



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

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

(11)



1-0037399

(51)^{2020.01} C07K 14/605; C12N 15/16

(13) B

(21) 1-2021-08331

(22) 30/12/2015

(62) 1-2017-02599

(86) PCT/KR2015/014422 30/12/2015

(87) WO2016/108586 07/07/2016

(30) 10-2014-0193800 30/12/2014 KR

(45) 27/11/2023 428

(43) 25/02/2022 407

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

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

(72) KIM, Jung Kuk (KR); LEE, Jong Min (KR); KIM, Sang Yun (KR); BAE, Sung Min (KR); JUNG, Sung Youb (KR); KWON, Se Chang (KR).

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

(54) DẪN XUẤT GLUCAGON VÀ POLYNUCLEOTIT MÃ HÓA DẪN XUẤT NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến dẫn xuất glucagon chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.14, SEQ ID NO.17, SEQ ID NO.19, SEQ ID NO.21, SEQ ID NO.24, SEQ ID NO.25, SEQ ID NO.29 và SEQ ID NO.34, cũng như polynucleotit mã hóa dẫn xuất này. Dẫn xuất glucagon này có đặc tính vật lý được cải thiện do thay đổi về điểm đẳng điện đồng thời có thể duy trì hoạt tính trên thụ thể glucagon, do đó làm tăng tính tuân thủ của đối tượng bị bệnh khi sử dụng làm dược chất điều trị hạ đường huyết, và cũng thích hợp để sử dụng kết hợp với các dược chất chống béo phì khác. Do đó, dẫn xuất glucagon theo sáng chế có thể được sử dụng hữu hiệu để phòng ngừa và điều trị hội chứng hạ đường huyết và bệnh béo phì.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến dẫn xuất glucagon có đặc tính vật lý được cải thiện do thay đổi về điểm đẳng điện, và polynucleotit mã hóa dẫn xuất glucagon này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Gần đây, tiến bộ kinh tế và thay đổi lối sống đã làm thay đổi lớn thói quen ăn uống. Đặc biệt, những người có cuộc sống bận rộn thường bị bệnh thừa cân và béo phì do sử dụng chế độ dinh dưỡng nhiều calo và lười vận động. Theo ghi nhận của Tổ chức Y tế Thế giới (WHO) trên toàn thế giới có trên một tỷ người trưởng thành bị bệnh thừa cân, trong số đó trên ba triệu người được chẩn đoán lâm sàng bị bệnh béo phì nặng, và mỗi năm có 25000 người chết vì các bệnh liên quan đến thừa cân hoặc béo phì (*World Health Organization, Global Strategy on Diet, Physical Activity and Health*, 2004).

Bệnh thừa cân và bệnh béo phì là nguyên nhân gây tăng huyết áp và nồng độ cholesterol và gây ra hoặc làm tiến triển nặng nhiều bệnh, như bệnh tim, bệnh đái tháo đường, bệnh viêm khớp, v.v. Ngoài ra, bệnh béo phì cũng là nguyên nhân chính làm tăng nguy cơ chứng xơ vữa động mạch, bệnh tăng huyết áp, bệnh tăng lipit máu, hoặc bệnh tim ở trẻ em hoặc trẻ vị thành niên cũng như người trưởng thành. Tuy nhiên, không dễ điều trị bệnh béo phì, do bệnh béo phì là bệnh phức tạp liên quan đến cơ chế kiểm soát thèm ăn và chuyển hóa năng lượng. Do đó, phương pháp điều trị bệnh béo phì không chỉ đòi hỏi nỗ lực của đối tượng bị bệnh, mà cần có cả phương pháp điều trị cơ chế bất thường liên quan đến kiểm soát thèm ăn và chuyển hóa năng lượng. Do đó, các nỗ lực đã được thực hiện để phát triển được chất để điều trị các cơ chế bất thường này.

Kết quả là, các dược chất, như rimonabant (Sanofi-Aventis), sibutramin (Abbott), contrave (Takeda), và orlistat (Roche) đã được phát triển, tuy nhiên các dược chất này có nhược điểm là gây ra tác dụng không mong muốn nghiêm trọng hoặc tác dụng chống béo phì rất thấp. Ví dụ, rimonabant có tác dụng không mong muốn là gây rối loạn hệ thần kinh trung ương, sibutramine và contrave có tác dụng không mong muốn trên hệ tim mạch, và orlistat chỉ làm giảm khoảng 4kg cân nặng khi uống trong 1 năm. Do đó, chưa có dược chất điều trị bệnh béo phì có thể được kê đơn an toàn cho đối tượng bị bệnh béo

phì.

Nhiều nghiên cứu chuyên sâu đã được thực hiện để phát triển được chất thế hệ mới để điều trị bệnh béo phì có thể khắc phục được nhược điểm của dược phẩm chống béo phì thông thường. Gần đây, dẫn xuất glucagon đã nhận được nhiều sự chú ý. Glucagon được sản sinh bởi tụy khi nồng độ glucoza máu giảm do tác dụng của các thuốc khác hoặc các bệnh khác, hoặc thiếu hụt hormon hoặc enzym. Glucagon kích thích phân hủy glycogen ở gan, và tạo điều kiện thuận lợi giải phóng glucoza để tăng nồng độ glucoza máu đến giới hạn bình thường. Ngoài tác dụng làm tăng nồng độ glucoza máu, glucagon ức chế thèm ăn và hoạt hóa lipaza nhạy hormon của tế bào tạo mỡ để tạo điều kiện thuận lợi phân hủy lipid, nhờ đó có tác dụng chống béo phì. Tuy nhiên, việc sử dụng glucagon làm dược chất bị hạn chế do glucagon có độ hòa tan thấp và kết tủa ở độ pH trung tính.

Một trong số các dẫn xuất glucagon là peptit tương tự glucagon 1, đang được phát triển để điều trị hội chứng tăng đường huyết ở đối tượng bị bệnh đái tháo đường. Peptit tương tự glucagon 1 có hoạt tính kích thích tổng hợp và bài tiết insulin, ức chế bài tiết glucagon, làm chậm tình trạng rỗng dạ dày, tăng sử dụng glucoza, và ức chế hấp thu dinh dưỡng.

Exendin-4, được tổng hợp từ thần lằn và có độ tương đồng axit amin bằng khoảng 50% so với peptit tương tự glucagon 1, cũng được ghi nhận là có hoạt tính hoạt hóa thụ thể peptit tương tự glucagon 1, nhờ đó làm giảm hội chứng tăng đường huyết ở đối tượng bị bệnh đái tháo đường. Tuy nhiên, dược phẩm chống béo phì chứa peptit tương tự glucagon 1 được ghi nhận là có tác dụng không mong muốn, như nôn và buồn nôn.

Do đó, để thay thế peptit tương tự glucagon, oxyntomodulin đã được tập trung nghiên cứu, oxyntomodulin có thể gắn kết với cả hai thụ thể của peptit tương tự glucagon 1 và glucagon. Oxyntomodulin là peptit được tổng hợp từ tiền chất glucagon và có hoạt tính ức chế hấp thu dinh dưỡng và tăng cảm giác no giống như peptit tương tự glucagon 1, và có hoạt tính phân giải lipid tương tự glucagon, do đó làm tăng hiệu lực điều trị bệnh béo phì.

Tuy nhiên, oxyntomodulin hoặc dẫn xuất của nó có nhược điểm là cần sử dụng hàng ngày lượng lớn dược chất này để điều trị bệnh béo phì do có hiệu lực thấp và thời gian bán thải *in vivo* ngắn.

Ngoài ra, khi một peptit có cả hoạt tính của peptit tương tự glucagon 1 lẫn glucagon, thì tỷ lệ hoạt tính của chúng không đổi, do đó khó sử dụng chất chủ vận đặc hiệu kép có tỷ lệ hoạt tính khác nhau. Do đó, phương pháp điều trị kết hợp có thể sử dụng các tỷ lệ hoạt tính khác nhau bằng cách điều chỉnh hàm lượng của peptit tương tự glucagon 1 và glucagon có thể hiệu quả hơn.

Tuy nhiên, để điều trị kết hợp, cần cải thiện đặc tính vật lý của glucagon, như kết tủa ở độ pH trung tính và kết tủa theo thời gian, do đó có độ hòa tan thấp.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

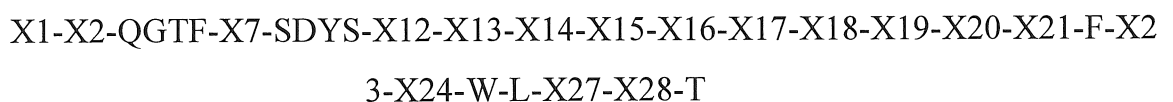
Các tác giả sáng chế đã phát triển dẫn xuất glucagon bằng cách cải biến một phần trình tự axit amin của glucagon để cải thiện tác dụng điều trị hội chứng hạ đường huyết và bệnh béo phì của glucagon bằng cách cải thiện đặc tính vật lý của glucagon, và phát hiện thấy rằng dẫn xuất glucagon này có độ hòa tan được cải thiện và độ ổn định cao hơn ở độ pH trung tính, nhờ đó hoàn thành sáng chế này.

Sáng chế đề cập đến dẫn xuất glucagon có đặc tính vật lý được cải thiện. Cụ thể sáng chế đề cập đến dẫn xuất glucagon chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.14, SEQ ID NO.17, SEQ ID NO.19, SEQ ID NO.21, SEQ ID NO.24, SEQ ID NO.25, SEQ ID NO.29 và SEQ ID NO.34.

Sáng chế cũng đề cập đến polynucleotit mã hóa dẫn xuất glucagon nêu trên.

Mô tả chi tiết sáng chế

Để đạt được các mục tiêu nêu trên, theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến dẫn xuất glucagon chứa trình tự axit amin có công thức (1) và có điểm đẳng điện, không giống với, tức là khác biệt với glucagon tự nhiên:



(1)

trong đó:

X1 là histidin, desamino-histidin, N-dimetyl-histidin, axit β -hydroxyimidazopropionic, axit 4-imidazoaxetic, axit β -carboxyimidazopropionic,

tryptophan, tyrosin, hoặc được loại bỏ;

X2 là axit α -methyl-glutamic, axit aminoisobutyric (Aib), D-alanin, glycin, Sar(N-methylglycin), serin, hoặc D-serin;

X7 là threonin hoặc valin;

X12 là lysin hoặc xystein;

X13 là tyrosin hoặc xystein;

X14 là leucin hoặc xystein;

X15 là axit aspartic, axit glutamic, hoặc xystein;

X16 là axit glutamic, axit aspartic, serin, axit α -methyl-glutamic, hoặc xystein;

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

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

X19 là alanin hoặc xystein;

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

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

X23 là valin hoặc arginin;

X24 là valin, leucin, glutamin, hoặc arginin;

X27 là isoleucin hoặc methionin; và

X28 là arginin hoặc asparagin

(với điều kiện là trình tự axit amin có công thức (1) không giống hệt như trình tự SEQ ID NO.1).

Dẫn xuất glucagon theo sáng chế bao gồm peptit, dẫn xuất peptit, hoặc hợp chất có cấu trúc tương tự peptit, có đặc tính vật lý được cải thiện do có điểm đẳng điện khác biệt với glucagon tự nhiên bằng cách cải biến một phần trình tự axit amin của glucagon tự nhiên.

Thuật ngữ “glucagon tự nhiên” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ glucagon tự nhiên của người có trình tự như sau:

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

Liên quan đến trình tự có công thức (1) theo sáng chế, các axit amin kéo dài từ đầu tận cùng N ở bên trái đến đầu tận cùng C ở bên phải được thể hiện theo phương pháp thông thường. Do đó, khi “vị trí của gốc axit amin bất kỳ được thể hiện trên trình tự có công thức (1)”, vị trí này cũng được thể hiện theo cách thức tương tự như khi vị trí bất kỳ trong glucagon tự nhiên hoặc các phân tử khác được thể hiện.

Theo sáng chế, không chỉ các mã một ký tự hoặc ba ký tự thông thường mã hóa cho các axit amin có trong tự nhiên, mà cả các mã ba ký tự mã hóa cho các axit amin khác, như α -axit aminoisobutyric (Aib), Sar(N-methylglycin), và axit α -methyl-glutamic, cũng được sử dụng.

Ngoài ra, các axit amin theo sáng chế được viết tắt theo quy tắc IUPAC-IUB như sau:

Alanin	A
Arginin	R
Asparagin	N
Axit aspartic	D
Xystein	C
Axit glutamic	E
Glutamin	Q
Glycin	G
Histidin	H
Isoleucin	I
Leucin	L
Lysin	K
Methionin	M
Phenylalanin	F
Prolin	P
Serin	S
Threonin	T
Tryptophan	W
Tyrosin	Y
Valin	V

Thuật ngữ “peptit” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ hợp chất có hai hoặc nhiều axit amin tự nhiên hoặc không tự nhiên hoặc các dẫn xuất axit amin, như axit α -amino được liên kết bằng liên kết peptit. Thuật ngữ “dẫn xuất glucagon” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ peptit chứa trình tự có công thức (1) hoặc dẫn xuất, chất tương tự, hoặc chất cải biến của nó. Peptit theo sáng chế bao gồm hợp chất có cấu trúc tương tự peptit, có điểm đẳng điện khác biệt với glucagon tự nhiên bằng cách cải biến một phần

trình tự axit amin của glucagon ở dạng gốc thay thế, v.v. Theo phương án cụ thể, dẫn xuất glucagon theo sáng chế có điểm đẳng điện khác biệt với glucagon tự nhiên đồng thời duy trì hoạt tính trên thụ thể glucagon. Theo phương án ưu tiên hơn, dẫn xuất glucagon theo sáng chế là peptit có độ ổn định được cải thiện của glucagon tự nhiên ở độ pH sinh lý đồng thời duy trì hoạt tính trên thụ thể glucagon.

Thuật ngữ “pI” hoặc “điểm đẳng điện” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ độ pH ở đó phân tử kích cỡ lớn, như polypeptit có điện tích toàn phần bằng không (0). Trong trường hợp của polypeptit có các nhóm chức tích điện khác nhau, điện tích toàn phần của toàn bộ polypeptit bằng “0” ở điểm ở đó độ pH tương đương với pI. Điện tích toàn phần của polypeptit ở độ pH cao hơn pI sẽ mang điện tích âm điện tích toàn phần của polypeptit ở độ pH thấp hơn pI sẽ mang điện tích dương.

Điểm đẳng điện có thể được đo bằng phương pháp thông thường trong lĩnh vực này. Ví dụ, điểm đẳng điện có thể được đo trên gel cố định có độ pH biến thiên bao gồm polyacrylamit, tinh bột, hoặc agarosa bằng phương pháp điện di đẳng điện, hoặc có thể được xác định từ trình tự axit amin bằng cách sử dụng thuật toán pI/Mw (http://expasy.org/tools/pi_tool.html; Gasteiger et al., 2003) trong phần mềm ExPASy.

Theo phương án ưu tiên, dẫn xuất glucagon chứa trình tự axit amin có công thức (1) bao gồm peptit bất kỳ được điều chế bằng cách thay thế, bổ sung, loại bỏ, hoặc cải biến sau dịch mã (ví dụ metyl hóa, axyl hóa, ubiquitin hóa, hoặc liên kết cộng hóa trị nội phân tử) các axit amin trong trình tự axit amin của glucagon tự nhiên như nêu trong SEQ ID NO.1, có độ hòa tan được cải thiện theo độ pH của dung dịch do có điểm đẳng điện khác biệt với glucagon tự nhiên đồng thời duy trì hoạt tính trên thụ thể glucagon, nhờ đó có độ ổn định hóa học *in vivo* được cải thiện.

Khi thay thế hoặc bổ sung axit amin, không chỉ 20 axit amin thường có trong protein của người, mà cả các axit amin không có trong tự nhiên hoặc không tự nhiên và dẫn xuất của chúng có thể được sử dụng. Các axit amin không tự nhiên có thể được cung cấp bởi Sigma-Aldrich, ChemPep Inc., Genzyme Pharmaceuticals, v.v. Peptit bao gồm các axit amin này và trình tự peptit không tự nhiên có thể được tổng hợp và mua từ các nhà cung cấp, ví dụ American Peptit Company, Bachem (USA), hoặc Anygen (Korea). Các dẫn xuất axit amin, ví dụ desamino-histidin, axit β -hydroxyimidazopropionic, axit 4-imidazoaxetic, hoặc axit β -carboxyimidazopropionic, có thể được thu nhận theo cách

thức tương tự.

Do có độ pH khoảng 7, nên glucagon hòa tan trong dung dịch có độ pH nằm trong khoảng từ 6 đến 8 và có xu hướng kết tủa ở độ pH trung tính. Trong dung dịch nước có độ pH bằng 3 hoặc thấp hơn, glucagon được hòa tan ở giai đoạn ban đầu nhưng kết tủa trong vòng 1 giờ do tạo gel. Do glucagon đã tạo gel chủ yếu bao gồm sợi dạng tấm β , nên khi tiêm glucagon đã kết tủa này bằng kim tiêm hoặc tiêm tĩnh mạch sẽ gây tắc mạch máu, do đó không thích hợp để tiêm. Để làm chậm kết tủa, dược phẩm có tính axit (độ pH nằm trong khoảng từ 2 đến 4) thường được sử dụng, nhờ đó glucagon có thể được duy trì ở trạng thái gần như không kết tủa trong khoảng thời gian ngắn. Tuy nhiên, glucagon có thể tạo sợi rất nhanh ở độ pH thấp, do đó dược phẩm có tính axit này phải được tiêm ngay sau khi bào chế.

Đã biết rằng độ hòa tan, hoạt tính, và độ ổn định của protein trong dung dịch có thể thay đổi theo điểm đẳng điện (Shaw, K. L. et al., *Protein Science* 10, pp 1206-1215, 2001).

Các tác giả sáng chế đã phát triển dẫn xuất glucagon có độ ổn định và hoạt tính chức năng được tăng cường bằng cách cải biến trình tự của glucagon tự nhiên, nhờ đó làm thay đổi điểm đẳng điện của nó. Do có điểm đẳng điện khác biệt với glucagon tự nhiên, nên dẫn xuất glucagon theo sáng chế có độ hòa tan và độ ổn định được cải thiện theo độ pH của dung dịch nhất định, so với glucagon tự nhiên.

Theo phương án ưu tiên, dẫn xuất glucagon theo sáng chế có thể là peptit, trong đó

X1 là histidin hoặc tryptophan, tyrosin, hoặc được loại bỏ;

X2 là serin hoặc axit aminoisobutyric (Aib);

X7 là threonin hoặc valin;

X12 là lysin hoặc xystein;

X13 là tyrosin hoặc xystein;

X14 là leucin hoặc xystein;

X15 là axit aspartic hoặc xystein;

X16 là axit glutamic, axit aspartic, serin, hoặc xystein;

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

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

X19 là alanin hoặc xystein;

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

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

X23 là valin hoặc arginin;

X24 là valin, leucin, hoặc glutamin;

X27 là isoleucin hoặc methionin; và

X28 là arginin hoặc asparagin, trong trình tự axit amin có công thức (1),

(với điều kiện là trình tự axit amin có công thức (1) không giống hệt như trình tự SEQ ID NO.1).

Tốt hơn nếu, dẫn xuất glucagon theo sáng chế có thể là peptit chứa trình tự axit amin bất kỳ trong số các trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.2-SEQ ID NO.34.

Peptit bao gồm dẫn xuất glucagon theo sáng chế có thể được điều chế bằng phương pháp tổng hợp tiêu chuẩn, hệ biểu hiện tái tổ hợp, hoặc phương pháp bất kỳ khác đã biết trong lĩnh vực này. Do đó, dẫn xuất tương tự glucagon theo sáng chế có thể được tổng hợp bằng nhiều phương pháp bao gồm các phương pháp mô tả dưới đây:

(a) phương pháp tổng hợp peptit pha rắn hoặc pha lỏng từng bước hoặc bằng cách lắp ráp mảnh, sau đó phân lập và tinh chế hợp chất peptit cuối cùng; hoặc

(b) phương pháp biểu hiện axit nucleic cấu trúc mã hóa peptit ở tế bào vật chủ và thu nhận hợp chất được biểu hiện từ môi trường nuôi cấy tế bào vật chủ; hoặc

(c) phương pháp biểu hiện axit nucleic cấu trúc *in vitro* không chứa tế bào mã hóa peptit và thu nhận hợp chất được biểu hiện từ đó; hoặc

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

Theo khía cạnh cụ thể, đã kiểm chứng được rằng dẫn xuất glucagon theo sáng chế có điểm đẳng điện khác biệt với glucagon tự nhiên (xem Bảng 1). Do đó, dẫn xuất glucagon theo sáng chế có độ hòa tan được cải thiện và độ ổn định theo độ pH của dung

dịch nhất định cao hơn glucagon tự nhiên. Do đó, dẫn xuất glucagon theo sáng chế có thể làm tăng tính tuân thủ của đối tượng bị bệnh khi sử dụng làm dược chất điều trị hạ đường huyết và cũng thích hợp để sử dụng kết hợp với các dược chất chống béo phì khác, do đó có thể được sử dụng hữu hiệu để phòng ngừa và điều trị hội chứng hạ đường huyết và bệnh béo phì.

Về vấn đề này, dẫn xuất glucagon theo sáng chế có thể tạo ra lựa chọn điều trị tối ưu đối với hội chứng hạ đường huyết, bệnh béo phì, hoặc các bệnh liên quan của chúng.

Ví dụ, dẫn xuất glucagon theo sáng chế là hormon kiểm soát đáp ứng insulin quan trọng, và cũng có thể được sử dụng hữu hiệu để điều trị hội chứng hạ đường huyết quá mức ở đối tượng bị bệnh đái tháo đường.

Ngoài ra, dẫn xuất glucagon theo sáng chế có thể được sử dụng làm thuốc không chỉ để phòng ngừa tăng cân, tăng cường giảm cân, hạn chế thừa cân và béo phì bao gồm bệnh béo phì nặng (ví dụ bằng cách kiểm soát thêm ăn, chế độ dinh dưỡng, lượng thức ăn, lượng calo, và/hoặc mức tiêu thụ năng lượng), mà còn để điều trị bệnh viêm liên quan đến béo phì, bệnh đường mật liên quan đến béo phì, và bệnh ngừng thở khi ngủ gây ra bởi béo phì, nhưng không chỉ giới hạn ở các bệnh này, và có thể được sử dụng để điều trị bệnh hoặc tình trạng bệnh liên quan. Dẫn xuất glucagon theo sáng chế cũng có thể được sử dụng để điều trị tình trạng bệnh liên quan đến bệnh béo phì, như hội chứng chuyển hóa, bệnh tăng huyết áp, rối loạn lipid máu gây ra bởi xơ vữa động mạch, chứng xơ vữa động mạch, chứng xơ cứng động mạch, bệnh mạch vành, bệnh đột quỵ, v.v. Tuy nhiên, tác dụng của dẫn xuất glucagon theo sáng chế có thể được điều hòa toàn bộ hoặc một phần bởi tác dụng liên quan đến cân nặng nêu trên hoặc có thể không phụ thuộc vào tác dụng liên quan đến cân nặng.

Trong khi đó, để cải thiện tác dụng điều trị của dẫn xuất glucagon theo sáng chế, dẫn xuất glucagon có thể được cải biến bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này, bao gồm phương pháp cải biến bằng polyme, như polyetylen glycol (PEG) và chuỗi đường, hoặc phương pháp dung hợp với albumin, transferrin, axit béo, và globulin miễn dịch, v.v. Ví dụ, ít nhất một chuỗi axit amin mạch bên trong hợp chất theo sáng chế có thể được gắn vào polyme để tăng độ hòa tan *in vivo* và/hoặc thời gian bán thải, và/hoặc tăng độ sinh khả dụng của chúng. Các phương pháp cải biến này được biết là làm giảm độ thanh thải của dược chất protein và peptit.

Đối với các polyme này, tốt hơn nếu polyme này là polyme trơ được dụng hòa tan và không độc (lương tính hoặc thân nước), và tốt hơn nếu, polyme này có thể bao gồm PEG, homopolyme hoặc copolyme của PEG, polyme được thể monometyl (mPEG), và axit poly-amin, như poly-lysin, axit polyaspartic, và axit polyglutamic.

Các biến thể của dẫn xuất glucagon nêu trên cũng nằm trong phạm vi của sáng chế sáng chế.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến polynucleotit mã hóa dẫn xuất glucagon nêu trên.

Liên quan đến polynucleotit, thuật ngữ “độ tương đồng” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ mức độ tương tự với trình tự axit amin thể đại và trình tự axit nucleic thể đại, và bao gồm trình tự gen có độ tương đồng bằng 75% hoặc cao hơn, tốt hơn nếu 85% hoặc cao hơn, tốt hơn nếu 90% hoặc cao hơn, và thậm chí tốt hơn nếu 95% hoặc cao hơn so với trình tự polynucleotit mã hóa dẫn xuất glucagon. Độ tương đồng được đánh giá bằng mắt thường hoặc bằng cách sử dụng chương trình có bán trên thị trường. Bằng cách sử dụng chương trình máy tính có bán trên thị trường, độ tương đồng giữa hai hoặc nhiều trình tự có thể được biểu diễn dưới dạng tỷ lệ phần trăm (%), và độ tương đồng (%) giữa các trình tự liên kế có thể được đánh giá. Polynucleotit mã hóa dẫn xuất glucagon có thể được chèn vào vector và biểu hiện để thu được lượng lớn của dẫn xuất glucagon.

Để biểu hiện tái tổ hợp, polynucleotit theo sáng chế được chèn vào vector thích hợp để thiết kế vector tách dòng hoặc vector tái tổ hợp chứa polynucleotit này, và vector này cũng nằm trong phạm vi của sáng chế sáng chế.

Thuật ngữ “vector tái tổ hợp” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ ADN cấu trúc chứa trình tự polynucleotit mã hóa peptit đích, được liên kết điều khiển với trình tự điều hòa thích hợp để cho phép biểu hiện peptit đích, ví dụ dẫn xuất glucagon, ở tế bào vật chủ. Trình tự điều hòa bao gồm vùng khởi đầu hoạt hóa phiên mã, trình tự chỉ huy để điều hòa phiên mã, trình tự mã hóa vùng gắn kết ARN thông tin ribosom thích hợp, và trình tự điều hòa kết thúc phiên mã và dịch mã. Sau khi được chuyển vào tế bào vật chủ thích hợp, vector tái tổ hợp có thể được tái bản hoặc có hoạt tính không phụ thuộc vào bộ gen của vật chủ, hoặc có thể được tích hợp vào chính bộ gen của vật chủ.

Vector tái tổ hợp được sử dụng trong sáng chế không bị giới hạn cụ thể miễn là vector này có thể tái bản trong tế bào vật chủ, và có thể được thiết kế bằng cách sử dụng vector bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này. Ví dụ về vector này có thể bao gồm plasmid, cosmit, virut, và thực khuẩn thể tái tổ hợp hoặc tự nhiên. Ví dụ về vector thực khuẩn thể hoặc vector cosmit bao gồm pWE15, M13, MBL3, MBL4, IXII, ASHII, APII, t10, t11, Charon4A, Charon21A, v.v., và ví dụ về vector plasmid bao gồm pBR, pUC, pBluescriptII, pGEM, pTZ, pCL, pET, v.v. Các vector có thể được sử dụng trong sáng chế không bị giới hạn cụ thể nhưng vector biểu hiện đã biết bất kỳ có thể được sử dụng.

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

Thuật ngữ “chuyển gen” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ quá trình chèn vector tái tổ hợp bao gồm polynucleotit mã hóa protein đích vào tế bào vật chủ, nhờ đó cho phép biểu hiện polynucleotit mã hóa protein trong tế bào vật chủ. Đối với polynucleotit đã được chuyển gen, không quan trọng là polynucleotit này được chèn vào nhiễm sắc thể của tế bào vật chủ và nằm trong nhiễm sắc thể hoặc nằm ngoài nhiễm sắc thể, miễn là có thể được biểu hiện trong tế bào vật chủ, và cả hai trường hợp được bao gồm trong sáng chế.

Ngoài ra, polynucleotit bao gồm ADN và ARN mã hóa protein đích. Polynucleotit có thể được chèn ở dạng bất kỳ vào tế bào vật chủ và biểu hiện trong tế bào vật chủ. Ví dụ, polynucleotit có thể được chèn vào tế bào vật chủ ở dạng cat-xet biểu hiện. Cat-xet biểu hiện có thể bao gồm vùng khởi đầu được liên kết điều khiển với polynucleotit, trình tự tín hiệu kết thúc phiên mã, vùng gắn kết ribosom, và trình tự tín hiệu kết thúc dịch mã. Cat-xet biểu hiện có thể ở dạng vector biểu hiện có khả năng tự tái bản. Ngoài ra, polynucleotit có thể được chèn vào tế bào vật chủ và liên kết điều khiển với trình tự cần thiết để biểu hiện trong tế bào vật chủ, nhưng không chỉ giới hạn ở. Ngoài ra, thuật ngữ “được liên kết điều khiển” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ liên kết chức năng giữa vùng khởi đầu, hoạt hóa và điều hòa phiên mã polynucleotit mã hóa protein đích theo sáng chế, và trình tự gen nêu trên.

Vật chủ thích hợp được sử dụng trong sáng chế không bị giới hạn cụ thể miễn là

có thể biểu hiện polynucleotit theo sáng chế. Ví dụ về vật chủ thích hợp có thể bao gồm vi khuẩn thuộc chi *Escherichia*, như *E. coli*, vi khuẩn thuộc chi *Bacillus*, như *Bacillus subtilis*, vi khuẩn thuộc chi *Pseudomonas*, như *Pseudomonas putida*, nấm men, như *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, và *Schizosaccharomyces pombe*, tế bào côn trùng, như *Spodoptera frugiperda* (Sf9), và tế bào động vật, như CHO, COS, và BSC.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến dược phẩm để phòng ngừa hoặc điều trị hội chứng hạ đường huyết hoặc bệnh béo phì chứa dẫn xuất glucagon.

Thuật ngữ “phòng ngừa” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ biện pháp bất kỳ ức chế hoặc làm chậm khởi phát bệnh béo phì bằng cách sử dụng dẫn xuất glucagon hoặc dược phẩm, và thuật ngữ “điều trị” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ biện pháp bất kỳ cải thiện triệu chứng của bệnh béo phì hoặc tạo ra thay đổi có lợi bằng cách sử dụng dẫn xuất glucagon hoặc dược phẩm.

Thuật ngữ “sử dụng” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ việc đưa hợp chất cụ thể vào đối tượng bị bệnh bằng phương pháp thích hợp, và dược phẩm có thể được sử dụng theo đường đưa thuốc bất kỳ miễn là dược phẩm có thể đến được mô đích. Ví dụ, dược phẩm có thể được sử dụng qua đường tiêm màng bụng, tiêm tĩnh mạch, tiêm bắp, tiêm dưới da, tiêm qua da, đường miệng, khu trú, trong mũi, qua đường hô hấp, qua đường trực tràng, v.v.

Thuật ngữ “hội chứng hạ đường huyết” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ triệu chứng cấp tính của bệnh đái tháo đường, ở đó nồng độ glucoza máu thấp hơn nồng độ glucoza máu của đối tượng bình thường, và tình trạng khi nồng độ glucoza máu bằng 50mg/dL hoặc nhỏ hơn. Hội chứng hạ đường huyết thường xuất hiện khi đối tượng uống thuốc hạ đường huyết đã ăn ít hơn bình thường hoặc thực hiện hoạt động hoặc tập thể dục quá mức bình thường. Ngoài ra, hội chứng hạ đường huyết có thể xuất hiện do sử dụng dược chất hạ glucoza, thể chất yếu, thiếu hụt hormone, như hormone tuyến thượng thận và glucagon, khối u ở đảo tụy sản xuất insulin, hội chứng tự miễn dịch insulin, đối tượng bị cắt dạ dày, rối loạn chuyển hóa carbohydrat bẩm sinh, v.v.

Các triệu chứng của hội chứng hạ đường huyết bao gồm suy nhược, run sợ, da tái, vã mồ hôi, chóng mặt, kích động, lo lắng, tim đập nhanh, dạ dày rỗng, đau đầu, mệt mỏi, v.v. Trong trường hợp của hội chứng hạ đường huyết nghiêm trọng, có thể dẫn đến co giật hoặc co cứng, và có thể gây sốc, do đó gây ngất xỉu.

Thuật ngữ “bệnh béo phì” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ tình trạng bệnh lý dư thừa chất béo trong cơ thể, và khi đối tượng có chỉ số khối lượng cơ thể (BMI; khối lượng cơ thể (kg) chia cho bình phương chiều cao cơ thể (m)) bằng 25 hoặc cao hơn được chuẩn đoán là bị bệnh béo phì. Bệnh béo phì thường xuất hiện do mất cân bằng năng lượng trong thời gian dài ở đó năng lượng hấp thu vượt quá năng lượng tiêu hao. Bệnh béo phì là bệnh chuyển hóa ảnh hưởng đến toàn bộ cơ thể, tăng nguy cơ bệnh đái tháo đường, bệnh tăng lipid máu, rối loạn tình dục, bệnh viêm khớp, và bệnh tim mạch, và trong một số trường hợp, bệnh béo phì cũng liên quan đến sự xuất hiện của bệnh ung thư.

Dược phẩm theo sáng chế có thể chứa chất mang, tá dược, hoặc tá dược pha loãng được dụng. Thuật ngữ “dược dụng” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ hợp chất có lượng đầy đủ để tạo ra tác dụng điều trị và không gây tác dụng bất lợi, và có thể được xác định dễ dàng bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này dựa trên các yếu tố đã biết, như loại bệnh, tuổi, cân nặng, tình trạng sức khỏe, giới tính, độ mẫn cảm với dược chất của đối tượng bị bệnh, đường đưa thuốc, phương pháp sử dụng, tần suất sử dụng, thời gian điều trị, dược chất được phối hợp hoặc sử dụng kết hợp đồng thời, v.v.

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

Dược phẩm theo sáng chế có thể được bào chế bằng cách kết hợp với chất mang dược dụng nêu trên. Ví dụ, để sử dụng qua đường miệng, dược phẩm có thể được bào chế thành viên nén, viên ngậm, viên nang, cốm thuốc, hỗn dịch, xi-rô, viên nhện, v.v. Để sử dụng qua đường tiêm, dược phẩm có thể được bào chế thành dạng thuốc đơn liều hoặc đa liều đựng trong ống tiêm hoặc đồ chứa. Dược phẩm cũng có thể được bào chế thành dung dịch, hỗn dịch, viên nén, viên nang, và chế phẩm giải phóng chậm.

Trong khi đó, ví dụ về chất mang, tá dược, và tá dược pha loãng thích hợp có thể bao gồm lactoza, dextroza, sucroza, sorbitol, manitol, xylitol, erythritol, maltitol, tinh bột, gồm acacia, alginat, gelatin, canxi phosphat, canxi silicat, xenluloza, metyl xenluloza,

xenluloza vi tinh thể, polyvinylpyrrolidon, nước, metyl hydroxybenzoat, propyl hydroxybenzoat, talc, magie stearat, dầu khoáng, v.v. Ngoài ra, dược phẩm có thể còn chứa tá dược độn, chất chống đông, tá dược trơn, chất làm ẩm, chất thơm, chất bảo quản, v.v.

Ngoài ra, dược phẩm theo sáng chế có thể được bào chế ở dạng thuốc bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm viên nén, viên tròn, thuốc bột, thuốc cốm, viên nang, hỗn dịch, dung dịch thuốc uống, nhũ tương, xi-rô, dung dịch tiêm vô trùng, dung dịch chứa dung môi và không chứa nước, chế phẩm đông khô, và thuốc đạn.

Ngoài ra, dược phẩm có thể được bào chế thành dạng thuốc đơn liều thích hợp cho cơ thể đối tượng bị bệnh, và tốt hơn nếu dược phẩm có thể được bào chế thành chế phẩm hữu ích cho dược chất peptit theo phương pháp thông thường để sử dụng qua đường miệng hoặc đường ngoài tiêu hóa, như đường qua da, tiêm tĩnh mạch, tiêm bắp, tiêm động mạch, tiêm vào tủy sống, tiêm vào nội tủy mạc, tiêm vào não thất, qua đường hô hấp, tiêm qua da, tiêm dưới da, tiêm màng bụng, trong mũi, trong dạ dày, khu trú, dưới lưỡi, âm đạo, hoặc trực tràng, nhưng không chỉ giới hạn ở các đường đưa thuốc này.

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

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

Tổng liều hữu hiệu của dược phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng cho đối tượng bị bệnh ở dạng liều đơn, hoặc có thể được sử dụng trong thời gian kéo dài ở dạng đa liều theo phác đồ điều trị chia liều. Trong dược phẩm theo sáng chế, lượng hoạt chất có thể thay đổi phụ thuộc vào mức độ nghiêm trọng của bệnh. Tốt hơn nếu, tổng liều hàng ngày của peptit theo sáng chế có thể nằm trong khoảng từ 0,0001 μ g đến 500mg/kg cân nặng của đối tượng bị bệnh. Tuy nhiên, liều hữu hiệu của dẫn xuất glucagon được xác định theo các yếu tố khác nhau bao gồm tuổi, cân nặng, tình trạng sức khỏe, giới tính của đối tượng bị bệnh, mức độ nghiêm trọng của bệnh, chế độ dinh dưỡng, và tốc độ thải

trừ, cũng như đường đưa thuốc và tần suất sử dụng của dược phẩm. Về vấn đề này, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể dễ dàng xác định được liều hữu hiệu thích hợp để sử dụng dược phẩm theo sáng chế. Dược phẩm theo sáng chế không bị giới hạn ở dạng thuốc và đường đưa thuốc và cách dùng, miễn là thể hiện tác dụng theo sáng chế.

Dược phẩm theo sáng chế có hiệu lực và nồng độ hoạt chất *in vivo* rất cao, nhờ đó giảm đáng kể liều lượng và tần suất sử dụng.

Cụ thể, do dược phẩm theo sáng chế chứa hoạt chất là dẫn xuất glucagon có điểm đẳng điện khác biệt với glucagon tự nhiên, nên dược phẩm này có độ hòa tan được cải thiện và độ ổn định cao theo độ pH của dung dịch nhất định, do đó dược phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng hữu hiệu trong bào chế thuốc chứa glucagon ổn định để điều trị hội chứng hạ đường huyết hoặc bệnh béo phì.

Hơn nữa, dược phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng riêng hoặc kết hợp với các dược phẩm khác có tác dụng phòng ngừa hoặc điều trị bệnh béo phì. Ngoài ra, dược phẩm theo sáng chế có thể còn chứa dược chất khác có tác dụng phòng ngừa hoặc điều trị bệnh béo phì.

Dược chất khác có tác dụng phòng ngừa hoặc điều trị bệnh béo phì không bị giới hạn cụ thể, và có thể bao gồm chất chủ vận thụ thể peptit tương tự glucagon 1, chất đối kháng thụ thể peptit kích thích sản sinh insulin phụ thuộc glucoza, chất chủ vận thụ thể leptin, chất ức chế dipeptidyl peptidaza-IV, chất đối kháng thụ thể Y5, chất đối kháng thụ thể hormon tích tụ melanin, chất chủ vận thụ thể Y2/3/4, chất chủ vận thụ thể MC3/4, chất ức chế lipaza dạ dày/tụy, chất chủ vận 5HT2c, chất chủ vận thụ thể β 3A, chất chủ vận thụ thể amylin, chất đối kháng ghrelin and a chất đối kháng thụ thể ghrelin, chất chủ vận thụ thể yếu tố tăng trưởng nguyên bào sợi-1, chất chủ vận thụ thể yếu tố tăng trưởng nguyên bào sợi-21, chất chủ vận thụ thể cholecystokinin, chất chủ vận thụ thể polypeptit tụy, chất ức chế tái hấp thu dopamin, v.v.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp phòng ngừa hoặc điều trị hội chứng hạ đường huyết hoặc bệnh béo phì, bao gồm bước cho đối tượng sử dụng dẫn xuất glucagon hoặc dược phẩm chứa dẫn xuất này.

Thuật ngữ “đối tượng” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ đối tượng nghi ngờ bị

hội chứng hạ đường huyết hoặc bệnh béo phì, là động vật có vú bao gồm người, chuột nhắt, và vật nuôi bị hội chứng hạ đường huyết hoặc bệnh béo phì, hoặc có nguy cơ bị hội chứng hạ đường huyết hoặc bệnh béo phì. Tuy nhiên, đối tượng bất kỳ cần điều trị bằng dẫn xuất glucagon hoặc dược phẩm theo sáng chế không bị giới hạn cụ thể. Dược phẩm chứa dẫn xuất glucagon theo sáng chế có thể được sử dụng cho đối tượng nghi ngờ bị hội chứng hạ đường huyết hoặc bệnh béo phì, nhờ đó điều trị hiệu quả cho đối tượng này. Hội chứng hạ đường huyết và bệnh béo phì được định nghĩa nêu trên.

Phương pháp điều trị theo sáng chế có thể bao gồm bước sử dụng dược phẩm chứa dẫn xuất glucagon ở lượng hữu hiệu. Tốt hơn nếu, tổng liều hàng ngày cần được xác định dựa trên chẩn đoán thích hợp của nhân viên y tế và được sử dụng một hoặc nhiều lần. Theo sáng chế, liều hữu hiệu cho đối tượng bị bệnh cụ thể bất kỳ có thể thay đổi phụ thuộc vào các yếu tố khác nhau, như loại và mức độ đáp ứng cần đạt được, dược phẩm cụ thể bao gồm cho dù được chất khác có được sử dụng hay không, tuổi, cân nặng, tình trạng sức khỏe, giới tính của đối tượng bị bệnh, và chế độ dinh dưỡng, thời gian sử dụng và đường đưa thuốc, tốc độ thải trừ của dược phẩm, thời gian điều trị, các dược chất khác được sử dụng kết hợp hoặc đồng thời với dược phẩm cụ thể, và các yếu tố tương tự đã biết trong lĩnh vực này.

Sáng chế cũng mô tả việc sử dụng dẫn xuất glucagon trong sản xuất thuốc để phòng ngừa hoặc điều trị hội chứng hạ đường huyết hoặc bệnh béo phì.

Dẫn xuất glucagon theo sáng chế có độ ổn định và độ hòa tan rất cao theo độ pH của dung dịch nhất định có điểm đẳng điện khác biệt với glucagon tự nhiên. Do đó, khi dẫn xuất glucagon theo sáng chế được sử dụng để điều trị hội chứng hạ đường huyết, có thể làm tăng tính tuân thủ của đối tượng bị bệnh. Ngoài ra, dẫn xuất glucagon theo sáng chế thích hợp để sử dụng kết hợp với các dược chất chống béo phì khác, do đó có thể được sử dụng hữu hiệu để phòng ngừa hoặc điều trị hội chứng hạ đường huyết và bệnh béo phì.

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: Sản xuất dòng tế bào có đáp ứng AMP mạch vòng với glucagon

PCR được thực hiện bằng cách sử dụng khuôn là vùng tương ứng với khung đọc mã mở (open reading frame - ORF) trong ADN bổ sung (OriGene Technologies, Inc., USA) của gen thụ thể glucagon của người, và mỗi xuôi có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.35 và mỗi ngược có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.36, bao gồm mỗi vị trí cắt giới hạn HindIII và EcoRI.

Cụ thể, PCR được thực hiện trong tổng cộng 30 chu trình bằng cách sử dụng các điều kiện sau: 95°C biến tính trong 60 giây, lai ở nhiệt độ 55°C trong 60 giây, và tổng hợp ở nhiệt độ 68°C trong 30 giây. Do đó, sản phẩm PCR thu được được điện di trên gel agarosa 1,0%, và băng có kích cỡ bằng 450bp được thu nhận từ đó bằng cách rửa giải.

Mỗi xuôi: 5'-CAGCGACACCGACCGTCCCCCGTACTTAAGGCC-3' (SEQ ID NO.35)

Mỗi ngược: 5'-CTAACCGACTCTCGGGGAAGACTGAGCTCGCC-3' (SEQ ID NO.36)

Sản phẩm PCR được tách dòng vào vector biểu hiện tế bào động vật đã biết, x0GC/dhfr, để thu được vector tái tổ hợp x0GC/GCGR. Dòng tế bào CHO DG44 được nuôi cấy trên môi trường DMEM/F12 (10% FBS) được chuyển nạp với vector tái tổ hợp x0GC/GCGR bằng cách sử dụng lipofectamin, và nuôi cấy chọn lọc trên môi trường chọn lọc chứa 1mg/mL G418 và 10nM methotraxat. Các tế bào đơn dòng được chọn lọc từ đó bằng phương pháp pha loãng tối hạn, và trong số đó, dòng tế bào có đáp ứng AMP mạch vòng mạnh với glucagon theo cơ chế phụ thuộc nồng độ được chọn lọc cuối cùng từ đó.

Ví dụ 2: Tổng hợp dẫn xuất glucagon

Đã biết rằng độ hòa tan, hoạt tính, và độ ổn định của protein trong dung dịch có thể thay đổi theo điểm đẳng điện (Shaw, K. L. et al., *Protein Science* 10, pp 1206-1215, 2001). Để tổng hợp dẫn xuất glucagon có đặc tính vật lý được cải thiện, trình tự axit amin của glucagon tự nhiên như nêu trong SEQ ID NO.1 được thay thế bằng các gốc axit amin có điện tích dương và điện tích âm, nhờ đó dẫn xuất glucagon được tổng hợp như được thể hiện trong Bảng 1.

Bảng 1

SEQ ID NO	Trình tự axit amin	Tạo vòng
SEQ ID NO.1	HSQGTFTSDYSKYLD S RRRAQDFVQWLMNT	-
SEQ ID NO.2	HSQGTFTSDYSKYLD C DRAQDFVQWLMNT	-
SEQ ID NO.3	HSQGTFTSDYSKYLD C ERAQDFVQWLMNT	-
SEQ ID NO.4	HSQGTFTSDYSKYLD S CDAQDFVQWLMNT	-
SEQ ID NO.5	HSQGTFTSDYSKYLD S CEAQDFVQWLMNT	-
SEQ ID NO.6	HSQGTFTSDYSKYLD S CEADDFVQWLMNT	-
SEQ ID NO.7	YSQGTFTSDYSKYLD S CEADDFVQWLMNT	-
SEQ ID NO.8	YXQGTFTSDYSKYLD S CDAQDFVQWLINT	-
SEQ ID NO.9	YXQGTFTSDYSKYLD S CDAQDFVWLINT	-
SEQ ID NO.10	YXQGTFTSDYSKYLD S CDADDFVWLINT	-
SEQ ID NO.11	YXQGTFTSDYSKYLD E KCAKEFVQWLMNT	-
SEQ ID NO.12	YXQGTFTSDYSKYLD S RRRAQDFVQWLMNT	-
SEQ ID NO.13	YXQGTFTSDYSCYL D EKRAKEFVQWLMNT	-
SEQ ID NO.14	YXQGTFTSDYSKYLD C KRAKEFVQWLMNT	-
SEQ ID NO.15	YXQGTFTSDYSKYLD C EKRAQDFVQWLMNT	-
SEQ ID NO.16	YXQGTFTSDYSKYLD C RRRAQVQWLMRT	-
SEQ ID NO.17	YXQGTFTSDYSKYLD C VRAQDFVQWLMRT	-
SEQ ID NO.18	YXQGTFTSDYSKYLD S RRACDFRLWLMNT	-
SEQ ID NO.19	YXQGTFTSDYSKYLD C EKRAKEFVQWLMNT	vòng được tạo ra
SEQ ID NO.20	YXQGTFTSDYSKYLD E CRAKEFVQWLMNT	vòng được tạo ra
SEQ ID NO.21	YXQGTFTSDYSKYLD E KCAKEFVQWLMNT	vòng được tạo ra
SEQ ID NO.22	YXQGTFTSDYSKYLD E KRCKEFVQWLMNT	vòng được tạo ra
SEQ ID NO.23	YXQGTFTSDYSKYLD E KRAKEFVQWLMNT	vòng được tạo ra
SEQ ID NO.24	YXQGTFTSDYSKYLD E KRAKCFVQWLMNT	vòng được tạo ra
SEQ ID NO.25	YXQGTFTSDYSKYLD E CRAKDFVQWLMNT	vòng được tạo ra
SEQ ID NO.26	WXQGTFTSDYSKYLD E CRAKDFVQWLMNT	vòng được tạo ra
SEQ ID NO.27	YXQGTFTSDYSKYLD E CRAKDFVQWLMNT	vòng được tạo ra
SEQ ID NO.28	WXQGTFTSDYSKYLD E CRAKDFVQWLMNT	vòng được tạo ra
SEQ ID NO.29	YXQGTFTSDYSKYLD E ERRAKDFVQWLMNT	vòng được tạo ra
SEQ ID NO.30	WXQGTFTSDYSKYLD E ERRAKDFVQWLMNT	vòng được tạo ra
SEQ ID NO.31	YXQGTFTSDYSKYLD C KRAKEFVQWLMNT	vòng được tạo ra
SEQ ID NO.32	-SQGTFTSDYSKYLD E CRAKEFVQWLMNT	vòng được tạo ra
SEQ ID NO.33	WXQGTFTSDYSKYLD E ERRAKDFVQWLMNT	vòng được tạo ra
SEQ ID NO.34	YXQGTFTSDYSKYLD E ERRAKDFVQWLMNT	vòng được tạo ra

Liên quan đến SEQ ID NO.8-SEQ ID NO.31 và SEQ ID NO.33-SEQ ID NO.34 được thể hiện trong Bảng 1, “axit amin X” là axit amin không có trong tự nhiên, axit aminoisobutyric (Aib); “-” trong trình tự axit amin SEQ ID NO.32 có nghĩa là không có gốc axit amin ở vị trí tương ứng; và hai gốc axit amin được in đậm và gạch chân thể hiện vòng được tạo ra giữa hai gốc axit amin này.

Ví dụ 3: Đo điểm đẳng điện của dẫn xuất glucagon

Để đánh giá đặc tính vật lý được cải thiện của dẫn xuất glucagon được tổng hợp trong ví dụ 2, điểm đẳng điện được tính toán dựa trên các trình tự axit amin bằng cách sử

dụng thuật toán pI/Mw (http://expasy.org/tools/pi_tool.html; Gasteiger et al., 2003) trong chương trình ExPASy.

Bảng 2

Dẫn xuất glucagon	Điểm đẳng điện
SEQ ID NO.1	6,8
SEQ ID NO.2	4,56
SEQ ID NO.3	4,66
SEQ ID NO.4	4,13
SEQ ID NO.5	4,22
SEQ ID NO.6	4,03
SEQ ID NO.7	3,71
SEQ ID NO.8	3,77
SEQ ID NO.9	3,77
SEQ ID NO.10	3,66
SEQ ID NO.11	4,78
SEQ ID NO.12	6,04
SEQ ID NO.13	4,78
SEQ ID NO.14	8,12
SEQ ID NO.15	6,11
SEQ ID NO.16	9,11
SEQ ID NO.17	6,03
SEQ ID NO.18	8,15
SEQ ID NO.19	8,12
SEQ ID NO.20	4,78
SEQ ID NO.21	4,78
SEQ ID NO.22	6,20
SEQ ID NO.23	6,20
SEQ ID NO.24	6,21
SEQ ID NO.25	8,12
SEQ ID NO.26	4,68
SEQ ID NO.27	4,68
SEQ ID NO.28	4,68
SEQ ID NO.29	6,15
SEQ ID NO.30	4,44
SEQ ID NO.31	8,12
SEQ ID NO.32	4,78
SEQ ID NO.33	6,21
SEQ ID NO.34	6,21

Như được thể hiện trong Bảng 2, trong khi glucagon tự nhiên có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1 có điểm đẳng điện bằng 6,8, thì dẫn xuất glucagon theo sáng chế có điểm đẳng điện nằm trong khoảng từ 4 đến 9, do đó có đặc tính vật lý được cải thiện. Do dẫn xuất glucagon theo sáng chế có điểm đẳng điện khác biệt với glucagon tự nhiên, nên dẫn xuất này có độ hòa tan được cải thiện và độ ổn định cao hơn theo độ pH dung dịch nhất định.

Do đó, khi dẫn xuất glucagon theo sáng chế được sử dụng để điều trị hội chứng hạ

đường huyết, có thể làm tăng tính tuân thủ của đối tượng bị bệnh, và cũng thích hợp để sử dụng kết hợp với các dược chất chống béo phì khác, ví dụ chất đối kháng thụ thể peptit tương tự glucagon 1, chất đối kháng thụ thể peptit kích thích sản sinh insulin phụ thuộc glucoza, v.v., do đó có thể được sử dụng hữu hiệu để điều trị hội chứng hạ đường huyết và bệnh béo phì.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rằng sáng chế có thể được thể hiện bằng các dạng cụ thể khác mà không nằm ngoài phạm vi của sáng chế. Các phương án đã mô tả chỉ nhằm mục đích minh họa chứ không giới hạn phạm vi của sáng chế. Do đó, phạm vi của sáng chế được thể hiện bởi bộ yêu cầu bảo hộ kèm theo chứ không phải phần mô tả nêu trên. Toàn bộ các thay đổi nằm trong phạm vi của bộ yêu cầu bảo hộ cũng nằm trong phạm vi của sáng chế.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Dẫn xuất glucagon chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.14, SEQ ID NO.17, SEQ ID NO.19, SEQ ID NO.21, SEQ ID NO.24, SEQ ID NO.25, SEQ ID NO.29 và SEQ ID NO.34.
2. Dẫn xuất glucagon theo điểm 1, trong đó dẫn xuất glucagon này có hoạt tính kích thích thụ thể glucagon.
3. Dẫn xuất glucagon theo điểm 1, trong đó dẫn xuất glucagon này chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.21, SEQ ID NO.24, SEQ ID NO.25 và SEQ ID NO.29
4. Polynucleotit mã hóa dẫn xuất glucagon theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

```

<110> HANMI PHARM. CO., LTD.
<120> DẪN XUẤT GLUCAGON VÀ POLYNUCLEOTIT MÃ HÓA DẪN XUẤT NÀY
<130> OPA15322
<150> KR 10-2014-0193800
<151> 2014-12-30
<160> 36
<170> KoPatentIn 3.0
<210> 1
<211> 29
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 1
His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser
 1           5           10           15
Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
      20           25

<210> 2
<211> 29
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Dẫn xuất glucagon
<400> 2
His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Cys
 1           5           10           15
Asp Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
      20           25

<210> 3
<211> 29
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Dẫn xuất glucagon
<400> 3
His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Cys
 1           5           10           15
Glu Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
      20           25

<210> 4
<211> 29
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Dẫn xuất glucagon
<400> 4
His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser
 1           5           10           15
Cys Asp Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
      20           25

<210> 5
<211> 29
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Dẫn xuất glucagon
<400> 5
His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser
 1           5           10           15
Cys Glu Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
      20           25

<210> 6
<211> 29
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Dẫn xuất glucagon
<400> 6
His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser
 1           5           10           15
Cys Glu Ala Asp Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
      20           25

<210> 7
<211> 29
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>

```

```

<223>   Dẫn xuất glucagon
<400>   7
Tyr Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser
 1             5             10             15

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

<210>   8
<211>   29
<212>   PRT
<213>   Trình tự nhân tạo
<220>
<223>   Dẫn xuất glucagon
<220>
<221>   Biến thể
<222>   (2)
<223>   Xaa là axit aminoisobutyric
<400>   8
Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser
 1             5             10             15
Cys Asp Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Ile Asn Thr
      20             25

<210>   9
<211>   29
<212>   PRT
<213>   Trình tự nhân tạo
<220>
<223>   Dẫn xuất glucagon
<220>
<221>   Biến thể
<222>   (2)
<223>   Xaa là axit aminoisobutyric
<400>   9
Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser
 1             5             10             15
Cys Asp Ala Gln Asp Phe Val Val Trp Leu Ile Asn Thr
      20             25

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

<210>   11
<211>   29
<212>   PRT
<213>   Trình tự nhân tạo
<220>
<223>   Dẫn xuất glucagon
<220>
<221>   Biến thể
<222>   (2)
<223>   Xaa là axit aminoisobutyric
<400>   11
Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu
 1             5             10             15
Lys Cys Ala Lys Glu Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
      20             25

<210>   12
<211>   29
<212>   PRT
<213>   Trình tự nhân tạo
<220>
<223>   Dẫn xuất glucagon
<220>
<221>   Biến thể
<222>   (2)
<223>   Xaa là axit aminoisobutyric
<400>   12
Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser

```



```

      1           5           10           15
Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
      20           25
<210>      13
<211>      29
<212>      PRT
<213>      Trình tự nhân tạo
<220>
<223>      Dẫn xuất glucagon
<220>
<221>      Biến thể
<222>      (2)
<223>      Xaa là axit aminoisobutyric
<400>      13
Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Cys Tyr Leu Asp Glu
      1           5           10           15
Lys Arg Ala Lys Glu Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
      20           25
<210>      14
<211>      29
<212>      PRT
<213>      Trình tự nhân tạo
<220>
<223>      Dẫn xuất glucagon
<220>
<221>      Biến thể
<222>      (2)
<223>      Xaa là axit aminoisobutyric
<400>      14
Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Cys
      1           5           10           15
Lys Arg Ala Lys Glu Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
      20           25
<210>      15
<211>      29
<212>      PRT
<213>      Trình tự nhân tạo
<220>
<223>      Dẫn xuất glucagon
<220>
<221>      Biến thể
<222>      (2)
<223>      Xaa là axit aminoisobutyric
<400>      15
Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Cys Glu
      1           5           10           15
Lys Arg Ala Gln Asp Phe Val Val Trp Leu Met Asn Thr
      20           25
<210>      16
<211>      29
<212>      PRT
<213>      Trình tự nhân tạo
<220>
<223>      Dẫn xuất glucagon
<220>
<221>      Biến thể
<222>      (2)
<223>      Xaa là axit aminoisobutyric
<400>      16
Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Cys
      1           5           10           15
Arg Arg Ala Gln Val Phe Val Gln Trp Leu Met Arg Thr
      20           25
<210>      17
<211>      29
<212>      PRT
<213>      Trình tự nhân tạo
<220>
<223>      Dẫn xuất glucagon
<220>
<221>      Biến thể
<222>      (2)
<223>      Xaa là axit aminoisobutyric
<400>      17
Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Cys
      1           5           10           15
Val Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Arg Thr
      20           25
<210>      18

```

```

<211> 29
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Dẫn xuất glucagon
<220>
<221> Biến thể
<222> (2)
<223> Xaa là axit aminoisobutyric
<400> 18
Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser
1          5          10          15
Arg Arg Ala Cys Asp Phe Arg Leu Trp Leu Met Asn Thr
          20          25

<210> 19
<211> 29
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Dẫn xuất glucagon
<220>
<221> Biến thể
<222> (2)
<223> Xaa là axit aminoisobutyric
<220>
<221> Biến thể
<222> (16), (20)
<223> Các axit amin ở vị trí số 16 và vị trí số 20 tạo thành vòng
<400> 19
Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Cys Glu
1          5          10          15
Lys Arg Ala Lys Glu Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
          20          25

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

<210> 21
<211> 29
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Dẫn xuất glucagon
<220>
<221> Biến thể
<222> (2)
<223> Xaa là axit aminoisobutyric
<220>
<221> Biến thể
<222> (16), (20)
<223> Các axit amin ở vị trí số 16 và vị trí số 20 tạo thành vòng
<400> 21
Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu
1          5          10          15
Lys Cys Ala Lys Glu Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
          20          25

<210> 22
<211> 29
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Dẫn xuất glucagon
<220>
<221> Biến thể

```

```

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

```

<221> Biến thể
 <222> (16), (20)
 <223> Các axit amin ở vị trí số 16 và vị trí số 20 tạo thành vòng
 <400> 26
 Trp Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu
 1 5 10 15
 Cys Arg Ala Lys Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
 20 25
 <210> 27
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Dẫn xuất glucagon
 <220>
 <221> Biến thể
 <222> (2)
 <223> Xaa là axit aminoisobutyric
 <220>
 <221> Biến thể
 <222> (16), (20)
 <223> Các axit amin ở vị trí số 16 và vị trí số 20 tạo thành vòng
 <400> 27
 Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Val Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu
 1 5 10 15
 Cys Arg Ala Lys Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
 20 25
 <210> 28
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Dẫn xuất glucagon
 <220>
 <221> Biến thể
 <222> (2)
 <223> Xaa là axit aminoisobutyric
 <220>
 <221> Biến thể
 <222> (16), (20)
 <223> Các axit amin ở vị trí số 16 và vị trí số 20 tạo thành vòng
 <400> 28
 Trp Xaa Gln Gly Thr Phe Val Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu
 1 5 10 15
 Cys Arg Ala Lys Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
 20 25
 <210> 29
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Dẫn xuất glucagon
 <220>
 <221> Biến thể
 <222> (2)
 <223> Xaa là axit aminoisobutyric
 <220>
 <221> Biến thể
 <222> (16), (20)
 <223> Các axit amin ở vị trí số 16 và vị trí số 20 tạo thành vòng
 <400> 29
 Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Cys Leu Asp Glu
 1 5 10 15
 Arg Arg Ala Lys Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
 20 25
 <210> 30
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Dẫn xuất glucagon
 <220>
 <221> Biến thể
 <222> (2)
 <223> Xaa là axit aminoisobutyric
 <220>
 <221> Biến thể
 <222> (16), (20)

<223> Các axit amin ở vị trí số 16 và vị trí số 20 tạo thành vòng
 <400> 30
 Trp Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Cys Leu Asp Glu
 1 5 10 15
 Arg Arg Ala Glu Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
 20 25
 <210> 31
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Dẫn xuất glucagon
 <220>
 <221> Biến thể
 <222> (2)
 <223> Xaa là axit aminoisobutyric
 <220>
 <221> Biến thể
 <222> (17), (21)
 <223> Các axit amin ở vị trí số 17 và vị trí số 21 tạo thành vòng
 <400> 31
 Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Cys
 1 5 10 15
 Lys Arg Ala Lys Glu Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
 20 25
 <210> 32
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Dẫn xuất glucagon
 <220>
 <221> Biến thể
 <222> (15), (19)
 <223> Các axit amin ở vị trí số 15 và vị trí số 19 tạo thành vòng
 <400> 32
 Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu Cys
 1 5 10 15
 Arg Ala Lys Glu Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
 20 25
 <210> 33
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Dẫn xuất glucagon
 <220>
 <221> Biến thể
 <222> (2)
 <223> Xaa là axit aminoisobutyric
 <220>
 <221> Biến thể
 <222> (16), (20)
 <223> Các axit amin ở vị trí số 16 và vị trí số 20 tạo thành vòng
 <400> 33
 Trp Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Cys Asp Glu
 1 5 10 15
 Arg Arg Ala Lys Glu Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
 20 25
 <210> 34
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Dẫn xuất glucagon
 <220>
 <221> Biến thể
 <222> (2)
 <223> Xaa là axit aminoisobutyric
 <220>
 <221> Biến thể
 <222> (16), (20)
 <223> Các axit amin ở vị trí số 16 và vị trí số 20 tạo thành vòng
 <400> 34
 Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Cys Asp Glu
 1 5 10 15
 Arg Arg Ala Lys Glu Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
 20 25

<210> 35
<211> 34
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Mỗi xuôi
<400> 35
cagcgacacc gaccgtcccc ccgtacttaa ggcc 34
<210> 36
<211> 32
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Mỗi ngược
<400> 36
ctaaccgact ctcggggaag actgagctcg cc 32