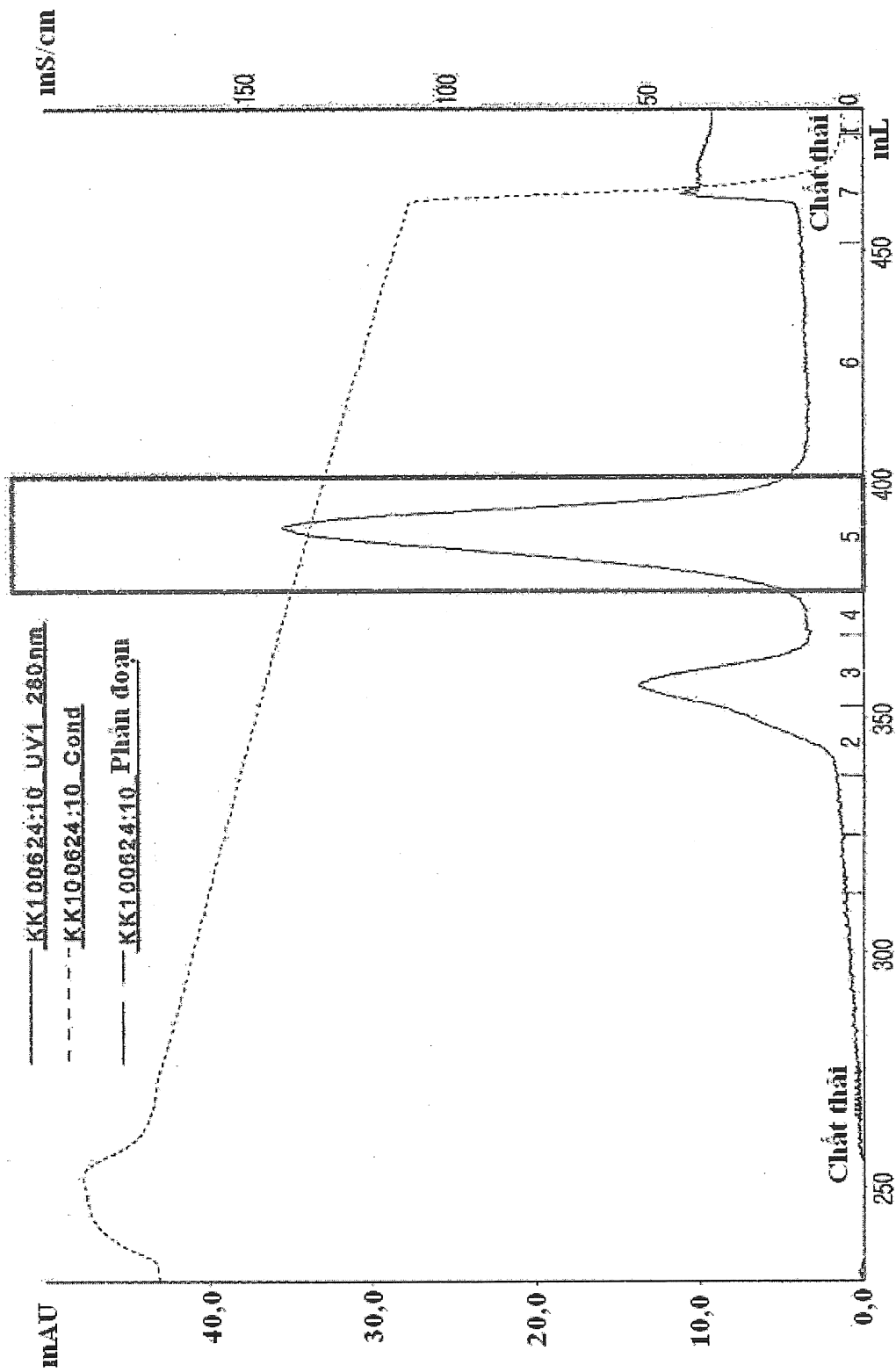
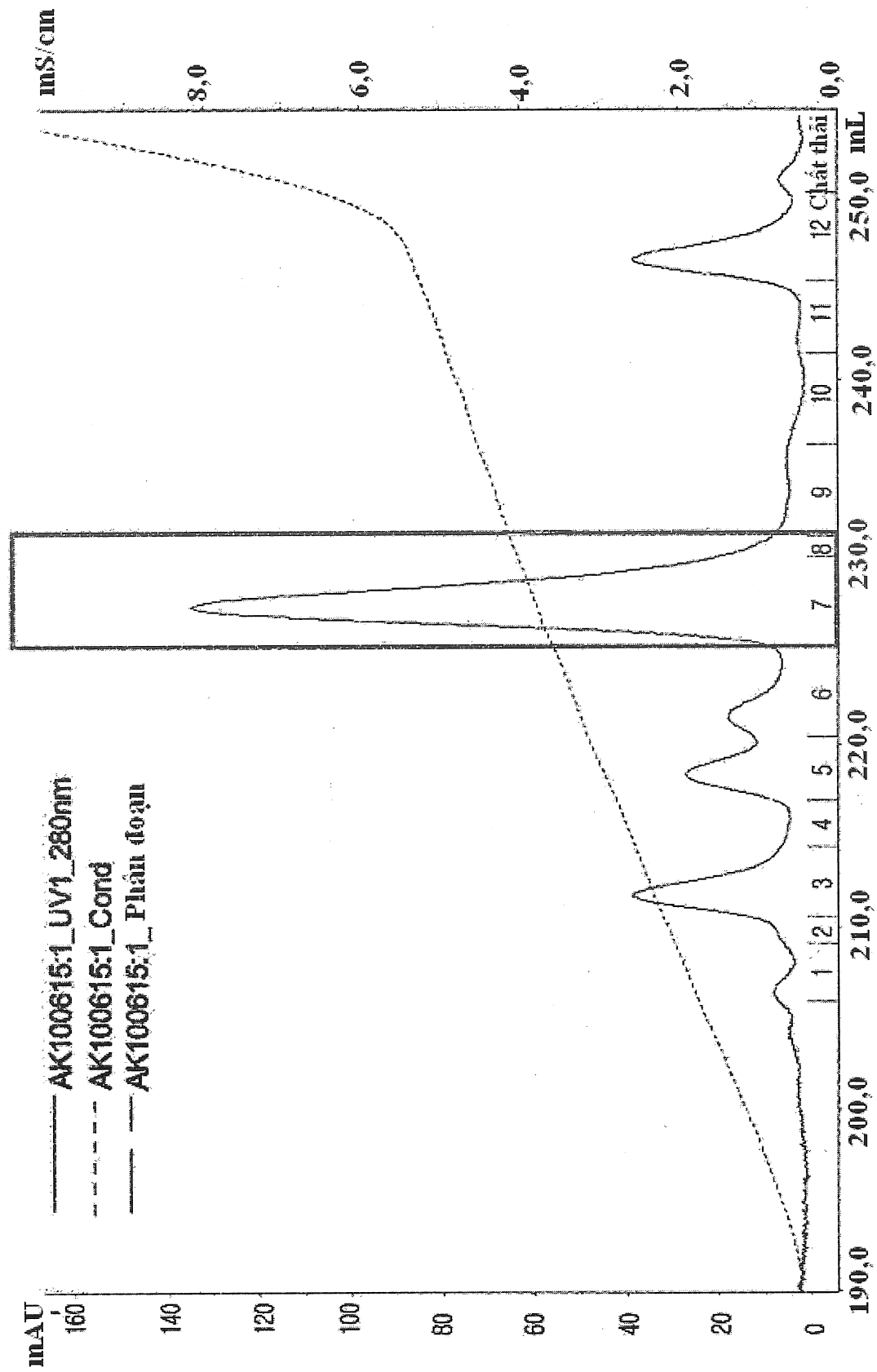
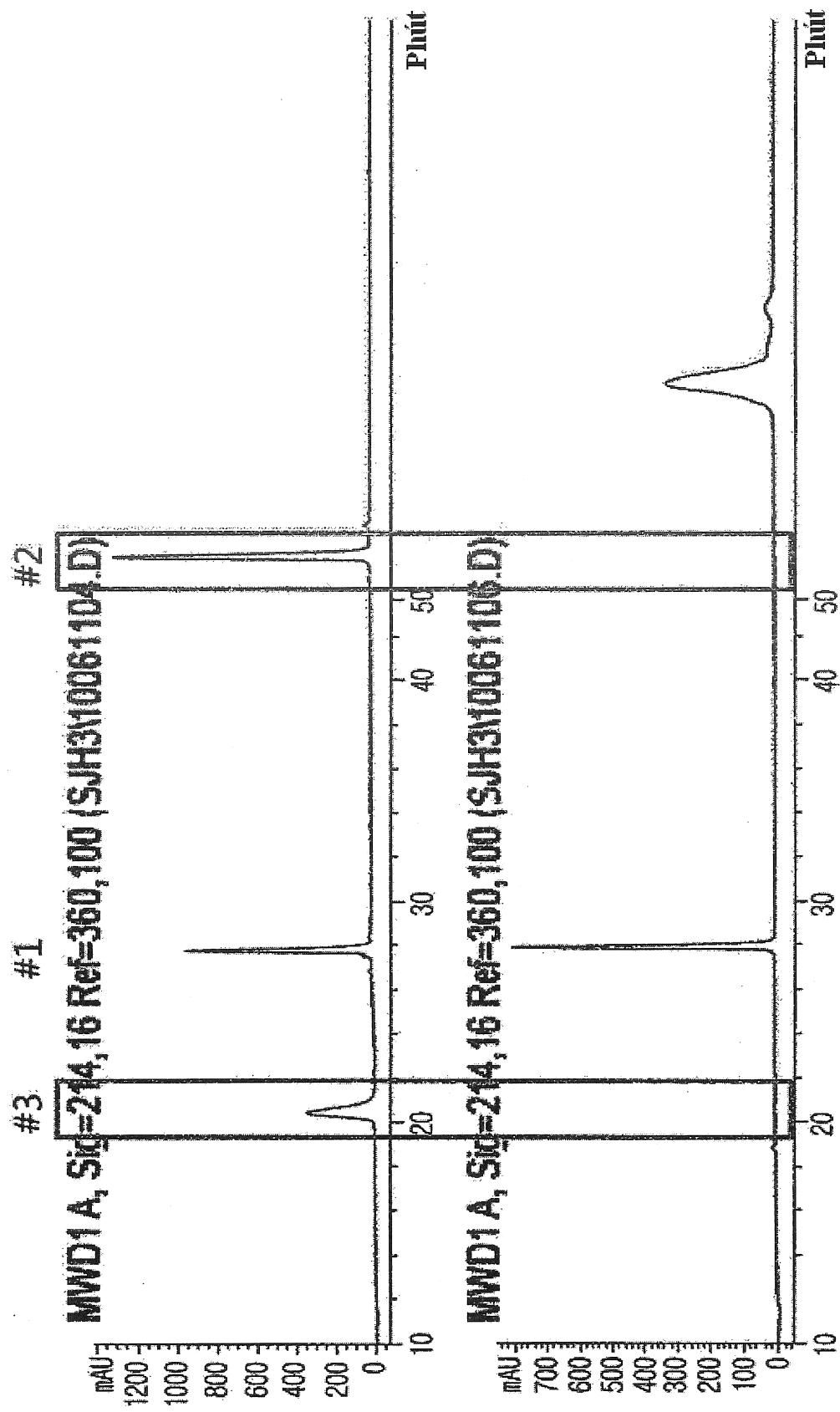
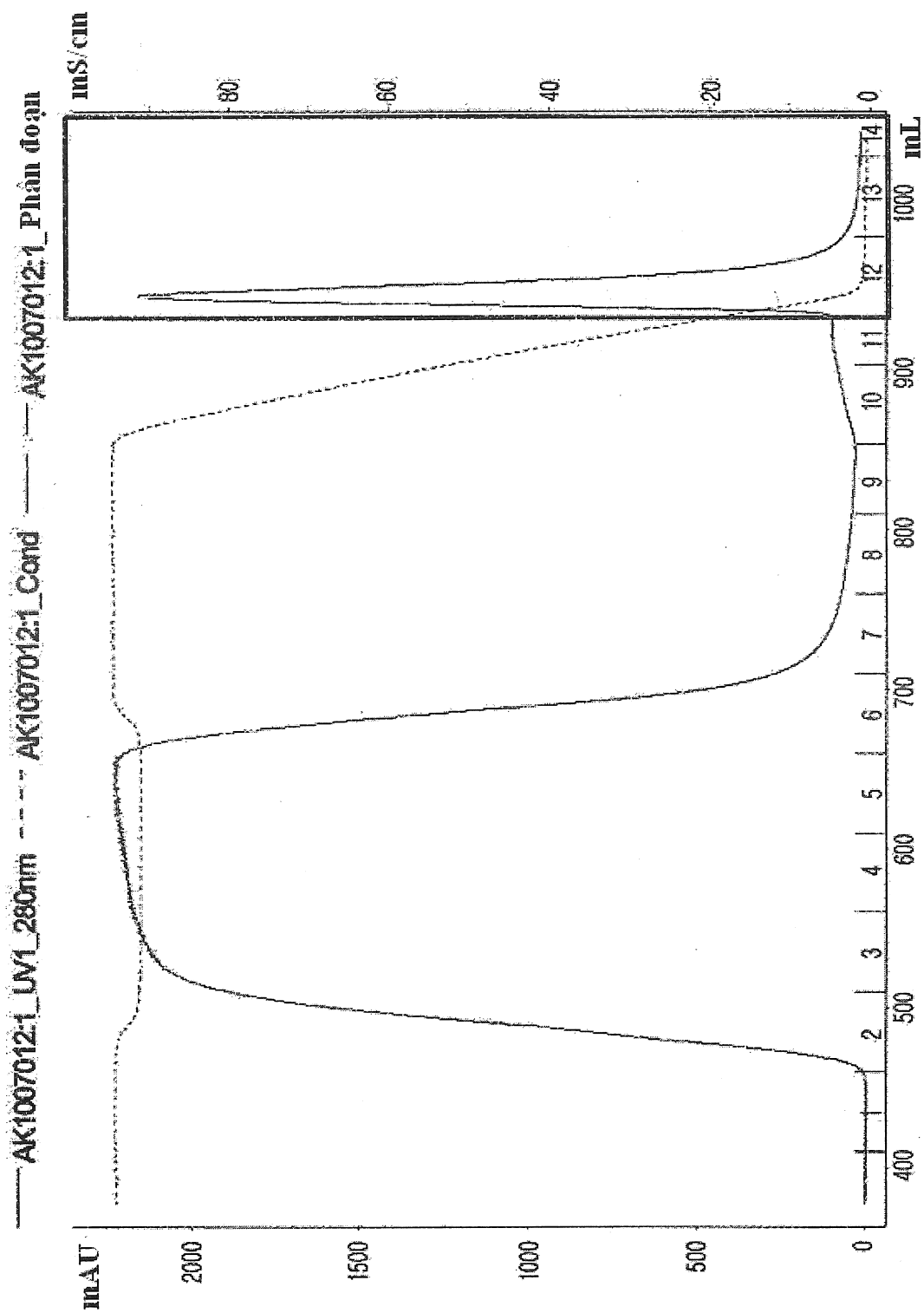
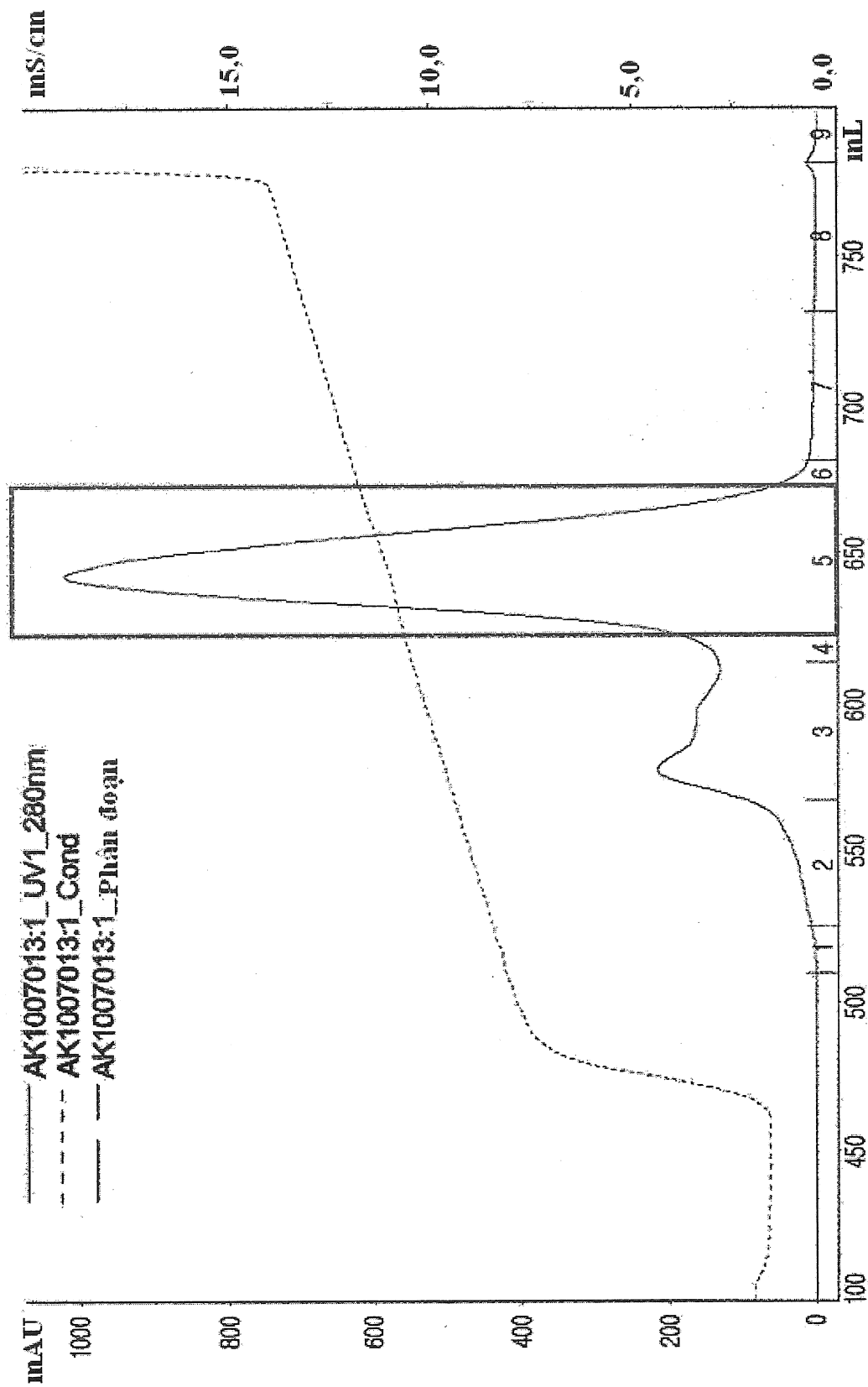


Fig.6d

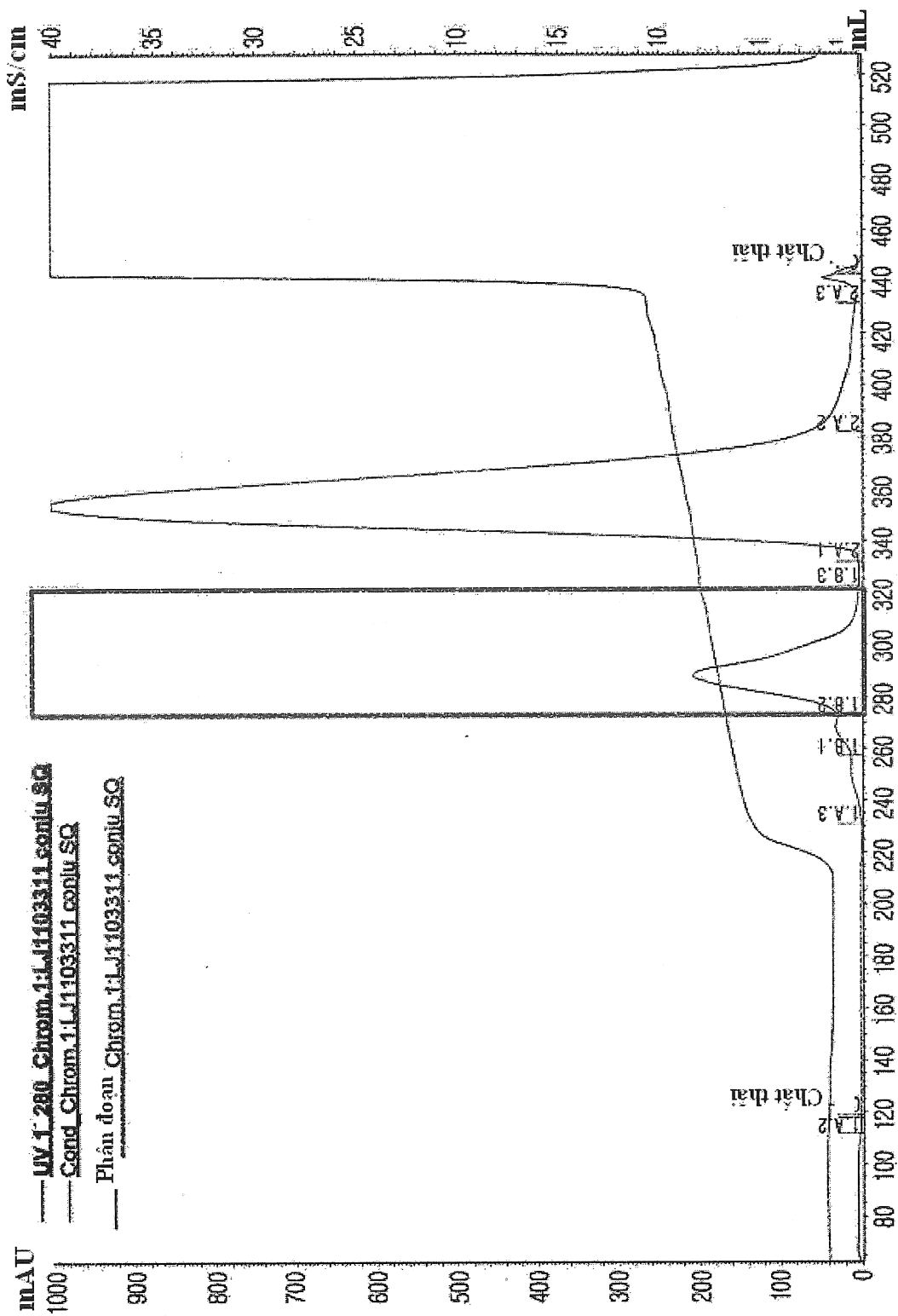
**Fig. 7a**

**Fig. 7b**

**Fig.7c**

**Fig. 7d**





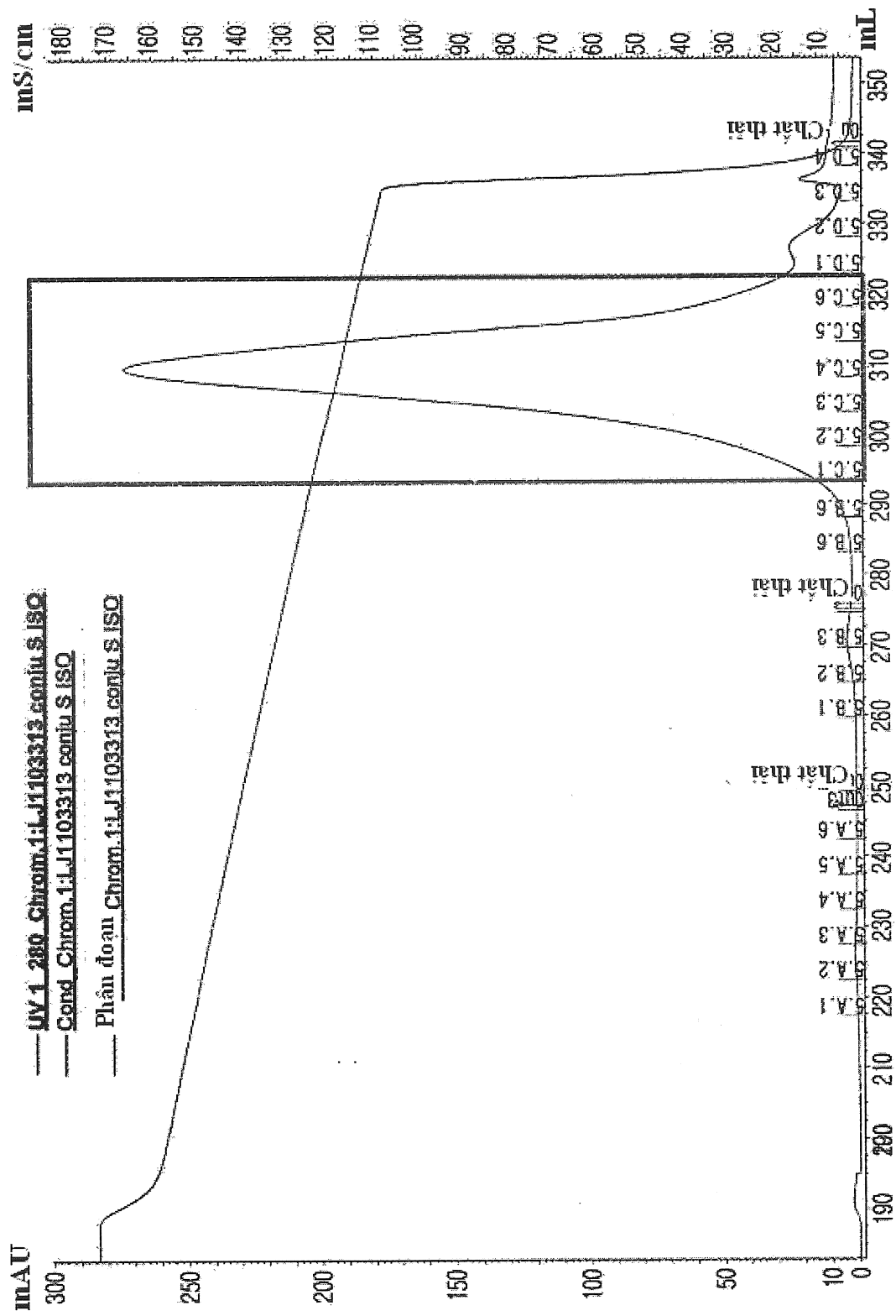
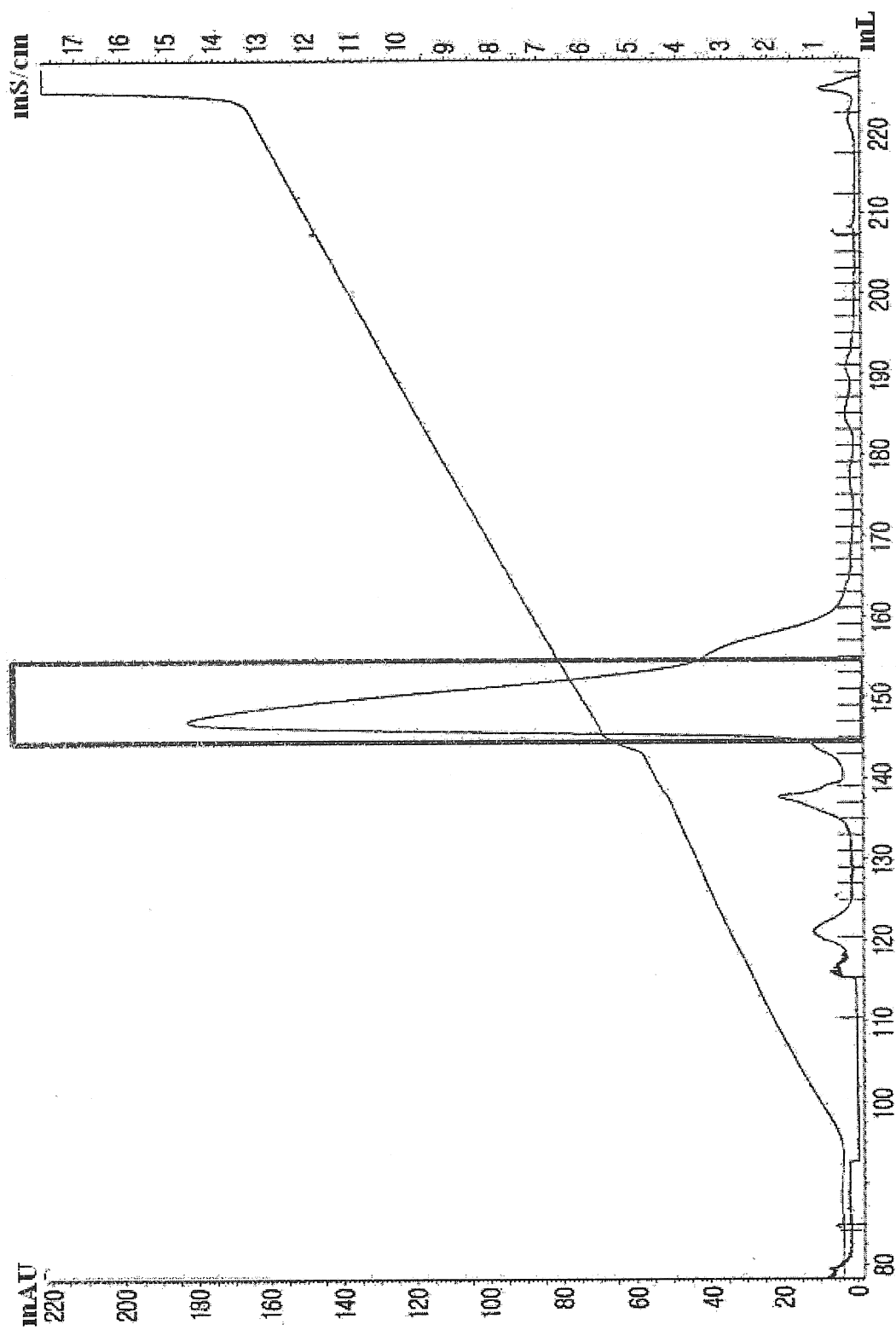


Fig.8c

**Fig. 9a**

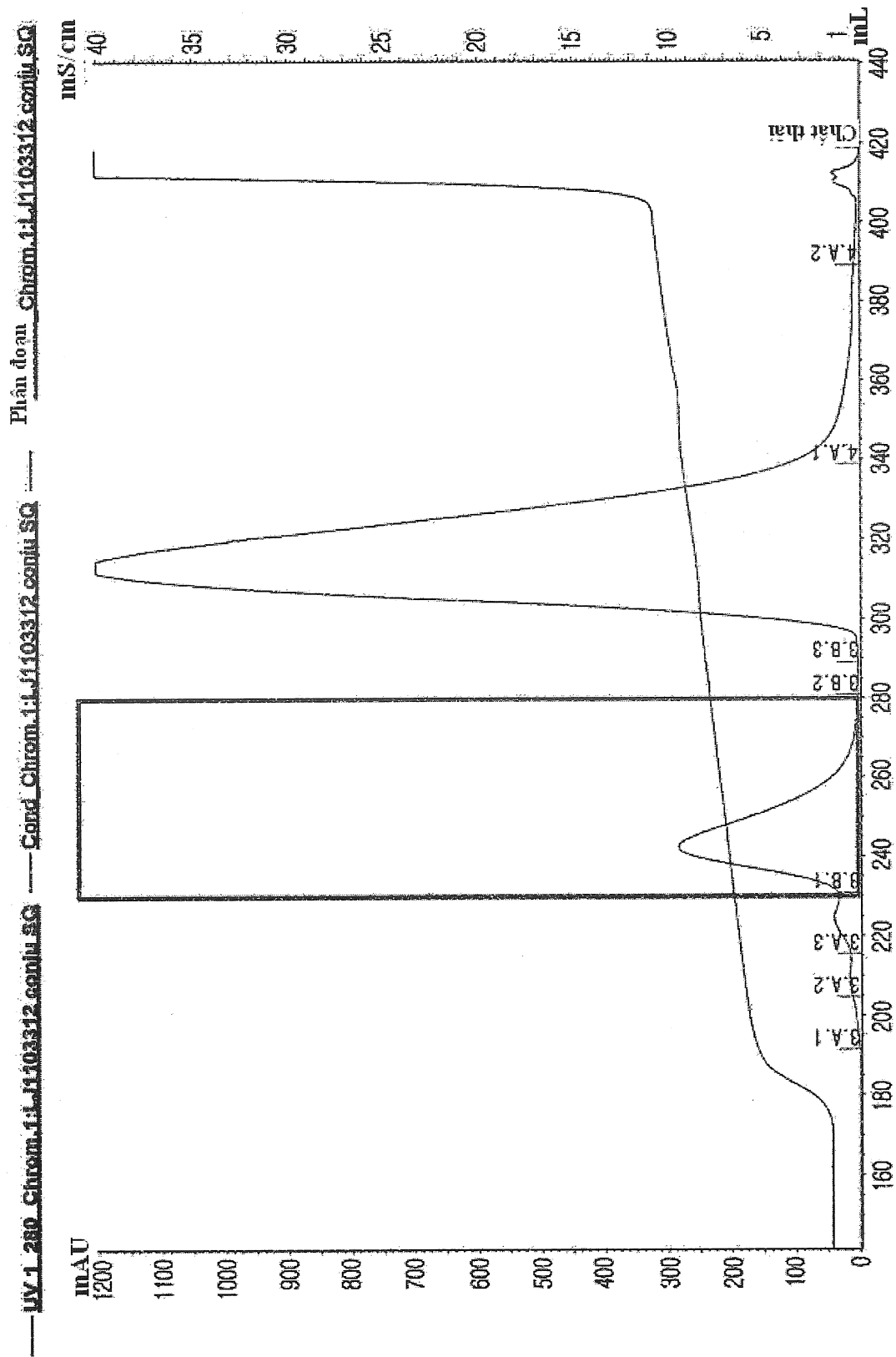


Fig.9b

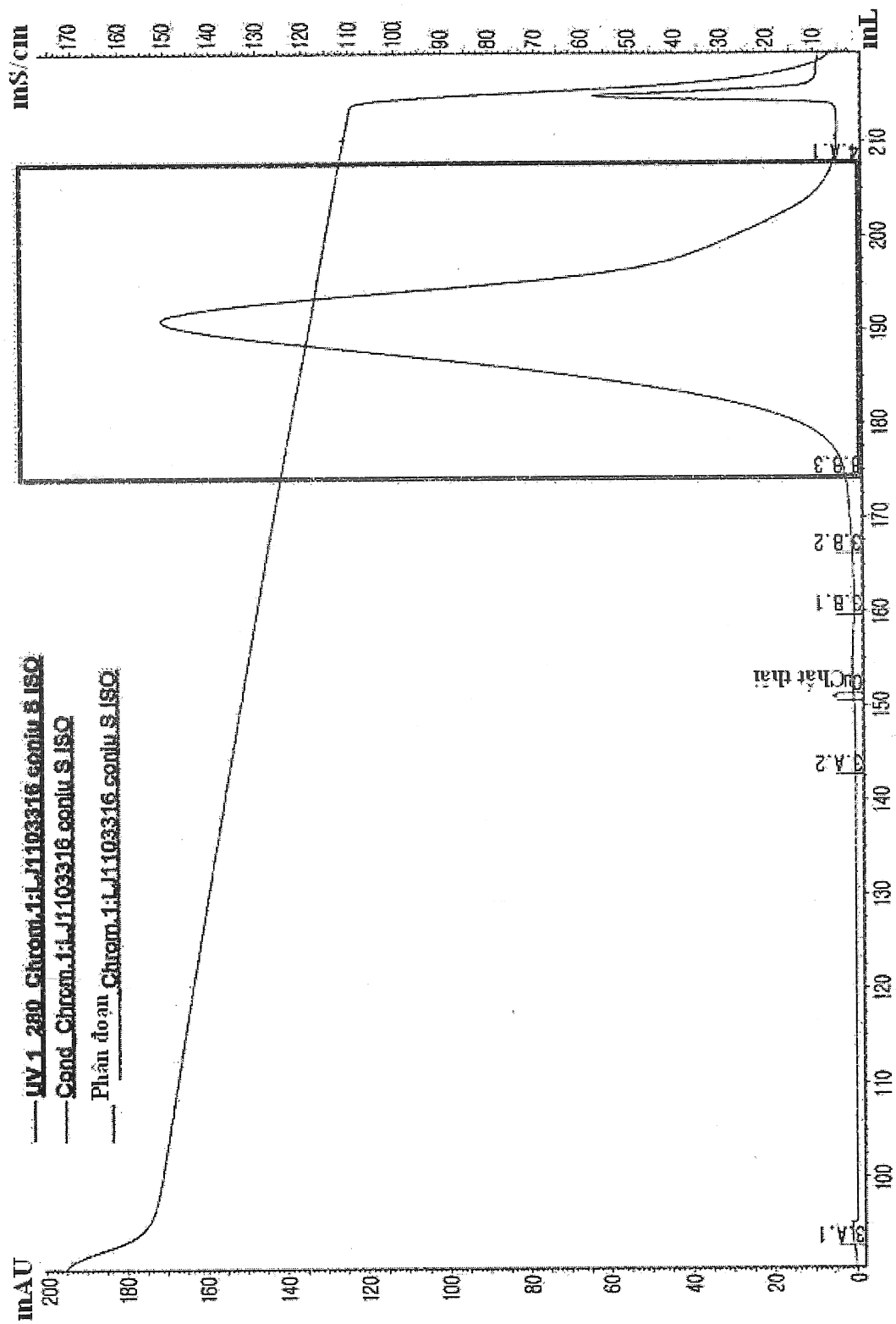
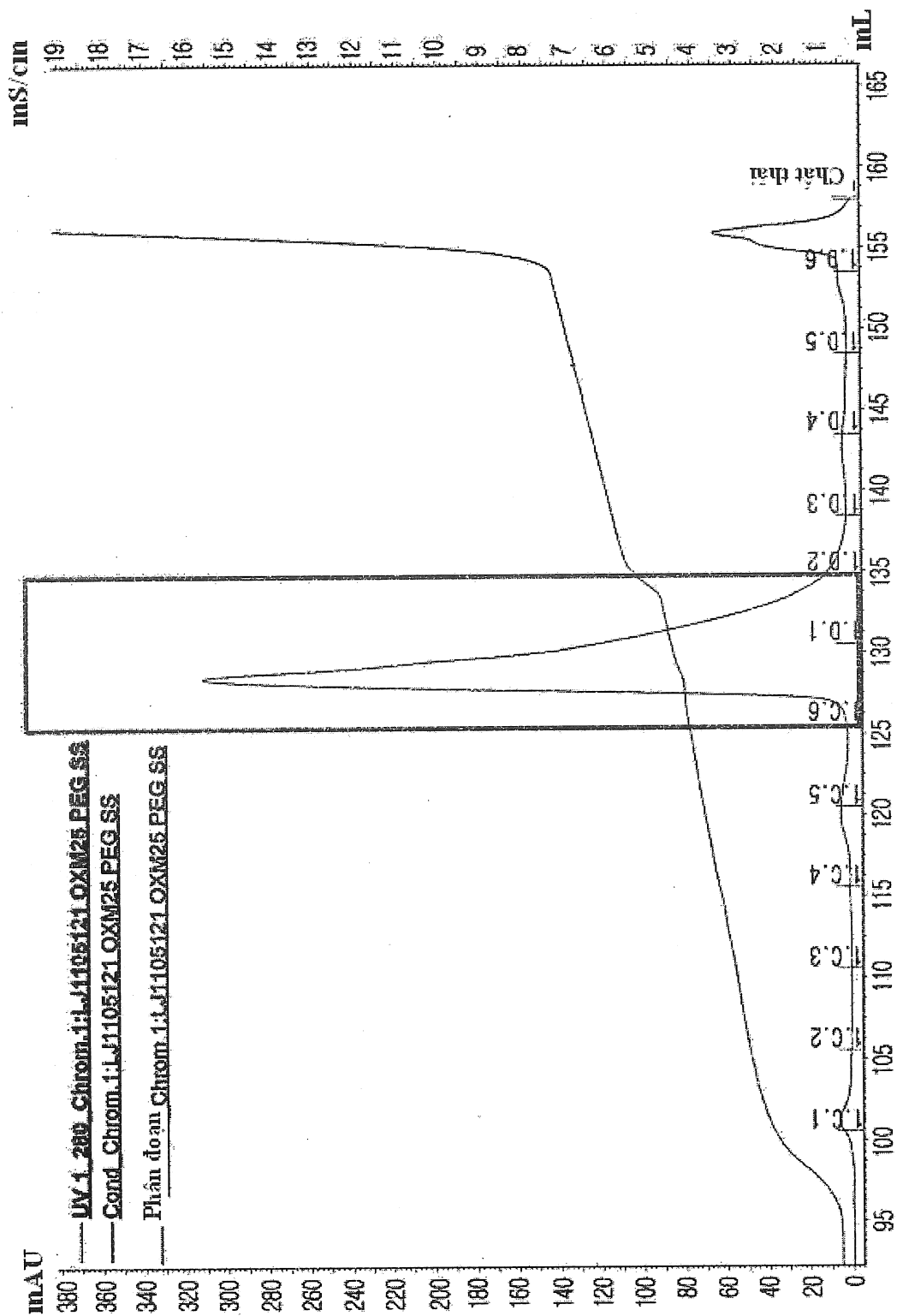
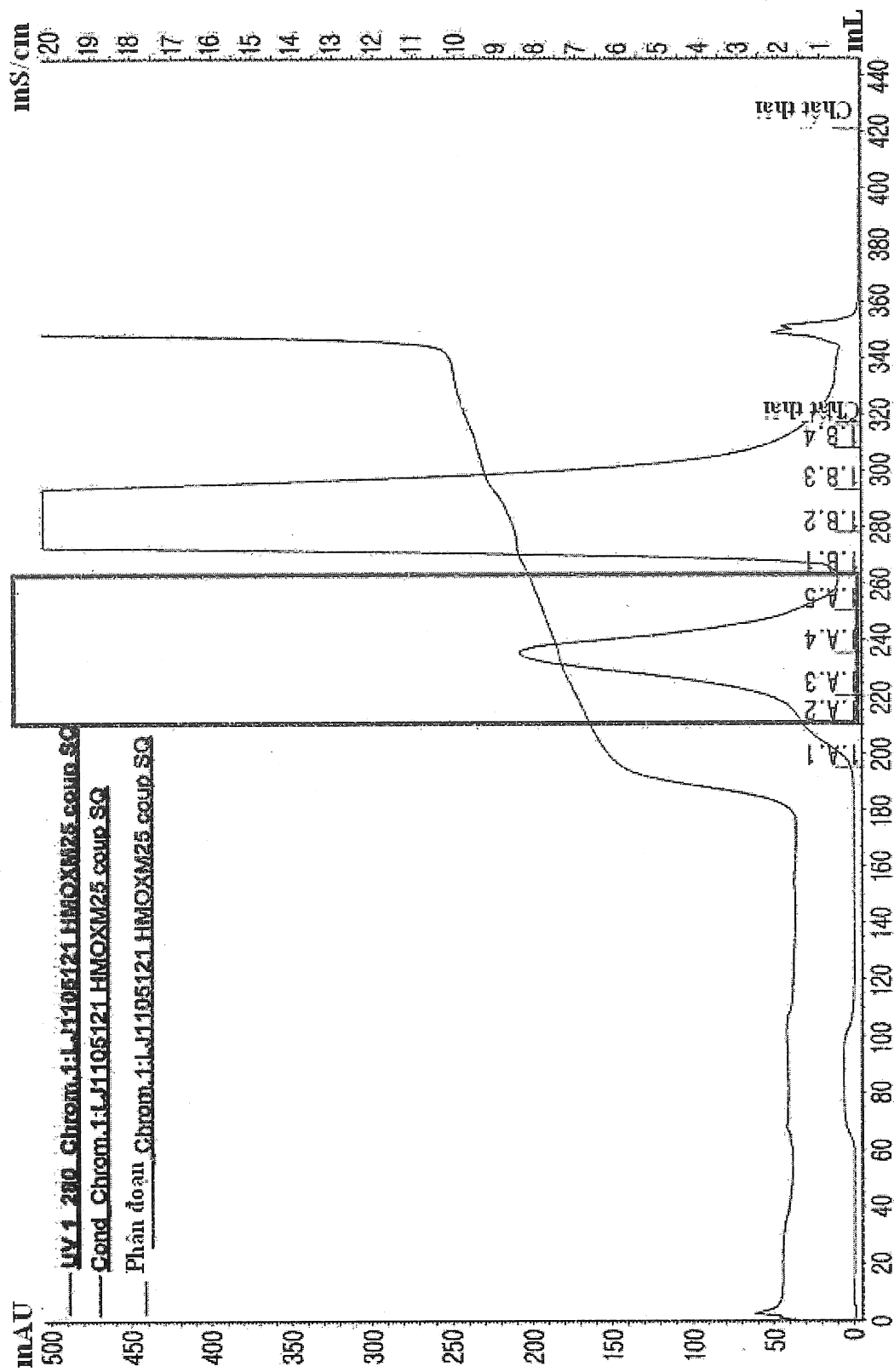


Fig.9c

**Fig.10a**

**Fig.10b**

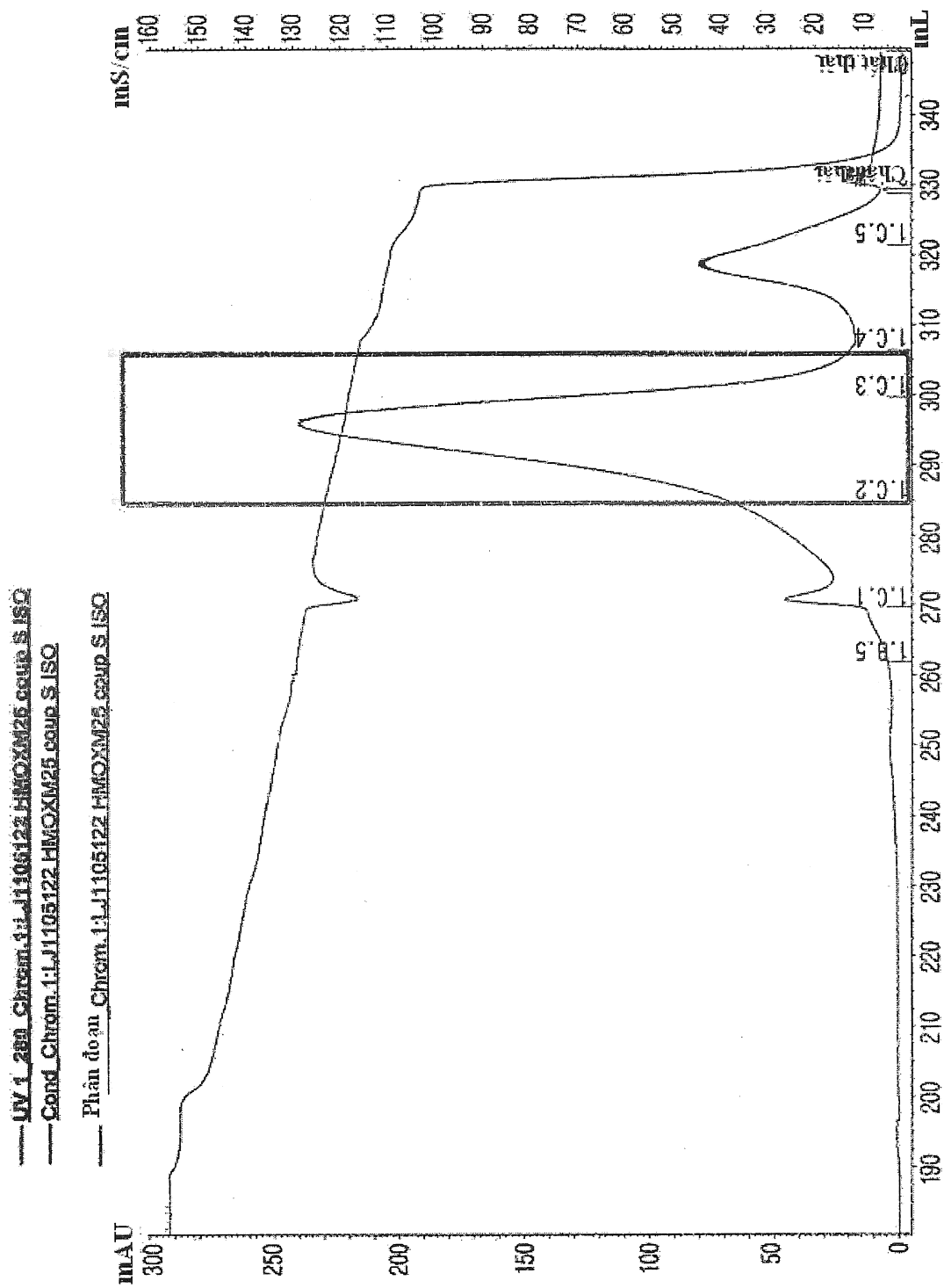


Fig.10c

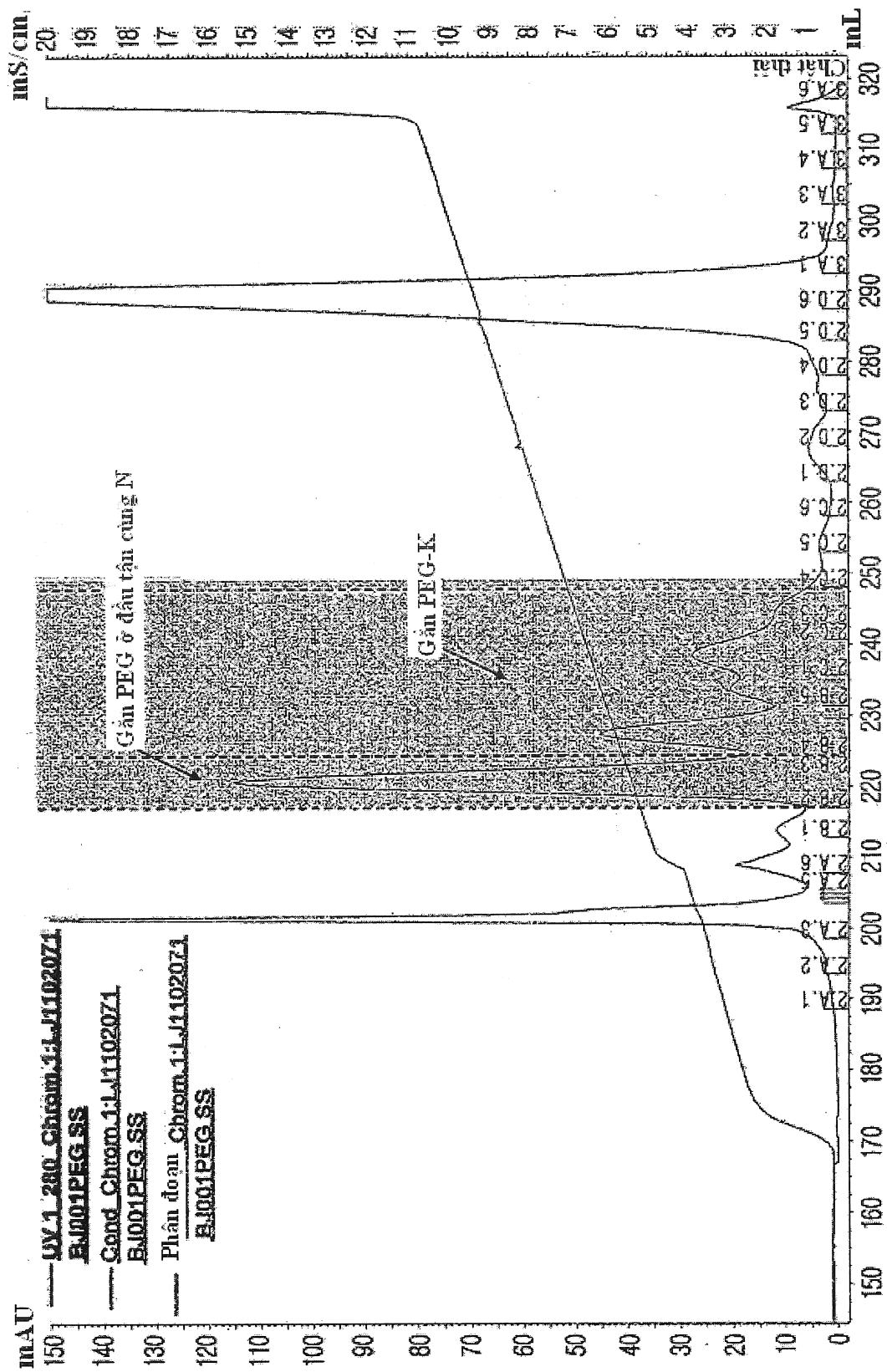


Fig.11a

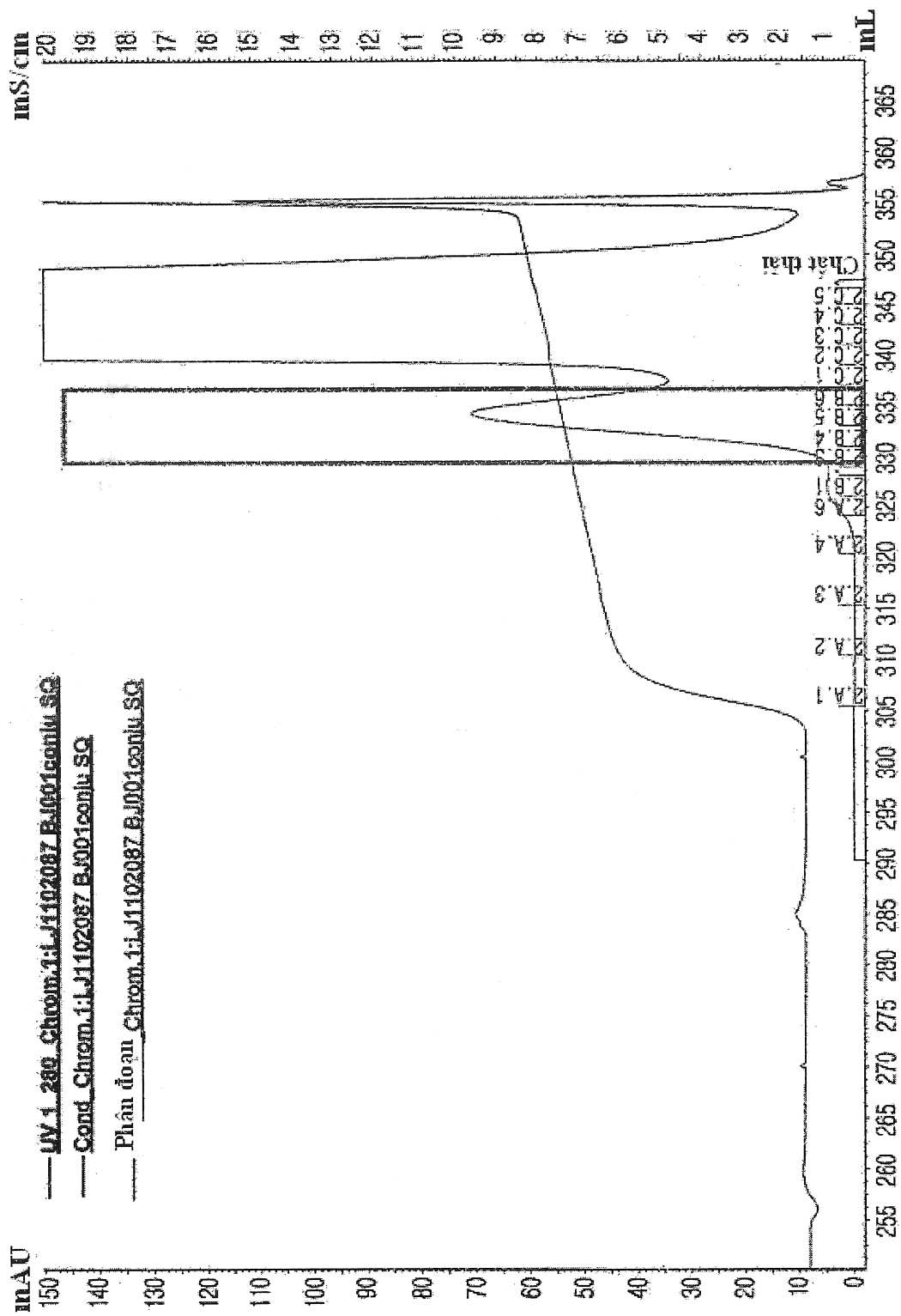


Fig.11b

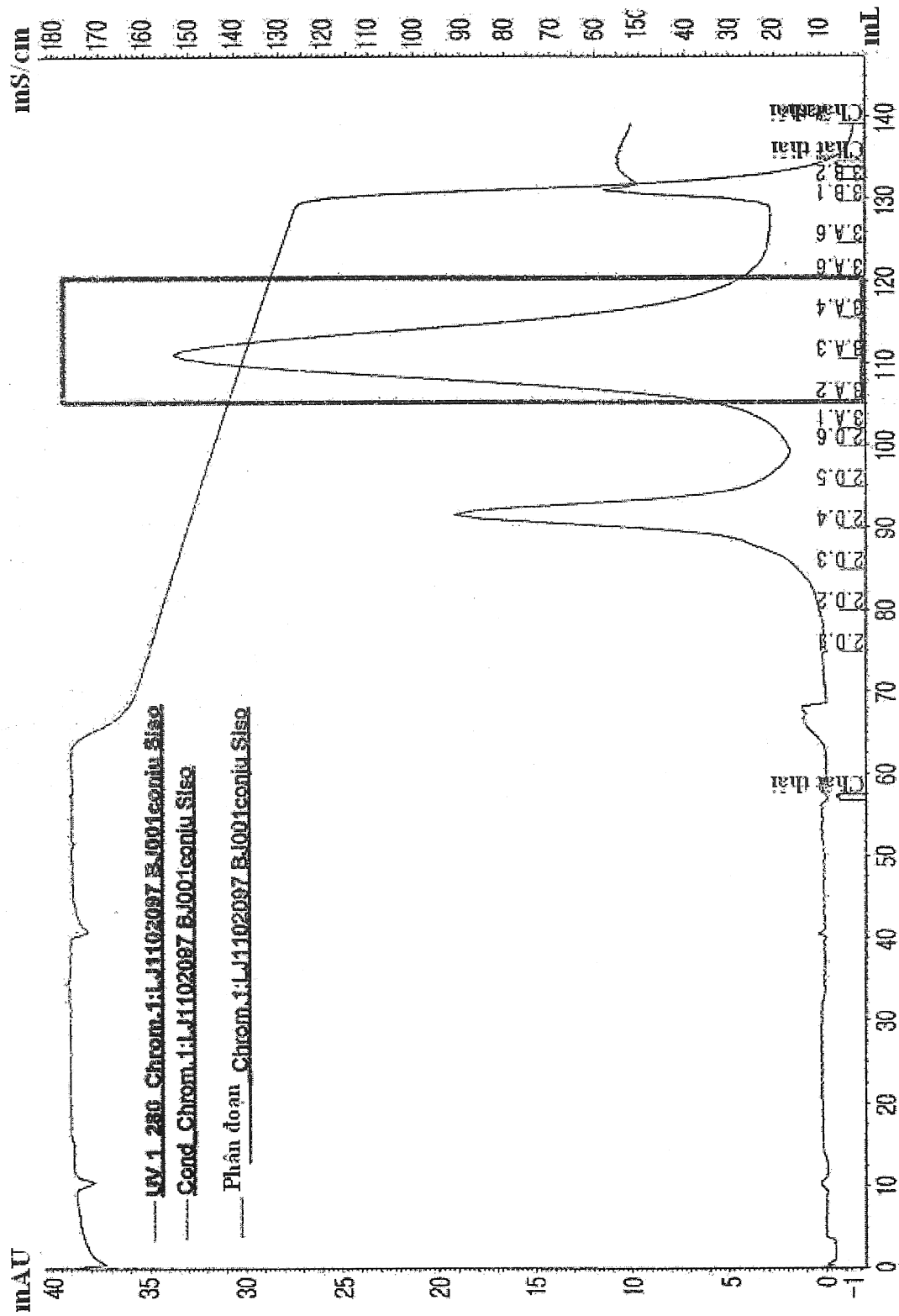
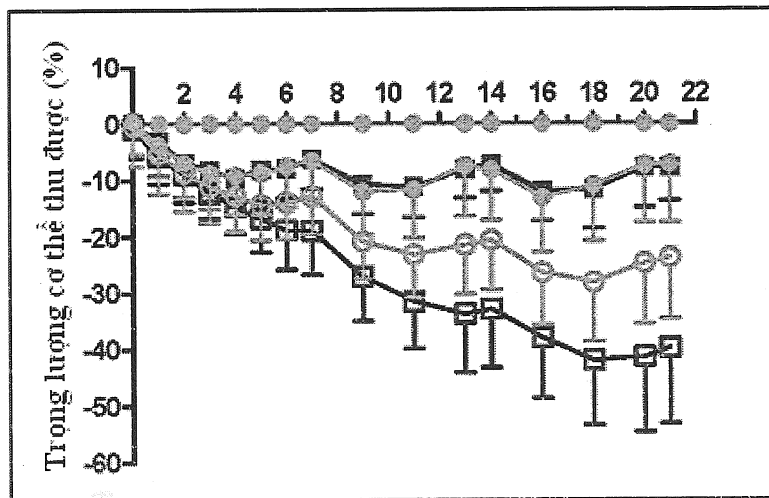
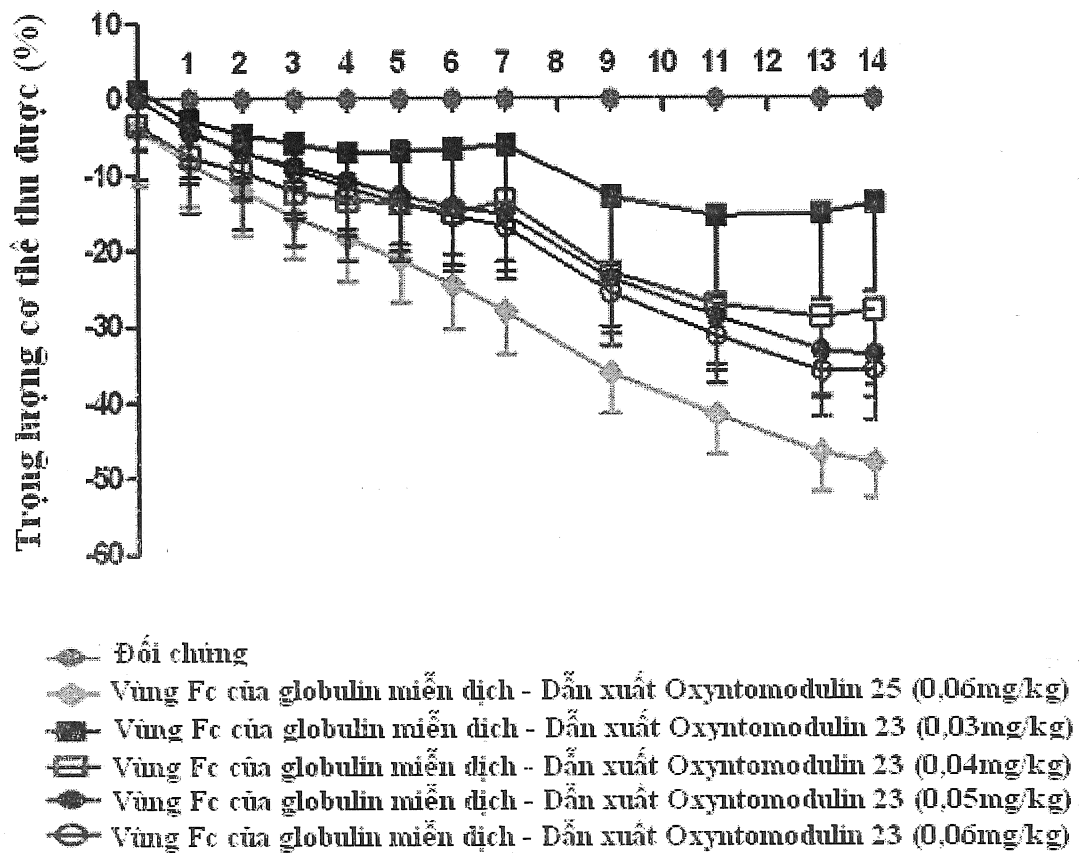


Fig. 11c



- Đôi chùng
- Thê tiếp hợp chứa vùng Fc của globulin miễn dịch và dẫn xuất Oxyntomodulin 23 (0,03mg/kg)
- ▣ Thê tiếp hợp chứa vùng Fc của globulin miễn dịch và dẫn xuất Oxyntomodulin 23 (0,06mg/kg)
- Thê tiếp hợp chứa vùng Fc của globulin miễn dịch và dẫn xuất Oxyntomodulin 24 (0,03mg/kg)
- Thê tiếp hợp chứa vùng Fc của globulin miễn dịch và dẫn xuất Oxyntomodulin 24 (0,06mg/kg)

**Fig.12**



**Fig.13**

## DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> HANMI SCIENCE CO., LTD.  
 <120> THỂ TIẾP HỢP CHỨA DẪN XUẤT OXYNTOMODULIN VÀ VÙNG Fc CỦA GLOBULIN MIỄN DỊCH VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA THỂ TIẾP HỢP NÀY  
 <130> OPA12063  
 <150> KR 10-2011-0058852  
 <151> 2011-06-17  
 <160> 53  
 <170> KopatentIn 2.0  
 <210> 1  
 <211> 37  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <220>  
 <223> Oxyntomodulin  
 <400> 1  
 His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser  
 1 5 10 15  
 Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr Lys Arg Asn  
 20 25 30  
 Arg Asn Asn Ile Ala  
 35  
 <210> 2  
 <211> 37  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo  
 <220>  
 <223> Dẫn xuất oxyntomodulin  
 <220>  
 <221> Biến thể  
 <222> (1)  
 <223> Xaa = 4-imidazoaxetyl  
 <400> 2  
 Xaa Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu  
 1 5 10 15  
 Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Met Asn Thr Lys Arg Asn  
 20 25 30  
 Arg Asn Asn Ile Ala  
 35  
 <210> 3  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo  
 <220>  
 <223> Dẫn xuất oxyntomodulin  
 <220>  
 <221> Biến thể  
 <222> (1)  
 <223> Xaa = 4-imidazoaxetyl  
 <400> 3  
 Xaa Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu  
 1 5 10 15  
 Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Ala Trp Leu Lys Asn Thr Gly Pro Ser  
 20 25 30  
 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser  
 35  
 <210> 4  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo  
 <220>  
 <223> Dẫn xuất oxyntomodulin  
 <220>  
 <221> Biến thể  
 <222> (1)  
 <223> Xaa = 4-imidazoaxetyl  
 <400> 4  
 Xaa Gly Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Tyr Leu Glu Glu  
 1 5 10 15  
 Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30  
 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser  
 35  
 <210> 5  
 <211> 39  
 <212> PRT

```

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

```

```

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

```

```

<211> 37
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Dẫn xuất oxyntomodulin
<220>
<221> Biến thể
<222> (1)
<223> Xaa = 4-imidazoaxetyl
<220>
<221> Biến thể
<222> (20)
<223> Xaa = axit alpha-metyl-glutamic
<220>
<221> Biến thể
<222> (24)
<223> Xaa = axit alpha-metyl-glutamic
<400> 14
Xaa Gly Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Tyr Leu Asp Glu
 1           5           10           15
Glu Ala Val Xaa Leu Phe Ile Xaa Trp Leu Met Asn Thr Lys Arg Asn
          20           25           30
Arg Asn Asn Ile Ala
          35
<210> 15
<211> 37
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Dẫn xuất oxyntomodulin
<220>
<221> Biến thể
<222> (1)
<223> Xaa = 4-imidazoaxetyl
<220>
<221> Biến thể
<222> (24)
<223> Xaa = axit alpha-metyl-glutamic
<400> 15
Xaa Gly Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Tyr Leu Asp Glu
 1           5           10           15
Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Xaa Trp Leu Met Asn Thr Lys Arg Asn
          20           25           30
Arg Asn Asn Ile Ala
          35
<210> 16
<211> 34
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Dẫn xuất oxyntomodulin
<220>
<221> Biến thể
<222> (1)
<223> Xaa = 4-imidazoaxetyl
<400> 16
Xaa Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Arg Gln Leu Glu Gly
 1           5           10           15
Gly Gly His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Arg Gln Leu
          20           25           30
Glu Lys

<210> 17
<211> 37
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Dẫn xuất oxyntomodulin
<220>
<221> Biến thể
<222> (1)
<223> Xaa = 4-imidazoaxetyl
<400> 17
Xaa Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Tyr Leu Asp Glu
 1           5           10           15
Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Ile Arg Asn Thr Lys Arg Asn
          20           25           30
Arg Asn Asn Ile Ala
          35

```

```

<210> 18
<211> 40
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Dẫn xuất oxyntomodulin
<220>
<221> Biểu thể
<222> (1)
<223> Xaa = 4-imidazoaxetyl
<400> 18
Xaa Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Tyr Leu Asp Glu
 1           5           10           15
Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Ile Arg Asn Gly Gly Pro Ser
      20           25           30
Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Lys
      35           40
<210> 19
<211> 37
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Dẫn xuất oxyntomodulin
<220>
<221> Biểu thể
<222> (1)
<223> Xaa = 4-imidazoaxetyl
<220>
<221> Biểu thể
<222> (16), (20)
<223> Các axit amin ở vị trí 16 và vị trí 20 tạo ra vòng
<400> 19
Xaa Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Tyr Leu Asp Glu
 1           5           10           15
Glu Ala Val Lys Leu Phe Ile Glu Trp Ile Arg Asn Thr Lys Arg Asn
      20           25           30
Arg Asn Asn Ile Ala
      35
<210> 20
<211> 40
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Dẫn xuất oxyntomodulin
<220>
<221> Biểu thể
<222> (1)
<223> Xaa = 4-imidazoaxetyl
<220>
<221> Biểu thể
<222> (16), (20)
<223> Các axit amin ở vị trí 16 và vị trí 20 tạo ra vòng
<400> 20
Xaa Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Tyr Leu Asp Glu
 1           5           10           15
Glu Ala Val Lys Leu Phe Ile Glu Trp Ile Arg Asn Gly Gly Pro Ser
      20           25           30
Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Lys
      35           40
<210> 21
<211> 37
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Dẫn xuất oxyntomodulin
<220>
<221> Biểu thể
<222> (1)
<223> Xaa = 4-imidazoaxetyl
<400> 21
Xaa Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Gln Leu Glu Glu
 1           5           10           15
Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Val Arg Asn Thr Lys Arg Asn
      20           25           30
Arg Asn Asn Ile Ala
      35
<210> 22
<211> 30
<212> PRT

```

```

<213>   Trình tự nhân tạo
<220>
<223>   Dẫn xuất oxyntomodulin
<220>
<221>   Biến thể
<222>   (1)
<223>   Xaa = desamino-histidyl
<220>
<221>   Biến thể
<222>   (16), (20)
<223>   Các axit amin ở vị trí 16 và vị trí 20 tạo ra vòng
<400>   22
Xaa Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu
1         5         10        15
Lys Arg Ala Lys Glu Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr Lys
         20        25        30
<210>   23
<211>   29
<212>   PRT
<213>   Trình tự nhân tạo
<220>
<223>   Dẫn xuất oxyntomodulin
<220>
<221>   Biến thể
<222>   (2)
<223>   Xaa = axit aminoisobutyric
<400>   23
His Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu
1         5         10        15
Lys Arg Ala Lys Glu Phe Val Cys Trp Leu Met Asn Thr
         20        25
<210>   24
<211>   30
<212>   PRT
<213>   Trình tự nhân tạo
<220>
<223>   Dẫn xuất oxyntomodulin
<220>
<221>   Biến thể
<222>   (2)
<223>   Xaa = axit aminoisobutyric
<400>   24
His Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu
1         5         10        15
Lys Arg Ala Lys Glu Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr Cys
         20        25        30
<210>   25
<211>   30
<212>   PRT
<213>   Trình tự nhân tạo
<220>
<223>   Dẫn xuất oxyntomodulin
<220>
<221>   Biến thể
<222>   (2)
<223>   Xaa = axit aminoisobutyric
<220>
<221>   Biến thể
<222>   (16), (20)
<223>   Các axit amin ở vị trí 16 và vị trí 20 tạo ra vòng
<400>   25
His Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu
1         5         10        15
Lys Arg Ala Lys Glu Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr Cys
         20        25        30
<210>   26
<211>   30
<212>   PRT
<213>   Trình tự nhân tạo
<220>
<223>   Dẫn xuất oxyntomodulin
<220>
<221>   Biến thể
<222>   (2)
<223>   Xaa = axit aminoisobutyric
<220>
<221>   Biến thể
<222>   (12), (16)
<223>   Các axit amin ở vị trí 12 và vị trí 16 tạo ra vòng

```

```

<400>      26
His Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu
  1           5           10           15
Lys Arg Ala Lys Glu Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr Cys
      20           25           30

<210>      27
<211>      29
<212>      PRT
<213>      Trình tự nhân tạo
<220>
<223>      Dẫn xuất oxyntomodulin
<220>
<221>      Biểu thể
<222>      (2)
<223>      Xaa = axit aminoisobutyric
<220>
<221>      Biểu thể
<222>      (16), (20)
<223>      Các axit amin ở vị trí 16 và vị trí 20 tạo ra vòng
<400>      27
His Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu
  1           5           10           15
Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Cys Trp Leu Met Asn Thr
      20           25

<210>      28
<211>      29
<212>      PRT
<213>      Trình tự nhân tạo
<220>
<223>      Dẫn xuất oxyntomodulin
<220>
<221>      Biểu thể
<222>      (2)
<223>      Xaa = axit aminoisobutyric
<400>      28
His Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu
  1           5           10           15
Lys Arg Ala Lys Glu Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
      20           25

<210>      29
<211>      37
<212>      PRT
<213>      Trình tự nhân tạo
<220>
<223>      Dẫn xuất oxyntomodulin
<220>
<221>      Biểu thể
<222>      (2)
<223>      Xaa = d-serine.
<400>      29
His Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser
  1           5           10           15
Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr Lys Arg Asn
      20           25           30
Arg Asn Asn Ile Ala
      35
<210>      30
<211>      37
<212>      PRT
<213>      Trình tự nhân tạo
<220>
<223>      Dẫn xuất oxyntomodulin
<220>
<221>      Biểu thể
<222>      (1)
<223>      Xaa = 4-imidazoaxetyl
<400>      30
Xaa Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser
  1           5           10           15
Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr Lys Arg Asn
      20           25           30
Arg Asn Asn Ile Ala
      35
<210>      31
<211>      37
<212>      PRT
<213>      Trình tự nhân tạo

```

```

<220>
<223> Dẫn xuất oxyntomodulin
<220>
<221> Biến thể
<222> (1)
<223> Xaa = 4-imidazoaxetyl
<220>
<221> Biến thể
<222> (2)
<223> Xaa = d-serine.
<400> 31
Xaa Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser
 1           5           10           15
Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr Lys Arg Asn
      20           25           30
Arg Asn Asn Ile Ala
      35
<210> 32
<211> 30
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Dẫn xuất oxyntomodulin
<220>
<221> Biến thể
<222> (1)
<223> Xaa = 4-imidazoaxetyl
<220>
<221> Biến thể
<222> (2)
<223> Xaa = axit aminoisobutyric
<220>
<221> Biến thể
<222> (16), (20)
<223> Các axit amin ở vị trí 16 và vị trí 20 tạo ra vòng
<400> 32
Xaa Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu
 1           5           10           15
Lys Arg Ala Lys Glu Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr Cys
      20           25           30
<210> 33
<211> 30
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Dẫn xuất oxyntomodulin
<220>
<221> Biến thể
<222> (2)
<223> Xaa = axit aminoisobutyric
<220>
<221> Biến thể
<222> (16), (20)
<223> Các axit amin ở vị trí 16 và vị trí 20 tạo ra vòng
<400> 33
His Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ala Lys Tyr Leu Asp Glu
 1           5           10           15
Lys Arg Ala Lys Glu Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr Cys
      20           25           30
<210> 34
<211> 30
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Dẫn xuất oxyntomodulin
<220>
<221> Biến thể
<222> (2)
<223> Xaa = axit aminoisobutyric
<220>
<221> Biến thể
<222> (16), (20)
<223> Các axit amin ở vị trí 16 và vị trí 20 tạo ra vòng
<400> 34
Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu
 1           5           10           15
ys Arg Ala Lys Glu Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr Cys
      20           25           30
<210> 35

```

```

<211>      8
<212>      PRT
<213>      Trình tự nhân tạo
<220>
<223>      Nhóm R2
<400>      35
Lys Arg Asn Arg Asn Asn Ile Ala
  1              5
<210>      36
<211>      10
<212>      PRT
<213>      Trình tự nhân tạo
<220>
<223>      Nhóm R2
<400>      36
Gly Pro Ser Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
  1              5              10
<210>      37
<211>      11
<212>      PRT
<213>      Trình tự nhân tạo
<220>
<223>      Nhóm R2
<400>      37
Gly Pro Ser Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Lys
  1              5              10
<210>      38
<211>      15
<212>      PRT
<213>      Trình tự nhân tạo
<220>
<223>      Nhóm R2
<400>      38
His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp
  1              5              10              15
<210>      39
<211>      16
<212>      PRT
<213>      Trình tự nhân tạo
<220>
<223>      Nhóm R2
<400>      39
His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Tyr Leu Asp Lys
  1              5              10              15
<210>      40
<211>      20
<212>      PRT
<213>      Trình tự nhân tạo
<220>
<223>      Nhóm R2
<400>      40
His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
  1              5              10              15
Glu Ala Val Lys
  20
<210>      41
<211>      28
<212>      PRT
<213>      Trình tự nhân tạo
<220>
<223>      Nhóm A hoặc B
<400>      41
Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser Arg
  1              5              10              15
Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
  20              25
<210>      42
<211>      28
<212>      PRT
<213>      Trình tự nhân tạo
<220>
<223>      Nhóm A hoặc B
<400>      42
Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu Glu
  1              5              10              15
Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Met Asn Thr
  20              25
<210>      43
<211>      28

```

```

<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Nhóm A hoặc B
<400> 43
Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu Arg
 1             5             10             15
Arg Ala Gln Asp Phe Val Ala Trp Leu Lys Asn Thr
          20             25

<210> 44
<211> 28
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Nhóm A hoặc B
<400> 44
Gly Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Tyr Leu Glu Glu Glu
 1             5             10             15
Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly
          20             25

<210> 45
<211> 28
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Nhóm A hoặc B
<400> 45
Gly Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Gln Met Glu Glu Glu
 1             5             10             15
Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly
          20             25

<210> 46
<211> 26
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Nhóm A hoặc B
<400> 46
Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Arg Gln Met Glu Glu Glu
 1             5             10             15
Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Ala Ala
          20             25

<210> 47
<211> 28
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Nhóm A hoặc B
<400> 47
Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Gln Met Glu Glu Glu
 1             5             10             15
Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Met Asn Gly
          20             25

<210> 48
<211> 24
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Nhóm B
<400> 48
Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Arg Gln Met Glu Glu Glu
 1             5             10             15
Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp
          20

<210> 49
<211> 14
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Nhóm B
<400> 49
Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Tyr Leu Asp
 1             5             10

<210> 50
<211> 30
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo
<220>

```

```

<223>   Đoạn mới
<400>   50
cccgcccccc gcggccgcta ttcgaaatac          30
<210>   51
<211>   33
<212>   DNA
<213>   Trình tự nhân tạo
<220>
<223>   Đoạn mới
<400>   51
gaacgggtccg gaggacgtcg actcttaaga tag      33
<210>   52
<211>   34
<212>   DNA
<213>   Trình tự nhân tạo
<220>
<223>   Đoạn mới
<400>   52
cagcgacacc gaccgtcccc cgtacttaa ggcc      34
<210>   53
<211>   32
<212>   DNA
<213>   Trình tự nhân tạo
<220>
<223>   Đoạn mới
<400>   53
ctaaccgact ctcggggaag actgagctcg cc        32

```