



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

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ



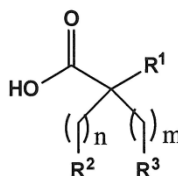
1-0030894

(51)⁷ A61K 47/48; C07K 14/475; A61P 3/00 (13) B

- (21) 1-2017-00220 (22) 18/06/2015
(86) PCT/US2015/036328 18/06/2015 (87) WO 2015/200078 30/12/2015
(30) 62/015,862 23/06/2014 US; 62/082,327 20/11/2014 US; 62/107,016 23/01/2015 US
(45) 25/01/2022 406 (43) 26/06/2017 351A
(73) NOVARTIS AG (CH)
Lichtstrasse 35, CH-4056 Basel, Switzerland
(72) BARNES, David Weninger (US); YAMADA, Ken (JP); IBEBUNJO, Chikwendu (US); DUTTARROY, Alokesh (US); KIRMAN, Louise Clare (GB); BRUCE, Alexandra Marshall (US); USERA, Aimee Richardson (US); ZECRI, Frederic (FR); YUAN, Jun (US); LOU, Changgang (CN); KANTER, Aaron (US); BOSE, Avirup (US).
(74) Công ty TNHH Ban Ca (BANCA)

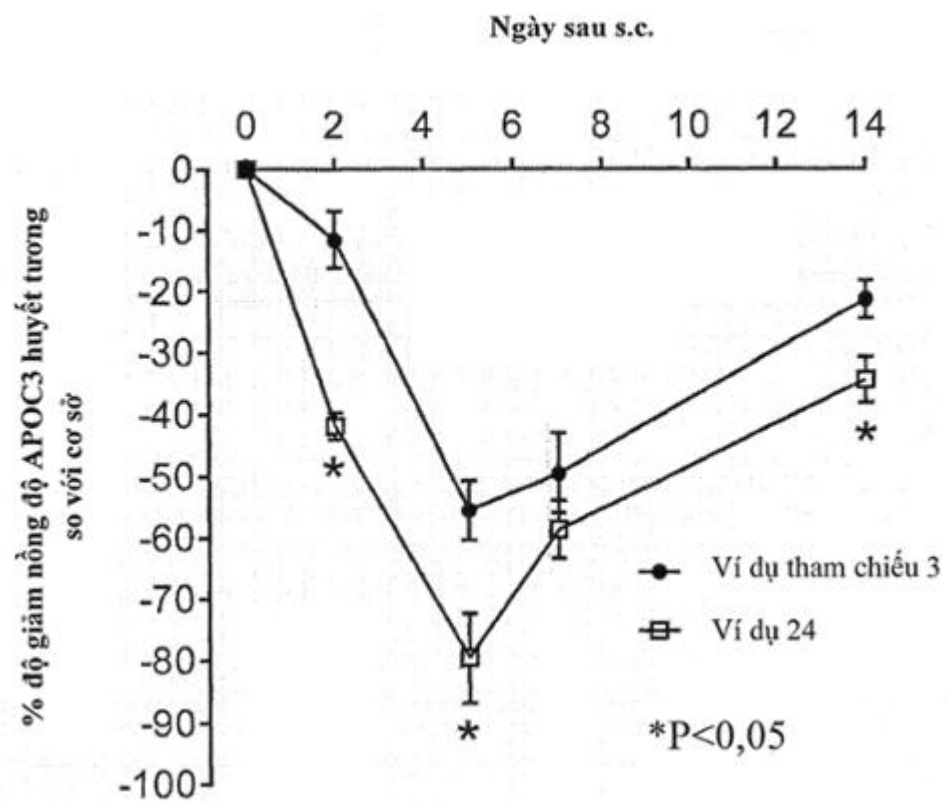
(54) THỂ LIÊN HỢP BAO GỒM PHÂN TỬ SINH HỌC ĐƯỢC NỐI VỚI AXIT BÉO, DƯỢC PHẨM VÀ TỔ HỢP CHỨA THỂ LIÊN HỢP NÀY

(57) Sáng chế đề xuất thể liên hợp bao gồm GDF15 được nối với axit béo qua cầu nối trong đó axit béo này có công thức A1 sau đây:



A1

trong đó R¹ là CO₂H; R², R³, n, m được xác định trong bản mô tả. Sáng chế cũng đề cập đến hỗn hợp, dược phẩm và tổ hợp chứa thể liên hợp này.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến các thể liên hợp mới của GDF15 được nối với axit béo có chu kỳ bán rã và quá trình hoạt động được cải thiện. Sáng chế còn đề cập đến hỗn hợp, được phẩm và tổ hợp chứa thể liên hợp này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các peptit và các protein được sử dụng rộng rãi trong thực tiễn y học, và do chúng có thể được tạo ra bằng công nghệ ADN tái tổ hợp, có thể mong đợi rằng tầm quan trọng của chúng cũng sẽ tăng trong những năm tiếp theo. Số lượng các peptit và protein nội sinh đã biết có hoạt tính sinh học quan tâm đang tăng lên nhanh chóng, cũng là kết quả của việc khám phá hệ gen người đang tiếp diễn. Do các hoạt tính sinh học của chúng, nhiều polypeptit và protein trong số các polypeptit và protein này về nguyên tắc được sử dụng như các chất có tác dụng điều trị. Các peptit hoặc các protein nội sinh, tuy nhiên, không phải luôn luôn phù hợp để làm các đề cử được chất bởi vì chúng thường có chu kỳ bán rã trong vài phút do bị phân hủy nhanh chóng bởi các peptidaza và/hoặc do lọc ở thận và thanh thải trong nước tiểu. Chu kỳ bán rã của các polypeptit hoặc các protein trong huyết tương của người rất khác nhau (từ vài phút đến nhiều hơn một tuần).

Việc thanh thải ở mức độ cao chất điều trị là không tiện dụng trong nhiều trường hợp mà được mong muốn duy trì nồng độ cao của nó trong máu trong khoảng thời gian kéo dài. Một cách hiện được sử dụng để khắc phục điểm bất lợi này là sử dụng liều lượng cao của peptit hoặc các protein điều trị quan tâm với bệnh nhân, như vậy ngay cả khi một số peptit hoặc protein điều trị bị phân hủy, vẫn đủ để có hiệu quả điều trị. Tuy nhiên, phương pháp này không tiện dụng với bệnh nhân. Do phần lớn các peptit hoặc các protein điều trị không thể được sử dụng qua đường miệng, các peptit hoặc các protein điều trị bệnh này sẽ phải được truyền cố định, truyền thường xuyên bằng cách tiêm trong tĩnh mạch hoặc được sử dụng thường xuyên bằng các con đường tiêm dưới da không tiện dụng. Nhu cầu đối với tần suất sử dụng cũng khiến hầu hết các chất điều trị là peptit hoặc protein có tiềm năng có giá thành điều trị được đưa ra quá cao. Có một lượng lớn peptit hoặc protein bị phân hủy cũng có thể tạo ra các tác dụng phụ không mong muốn.

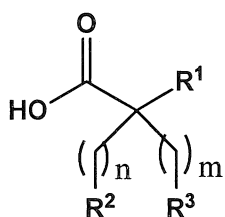
Không tiện dụng trong việc sử dụng và giá thành cao là hai lý do khiến phần lớn các peptit hoặc các protein điều trị có tập hợp các đặc trưng hoạt tính sinh học hấp dẫn có thể không được phát triển thành các đề cử dược chất.

Do đó, một cách tiếp cận để kéo dài chu kỳ bán rã của các peptit hoặc các protein là cải biến các peptit hoặc các protein điều trị bệnh theo cách mà quá trình phân hủy chúng được làm chậm lại trong khi vẫn duy trì được hoạt tính sinh học. Albumin huyết thanh có chu kỳ bán rã là nhiều hơn một tuần, và một cách tiếp cận để gia tăng chu kỳ bán rã huyết tương của các peptit hoặc các protein là dẫn xuất chúng bằng các gốc hóa học gắn kết với albumin huyết thanh hoặc các protein huyết tương khác.

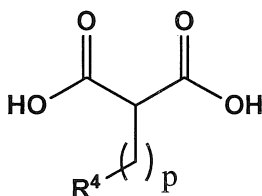
Tuy nhiên, vẫn có nhu cầu xác định các gốc kéo dài chu kỳ bán rã mới để cải biến các phân tử sinh học có hiệu quả điều trị bệnh chẳng hạn các peptit và các protein để mang lại thời gian có hoạt tính in vivo dài hơn trong khi duy trì các lợi thế về độc tính thấp và lợi thế điều trị bệnh.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

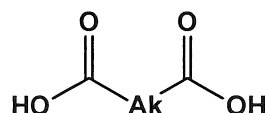
Sáng chế đề cập đến thể liên hợp bao gồm phân tử sinh học được nối với axit béo qua cầu nối trong đó axit béo này có các công thức sau đây A1, A2 hoặc A3:



A1



A2



hoặc A3

R^1 là CO_2H hoặc H ;

R^2 , R^3 và R^4 độc lập nhau là H , OH , CO_2H , $-\text{CH}=\text{CH}_2$ hoặc $-\text{C}\equiv\text{CH}$;

Ak là C_6 - C_{30} alkylen phân nhánh;

n , m và p độc lập nhau là số nguyên giữa 6 và 30, hoặc amit, este hoặc muối được dụng của chúng.

Axit béo có các công thức A1, A2 và A3 khi được liên hợp với phân tử sinh học quan tâm qua cầu nối đã được nhận thấy là làm tăng chu kỳ bán rã của phân tử sinh học đã nêu đến mức độ cao hơn nhiều so với nhiều gốc axit béo đã được sử dụng phổ biến.

Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến thể liên hợp bao gồm phân tử sinh học được nối với axit béo có công thức A1 trong đó ít nhất một trong số R^2 và R^3 là CO_2H .

Theo phương án khác của sáng chế, phân tử sinh học quan tâm là peptit có hiệu quả điều trị, protein có hiệu quả điều trị hoặc ARN. Vẫn theo khía cạnh khác của phương án này, phân tử sinh học quan tâm là peptit hoặc polypeptit. Vẫn theo khía cạnh khác của phương án này, peptit hoặc polypeptit này là peptit chủ vận APJ, peptit chủ vận thụ thể oxytocin, serelaxin, NPFF, peptit PIP, peptit FGF23, peptit AgRP hoặc protein yếu tố biệt hóa tăng trưởng 15 (GDF15: Growth Differentiation Factor 15), thể tương đồng, các biến thể, các mảnh và các dạng được cải biến khác của chúng.

Vẫn theo phương án khác, sáng chế đề cập đến dược phẩm, chứa thể liên hợp theo sáng chế và một hoặc nhiều chất mang dược dụng.

Vẫn theo phương án, sáng chế đề cập đến tổ hợp bao gồm, thể liên hợp theo sáng chế, và tổ hợp dược của một hoặc nhiều hoạt chất điều trị bệnh.

Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến axit béo có các công thức A1, A2 hoặc A3.

Theo phương án khác, sáng chế dự tính việc sử dụng thể liên hợp được mô tả ở đây, và chế phẩm của nó, để phòng và/hoặc điều trị nhiều loại tình trạng, rối loạn và bệnh khác nhau, và/hoặc các triệu chứng của chúng.

Ví dụ, sáng chế đề cập đến phương pháp hoạt hóa thụ thể APJ ở đối tượng cần dùng chúng, bao gồm: cho đối tượng sử dụng lượng có hiệu quả điều trị bệnh của thể liên hợp theo sáng chế trong đó phân tử sinh học là chất chủ vận APJ. Thể liên hợp theo sáng chế, qua việc hoạt hóa của thụ thể APJ có tính hữu dụng trong việc điều trị bệnh suy tim mất bù cấp (ADHF: acute decompensated chứng suy tim), bệnh suy tim mạn tính, chứng tăng áp phổi, chứng rung tâm nhĩ, hội chứng Brugada, rối loạn nhịp thất nhanh, chứng xơ vữa động mạch, chứng cao huyết áp, chứng tái hẹp mạch, các bệnh tim

mạch do thiếu máu cục bộ, bệnh cơ tim, chứng xơ hóa tim, chứng rối loạn nhịp tim, chứng giữ nước, các loại bệnh đái tháo đường (bao gồm bệnh đái tháo đường thai kỳ), béo phì, bệnh động mạch ngoại vi, các tai nạn gây tai biến mạch máu não, các cơn thiếu máu nhất thời, các tổn thương gây chấn thương não, chứng teo cơ xơ cứng cột bên, các tổn thương do bỏng (bao gồm cháy nắng) và chứng tiền sản giật. Theo khía cạnh ưu tiên của phương án này thể liên hợp theo sáng chế hữu ích trong việc điều trị bệnh suy tim mất bù cấp (ADHF) hoặc bệnh suy tim mạn tính.

Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến phương pháp hoạt hóa thụ thể oxytocin ở đối tượng cần dùng chúng; bao gồm: cho đối tượng sử dụng lượng có hiệu quả điều trị bệnh của thể liên hợp theo sáng chế trong đó phân tử sinh học là peptit chủ vận thụ thể oxytocin. Thể liên hợp theo sáng chế, qua việc hoạt hóa thụ thể oxytocin, có tính hữu dụng trong việc điều trị bệnh tự kỷ (phòng bệnh hoặc điều trị bệnh), bệnh đau nửa đầu, rối loạn tăng động giảm chú ý (ADHD: attention deficit hyperactivity disorder), rối loạn thách thức chống đối (ODD), sang chấn tâm lý, bao gồm rối loạn sang chấn tâm lý sau chấn thương, lo âu, bao gồm các rối loạn lo âu và trầm cảm, chứng tâm thần phân liệt, các rối loạn tâm thần và chứng mất trí nhớ, chứng cai rượu, nghiện dược chất, hội chứng Prader-Willi, rối loạn hoặc bệnh chuyển hóa, tiểu đường typ 2, béo phì, rối loạn lipid máu, nồng độ glucoza cao, nồng độ insulin cao và bệnh thận do tiểu đường, chứng đau cơ xơ hóa, rối loạn giấc ngủ, chứng ngưng thở khi ngủ, chứng suy tim tâm trương, chứng tiểu không kiểm soát, chứng xơ vữa động mạch, chứng cao huyết áp, rối loạn chức năng cương dương, các triệu chứng phì đại tuyến tiền liệt, bệnh gan nhiễm mỡ không do rượu, các tình trạng tiết sữa bị tổn thương, tổn thương khi chuyển dạ, các tình trạng suy giảm trương lực tử cung, chảy máu quá mức, chứng viêm, đau, đau bụng, đau lưng, rối loạn chức năng sinh dục ở nam và nữ, hội chứng ruột kích thích (IBS: irritable bowel syndrome), táo bón, tắc nghẽn đường tiêu hóa, mất máu do phẫu thuật, băng huyết sau sinh, làm lành vết thương, bệnh xâm nhiễm, chứng viêm vú, suy giảm truyền qua nhau thai, chứng loãng xương; và và để chẩn đoán ung thư và chẩn đoán suy nhau thai. Theo khía cạnh ưu tiên của phương án này thể liên hợp theo sáng chế hữu ích trong việc điều trị bệnh tự kỷ, lo âu, bao gồm các rối loạn lo âu và trầm cảm, bệnh đau nửa đầu, ADHD, rối loạn thách thức chống đối, chứng tâm thần phân liệt, các rối loạn tâm thần, béo phì, các tình trạng tiết sữa bị tổn thương, tổn thương khi chuyển dạ, các tình trạng

suy giảm trương lực tử cung, chảy máu quá mức, băng huyết sau sinh. Theo một phương án được ưu tiên hơn, thể liên hợp theo sáng chế hữu ích để điều trị hội chứng Prader-Willi.

Vẫn theo phương án khác, sáng chế đề cập đến phương pháp điều trị hội chứng Cushing, tăng sản cortisol, hội chứng ACTH ngoài tử cung, thay đổi khối lượng vô thương thân, bệnh thượng thận nổi nốt sắc tố sơ cấp (PPNAD) phức Carney (CNC), dư thừa mineralocorticoid do cortisol cảm ứng, các tình trạng liên quan đến rối loạn sang chấn tâm lý sau chấn thương, chứng rậm lông, chứng da dày, bệnh ở cơ, chứng loãng xương, độ dễ vỡ của mô tăng, làm lành vết thương chậm, chứng cao huyết áp, các loại bệnh đái tháo đường, kali trong huyết thanh thấp, bạch cầu ưa axit thấp và giảm bạch cầu lympho, bao gồm: cho đối tượng sử dụng lượng có hiệu quả điều trị bệnh của thể liên hợp theo sáng chế trong đó phân tử sinh học là peptit AgRP. Theo khía cạnh ưu tiên của phương án này thể liên hợp theo sáng chế hữu ích trong việc điều trị hội chứng Cushing, tăng sản cortisol, hội chứng ACTH ngoài tử cung, chứng loãng xương.

Vẫn theo phương án khác, sáng chế đề cập đến phương pháp điều trị hoặc phòng ngừa các bệnh liên quan đến FGF23 chẳng hạn các tình trạng do tuổi già (được chọn từ nhóm bao gồm bệnh thiếu cơ, bệnh teo da, chứng hao mòn cơ, bệnh teo não, chứng xơ vữa động mạch, chứng xơ cứng động mạch, bệnh khí thũng phổi, chứng loãng xương, chứng viêm xương khớp, chứng thiếu năng miễn dịch, huyết áp cao, chứng mất trí, bệnh Huntington, bệnh Alzheimer, bệnh đục thủy tinh thể, thoái hóa điểm vàng do tuổi già, ung thư tuyến tiền liệt, đột quỵ, giảm tuổi thọ, suy giảm trí nhớ, hình thành nếp nhăn, chức năng thận bị suy yếu, và mất chức năng nghe do tuổi già), rối loạn chuyển hóa (được chọn từ nhóm bao gồm tiểu đường typ II, hội chứng chuyển hóa, chứng tăng đường huyết, và chứng béo phì), tăng phosphat máu (vô hóa khối u, hội chứng tăng phosphat máu tăng tạo xương), bệnh thận mạn tính, bệnh suy thận mạn tính, ung thư, ung thư vú, và/hoặc teo cơ; bao gồm: cho đối tượng sử dụng lượng có hiệu quả điều trị bệnh của thể liên hợp theo sáng chế trong đó phân tử sinh học là peptit FGF23.

Vẫn theo phương án khác, sáng chế đề cập đến phương pháp điều trị chứng suy tim cấp tính, bệnh suy tim mạn tính có phân suất tống máu giảm (HFrEF), bệnh suy tim

mạn tính có phân suất tổng máu được bảo toàn (HFpEF), rối loạn chức năng tâm trương, sau khi tổ chức lại cơ tim, chứng đau thắt ngực, chứng cao huyết áp, chứng tăng áp phổi, chứng tăng áp động mạch phổi, xơ hóa (lan tỏa, tim, thận, phổi, gan), đa xơ cứng, làm lành vết thương, thiếu máu đến các chi mức độ nghiêm trọng, bệnh mạch ngoại vi, đau cách hồi ở chân, rối loạn chức năng thận và bệnh thận mạn tính; bao gồm: cho đối tượng sử dụng lượng có hiệu quả điều trị bệnh của thể liên hợp theo sáng chế trong đó phân tử sinh học peptit serelaxin. Theo khía cạnh ưu tiên của phương án này, thể liên hợp serelaxin theo sáng chế hữu ích trong việc điều trị chứng suy tim cấp tính, bệnh suy tim mạn tính có phân suất tổng máu giảm (HFrEF), bệnh suy tim mạn tính có phân suất tổng máu được bảo toàn (HFpEF), rối loạn chức năng tâm trương, sau khi tổ chức lại cơ tim, chứng đau thắt ngực, chứng cao huyết áp, chứng tăng áp phổi hoặc chứng tăng áp động mạch phổi.

Vẫn theo phương án khác, sáng chế đề cập đến phương pháp điều trị hoặc phòng ngừa các rối loạn chuyển hóa chẳng hạn tiểu đường typ 2 (T2DM), chứng suy kiệt tế bào beta tuyến tụy, chứng không dung nạp glucoza, chứng tăng đường huyết, chứng kháng insulin, béo phì, rối loạn lipit máu, viêm gan nhiễm mỡ không do rượu (NASH), hội chứng chuyển hóa, và các rối loạn chuyển hóa khác; bao gồm: cho đối tượng sử dụng lượng có hiệu quả điều trị bệnh của thể liên hợp theo sáng chế trong đó phân tử sinh học là peptit PIP.

Vẫn theo phương án khác, sáng chế đề cập đến phương pháp điều trị hoặc phòng ngừa rối loạn hoặc bệnh chuyển hóa, tiểu đường typ 2, béo phì, chứng viêm tụy, rối loạn lipit máu, viêm gan nhiễm mỡ không do rượu, chứng kháng insulin, chứng tăng insulin, chứng không dung nạp glucoza, chứng tăng đường huyết, hội chứng chuyển hóa, chứng cao huyết áp, bệnh tim mạch, chứng xơ vữa động mạch, bệnh động mạch ngoại vi, đột quỵ, chứng suy tim, bệnh tim mạch vành, các biến chứng tiểu đường (bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở bệnh thận mạn tính), bệnh lý thần kinh, bệnh liệt dạ dày, chứng tiểu són, chứng buồn ngủ, đau do viêm và đau do bệnh lý thần kinh, suy giảm trí nhớ, và các rối loạn chuyển hóa khác; bao gồm: cho đối tượng sử dụng lượng có hiệu quả điều trị bệnh của thể liên hợp theo sáng chế trong đó phân tử sinh học là peptit NPFF.

Vẫn theo khía cạnh khác theo sáng chế, sáng chế đề cập đến phương pháp điều trị rối loạn hoặc bệnh chuyển hóa, tiểu đường, tiểu đường typ 2, béo phì, chứng viêm ga nhiễm mỡ/bệnh gan nhiễm mỡ do rượu và không do rượu và các bệnh về gan tiến triển khác, chứng viêm tụy, rối loạn lipit máu, chứng kháng insulin, chứng tăng insulin, chứng không dung nạp glucoza, chứng tăng đường huyết, hội chứng chuyển hóa, chứng cao huyết áp, bệnh tim mạch, chứng xơ vữa động mạch, bệnh động mạch ngoại vi, đột quy, chứng suy tim, bệnh tim mạch vành, các biến chứng tiểu đường (bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở bệnh thận mạn tính), bệnh lý thần kinh, bệnh liệt dạ dày và các rối loạn chuyển hóa khác, ở đối tượng cần dùng chúng, bao gồm: cho đối tượng sử dụng lượng có hiệu quả điều trị bệnh của thể liên hợp theo sáng chế trong đó phân tử sinh học là yếu tố biệt hóa tăng trưởng của người 15 (GDF15), chất tương tự, biến thể, đột biến, mảnh và các dạng biến thể khác của chúng.

Các khía cạnh này và các khía cạnh khác theo sáng chế sẽ được làm sáng tỏ trong phần mô tả chi tiết sáng chế sau đây.

Mô tả vắn tắt hình vẽ

Fig. 1 chỉ ra rằng Ví dụ 24 làm giảm nồng độ APOC3 huyết tương hiệu quả hơn so với chất tham chiếu ở ví dụ 3.

Mô tả chi tiết sáng chế

Định nghĩa:

Để hiểu rõ phần mô tả, các định nghĩa sau đây sẽ áp dụng trừ phi có quy định khác và bất kể khi nào thích hợp, các thuật ngữ được sử dụng ở dạng số ít cũng sẽ bao gồm số nhiều và ngược lại.

Phải lưu ý là như được sử dụng ở đây và trong phần yêu cầu bảo hộ, các dạng chỉ số ít “một”, “này” bao gồm các từ chỉ số nhiều trừ phi ngữ cảnh chỉ rõ điều ngược lại. Do đó, ví dụ, tham chiếu đến “thể liên hợp” bao gồm tham chiếu đến một hoặc nhiều thể liên hợp; tham chiếu đến “polypeptit” bao gồm tham chiếu đến một hoặc nhiều polypeptit; v.v.

Thuật ngữ alkyl dùng để chỉ gốc hydrocacbon no phân nhánh hoặc không phân nhánh (hoặc mạch thẳng hoặc tuyến tính), gồm 1 đến 30 nguyên tử cacbon. Tốt hơn nếu

alkyl này bao gồm 5 đến 20 nguyên tử cacbon, và tốt hơn nữa nếu gồm 10 đến 15 nguyên tử cacbon. C₁₀₋₁₅alkyl dùng để chỉ mạch alkyl gồm 10 đến 15 cacbon. Thuật ngữ “alkylen” dùng để chỉ alkyl hóa trị hai như được định nghĩa ở trên.

Thuật ngữ “alkenyl” dùng để chỉ hydrocacbon phân nhánh hoặc không phân nhánh có ít nhất một liên kết đôi cacbon-cacbon. Thuật ngữ "C₂₋₃₀-alkenyl" dùng để chỉ hydrocacbon có hai đến bảy nguyên tử cacbon và bao gồm ít nhất một liên kết đôi cacbon-cacbon.

Thuật ngữ “alkynyl” dùng để chỉ phân nhánh hoặc không phân nhánh hydrocacbon có ít nhất một liên kết ba cacbon-cacbon. Thuật ngữ "C₂₋₃₀-alkynyl" dùng để chỉ hydrocacbon có hai đến bảy nguyên tử cacbon và bao gồm ít nhất một liên kết ba cacbon-cacbon.

Thuật ngữ aryl dùng để chỉ các nhóm hydrocacbon vòng thơm một vòng hoặc hai vòng có 6-10 nguyên tử cacbon trong thành phần vòng. Các ví dụ tiêu biểu về aryl là phenyl hoặc naphthyl.

Thuật ngữ heteroaryl bao gồm heteroaryl một vòng hoặc hai vòng, gồm từ 5-10 thành phần vòng được chọn từ nguyên tử cacbon và 1 đến 5 nguyên tử khác loại, và mỗi nguyên tử khác loại độc lập được chọn từ O, N hoặc S trong đó S và N có thể được oxi hóa đến các trạng thái oxi hóa khác nhau. Đối với hệ heteroaryl hai vòng, hệ này là vòng thơm toàn bộ (tức là tất cả các vòng là vòng thơm).

Thuật ngữ xycloalkyl dùng để chỉ các nhóm hydrocacbon một vòng, hai vòng hoặc ba vòng no hoặc không no nhưng không phải là vòng thơm có 3-12 nguyên tử cacbon, tốt hơn nếu có 3-8, hoặc 3-7 nguyên tử cacbon. Đối với hệ xycloalkyl hai vòng, hoặc ba vòng, tất cả các vòng là các vòng không phải vòng thơm. Ví dụ, xycloalkyl bao gồm xycloalkenyl và xycloalkynyl. Thuật ngữ “xycloalkenyl” dùng để chỉ nhóm hydrocacbon hai vòng hoặc ba vòng có 3-12 nguyên tử cacbon, có ít nhất một liên kết đôi cacbon-cacbon. Thuật ngữ “xycloalkynyl” dùng để chỉ nhóm hydrocacbon hai vòng hoặc ba vòng có 3-12 nguyên tử cacbon, có ít nhất một liên kết ba cacbon-cacbon.

Thuật ngữ heteroxyclyl dùng để chỉ hệ vòng một vòng, hai vòng hoặc ba vòng no hoặc không no không phải là vòng thơm (không no một phần nhưng không phải vòng thơm) bao gồm ít nhất một nguyên tử khác loại được chọn từ O, S và N, trong đó N và S này cũng có thể tùy ý được oxi hóa đến các trạng thái oxi hóa khác nhau. Theo một phương án, gốc heteroxyclyl thể hiện vòng đơn vòng no bao gồm từ 5-7 nguyên tử vòng

và tùy ý bao gồm nguyên tử khác ngoại khác, được chọn từ O, S hoặc N. Vòng dị vòng có thể được thế bằng alkyl, halo, oxo, alkoxy, haloalkyl, haloalkoxy. Theo phương án khác, heteroxyclyl có hai vòng hoặc ba vòng. Đối với hệ đa vòng, một số vòng có thể là vòng thơm và được dung hợp với vòng hoặc các vòng no hoặc no một phần. Hệ vòng được dung hợp toàn bộ này không là vòng thơm hoàn toàn. Ví dụ, hệ vòng dị vòng có thể là vòng heteroaryl thơm được ngưng tụ với hệ vòng xycloalkyl no hoặc no một phần.

Thuật ngữ “liên hợp” được chủ định dùng để chỉ thực thể được tạo ra do việc gắn kèm cộng hóa trị phân tử sinh học và gốc axit béo, qua cầu nối. Thuật ngữ “phản ứng liên hợp” dùng để chỉ phản ứng hóa học tạo ra sự gắn kèm cộng hóa trị phân tử sinh học và gốc axit béo.

Phân tử sinh học:

Như được sử dụng ở đây thuật ngữ phân tử sinh học bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các kháng thể (ví dụ, kháng thể đơn dòng, kháng thể dạng khảm, kháng thể được làm giống như của người, kháng thể nanobody, và các mảnh của chúng .v.v.), cholesterol, các hormon, các peptit, các protein, các chất hóa trị liệu và các loại chất kháng tân mạch khác, dược chất có trọng lượng phân tử thấp, các vitamin, các đồng yếu tố, các nucleosit, các nucleotit, các oligonucleotit, các axit nucleic enzym, các axit nucleic đối nghĩa, các oligonucleotit tạo thành phức ba (triplex), các chế phẩm ADN hoặc ARN đối nghĩa, các chế phẩm ADN:ARN thể khảm, các allozym, các aptame, ribozym, các decoy (mồi bẫy) và các chất tương tự của chúng, các plasmit và các loại vectơ biểu hiện khác, và axit nucleic phân tử nhỏ, các chất RNAi, các phân tử axit nucleic ngăn gây cản trở (siNA: short interfering nucleic acid), các phân tử axit ribonucleic thông tin (ARN thông tin, mARN), các phân tử ARN ngăn gây cản trở-siARN (siRNA: short interfering RNA), các phân tử ARN mạch kép (dsRNA), các phân tử vi ARN-miARN (miRNA: micro-RNA), và các phân tử ARN cấu trúc kẹp tóc ngăn-shARN (shRNA: short hairpin), axit nucleic peptit (PNA: peptide nucleic acid), axit nucleic ribonucleotit bị khóa (LNA: locked nucleic acid), nucleotit morpholino, axit nucleic threosa (TNA: threose nucleic acid), axit nucleic glycol (GNA: glycol nucleic acid), ARN gây cản trở kích thước nhỏ được nội phân mảnh (sisiRNA: small internally segmented interfering RNA), ARN gây cản trở không đối xứng (aiRNA: asymmetrical interfering RNA), và siRNA có 1, 2 hoặc nhiều điểm không khớp giữa mạch có nghĩa

và mạch đối nghĩa và với các mô và/hoặc tế bào liên quan, chẳng hạn trong dịch nuôi cấy tế bào, đối tượng hoặc sinh vật. Các hợp chất này có thể được tinh sạch hoặc tinh sạch một phần, và có thể có trong tự nhiên hoặc được tổng hợp, và có thể được biến đổi hóa học.

Theo một phương án, phân tử sinh học là polypeptit, peptit, các protein hoặc chất ARNi, phân tử axit nucleic ngắn gây cản trở (siNA), phân tử ARN ngắn gây cản trở (siRNA), phân tử ARN mạch kép (dsRNA), phân tử vi ARN (miRNA), hoặc phân tử ARN cấu trúc kẹp tóc ngắn (shRNA).

Theo phương án khác, phân tử sinh học là polypeptit (hoặc protein), hoặc peptit. Các ví dụ về các polypeptit hoặc các peptit là các peptit chủ vận APJ, các peptit oxytoxin, serelaxin, NPFF, peptit PIP, peptit FGF23, các peptit AgRP và peptit GDF15. Theo phương án ưu tiên, phân tử sinh học là polypeptit GDF15, thể tương đồng, biến thể, đột biến, mảnh và các dạng biến thể khác của chúng.

"Axit ribonucleic" (ARN) là polyme của các nucleotit được nối bằng liên kết phosphodiester, trong đó mỗi nucleotit bao gồm ribosa hoặc dạng cải biến của chúng ở thành phần đường. mỗi nucleotit bao gồm adenin (A), guanin (G), xytosin (C), uraxil (U) hoặc dạng cải biến của chúng ở bazơ này. Thông tin di truyền trong phân tử mARN được mã hóa trong trình tự của các nucleotit của phân tử mARN, được sắp xếp thành các codon, mỗi codon bao gồm ba bazơ nucleotit. Mỗi codon mã hóa cho một axit amin đặc hiệu của polypeptit, ngoại trừ các codon kết thúc, kết thúc dịch mã (tổng hợp protein). Bên trong tế bào sống, mARN được vận chuyển đến ribosom, vị trí tổng hợp protein, trong đó nó cung cấp thông tin di truyền cho quá trình tổng hợp protein (dịch mã). Với sự mô tả đầy đủ hơn, xem, Alberts B et al. (2007) *Molecular Biology of the Cell*, tái bản lần thứ năm, Garland và Science.

Các thuật ngữ "chất ARNi," "ARN ngắn gây cản trở", "siARN", "axit nucleic ngắn gây cản trở", "siAN" và tương tự như được sử dụng ở đây dùng để chỉ phân tử axit nucleic bất kỳ có khả năng ức chế hoặc điều hòa giảm biểu hiện gen hoặc tái bản virus bằng cách trung gian gây ra sự cản trở ARN (RNAi) hoặc làm câm gen theo phương thức đặc hiệu trình tự. Các thuật ngữ này bao gồm phân tử ARN ngắn gây cản trở (siRNA), phân tử ARN cấu trúc kẹp tóc ngắn (shRNA), phân tử vi ARN (miARN), các oligonucleotit ngắn gây cản trở, phân tử axit nucleic ngắn được cải biến hóa học, ARN gây cản trở kích thước nhỏ được nội phân mảnh (sisiARN), ARN gây cản trở không đối

xúng (aiARN), siARN có 1, 2 hoặc nhiều điểm không khớp giữa mạch có nghĩa và mạch đối nghĩa và với các mô và/hoặc tế bào liên quan, chất RNAi trong đó mạch có nghĩa so với mạch đối nghĩa là rất ngắn và/hoặc có một hoặc nhiều khác trên một mạch (single-stranded nick), hoặc bất kỳ phân tử khác có khả năng trung gian cản trở bằng ARN. Các chất ARNi có thể bao gồm các ribonucleotit, hoặc được cải biến hoặc được thể ở một hoặc nhiều đường, bazơ và/hoặc phosphat. Dưới dạng các ví dụ không giới hạn, chất RNAi có thể được cải biến ở vị trí 2' bằng 2'-cải biến được chọn từ nhóm bao gồm: 2'-deoxy, 2'-deoxy-2'-flo, 2'-O-metyl, 2'-O-metoxyletyl (2'-O-MOE), 2'-O-aminopropyl (2'-O-AP), 2'-O-dimethylaminoetyl (2'-O-DMAOE), 2'-O-dimethylaminopropyl (2'-O-DMAP), 2'-O-dimethylaminoetyloxyetyl (2'-O-DMAEOE), và 2'-O-N-metylaxetamido (2'-O-NMA). Theo một phương án, tất cả các pyrimidin (uridin và xytidin) là các nucleosit được cải biến 2'-O-metyl. Theo các phương án khác nhau, một hoặc nhiều phosphat có thể được thể bằng cầu nối giữa nucleosit được cải biến, được chọn từ phosphorothioat, phosphorodithioat, phosphoramidat, boranophosphonoat, và cầu nối amit. Theo các phương án khác nhau, một hoặc nhiều nucleotit có thể được cải biến, hoặc được thể bằng ADN, axit nucleic peptit (PNA), axit nucleic bị khóa (LNA), nucleotit morpholino, axit nucleic threosa (TNA), axit nucleic glycol (GNA), axit nucleic arabinoza (ANA), axit nucleic 2'-floanarabinoza (FANA), axit nucleic xyclohexen (CeNA), axit nucleic anhydrohexitol (HNA), axit nucleic không bị khóa (UNA). Nhiều loại cải biến và các phân tử thể khác nhau của chất ARAi đã được biết đến trong lĩnh vực này và có thể được sử dụng trong ngữ cảnh của sáng chế. siARN có nhiệm vụ cản trở ARN, quá trình làm câm gen sau dịch mã đặc hiệu trình tự ở động vật và thực vật. Các siARN được tạo ra tự nhiên bằng sự phân cắt ribonucleaza III từ ARN mạch kép (dsARN) dài hơn mà tương đồng với, hoặc đặc hiệu với, đích gen bị làm im lặng; chất ARNi nhân tạo có thể được tạo ra bằng phương pháp bất kỳ đã được biết đến trong lĩnh vực này.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "polypeptit" dùng để chỉ polyme của gốc axit amin được nối bằng các liên kết peptit, được tạo ra tự nhiên hoặc theo cách tổng hợp. Các polypeptit có ít hơn khoảng 10 gốc axit amin thường được đề cập đến là "các peptit". Thuật ngữ "peptit" được chủ định bao gồm trình tự của hai hoặc nhiều axit amin được nối bằng các liên kết peptit, trong đó các axit amin đã nêu có thể có trong tự nhiên hoặc không có trong tự nhiên. Thuật ngữ này bao gồm các thuật ngữ các polypeptit và các

protein, mà có thể bao gồm hai hoặc nhiều peptit được giữ với nhau bằng các tương tác cộng hóa trị, chẳng hạn, ví dụ, các cầu xystein, hoặc các tương tác không cộng hóa trị. Các ký hiệu viết tắt có ba chữ cái hoặc có một chữ cái đã được cộng nhận trong lĩnh vực này được sử dụng gốc axit amin tạo ra các peptit và polypeptit theo sáng chế. Trừ phi khi có “D” đứng trước, axit amin này là L-axit amin. Khi ký hiệu viết tắt một chữ cái là chữ cái hoa, nó dùng để chỉ D-axit amin. Khi ký hiệu viết tắt một chữ cái là chữ cái thường, nó dùng để chỉ L-axit amin. Các ký hiệu viết tắt của các nhóm hoặc các string hoặc các axit amin được sử dụng với các peptit. Các peptit được đề cập có đầu N bên trái và trình tự được viết từ đầu N đến đầu C.

Peptit theo sáng chế bao gồm axit amin không có trong tự nhiên (tức là, hợp chất không xuất hiện trong tự nhiên) và các chất tương tự axit amin khác dưới dạng đã biết trong lĩnh vực này có thể được sử dụng luân phiên.

Các axit amin không có trong tự nhiên nhất định có thể được đưa vào bằng công nghệ được mô tả trong Deiters et al., J Am Chem Soc 125:11782-11783, 2003; Wang và Schultz, Science 301:964-967, 2003; Wang et al., Science 292:498-500, 2001; Zhang et al., Science 303:371-373, 2004 hoặc trong Patent Mỹ số 7,083,970. Ngắn gọn là, một số hệ thống trong số các hệ thống biểu hiện này bao gồm phát sinh đột biến được định hướng vị trí để đặt codon vô nghĩa, chẳng hạn TAG amber, vào trong khung đọc mở mã hóa polypeptit theo sáng chế. Sau đó các vector biểu hiện này được đưa vào vật chủ mà có thể sử dụng tARN đặc hiệu đối với codon vô nghĩa được đưa vào và mang axit amin không có trong tự nhiên được lựa chọn. Các axit amin không có trong tự nhiên cụ thể có ích cho mục đích liên hợp các gốc với polypeptit theo sáng chế bao gồm các axit amin có chuỗi bên axetylen và chuỗi bên azido.

"Protein" là đại phân tử bao gồm một hoặc nhiều chuỗi polypeptit. Mỗi chuỗi trong số các chuỗi polypeptit đó có thể được liên hợp với phân tử axit béo có công thức A1, A2 hoặc A3. Protein cũng có thể bao gồm các thành phần không phải peptit, chẳng hạn các nhóm hydratecarbon. Các hydratecarbon và các phân tử thế không phải peptit khác có thể được thêm vào protein bằng tế bào trong đó protein này được tạo ra, và sẽ thay đổi theo loại tế bào. Các protein được xác định ở đây liên quan đến các cấu trúc liên kết xương sống (backbone) axit amin của chúng; các phân tử thế chẳng hạn các nhóm hydratecarbon nói chung là không đặc hiệu, nhưng dù sao thì cũng có thể có mặt.

Protein hoặc polypeptit được mã hóa bằng phân tử ADN không đặc hiệu vật chủ là protein hoặc polypeptit "dị hợp".

"Polypeptit được phân lập hoặc protein được phân lập" là polypeptit hoặc protein (ví dụ, GDF15) về cơ bản là không chứa các thành phần tế bào, chẳng hạn hydratcacbon, lipid, hoặc các thành phần không tinh sạch có bản chất là protein khác có liên quan đến polypeptit trong tự nhiên. Thông thường, chế phẩm polypeptit hoặc protein được phân lập bao gồm polypeptit hoặc protein ở dạng có độ tinh sạch cao, tức là, độ tinh sạch ít nhất là khoảng 80%, độ tinh sạch ít nhất là khoảng 90%, độ tinh sạch ít nhất là khoảng 95%, độ tinh sạch lớn hơn 95%, chẳng hạn có độ tinh sạch bằng 96%, 97%, hoặc 98% hoặc cao hơn, hoặc có độ tinh sạch cao hơn 99%. một cách để biểu thị rằng chế phẩm protein gồm polypeptit hoặc protein được phân lập bằng sự trình diện một băng duy nhất sau khi điện di chế phẩm protein này trên gel natri dodecyl sulfat (SDS)-polyacrylamit và nhuộm gel bằng Coomassie Brilliant Blue. Tuy nhiên, thuật ngữ "được phân lập" không loại trừ sự có mặt cùng một polypeptit hoặc protein ở các dạng khác về vật lý, chẳng hạn các đime hoặc các dạng được dẫn xuất hoặc được glycosyl hóa khác. Tốt hơn nếu polypeptit được phân lập về cơ bản là không nhiễm các polypeptit hoặc các yếu tố nhiễm khác mà được tìm thấy trong môi trường tự nhiên của nó có thể cản trở ứng dụng trong phòng ngừa, ứng dụng trong chẩn đoán, ứng dụng trong điều trị hoặc ứng dụng trong nghiên cứu của nó.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ nhận thức được rằng nhiều loại phân tử thể axit amin khác nhau, ví dụ, các phân tử thể axit amin kiểu bảo toàn, có thể được tạo ra theo trình tự của polypeptit hoặc protein được mô tả ở đây, không nhất thiết phải làm giảm hoạt tính của nó. Như được sử dụng ở đây, "axit amin thường được sử dụng như một phân tử thể của nó" bao gồm các phân tử thể kiểu bảo toàn (tức là, các phân tử thể có các axit amin có các đặc tính hóa học tương thích). Với mục đích thể bảo toàn, các axit amin không phân cực (kỵ nước) bao gồm alanin, leuxin, isoleuxin, valin, glyxin, prolin, phenylalanin, tryptophan và methionin. Các axit amin phân cực (ưa nước), các axit amin trung tính bao gồm serin, threonin, xystein, tyrosin, asparagin, và glutamin. Các axit amin tích điện dương (có tính bazơ) bao gồm arginin, lysin và histidin. Các axit amin tích điện âm (có tính axit) bao gồm axit aspartic axit glutamic.

Các ví dụ về thể axit amin bao gồm thể L-axit amin bằng D-axit amin tương ứng của nó thể xystein bằng homoxystein hoặc các axit amin không có trong tự nhiên khác có chuỗi bên chứa thiol, thể lysin bằng homolysin, axit diaminobutyric, axit diaminopropionic, ornithin hoặc các axit amin không có trong tự nhiên khác có chuỗi bên chứa amino, hoặc thể alanin bằng norvalin hoặc tương tự.

Thuật ngữ “axit amin” như được sử dụng ở đây, dùng để chỉ các axit amin xuất hiện trong tự nhiên, axit amin không có trong tự nhiên, các phân tử tương tự axit amin và chất bắt chước axit amin có chức năng theo cách tương tự với các axit amin xuất hiện trong tự nhiên, tất cả các chất đồng phân lập thể ở dạng D và L của chúng nếu cấu trúc của chúng cho phép các dạng chất đồng phân lập thể này. Các axit amin được đề cập đến ở đây bằng tên của chúng, hoặc các ký tự ba chữ cái thường là đã biết của chúng hoặc bằng các ký tự một chữ cái được khuyến nghị bởi ủy ban về danh pháp hóa sinh IUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commission.

Thuật ngữ “xuất hiện trong tự nhiên” dùng để chỉ các nguyên liệu được tìm thấy trong tự nhiên và không bị con người điều khiển. Tương tự như vậy, “không xuất hiện trong tự nhiên”, “không tự nhiên”, và tương tự, như được sử dụng ở đây, dùng để chỉ nguyên liệu không được tìm thấy trong tự nhiên hoặc được cải biến về cấu trúc hoặc được con người tổng hợp. Khi được sử dụng liên quan đến các axit amin, thuật ngữ “xuất hiện trong tự nhiên” dùng để chỉ 20 axit amin thông thường (tức là, alanin (A hoặc Ala), xystein (C hoặc Cys), axit aspartic (D hoặc Asp), axit glutamic (E hoặc Glu), phenylalanin (F hoặc Phe), glyxin (G hoặc Gly), histidin (H hoặc His), isoleuxin (I hoặc Ile), lysin (K hoặc Lys), leuxin (L hoặc Leu), methionin (M hoặc Met), asparagin (N hoặc Asn), prolin (P hoặc Pro), glutamin (Q hoặc Gln), arginin (R hoặc Arg), serin (S hoặc Ser), threonin (T hoặc Thr), valin (V hoặc Val), tryptophan (W hoặc Trp), và tyrosin (Y hoặc Tyr)).

Các thuật ngữ “axit amin không có trong tự nhiên” và “axit amin không tự nhiên” như được sử dụng ở đây, được chủ định dùng thay thế cho nhau để chỉ các cấu trúc axit amin không thể được tạo ra bằng cách sinh tổng hợp trong sinh vật bất kỳ sử dụng các gen không được cải biến hoặc các gen được cải biến từ sinh vật bất kỳ, giống nhau hoặc khác nhau. Các thuật ngữ này dùng để chỉ gốc axit amin không có trong trình tự protein xuất hiện trong tự nhiên (kiểu đại) hoặc các trình tự theo sáng chế. Các axit amin này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các axit amin và/hoặc các chất tương tự axit amin

được cải biến mà không phải một trong số 20 axit amin xuất hiện trong tự nhiên, selenoxystein, pyrolysine (Pyl), hoặc pyroline-carboxy-lysine (Pcl, ví dụ, như được mô tả trong công bố patent PCT WO2010/48582). Gốc axit amin không có trong tự nhiên có thể được đưa vào bằng cách thế các axit amin xuất hiện trong tự nhiên, và/hoặc bằng cách chèn các axit amin không có trong tự nhiên vào trình tự protein xuất hiện trong tự nhiên (kiểu đại) hoặc các trình tự theo sáng chế. Gốc axit amin không có trong tự nhiên cũng có thể được kết hợp sao cho nhóm chức mong muốn được truyền cho phân tử này, ví dụ, khả năng nối gốc có chức năng (ví dụ, PEG). Khi được sử dụng liên quan đến các axit amin, ký hiệu “U” sẽ có nghĩa là “axit amin không có trong tự nhiên” và “axit amin không tự nhiên” như được sử dụng ở đây.

Thuật ngữ "chất tương tự" như được sử dụng ở đây để chỉ polypeptit hoặc protein là peptit hoặc protein được cải biến trong đó một hoặc nhiều gốc axit amin của peptit/protein này được thế bằng gốc axit amin khác và/hoặc trong đó một hoặc nhiều gốc axit amin bị xóa khỏi peptit/protein này và/hoặc trong đó một hoặc nhiều gốc axit amin được thêm vào peptit/protein này. Việc thêm hoặc xóa gốc axit amin có thể diễn ra ở đầu N- của peptit và/hoặc ở đầu C của peptit.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “este của thể liên hợp” dùng để chỉ thể liên hợp chứa peptit hoặc polypeptit trong đó có mặt chất dẫn xuất este của nhóm axit carboxylic (ví dụ, $\text{-CO}_2\text{H}$ ở đầu C được chuyển hóa thành -COOR) trong đó R của este này dùng để chỉ các nhóm C_{1-6} alkyl chẳng hạn methyl, ethyl, n-propyl, isopropyl, n-butyl, v.v., các nhóm C_{3-8} xycloalkyl chẳng hạn xyclopentyl, xyclohexyl, v.v., các nhóm C_{6-10} aryl chẳng hạn phenyl, α -naphthyl, v.v., các nhóm C_{6-10} aryl- C_{1-6} alkyl, ví dụ, các nhóm phenyl- C_{1-2} alkyl chẳng hạn benzyl, phenetyl, benzhydryl, v.v., và các nhóm α -naphthyl- C_{1-2} alkyl chẳng hạn α -naphthylmethyl và tương tự. Khi gốc peptit hoặc polypeptit của thể liên hợp sở hữu các nhóm carboxyl hoặc các nhóm carboxylat bổ sung ở các vị trí khác với đầu C, các polypeptit này trong đó các nhóm này được amit hóa hoặc este hóa cũng nằm trong phạm trù polypeptit theo sáng chế. Trong các trường hợp này, các este này có thể, ví dụ, cùng loại este với các este đầu C đã nêu.

Như được sử dụng ở đây thuật ngữ “amit của thể liên hợp” dùng để chỉ thể liên hợp chứa peptit hoặc polypeptit trong đó có mặt chất dẫn xuất amit của nhóm axit

carboxylic (ví dụ, $-\text{CO}_2\text{H}$ được chuyển hóa thành $-\text{CO}(\text{NR}'\text{R}')$ trong đó R' là H hoặc R và R đã được xác định ở trên. Thuật ngữ “amit của thể liên hợp” cũng dùng để chỉ thể liên hợp chứa peptit hoặc polypeptit trong đó có mặt chất dẫn xuất amit của nhóm amino (tức là khác với nhóm amino được liên hợp với axit béo) (ví dụ, $-\text{NH}_2$ được chuyển hóa thành $-\text{NH}-\text{C}(\text{O})\text{R}$) trong đó R đã được định nghĩa ở trên. Theo phương án ưu tiên, “amit của thể liên hợp” là thể liên hợp chứa peptit hoặc polypeptit trong đó nhóm carboxylic ở đầu C được amit hóa (ví dụ, $-\text{CO}_2\text{H}$ được chuyển hóa thành $-\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$, $-\text{C}(\text{O})\text{NH}-\text{C}_{1-6}$ alkyl, $-\text{C}(\text{O})\text{NH}-\text{C}_{1-2}$ alkylphenyl, hoặc $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{C}_{1-6}$ alkyl) $_2$).

Thuật ngữ “APJ” (cũng dùng để chỉ “thụ thể apelin”, “thụ thể tương tự angiotensin-1” “thụ thể tương tự angiotensin II-1” và tương tự) biểu thị thụ thể ghép cặp Gi có miền xuyên màng 7 lần, gồm 380 gốc có gen được định vị trên cánh tay dài hơn của nhiễm sắc thể 11 ở người (Trình tự tham chiếu NCBI: NP_005152.1, và được mã hóa bằng trình tự tham chiếu NCBI: NM_005161). APJ đã được tách dòng lần đầu tiên vào năm 1993 từ hệ gen ADN của người sử dụng các đoạn môi oligonucleotit thoái hóa (O'Dowd et al. Gene, 136:355-60, 1993) và có chung sự tương đồng đáng kể với thụ thể angiotensin II typ 1. Mặc dù có sự tương đồng này, tuy nhiên, angiotensin II không gắn kết APJ. Mặc dù orphan trong nhiều năm, phối tử nội sinh này đã được phân lập và được đặt tên là apelin (Tatemoto et al., Biochem Biophys Res Commun 251, 471-6 (1998)).

Thuật ngữ “chất chủ vận APJ” bao gồm các polypeptit apelin: Apelin biểu thị tiền protein gồm 77 gốc (trình tự tham chiếu NCBI: NP_0059109.3, và được mã hóa bằng trình tự tham chiếu NCBI: NM_017413.3), được xử lý thành các dạng có hoạt tính sinh học của các peptit apelin, chẳng hạn apelin-36, apelin-17, apelin-16, apelin-13, apelin-12. Peptit trưởng thành có chiều dài đầy đủ, dùng để chỉ “apelin-36,” bao gồm 36 axit amin, nhưng dạng đồng đẳng có tiềm lực lớn nhất là dạng được pyroglutamat hóa của 13me của apelin (apelin-13), dùng để chỉ “Pyr-1-apelin-13 hoặc Pyr¹-apelin-13”. Các dạng apelin khác được mô tả, ví dụ, trong patent Mỹ 6,492,324B1. Các chất chủ vận peptit apelin cũng được mô tả trong đơn yêu cầu cấp patent số WO 2013/111110, đơn Mỹ số 14/082771, và đơn tạm thời của Mỹ số 61/858263, 61/858280 và 61/858290.

Thuật ngữ “peptit chủ vận thụ thể oxytocin” hoặc “oxytocin peptit” được sử dụng thay thế cho nhau và bao gồm oxytocin và các chất tương tự của nó. Oxytocin là hormon peptit vòng gồm chín axit amin với hai gốc xystein tạo thành cầu disulfua giữa vị trí 1 và vị trí 6. Oxytocin của người gồm trình tự Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Leu-Gly (SEQ ID NO: 14). Thuật ngữ “peptit chủ vận thụ thể oxytocin” cũng bao gồm chất tương tự của oxytocin vẫn giữ được hoạt tính sinh học. Các phân tử tương tự này có khả năng hoạt động theo phương thức tương tự với oxytocin nội sinh, bao gồm việc gắn kết thụ thể oxytocin. Chất tương tự oxytocin được quan tâm cụ thể là các chất tương tự oxytocin được mô tả trong công bố đơn PCT số WO 2014/095773 (cụ thể là ví dụ 13); các chất tương tự oxytocin được mô tả trong đơn patent Mỹ số US2011/044905 (cụ thể là ví dụ 49); và các chất tương tự oxytocin được mô tả trong Kazimierz Wisniewski et al., *Journal of Medicinal Chemistry* 2014, 57, 5306-5317 và Zbigniew Grzonka et al., *Journal of Medicinal Chemistry* 1983, 26, 1786-1787.

Thuật ngữ “PIP” hoặc “peptit có khả năng cảm ứng bằng prolactin” có nghĩa là protein có số truy nhập GenBank là NP_002643 thể hiện các vai trò trong vô số các quá trình sinh học khác nhau. PIP cũng đã được biết trong lĩnh vực này as protein thể dịch từ bệnh u nang lớn -15 (GCDFP-15); protein gắn kết actin tiết (SABP); glycoprotein-ngoài tuyến mang tai (EP-GP); và protein gắn kết CD4 17kDa (GP17). PIP được biểu hiện trong các cơ quan ngoại tiết, và trong các khối u vú lành tính và khối u ác tính của người. Protein PIP được tiết trưởng thành có khối lượng phân tử 13kDa và nó chạy trên SDS-PAGE như một polypeptit có khối lượng phân tử 17-20kDa gợi ý sự kiện glycosyl hóa. PIP được biểu hiện ở hầu hết các cơ quan góp phần vào dịch thể của người; biểu hiện PIP cao nhất ở tuyến nước bọt, sau đó là tuyến nước mắt, tuyến tụy, tuyến cơ, các tuyến phế quản và và tuyến vú. Gen PIP này mã hóa polypeptit PIP.

Thuật ngữ “peptit PIP” như được sử dụng ở đây có nghĩa là PIP của người hoặc thể tương đồng, biến thể, mảnh hoặc dạng cải biến của chúng, mà vẫn giữ ít nhất một hoạt tính của PIP của người.

Trình tự của ví dụ không bị giới hạn về PIP của người được thể hiện trong SEQ ID NO: 11:

```
1 MRLQLLFRA SPATLLLVLC LQLGANKAQD NTRKIIIKNF DIPKSVRPND
EVTAVLAVQT
```

61 ELKECMVVKT YLISSIPLQG AFNYKYTACL CDDNPKTFYW
DFYTNRTVQI AAVVDVIREL

121 GICPDDAAVI PIKNNRFYTI EILKVE (SEQ ID NO: 11)

SEQ ID NO:11 thể hiện PIP kiểu đại của người có chiều dài đầy đủ, bao gồm peptit tín hiệu (axit amin 1-28), không cần có mặt để có chức năng.

Ví dụ không bị giới hạn khác về thuật ngữ “PIP” như được sử dụng ở đây là các axit amin (aa) 29-146 của SEQ ID NO: 11, mà do đó thiếu peptit tín hiệu (axit amin 1-28) và được thể hiện sau đây dưới SEQ ID NO: 12.

1 QDNTRKIIK NFDIPKSVRP NDEVTAVLAV QTELKECMVV KTYLISSIPL
QGAFNYKYTA

61 CLCDDNPKTF YWDFYTNRTV QIAAVVDVIR ELGICPDDAA VIPIKNNRFY
TIEILKVE

(SEQ ID NO: 12)

Thuật ngữ “thể tương đồng”, “biến thể”, “mảnh” hoặc “dạng cải biến” của PIP hoặc tương tự có nghĩa là polypeptit tương tự nhưng không giống hệt với PIP của người, nhưng vẫn giữ ít nhất một hoạt tính của PIP của người. Polypeptit này có thể có trình tự không giống hệt với trình tự của PIP của người (ví dụ, SEQ ID NO: 12), hoặc có trình tự giống với trình tự PIP của người (ví dụ, SEQ ID NO: 12), nhưng khác nhau theo phương thức khác (ví dụ, cải biến sau dịch mã). Polypeptit này có thể bao gồm, ví dụ, ít nhất 70%, ít nhất 80%, ít nhất 90% hoặc ít nhất 95% độ giống trình tự so với SEQ ID NO: 12, hoặc có, ví dụ, tối đa 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 hoặc 50 sự khác nhau về axit amin (ví dụ, các phần tử thể, mất đoạn và/hoặc thêm đoạn) so với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 12. Theo một số phương án, chất tương đồng, biến thể, mảnh của PIP hoặc dạng cải biến của chúng vẫn giữ ít nhất 90% độ giống về trình tự hoặc có tối đa 25 sự khác về axit amin so với SEQ ID NO:12. Chất tương đồng PIP, biến thể của PIP, mảnh của PIP hoặc dạng cải biến của PIP vẫn giữ ít nhất một hoạt tính của PIP của người.

Thuật ngữ “FGF23” hoặc “Yếu tố tăng trưởng nguyên bào sợi 23” có nghĩa là polypeptit này cũng được gọi là FGF-23, ADHR; FGFN; HPDR2; HYPF; PHPTC; ký hiệu ngoài: OMIM: 605380 MGI: 1891427 Homologene: 10771 GeneCards: FGF23

Gene; Species: Human; Entrez 8074; Ensembl ENSG00000118972; UniProt: Q9GZV9; RefSeq (mRNA): NM_020638; RefSeq (protein): NP_065689; Location (UCSC): Chr 12: 4.48 – 4.49 Mb; Species: Mouse; Entrez: 64654; Ensembl: ENSMUSG00000000182; UniProt: Q9EPC2; RefSeq (mRNA): NM_022657; RefSeq (protein): NP_073148; Location (UCSC): Chr 6: 127.07 – 127.08 Mb. Gen FGF23 mã hóa polypeptit FGF23.

Thuật ngữ “Peptit FGF23” như được sử dụng ở đây có nghĩa là FGF23 của người hoặc thể tương đồng, biến thể, mảnh hoặc dạng cải biến của chúng, mà vẫn giữ ít nhất một hoạt tính của FGF23 của người.

Trình tự của ví dụ không bị giới hạn về FGF23 của người, bao gồm peptit tín hiệu, được thể hiện trong SEQ ID NO: 9:

10	20	30	40	50
MLGARLRLWV	CALCSVCSMS	VLRAYPNASP	LLGSSWGGLI	HLYTATARN
60	70	80	90	100
YHLQIHKN	VDGAPHQTIY	SALMIRSEDA	GFVVITGVMS	RRYLCMDFRG
110	120	130	140	150
NIFGSHYFDP	ENCRFQHQTL	ENGVDVYHSP	QYHFLVSLGR	AKRAFLPGMN
160	170	180	190	200
PPPYSQFLSR	RNEIPLIHFN	TIPIRRHTRS	AEDDSERDPL	NVLKPRARMT
210	220	230	240	250
PAPASCSQEL	PSAEDNSPMA	SDPLGVVRGG	RVNTHAGGTG	PEGCRPFAKF
260				

I (SEQ ID NO: 9)

SEQ ID NO: 9 thể hiện FGF23 kiểu đại của người có chiều dài đầy đủ, bao gồm peptit tín hiệu (axit amin 1-24), không cần có mặt để có chức năng. Yamashita et al. 2000 Biochem. Biophys. Res. Comm. 277: 494-498; Shimada et al. 2001 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 6500-6505; và Zhang et al. 2004 Protein Sci. 13: 2819-2824.

Ví dụ không bị giới hạn về thuật ngữ “FGF23” như được sử dụng ở đây là các axit amin (aa) 25-251 của SEQ ID NO: 9, mà do đó thiếu peptit tín hiệu (axit amin 1-24) và được thể hiện sau đây dưới SEQ ID NO: 8.

	10	20	30	40	
50					YPNASP LLGSSWGGLI HLYTATARN
	60	70	80	90	
100					
					YHLQIHKNGH VDGAPHQTIY SALMIRSEDA GFVVITGVMS RRYLCMDFRG
	110	120	130	140	150
					NIFGSHYFDP ENCRFQHQL ENGVDVYHSP QYHFLVSLGR AKRAFLPGMN
	160	170	180	190	200
					PPPYSQFLSR RNEIPLIHFN TPIPRRHTRS AEDDSERDPL NVLKPRARMT
	210	220	230	240	250
					PAPASCSQEL PSAEDNSPMA SDPLGVVRGG RVNTHAGGTG PEGCRPFAKF
260					

I (SEQ ID NO: 8)

Thuật ngữ “thể tương đồng”, “biến thể”, “mảnh” hoặc “dạng cải biến” của FGF23 hoặc tương tự có nghĩa là polypeptit tương tự nhưng không giống hệt với FGF23 của người (ví dụ, SEQ ID NO: 8), nhưng vẫn giữ ít nhất một hoạt tính của FGF23 của người. Polypeptit này có thể bao gồm, ví dụ, ít nhất 70%, ít nhất 80%, ít nhất 90% hoặc ít nhất 95% độ giống trình tự so với SEQ ID NO: 8, hoặc có, ví dụ, tối đa 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 hoặc 50 sự khác nhau về axit amin (ví dụ, các phần tử thể, mất đoạn và/hoặc thêm đoạn) so với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 8. Theo một số phương án, chất tương đồng của FGF23, biến thể, mảnh hoặc dạng cải biến của chúng vẫn giữ ít nhất 90% độ giống về trình tự hoặc có tối đa 25 sự khác về axit amin so với SEQ ID NO: 8. Thể tương đồng, biến thể, mảnh hoặc dạng cải biến của FGF23 vẫn giữ ít nhất một hoạt tính của FGF23 của người. Các hoạt tính này (hoặc các chức năng) bao gồm, dưới dạng các ví dụ không giới hạn, các hoạt tính đã được biết của FGF23 của người, bao gồm có vai trò trong gắn kết với thụ thể của FGF23, tương tác với protein Klotho, tăng sinh tế

bào, và truyền tín hiệu tế bào; và hoạt tính trong nhiều loại thử nghiệm in vitro hoạt tính FGF23 khác nhau, bao gồm thử nghiệm Egr-1-luciferaza; và hoạt tính liên quan đến bệnh liên quan đến FGF23 chẳng hạn tình trạng do tuổi già (được chọn từ nhóm bao gồm bệnh thiếu cơ, bệnh teo da, chứng hao mòn cơ, bệnh teo não, chứng xơ vữa động mạch, chứng xơ cứng động mạch, bệnh khí thũng phổi, chứng loãng xương, chứng viêm xương khớp, chứng thiếu năng miễn dịch, huyết áp cao, chứng mất trí, bệnh Huntington, bệnh Alzheimer, bệnh đục thủy tinh thể, thoái hóa điểm vàng do tuổi già, ung thư tuyến tiền liệt, đột quỵ, giảm tuổi thọ, suy giảm trí nhớ, hình thành nếp nhăn, chức năng thận bị suy yếu, và mất chức năng nghe do tuổi già), rối loạn chuyển hóa (được chọn từ nhóm bao gồm tiểu đường typ II, Hội chứng chuyển hóa, chứng tăng đường huyết, và chứng béo phì), tăng phosphat máu (vôi hóa khối u, hội chứng tăng phosphat máu tăng tạo xương), bệnh thận mạn tính, bệnh suy thận mạn tính, ung thư, ung thư vú, và/hoặc teo cơ. Yamashita et al. 2000 *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 277: 494-498; Shimada et al. 2001 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 6500-6505; Urakawa et al. 2006 *Nature* 444: 770-774; Zhang et al. 2004 *Protein Sci.* 13: 2819-2824; WO 2013/027191, WO 2011/092234 và WO 2009/095372. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất thể liên hợp gồm axit béo được mô tả ở đây và peptit FGF23, trong đó peptit FGF23 vẫn giữ ít nhất một hoạt tính của FGF23; và theo một số phương án, hoạt tính của FGF23 được giữ lại là chức năng trong thử nghiệm in vitro Egr-1-luciferaza.

Thuật ngữ “thể tương đồng” của FGF23 có nghĩa là polypeptit tương ứng với FGF23 của người, nhưng có nguồn gốc khác, chẳng hạn thú, chẳng hạn chuột, khỉ cynomolgus, bò, lợn, cừu, ngựa, chó v.v., mà vẫn giữ ít nhất một chức năng của FGF23 của người.

Thuật ngữ “biến thể” của FGF23 có nghĩa là FGF23 chứa một hoặc nhiều đột biến (ví dụ, mất, thay thế hoặc thêm), ví dụ, so với SEQ ID NO: 8, mà vẫn giữ ít nhất một chức năng của FGF23 của người. Các đột biến trong FGF23 bao gồm các đột biến ở các vị trí Y154, Q156, R176, R179, C206 và C244. Các đột biến này trước đó đã được mô tả. Đột biến ở R179 mang lại tính kháng ly giải protein cho FGF23; trong ADHR, các đột biến ở vị trí 176RXXR179 ngăn sự phân cắt và bất hoạt FGF23. White et al. 2000 *Nat. Genet.* 26: 345-348; Liu et al. 2003 *J. Biol. Chem.* 278: 37419-37426. Đột

biến ở Y154 làm giảm phân hủy; đột biến ở Q156 loại trừ một vị trí phân cắt; và các đột biến ở C206 và C244 giảm quá trình dime hóa và quá trình kết cụm. WO 2013/027191 và WO 2011/092234. Thể tương đồng của FGF23, biến thể của FGF23, hoặc dạng cải biến của FGF23 còn có thể bao gồm một hoặc nhiều các axit amin bổ sung (bình thường là không được tìm thấy trong FGF23 kiểu dại của người).

Ví dụ không bị giới hạn về biến thể của FGF23 được thể hiện ở đây:

10	20	30	40	
50				
				MYPNASP LLGSSWGGLI HLYTATARN
	60	70	80	90
				100
				YHLQIHKNGH VDGAPHQTIY SALMIRSEDA GFVVITGVMS RRYLCMDFRG
	110	120	130	140
				150
				NIFGSHYFDP ENCRFQHQTL ENGVDVYHSP QYHFLVSLGR AKRAFLPGMN
	160	170	180	190
				200
				PPPYSQFLSR RNEIPLIHFN TPIPRRHTQS AEDDSERDPL NVLKPRARMT
	110	220	230	240
				250
				PAPASCSQEL PSAEDNSPMA SDPLGVVRGG RVNTHAGGTG PEGCRPFAKF
	260			

I (SEQ ID NO: 10)

SEQ ID NO: 10 chỉ ra biến thể của FGF23 trong đó peptit tín hiệu (aa 1-24) bị xóa, nhưng chữ đầu tiên M ở vị trí 1 được đặt vào lại; và axit amin tương ứng với R179 bị đột biến thành Q. SEQ ID NO: 10 còn được gọi là “hFGF23 R 179Q”, “FGF23 R179”, “hFGF23(R179Q)” và tương tự và thể hiện biến thể của FGF23 được sử dụng trong Ví dụ 28C.

Các biến thể bổ sung của FGF23 bao gồm, dưới dạng các ví dụ không giới hạn, các biến thể có trình tự của SEQ ID NO: 8 hoặc SEQ ID NO: 10, nhưng cũng có đột biến ở một hoặc nhiều trong số: Y154, Q156, R176, R179, C206 và C244. Các biến thể bổ sung của FGF23 bao gồm, dưới dạng các ví dụ không giới hạn, các biến thể có trình tự của SEQ ID NO: 8 hoặc SEQ ID NO: 10, nhưng cũng có đột biến ở một hoặc nhiều

trong số: Y154, Q156, R176, R179, C206 và C244 và còn bao gồm một hoặc nhiều các axit amin bổ sung (bình thường là không được tìm thấy trong FGF23 kiểu đại của người).

Thuật ngữ “mảnh” của FGF23 có nghĩa là FGF23 mà bao gồm một hoặc nhiều axit amin bị mất, ví dụ, so với SEQ ID NO: 8, tuy nhiên vẫn giữ ít nhất một chức năng của FGF23 của người. Các mảnh chức năng của FGF23 bao gồm axit amin 180-251 của SEQ ID NO: 8, Goetz et al. 2010 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 107: 407-412. Mảnh FGF23 cũng có thể có một hoặc các đột biến, ví dụ, ở vị trí bất kỳ hoặc hoặc nhiều vị trí trong số các vị trí Y154, Q156, R176, R179, C206 và C244, nhưng có thể vẫn giữ ít nhất một hoạt tính của FGF23 của người.

Thuật ngữ “dạng cải biến” của FGF23 có nghĩa là FGF23 có trình tự tương tự hoặc giống với trình tự của FGF23, ví dụ, SEQ ID NO: 8, nhưng có một hoặc nhiều cải biến, và vẫn giữ ít nhất một hoạt tính của FGF23 của người. Cải biến này có thể bao gồm, dưới dạng các ví dụ không giới hạn, cải biến sau dịch mã (phosphoryl hóa, metyl hóa, hoặc bổ sung hydratecacbon), hoặc liên hợp với gốc thứ hai, không phải là FGF23. Gốc thứ hai này có thể, dưới dạng các ví dụ không giới hạn, peptit tín hiệu, Klotho alpha hoặc Klotho beta hoặc mảnh của chúng (ví dụ, Klotho hoặc sKlotho hòa tan), Fc (ví dụ, FcLALA), hoặc cải biến khác. WO 2011/092234 và WO 2009/095372.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “peptit hoặc polypeptit AgRP”, và các thuật ngữ tương tự dùng để chỉ Peptit có liên quan đến Agouti, tức là, phân tử truyền tín hiệu được tạo thành bởi 132 axit amin được xử lý sau dịch mã thành dạng trưởng thành hoặc dạng có hoạt tính, AgRP (83-132), bao gồm 10 gốc xystein và tạo thành mạng lưới năm liên kết disulfua. AgRP đóng vai trò làm chất chủ vận nghịch của các thụ thể melanocortin MC3R và MC4R. Thuật ngữ “peptit AgRP” trong tất cả các trường hợp bao gồm các muối của nó. Theo một số phương án, AgRP có thể ở dạng amit, ví dụ, amit hóa đầu C- $\text{-CO}_2\text{H}$ để tạo ra C(O)-NH_2 . Theo các phương án khác, AgRP có thể ở dạng axit.

Thuật ngữ “AgRP peptit” cũng bao gồm các mảnh ngắn hơn có hoạt tính sinh học của AgRP. Mảnh là một phần của trình tự gốc giống hệ về trình tự nhưng ngắn hơn về độ dài so với trình tự gốc và vẫn giữ hoạt tính sinh học (tức là chủ vận nghịch đảo). Các mảnh của AgRP các polypeptit cũng như các biến thể của chúng have cũng đã được mô tả trong Jackson, P. J. et al., Biochemistry 41, 7565-7572, được kết hợp với nhau

bằng cách tham chiếu ở đây. Ví dụ, AgRP (87-120) và AgRP(87-132) có ái lực MC3R và MC4R gần như là giống như AgRP(83-132) và thể hiện chủ vận nghịch đảo tương đương. Các mảnh bổ sung của polypeptit AgRP đã được mô tả trong Christine G. Joseph et al., Các peptit 24 (2003), 263-270; được kết hợp với nhau bằng cách tham chiếu ở đây. Các ví dụ về các mảnh này là AgRP(86-132) và AgRP đơn vòng (109-118) cũng như sự kéo dài của chúng ở đầu N và/hoặc Đầu C.

Thuật ngữ “các polypeptit AgRP” cũng bao hàm “polypeptit AgRP đột biến” là polypeptit AgRP trong đó trình tự của polypeptit AgRP xuất hiện trong tự nhiên được cải biến. Các cải biến này đã được mô tả trong đơn PCT số WO2013/006656, được kết hợp với nhau bằng cách tham chiếu ở đây.

Các thuật ngữ “peptit GDF15”, “polypeptit GDF15” và “protein GDF15” được sử dụng thay thế lẫn nhau và có nghĩa là polypeptit kiểu đại xuất hiện trong tự nhiên được biểu hiện ở thú, chẳng hạn ở người hoặc ở chuột. Theo mục đích của sáng chế, thuật ngữ “protein GDF15” có thể được sử dụng thay thế lẫn nhau để chỉ polypeptit GDF15 có chiều dài đầy đủ bất kỳ, được tạo thành từ 308 gốc axit amin; (NCI Ref. Seq. NP_004855.2) bao gồm peptit tín hiệu gồm 29 axit amin (axit amin 1-29), miền trước khi có hoạt tính (pro-domain) gồm 167 axit amin (các axit amin 30-196), và miền trưởng thành gồm 112 axit amin (axit amin 197-308) được cắt khỏi miền trước khi có hoạt tính bằng các proteaza tương tự furin. Polypeptit GDF15 gồm 308-axit amin dùng để chỉ polypeptit GDF15 “có chiều dài đầy đủ”; polypeptit GDF15 gồm 112 axit amin (ví dụ, axit amin 197-308) là polypeptit GDF15 “trưởng thành”. Peptit GDF15 trưởng thành gồm bảy gốc xystein được bảo toàn cần có để tạo thành mô-típ nút (motif knot) xystein (có ba liên kết disulfua bên trong chuỗi) và một liên kết disulfua giữa các chuỗi là điển hình cho các thành viên của liên họ TGF β . Peptit GDF15 trưởng thành bao gồm hai gốc xystein bổ sung tạo ra liên kết disulfua bên trong chuỗi thứ tư. Do đó, GDF15 có hoạt tính sinh học là đồng đime (homodimer) của peptit trưởng thành được liên kết cộng hóa trị bằng một liên kết disulfua giữa các chuỗi. Protein hoặc polypeptit GDF15 do đó cũng bao gồm đa-me (multimer), cụ thể hơn là đime của protein này. Mỗi đơn vị monome tạo ra GDF15 đồng đime này có thể được nối với axit béo có các công thức A1, A2 hoặc A3.

Thuật ngữ “GDF15” hoặc “Protein GDF15” như được sử dụng ở đây là cũng có nghĩa là GDF15 của người hoặc thể tương đồng, biến thể, thể đột biến, mảnh hoặc dạng cải biến của chúng, mà vẫn giữ ít nhất một hoạt tính của GDF-15 của người.

Thuật ngữ "polypeptit GDF15 đột biến" hoặc “polypeptit GDF15 biến thể” bao hàm polypeptit GDF15 trong đó trình tự của polypeptit GDF15 xuất hiện trong tự nhiên được cải biến. Các cải biến này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, một hoặc sự thay thế axit amin, bao gồm sự thay thế bằng các axit amin không xuất hiện trong tự nhiên, sự thay thế bằng các chất tương tự axit amin không xuất hiện trong tự nhiên và các chất bất chức axit amin.

Theo một khía cạnh, thuật ngữ "protein GDF15 đột biến" hoặc “polypeptit GDF15 biến thể” dùng để chỉ trình tự của protein GDF15 trong đó ít nhất một gốc thường được phát hiện thấy ở vị trí đã biết của polypeptit GDF15 nguyên bản bị xóa hoặc bị thay thế bằng gốc không thường được phát hiện thấy ở vị trí đó trong trình tự GDF15 nguyên bản này. Trong một số trường hợp, được mong muốn để thay thế một gốc duy nhất thường được phát hiện thấy ở vị trí đã biết của polypeptit GDF15 nguyên bản bằng nhiều hơn một gốc không thường được phát hiện thấy ở vị trí này; vẫn theo các trường hợp khác, có thể được mong muốn để giữ nguyên trình tự polypeptit GDF15 nguyên bản và chèn một hoặc nhiều gốc vào vị trí đã biết trong protein này; vẫn theo các trường hợp khác, có thể được mong muốn để xóa hoàn toàn một gốc đã biết; tất cả các cấu trúc này được bao hàm bởi thuật ngữ "protein GDF 15 đột biến" hoặc “protein GDF15 biến thể”. Theo một khía cạnh theo sáng chế, protein GDF15 đột biến hoặc “protein GDF15 biến thể” này có trình tự được chọn từ trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO 1 đến SEQ ID No 7. Sáng chế cũng bao hàm các axit nucleic mã hóa các trình tự của polypeptit GDF15 đột biến hoặc các trình tự của polypeptit GDF15 biến thể.

Thuật ngữ “thể tương đồng”, “biến thể”, “mảnh” hoặc “dạng cải biến” của GDF15 hoặc tương tự có nghĩa là polypeptit tương tự nhưng không giống hệt với GDF15 của người, nhưng vẫn giữ ít nhất một hoạt tính của GDF-15 của người.

Thuật ngữ “dạng cải biến” của GDF15 có nghĩa là GDF15 có trình tự tương tự hoặc giống với trình tự của GDF15, nhưng có một hoặc nhiều cải biến, và vẫn giữ ít nhất một hoạt tính của GDF-15 của người. Cải biến này có thể bao gồm, dưới dạng các ví dụ không giới hạn, cải biến sau dịch mã (phosphoryl hóa, metyl hóa, hoặc bổ sung hydratcacbon).

Thuật ngữ “thể tương đồng” của GDF15 có nghĩa là polypeptit tương ứng với GDF15 của người, nhưng có nguồn gốc khác, chẳng hạn từ thú, chẳng hạn khi cynomolgous, chuột và chuột nhắt .v.v., mà vẫn giữ ít nhất một chức năng của GDF15 của người. Trong một số trường hợp, thể tương đồng GDF15 có thể được sử dụng để điều trị hoặc làm thuyên giảm rối loạn chuyển hóa ở đối tượng ở dạng trưởng thành của polypeptit GDF15 đột biến có nguồn gốc từ cùng loài với đối tượng này.

Theo các phương án khác nhau, polypeptit GDF15, thể tương đồng, biến thể, thể đột biến, mảnh hoặc dạng cải biến của chúng có trình tự axit amin có ít nhất khoảng 85% đồng nhất với protein GDF15 xuất hiện trong tự nhiên. Theo các phương án khác, polypeptit GDF15 có trình tự axit amin có ít nhất khoảng 90%, hoặc khoảng 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% đồng nhất với trình tự axit amin của polypeptit GDF15 xuất hiện trong tự nhiên. Polypeptit GDF15, thể tương đồng, biến thể, thể đột biến, mảnh hoặc dạng cải biến của chúng có ít nhất một hoạt tính của polypeptit đột biến của GDF15 kiểu dại, chẳng hạn khả năng giảm nồng độ glucoza, insulin, triglyxerit, hoặc cholesterol trong máu; khả năng làm giảm khối lượng cơ thể; hoặc khả năng cải thiện độ dung nạp glucoza, độ tiêu hao năng lượng, hoặc độ nhạy cảm insulin.

Theo các phương án khác nhau tương ứng, polypeptit GDF15 hoặc thể tương đồng, biến thể, thể đột biến, mảnh hoặc dạng cải biến của chúng có hoạt tính sinh học tương đương, lớn hơn hoặc nhỏ hơn hoạt tính sinh học của dạng xuất hiện trong tự nhiên của protein GDF15 trưởng thành. Các ví dụ về các hoạt tính sinh học bao gồm khả năng giảm nồng độ glucoza, insulin, triglyxerit, hoặc cholesterol trong máu; the ability để làm giảm khối lượng cơ thể; hoặc khả năng cải thiện độ dung nạp glucoza, độ tiêu hao năng lượng, hoặc độ nhạy cảm insulin; khả năng làm giảm tiết glucoza và protein trong nước tiểu.

Như được sử dụng ở đây, trong ngữ cảnh cấu trúc của polypeptit hoặc protein, thuật ngữ "đầu N-" (hoặc "đầu amino ") và "đầu C-" (hoặc "đầu carboxyl ") dùng để chỉ tương ứng là các gốc amino và carboxyl tận cùng của polypeptit này.

Thuật ngữ "polypeptit điều trị" hoặc "protein điều trị" như được sử dụng ở đây có nghĩa là polypeptit hoặc protein đang được phát triển cho ứng dụng điều trị bệnh, hoặc đã được phát triển cho ứng dụng điều trị bệnh.

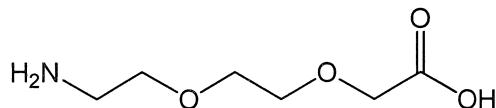
Cầu nối tách phân tử sinh học và gốc axit béo. Cấu trúc hóa học của nó không có tính quyết định, do nó có vai trò chủ yếu là một yếu tố cách.

Cầu nối là gốc hóa học gồm hai nhóm phản ứng/nhóm chức, một trong số đó có thể phản ứng với phân tử sinh học và nhóm phản ứng/nhóm chức còn lại phản ứng với gốc axit béo. Hai nhóm phản ứng/nhóm chức của cầu nối được nối qua gốc hoặc yếu tố cách liên kết, cấu trúc của chúng không có tính quyết định miễn là nó không cản trở quá trình ghép cặp cầu nối với phân tử sinh học và gốc axit béo có công thức A1, A2 hoặc A3.

Cầu nối có thể được làm từ các axit amin được nối cùng nhau bằng các liên kết peptit. Trong một số phương án theo sáng chế, cầu nối được tạo ra bởi 1 đến 20 axit amin được nối bằng các liên kết peptit, trong đó các axit amin này được chọn từ 20 axit amin xuất hiện trong tự nhiên. Theo các phương án khác nhau, 1 đến 20 axit amin được chọn từ các axit amin glyxin, serin, alanin, methionin, asparagin, glutamin, xystein và lysin. Theo một số phương án, cầu nối được tạo ra từ một số lượng lớn các axit amin không bị cản trở về mặt không gian, chẳng hạn glyxin và alanin. Theo một số phương án, các cầu nối là polyglyxin, polyalanin, tổ hợp của glyxin và alanin (chẳng hạn poly(Gly-Ala)), hoặc tổ hợp của glyxin và serin (chẳng hạn poly(Gly-Ser)). Theo một số phương án, cầu nối được tạo ra từ một số lượng lớn các axit amin được chọn từ histidin, alanin, methionin, glutamin, asparagin và glyxin. Theo một số phương án, các cầu nối chứa gốc poly-histidin.

Theo một số phương án, cầu nối này bao gồm 1 đến 20 axit amin được chọn từ các axit amin không có trong tự nhiên. Trong khi cầu nối gồm 1-10 gốc axit amin được ưu tiên để liên hợp với gốc axit béo, sáng chế dự tính các cầu nối có chiều dài bất kỳ

hoặc là tổ hợp bất kỳ. Ví dụ về cầu nối gồm axit amin không có trong tự nhiên là axit 8-amino-3,6-dioxaoctanoic có công thức sau:



hoặc các đơn vị lặp lại của nó.

Các cầu nối được mô tả ở đây là các ví dụ minh họa, và các cầu nối dài hơn nhiều và bao gồm các gốc khác được chủ tính theo sáng chế. Các cầu nối không phải peptit cũng được chủ tính theo sáng chế.

Theo các phương án khác, cầu nối gồm một hoặc nhiều nhóm alkyl, nhóm alkenyl, nhóm xycloalkyl, nhóm aryl, nhóm heteroaryl, nhóm dị vòng, polyetylen glycol và/hoặc một hoặc nhiều axit amin có trong tự nhiên hoặc axit amin không có trong tự nhiên, hoặc tổ hợp của chúng, trong đó mỗi nhóm trong số các alkyl, alkenyl, xycloalkyl, aryl, heteroaryl, heteroxyclyl, polyetylen glycol và/hoặc axit amin có trong tự nhiên hoặc axit amin không có trong tự nhiên tùy ý đã kết hợp và được nối cùng nhau, hoặc được nối với phân tử sinh học và/hoặc với gốc axit béo, qua nhóm hóa học được chọn từ $-C(O)O-$, $-OC(O)-$, $-NHC(O)-$, $-C(O)NH-$, $-O-$, $-NH-$, $-S-$, $-C(O)-$, $-OC(O)NH-$, $-NHC(O)-O-$, $=NH-O-$, $=NH-NH-$ hoặc $=NH-N(alkyl)-$.

Các cầu nối bao gồm yếu tố cách alkyl ví dụ, là $-NH-(CH_2)_z-C(O)-$ hoặc $-S-(CH_2)_z-C(O)-$ hoặc $-O-(CH_2)_z-C(O)-$, $-NH-(CH_2)_z-NH-$, $-O-C(O)-(CH_2)_z-C(O)-O-$, $-C(O)-(CH_2)_z-O-$, $-NHC(O)-(CH_2)_z-C(O)-NH-$ và tương tự trong đó z là 2-20 có thể được sử dụng. Các cầu nối alkyl này còn có thể được thế bằng nhóm cản trở không về không gian, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, alkyl thấp (ví dụ, C_1-C_6), axyl thấp, halogen (ví dụ, Cl, Br), CN, NH_2 , hoặc phenyl.

Cầu nối cũng có thể có bản chất là polyme. Cầu nối có thể bao gồm các đơn vị hoặc các chuỗi polyme có khả năng phân hủy sinh học hoặc ổn định sinh học. Các polyme có liên kết lặp lại có thể có nhiều mức độ độ ổn định khác theo các tình trạng sinh lý phụ thuộc vào tính bất ổn định của liên kết. Các polyme có thể chứa các liên kết chẳng hạn các polycarbonat ($-O-C(O)-O-$), các polyeste ($-C(O)-O-$), các polyuretan ($-NH-C(O)-O-$), polyamit ($-C(O)-NH-$). Các liên kết này được đề xuất bằng cách nêu ví dụ, và không được chủ định nhằm giới hạn các loại liên kết có thể sử dụng trong các chuỗi hoặc các cầu nối polyme theo sáng chế. Các polyme thích hợp bao gồm, ví dụ, polyetylen glycol (PEG), polyvinyl pyrrolidon, rượu polyvinyl, các polyaxit amin,

divinylete maleic anhydrit, N-(2-hydroxypropyl)-metacrylicamit, dextran, các chất dẫn xuất dextran, polypropylen glycol, polyol được polyoxyetyl hóa, heparin, các mảnh heparin, các polyxacarit, xenluloza và các chất dẫn xuất xenluloza, tinh bột và các chất dẫn xuất tinh bột, polyalkylen glycol và các chất dẫn xuất của nó, các đồng polyme của các polyalkylen glycol và các chất dẫn xuất của chúng, polyvinyl etyl ete, và tương tự và các hỗn hợp của chúng. Cầu nối polyme, ví dụ, là polyetylen glycol (PEG). Cầu nối PEG có thể là mạch thẳng hoặc được phân nhánh. Khối lượng phân tử của cầu nối PEG theo sáng chế không bị giới hạn về kích thước cụ thể bất kỳ, nhưng các phương án cụ thể có khối lượng phân tử nằm trong khoảng 100Dalton đến 5000Dalton ví dụ, 500Dalton đến 1500Dalton.

Cầu nối gồm các nhóm phản ứng-chức năng ở cả hai đầu mà tạo thành cầu giữa nhóm amino của peptit hoặc polypeptit/protein và nhóm phản ứng-chức năng trên gốc axit béo (ví dụ, nhóm chức axit carboxylic của gốc axit béo có công thức A1, A2 và A3).

Cầu nối có thể gồm một số gốc liên kết (hoặc yếu tố cách) có bản chất khác nhau (ví dụ, tổ hợp của các axit amin, gốc heteroxyclyl, các gốc PEG và/hoặc các gốc alkyl). Trong trường hợp này, mỗi gốc liên kết chứa các nhóm chức-phản ứng thích hợp ở cả hai đầu tạo cầu giữa nhóm amino của peptit hoặc polypeptit/protein và gốc liên kết tiếp theo có bản chất khác và/hoặc bao gồm các nhóm chức-phản ứng thích hợp tạo cầu giữa gốc liên kết trước đó có bản chất khác và gốc axit béo.

Các peptit được cải biến hoặc các polypeptit được cải biến và/hoặc cấu trúc một phần peptit-polypeptit được cải biến (tức là peptit/polypeptit được gắn kèm với cầu nối một phần) bao gồm các nhóm phản ứng có thể phản ứng với các nhóm chức phản ứng hiện có trên gốc axit béo này (hoặc gốc axit béo được cải biến: tức là đã được gắn kèm cầu nối một phần) để tạo ra liên kết cộng hóa trị. Các nhóm phản ứng là các nhóm hóa học có khả năng tạo ra liên kết cộng hóa trị. Các nhóm phản ứng được đặt ở vị trí cho quá trình liên hợp và nói chung có thể là carboxy, phosphoryl, nhóm axyl, este hoặc anhydrit được trộn, maleimit, N-hydroxysuccinimit, tetrazin, alkyn, imidat, pyridin-2-yl-disulfanyl, nhờ đó có khả năng tạo liên kết cộng hóa trị với các nhóm chức như nhóm amino, nhóm hydroxyl, nhóm alken, nhóm hydrazin, nhóm hydroxylamin, nhóm azit hoặc nhóm thiol ở các vị trí khác nhau của quá trình liên hợp.

Các nhóm phản ứng được quan tâm đặc biệt để liên hợp phân tử sinh học hoặc phân tử sinh học được cải biến với cầu nối và/hoặc cầu nối với gốc axit béo và/hoặc để

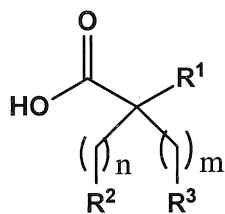
liên hợp nhiều gốc liên kết khác nhau có nguồn gốc khác nhau lại với nhau là N-hydroxysuccinimit, alkyn (cụ thể hơn là xyclooctyn).

Các nhóm chức bao gồm: 1. các nhóm thiol để phản ứng với các maleimit, tosyl sulfon hoặc pyridin-2-ylidisulfanyl; 2. các nhóm amino (ví dụ, nhóm chức amino của axit amin) để liên kết với axit carboxylic hoặc axit carboxylic được hoạt hóa (ví dụ, việc tạo thành liên kết amit qua hóa N-hydroxysuccinamit), các nhóm phosphoryl, nhóm axyl hoặc anhydrit được trộn; 3. Azit để tham gia phản ứng cộng vòng (cycloaddition) Huisgen với alkyn kết thúc và cụ thể hơn là xyclooctyn (được gọi phổ biến hơn là hóa click); 4. nhóm carbonyl để phản ứng với hydroxylamin hoặc hydrazin để tương ứng tạo thành oxime hoặc hydrazin; 5. alken và cụ thể hơn là alken được kéo thẳng để phản ứng với tetrazin trong phản ứng cộng aza [4+2]. Trong khi một vài ví dụ về các cầu nối và các nhóm chức/nhóm phản ứng được mô tả ở đây, sáng chế dự tính các cầu nối có độ dài bất kỳ và chế phẩm bất kỳ.

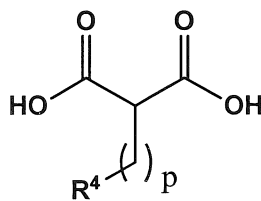
Các phương án

Các phương án khác nhau theo sáng chế được mô tả ở đây. Sẽ được nhận thức rằng các đặc điểm được cụ thể hóa trong mỗi phương án có thể được kết hợp các đặc điểm khác được cụ thể hóa để đưa ra các phương án khác nữa.

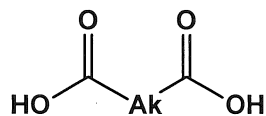
Theo phương án 1, sáng chế đề cập đến thể liên hợp bao gồm phân tử sinh học được nối với gốc axit béo qua cầu nối trong đó gốc axit béo có các công thức A1, A2 hoặc A3 sau:



A1



A2



hoặc A3

R^1 là CO_2H , H;

R^2 , R^3 và R^4 độc lập nhau là H, OH, CO_2H , $-\text{CH}=\text{CH}_2$ hoặc $-\text{C}\equiv\text{CH}$;

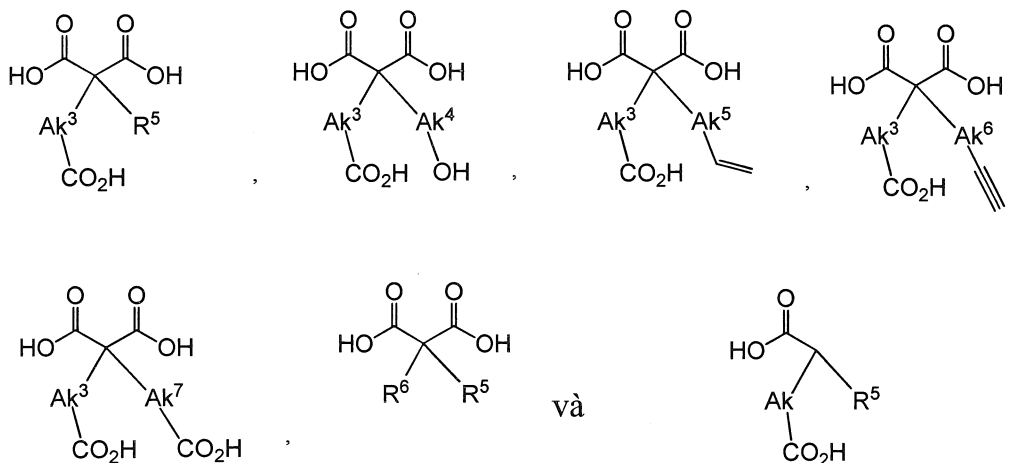
Ak là C_6 - C_{30} alkylen phân nhánh;

n , m và p độc lập nhau là số nguyên giữa 6 và 30; hoặc amit, este hoặc muối được dùng của chúng.

Theo khía cạnh khác của phương án 1, thể liên hợp theo phương án 1 còn có thể bao gồm axit béo có công thức A1, A2 hoặc A3 đã mô tả trên đây. Do các khó khăn trong việc thực hiện được liên hợp chọn lọc và/hoặc đạt được đơn liên hợp (môn-conjugation) của axit béo với phân tử sinh học, thể liên hợp theo sáng chế, có thể bao gồm phân tử sinh học được nối với một hoặc nhiều gốc axit béo có công thức A1, A2 hoặc A3. Ngoài ra, do bản chất đa-me của một số protein, mỗi đơn vị monome tạo ra một protein đa-me, có thể được nối với gốc axit béo, nhưng không phải tất cả các đơn vị monome nhất thiết phải được nối với gốc axit béo miễn là ít nhất một trong số các đơn vị monome này được nối với gốc axit béo. Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến các hỗn hợp của thể liên hợp theo sáng chế. Ví dụ, hỗn hợp này có thể bao gồm phân tử sinh học, ví dụ, phân tử sinh học đa-me, ví dụ, phân tử sinh học dime, được nối với một gốc axit béo có công thức A1, A2 hoặc A3, và phân tử sinh học, ví dụ, phân tử sinh học đa-me, ví dụ, phân tử sinh học dime, được nối với nhiều hơn một gốc axit béo có công thức A1, A2 hoặc A3. Các ví dụ theo sáng chế sau đây còn được nhấn mạnh về khía cạnh chọn lọc hoặc không chọn lọc đa liên hợp của các axit béo với protein hoặc polypeptit.

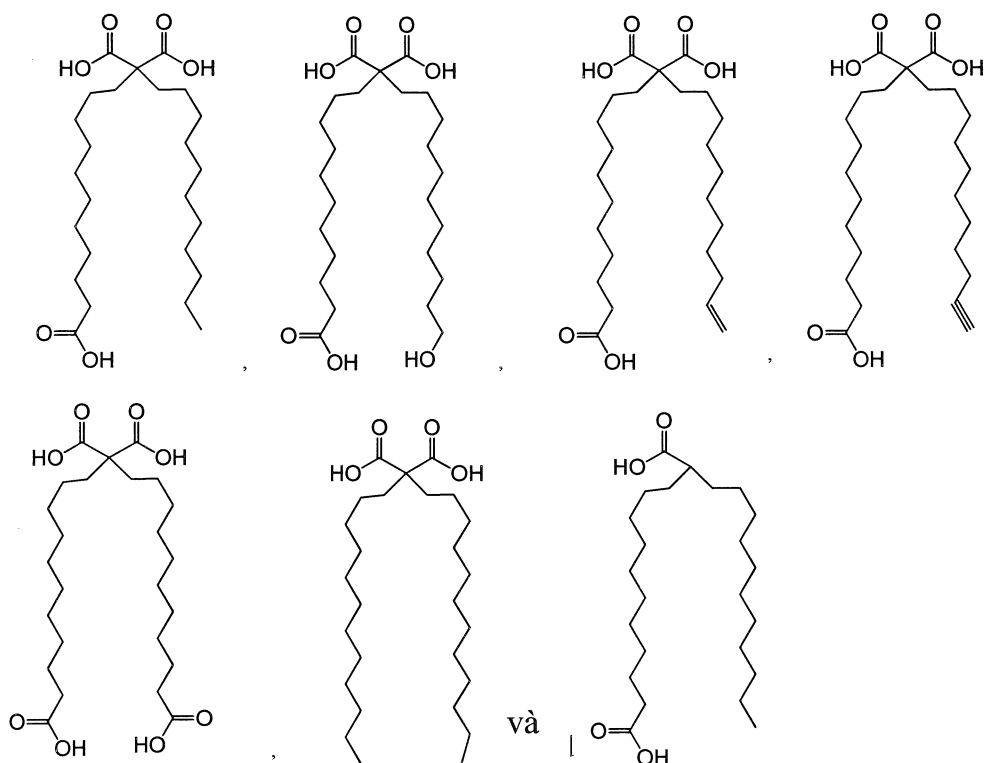
Theo phương án 1A, sáng chế đề cập đến thể liên hợp theo phương án 1 trong đó gốc axit béo này có công thức A1. Theo khía cạnh cụ thể của phương án này, thể liên hợp này bao gồm gốc axit béo có công thức A1 trong đó n và m độc lập 8 đến 20, tốt hơn nếu là 10 đến 16. Theo khía cạnh khác của phương án này, sáng chế đề cập đến thể liên hợp theo phương án 1 hoặc 1A trong đó gốc axit béo này có công thức A1 và trong đó ít nhất một trong số R^2 và R^3 là CO_2H .

Theo phương án 2, sáng chế đề cập đến thể liên hợp theo phương án 1 hoặc 1A, trong đó gốc axit béo được chọn từ các công thức sau đây:

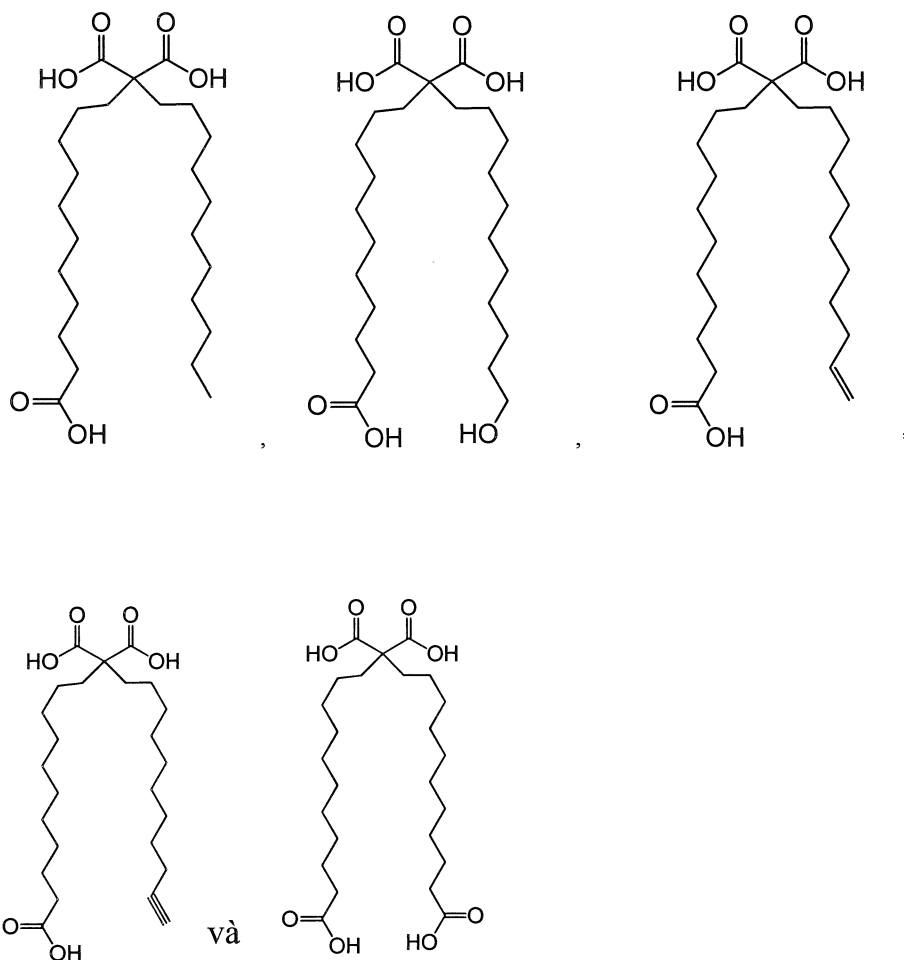


trong đó Ak^3 , Ak^4 , Ak^5 , Ak^6 và Ak^7 độc lập là (C_8-20) alkylen, R^5 và R^6 độc lập là (C_8-20) alkyl.

Theo phương án 3, sáng chế đề cập đến thể liên hợp theo phương án 1, 1A hoặc 2 trong đó gốc axit béo được chọn từ các công thức sau đây:

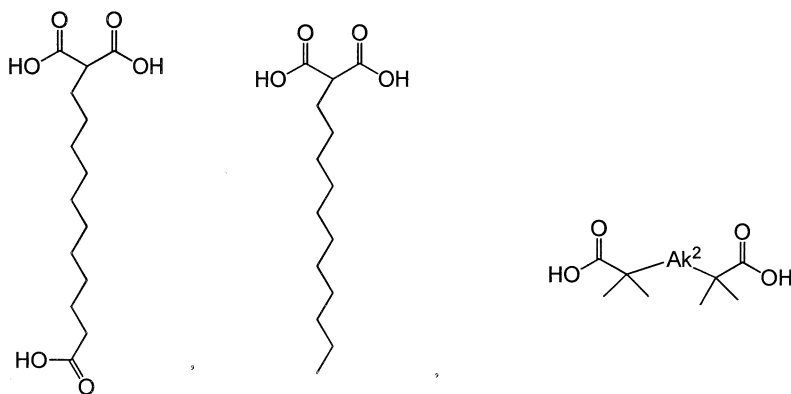


Theo phương án 3A, sáng chế đề cập đến thể liên hợp theo phương án 1, 1A hoặc 2 trong đó gốc axit béo được chọn từ các công thức sau đây:



Theo phương án 3B, sáng chế đề cập đến thể liên hợp theo phương án 1 trong đó gốc axit béo này có công thức A2 hoặc A3. Theo khía cạnh cụ thể của phương án này, thể liên hợp này bao gồm gốc axit béo có công thức A2 trong đó p là 8 đến 20, hoặc gốc axit béo có công thức A3 trong đó Ak là C₈₋₂₀alkylen.

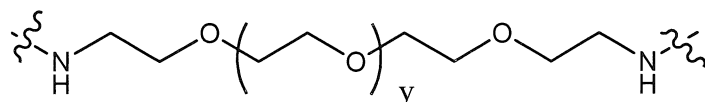
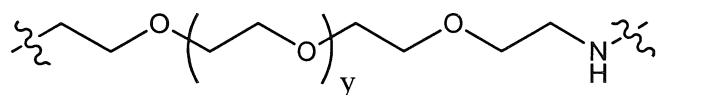
Theo phương án 3C, sáng chế đề cập đến thể liên hợp theo phương án 1 hoặc 3B trong đó the gốc axit béo được chọn từ các công thức sau đây:



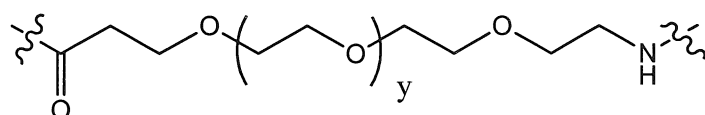
trong đó Ak² là C₈₋₂₀alkylen.

Theo phương án 4, sáng chế đề cập đến thể liên hợp theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên trong đó cầu nối bao gồm một hoặc nhiều nhóm alkyl, nhóm alkenyl, nhóm xycloalkyl, nhóm aryl, nhóm heteroaryl, nhóm dị vòng, polyetylen glycol, một hoặc nhiều axit amin có trong tự nhiên hoặc axit amin không có trong tự nhiên, hoặc tổ hợp của chúng, trong đó mỗi nhóm trong số alkyl, alkenyl, xycloalkyl, aryl, heteroaryl, heteroxyclyl, polyetylen glycol và/hoặc axit amin có trong tự nhiên hoặc axit amin không có trong tự nhiên này tùy ý được kết hợp và được nối cùng nhau hoặc được nối với phân tử sinh học và/hoặc với gốc axit béo qua nhóm hóa học được chọn từ $-C(O)O-$, $-OC(O)-$, $-NHC(O)-$, $-C(O)NH-$, $-O-$, $-NH-$, $-S-$, $-C(O)-$, $-OC(O)NH-$, $-NHC(O)-O-$, $=NH-O-$, $=NH-NH-$ hoặc $=NH-N(alkyl)-$.

Theo phương án 5, sáng chế đề cập đến thể liên hợp theo phương án bất kỳ trong số các phương án trên, trong đó cầu nối này bao gồm gốc oligo etylen glycol không phân nhánh có công thức:

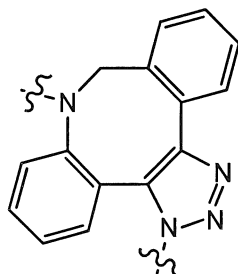
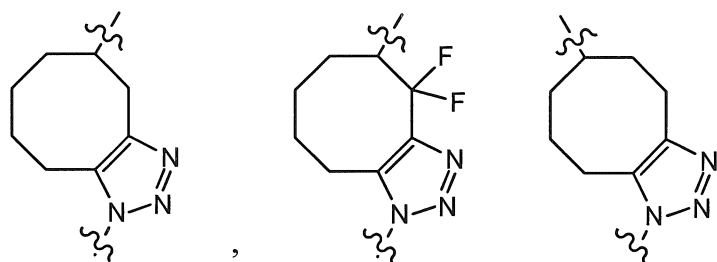
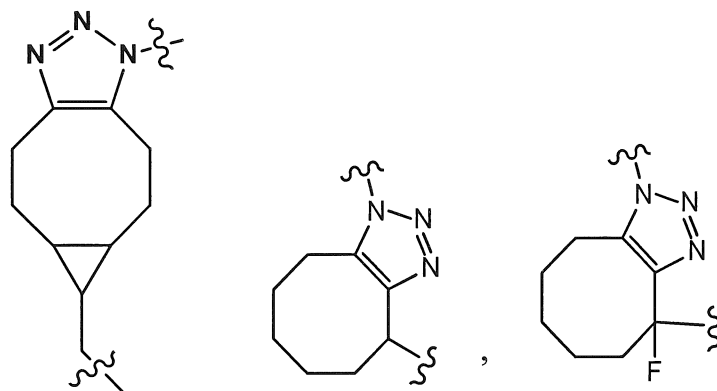


hoặc,



trong đó y là 0 đến 34.

Theo phương án 6, sáng chế đề cập đến thể liên hợp theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên trong đó cầu nối này bao gồm (hoặc còn bao gồm) gốc dị vòng được chọn từ các công thức sau đây:

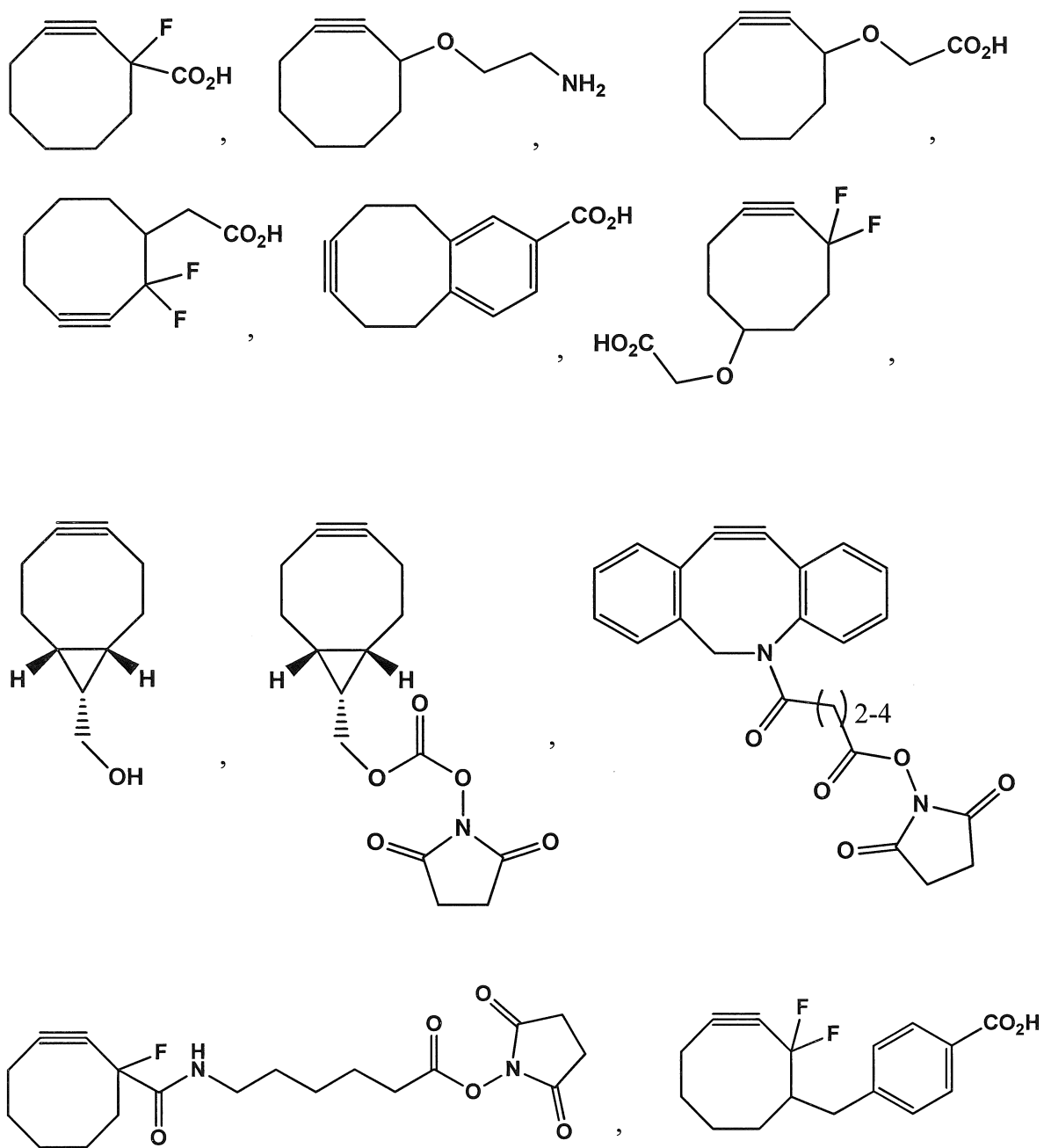


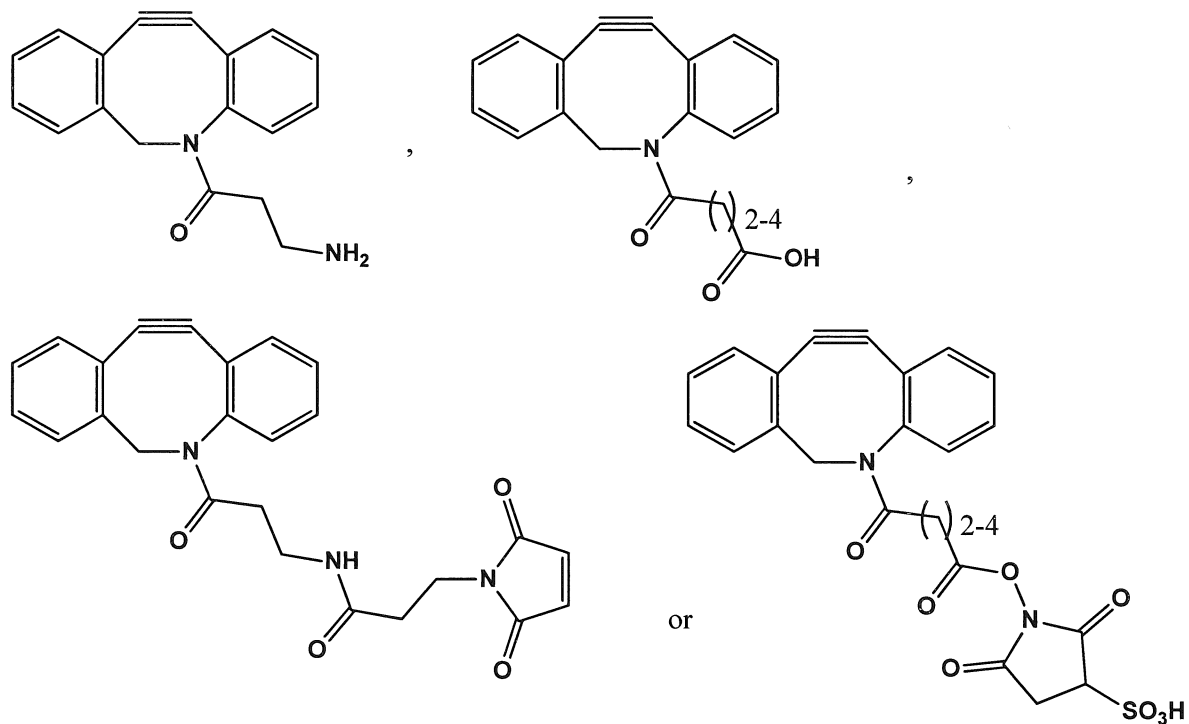
và

Các cầu nối chứa heterocyclyl này thu được ví dụ bằng phản ứng cộng vòng azit-alkyn Huisgen, được gọi phổ biến hơn là hóa click. Cụ thể hơn, một số gốc trong số heterocyclyl được mô tả ở trên là từ phản ứng của xycloalkyn với gốc chứa azit.

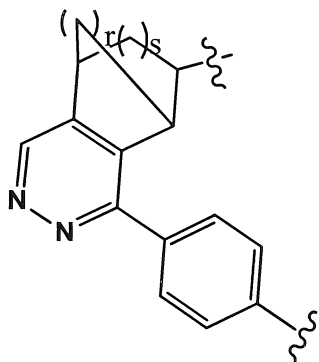
Xycloalkyn dễ dàng sẵn có ngoài thị trường và do đó có thể được làm cho có chức năng qua phản ứng cộng vòng với gốc chứa nhóm chức azit (ví dụ, cầu nối bao gồm nhóm chức azit ở tận cùng). Các ví dụ về việc sử dụng hóa click alkyn vòng trong đánh dấu protein được mô tả trong US 2009/0068738.

Các ví dụ không giới hạn về chất xycloalkyn mà có thể được sử dụng trong phản ứng cộng vòng Huisgen là:



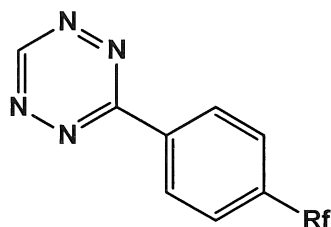


Theo phương án 6A, sáng chế đề cập đến thể liên hợp theo phương án bất kỳ trong số các phương án 1 đến 5, trong đó cầu nối này bao gồm (hoặc còn bao gồm) heterocyclyl được chọn từ các công thức sau đây:

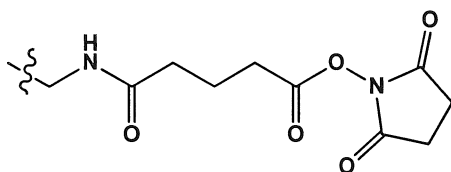


trong đó r là số nguyên 0 đến 2 và s là số nguyên 0 đến 3.

Các cầu nối dị vòng này có thể thu được qua phản ứng cộng vòng aza [4+2] của alken, hoặc tốt hơn là alken bị biến dạng chẳng hạn xycloalkan, với gốc sau:

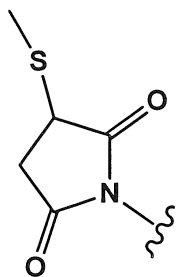


trong đó Rf ví dụ, là $-\text{CH}_2\text{NH}_2$, $-\text{OH}$, $-\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$, $-\text{S-CH}_2\text{CO}_2\text{H}$, $-(\text{O-CH}_2)_{4-6}\text{-C(O)-OH}$ –hoặc



Các gốc tetrazin này dễ dàng sẵn có bán ngoài thị trường và có thể phản ứng với gốc chứa alken, ví dụ, cầu nối bao gồm nhóm chức alken ở tận cùng.

Theo phương án 6B, sáng chế đề cập đến thể liên hợp theo phương án bất kỳ trong số các phương án 1 đến 5 trong đó cầu nối này bao gồm (hoặc còn bao gồm) heteroxyclyl có công thức:



Gốc dị vòng này có thể thu được bằng cách cho maleimit phản ứng với gốc chứa thiol, chẳng hạn ví dụ, cầu nối bao gồm nhóm chức thiol ở đầu tận cùng.

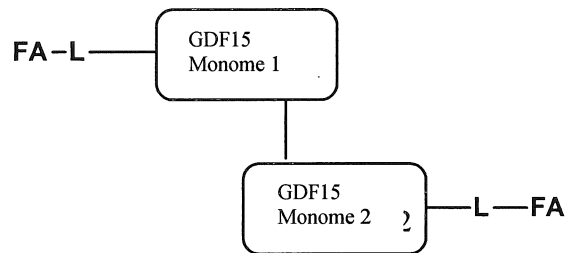
Các chất phản ứng dễ dàng sẵn có và/hoặc sẵn có ngoài thị trường được gắn trực tiếp hoặc qua cầu nối đã mô tả trên đây với peptit hoặc polypeptit quan tâm. Các nhóm phản ứng alkyn, maleimit hoặc tetrazin được phản ứng với nhóm chức (tương ứng là

azit, thiol và alken) có trên gốc axit béo hoặc trên cấu trúc cầu nối-axit béo (chẳng hạn ví dụ, cấu trúc PEG-axit béo).

Theo phương án 7, sáng chế đề cập đến thể liên hợp theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên trong đó cầu nối này bao gồm hoặc còn bao gồm một hoặc nhiều axit amin độc lập được chọn từ histidin, methionin, alanin, glutamin, asparagin và glyxin. Theo một khía cạnh cụ thể của phương án này, cầu nối này bao gồm 1 đến 6 axit amin được chọn từ histidin, alanin và methionin.

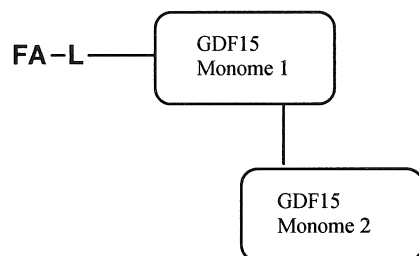
Theo phương án 8, sáng chế đề cập đến thể liên hợp theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên trong đó phân tử sinh học là peptit hoặc polypeptit. Theo một khía cạnh cụ thể của phương án 8, sáng chế đề cập đến thể liên hợp theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên trong đó peptit hoặc polypeptit này là 1) yếu tố biệt hóa tăng trưởng của người 15 (GDF15), chất tương tự, biến thể, thể đột biến, mảnh và các dạng biến thể khác của chúng; 2) peptit chủ vận APJ, 3) peptit chủ vận thụ thể oxytoxin, 4) serelaxin, 5) NPFF, 6) peptit PIP, 7) peptit FGF23 8) peptit AgRP hoặc 9) siARN.

Theo phương án 8A, sáng chế đề cập đến thể liên hợp theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên trong đó phân tử sinh học là yếu tố biệt hóa tăng trưởng của người 15 (GDF15), chất tương tự, biến thể, đột biến, mảnh và các dạng biến thể khác của chúng; hoặc đime của chúng. Theo một khía cạnh của phương án này, phân tử sinh học là thể đột biến hoặc biến thể của yếu tố biệt hóa tăng trưởng của người 15 (GDF15). Theo phương án ưu tiên, phân tử sinh học là đime của GDF15 hoặc biến thể hoặc đột biến của chúng. Do bản chất đồng đime của polypeptit GDF15 hoặc đột biến hoặc biến thể của chúng, mỗi nhóm trong số hai chuỗi polypeptit (tức là mỗi đơn vị monome) tạo ra đồng đime này, có thể được nối với phân tử axit béo có công thức A1, A2 hoặc A3 qua cầu nối. Do đó đồng đime GDF15 có thể được nối với một hoặc hai axit béo qua cầu nối. Cấu trúc của GDF15 được nối với gốc axit béo qua cầu nối có thể được thể hiện lại như sau:



cấu trúc A

; trong đó FA là gốc axit béo và cầu nối L, và monome GDF15 đơn vị 1 và đơn vị 2 cả hai được nối với gốc axit béo qua cầu nối; hoặc



Cấu trúc B

; trong đó FA là gốc axit béo và cầu nối L và chỉ một trong số các đơn vị monome này được nối với gốc axit béo qua cầu nối và trong đó đường kẻ giữa 2 đơn vị monome là liên kết disulfua. Ngoài ra, sáng chế cũng đề cập đến hỗn hợp bao gồm thể liên hợp có cấu trúc A và thể liên hợp có cấu trúc B.

Theo phương án 8B, sáng chế dự tính thể liên hợp theo phương án 8A trong đó đột biến GDF15 của người thu được bằng sự thay thế một hoặc nhiều gốc axit amin của polypeptit trưởng thành bằng gốc khác. Theo một khía cạnh cụ thể của phương án này, hai gốc axit amin cuối cùng ở đầu N của GDF15 của người (tức là Arginin 198 và Alanin 197) được thay thế bằng trình tự axit amin XH trong đó H là histidin và X là axit amin được chọn từ methionin, alanin, glutamin, asparagin và glyxin. Theo khía cạnh ưu tiên của phương án này, thể đột biến của hGDF15 là MH(199-308)hGDF15 hoặc AH(199-308)hGDF15 (SEQ ID NO:7).

Theo phương án 8C, ba gốc axit amin cuối cùng ở đầu N- của GDF15 của người (tức là Asparagin 199, Arginin 198 và Alanin 197) được thay thế bằng trình tự axit amin XHX'- trong đó H là histidin và X' và X là các axit amin độc lập được chọn từ methionin, alanin, glutamin, asparagin và glyxin. Theo khía cạnh khác của phương án

này, ba gốc axit amin cuối cùng ở đầu N của GDF15 của người (tức là Asparagin 199, Arginin 198 và Alanin 197) được thay thế bằng trình tự axit amin AHX' trong đó H là histidin và X' là axit amin độc lập được chọn từ methionin, alanin, glutamin, asparagin và glyxin. Theo khía cạnh ưu tiên của phương án này, protein GDF15 được cải biến là MHA(200-308)hGDF15 hoặc AHA(200-308)hGDF15.

So với protein GDF15 nguyên bản, thể đột biến của GDF15 cho phép đánh dấu chọn lọc protein ở đầu N (tức là sự liên hợp axit béo ở đầu N được ưu tiên của GDF15). Sự đánh dấu chọn lọc peptit và protein được mô tả chi tiết hơn trong các đơn cùng được nộp ở Mỹ số 62/015,858 (Mã đại diện PAT056275-US-PSP) và 62/082,337 (Mã đại diện PAT056275-US-PSP02).

Theo phương án 8D, sáng chế đề cập đến thể liên hợp theo phương án bất kỳ trong số các phương án 1 đến 8, trong đó phân tử sinh học là peptit chủ vận APJ. Theo khía cạnh cụ thể của phương án này, peptit chủ vận APJ là peptit được mô tả trong các Công bố đơn quốc tế số WO 2013/111110, WO 2014/081702, WO 2015/013168, WO 2015/013165, WO 2015/013167 và WO 2015/013169.

Theo phương án 8E, sáng chế đề cập đến thể liên hợp theo phương án bất kỳ trong số các phương án 1 đến 8, trong đó phân tử sinh học là peptit chủ vận thụ thể oxytocin. Theo khía cạnh cụ thể của phương án này, peptit chủ vận thụ thể oxytocin là peptit được mô tả trong các đơn yêu cầu cấp patent số WO 2009/122285 (Ferring B.V.) và WO 2014/095773 (Hoffman-La Roche).

Theo phương án 8F, sáng chế đề cập đến thể liên hợp theo phương án bất kỳ trong số các phương án 1 đến 8, trong đó phân tử sinh học là peptit AgRP. Theo khía cạnh cụ thể của phương án này, peptit AgRP là agRP(83-132) trong đó đầu C- ở dạng $-CO_2H$ tự do hoặc amit của chúng (ví dụ $-C(O)NH_2$).

Theo phương án 8G, sáng chế đề cập đến thể liên hợp theo phương án bất kỳ trong số các phương án 1 đến 8, trong đó phân tử sinh học là peptit FGF23. Theo khía cạnh cụ thể của phương án này, peptit FGF23 là biến thể FGF23 của SEQ ID NO: 8 có đột biến ở R179 và tùy ý một hoặc nhiều đột biến bổ sung ở Y154, Q156, R176, R179,

C206 và C244. Theo khía cạnh cụ thể khác của phương án này, peptit FGF23 là biến thể FGF23 của SEQ ID NO: 8 có các đột biến ở R179, Q156, C206 và C244.

Theo phương án 8H, sáng chế đề cập đến thể liên hợp theo phương án bất kỳ trong số các phương án 1 đến 8, trong đó phân tử sinh học là Serelaxin.

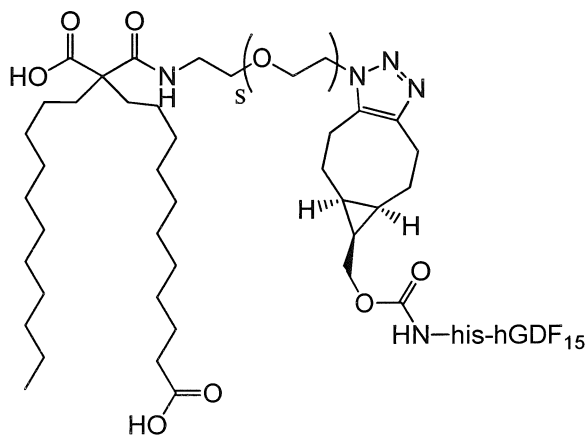
Theo phương án 8I, sáng chế đề cập đến thể liên hợp theo phương án bất kỳ trong số các phương án 1 đến 8, trong đó phân tử sinh học là peptit NPFF.

Theo phương án 8J, sáng chế đề cập đến thể liên hợp theo phương án bất kỳ trong số các phương án 1 đến 8, trong đó phân tử sinh học là peptit PIP. Theo khía cạnh cụ thể của phương án này, peptit PIP là protein được gắn thẻ his MHHHHHHH-PIP (SEQ ID NO: 15) trong đó PIP là của SEQ ID NO: 12.

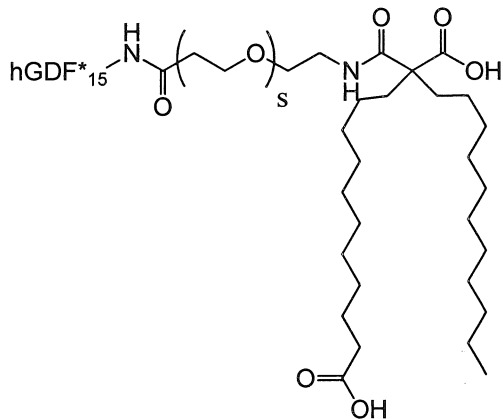
Theo phương án 8K, sáng chế đề cập đến thể liên hợp theo phương án bất kỳ trong số các phương án 1 đến 8, trong đó phân tử sinh học là siARN.

Theo phương án 8L, sáng chế đề cập đến thể liên hợp theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên, còn bao gồm gốc axit béo thứ hai được nối với phân tử sinh học qua cầu nối. Tốt hơn là hai gốc axit béo-cầu nối có cùng cấu trúc.

Theo phương án 9, sáng chế đề cập đến thể liên hợp theo phương án 1, 2, 8, 8A, 8B hoặc 8C có cấu trúc sau đây:



hoặc



trong đó hGDF15* là hGDF15 trong đó 2 hoặc 3 axit amin ở đầu N- được thay thế bằng trình tự axit amin XH- hoặc XHX'- một cách tương ứng,

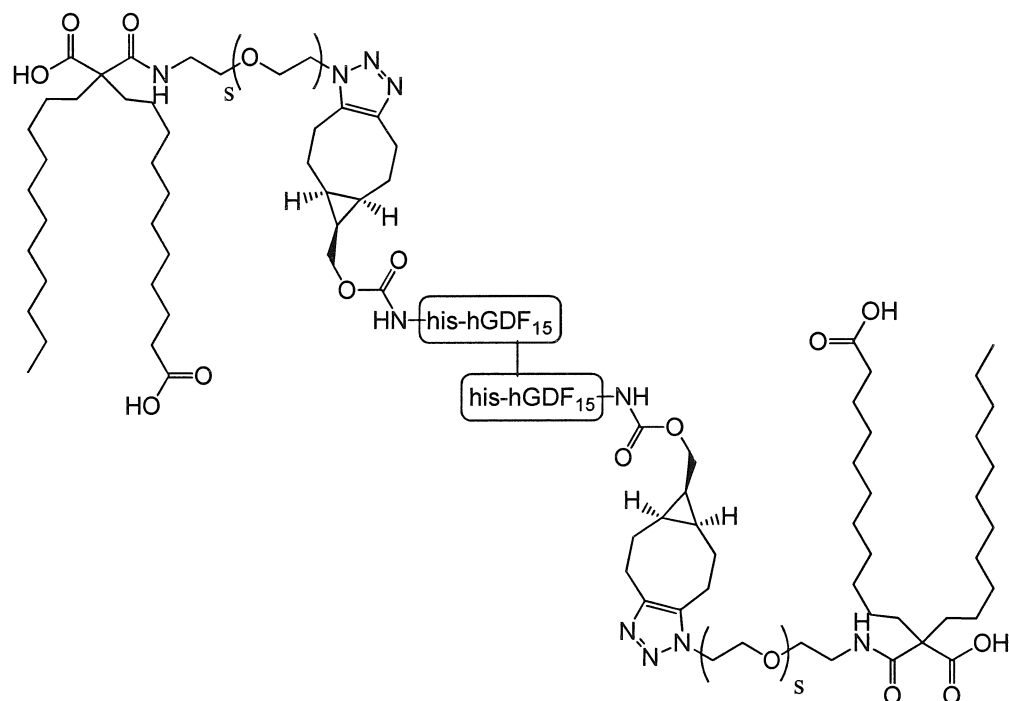
trong đó H là histidin và X và X' độc lập được chọn từ M và A; hoặc dime của chúng; và

trong đó his-hGDF15 là hGDF15 trong đó nhãn đánh dấu, bao gồm 1 đến 6 axit amin histidin và tùy ý gồm 1 hoặc 2 axit amin methionin, được thêm vào đầu N- của hGDF15; hoặc dime của chúng; và

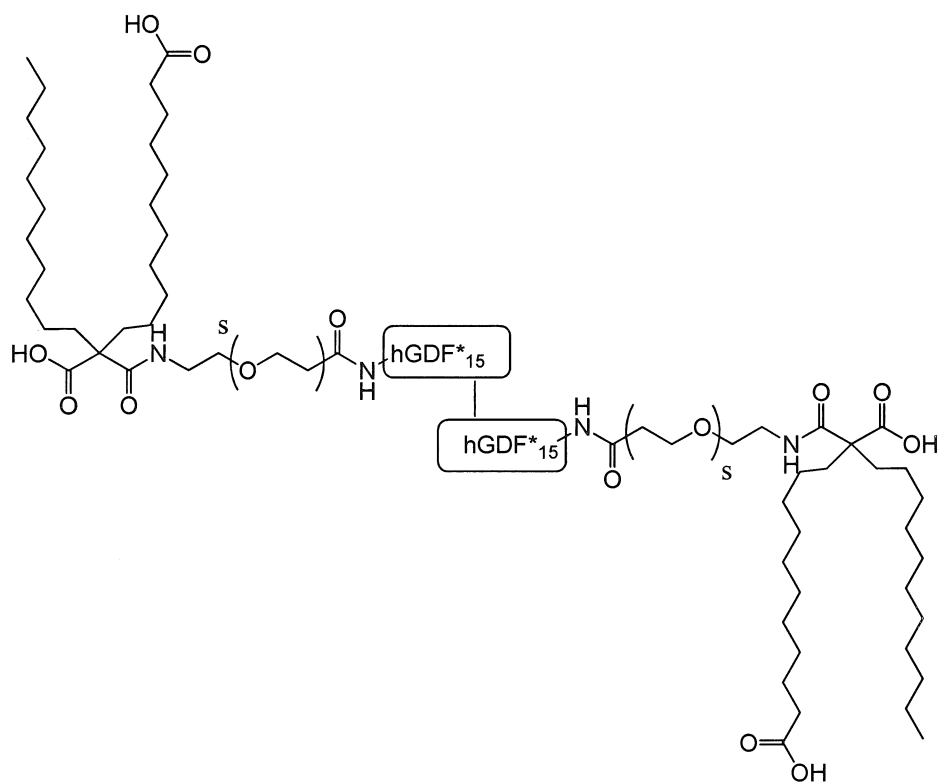
s là số nguyên nằm trong khoảng 20-30

Theo một khía cạnh của phương án này đầu gồm các axit amin histidin và 1 hoặc 2 axit amin methionin không liền kề. Theo khía cạnh khác của phương án này, sự sắp xếp axit amin histidin và methionin là sao cho axit amin ở vị trí liền kề với axit amin đầu N là histidin. Theo khía cạnh khác của phương án này đầu được chọn từ MHHHHHHM- (SEQ ID NO: 16) và MHHHHHHH- (SEQ ID NO: 17).

Theo khía cạnh cụ thể của phương án 9, do bản chất đồng dime của hGDF15* và his-hGDF15, một hoặc hai chuỗi polypeptit (đơn vị monome) tạo ra đồng dime có thể được nối phân tử axit béo này qua cầu nối. Kết quả là, đồng dime có thể được nối với một hoặc có thể được nối với hai phân tử axit béo qua cầu nối ở đầu N. Phương án này được thể hiện bằng phân tử sinh học GDF15 được nối với axit béo qua cầu nối có các công thức sau đây:

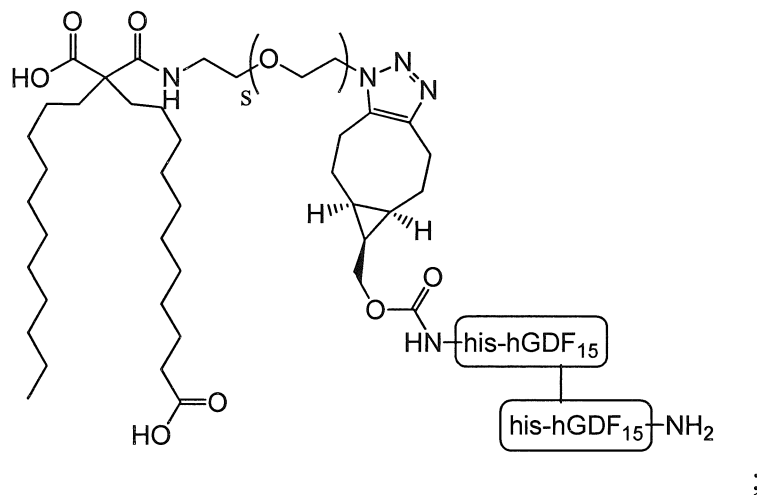


CÔNG THỨC C; hoặc

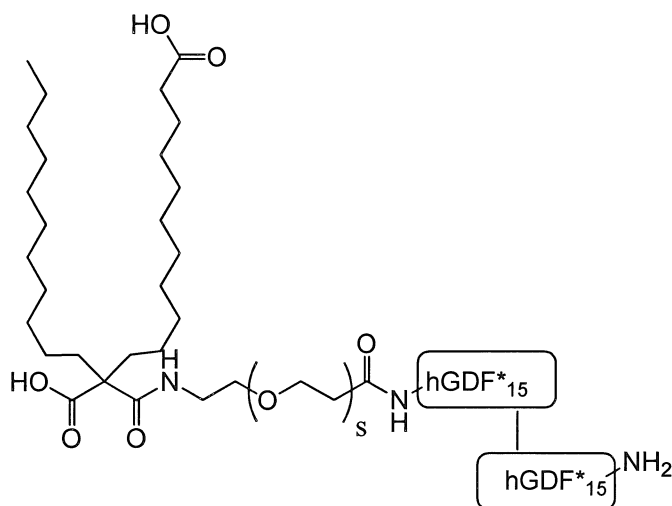


CÔNG THỨC D;

trong đó cả hai đơn vị monome của his-hGDF₁₅ hoặc của hGDF₁₅* (như được định nghĩa ở trên) được nối với gốc axit béo qua cầu nối ở cả hai đầu N-; hoặc



CÔNG THỨC E; hoặc



CÔNG THỨC F;

trong đó chỉ một đơn vị monome của his-hGDF15 hoặc của hGDF15* (như được định nghĩa ở trên) được nối với gốc axit béo qua cầu nối ở đầu N. Ngoài ra, sáng chế cũng dự tính các hỗn hợp của các thể liên hợp theo sáng chế; ví dụ, hỗn hợp bao gồm thể liên hợp có công thức C và thể liên hợp có công thức E, hoặc hỗn hợp bao gồm thể liên hợp có công thức D và thể liên hợp có công thức F.

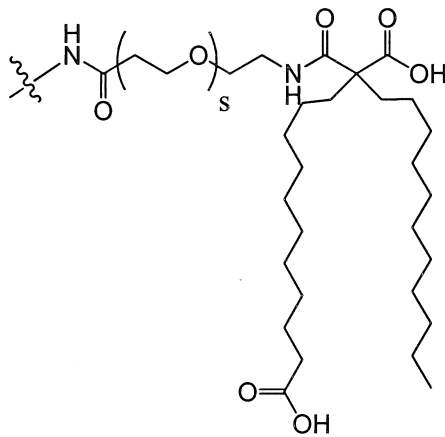
Theo phương án 10, sáng chế đề cập đến chế phẩm chứa hỗn hợp của thể liên hợp có công thức C và thể liên hợp có công thức E. Theo phương án 10A, sáng chế đề cập đến chế phẩm chứa hỗn hợp của thể liên hợp có công thức D và thể liên hợp có công thức F.

Do đó, Theo phương án 10B, sáng chế đề cập đến thể liên hợp theo điểm 1, 2, 9 hoặc 10, bao gồm:

1. biến thể của đồng đime hGDF15 trong đó 2 hoặc 3 axit amin ở đầu N này được thay thế tương ứng bằng trình tự axit amin XH- hoặc XHX'-, trong đó H là histidin và X và X' độc lập được chọn từ M và A; hoặc

đồng đime hGDF15 trong đó đầu, bao gồm 1 đến 6 axit amin histidin và tùy ý 1 hoặc 2 axit amin methionin, được thêm ở đầu N của hGDF15; và

2. một hoặc hai axit béo có công thức:



trong đó axit béo được nối với đầu N của chuỗi polypeptit chain qua cầu nối; hoặc hỗn hợp của thể liên hợp.

Theo phương án 10C, sáng chế đề cập đến thể liên hợp theo phương án 9, 10, 10A hoặc 10B, trong đó hGDF15* là hGDF15 trong đó 2 hoặc 3 axit amin ở đầu N được thay thế tương ứng bằng trình tự axit amin XH hoặc XHX', trong đó H là histidin và X và X' độc lập được chọn từ M và A; hoặc đime của chúng; và

trong đó his-hGDF15 là hGDF15 trong đó nhãn đánh dấu, bao gồm 4 đến 6 axit amin histidin và 1 hoặc 2 axit amin methionin, được thêm vào đầu N- của hGDF15; hoặc đime của chúng;

và s là số nguyên nằm trong khoảng 22 đến 28. Theo một khía cạnh của phương án này đầu bao gồm axit amin histidin và 1 hoặc 2 axit amin methionin không liên kề. Theo

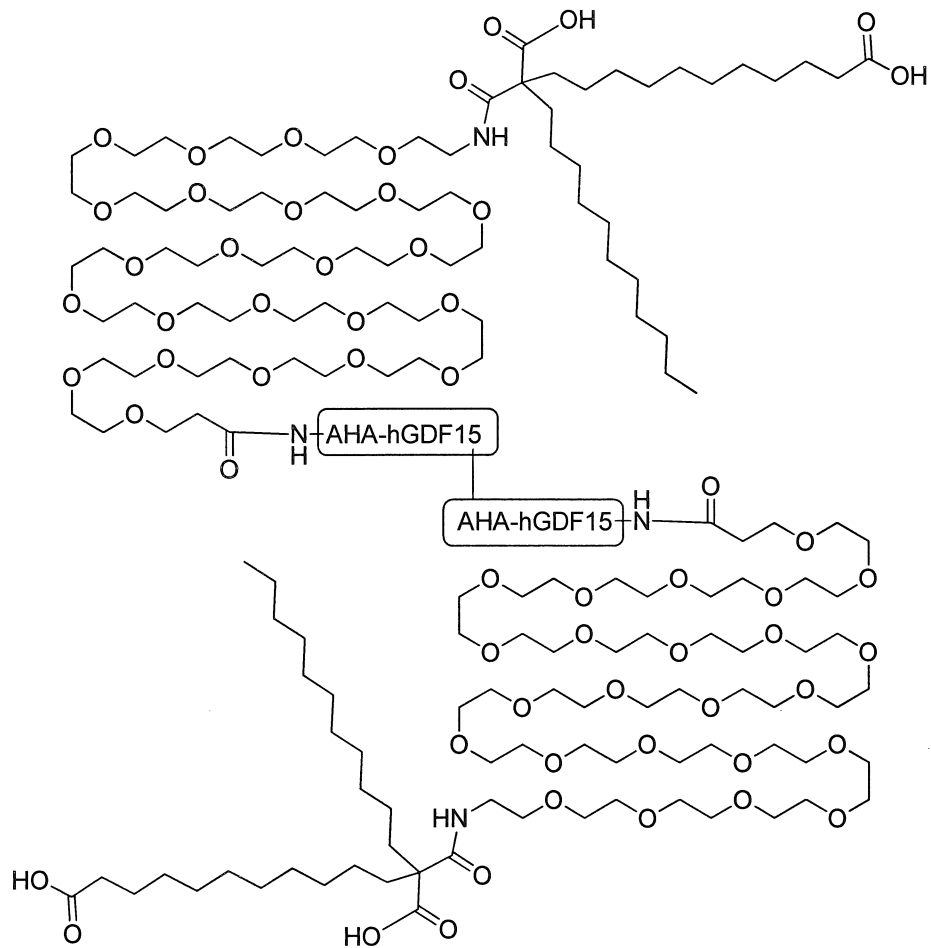
khía cạnh khác của phương án này, sự sắp xếp các axit amin histidin và methionin sao cho axit amin ở vị trí liền kề với axit amin đầu N là histidin. Theo khía cạnh khác của phương án này đều được chọn từ MHHHHHHM- (SEQ ID NO: 16) và MHHHHHHH- (SEQ ID NO: 17).

Theo phương án 11, sáng chế đề cập đến thể liên hợp theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên, trong đó phân tử sinh học được chọn từ M-(His)6-hGDF15 (SEQ ID No 1), M-(his)6-M-hGDF15 (SEQ ID NO: 2), MH(199-308)hGDF15 (SEQ ID NO: 4), MHA(200-308)hGDF15 (SEQ ID NO: 6), AHA(200-308)hGDF15 (SEQ ID NO: 7) và AH(199-308)GDF15 (SEQ ID NO: 5); hoặc dime của chúng.

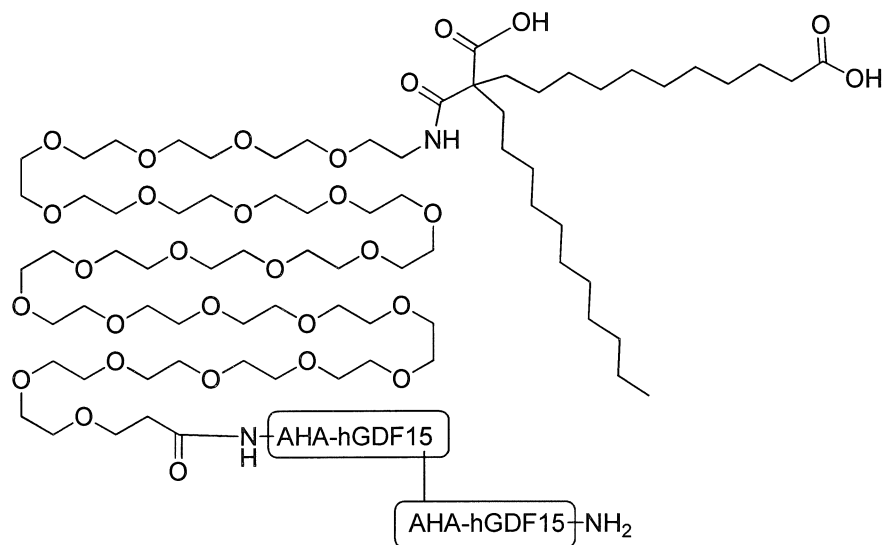
Theo phương án 11A, sáng chế đề cập đến thể liên hợp theo phương án 11, trong đó phân tử sinh học được chọn từ MH(199-308)hGDF15 (SEQ ID NO: 4), MHA(200-308)hGDF15 (SEQ ID NO: 6), AHA(200-308)hGDF15 (SEQ ID NO: 7) và AH(199-308)GDF15 (SEQ ID NO: 5); hoặc dime của chúng.

Theo phương án 11B, sáng chế đề cập đến thể liên hợp theo phương án 11 trong đó, phân tử sinh học được chọn từ AHA(200-308)hGDF15 (SEQ ID NO: 7); hoặc dime của chúng.

Theo phương án 12, sáng chế đề cập đến thể liên hợp theo phương án 11B trong đó phân tử sinh học được nối với axit béo qua cầu nối có công thức G hoặc có công thức H:



Công thức G;



CÔNG THỨC H,

trong đó AHA-hGDF15 là SEQ ID NO: 7 và axit béo được nối ở đầu N của một hoặc của 2 đơn vị monome. Ngoài ra, sáng chế dự tính hỗn hợp bao gồm thể liên hợp có công thức G và thể liên hợp có công thức H.

Theo phương án 13, sáng chế đề cập đến chế phẩm chứa hỗn hợp của thể liên hợp theo phương án 12 có công thức G và thể liên hợp theo phương án 12 có công thức H. Theo khía cạnh cụ thể của phương án này, hỗn hợp này có tỷ lệ mol của các thể liên hợp có công thức G và thể liên hợp có công thức H là 1:1.

AHA-(200-308)-hGDF15 (SEQ ID NO: 7) được thiết kế để loại bỏ vị trí cắt được quan sát thấy bên trong protein nguyên bản cũng như loại bỏ vị trí formyl hóa methionin (M1) tiềm năng và vị trí khử amin hóa ở N-199. Chất lượng cao và độ đồng nhất cao của AHA này được xác nhận bằng việc kiểm tra chất lượng nguyên liệu cho thấy không có hiện tượng cắt, khử amin, hoặc oxi hóa methionin mà được quan sát với trình tự của hGDF15 nguyên bản.

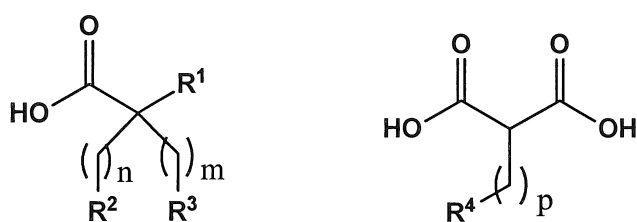
	MHHHHHHH-ARN-(200-308)-hGDF15 (SEQ ID NO:17)	AHA-(200-308)-hGDF15 (SEQ ID NO:7)
hiện tượng cắt	R9/N10 (< 1%) N10/G11 (< 1%)	không phát hiện thấy
oxi hóa methionin	M1: oxi hóa 12,0%	N/A
khử amin N-199	N10: khử amin 50,1%	N/A

Theo phương án 14, sáng chế đề cập đến thể liên hợp theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên, trong đó gốc axit béo được gắn kèm đầu N của peptit hoặc protein qua cầu nối. Theo phương án 15, sáng chế đề cập đến thể liên hợp theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên, trong đó thể liên hợp có tính ổn định chu kỳ bán rã trong huyết tương nhiều hơn 5 giờ. Theo một khía cạnh của phương án này, thể liên hợp có tính ổn định chu kỳ bán rã trong huyết tương nhiều hơn 10 giờ. Theo khía cạnh khác của phương án này, thể liên hợp có tính ổn định chu kỳ bán rã trong huyết tương nhiều hơn 20 giờ hoặc nhiều hơn 30 giờ. Vẫn theo khía cạnh khác của phương án này, thể liên hợp có tính ổn định chu kỳ bán rã trong huyết tương nhiều hơn 40 giờ hoặc nhiều hơn 50 giờ.

Theo phương án 16, sáng chế đề cập đến thể liên hợp theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên trong đó sự cải thiện tính ổn định chu kỳ bán rã trong huyết tương so với phân tử sinh học không được liên hợp gấp 2 lần, 5 lần, 10 lần, 20 lần, 30 lần, 40 lần, 50 lần hoặc 75 lần.

Theo phương án khác, phân tử sinh học, cầu nối và gốc axit béo (R^1 đến R^4 , n, m p và Ak) là các thành phần đã được xác định trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế sau đây.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến hợp chất có công thức:



hoặc

A1

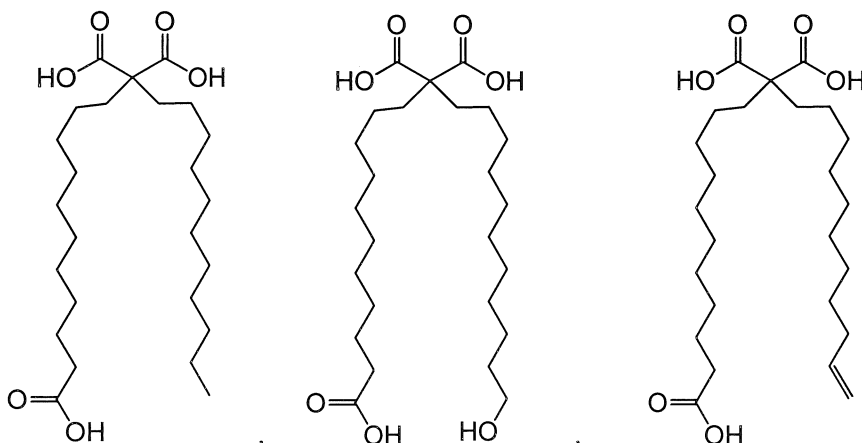
A2

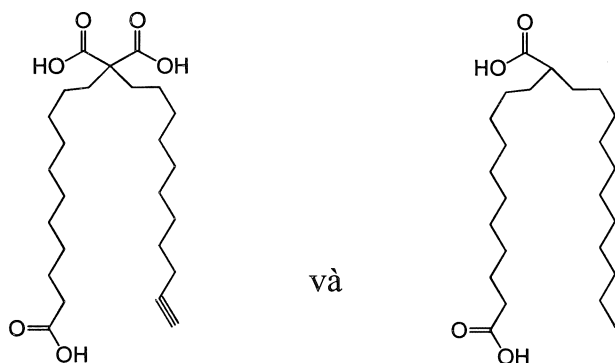
R^1 là CO_2H hoặc H;

R^2 và R^3 độc lập nhau là H, OH, CO_2H , $-CH=CH_2$ hoặc $-C\equiv CH$; với điều kiện là R^2 và R^3 là không giống nhau;

R^4 là CO_2H ;

n và m độc lập nhau là số nguyên giữa 6 và 30; hoặc amit, este hoặc muối được dùng của chúng. Theo khía cạnh khác của phương án này, sáng chế đề cập đến hợp chất có công thức A1 trong đó ít nhất một trong số R^2 và R^3 là CO_2H . Vẫn theo khía cạnh khác của phương án này, sáng chế đề cập đến hợp chất được chọn từ nhóm bao gồm:





Tổng hợp Peptit/polypeptit và/hoặc dạng cải biến của chúng

Peptit hoặc polypeptit theo sáng chế có thể được tạo ra bằng quy trình hóa học tổng hợp hoặc bằng phương pháp tái tổ hợp hoặc tổ hợp cả hai phương pháp này. Các cấu trúc peptit hoặc polypeptit/protein có thể được điều chế dưới dạng có chiều dài đầy đủ hoặc có thể được tổng hợp dưới dạng các mảnh không có chiều dài đầy đủ và được ghép lại với nhau. Peptit và polypeptit theo sáng chế có thể được tạo ra bằng các quy trình tổng hợp peptit đã biết rõ. Các phương pháp tổng hợp peptit có thể tổng hợp pha rắn hoặc tổng hợp pha lỏng. Do đó, peptit và polypeptit quan tâm có thể được tạo ra bằng quy trình ngưng tụ peptit hoặc axit amin một phân có khả năng tạo ra protein bằng phần còn lại của chúng và, khi sản phẩm này có nhóm bảo vệ, nhóm bảo vệ được loại bỏ sau khi peptit mong muốn có thể được tạo ra. Các phương pháp ngưng tụ và khử bảo vệ đã biết bao gồm các quy trình được mô tả trong tài liệu kỹ thuật sau đây (1) - (5).

- (1) M. Bodanszky và M. A. Ondetti, peptit Synthesis, Interscience Publishers, New York, 1966,
- (2) Schroeder và Luebke, The Peptit, Academic Press, New York, 1965,
- (3) Nobuo Izumiya et al.. Fundamentals và Experiments in peptit Synthesis, Maruzen, 1975,
- (4) Haruaki Yajima và Shumpei Sakakibara, Biochemical Experiment Series 1, Protein Chemistry IV, 205, 1977, và
- (5) Haruaki Yajima (ed.), Development of Drugs-Continued, 14, peptit Synthesis, Hirokawa Shoten.

Sau phản ứng, peptit hoặc polypeptit có thể được tinh sạch và phân lập bằng cách tổ

hợp các kỹ thuật tinh sạch thông thường chẳng hạn chiết dung môi, sắc ký cột, sắc ký lỏng, sắc ký loại trừ kích thước và sắc ký trao đổi ion và tái kết tinh. Trong đó peptit này được phân lập như trên là hợp chất tự do, nó có thể được chuyển hóa thành muối thích hợp bằng phương pháp đã biết. Ngược lại, trong trường hợp sản phẩm được phân lập là muối, nó có thể được chuyển hóa thành peptit tự do bằng phương pháp đã biết.

Amit của polypeptit có thể thu được bằng cách sử dụng nhựa cho việc tổng hợp peptit thích hợp cho sự amit hóa. Nhựa bao gồm nhựa clorometyl, nhựa hydroxymetyl, nhựa benzhydrylamin, nhựa aminometyl, nhựa rượu 4-benzyloxybenzyl, nhựa 4-methylbenz-hydrylamin, nhựa PAM, nhựa 4-hydroxymetylmethylphenylaxetamidometyl, nhựa polyacrylamit, nhựa 4-(2',4'-dimetoxypheyl-hydroxymetyl)phenoxy, nhựa 4-(2',4'-dimetoxypheyl-Fmoc-aminometyl)phenoxy, nhựa 2-clotrityl clorua, và các loại nhựa khác. Sử dụng nhựa này, các axit amin có các nhóm α -amino và các nhóm chức của chuỗi bên thích hợp để được bảo vệ được tập trung trên nhựa theo trình tự của peptit mục tiêu bằng nhiều kỹ thuật ngưng tụ khác nhau đã được biết rõ. Ở cuối chuỗi phản ứng, peptit hoặc peptit được bảo vệ được loại bỏ khỏi nhựa và các nhóm bảo vệ được loại bỏ và nếu cần thiết, các cầu disulfua được tạo ra thể thu được polypeptit mục tiêu.

Để ngưng tụ các axit amin được bảo vệ nêu trên, nhiều chất hoạt hóa khác nhau để tổng hợp peptit có thể được sử dụng chẳng hạn HATU, HCTU hoặc ví dụ, carbodiimit. Carbodiimit bao gồm DCC, N,N' -diisopropylcarbodiimit, và N-etyl-N'-(3-dimetylaminopropyl)carbodiimit. Để hoạt hóa bằng chất hoạt hóa này, chất phụ gia chất ức chế raxxemic hóa, ví dụ, HOBt hoặc Oxyma Pure có thể được sử dụng. Axit amin được bảo vệ có thể được thêm trực tiếp vào nhựa cùng với các chất hoạt hóa và các chất ức chế raxemic hóa hoặc được hoạt hóa trước như anhydrit axit đối xứng, este HOBt, hoặc este HOObt sau đó thêm vào nhựa. Dung môi cho quá trình hoạt hóa các axit amin được bảo vệ hoặc ngưng tụ với nhựa có thể được chọn thích đáng trong số các dung môi đã biết là cho các phản ứng ngưng tụ peptit. Ví dụ, N,N-dimetylformamit, N-metylpyrrolidon, clorofom, trifloetanol, dimetyl sulfoxit, DMF, pyridin, dioxan, metylen clorua, tetrahydrofuran, axetonitril, etyl axetat, hoặc các hỗn hợp thích hợp của chúng có thể được đề cập. Nhiệt độ phản ứng có thể được chọn trong khoảng hiện được biết đến là hữu ích đối với sự tạo liên kết peptit và thường được chọn trong phạm vi khoảng -20°C - 50°C . Chất dẫn xuất axit amin được hoạt hóa nói chung được sử dụng ở tỷ lệ độ dư 1,5-4 lần. Nếu việc ngưng tụ được phát hiện là không đủ bằng phép kiểm tra sử dụng

phản ứng ninhydrin, phản ứng ngưng tụ có thể được lặp lại để đạt được quá trình ngưng tụ đủ mà không loại bỏ nhóm bảo vệ này. Nếu sự lặp lại ngưng tụ vẫn không đủ để cung cấp độ ngưng tụ cần thiết, nhóm amino không được tái hoạt hóa có thể được axetyl hóa bằng anhydrit axetic hoặc axetylimidazol.

Nhóm bảo vệ của nhóm amino cho nguyên liệu ban đầu axit amin bao gồm Z, Boc, amyloxycarbonyl bậc ba, isobornyloxycarbonyl, 4-metoxybenzyloxycarbonyl, CI-Z, Br-Z, adamantyloxycarbonyl, trifloaxetyl, phtalyl, formyl, 2-nitrophenylsulfenyl, diphenylphosphinothiyl, hoặc Fmoc. Nhóm bảo vệ carboxy có thể được sử dụng bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở C₁₋₆ alkyl, C₃₋₈ xycloalkyl và C₆₋₁₀aryl-C₁₋₂alkyl cũng như 2-adamantyl, 4-nitrobenzyl, 4-metoxybenzyl, 4-clorobenzyl, phenaxyl, benzyloxycarbonylhydrazido, butoxycarbonylhydrazido bậc ba, và tritylhydrazido đã nêu trên.

Nhóm hydroxy của serin và threonin có thể được bảo vệ bằng cách este hóa hoặc ete hóa. Nhóm này thích hợp cho quá trình este hóa đã nêu bao gồm các nhóm dẫn xuất từ cacbon chẳng hạn các nhóm alkanoyl thấp, ví dụ, axetyl, .v.v., các nhóm aroyl, ví dụ, benzoyl .v.v., benzyloxycarbonyl, và etoxycarbonyl. Nhóm này thích hợp cho quá trình ete hóa đã nêu bao gồm benzyl, tetrahydropyranyl, và butyl bậc ba. Nhóm bảo vệ cho nhóm phenolic hydroxyl của tyrosin bao gồm Bzl, Cl₂-Bzl, 2-nitrobenzyl, Br-Z, và butyl bậc ba.

Nhóm bảo vệ imidazol của histidin bao gồm Tos, 4-metoxy-2,3,6-triethylbensensulfonyl, DNP, benzyloxymetyl, Bum, Boc, Trt, và Fmoc.

Nhóm carboxyl được hoạt hóa của axit amin ban đầu bao gồm acid anhydrit tương ứng, azit tương ứng và các este hoạt hóa, ví dụ, các este với rượu chẳng hạn pentaclorophenol, 2,4,5-triclorophenol, 2,4-dinitrophenol, rượu xyanometyl, p-nitrophenol, HONB, N-hydroxysucxinimit, N-hydroxyPhtalimit, HOBt, .v.v. Nhóm amino được hoạt hóa của axit amin ban đầu bao gồm phosphoramit tương ứng.

Phương pháp loại trừ nhóm bảo vệ bao gồm phản ứng khử có xúc tác sử dụng khí hydro khi có mặt chất xúc tác chẳng hạn paladi đen hoặc paladi-trên-cacbon, axit được xử lý bằng hydro florua khan, axit metansulfonic, axit triflometanesulfonic, axit trifloaxetic, hoặc hỗn hợp của các axit này, bazơ được xử lý

bằng diisopropyletylamin, trietylamin, piperidin, piperazin, khử bằng kim loại natri trong amoniac lỏng. Phương pháp loại trừ phản ứng bằng cách sử dụng axit acid điều trị nêu trên nói chung được thực hiện ở nhiệt độ -20°C - 40°C và có thể được tiến hành thuận lợi bằng cách bổ sung chất nhận cation chẳng hạn anisol, phenol, thioanisol, m-cresol, p-cresol, dimetyl sulfua, 1,4-butandithiol, 1,2-etandithiol. Nhóm 2,4-dinitrophenyl được sử dụng để bảo vệ nhóm imidazol của histidin có thể được loại bỏ bằng cách xử lý với thiophenol, trong khi nhóm formyl được sử dụng để bảo vệ nhóm indol của tryptophan có thể được loại bỏ bằng cách xử lý kiềm với dung dịch natri hydroxit hoặc amoniac chứa nước pha loãng cũng như xử lý axit nêu trên khi có mặt 1,2-etandithiol, 1,4-butandithiol.

Phương pháp này để bảo vệ các nhóm chức không nên tham gia vào phản ứng của nguyên liệu ban đầu, các nhóm bảo vệ có thể được sử dụng, phương pháp loại bỏ các nhóm bảo vệ, và phương pháp hoạt hóa các nhóm chức để tham gia vào phản ứng tất cả có thể được chọn vô tư trong số các nhóm và các phương pháp đã biết.

Một phương pháp khác để thu được dạng amit của polypeptit bao gồm đầu tiên, amit hóa nhóm carboxyl của axit amin đầu C, sau đó kéo dài chuỗi peptit về phía đầu N cho đến khi đạt được độ dài mong muốn, và sau đó loại bỏ bảo vệ cách chọn lọc của nhóm α -amino nhóm của đầu C peptit và nhóm α -carboxy của axit amin hoặc peptit này mà để tạo ra phần còn lại của polypeptit mục tiêu và ngưng tụ hai mảnh có nhóm α -amino và các nhóm chức chuỗi bên đã được bảo vệ bằng các nhóm bảo vệ thích hợp đã nêu trong dung môi được trộn chẳng hạn dung môi đã nêu trước đó. Các tham số của phản ứng ngưng tụ này có thể là giống như được mô tả trước đó. Từ peptit được bảo vệ thu được bằng quá trình ngưng tụ, tất cả các nhóm bảo vệ được loại bỏ bằng phương pháp đã nêu do đó, cung cấp peptit thô mong muốn. Peptit thô này có thể được tinh sạch bằng các quy trình tinh sạch đã biết và phân đoạn chính được đông khô để cung cấp polypeptit được amit hóa. Để thu được este của polypeptit này, nhóm α -carboxyl của axit amin đầu C được cô đặc bằng rượu mong muốn để thu được este của axit amin và sau đó, quy trình nêu trên để sản xuất amit được tiếp nối.

Ngoài ra, các phương pháp biểu hiện tái tổ hợp đặc biệt hữu ích. Biểu hiện protein tái tổ hợp sử dụng tế bào chủ (tế bào được thiết kế nhân tạo để chứa các axit nucleic mã hóa trình tự của peptit và sẽ được phiên mã và dịch mã, và tùy ý, tiết peptit này vào môi

trường tăng trưởng tế bào) được sử dụng thông thường trong lĩnh vực này. Với quy trình sản xuất tái tổ hợp, axit nucleic mã hóa trình tự axit amin của peptit sẽ diễn hình là được tổng hợp bằng các phương pháp thông thường và được cài vào vector biểu hiện. Các phương pháp được ưu tiên cụ thể để sản xuất các chế phẩm polypeptit bao gồm các peptit được dung hợp với các trình trình peptit bổ sung hoặc các protein khác hoặc các mảnh hoặc các miền khác của protein. Tế bào chủ có thể tùy ý ít nhất là tế bào được chọn từ E.Coli, COS-1, COS-7, HEK293, BHT21, CHO, BSC-1, Hep G2, 653, SP2/0, 293, heLa, tế bào u tủy, tế bào u lympho, nấm men, tế bào côn trùng hoặc tế bào thực vật, hoặc tế bào được biến nạp hoặc được tạo dòng bất từ dẫn xuất bất kỳ của nó.

Sáng chế cũng bao hàm các polynucleotit mã hóa các biến thể nêu trên có thể ở dạng ARN hoặc ở dạng ADN, trong đó ADN bao gồm cADN, DNA hệ gen, và ADN tổng hợp. ADN có thể là mạch đơn hoặc mạch kép. Các trình tự mã hóa mà mã hóa các chế phẩm theo sáng chế có thể khác nhau do kết quả của tính dư thừa hoặc tính thoái hóa của mã di truyền.

Các polynucleotit mã hóa các chế phẩm theo sáng chế có thể bao gồm các polynucleotit sau: chỉ trình tự mã hóa cho biến thể, trình tự mã hóa cho biến thể và trình tự mã hóa bổ sung chẳng hạn polypeptit chức năng, hoặc trình tự dẫn đầu hoặc trình tự tiết hoặc trình tự protein trước khi có chức năng; trình tự mã hóa cho biến thể và trình tự không mã hóa, chẳng hạn các intron hoặc trình tự không mã hóa 5' và/hoặc 3' của trình tự mã hóa cho biến thể này. Do đó, thuật ngữ “polynucleotit mã hóa biến thể” bao hàm polynucleotit có thể bao gồm nhưng không chỉ trình tự mã hóa cho biến thể nhưng cũng gồm polynucleotit, mà bao gồm trình tự mã hóa bổ sung và/hoặc trình tự không mã hóa.

Sáng chế còn đề cập đến các biến thể của các polynucleotit được mô tả mã hóa cho các mảnh, các chất tương tự và các dẫn xuất của polypeptit chứa các phần tử thể được chỉ định. Biến thể của polynucleotit có thể là biến thể về alen xuất hiện trong tự nhiên của trình tự GDF15 của người, biến thể không xuất hiện trong tự nhiên, hoặc biến thể bị cắt ngắn như đã nêu trên. Do đó, sáng chế cũng bao gồm các polynucleotit mã hóa các biến thể đã được mô tả, cũng như các biến thể của các polynucleotit này, các biến thể mã hóa mảnh, chất dẫn xuất hoặc chất tương tự với biến thể theo sáng chế. Các biến thể nucleotit này bao gồm các biến thể xóa, các biến thể thay thế, các biến thể bị cắt ngắn, và các biến thể bổ sung hoặc các biến thể chèn miễn là ít nhất một trong số các

phần tử thể axit amin được chỉ ra của phương án thứ nhất hoặc phương án thứ hai có mặt.

Các polynucleotit theo sáng chế có thể được biểu hiện trong vật chủ sau khi các trình tự này đã được nối có khả năng vận hành với (tức là, được đặt vào vị trí đảm bảo có chức năng) trình tự điều khiển biểu hiện. Các vectơ biểu hiện này điển hình là có khả năng tái bản trong các sinh vật chủ ở dạng các episome hoặc ở dạng phần cài vào ADN nhiễm sắc thể của vật chủ. Phổ biến là, các vectơ biểu hiện sẽ chứa các dấu chuẩn chọn lọc, ví dụ, tetracyclin, neomycin, và dihydrofolat reductaza, để cho phép phát hiện các tế bào này được biến nạp các trình tự ADN mong muốn. Biến thể GDF15 có thể được biểu hiện trong các tế bào của thú, côn trùng, nấm men, vi khuẩn hoặc các tế bào khác dưới sự điều khiển của các promoter thích hợp. Các hệ thống dịch mã ngoài tế bào cũng có thể được sử dụng để tạo ra các protein này bằng cách sử dụng các ARN có nguồn gốc từ các cấu trúc ADN theo sáng chế.

Escherichia Coli (*E. coli*) là vật chủ thuộc sinh vật nhân sơ cụ thể là hữu ích để tách dòng các polynucleotit theo sáng chế. Các vật chủ là vi sinh vật khác thích hợp để sử dụng bao gồm *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium*, và nhiều loài khác của *Serratia*, *Pseudomonas*, *Streptococcus*, và *Staphylococcus*, mặc dù các vi sinh vật khác cũng có thể được sử dụng như một phương án lựa chọn. Trong các vật chủ thuộc sinh vật nhân sơ này, người ta cũng có thể khiến các vectơ biểu hiện, điển hình là chứa các trình tự điều khiển biểu hiện tương thích với tế bào vật chủ (ví dụ, tái bản). Ngoài ra, bất kỳ trong số nhiều promoter đã được biết rõ có thể có, chẳng hạn hệ thống promoter lactoza, hệ thống promoter tryptophan (Trp), hệ thống promoter beta-lactamaza, hoặc hệ thống promoter từ thể thực khuẩn lambda hoặc T7. Các promoter này điển hình là sẽ điều khiển biểu hiện, tùy ý bằng trình tự vận hành, và có các trình tự vị trí gắn kết ribosom và tương tự, để bắt đầu và hoàn thành quá trình phiên mã và dịch mã.

Người có hiểu biết trong lĩnh vực biểu hiện các protein sẽ nhận thức được rằng trình tự mã hóa cho methionin hoặc methionin-arginin có thể được đưa vào ở đầu N của trình tự trưởng thành để biểu hiện trong *E. coli* và được chủ định nằm trong ngữ cảnh của sáng chế. Do đó, trừ phi điều ngược lại được lưu ý, các chế phẩm theo sáng chế được biểu hiện trong *E. coli* có trình tự mã hóa methionin được đưa vào ở đầu N.

Các vi sinh vật khác, chẳng hạn nấm men hoặc nấm, cũng có thể được sử dụng cho quá trình biểu hiện. *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*,

Schizosaccharomyces pombe, và *Pichia angusta* là các ví dụ về các vật chủ là nấm men được ưu tiên, với các vectơ thích hợp có các trình tự điều khiển biểu hiện, chẳng hạn các promotơ, bao gồm 3-phosphoglycerat kinaza hoặc các enzym thuộc quá trình phân giải glucoza, và tâm tái bản, các trình tự kết thúc và tương tự khi được mong muốn. *Aspergillus niger*, *Trichoderma reesei*; và *Schizophyllum commune*, là các ví dụ về các vật chủ là nấm, mặc dù các nấm khác cũng có thể được sử dụng như một phương án lựa chọn.

Môi trường nuôi cấy tế bào mô của thú cũng có thể được sử dụng để biểu hiện và tạo ra polypeptit theo sáng chế. Nhiều dòng tế bào vật chủ thích hợp có khả năng tiết các biến thể nguyên vẹn đã được phát triển trong lĩnh vực này, và bao gồm dòng tế bào CHO, nhiều dòng tế bào COS khác nhau, các tế bào NSO, các dòng tế bào buồng trứng của chuột Hamster Syri, các tế bào HeLa, hoặc các dòng tế bào thận gốc phôi của người (tức là HEK293, HEK293EBNA).

Các vectơ biểu hiện cho các tế bào của thú có thể chứa các trình tự điều khiển biểu hiện, chẳng hạn tâm tái bản, promotơ, yếu tố tăng cường, và các vị trí xử lý thông tin cần thiết khác, chẳng hạn vị trí gắn kết ribosom, các vị trí cắt ARN, các vị trí gắn polyadenin, và các trình tự kết thúc phiên mã. Các trình tự điều khiển biểu hiện được ưu tiên là các promotơ có nguồn gốc từ SV40, adenovirut, papilloma virut ở bò, cytomegalovirut, Raus sarcoma virut, và tương tự. Các vị trí gắn polyadenin được ưu tiên bao gồm các trình tự có nguồn gốc từ SV40 và hormone tăng trưởng ở bò.

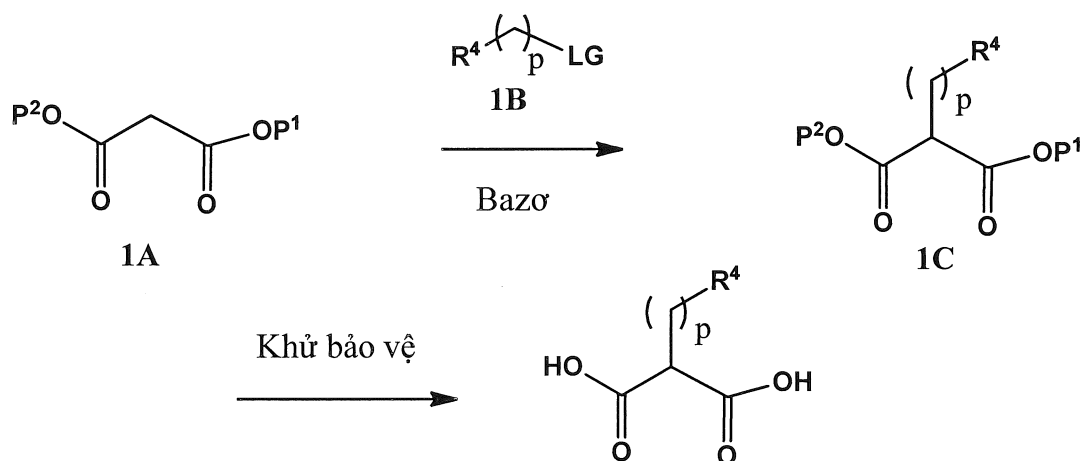
Các vectơ chứa các trình tự polynucleotit quan tâm (ví dụ, mã hóa các chế phẩm theo sáng chế và các trình tự điều khiển biểu hiện) có thể được chuyển vào trong tế bào chủ bằng các phương pháp đã được biết rõ, khác nhau phụ thuộc vào loại vật chủ là tế bào. Ví dụ, biến nạp canxi clorua thường được sử dụng đối với các tế bào động vật nhân sơ, trong khi xử lý canxi phosphat hoặc xung điện có thể được sử dụng cho các vật chủ là tế bào khác.

Nhiều phương pháp tinh sạch protein khác nhau có thể được sử dụng và các phương pháp này đã được biết đến trong lĩnh vực này và đã được mô tả, ví dụ, trong Deutscher, *Methods in Enzymology* 182: 83-9 (1990) và Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice*, Springer-Verlag, NY (1982). (Các) bước tinh sạch được chọn sẽ phụ thuộc vào, ví dụ, bản chất của quá trình sản xuất được sử dụng cho chế phẩm theo sáng chế.

Các polypeptit có thể được điều chế ở dạng được phân lập hoặc về cơ bản là tinh sạch (ví dụ, không chứa các polypeptit khác). Các polypeptit có thể có trong chế phẩm được làm giàu cho polypeptit này so với các thành phần khác có thể có (ví dụ, các polypeptit khác hoặc các thành phần tế bào vật chủ khác). Ví dụ, tinh sạch polypeptit có thể được đề xuất sao cho polypeptit này có trong chế phẩm về cơ bản là không chứa các protein được biểu hiện khác, ví dụ, ít hơn 90%, ít hơn 60%, ít hơn 50%, ít hơn 40%, ít hơn 30%, ít hơn 20%, ít hơn 10%, ít hơn 5%, hoặc ít hơn 1%, chế phẩm được tạo ra từ các protein được biểu hiện khác.

Tổng hợp gốc axit béo

Sơ đồ 1 mô tả quy trình tổng hợp gốc axit béo có công thức A2.



Sơ đồ 1

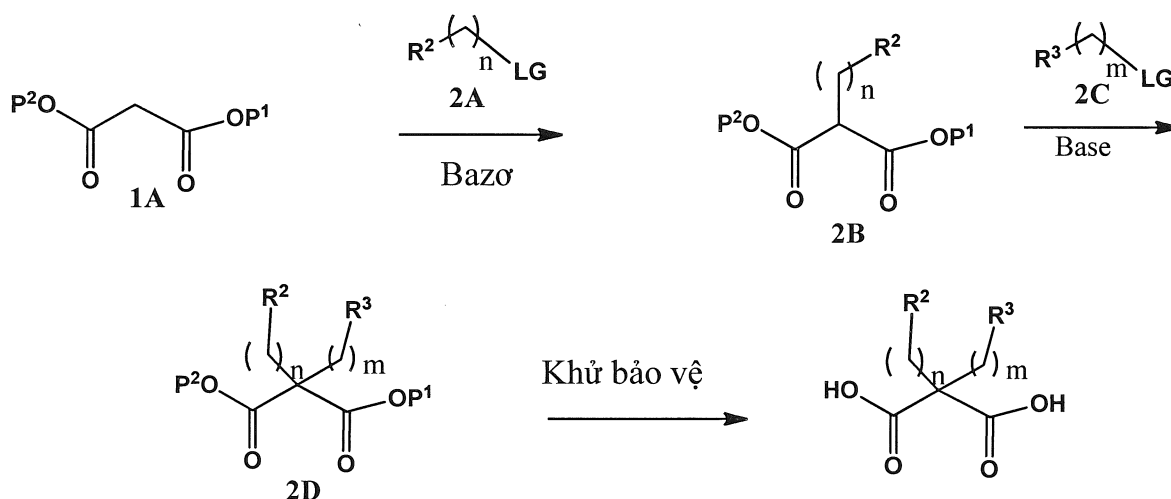
trong đó P^1 và P^2 là nhóm bảo vệ axit carboxylic chẳng hạn, ví dụ, metyl, etyl, tert-butyl, metoxybenzyl, benzyl, benzyloxy, metoxymetyl, metylthiometyl, tetrahydropyranyl, phenaxyl, N-phthalimit, xinamyl, triphenylmetyl, 9-anthrylmetyl, piperonyl, trimetylsilyl, t-butyldimetylsilyl hoặc 2-alkyl 1,3 oxazolin; trong đó LG là nhóm rời chuyển chẳng hạn, ví dụ, halo (ví dụ, Br, Cl, I) hoặc triflometansulfonyloxy và trong đó R^4 và p là như được mô tả theo phương án 1.

Alkyl hóa axit malonic được bảo vệ (1A) bằng chất alkyl hóa (1B) khi có mặt bazơ (ví dụ, natri hydrua, kali hoặc xesi carbonat, natri hydroxit, lithi diisopropyl amit, natri bis(trimetylsilyl)amit, kali bis(trimetylsilyl)amit, lithi tertametylpiperidit, 1,8-diaazaxycloundec-7-en, N,N-diisopropyl etyl amin hoặc 2,6-dit-butylputridin), trong dung môi chẳng hạn DMF, THF hoặc dimetyl axetamit, tạo ra gốc axit béo được bảo vệ

(1C). Khi R^4 là OH hoặc CO_2H , việc bảo vệ các nhóm chức này có thể được yêu cầu trước bước alkyl hóa. Các nhóm bảo vệ cho hydroxyl đã được biết đến trong lĩnh vực này và ví dụ là 1. Các ete chẳng hạn methyl ete, metoxymethyl ete (MOM), Tetrahydropyranyl ete (THP), t-butyl ete, allyl ete, benzyl ete, t-butyldimethylsilyl ete, t-butyldiphenyl silyl ete, tribenzyl silyl ete, isopropyldimethylsilyl ete, triphenylmethyl ete, nitrobenzyl ete, 2. Các este và cacbonat chẳng hạn este của axit axetic, este format, este trichloroaxetat, este phenoxyaxetat, este pivaloat, este benzoat, methyl carbonat, benzyl carbonat, allyl carbonat, nitrate ester, adamanoate ester, notrophenyl carbonat.

Gốc axit béo có công thức A2 thu được bằng cách khử bảo vệ sử dụng phương pháp khử bảo vệ thích hợp. Các phương pháp tiêu chuẩn có thể được áp dụng để thủy phân chất trung gian(1C) sử dụng bazơ được chọn từ, nhưng không chỉ giới hạn ở, NaOH, KOH, hoặc LiOH, hoặc axit được chọn từ, nhưng không chỉ giới hạn ở, TFA, HCl, hoặc BCl_3 . khi P^1 hoặc P^2 là benzyl hoặc metoxybenzyl, phương pháp được ưu tiên sử dụng để khử bảo vệ là hydro hóa khi có mặt chất xúc tác chẳng hạn, nhưng không chỉ giới hạn ở, paladi-trên-cacbon.

Sơ đồ 2 minh họa quy trình tổng hợp gốc axit béo có công thức A¹ trong đó R^1 là $\text{C}(\text{O})_2\text{H}$.



Sơ đồ 2

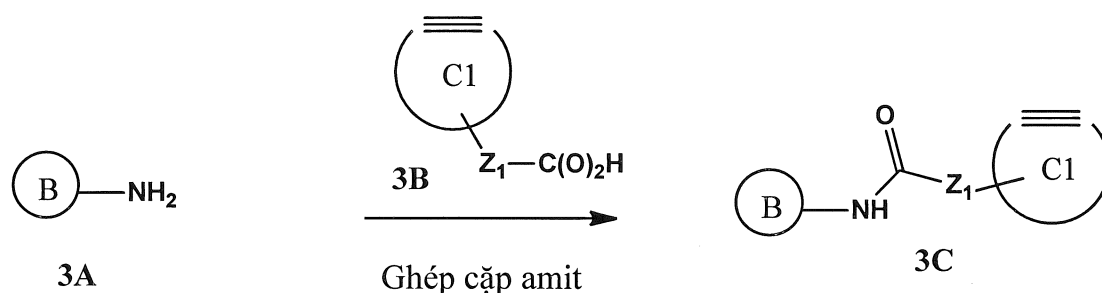
trong đó P^1 và P^2 , LG như được xác định ở trên và R^2 , R^3 , n và m như được xác định theo phương án 1.

Axit malonic được bảo vệ (1A) tham gia 2 bước alkyl hóa tiếp theo bằng chất alkyl hóa (2A) và (2C), thứ tự có thể được đảo ngược, trước khi khử bảo vệ sử dụng

phương pháp thích hợp đã mô tả trên đây trong Sơ đồ 1. Khi R^2 và R^3 là OH hoặc CO_2H , bảo vệ các nhóm chức này có thể được yêu cầu trước các bước alkyl hóa này.

Gốc axit béo có công thức A^1 trong đó R^1 là H có thể được điều chế bằng cách loại carboxyl gốc axit béo có công thức A^1 tương ứng trong đó R^1 là CO_2H . Các điều kiện loại carboxyl đã được biết rõ trong lĩnh vực này chẳng hạn ví dụ, loại carboxyl trong điều kiện bazơ (ví dụ, amon hydroxit).

Tổng hợp cấu trúc phân tử sinh học-cầu nối



Sơ đồ 3

trong đó B là phân tử sinh học hoặc dạng cải biến của chúng, Z^1 là cầu nối $\text{C}_1\text{-C}_{20}$ alkylen trong đó mạch alkylen tùy ý được thế bằng oxo ($=\text{O}$), và trong đó một hoặc nhiều cacbon được thay thế bằng O hoặc NH; và trong đó C1 là hệ vòng dị vòng hoặc hệ vòng một vòng, hai vòng hoặc ba vòng tùy ý được thế bằng flo.

Xycloalkyn (3B) được gắn với gốc amino của phân tử sinh học (3A) (ví dụ, với nhóm chức amino ở đầu N hoặc chuỗi bên của lysin) qua nhóm phản ứng axit carboxylic của nó sử dụng các phương pháp ghép cặp amit tiêu chuẩn. Các phương pháp ghép cặp đã biết có thể được áp dụng bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, chuyển hóa chất trung gian (3B) thành dạng được hoạt hóa của nó, [ví dụ, thành pyrrolidin-2,5-dion (sử dụng hóa N-hydrosuccinimit tiêu chuẩn), hoặc chuyển hóa axit (3B) sử dụng các chất chẳng hạn triphosgen, carbonyldiimidazol, 4-nitrophenyl cloroformat, hoặc disuccinimidyl carbonat, chuyển hóa axit (3B) thành halogenua axit tương ứng, sử dụng các chất chẳng hạn thionyl clorua hoặc oxalyl clorua, hoặc chuyển hóa axit (3B) thành anhydrit được trộn tương ứng sử dụng các chất chẳng hạn $\text{ClC}(\text{O})\text{O-isobutyl}$, 2,4,6-triclorobenzoyl clorua hoặc trime vòng anhydrite axit propyl phosphonic (T3P), sau đó là phản ứng của oxazolidin-2,5-dion, halogenua axit, hoặc anhydrit được trộn] với phân

tử sinh học (3A) khi có mặt hoặc vắng mặt bazơ chẳng hạn amin bậc ba (ví dụ, triethylamin hoặc N,N-diisopropyl etylamin) hoặc K_2CO_3 . Ngoài ra, phân tử sinh học 3A có thể được ghép cặp với axit 3B sử dụng chất ngưng tụ peptit bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, dicyclohexylcarbodiimide (DCC), diisopropylcarbodiimide (DIC), 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydroclorua (EDC HCl), benzotriazol-1-yl-oxy-tris-pyrolidino-phosphoni hexaflorophosphat (PyBOP), hoặc benzotriazol-1-yl-oxy-tris-(dimethylamino)-phosphoni hexaflorophosphat (BOP) khi có mặt hoặc vắng mặt chất phản ứng chẳng hạn 1-hydroxybenzotriazol, 1-hydroxy-7-azabenzotriazol, hoặc dimethylaminopyridin. tốt hơn, nếu chất trung gian axit/xycloalkyn (3B) này được chuyển hóa thành dạng được hoạt hóa của chúng sử dụng hóa NHS trước khi phản ứng với nhóm chức amino trên phân tử sinh học.

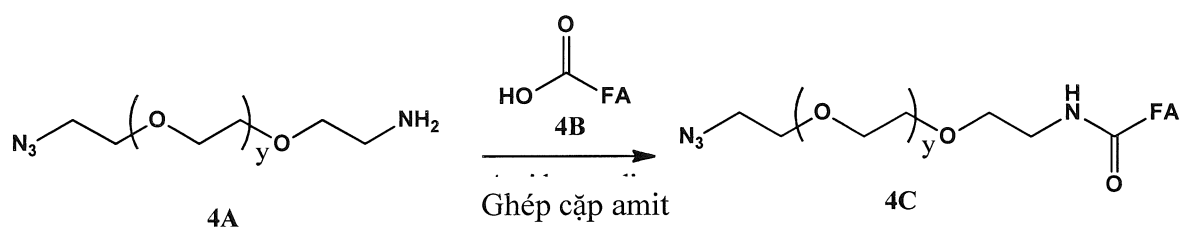
Axyl hóa chọn lọc nhóm chức amino đầu N của phân tử sinh học được phát triển và được báo cáo trong các đơn đồng được nộp tại US số 62/015,858 (Mã số của đại diện PAT056275-US-PSP) và 62/082,337 (Mã đại diện số PAT056275-US-PSP02).

Axyl hóa chọn lọc bao gồm phản ứng của chất tương tự xyclooctyn được hoạt hóa bằng NHS (các chất dẫn xuất NHS của (3B) với phân tử sinh học trong đó đầu N được được cải biến để chứa axit amin histidin liền kề với axit amin đầu N. Phản ứng có độ chọn lọc cao đối với nhóm chức amino ở đầu N khi được thực hiện ở độ pH = 4, do sự có mặt của tác động lân cận của axit amin histidin.

Tổng hợp cấu trúc gốc axit béo-cầu nối

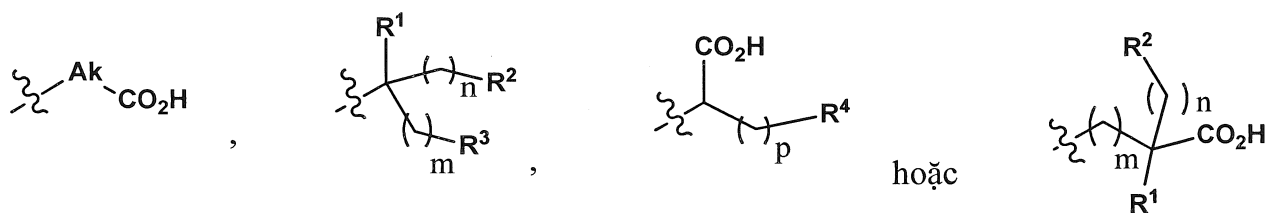
Cấu trúc cầu nối-axit béo hóa click

Sơ đồ 4 mô tả quá trình tổng hợp cấu trúc axit béo- cầu nối PEG với nhóm chức azido kết thúc.



Sơ đồ 4

trong đó y là 0 đến 34 và FA là gốc axit béo như được mô tả trong công thức A1, A2 hoặc A3 được gắn kèm qua một trong số các nhóm chức axit carboxylic của nó với cầu nối PEG, FA dưới dạng các công thức sau đây:

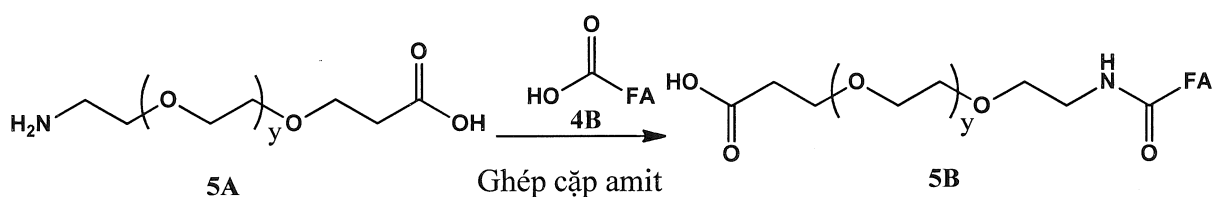


Gốc axit béo (4B) được gắn kèm với cầu nối chứa PEG (4A) qua phản ứng ghép cặp amit. Các phương pháp ghép cặp đã biết đã được mô tả chi tiết nêu trên trong Sơ đồ 3. Tốt hơn là nhóm chức axit trên gốc axit béo được hoạt hóa sử dụng hóa NHS.

Trong đó R^1 là CO_2H , R_2 , R_3 và R_4 là CO_2H hoặc OH , các nhóm bảo vệ có thể cần được đưa vào trước phản ứng ghép cặp để kiểm soát vị trí phản ứng. Nhóm bảo vệ các nhóm axit carboxylic và nhóm hydroxy đã được mô tả trên đây trong sơ đồ 1. Ngoài ra, hoạt hóa chọn lọc axit carboxylic có thể đạt được bằng cách sử dụng hóa NHS.

Cầu nối-axit béo để gắn kèm trực tiếp với phân tử sinh học quan tâm

Sơ đồ 5 mô tả tổng hợp cấu trúc axit béo-cầu nối PEG với nhóm chức đầu CO_2H .



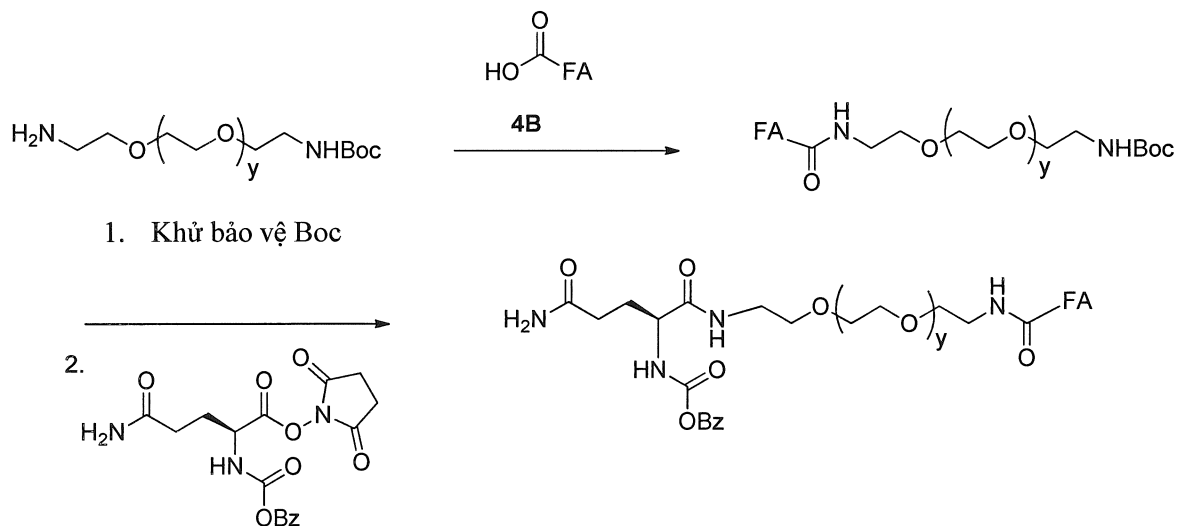
Sơ đồ 5

trong đó FA như được xác định ở trên trong Sơ đồ 4 và y là 0 đến 34.

Axit béo (4B) có thể được gắn kèm với cầu nối chứa PEG (5A) sử dụng ghép cặp amit nêu trên.

Cấu trúc cầu nối-axit béo để gắn kèm với phân tử sinh học quan tâm sử dụng enzym transglutaminaza

Sơ đồ 5A mô tả việc tạo ra cấu trúc cầu nối-axit béo bao gồm axit amin axit glutamic cho phép cải biến chọn lọc vị trí của lysin khi sử dụng enzym transglutaminaza.

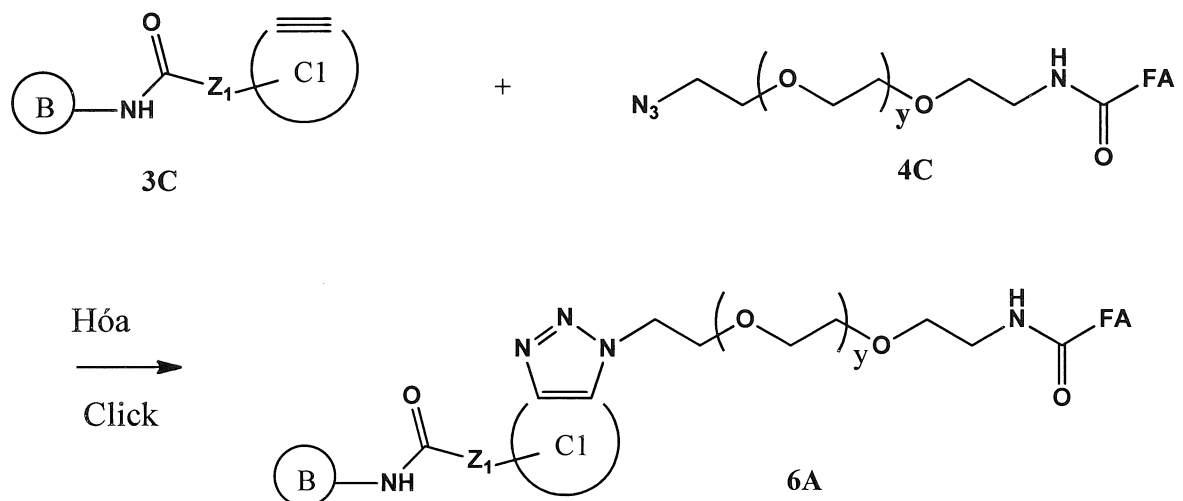


Sơ đồ 5B

trong đó y và FA như đã được xác định trước đó. Các cấu trúc này cho phép cải biến chọn lọc vị trí nhóm amino trên chuỗi bên của lysin. Cải biến chọn lọc vị trí transglutaminaza của protein được được mô tả trong đơn US số 61/845,273 đã nộp ngày 11/07/2013 (Mã đại diện PAT055641-US-PSP).

Tổng hợp thể liên hợp theo sáng chế

Liên hợp sử dụng hóa click

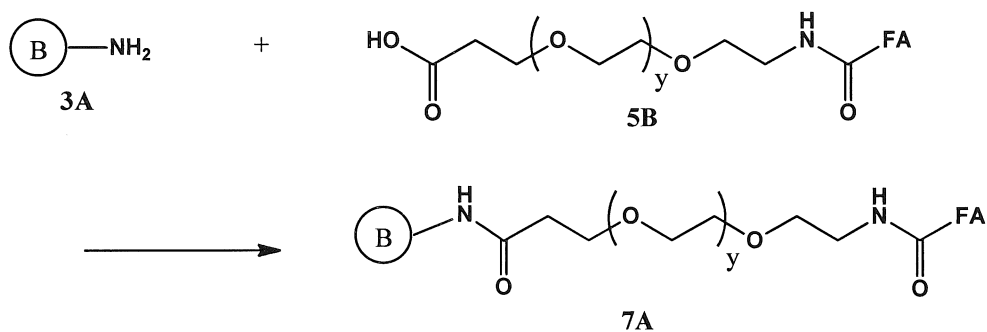


Sơ đồ 6

trong đó B là phân tử sinh học quan tâm hoặc dạng cải biến của chúng (ví dụ, đột biến hoặc phân tử sinh học chứa đầu histidin) và y, C1, Z1, FA và y như được xác định trên đây.

Cấu trúc xycloalkyn (3C) tham gia phản ứng cộng vòng Huisgen với azit kết thúc của cấu trúc cầu nối-axit béo (4C) thường được gọi là hóa click. Ví dụ về các phản ứng hóa click đã được mô tả trong US 2009/0068738.

Liên hợp bằng cách gắn trực tiếp sử dụng các điều kiện ghép cặp



Sơ đồ 7

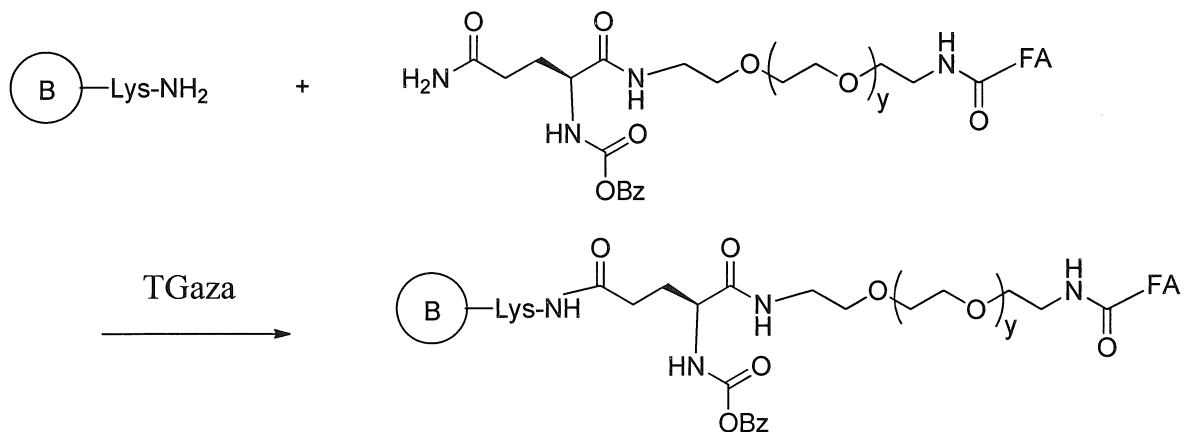
trong đó B là phân tử sinh học quan tâm hoặc dạng cải biến của chúng (chẳng hạn, ví dụ, đột biến và/hoặc phân tử sinh học chứa đầu histidin) và cấu trúc cầu nối-axit béo được gắn với đầu N của phân tử sinh học này.

Cấu trúc cầu nối-axit béo (5B) được gắn với gốc amino của phân tử sinh học (3A) (ví dụ, với nhóm chức amino ở đầu N hoặc chuỗi bên của lysin) qua qua nhóm phản ứng axit carboxylic của chúng sử dụng các phương pháp ghép cặp st amit và ard amit. Các phương pháp ghép cặp đã biết đã được mô tả chi tiết nêu trên trong Sơ đồ 3. Tốt hơn là nhóm chức axit trên cấu trúc cầu nối-axit béo này được hoạt hóa bằng cách sử dụng hóa NHS.

Axyl hóa chọn lọc nhóm chức amino ở đầu N của phân tử sinh học được phát triển và được đề cập đến trong các đơn US cùng được nộp số 62/015,858 (Mã số của đại diện PAT056275-US-PSP) và 62/082,337 (Mã đại diện PAT056275-US-PSP02). Axyl hóa chọn lọc liên quan đến phản ứng của hợp chất được hoạt hóa NHS (các chất dẫn xuất NHS của (5B)) bằng phân tử sinh học trong đó đầu N- được cải biến để bao gồm axit amin histidin liền kề với axit amin đầu N. Phản ứng có độ chọn lọc cao đối với

nhóm chức amino ở đầu N- khi được thực hiện ở độ pH=4, làm sự có mặt hiệu ứng lân cận của axit amin histidin.

Liên hợp sử dụng enzym transglutaminaza



Sơ đồ 7B

Cải biến chọn lọc phân tử sinh học ở chuỗi bên lysin của nó có thể đạt được bằng cách sử dụng enzym transglutaminaza. Cải biến này được đề cập đến trong đơn US số 61/845,273 nộp ngày 11/07/2013 (Mã đại diện PAT055641-US-PSP) hoặc WO 2015/006728 (trong ví dụ 25 của đơn này).

Dược phẩm

Thể liên hợp theo sáng chế có thể được sử dụng theo đường bất kỳ trong số các đường sau, bao gồm dưới da, trong cơ bắp, đường tĩnh mạch, qua màng bụng, qua đường hít, đường mũi, qua đường miệng v.v.. Các phương án được ưu tiên cụ thể theo sáng chế dùng việc sử dụng theo đường tĩnh mạch liên tục của thể liên hợp theo sáng chế, hoặc amit, este, hoặc muối của nó. Thể liên hợp theo sáng chế có thể được sử dụng dưới dạng tiêm tĩnh mạch nhanh (bolus) hoặc truyền liên tục trong một khoảng thời gian. Bơm cấy ghép có thể được sử dụng. Các phương án nhất định theo sáng chế, việc sử dụng liên hợp gián đoạn hoặc liên tục được tiến hành liên tục trong một đến vài ngày (ví dụ, 2-3 ngày hoặc nhiều hơn), hoặc trong thời gian dài, ví dụ, nhiều tuần, nhiều tháng hoặc nhiều năm. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất việc sử dụng liên hợp gián đoạn hoặc liên tục trong ít nhất khoảng 3 ngày, tốt hơn là ít nhất khoảng 6 ngày. Theo các phương án khác, sáng chế đề xuất việc sử dụng liên hợp gián đoạn hoặc liên tục trong ít nhất khoảng một tuần. Theo các phương án khác, sáng chế đề xuất việc sử dụng liên hợp

gián đoạn hoặc liên tục trong ít nhất khoảng hai tuần. Có thể là mong muốn duy trì nồng độ liên hợp huyết tương trung bình ở trên giá trị ngưỡng cụ thể trong khi sử dụng hoặc giữa việc sử dụng các liều đa. Có thể xác định nồng độ mong muốn, ví dụ, dựa trên tình trạng sinh lý của đối tượng, độ nghiêm trọng của bệnh, v.v. Các giá trị mong muốn này của thể được xác định bằng cách tiến hành các thử nghiệm lâm sàng tiêu chuẩn. Theo cách khác, các peptit và liên hợp của chúng có thể được phân phối qua đường miệng qua cơ chế FcRn. (Nat Rev Immunol. 7(9), 715-25, 2007; Nat Commun. 3;3:610, 2012, Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 304: G262–G270, 2013).

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất được phẩm chứa thể liên hợp theo sáng chế hoặc amit, este hoặc a muối của chúng và một hoặc nhiều chất mang dược dụng. Dược phẩm có thể được bào chế cho con đường sử dụng cụ thể chẳng hạn việc sử dụng qua đường miệng, việc sử dụng qua da, việc sử dụng qua đường ngoài tiêu hóa, và việc sử dụng qua đường ruột, v.v. Ngoài ra, dược phẩm theo sáng chế có thể được bào chế ở dạng rắn (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, viên nang, viên nén, viên nén tròn, dạng hạt, dạng đông khô, dạng bột hoặc thuốc đạn), hoặc ở dạng lỏng (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, dung dịch, huyền phù hoặc nhũ tương). Dược phẩm có thể có thể được đưa vào các thao tác dược thông thường chẳng hạn sản xuất vô trùng, tiệt trùng và/ hoặc có thể chứa chất pha loãng trợ, chất tạo bánh, chất ưu trương, chất làm trơn, hoặc chất đệm thông thường, cũng như các tá dược, chẳng hạn chất bảo quản, chất làm ổn định, chất làm ướt, chất tạo nhũ tương và tá dược đệm, v.v.

Thông thường, dược phẩm thích hợp để sử dụng có thể tiêm bao gồm dung dịch (trong đó có thể tan trong nước) hoặc thể phân tán chứa nước vô trùng hoặc và bột vô trùng để bào chế ngay tức thì của dung dịch hoặc thể phân tán có thể tiêm vô trùng.

Đối với việc sử dụng trong tĩnh mạch, chất mang phù hợp bao gồm nước muối sinh lý, nước kìm hãm vi khuẩn, Cremophor ELTM (BASF, Parsippany, N.J.) hoặc nước muối đệm phosphat (PBS). Trong tất cả các trường hợp, dược phẩm nên là vô trùng và nên ở dạng lỏng đến mức khả năng có thể tiêm được dễ dàng. Dược phẩm ưu tiên ổn định trong điều kiện sản xuất và lưu trữ và nên được bảo quản để chống lại tác động gây ô nhiễm của vi sinh vật chẳng hạn vi khuẩn và nấm. Nhìn chung, chất mang thích hợp có thể là dung môi hoặc môi trường phân tán bao gồm, ví dụ, nước, etanol, polyol (ví dụ, glyxerol, propylen glycol, và polyetylen glycol lỏng, và tương tự), và hỗn hợp thích hợp của nso. Độ lỏng thích hợp có thể được duy trì, ví dụ, bằng việc sử dụng chất phụ

chẳng hạn lecitin, bằng cách duy trì kích thước hạt cần thiết trong trường hợp thể phân tán và bằng việc sử dụng chất hoạt động bề mặt. Có thể đạt được việc phòng ngừa tác động của vi sinh vật bằng các chất kháng khuẩn và kháng nấm khác nhau, ví dụ, paraben, clorobutanol, phenol, axit ascorbic, thimerosal, và tương tự. Trong nhiều trường hợp, tốt hơn là bao gồm các chất đẳng trương, ví dụ, đường, polyalcohol chẳng hạn manitol, axit amin, sorbitol, natri clorua trong dược phẩm. Sự hấp thu kéo dài của dược phẩm có thể tiêm có thể được đem lại bằng cách bao gồm trong dược phẩm chất trì hoãn hấp thu, ví dụ, nhôm monostearat và gelatin. Theo một số phương án, tá dược đa chức năng chẳng hạn albumin tái tổ hợp có thể được kết hợp vào quy trình bào chế để tạo điều kiện làm ổn định sản phẩm liên hợp từ quy trình phân rã hoặc kết tụ, để cải thiện độ hòa tan và hỗ trợ việc sử dụng và giải phóng thành phần hoạt tính. (BioPharm International, 2012, Vol 23, Issue 3, pp 40-44).

Dược phẩm có thể tiêm nhất định là dung dịch hoặc huyền phù đẳng trương chứa nước, và thuốc đạn được bào chế thuận lợi từ nhũ tương hoặc huyền phù béo. Dược phẩm đã nêu có thể được vô trùng và/ hoặc chứa tá dược, chẳng hạn chất bảo quản, chất làm ổn định, chất làm ướt hoặc chất tạo nhũ tương, promoter dung dịch, muối để điều hòa áp suất thẩm thấu và/hoặc chất đệm. Ngoài ra, các dược phẩm này cũng có thể chứa các dược chất có lợi ích điều trị bệnh khác. Các dược phẩm này được bào chế theo các phương pháp lần lượt là trộn, tạo hạt hoặc phủ thông thường, và chứa khoảng 0,1-75%, hoặc chứa khoảng 1-50%, thành phần hoạt tính.

Dung dịch có thể tiêm vô trùng có thể được điều chế bằng cách kết hợp hợp chất có hoạt tính ở lượng cần thiết trong dung môi thích hợp với một hoặc tổ hợp các thành phần được liệt kê ở trên, như dược yêu cầu, sau đó là vô trùng lọc. Thông thường, thể phân tán được điều chế bằng cách kết hợp hợp chất hoạt tính vào chất dẫn thuốc vô trùng mà bao gồm môi trường phân tán bazơ và các thành phần khác cần thiết từ các thành phần được liệt kê ở trên. Trong trường hợp bột vô trùng để điều chế dung dịch có thể tiêm vô trùng, các phương pháp bào chế ưu tiên là sấy khô chân không và đông khô thu được bột của thành phần hoạt tính cộng thành phần mong muốn bổ sung bất kỳ từ dung dịch được lọc vô trùng trước đó của nó.

Dược phẩm dùng qua đường miệng thông thường bao gồm chất pha loãng trợ hoặc chất mang có thể ăn được. Với mục đích sử dụng trị bệnh qua đường miệng, hợp

chất có hoạt tính có thể được kết hợp với các tá dược và sử dụng ở dạng viên nén, viên ngậm, hoặc viên nang, ví dụ, viên nang gelatin. Dược phẩm dùng qua đường miệng có thể cũng được điều chế bằng cách sử dụng chất mang lỏng để sử dụng như kem đánh răng. Chất gắn kết có khả năng tương thích về mặt dược, và/ hoặc nguyên liệu tá dược có thể bao gồm như một phần của dược phẩm. Viên nén, viên nén tròn, viên nang, viên ngậm và tương tự có thể chứa thành phần bất kỳ trong số các thành phần sau, hoặc hợp chất có cấu trúc tương tự: chất gắn kết chẳng hạn xenluloza vi tinh thể, gum tragacanth hoặc gelatin; tá dược chẳng hạn tinh bột hoặc lactoza, chất phân rã chẳng hạn axit alginic, primogel, hoặc tinh bột ngô; tá dược trơn chẳng hạn magie stearat hoặc sterote; chất gây trượt chẳng hạn silicon dioxit keo; chất tạo ngọt chẳng hạn sucroza hoặc saccarin; hoặc chất tạo mùi vị chẳng hạn tạo vị bạc hà cay, metyl salixylat, hoặc tạo vị cam. Chế phẩm để vận chuyển qua đường miệng có thể được kết hợp thuận tiện các chất để cải thiện độ ổn định trong đường tiêu hóa và/ hoặc để tăng cường hấp thu.

Đối với việc sử dụng bằng cách hít, chất có tác dụng điều trị bệnh theo sáng chế tốt hơn là được vận chuyển ở dạng bụi sol khí từ dụng cụ chứa hoặc dụng cụ phân tán được nén áp suất mà bao gồm chất đẩy thích hợp, ví dụ, gas chẳng hạn cacbon dioxit, hoặc máy phun sương. Chú ý rằng phổi cung cấp diện tích bề mặt lớn để vận chuyển có hệ thống chất có tác dụng điều trị bệnh.

Chất có thể tạo viên nang, ví dụ, dạng vi hạt polyme chẳng hạn vi hạt được mô tả trong công bố đơn Mỹ số US 20040096403, hoặc kết hợp với chất bất kỳ trong một loạt các chất dẫn thuốc vận chuyển dược chất khác đã biết trong lĩnh vực này. Theo các phương án khác theo sáng chế, các chất này được phân phối kết hợp với lipit tích điện như được mô tả, ví dụ, trong công bố đơn Mỹ số US 20040062718. Cần lưu ý rằng hệ thống được đề cập thứ hai nêu trên được sử dụng để dùng polypeptit, insulin điều trị bệnh, chỉ ra tính hữu dụng của hệ thống này đối với việc sử dụng các chất peptit.

Việc sử dụng có hệ thống cũng có thể bằng thiết bị qua da hoặc qua niêm mạc.

Dược phẩm phù hợp để dùng qua da bao gồm lượng có hiệu quả của thể liên hợp theo sáng chế với chất mang thích hợp. Chất mang thích hợp để vận chuyển qua da bao gồm các dung môi dược dụng hấp thu để hỗ trợ đi qua da của vật chủ. Ví dụ, thiết bị qua da ở dạng băng gạc bao gồm thành phần lót, bình chứa bao gồm hợp chất tùy ý với chất mang, tùy ý thanh kiểm soát tốc độ để vận chuyển hợp chất ở da của vật chủ ở tốc độ được kiểm soát và xác định qua thời gian dài, và các thiết bị bảo vệ dụng cụ gắn vào da.

Dược phẩm phù hợp với việc dùng tại chỗ, ví dụ, với da và mắt, bao gồm aqueous dung dịch, huyền phù, thuốc mỡ, kem, gel chứa nước hoặc chế phẩm phun, ví dụ, để vận chuyển bằng sol khí hoặc tương tự. Các hệ vận chuyển tại chỗ này đặc biệt thích hợp đối với việc dùng cho da. Do đó, chúng đặc biệt phù hợp để sử dụng tại chỗ, bao gồm mỹ phẩm, các chế phẩm đã biết rõ trong lĩnh vực này. Dược phẩm này có thể chứa chất hòa tan, chất làm ổn định, chất tăng cường ưu trương, các tá dược đệm và các chất bảo quản.

Theo các phương án nhất định, dược phẩm là để sử dụng qua da. Các thành phần chế phẩm phù hợp và các phương pháp để sử dụng dưới da của các chất trị bệnh polypeptit (ví dụ, các kháng thể, các protein dung hợp và tương tự) đã biết trong lĩnh vực này. Xem, ví dụ, Công bố đơn sáng chế Mỹ số No 2011/0044977 và US Patent No. 8,465,739 và Bằng sáng chế Mỹ số 8,476,239. Thông thường, dược phẩm để sử dụng dưới da chứa các chất làm ổn định (ví dụ, axit amin, chẳng hạn metionin, và hoặc saccarit chẳng hạn sucroza), chất đệm và chất đẳng trương thích hợp.

Như được sử dụng ở đây việc dùng tại chỗ cũng có thể đề cập đến việc hít hoặc dùng qua đường mũi. Chúng có thể được vận chuyển thuận tiện ở dạng bột khô (riêng lẻ, dạng hỗn hợp, ví dụ, hỗn hợp khô với lactoza, hoặc hạt thành phần được trộn, ví dụ, với phospholipit) từ máy xông bột khô hoặc sự có mặt của bụi sol khí từ dụng cụ chứa được nén áp suất, bơm, dịch phun, bình xịt thuốc hoặc máy xông, có hoặc không có sử dụng chất đẩy thích hợp.

Sáng chế còn đề xuất dược phẩm và dạng bào chế mà bao gồm một hoặc nhiều chất giảm tốc độ theo đó hợp chất theo sáng chế làm thành phần hoạt tính sẽ phân hủy. Các chất này được đề cập đến ở đây là "các chất làm ổn định," bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, chất chống độc chẳng hạn axit ascorbic, chất đệm pH, hoặc chất đệm, albumin tái tổ hợp.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "muối dược dụng" dùng để chỉ muối mà vẫn giữ các hiệu quả và đặc tính sinh học của thể liên hợp theo sáng chế và, muối này thông thường không phải là không mong muốn về mặt sinh học hoặc mặt khác. Trong nhiều trường hợp, thể liên hợp theo sáng chế có khả năng tạo muối acit và/ hoặc muối bazơ

bằng tác dụng của sự có mặt của các nhóm amino và/ hoặc carboxyl hoặc các nhóm tương tự.

Muối cộng axit được dùng có thể được tạo thành bằng các axit vô cơ và axit hữu cơ, ví dụ, muối của axetat, aspartat, benzoat, besylat, bromua/hydrobromua, bicarbonat/cacbonat, bisulfat/sulfat, camphorsulfonat, clorua/hydroclorua, clortheophyllonat, xitrat, etandisulfonat, fumarat, gluxepat, gluconat, glucuronat, hipurat,, hydroiodua/iodua, isethionat, lactat, lactobionat, laurylsulfat, malat, maleat, malonat, mandelat, mesylat, metylsulphat, naphthoat, napsylat, nicotinat, nitrat, octadecanoat, oleat, oxalat, palmitat, pamoat, phosphat/hydrogen phosphat/dihydrogen phosphat, polygalacturonat, propionat, stearat, succinat, sulfosalixylat, tartrat, tosylat và trifloaxetat.

Axit vô cơ mà từ đó muối có thể được dẫn xuất bao gồm, ví dụ, axit clohydric, axit bromhydric, axit sulfuric, axit nitric, axit phosphoric, và tương tự.

Các axit hữu cơ mà từ đó muối có thể được dẫn xuất bao gồm, ví dụ, axit axetic, axit propionic, axit glycolic, axit oxalic, axit maleic, axit malonic, axit succinic, axit fumaric, axit tartaric, axit xitric, axit benzoic, axit mandelic, axit metanesulfonic, axit etanesulfonic, axit toluenesulfonic, axit sulfosalixylic, và tương tự. Muối cộng bazơ được dùng có thể được hình thành bằng bazơ vô cơ và hữu cơ.

Bazơ vô cơ mà từ đó muối có thể được dẫn xuất bao gồm, ví dụ, muối amoni và kim loại từ cột I đến XII của bảng tuần hoàn hóa học. Các phương án nhất định, muối được dẫn xuất từ muối natri, kali, amoni, canxi, magie, sắt, bạc, kẽm, và đồng; cụ thể là, các muối thích hợp bao gồm muối amoni, kali, natri, canxi và magie.

Bazơ hữu cơ mà từ đó các muối có thể được dẫn xuất bao gồm, ví dụ, amin bậc một, bậc hai và bậc ba, amin được thể bao gồm các amin được thể có trong tự nhiên, amin vòng, nhựa trao đổi ion bazơ, và tương tự. Các amin hữu cơ nhất định bao gồm isopropylamin, benzathin, cholinat, dietanolamin, dietylamin, lysin, meglumin, piperazin và trometamin.

Muối được dùng theo sáng chế có thể được tổng hợp từ hợp chất gốc, gốc bazơ hoặc axit, bằng các phương pháp hóa học thông thường. Thông thường, các muối này có thể được điều chế bằng cách cho dạng axit tự do của các hợp chất này với lượng tỷ lệ lượng của bazơ thích hợp (chẳng hạn Na, Ca, Mg, hoặc K hydroxit, cacbonat, bicarbonat hoặc tương tự), hoặc bằng cách cho dạng bazơ tự do của các hợp chất này phản ứng với

lượng tỷ lệ của axit thích hợp. Thông thường các phản ứng này được tiến hành trong nước hoặc dung môi hữu cơ, hoặc trong hỗn hợp của hai chất này. Thông thường, sử dụng môi trường không chứa nước như ete, etyl axetat, etanol, isopropanol, hoặc axetonitril là được mong muốn, trong thực nghiệm. Danh sách các muối thích hợp bổ sung có thể được tìm thấy, ví dụ, trong “Remington's Pharmaceutical Sciences”, tái bản lần 20, Mack Publishing Company, Easton, Pa., (1985); và in “Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use” bởi Stahl và Wermuth (Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 2002).

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "chất mang dược dụng" bao gồm bất kỳ và tất cả dung môi, môi trường phân tán, chất bao, chất hoạt động bề mặt, chất chống oxy hóa, chất bảo quản (ví dụ, chất kháng vi khuẩn, chất kháng nấm), chất đẳng trương, chất trì hoãn hấp thu, muối, chất bảo quản, dược chất, chất ổn định dược chất, chất gắn kết, tá dược, chất phân rã, chất làm trơn, chất tạo ngọt, chất tạo mùi vị, thuốc nhuộm, tá dược đa chức năng chẳng hạn albumin tái tổ hợp và tương tự và tổ hợp của chúng, như đã biết với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này (xem, ví dụ, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. Mack Printing Company, 1990, pp. 1289- 1329). Ngoại trừ trường hợp là chất mang thông thường bất kỳ không tương thích với thành phần hoạt tính, việc sử dụng nó trong điều trị bệnh hoặc dược phẩm là được dự tính.

Phương pháp theo sáng chế

Mức độ tuần hoàn GDF15 được báo cáo là tăng trong nhiều điều kiện sinh lý và bệnh lý, đáng chú ý nhất là khi mang thai (Moore AG 2000. J Clin Endocrinol Metab 85: 4781-4788), β -thalassemia (Tanno T 2007, Nat Med 13:1096-101) (Zimmermann MB, 2008 Am J Clin Nutr 88:1026-31), và thiếu máu do thiếu sắt bẩm sinh (Tamary H 2008, Blood. 112:5241-4). GDF15 cũng được liên kết với các hoạt tính sinh học kép theo các tài liệu báo cáo. Các nghiên cứu về sự bất hoạt GDF15 và chuột chuyển gen gợi ra rằng GDF15 có thể bảo vệ chống lại tổn thương tim gây ra bởi thiếu máu cục bộ/tái tưới máu- hoặc quá tải (Kemp T, 2006, Circ Res.98:351-60) (Xu J, 2006, Circ Res. 98:342-50), bảo vệ chống lại mất thần kinh vận động và thần kinh cảm giác do lão hóa (Strelau J, 2009, J Neurosci. 29 : 13640-8), bảo vệ nhẹ chống lại nhiễm toan chuyển hóa ở thận, và có thể gây suy giảm sức khỏe ở bệnh nhân ung thư (Johnen H 2007 Nat Med. 11: 1333-40). Nhiều nhóm cũng nghiên cứu vai trò của GDF15 trong việc gây chết

tế bào theo chương trình và tăng sinh tế bào và các kết quả gây nhiều tranh cãi đã được báo cáo sử dụng các mẫu dị ghép và nuôi cấy tế bào khác nhau. Các nghiên cứu về chuột chuyển gen thể hiện rằng GDF15 bảo vệ chống lại chất gây ung thư hoặc bệnh tân sinh gây ra bởi đột biến Ape ở ruột và phổi (Baek SJ 2006, Gastroenterology. 131: 1553-60; Cekanova M 2009, Cancer Prev Res 2:450-8).

GDF15 cũng được báo cáo là đóng vai trò trong viêm nhiễm, ung thư và chuyển hóa (Samule Breit et al. Growth Factors, October 2011; 29(5): 187–195). GDF15 còn liên quan đến sự điều hòa chứng thèm ăn sinh lý và khối lượng cơ thể (Vicky Wang-Wei Tsai et al. Public Library of Science: PLOS một 2013, Vol. 8, Issue 2, e55174)

Sáng chế đề xuất các phương pháp điều trị hoặc phòng ngừa rối loạn hoặc bệnh chuyển hóa, tiểu đường, tiểu đường typ 2, béo phì, chứng viêm tụy, rối loạn lipid máu, bệnh gan nhiễm mỡ/viêm gan nhiễm mỡ do rượu và không do rượu và các bệnh về gan tiến triển khác, chứng kháng insulin, chứng tăng insulin, chứng không dung nạp glucoza, chứng tăng đường huyết, hội chứng chuyển hóa, chứng cao huyết áp, bệnh tim mạch, chứng xơ vữa động mạch, bệnh động mạch ngoại vi, đột quy, chứng suy tim, bệnh tim mạch vành, các biến chứng tiểu đường (bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở bệnh thận mạn tính), bệnh lý thần kinh, bệnh liệt dạ dày và các rối loạn chuyển hóa khác, ở đối tượng cần dùng chúng, bao gồm: cho đối tượng sử dụng lượng có hiệu quả điều trị bệnh của thể liên hợp theo sáng chế, hoặc amit, este hoặc muối của chúng hoặc hỗn hợp của thể liên hợp, trong đó phân tử sinh học là yếu tố biệt hóa tăng trưởng của người 15 (GDF15), chất tương tự, biến thể, đột biến, mảnh và các dạng biến thể khác của chúng.

Các phương pháp này có thể có hiệu quả thuận lợi chẳng hạn ví dụ, giảm tần suất việc sử dụng.

Do đó, dưới dạng phương án khác, sáng chế đề xuất việc sử dụng thể liên hợp như được mô tả ở đây, hoặc amit, este hoặc muối được dụng của chúng hoặc hỗn hợp của thể liên hợp được mô tả ở đây, trong đó phân tử sinh học là yếu tố biệt hóa tăng trưởng của người 15 (GDF15), chất tương tự, biến thể, đột biến, mảnh và các dạng biến thể khác của chúng, để điều trị rối loạn hoặc bệnh chuyển hóa, tiểu đường typ 2, béo phì, chứng viêm tụy, rối loạn lipid máu, bệnh gan nhiễm mỡ/viêm gan nhiễm mỡ do rượu và không do rượu và các bệnh về gan tiến triển khác, chứng kháng insulin, chứng tăng

insulin, chứng không dung nạp glucoza, chứng tăng đường huyết, hội chứng chuyển hóa, chứng cao huyết áp, bệnh tim mạch, chứng xơ vữa động mạch, bệnh động mạch ngoại vi, đột quỵ, chứng suy tim, bệnh tim mạch vành, các biến chứng tiểu đường (bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở bệnh thận mạn tính), bệnh lý thần kinh, bệnh liệt dạ dày và các rối loạn chuyển hóa khác.

Do đó, dưới dạng phương án khác, sáng chế đề xuất việc sử dụng thể liên hợp hoặc amit, este hoặc muối được dụng của chúng, hoặc hỗn hợp của thể liên hợp, trong trị liệu.

Lượng hiệu quả của dược phẩm hoặc tổ hợp theo sáng chế để sử dụng điều trị bệnh sẽ, ví dụ, phụ thuộc vào hoàn cảnh và mục đích điều trị bệnh. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ đánh giá cao rằng mức độ liều thích hợp để điều trị do đó sẽ thay đổi phụ thuộc, một phần, vào phân tử được vận chuyển, chỉ định mà thể liên hợp được sử dụng, con đường sử dụng, và kích thước (khối lượng cơ thể, bề mặt cơ thể, hoặc kích thước cơ quan) và tình trạng của bệnh nhân (tuổi và sức khỏe tổng quát). Theo đó, bác sĩ có thể chuẩn độ liều lượng và điều biến con đường sử dụng để đạt hiệu quả điều trị bệnh tối ưu. Liều lượng thông thường có thể trong khoảng từ 0,1µg/kg đến khoảng 100 mg/kg hoặc nhiều hơn, phụ thuộc vào các yếu tố nêu trên. Theo các phương án khác, liều lượng có thể thay đổi từ 0,1µg/kg đến khoảng 100 mg/kg; hoặc 1µg/kg đến khoảng 100mg/kg. Theo khía cạnh khác của phương án này, liều lượng có thể thay đổi từ 5µg/kg đến 25µg/kg. Vẫn theo khía cạnh khác của phương án này, liều lượng có thể thay đổi từ 10µg/kg đến 20µg/kg.

Tần suất liều phụ thuộc vào các thông số dược động học của protein chức năng kép. Thông thường, bác sĩ sẽ sử dụng dược phẩm cho tới khi liều lượng đạt đến hiệu quả mong muốn. Do đó, dược phẩm có thể được sử dụng dưới dạng một liều, dưới dạng hai hoặc nhiều liều (mà có thể chứa hoặc có thể không chứa lượng tương tự của phân tử mong muốn) theo thời gian, hoặc dưới dạng truyền liên tục qua thiết bị cấy ghép hoặc ống dẫn. Sự cải tiến thêm về liều lượng thích hợp được tiến hành thường xuyên bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này và trong phạm vi nhiệm vụ được tiến hành thường xuyên bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Liều lượng thích hợp có thể được xác định thông qua việc sử dụng dữ liệu đáp ứng liều thích hợp.

Các thuật ngữ “liều có hiệu quả điều trị bệnh” và “lượng có hiệu quả điều trị bệnh,” như được sử dụng ở đây, nghĩa là lượng liên hợp mà đem lại phản ứng sinh học hoặc y học trong hệ mô, động vật, hoặc người được nhận thấy bởi nhà nghiên cứu, bác sĩ, hoặc bác sĩ lâm sàng khác, mà bao gồm sự giảm hoặc cải thiện các triệu chứng của bệnh hoặc rối loạn được điều trị, tức là, lượng của liên hợp polypeptit GDF15 (hoặc đột biến GDF15) mà hỗ trợ mức độ có thể quan sát của một hoặc nhiều phản ứng sinh học hoặc y học mong muốn, ví dụ, giảm glucoza máu, insulin, triglyxerit, hoặc mức độ cholesterol; giảm khối lượng cơ thể; làm giảm nhu cầu nạp thức ăn hoặc cải thiện sự dung nạp glucoza, sự tiêu hao năng lượng, hoặc độ nhạy insulin).

Các thuật ngữ “bệnh nhân” hoặc “đối tượng” được sử dụng hoán đổi to dùng để chỉ người hoặc động vật không phải người (ví dụ, động vật có vú).

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “điều trị”, “việc điều trị” hoặc “sự điều trị” bệnh hoặc rối loạn bất kỳ trong một phương án, dùng để chỉ việc cải thiện bệnh hoặc rối loạn (tức là, làm chậm hoặc hãm hoặc làm giảm sự phát triển bệnh hoặc ít nhất một trong số các triệu chứng lâm sàng của nó). Theo phương án khác, “điều trị”, “việc điều trị” hoặc “sự điều trị” dùng để chỉ làm giảm bớt hoặc cải thiện ít nhất một thông số vật lý bao gồm thông số mà có thể bệnh nhân không nhận thấy. Vẫn theo phương án khác, “điều trị”, “việc điều trị” hoặc “sự điều trị” dùng để chỉ điều biến bệnh hoặc rối loạn, về mặt vật lý, (ví dụ, làm ổn định triệu chứng có thể nhận thấy), về mặt sinh lý, (ví dụ, làm ổn định thông số vật lý), hoặc cả hai. Do đó, điều trị bao gồm ức chế (tức là, hãm sự tiến triển hoặc tiến triển thêm của bệnh, rối loạn hoặc tình trạng hoặc triệu chứng lâm sàng có liên quan) bệnh tiến triển (ví dụ trong trường hợp thể liên hợp GDF15, để làm giảm khối lượng cơ thể, để làm giảm nhu cầu nạp thức ăn, để làm giảm mức insulin và/ hoặc glucoza trong mạch máu, để làm tăng sự dung nạp glucoza, để làm giảm tối thiểu độ biến động mức độ glucoza, và/ hoặc để bảo vệ chống lại các bệnh do gián đoạn cân bằng nội môi glucoza).

Vẫn theo phương án khác, “điều trị”, “việc điều trị” hoặc “sự điều trị” dùng để chỉ phòng ngừa hoặc trì hoãn sự khởi phát hoặc sự phát triển hoặc sự tiến triển của bệnh hoặc rối loạn.

Thuật ngữ "cần điều trị" như được sử dụng ở đây dùng để chỉ sự quyết định bởi bác sĩ hoặc người chăm sóc khác rằng đối tượng cần hoặc sẽ có lợi từ việc điều trị. Quyết định này dựa trên nhiều yếu tố là thuộc lĩnh vực chuyên môn của bác sĩ hoặc người chăm sóc.

Các thuật ngữ "phòng ngừa", "sự phòng ngừa", "việc phòng ngừa" và tương tự dùng để chỉ hướng tác động (chẳng hạn sử dụng thể liên hợp theo sáng chế hoặc được phẩm chứa thể liên hợp) được bắt đầu theo cách thức (ví dụ, trước sự khởi phát bệnh, rối loạn, tình trạng hoặc triệu chứng của nó) để phòng ngừa, ngăn chặn, ức chế hoặc giảm, tạm thời hoặc lâu dài, nguy cơ phát triển bệnh, rối loạn, tình trạng hoặc tương tự ở đối tượng (như được xác định bởi, ví dụ, sự thiếu các triệu chứng lâm sàng) hoặc trì hoãn sự khởi phát của nó, thông thường là trong hoàn cảnh đối tượng dễ mắc phải bệnh, rối loạn hoặc tình trạng cụ thể. Theo các trường hợp nhất định, các thuật ngữ này cũng dùng để chỉ làm chậm quá trình tiến triển của bệnh, rối loạn hoặc tình trạng hoặc ức chế tiến triển của chúng với trạng thái có hại hoặc không mong muốn khác.

Thuật ngữ "bệnh hoặc rối loạn chuyển hóa" dùng để chỉ một loạt bệnh có liên quan có các đặc điểm bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, chứng tăng insulin, dung nạp glucoza bất thường, béo phì, tích mỡ vào bụng hoặc khoang trên của cơ thể, chứng cao huyết áp, rối loạn lipit máu đặc trưng bởi triglyxerit cao, cholesterol có lipoprotein tỷ trọng cao (HDL) thấp, và các hạt lipoprotein tỷ trọng thấp (LDL) dày đặc, nhỏ cao. Các đối tượng mắc bệnh hoặc rối loạn chuyển hóa có nguy cơ phát triển các loại bệnh tiểu đường typ 2 và, ví dụ, chứng xơ vữa động mạch.

Cụm từ "rối loạn chuyển hóa glucoza" bao gồm rối loạn bất kỳ đặc trưng bởi triệu chứng lâm sàng hoặc tổ hợp của triệu chứng lâm sàng có liên quan đến mức độ glucoza cao và/ hoặc mức insulin cao ở đối tượng so với cá thể khỏe mạnh. Mức độ glucoza và/ hoặc insulin cao có thể xuất hiện ở các bệnh, rối loạn và tình trạng sau: chứng tăng đường huyết, tiểu đường typ II, các loại bệnh đái tháo đường lúc thai kỳ, các loại bệnh đái tháo đường typ II, chứng kháng insulin, dung nạp glucoza giảm, chứng tăng insulin, chuyển hóa glucoza giảm, các loại bệnh tiền đái tháo đường, các rối loạn chuyển hóa (chẳng hạn bệnh hoặc rối loạn chuyển hóa, cũng được dùng để chỉ hội chứng X), và chứng béo phì, trong số các bệnh hoặc rối loạn khác. Thể liên hợp GDF15 theo sáng

chế, và chế phẩm của nó, có thể được sử dụng, ví dụ, để đạt được và/ hoặc duy trì cân bằng nội môi glucoza, ví dụ, để làm giảm mức glucoza trong mạch máu và/ hoặc để làm giảm mức insulin đến mức nhận thấy được ở đối tượng khỏe mạnh.

Thuật ngữ "chứng kháng insulin" như được sử dụng ở đây dùng để chỉ tình trạng trong đó lượng insulin thông thường là không có khả năng để tạo phản ứng phân tử hoặc sinh lý thông thường. Trong một số trường hợp, lượng insulin sinh lý quá mức, được sản xuất nội sinh hoặc dùng ngoại sinh, là có khả năng để khắc phục chứng kháng insulin, toàn bộ hoặc một phần, và tạo ra đáp ứng sinh học.

Cụm từ "dung nạp glucoza", như được sử dụng ở đây, dùng để chỉ khả năng của đối tượng để kiểm soát mức độ glucoza trong huyết tương và/hoặc insulin trong huyết tương khi nạp glucoza biến động. Ví dụ, dung nạp glucoza bao gồm khả năng của đối tượng để làm giảm, trong khoảng 120 phút, mức độ glucoza huyết tương trở về mức độ được xác định trước khi nạp glucoza.

Thuật ngữ "Không dung nạp glucoza, hoặc 'dung nạp glucoza giảm (IGT) là trạng thái tiền tiểu đường của rối loạn đường huyết mà có liên quan đến nguy cơ tăng các bệnh lý tim mạch. Tình trạng tiền tiểu đường ngăn đối tượng chuyển glucoza vào tế bào có hiệu quả và sử dụng nó như nguồn nguyên liệu hiệu quả, dẫn đến mức độ glucoza cao trong máu và một số mức độ chứng kháng insulin.

Thuật ngữ "Tiểu đường typ 2" là tình trạng đặc trưng bởi sự sản xuất glucoza dư và mức độ glucoza tuần hoàn duy trì ở mức cao là kết quả của việc thanh thải glucoza không đủ và việc mất khả năng của tuyến tụy để sản xuất đủ insulin.

Thuật ngữ "chứng tăng đường huyết", như được sử dụng ở đây, dùng để chỉ tình trạng trong đó lượng glucoza tăng tuần hoàn trong huyết tương máu của đối tượng so với cá thể khỏe mạnh.

Chứng tăng đường huyết có thể được chẩn đoán bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này, bao gồm phép đo mức độ glucoza trong máu lúc đói như được mô tả ở đây.

Thuật ngữ "Giảm đường huyết", cũng được gọi là lượng đường trong máu thấp, xảy ra khi mức glucoza trong máy giảm xuống quá thấp để cung cấp đủ năng lượng cho các hoạt động cơ thể.

Thuật ngữ "chứng tăng insulin", như được sử dụng ở đây, dùng để chỉ tình trạng trong đó mức độ insulin tuần hoàn tăng khi, đồng thời, mức độ glucoza máu tăng hoặc

bình thường. Chứng tăng insulin có thể là do chứng kháng insulin có liên quan đến rối loạn lipid máu chẳng hạn triglycerit cao, cholesterol cao, lipoprotein tỷ trọng thấp (LDL) cao và lipoprotein tỷ trọng cao (HDL) thấp; mức độ axit uric cao; hội chứng buồng trứng đa nang; tiểu đường typ II và chứng béo phì. Chứng tăng insulin có thể được chẩn đoán là có mức insulin huyết tương cao hơn khoảng 2pU/mL.

Thuật ngữ “Chứng viêm tụy” là viêm nhiễm tuyến tụy.

Thuật ngữ “Rối loạn lipid máu” là rối loạn chuyển hóa lipoprotein, bao gồm sản xuất quá mức hoặc thiếu hụt lipoprotein. Rối loạn lipid máu có thể được biểu hiện bằng sự tăng tổng lượng, nồng độ cholesterol có lipoprotein tỷ trọng thấp (LDL) và nồng độ triglycerit, và làm giảm nồng độ cholesterol có lipoprotein tỷ trọng cao (HDL) trong máu.

Thuật ngữ “bệnh gan nhiễm mỡ (FLD)”, cũng được gọi là gan nhiễm mỡ, là tình trạng trong đó không bào lớn của sự tích lũy chất béo triglycerit ở các tế bào gan qua quá trình gan nhiễm mỡ (tức là, sự lưu giữ bất thường lipid trong tế bào). Mặc dù có nhiều nguyên nhân, gan nhiễm mỡ có thể được xem là bệnh duy nhất mà xảy ra trên toàn thế giới ở những người uống quá nhiều rượu và người béo phì (có hoặc không có tác động của chứng kháng insulin). Khi quá trình chuyển hóa mỡ này bị gián đoạn, mỡ có thể tích tụ trong gan ở lượng dư, do đó gây ra gan nhiễm mỡ. Sự tích tụ mỡ có thể cũng đi kèm với viêm nhiễm tiến triển gan (viêm gan), cũng được gọi là viêm gan nhiễm mỡ. Bằng cách xem xét sự đóng góp bởi rượu, gan nhiễm mỡ có thể được gọi là bệnh gan nhiễm mỡ do rượu hoặc bệnh gan nhiễm mỡ không do rượu (nonalcoholic fatty liver disease - NAFLD), và các dạng nghiêm trọng hơn là viêm gan nhiễm mỡ do rượu và viêm gan nhiễm mỡ không do rượu (NASH).

Thuật ngữ “viêm gan nhiễm mỡ” là dạng bệnh về gan, đặc trưng bởi sự thay đổi mỡ ở các tế bào gan, kèm theo là viêm nhiễm và xơ trong tiểu thùy. Khi không liên quan đến uống quá nhiều rượu, nó cũng dùng để chỉ viêm gan nhiễm mỡ không do rượu (NASH).

Thuật ngữ “bệnh gan tiến triển” là bệnh gan do một loạt các bệnh lý về gan tiến triển từ trạng thái lành tính tương đối như gan nhiễm mỡ tới các trạng thái nghiêm trọng hơn bao gồm viêm gan, xơ, xơ gan, và ung thư biểu mô tế bào gan. PNPLA3 đặc biệt

liên quan đến các bệnh gan tiến triển chẳng hạn NAFLD/NASH, AFLD/ASH, viêm gan do virus, bệnh Wilson, bệnh thừa sắt di truyền và viêm đường mật xơ nguyên phát (Paola Dongiovanni et al. World Journal of Gastroenterology, 2013, 19(41), 6969-6978)

Thuật ngữ “Chứng béo phì,” trong hoàn cảnh đối tượng là người, có thể được xác định là người trưởng thành có Chỉ số khối lượng cơ thể (BMI) là 30 hoặc cao hơn (Trung tâm phòng ngừa và kiểm soát bệnh).

“Hội chứng chuyển hóa” có thể được xác định là tập hợp các nhân tố nguy cơ làm tăng nguy cơ mắc bệnh tim và các bệnh khác như các loại bệnh đái tháo đường và đột quỵ. Các nhân tố nguy cơ này bao gồm: Đường trong máu cao -- ít nhất 110 miligam/dexilit (mg/dl) sau khi nhịn ăn; triglyxerit cao-- ít nhất 150 mg/dL trong mạch máu; HDLthấp—thấp hơn 40mg/dl; và, áp suất máu là 130/85mmHg hoặc cao hơn (Tổ chức y tế thế giới).

Thuật ngữ “Bệnh tim mạch” là cách bệnh liên quan đến tim hoặc mạch máu.

Thuật ngữ “Chứng xơ vữa động mạch” là bệnh mạch máu đặc trưng bởi sự phân bố không đều các mảng lipid trong nội mạc của các động mạch có kích thước trung bình và lớn, một số gây ra casử dụng hẹp lumen động mạch và cuối cùng là dẫn đến xơ và vôi hóa. Các tổn thương thường là ổ và tiến triển chậm và không liên tục. Hạn chế lưu lượng máu được coi là biểu hiện lâm sàng chủ yếu, mà thay đổi theo sự phân bố và mức độ nghiêm trọng của tổn thương.

Thuật ngữ “Bệnh tim mạch vành”, cũng được gọi là bệnh động mạch hình vành, là làm hẹp mạch máu nhỏ mà cung cấp máu và oxy đến tim.

“Các biến chứng tiểu đường” là vấn đề do mức độ glucoza trong máu cao, với các chức năng cơ thể khác chẳng hạn thận, dây thần kinh (bệnh thần kinh), chân (loét chân và tuần hoàn kém) và mắt (ví dụ các bệnh võng mạc). Các loại bệnh đái tháo đường cũng làm tăng nguy cơ bệnh tim và rối loạn xương và khớp. Các biến chứng dài kỳ khác của các loại bệnh đái tháo đường bao gồm các vấn đề về da, các vấn đề tiêu hóa, rối loạn chức năng tình dục và các vấn đề với răng và lợi.

Như được sử dụng ở đây, cụm từ “rối loạn khối lượng cơ thể ” dùng để chỉ tình trạng có liên quan đến thừa khối lượng cơ thể và/ hoặc tăng cường thèm ăn. Nhiều thông số được sử dụng để xác định đối tượng trọng lượng quá mức so với các cá thể khỏe mạnh tham chiếu, bao gồm tuổi, cân nặng, giới tính và tình trạng sức khỏe của đối tượng. Ví dụ, đối tượng có thể được xem là thừa trọng lượng hoặc béo phì theo đánh giá của

chỉ số khối lượng cơ thể (BMI) của đối tượng, mà được tính bằng cách chia khối lượng của đối tượng tính bằng kilogam cho bình phương chiều cao của đối tượng tính bằng mét. Người trưởng thành có BMI trong khoảng từ -18,5 đến -24,9kg/m được xem là có khối lượng bình thường; người trưởng thành có BMI từ -25 đến -29,9kg/m có thể xem là thừa khối lượng (tiền béo phì); người trưởng thành có BMI là -30kg/m hoặc cao hơn có thể xem là béo phì. Tăng cường thêm ăn góp phần thường xuyên vào khối lượng cơ thể dư thừa.

Có nhiều tình trạng liên quan đến chứng thèm ăn, bao gồm, ví dụ, hội chứng ăn đêm, đặc trưng bởi chán ăn sáng và ăn nhiều vào đêm thường liên quan đến mất ngủ, nhưng mà có thể liên quan đến tổn thương vùng dưới đồi.

Tất cả các phương pháp được mô tả ở đây có thể được tiến hành theo trình tự thích hợp bất kỳ nếu không có quy định khác ở đây hoặc được chỉ ra rõ ràng mâu thuẫn với ngữ cảnh. Việc sử dụng bất kỳ và tất cả các ví dụ, hoặc từ ngữ điển hình (ví dụ "chẳng hạn") được đề xuất ở đây nhằm mục đích làm rõ hơn sáng chế và không nhằm mục đích giới hạn phạm vi theo sáng chế được yêu cầu bảo hộ.

Hoạt tính và tính ổn định trong huyết tương của thể liên hợp theo sáng chế có thể được đánh giá bằng các phương pháp được mô tả sau đây.

Thử nghiệm và dữ liệu

Hoạt tính và tính ổn định trong huyết tương của các thể liên hợp GDF15 ở Các ví dụ 1 và 19B theo sáng chế có thể được đánh giá bằng các phương pháp in vitro và in vivo được mô tả sau đây.

Các phương pháp đối với thử nghiệm động vật

Tất cả các nghiên cứu động vật được mô tả trong tài liệu này được chấp thuận bởi Novartis Institutes for Biomedical Research Animal Care và Use Committee theo các quy định và hướng dẫn của địa phương và liên bang. Chuột đực béo phì do chế độ ăn uống (C57BL/6NTac) được mua từ Taconic và được cho ăn chế độ ăn chất béo 60% (Research Diets D12492i) từ 6 tuần tuổi trở đi. Sau khi mua về, chuột được nuôi mỗi con một lồng trong chu kỳ sáng-tối đảo ngược 12h:12h. Tất cả động vật được tối thiểu

1 tuần thích nghi trước khi được sử dụng bất kỳ. Thông thường chuột được thí nghiệm giữa 3-4 tháng tuổi. Một ngày trước khi được thí nghiệm, được chọn ngẫu nhiên dựa vào khối lượng cơ thể sao cho mỗi nhóm có khối lượng cơ thể trung bình tương tự nhau. Vào ngày thí nghiệm, chuột được đặt trong các lồng sạch, và loại bỏ đồ ăn cũ. Sau khoảng 1h và ngay trước chu kỳ tối, chuột được tiêm một liều dưới da đơn của chất dẫn thuốc (30 mM natri axetat, pH4) hoặc chất tương tự GDF15 liên hợp lipit (0,5mg/kg). Sau khi tất cả liều tiêm hoàn thành, chuột được cân lại và xác định lượng thức ăn còn lại (~ 50g/con chuột). Sự nạp thức ăn và khối lượng cơ thể được đo trong khoảng thời gian ~2 tuần ở các thời điểm được chỉ ra trong hình vẽ. Ở động vật thay thế được điều trị như được mô tả ở trên, huyết tương được thu ở các thời điểm được chỉ định, và mức độ GDF15 được đo bằng thử nghiệm ELISA theo mỗi hướng dẫn của nhà sản xuất (R&D Systems Quantikine of human GDF15 Immunoassay; DGD150).

Liều đơn dùng dưới da chuột DIO

Hoạt tính và chu kỳ bán rã của thể liên hợp theo sáng chế được thử nghiệm trong thử nghiệm được mô tả ở trên.

Bảng 1

Liên hợp (ví dụ)	PK (thời gian bán rã) (giờ)	Thời gian hoạt động	
		Sự giảm nạp thức ăn (FI) (ngày)	Sự giảm khối lượng cơ thể (BW) (ngày)
1	36	6	8
2		8	8
4	15,1	3	3
5	33,1	8	8
6		3	3
7	21,8	6	6
12		6-8	6-8
13	45,8	8-10	10
15*		2	6
16		6	6
18	55	8-10	10
19A		8	10

19B thô	86,4	8	14
19B1	56,9 (exp 1)	14 (exp 1)	14 (exp 1)
	50,9 (exp 2)	14 (exp 2)	14 (exp 2)
19B2	97,68 (exp 1)	8 (exp 1)	10 (exp 1)
	74,2 (exp 2)	14 (exp 2)	14 (exp 2)
19B3	98,9	8	10
19Bm	65,04	14	17
Ví dụ tham chiếu 2		3	3
Ví dụ tham chiếu 1		1	1
hGDF15	1	1	1

*Chuột nạc (gầy, không mỡ)

Exp 1: thử nghiệm in vivo 1; Exp 2: thử nghiệm in vivo 2.

Dữ liệu trong bảng 1 minh họa rằng thể liên hợp theo sáng chế có thời gian hoạt động dài hơn đáng kể so với không được liên hợp hGDF15 và/ hoặc như so với hGDF15 được pegyl hóa.

Hiệu quả liên hợp GDF15 ở chó được cho ăn thức ăn: Liên hợp GDF15-axit béo

Mục đích nghiên cứu: để đánh giá hiệu quả của việc sử dụng dưới da 0,05mg/kg thể liên hợp GDF15-gốc axit béo theo sáng chế hoặc đối chứng sử dụng chất dẫn thuốc về sự nạp thức ăn ở thiết lập cấp tính (6h) và qua giai đoạn 96 giờ ở chó Béc-giê. Các mẫu huyết tương thu được ở các thời điểm khác nhau trong khoảng thời gian 14 ngày sau khi dùng liều để đo profin PK của hợp chất này. Khối lượng cơ thể được xác định trong suốt nghiên cứu.

Động vật: khối lượng cơ thể cơ bản và điều trị

ID của chó	Khối lượng (kg)	Điều trị
50	12,65	Chất dẫn thuốc
62	8.85	Chất dẫn thuốc
77	10,15	Chất dẫn thuốc
67	8,85	GDF15
73	9,95	GDF15

75	12,25	GDF15
----	-------	-------

Bảng 2

Tiến trình dùng liều: Tiến hành dùng chất dẫn thuốc hoặc GDF15 sau khi thu thập khối lượng cơ thể và mẫu máu cơ bản. Liên hợp GDF15-gốc axit béo được cung cấp ở dạng dung dịch 0,97mg/ml và được dùng bằng cách tiêm dưới da không có chất pha loãng ở 0,05mg/kg. Thể tích đương lượng là 30mmol/l chất dẫn thuốc Natri Axetat pH 4 (52 µl/kg) được đưa vào động vật sử dụng chất dẫn thuốc bằng cách tiêm dưới da.

Lấy máu: Lấy các mẫu máu từ tĩnh mạch ở đầu và cổ (3ml, trong các ống bao gồm EDTA và các chất ức chế proteaza Diprotin A và Aprotinin) và đặt trong đá cho tới khi ly tâm ở 3,000 vòng/phút trong 20min ở 4°C. Phân phối huyết tương trong các phần phân ước và lưu trữ ở -70°C cho tới khi thử nghiệm. Lấy máu ở các thời điểm sau: 0, 6,75, 24,75, 48,75, 72,75 và 96,75 giờ. Thu các mẫu bổ sung ở ngày 7, 10 và 14.

Đo sự nạp thức ăn: Bắt đầu đo sự nạp thức ăn tùy ý 45 phút sau khi dùng chất dẫn thuốc. Phép đo sự nạp thức ăn này bao gồm hai pha: đo cấp tính (0-6 giờ) và đo cận mạn tính (0-96 giờ).

Từ 0-2 giờ, chó được cung cấp 500g thức ăn bình thường (chế độ ăn Hill's J/D). Ở 2 giờ, loại bỏ thức ăn còn thừa, đo trọng lượng và cung cấp thêm 500g thức ăn trong thời gian 2-4 giờ. Ở thời điểm 4 giờ, loại bỏ thức ăn còn thừa, đo trọng lượng và cung cấp thêm 300g thức ăn trong thời gian 4-6 giờ. Ở thời điểm 6 giờ, loại bỏ thức ăn còn thừa và đo trọng lượng. Lấy các mẫu máu ở thời điểm (6,75 giờ). Sau đó cung cấp cho chó 500g thức ăn qua đêm. Vào các buổi sáng ngày 1-4, loại bỏ thức ăn còn thừa, đo trọng lượng và lấy mẫu máu từ mỗi động vật. Sau đó vào các ngày 1-3, cung cấp cho chó 500g thức ăn trong thời gian 24 giờ. Vào ngày 4, chó được quay lại phần thức ăn thông thường của chúng (260 g).

Phép đo sự nạp thức ăn thêm: Vào ngày 7, 14 và 28, động vật thử nghiệm được đưa ra were given 6 hours to để tiêu thụ thức ăn hàng ngày của chúng (260 g). Khi kết thúc khoảng thời gian này, thức ăn còn lại bất kỳ được thu lại và cân.

Phép đo khối lượng cơ thể: Khối lượng cơ thể được đo ở thời điểm tiêu chuẩn và các ngày 2, 4, 7, 10, 14, 18 và 28. Khối lượng cơ thể tiêu chuẩn thu được ở trạng thái đói. Khối lượng cơ thể thu được ở các ngày 2 và 4 là không đói. Đối với động vật được điều trị bằng chất dẫn thuốc, tất cả khối lượng cơ thể khác thu được ở trạng thái đói. Đối với động vật được điều trị bằng GDF15, khối lượng cơ thể được xác định vào các ngày 7-

28 không đói vì động vật được cung cấp thức ăn liên tục để kích thích sự thèm ăn và phục hồi trọng lượng.

Hiệu quả của liên hợp thử nghiệm GDF15-axit béo theo sáng chế ở chó cho ăn thức ăn Mục tiêu thử nghiệm: Để thử nghiệm hiệu quả của việc sử dụng dưới da đối chứng sử dụng chất dẫn thuốc và 0,015mg/kg hoặc 0,005mg/kg thể liên hợp GDF15-gốc axit béo theo sáng chế ở sự nạp thức ăn trong sự thiết đặt chính xác (6 giờ) và trong thời gian 96 giờ ở chó Béc-giê (Trong thử nghiệm này, nhánh sử dụng chất dẫn thuốc được tiến hành trước nhánh sử dụng hGDF15 ở tất cả các con chó). Lấy mẫu huyết tương ở các thời điểm khác nhau trong suốt thời gian 14 ngày sau khi dùng liều để đo profin PK của hợp chất này. Xác định khối lượng cơ thể trong suốt thử nghiệm.

Động vật: Khối lượng cơ thể tiêu chuẩn và điều trị

ID chó	Trọng lượng (kg)	Điều trị	Trọng lượng (kg)	Điều trị
29	12,75	Chất dẫn thuốc	12,85	5µg/kg hGDF15
57	13,35	Chất dẫn thuốc	13,80	5µg/kg hGDF15
61	9,30	Chất dẫn thuốc	9,45	5µg/kg hGDF15
77	10,70	Chất dẫn thuốc	11,15	5µg/kg hGDF15
45	11,90	Chất dẫn thuốc	12,20	15µg/kg hGDF15
50	13,00	Chất dẫn thuốc	13,05	15µg/kg hGDF15
59	14,20	Chất dẫn thuốc	14,65	15µg/kg hGDF15
72	8,80	Chất dẫn thuốc	9,05	15µg/kg hGDF15

Bảng 3

Tiến trình dùng: Việc dùng chất dẫn thuốc được tiến hành sau khi ghi nhận khối lượng cơ thể tiêu chuẩn và lấy mẫu máu. 52µl/kg của 30 mmol/l Chất dẫn thuốc Natri Axetat pH 4 (52 µl/kg) được đưa vào động vật chất dẫn thuốc bằng cách tiêm dưới da. Tiến hành việc dùng GDF15 sau khi ghi nhận khối lượng cơ thể tiêu chuẩn và lấy mẫu máu. Cung cấp liên hợp GDF15-gốc axit béo ở dạng dung dịch 1,20mg/ml và dùng chất dẫn thuốc bằng cách tiêm dưới da sau khi pha loãng ở 0,015mg/kg và 0,005mg/kg. Pha loãng dung dịch gốc GDF15 để duy trì 52µl/kg được vận chuyển ở nghiên cứu trước.

Thu máu: Thu mẫu máu cho nhánh chất dẫn thuốc và nhánh điều trị theo nghiên cứu. Lấy mẫu từ tĩnh mạch đầu và cổ (3ml, trong các ống chứa EDTA và chất ức chế proteaza

Diprotin A và Aprotinin) và đặt trong đá cho tới khi ly tâm ở 3,000 vòng/phút trong 20 phút ở 4°C. Phân bố huyết tương thành các phân phân ước và lưu trữ ở -70°C cho tới khi phân tích. Lấy mẫu ở các thời điểm sau: 0, 6,75, 24,75, 48,75, 72,75 và 96,75 giờ. Thu mẫu bổ sung ở các ngày 7, 10 và 14.

Đo sự nạp thức ăn: Đo sự nạp thức ăn trong cả hai nhánh chất dẫn thuốc và điều trị của thử nghiệm. Bắt đầu đo sự nạp thức ăn tùy ý đo 45 phút sau khi dùng liều. Phép đo sự nạp thức ăn này bao gồm hai pha: đo cấp tính (0-6 giờ) và đo cận mạn tính (0-96 giờ). Từ 0-2 giờ, cung cấp cho chó 500g thức ăn tiêu chuẩn (chế độ ăn Hill's J/D). Ở 2 giờ, loại bỏ thức ăn còn thừa, đo trọng lượng và cung cấp thêm 500g thức ăn trong thời gian 2-4 giờ. Ở 4 giờ, loại bỏ thức ăn còn thừa, đo trọng lượng và cung cấp thêm 300g thức ăn trong thời gian 4-6 giờ. Ở 6 giờ, loại bỏ thức ăn còn thừa và đo trọng lượng. Lấy các mẫu máu ở thời điểm này (6,75 giờ). Sau đó cung cấp cho chó 500g thức ăn qua đêm. Vào các sáng ngày 1-4, loại bỏ thức ăn thừa, đo trọng lượng và lấy mẫu máu từ mỗi động vật. Sau đó vào các ngày 1-3, cung cấp cho chó 500g thức ăn trong thời gian 24 giờ. Vào ngày 4, các con chó này được quay về phần ăn thông thường của chúng (260 g).

Các phép đo sự nạp thức ăn bổ sung: Vào các ngày từ ngày 7 đến 14 ở nhánh sử dụng chất dẫn thuốc và từ ngày 7 đến 28 trong nhánh điều trị, động vật nghiên cứu được cho 6 giờ để tiêu thụ thức ăn hàng ngày của nó (225 g). Tại thời điểm kết thúc giai đoạn này, thu thức ăn thừa bất kỳ và đo trọng lượng. Một lần một tuần, tiến hành phép đo tại thời điểm xác định về sự tiêu thụ thức ăn. Đo sự tiêu thụ 225g thức ăn ở 1, 2, 4 và 6 giờ sau khi cho ăn để xác định phần ăn của mỗi con chó đã trở lại bình thường.

Đo khối lượng cơ thể: Đo khối lượng cơ thể trong cả hai nhánh chất dẫn thuốc và điều trị theo nghiên cứu. Trong nhánh chất dẫn thuốc, đo khối lượng cơ thể ở thời điểm tiêu chuẩn và các ngày 2, 4, 7, 10 và 14. Trong nhánh điều trị, đo khối lượng cơ thể ở thời điểm tiêu chuẩn và các ngày 2, 4, 7, 10, 14, 17, 21, 24 và 28. Khối lượng cơ thể được đo ở ngày 2 và 4 là không đổi. Tất cả khối lượng cơ thể khác được đo ở trạng thái đổi.

Liên hợp của Ví dụ 2 được thử nghiệm ở các thử nghiệm trên

Liều đơn sơ cho chó

Liều				Thời gian tác động
------	--	--	--	--------------------

(ug/kg)	Sự thay đổi khối lượng cơ thể (%) (ở 14 ngày)	Sự thay đổi nạp thức ăn (% chất dẫn thuốc) (0-6 giờ)	(0-96 giờ)	Sự giảm nạp thức ăn (FI) (ngày)	Sự giảm khối lượng cơ thể (BW) (ngày)
5	-5	55	45	7	14
15	-5	60	38	9	14
50	-13	50	26	7	18
dGDF15 (50ug/kg)	----	31			

Bảng 4

Thể liên hợp GDF15 cải thiện các phép đo ở các bệnh chuyển hóa bao gồm các loại bệnh đái tháo đường và bệnh gan nhiễm mỡ ở chuột béo phì

Chuột béo phì do chế độ ăn được dùng một lần hàng tuần bằng chất dẫn thuốc hoặc Ví dụ 19Bm (0,5mg/kg/ s.c.) trong 4 tuần. Glucoza và insulin khi không nhịn ăn được đo 2 tuần sau liều thứ nhất, và glucoza và insulin trong máu khi nhịn ăn qua đêm được đo 4 tuần sau liều thứ nhất. Ví dụ 19Bm glucoza khi không nhịn ăn giảm khoảng 23% (207,1 mg/dl chất dẫn thuốc được điều trị bằng 160,4mg/dl Ví dụ 19Bm; $p<0.05$). Ví dụ 19Bm mức insulin khi không nhịn đói giảm khoảng 75% so với chuột được điều trị bằng chất dẫn thuốc (2,1 vs 8,7 ng/ml; $p<0.05$). Bốn tuần sau liều ban đầu, Ví dụ 19Bm glucoza trong máu khi nhịn đói giảm khoảng 28% (142,7 vs. 199,5 mg/dl; $p<0,05$) và insulin khi nhịn đói giảm khoảng 78% (0,77 vs. 3,5 ng/ml; $p<0.05$). Các dấu hiệu của bệnh gan nhiễm mỡ cũng cải thiện bằng liều bốn lần, một lần một tuần của Ví dụ 19Bm. Ví dụ 19Bm gan nhiễm mỡ giảm khoảng 57,5% (11,36 vs. 26,73% mỡ trong gan; $p<0,05$) và các mức độ huyết thanh của dấu hiệu tổn thương gan, alanin aminotransferaza (ALT), khoảng 58% (46,2 vs. 110,5 U/L; $p<0,05$). Ngoài ra, Ví dụ 19Bm làm giảm biểu hiện ở gan của PNPLA3, gen gây bệnh ở các bệnh gan tiến triển, khoảng 77% ($p<0,05$).

Hoạt tính và tính ổn định trong huyết tương của các liên hợp chủ vận APJ của Các ví dụ 20 và 21 theo sáng chế có thể được đánh giá bằng các phương pháp in vitro và in vivo sau đây được mô tả sau đây.

Thử nghiệm dòng canxi hAPJ:

Các tế bào ổn định Chem-5 APJ (Millipore # HTS068C) được dàn mỏng vào đĩa 384 giếng với 10.000 tế bào/giếng trong 25 μ l môi trường sinh trưởng, sau đó sinh trưởng 24 giờ ở 37°C bằng tủ ẩm nuôi cấy mô. Một giờ trước khi thử nghiệm, thêm 25 μ l/giếng thuốc nhuộm FLIPR Calcium 4 (Molecular Devices R8142) với probenecid 2,5mM, và ủ các tế bào một giờ bằng tủ ẩm nuôi cấy mô 37°C. Hòa tan các peptit trong HBSS, HEPES & chất đệm BSA 0,1%, và pha loãng liên tiếp 10-lần, từ 50 μ M đến 5 pM, ba lần. FLIPR Tetra được sử dụng để thêm peptit vào tế bào với thuốc nhuộm (1:5, với nồng độ peptit cuối cùng trong khoảng từ 10 μ M đến 1 pM). Thuốc nhuộm FLIPR bên trong tế bào phát huỳnh quang sau khi gắn kết với canxi, trong khi huỳnh quang từ bên ngoài tế bào bị giấu đi. Đo huỳnh quang bằng cách sử dụng bước sóng kích thích 470-495 và bước sóng phát xạ 515-575 trên FLIPR Tetra. Việc đọc được tiến hành trong tổng thời gian 3 phút, bắt đầu từ 10 giây trước khi thêm peptit. Tính các giá trị tối đa-tối đa và vẽ đồ thị với mỗi nồng độ peptit, và sử dụng phần mềm GraphPad prism để tính các giá trị EC₅₀ ở các điểm uốn của đường cong, đối với sự kích thích dòng canxi bằng các peptit.

Thử nghiệm in vivo:

Hòa tan thể liên hợp trong PBS (Muối đệm phosphat) đến nồng độ 1mg/ml để tạo thành dung dịch liều. Dung dịch liều được dùng qua đường tĩnh mạch cho chuột Sprague-Dawley đực qua tĩnh mạch bên của đuôi ở thể tích 1ml/kg khối lượng cơ thể, tương ứng với liều 1mg/kg. Lấy các mẫu máu tĩnh mạch từ ống tĩnh mạch cổ ở các thời điểm quy định sau khi dùng liều và đặt ngay trên đá ướt. Ly tâm các mẫu này ở 4°C, với dịch nổi huyết tương được chuyển vào ống nghiệm sạch để phân tích.

Thử nghiệm sinh học:

Chuẩn bị đường cong tiêu chuẩn: Điều chế dung dịch gốc bằng cách hoà tan thể liên hợp peptit trong nước đến 1 mg/ml. Trộn 10 μ L dung dịch gốc với 990 μ L huyết tương của chuột để tạo thành dung dịch gốc hoạt động của 10,000 ng/ml

trong huyết tương. Pha loãng liên tục dung dịch này trong huyết tương để tạo thành các mẫu chuẩn 5000, 1000, 500, 100, 50, 10, 5 và 1ng/ml.

Chuẩn bị mẫu và mẫu chuẩn: chuyển 25uL mẫu huyết tương hoặc mẫu chuẩn vào đĩa sạch. Thêm 150uL axetonitril:MeOH (1:1) chứa 100ng/ml glyburit làm mẫu chuẩn nội vào mỗi lọ phản ứng và khuấy đĩa để trộn các thành phần. Ly tâm đĩa ở 4000 vòng/phút ở 4°C. Chuyển 125uL dịch nổi vào đĩa sạch, trộn với 50uL nước và phân tách LC/MS.

Thử nghiệm LC/MS:

HPLC: Agilent 1290 HPLC với mẫu tự động

Cột: MAC-MOD ACE C18, 3µm, 30mm x 2,1mm i.d.

Pha di động A: axit formic 0,1% trong axetonitril

Pha di động B: axit formic 0,1% trong nước

Chương trình Gradient:

Thời gian (phút)	Dòng (mL)	Pha di động A(%)	Pha di động B(%)
0	0,7	98	2
0,5	0,7	98	2
1,5	0,7	5	95
2,5	0,7	5	95
2,6	0,7	98	2
3,1	0,7	98	2

Khối phổ: AB Sciex 6500

Điều kiện MS Q1 (m/z+) 809,3; Q3 (m/z+) 923,7; DP: 60; CE : 25

Phân tích dữ liệu: Thu được dữ liệu MS và phân tích bằng cách sử dụng Phần mềm WatsonLIMS v7.4.

Hoạt tính và độ ổn định của thể liên hợp chất chủ vận APJ theo sáng chế sử dụng các thử nghiệm đã được mô tả ở trên

Peptit	EC ₅₀ dòng Ca ²⁺ hAPJ [nM]	Tính ổn định trong huyết tương in vivo t _{1/2} [h]
--------	---	---

pE-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P- (D-Nle)-NH(Phenetyl) (disulfua C ⁴ -C ⁷)	3	0,9
pE-R-P-R-L-C*-H-K-G-P- Nle-C*-F-OH(Disulfua C ⁶ - C ¹²) (SEQ ID NO: 18)	1,04	0,7
Ví dụ 20A	2479	—
Ví dụ 21A	65	7,4
Ví dụ 21B	839	—

Bảng 5

Hoạt tính và tính ổn định trong huyết tương của thể liên hợp oxytocin của Ví dụ 26A và 26B theo sáng chế có thể được đánh giá bằng các phương pháp in vitro và in vivo sau đây được mô tả sau đây.

Mô tả thử nghiệm In vitro:

Nguyên liệu & phương pháp

Chuẩn bị đĩa hợp chất

Điều chế các hợp chất được cung cấp trong DMSO và cuối cùng là điều chế trong Dung dịch đệm thử nghiệm Eurofins Discovery Services GPCRProfiler® đến nồng độ cao gấp ba lần so với nồng độ thử nghiệm cuối cùng. Tương tự, các đối chứng sử dụng chất dẫn thuốc và đối chứng dương được chuẩn bị để đảm bảo tất cả các thử nghiệm được kiểm soát thích hợp.

Đối chứng tham chiếu

Đích GPCR	Chất chủ vận tham chiếu	E _{max}
OT	Oxytocin	1,25μM

Chuẩn bị tất cả các giếng bằng cách sử dụng chất đệm thử nghiệm Eurofins Discovery Services GPCRProfiler®. Chất đệm thử nghiệm GPCRProfiler® là dung dịch muối cân bằng Hanks (Hanks Balanced Salt-Solution HBSS) được cải biến trong đó HBSS được bổ sung để chứa 20mM HEPES và 2,5mM Probenecid ở pH7,4.

Thử nghiệm dòng canxi

Thử nghiệm chất chủ vận

Dàn mỏng hợp chất được cung cấp được hai lần với mỗi nồng độ được thử nghiệm.

Chất chủ vận tham chiếu, oxytocin, được chuẩn bị theo cách tương tự để đóng vai trò như đối chứng thử nghiệm. Chất chủ vận tham chiếu, oxytocin, được chứa ở Emax (ở nồng độ mà ở đó chất chủ vận tham chiếu đem lại phản ứng tối đa).

Thử nghiệm chất chủ vận được tiến hành trên thiết bị FLIPRTETRA trong đó các hợp chất thử nghiệm, các đối chứng sử dụng chất dẫn thuốc, và chất chủ vận tham chiếu được thêm vào đĩa thử nghiệm sau khi đường cơ sở huỳnh quang/phát quang được hình thành. Thử nghiệm chất chủ vận có tổng 180 giây và được sử dụng để đánh giá mỗi khả năng của hợp chất để hoạt hóa mỗi GPCR thử nghiệm.

Sau khi hoàn thành thử nghiệm chất chủ vận ba phút, ủ đĩa thử nghiệm ở 25°C thêm bảy (7) phút.

Xử lý dữ liệu

Tất cả các đĩa được đưa vào các điều chỉnh đường cơ sở thích hợp. Khi các điều chỉnh tiêu chuẩn được tiến hành, xuất ra giá trị huỳnh quang/phát quang tối đa và dữ liệu được thao tác để tính toán phần trăm hoạt hóa và phần trăm ức chế. Giá trị âm từ 0 đến -30% có thể là kết quả của các biến đổi sinh học. Sự tính toán thao tác dữ liệu như sau: $((RLU \text{ tối đa}) - (Avg. \text{tiêu chuẩn})) / ((Avg. \text{dương tính}) - (Avg. \text{tiêu chuẩn}))$

Mô tả thử nghiệm in vivo:

Hòa tan thể liên hợp trong PBS (Muối đệm phosphat) đến nồng độ 3mg/ml để tạo thành dung dịch liều. Dùng dung dịch liều theo đường tĩnh mạch cho chuột Sprague-Dawley đực qua tĩnh mạch bên của đuôi ở thể tích 1ml/kg khối lượng cơ thể, tương ứng với liều 3mg/kg. Mẫu máu tĩnh mạch được lấy từ ống tĩnh mạch ở cổ tại các thời điểm quy định sau khi dùng liều và được đặt ngay lập tức vào đá khô. Ly tâm các mẫu này ở 4°C, chuyển dịch nổi huyết tương vào ống nghiệm sạch để phân tích.

Phân tích sinh học:

Chuẩn bị đường cong tiêu chuẩn: Điều chế dung dịch gốc bằng cách hòa tan thể liên hợp peptit và peptit vào hai lọ phản ứng tách biệt trong dimethylsulfoxit đến 1 mg/ml. Trộn 10uL mỗi dung dịch gốc với 980uL huyết tương chuột để tạo thành dung dịch gốc hoạt động ở 10,000ng/ml trong huyết tương. Lần lượt pha loãng dung dịch này để tạo thành mẫu chuẩn 5000, 1000, 500, 100, 50, 10, 5, 1, 0,5, và 0,1ng/ml.

Điều chế mẫu và mẫu chuẩn: Chuyển 25uL mẫu huyết tương hoặc mẫu chuẩn vào đĩa sạch. Thêm 150uL axetonitril bao gồm 100ng/ml glyburit làm mẫu chuẩn nội vào mỗi lọ phản ứng và các đĩa được khuấy để trộn các thành phần. Ly tâm đĩa ở 4000 vòng/phút ở 4C. Chuyển 125uL dịch nổi vào đĩa sạch, trộn với 150uL nước và phân tích bằng LC/MS.

Thử nghiệm LC/MS:

HPLC: Agilent 1290 HPLC với mẫu tự động

Cột: MAC-MOD ACE C18, 3µm, 30mm x 2,1mm (i.d.)

Pha di động A: axit formic 0,1% trong axetonitril

Pha di động B: axit formic 0,1% trong nước

Chương trình Gradient:

Thời gian (phút)	Dòng (mL)	Pha di động A(%)	Pha di động B(%)
0	0,7	98	2
0,5	0,7	98	2
2.0	0,7	2	98
2,5	0,7	2	98
2,6	0,7	98	2
3.0	0,7	98	2

Khối phổ: AB Sciex 6500

Điều kiện MS peptit Q1 (m/z+) 945,20; Q3 (m/z+) 687,27; DP: 140; CE : 39

Điều kiện MS liên hợp peptit: Q1 (m/z+) 1270,85; Q3 (m/z+) 468.30; DP : 140; CE : 77

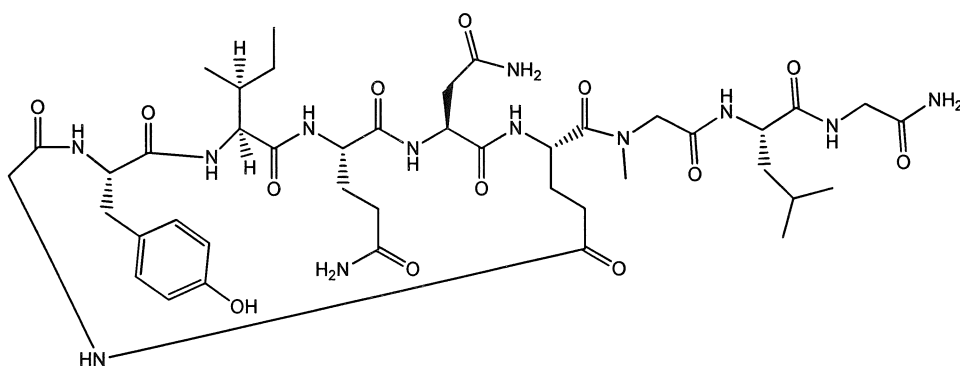
Phân tích dữ liệu: Thu được dữ liệu MS và analyzed sử dụng Phần mềm WatsonLIMS v7.4.

Hoạt tính và độ ổn định của thể liên hợp axit béo oxytoxin theo sáng chế theo các thử nghiệm đã được mô tả ở trên

Peptit	EC ₅₀ dòng Ca ²⁺ OT [nM]	Tính ổn định trong huyết tương in vivo t _{1/2} [h]
Ví dụ 26A	8,4	46
Chất tương tự oxytocin không được liên hợp Ví dụ 13 của WO2014/095773	7,8	0,6

Bảng 6

Ví dụ 13 của WO2014/095773 được thể hiện sau đây:



Thế liên hợp oxytocin-axit béo theo sáng chế minh họa sự tăng chu kỳ bán rã 75 lần so với chất tương tự oxytocin không được liên hợp.

Hoạt tính và tính ổn định trong huyết tương của liên hợp AgRP của Ví dụ 27A và 27 B theo sáng chế có thể được đánh giá bằng các phương pháp in vitro và in vivo được mô tả sau đây.

A) Cách thức thử nghiệm HTRF cAMP:

Cấy chuyển của tế bào HEK293/MC4R

Tế bào: dòng tế bào ổn định HEK293/MC4R

Môi trường đầy đủ: DMEM/F12 1:1 (Gibco, Cat. No. 11039, Đối với thử nghiệm, môi trường không phenol đỏ Cat. No.21041)

10% FBS (bất hoạt bằng nhiệt, Gibco, Cat. No. 10082)

200 μ g/mL Geneticin (Gibco, Cat. No. 10131)

15 mM Hepes (GIBCO, Cat No. 15630)

2mM L-glutamin (GIBCO, Cat No. 25030)

Bình phản ứng: Bình xử lý nuôi cấy mô 150cm² (Corning, Cat. No. 430825).

- Môi trường tạo điều kiện hút
- Rửa bằng 25mL DPBS (Gibco, Cat. No. 14190), sau đó hút nó
*FBS ức chế điều trị Trypsin-EDTA.
- Thêm 2,5mL 0,05% Trypsin-EDTA (Gibco, Cat. No. 25300)
- Để yên trong vài phút, sau đó gõ vào bình vài phút để tách các tế bào
- Thêm 25mL môi trường đầy đủ để dừng xử lý Trypsin-EDTA
*Chuẩn bị tế bào cho các thử nghiệm, môi trường đầy đủ không phenol đỏ được sử dụng.
- Hút bằng pipet nhẹ nhàng vài lần để tạo huyền phù các tế bào kết tụ
- Chuyển huyền phù vào ống ly tâm 50mL
- Quay ở 1200 vòng/phút trong 3 phút
- Hút dịch nổi
- Phân tán các tế bào bằng cách gõ nhẹ vào đáy
- Thêm 5-10mL môi trường đầy đủ, sau đó tạo huyền phù bằng cách hút bằng pipet nhẹ nhàng
*Chuẩn bị các tế bào cho các thử nghiệm, môi trường đầy đủ không phenol đỏ được sử dụng.
- Chuyển 0,5mL huyền phù vào lọ đựng mẫu đối với Vi-cell
- Đếm số tế bào bằng cách sử dụng Vi-cell *Ghi lại mật độ tế bào Record cell density và khả năng sống sót mọi lần
- Chuyển 1-3x10⁶ tế bào vào bình phản ứng 150cm mới
Trong 3 ngày: 3x10⁶ tế bào/bình
Trong 4 ngày: 1x10⁶ tế bào/bình
- Ủ ở 37°C với 5% CO₂

Cấy tế bào cho các thử nghiệm HTRF cAMP (Một ngày trước khi thử nghiệm)

- Chuẩn bị huyền phù tế bào trong như trong phần cấy chuyển

- Pha loãng huyền phù đến $2,34 \times 10^5$ tế bào/mL
*13mL là đủ cho một đĩa 384 giếng.
- Phân tán 30 μ L huyền phù tế bào vào mỗi giếng của đĩa sạch 384 giếng Poly-D-Lysin BIOCOAT (Becton Dickinson, Cat. No. 354660): 7000 tế bào/giếng
*Đĩa phủ Poly-D-lysine là cần thiết trong thử nghiệm này.
*Không có tế bào cho các giếng theo tiêu chuẩn cAMP
- Ủ ở 37°C với 5% CO₂ qua đêm

Thử nghiệm HTRF cAMP

1. Chuẩn bị chất phản ứng

- IBMX 1M

IBMX (MW 222,25g/mol, ACROS Cat. No. 228420010)
111

mg

DMSO (Sigma Aldrich, Cat. No. D2650)
500 μ

L

Lưu trữ ở 4°C

- 40mg/mL dung dịch BSA

Albumin huyết thanh của bò (Sigma A7030-50G)
200

mg

dH₂O 5mL

Lưu trữ ở 4°C

- 1mg/mL (176 μ M) dung dịch nước cái AgRP (trong HBSS/ 2mg/mL BSA)

R&D đầu tận cùng C AgRP của người (Cat.No. 3726-AG-100) 100 μ g/lọ

1x Dung dịch muối đệm Hanks (HBSS) (Gibco, Cat. No. 14065, w/Ca và Mg)
95 μ

L

40mg/mL dung dịch BSA 5 μ L

Lưu trữ ở 4°C

- 2mM dung dịch nước cái NDP-aMSH

NDP-aMSH (MW 1646.9, Bachem, Cat. No. H1100)

1mg/lọ

dH₂O

304u

L

*Khi hòa tan, phân tán phần phân ước 10uL vào ống nghiệm 200uL, sau đó lưu trữ ở -20C

- Dung dịch đệm thử nghiệm 1

HBSS

10m

L

1M

Hepes

(Gibco,

Cat.

No.15630)

0,2

mL

1M

IBMX

20u

L

*Để tránh sự kết tủa IBMX, khuấy dung dịch đệm cho tới khi tan hoàn toàn.

- Dung dịch đệm thử nghiệm 2

HBSS

20m

L

1M

Hepes

(Gibco,

Cat.

No.15630)

0,4

mL

1M

IBMX

40u

L

40mg/mL

BSA

solution

0,25

mL

* Để tránh sự kết tủa IBMX, khuấy dung dịch đệm cho tới khi tan hoàn toàn.

- 6nM NDP-aMSH đối với chuẩn độ IgG và chuẩn độ AgRP

2uM NDP-aMSH (pha loãng 1000 lần dung dịch nước cái)
10,8

uL

Dung dịch đậm thử nghiệm 1
3600

uL

*Ví dụ cho một thử nghiệm 384 giếng

- 120nM AgRP cho chuẩn độ IgG

Dung dịch nước cái được pha loãng 10 lần (17,6uM)
26u

L

Dung dịch đậm thử nghiệm2
3800

uL

*Ví dụ cho một đĩa 384 giếng

- dung dịch hoạt động NDP-aMSH để chuẩn độ (xem các chất phản ứng)
- Dung dịch hoạt động AgRP để chuẩn độ (xem các chất phản ứng)
- Dung dịch hoạt động IgG để chuẩn độ (xem các chất phản ứng)
- Dung dịch tiêu chuẩn cAMP (xem các chất phản ứng)

2. Thử nghiệm (cách thức 2 bước)

Kit thử nghiệm: kit Cisbio cAMP HiRange HTRF (Cat. No. 62AM6PEB)

– Chuẩn bị hỗn hợp IgG/AgRP (1:1)

- Trộn 15uL dung dịch hoạt động IgG và 15uL AgRP 120nM, sau đó ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ môi trường

– Chuẩn bị đĩa thử nghiệm

- Loại bỏ môi trường nuôi cấy bằng cách đảo ngược đĩa thử nghiệm 384 giếng chứa các tế bào trên Wipeall, sau đó vỗ nhẹ để loại bỏ môi trường nuôi cấy.
- Thêm 100μL DPBS vào mỗi giếng và loại bỏ theo cùng cách thức

*Khi loại bỏ PBS, chuyển sang bước tiếp theo nhanh nhất để tránh bị khô

- Chuyển 10 μ L các chất phản ứng sau vào mỗi giếng dựa vào sự xếp mẫu

Tiêu chuẩn cAMP	: tiêu chuẩn cAMP
Đối chứng âm đối với chuẩn độ cAMP	: Pha loãng bằng kit HTRF
Đối chứng dương	: đối chứng dương cAMP bằng kit HTRF
Chuẩn độ MSH	: Dung dịch đệm thử nghiệm 2
Chuẩn độ AgRP	: dung dịch hoạt động AgRP
Chuẩn độ IgG	: hỗn hợp IgG/AgRP
Đối chứng âm đối với thử nghiệm tế bào	: Dung dịch đệm thử nghiệm 2

- Quay nhanh đĩa đĩa 384 giếng ở 1200 vòng/phút
- Ủ tế bào trong 15 phút ở nhiệt độ môi trường
- Thêm 10 μ L các chất phản ứng sau vào mỗi giếng dựa trên sự sắp xếp mẫu của bạn

tiêu chuẩn cAMP	: Dung dịch đệm thử nghiệm 1
Đối chứng âm đối với chuẩn độ cAMP	: Dung dịch đệm thử nghiệm 1
Đối chứng dương	: Dung dịch đệm thử nghiệm 1
Chuẩn độ MSH	: Dung dịch hoạt động MSH
Chuẩn độ AgRP	: dung dịch MSH 6nM
Chuẩn độ IgG	: dung dịch MSH 6nM
Đối chứng âm đối với thử nghiệm tế bào	: Dung dịch đệm thử nghiệm 1

- Quay nhanh đĩa 384 giếng ở 1200 vòng/phút
- Ủ tế bào thêm 30 phút ở nhiệt độ môi trường

*Thời gian ủ này không quá chính xác. +/- 5 phút là ổn theo dữ liệu xây dựng thử nghiệm.

- Thêm 10 μ L cAMP-d2 (pha loãng 1:4 trong chất đệm lysis được cung cấp ở kit)

*Chú ý!! Với đối chứng âm, không có cAMP-d2, nhưng có chất đệm lysis

- Thêm 10 μ L Cryptat chống-cAMP (pha loãng 1:4 trong chất đệm lysis được cung cấp trong kit)
- Quay nhanh ở 1200 vòng/phút.
- Ủ đĩa thử nghiệm trong 45 -60min ở nhiệt độ môi trường.
- Chuyển 30 μ L mỗi mẫu vào nuôi cấy mô được xử lý bằng đĩa thử nghiệm 384 giếng polystyren trắng (Corning, Cat. No. 3572)
- Quay nhanh ở 1200 vòng/phút.
- Đo huỳnh quang bằng thiết bị phân tử M5 hoặc M5e bằng thiết lập sau.

Thiết lập thiết bị phân tử M5/M5e

Loại thử nghiệm	Huỳnh quang phân giải theo thời gian
Integ trì hoãn	50us
Integration	400us
Đọc	Đọc đỉnh
Bước sóng	Ex 314nm/Em668nm Cutoff 630nm
	Ex318nm/Em570nm Cutoff 570nm
Trộn tự động	Tắt
Hiệu chuẩn tự động	Bật
Độ nhạy	Reading 75
PMT	Bật
Đĩa	384 giếng tiêu chuẩn opaque
Thời gian cài đặt	Tắt
Ưu tiên bước sóng cột	Ưu tiên cột
Tốc độ vận chuyển	Thông thường
Đọc tự động	Tắt

B) Thử nghiệm MC3 cAMP

Các nguyên liệu:

Tế bào: dòng tế bào ổn định HEK293/MC3R

Môi trường đầy đủ: DMEM/F12 1:1 (Gibco, Cat. No. 11039)

10% FBS (Bất hoạt bằng nhiệt, Gibco, Cat. No. 10082) x

200 μ g/mL Geneticin (Gibco, Cat. No. 10131)

2mM L-glutamin (GIBCO, Cat No. 25030)

Bình phản ứng: bình xử lý nuôi cấy mô 150cm² (Corning, Cat. No. 430825).

Dung dịch đệm thử nghiệm

HBSS (Gibco – 14175-095)

10m

L

Hepes 1M (Fisher, Cat. No. BP299-1)

0,2

mL

500mM IBMX (MW 222.25 g/mol, ACROS Cat. No. 228420010)

40ul

BSA

0,25%

Đĩa

Đĩa đáy tròn rắn 384 giếng, Greiner bio-one (Cat no. - 781080)

Phương thức thử nghiệm (Phương thức chất đối kháng):

- I. Môi trường tạo điều kiện hút
- II. Rửa bằng 2,5mL DPBS (Gibco, Cat. No. 14190)
- III. Thêm 2mL Trypsin-EDTA 0,25% (Gibco, Cat. No. 25200-056)
- IV. Để bình phản ứng vài phút trong tủ ấm, gõ vào bình phản ứng vài lần để tách tế bào.
- V. Thêm 10mL môi trường đầy đủ dừng xử lý Trypsin-EDTA và trộn mạnh bằng cách hút bằng pipet nhẹ nhàng vài lần để tạo huyền phù các tế bào kết tụ
- VI. Chuyển 1,5ml tế bào vào bình phản ứng dung tích 150cm mới chứa 20ml môi trường đầy đủ
- VII. Chuyển huyền phù còn lại vào ống ly tâm 50mL
- VIII. Quay ở 1200 vòng/phút trong 4 phút. Hút dịch nổi
- IX. Thêm 6mL dung dịch đệm thử nghiệm vào ống nghiệm và tạo huyền phù thể bào bằng cách hút bằng pipet nhẹ nhàng
- X. Chuyển 0,5mL huyền phù vào lọ mẫu đối với Vi-cell và thêm tiếp 0,5ml PBS.

- XI. Đếm số lượng tế bào bằng cách sử dụng Vi-cell *Ghi lại mật độ tế bào và tỷ lệ sống sót mỗi lần
- i. Đặt các tế bào trên đĩa ở 4K/giếng trong 10ul/giếng của dung dịch đệm thử nghiệm bao gồm IBMX.
 - ii. Để đĩa trong tủ ấm ~30 phút trước khi bắt đầu thử nghiệm trên các tế bào huyền phù.

Sau đó là phương thức cAMP hai bước để xác định cAMP.

Tiến trình

- I. Thêm 5ul AgRP được điều chế ở 3x trong dung dịch đệm thử nghiệm vào 10ul/giếng tế bào chỉ với các giếng chất đối kháng.
- II. Thêm 5ul chất đệm vào giếng đối chứng dương (các giếng sẽ có NDP- α -MSH).
- III. Ủ đĩa ở 37°C trong ~20 phút.
- IV. Thêm 5ul/giếng chất chủ vận EC80 (NDP- α -MSH) được điều chế ở 4X vào các giếng bao gồm AgRP DRC.
- V. Thêm 5ul/giếng chất chủ vận (NDP- α -MSH) DRC được điều chế ở 4X (nồng độ cao nhất cuối cùng là 100nM) để tính toán EC50 NDP- α -MSH
- VI. Chỉ thêm chất đệm vào đối chứng âm.
- VII. Quay xung đĩa 384 giếng và ủ các tế bào trong 30 phút bằng tủ ấm.
- VIII. Thêm 10 μ L các chất phản ứng sau vào mỗi giếng:
 - a. 10 μ L cAMP-d2
 - b. *Chú ý!! Với đối chứng âm, không thêm cAMP-d2, nhưng chỉ chất đệm lysis và 10ul/giếng Tb-cryptat
 - c. 10 μ L Cryptat kháng-cAMP
 - d. Quay xung đĩa và ủ trong 60 phút ở nhiệt độ phòng.

C. Mô tả thử nghiệm in vivo:

Hòa tan 10 nanomol liên hợp trong 300 μ L PBS (muối đệm phosphat) để tạo thành dung dịch liều. Dung dịch liều (300 μ M) được dùng theo đường tĩnh mạch cho chuột Sprague-Dawley đực qua tĩnh mạch bên ở đuôi (tương ứng với liều 10 nanomol mỗi con chuột). Lấy máu qua vết rạch ở đuôi ở các lần quy định sau khi dùng liều và đặt ngay lập tức

vào đá khô. Ly tâm các mẫu này ở 4°C, chuyển dịch nổi huyết tương vào ống nghiệm sạch để phân tích.

Phân tích sinh học:

Chuẩn bị đường cong tiêu chuẩn: Liên hợp hai axit béo của các ví dụ 27A và 27B và một peptit AgRP của người trưởng thành được sử dụng để tạo mẫu chuẩn. Các dung dịch gốc chất trung gian của mỗi AgRP được điều chế bằng cách pha loãng các peptit được đánh dấu gốc trong chất pha loãng mẫu ELISA với casein đến 100 ug/ml. Để thử nghiệm, pha loãng các chất trung gian đến nồng độ tiêu chuẩn đỉnh là 2500pg/mL và sau đó pha loãng 2 lần liên tục đến 16 điểm bao gồm liều số không tiêu chuẩn trong mẫu ELISA pha loãng với albumin huyết thanh của bò (BSA).

Pha loãng mẫu: Pha loãng mẫu huyết tương 10 lần và sau đó là 5 lần liên tiếp đến cho ra 31,250- lần trong chất pha loãng mẫu ELISA với BSA.

Phương pháp ELISA 5B1 AgRP của người: vi đĩa 384 giếng được phủ bằng dòng 5B1 kháng AgRP của người qua đêm ở 30uL/giếng trong 1x PBS ở nhiệt độ phòng (RT). Các đĩa được hút và phong bế bằng chất phong bế trên cơ sở sữa ở 90uL/giếng trong 2 giờ ở RT. Tất cả việc ủ thêm được tiến hành ở 30uL/giếng. Hút lại các đĩa và các mẫu và mẫu chuẩn được thêm vào các giếng trong 2 giờ ở RT. Sau đó rửa sạch các đĩa này ba lần bằng chất đệm tẩy rửa trên cơ sở phosphat với tween-20 và thêm kháng thể đa dòng kháng người của dê được biotinyl hóa vào các giếng để phát hiện AgRP liên kết trong 2 giờ ở RT. Rửa lại các đĩa và thêm chất phản ứng streptavidin được đánh dấu HRP vào các giếng trong 30 phút ở RT. Rửa lần cuối các đĩa và thêm chất hóa phát quang vào tất cả giếng và đọc các đĩa ngay trên Spectramx M5 với ánh sáng phát ra.

Phân tích dữ liệu: Dữ liệu thô được sắp xếp và phân tích về các thông số PK cơ bản.

Hoạt tính và Độ ổn định của thể liên hợp AgRP axit béo theo sáng chế theo các thử nghiệm đã được mô tả ở trên:

Peptit	MC4R EC50 [nM]	MC3R EC50 [nM]	Tính ổn định trong huyết tương in vivo $t_{1/2}$ [h]
Ví dụ 27A (liên hợp mono axit béo)	18	7	20
Ví dụ 27B (liên hợp di-axit béo)	167	65	52
AgRP	1,7	12	4.4

Bảng 7

Hoạt tính và tính ổn định trong huyết tương của liên hợp FGF23 của ví dụ 28A, 28B và 28C có thể được đánh giá bằng các phương pháp in vivo được mô tả sau đây.

Thử nghiệm hoạt tính in vitro

Egr-1-luxiferaza: Hoạt tính sinh học của thể liên hợp hFGF23-F tinh khiết được thử nghiệm bằng các thử nghiệm báo cáo Egr-1-luxiferaza. Gắn kết thể liên hợp hFGF23-FA với thụ thể FGF23 tạo thành sự hoạt hóa xuôi dòng Egr-1 và sự biểu hiện chỉ thị luxiferaza được điều hòa bởi promoter Egr-1. Gen chỉ thị Egr-1-luxiferaza được xây dựng dựa trên báo cáo của Urakawa et al. (Nature, 2006, Vol 444, 770-774). Các tế bào HEK293T được nuôi cấy trong đĩa poly-D-lysine 48 giếng được chuyển nạp bằng gen chỉ thị Egr-1-luxiferaza, dạng xuyên màng có chiều dài đầy đủ của Klotho và gen chỉ thị chuẩn hóa chuyển nạp (Renilla luxiferaza). Năm giờ sau khi chuyển nạp, hỗn hợp chuyển nạp được thay bằng 3ml DMEM cộng FBS 1% bao gồm các nồng độ được phân loại của protein thử nghiệm. Các tế bào được dung giải 20 giờ sau khi trong chất đệm lysis thụ động (Promega, Cat #E194A) và hoạt tính luxiferaza được xác định bằng cách sử dụng hệ thử nghiệm Glo Luxiferaza kép (Promega, Cat #E2940).

Kết quả

Ví dụ	EC50 (nM)
Ví dụ 28B	1,195
Ví dụ 28C	0,258

Bảng 8

Hoạt tính và tính ổn định trong huyết tương của liên hợp serelaxin axit béo của các ví dụ 29A và 29B theo sáng chế có thể được đánh giá bằng các phương pháp in vitro và in vivo được mô tả sau đây.

Thử nghiệm hoạt tính in vitro # 1:

Nguyên liệu:

DMEM: môi trường F12 (Gibco, cat#11320)

IBMX (Sigma, cat#I5879)

Đĩa trắng đáy tròn rắn 384 (Greiner bio-one, cat #781945)

20.000 dynamic-2 cAMP kit (Cisbio, cat#62AM4PEC)

Adenosin 3' , 5' -cyclic monophosphat (Sigma, cat#A9501)

Liên hợp đĩa chất nền cộng (được sử dụng để bổ sung 5 µl chất phản ứng thử nghiệm)

PBS-Gibco (cat#10010-023)

Ký hiệu viết tắt	Định nghĩa hoặc giải thích
cAMP	adenosin monophosphat vòng
RXFP1	Thụ thể được gắn relaxin/Insulin
DMSO	dimetyl sulfoxiy
HTRF	Huỳnh quang phân giải theo thời gian đồng nhất
8k	Tám nghìn
cAMP-d2	cAMP được đánh dấu bằng thuốc nhuộm d2
PDL	Poly-d-lysin
ul	Microlit
@	@
o/N	Qua đêm
uM	Micromol
Min	phút
37c	37 độ C
3x	Ba lần
hr	Giờ
DMEM:F12	Môi trường Dulbecco's Modified Eagle: Hỗn hợp dinh dưỡng F-12 (DMEM/F-12)
rhRLX	Relaxin của người tái tổ hợp
RPMI	Môi trường Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640
FRET	Truyền năng lượng cộng hưởng huỳnh quang
HEK293	Tế bào thận phôi người 293
IBMX	3-Isobutyl-1-metylxantin

nM	nano mol
std	mẫu chuẩn
con	Nồng độ
PBS	Muối đệm phosphat
cpd	Hợp chất
HS	Huyết thanh của người
HBSS	Dung dịch muối đệm Hanks

Phương thức:

Ngày1: Cấy các tế bào RXFP1-HEK293 / HEK293 gốc 8k trong 10µl môi trường DMEM:

F12 trong đĩa trắng được phủ PDL đáy tròn

Ngày2: Tiến hành thử nghiệm với hợp chất

Chế độ chất chủ vận (tổng quan):

- Các tế bào trong 10µl môi trường DMEM:F12 @37°C O/N
- 5µl của 2000µM(4x) của IBMX vào tế bào trong 30 phút ở 37°C
- 5 µl của 4x hợp chất/Serelaxin vào dung dịch trên trong 30 phút ở 37°C
(từ bước 3 pha loãng hợp chất, 400nM- nồng độ cuối là cao nhất 100nM)
- 10µl liên hợp cAMP-d2
- 10 µl liên hợp Kháng-cAMP cryptat
- Ủ trong 1 giờ ở RT
- Đọc tín hiệu FRET–Envision 665nm/620nm

Điều chế hợp chất

Serelaxin:

- 1) Pha loãng dung dịch gốc 683,3µM, tức là 11,7µl trong 188,3 PBS pH7,4 được pha loãng 3x lần trong PBS bằng cách chuyển 15µl hợp chất thành 30µl (nồng độ cuối là 40 µM) –bằng tay

- 2) Pha loãng 1:10, tức là 6 μ l dung dịch ở trên trong 54 μ l DMEM:F12 (nồng độ cuối là 4 μ M) –bằng tay
- 3) Pha loãng 1:10, tức là 10 μ l dung dịch ở trên trong 90 μ l DMEM:F12 (nồng độ cuối là 400nM) –bằng tay

Thẻ liên hợp Serelaxin- FA

- 1) Pha loãng dung dịch gốc đến 40 μ M trong PBS pH7,4 được pha loãng 3x lần trong PBS bằng cách chuyển 15 μ l hợp chất vào 30 μ l
- 2) Pha loãng 1:10, tức là 6 μ l dung dịch ở trên trong 54 μ l DMEM:F12 – bằng tay
- 3) Pha loãng 1:10, tức là 10 μ l dung dịch ở trên trong 90 μ l DMEM:F12 (pha loãng 1:100)-bằng tay

Axit béo

- 1) Pha loãng dung dịch gốc đến 40 μ M trong PBS pH7,4 được pha loãng 3x lần trong PBS bằng cách chuyển 15 μ l hợp chất thành 30 μ l
- 2) Pha loãng 1:10, tức là 6 μ l dung dịch ở trên trong 54 μ l DMEM:F12 –bằng tay
- 3) Pha loãng 1:10, tức là 10 μ l dung dịch ở trên trong 90 μ l DMEM:F12 (pha loãng 1:100)- bằng tay

Pha loãng đường cong cAMP tiêu chuẩn:

1. 150 μ l mẫu chuẩn cAMP được pha loãng trong môi trường DMEM:F12 vào cột thứ nhất (2800nM)
2. 100 μ l môi trường DMEM:F12 vào 10 cột tiếp theo (1-11)
3. pha loãng 3x, bằng cách chuyển 50 μ l vào 100 μ l
4. 20 μ l dung dịch từ bước 3 vào các giếng thích hợp của đĩa đường cong tiêu chuẩn
5. 10 μ l thẻ liên hợp kháng-d2 & kháng-cAMP cryptat
6. Ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng
7. Đọc tín hiệu FRET–Envision 665nm/620nm

Phân tích:

Nồng độ nM cAMP là Log (x) được chuyển bằng cách sử dụng phần mềm Graph pad prism
 Lượng cAMP được nội suy từ đường cong tiêu chuẩn sử dụng hồi quy phi tuyến 4 thông số.

Các giá trị nội suy được chuyển thành nM sử dụng phép biến đổi 10^Y

Lượng cAMP được tính được tạo đồ thị nồng độ hợp chất, sử dụng hồi quy phi tuyến 4 thông số

Kết quả

Hợp chất	EC50 (nM)
Serelaxin	1,12
Thế liên hợp Serelaxin-F Ví dụ 29B	4,51

Bảng 9

Hoạt tính in vitro khi có mặt albumin huyết thanh của bò và huyết thanh của người # 2:

Nguyên liệu:

DMEM: môi trường F12 (Gibco, cat#11320)

IBMX (Sigma, cat#I5879)

đĩa trắng đáy tròn rắn 384 (Greiner bio-one, cat #781945)

20,000 dynamic-2 cAMP kit (Cisbio, cat#62AM4PEC)

Adenosin 3' , 5' -monophosphat vòng (Sigma, cat#A9501)

Liên hợp đĩa chất nền cộng (được sử dụng để thêm 5µl chất thử nghiệm)

PBS-Gibco (cat#10010-023)

1M HEPES Gibco (cat-15630-080)

1X HBSS Gibco (cat-14175-095)

Dung dịch đệm thử nghiệm - 1xHBSS + 10mM HEPES

Albumin huyết thanh của bò cat# A2153 (Sigma-Aldrich)

Sigma Aldrich –H4522 (huyết thanh của người)

Điều kiện:

- 600µM BSA
- 4% huyết thanh của người
- 10% huyết thanh của người (Sigma aldrich –H4522)
- Dung dịch đệm thử nghiệm

Hợp chất thử nghiệm:

- Serelaxin
- Serelaxin-FA (Ví dụ 29A)

Xử lý hợp chất:

Serelaxin-: Dung dịch gốc là (796,57uM) tức là 4,75 mg/ml MW là 5963 Dalton

10ul dung dịch gốc serelaxin được hòa tan trong 190ul PBS, nồng độ cuối là 40μM, được pha loãng 3x lần bằng cách chuyển 30ul vào 60ul dung dịch đệm thử nghiệm đường cong 11 điểm, (A2-A12) điểm 12 là 0.

Thể liên hợp Serelaxin-FA: Dung dịch gốc là (287,79 uM) tức là 2,61mg/ml MW là 9069 Dalton

27,798 ul dung dịch gốc serelaxin được hòa tan trong 172,2ul PBS, nồng độ cuối là 40μM, pha loãng 3x lần bằng cách chuyển 30ul vào 60ul dung dịch đệm thử nghiệm đường cong 11 điểm, (A2-A12) điểm 12 là 0.

Điều chế dung dịch gốc BSA:

Với BSA 666,66 uM: tạo dung dịch đệm thử nghiệm 30ml bằng cách hòa tan 1,32gm BSA

Với BSA 600uM: tạo dung dịch đệm thử nghiệm 30ml bằng cách hòa tan 1,18gm BSA

Không BSA, chỉ có dung dịch đệm thử nghiệm

Huyết thanh của người

Với HS 4,44%: 1,34ml trong 28,66ml dung dịch đệm thử nghiệm

Với 4% HS: 1,2ml trong 28,8ml dung dịch đệm thử nghiệm

Với 11,11% HS : 3,33ml trong 26,67ml dung dịch đệm thử nghiệm

Với 10% HS : 3ml trong 27ml dung dịch đệm thử nghiệm

Tiến trình:

Ngày 1: Cấy 8.000 tế bào/giếng RXFP1-HEK293 và tế bào HEK293 (bố mẹ) trong thể tích 10µl/giếng trong môi trường DMEM:F12 cơ bản- trên đĩa đáy tròn rắn. Ủ các tế bào qua đêm ở 37°C/CO₂ 5%.

Ngày 2:

1. Rửa các tế bào 2x lần bằng 50ul dung dịch đệm thử nghiệm và vỗ nhẹ lên khăn giấy để loại bỏ dung dịch đệm thử nghiệm sau khi rửa lần thứ nhất và thứ hai
2. Xử lý sơ bộ tế bào bằng 15ul môi trường với IBMX (666,66uM) bao gồm môi trường tương ứng (600uM BSA, BSA 4%, huyết thanh của người 10% và dung dịch đệm thử nghiệm riêng lẻ) trong 30 phút ở 37⁰c
3. Lần lượt pha loãng các hợp chất 3x lần, đường cong 11 điểm –chuyển 15ul hợp chất từ giếng trước đó vào giếng tiếp theo với 30ul PBS, giếng 11 chỉ duy nhất PBS
4. Pha loãng (1:10) trong dung dịch đệm thử nghiệm từ bước 3 (tức là 10ul đến 90ul dung dịch đệm thử nghiệm)
5. Pha loãng lần nữa từ bước 4 (1:10) trong môi trường tương ứng (666,66µM BSA & 4,44% & 11,11% huyết thanh của người và dung dịch đệm thử nghiệm) nồng độ cuối của BSA là 600µM và huyết thanh của người là 4 & 10%
6. (*Ủ hợp chất trong 1 giờ ở RT trong môi trường tương ứng của chúng, trước khi thêm vào tế bào)
7. Thêm 5ul từ bước 6 tức là 4x Serelaxin/Serelaxin-FA vào 15ul tế bào trong 30 phút nữa ở 37⁰c (nồng độ đỉnh của Serelaxin là 100nM)
8. Thêm 10ul liên hợp cAMP d2
9. Thêm 10ul kháng-cAMP-Cryptat
10. Ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng
11. Đọc FRET trên Envision
12. Thiết lập đường cong tiêu chuẩn cAMP trong môi trường tương ứng của chúng.

Pha loãng đường cong cAMP tiêu chuẩn:

Dung dịch gốc nội của cAMP tiêu chuẩn là 1120000nM

1. Pha loãng dung dịch gốc nội (1:4) bằng cách hòa tan 20ul dung dịch gốc cAMP trong 60ul dung dịch đệm thử nghiệm
2. Pha loãng dung dịch (1:10) của bước 1 trong dung dịch đệm thử nghiệm (tức là 20ul trong 180ul dung dịch đệm thử nghiệm)
3. Pha loãng dung dịch (1:10) của bước 2 trong nồng độ tương ứng của HS 4,44% & 11,11% HS, BSA 666,66uM hoặc không BSA—Nồng độ cuối dùng sẽ kết thúc ở HS 4%, 10% và BSA 600μM.

Đường cong cAMP tiêu chuẩn

1. Thêm 150μl cAMP tiêu chuẩn tương ứng vào cột thứ nhất (2800nM)
2. Thêm 100μl dung dịch đệm thử nghiệm với nồng độ tương ứng 600uM BSA, 4% & 10% HS và 0%) vào 11 cột tiếp theo, tức là (2-12)
3. Pha loãng 3x, bằng cách chuyển 50μl thành 100μl các giếng tiếp theo, giếng thứ 12 là số Zero no cAMP
4. 20μl từ bước 3 vào các giếng thích hợp của đĩa đường cong tiêu chuẩn
5. Thêm 10μl liên hợp d2
6. Ủ 1 giờ nhiệt độ phòng
7. Đọc trên HTRF- Envision

Phân tích:

Nồng độ nM của cAMP là Log (x) được chuyển đổi bằng cách sử dụng sử dụng Graph pad prism

Lượng cAMP được nội suy từ đường cong tiêu chuẩn sử dụng hồi quy phi tuyến tính 4 tham số.

Các giá trị nội suy được chuyển hóa thành nM sử dụng biến đổi 10^Y

Lượng cAMP tính được được vẽ đồ thị nồng độ hợp chất, sử dụng hồi quy phi tuyến 4 thông số

Kết quả:

	EC ₅₀ (nM)			
	Huyết tương 0%	Huyết tương 4%	Huyết tương 10%	BSA 600uL
SeRelaxin	8	0,3	0,4	0,7
FA-SeRelaxin (Ex 29a)	100	11	15	15

Bảng 10

Thử nghiệm in vivo:

Các hợp chất (serelaxin và thể liên hợp serelaxin liên hợp) có thể được thử nghiệm trong nhiều mẫu động vật gặm nhấm để đánh giá phản ứng tim mạch chu kỳ dài và chu kỳ ngắn. Các mẫu chu kỳ ngắn—Chuột nhắt (chủng bất kỳ, nhưng ưu tiên DBA/2) hoặc chuột (chủng bất kỳ, nhưng ưu tiên Sprague-Dawley) được gây mê bằng cách cho hít isofluran, duy trì ở mức độ gây mê ổn định bằng isofluran ~2% trong oxy 100%, và nhiệt độ trực tràng được duy trì ở mức độ thông thường. Động mạch cảnh và tĩnh mạch cổ (chuột nhắt) hoặc động mạch và tĩnh mạch đùi (chuột) được bộc lộ qua vết rạch da, và mạch được thông. Ống thông động mạch được nối với bộ chuyển đổi áp suất và tín hiệu được chuyển đến hệ thu thập dữ liệu kỹ thuật số (ví dụ, Ponemah) để đo liên tục áp suất động mạch và kích thích nhịp tim. Theo cách khác, nhịp tim được kích thích bằng tín hiệu điện tim đồ được ghi lại qua kim điện cực được gắn dưới da. Sau khi để áp suất động mạch và nhịp tim ổn định, hỗn hợp chất phong bế tự trị (ví dụ, atropin và propranolol ở 2mg/kg mỗi chất) được dùng theo đường tĩnh mạch trong ~3-4 phút. Khi các thông số tim mạch tái ổn định, serelaxin hoặc thể liên hợp serelaxin được tiêm bằng cách tiêm nhanh qua tĩnh mạch trong ~ 3 giây. Relaxin tạo ra sự tăng nhịp tim với khởi phát chậm đặc trưng (phản ứng đỉnh trong ~6 phút) và thời gian duy trì hoạt động (giờ). Theo cùng cách chuẩn bị động vật, chức năng tim mạch (ví dụ, phân suất tổng máu, co ngắn sợi cơ, cung lượng tim) được đo bằng cách thu hàng loạt hình ảnh siêu âm tim, mà được phân tích ngoại tuyến.

Các mẫu chu kỳ dài—Chuột nhắt (chủng bất kỳ, nhưng ưu tiên DBA/2) hoặc chuột (chủng bất kỳ, nhưng ưu tiên Sprague-Dawley) được gây mê bằng cách cho hít isofluran và duy trì mức độ gây mê ổn định với isofluran ~2% trong oxy 100%. Thuốc giảm đau được dùng cùng lúc và sau khi phẫu thuật. Động mạch và tĩnh mạch đưa ống thông như được mô tả ở trên, nhưng các ống thông được hiện qua vùng da lưng, súc nước muối heparin hóa, và được gắn pin thép không gỉ. Ống thông dưới da cũng có thể được cấy dưới da ở chuột nhắt và được hiện theo cách tương tự. Ở chuột, các ống thông được gắn qua hệ dây đàn hồi/ quay. Vào ngày thí nghiệm, ống thông động mạch được nối với bộ chuyển đổi áp suất, chất phong bế tự trị thu được như được mô tả ở trên ngoại trừ chất phong bế có thể cũng được sử dụng qua ống thông dưới da ở chuột, và chất phong bế ở cả hai loài được duy trì sau đó truyền tĩnh mạch hoặc dưới da liên tục các chất tự trị. Áp suất động mạch và nhịp tim được kiểm soát liên tục bằng hệ thu thập dữ liệu kỹ thuật số. Sau khi để áp suất động mạch và nhịp tim ổn định, chất phong bế tự trị được dùng theo đường tĩnh mạch hoặc dưới da trong ~3-4 phút. Khi các thông số tim mạch tái ổn định, serelaxin hoặc thể liên hợp serelaxin được truyền bằng cách tiêm nhanh tĩnh mạch trong ~ 3 giây. Để đánh giá chức năng tim mạch và nhịp tim trong khoảng thời gian nhiều tuần ở chuột nhắt và chuột, thể liên hợp serelaxin được truyền dưới da 1-3 lần một tuần và thu hàng loạt hình ảnh siêu âm thời điểm tiêu chuẩn và hàng tuần sau đó.

Nguồn Serelaxin:

Serelaxin (relaxin của người 1 chuỗi tái tổ hợp)

Công ty Connetics, lot # 00L605

1,0mg/mL (lọ 5mL) trong chất đệm Na axetat 20nM (pH 5.0)

Pha loãng dung dịch gốc trong chất dẫn thuốc đến nồng độ serelaxin mong muốn cho mỗi liều.

Hoạt tính và tính ổn định trong huyết tương của thể liên hợp PIP của ví dụ 30 có thể được đánh giá bằng các phương pháp in vitro và in vivo được mô tả sau đây.

Thử nghiệm tiết insulin được kích thích bằng glucoza (GSIS):

Thử nghiệm GSIS được tiến hành như phép đo chức năng tế bào beta tuyến tụy in vivo để đáp ứng với protein cảm ứng Prolactin của người (hPIP) tái tổ hợp ở chuột béo phì do chế độ ăn uống (diet-induced obese - DIO) có lượng mỡ cao. Ngắn gọn là, chuột nhắt (m=5-7/nhóm) cho nhịn ăn qua đêm (5:00PM-8:00AM) và vào ngày thử nghiệm, khối lượng cơ thể và glucoza máu (BG; được xác định bằng dụng cụ đo glucoza Embrace) mà được thiết kế làm thời điểm cơ sở. Tiếp theo, cho chuột nhắt dùng hPIP (PIP liên hợp FA và tự nhiên; dung dịch trong PBS; được dùng ở 4ml/kg khối lượng cơ thể) hoặc đối chứng sử dụng chất dẫn thuốc (PBS) một lần theo đường tĩnh mạch (IV). 45 phút sau khi sử dụng hPIP, tất cả chuột nhắt được dùng liều glucoza qua đường miệng (3g/kg dextroza; dung dịch trong PBS; được dùng ở 4ml/kg khối lượng cơ thể). Glucoza máu được đo ngay trước khi nạp glucoza (được thiết kế ở thời điểm 0 phút) và ở 15 và 30 phút sau khi nạp glucoza. Lấy các mẫu máu để phân lập huyết tương và tiến hành đo insulin trong huyết tương ở 0, 15 và 30 phút sau khi dùng glucoza.

Thử nghiệm được động học (PK):

Đo sự tiếp xúc với huyết tương của hPIP ở chuột DIO sau khi sử dụng IV đơn. Ngắn gọn là, chuột DIO được cho ăn tự do (n=2) được dùng hPIP (PIP được liên hợp FA và tự nhiên; dung dịch trong PBS; được dùng ở 4ml/kg khối lượng cơ thể) một lần theo đường tĩnh mạch (IV). Lấy các mẫu máu và tách huyết tương ở liều sau 0,25, 0,5, 1, 3, 7, 24 và 48 giờ bằng thử nghiệm ELISA nội bộ (phương thức được thể hiện sau đây).

Đánh giá thử nghiệm bằng cách bước sau:

- Các đĩa được phủ bằng 30ul kháng thể hPIP ở nhiệt độ phòng qua đêm (được gọi là PIP-8-AB; được sản xuất nội bộ; NBC clone# 87,19G9A11, ở 8ug/ml trong PBS).
- Hút trước khi phong bế 2 giờ bằng 100ul chất phong bế.
- Hút và thêm 30ul mẫu để ủ trong 2 giờ, pha loãng các mẫu và mẫu chuẩn trong chất đệm Casein (1% Casein, 1,7mM Natri Phosphat Monobazơ, 8,1mM Natri Phosphat diaxit Heptahydrate, 0,15M Natri Clorua, 0,7% Triton X-100, và 0,1% Natri Azit.)
- Rửa các đĩa 3x 100ul bằng chất đệm tẩy rửa Teknova (0,05% Tween trong PBS)
- 30ul kháng thể PIP được biotinyl hóa (được gọi là PIP-6 Ab; được sản xuất nội bộ, MBC clone# 87.8C6B3, ở 10ug/ml trong chất đệm casein) và ủ trong 1 giờ

- Rửa như trên
- Thêm 30ul Streptavidine-HRP (Pierce cat # 21140, ở 0,4ug/ml trong chất đệm HRP) chất đệm HRP (Casein 0,4%, 1,7mM Natri Phosphat Monobazơ, 8,1mM Natri Phosphat diaxit heptahydrat, 0,15M Natri Clorua, và 0,1% Chloroaxetamit) ủ 30 phút.
- Được rửa như trên
- Thêm chất nền hóa phát quang Femto 30 (Thermo cat #34096) và đọc trực tiếp

Hoạt tính và Độ ổn định của thể liên hợp axit béo PIP theo sáng chế theo các thử nghiệm đã được mô tả ở trên

Peptit	Insulin huyết tương AUCB (ng/mL*min)**	Tính ổn định trong huyết tương in vivo t _{1/2} [h]	Cmax (nM)	MRT (hr)
Ví dụ 30	+75%	---13,8-	497,1	18,1
PIP không liên hợp	+29%	--18,0-	219,8	12,0

**so với chất dẫn thuốc

Bảng 11

Thể liên hợp axit béo PIP theo sáng chế có tiếp xúc kéo dài đem lại hiệu quả cải thiện

Hoạt tính và tính ổn định trong huyết tương của thể liên hợp NPFF của ví dụ 31 có thể được đánh giá bằng các phương pháp in vitro được mô tả sau đây.

Phương thức thử nghiệm cAMP với Kit Cisbio cAMP

Thể liên hợp NPFF-FA theo sáng chế được thử nghiệm khi có mặt Forskolin theo thử nghiệm được mô tả sau đây

Chất phản ứng/nguyên liệu

	Nhà cung cấp	Cat#	Nhiệt độ (Dung dịch gốc)
--	--------------	------	--------------------------

Đĩa đáy tròn sạch 384 Greiner 384 được phủ sơ bộ bằng Poly-Lysin	Greiner Bio-One	781944	
kit cAMP	Cisbio	62AM4PEJ	4°C/-20°C
DMSO	Sigma	D2650	
cAMP tiêu chuẩn (1,12mM trong dung dịch đệm thử nghiệm + IBMX)	Sigma	A9501	-80°C
Dung dịch gốc 5mM Forskolin (DMSO)	Sigma	F6886	-20°C
Dung dịch gốc 250mM IBMX (DMSO)	Sigma	I5879	-20°C
HBSS	Invitrogen	14175-095	Nhiệt độ phòng
HEPES	invitrogen	15630-080	Nhiệt độ phòng
PTX (độc tố Pertussis)	Sigma	P2880	-20°C
Axit béo tự do BSA (30%)	Sigma	A9205	4°C

Ngày 1: Đặt các tế bào vào đĩa 384 giếng.

“Phương thức cấy chuyển” sau đây.

1. Tạo môi trường sinh trưởng không có kháng thể (nếu cần thiết).
2. Môi trường sinh trưởng cân bằng mà không có bình kháng sinh trong bể nước 37°C sau khi phun với etanol 70%.
3. Tách các tế bào bằng Versene (3ml mỗi bình T,75).
4. Chuyển vào ống nghiệm Falcon 50ml bao gồm 17ml môi trường sinh trưởng.
5. Ly tâm 4min với 150g.
6. Tạo huyền phù các tua tế bào trong 10ml chất đệm kích thích. Đếm số tế bào.
7. Điều chế huyền phù tế bào trong môi trường sinh trưởng với kháng sinh ở 5'000 tế bào/50ul.
8. Dàn 50ul huyền phù tế bào sử dụng pipet Viaflow 384-125ul.

9. Để các đĩa trong chụp hút TC trong 15 phút.
10. Ủ ở 37°C, CO₂ 5% và độ ẩm 90%.

Ngày 2:

Điều chế dung dịch các chất phản ứng:

1. Dung dịch đệm thử nghiệm:
500 ml HBSS + 10 ml HEPES. Lưu trữ ở nhiệt độ phòng
Dung dịch đệm thử nghiệm: 250ml HBSS/HEPES + 250ul dung dịch IBMX 1000X + 0,1% BSA (825ul). làm sạch hàng ngày.
2. Dung dịch Forskolin 2X: nồng độ cuối 1uM trong thử nghiệm:
Để pha loãng hợp chất: 40ul FSK/100ml dung dịch đệm thử nghiệm.
Để pha loãng NPFF: 10ul DMSO/10ml 2X FSK.
3. Pha loãng NPFF: dung dịch gốc 1mM trong dH₂O- nồng độ cuối cùng trong thử nghiệm 1uM
 - a. 5ul dung dịch gốc/625ul ul FSK 2X/DMSO.
 - b. 100ul dung dịch a + 300ul FSK 2x/DMSO. Nồng độ cuối cùng trong thử nghiệm 1uM.
 - c. Tiến hành 10 bước pha loãng 1/4: 100 ul + 300 ul in FSK 2X/DMSO.
4. Pha loãng hợp chất: Dung dịch gốc 10mM trong DMSO- Nồng độ cuối cùng trong thử nghiệm 40uM
 - a. 5ul dung dịch gốc/625ul FSK 2X.
 - b. Tiến hành 11 bước pha loãng 1/4: 100ul + 300ul FSK 2X.
5. cAMP tiêu chuẩn:
 - a. 10ul dung dịch gốc cAMP tiêu chuẩn (1,12mM) + 90ul dung dịch đệm thử nghiệm.
 - b. 10ul dịch pha loãng a + 90ul chất đệm kích thích.

- c. 20 ul dịch pha loãng b + 428 ul chất đệm kích thích: 500 nM.
- d. Tiến hành 11 lần pha loãng $\frac{1}{2}$ bắt đầu từ dịch pha loãng c: 100ul dịch pha loãng c + 100ul chất đệm kích thích.

6. Chất phản ứng dò cAMP:

- a. d2-cAMP: 1000 ul/ 20 ml đệm ly giải. (250 ul/ 5 ml for một 384 giếng plate).
- b. Thẻ liên hợp Cryptat: 1000ul/20ml chất đệm ly giải. (250ul/5ml với một đĩa 384 giếng).

Tiến trình thử nghiệm

Bước một:

1. Điều chế chất đệm kích thích.
2. Để chất đệm ly giải Cisbio ở nhiệt độ phòng.
3. Điều chế WellMate (rửa bằng rượu 70% sau đó là dH₂O và HBSS/HEPES).
4. Điều chế Forskolin và pha loãng hợp chất.

Bước hai: Kích thích bằng Forskolin

1. Rửa các tế bào bằng 50ul chất đệm kích thích :
 - a. Gõ nhẹ vào đĩa để loại bỏ môi trường O/N.
 - b. Đặt khăn giấy lên mặt đĩa và ly tâm đĩa lộn ngược trong 20 giây ở 300 vòng/phút sử dụng ly tâm VWR Symphony 4417.
 - c. Thêm 50ul chất đệm kích thích sử dụng WellMate.
 - d. Gõ nhẹ vào đĩa để loại bỏ môi trường O/N.
 - e. Đặt khăn giấy trắng lên mặt đĩa và ly tâm lộn ngược trong 20 giây ở 300 vòng/phút sử dụng ly tâm VWR Symphony 4417.
 - f. Kiểm tra các tế bào dưới kính hiển vi.
2. Thêm 10ul chất đệm kích thích bao gồm IBMX sử dụng Viaflow 384
3. Thêm 10ul dung dịch Forskolin 2x bao gồm các hợp chất sử dụng Viaflow 384 (ở tầng 7). Trộn dung dịch trước khi thêm vào tế bào.

4. Ủ 30 phút ở nhiệt độ phòng (đặt đĩa ngăn kéo để tránh sự thay đổi nhiệt độ).
5. Chuẩn bị đường cong cAMP tiêu chuẩn và chất dò cAMP.
6. Thêm 20ul/giếng đường cong cAMP tiêu chuẩn vào đĩa đường cong tiêu chuẩn (đĩa tương tự đĩa thử nghiệm).

Bước 3: Thử nghiệm LANCE cAMP

1. Thêm 10ul d2 cAMP /giếng vào đĩa thử nghiệm sử dụng Combi 384.
2. Thêm 10ul/giếng liên hợp Cryptat vào đĩa thử nghiệm bằng tay.
3. Đậy kín đĩa.
4. Ủ trong tối thiểu một giờ ở nhiệt độ phòng (đĩa có thể được đọc trong vòng 24 giờ).
5. Đặt miếng băng dính lên đáy của đĩa.
6. Đọc bằng chương trình Envision “Cisbio 384 full plate”
7. Xem dữ liệu thô trong các file đính kèm.
8. Dữ liệu được phân tích bằng GraphPad (xem file trong file đính kèm).

Kết quả:

R2 của người	BSA 0,1% (FFA)	BSA 3% (FFA)	HSA 0,1%	HSA 3%
compound	IC50(nM) n=4	IC50(nM) n=4	IC50(nM) n=2	IC50(nM) n=2
NPFF	0,43 (+/- 0,11)	0,36 (+/- 0,17)	0,63 (+/- 0,25)	1,9 (+/- 1,7)
Ví dụ 31	53,9 (+/-26)	133 (+/-47)	33,5 (+/-3,11)	98,5 (+/-19)
Human R1	0,1% BSA (FFA)	3% BSA (FFA)	0,1% HSA	3% HSA
compound	IC50(nM) n=4	IC50(nM) n=4	IC50(nM) n=2	IC50(nM) n=2
NPFF	6,23 (+/- 3,3)	7,2 (+/- 6,0)	8,4 (+/- 0,6)	33,4 (+/- 29)
Ví dụ 31	>1000	>4000	620 (+/- 142)	>4uM

Bảng 12

Hoạt tính và tính ổn định trong huyết tương của thể liên hợp theo sáng chế trong đó phân tử sinh học là siRNA có thể được đánh giá bằng các phương pháp in vivo được mô tả sau đây.

Các phương pháp

Liên hợp của Ví dụ 24 là hợp chất của thể liên hợp APOC3 siARN với GalNAc (Ví dụ tham chiếu 3) và axit béo. Chuột chuyển gen APOC3 của người (B6;CBA-Tg(APOC3)3707Bres/J) được mua từ Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). Cho chuột ăn thức ăn của động vật gặm nhấm tiêu chuẩn và nước ad libitum với chu kỳ 12h sáng/tối. Trong điều kiện này, chuột chuyển gen APOC3 phát triển tự nhiên tăng triglycerit máu với hàm lượng TG huyết tương tăng rõ rệt (Aalto-Setälä K, J Clin Invest 1992). Bốn con chuột trong mỗi nhóm được tiêm dưới da bằng ví dụ tham chiếu 3 (APOC3 siRNA-GalNAc) hoặc liên hợp của Ví dụ 24 ở liều 25 mg/Kg khối lượng cơ thể. Lấy máu ở thời điểm tiêu chuẩn ngay trước khi tiêm, và các ngày 2, 4, 7 và 14 sau khi tiêm. Huyết tương được dùng để đo mức độ protein APOC3 của người bằng thử nghiệm HTRF từ Cisbio. ANOVA một chiều được sử dụng để so sánh sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các nhóm.

Kết quả

Các mức độ APOC3 trong huyết tương cơ sở là 176 ± 21 mg/dL và 178 ± 9 mg/dL trong ví dụ tham chiếu 3 và thể liên hợp 24 nhóm, một cách tương ứng. Ví dụ tham chiếu 3, nồng độ APOC3 trong huyết tương giảm phụ thuộc theo thời gian, khoảng 56% năm ngày sau khi dùng so với các mức tiêu chuẩn. Bằng cách so sánh, liên hợp của ví dụ 24 làm giảm APOC3 trong huyết tương hiệu quả hơn, với giảm 80% năm ngày sau khi dùng (Fig. 1). Thời gian hoạt động là tương ứng với cả hai ví dụ tham chiếu 3 và ví dụ 24 như thể hiện trong Fig. 1.

Thể liên hợp theo sáng chế có tính ổn định trong huyết tương là ít nhất 5h, ít nhất 10h, ít nhất 20h, ít nhất 30h, ít nhất 40h hoặc ít nhất 50h. Theo một phương án, sự cải thiện tính ổn định trong huyết tương so với phân tử sinh học không được liên hợp là ít nhất 2 lần, 5 lần, 10 lần, 20 lần, 30 lần, 40 lần hoặc 50 lần hoặc 75 lần.

Trị liệu tổ hợp

Thể liên hợp theo sáng chế có thể được sử dụng đồng thời với, hoặc trước hoặc sau, một hoặc nhiều chất điều trị bệnh khác. Thể liên hợp theo sáng chế có thể được sử dụng

riêng biệt, theo đường dùng giống hoặc khác nhau, hoặc cùng nhau trong cùng được phẩm làm chất khác.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất sản phẩm bao gồm thể liên hợp theo phương án bất kỳ trong số các phương án đã nêu hoặc hỗn hợp của thể liên hợp như được mô tả trong các phương án 10 và 13, và ít nhất một chất điều trị bệnh khác làm tổ hợp để dùng đồng thời, riêng biệt hoặc theo thứ tự trong trị liệu. Theo một phương án, trị liệu là điều trị rối loạn hoặc bệnh chuyển hóa, tiểu đường typ 2, béo phì, rối loạn lipit máu, mức độ glucoza cao, nồng độ insulin cao và bệnh thận do tiểu đường ở đối tượng cần dùng chúng, bao gồm: cho đối tượng sử dụng lượng có hiệu quả điều trị bệnh của thể liên hợp theo sáng chế, hoặc amit, este hoặc muối của chúng, trong đó phân tử sinh học là yếu tố biệt hóa tăng trưởng của người 15 (GDF15), chất tương tự, biến thể, đột biến, mảnh và các dạng biến thể khác của chúng.

Các sản phẩm được đề xuất làm tổ hợp bao gồm chế phẩm chứa thể liên hợp theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên, và (các) chất điều trị bệnh khác cùng trong một được phẩm, hoặc thể liên hợp theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên, và các chất điều trị bệnh khác ở dạng riêng biệt, ví dụ ở dạng kit.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất được phẩm chứa thể liên hợp theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên hoặc hỗn hợp của thể liên hợp theo phương án 10 hoặc 13, và (các) chất điều trị bệnh khác. Tùy ý, được phẩm có thể bao gồm tá dược được dùng, như được mô tả ở trên.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất kit bao gồm hai hoặc nhiều được phẩm riêng biệt, ít nhất một trong số các được phẩm ày bao gồm thể liên hợp theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên. Theo một phương án, kit chứa các thiết bị để lưu giữ riêng biệt các được phẩm đã nêu, chẳng hạn dụng cụ chứa, bình phân chia, hoặc bao gói kim loại phân chia. Ví dụ về kit này là bao gói phòng rộp, như thông thường được sử dụng để đóng gói viên nén, viên nang và tương tự.

Kit theo sáng chế có thể được sử dụng để sử dụng các dạng liều khác nhau, ví dụ, qua đường miệng, dưới da và ngoài đường tiêu hóa, để sử dụng các được phẩm riêng biệt ở các khoảng liều lượng khác nhau, hoặc để chuẩn độ các được phẩm riêng biệt với một được

phẩm khác. Để hỗ trợ việc tuân thủ dùng được phẩm, thông thường kit theo sáng chế bao gồm các hướng dẫn sử dụng.

Trong các trị liệu tổ hợp theo sáng chế, thể liên hợp theo sáng chế và chất điều trị bệnh khác có thể được sản xuất và/ hoặc bào chế theo các sản xuất giống hoặc khác nhau. Ngoài ra, thể liên hợp theo sáng chế và chất điều trị bệnh khác có thể được kết hợp cùng nhau vào trị liệu tổ hợp: (i) trước khi phát hành sản phẩm kết hợp đến các bác sĩ (ví dụ trong trường hợp kit chứa thể liên hợp theo sáng chế và chất trị bệnh khác); (ii) bởi chính các bác sĩ (hoặc dưới sự hướng dẫn của các bác sĩ) ngay trước khi sử dụng; (iii) ở chính bệnh nhân, ví dụ suốt quá trình sử dụng liên tục thể liên hợp theo sáng chế và chất trị bệnh khác.

Sáng chế cũng đề xuất việc sử dụng thể liên hợp theo phương án bất kỳ trong số các phương án đã nêu, để điều trị bệnh hoặc tình trạng được liệt kê ở đây, trong đó bệnh nhân được điều trị trước đó (ví dụ trong 24 giờ) bằng chất điều trị bệnh khác. Sáng chế cũng đề xuất việc sử dụng chất điều trị bệnh khác để điều trị bệnh hoặc tình trạng được liệt kê ở đây, trong đó bệnh nhân được điều trị trước đó (ví dụ trong 24 giờ) bằng thể liên hợp theo một phương án bất kỳ trong số các phương án đã nêu.

Thuật ngữ “kết hợp với” chất hoặc điều trị thứ hai bao gồm việc đồng sử dụng thể liên hợp theo sáng chế (ví dụ, thể liên hợp theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên hoặc thể liên hợp khác được mô tả ở đây) với chất hoặc điều trị thứ hai, việc sử dụng hợp chất theo sáng chế trước, sau đó là chất hoặc điều trị thứ hai và việc sử dụng chất hoặc điều trị thứ hai trước, sau đó là thể liên hợp theo sáng chế.

Các thuật ngữ “chất thứ hai” và “đồng chất” được sử dụng hoán đổi và bao gồm chất bất kỳ mà đã được biết trong lĩnh vực này để điều trị, phòng ngừa, hoặc làm giảm triệu chứng của bệnh hoặc rối loạn được mô tả ở đây, ví dụ rối loạn hoặc bệnh được chọn từ rối loạn hoặc bệnh chuyển hóa, tiểu đường typ 2, béo phì, chứng viêm tụy, rối loạn lipid máu, bệnh gan nhiễm mỡ/viêm gan nhiễm mỡ do rượu và không do rượu và các bệnh về gan tiến triển khác, chứng kháng insulin, chứng tăng insulin, không dung nạp glucoza, chứng tăng đường huyết, hội chứng chuyển hóa, chứng cao huyết áp, bệnh tim mạch, chứng xơ vữa động mạch, bệnh động mạch ngoại vi, đột quỵ, chứng suy tim, bệnh tim mạch vành, các biến chứng tiểu

đường (bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở bệnh thận mạn tính), bệnh lý thần kinh, bệnh liệt dạ dày và các rối loạn chuyển hóa khác.

Theo một phương án, trị liệu là điều trị rối loạn hoặc bệnh chuyển hóa, tiểu đường typ 2, béo phì, chứng viêm tụy, rối loạn lipit máu, bệnh gan nhiễm mỡ/viêm gan nhiễm mỡ do rượu và không do rượu và các bệnh về gan tiến triển khác, chứng kháng insulin, chứng tăng insulin, không dung nạp glucoza, chứng tăng đường huyết, hội chứng chuyển hóa, chứng cao huyết áp, bệnh tim mạch, chứng xơ vữa động mạch, bệnh động mạch ngoại vi, đột quỵ, chứng suy tim, bệnh tim mạch vành, các biến chứng tiểu đường (bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở bệnh thận mạn tính), bệnh lý thần kinh, bệnh liệt dạ dày và các rối loạn chuyển hóa khác, ở đối tượng cần dùng chúng, bao gồm: cho đối tượng sử dụng lượng có hiệu quả điều trị bệnh của thể liên hợp theo sáng chế, hoặc amit, este hoặc muối của chúng, trong đó phân tử sinh học là yếu tố biệt hóa tăng trưởng của người 15 (GDF15), chất tương tự, biến thể, đột biến, mảnh và các dạng biến thể khác của chúng.

Các ví dụ về chất thứ hai để kết hợp với thể liên hợp sáng chế nhất định, trong đó phân tử sinh học là yếu tố biệt hóa tăng trưởng của người 15 (GDF15), chất tương tự, biến thể, đột biến, mảnh và các dạng biến thể khác của chúng; bao gồm:

1. Chất chống tiểu đường, chẳng hạn insulin, chất dẫn xuất insulin và chất bắt chước insulin; chất kích thích bài tiết insulin chẳng hạn sulfonylure (ví dụ, clorpropamit, tolazamit, axetohexamit, tolbutamit, glyburit, glimepirit, glipizit); glyburit và Amaryl; các phối tử thụ thể sulfonylure kích thích tiết insulin chẳng hạn các meglitinid, ví dụ nateglinid và repaglinid; thiazolidinedion (ví dụ, rosiglitazon (AV VÀ IA), troglitazon (REZULIN), pioglitazon (ACTOS), balaglitazon, rivoglitazon, netoglitazon, troglitazon, englitazon, ciglitazon, adaglitazon, darglitazon mà tăng cường hoạt động insulin (ví dụ, bằng cách kích ứng insulin), do đó thúc đẩy việc sử dụng glucoza utilization trong các mô ngoại vi; chất ức chế protein tyrosin phosphatase-1B (PTP-1B) chẳng hạn PTP-112; chất ức chế protein chuyển este colesteryl (CETP) chẳng hạn torcetrapib, chất ức chế GSK3 (glycogen syntaza kinaza-3) chẳng hạn SB-517955, SB-4195052, SB-216763, NN-57-05441 và NN-57-05445; các phối tử RXR chẳng hạn GW-0791 và AGN-194204; chất ức chế chất đồng vận chuyển

glucoza phụ thuộc natri chẳng hạn T-1095; chất ức chế glycogen phosphorylaza A chẳng hạn BAY R3401; các chất biguanide chẳng hạn metformin và chất khác mà hoạt động bằng cách thúc đẩy việc sử dụng glucoza, làm giảm sự sản xuất glucoza gan và/ hoặc giảm lượng glucoza ruột; chất ức chế anpha-glucosidaza chẳng hạn acarboza và miglitol) và chất khác mà làm chậm phân giải hydratecacbon và do đó là hấp thụ từ ruột và giảm chứng tăng đường huyết sau khi ăn; GLP-1 (peptit tương tự glucagon-1), các chất tương tự GLP-1 chẳng hạn Exendin-4 và chất bắt chước GLP-1; và chất ức chế DPP-IV (dipeptidyl peptidaza IV) chẳng hạn vildagliptin;

2. Các chất giảm lipid chẳng hạn chất ức chế 3-hydroxy-3-metyl-glutaryl coenzym A (HMG-CoA) reductaza, ví dụ lovastatin, pitavastatin, simvastatin, pravastatin, cerivastatin, mevastatin, velostatin, fluvastatin, dalvastatin, atorvastatin, rosuvastatin và rivastatin; chất ức chế squalen syntaza; FXR (thụ thể farnesoid X) và phối tử LXR (thụ thể X của gan); các phụ gia cô lập axit mật, chẳng hạn cholestyramin và colesevelam; fibrat; axit nicotinic và aspirin;

3. Các chất chống béo phì chẳng hạn orlistat hoặc rimonabant, phentermin, topiramate, qnexa, và locaserin;

4. Các chất chống tăng huyết áp, ví dụ thuốc lợi niệu vòng (loop diuretic) chẳng hạn axit ethacrynic, furosemit và torsemit; chất ức chế enzym chuyển hóa angiotensin (ACE) chẳng hạn benazepril, captopril, enalapril, fosinopril, lisinopril, moexipril, perinodopril, quinapril, ramipril và trandolapril; chất ức chế bơm màng Na-K-ATPaza chẳng hạn digoxin; chất ức chế endopeptidaza trung hòa (NEP); chất ức chế ACE/NEP chẳng hạn omapatrilat, sampatrilat và fasidotril; chất đối kháng angiotensin II chẳng hạn candesartan, eprosartan, irbesartan, losartan, telmisartan và valsartan, cụ thể là valsartan; chất ức chế thận tố chẳng hạn ditekiren, zankiren, terlakiren, aliskiren, RO 66-1132 và RO-66-1168; chất phong bế thụ thể tiết adrenalin β chẳng hạn axebutolol, atenolol, betaxolol, bisoprolol, metoprolol, nadolol, propranolol, sotalol và timolol; chất co cơ chẳng hạn digoxin, dobutamin và milrinone; chất phong bế kênh canxi chẳng hạn amlodipin, bepridil, diltiazem, felodipin, nicardipin, nimodipin, nifedipin, nisoldipin và verapamil; chất đối kháng thụ thể aldosterone; và chất ức chế aldosteron synthaza;

5. Các chất chủ vận thụ thể chất hoạt hóa - chất tăng sinh peroxisom, chẳng hạn fenofibrat, pioglitazon, rosiglitazon, tesaglitazar, BMS-298585, L-796449, các hợp chất được mô tả cụ thể trong đơn sáng chế WO 2004/103995 tức là các hợp chất của các ví dụ 1 đến 35 hoặc hợp chất được liệt kê cụ thể trong điểm 21, hoặc hợp chất được mô tả cụ thể trong đơn sáng chế WO 03/043985 tức là hợp chất của các ví dụ 1 đến 7 hoặc các hợp chất được liệt kê cụ thể trong điểm 19 và đặc biệt là (R)-1-{4-[5-metyl-2-(4-triflometyl-phenyl)-oxazol-4-ylmetoxy]-benzensulfonyl}-2,3-dihydro-1H-indol-2-carboxylic hoặc muối của nó; và

6. Hợp chất chống tiểu đường cụ thể được mô tả trong Expert Opin Investig Drugs 2003, 12(4): 623-633, fig. 1 đến 7.

Ngoài ra, sáng chế dự tính trị liệu tổ hợp với các chất và các phương pháp để thúc đẩy giảm trọng lượng, chẳng hạn chất kích thích chuyển hóa hoặc làm giảm sự thèm ăn, và chế độ ăn được cải biến và/ hoặc phác đồ luyện tập để thúc đẩy giảm trọng lượng.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ký hiệu viết tắt

ACN	Axetonitril
BEH	Hỗn hợp có cầu etylen
BOC	tert-Butyloxycarbonyl
BSA	albumin huyết thanh bò
DCM	diclometan
DCC	N,N'-dixyclohexylcarbodiimit
DIC	N,N'-Diisopropylcarbodiimit
DIPEA	N,N'-Diisopropyletylamin
DMAP	Dimetylaminopyridin
DMF	N,N'-Dimetylformamit

DTT	Dithiothreitol
DOT	3,6-dioxa-1,8-octandithiol
EDC	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide
EDTA	axit etylenđiamintetraaxetic
ESI	ion hóa bằng phun điện tử
FFA	khảo nghiệm tạo điểm huỳnh quang
Fmoc	florenylmetyloxycarbonyl clorua
HCTU:	O-(6-clobenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetrametyluroni hexaflophosphat
HEP	Heptan
HFIP	Hexafloisopropanol
HPLC	Sắc ký lỏng hiệu năng cao
HRMS	Khối phổ phân giải cao
HOBT	Hydroxybenzotriazol
HS	huyết thanh người
LC/MS	sắc ký lỏng/khối phổ
MS	Khối phổ
MW	trọng lượng phân tử
MRT	thời gian cư trú
NHS	N-hydroxysuccinimide
NMM	N-metylmorpholin
NMR	Cộng hưởng từ hạt nhân

PEG	polyetylen glycol
pE	Pyroglutamat
pbf	2,2,4,6,7-pentametyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl
PG:	nhóm bảo vệ
PK	độc động học
Pol	chất trợ polyme
QTOF:	Khối phổ kế thời gian bay Quadrupole
Rt :	thời gian lưu
Rt hoặc RT:	nhiệt độ phòng
Rpm:	vòng/phút
Sc	dưới da
SFC	chất lỏng siêu tới hạn
SPPS	tổng hợp peptit pha rắn
TBME	metyl tert-butyl ete
Trt	trityl
THF	Tetrahydrofuran
TEA	trimetylamin
TIS	trietylsilan
t, s, quin, br, m, d	(đỉnh ba, đỉnh đơn, đỉnh năm, rộng, đỉnh đa)
UPLC	sắc ký lỏng siêu hiệu năng

Quá trình tổng hợp:

Các phương pháp LCMS được mô tả

Phương pháp A	Cột	Acquity BEH 1,7 μ m 2,1x50mm
	Nhiệt độ cột	50 C
	Dung môi rửa giải	A: Nước (axit formic 0,1%); B: ACN (axit formic 0,1%)
	Lưu lượng dòng	1 mL/phút
	Gradient	0 phút 2% B; 2% đến 98% B trong 1,7 phút; 2,06 phút 98% B; 2,16 phút 2% B
	Khối phổ kế	Máy Quadrupole ESI đơn quét trong khoảng 120-1600
	UPLC	Waters Acquity
Phương pháp B	Cột	Acquity BEH 1,7 μ m 2,1x50mm
	Nhiệt độ cột	50 C
	Dung môi rửa giải	A: Nước (axit formic 0,1%); B: ACN (axit formic 0,1%)
	Lưu lượng dòng	1 mL/phút
	Gradient	0 phút 40% B; 40% đến 98% B trong 1,40 phút; 2,05 phút 98% B; 2,1 phút 40%B

	Khối phổ kế	Máy Quadrupole ESI đơn quét trong khoảng 120-1600
	UPLC	Waters Acquity
Phương pháp C		
	Cột	Cột XBridge C18, 3,5 μ m, 3,0 x 30mm
	Nhiệt độ cột	40 C
	Dung môi rửa giải	A: Nước (axit formic 0,1%); B: ACN
	Lưu lượng dòng	2 mL/phút
	Gradient	0 phút 40% B; 40% đến 95% B trong 1,70 phút; 2,0 phút 95% B; 2,1 phút 40%B
	Khối phổ kế	Máy Quadrupole ESI đơn quét trong khoảng 150-1600
	HPLC	Chuỗi Agilent 1100
Phương pháp D		
	Cột	Hilic 2,1 x 100mm
	Nhiệt độ cột	55 C
	Dung môi rửa giải	A: CO ₂ B: MeOH
	Lưu lượng dòng	2mL/phút
	Gradient	0,15 phút 2% B; 2% đến 50% B trong 1,5 phút; 2,1 phút 50% B; 2,25 phút 2% B; 2,5 phút 2% B
	Khối phổ kế	Máy Quadrupole ESI đơn

	SCF	Waters Acquity
Phương pháp E		
	Cột	Proswift Monolith 4,6x50mm
	Nhiệt độ cột	50 C
	Dung môi rửa giải	A: Nước (axit formic 0,1%); B: ACN (axit formic 0,1%)
	Lưu lượng dòng	1 mL/phút
	Gradient	0,7 phút 2% B; 2% đến 60% B trong 12,8 phút; 14 phút 60% B; 14,2 phút 2% B
	Khối phổ kế	Máy Qtof ESI quét trong khoảng 600-3500; giải phổ bằng Max Ent 1 trong gói phần mềm Mass Lynx
	UPLC	Waters Acquity

HPLC - Phương pháp phân tích F

- Cột: XBridge BEH300 C18 (100x4,6 mm), 3 µm; số Part: 186003612
- Dung môi rửa giải A: TFA 0,1% trong nước / Dung môi rửa giải B: TFA 0,1% trong ACN
- Lưu lượng: 1,0mL/phút
- Nhiệt độ: 40°C
- Gradient:

Thời gian [phút]	A [%]	B [%]
0,0	98	2

18	2	98
20	2	98
22	98	2

UPLC-HRMS - Phương pháp phân tích G

- Waters Acquity UPLC® BEH C18, 1,7 μ m, 2,1x50mm; số Part: 186002350
- Dung môi rửa giải A: FA 0,05% + amoni axetat 3,75mM trong nước; Dung môi rửa giải B: FA 0,04% trong ACN
- Lưu lượng: 1,0mL/phút
- Nhiệt độ: 50°C
- Gradient: 2 đến 98% trong 4,4 phút

Phương pháp H: phương pháp LC-MS

- [0100] HPLC: Pha di động A: HFIP 2% + TEA 0,1%; Pha di động B: Metanol;
- [0101] Gradient: 0 phút 95%A, 4 phút: 75%A, 8 phút 10%A, 8,1 phút 95%A, 10 phút 95%A;
- [0102] Lưu lượng dòng: 250 μ l/phút;
- [0103] Cột: Acquity UPLC BEH C18, 1,7 μ m, 2,1x50mm(waters);
- [0104] Nhiệt độ cột: 75°C
- [0105] MS: chế độ âm (negative mode) QTOF(waters);
- [0106] ESI: 2,9kv; nhiệt độ mao mạch 350°C; khí phun: 600mL/phút; nhiệt độ nguồn: 150°C

Phương pháp I: Phương pháp LC-MS:

- Pha di động A: Nước + axit formic 0,1%;
- Pha di động B: AXETONITRIL + axit formic 0,1%;

- Gradient: 0 phút 98% A, 0,06 phút 98% A, 1,76 phút 2% A, 2,06 phút 2%A, 2,16 phút 98%; Lưu lượng dòng: 1ml/phút.;
- Cột: ACQUITY UPLC BEH C18, 130Å, 1,7µm, 2,1mm X 50mm;
- Nhiệt độ cột: 50°C;
- Đầu dò: UV/Vis/CAD (Đầu dò sol khí nạp điện)

UPLC HRMS Phương pháp J:

- Cột: Acquity BEH300 C4 1,7µm, 2,1x50mm
- Dung môi rửa giải A: Nước (TFA 0,1%)
- Dung môi rửa giải B: ACN (TFA 0,1%)
- Lưu lượng: 0,5 mL/phút
- Nhiệt độ: 40°C
- Gradient: 20% giữ trong 0,5 phút, tăng lên tới 80% ACN trong 10 phút

Phương pháp K:

- Cột: Cột Waters Protein BEH C4, 300 Angstrom, 3,5µm, 4,6x100mm
- Pha di động: A: Nước (TFA 0,05%) B: ACN (TFA 0,05%)
- Lưu lượng: 2mL/phút
- Nhiệt độ: 40°C
- Gradient: Giữ 25% B trong 1 phút, tăng từ 25-60%ACN ở 10 phút, tăng lên đến 95%B ở 10,50 phút và giữ trong 2 phút, sau đó làm cân bằng ở 25% trong 2 phút. Tổng thời gian di chuyển là 15 phút.
- Khối phổ kế: Waters ZQ mass spec
- UPLC: Cột: BEH C4, 300 Angstrom, 1,7µm, 2,1x50mm

Phương pháp L:

- Cột: Proswift Monolith 4,6 x 50mm

- Pha di động: A: Nước (axit formic 0,1%) B: ACN (axit formic 0,1%)
- Lưu lượng: 1ml/phút
- Nhiệt độ: 50°C
- Gradient: 0 phút 3% B; 3% đến 80% B trong 2 phút; 2,1 phút 10% B; 2,8 phút 95% B; 2,9 phút 3% B
- Khối phổ kế: Qtof ESI quét trong khoảng 100-1900; giải phổ bằng Max Ent 1 trong gói phần mềm Mass Lynx
- UPLC: Waters Acquity

Phương pháp M	Cột	Acquity BEH 1,7 μ m 2,1x50mm
	Nhiệt độ cột	50 C
	Dung môi rửa giải	A: Nước (axit formic 0,1%); B: ACN (axit formic 0,1%)
	Lưu lượng dòng	1 mL/phút
	Gradient	0 phút 2% B; 2% đến 98% B trong 4,40 phút; 5,15 phút 98% B; 5,19 phút 2% B
	Khối phổ kế	Máy Quadrupole ESI đơn quét trong khoảng 120-1600
	UPLC	Waters Acquity
Phương pháp N	Cột	Sunfire 30x50 mm 5 um
	Dung môi rửa giải	A: Nước (0,1% TFA); B: ACN (0,1% TFA)
	Lưu lượng dòng	75 mL/phút

	Gradient	5-20% ACN trong hơn 3,2 phút
Phương pháp O		
	Cột	Acquity BEH 1,7 μ m 2,1x50mm
	Nhiệt độ cột	50 C
	Dung môi rửa giải	A: Nước (axit formic 0,1%); B: ACN (axit formic 0,1%)
	Lưu lượng dòng	1 mL/phút
	Gradient	0 phút 40% B; 40% đến 98% B trong 3,40 phút; 5,15 phút 98% B; 5,19 phút 40%B
	Khối phổ kế	Máy Quadrupole ESI đơn quét trong khoảng 120-1600
	UPLC	Waters Acquity
Phương pháp P		
	Cột	Proswift Monolith 4,6 x 50mm
	Nhiệt độ cột	50 C
	Dung môi rửa giải	A: Nước (axit formic 0,1%) B: ACN (axit formic 0,1%)
	Lưu lượng dòng	1mL/phút
	Gradient	0 phút 2% B; 2% đến 98% B trong 2 phút; 2,1 phút 98% B; 2,3 phút 2% B; 3,3 phút 2% B
	Khối phổ kế	Qtof ESI quét trong khoảng 100-1900; giải phổ bằng Max Ent 1 trong gói phần mềm Mass Lynx

	UPLC	Waters Acquity
Phương pháp Q		
	Cột	Proswift Monolith 4,6x50mm
	Nhiệt độ cột	50 C
	Dung môi rửa giải	A: Nước (axit formic 0,1%); B: ACN (axit formic 0,1%)
	Lưu lượng dòng	1 mL/phút
	Gradient	0,7 phút 2% B; 2% đến 60% B trong 12,8 phút; 14 phút 60% B; 14,2 phút 2% B
	Khối phổ kế	Qtof ESI quét trong khoảng 600-3500; giải phổ bằng Max Ent 1 trong gói phần mềm Mass Lynx
	UPLC	Waters Acquity
Phương pháp R		
	Cột	Proswift Monolith 4,6 x 50mm
	Nhiệt độ cột	50 C
	Dung môi rửa giải	A: Nước (axit formic 0,1%) B: ACN (axit formic 0,1%)
	Lưu lượng dòng	1mL/phút
	Gradient	0 phút 3% B; 3% đến 90% B trong 7 phút; 7,1 phút 15% B; 7,70 phút 95% B; 7,8 phút 3% B
	Khối phổ kế	Qtof ESI quét trong khoảng 100-1900; giải phổ bằng Max Ent 1 trong gói phần mềm Mass Lynx

	UPLC	Waters Acquity
--	------	----------------

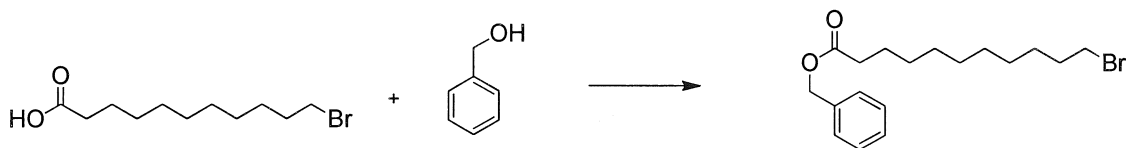
Phương pháp phân tích S:

- Cột Xbridge C18, 3,5 μ M, 3,0 x 3,0mm
- Dung môi rửa giải: A: Nước + Amoni hydroxit B 5mM: ACN
- Lưu lượng dòng: 2mL/phút
- Gradient: 0,0 phút 2% B; 2% đến 95% B trong 1,70 phút; 2,00 phút 95% B; 2,10 phút 5% B;
- Khối phổ kế: Single Quadrupole ESI
- HPLC: chuỗi Agilent 1100
- Nhiệt độ: 40C

Phương pháp phân tích T:

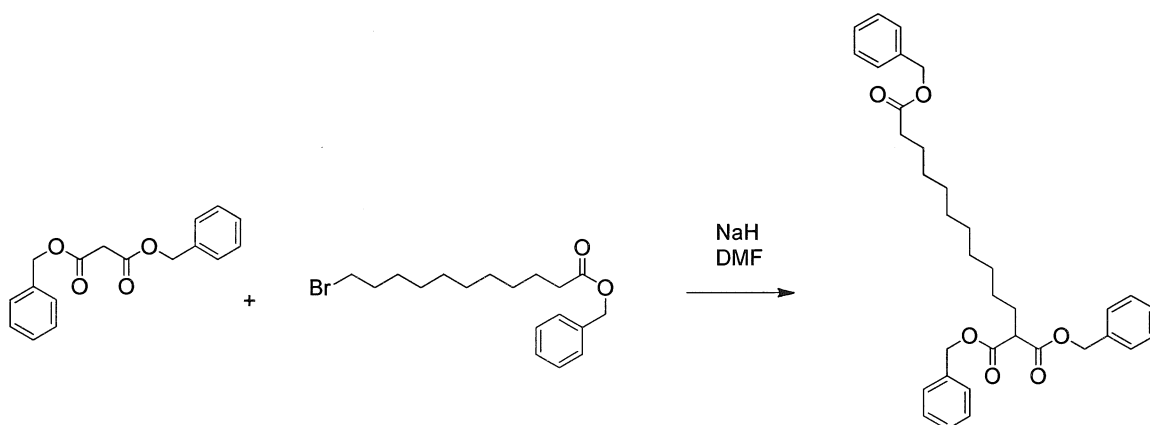
Cột	Acquity BEH 1,7 μ m 2,1x50mm
Nhiệt độ cột	50 C
Dung môi rửa giải	A: Nước (axit formic 0,1%) B: ACN (axit formic 0,1%)
Lưu lượng dòng	1mL/phút
Gradient	0 phút 5% B; 5% đến 60% B trong 4 phút; 7,2 phút 98% B; 4,5 phút 95% B; 4,6 phút 5% B
Khối phổ kế	Acquity G2 Xevo QToF - Rs(FWHM) > 20000 Độ chính xác < 5 ppm
UPLC	Waters Acquity

Chất trung gian 1: Benzyl 11-bromoundecanoat



Hòa tan axit 11-bromoundecanoic (4g, 15,08mmol), rượu benzyl (1,875mL, 18,10mmol), và DMAP (92mg, 0,754mmol) trong DCM trong điều kiện N₂ ở nhiệt độ phòng. Thêm EDC-HCl (4,34g, 22,63mmol) và khuấy hỗn hợp phản ứng trong 17 giờ. Cô đặc phản ứng, sau đó pha loãng với Et₂O (150mL). Chiết hỗn hợp bằng nước (30mL), và chiết pha chứa nước bằng Et₂O (150mL). Rửa các pha hữu cơ kết hợp bằng nước muối (20mL) và sấy khô trên Na₂SO₄. Loại bỏ dung môi và tinh chế phần cặn bằng cột nhanh (silic đioxit 120g, 0-10% Et₂O / ete dầu hỏa) để tạo ra chất trung gian 1 là chất lỏng không màu (6,75g, có thể định lượng): phương pháp LCMS phương pháp A Rt = 1,79 phút, M+H 355,2; ¹H NMR (400MHz, CHLOROFORM-d) δ ppm 1,18 – 1,36 (m, 10 H) 1,37 - 1,47 (m, 2H) 1,64 (quin, J=7,33 Hz, 2H) 1,85 (dt, J=14,56, 7,06 Hz, 2H) 2,35 (t, J=7,58 Hz, 2H) 3,40 (t, J=6,88 Hz, 2H) 5,11 (s, 2H) 7,28 - 7,45 (m, 5H).

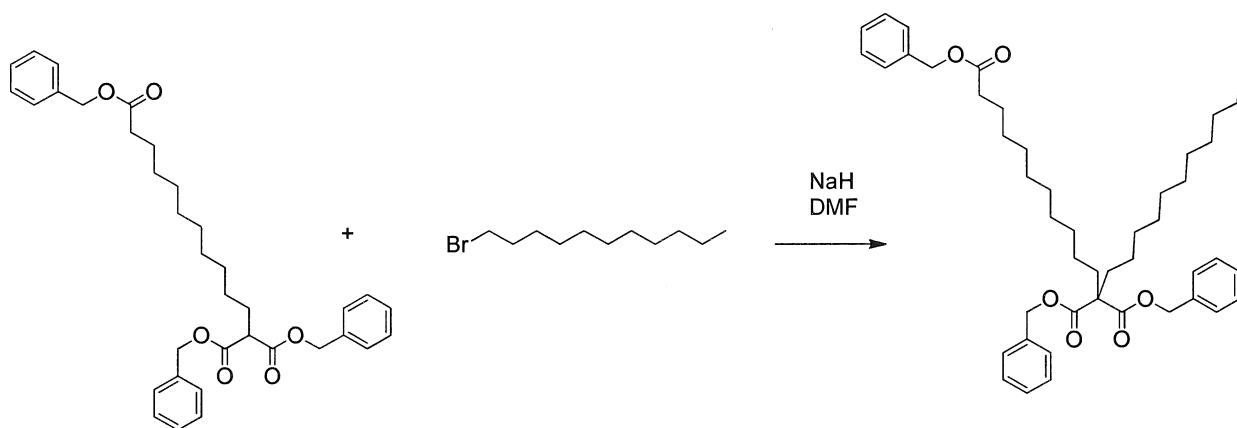
Chất trung gian 2: Tribenzyl undecan-1,1,11-tricarboxylat



Tạo huyền phù NaH (113mg, 2,83mmol) trong DMF (6mL) trong điều kiện N₂ ở 0°C. Thêm từ từ dibenzyl malonat (0,704mL, 2,82mmol) vào huyền phù đang khuấy trong hơn 30 phút. Thêm chất trung gian 1 (903mg, 2,54mmol) đã hòa tan trong DMF (3mL) và khuấy hỗn hợp phản ứng ở 0°C trong 2,75 giờ trước khi làm ấm đến nhiệt độ phòng và khuấy

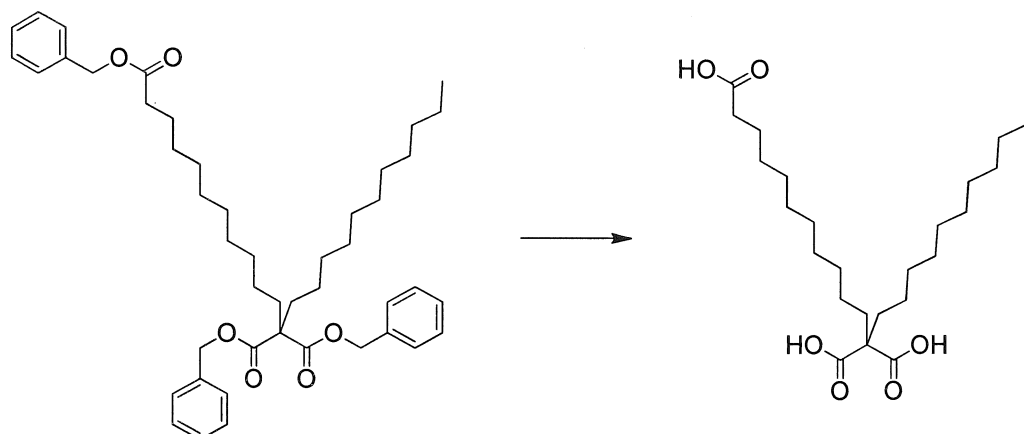
qua đêm. Pha loãng hỗn hợp phản ứng bằng Et₂O (75mL) và chiết bằng nước (20mL). Chiết pha chứa nước bằng Et₂O (75mL) và rửa các pha hữu cơ kết hợp bằng nước muối (30mL). Sấy khô các chất hữu cơ trên Na₂SO₄ rồi cô đặc. Tinh chế phân cô đặc bằng cột nhanh (silic đioxit 80g, 0-10% EtOAc / HEP) để tạo ra dầu không màu (770mg, 1,38mmol, 34%) độ tinh khiết 70%: LCMS phương pháp B Rt = 1,41 phút, M+H 559,6.

Chất trung gian 3: Tribenzyl docosan-1,11,11-tricarboxylat



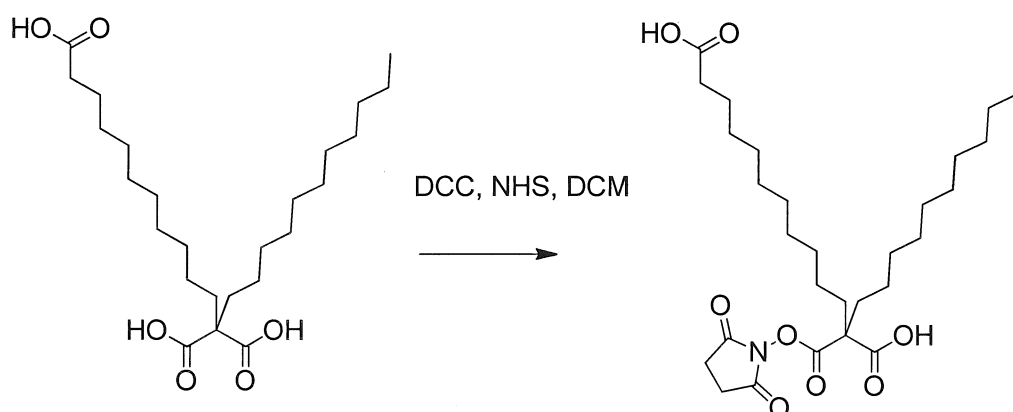
Thêm chất trung gian 2 (770mg, 1,38mmol) trong DMF (4mL) vào huyền phù của NaH (66,1mg, 1,65mmol) trong DMF (2mL) ở 0°C trong điều kiện N₂. Sau 35 phút, thêm dung dịch 1-bromoundecan (0,338mL, 1,52mmol) trong DMF (2mL) vào phản ứng, làm ấm phản ứng này đến nhiệt độ phòng sau khi khuấy trong 25 phút. Khuấy hỗn hợp phản ứng trong 2 ngày. Pha loãng hỗn hợp phản ứng bằng Et₂O (75mL) và chiết bằng LiCl 10% (25mL). Chiết pha chứa nước bằng Et₂O (75mL). Rửa các pha hữu cơ kết hợp bằng nước muối, sấy khô trên Na₂SO₄, và làm bay hơi dung môi. Quá trình tinh chế phân cận bằng cột nhanh (silic đioxit 80g, 0-10% EtOAc/HEP) đã tạo ra chất trung gian 3 là dầu không màu (590mg, 0,827mmol, 33%): phương pháp LCMS phương pháp B Rt= 1,89 phút, M+Na 735,5; ¹H NMR (400MHz, CHLOROFORM-d) δ ppm 0,87 - 0,95 (m, 3H) 1,07 (br, s, 4H) 1,14 - 1,36 (m, 28 H) 1,66 (quin, J=7,43 Hz, 2H) 1,85 - 1,95 (m, 4H) 2,37 (t, J=7,58 Hz, 2H) 5,12 (s, 4H) 5,14 (s, 2H) 7,27 (d, J=2,32 Hz, 1H) 7,28 - 7,43 (m, 14H).

Chất trung gian 4: Axit docosan-1,11,11-tricarboxylic



Kết hợp chất trung gian 3 (590mg, 0,827mmol) đã hòa tan trong THF (12mL) với huyền phù của 10% Pd trên cacbon trong THF (8mL). Khuấy huyền phù này và đặt trong điều kiện khí hydro thông qua bình cầu. Sau 1 giờ, đưa phản ứng qua bộ lọc màng và rửa các chất rắn với EtOAc. Làm bay hơi phần dịch lọc, tạo ra hợp chất nêu trong đề mục dưới dạng dầu không màu (353mg, 0,798mmol, 96%): phương pháp LCMS phương pháp B Rt = 1,16 phút, M+H 443,5; ^1H NMR (400MHz, CHLOROFORM- d) δ ppm 0,77 - 0,84 (m, 3H) 1,06 - 1,33 (m, 32H) 1,59 (quin, J=7,18 Hz, 2H) 1,83 - 1,92 (m, 4H) 2,32 (t, J=7,03 Hz, 2H).

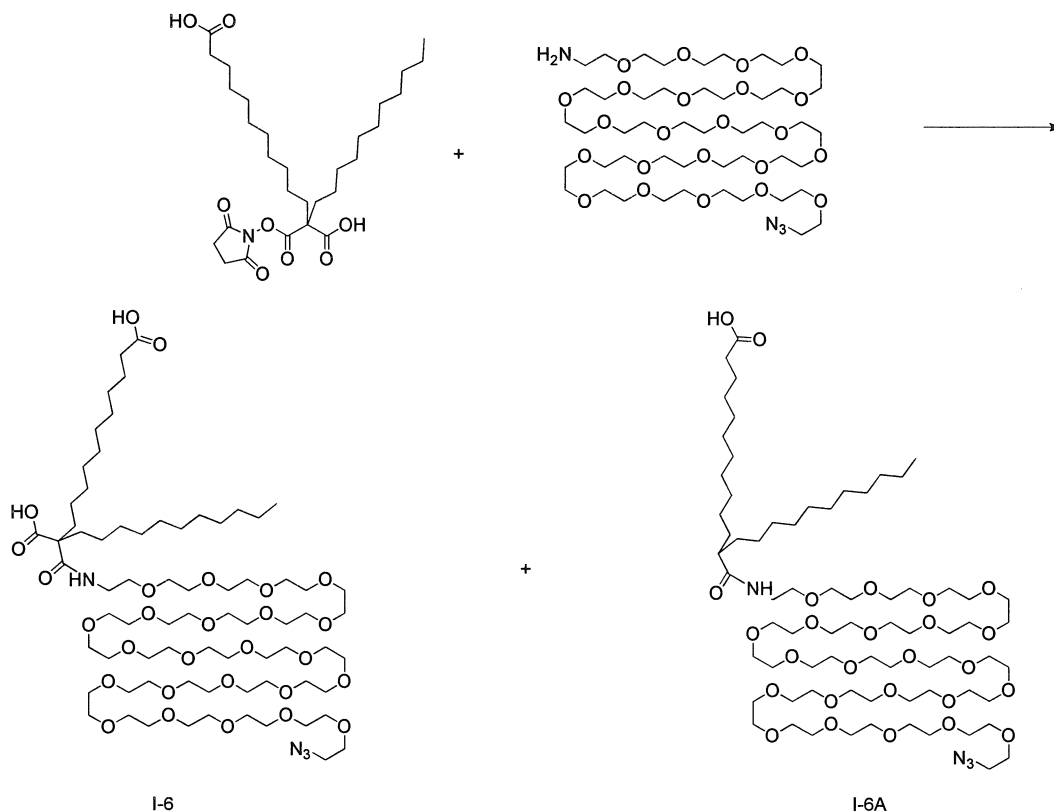
Chất trung gian 5: Axit 2-(((2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)oxy)carbonyl)-2-undexyltridecandioic



Thêm dung dịch DCC (126mg, 0,610mmol) trong DCM (1,57mL) vào dung dịch gồm chất trung gian 4 và N-hydroxysuccinimit trong DCM (5mL) và THF (5mL) trong điều kiện N₂. Sau 3,5 giờ, làm bay hơi phần dung môi và tinh chế phần cặn bằng phương pháp sắc ký lỏng

siêu tới hạn (SFC; Princeton 2-ethyl-pyridin, 20x150mm, 20-30% MeOH / CO₂), tạo ra hợp chất nêu trong đề mục dưới dạng dầu không màu (138mg, 0,256mmol, 50%): LCMS phương pháp B Rt = 1,21phút, M+H 540,5; ¹H NMR (600MHz, AXETONITRIL-d₃) δ ppm 0,91 (t, J=7,20Hz, 3H) 1,22 - 1,42 (m, 34H) 1,57 (quin, J=7,34 Hz, 2H) 1,93 - 1,96 (m, 2H) 2,28 (t, J=7,47 Hz, 2H) 2,79 (br, d, J=6,30Hz, 4H).

Chất trung gian 6 và 6A: Cấu trúc axit 2-(azido-PEG23-carbamoyl)-2-undexyltridecandioic (6) và cấu trúc axit 12-(azido-PEG23-carbamoyl)tricosanoic (6A)

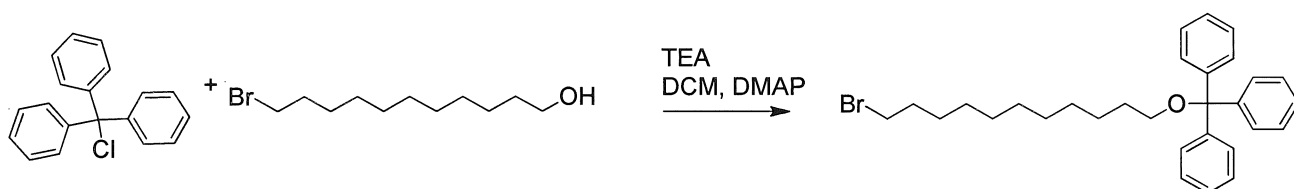


Kết hợp chất trung gian 5 (36mg, 0,066mmol) và azido-dPEG23-NH₂ (Quanta Biodesign: 73mg, 0,066mmol) trong THF (1,5mL) và trộn trên đĩa lắc trong 15 phút trước khi bổ sung DIPEA (17μL, 0,10mmol). Để phản ứng trên đĩa lắc qua đêm. Làm bay hơi phần dung môi và tinh chế phần cặn bằng HPLC (Sunfire C18 30x50mm, 55-80% ACN/nước + TFA 0,1%) để tạo ra chất trung gian 6 (39mg, 0,025mmol, 38%) và chất trung gian 6a (20mg, 0,013mmol, 20%): LCMS phương pháp B Rt = 1,11 phút, [M+2H]⁺ 763,4; ¹H NMR (400MHz, CHLOROFORM-d) δ ppm 0,86 - 0,93 (m, 3H) 1,10 - 1,19 (m, 2H) 1,20 - 1,29 (m, 23H) 1,32 (br, s., 7 H) 1,58 - 1,69 (m, 2H) 1,69 - 1,79 (m, 2H) 1,96 - 2,10 (m, 2H) 2,35 (t, J=7,15 Hz, 2H) 3,41 (t, J=5,07 Hz, 2H) 3,51 - 3,57 (m, 2H) 3,58 - 3,62 (m, 2H) 3,62 - 3,73 (m, 90 H) 7,46 (br. s., 1H); LCMS Phương pháp B Rt = 1,23 phút, [M+2]⁺ 740,9; ¹H NMR (400MHz, CLOROFORM-d) δ ppm 0,83 - 0,96 (m, 3H) 1,27 (br, s., 25H) 1,29 - 1,37

(m, 7 H) 1,37 - 1,46 (m, 2H) 1,53 - 1,73 (m, 4H) 2,34 (t, J=7,21 Hz, 2H) 3,41 (t, J=5,07 Hz, 2H) 3,44 - 3,52 (m, 2H) 3,55 - 3,60 (m, 2H) 3,60 - 3,74 (m, 90 H) 6,19 - 6,30 (m, 1H).

Theo cách khác, thu được cấu trúc 6A theo quy trình sau: thêm dung dịch chất trung gian 5 (48mg, 0,042mmol) trong THF (1mL) vào lọ đã được nạp azido-PEG23-amin (Quanta Biodesign cat # 10525) (46mg, 0,042mmol). Khuấy hỗn hợp phản ứng trong 20 phút trước khi bổ sung DIPEA (11μL, 0,063mmol) và sau đó duy trì qua đêm. Thêm azido-PEG23-amin (23mg, 0,021mmol) và DIPEA (5μL, 0,029mmol) và khuấy hỗn hợp phản ứng một ngày nữa. Làm bay hơi phần dung môi và tinh chế phần cặn bằng HPLC (Xbridge C18 30x50mm, 10-30% ACN / NH₄OH 5mM). Quá trình đông khô các phân đoạn tạo thành hỗn hợp các sản phẩm. Tinh chế vật liệu bằng phương pháp HPLC (Sunfire C18 30x50mm, 45-70% ACN / nước + TFA 0,1%) để tạo ra chất trung gian 6A nêu trong đề mục (30mg, 0,020mmol, 48%): LCMS phương pháp B Rt = 0,81 phút, [M+H+H₃O]⁺² 764,5; ¹H NMR (400MHz, AXETONITRIL-d₃) δ ppm 1,30 (br, s., 28 H) 1,40 - 1,50 (m, 2H) 1,50 - 1,62 (m, 6 H) 2,14 (t, J=7,52 Hz, 2H) 2,23 - 2,35 (m, 3H) 3,32 (q, J=5,58 Hz, 2H) 3,37 - 3,43 (m, 2H) 3,47 - 3,52 (m, 2H) 3,53 - 3,68 (m, 90 H) 6,54 (br. s., 1H) .

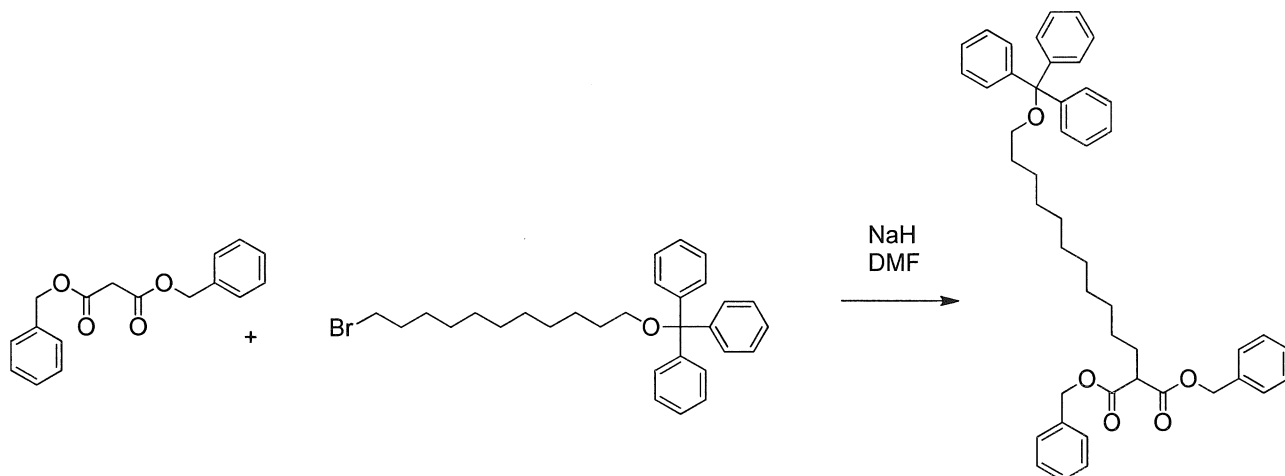
Chất trung gian 7: (((11-bromundexyl)oxy)metantriyl)tribenzen



Hòa tan trityl clorua (2,49g, 8,92mmol), 11-bromoundecan-1-ol (2,00g, 7,96mmol), và DMAP (10mg, 0,080mmol) trong DCM (16mL) trong điều kiện N₂. Thêm DIPEA (1,39mL, 7,96mmol) đồng thời khuấy và duy trì phản ứng trong 7 ngày. Phân chia phản ứng giữa DCM (20mL) và nước (10mL). Chiết pha hữu cơ bằng nước (20mL), sấy khô trên MgSO₄, rồi cô đặc. Tinh chế phần cô đặc bằng cột nhanh (silic đioxit 120g, 0-6% EtOAc / HEP) để tạo ra chất trung gian 7 (2,50g, 5,07mmol, 64%) dưới dạng dầu không màu: ¹H NMR (400MHz, CLOROFORM-d) δ ppm 1,19 - 1,49 (m, 14H) 1,58 - 1,69 (m, 2H) 1,79 (dt,

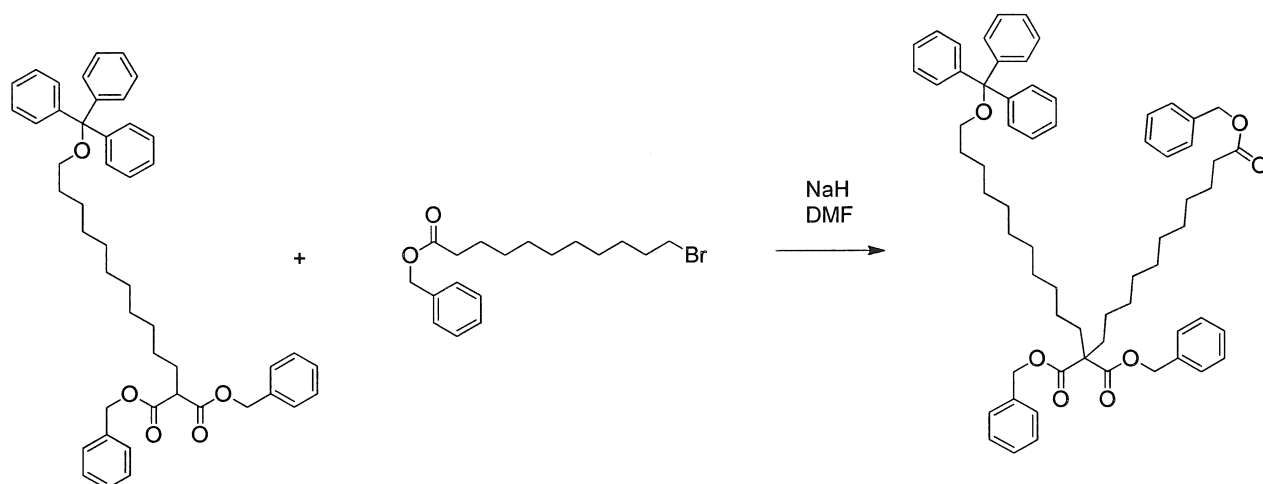
$J=14,50, 7,00\text{Hz}, 1\text{H})$ 1,87 (dt, $J=14,55, 7,03\text{ Hz}, 1\text{H})$ 3,07 (t, $J=6,66\text{ Hz}, 2\text{H})$ 3,43 (t, $J=6,85\text{ Hz}, 1\text{H})$ 3,55 (t, $J=6,79\text{ Hz}, 1\text{H})$ 7,18 - 7,36 (m, 10 H) 7,42 - 7,52 (m, 5H).

Chất trung gian 8: Dibenzyl 2-(11-(trityloxy)undecyl)malonat



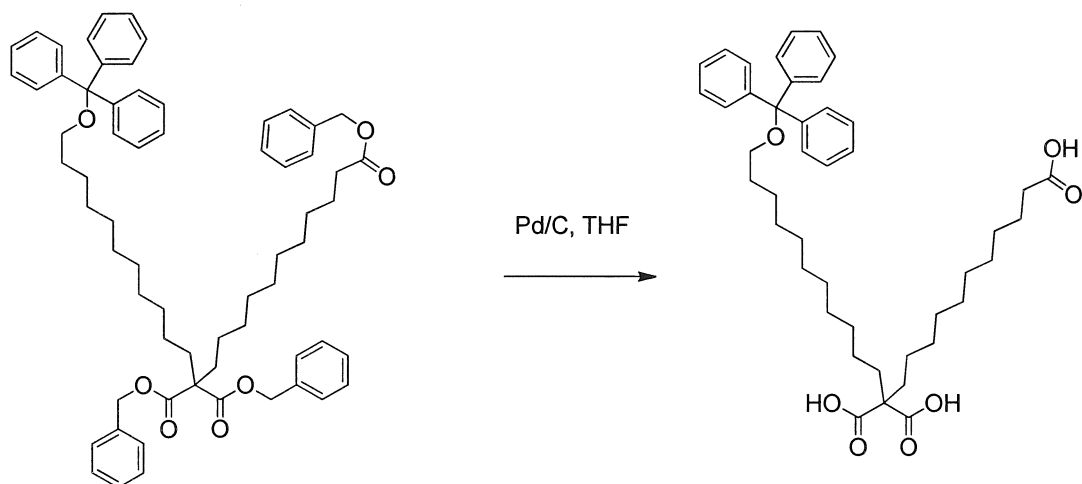
Tạo huyền phù NaH (113mg, 2,83mmol) trong DMF (6mL) ở 0°C trong điều kiện N₂. Thêm từ từ dibenzyl malonat vào huyền phù đã khuấy. Sau 30 phút, thêm dung dịch chất trung gian 7 (1,26g, 2,54mmol) trong DMF (3mL). Sau khi khuấy 15 phút, làm ấm hỗn hợp tạo thành đến nhiệt độ phòng. Sau 3 ngày, pha loãng hỗn hợp phản ứng bằng Et₂O (75mL) và chiết bằng nước (40mL). Chiết pha chứa nước bằng Et₂O (75mL). Sấy khô các chất hữu cơ kết hợp trên Na₂SO₄ rồi cô đặc. Tinh chế phần cô đặc bằng cột nhanh (silic đioxit 80g, 0-10% EtOAc / HEP) để tạo ra hợp chất nêu trong đề mục dưới dạng dầu không màu (815mg, 1,17mmol, 41%): HPLC Phương pháp B Rt = 1,68 phút; ¹H NMR (400MHz, CLOROFORM-d) δ ppm 1,16 - 1,40 (m, 16 H) 1,58 - 1,69 (m, 2H) 1,94 (q, $J=7,38\text{ Hz}, 2\text{H})$ 3,06 (t, $J=6,66\text{ Hz}, 2\text{H})$ 3,45 (t, $J=7,52\text{ Hz}, 1\text{H})$ 5,16 (s, 4H) 7,21 - 7,28 (m, 3H) 7,28 - 7,39 (m, 16 H) 7,42 - 7,51 (m, 6 H).

Chất trung gian 9: Tribenzyl 22-(trityloxy)docosan-1,11,11-tricarboxylat



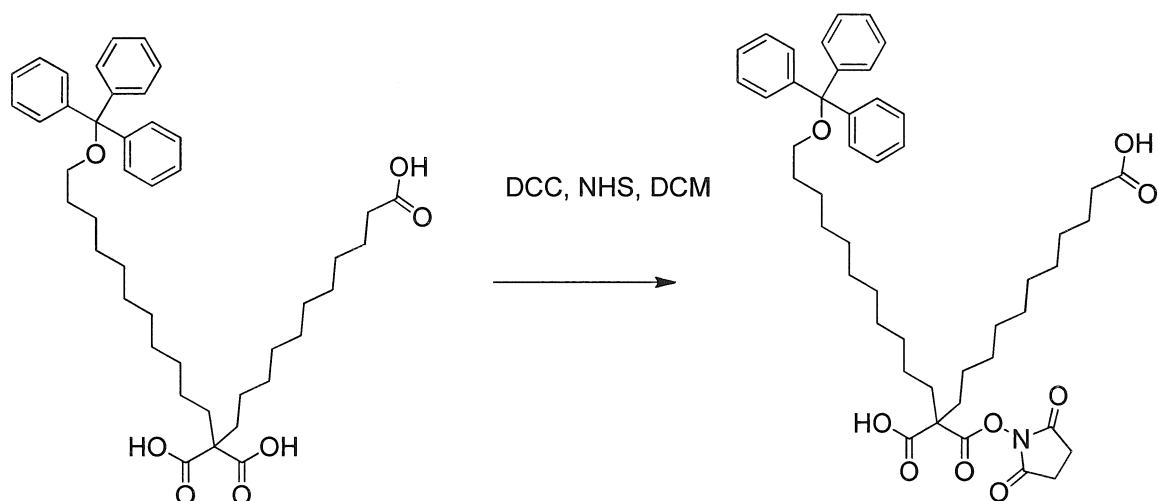
Thêm dung dịch chất trung gian 8 (815mg, 1,17mmol) trong DMF (2mL) vào huyền phù của NaH (56mg, 1,40mmol) trong DMF (2mL) trong điều kiện N₂ ở 0°C. Khuấy hỗn hợp trong 1 giờ. Thêm benzyl 11-bromoundecanoat (457mg, 1,29mmol) trong DMF (2mL) vào phản ứng. Làm ấm phản ứng đến nhiệt độ phòng 20 phút sau quá trình bổ sung và khuấy qua đêm. Pha loãng hỗn hợp phản ứng bằng Et₂O (75mL) và chiết bằng nước (25mL). Chiết pha chứa nước bằng Et₂O (75mL) và kết hợp các chất hữu cơ. Sấy khô các chất hữu cơ kết hợp trên Na₂SO₄ và làm bay hơi. Tinh chế phân cận bằng cột nhanh (silic đioxit 40g, 0-10% EtOAc/HEP) để tạo ra hợp chất nêu trong đề mục dưới dạng dầu không màu (780mg, 0,803mmol, 69%): ¹H NMR (400MHz, CLOROFORM-d) δppm 0,99 - 1,14 (m, 4H) 1,15 - 1,41 (m, 26 H) 1,58 - 1,71 (m, 4H) 1,82 - 1,96 (m, 4H) 2,37 (t, J=7,52 Hz, 2H) 3,06 (t, J=6,66 Hz, 2H) 5,12 (s, 4H) 5,14 (s, 2H) 7,28 (s, 24H) 7,42 - 7,52 (m, 6 H).

Chất trung gian 10: Axit 22-(trityloxy)docosan-1,11,11-tricarboxylic



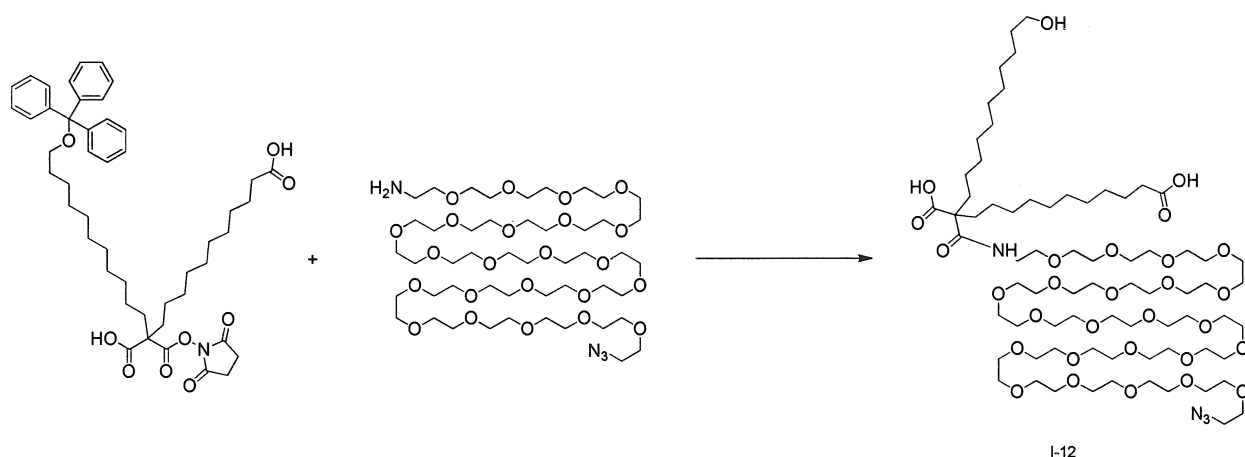
Thêm huyền phù của 10% Pd trên cacbon (11mg, 0,010mmol) trong THF (2,5mL) vào dung dịch chất trung gian 9 (200mg, 0,206mmol) trong THF (2,5mL). Đặt huyền phù đã khuấy trong điều kiện hydro thông qua bình cầu. Sau 2,25 giờ đưa phản ứng qua bộ lọc màng và rửa các chất rắn bằng EtOAc. Làm bay hơi phần dịch lọc để tạo ra chất trung gian 10 (150mg, có thể định lượng): ^1H NMR (400MHz, CLOROFORM-d) δ ppm 1,04 - 1,33 (m, 30 H) 1,45 - 1,62 (m, 4H) 1,76 - 1,91 (m, 4H) 2,21 - 2,36 (m, 2H) 2,97 (t, $J=6,60\text{Hz}$, 2H) 7,06 - 7,18 (m, 4H) 7,19 - 7,24 (m, 5H) 7,33 - 7,50 (m, 6 H) .

Chất trung gian 11: Axit 2-(((2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)oxy)carbonyl)-2-(11-(trityloxy)undexyl)tridecandioic (11).



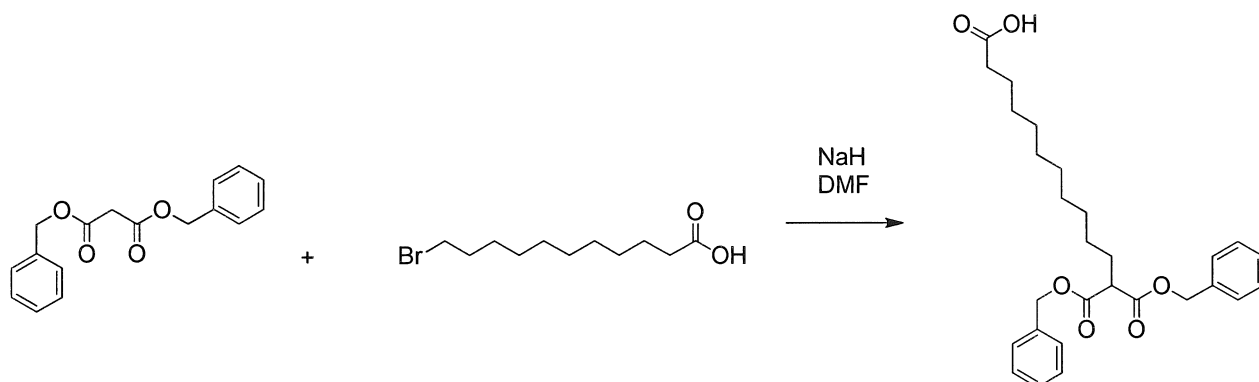
Kết hợp chất trung gian 10 (150mg, 0,214mmol) và N-hydroxysuccinimit (25mg, 0,214mmol) trong DCM (4mL). Thêm DCC (49mg, 0,235mmol) đã hòa tan trong DCM (0,61mL), và khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ phòng trong 7 giờ. Làm bay hơi phần dung môi và tinh chế phần cặn bằng HPLC (Sunfire C18 30x50mm; 65-95% ACN / nước + TFA 0,1%) sau đó bằng phương pháp SFC (Princeton 2-ethylpyridin cột 20x100mm, 25-35% MeOH / CO₂) để tạo ra chất trung gian 11 (34mg, 0,043mmol, 20%) dưới dạng dầu không màu: LCMS Phương pháp B Rt = 1,47 phút, M-CO₂H 752,7; ¹H NMR (400MHz, CLOROFORM-d) δ ppm 1,13 - 1,42 (m, 30 H) 1,56 - 1,73 (m, 4H) 1,94 - 2,14 (m, 4H) 2,37 (t, J=7,21 Hz, 2H) 2,83 (br, s, 4H) 3,06 (t, J=6,66 Hz, 2H) 7,15 - 7,28 (m, 3H) 7,29 - 7,36 (m, 6 H) 7,41 - 7,50 (m, 6 H).

Chất trung gian 12: Cấu trúc axit 2-((azido-PEG23)carbamoyl)-2-(11-hydroxyundexyl)tridecandioic



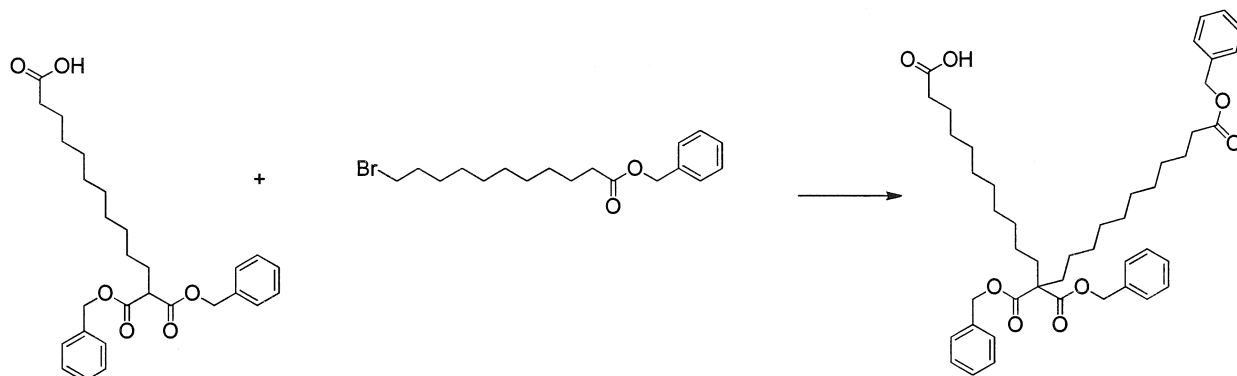
Kết hợp azido-dPEG23-amin (Quanta Biodesign) 42mg, 0,038mmol) trong THF (1,5mL) với chất trung gian 11 (34mg, 0,043mmol) trong điều kiện N₂. Đặt phản ứng trên đĩa lắc và khuấy trong 20 phút. Thêm DIPEA (7,44μL, 0,043mmol) và khuấy hỗn hợp phản ứng trong 2 giờ. Thêm DIPEA (4μL, 0,023mmol) và duy trì phản ứng qua đêm. Làm bay hơi phần dung môi và hấp thụ phần cặn trong DCM (3mL) và TFA (0,5mL). Khuấy dung dịch trong 1 giờ tại thời điểm dung môi bị tách ra. Tinh chế phần cặn bằng phương pháp HPLC (sunfire C18 30x50mm, 45-70% ACN/nước + TFA 0,1%) để tạo ra chất trung gian 12 (4mg, 1,8μmol, 4,2%): LCMS phương pháp B Rt = 0,75 phút, [M+2H]⁺ 771,4; ¹H NMR (400MHz, CLOROFORM-d) δ ppm 1,05 - 1,39 (m, 30 H) 1,52 - 1,82 (m, 6 H) 1,97 - 2,09 (m, 2H) 2,35 (t, J=7,21 Hz, 2H) 3,41 (t, J=5,07 Hz, 2H) 3,51 - 3,63 (m, 6 H) 3,63 - 3,75 (m, 90 H) 4,36 (t, J=6,72 Hz, 1H) 7,49 - 7,65 (m, 1H).

Chất trung gian 13: Axit 13-(benzyloxy)-12-((benzyloxy)carbonyl)-13-oxotridecanoic



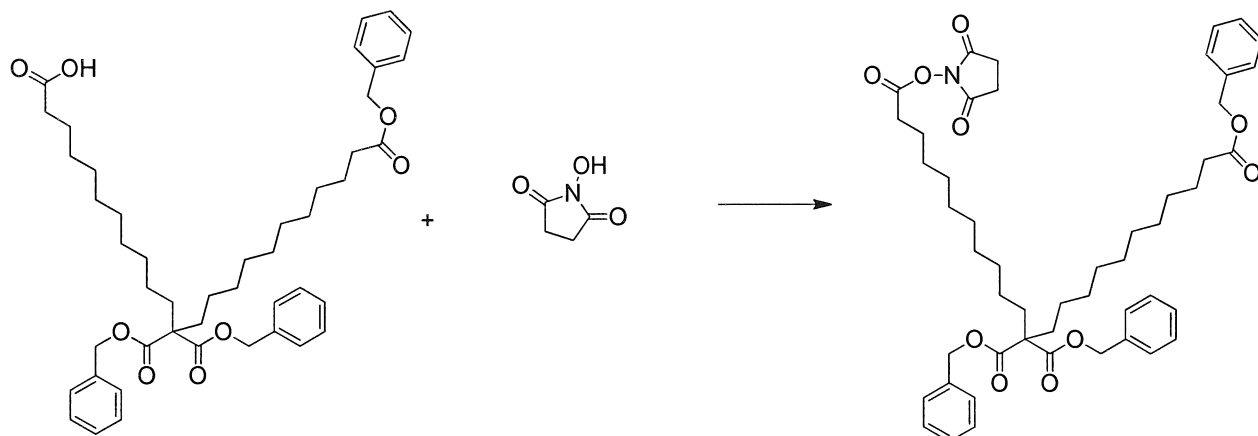
Thêm từ từ dibenzyl malonat (0,88mL, 3,52mmol) trong DMF (3mL) vào huyền phù của NaH (274mg, 6,86mmol) trong điều kiện N₂ ở 0°C. Khuấy hỗn hợp trong 1,5 giờ trước khi làm ấm đến nhiệt độ phòng. Thêm axit 11-bromoundecanoic (933mg, 3,52mmol) trong DMF (3mL) và để phản ứng diễn ra qua đêm. Gia nhiệt phản ứng đến 80°C trong 3 giờ trước khi làm nguội. Pha loãng hỗn hợp phản ứng bằng EtOAc (50mL) và Et₂O (50mL) và chiết bằng HCl 1M (25mL). Chiết pha chứa nước bằng EtOAc / Et₂O (100mL). Sấy khô các chất hữu cơ kết hợp trên Na₂SO₄ và làm bay hơi dung môi. Tinh chế phần cặn bằng cột nhanh (C18 50g 30-100% ACN / nước + TFA 0,1) để tạo ra chất trung gian 13 (315mg, 0,672mmol, 19%) dạng bột màu trắng: LCMS phương pháp B Rt = 1,05 phút, M+H 469,5.

Chất trung gian 14: Axit 23-(benzyloxy)-12,12-bis((benzyloxy)carbonyl)-23-oxotricosanoic



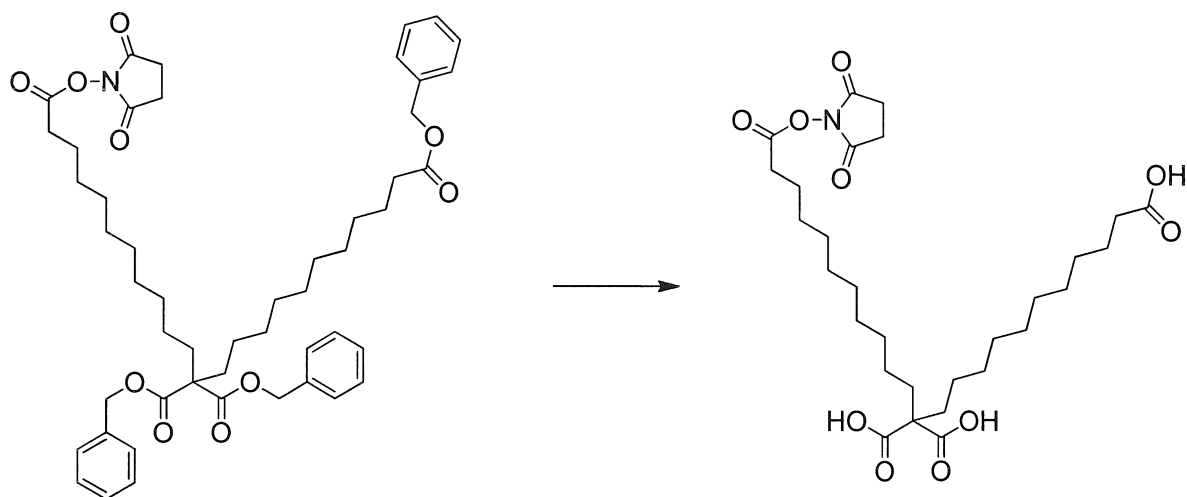
Tạo huyền phù NaH (54mg, 1,34mmol) trong DMF (1mL) ở 0°C trong điều kiện N₂. Thêm chất trung gian 13 (315mg, 0,672mmol) trong DMF (3mL) vào hỗn hợp này bằng cách nhỏ giọt. Khuấy hỗn hợp phản ứng trong 1 giờ trước khi thêm chất trung gian 1 (239mg, 0,672mmol) trong DMF (1mL). Duy trì phản ứng ở 0°C trong 45 phút nữa trước khi làm ấm đến nhiệt độ phòng. Khuấy hỗn hợp phản ứng qua đêm. Pha loãng hỗn hợp phản ứng với 1:1 Et₂O và EtOAc (75mL) và chiết bằng HCl 1M (20mL). Chiết pha chứa nước bằng 1:1 Et₂O và EtOAc (75mL). Sấy khô các chất hữu cơ kết hợp trên Na₂SO₄ và làm bay hơi. Quá trình tinh chế phân cận tạo thành bằng phương pháp HPLC (Xbridge C18 30x50mm, 45-70% ACN / nước + NH₄OH 5mM) đã tạo ra hợp chất nêu trong đề mục (132mg, 0,178mmol, 26%): LCMS phương pháp B; Rt= 1,53 phút, M-H 741,8.

Chất trung gian 15: 1,11,11-tribenzyl 21-(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl) henicosan-1,11,11,21-tetracarboxylat



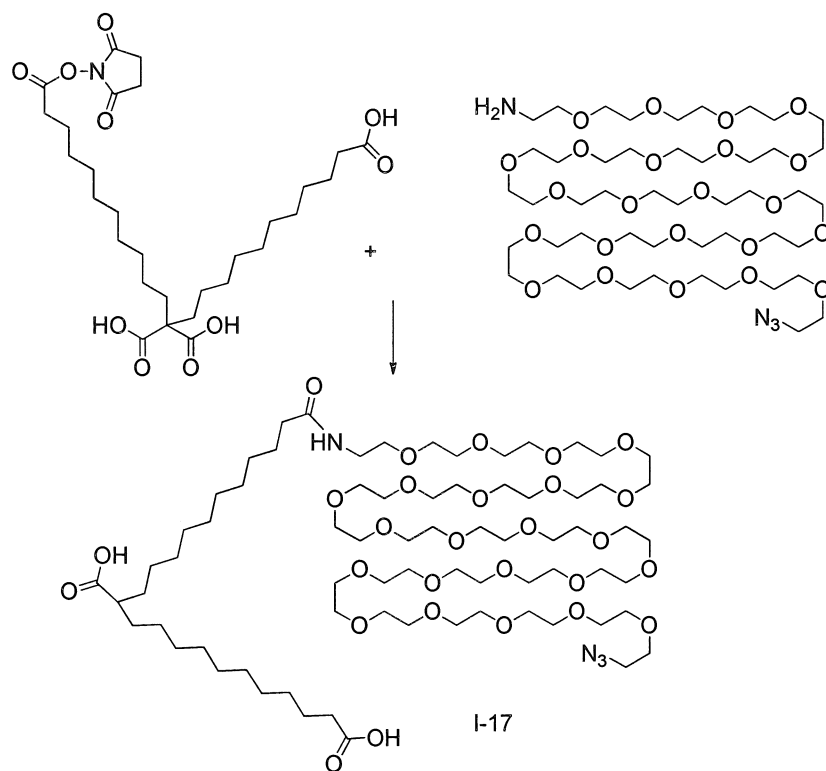
Thêm DCC (44mg, 0,213mmol) trong DCM (1mL) vào dung dịch gồm chất trung gian 14 (132mg, 0,178mmol) và N-hydroxysuccinimide (20mg, 0,178mmol) trong DCM (2,5mL). Khuấy hỗn hợp phản ứng trên đĩa lắc trong 17 giờ. Lọc phản ứng và rửa các chất rắn bằng DCM. Cô đặc phần dịch lọc và tinh chế bằng cột nhanh (silic đioxit 12g, 0-40% EtOAc / HEP) để tạo ra chất trung gian 15 (107mg, 0,127mmol, 72%): LCMS phương pháp B Rt = 1,53 phút, M+Na 862,8.

Chất trung gian 16: Axit 22-((2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)oxy)-22-oxodocosan-1,11,11-tricarboxylic



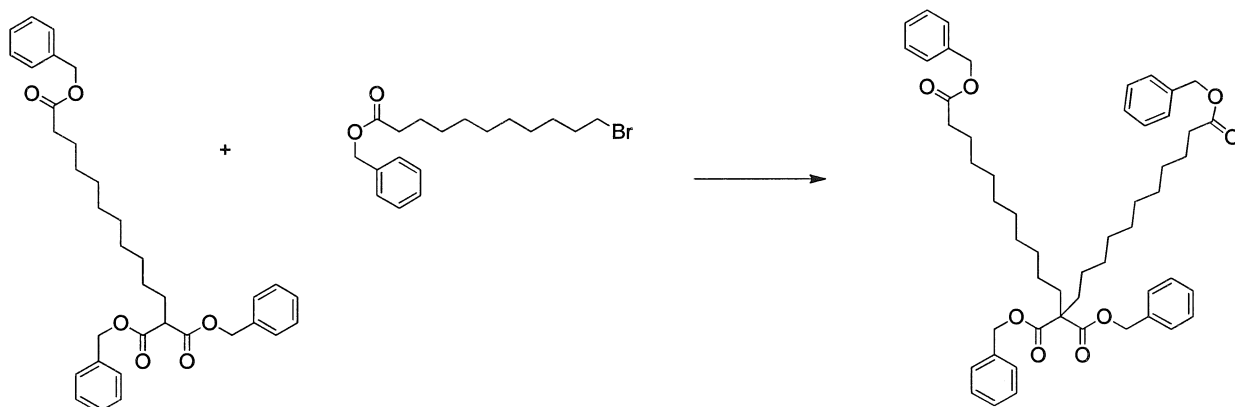
Thêm huyền phù của 10% Pd trên cacbon trong THF (2,5mL) vào dung dịch chất trung gian 15 (107mg, 0,127mmol) trong THF (2,5mL). Đặt hỗn hợp trong điều kiện khí hydro trong 1,5 giờ. Đưa phản ứng qua bộ lọc màng và rửa phần chất rắn bằng DCM và THF. Làm bay hơi phần dịch lọc để tạo ra dầu không màu (95mg, có thể định lượng), dầu này chứa hợp chất nêu trong đề mục: LCMS phương pháp B Rt = 0,65 phút, M+H 570,5.

Chất trung gian 17: Cấu trúc axit 2-(11-(azido-PEG23-amino)-11-oxoundexyl)tridecandioic



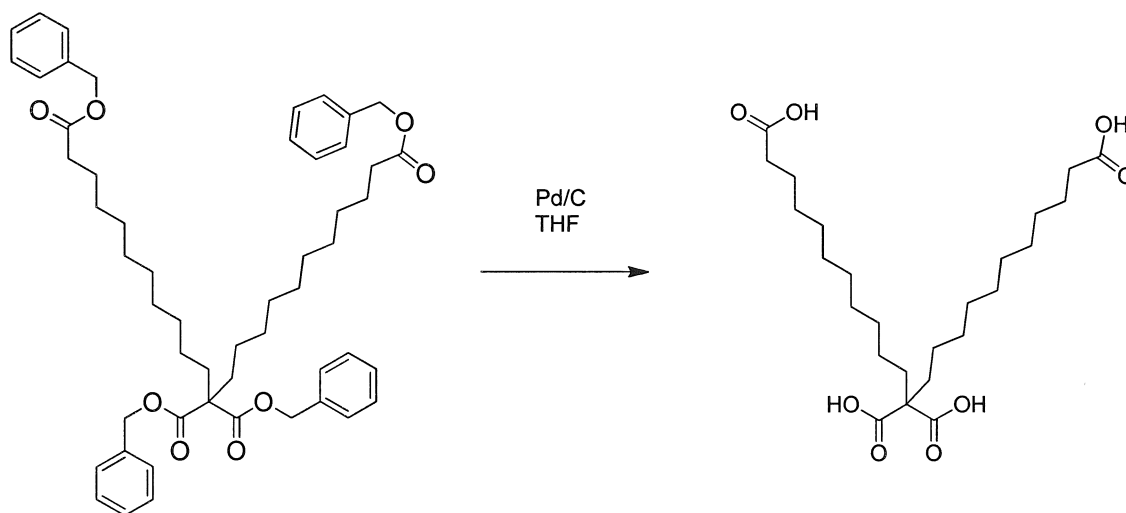
Thêm dung dịch chất trung gian 16 (48mg, 0,042mmol) trong THF (1mL) vào lọ đã được nạp azido-dPEG23-amin (Quanta Biodesign: 46mg, 0,042mmol). Khuấy hỗn hợp phản ứng trong 20 phút trước khi thêm DIPEA (11 μ L, 0,063mmol) và sau đó duy trì qua đêm. Thêm azido-PEG23-amin (23mg, 0,021mmol) và DIPEA (5 μ L, 0,029mmol) và khuấy hỗn hợp phản ứng một ngày nữa. Làm bay hơi phần dung môi và tinh chế phân cận bằng phương pháp HPLC (Xbridge C18 30x50mm, 10-30% ACN / NH₄OH 5mM). Quá trình đông khô các phân đoạn tạo thành hỗn hợp các sản phẩm. Tinh chế vật liệu bằng phương pháp HPLC (Sunfire C18 30x50mm, 45-70% ACN / nước + TFA 0,1%) để tạo ra chất trung gian 17 nêu trong đề mục (30mg, 0,020mmol, 48%): LCMS SQ4 Rt = 0,81 phút, [M+H+H₃O]⁺² 764,5; ¹H NMR (400MHz, AXETONITRIL-d₃) δ ppm 1,30 (br, s., 28 H) 1,40 - 1,50 (m, 2H) 1,50 - 1,62 (m, 6 H) 2,14 (t, J=7,52 Hz, 2H) 2,23 - 2,35 (m, 3H) 3,32 (q, J=5,58 Hz, 2H) 3,37 - 3,43 (m, 2H) 3,47 - 3,52 (m, 2H) 3,53 - 3,68 (m, 90 H) 6,54 (br. s., 1H).

Chất trung gian 18: Tetrabenzyl henicosan-1,11,11,21-tetracarboxylat



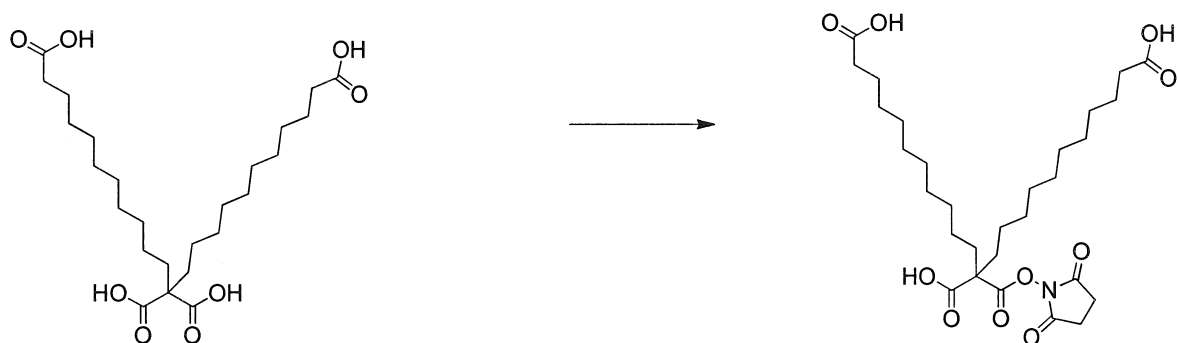
Thêm từ từ chất trung gian 2 (337mg, 0,603mmol) trong DMF (2mL) vào huyền phù của NaH (48mg, 1,21mmol) trong DMF (2mL) ở 0°C trong điều kiện N₂. Khuấy hỗn hợp trong 15 phút trước khi thêm chất trung gian 1 (429mg, 1,21mmol) trong DMF (2mL). Khuấy hỗn hợp phản ứng ở 0°C trong 20 phút trước khi làm ấm đến nhiệt độ phòng. Duy trì phản ứng ở nhiệt độ phòng đồng thời khuấy trong 3 ngày. Pha loãng hỗn hợp phản ứng bằng Et₂O (75mL) và chiết bằng nước (20mL). Chiết pha chứa nước bằng Et₂O (75mL). Sấy khô các chất hữu cơ kết hợp trên Na₂SO₄ và làm bay hơi. Tinh chế phân cận bằng cột nhanh (silic đioxit 24g, 0-15% EtOAc / HEP) để tạo ra hợp chất nêu trong đề mục (315mg, 0,378mmol, 63%): LCMS Phương pháp B Rt = 1,70 phút, M+Na 855,8; ¹H NMR (400MHz, CLOROFORM-d) δ ppm 0,95 - 1,13 (m, 4H) 1,13 - 1,40 (m, 24H) 1,59 - 1,72 (m, 4H) 1,82 - 1,95 (m, 4H) 2,37 (t, J=7,52 Hz, 4H) 5,12 (s, 4H) 5,14 (s, 4H) 7,14 - 7,44 (m, 20 H).

Chất trung gian 19: Axit henicosan-1,11,11,21-tetracarboxylic



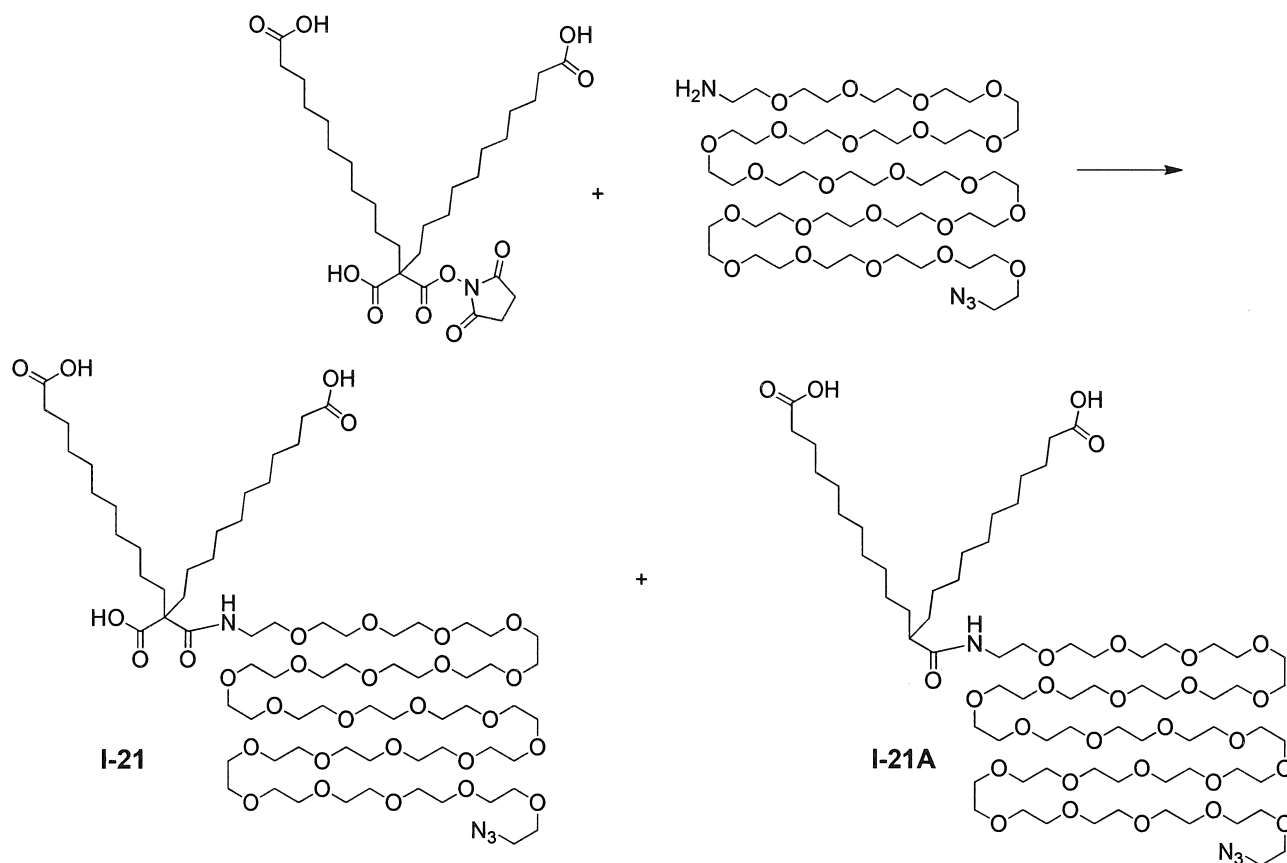
Thêm huyền phù của 10% Pd trên cacbon (20mg, 0,019mmol) trong THF (4mL) vào dung dịch chất trung gian 18 (315mg, 0,378mmol) trong THF (6mL), và đặt phản ứng trong điều kiện khí hydro trong 2 giờ. Sử dụng bộ lọc màng để loại bỏ các chất rắn, rửa các chất này với EtOAc. Quá trình bay hơi phần dịch lọc đã tạo ra chất trung gian 19 (179mg, có thể định lượng) dạng chất rắn màu trắng: LCMS phương pháp A Rt = 1,24 phút, M+H 473,4; ¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δppm 0,99 - 1,15 (m, 4H) 1,24 (br, s., 24H) 1,48 (quin, J=6,94 Hz, 4H) 1,62 - 1,76 (m, 4H) 2,18 (t, J=7,34 Hz, 4H) 12,23 (br. s, 4H).

Chất trung gian 20: Axit 11-(((2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)oxy)cacbonyl)henicosan-1,11,21-tricarboxylic



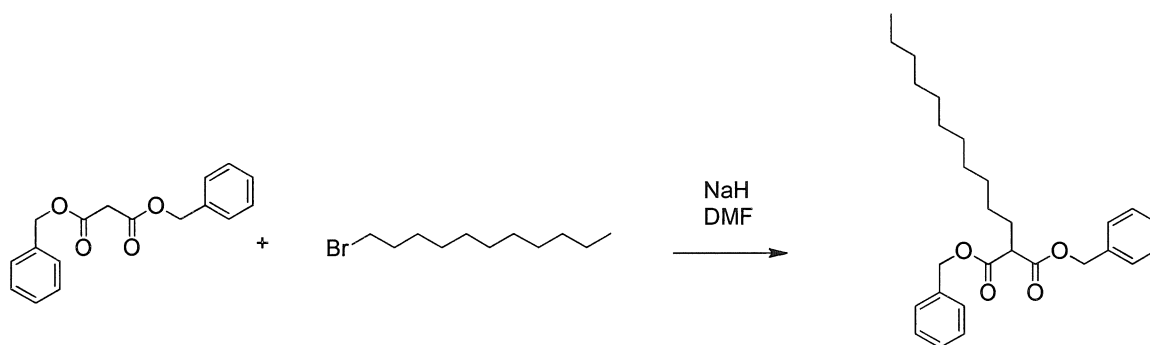
Hòa tan N-hydroxysuccinimit (20mg, 0,170mmol) và chất trung gian 19 (90mg, 0,190mmol) trong DCM (3mL) và THF (0,3mL). Thêm dung dịch DCC (39mg, 0,190mmol) trong DCM (0,5mL) và khuấy hỗn hợp phản ứng qua đêm. Làm bay hơi phần dung môi và tinh chế phần cặn bằng phương pháp HPLC (Sunfire C18 30x50mm; 35-60% ACN/nước + TFA 0,1%) để tạo ra hợp chất nêu trong đề mục dạng bột màu trắng (21mg, 0,037mmol, 19%): LCMS (Phương pháp C Rt = 1,01 phút, M+H 570,3.

Chất trung gian 21 và 21a: Axit 11-((azido-PEG23)carbamoyl) henicosan-1,11,21-tricarboxylic (21) và axit 12-((azido-PEG23)carbamoyl) tricosandioic (21a)



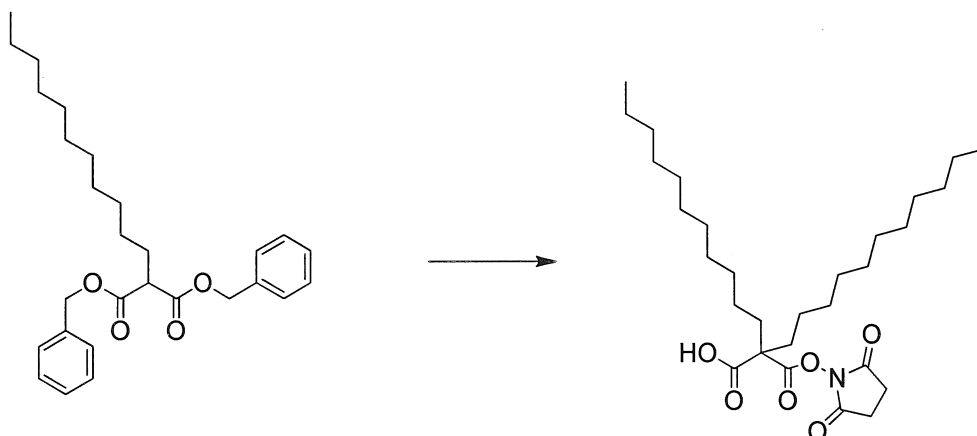
Kết hợp azido-PEG23-amin (41mg, 0,037mmol) và chất trung gian 20 (21mg, 0,037mmol) trong THF (1mL) và khuấy trong 10 phút. Thêm DIPEA (9,66μL, 0,055mmol), và khuấy hỗn hợp phản ứng qua đêm. Làm bay hơi phần dung môi, và tinh chế phần cặn bằng phương pháp HPLC (Sunfire C18 30x50mm, 35-60% ACN / nước + TFA 0,1%) để tạo ra chất trung gian 21 (22mg, 0,014mmol, 38%) và 21a (4mg, 2,6μmol, 7%): LCMS phương pháp B Rt = 0,69 phút, M+H 1555,3; ¹H NMR (400MHz, CLOROFORM-d) δ ppm 1,27 (br. s., 19 H) 1,29 - 1,41 (m, 9 H) 1,65 (quin, J=7,12 Hz, 4H) 1,78 (td, J=12,13, 4,22 Hz, 2H) 1,95 - 2,08 (m, 2H) 2,35 (t, J=7,21 Hz, 4H) 3,41 (t, J=5,07 Hz, 2H) 3,54 (q, J=5,05 Hz, 2H) 3,58 - 3,77 (m, 92H) 7,60 (t, J=4,95 Hz, 1H); LCMS phương pháp B Rt = 0,78 phút, M-H 1509,3; ¹H NMR (400MHz, CLOROFORM-d) δ ppm 1,18 (br. s., 19 H) 1,21 - 1,38 (m, 11H) 1,43 - 1,63 (m, 6 H) 1,91 - 2,04 (m, 1H) 2,26 (t, J=7,15 Hz, 4H) 3,31 (t, J=5,07 Hz, 2H) 3,40 (q, J=5,14 Hz, 2H) 3,46 - 3,50 (m, 2H) 3,51 - 3,69 (m, 90 H) 6,23 (t, J=5,01 Hz, 1H).

Chất trung gian 22: Dibenzyl 2-undexylmalonat



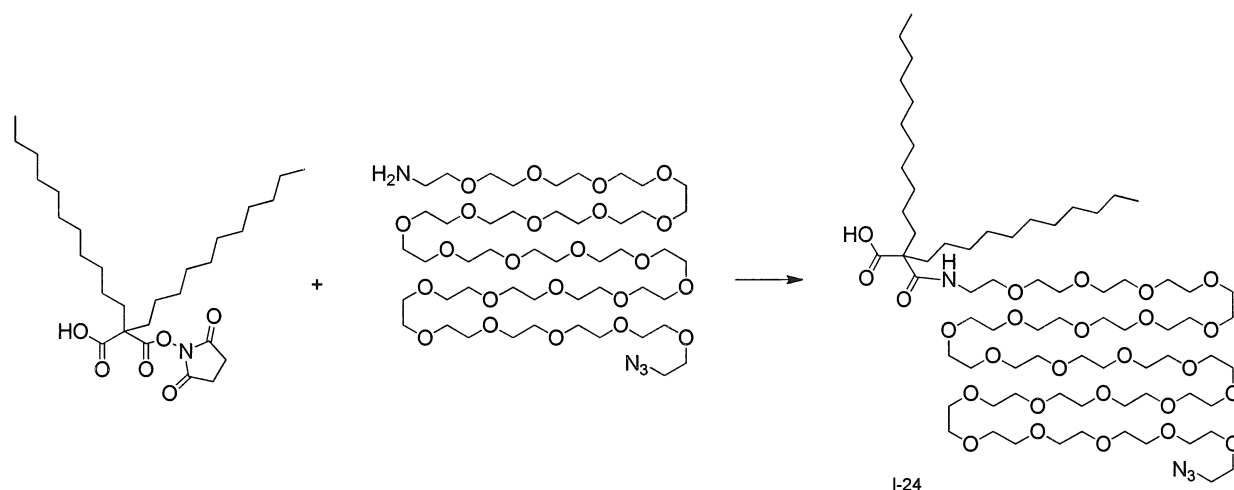
Thêm từng giọt dibenzyl malonat (0,88mL, 3,52mmol) trong DMF (1,5mL) vào huyền phù của NaH (155mg, 3,87mmol) trong DMF (6mL) trong điều kiện N₂ ở 0°C. Khuấy hỗn hợp trong 30 phút trước khi thêm 1-bromoundecan (0,785mL, 3,52mmol) trong DMF (1,5mL) vào phản ứng. Làm ấm phản ứng đến nhiệt độ phòng và khuấy trong 5 ngày. Pha loãng hỗn hợp phản ứng bằng Et₂O (75mL) và chiết bằng nước (20mL). Chiết pha chứa nước bằng Et₂O (75mL). Sấy khô các chất hữu cơ kết hợp trên Na₂SO₄ rồi làm bay hơi. Tinh chế phân cực bằng cột nhanh (silic đioxit 80g, 0-10% EtOAc / HEP) để tạo ra hợp chất nêu trong đề mục (974mg, 2,22mmol, 63%) dưới dạng dầu không màu: LCMS phương pháp B Rt = 1,55 phút, M+H 439,5.

Chất trung gian 23: Axit 2-(((2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)oxy)carbonyl)-2-undexyltridecanoic



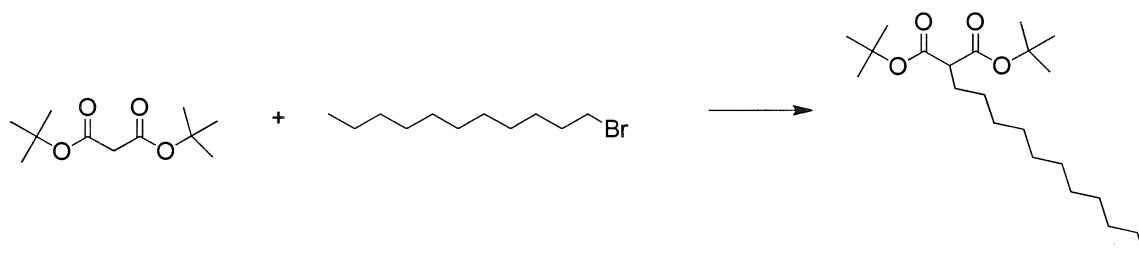
Thêm từng giọt dibenzyl 2-undecylmalonate (chất trung gian 22: 400mg, 0,912mmol) trong DMF (1mL) vào huyền phù của NaH (44mg, 1,09mmol) trong DMF (2mL) trong điều kiện N₂ ở 0°C. Khuấy hỗn hợp trong 45 phút trước khi thêm 1-bromoundecan (0,285mL, 1,28mmol) trong DMF (1mL) vào phản ứng. Làm ấm phản ứng đến nhiệt độ phòng và khuấy trong 1 ngày. Pha loãng hỗn hợp phản ứng bằng Et₂O (75mL) và chiết bằng nước (20mL). Chiết pha chứa nước bằng Et₂O (75mL). Sấy khô các chất hữu cơ kết hợp trên Na₂SO₄ rồi làm bay hơi. Tinh chế phần cặn bằng cột nhanh (silic đioxit 40g, 0-5% EtOAc / HEP) để tạo ra dầu không màu (412mg). Hòa tan dầu này trong THF/MeOH và đưa qua thiết bị Thales Nano H-Cube (1mL/phút, 2 bar H₂, 22°C) chứa cột 10% Pd/C. Thu lấy dòng ra và làm bay hơi để tạo ra chất sáp rắn (272mg). Hòa tan chất sáp rắn này trong DCM / THF 3:1 rồi cô đặc thành dầu. Hòa tan lại dầu này trong DCM (6mL) trong điều kiện N₂, và N-hydroxysuccinimide (68mg), sau đó thêm DCC (136mg) trong DCM (3mL). Khuấy hỗn hợp phản ứng trong ngày. Lọc phản ứng và cô đặc phần dịch lọc. Tinh chế phần cô đặc bằng cột nhanh (C18 12g, 25-100% ACN / nước + axit formic 0,1%). Tinh chế tiếp vật liệu tạo thành bằng phương pháp sắc ký lỏng siêu tới hạn (Princeton 2-ethylpyridin 20x150mm; 5-15% MeOH / CO₂) để tạo ra chất trung gian 23 (37mg, 0,073mmol, 8%): LCMS phương pháp B Rt = 1,67 phút, M+NH₄ 527,6; ¹H NMR (400MHz, CLOROFORM-d) δ ppm 0,80 - 0,94 (m, 6 H) 1,18 - 1,42 (m, 36 H) 1,97 - 2,14 (m, 4H) 2,87 (br. s., 4H).

Chất trung gian 24: Axit 2-((azido-PEG23)carbamoyl)-2-undexyltridecanoic



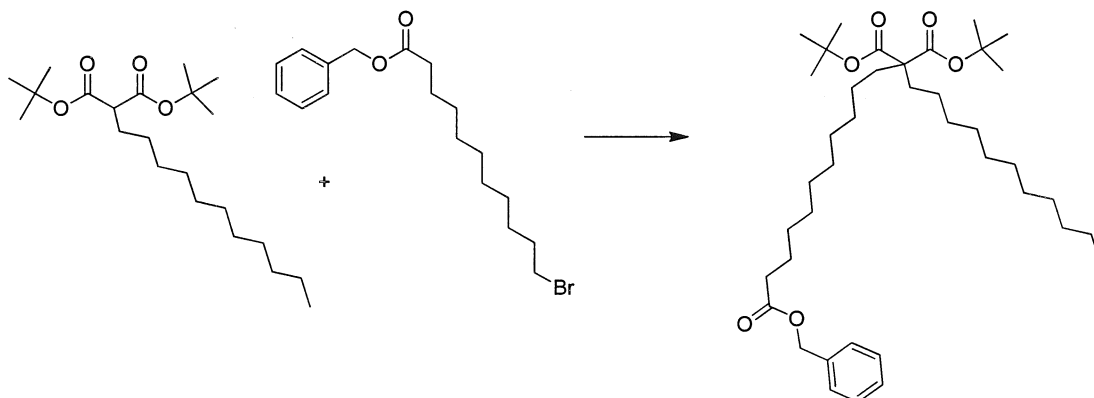
Thêm dung dịch chất trung gian 23 (37mg, 0,073mmol) trong THF (1mL) vào lọ đã được nạp với azido-dPEG23-amin (Quanta Biodesign: 80mg, 0,073mmol). Khuấy dung dịch trên đĩa lắc và thêm DIPEA (11μL, 0,065mmol). Khuấy hỗn hợp phản ứng qua đêm trước khi thêm một phần bổ sung DIPEA (12μL, 0,071mmol), và để phản ứng diễn ra qua đêm. Làm bay hơi phần dung môi và tinh chế phần cặn bằng phương pháp sắc ký lỏng siêu tới hạn (Princeton Amino 21x150mm; 20-30% MeOH / CO₂) để tạo ra hợp chất nêu trong đề mục (45mg, 0,030mmol, 41%): LCMS phương pháp B Rt = 1,50 phút, [M+2H]²⁺ 748,1; ¹H NMR (400MHz, CLOROFORM-d) δ ppm 0,90 (t, J=6,85 Hz, 6 H) 1,09 - 1,38 (m, 30 H) 1,58 (br. s., 12H) 1,64 - 1,76 (m, 2H) 1,98 - 2,16 (m, 2H) 3,41 (t, J=5,14 Hz, 2H) 3,46 - 3,64 (m, 5H) 3,64 - 3,91 (m, 83H).

Chất trung gian 25: Di-tert-butyl 2-undexylmalonat



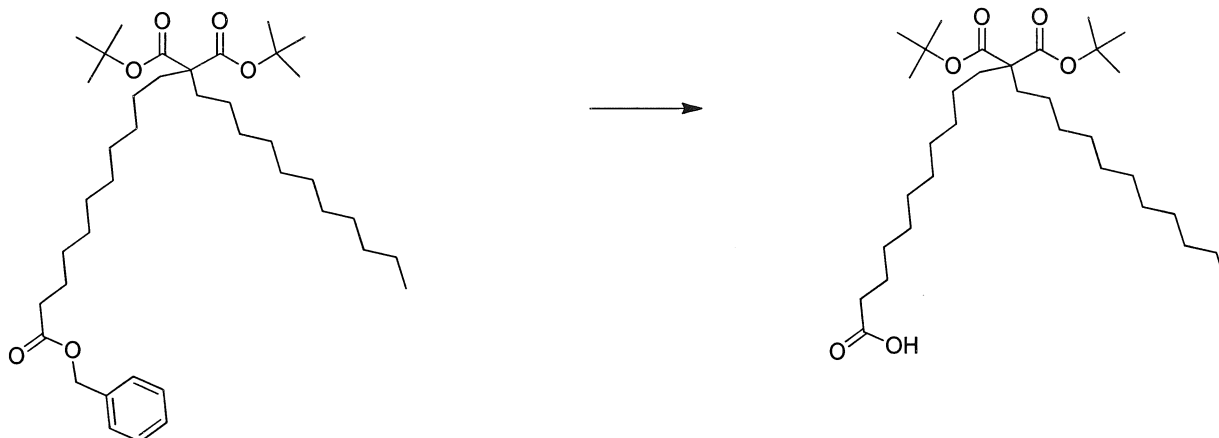
Thêm di-tert-butyl malonat (1,0g, 4,62mmol) trong DMF (2mL) vào huyền phù của NaH (213mg, 5,32mmol) trong DMF (5mL) trong điều kiện N₂ ở 0°C. Khuấy hỗn hợp phản ứng trong 30 phút trước khi thêm 1-bromoundecan trong DMF (2mL). Khi thêm, làm ấm phản ứng đến nhiệt độ phòng và khuấy trong 2 ngày. Pha loãng hỗn hợp phản ứng bằng Et₂O (75mL) và chiết bằng nước (25mL). Chiết pha chứa nước bằng Et₂O (75mL). Sấy khô các chất hữu cơ kết hợp trên Na₂SO₄ và làm bay hơi phần dung môi. Tinh chế phân cô đặc bằng cột nhanh (silic đioxit 120g, 0-40% Et₂O/ ete dầu hỏa) để tạo ra chất trung gian 25 (0,998g, 2,69mmol, 58%): LCMS phương pháp B Rt = 1,64 phút, M+Na 393,5; ¹H NMR (400MHz, CLOROFORM-d) δppm 0,85 - 0,94 (m, 3H) 1,24 - 1,36 (m, 18 H) 1,41 - 1,52 (m, 18 H) 1,74 - 1,86 (m, 2H) 3,13 (t, J=7,58 Hz, 1H).

Chất trung gian 26: 1-benzyl 11,11-di-tert-butyl docosan-1,11,11-tricarboxylat



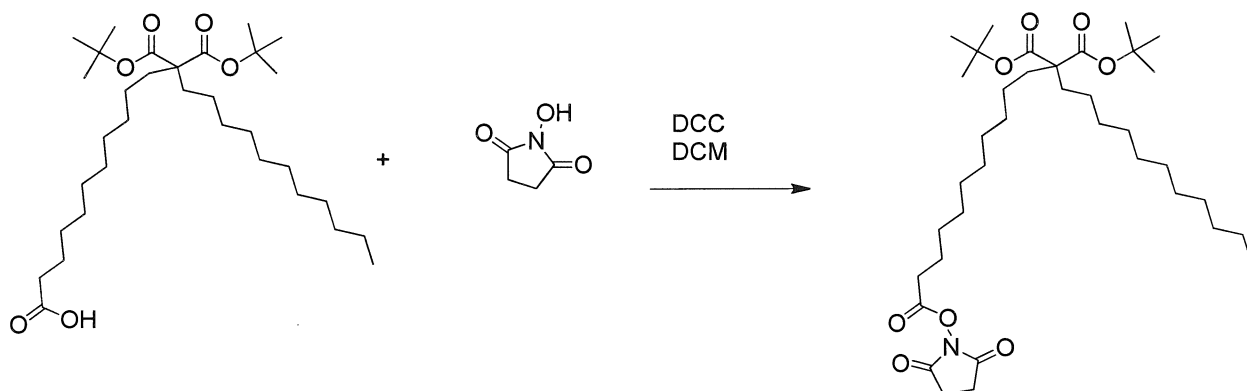
Tổng hợp hợp chất nêu trong đề mục theo cách tương tự như chất trung gian 9 sử dụng chất trung gian 25 làm nguyên liệu ban đầu để tạo ra dầu không màu (980mg, 1,52mmol, 66%): ¹H NMR (400MHz, CLOROFORM-d) δ ppm 0,89 (t, J=6,91 Hz, 3H) 1,06 - 1,20 (m, 4H) 1,20 - 1,35 (m, 28 H) 1,45 (s, 18 H) 1,58 - 1,70 (m, 2H) 1,72 - 1,83 (m, 4H) 2,36 (t, J=7,52 Hz, 2H) 5,12 (s, 2H) 7,30 - 7,45 (m, 5H).

Chất trung gian 27: Axit 12,12-bis(tert-butoxycarbonyl)tricosanoic



Tổng hợp hợp chất nêu trong đề mục (472mg, 0,851mmol, 100%) theo cách tương tự như chất trung gian 19 bằng cách sử dụng chất trung gian 26: LCMS phương pháp B Rt = 1,76 phút, M-H 553,6; ^1H NMR (400MHz, CLOROFORM-d) δ ppm 0,84 - 0,95 (m, 3H) 1,07 - 1,21 (m, 4H) 1,21 - 1,40 (m, 28 H) 1,46 (s, 18 H) 1,58 - 1,70 (m, 2H) 1,72 - 1,84 (m, 4H) 2,37 (t, J=7,46 Hz, 2H).

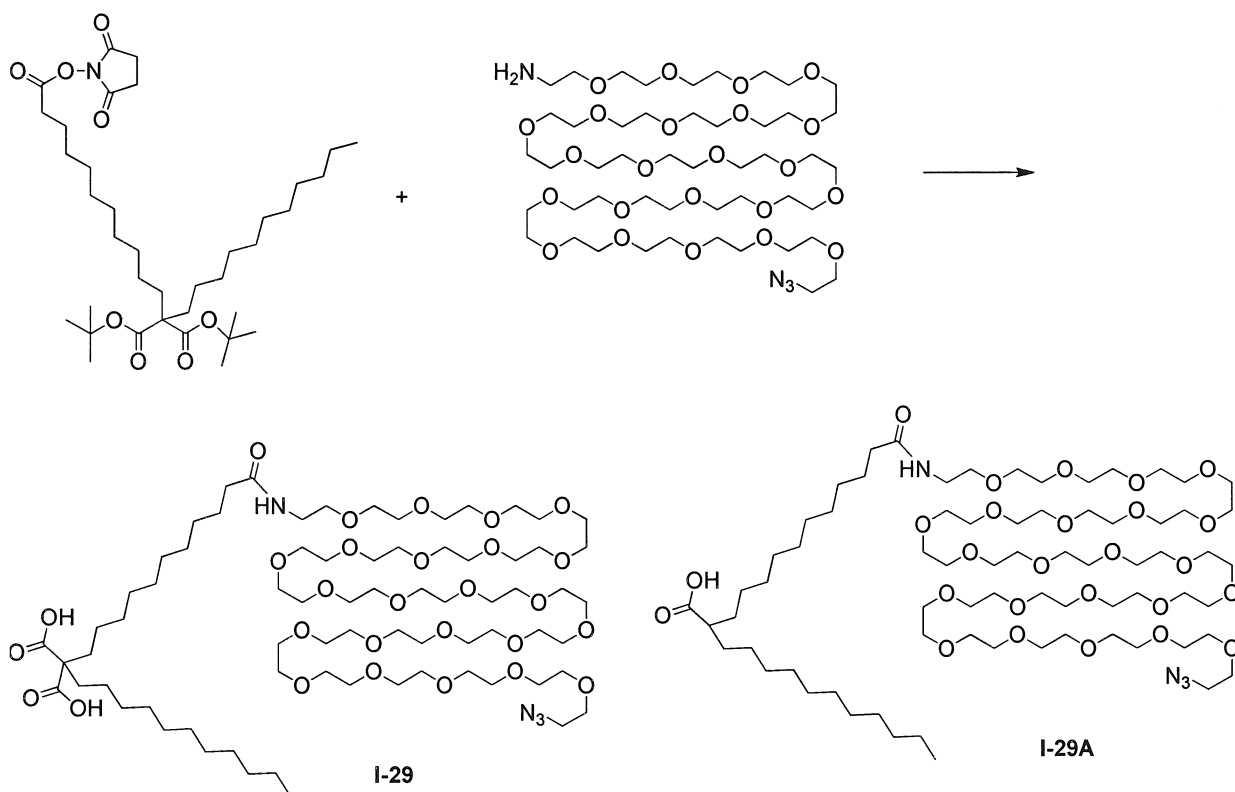
Chất trung gian 28: 11,11-di-tert-butyl 1-(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl) docosan-1,11,11-tricarboxylat



Hòa tan chất trung gian 27 (200mg, 0,360mmol) và N-hydroxysuccinimit (42mg, 0,360mmol) trong DCM (3mL). Thêm dung dịch DCC (89mg, 0,433mmol) trong DCM (1,6mL) vào và khuấy hỗn hợp phản ứng trong 4,5 giờ. Lọc phản ứng và cô đặc phần dịch

lọc. Tinh chế phân cô đặc bằng cột nhanh (silic đioxit 24g, 0-40% EtOAc/HEP) để tạo ra hợp chất nêu trong đề mục dưới dạng dầu không màu (70mg, 0,107mmol, 30%): LCMS phương pháp B Rt = 1,74 phút, M+Na 674,7.

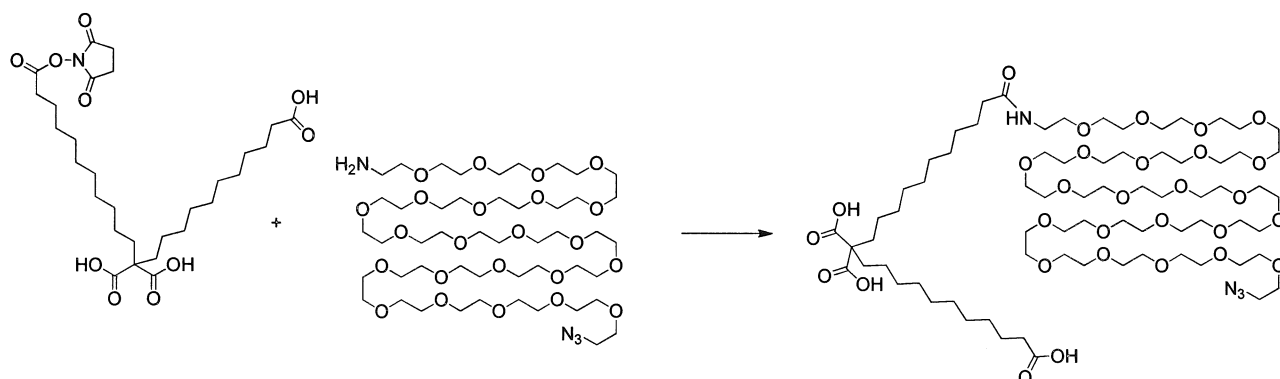
Các chất trung gian 29 và 29A: axit 2-(11-((azido-PEG23)-amino)-11-oxoundexyl)-2-undexylmalonic (29) và axit 13-((azido-PEG23)-amino)-13-oxo-2-undexyltridecanoic (29A)



Thêm dung dịch chất trung gian 28 (35mg, 0,054mmol) trong THF (1mL) vào lọ đã được nạp azido-PEG23-amin (59mg, 0,054mmol). Thêm DIPEA (14μL, 0,081mmol) và khuấy hỗn hợp phản ứng qua đêm. Làm bay hơi phần dung môi và hòa tan lại phần cặn trong DCM (1mL) và TFA (0,2mL). Khuấy hỗn hợp phản ứng trong 1,25 giờ trước khi làm bay hơi phần

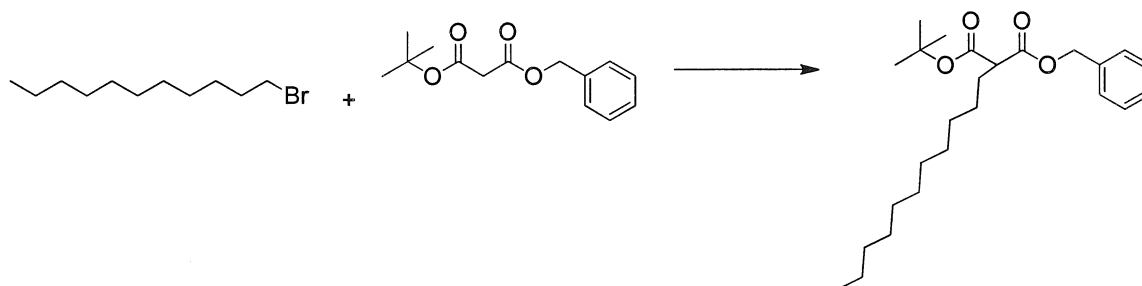
dung môi. Tinh chế phân cận bằng phương pháp HPLC (Sunfire 30x50mm C18, 55-80% ACN / nước + TFA 0,1%) và hòa tan lại vật liệu tạo thành trong DCM (4mL) và TFA (2mL) và khuấy trong 1,5 giờ. Làm bay hơi phần dung môi và tinh chế phân cận bằng HPLC (Sunfire 30x50mm C18, 55-80% ACN / nước + TFA 0,1%) để tạo ra chất trung gian 29 (28mg, 0,016mmol, 29%) và chất trung gian 29A (1mg, 0,6 μ mol, 1%): LCMS phương pháp B Rt = 1,08 phút, $[M+H+H_3O]^+2$ 771,5; 1H NMR (400MHz, CLOROFORM-d) δ ppm 0,90 (t, J=6,72 Hz, 3H) 1,26 (br. s., 24H) 1,32 - 1,41 (m, 8 H) 1,62 (quin, J=7,64 Hz, 2H) 1,88 - 2,01 (m, 4H) 2,31 (t, J=7,70Hz, 2H) 3,41 (t, J=5,07 Hz, 2H) 3,46 - 3,56 (m, 3H) 3,57 - 3,90 (m, 91H); LCMS phương pháp B Rt = 1,29 phút, $[M+2H]^+2$ 741,1.

Chất trung gian 30: axit 22-((azido-PEG23)amino)-22-oxodocosan-1,11,11-tricarboxylic



Thêm dung dịch chất trung gian 16 (58mg, 0,063mmol) trong THF (1mL) vào lọ đã được nạp azido-PEG23-amin (70mg, 0,063mmol). Thêm DIPEA (17 μ L, 0,095mmol) và khuấy hỗn hợp phản ứng trên đĩa lắc qua đêm. Cô đặc phản ứng và tinh chế bằng phương pháp HPLC (Sunfire C18 30x50mm, 35-60% ACN / nước + TFA 0,1%) để tạo ra chất trung gian 30 (57mg, 0,036mmol, 57%) dưới dạng chất rắn sáp màu trắng: LCMS phương pháp B Rt = 0,62 phút, M+H 1555,4; 1H NMR (400MHz, CLOROFORM-d) δ ppm 1,28 (br. s., 18 H) 1,30 - 1,40 (m, 10 H) 1,63 (m, J=7,10, 7,10, 7,10, 7,10, 7,10Hz, 4H) 1,88 - 2,02 (m, 4H) 2,28 (t, J=8,10Hz, 2H) 2,35 (t, J=7,40Hz, 2H) 3,41 (t, J=5,07 Hz, 2H) 3,50 (dt, J=9,20, 4,39 Hz, 2H) 3,57 - 3,63 (m, 2H) 3,63 - 3,73 (m, 90 H)

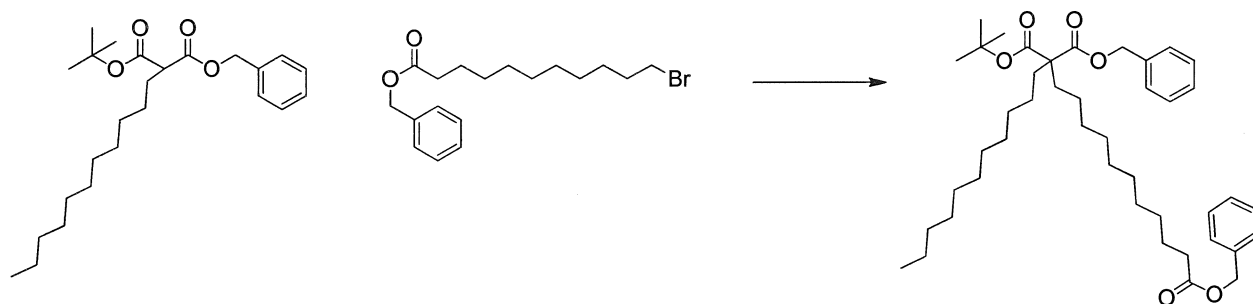
Chất trung gian 31: 1-benzyl 3-tert-butyl 2-undexylmalonat



Thêm benzyl tert-butyl malonat (1,0g, 4,0mmol) trong DMF (2mL) vào huyền phù của NaH (160mg, 4,0mmol) trong DMF (8mL) ở 0°C trong điều kiện N₂. Khuấy hỗn hợp trong 50 phút sau đó thêm 1-bromoundecan trong DMF (2mL). Sau khi khuấy một giờ nữa, làm ấm phản ứng đến nhiệt độ phòng. Duy trì phản ứng qua đêm. Thêm Et₂O (100mL) và nước (20mL) vào các vùng phân chia của phản ứng. Chiết pha chứa nước bằng Et₂O (100mL), và sấy khô các chất hữu cơ kết hợp trên Na₂SO₄. Làm bay hơi phần dung môi và tinh chế phần cặn bằng cột nhanh (C18 12g, 40-100% ACN / nước + TFA 0,1%) để tạo ra hợp chất nêu trong đề mục dưới dạng dầu không màu (1,14g, 2,82mmol, 71%): LCMS phương pháp A Rt = 1,58 phút, M+Na 427,4; ¹H NMR (400MHz, CLOROFORM-d) δ ppm 0,84 - 0,96 (m, 3H) 1,28 (br. s, 12H) 1,31 (m, J=3,90Hz, 6 H) 1,41 (s, 9 H) 1,88 (q, J=7,38 Hz, 2H) 3,29 (t, J=7,58 Hz, 1H) 5,19 (q, J=12,27 Hz, 2H) 7,30 - 7,42 (m, 5H).

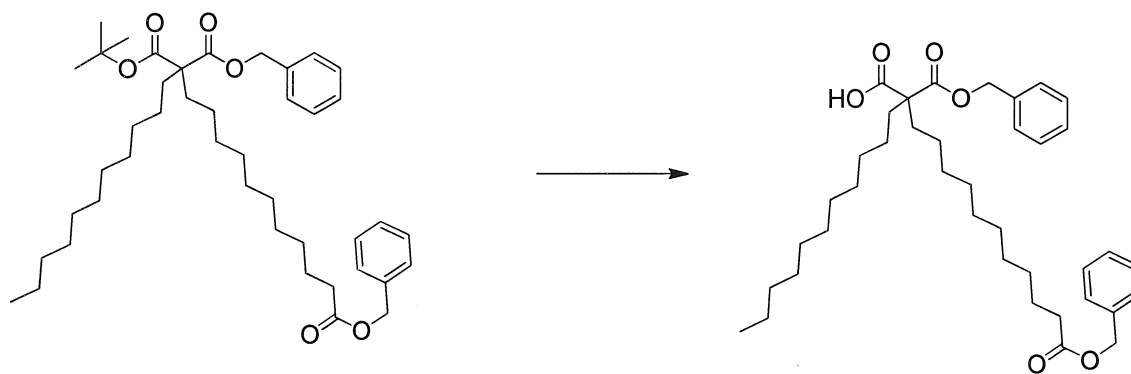
Theo cách khác, có thể thực hiện quá trình alkyl hóa tert-butyl malonat bằng cách sử dụng 1-iodoundecan (1,2 eq) khi có mặt kali cacbonat (2 eq) trong DMF.

Chất trung gian 32: 1,11-dibenzyl 11-tert-butyl docosan-1,11,11-tricarboxylat



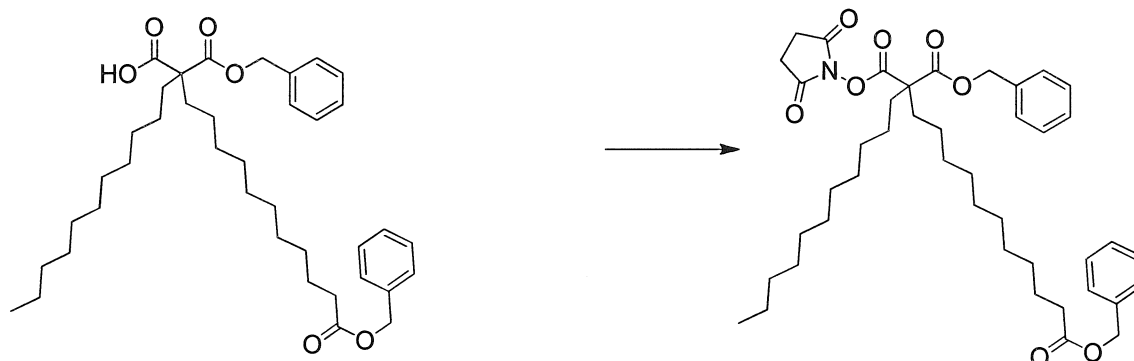
Tổng hợp hợp chất nêu trong đề mục theo cách tương tự như chất trung gian 9 sử dụng chất trung gian 31 (650mg, 1,61mmol) làm nguyên liệu ban đầu để tạo ra dầu không màu (823mg, 1,21mmol, 75%): ^1H NMR (400MHz, CLOROFORM- d) δ ppm 0,84 - 0,94 (m, 3H) 1,12 (m, $J=6,60\text{Hz}$, 4H) 1,19 - 1,33 (m, 28 H) 1,35 (s, 9 H) 1,66 (quin, $J=7,40\text{Hz}$, 2H) 1,85 (t, $J=8,44\text{ Hz}$, 4H) 2,37 (t, $J=7,52\text{ Hz}$, 2H) 5,14 (s, 2H) 5,16 (s, 2H) 7,30 - 7,42 (m, 10 H).

Chất trung gian 33: Axit 13-(benzyloxy)-2-((benzyloxy)cacbonyl)-13-oxo-2-undexyltridecanoic



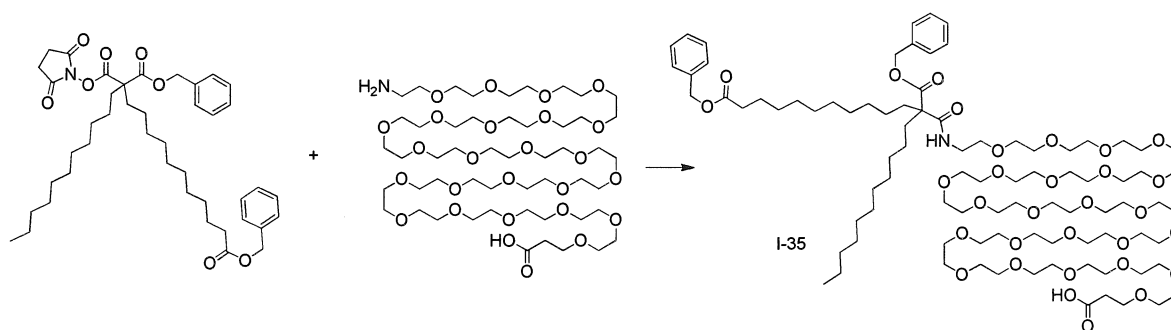
Thêm TFA (0,6mL) vào dung dịch chất trung gian 32 (200mg, 0,295mmol) trong DCM (3mL), và khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ phòng trong 3 giờ. Làm bay hơi phần dung môi và tinh chế phần cặn bằng cột nhanh (silic đioxit 12g, 0-15% EtOAc / HEP) để tạo ra hợp chất nêu trong đề mục (177mg, 0,284mmol, 96%): ^1H NMR (400MHz, CLOROFORM- d) δ ppm 0,87 - 0,94 (m, 3H) 0,94 - 1,05 (m, 2H) 1,19 (br. s., 14H) 1,23 - 1,37 (m, 16 H) 1,65 (quin, $J=7,40\text{Hz}$, 2H) 1,78 - 1,91 (m, 2H) 1,93 - 2,05 (m, 2H) 2,37 (t, $J=7,52\text{ Hz}$, 2H) 5,14 (s, 2H) 5,27 (s, 2H) 7,31 - 7,44 (m, 10 H).

Chất trung gian 34: 1,11-dibenzyl 11-(2,5-dioxocyclopentyl) docosan-1,11,11-tricarboxylat



Tổng hợp hợp chất nêu trong đề mục theo cách tương tự với chất trung gian 15 sử dụng chất trung gian 33 (177mg, 0,284mmol) làm nguyên liệu ban đầu để tạo ra dầu không màu (153mg, 0,213mmol, 75%): ^1H NMR (400MHz, CLOROFORM-d) δ ppm 0,86 - 0,93 (m, 3H) 1,12 - 1,21 (m, 2H) 1,21 - 1,37 (m, 30 H) 1,66 (quin, $J=7,40\text{Hz}$, 2H) 1,89 - 2,07 (m, 4H) 2,37 (t, $J=7,58\text{ Hz}$, 2H) 2,84 (br. s., 4H) 5,13 (s, 2H) 5,25 (s, 2H) 7,30 - 7,47 (m, 10 H).

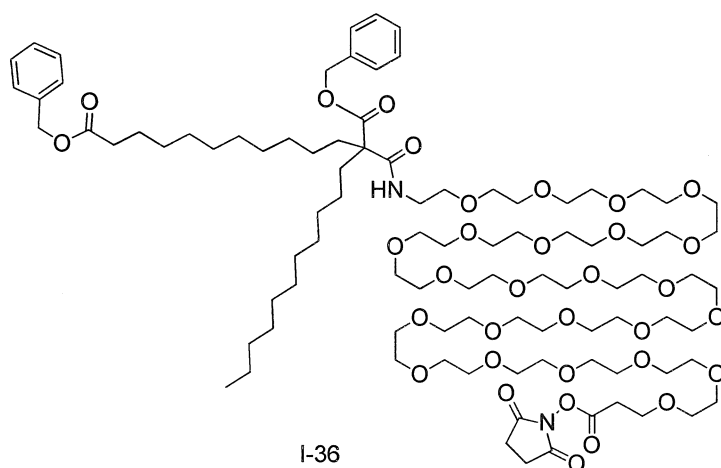
Chất trung gian 35:



Thêm dung dịch gồm chất trung gian 34 (145mg, 0,201mmol) trong THF (1,5mL) và DCM (1,5mL) vào lọ đã được nạp amino-PEG24-axit. Thêm DIPEA (88 μL , 0,504mmol) và khuấy hỗn hợp phản ứng trên đĩa lắc trong 15 giờ. Làm bay hơi phần dung môi và tinh chế phân cặn bằng phương pháp sắc ký lỏng siêu tới hạn (Waters HILIC 20x150mm; 15-25% MeOH

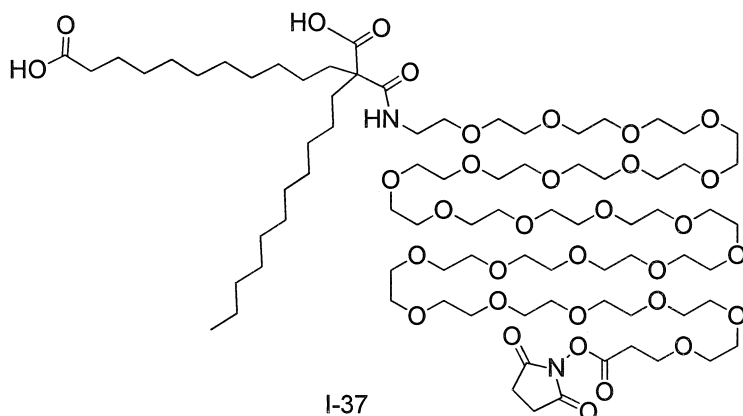
/ CO₂) để tạo ra chất trung gian 35 (151mg, 0,086mmol, 43%): LCMS phương pháp D Rt = 1,30 phút, [M+2H]⁺ 876,4; ¹H NMR (400MHz, CLOROFORM-d) δ ppm 0,86 - 0,93 (m, 3H) 0,93 - 1,04 (m, 2H) 1,19 (br. s., 15H) 1,23 - 1,37 (m, 15H) 1,61 - 1,68 (m, 2H) 1,78 (td, J=12,44, 4,34 Hz, 2H) 1,92 - 2,05 (m, 2H) 2,37 (t, J=7,58 Hz, 2H) 2,62 (t, J=6,05 Hz, 2H) 3,49 (dd, J=6,72, 2,32 Hz, 2H) 3,52 - 3,59 (m, 2H) 3,59 - 3,73 (m, 92H) 3,80 (t, J=6,05 Hz, 2H) 5,13 (s, 2H) 5,18 (s, 2H) 7,31 - 7,42 (m, 10 H) 8,09 (t, J=5,26 Hz, 1H).

Chất trung gian 36:



Thêm DCC (22mg, 0,103mmol) trong DCM (0,265mL) vào dung dịch gồm chất trung gian 35 (150mg, 0,086mmol) và N-hydroxysuccinimit trong DCM (1,5mL). Khuấy hỗn hợp phản ứng trong 1,5 giờ. Thêm N-hydroxysuccinimit (10mg) bổ sung trong THF (0,5mL) và DCC (22mg) trong DCM (0,265mL) và khuấy hỗn hợp phản ứng qua đêm. Làm bay hơi phần dung môi và tinh chế phân cận bằng cột nhanh (silic đioxit 12, 0-5% MeOH / DCM) để tạo ra chất trung gian 36 (159mg, có thể định lượng) là chất rắn màu trắng: LCMS phương pháp B Rt = 1,55 phút, [M+H₃O+H]⁺ 933,9 .

Chất trung gian 37:



Thêm huyền phù của 10% Pd trên cacbon (4,6mg, 4,3 μ mol) trong THF (1mL) vào dung dịch chất trung gian 36 (159mg, 0,086mmol) trong THF (5mL). Đặt phản ứng trong điều kiện hydro và khuấy trong 40 phút. Thêm nhiều Pd trên cacbon (7mg, 6,5 μ mol) hơn và khuấy 1 giờ nữa trong điều kiện hydro. Đưa phản ứng qua bộ lọc màng và làm bay hơi phần dịch lọc. Tinh chế phần cặn bằng phương pháp HPLC (Sunfire C18 30x50mm, 45-70% ACN / nước + TFA 0,1%) để tạo ra hợp chất nêu trong đề mục (83mg, 0,047mmol, 54%): LCMS phương pháp B Rt = 1,03 phút, $[M+2H]+2$ 835,2; ^1H NMR (400MHz, CLOROFORM-d) δ ppm 0,84 - 0,94 (m, 3H) 1,17 (br, s, 2H) 1,21 - 1,39 (m, 30 H) 1,57 - 1,68 (m, 2H) 1,69 - 1,80 (m, 2H) 1,97 - 2,10 (m, 2H) 2,34 (t, J=7,21 Hz, 2H) 2,86 (s, 4H) 2,92 (t, J=6,48 Hz, 2H) 3,51 - 3,73 (m, 96 H) 3,87 (t, J=6,48 Hz, 2H) 7,45 (t, J=4,46 Hz, 1H)

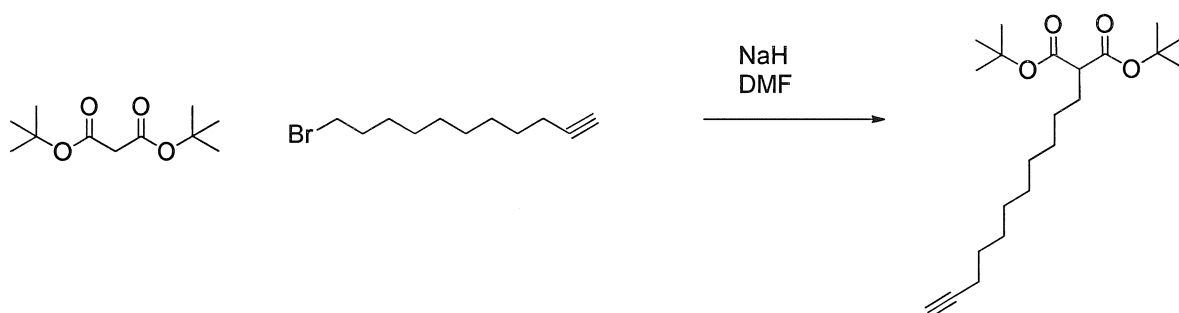
Chất trung gian 38: 11-bromoundec-1-yn



Thêm từng phần triphenylphosphin (3,43g, 13,1mmol) vào dung dịch gồm 10-undecyn-1-ol (2,29mL, 11,9mmol) và cacbon tetrabromua (4,34g, 13,1mmol) trong DCM (10mL) trong điều kiện N₂ ở 0°C trong hơn 30 phút. Khi hoàn thành quá trình bổ sung, làm ấm phản ứng đến nhiệt độ phòng. Sau 1,5 giờ, đổ hỗn hợp phản ứng vào xyclohexan đang khuấy (75mL)

và thu lấy phần kết tủa. Rửa phần chất rắn với xyclohexan và làm bay hơi phần dịch lọc kết hợp. Tinh chế phần cặn bằng cột nhanh (silic đioxit 80g, 0-10% EtOAc/HEP) để tạo ra hợp chất nêu trong đề mục (1,75g, 7,57mmol, 64%): ^1H NMR (400MHz, CLOROFORM-d) δ ppm 1,21 - 1,35 (m, 6 H) 1,35 - 1,48 (m, 4H) 1,48 - 1,59 (m, 2H) 1,80 - 1,91 (m, 2H) 1,94 (t, $J=2,63$ Hz, 1H) 2,19 (td, $J=7,09, 2,69$ Hz, 2H) 3,41 (t, $J=6,85$ Hz, 2H).

Chất trung gian 39: Di-tert-butyl 2-(undec-10-yn-1-yl)malonat



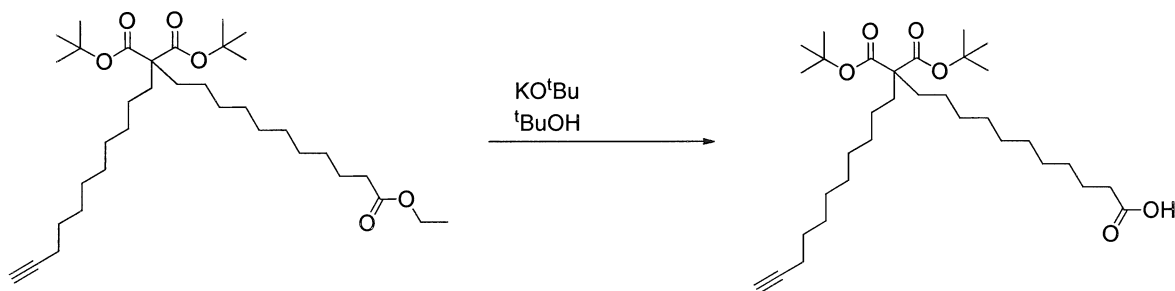
Hòa tan di-tert-butyl malonat (800mg, 3,70mmol) trong DMF (9mL) ở 0°C trong điều kiện N_2 và thêm NaH (148mg, 3,70mmol). Khuấy hỗn hợp phản ứng 30 phút ở 0°C và thêm từ từ từng giọt chất trung gian 38 (770mg, 3,33mmol), tạo thành dung dịch màu vàng. Khuấy hỗn hợp phản ứng ở 0°C trong 2 giờ sau đó làm ấm đến r.t. và khuấy trong 16 giờ. Hấp thụ hỗn hợp trong EtOAc (75 mL) và rửa bằng H_2O (25mL). Chiết lớp chứa nước bằng EtOAc (75mL) và sấy khô các lớp hữu cơ kết hợp trên Na_2SO_4 , lọc rồi cô đặc. Tinh chế hỗn hợp hai lần qua cột nhanh (cột silic đioxit 12g, 0-20% EtOAc/Heptan) và cô đặc các phân đoạn để tạo ra 162,1mg sản phẩm được mong muốn dưới dạng dầu không màu (12%). LCMS (Waters Acquity UPLC BEH C18, 130 Å, $1,7\mu\text{m}$, 2,1 mm x 50 mm, 50°C , dung môi A: nước+axit formic 0,1%, dung môi B: axetonitril+axit formic 0,1%, 98% B trong hơn 2,20 phút): $R_t = 1,37$ phút, MS $[\text{M}+\text{H}]$ quan sát được: 366,0, tính toán được: 366,535. ^1H NMR (400MHz, CLOROFORM-d) δ ppm 1,29 (s, 10 H) 1,47 (s, 18 H) 1,52 (dd, $J=14,78, 7,20\text{Hz}$, 3H) 1,48 (d, $J=1,26$ Hz, 1H) 1,75 - 1,83 (m, 2H) 1,94 (t, $J=2,65$ Hz, 1H) 2,18 (td, $J=7,14, 2,65$ Hz, 2H) 3,11 (t, $J=7,58$ Hz, 1H).

Chất trung gian 40: 11,11-di-tert-butyl 1-ethyl docos-21-yne-1,11,11-tricarboxylat



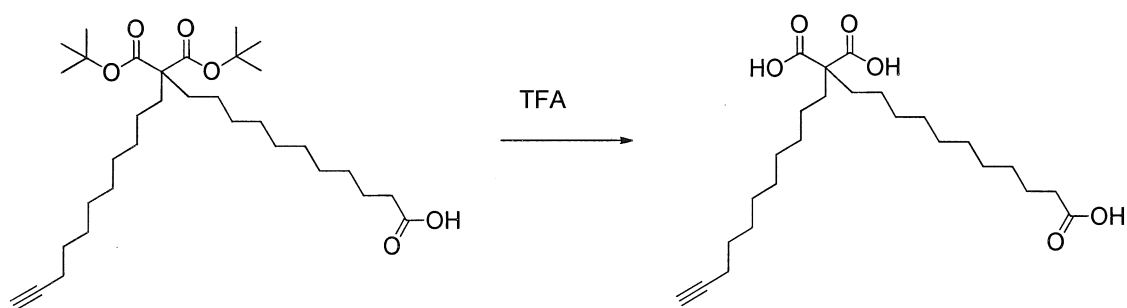
Hòa tan chất trung gian 39 (162,1mg, 0,442mmol) trong DMF (2mL) ở 0°C và thêm NaH (21,23mg, 0,531mmol). Khuấy hỗn hợp phản ứng ở 0°C trong 15 phút và thêm từ từ từng giọt ethyl 11-bromoundecanoat (143mg, 0,486mmol). Làm ấm phản ứng đến r.t. và khuấy trong 16 giờ. Pha loãng hỗn hợp bằng EtOAc (40 mL) và rửa một lần với H₂O (20 mL). Chiết lớp chứa nước một lần với EtOAc (40mL) và kết hợp các lớp hữu cơ, sấy khô trên Na₂SO₄, lọc và cô đặc để tạo ra dầu màu vàng, sạch. Hòa tan mẫu trong 1mL DCM và tinh chế qua cột nhanh (cột 12g silic đioxit, 0-20% EtOAc/Heptan, 15 phút). Kết hợp các phân đoạn rồi cô đặc để tạo ra 90,1mg sản phẩm được mong muốn (35%). ¹H NMR (400MHz, CLOROFORM-d) δ ppm 1,28 (br. s., 24H) 1,45 (s, 18 H) 1,48 (s, 3H) 1,53 (d, J=7,58 Hz, 3H) 1,51 (s, 1H) 1,64 (br. s., 1H) 1,61 (d, J=7,33 Hz, 1H) 1,77 (d, J=16,93 Hz, 2H) 1,74 - 1,80 (m, 2H) 1,94 (t, J=2,65 Hz, 1H) 2,18 (td, J=7,07, 2,53 Hz, 2H) 2,29 (t, J=7,58 Hz, 2H) 4,13 (q, J=7,24 Hz, 2H).

Chất trung gian 41: Axit 12,12-bis(tert-butoxycacbonyl)tricos-22-ynoic



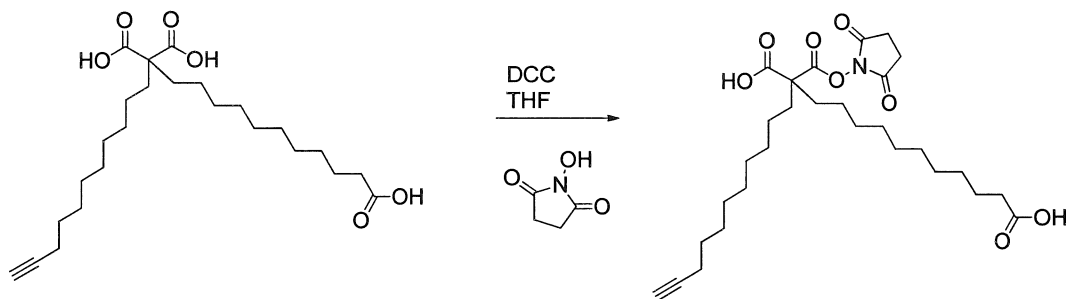
Thêm dung dịch KOtBu (114mg, 1,012mmol) trong ^tBuOH (2mL) vào dung dịch chất trung gian 40 (21,7mg, 0,037mmol) trong ^tBuOH (1mL) ở 30°C trong điều kiện N₂. Khuấy hỗn hợp ở nhiệt độ phòng và theo dõi bằng TLC (1:1 EtOAc/hexan, KMnO₄, chế độ hồi lưu). Sử dụng nguyên liệu ban đầu sau 3 giờ và đập tắt hỗn hợp phản ứng bằng HCl 1M (20mL) và chiết hai lần bằng EtOAc (25mL). Kết hợp các lớp hữu cơ, sấy khô trên Na₂SO₄, lọc rồi cô đặc đến khi tạo thành dầu không màu, sạch (18mg, 87%). Đưa vật liệu này sang bước tiếp theo để tiến hành mà không tinh chế thêm. ¹H NMR (400MHz, CLOROFORM-d) δ ppm 1,27 (br, s., 22H) 1,44 (br. s., 18 H) 1,48 (s, 3H) 1,52 (s, 3H) 1,62 (br, s., 2H) 1,77 (br. s., 4H) 1,94 (br. s., 1H) 2,18 (s, 2H) 2,35 (s, 2H).

Chất trung gian 42: Axit docos-21-yne-1,11,11-tricarboxylic



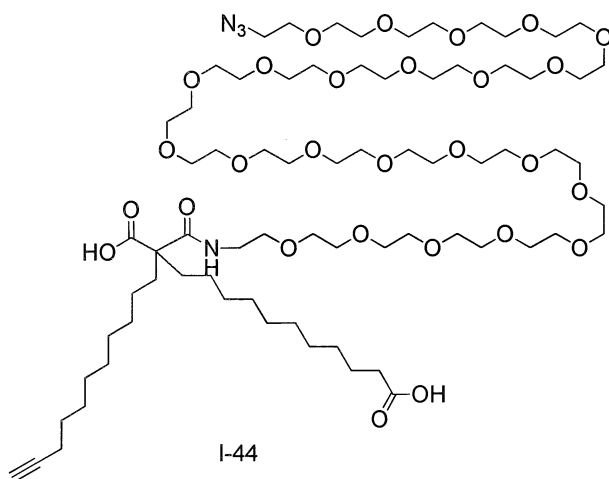
Thêm TFA (2mL) vào chất trung gian 41 (12mg, 0,022mmol) và khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ. Pha loãng hỗn hợp bằng DCM (10mL) rồi cô đặc hai lần để tạo ra dầu màu nâu. Hấp thụ vật liệu trong EtOAc (10 mL) và rửa bằng H₂O (20mL). Sấy khô lớp hữu cơ trên Na₂SO₄, lọc rồi cô đặc thành dầu màu nâu. Hòa tan vật liệu thô trong 1mL MeOH và tinh chế nhờ phương pháp HPLC đã kích hoạt MS (cột Sunfire 30x50mm 5μm ACN/H₂O w/ 0,1%TFA 75mL/phút, bơm 1,5ml, 45-70% ACN trong hơn 3,5 phút): R_t = 3,42 phút; MS [M+H+Na] quan sát được: 461,00, tính toán được: 461,597. Gộp các phân đoạn và làm đông khô để tạo ra 5,3mg hợp chất nêu trong đề mục ở hiệu suất 56%.

Chất trung gian 43: Axit 2-(((2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)oxy)carbonyl)-2-(undec-10-yn-1-yl)tridecandioic



Thêm N-hydroxy succinimit (1,53mg, 0,013mmol) vào dung dịch chất trung gian 42 (5,3mg, 0,012mmol) trong THF (0,5mL). Thêm dung dịch DCC (2,493mg, 0,012mmol) trong THF (0,5mL) và khuấy hỗn hợp ở nhiệt độ phòng trong điều kiện N₂ trong 4 giờ. Quan sát quá trình biến đổi hoàn toàn nguyên liệu ban đầu bằng LCMS. Cô đặc hỗn hợp và đưa sang bước tiếp theo mà không tinh chế thêm. LCMS (Sunfire C18 3,5μm 3,0x30mm, 40°C, dung môi rửa giải có tính axit A: nước + axit trifloaxetic 0,05%, dung môi rửa giải có tính bazơ A: nước + amoni hydroxit 5mM, dung môi rửa giải B: ACN, 5-95% trong hơn 2 phút): R_t = 1,72 phút; MS [M+H+Na] quan sát được: 558,0, tính được: 558,67.

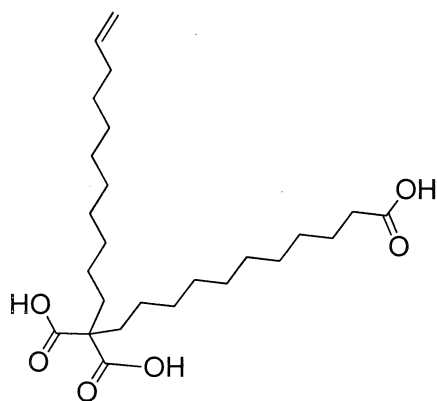
Chất trung gian 44:



Thêm dung dịch azido-dPEG23-amin (Quanta Biodesign, 7,88mg, 7,17μmol) trong DCM (0,5mL) và DIPEA (2,09μL, 0,012mmol) vào dung dịch chất trung gian 43 (3,2mg, 5,97μmol) trong DCM (0,5mL) và khuấy hỗn hợp ở nhiệt độ phòng trong 16 giờ, ở thời điểm chuyển hóa, nguyên liệu ban đầu được quan sát bằng LCMS. Cô đặc hỗn hợp phản ứng và

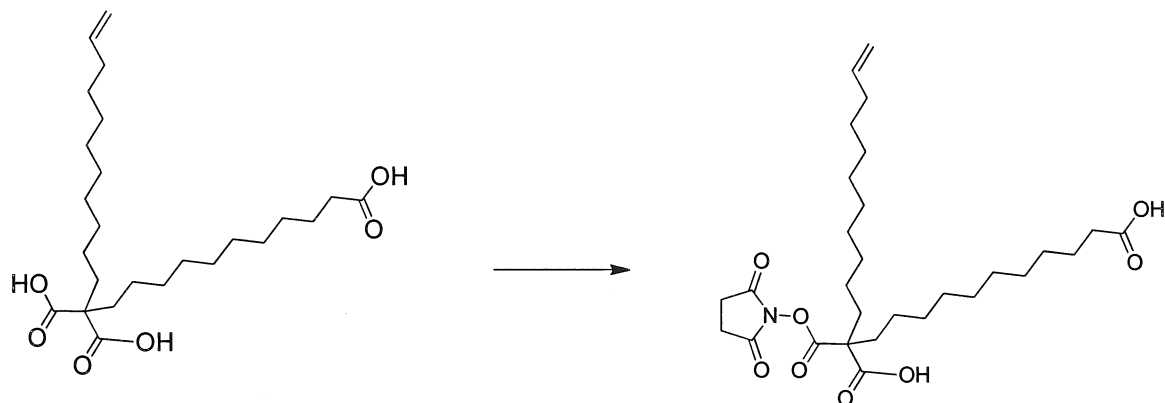
hòa tan trong 1mL MeOH và tinh chế bằng phương pháp HPLC đã kích hoạt MS (cột Sunfire 30x50mm 5 μ m ACN/H₂O w/TFA 0,1% 75mL/phút, bơm 1,5ml, gradien 55-80% ACN 5 phút, R_t = 1,92 phút) và gộp các phân đoạn rồi đông khô để tạo ra 1,7mg hợp chất nêu trong đề mục ở hiệu suất 19%. LCMS (Acquity BEH 1,7 μ m 2,1x50mm - 50°C, dung môi A: nước+axit formic 0,1%, dung môi B: axetonitril+axit formic 0,1%, 98% B trong hơn 2,20 phút): R_t = 1,89 phút; MS [M+H/2] quan sát được: 760,0, tính được: 759,5.

Chất trung gian 45: Axit docos-21-en-1,11,11-tricarboxylic



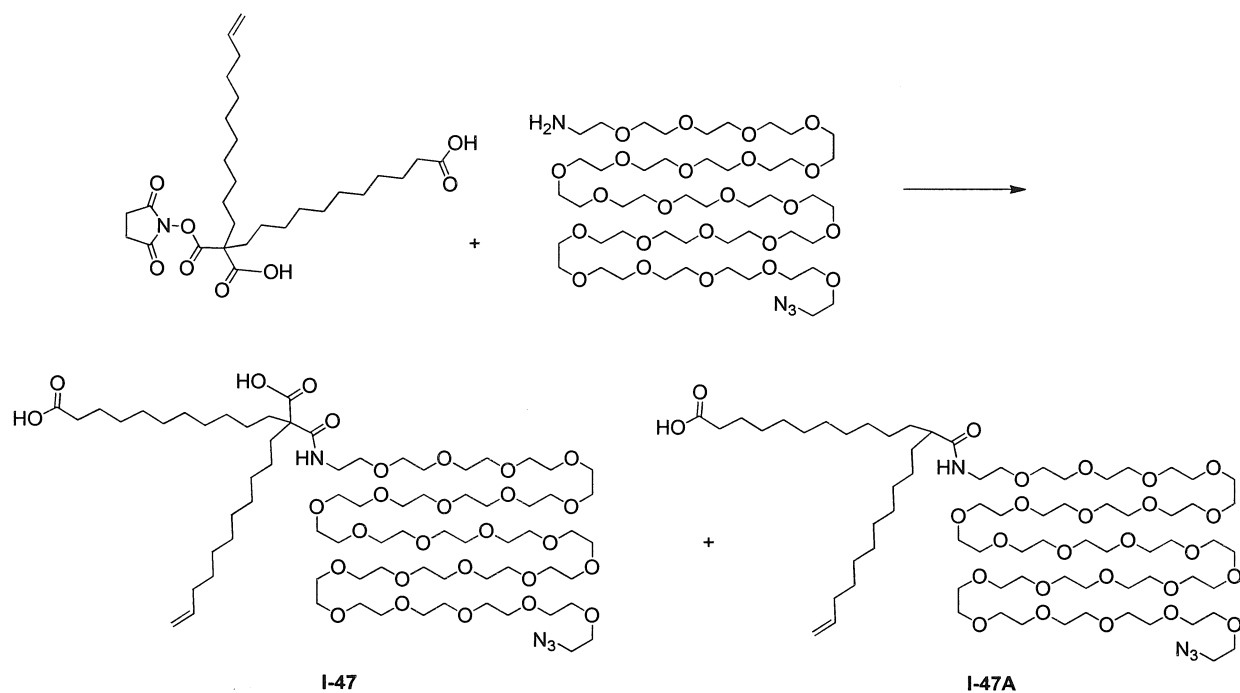
Điều chế chất trung gian 45 theo quy trình điều chế chất trung gian 39-42 thể 11-bromo-dec-1-en cho 11-bromo-dec-1-yn.

Chất trung gian 46: Axit 2-(((2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)oxy)carbonyl)-2-(undec-10-en-1-yl)tridecandioic



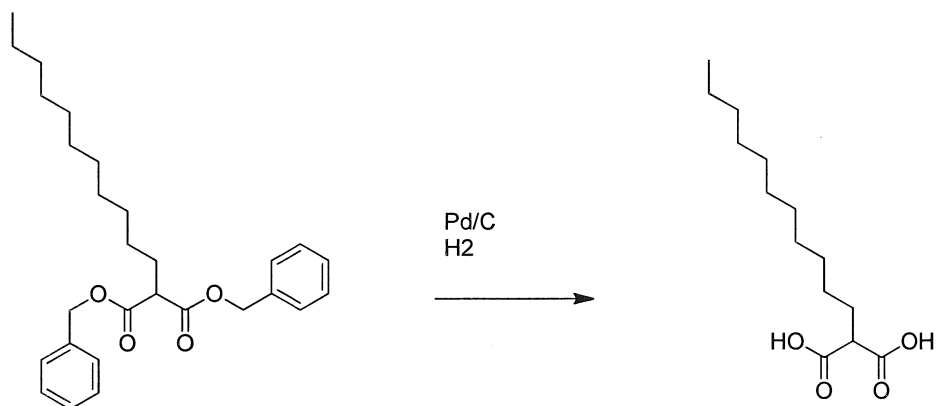
Thêm DCC (187mg, 0,908mmol) trong DCM (2mL) vào dung dịch gồm N-hydroxysuccinimide (99mg, 0,862mmol) và axit docos-21-en-1,11,11-tricarboxylic (chất trung gian 45: 400mg, 0,908mmol) trong DCM (7mL) và THF (0,7mL). Khuấy hỗn hợp phản ứng qua đêm trước khi làm bay hơi phần dung môi. Tinh chế phân cận bằng phương pháp HPLC (Sunfire C18 30x50mm; 55-80% ACN / nước +TFA 0,1%) để tạo ra hợp chất nêu trong đề mục (155mg, 0,288mmol, 32%): bằng LCMS phương pháp C Rt = 1,51 phút, M+H 538,3; ^1H NMR (400MHz, CLOROFORM-d) δ ppm 1,16 - 1,46 (m, 28 H) 1,60 - 1,87 (m, 3H) 1,91 - 2,17 (m, 5H) 2,38 (t, J=7,03 Hz, 2H) 2,86 (br, s, 4H) 3,68 (dd, J=11,25, 7,34 Hz, 1H) 3,78 (dd, J=11,31, 5,20Hz, 1H) 3,99 - 4,10 (m, 1H).

Các chất trung gian 47 và 47A:



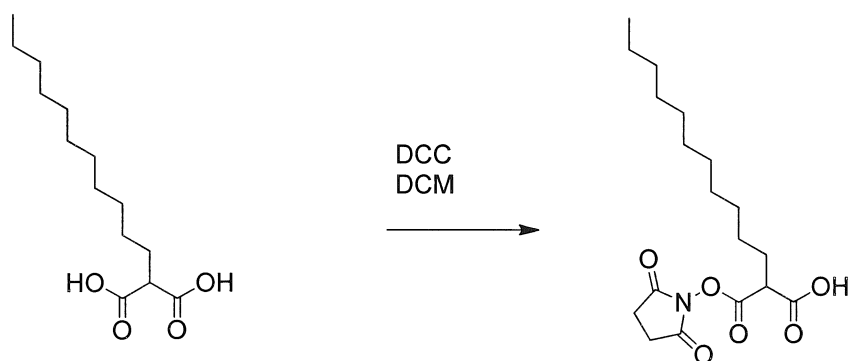
Hòa tan azido-dPEG23-amin (Quanta Biodesign: 164mg, 0,149mmol) và chất trung gian 46 (80mg, 0,149mmol) trong THF (2,5mL). Thêm DIPEA (39 μ L, 0,233mmol) và khuấy hỗn hợp phản ứng qua đêm. Làm bay hơi phần dung môi và tinh chế phần cặn bằng HPLC (Sunfire C18 30x50mm; 45-70% ACN/nước + TFA 0,1%) để tạo ra các hợp chất 47 (97mg, 0,061mmol, 41%) và 47A (32mg, 0,021mmol, 14%): LCMS phương pháp C Rt = 1,35 phút, $[M+2H]^{+2}$ 761,9; 1H NMR (400MHz, AXETONITRIL- d_3) δ ppm 1,05 - 1,18 (m, 3H) 1,19 - 1,32 (m, 20 H) 1,36 (t, J=7,15 Hz, 1H) 1,48 - 1,59 (m, 2H) 1,65 - 1,75 (m, 2H) 2,01 - 2,06 (m, 2H) 2,25 (t, J=7,46 Hz, 2H) 3,33 - 3,39 (m, 2H) 3,39 - 3,44 (m, 2H) 3,50 - 3,67 (m, 98 H) 4,84 - 4,95 (m, 1H) 4,95 - 5,06 (m, 1H) 5,83 (ddt, J=17,07, 10,29, 6,68, 6,68 Hz, 1H) 7,31 (t, J=5,44 Hz, 1H); LCMS phương pháp C Rt = 1,50 phút, $[M+2H]^{+2}$ 739,9; 1H NMR (400MHz, AXETONITRIL- d_3) δ ppm 1,16 - 1,42 (m, 30 H) 1,42 - 1,63 (m, 5H) 2,00 - 2,07 (m, 2H) 2,22 - 2,28 (m, 2H) 2,40 - 2,52 (m, 2H) 3,25 - 3,33 (m, 2H) 3,33 - 3,42 (m, 2H) 3,42 - 3,50 (m, 2H) 3,50 - 3,68 (m, 88 H) 4,86 - 5,06 (m, 2H) 5,83 (ddt, J=17,04, 10,26, 6,71, 6,71 Hz, 1H) 6,40 - 6,74 (m, 1H).

Chất trung gian 48: Axit 2-undexylmalonic



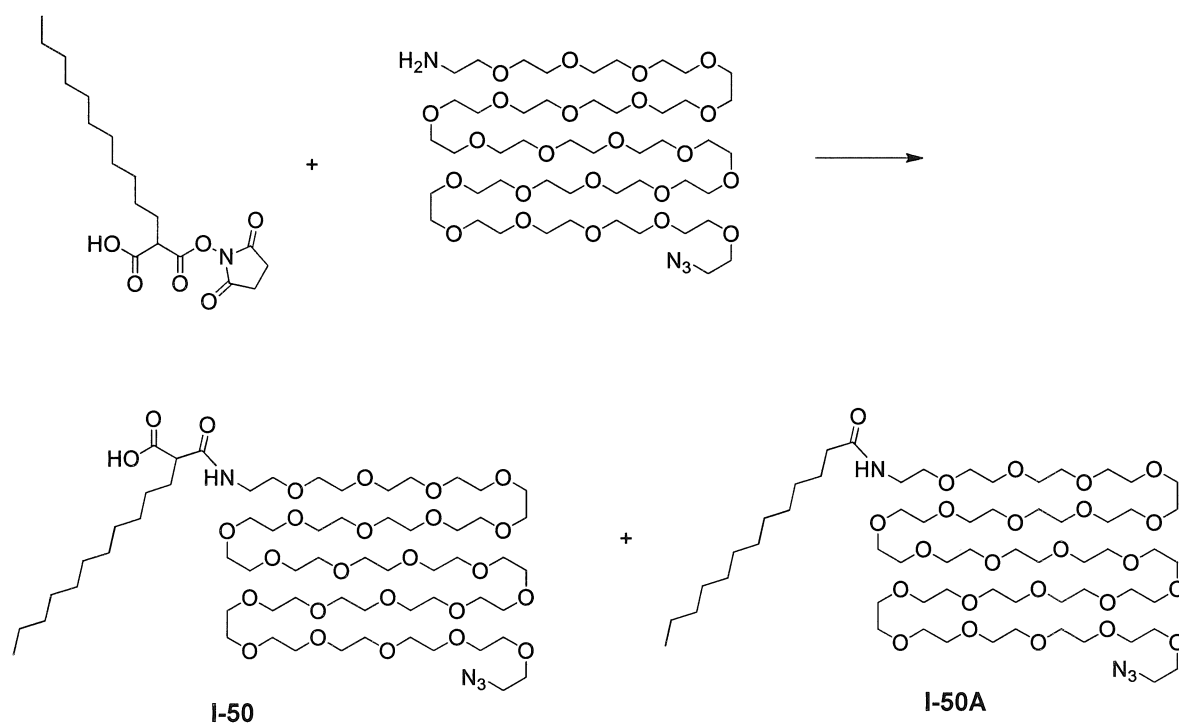
Có thể tổng hợp hợp chất nêu trong đề mục (185mg, có thể định lượng) theo cách tương tự như chất trung gian 19 bằng cách sử dụng chất trung gian 22 (290mg, 0,661mmol): LCMS phương pháp B LCMS Rt = 0,82 phút, M-H 257,3

Chất trung gian 49: Axit 2-(((2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)oxy)carbonyl)tridecanoic



Thêm DCC (122mg, 0,592mmol) vào dung dịch gồm chất trung gian 48 (170mg, 0,658mmol) và N-hydroxysuccinimit (68mg, 0,592mmol) trong DCM (6mL) và THF (0,5mL). Khuấy hỗn hợp phản ứng trong 16 giờ trước khi thêm nhiều hơn DCC (30mg, 0,145mmol) trong DCM (0,5mL) vào. Khuấy hỗn hợp phản ứng trong 2 ngày nữa. Làm bay hơi phần dung môi và tinh chế phân cực bằng HPLC (Sunfire C18 30x50mm, 45-70% ACN/nước + TFA 0,1%) để tạo ra hợp chất nêu trong đề mục dạng bột màu trắng (46mg, 0,129mg, 20%): LCMS phương pháp B Rt = 0,94 phút, M+H 356,3; ¹H NMR (400MHz, CLOROFORM-d) δ ppm 0,89 (t, J=7,00Hz, 3H) 1,20 - 1,40 (m, 16 H) 1,43 - 1,55 (m, 2H) 1,99 - 2,14 (m, 2H) 2,86 (s, 4H) 3,71 (t, J=7,46 Hz, 1H).

Chất trung gian 50 và 50A:



Tổng hợp các hợp chất nêu trong đề mục theo cách tương tự với 50 và 50A từ chất trung gian 49 (30mg, 0,084mmol) tạo ra chất trung gian 50 (18mg, 0,013mmol, 16%) và chất trung gian 50A (5mg, 4μmol, 5%): LCMS phương pháp B Rt = 0,85 phút, M+H 1340,3; ¹H NMR (400MHz, CLOROFORM-d) δ ppm 0,82 - 0,98 (m, 3H) 1,20 - 1,36 (m, 16 H) 1,36 - 1,51

(m, 2H) 1,83 - 2,02 (m, 1H) 2,11 - 2,27 (m, 1H) 2,33 (dd, $J=11,80, 4,22$ Hz, 1H) 3,41 (t, $J=5,14$ Hz, 3H) 3,49 (d, $J=5,01$ Hz, 1H) 3,56 - 3,79 (m, 92H); LCMS phương pháp B Rt = 0,96 phút, M+H 1296,3.

Các chất trung gian 51-57: đột biến protein GDF15.

Sự biểu hiện của protein GDF-15 của người ở tế bào E.coli

Các tế bào BL21 (DE3) Gold (Stratagene) và Rosetta (DE3) pLysS (Novagen) của các chủng E.coli được biến đổi các cấu trúc 51 đến 56 và cấu trúc MAHA-(200-308)-hGDF15 một cách tương ứng, tách dòng chuyển vào vector pET26b. Các tế bào biến nạp được phát triển trong điều kiện chọn lọc kháng sinh, đầu tiên trong 3ml và sau đó trong 50ml Luria Broth (Bacto-Trypton 10g/L, chiết xuất nấm men 5g/L, NaCl 5/L, glucoza 6g/L) đến khi đạt được OD600 là 1,5. Các môi trường nuôi cấy trước được sử dụng để cấy hai chất gây men 1-L chứa đầy môi trường Terrific Broth (NH_4SO_4 1,2g/L, H_2PO_4 0,041 g/L, K_2HPO_4 0,052 g/L, Bacto-Trypton 12g/L, chiết xuất nấm men 24g/L). Các môi trường này được cảm ứng bằng cách thêm tự động isopropyl-beta-D-thiogalactopyranosit (IPTG) 1mM khi pH tăng trên 7,1. Các thông số quá trình lên men khác là: nhiệt độ = 37°C ; pH = $7,0 \pm 0,2$ được điều chỉnh bằng cách thêm NaOH/ H_2SO_4 2N; $\text{pO}_2 > 30\%$ nhờ bổ sung tốc độ của các tầng máy khuấy, dòng không khí và oxy. Năm giờ sau khi cảm ứng, làm lạnh môi trường đến 10°C và thu hoạch tế bào bằng cách ly tâm.

Quá trình tinh chế và cuộn gấp lại các biến thể GDF15

a) Thể vùi

Tạo huyền phù lại các kết tủa (pellets) coli tái tổ hợp biểu hiện protein quan tâm (5% trọng lượng/thể tích) trong NaH_2PO_4 50mM / NaCl 150mM / benzamidin.HCl 5mM / DTT 5mM, pH = 8,0 ở 4°C , được đồng nhất và ly giải qua hai lần cấy chuyển nhờ máy French press (800 và 80 bar). Các thể vùi (IBs) được phân lập bằng cách ly tâm ở tốc độ 12'000 rpm trong 60 phút ở 4°C .

b) Quá trình tinh chế protein thô không cuộn gấp

Hòa tan các IB (5% trọng lượng/thể tích) trong guanidin 6M / NaH_2PO_4 100mM / Tris 10mM / beta-mercaptoethanol 20mM, pH = 8,0 và khuấy trong 2 giờ ở nhiệt độ phòng. Loại bỏ các mảnh vụn bằng cách ly tâm ở 12'000 rpm. Các IB đã hòa tan được tinh chế tiếp trên Ni-NTA-Superflow (cấu trúc không có đuôi His này cũng liên kết với nhựa này do hàm lượng histidin cao). Sau khi rửa qua các bước cơ bản với guanidin 6M / NaH_2PO_4 100mM / Tris 10mM / beta-mercaptoethanol 5mM, pH = 8,0, rửa giải các vật liệu đã liên kết với cùng chất đệm được điều chỉnh đến độ pH = 4,5. Nước giải hấp được điều chỉnh đến độ pH = 8,0, thêm DTT 100mM và khuấy dung dịch qua đêm ở 4°C. Sau đó, điều chỉnh độ pH đến 2 bằng cách thêm axit trifloaxetic (TFA, dung dịch gốc 10% trong nước) và pha loãng tiếp dung dịch theo tỷ lệ 1:1 với TFA 0,1% trong nước. Tinh chế tiếp dung dịch protein thô bằng phương pháp RP-HPLC (Poros) sử dụng gradien 0-50% axetonitril trong 50 phút. Gộp các phân đoạn chứa GDF-15 rồi đông khô.

c) Cuộn gấp protein

Phương pháp 1: Hòa tan vật liệu đã đông khô ở 2mg/ml trong axit axetic 100mM, pha loãng 15-20 lần trong chất đệm cuộn gấp (CHES 100mM / NaCl 1M / CHAPS 30mM / GSH 5mM / GSSG 0,5mM / DMSO 20%, pH = 9,5, 4°C) và khuấy nhẹ dung dịch trong suốt 3 ngày ở 4°C. Sau 3 ngày, thêm 3 lần axit axetic 100mM vào và cô đặc dung dịch bằng quá trình siêu lọc (ngắt ở 5kDa) đến khoảng 100-200ml, pha loãng 10 lần với axit axetic 100mM rồi cô đặc lại. Tinh chế tiếp các vật liệu đã pha loãng bằng phương pháp RP-HPLC điều chế trên cột Vydac C4 hoạt động ở 50°C (chất đệm A: TFA 0,1% trong nước; chất đệm B: TFA 0,05% trong axetonitril). Sau khi tải lên, rửa cột bằng 15% chất đệm B và rửa giải với gradien 15% B đến 65% B trong 50 phút. Các phân đoạn đã được thu lại bao gồm protein quan tâm được pha loãng bằng một lượng chất đệm A tương đương rồi đông khô. Hiệu suất cuộn gấp là khoảng 25% đối với cả hai protein.

Phương pháp 2: Phương thức theo như phương pháp 1 với chất đệm quá trình cuộn gấp: CHES 100mM, pH = 9,4, arginin 0,9M, NaCl 0,5M, EDTA 1mM, GSH 2,5mM, GSSG 1mM (nồng độ cuối cùng).

Các đột biến GDF15 sau được tạo ra theo quy trình ở trên:

Chất trung gian 51: M-(His)₆-hGDF15

MHHHH HHAR NGDHC PLGPG RCCRL HTVRA SLEDL GWADW VLSPR EVQVT
MCIGA CPSQF RAANM HAQIK TSLHR LKPDT VPAPC CVPAS YNPMV LIQKT
DTGVS LQTYD DLLAK DCHCI (SEQ ID NO: 1)

LCMS: khối lượng tính toán được: 26462 Khối lượng quan sát được: 26464

Chất trung gian 52: M-(His)₆-M-hGDF15

MHHHHHHMARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMC
GACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGVS
LQTYDDLLAKDCHCI (SEQ ID NO: 2)

LCMS: Khối lượng tính toán được: 26724 Khối lượng quan sát được: 26725

Chất trung gian 53: His-dGDF15:

MHHHHHHHAHARDGCPLGEGRCCRLQSLRASLQDLGWANWVAPRELDVRMCV
GACPSQFRSANTHAQMQLHGLNPDAAPAPCCVPASYEPVVLMLHQDS
DGRVSLTPFDDLVAKDCHCV (SEQ ID NO: 3)

LCMS: Khối lượng tính toán được (đime): 26368 Khối lượng quan sát được: 26363

Chất trung gian 54: MH-(199-308)-hGDF15

MHNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRA
ANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGVS
LQTYDDLLAKDCHCI (SEQ ID NO: 4)

LCMS: Khối lượng tính toán được: 24636 Khối lượng quan sát được: 24638

Chất trung gian 55: AH-(199-308)-hGDF15

AHNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRA
ANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSLQTYDDLLAKDC
HCl (SEQ ID NO: 5)

Bước 1: Quá trình tạo ra cấu trúc M-His₆-TEV(ENLYFQ/A)-H-hsGDF15 aa199-308

Cấu trúc M-His₆-TEV(ENLYFQ/A)-H-hsGDF15 aa199-308 được tạo ra theo quy trình ở trên (các bước a, b và c).

Bước 2: Sự phân cắt TEV của protein từ bước 1

Protein đã đông khô được hòa tan trong nước đến nồng độ cuối cùng là 1,75 mg/ml. Protein lại được mở ra bằng cách pha loãng 1:1 trong Guan 6M / Tris 50mM, pH = 8,0 + DTT 50mM, và khuấy ở RT trong 1 giờ. Tinh chế lại vật liệu bằng phương pháp RP-HPLC điều chế trên cột Vydac C4 rồi đông khô. Hòa tan 26mg sản phẩm đông khô trong 26ml Tris 50mM / UREA 3M, pH = 7,5 + 3000 đơn vị proteaza AcTEV (Invitrogen, 12575-023) và ủ trong 4 ngày. Tiếp đó, điều chỉnh độ pH đến 2,0 bằng cách thêm axit trifloaxetic (TFA, dung dịch gốc 10% trong nước) và pha loãng tiếp dung dịch này đến 150ml với TFA 0,1% trong nước. Sau khi lọc qua màng 0,22µm, tinh chế lại vật liệu bằng phương pháp RP-HPLC điều chế trên cột Vydac C4 để phân lập thành công protein đã phân cắt. Thu lấy các phân đoạn bằng tay; các phân đoạn chứa protein đích được phân lập rồi đông khô. Protein GDF15 đã phân cắt sau đó được cuộn gấp lại và protein đã cuộn gấp lại được tinh chế như được mô tả ở trên.

LCMS: Khối lượng tính toán được (đime): 24516 Khối lượng quan sát được: 24518

Đột biến GDF15 sau đây có thể được tạo ra theo quy trình ở trên:

Chất trung gian 56: MHA-(200-308)-hGDF15

MHAGDHCPLGPGRCCRLHTVRSLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRA
ANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSLQTYDDLLAKDC
HCl (SEQ ID NO: 6)

LCMS: Khối lượng tính toán được (đime): 24752

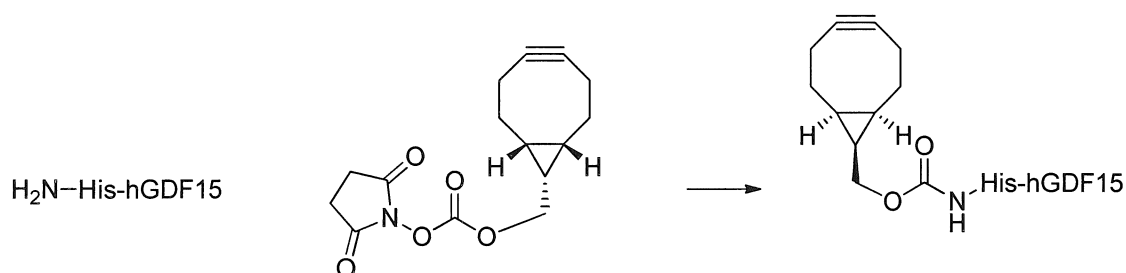
Đột biến GDF15 sau đây được tạo ra theo quy trình ở trên:

Chất trung gian 57: AHA-(200-308)-hGDF15

AHAGDHCPLGPGRCCRLHTVRSLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRA
ANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSLQTYDDLLAKDC
HCl (SEQ ID NO: 7)

LCMS: Khối lượng tính toán được (đime): 24430; Khối lượng quan sát được (đime): 24432

Chất trung gian 58: thể liên hợp His-hGDF15 BCN



His-hGDF15

Seq:MHHHHHHMARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRSLEDLGWADWVLSPREVQVT
MCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSLQTYDDLLAKDCHCl (SEQ ID NO: 2)

Pha loãng dung dịch His-hGDF15 gốc (chất trung gian 52: 0,6mL, 4,8mg/mL) đến 0,5mg/mL với chất đệm NaOAc 30mM có pH = 4,5 (5,2mL). Sau đó, thêm từ từ dung dịch

(1R,8S,9s)-bixyclo[6.1.0]non-4-yn-9-ylmethyl (2,5-dioxopyrrolidin-1-yl) cacbonat (NHS-BCN) trong DMSO (251 μ L) gốc 10mg/mL và đặt phản ứng trên đĩa lắc ở 24°C trong 21 giờ. Pha loãng hỗn hợp phản ứng đến 30mL với chất đệm NaOAc 30mM có pH = 4,5 rồi cô đặc đến 2mL sử dụng cột siêu lọc MWCO 10kDa (lặp lại 4 lần) để tạo ra 2,5mL sản phẩm cô đặc. Theo A_{280} ($\epsilon = 29090\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, 26730g/mol) nồng độ chất cô đặc là 0,93mg/mL (2,33mg, 80%): LCMS cực QT2_15-60kDa_15 phút (phương pháp E). Phân tích dung dịch tạo thành bằng MALDI chỉ ra sự liên hợp chính là +1 và +2 (đánh dấu đầu N- của monome và dime)

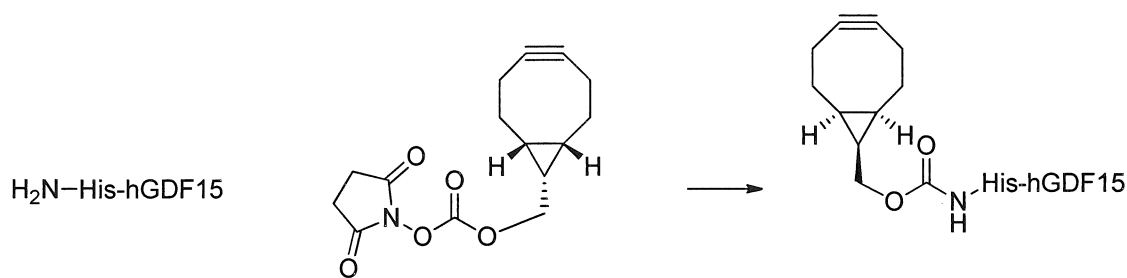
Mức độ đánh dấu	Tính toán được	Quan sát được	% TIC Cường độ (MS+)
GDF15	26726	26726	26
GDF15 +1BCN	26903	26904	43
GDF15 +2BCN	27080	27080	23
GDF15 +3BCN	27257	27256	9

His-hGDF15 +1BCN (bixyclo[6.1.0]non-4-ynyl) tương ứng với phản ứng tại nhóm chức amino đầu N trên một phân tử dime đồng nhất GDF15.

His-hGDF15 +2BCN tương ứng với phản ứng tại nhóm chức amino đầu N trên cả hai đơn vị monome của dime đồng nhất GDF15.

His-hGDF15 +3BCN tương ứng với phản ứng không chọn lọc ở một số vị trí khác của dime đồng nhất GDF15.

Chất trung gian 59: Thê liên hợp His-hGDF15 BCN



His-hGDF15 Seq:

MHHHH HHAR NGDHC PLGPG RCCRL HTVRA SLEDL GWADW VLSPR EVQVT
MCIGA CPSQF RAANM HAQIK TSLHR LKPDV VPAPC CVPAS YNPMV LIQKT
DTGVS LQTYD DLLAK DCHCI (SEQ ID NO: 1)

Pha loãng dung dịch gốc His-hGDF15 (chất trung gian 51: 7,04mL, 1,42mg/mL) đến 0,5mg/mL với chất đệm NaOAc 30mM có pH = 4,5 (12,95mL). Thêm từ từ dung dịch gốc (1R,8S,9s)-bixyclo[6.1.0]non-4-yn-9-ylmethyl (2,5-dioxopyrrolidin-1-yl) cacbonat (NHS-BCN) 10mg/mL trong DMSO (0,88mL) và đặt phản ứng trên đĩa lắc ở 24°C trong 24 giờ. Thêm một phần bổ sung của dung dịch gốc NHS-BCN (176μL), và duy trì phản ứng ở 24°C trong 24 giờ. Pha loãng hỗn hợp phản ứng tới 60mL với chất đệm NaOAc 30mM pH = 4,5 rồi cô đặc đến 4mL sử dụng cột siêu lọc MWCO 10kDa (lặp lại 4 lần) để tạo ra 4,1mL sản phẩm cô đặc. Theo A₂₈₀ (ε= 29090M⁻¹ cm⁻¹, 26700g/mol) nồng độ sản phẩm cô đặc là 2,19mg/mL (8,98mg, 89%); LCMS cực QT2 15-60kDa 15 phút (phương pháp E).

Mức độ đánh dấu	Tính toán được	Quan sát được	% TIC Cường độ (MS+)
GDF15	26468	26464	33
GDF15 +1BCN	26645	26640	34
GDF15 +2BCN	26822	26817	21

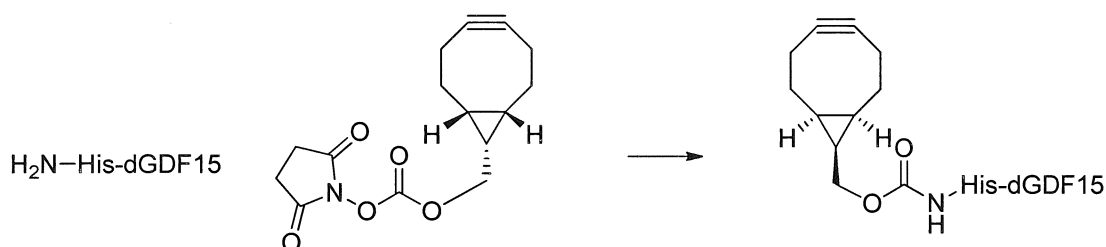
GDF15 +3BCN	26999	26993	3
-------------	-------	-------	---

His-hGDF15 +1BCN (bixyclo[6.1.0]non-4-ynyl) tương ứng với phản ứng tại nhóm chức amino đầu N trên một phân tử của đime đồng nhất GDF15.

His-hGDF15 +2BCN tương ứng với phản ứng tại nhóm chức amino đầu N trên cả hai đơn vị monome của đime đồng nhất GDF15.

His-hGDF15 +3BCN tương ứng với phản ứng không chọn lọc ở một số vị trí khác của đime đồng nhất GDF15.

Chất trung gian 60: His-dog-GDF15-BCN

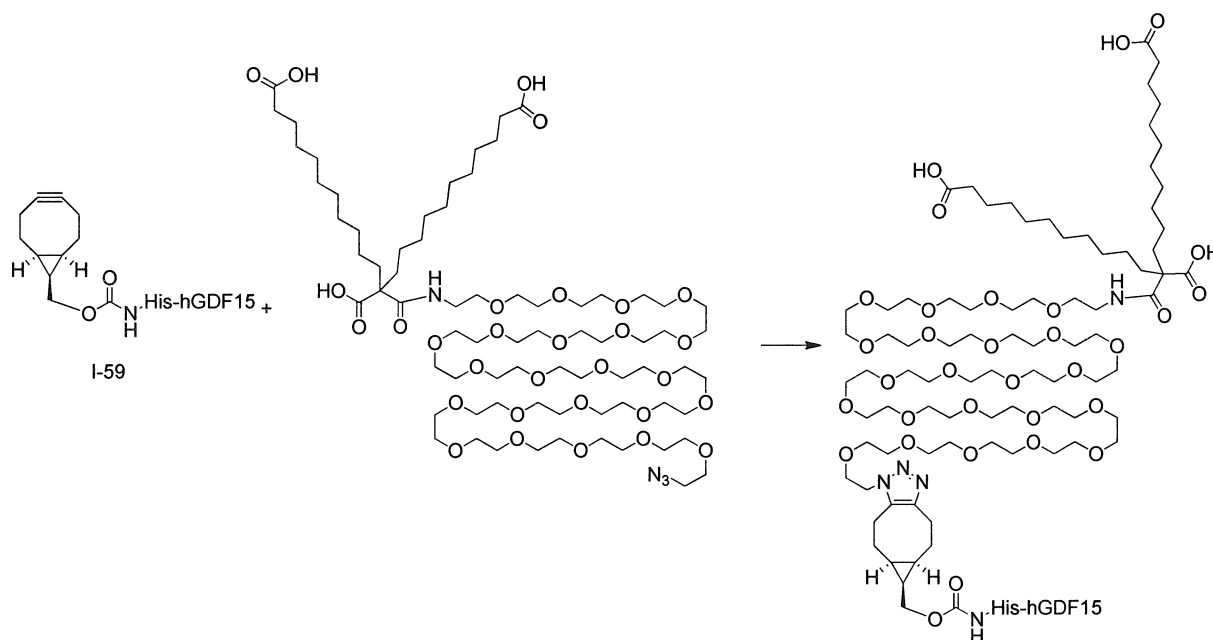


Kết hợp 100uL His-dGDF15 (0,68mg/mL), 100uL chất đệm có pH = 4,5, 4uL dung dịch BCN-NHS 10mg/mL và ủ ở rt trong hai ngày. Rửa hỗn hợp tạo thành với Amicon 10k 4 lần để tạo ra 200uL dung dịch, dung dịch này được sử dụng trong bước tiếp theo. Tiếp tục sử dụng sản phẩm này như là nguyên liệu thô cho quá trình chuyển hóa tiếp theo thành thể liên hợp.

Quy trình chung đối với phản ứng click giữa His-hGDF15 + axit béo-PEG-N₃. Pha loãng GDF15 được đánh dấu BCN đến nồng độ 0,5mg/mL trong chất đệm NaOAc 30mM có pH = 4,5 đồng thời điều chế dung dịch FA-PEG-N₃ (axit béo-PEG23-azit) 10mg/mL trong nước. Thêm 10eq FA-PEG-N₃ vào dung dịch GDF15, và đặt phản ứng trên đĩa lắc ở 24°C qua đêm. Theo dõi tiến triển của phản ứng bằng LCMS (phương pháp cực QTOF 15-60kDa_15 phút)

và thêm FA-PEG-N₃ bổ sung, nếu cần thiết có thể thêm tới 50eq, cho đến khi không quan sát thấy GDF15 được đánh dấu BCN phản ứng nữa. Tiếp đó, pha loãng hỗn hợp phản ứng 5-10 lần với chất đệm NaOAc 30mM có pH = 4 và trao đổi chất đệm này với chất đệm sạch sử dụng cột siêu lọc MWCO 10kDa (4 chu kỳ cô đặc sau đó pha loãng). Cô đặc mẫu đến nồng độ ~1mg/mL như đo được bằng A₂₈₀, các sản phẩm thu hồi có thể định lượng đến 34%. Phân tích các thể liên hợp cuối cùng bằng LCMS (phương pháp QTOF 15-60kDa_15min_polar) hoặc Maldi.

Ví dụ 1: His-hGDF15 BCN (I-59) liên hợp với chất trung gian 21:



Mức độ đánh dấu	Tính toán được	Quan sát được	% AUC @ 280nm
His-hGDF15	26468	26466	18
His-hGDF15 +1FA	28198	28192	36
His-hGDF15 +2FA	29928	29926	35

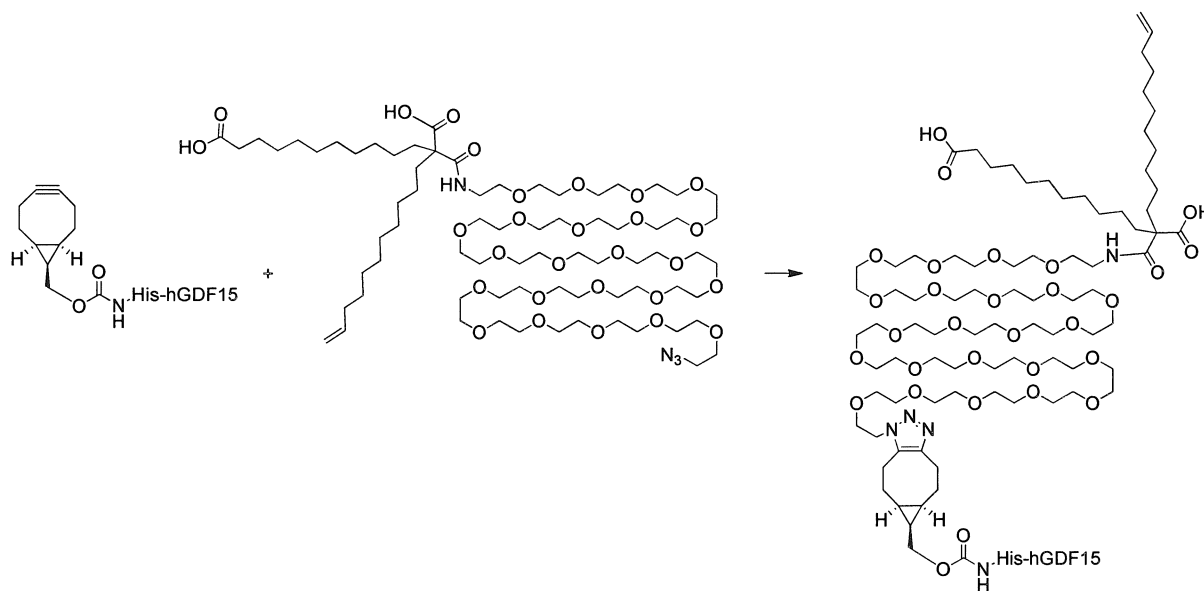
His-hGDF15 +3FA	31658	31654	11
-----------------	-------	-------	----

His-hGDF15 +1FA (axit béo) tương ứng với phản ứng tại nhóm chức amino đầu N trên một phân tử (một đơn vị monome) đime đồng nhất GDF15.

His-hGDF15 +2FA (axit béo) tương ứng với phản ứng tại nhóm chức amino đầu N trên cả hai đơn vị monome của đime đồng nhất GDF15.

His-hGDF15 +3FA (axit béo) tương ứng với phản ứng không chọn lọc ở một số vị trí khác của đime đồng nhất GDF15.

Ví dụ 2: His-hGDF15 BCN (I-59) liên hợp với chất trung gian 44:



Mức độ đánh dấu	Tính toán được	Quan sát được	% AUC @ 280nm
His-hGDF15	26464	26464	38
His-hGDF15 +1FA	28162	28162	33

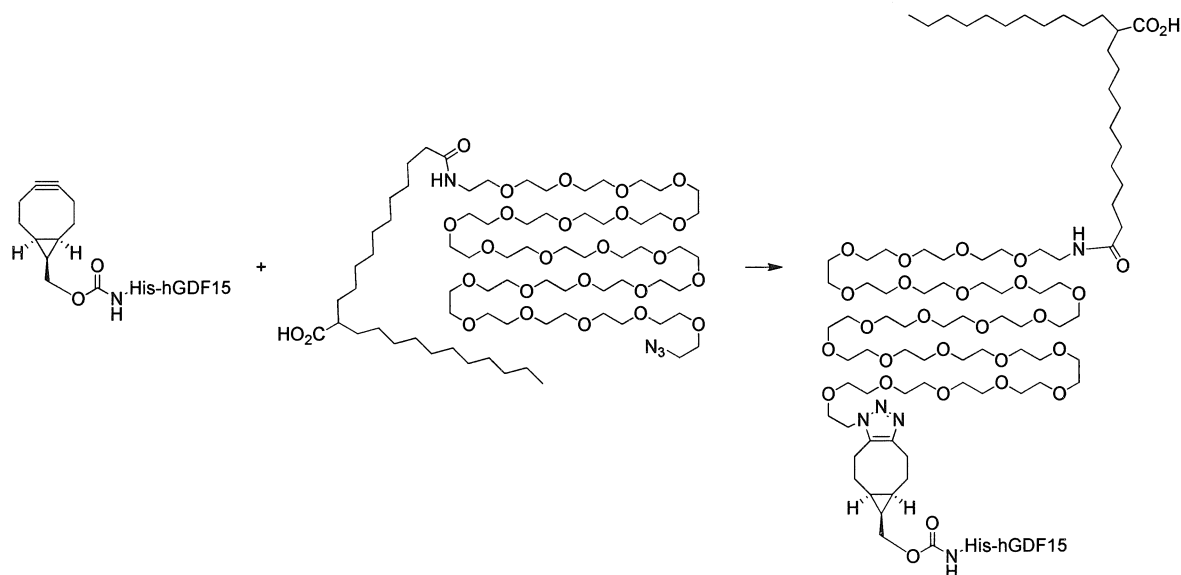
His-hGDF15 +2FA	29860	29860	21
His-hGDF15 +3FA	31558	31558	9

His-hGDF15 +1FA (axit béo) tương ứng với phản ứng tại nhóm chức amino đầu N trên một phân tử (một đơn vị monome) dime đồng nhất GDF15.

His-hGDF15 +2FA (axit béo) tương ứng với phản ứng tại nhóm chức amino đầu N trên cả hai đơn vị monome của dime đồng nhất GDF15.

His-hGDF15 +3FA (axit béo) tương ứng với phản ứng không chọn lọc ở một số vị trí khác của dime đồng nhất GDF15.

Ví dụ 3: His-hGDF15 BCN (I-59) liên hợp với chất trung gian 29A:



Mức độ đánh dấu	Tính toán được	Quan sát được	% AUC @ 280nm
His-hGDF15	26464	26466	50

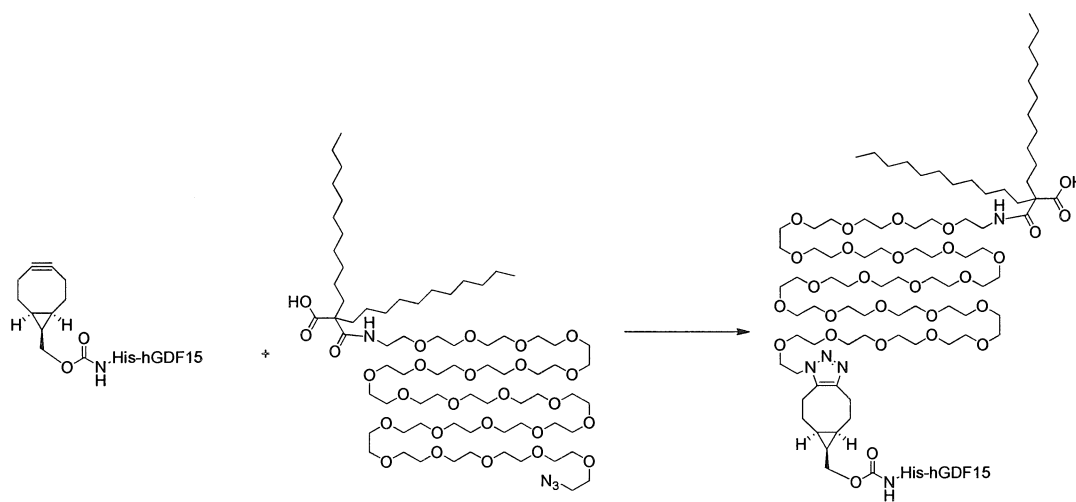
His-hGDF15 +1FA	28124	28120	28
His-hGDF15 +2FA	29780	29776	16
His-hGDF15 +3FA	31436	31432	7

His-hGDF15 +1FA (axit béo) tương ứng với phản ứng tại nhóm chức amino đầu N trên một phân tử (một đơn vị monome) đime đồng nhất GDF15.

His-hGDF15 +2FA (axit béo) tương ứng với phản ứng tại nhóm chức amino đầu N trên cả hai đơn vị monome của đime đồng nhất GDF15.

His-hGDF15 +3FA (axit béo) tương ứng với phản ứng không chọn lọc ở một số vị trí khác của đime đồng nhất GDF15.

Ví dụ 4: His-hGDF15 BCN (chất trung gian 58) liên hợp với chất trung gian 24:



Mức độ đánh dấu	Tính toán được	Quan sát được	% AUC @ 280nm
His-hGDF15	26726	26728	27
His-hGDF15 +1FA	28396	28398	42

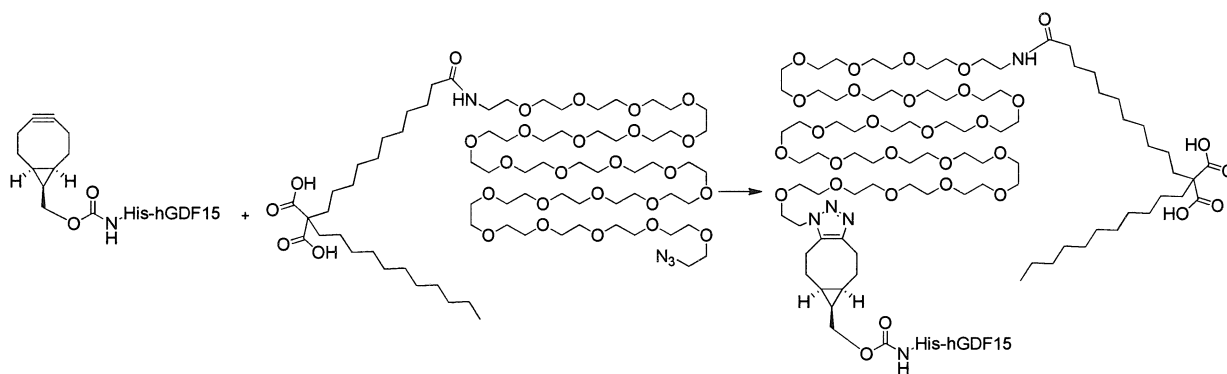
His-hGDF15 +2FA	30066	30068	24
His-hGDF15 +3FA	31736	31738	7

His-hGDF15 +1FA (axit béo) tương ứng với phản ứng tại nhóm chức amino đầu N trên một phân tử (một đơn vị monome) đime đồng nhất GDF15.

His-hGDF15 +2FA (axit béo) tương ứng với phản ứng tại nhóm chức amino đầu N trên cả hai đơn vị monome của đime đồng nhất GDF15.

His-hGDF15 +3FA (axit béo) tương ứng với phản ứng không chọn lọc ở một số vị trí khác của đime đồng nhất GDF15.

Ví dụ 5: His-hGDF15 BCN (I-58) liên hợp với chất trung gian 29:



Mức độ đánh dấu	Tính toán được	Quan sát được	% AUC @ 280nm
His-hGDF15	26726	26728	30
His-hGDF15 +1FA	28425	28426	36

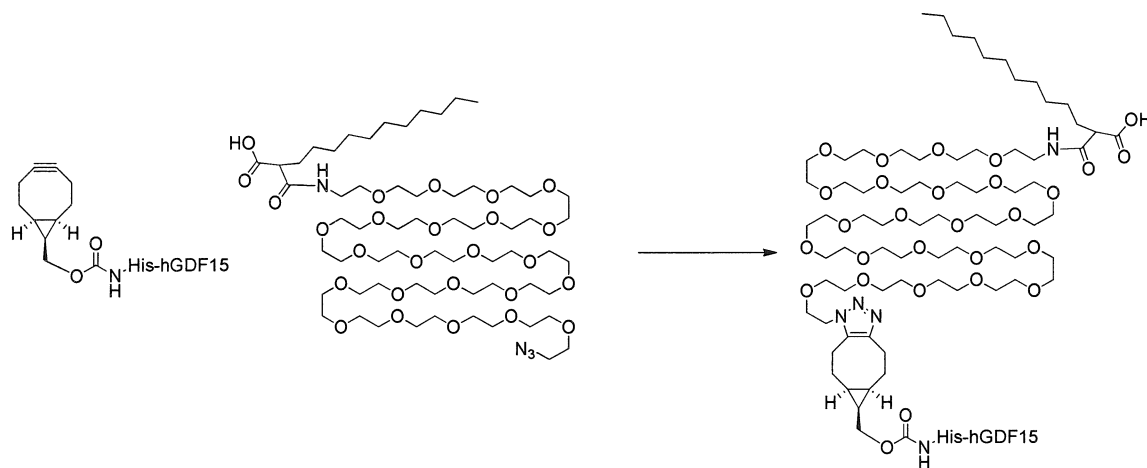
His-hGDF15 +2FA	30125	30126	23
His-hGDF15 +3FA	31825	31740	12

His-hGDF15 +1FA (axit béo) tương ứng với phản ứng tại nhóm chức amino đầu N trên một phân tử of dime đồng nhất GDF15.

His-hGDF15 +2FA (axit béo) tương ứng với phản ứng tại nhóm chức amino đầu N trên cả hai đơn vị monome của dime đồng nhất GDF15.

His-hGDF15 +3FA (axit béo) tương ứng với phản ứng không chọn lọc ở một số vị trí khác của dime đồng nhất GDF15.

Ví dụ 6: His-hGDF15 BCN (I-58) liên hợp với chất trung gian 55:



Mức độ đánh dấu	Tính toán được	Quan sát được	% AUC @ 280nm
His-hGDF15	26726	26728	28
His-hGDF15 +1FA	28242	28243	36
His-hGDF15 +2FA	29758	29759	28

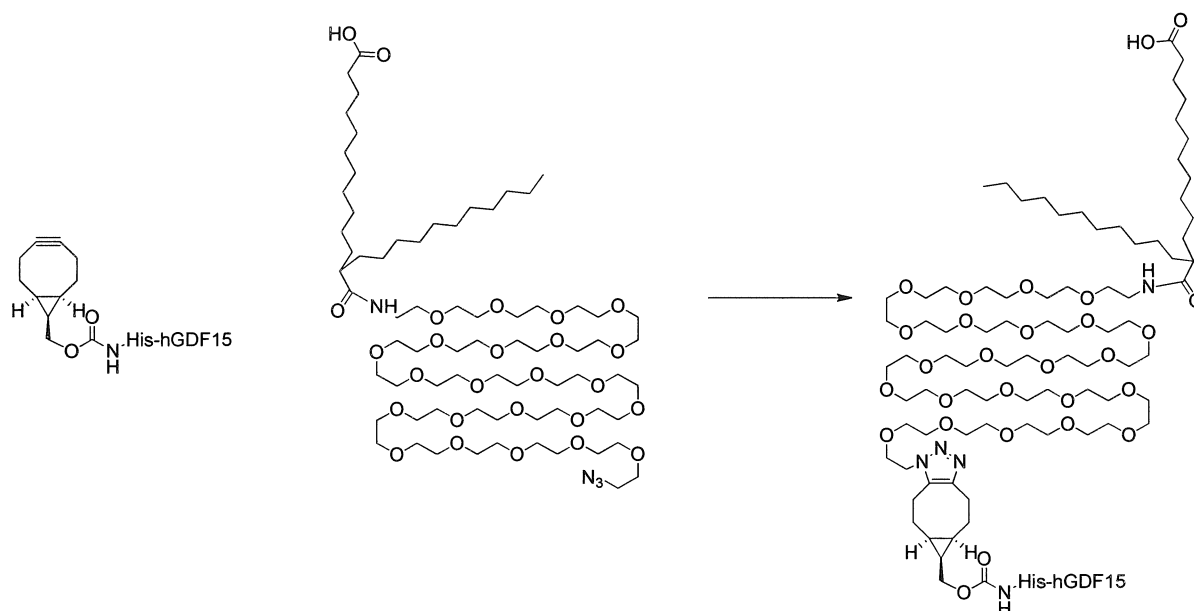
His-hGDF15 +3FA	31274	31275	11
-----------------	-------	-------	----

His-hGDF15 +1FA (axit béo) tương ứng với phản ứng tại nhóm chức amino đầu N trên một phân tử of đime đồng nhất GDF15.

His-hGDF15 +2FA (axit béo) tương ứng với phản ứng tại nhóm chức amino đầu N trên cả hai đơn vị monome của đime đồng nhất GDF15.

His-hGDF15 +3FA (axit béo) tương ứng với phản ứng không chọn lọc ở một số vị trí khác của đime đồng nhất GDF15.

Ví dụ 7: His-hGDF15 BCN (I-58) liên hợp với chất trung gian 6A:



Mức độ đánh dấu	Tính toán được	Quan sát được	% AUC @ 280nm
His-hGDF15	26726	26728	28

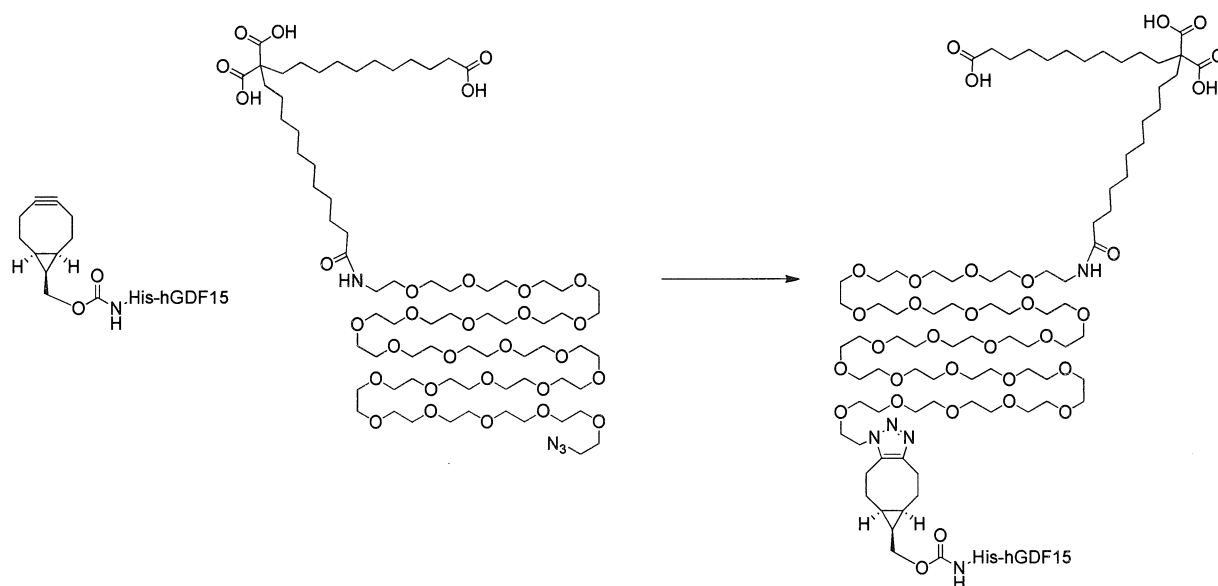
His-hGDF15 +1FA	28382	28382	42
His-hGDF15 +2FA	30038	30040	29
His-hGDF15 +3FA	31916	n/a	n/a

His-hGDF15 +1FA (axit béo) tương ứng với phản ứng tại nhóm chức amino đầu N trên một phân tử (một đơn vị monome) đime đồng nhất GDF15.

His-hGDF15 +2FA (axit béo) tương ứng với phản ứng tại nhóm chức amino đầu N trên cả hai đơn vị monome của đime đồng nhất GDF15.

His-hGDF15 +3FA (axit béo) tương ứng với phản ứng không chọn lọc ở một số vị trí khác của đime đồng nhất GDF15.

Ví dụ 9: His-hGDF15 BCN (I-58) liên hợp với chất trung gian 30:



Mức độ đánh dấu	Tính toán được	Quan sát được	% AUC @ 280nm
-----------------	----------------	---------------	---------------

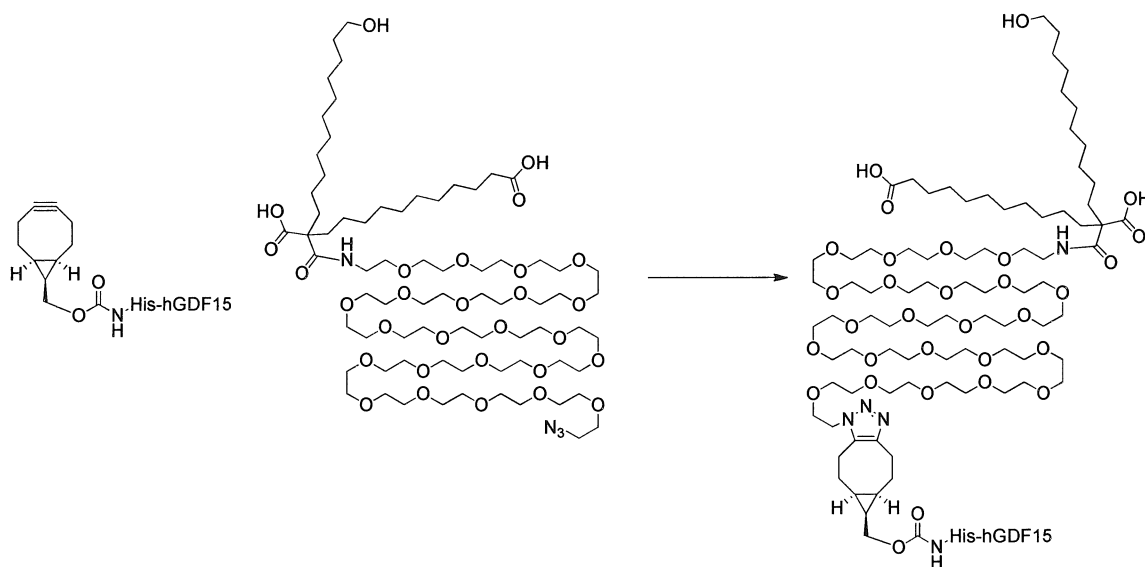
His-hGDF15	26726	26728	21
His-hGDF15 +1FA	28456	28456	47
His-hGDF15 +2FA	30186	30188	32
His-hGDF15 +3FA	31916	n/a	n/a

His-hGDF15 +1FA (axit béo) tương ứng với phản ứng tại nhóm chức amino đầu N trên một phân tử (đơn vị monome) đime đồng nhất GDF15.

His-hGDF15 +2FA (axit béo) tương ứng với phản ứng tại nhóm chức amino đầu N trên cả hai phân tử (đơn vị monomes) đime đồng nhất GDF15.

His-hGDF15 +3FA (axit béo) tương ứng với phản ứng không chọn lọc ở một số vị trí khác của đime đồng nhất GDF15.

Ví dụ 10: His-hGDF15 BCN (I-58) liên hợp với chất trung gian 12:



Mức độ đánh dấu	Tính toán được	Quan sát được	% AUC @ 280nm
His-hGDF15	26726	26729	17

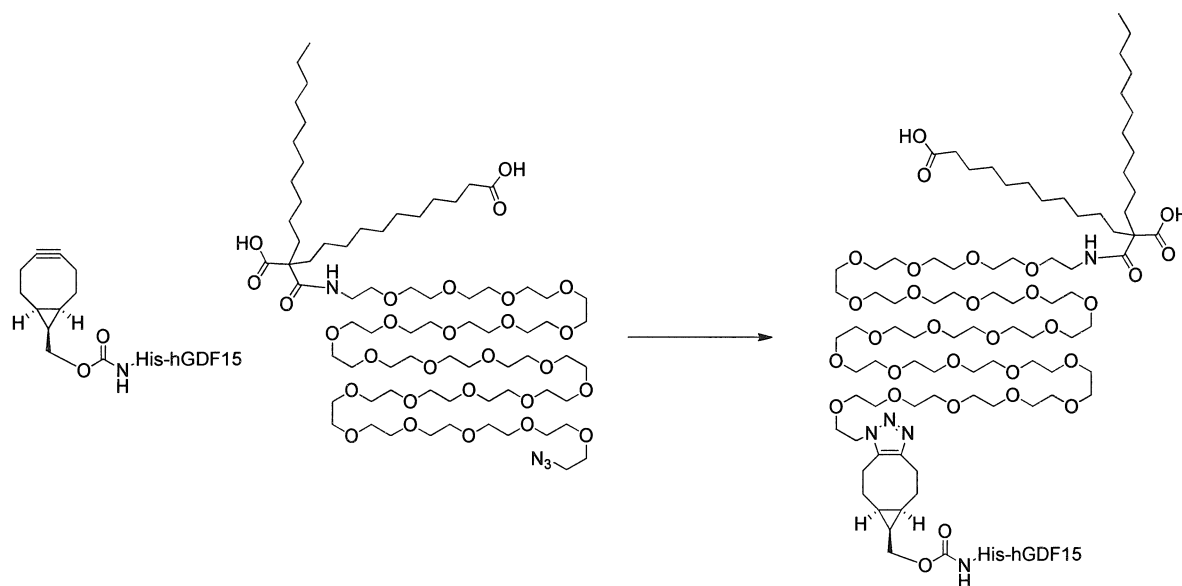
His-hGDF15 +1FA	28442	28445	37
His-hGDF15 +2FA	30158	30158	32
His-hGDF15 +3FA	31874	31877	13

His-hGDF15 +1FA (axit béo) tương ứng với phản ứng tại nhóm chức amino đầu N trên một phân tử (một đơn vị monome) dime đồng nhất GDF15.

His-hGDF15 +2FA (axit béo) tương ứng với phản ứng tại nhóm chức amino đầu N trên cả hai phân tử (đơn vị monomes) dime đồng nhất GDF15.

His-hGDF15 +3FA (axit béo) tương ứng với phản ứng không chọn lọc ở một số vị trí khác của dime đồng nhất GDF15.

Ví dụ 13: His-hGDF15 BCN (I-59) liên hợp với chất trung gian 6:



Mức độ đánh dấu	Tính toán được	Quan sát được	% AUC @ 280nm
His-hGDF15	26468	26464	28

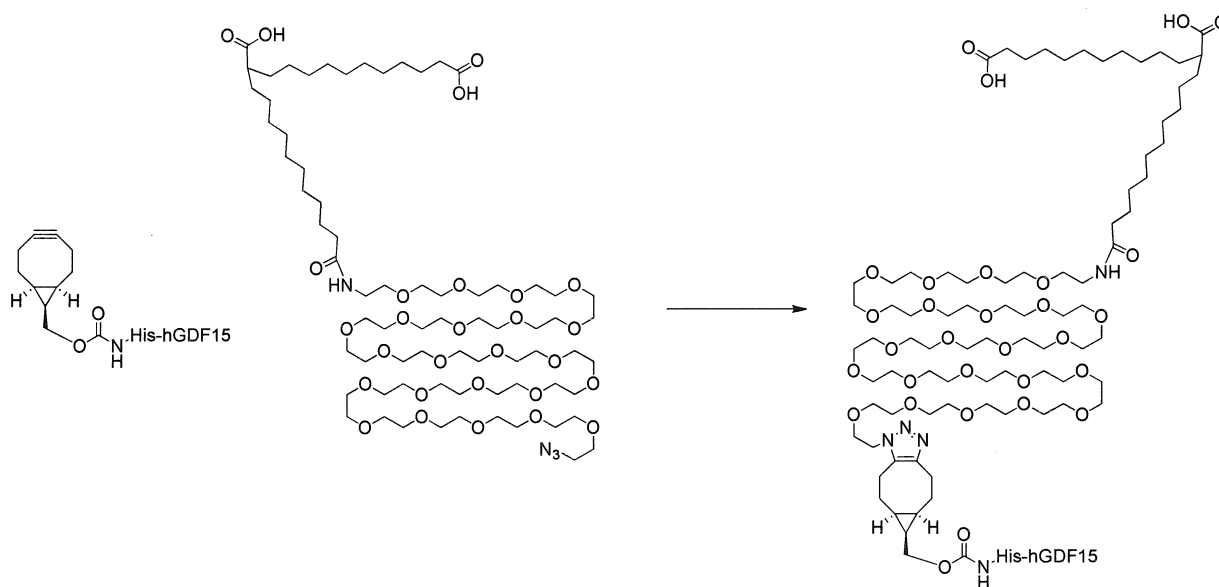
His-hGDF15 +1FA	28168	28164	42
His-hGDF15 +2FA	29868	29864	21
His-hGDF15 +3FA	31568	31564	10

His-hGDF15 +1FA (axit béo) tương ứng với phản ứng tại nhóm chức amino đầu N trên một phân tử (một đơn vị monome) dime đồng nhất GDF15.

His-hGDF15 +2FA (axit béo) tương ứng với phản ứng tại nhóm chức amino đầu N trên cả hai phân tử (cả hai đơn vị monome) dime đồng nhất GDF15.

His-hGDF15 +3FA (axit béo) tương ứng với phản ứng không chọn lọc ở một số vị trí khác của dime đồng nhất GDF15.

Ví dụ 14: His-hGDF15 BCN (I-58) liên hợp với chất trung gian 17:



Mức độ đánh dấu	Tính toán được	Quan sát được	% AUC @ 280nm
His-hGDF15	26726	26728	18

His-hGDF15 +1FA	28413	28414	34
His-hGDF15 +2FA	30100	30054	35
His-hGDF15 +3FA	31787	31726	13

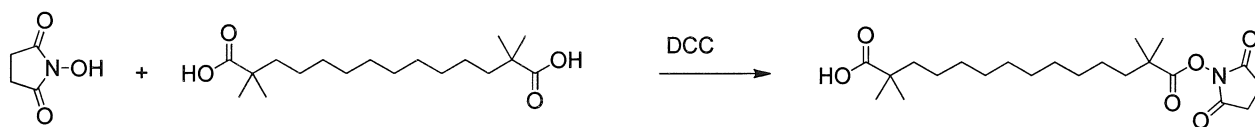
His-hGDF15 +1FA (axit béo) tương ứng với phản ứng tại nhóm chức amino đầu N trên một phân tử (một đơn vị monome) dime đồng nhất GDF15.

His-hGDF15 +2FA (axit béo) tương ứng với phản ứng tại nhóm chức amino đầu N trên cả hai phân tử (cả hai đơn vị monome) dime đồng nhất GDF15.

His-hGDF15 +3FA (axit béo) tương ứng với phản ứng không chọn lọc ở một số vị trí khác của dime đồng nhất GDF15.

Ví dụ 15:

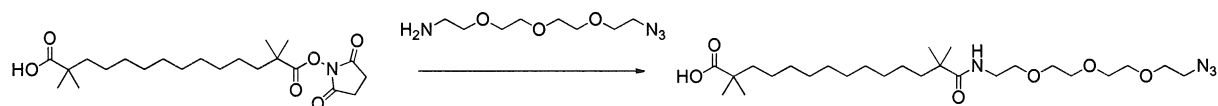
Bước 1:



Thêm dung dịch DCC (65,6mg, 0,318mmol) trong THF (5mL) vào dung dịch gồm axit 2,2,13,13-tetrametyltetradecandioic (Aldrich CPR, số thứ tự PH002322) (100mg, 0,318mmol) và N-hydroxysuccinimide (40,3mg, 0,35mmol) trong THF (5mL), và khuấy hỗn hợp ở nhiệt độ phòng qua đêm. Quan sát sự chuyển hóa từng phần thành sản phẩm mong muốn bằng phân tích LC-MS. Lọc hỗn hợp, và cô đặc phần dịch lọc. Hòa tan lại phần cặn trong DCM (40 mL), và rửa với nước, sấy khô trên Na₂SO₄, và tinh chế bằng phương pháp sắc ký silic

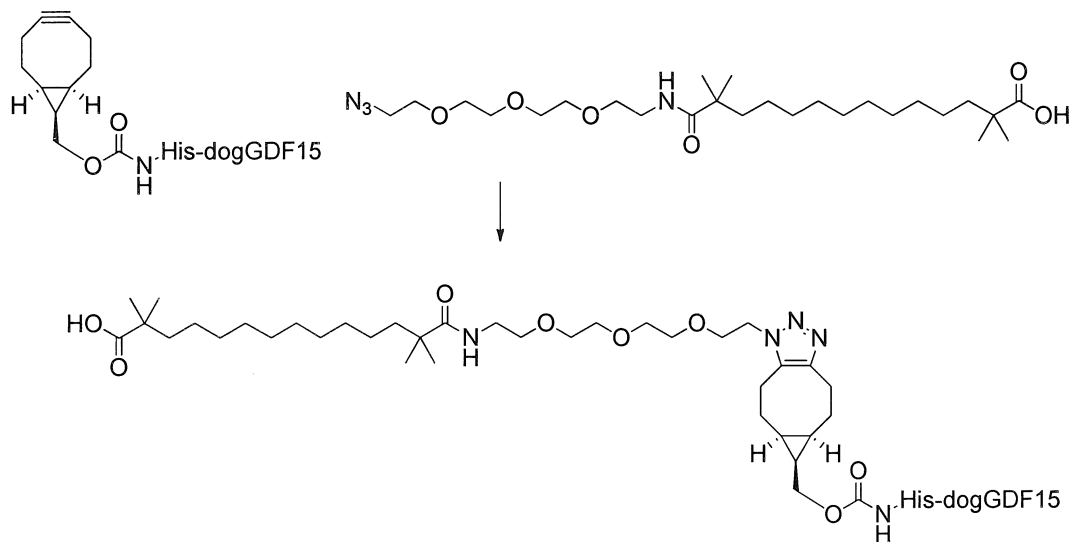
đioxit rửa giải với heptan/EtOAc/DCC (10:1:1) để tạo ra hỗn hợp. Tinh chế tiếp hỗn hợp này bằng phương pháp HPLC sử dụng axit đã kích hoạt MS [(gradient 55-80% ACN 3,5 phút): $rt = 2,48$ phút, khối lượng tính toán được: 314,46 khối lượng quan sát được: 314,00] để tạo ra sản phẩm sạch (50mg, hiệu suất 38,2%) và để thu hồi nguyên liệu ban đầu.

Bước 2:



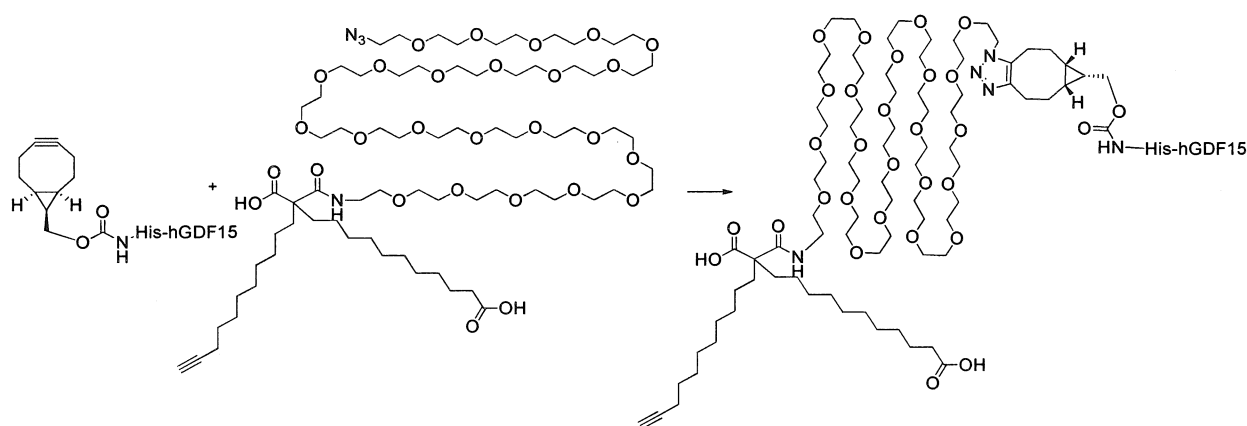
Thêm azido-dPEG3-amin (10mg, 0,049mmol) và DIPEA (9uL, 0,049mmol) vào dung dịch axit NHS-2,2,13,13-tetrametyltetradecandioic (10mg, 0,024mmol) trong DCM (3mL), và khuấy hỗn hợp ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ. Cô đặc hỗn hợp, hòa tan lại trong MeOH (3mL) và tinh chế bằng phương pháp HPLC đã kích hoạt MS (Gradient 55-80% ACN 3,5 phút $rt=2,35$, khối lượng dự kiến: 514,70 khối lượng quan sát được: 514,40) để tạo ra 7mg sản phẩm sạch ở hiệu suất 58%.

Bước 3:



Thêm chất đệm có pH = 4,5 (100 μ L) và azit (6 μ L trong DMSO, 10 mg/mL) vào 100 μ L dung dịch BCN-dGDF15 (I-60: 0,68mg/mL trong chất đệm có pH = 4,5), và ủ hỗn hợp này ở nhiệt độ phòng qua đêm. Rửa hỗn hợp này bằng Amicon 10k 4 lần. Phân tích dung dịch tạo thành bằng MALDI chỉ ra sự liên hợp chính là +1 và +2. Maldi: khối lượng tính toán được: 26546 khối lượng quan sát được: 26483; khối lượng tính toán được: 27060 khối lượng quan sát được: 27128; khối lượng tính toán được: 27574 khối lượng quan sát được: 27789.

Ví dụ 16: His-hGDF15 BCN (I-58) liên hợp với chất trung gian 44:

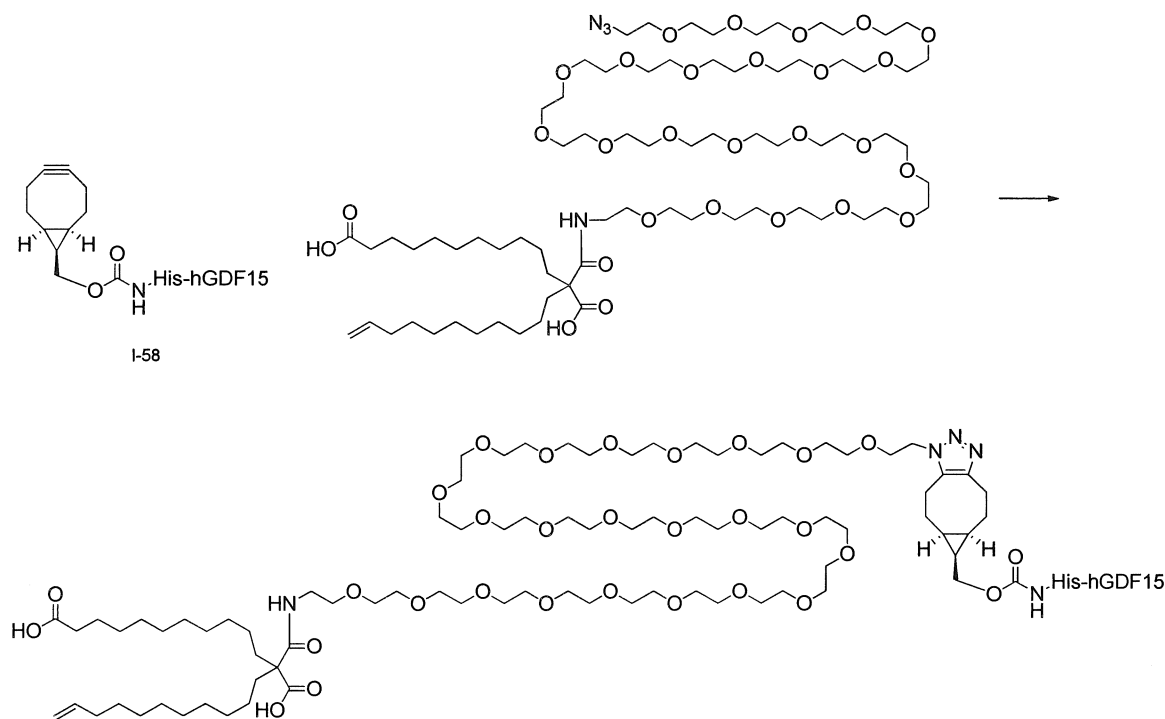


Mức độ đánh dấu	Tính toán được	Quan sát được	% AUC @ 280nm
His-hGDF15	26726	26728	45
His-hGDF15-BCN	26902	26904	21
His-hGDF15 +1FA	28422	28360	25
His-hGDF15 +2FA	29868	30012	9

His-hGDF15 +1FA (axit béo) tương ứng với phản ứng tại nhóm chức amino đầu N trên một phân tử (một đơn vị monome) dime đồng nhất GDF15.

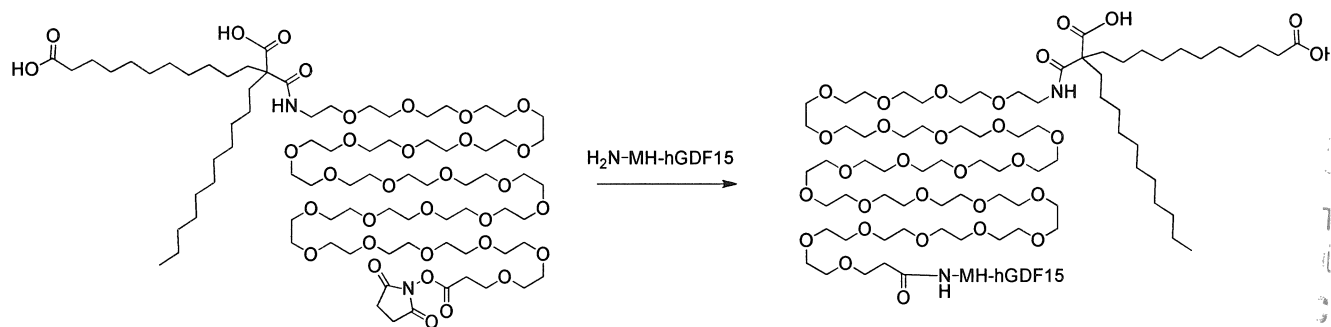
His-hGDF15 + 2FA (axit béo) tương ứng với phản ứng tại nhóm chức amino đầu N trên cả hai phân tử (cả hai đơn vị monome) dime đồng nhất GDF15.

Ví dụ 17: His-hGDF15-BCN liên hợp với chất trung gian 52



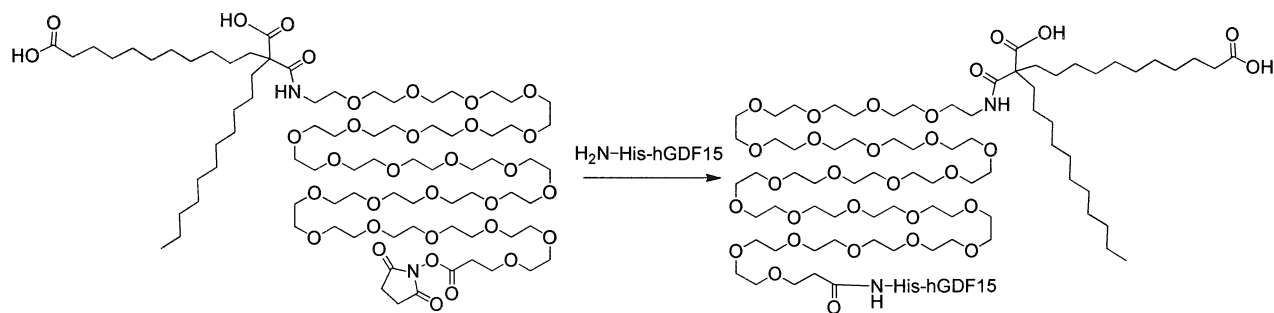
Thêm axit béo - peg azit (15uL trong 35mg/mL DMSO, 0,36umol) vào dung dịch 3mL xyclooctyn GDF15 (I-58: 0,46mg/mL, 0,051umol) trong 7mL chất đệm natri axetat có pH=4, và ủ hỗn hợp này ở nhiệt độ phòng qua đêm. Quan sát quá trình chuyển hóa hoàn toàn bằng phân tích MALDI. Sản phẩm được tinh chế bằng quá trình lọc amicon 10kD rửa ba lần để tạo ra 4,3ml sản phẩm mong muốn có nồng độ 0,29mg/ml ở hiệu suất 90%. Mald: xyclooctyn sm ~5% khối lượng dự kiến: 26902 khối lượng quan sát được: 26997; axit béo +1 ~40% khối lượng dự kiến: 28421 khối lượng quan sát được: 28525; axit béo +2 ~50% khối lượng dự kiến: 29940 khối lượng quan sát được: 30191 axit béo +3 5% khối lượng dự kiến: 31459 khối lượng quan sát được: 31874.

Ví dụ 18: MH-(199-308)GDF15 (I-54) liên hợp với chất trung gian 37



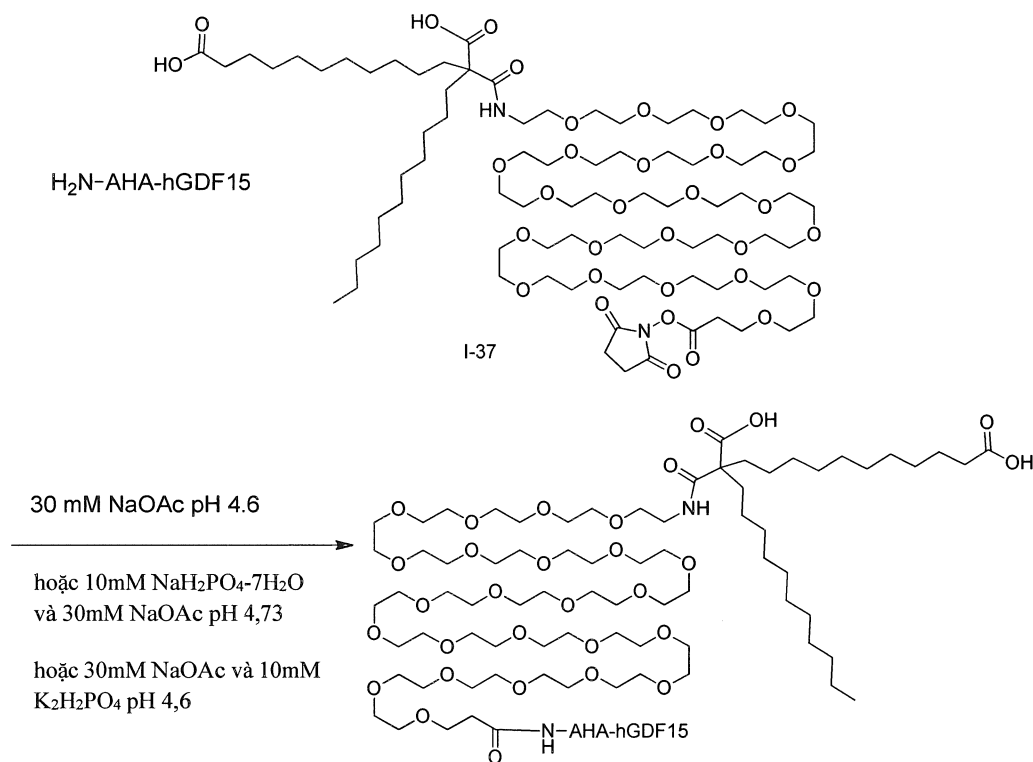
Thêm MH-(199-308)-GDF15 (chất trung gian 54: 0,393mL, 0,028 μ mol, 1,78mg/mL) vào 1,5ml chất đệm natri axetat 30mM, thêm axit béo NHS (474ug, 0,284 μ mol, 10mg/ml) vào dung dịch. Sau 5 giờ, phản ứng hoàn tất theo MALDI. Tinh chế các sản phẩm bằng cách rửa 5 lần sử dụng siêu lọc amicon 10kD để tạo ra 575ug sản phẩm liên hợp ở hiệu suất 73%. MALDI: sm (18%), khối lượng dự kiến: 24638 khối lượng quan sát được: 24735; axit béo +1 (38%) khối lượng dự kiến: 26192 khối lượng quan sát được: 26268; axit béo +2 (40%) khối lượng dự kiến: 27746 khối lượng quan sát được: 27798; axit béo +3 (4%) khối lượng dự kiến: 29300 khối lượng quan sát được: 29333.

Ví dụ 19A: His-hGDF15 (I-59) liên hợp với chất trung gian 37



Thêm His-GDF15 (0,493mL, 0,026 μ mol, 1,42mg/ml) vào 1,5ml chất đệm natri axetat 30mM có pH=4, thêm axit béo NHS (0,221mg, 0,132 μ mol, 10mg/mL) vào dung dịch này. Phản ứng xảy ra không hoàn toàn qua đêm, thêm không quá 2,5 đương lượng axit béo NHS (0,110mg, 0,066 μ mol, 10mg/mL) vào và sau 5 giờ Maldi cho thấy sản phẩm liên hợp +2 là sản phẩm chính. Tinh chế sản phẩm bằng cách rửa 5 lần sử dụng siêu lọc amicon 10kD để tạo ra 565ug sản phẩm liên hợp ở hiệu suất 76%. MALDI: sm (18%), khối lượng dự kiến: 26468 khối lượng quan sát được: 26553; axit béo +1 (38%) khối lượng dự kiến: 28022 khối lượng quan sát được: 28099; axit béo +2 (40%) khối lượng dự kiến: 29576 khối lượng quan sát được: 29649; axit béo +3 (4%) khối lượng dự kiến: 31130 khối lượng quan sát được: 31201.

Ví dụ 19B: AHA-hGDF15d liên hợp với chất trung gian 37



Điều chế dung dịch 10mg/mL của chất trung gian 37 trong nước loại dùng cho sinh học phân tử. Thêm NaOAc 30mM có pH = 4,6 (khoảng chấp nhận được là 4,5-5,0) vào AHA-hGDF15 (chất trung gian 57, 6,67mg/mL trong NaOAc 30mM có pH = 4,0, 5,247mL, 1,433 μ mol) để tạo ra protein cuối cùng nồng độ 0,88mg/mL. Thêm chất trung gian 37 (10eq., 2,39mL, 0,014mmol) vào và trộn hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ phòng trong 18 giờ. Kết tủa tạo thành trong bình phản ứng. Chia tách hỗn hợp phản ứng giữa các thiết bị lọc ly tâm Amicon 10kDa 4x15 mL và pha loãng mỗi hỗn hợp đến 15mL với NaOAc 30mM có pH = 4,0. Vật liệu là chất đệm trao đổi 4 lần vào NaOAc 30mM có pH = 4,0 và kết hợp các mẫu đến thể tích 25,6mL, khuấy trộn kết tủa trong thiết bị lọc bằng một đầu pipet giữa các lần rửa. Kết tủa vẫn còn trong dung dịch nên để hỗn hợp đứng yên ở 4°C qua đêm. Nồng độ đo bằng A280 (30040 cm⁻¹M⁻¹, 27538g/mol) là 1,62mg/mL (100%). Phân tích UPLC cho thấy mức độ thu hồi 60% của các sản phẩm +1FA (thời gian lưu: 4,88 phút) và +2FA (thời gian lưu: 5,80 phút) (phương pháp J). LCMS phương pháp T chỉ ra khối lượng mong muốn.

Thử nghiệm hỗn hợp thô ví dụ 19B (tỷ lệ được thể hiện trong bảng sau đây) in vivo và được báo cáo trong bảng 1:

Các loại	Tính được	Quan sát được	% quan sát được	Thời gian lưu
		LCMS Phương pháp T	UPLC Phương pháp J	(phút) UPLC Phương pháp J
AHA-GDF15	24430	24432	29	3,24
AHA-GDF15+1FA	25984	25985	27	4,88
AHA-GDF15+2FA	27538	27540	33	5,80
AHA-GDF15+3FA	29092	29091	11	6,66

AHA-hGDF15 +1FA (axit béo) tương ứng với phản ứng tại nhóm chức amino đầu N trên một trong số các chuỗi polypeptit (trên đơn vị monome) của đime đồng nhất GDF15 (như thể hiện theo phương án 11B, công thức H).

AHA-hGDF15 +2FA (axit béo) tương ứng với phản ứng tại nhóm chức amino đầu N trên cả hai chuỗi polypeptit của đime đồng nhất GDF15 (như thể hiện theo phương án 11B, công thức G).

AHA-hGDF15 +3FA (axit béo) tương ứng với phản ứng không chọn lọc ở một số vị trí khác của đime đồng nhất GDF15.

Quá trình tinh chế:

Tinh chế sản phẩm thô bằng phương pháp sắc ký pha đảo (chất đệm A TFA 0,1% trong nước; chất đệm B TFA 0,1M trong ACN Gradient; 99%-80% chất đệm A) trên Waters BEH300 130Å, 3,5µm, 4,6mmX100mm lưu lượng dòng 2,5mL/phút.

Phân đoạn 1: AHA-hGDF15 không phản ứng: Rt=17,33 phút

Phân đoạn 2: (19B1): AHA-GDF15 +1FA: Rt=20,2 phút (hiệu suất khoảng 15%) (Công thức H)

Phân đoạn 3: (19B2): AHA-GDF15 + 2FA: Rt=21,6 phút (hiệu suất khoảng 15%) (Công thức G)

Phân đoạn 4: (19B3): AHA-GDF15 + 3 FA: Rt=23,0 phút (hiệu suất khoảng 5%)

Hỗn hợp tỷ lệ 1:1 của 19B1 và 19B2 được điều chế và thử nghiệm (19Bm).

Theo cách khác, có thể thực hiện phản ứng trong $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10mM và NaOAc 30mM ở pH là 4,73: Điều chế dung dịch 10mg/mL của chất trung gian 37 trong nước loại dùng cho sinh học phân tử. Thêm NaOAc 30mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 - 7\text{H}_2\text{O}$ 10mM pH = 4,73 vào AHA-hGDF15 (chất trung gian 57, 12,04mg/mL trong NaOAc 30mM pH = 4,0, 4,15 μL , 0,002 μmol) để tạo ra protein cuối cùng có nồng độ 0,88mg/mL. Thêm chất trung gian 37 (20eq., 6,83 μL , 0,041 μmol) vào và trộn hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ phòng trong 18 giờ. Hỗn hợp phản ứng trở nên đục do kết tủa. Phân tích UPLC cho thấy 58% các sản phẩm +1 và +2 (phương pháp J).

Các loại	Tính được	% quan sát được
AHA-GDF15	24430	0
AHA-GDF15 +1 FA	25984	11
AHA-GDF15 +2 FA	27538	47
AHA-GDF15 +3 FA	29092	34
AHA-GDF15 +4 FA	30646	7

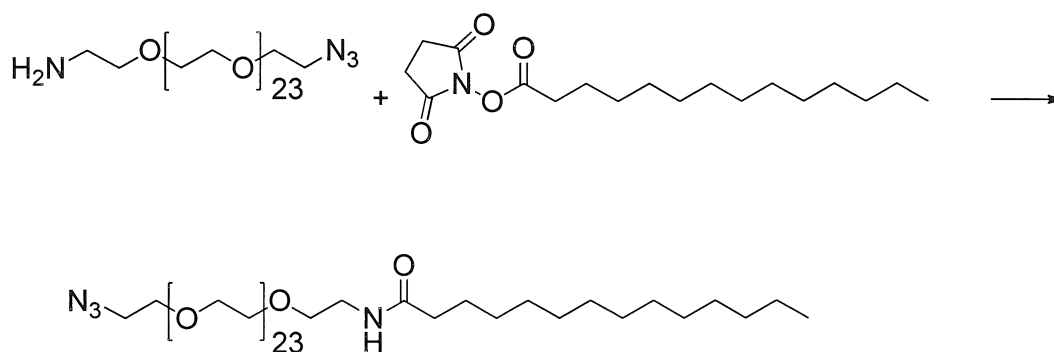
Cũng có thể thực hiện phản ứng trong NaOAc 30mM và K_2HPO_4 10mM ở pH = 4,6: Điều chế dung dịch 10mg/mL của chất trung gian 37 trong nước loại dùng cho sinh học phân tử. Thêm NaOAc 30mM K_2HPO_4 10mM pH = 4,6 (khoảng chấp nhận được là 4,5-5,0) vào AHA-hGDF15 (chất trung gian 57, 6,21mg/mL trong NaOAc 30mM pH = 4,0, 5,261mL, 1,337 μmol) để tạo ra protein cuối cùng nồng độ 0,88mg/mL. Thêm chất trung gian 37 (10eq., 68,3 μL , 0,409 μmol) vào và trộn hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ phòng trong 7 giờ. Hỗn hợp phản ứng trở nên đục do kết tủa. Chia tách hỗn hợp phản ứng vào bốn phần 9mL trong thiết bị lọc ly tâm Amicon 10kDa 15mL và pha loãng đến 15mL với NaOAc 30mM có pH = 4,0. Vật liệu là chất đệm trao đổi 4 lần vào NaOAc 30mM có pH = 4,0, khuấy trộn kết tủa giữa

mỗi lần rửa bằng một đầu pipet. Cô đặc hỗn hợp phản ứng đến thể tích 75mL. Kết tủa vẫn còn nên giữ vật liệu ở 4°C trong hai ngày. Nồng độ đo bằng A280 ($30040\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$, 27538g/mol) là $0,4\text{mg/mL}$ (97%). Phân tích UPLC cho thấy mức độ thu hồi 61% của các sản phẩm +1 và +2 (phương pháp J).

Các loại	Tính toán được	Quan sát được LCMS phương pháp T	% quan sát được UPLC Phương pháp J
AHA-GDF15	24430	24434	34
AHA-GDF15 +1 FA	25984	25987	34
AHA-GDF15 +2 FA	27538	27540	27
AHA-GDF15 +3 FA	29092	n/a	5

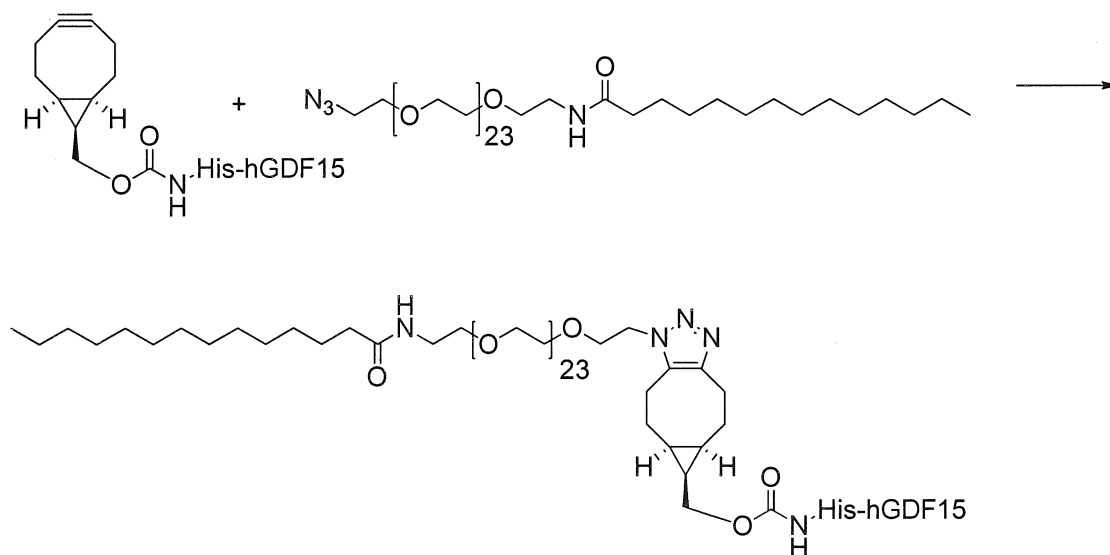
Ví dụ tham chiếu 1: His-hGDF15 BCN (I-58) liên hợp với chất trung gian cấu trúc axit PEG-myristic:

Bước 1:



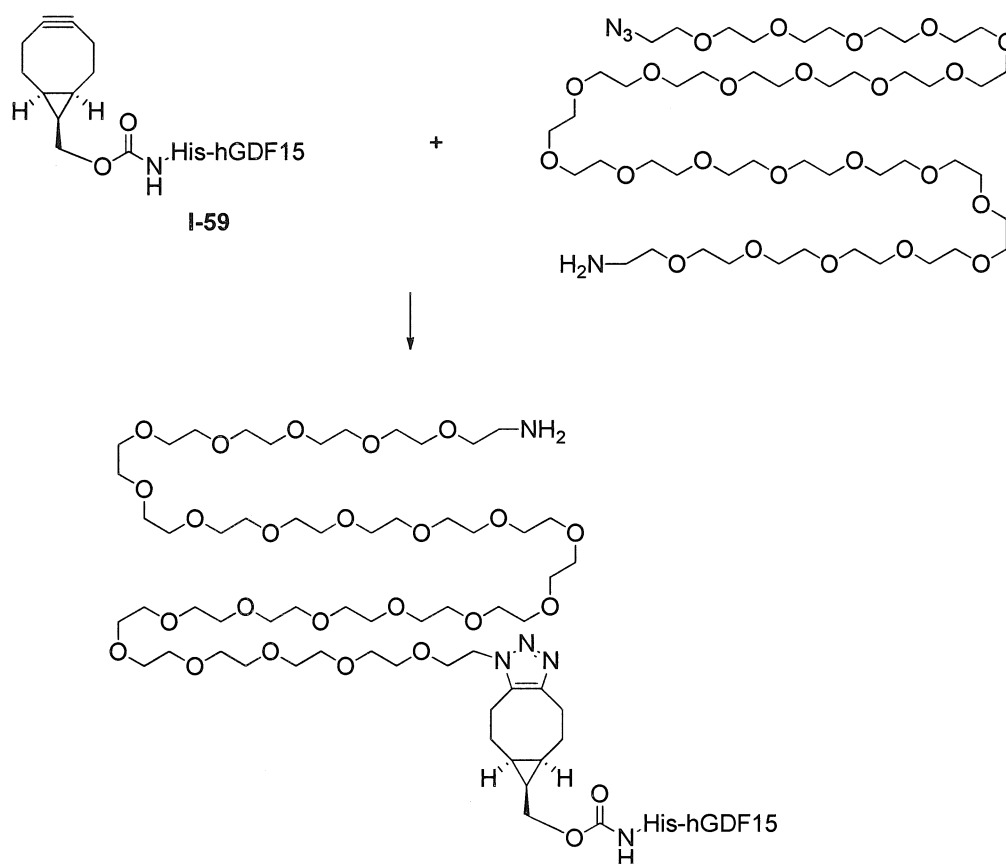
Thêm DCM (1mL) và DIPEA (13uL) vào hỗn hợp của Azido-PEG23-Amin (30mg, 0,027mmol) và este của myristic NHS (Toronto Research Chemicals, số cat # S69080) (12mg, 0,037mmol), và khuấy hỗn hợp ở nhiệt độ phòng qua đêm. Tinh chế hỗn hợp bằng phương pháp sắc ký silic đioxit rửa giải với EtOAc/Heptan (0-100%) sau đó là MeOH/DCM (0-10%) để tạo ra sản phẩm sạch ở khoảng 5% MeOH/DCM. LCMS: (Gradient: từ 40 đến 98% B trong 1,4 phút – lưu lượng 1 mL/phút dung môi rửa giải A: Nước + axit formic 0,05% + amoni axetat 3,75mM, dung môi rửa giải B: Axetonitril + axit formic 0,04%) LCMS: rt=2,20 (Phương pháp C) khối lượng +H tính toán được: 1354,71 khối lượng quan sát được: 1354,4.

Bước 2:



Thêm (2mg/mL trong DMSO, 6,3uL, 10eq) vào dung dịch BCN-hGDF15 (I-52: 800uL, 0,25mg/mL), và khuấy hỗn hợp ở nhiệt độ phòng qua đêm. 1,1mL 0,20mg/mL ở hiệu suất có thể định lượng. (Maldi: +1 khối lượng tính toán được: 28223 khối lượng quan sát được: 28640; +2 khối lượng tính toán được: 29543; khối lượng quan sát được: 29962, +3 khối lượng tính toán được: 30863 khối lượng quan sát được: 31426, +4 khối lượng tính toán được: 32183 khối lượng quan sát được: 32911).

Ví dụ tham chiếu 2: his-hGDF15-PEG23

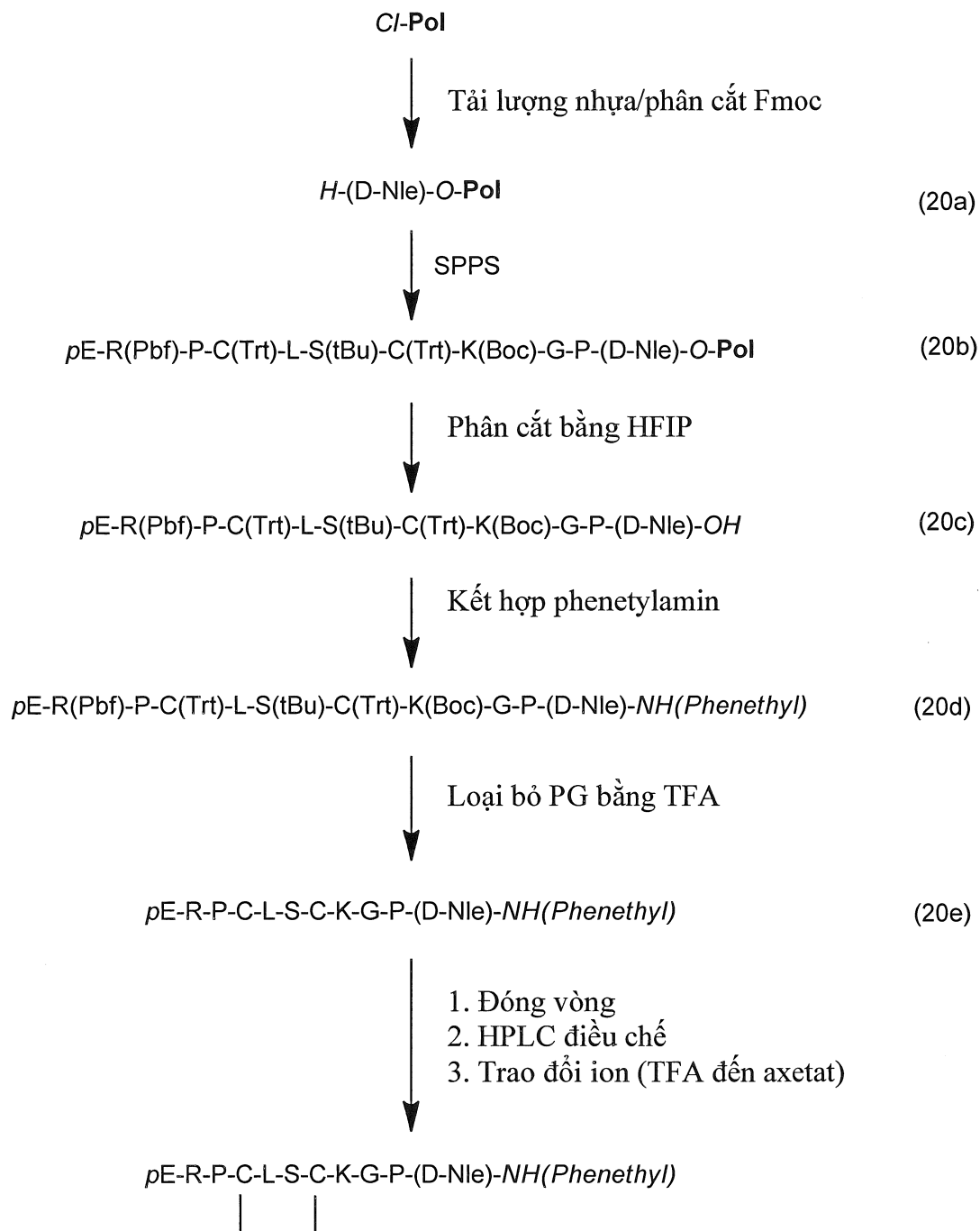


Mức độ đánh dấu	Tính toán được	Quan sát được	%
His-hGDF15	26468	26360,3	5
His-hGDF15-BCN	26644	n/a	0
His-hGDF15 +1 PEG23	27567	28178,6	15
His-hGDF15 +2 PEG23	28666	29385,1	46
His-hGDF15 +3 PEG23	29765	30547,2	28
His-hGDF15 +4 PEG23	30864	31731,8	5

Thêm azido-dPEG₂₃-amin (Quanta Biodesign, 104µg, 0,094µmol) vào dung dịch His-hGDF15 BCN (I59: 427µL, 1,17mg/mL, 0,019µmol) trong NaOAc 30mM có pH = 4,0 (427µL). Trộn hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ phòng trong 16 giờ, tại thời điểm đó trao đổi hỗn hợp vào NaOAc 30mM có pH = 4,0 sử dụng thiết bị lọc ly tâm Amicon MWCO 10kDa bằng cách pha loãng và cô đặc mẫu 5 lần đến thể tích 140µL. Phân tích MALDI cho thấy sự chuyển hóa hoàn toàn thành các sản phẩm +1 đến +4. Nồng độ đo bằng A₂₈₀ (29090M-1cm⁻¹, 27600g/mol) là 2,099mg/mL (57%).

Ví dụ 20: Peptit vòng apelin BCN liên hợp với chất trung gian 47:

Bước 1: Quá trình tổng hợp pE-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)-NH(Phenetyl) (disulfid C⁴-C⁷) (SEQ ID NO: 28) axetat



- Quy trình điều chế chất trung gian 20a
(Tải lượng của nhựa 2-clotrityl clorua chứa Fmoc-D-Nle-OH, loại bỏ Fmoc và sự xác định tải lượng nhựa này)

Tạo huyền phù nhựa 2-clotrityl clorua (50,0g, 85,0mmol) trong DCM (400mL), khuấy huyền phù này trong 10 phút và sau đó xả hết dung môi, rửa nhựa này với DCM (3 x 200 mL). Tiếp đó thêm dung dịch gồm Fmoc-D-Nle-OH (24,0g, 68,0mmol) và DIPEA (96,5ml, 552,5mmol) trong DCM (120,0mL) vào nhựa này, sục khí huyền phù với nitơ và khuấy ở rt trong 5 phút. Thêm một phần DIPEA (22,7ml, 127,5mmol) khác vào và khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ phòng qua đêm.

Xả hỗn hợp phản ứng và rửa nhựa này với DCM (3 x 250 mL) trong 2 phút mỗi lần. Dập tắt nhựa này bằng DCM/MeOH/DIPEA (70:15:15) (2 x 250 mL) trong 10 phút mỗi lần.

Phân cắt nhóm Fmoc bằng cách xử lý nhựa với piperidin/DMF (1:3) (1 x 300 mL) trong 5 phút. Tiếp theo, xả nhựa này (1 x 300 mL) trong 15 phút, sau đó rửa nhiều bước: DMF (6 x 250 mL, 2 phút mỗi lần), isopropanol (2 x 250 mL, 2 phút mỗi lần) và TBME (6 x 250 mL, 2 phút mỗi lần). Sấy khô nhựa này trong điều kiện chân không ở 35°C trong 24 giờ để tạo ra chất trung gian 20a (57,8g, tải lượng = 1,08 mmol/g).

- Quy trình điều chế chất trung gian 20b (Sự lắp ráp peptit mạch thẳng)
Chất trung gian 20a (18,5g, 20,0mmol) được đưa tới quá trình tổng hợp peptit pha rắn trên máy tổng hợp peptit tự động (CSBIO536™). Một chu kỳ liên kết được xác định như sau:

- Liên kết axit amin: AA (3,0eq.), DIC (3,0eq.), HOBt (3,0eq.), DMF (xem bảng sau đây)
- Rửa: DMF (4 x 150 mL, 2 phút mỗi lần).
- Quá trình khử bảo vệ Fmoc: Piperidin/DMF (1:3) (150mL trong 5 phút tiếp đó 150mL trong 15 phút).
- Rửa: DMF (6 x 150 mL, 2 phút mỗi lần).

Liên kết	AA	Số lần liên kết x Thời gian phản ứng	Phương pháp liên kết

1	Fmoc-L-Pro-OH	1 x 120 phút	DIC/HOBt
2	Fmoc-Gly-OH	1 x 120 phút	DIC/HOBt
3	Fmoc-L-Lys(Boc)-OH	1 x 120 phút	DIC/HOBt
4	Fmoc-L-Cys(Trt)-OH	1 x 120 phút	DIC/HOBt
5	Fmoc-L-Ser(tBu)-OH	1 x 120 phút	DIC/HOBt
6	Fmoc-L-Leu-OH	1 x 120 phút	DIC/HOBt
7	Fmoc-L-Cys(Trt)-OH	1 x 120 phút	DIC/HOBt
8	Fmoc-L-Pro-OH	1 x 120 phút	DIC/HOBt
9	Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH	1 x 120 phút	DIC/HOBt
10	Boc-L-Pyr-OH	1 x 120 phút	DIC/HOBt

Sau quá trình lắp ráp của peptit, rửa nhựa này với DMF (6 x 150 mL, 2 phút mỗi lần), isopropanol (6 x 150 mL, 2 phút mỗi lần) và TBME (6 x 150 mL, 2 phút mỗi lần). Sấy khô nhựa peptit này qua đêm trong điều kiện chân không cao ở 35°C để tạo ra chất trung gian 20b (57,6g, 20,0mmol).

- Quy trình điều chế chất trung gian 20c (Sự phân cắt HFIP từ nhựa)

Tạo huyền phù một phần chất trung gian 20b (27g, 9,37mmol) trong DCM (300mL) và khuấy trong 15 phút. Xả nhựa này sau đó xử lý bằng HFIP/DCM (3:7) (3 x 270mL, 15 phút mỗi lần). Lọc dung dịch phân chia ra và thu lại. Rửa nhựa này với DCM (3 x 300 mL). Cô đặc phần phân chia đã kết hợp và các dung dịch rửa đến khô trong chân không. Sấy khô bột màu trắng qua đêm trong điều kiện chân không ở 35°C tạo ra chất trung gian 20c-Batch1 (23,5g, 9,37mmol).

Lặp lại quy trình đã đề cập ở trên với một phần chất trung gian 20b (28,0g, 9,72mmol) khác, tạo ra chất trung gian 20c-Batch2 (26,1g, 9,72mmol).

- Quy trình điều chế chất trung gian 20d (Liên kết pha dung dịch của phenetylamin)

Hòa tan chất trung gian 20c-Batch2 (20,0g, 7,44mmol, 1,0eq) và HATU (5,23g, 13,8mmol, 1,85eq) trong DMF (400mL). Thêm dung dịch gồm phenetylamin (1,67g, 13,8mmol, 1,85eq) và DIPEA (3,56g, 27,6mmol, 3,71eq) trong DMF (60mL) vào.

Khuấy hỗn hợp phản ứng ở rt trong 30 phút sau đó làm lạnh xuống 0°C rồi thêm nước muối (460mL). Khuấy huyền phù này trong 10 phút sau đó phân lập sản phẩm bằng cách lọc. Rửa bánh lọc với H₂O (300mL), sau đó cẩn thận loại bỏ bánh lọc này, rồi hòa tan trong DCM (300mL). Sấy khô dung dịch này trên MgSO₄ rồi cô đặc đến khô trong chân không. Dem sản phẩm thô đi sắc ký nhanh trên silicagel (dung môi rửa giải: DCM và DCM/iPrOH (8:2)) để tạo ra chất trung gian 20d-Batch1 (14,4g, 6,6mmol).

Lặp lại cùng quy trình này với chất trung gian 20c-Batch1 (23,4g, 9,37mmol), ngoại trừ sắc ký nhanh, tạo ra chất trung gian 20d-Batch2 (28,0g, 9,37mmol).
- Quy trình điều chế chất trung gian 20e (Loại bỏ nhóm bảo vệ)

Hòa tan chất trung gian 20d-Batch2 (28,0g, 9,37mmol) trong TFA/DCM/EDT/TIS (90:5:2,5:2,5) (290mL) và khuấy hỗn hợp phản ứng ở rt trong 2 giờ.

Lọc dung dịch phân cắt ra và đổ lên trên TBME lạnh (3L) (0-4°C). Khuấy huyền phù đục trong bình nước đá trong 30 phút sau đó lọc qua thiết bị lọc thủy tinh 4 lõi. Rửa chất rắn màu trắng thu được từ đó với TBME (2 x 100 mL) sau đó sấy khô trong chân không ở 35°C qua đêm để tạo ra chất trung gian 20e-Batch1 (8,9g, 5,9mmol).

Lặp lại cùng quy trình với chất trung gian 20d-Batch1 (14,4g, 6,6mmol) tạo ra chất trung gian 20e-Batch2 (9,6g, 6,3mmol).
- Quy trình điều chế pE-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)-NH(Phenetyl) (disulfit C⁴-C⁷) axetat

1) Quy trình tạo vòng

Hòa tan chất trung gian 20e (5,0g, 3,3mmol) trong nước (500mL). Thêm dung dịch iodin (1,18g, 4,66mmol, 1,41eq) trong axit axetic (93mL) trong một phần. Khuấy hỗn hợp phản ứng ở rt trong 10 phút. Thêm dung dịch axit ascorbic (1,03g, 5,83mmol, 1,77eq) trong nước (5,8mL) vào và khuấy hỗn hợp phản ứng trong 10 phút, lọc rồi bảo quản ở 4°C đến khi tinh chế.

Lặp lại cùng quy trình tạo vòng đến khi xử lý được 18,3g (12,1mmol) chất trung gian 20e.

2) Quy trình tinh chế

Đem các dung dịch peptit vòng đi sắc ký HPLC điều chế trong các phần gồm 0,5-5,0g peptit trên mỗi lần bơm. Gộp các phân đoạn có độ tinh khiết lớn hơn 95% rồi sấy khô lạnh để tạo ra tổng lượng 4,89g (3,2mmol) peptit đã tinh chế (muối TFA).

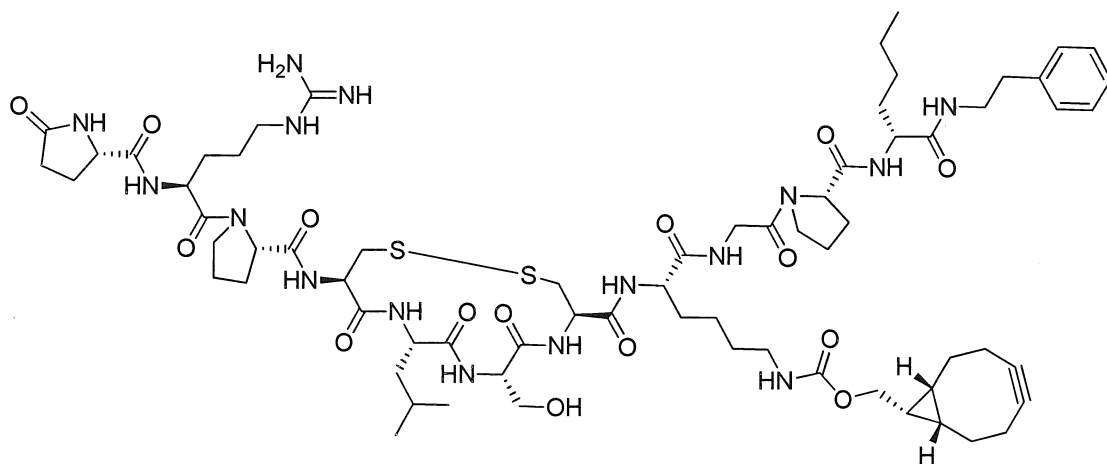
3) Sự tạo thành axetat bằng cách trao đổi ion

Đặt 75g (100mL) nhựa trao đổi ion mạnh (chất trao đổi III, Merck) ở dạng OH⁻ trong thiết bị lọc thủy tinh được thiêu kết (độ xốp 3) và sau đó thêm dung dịch axit axetic /nước (1:3) (300mL), khuấy huyền phù bằng tay trong 2 phút tiếp đó xả nhựa này. Lặp lại quy trình này với một phần axit axetic/nước khác (1:3) (300mL). Rửa nhựa này với nước đã khử ion cho đến khi quan sát thấy dòng xả trung hòa. Sau đó chuyển nhựa này vào cột 4 x 20cm được trang bị thiết bị lọc thủy tinh được thiêu kết (độ xốp 3).

Hòa tan 4,8g peptit đã tinh chế trong nước đã khử ion (50mL) và thêm vào cột. Rửa giải sản phẩm với nước đã khử ion (200mL). Kiểm soát quá trình rửa giải sản phẩm bằng phương pháp chấm mẫu tiếp xúc TLC, gộp các phân đoạn giàu và sấy khô đông lạnh để tạo ra pE-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)-NH(Phenetyl) (disulfit C⁴-C⁷) (SEQ ID NO: 28) axetat (4,1g, 2,9mmol).

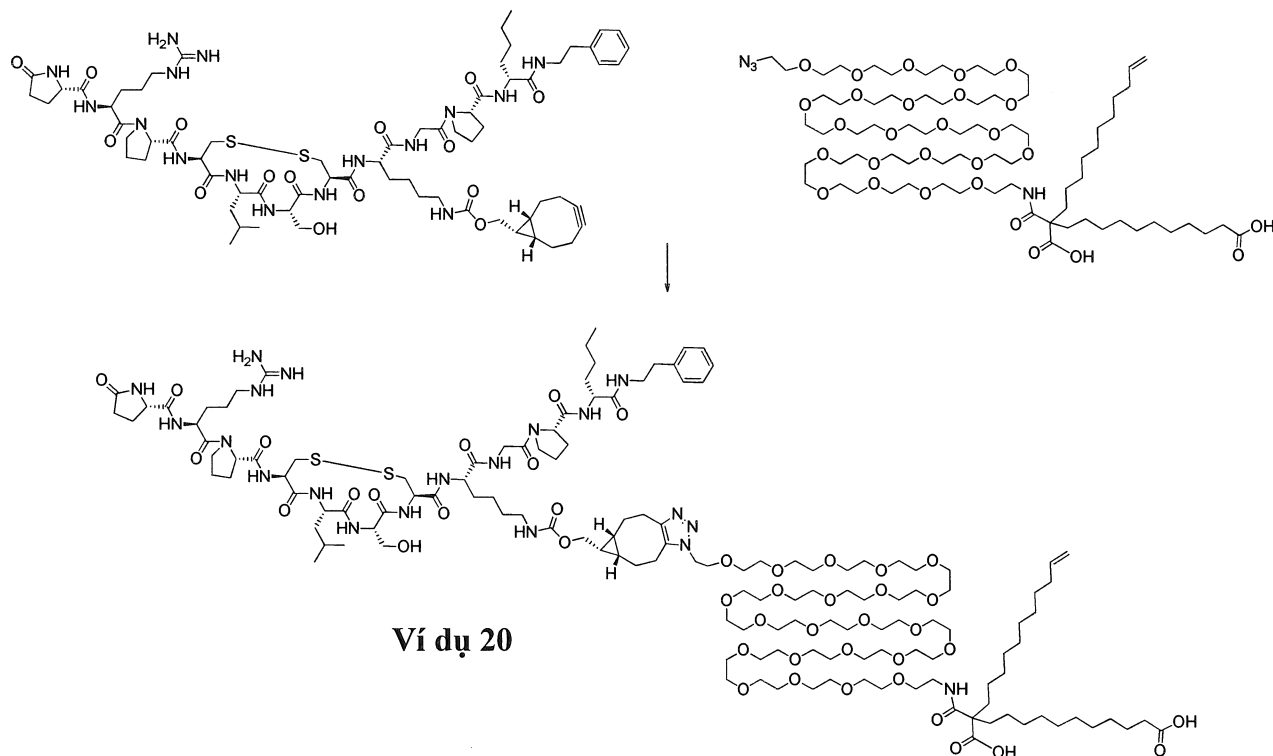
Phân tích sản phẩm tinh khiết bằng phương pháp HPLC phân tích (phương pháp phân tích F; $t_R=8,01$ phút) và UPLC-HRMS (phương pháp phân tích G; đo được: $[M+2H]^{2+}=643,328$; tính toán được: $[M+2H]^{2+}=643,324$). Hàm lượng axetat là 7,99-8,27% và hàm lượng nước là 1,94-1,96 %.

Bước 2: Quy trình điều chế pE-R-P-C*-L-S-CP-N⁶-[[$(1\alpha,8\alpha,9\alpha)$ -bixyclo[6.1.0]non-4-yn-9-ylmetoxy]cacbonyl]-K-G-P-(D-Nle)-NH(Phenetyl) [disulfua C4-C7] (SEQ ID NO: 30)



Khuấy hỗn hợp của pE-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)-NH(Phenetyl) triaxetat [disulfua C4-C7] (100mg, 0,068mmol), natri bicacbonat (38mg, 0,452mmol) và nước (83uL) trong DMF (1mL) ở RT trong 10 phút, sau đó thêm (1R,8S)-bixyclo[6.1.0]non-4-yn-9-ylmetyl succinimidyl cacbonat (Berry & associates, 20mg, 0,068mmol). Khuấy hỗn hợp phản ứng ở RT trong 90 phút. Thêm 1mL nước vào hỗn hợp này, và đông khô dung dịch tạo thành để tạo ra bột, sử dụng bột này cho bước tiếp theo mà không tinh chế thêm.

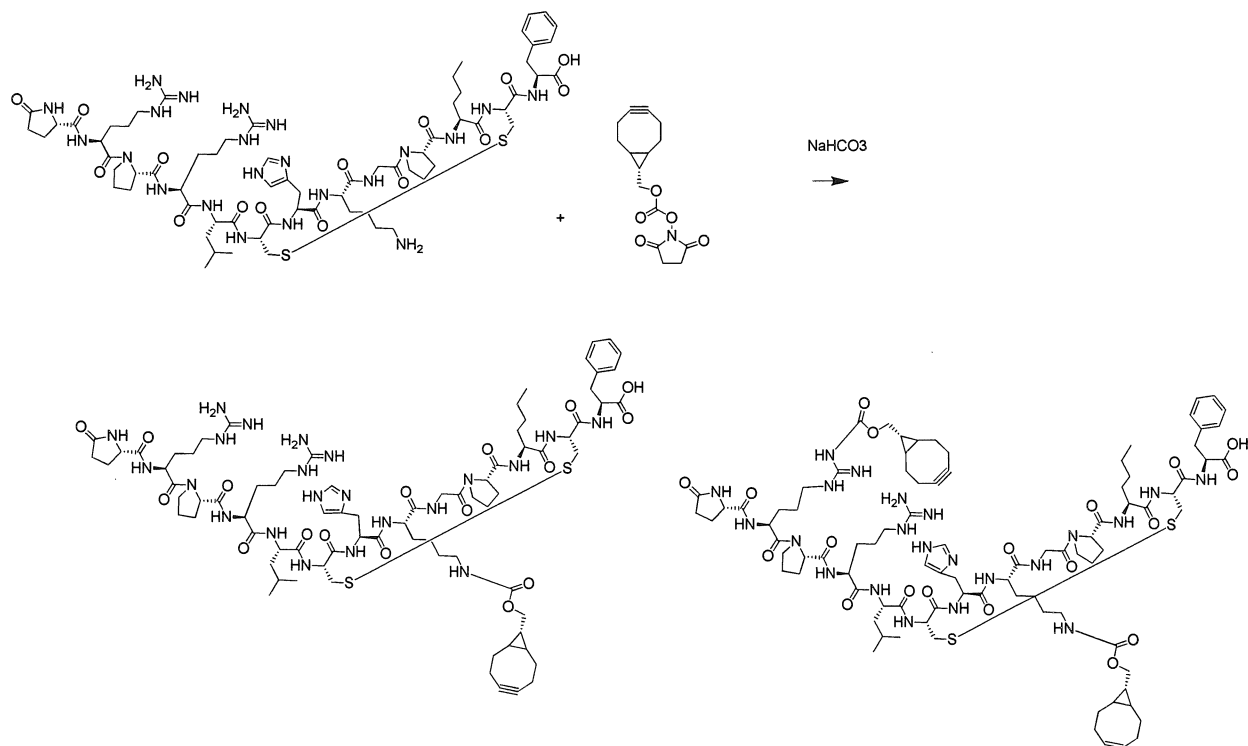
Bước 3: Quy trình điều chế ví dụ 20:



Khuấy hỗn hợp của pE-R-P-C*-L-S-C*-N⁶-[[$(1\alpha,8\alpha,9\alpha)$ -bixyclo[6.1.0]non-4-yn-9-ylmethoxy]carbonyl]-K-G-P-(D-Nle)-NH(Phenetyl) [disulfua C4-C7] (SEQ ID NO: 30) (50mg sản phẩm từ bước 2 trong 1mL nước, 0,034mmol) và chất trung gian 47 (52mg, trong 268uL nước) ở RT trong khoảng 3 giờ. Sau đó tinh chế hỗn hợp phản ứng bằng phương pháp HPLC điều chế (cột Sunfire 30x50mm 5um ACN/H₂O w/ TFA 0,1% 75mL/phút, gradien 15-40% ACN 5 phút). Đông khô phân đoạn sản phẩm để tạo ra sản phẩm nêu trong đề mục là muối TFA (24mg, 21%). LCMS (Waters Acquity UPLC BEH C18 1,7um 2,1x50mm, 50°C, dung môi rửa giải A: nước + axit formic 0,1%, dung môi rửa giải B: axetonitril + axit formic 0,1%, gradien 2% đến 98% B/A trong hơn 5,15 phút): thời gian lưu: 2,77 phút; MS [M+2]²⁺: quan sát được: 1491,8808, tính toán được: 1491,8560.

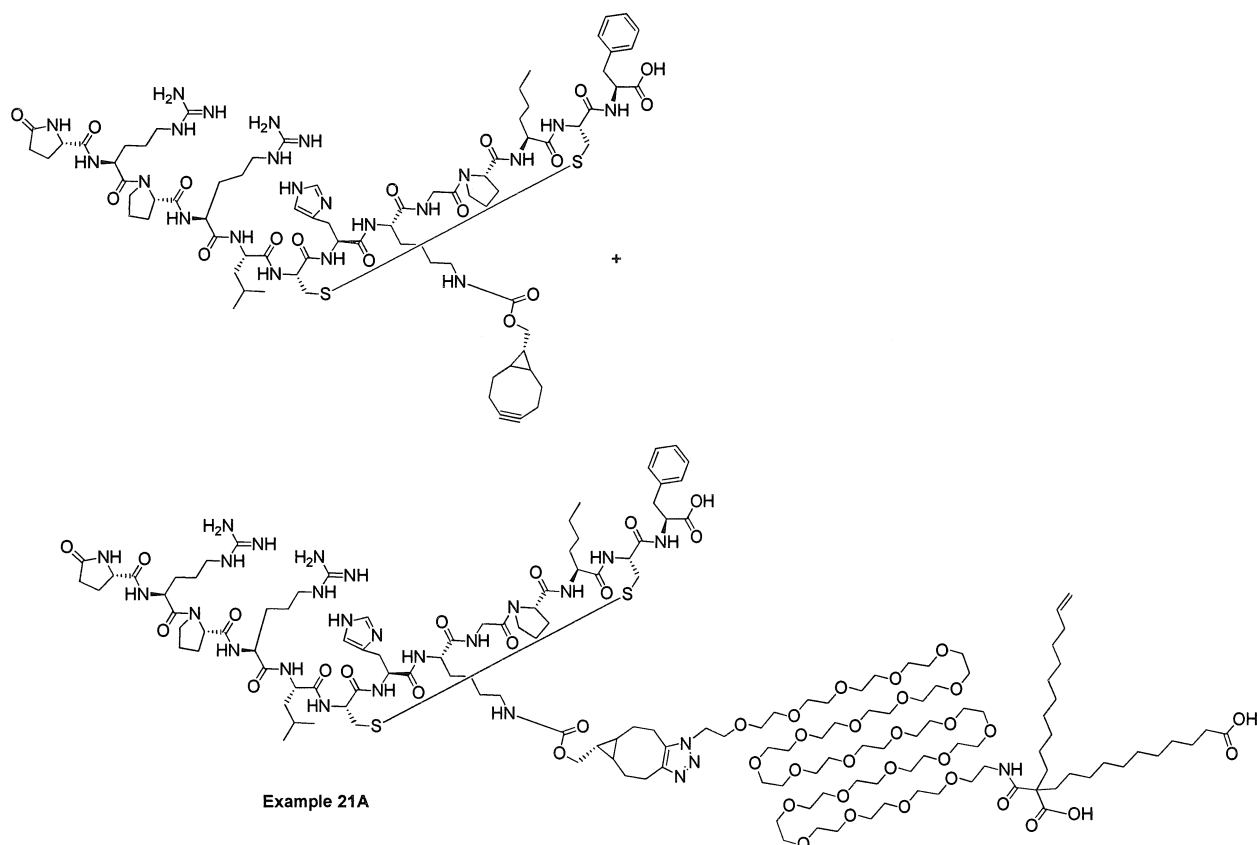
Ví dụ 21A: Peptit vòng apelin BCN liên hợp với chất trung gian 47

Bước 1:



Khuấy hỗn hợp của pE-R-P-R-L-C*-H-K-G-P-Nle-C*-F-OH(Disulfua C⁶-C¹²) (SEQ ID NO: 29) 50mg, 0,033mmol, như được điều chế trong bằng sáng chế Mỹ số US 8,673848), natri bicacbonat (18mg, 0,215mmol) và nước (40uL) trong DMF (0,5mL) ở RT trong 10 phút, sau đó thêm (1R,8S)-bixyclo[6.1.0]non-4-yn-9-ylmetyl succinimidyl cacbonat (Berry & associates, 18mg, 0,065mmol). Khuấy hỗn hợp phản ứng ở RT trong 90 phút. Sự bổ sung hỗn hợp gồm các chất +1 và +2 được quan sát bằng LCMS, do đó tinh chế hỗn hợp bằng phương pháp HPLC kích hoạt khối lượng (phương pháp Peptit 5 25-50% ACN 5 phút gradien: các điều kiện: cột Sunfire 30x50mm 5um ACN/H₂O w/ TFA 0,1% 75mL/phút 1,5ml bơm): rt 3,2 phút (+1), rt 4,65 phút, 4,9 phút (hỗn hợp +1 và +2). LCMS xác nhận sản phẩm +1 mong muốn ở hiệu suất 61% và hỗn hợp +1, +2 ở hiệu suất 18%. LCMS: (dung môi rửa giải có tính bazơ A: nước + amoni hydroxit 5mM dung môi rửa giải B: ACN Cột axit: Sunfire C18 3,5µm 3,0x30mm - 40°C Cột bazơ: XBridge C18 3,5µm 3,0x30mm - 40°C) thời gian lưu: 0,98 phút; MS [M+2]²⁺: quan sát được: 856,0, tính toán được: 865,0245.

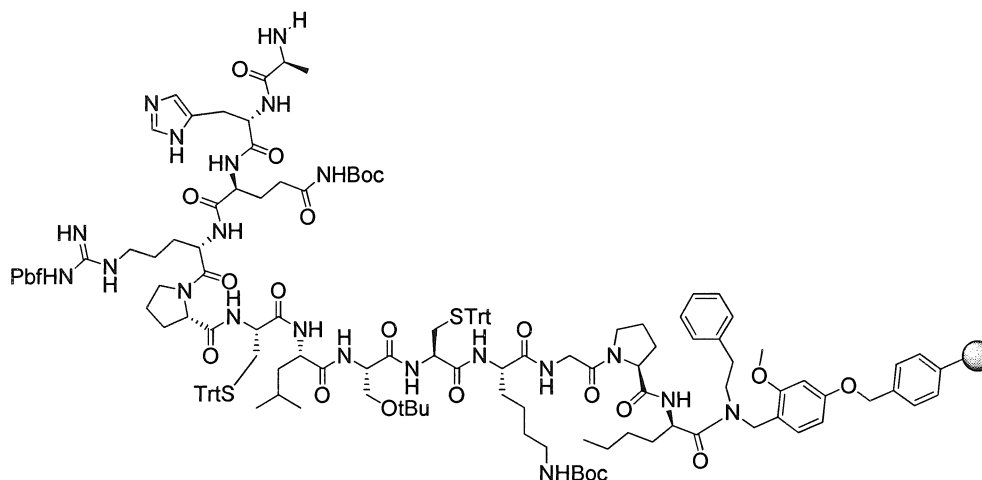
Bước 2:



Khuấy hỗn hợp của pE-R-P-R-L-C*-H- N⁶-[[$(1\alpha,8\alpha,9\alpha)$ -bixyclo[6.1.0]non-4-yn-9-ylmethoxy]cacbonyl]-K-G-P-Nle-C*-F-OH(Disulfua C⁶-C¹²) (SEQ ID NO: 31) (21,33mg, 0,014mmol) và chất trung gian 47 (24mg, 0,014mmol) ở RT trong khoảng 3 giờ. Hoàn tất phản ứng bằng LCMS và đông khô để tạo ra sản phẩm nêu trong đề mục (23mg, 48%). LCMS (Waters Acquity UPLC BEH C18 1,7 μ m 2,1x50mm, 50°C, dung môi rửa giải A: nước + axit formic 0,1%, dung môi rửa giải B: axetonitril + axit formic 0,1%, gradien 2% đến 98% B/A trong hơn 5,15 phút): Thời gian lưu: 2,22 phút; MS [M+2]²⁺: quan sát được: 1616,9464, tính được: 1616,976.

Ví dụ 21B: Peptit vòng apelin liên hợp với cấu trúc axit béo-chất liên kết I-37

Bước 1: Quá trình tổng hợp chất trung gian 21B1 A-H-Q-R-P-C-L-S-C-K-G-P-Dnle-Phenetyl amin (SEQ ID NO: 32)



Đưa nhựa phenetylamin-AMEBA (Sigma Aldrich, 0,1mmol, 1,0mmol/g) đến quá trình tổng hợp peptit pha rắn trên máy tổng hợp peptit tự động (CEM Liberty Blue Microwave) hai lần Arg tiêu chuẩn đối với các gốc Arg và kết hợp hai lần Dnle. Chuẩn bị các axit amin dưới dạng các dung dịch 0,2M trong DMF. Một chu kỳ liên kết tiêu chuẩn được xác định như sau:

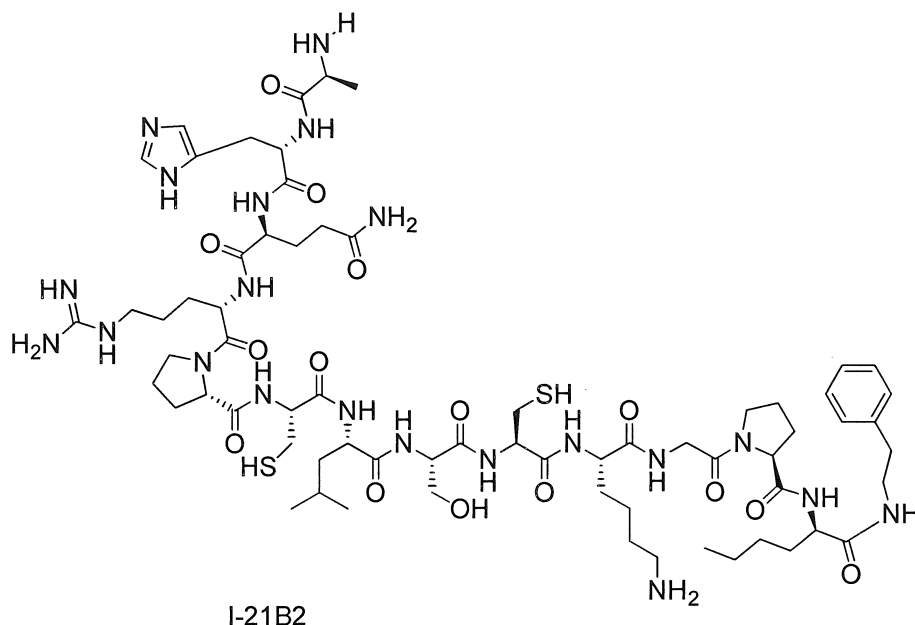
- Liên kết axit amin: AA (5eq.), HATU (5eq.), DIEA (25eq.)
- Rửa: DMF (3 X 7 mL)
- Quá trình khử bảo vệ Fmoc: Piperidin 20%/HOBt 0,1M (2 x 7 mL)
- Rửa: DMF (4 x 7mL sau đó 1 x 5 mL)

Liên kết	AA	Số lần liên kết x Thời gian phản ứng (nhiệt độ)	Phương pháp ghép đôi
1	Fmoc-D-Nle- OH	1 x 10 phút (70°C)	DIEA/HATU
2	Fmoc-L-Pro- OH	1 x 5 phút (70°C)	DIEA/HATU

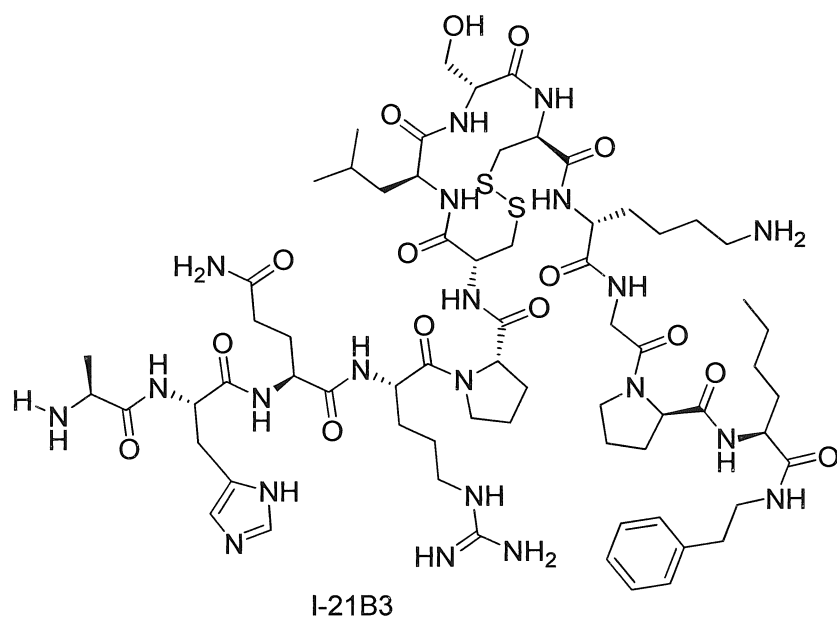
3	Fmoc-L-Gly- OH	1 x 5 phút (70°C)	DIEA/HATU
4	Fmoc-L-Lys- OH	1 x 5 phút (70°C)	DIEA/HATU
5	Fmoc-L-Cys- OH	1 x 5 phút (70°C)	DIEA/HATU
6	Fmoc-L-Ser- OH	1 x 5 phút (70°C)	DIEA/HATU
7	Fmoc-L-Leu- OH	1 x 5 phút (70°C)	DIEA/HATU
8	Fmoc-L-Cys- OH	1 x 5 phút (70°C)	DIEA/HATU
9	Fmoc-L-Pro- OH	1 x 5 phút (70°C)	DIEA/HATU
10	Fmoc-L-Arg- OH	2 x 25 phút (25°C)	DIEA/HATU
11	Fmoc-L-Gln- OH	1 x 5 phút (70°C)	DIEA/HATU
12	Fmoc-L-His- OH	1 x 5 phút (70°C)	DIEA/HATU
13	Fmoc-L-Ala- OH	1 x 5 phút (70°C)	DIEA/HATU

Sau quá trình lắp ráp peptit, rửa nhựa này với DMF (2 x 50 mL) và DCM (2 x 50 mL) sau đó sấy khô trong điều kiện chân không để tạo ra chất trung gian 21B1 (276mg, 0,1mmol).

Bước 2: Quy trình điều chế chất trung gian 21B2 (Sự phân cắt peptit từ nhựa)



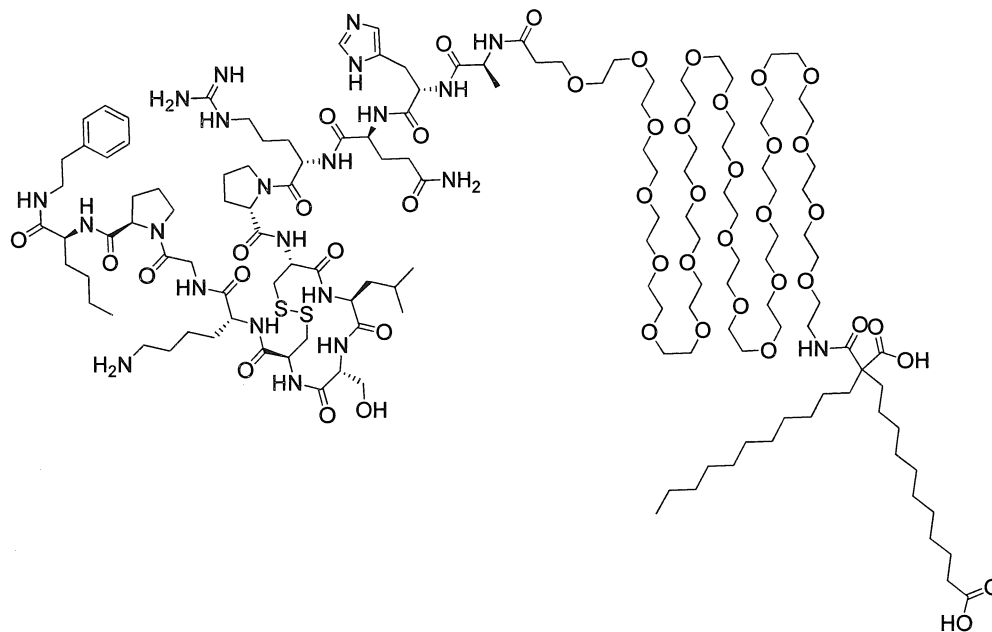
Kết hợp chất trung gian 21B1 (276mg, 0,1mmol) với 4mL dung dịch TFA (37mL TFA, 1mL H₂O, 1mL TIPS, 3,06g DTT) và lắc ở nhiệt độ phòng trong 3 giờ. Loại bỏ dung dịch khỏi nhựa và kết tủa vào 40mL Et₂O lạnh. Tạo xoáy dung dịch và để đứng yên trên đá trong 10 phút trước khi ly tâm ở 4000 rpm trong 5 phút. Loại bỏ dung môi và rửa chất rắn màu trắng hai lần nữa với Et₂O lạnh (40mL mỗi lần), ly tâm (5 phút mỗi lần) rồi lắng gạn. Sấy khô chất rắn trong điều kiện chân không qua đêm tạo ra chất trung gian 21B2 (17,4mg, 0,012mmol). LCMS (SQ2 ProductAnalysis-Axitic-Peptide-Polar, cột Acquity UPLC BEH C18, 130Å, 1,7μm, 2,1mm x 50mm, 50°C): R_t = 1,83 phút, MS [M+H] 1513,5.



Bước 3: Quy trình điều chế chất trung gian 21B3 (Quy trình tạo vòng gốc xystein)

Hòa tan chất trung gian 21B1 (29,6mg, 0,020mmol) trong nước (3mL) và 10 giọt DMSO để tạo ra dung dịch vẩn nhẹ. Thêm từ từ từng giọt iot (50mM trong HOAc, 0,783mL, 0,039mmol) và trộn hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ phòng qua đêm. Phân tích LCMS phản ứng thô cho thấy nguyên liệu ban đầu chuyển hóa hoàn toàn. Thêm từng giọt axit ascorbic 0,5M cho đến khi màu tan hết. Tinh chế vật liệu qua HPLC kích hoạt MS. Quá trình đông khô các phân đoạn gộp đã tạo ra 7mg sản phẩm được mong muốn dạng bột màu trắng (4,63 μ mol, 24%). LCMS (SQ2 ProductAnalysis-Axitic-Peptit, cột Acquity UPLC BEH C18, 130Å, 1,7 μ m, 2,1mm x 50mm, 50°C): R_t = 0,90 phút, MS [M+H] 1511,8.

Bước 4: Quy trình điều chế sản phẩm liên hợp bao gồm Apelin A-H-Q-R-P-C-L-S-C-K-G-P-Dnle-Phenetyl amin (SEQ ID NO: 32) và chất trung gian I-37 (sự liên hợp đầu N-)- Ví dụ 21B



Điều chế dung dịch 10mg/mL của NHS-axit béo trong H₂O. Hòa tan chất trung gian 21B3 (1,5mg, 0,993μmol) trong chất đệm NaOAc 30mM có pH=4 (672μL) và thêm NHS-axit béo (I-37: 0,850mL, 5,10μmol). Trộn hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ phòng trong 16 giờ, ở thời điểm đó thêm 1,5mg NHS-axit béo (10mg/mL trong H₂O) bổ sung và trộn hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ phòng trong 16 giờ. Thêm 8mg NHS-axit béo (10mg/mL trong H₂O) và trộn hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ phòng trong 3 ngày và thêm 1,7mg NHS-axit béo (10mg/mL trong H₂O). Lắc hỗn hợp này ở nhiệt độ phòng trong 16 giờ và tinh chế qua HPLC đã kích hoạt M để tạo ra 1,7mg hợp chất nêu trong đề mục dạng bột màu trắng (0,510μmol, 51%). LCMS (SQ2 ProductAnalysis-Axitic-Peptide-Polar, cột Acquity UPLC BEH C18, 130Å, 1,7μm, 2,1mm x 50mm, 50°C): R_t = 3,87 phút, MS [M+H+2/2] 1533,1; [M+H+3/3] 1022,9.

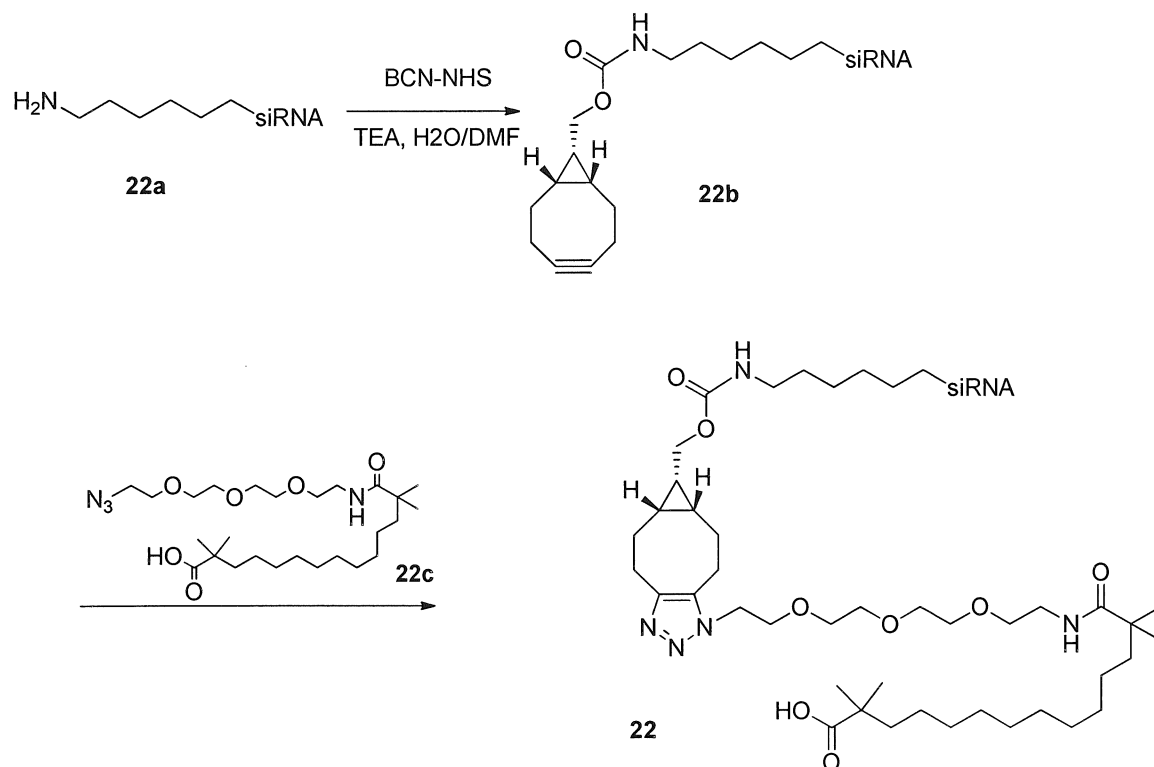
Các ví dụ 22 đến 24 dùng để chỉ các sản phẩm liên hợp của axit béo với siARN.

Các kit để tổng hợp siARN là sẵn có trên thị trường, ví dụ, từ New England Biolabs và Ambion. Chất siARN có thể được cấu tạo sử dụng quy trình tổng hợp hóa học và các phản ứng nối enzym sử dụng các quy trình đã biết trong lĩnh vực này. Ví dụ, chất siARN có thể được tổng hợp hóa học sử dụng các nucleotit xuất hiện trong tự nhiên hoặc các nucleotit được biến đổi khác nhau được được thiết kế để làm giảm các hiệu ứng không phải đích, và/

hoặc tăng sự ổn định sinh học của phân tử hoặc để làm tăng sự ổn định vật lý của phân tử kép được tạo thành giữa các axit nucleic vô nghĩa và có nghĩa, ví dụ, các dẫn xuất phosphothioat và các nucleotit được thể acridin có thể được sử dụng. Mỗi “G,” “C,” “A,” “T” và “U” nói chung lần lượt đại diện cho một nucleotit mà chứa guanin, cytosin, adenin, thymidin và uracil đóng vai trò như là bazơ. Tuy nhiên, các thuật ngữ “ribonucleotit”, “deoxynucleotit”, hoặc “nucleotit” cũng có thể dùng để chỉ nucleotit được biến đổi hoặc gốc thay thế.

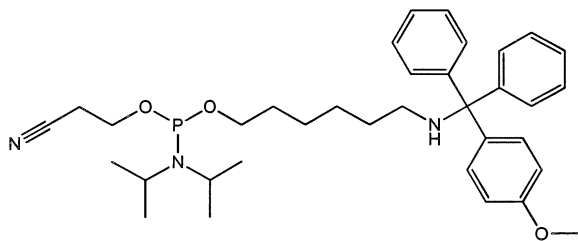
Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ nhận ra rằng có thể tổng hợp và biến đổi siARN như mong muốn, sử dụng phương pháp thông thường bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này (xem Henschel et al. 2004 DEQOR: công cụ dựa trên web để thiết kế và kiểm soát chất lượng siARN. Nghiên cứu về các axit nucleic 32 (Web Server Issue): W113-W120).

Ví dụ 22: Sự liên hợp của gốc axit béo có công thức A3 với siARN



Quy trình điều chế chất trung gian 22a:

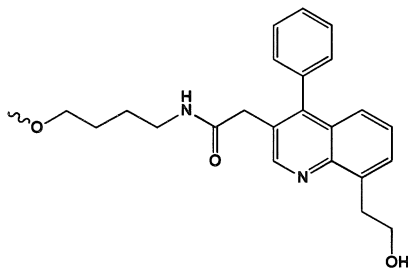
Từ TTR siARN [siARN liên kết với transthyretin (TTR), được tổng hợp bằng cách sử dụng các phương pháp thông thường đã biết trong lĩnh vực này], được chuyển hóa thành 22a sử dụng các quy trình oligonucleotit tiêu chuẩn (ví dụ phản ứng với 6-(4-monometoxytritylamino)hexyl-(2-xyanoethyl)-(N,N-diisopropyl)-phosphoramidit (Số Catalog theo nghiên cứu Glen: 10-1906))



TTR siARN:

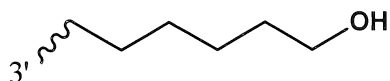
Sợi đối nghĩa: Puagagcaagaacacug*u*^{*}*u*^{*}*r*X058 (SEQ ID NO: 18) trong đó:

P là phosphat, các chữ cái thấp hơn dùng để chỉ nucleotit được biến đổi 2'-OMe, các chữ cái được gạch chân dùng để chỉ nucleotit được biến đổi 2'-F, các chữ cái in nghiêng dùng để chỉ nucleotit được biến đổi 2'-MOE, r là abasic ribitol, * dùng để chỉ mỗi liên kết phosphorothioat, và X058 là mũ đầu 3' không phải nucleotit có công thức:



Sợi có nghĩa: aacaguguuucugcucuar-C6OH (SEQ ID NO: 19).

- a) dùng để chỉ phosphat; và C6OH (cũng được gọi là C6) là mũ đầu 3' không phải nucleotit có công thức:



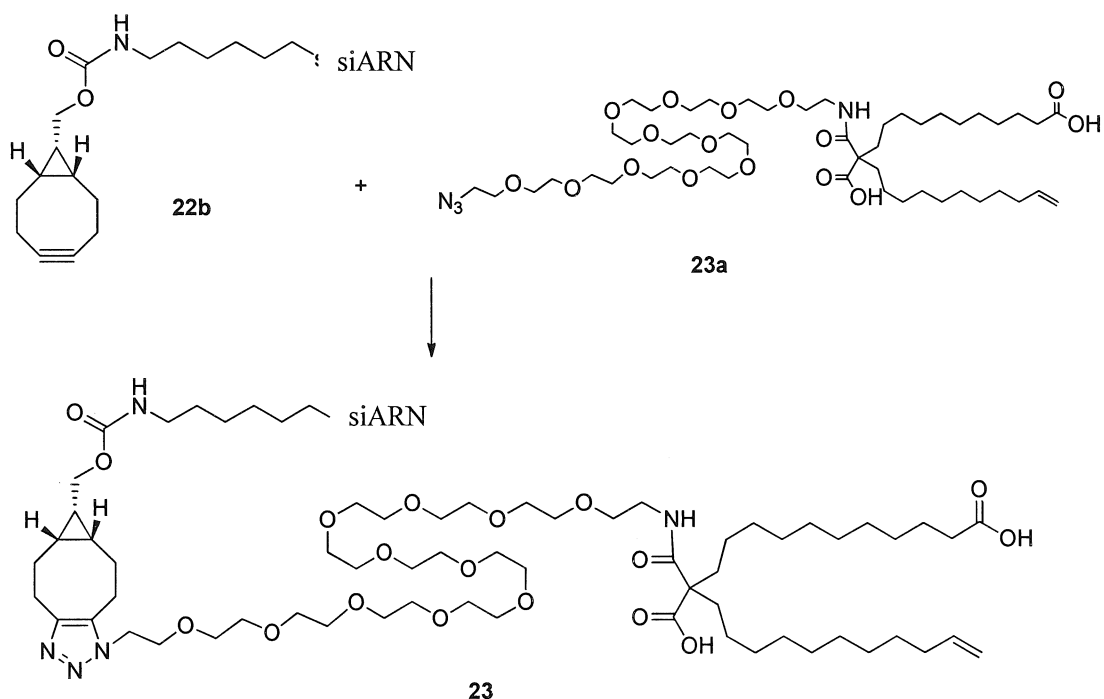
Quy trình điều chế chất trung gian 22b:

Thêm 0,556ml DMF vào 0,556ml dung dịch siARN 22a (TTR siARN 14,02mM trong H₂O, 7,79μmol) ở 0°C, và làm ấm lên đến nhiệt độ phòng. Tiếp đó thêm 208μl TEA (0,3M trong DMF, 62μmol) và 260μl BCN-NHS ((1R,8S,9s)-Bixyclo[6.1.0]non-4-yn-9-ylmethyl N-succinimidyl carbonat) (0,15M trong DMF, 39μmol). Khuấy hỗn hợp phản ứng tạo thành ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ. Phương pháp HPLC phân tích cho thấy sự biến mất của nguyên liệu ban đầu 22a. Pha loãng hỗn hợp phản ứng đến 10ml bằng H₂O đã khử ion và hỗn hợp phản ứng trở nên vẩn. Chiết hỗn hợp trên bằng etylaxetat 5 lần để loại bỏ các phân tử hữu cơ nhỏ. Tách lớp chứa nước rồi đông khô. Sử dụng sản phẩm rắn khô (22b) mà không biến đổi nó.

Quy trình điều chế ví dụ 22:

Trộn 80μl hợp chất 22b (12,3mM trong H₂O, 0,968μmol) và 65μl bis axit béo-N₃ (22c: bước 2 của ví dụ 15: 44,7mM trong DMSO, 2,90μmol). Hỗn hợp tạo thành bị vẩn, nên thêm 80μl 1:1 DMF/THF vào và phản ứng vẫn hơi vẩn. Thêm 80μl DMSO nữa vào để thu được dung dịch sạch. Khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ phòng qua đêm. Pha loãng hỗn hợp phản ứng bằng H₂O đã khử ion và tinh chế trên HPLC để tạo ra 5,6mg hợp chất 22 (hiệu suất 65,9%). Các điều kiện HPLC để điều chế: Cột: Xselect Prep phenylhexyl 5um OBD 19x50mm; dung môi hữu cơ: ACN được biến đổi bằng TEA.HOAc 100mM; dung môi chứa nước: H₂O được biến đổi bằng TEA.HOAc 100mM; Gradient: 5-60% AcCN/H₂O; Thời gian: 10 phút. Trong điều kiện LC-MS phương pháp H, sản phẩm cho thấy đỉnh đơn với thời gian lưu 5,44 phút với MW mong muốn là 8778 sau bước đầu thực hiện.

Ví dụ 23: Sự liên hợp của gốc axit béo có công thức A1 với siARN Quy trình điều chế hợp chất 4



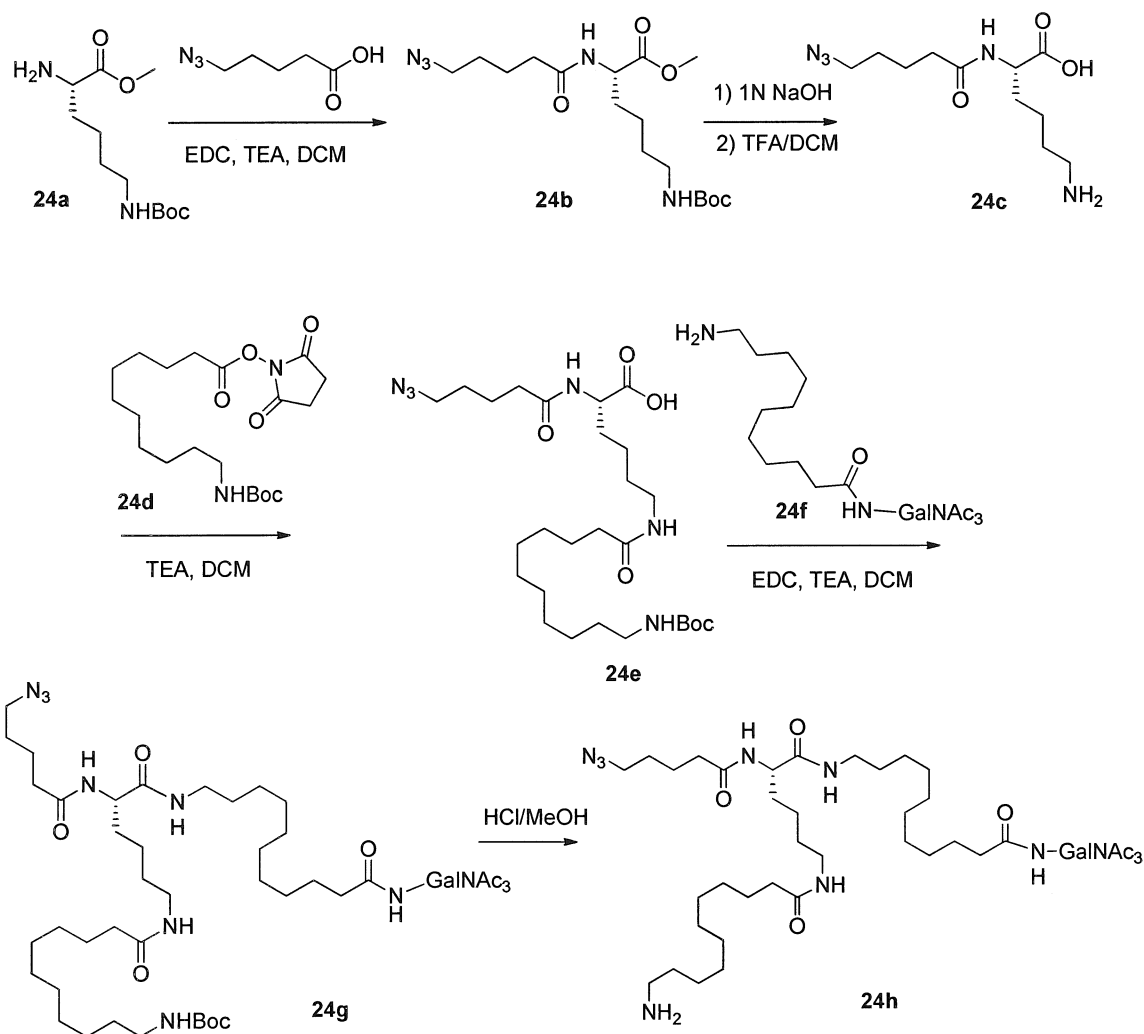
Ví dụ 23 được điều chế sử dụng cùng quy trình như ví dụ 22.

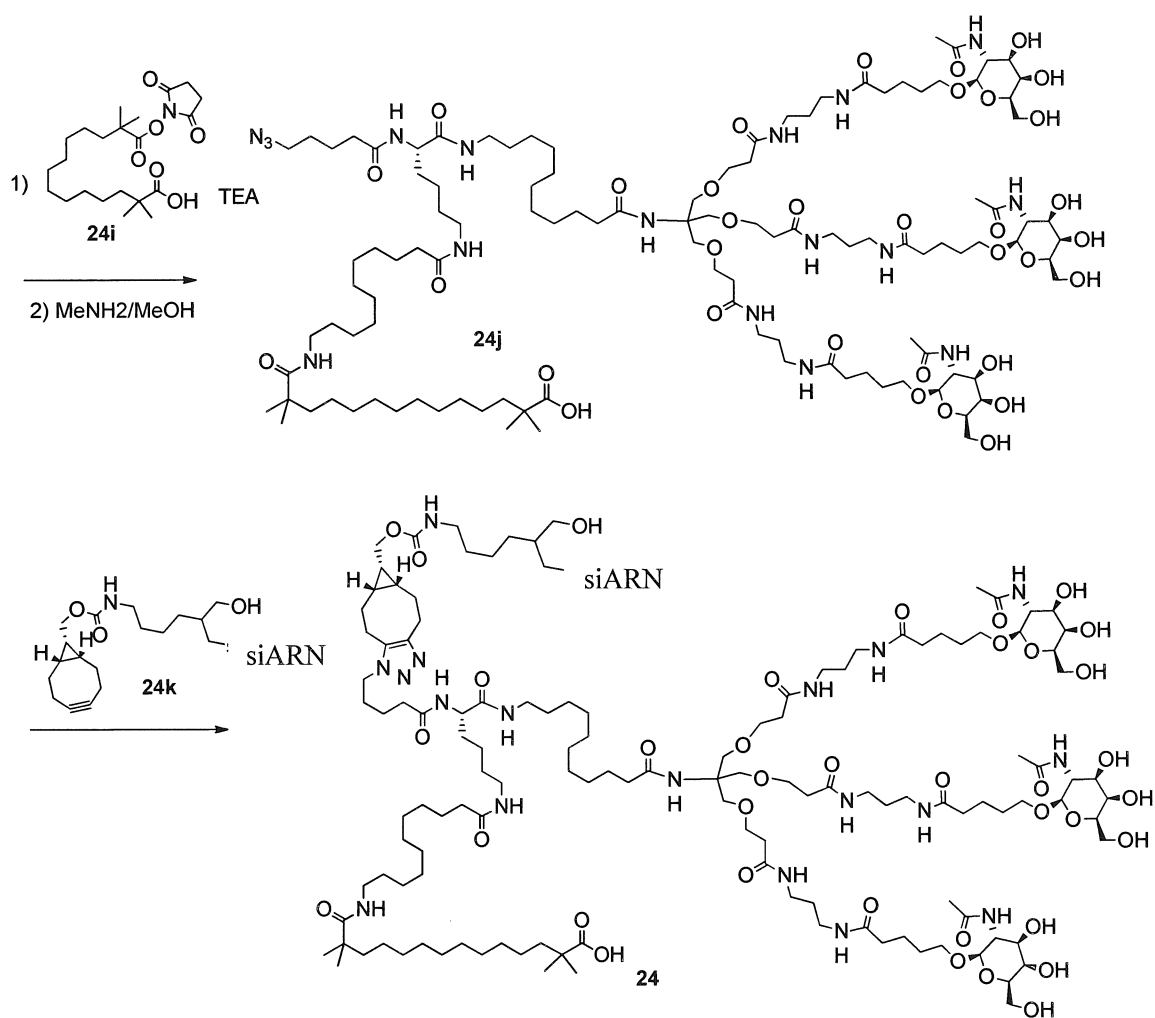
Quy trình điều chế 23a:

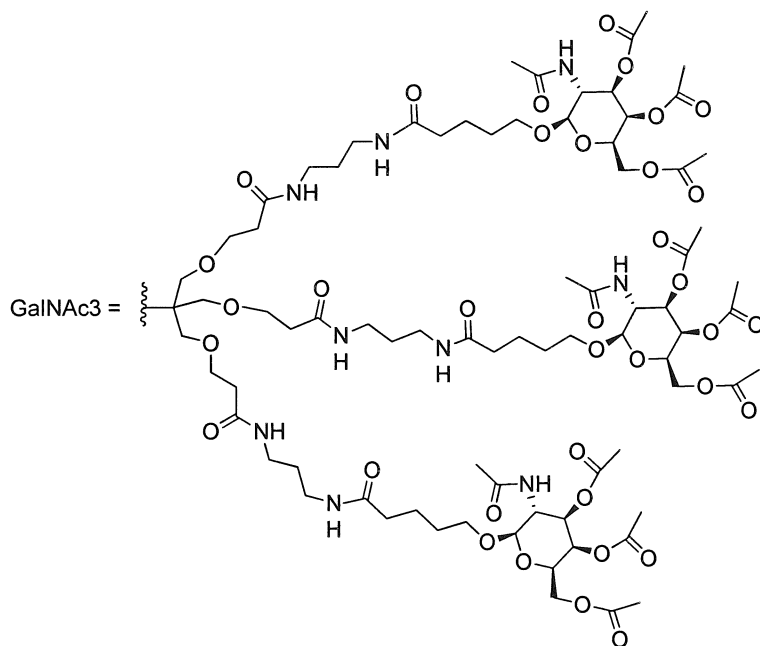
Thêm azido-peg7-amin (QuantaBioscience, cat #10523) (31mg) và DIPEA (52uL) vào dung dịch NHS-axit béo (20mg) trong DCM (16mL) và khuấy hỗn hợp ở nhiệt độ phòng trong 2h. Quan sát sự chuyển hóa hoàn toàn bằng phân tích LC-MS. Cô đặc hỗn hợp, hòa tan lại trong MeOH (3mL) và tinh chế bằng phương pháp HPLC kích hoạt MS với TFA 0,1% (rt=1,59 phút, khối lượng (M+1) dự kiến: 818,062 khối lượng quan sát được: 817,9) để tạo ra sản phẩm sạch. Một nửa nguyên liệu bị mất do bộ ngắt 800 Da trong hệ thống HPLC MS. Thu được 5-10mg (17-33%) sản phẩm sạch.

Trộn 80µl 22b (12,3mM trong H₂O, 0,968µmol) và 65µl axit béo tris -N₃ (23a: 44,7mM trong DMSO, 2,90µmol). Phản ứng tạo ra 5,2mg hợp chất 23 (hiệu suất 58,0%). Trong điều kiện LC-MS phương pháp H, sản phẩm cho thấy đỉnh đơn với thời gian lưu 5,87 phút với MW mong muốn là 9257 sau bước đầu thực hiện.

Ví dụ 24: Sự liên hợp của axit béo có công thức A3 với APOCIII siARN







Quy trình điều chế 24b

Thêm TEA (0,58ml, 4,19mmol) vào dung dịch 24a (1,244g, 4,19mmol) trong 25ml DCM, sau đó thêm axit N3-pentanoic (500mg, 3,49mmol). Cuối cùng thêm EDC (804mg, 4,19mmol). Khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ phòng trong 4 giờ. Chiết phản ứng giữa nước muối và DCM. Kết hợp tất cả các chất hữu cơ, sấy khô, cô đặc và tinh chế trên SiO₂ gel chứa etylaxetat 60% /Heptan để tạo ra 1,20g hợp chất 24b (hiệu suất 89%) . ¹H NMR (CLOROFORM-d, 400MHz) δ: 5,88-6,37 (m, 1H), 4,60 (d, J=4,8 Hz, 2H), 3,77 (s, 3H), 3,33 (t, J=6,7 Hz, 2H), 3,13 (d, J=6,5 Hz, 2H), 2,30 (t, J=7,2 Hz, 2H), 1,81-1,95 (m, 1H), 1,63-1,81 (m, 5H), 1,48-1,57 (m, 2H), 1,46 (s, 9H), 1,36 (d, J=6,8 Hz, 2H)

Quy trình điều chế 24c

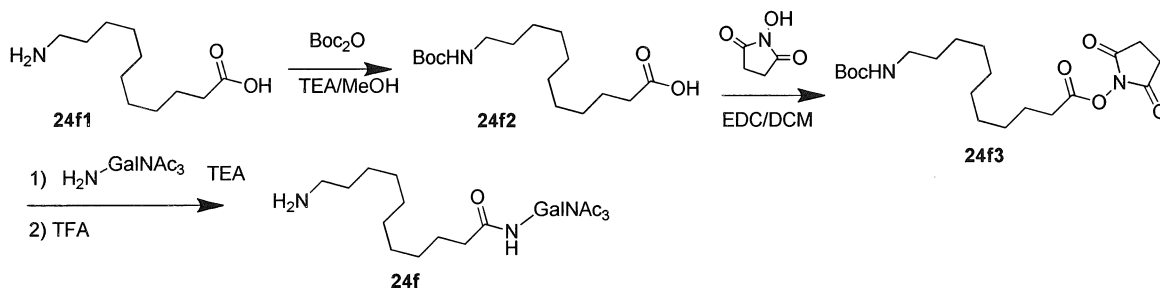
Thêm NaOH 1N (5,58ml, 5,58mmol) vào dung dịch 24b (860mg, 2,23mmol) trong 12ml THF. Khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ phòng trong 0,5 giờ. Pha loãng hỗn hợp phản ứng bằng nước muối và thêm vào 20ml DCM. Điều chỉnh độ pH của lớp chứa nước đến giá trị

pH ~5 bằng HCl 1N, rồi chiết bằng DCM. Kết hợp tất cả các chất hữu cơ, sấy khô, cô đặc và hòa tan lại chất rắn thô vào 6ml DCM. Thêm 0,6ml TFA vào và khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ phòng trong 2 giờ. Cô đặc phản ứng và tạo ra 24c thô (400mg, 54%), sử dụng chất này trực tiếp mà không tinh chế thêm. Theo LC-MS phương pháp I, sản phẩm cho thấy đỉnh lớn nhất ở 0,43 phút với khối lượng 272,5 ($M+H^+$).

Quy trình điều chế 24e

Thêm TEA (0,434mL, 3,11mmol) vào dung dịch 24c (400mg, 1,04mmol) trong 10ml DCM, sau đó thêm 24d (538mg, 1,35mmol). Khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ phòng trong 3 giờ. Chiết phản ứng giữa H₂O và DCM. Kết hợp tất cả các chất hữu cơ, sấy khô, cô đặc và tinh chế trên SiO₂ gel với 8% MeOH/DCM để tạo ra 475mg 24e (hiệu suất 82%). ¹H NMR (CLOROFORM-d, 400MHz) δ: 6,74-6,98 (m, 1H), 5,95-6,13 (m, 1H), 4,55 (dd, J=7,2, 2,4 Hz, 2H), 3,32 (t, J=6,7 Hz, 4H), 3,11 (d, J=5,8 Hz, 2H), 2,30-2,37 (m, 2H), 2,20-2,26 (m, 2H), 1,90 (br. s., 2H), 1,71-1,80 (m, 2H), 1,59-1,71 (m, 4H), 1,51-1,59 (m, 2H), 1,35-1,51 (m, 13H), 1,20-1,35 (m, 13H)

Quy trình điều chế 24f



Quy trình điều chế chất trung gian 24f2

Thêm TEA (1,04ml, 7,45mmol) vào dung dịch 24f1 (1,0g, 4,97mmol) trong MeOH (40ml), sau đó thêm di t-butyl dicacbonat (2,17g, 9,94mmol). Gia nhiệt phản ứng ở 60°C trong 1,5 giờ. Cô đặc phản ứng và tinh chế trên SiO₂ cột với 5% MeOH/DCM để tạo ra 1,2g hợp chất 24f2 (hiệu suất 80%). ¹H NMR (CLOROFORM-d, 400MHz) δ: 4,51 (br. s, 1H), 3,00-3,22 (m, 2H), 2,37 (t, J=7,4 Hz, 2H), 1,59-1,71 (m, 2H), 1,46 (s, 11H), 1,29 (br. s., 12H).

Quy trình điều chế chất trung gian 24f3

Thêm N-hydroxyl scucxinimit (0,60g, 5,18mmol) vào dung dịch 24f2 (1,2g, 3,98mmol) trong DCM (30ml), sau đó thêm EDC (1,0g, 5,18mmol). Khuấy dung dịch này ở nhiệt độ phòng qua đêm. Cô đặc phản ứng, tải trực tiếp lên trên cột SiO₂ và tinh chế với 40% etylaxetat/heptan để tạo ra 1,46g hợp chất 24f3 (hiệu suất 92%). ¹H NMR (CLOROFORM-d, 400MHz) δ: 4,49 (br. s, 1H), 3,04-3,19 (m, 2H), 2,86 (d, J=4,5 Hz, 4H), 2,62 (t, J=7,4 Hz, 2H), 1,70-1,82 (m, 2H), 1,37-1,53 (m, 13H), 1,30 (br. s., 10H)

Quy trình điều chế chất trung gian 24f

Thêm TEA (0,11mL, 0,79mmol) vào dung dịch GalNAc3-NH₂ (300mg, 0,16mmol) trong DCM (1,5ml), sau đó thêm 24f3 (188mg, 0,47mmol). Khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ phòng qua đêm. Tiếp đó thêm axit trifloaxetic (1,0ml). Sau 2 giờ, LC-MS cho thấy sự biến mất của chất trung gian. Cô đặc phản ứng và tinh chế trên HPLC mở trong điều kiện axit với ELSD làm bộ dò. Các phân đoạn HPLC chứa sản phẩm được thu lại và làm bay hơi phần dung môi để tạo ra 220mg hợp chất 24f (hiệu suất 67%). LC-MS cho thấy một phần sản phẩm mất một nhóm axetyl. Các điều kiện HPLC để tinh chế: cột: cột Sunfire 30x100mm 5μm; dung môi hữu cơ: ACN w/ TFA 7,5%; dung môi chứa nước: H₂O w/ TFA 7,5%; lưu

lượng dòng: 75mL/phút. Gradien: 15-40% H₂O/AcCN; Thời gian: 9,5 phút. Bộ dò: ELSD (Evaporative Light Scattering Detector) để dò. Theo LC-MS phương pháp I, sản phẩm cho thấy đỉnh ở 0,83 phút. với khối lượng 989,9 (M/2+H⁺).

Quy trình điều chế 24g

Thêm 24f (250mg, 0,12mmol) vào dung dịch 24e (172mg, 0,31mmol) trong 3ml DCM, sau đó thêm TEA (0,069mL, 0,50mmol). Cuối cùng, thêm vào EDC (95mg, 0,5mmol). Khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ phòng qua đêm. Cô đặc phản ứng và tinh chế trên cột SiO₂ với 5% MeOH/DCM để tạo ra 230mg 24g (hiệu suất 74%). Theo LC-MS phương pháp I, sản phẩm cho thấy đỉnh 1,30 phút. Với khối lượng 1258,2 (M/2+H⁺).

Quy trình điều chế 24h

Thêm 0,457ml HCl 4N (trong dioxan, 1,83mmol) vào dung dịch 24g (230mg, 0,091mmol) trong 1ml THF. Khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ. Cô đặc phản ứng và tinh chế trên HPLC để tạo ra 50mg 24h (hiệu suất 23%), chất này mất một nhóm axetyl trên đường. Các điều kiện tinh chế HPLC: cột: cột Sunfire 30x100mm 5um; dung môi hữu cơ: ACN w/ TFA 7,5%; dung môi chứa nước: H₂O w/ TFA 7,5%; lưu lượng dòng: 75mL/phút. Gradien: 15-40% H₂O/AcCN; thời gian: 9,5 phút. Bộ dò: ELSD (Evaporative Light Scattering Detector) để dò. Theo LC-MS phương pháp I, sản phẩm cho thấy đỉnh ở 0,95 phút. Với khối lượng là 1187,1 (M/2+ H⁺).

Quy trình điều chế 24i

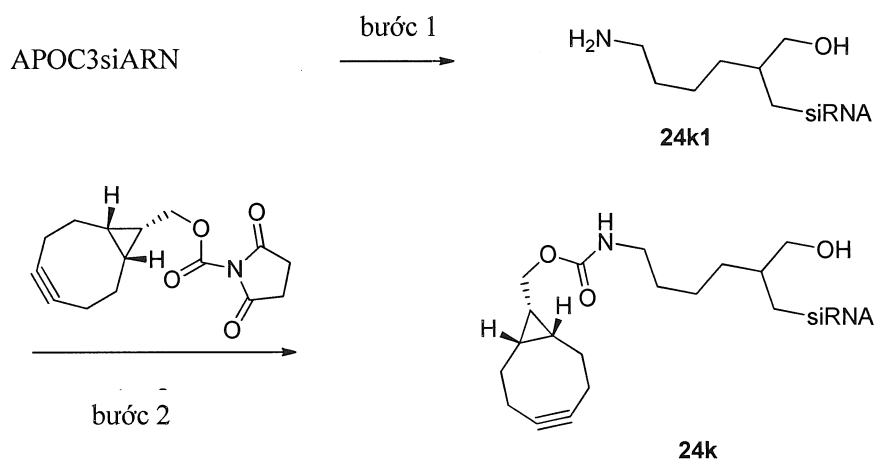
Thêm N-OH succinimit (9,81mg, 0,085mmol) vào dung dịch axit 2,2,13,13-tetrametyltetradecandioic (40mg, 0,127mmol) trong 2ml DCM, sau đó thêm EDC (16,34mg, 0,085mmol). Khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ phòng qua đêm. Cô đặc phản ứng và tinh chế trên HPLC để tạo ra 20mg 24i (hiệu suất 38%). Các điều kiện tinh chế HPLC: cột: cột

Sunfire 30x100mm 5um; dung môi hữu cơ: ACN w / TFA 7,5%; dung môi chứa nước: H₂O w/ TFA 7,5%; lưu lượng dòng: 75mL/phút. Gradien: 45-70% H₂O/AcCN; thời gian: 9,5 phút. Bộ dò: ELSD (Evaporative Light Scattering Detector) để dò. Theo LC-MS phương pháp I, sản phẩm cho thấy đỉnh ở 1,55 phút. Với khối lượng 434,3 (M+Na⁺).

Quy trình điều chế 24j

Thêm TEA (4,5μl, 32μmol) vào dung dịch 24h (20mg, 8,05μmol) trong 0,5ml DCM, sau đó thêm 24i (6,62mg, 16μmol) và DMAP (3,93mg, 32μmol). Khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ phòng qua đêm. Tiếp đó thêm 0,5ml MeNH₂ 2N/MeOH để khử bảo vệ. Khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ phòng qua đêm nữa. Cô đặc phản ứng và thêm axeton để kết tủa sản phẩm và loại bỏ các chất phản ứng dư và các chất lỏng để tạo ra 12mg 24j (hiệu suất 64%). Theo LC-MS phương pháp I, sản phẩm cho thấy đỉnh ở 0,69 phút. Với khối lượng là 1166,9 (M/2+ H⁺).

Quy trình điều chế 24K



Bước 1:

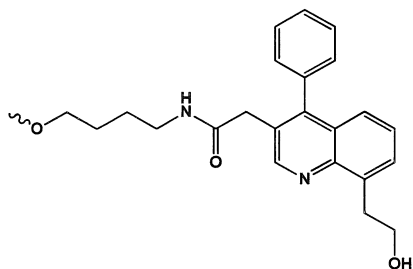
APOCIII siARN [siARN kết hợp với gen APOCIII (cũng được gọi là APOC3 hoặc Apoc 3), được tổng hợp sử dụng các phương pháp thông thường đã biết trong lĩnh vực này]:

Gắn mỗi các oligonucleotit

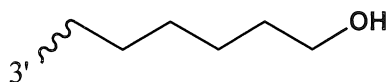
Quy trình chung:

Mỗi phần kết tủa (pellet) oligonucleotit được quay nhanh xuống một máy ly tâm và hòa tan trong chất đệm kép (Kali Axetat 100mM; HEPES 30mM, pH = 7,5) ở nồng độ cao (1-10 OD260/100mL chất đệm). Gia nhiệt (lên đến 94°C) và có thể tạo xoáy để tạo huyền phù lại dễ dàng. Tiếp đó, sợi có nghĩa và vô nghĩa cùng được thêm vào với lượng cân bằng. Tiếp đó, gia nhiệt các oligonucleotit đã trộn lẫn đến 94°C và làm lạnh xuống dần dần. Đối với các trình tự chứa cấu trúc bậc hai quan trọng, có thể áp dụng một bước làm lạnh dần dần/gắn mỗi nửa. Việc này dễ dàng thực hiện bằng cách đặt dung dịch oligo trong bình nước hoặc khối nhiệt rồi rút/tắt máy. Sản phẩm tạo thành sẽ ở dạng ổn định, sợi kép và có thể được bảo quản ở 4°C hoặc đóng đá.

Sợi đối nghĩa APOCIII siARN bao gồm trình tự APOCIII, trong đó đầu 3' của sợi này chấm dứt ở phosphat và còn bao gồm, trong trình tự 5' đến 3', ribitol, phosphat khác, và mũ đầu 3' X058, mũ đầu 3' không phải nucleotit có công thức:



Sợi có nghĩa bao gồm trình tự APOCIII bổ sung cho sợi đối nghĩa, trong đó đầu 3' của sợi này chấm dứt ở phosphat và còn bao gồm, trong trình tự 5' đến 3', ribitol, phosphat khác, và mũ đầu 3' C6OH, mũ đầu 3' không phải nucleotit có công thức:



Cho APOCIII siARN phản ứng với alkylamino-CPG chuỗi dài 2-dimethoxytrityloxymethyl-6-florenylmethoxycarbonylamino-hexan-1-succinoyl (Số Nghiên cứu Glen 20-2957) tạo ra sản phẩm 24k1.

Bước 2

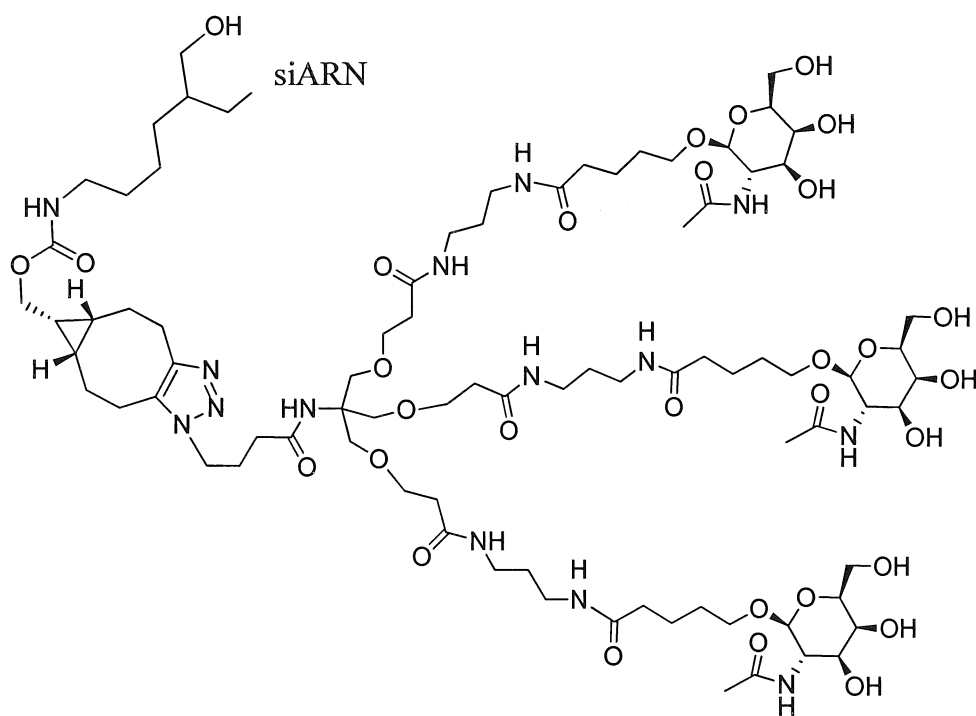
Trộn APOCIII siARN (24k1: 401 μ L, 11,2mM trong H₂O, 4,49 μ mol) với 401 μ L DMF để thu được dung dịch sạch. Tiếp đó thêm TEA (180 μ L, 0,25M trong DMF, 45 μ mol), sau đó thêm BCN-NHS ((1R,8S,9s)-bicyclo[6.1.0]non-4-yn-9-ylmethyl N-succinimidyl carbonat) (9,16mg, 31 μ mol). Khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ. Pha loãng hỗn hợp phản ứng bằng H₂O đến 10ml và chiết bằng etylaxetat 3 lần. Tách lớp chứa nước rồi cô đặc đến ~5ml và tinh chế trên cột khử muối PD-10 (GE healthcare).

Quy trình điều chế 24

Thêm 24j (5,8mg, 2,5 μ mol) vào 105 μ L hợp chất 24k (Apoc 3 siARN 9,5mM trong H₂O, 0,993 μ mol). Sau 1 giờ, hỗn hợp phản ứng trở nên có tính nhớt. Do đó, thêm 60 μ L H₂O khác và khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ phòng qua đêm. Pha loãng hỗn hợp phản ứng bằng H₂O và tinh chế trên HPLC để tạo ra 5mg sản phẩm liên hợp 24 (hiệu suất 57%). Các điều kiện tinh chế HPLC: Cột: Xselect Prep phenylhexyl 5 μ m OBD 19x50mm; dung môi hữu cơ: AcCN được biến đổi bằng TEA.HOAc 100mM; dung môi chứa nước: H₂O được biến đổi

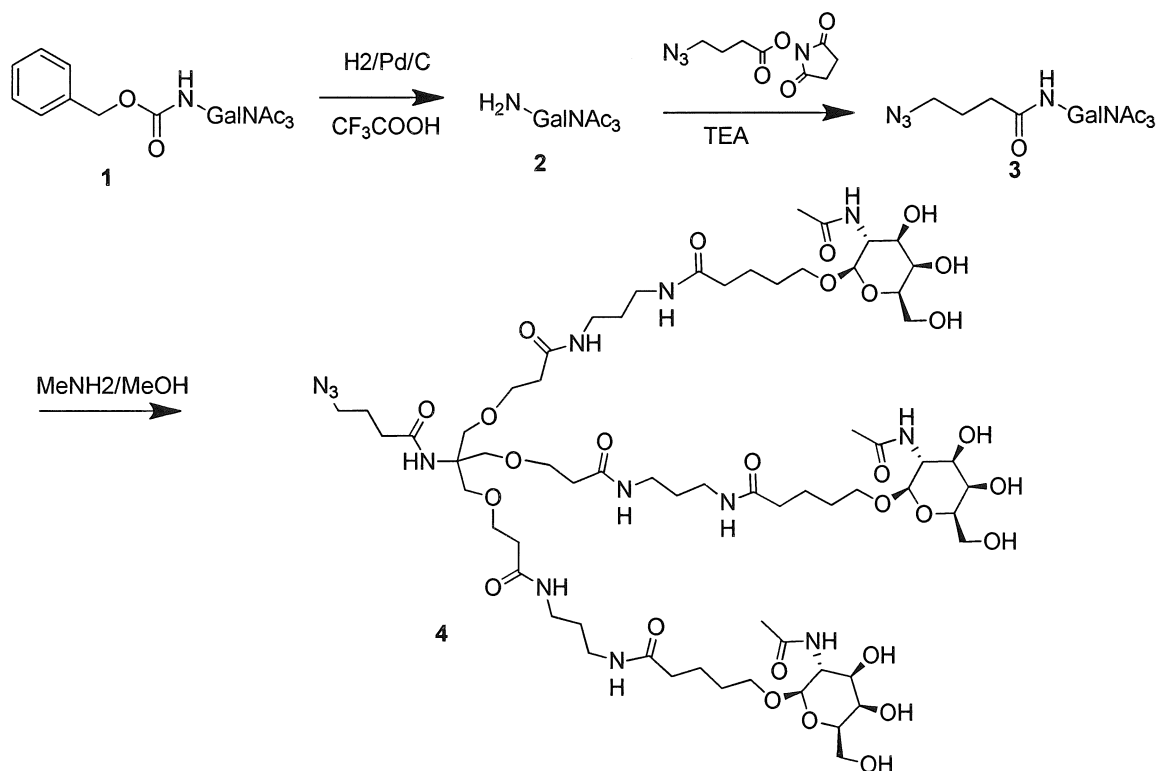
bằng TEA.HOAc 100mM; gradien: 5-50% AcCN/H₂O; Thời gian: 10 phút. Theo LC-MS phương pháp H, sản phẩm cho thấy đỉnh ở 5,96 phút. Với khối lượng mong muốn là 8896 sau khi thực hiện bước đầu tiên.

Ví dụ tham chiếu 3: siARN liên hợp với GalNAc



Ví dụ tham chiếu 3 được điều chế theo quy trình của ví dụ 24 (thay thế 24j bằng GalNac3-N3 (dưới đây)).

Quy trình điều chế GalNac3-N3



Quy trình điều chế chất trung gian 2

Hòa tan hợp chất 1 (2,06g, 1,07mmol) trong 20ml etanol, thêm TFA (82ul, 1,07mmol), sau đó thêm 10% Pd/C (0,114g, 0,11mmol). Xử lý phản ứng trong điều kiện bình cầu H_2 trong 6 giờ. Lọc phản ứng, rửa với etanol rồi cô đặc để thu được chất rắn màu trắng, sử dụng trực tiếp chất này cho bước tiếp theo. Theo LC-MS phương pháp I, sản phẩm cho thấy đỉnh ở 0,81 phút. Với khối lượng là 898,5 ($\text{M}/2+\text{H}^+$).

Quy trình điều chế chất trung gian 3

Hòa tan hợp chất 2 (4,848 g, 0,479mmol) trong 10ml DMF khan, thêm 2,5-dioxopyrrolidin-1-yl-4 azidobutanoat (0,325g, 1,436mmol), sau đó thêm DIPEA (0,418ml, 2,394mmol). Các phản ứng diễn ra qua đêm ở nhiệt độ phòng. Cô đặc phản ứng mà không gia nhiệt, trực tiếp

tải lên trên cột SiO₂ cân bằng trước và tinh chế bằng gradien bước 0-20% metanol/DCM để tạo ra 2,383g hợp chất 3 (hiệu suất 49,25%).

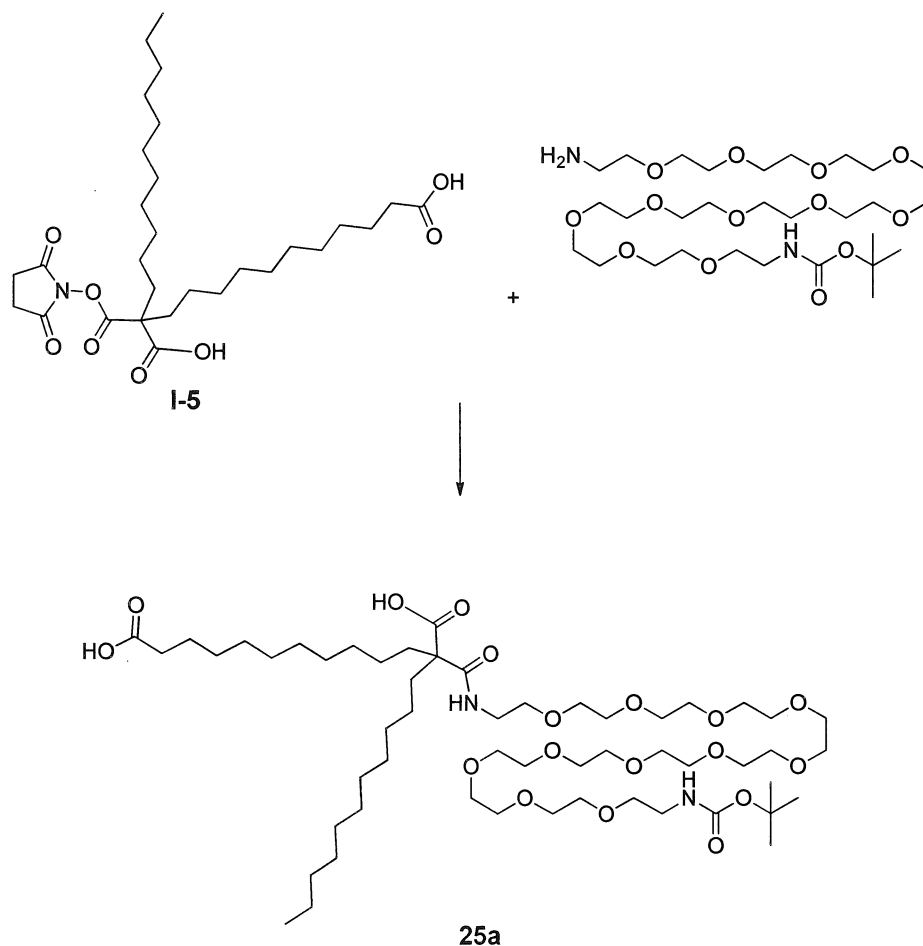
Theo LC-MS phương pháp I, sản phẩm cho thấy đỉnh ở 1,27 phút. Với khối lượng là 953,7 (M/2+H⁺).

Quy trình điều chế chất trung gian 4

Trộn hợp chất 3 (1,33g, 0,70mmol) với MeNH₂ (17,45ml, 2,0M trong metanol, 34,9mmol). Khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ phòng trong 2 giờ. LC-MS chỉ cho thấy đỉnh sản phẩm. Cô đặc phản ứng. Tiếp đó hòa tan lại chất rắn vào etanol và kết tủa với axeton để tạo ra 1,0g hợp chất 4 (hiệu suất 94%). Theo LC-MS phương pháp I, sản phẩm cho thấy đỉnh ở 0,53 phút. Với khối lượng là 764,5 (M/2+H⁺).

Ví dụ 25: Sự liên hợp của chất mang protein (CRM197) và axit béo

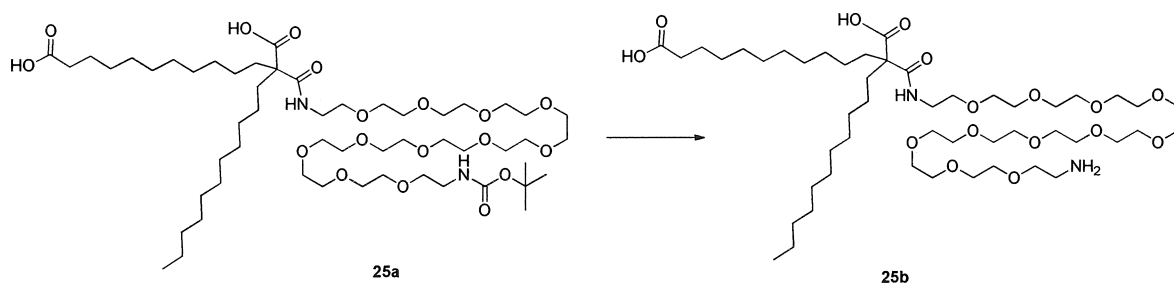
Bước 1: Axit 2-((2,2-dimetyl-4-oxo-3,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38-dodecaoxa-5-azatetracontan-40-yl)carbamoyl)-2-undexyltridecandioic (25a).



Hòa tan t-boc-N-amido-dPEG®₁₁-amin (100mg, 0,155mmol, Quanta Biodesign) và chất trung gian 5 (80mg, 0,148mmol) trong THF (3mL) và khuấy ở nhiệt độ phòng trong điều kiện nitơ. Sau 30 phút, thêm DIPEA (0,05mL, 0,286mmol) và khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ phòng qua đêm. Quan sát quá trình chuyển hóa hoàn toàn bằng LCMS (dung môi rửa giải axit A: Nước + Axit trifloaxetic 0,05%, dung môi rửa giải B: ACN, cột Sunfire C18 3,5µm 3,0x30mm - 40°C, gradien 5-95% 2 phút, thời gian lưu 1,92 phút). Cô đặc hỗn hợp phản ứng trong điều kiện áp suất giảm, sau đó hòa tan trong khoảng 1,5mL axetonitril. Tinh chế trên HPLC kích hoạt MS (cột Sunfire 30x50mm 5µm ACN/H₂O w/ TFA 0,1% 75mL/phút 1,5ml bơm, gradien 65-95% ACN 3,5 phút, thời gian lưu 3,23 phút) và gộp các phân đoạn lại rồi đông khô để cho ra 85mg sản phẩm sạch ở hiệu suất 54%. Dầu sạch. LCMS: Phương pháp D Rt= 1,18 phút, M+H 1070,1; ¹H NMR (400MHz, AXETONITRIL-d₃) δ ppm 0,82 - 1,03 (m, 1H) 1,11 - 1,37 (m, 10 H) 1,37 - 1,51 (m, 2H) 1,51 - 1,64 (m, 1H) 1,69

- 1,82 (m, 1H) 1,90 - 2,04 (m, 66 H) 2,05 - 2,21 (m, 8 H) 2,21 - 2,42 (m, 1H) 3,17 - 3,28 (m, 1H) 3,40 - 3,68 (m, 13H).

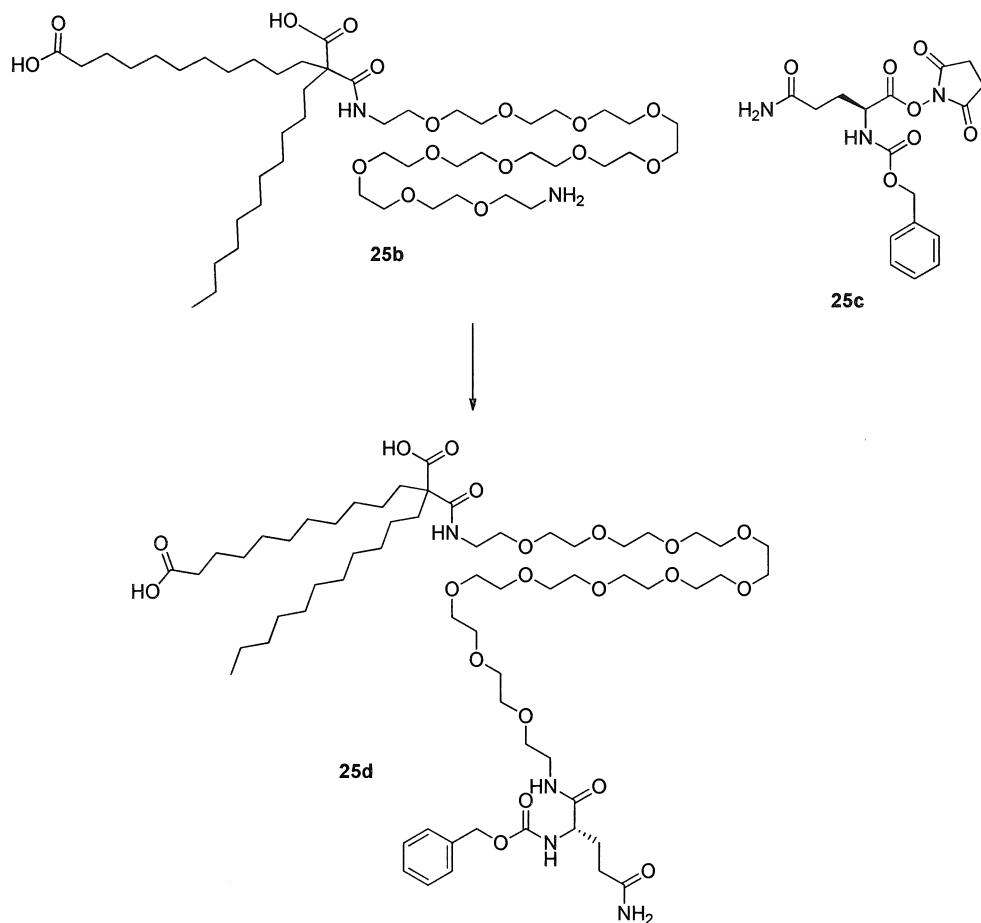
Bước 2: Axit 2-(((35-amino-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33-undecaoxapentatriacontyl)carbamoyl)-2-undexyltridecandioic (25b).



Hòa tan 25a (5mg, 4,68 μ mol) trong DCM (thể tích: 2mL), tiếp đó thêm axit trifloaxetic (25 μ L, 0,324mmol). Khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ phòng trong điều kiện khí nitơ trong khoảng 2 giờ. Quan sát sự chuyển hóa hoàn toàn bằng LCMS (Dung môi rửa giải axit A: nước + axit trifloaxetic 0,05%, dung môi rửa giải B: ACN, cột Sunfire C18 3,5 μ m 3,0x30mm - 40°C, gradien 5-95% 2 phút, thời gian lưu 1,45 phút). Cô đặc hỗn hợp phản ứng trong điều kiện áp suất giảm, sau đó rửa với DCM rồi cô đặc lại 3 lần. Hòa tan trong hỗn hợp của axetonitril và DMSO. Tinh chế trên HPLC kích hoạt MS (cột Sunfire 30x50mm 5 μ m ACN/H₂O w/ TFA 0,1% 75mL/phút 1,5ml bơm, gradien 45-70% ACN 3,5 phút, thời gian lưu 2,50 phút) và gộp các phân đoạn lại rồi đông khô để cho ra 2,5mg sản phẩm sạch ở hiệu suất 55%. Dầu sạch.

Phương pháp A Rt = 1,45 phút, M+H 969,9; ¹H NMR (400MHz, AXETONITRIL-d₃) δ ppm 0,62 - 0,91 (m, 2H) 0,91 - 1,10 (m, 3H) 1,10 - 1,31 (m, 18 H) 1,46 (quin, J=7,21 Hz, 2H) 1,59 - 1,89 (m, 35H) 1,94 - 2,09 (m, 1H) 2,16 (t, J=7,40Hz, 2H) 2,97 - 3,11 (m, 1H) 3,24 - 3,37 (m, 1H) 3,37 - 3,61 (m, 28 H) 3,61 - 3,89 (m, 2H) 7,85 (br. s., 1H).

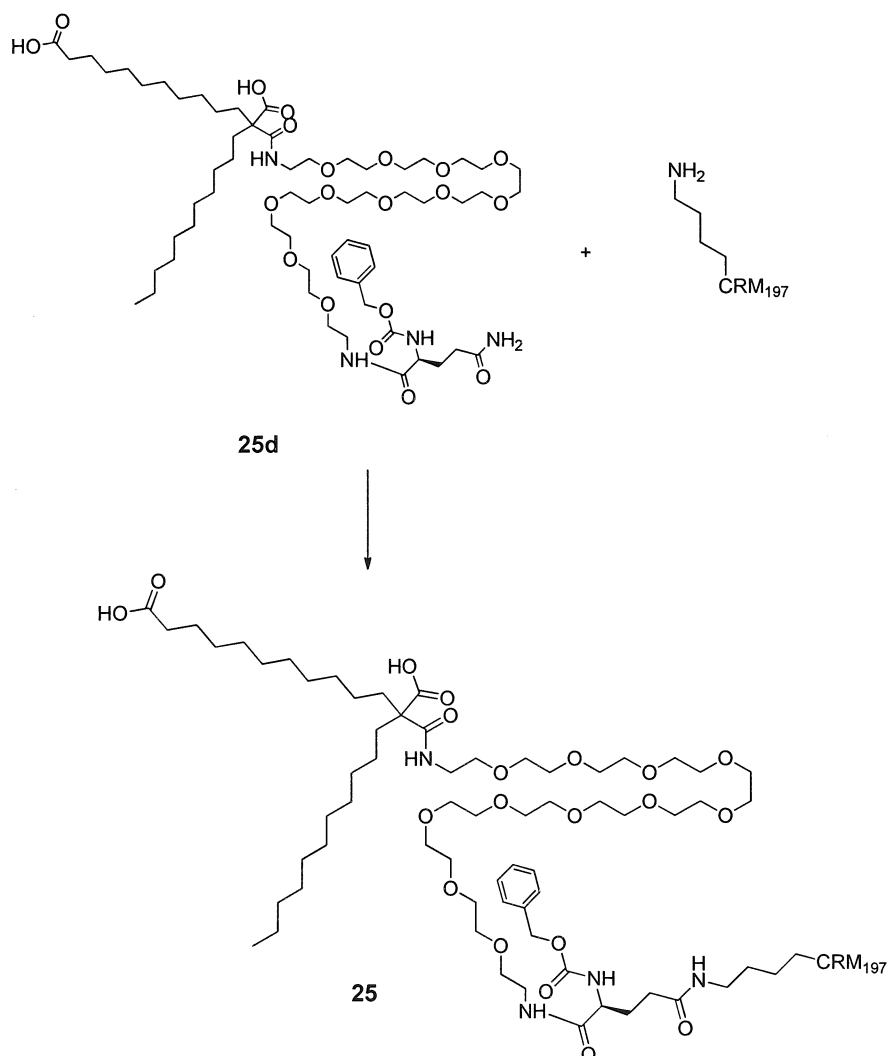
Bước 3: Axit 2-(((S)-5-(3-amino-3-oxopropyl)-3,6-dioxo-1-phenyl-2,10,13,16,19,22,25,28,31,34,37,40-dodecaoxa-4,7-diazadotetracontan-42-yl)carbamoyl)-2-undexyltridecandioic (25d).



Thêm dung dịch 25b (20mg, 0,018mmol) trong THF (thể tích: 2mL) vào Z-L-Gln-Osu 25c (Santa Cruz Biotechnology, CAS 34078-85-8, 11mg, 0,029mmol), sau đó thêm DIPEA (75μL, 0,429mmol). Khuấy ở nhiệt độ phòng trong điều kiện khí nitơ qua cuối tuần. Quan sát sự chuyển hóa hoàn toàn bằng LCMS (dung môi rửa giải axit A: nước + axit trifloaxetic 0,05%, dung môi rửa giải B: ACN, cột Sunfire C18 3,5μm 3,0x30mm - 40°C, gradien 5-95% 2 phút, thời gian lưu 1,77 phút). Cô đặc hỗn hợp phản ứng trong điều kiện áp suất giảm, sau đó hòa tan trong axetonitril. Tinh chế trên HPLC kích hoạt MS (cột Sunfire 30x50mm 5μm ACN/H₂O w/ TFA 0,1% 75mL/phút bơm 1,5ml, gradien 55-80% ACN 3,5 phút, thời gian lưu 2,70 phút) và gộp các phân đoạn lại rồi đông khô để cho ra 10,5mg sản phẩm sạch ở hiệu suất 46% dưới dạng dầu không màu. Phương pháp C Rt = 1,60 phút, M+H 1232,4; ¹H NMR (400MHz, AXETONITRIL-*d*₃) δ ppm 0,67 - 0,93 (m, 2H) 0,93 - 1,10 (m, 2H) 1,10 - 1,32 (m, 15H) 1,45 (quin, J=7,24 Hz, 1H) 1,59 - 1,69 (m, 1H) 1,75 - 1,93 (m, 30 H) 1,94 - 2,21 (m, 20 H) 3,23 (quin, J=5,26 Hz, 1H) 3,28 - 3,51 (m, 23H) 3,95 (td, J=7,73, 5,44 Hz,

¹H) 4,92 - 5,22 (m, 1H) 5,78 (br. s., 1H) 6,13 – 6,42 (m, 1H) 6,88 (br. s., 1H) 7,20 - 7,36 (m, 2H) 7,42 (t, J=5,07 Hz, 1H).

Bước 4: Đánh dấu CRM197 với axit béo qua trung gian mTGaza (ví dụ 25):



Thêm CRM197 (33mg/mL, 1,515 μ L, 0,00086 μ mol) vào dung dịch 25d trong chất đệm tris 100mM có pH = 8 (8mg/mL, 203 μ L, 1,316 μ mol) sau đó thêm dung dịch enzym transglutaminaza (Ajinomoto) trong PBS (50mg/mL, 0,455 μ L, 0,00060 μ mol). Khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ phòng trong 16 giờ. Trao đổi hỗn hợp phản ứng vào chất đệm tris

100mM có pH = 8 sử dụng thiết bị lọc ly tâm Amicon MWCO 10kDa bằng cách pha loãng và cô đặc phản ứng 5 lần đến thể tích 100 μ L. Phân tích LCMS cho thấy sự chuyển hóa thành các sản phẩm +1, +2, +3 và +4. LCMS QT2; Protein_35-70 kDa_3 phút: R_t = 1,45 phút; MS [M+25d]: quan sát được: 59625, tính toán được: 59624; MS [M+(2 x 25d)]: quan sát được: 60839, tính toán được: 60838; MS [M+(3 x 25d)]: quan sát được: 62054, tính toán được: 62052; MS [M+(4 x 25d)]: quan sát được: 63270, tính toán được: 63266.

Trình tự CRM197:

(SEQ ID NO: 20)

GADDVVDSSK SFVMENFSSY HGTKPGYVDS IQKGIQKPKS GTQGNYYDDDW
 KEFYSTDN KY DAAGYSVDNE NPLSGKAGGV VKVTYPGLTK VLALKVDNAE
 TIKKELGLSL TEPLMEQVGT EEFIKRFGDG ASRVVLSLPF AEGSSSV EYI
 NNWEQAKALS VELEINFETR GKRQGDAMY EYMAQACAGNR VRRSVGSSLS
 CINLDWDVIR DKTKTKIESL KEHGPIKNKM SESPNTVSE EKAKQYLEEF
 HQTALEHPEL SELKTVTG TN PVFAGANYAA WAVNVAQVID SETADNLEKT
 TAALSILPGI GSVMGIADGA VHHNTEEIVA QSIALSSLMV AQAIPLVGEL
 VDIGFAAYNF VESIINLFQV VHNSYNRPAY SPGHKTQPFL HDGYAVSWNT
 VEDSIIRTF QGESGHDIKI TAENTPLPIA GVLLPTIPGK LDVNKSKTHI
 SVNGRKIRMR CRAIDGDVTF CRPKSPVYVG NGVHANLHVA FHRSSSEKIH

Mức độ đánh dấu	Tính toán được	Quan sát được	%	R_t (phút)
CRM197	58410	n/a	0	n/a
CRM197 +1 25d	59624	59625	14	1,45
CRM197 +2 25d	60838	60839	23	1,45

CRM197 +3 25d	62052	62054	35	1,45
CRM197 +4 25d	63266	63270	28	1,45

Tóm tắt thí nghiệm lập bản đồ peptit:

Lập bản đồ peptit bằng cách phân hủy: khử 5µg các mẫu CRM197 được biến đổi và CRM197 đối chứng dương bằng DTT 20mM và phân hủy bằng 1/30 (trọng lượng/trọng lượng) enzym/protein ở 26°C qua đêm bằng trypsin. Phần phân ước protein bị phân hủy bằng trypsin được phân hủy tiếp bằng enzym GluC ở tỷ lệ 1/20 enzym/protein trong 4 giờ ở 26°C; chú ý tất cả các enzym được mua từ Roche Diagnostics (GmbH, Đức).

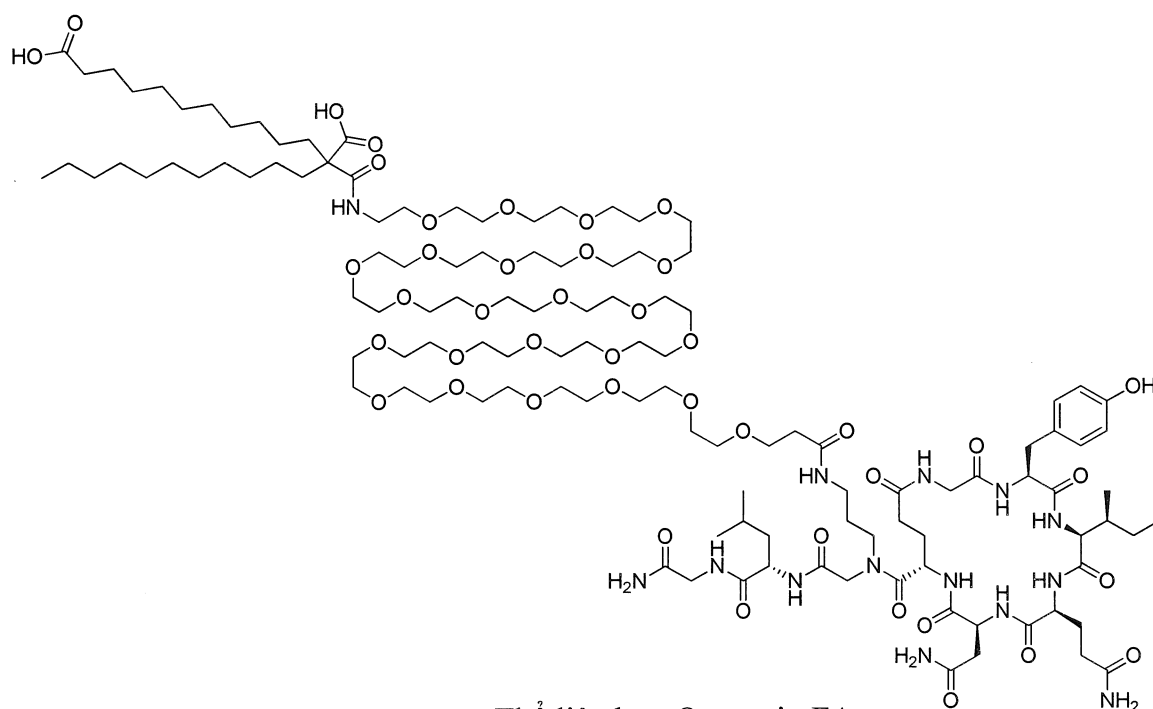
Phân tích LC-MS/MS pha đảo: Phân tích peptit bị phân hủy tạo thành bằng phương pháp sắc ký lỏng kết hợp phun điện tử và khối phổ liên tiếp (LC-ESI MS/MS) trên máy Thermo LTQ Orbitrap Discovery (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA) kết hợp với máy Agilent CapLC (Santa Clara, CA). ~10-15 pmol đối chứng CRM được tải và CRM197 được biến đổi phân hủy trên cột ở 40°C (Waters Acuity BEH C18, 1,7µm, cột 1x100mm). Gradient tổng vận hành là 80 phút ở 10µL/phút chỉ ra 4% B ở 0-1 phút, tăng đến 7% B ở 1,1 phút, 45% B ở 55 phút, sau đó 95% B ở 63 phút, sau đó rửa và cân bằng cột. Các thông số của khối phổ kế bao gồm kết quả quét đầy đủ sử dụng máy phân tích FTMS ở độ phân giải 30000 từ m/z 300-2000 cho 30 ms. Tiến hành sự phân ly gây ra do va chạm MS/MS trên bảy ion có cường độ mạnh nhất (ngoại trừ các ion 1+) trong máy phân tích bắt ion, kích hoạt ở 500 lần đếm (đối với tất cả kết quả) ngưỡng cường độ tín hiệu trong 30 ms.

Phân tích dữ liệu và tra cứu cơ sở dữ liệu: tất cả khối phổ được xử lý trong Qual Browser V 2.0.7 (Thermo Scientific). Các tệp chung Mascot (mgf) được tạo ra bằng MS DeconTools (R.D. Smith Lab, PPNL) và được tra cứu sử dụng cơ sở dữ liệu Mascot V2.3.01 (Matrix Science Inc., Boston, MA) đối với trình tự protein được đề xuất bên cạnh các dữ liệu tùy chỉnh nội bộ và cơ sở dữ liệu SwissProt database (V57 với 513.877 trình tự) đối với các protein bị lây nhiễm. Các thông số tra cứu bao gồm: enzym: semitrypsin hoặc trypsin/Glu-C, cho phép lên đến ba phân cắt sai hỏng; các biến đổi khác nhau: khối lượng dự kiến được bổ sung của các phân tử nhỏ (362,147787 Da và 463,206698 Da) vào cơ sở dữ

liệu được gọi là “CRM Tgase +alkyn 362Da mod (CKR), CRM Tgase +alkyn 362Da mod (đầu N), CRM Tgase+azit 463Da mod (CKR), CRM Tgase+azit 463Da mod (N-term)”; sự dung nạp peptit: ± 20 ppm; sự dung nạp MS/MS: $\pm 0,6$ Da. Thông tin về trình tự và đánh giá sự biến đổi phân tử nhỏ được thực hiện trên các điểm số ion với độ tin cậy $>95\%$. Các ion peptit có điểm số cao tiếp đó được chọn để phân tích MS/MS thủ công sử dụng Qual Browser.

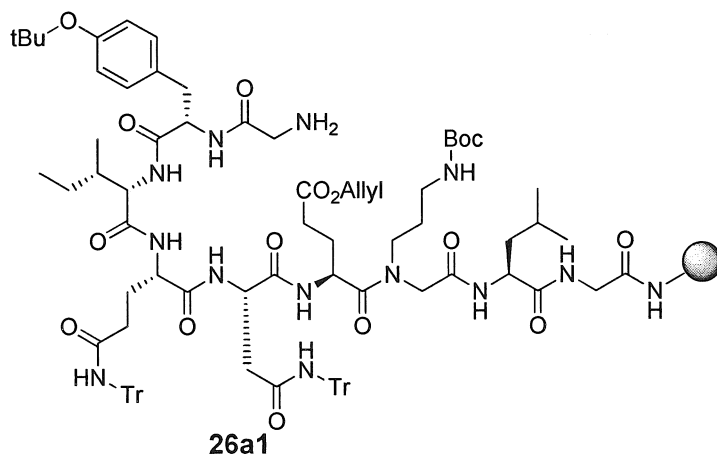
Các vị trí mà ở đó sự biến đổi lysin xảy ra có thể được xác định theo thí nghiệm lập bản đồ ở trên. Theo sự liên hợp tương tự được mô tả trên CRM197 trong đơn Mỹ số: US 2015/0017192 nộp ngày 11 tháng 07 năm 2014 (mã số đại diện PAT055641-US-NP), chúng ta có thể suy luận rằng sự biến đổi đã xảy ra trên Lys37 hoặc Lys39, Lys 33 và Lys440.

Ví dụ 26A: Sự liên hợp của chất dẫn xuất oxytocin và axit béo:



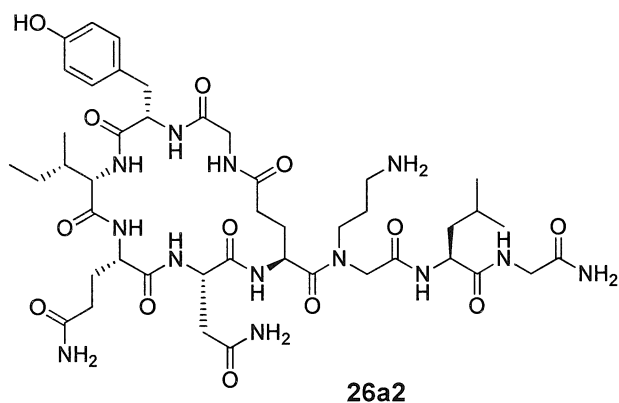
Thẻ liên hợp Oxytocin FA

Bước 1: Quy trình điều chế oxytocin được bảo vệ trên nhựa



Dạng được bảo vệ của oxytocin trên nhựa (26a1) được tổng hợp tương tự theo ví dụ 21B bước 1.

Bước 2: Khử bảo vệ allyl, đóng vòng, phân cắt từ nhựa

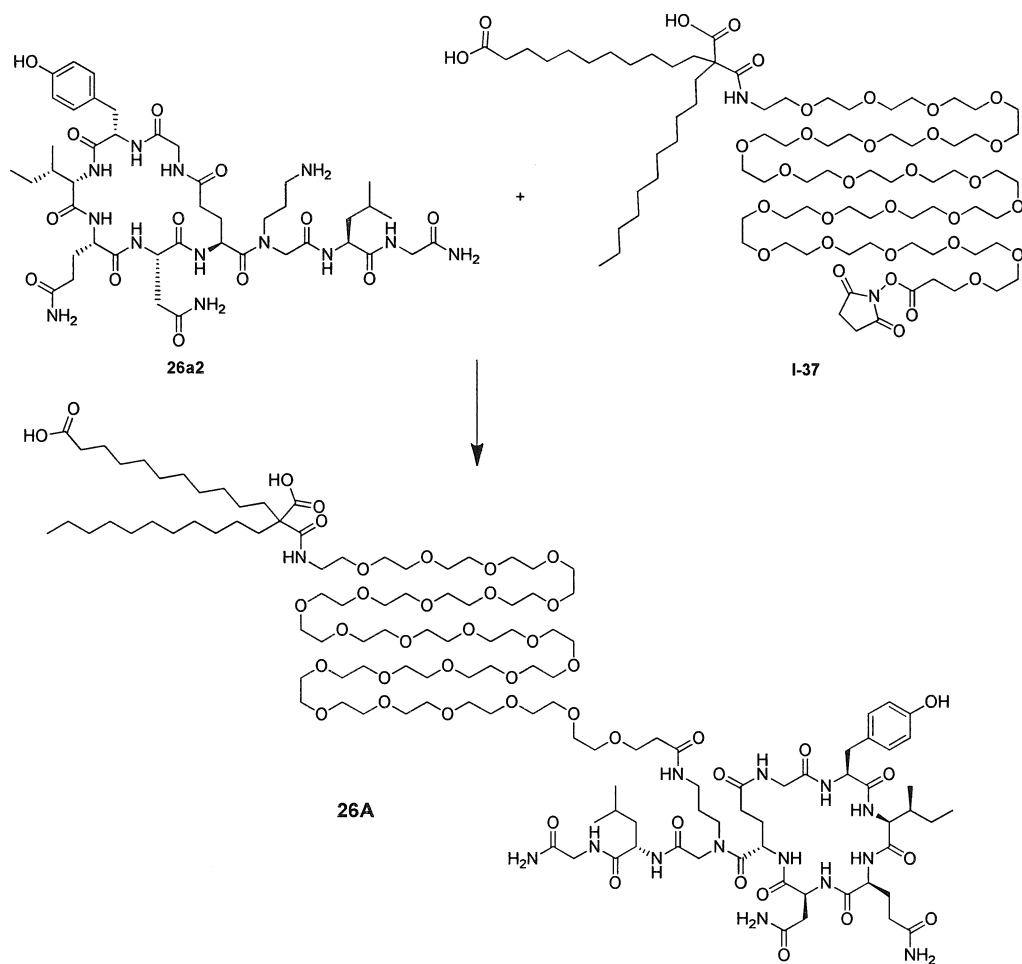


Hấp thụ chất trung gian được bảo vệ (26a1) (0,2mmol) trong 6ml DCM bao gồm phenylsilan (1mmol) và $\text{Pd(PPh}_3)_4$ (0,02mmol). Khuấy nhựa trong dung dịch này trong 15 phút rồi lọc. Lặp lại quy trình này hai lần với phenylsilan/ $\text{Pd(PPh}_3)_4$ trong dung dịch DCM. Sau lần khuấy cuối, lọc nhựa này và rửa với NMP (3 lần), DCM (3 lần), DIEA 0,5% /DCM (3 lần) và cuối cùng là NMP (3 lần). Sấy khô nhựa đã rửa tạo thành trong điều kiện chân không. Hấp thụ một phần nhựa đã sấy khô (~0,1mmol) trong dung dịch PyBOP (0,2mmol), HOBT

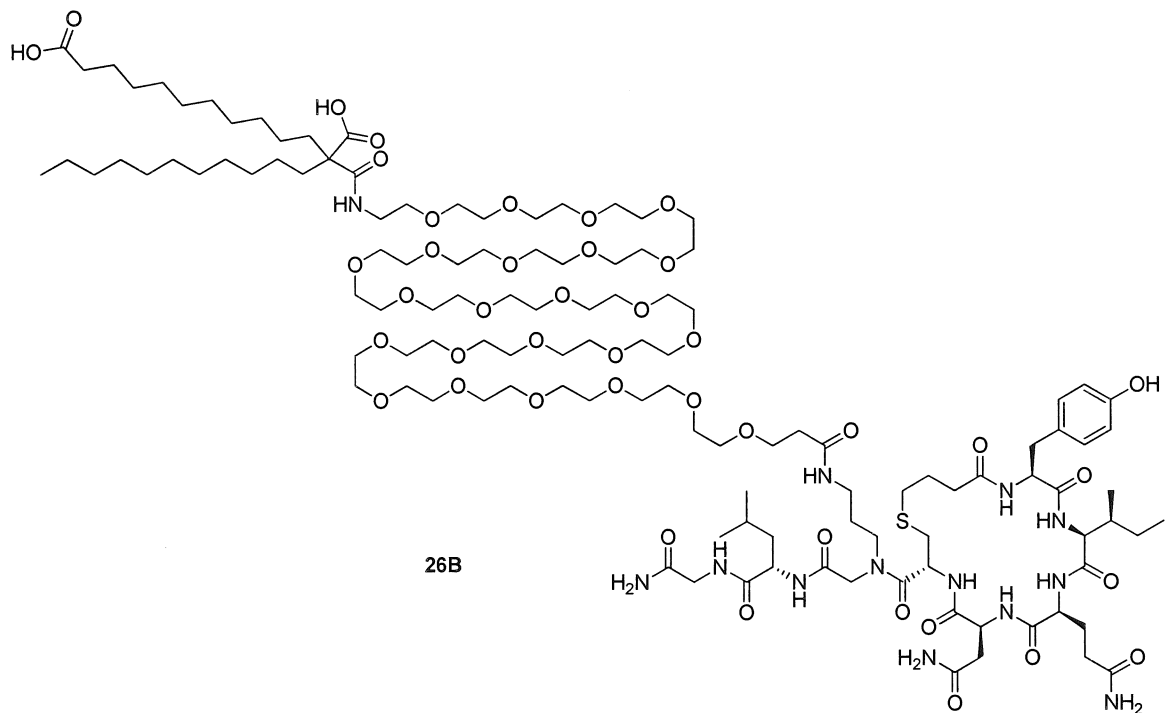
(0,4mmol), và DIEA (0,5mmol) trong 6mL NMP. Khuấy hỗn hợp phản ứng này ở nhiệt độ phòng trong 20 giờ. Lọc nhựa này và rửa với EtOAc (3 lần) và DCM (3 lần). Hấp thụ nhựa này trong 4mL 95/2,5/2,5 TFA/TIPS/H₂O và khuấy trong 2 giờ. Tiếp đó, lọc dung dịch TFA/TIPS/H₂O vào Et₂O lạnh (<-20°C) để kết tủa peptit bị phân cắt. Sau khi ly tâm, lắng gạn Et₂O và rửa phần cặn màu trắng nhạt với Et₂O và ly tâm lại. Sấy khô chất rắn màu trắng nhạt tạo thành trong điều kiện N₂ qua đêm. Tinh chế chất rắn này trên HPLC điều chế kích hoạt khối lượng (hệ thống Waters Autopure HPLC; cột Sunfire C18 30x50mm 5um; pha di động: gradien 7,5-20% ACN trong nước, 5 phút, 75mL/phút, được biến đổi với TFA 0,1%). Kết hợp các phân đoạn tương ứng với chất trung gian (26a2), đóng đá, rồi đông khô thành chất rắn màu trắng (13,5mg, 14%). Phương pháp G HRMS - Phân tích: Rt = 0,90 phút, MS m/z 988,5225 [M+H]⁺.

Bước 3: Sự liên hợp với axit béo

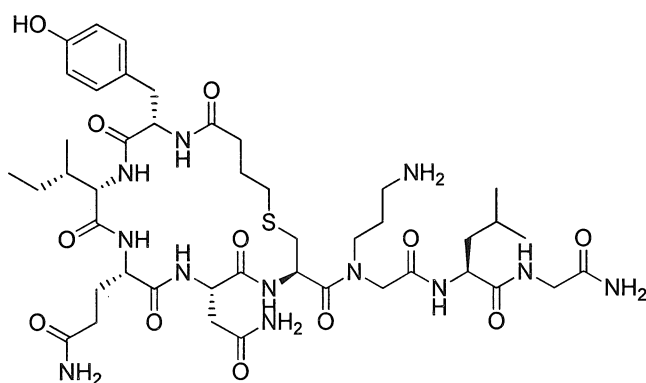
Thêm dung dịch I-37 (8,39μmol) trong 0,5ml chất đệm phosphat có pH = 6,40 vào dung dịch chất trung gian (26a2) (2,82μmol) trong 0,5mL chất đệm phosphat có pH = 6,40. Khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ phòng trong 18 giờ. Lọc hỗn hợp phản ứng qua 4,5μm thủy tinh frit và tinh chế trên HPLC điều chế kích hoạt khối lượng (hệ thống Waters Autopure HPLC; cột Sunfire C18 30x50mm 5um; pha di động: gradien 45-70% ACN trong nước, 5 phút, 75mL/phút, được biến đổi với TFA 0,1%). Kết hợp các phân đoạn tương ứng với sản phẩm liên hợp Oxytoxin-FA (26A), đông lạnh, rồi đông khô thành chất rắn màu trắng (1,71mg, 24%). LCMS-Phân tích phương pháp G: Rt = 3,07 phút, MS m/z 2540,5 [M+H]⁺.



Ví dụ 26B: Sự liên hợp của chất dẫn xuất oxytocin và axit béo:



Có thể điều chế ví dụ trên (26B) theo bước 3 của ví dụ 26A được mô tả bằng phản ứng: SEQ ID NO: 33, *Butyrat-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys*-Gly(N-CH₂CH₂CH₂NH₂)-Leu-Gly-NH₂ * = liên kết sulfua (26b1):



(26b1) với chất trung gian I-37.

Điều chế peptit vòng (26b1) bằng cách áp dụng quy trình của ví dụ 41 đã bộc lộ trong Wisniewski et al, J. Med. Chem. (2014), 57 5306-5317 kết hợp với tài liệu này.

Tổng hợp peptit một cách thủ công trên 1mmol nhựa Fmoc-Rink Amit AMS qua hóa chất Fmoc. Các nhóm bảo vệ được sử dụng cho các axit amin là: nhóm t-butyl cho Tyr, nhóm Trt

cho Gln và Asn. Hai axit amin không thông dụng, Fmoc-Cys(CH₂CH₂CH₂CO₂Allyl)-OH và Fmoc-[N α -CH₂CH₂CH₂NH(Boc)]Gly-OH, được sử dụng. Chuỗi peptit được gắn trên nhựa bằng cách loại bỏ nhiều lần nhóm bảo vệ Fmoc và liên kết axit amin được bảo vệ (3eq) trong DMF. Sử dụng HBTU và HOBT (3eq: 3eq) làm chất phản ứng liên kết; và sử dụng N-methylmorpholin (NMM, 6eq) làm bazơ. Sử dụng piperidin 20% trong DMF (3 lần thể tích nhựa) làm chất phản ứng khử Fmoc. Rửa nhựa bằng DMF (3 lần thể tích nhựa) sau mỗi lần liên kết và khử Fmoc; thực hiện thử nghiệm Ninhydrin sau mỗi lần liên kết để kiểm tra hiệu quả liên kết.

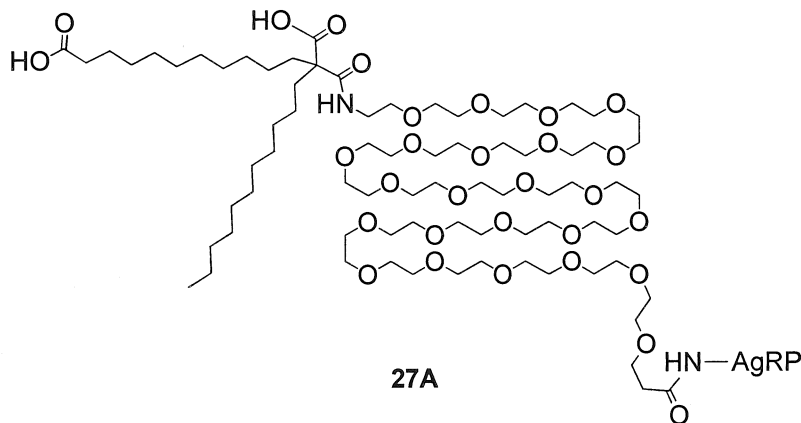
Sau khi loại bỏ nhóm bảo vệ Fmoc cuối cùng, rửa nhựa này với etyl ete và sấy khô trong điều kiện chân không. Thực hiện loại bỏ chọn lọc trên nhựa nhóm bảo vệ allyl este bằng Pd(PPh₃)₄/5,5-dimethyl-1,3-cyclohex và ion (1eq/10eq) trong DCM/THF (1/1, 10 lần thể tích nhựa) trong 3 giờ. Rửa nhựa này với DMF (3x) sau đó là natri diethyl dithiocarbamat 0,5% trong DMF (5x). Cuối cùng, thực hiện đóng vòng trên nhựa bằng HCTU/NMM (3eq/6eq) trong DMF. Rửa nhựa này và sấy khô trong điều kiện chân không để tạo ra 3,2gam nhựa peptit, xử lý nhựa này bằng 32ml TFA/TIS/DOT/H₂O(92,5/2,5/2,5/2,5, thể tích/thể tích) trong 3 giờ ở nhiệt độ phòng để loại bỏ các nhóm bảo vệ các chuỗi bên và phân cắt peptit khỏi nhựa. Kết tủa peptit thô từ ete lạnh sau đó thu lại bằng cách lọc và sấy khô trong điều kiện chân không cao. Sản lượng: 1,15g (116%).

Tất cả nguyên liệu peptit thô được tinh chế trên cột C18 2-inch với chất đệm TFA (chất đệm A, TFA 0,1% trong nước; chất đệm B, axetonitril). Đông khô các phân đoạn đã gộp có độ tinh khiết >95% để làm khô. Thu được 84mg sản phẩm peptit (muối TFA). MS: 991,6 [M+H]⁺, HPLC thời gian lưu 9,49 phút (phương pháp: lưu lượng dòng 1,2 mL/phút; chất đệm A: TFA 0,1% trong nước; chất đệm B: TFA 0,1% trong axetonitril; nhiệt độ phòng; cột: Discovery, C18, 4,6mm x 250 mm, 5 micro; gradien (tuyến tính) 15%-35% chất đệm B trong 20 phút; thể tích bơm 0,02mL)

Ví dụ 27: Sản phẩm liên hợp protein liên quan đến agouti (AgRP)- axit béo

Sản phẩm liên hợp AgRP(83-132)-FA:

Ví dụ 27A: sản phẩm liên hợp mono axit béo của AgRP (AgRP+1FA) trong đó axit béo được gắn vào đầu N của AgRP qua cầu nối (PEG)



trong đó AgRP(83-132) có trình tự sau:

Ser-Ser-Arg-Arg-Cys-Val-Arg-Leu-His-Glu-Ser-Cys-Leu-Gly-Gln-Gln-Val-Pro-Cys-Cys-Asp-Pro-Cys-Ala-Thr-Cys-Tyr-Cys-Arg-Phe-Phe-Asn-Ala-Phe-Cys-Tyr-Cys-Arg-Lys-Leu-Gly-Thr-Ala-Met-Asn-Pro-Cys-Ser-Arg-Thr (SEQ ID NO: 21); trình tự này bao gồm 5 cầu disulfua ở vị trí các cầu C87&C102, C94&C108, C101&C119, C105&C129, C110&C117.

Ví dụ 27B: Sản phẩm liên hợp di-acid béo của AgRP(83-132) (AgRP+2 FA) trong đó một axit béo được gắn vào đầu N của AgRP (tức là Serin 83) qua cầu nối (PEG) và axit béo còn lại được gắn vào chuỗi bên của Lysin ở vị trí 121 thông qua cầu nối PEG.

Thêm 0,80ml chất đệm axetat có pH=4,43 vào 0,90ml dung dịch AgRP(83-132) 10mg/ml (sẵn có từ R&D Systems™) trong chất đệm xitrat có pH = 4,5 (9mg, 1,585μmol) sau đó thêm 1,30ml của dung dịch I-37 10mg/ml trong H₂O (13mg, 7,79μmol). Khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ phòng trong 16 giờ. HRMS (QT2) cho thấy xuất hiện cả hai AgRP + 1FA, m/z 7226,3 [M+H]⁺ ở 1,89 phút, và AgRP + 2FA, m/z 8778,4 [M+H]⁺ ở 2,41 phút. Lọc phản ứng qua 4,5μm thủy tinh frit, kết hợp với phản ứng thứ hai diễn ra ở trên (0,881μmol AgRP, 2,64μmol I-37), và tinh chế trên HPLC điều chế (hệ thống Waters Autopure HPLC; cột Waters Protein BEH C4, 300Å, 5μm, 10x250mm; pha di động: gradien 20-80% ACN trong nước, 11 phút, 10mL/phút, được biến đổi bằng TFA 0,1%; thời gian phản ứng: 15 phút; sự tập hợp các phân đoạn: UV 210nm). Phân lập các phân đoạn tương ứng với AgRP + 1FA và AgRP + 2FA, đông lạnh, rồi đông khô để cho ra các muối TFA của AgRP + 1FA (27A) và AgRP + 2FA (27B) là các chất rắn màu trắng (3,24mg, AgRP 16% + 1FA; 2,26mg, AgRP 9% + 2FA) LCMS-Analytic Phương pháp G: (AgRP + 1FA) Rt = 1,91 phút, MS m/z 7226,4 [M+H]⁺; (AgRP + 2FA) Rt = 2,43 phút, MS m/z 8778,4 [M+H]⁺.

Thí nghiệm đánh dấu để xác định vị trí gắn axit béo.

Việc đánh dấu ở gốc Ser đầu N được xác nhận bằng cách phân hủy hỗn hợp phản ứng với Asp-N (Promega) theo phương thức của nhà sản xuất. Tất cả các thử nghiệm lập bản đồ peptit đạt được bằng cách sử dụng Thermo Dionex Ultimate 3000 LC liên kết với khối phổ kế Bruker Maxis Impact Q-TOF. Thực hiện quá trình tách trên cột ACQUITY UPLC BEH130 C18 (2,1x150 mm, 1,7μm, Waters) được giữ ở 40°C. Lưu lượng dòng là 0,1mL/phút với FA 0,1% trong nước làm pha di động A và FA 0,1% trong axetonitril làm pha di động B.

Hoàn nguyên dung dịch Asp-N (Promega Part# V162A) trong 20μL nước HPLC/MS (0,1μg/μL). Pha loãng khoảng 10μg mẫu đến thể tích cuối cùng là 25μL trong ure 6M, dithiothreitol 10mM, EDTA 5mM, và Tris_HCl 50mM (pH = 8,0). Sau quá trình khử và alkyl hóa, pha loãng các dung dịch sáu lần với Tris_HCl 50mM (pH = 8,0), tiếp đó thực

hiện quá trình phân giải protein với 1 microgram Asp-N bổ sung. Sự phân hủy xảy ra qua đêm ở 37 độ bách phân. Phân tích LCMS chỉ ra rằng sự phân cắt đã xảy ra ở các vị trí D đầu N của AgRP kiểu đại và AgRP được biến đổi với một lần bổ sung axit béo trên mỗi mảnh như trình bày trong bảng dưới đây.

Trình tự peptit	Vị trí	Khối lượng	RT	m/z dự kiến	m/z quan sát được	Điện tích
SSRRCVRLHESCLGQQVPCC (SEQ ID NO: 22)	A(1-20)	2488,13	8,1	623,04	623,03	4
DPCATCYCRFFNAFCYCRK LGTAMNPCSRT (SEQ ID NO: 23)	A(21-50)	3783,58	10,1	757,72	757,72	5
Được biến đổi						
SSRRCVRLHESCLGQQVPCC (SEQ ID NO: 22) + fa	A(1-20)	4040,12	17,4	1011,04	1011,03	4
DPCATCYCRFFNAFCYCRK LGTAMNPCSRT (SEQ ID NO: 23) + fa	A(21-50)	5335,56	18,1	1068,12	1068,12	5

Ví dụ 28 (28A, 28B và 28C) đề cập đến các sản phẩm liên hợp của biến thể hFGF23.

Các biến thể FGF23 được sử dụng

Trình tự biến thể FGF23 của người, được sử dụng và được xác định trong ví dụ này là “hFGF23(R179Q)”, “hFGF23 R179” hoặc đơn giản là “hFGF23”, được đề xuất ở SEQ ID

NO: 10. Biến thể FGF23 này thiếu peptit tín hiệu, nhưng có M dự trữ ở vị trí 1, và có đột biến ở R179 (R179Q). Sản phẩm liên hợp chứa axit béo được mô tả ở đây được điều chế bằng peptit FGF23 này (ví dụ 28C) và cho thấy vẫn giữ lại ít nhất một hoạt tính FGF23 trong bảng 8.

Hai biến thể khác của FGF23 của người cũng được sử dụng trong ví dụ này (các ví dụ 28A và 28B) để cấu thành các sản phẩm liên hợp với axit béo được bộc lộ ở đây. Giống như peptit của SEQ ID NO: 10, các peptit này thiếu peptit tín hiệu FGF23 và có đột biến ở R179, nhưng có một hoặc nhiều đột biến bổ sung, nhưng vẫn giữ lại ít nhất một hoạt tính FGF23. Hai biến thể FGF23 này được sử dụng trong và cả hai được xác định trong ví dụ này là “biến thể hFGF23” hoặc “biến thể FGF23” hoặc tương tự.

Các phương pháp sản xuất sản phẩm liên hợp được mô tả ở đây có thể được sử dụng với các peptit FGF23 khác, bao gồm FGF23, hoặc chất tương đồng, biến thể, mảnh, hoặc dạng biến đổi của chúng.

Phương thức sản xuất các biến thể FGF23

Sự biến đổi:

Tạo ra polypeptit hFGF23(R179) bằng cách chuyển tạm thời plasmit biểu hiện pET28c-hFGF23 R179Q vào các tế bào khả nạp BL21(DE3), ủ trên đá trong 30 phút, gây sốc bằng nhiệt ở 42°C trong 45 giây, bổ sung môi trường SOC và ủ vi khuẩn trong máy lắc 37°C trong một giờ. Sau đó, nhân rộng môi trường vi khuẩn trên đĩa LB chứa Kanamycin và ủ qua đêm ở 37°C. Các dòng đã phân lập được chuyển vào môi trường LB chứa Kanamycin, ủ qua đêm ở 37°C đồng thời lắc và 25mL dịch chất được chuyển vào môi trường LB mới chứa Kanamycin và được lắc ở 37°C trong khoảng 2,5 giờ. Khi các tế bào đủ tỷ trọng (OD là ~0,6), bổ sung IPTG 1M vào mỗi môi trường nuôi cấy đồng thời lắc liên tục ở 37°C để tạo ra biểu hiện của polypeptit này. Sau 4 giờ, kết tủa các tế bào bằng cách ly tâm ở tốc độ 6000 rpm trong 10 phút và đông lạnh kết tủa xuống -20°C. Tiếp theo, tạo huyền phù lại kết tủa trong chất đệm ly giải (Tris 50mM, pH = 8, NaCl 100mM, Triton 0,1% X-100) và các tế

bào đã ly giải sử dụng vi thiết bị hóa lỏng. Bổ sung 10mg lysozym và 10 μ L DNase (1 đơn vị/ mL, Invitrogen) cho 100mL hỗn hợp ly giải và ủ ở nhiệt độ phòng trong 30 phút, sau đó quay xuống ở tốc độ 8000 rpm ở 4°C trong 20 phút, rửa với ba lần thay đổi 100mL chất đệm ly giải và quay, và lần thứ tư với chất đệm ly giải không chứa Triton X-100. Kết tủa (của thể vùi) từ lần quay cuối cùng ngay lập tức được hòa tan trong Tris 50mM, pH = 7,4, guanidin 6M, DTT 10mM, và nồng độ protein được xác định và điều chỉnh đến 1mg/ml trước khi cuộn gấp lại.

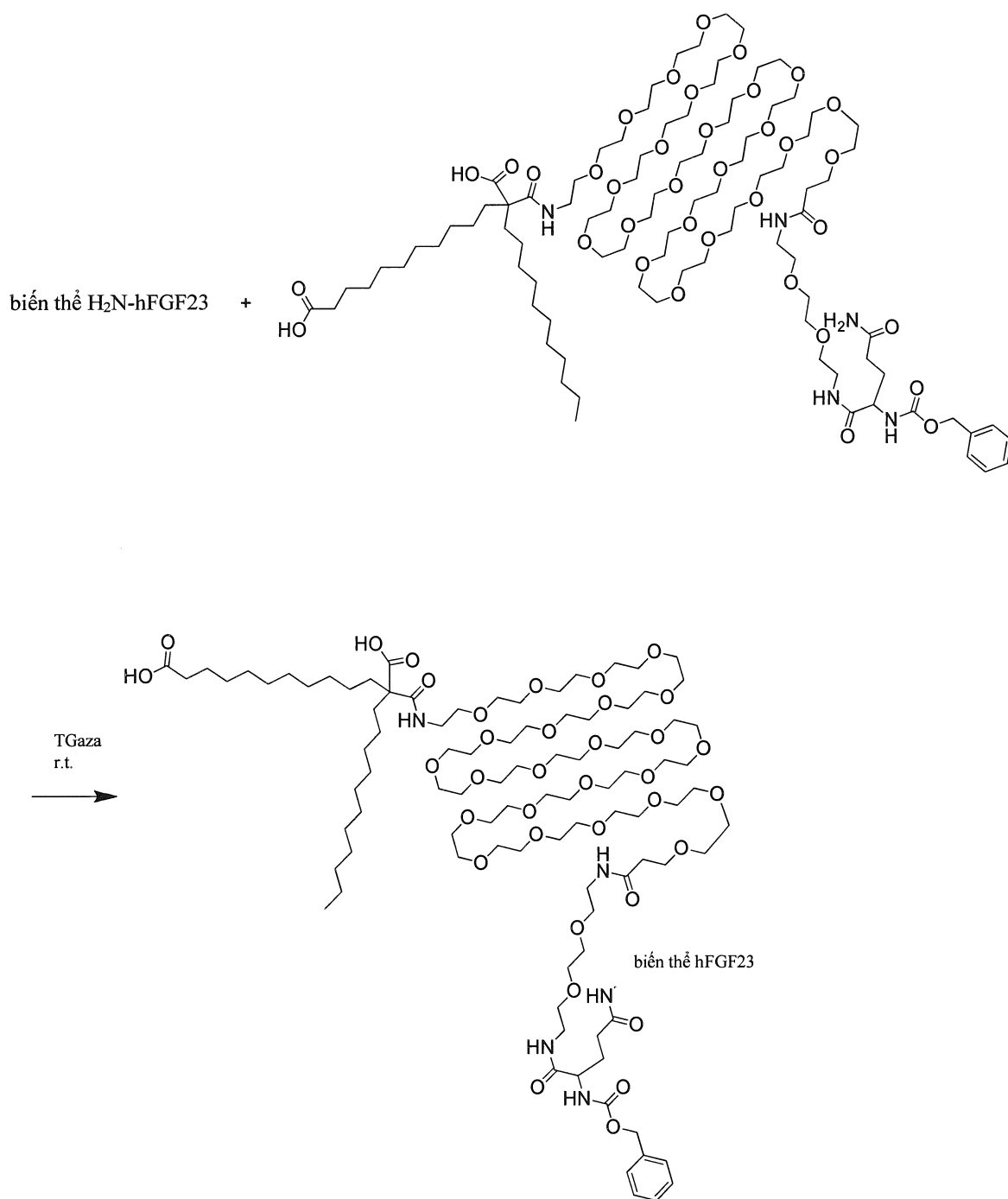
Cuộn gấp lại protein:

Để cuộn gấp lại protein, thêm 368mg glutathion (GSSH) đã khử và 74mg glutathion (GSSG) đã oxy hóa vào mỗi 400ml thể vùi đã bị hòa tan. Thẩm tách protein này qua đệm ở 4°C đối với 4L Tris 50mM, pH = 8,0 và Arginin 250mM. Tiếp đó loại bỏ 2L chất đệm thẩm tách và thay thế bằng 2L nước và tiếp tục thẩm tách trong 8 giờ nữa. Sau đó biến đổi chất đệm thẩm tách đến Tris 20mM, pH = 8,0, NaCl 50mM, Arginin 25mM, và tiếp tục thẩm tách qua đệm.

Tinh chế protein:

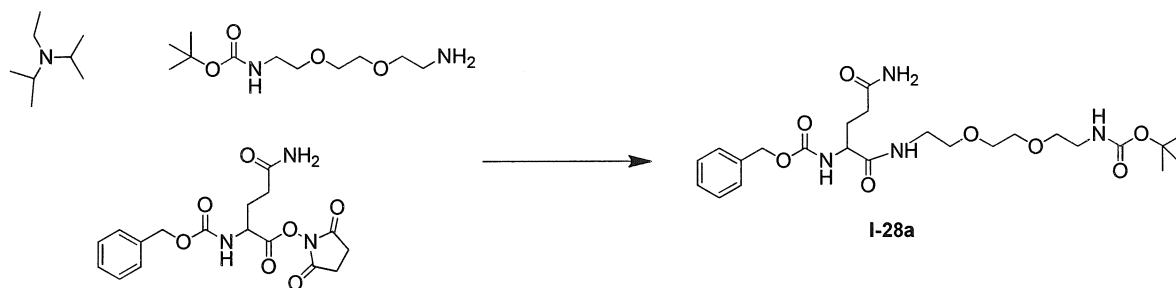
Để tinh chế protein, hỗn hợp đã thẩm tách được quay xuống ở 12000 rpm trong 30 phút, tải các chất nổi trên bề mặt lên trên cột Heparin-Sepharose cân bằng với chất đệm thẩm tách cuối cùng, và rửa cột này bằng 20 lần thể tích cơ sở của 1xPBS. Rửa giải protein đã cuộn gấp với 1xPBS được bổ sung NaCl 0,5M, đánh giá độ tinh khiết protein bằng SDS-PAGE gel, và đo nồng độ protein bằng OD của nó ở bước sóng 280nm.

Ví dụ 28A: Sự liên hợp của biến thể hFGF23 với axit béo



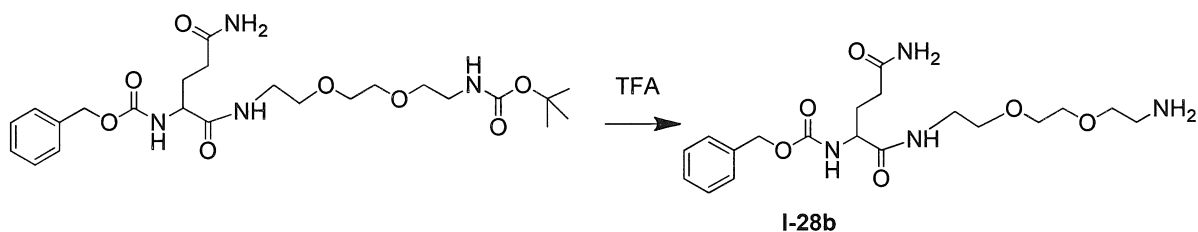
trong đó -NH₂ trong hFGF23varian-NH₂- nghĩa là nhóm chức amino của gốc lysin.

Bước 1: Chất trung gian 28a



Hòa tan 2,5-dioxopyrrolidin-1-yl 5-amino-2-(((benzyloxy)cacbonyl)amino)-5-oxopentanoat (0,5g, 1,325mmol) trong DMF (thể tích: 9,96ml) và thêm tert-butyl (2-(2-(2-aminoetoxy)etoxy)etyl)carbammat (0,503ml, 2,120mmol). Thêm DIPEA (0,274g, 2,120mmol) vào hỗn hợp này và khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ phòng trong 2 giờ ở thời điểm mà phân tích LCMS cho thấy sự tạo thành sản phẩm mong muốn và sự tiêu thụ nguyên liệu ban đầu ZQ-NHS (phương pháp A, $R_t = 0,98$ phút, $M+H$ 511,4). Đổ hỗn hợp phản ứng vào DCM (100mL) và rửa bằng nước đá (3 x 50 mL). Sấy khô lớp hữu cơ trên Na_2SO_4 , lọc rồi cô đặc để tạo ra 1,14g dầu màu vàng. Phân tích LCMS chỉ ra sự có mặt của sản phẩm mong muốn (Phương pháp M, $R_t = 1,82$ phút, $M+H$ 511,4, 1,14g). Đưa nguyên liệu sang bước tiếp theo mà không tinh chế thêm.

Bước 2: Chất trung gian 28b, benzyl (5-amino-1-((2-(2-(2-aminoetoxy)etoxy)etyl)amino)-1,5-dioxopentan-2-yl)carbammat

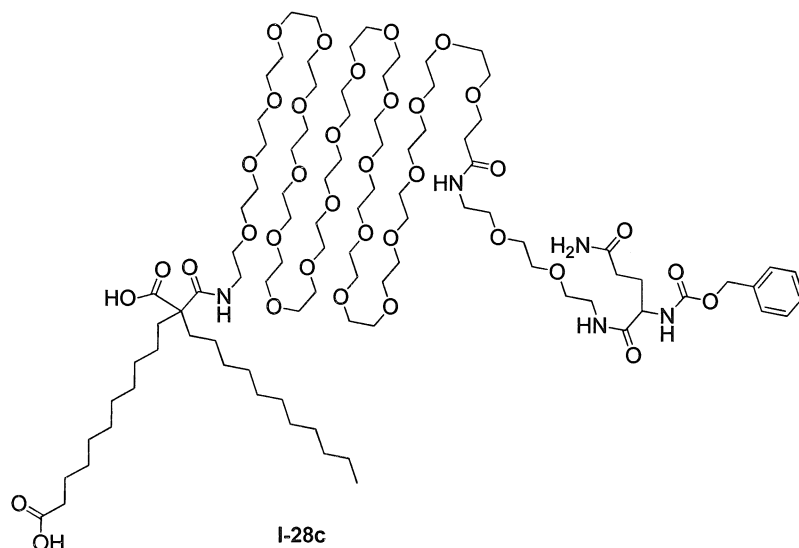


Thêm axit trifloaxetic (10mL, 2,233mmol) vào chất trung gian 28a (1,14g, 2,233mmol) và khuấy ở nhiệt độ phòng trong khoảng một giờ. Phân tích LCMS cho thấy sự chuyển hóa hoàn toàn của nguyên liệu ban đầu thành sản phẩm mong muốn (Phương pháp A, $R_t = 0,56$ phút, $M+H$ 411,3). Hấp thụ hỗn hợp phản ứng trong DCM (30mL) rồi cô đặc thành dầu hai

lần. Pha loãng đầu này bằng 1mL ACN và 1mL MeOH và tinh chế bằng phương pháp HPLC đã kích hoạt MS (Phương pháp N). Gộp các phân đoạn có khối lượng mong muốn, đông lạnh rồi đông khô để tạo ra chất trung gian 28b dạng bột màu trắng (Phương pháp O, $R_t = 0,22$ phút, $M+H$ 411,3, 160mg, 18%)

Bước 3: Chất trung gian 28c,

Hòa tan chất trung gian 28b (19,69mg, 0,048mmol) trong DMF (0,5mL) và thêm vào dung dịch chất trung gian 37 (50mg, 0,030mmol) trong DMF (1,0mL). Thêm 3 giọt DIPEA vào và khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ phòng trong 2 giờ ở thời điểm mà phân tích LCMS cho thấy sự chuyển hóa hoàn toàn thành sản phẩm (Phương pháp B, $R_t = 1,22$ phút, $M+H+2/2$ 982,9). Tải hỗn hợp phản ứng lên trên cột C-18 20g để sắc ký pha đảo. Sử dụng dung môi gradien từ 100% nước (TFA 0,1%) đến 100% MeCN trong giai đoạn hơn 20 phút, thu lấy các phân đoạn và phân tích bằng LCMS. Kết hợp các phân đoạn có khối lượng mong muốn, đông lạnh rồi đông khô qua đêm để tạo ra chất trung gian 28c là dầu không màu, sạch (Phương pháp C, $R_t = 1,21$ phút, $M+H+2/2$ 982,9, $M+H+3/3$ 655,5, 15,3mg, 26%). Giải phổ tạm thời 1H -NMR chỉ ra sự có mặt của liên kết amit được tạo thành ở 6,29ppm (1H, br m). 1H NMR (400MHz, CLOROFORM-d) δ 7,52 (s, 1H), 7,35 (d, $J = 3,3$ Hz, 5H), 5,10 (s, 2H), 4,30 (s, 1H), 3,77 (t, $J = 5,8$ Hz, 2H), 3,69 - 3,49 (m, 94H), 3,46 (s, 4H), 2,59 (s, 3H), 2,32 (t, $J = 7,2$ Hz, 25H), 2,08 - 1,94 (m, 4H), 1,79 - 1,65 (m, 2H), 1,65 - 1,52 (m, 2H), 1,40 - 1,06 (m, 31H), 0,94 - 0,82 (m, 3H).



Bước 4: hFGF23-biến thể + chất trung gian 28c

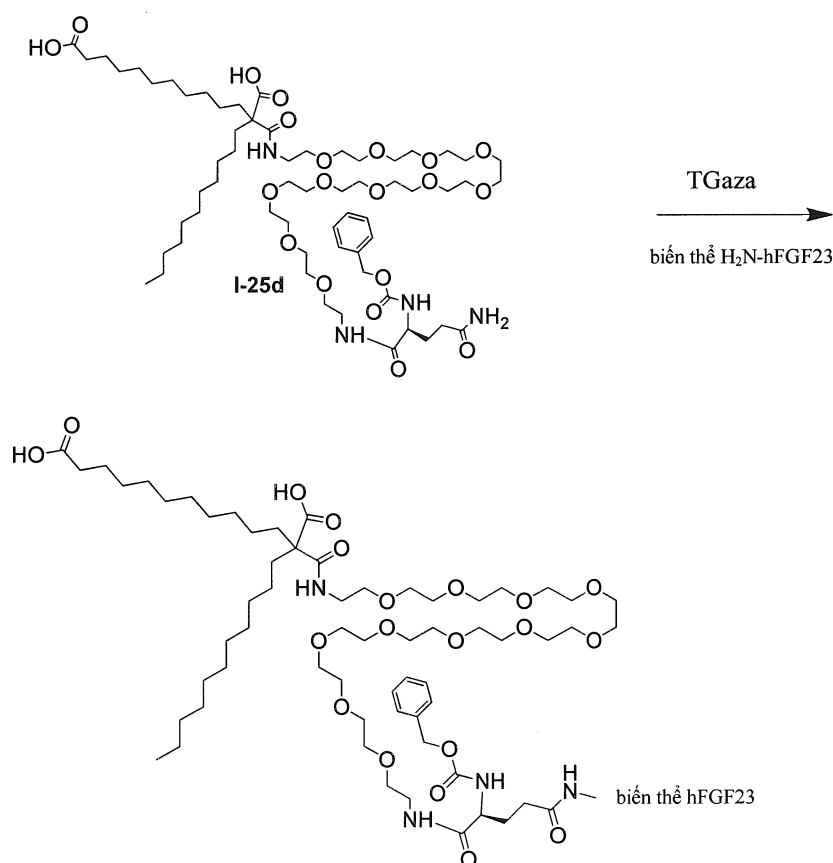
Đối với bước này, biến thể FGF23 của người (hFGF23) (“hFGF23-biến thể”) được sử dụng, biến thể này peptit tín hiệu, nhưng có một hoặc nhiều các đột biến so với SEQ ID NO: 8 nhưng vẫn giữ lại ít nhất một hoạt tính FGF23, và trong đó “-NH₂” trong “FGF23-biến thể-NH₂” chỉ nhóm chức amino của gốc lysin.

Điều chế dung dịch TGase 50mg/mL trong MES 30mM có pH = 6 và dung dịch chất trung gian 28c 8mg/mL trong chất đệm MES 30mM có pH = 6. Dung dịch axit béo trở nên vẫn trong MES có pH = 6. Thêm chất trung gian 28c (217μL, 0,883μmol) vào hFGF23-biến thể (0,3mg/mL trong MES 30mM có pH = 6, 7,5mL, 0,088μmol) sau đó thêm TGase (33,5μL, 0,044μmol). Trộn hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ phòng trong 18 giờ và thêm một lượng bổ sung là 217μL chất trung gian 28c vào. Trộn hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ phòng trong 18 giờ và thêm một lượng bổ sung là 217μL chất trung gian 28c vào. Trộn hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ phòng trong 18 giờ và thêm một lượng bổ sung là 108,5μL chất trung gian 28c vào. Trộn hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ phòng trong 4 giờ ở thời điểm mà phân tích LCMS cho

thấy sự chuyển hóa hoàn toàn của nguyên liệu ban đầu (Phương pháp P, $R_t = 1,55$ phút, M+H 27432). Chia hỗn hợp phản ứng giữa hai thiết bị lọc ly tâm MWCO Amicon 4mL 10kDa và chất đệm trao đổi 3 lần với chất đệm MES 30mM có pH = 6, sau đó cô đặc đến 1,5mL. Bảo quản nguyên liệu trong tủ lạnh qua đêm. Một số chất rắn lắng xuống đáy ống. Đo nồng độ của các chất nổi trên bề mặt bằng A280 ($18730 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$, 25485 g/mol) là 0,43mg/mL (27%).

Ví dụ 28B: Sự liên hợp của hFGF23-biến thể với ZQG-PEG11-axit béo

Đối với ví dụ này, thể liên hợp được điều chế chứa axit béo và biến thể FGF23, biến thể này thiếu peptit tín hiệu và có một hoặc nhiều các đột biến liên quan đến trình tự SEQ ID NO: 8, nhưng các biến thể vẫn giữ ít nhất một hoạt tính FGF23.



trong đó $-NH_2$ trong hFGF23-biến thể- NH_2 nghĩa là nhóm chức amino của gốc lysin.

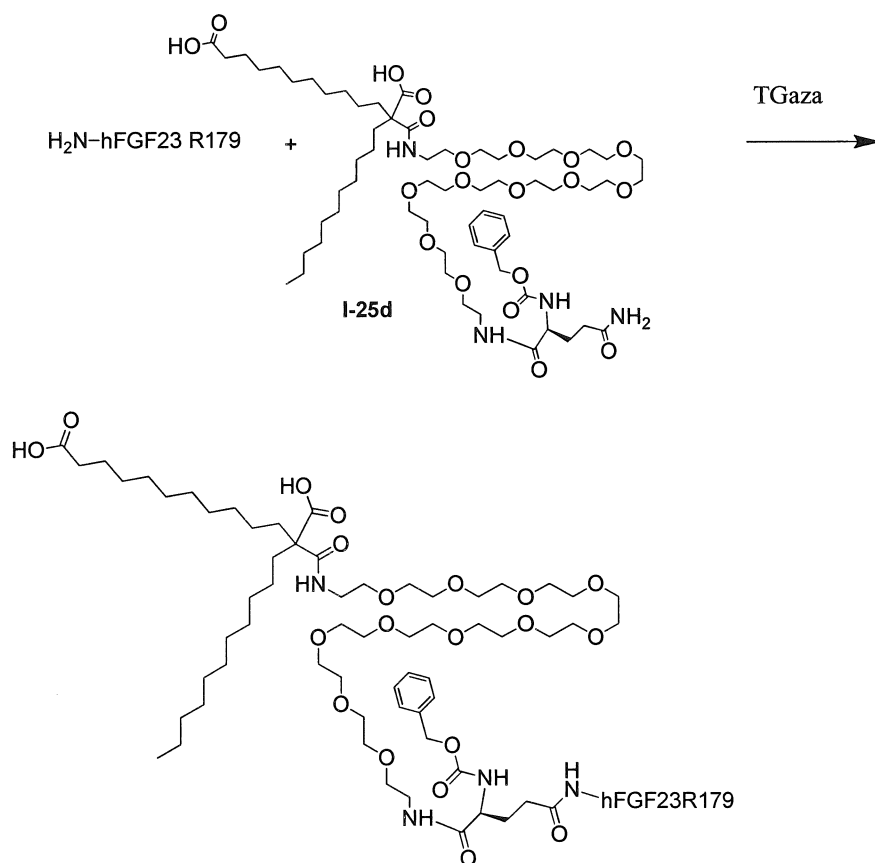
Điều chế dung dịch chất trung gian 25d 8mg/mL trong chất đệm tris 100mM có pH = 8. Điều chế dung dịch TGase 50mg/mL trong H_2O . Thêm chất trung gian 25d (0,207mL, 1,343 μ mol) vào dung dịch hFGF23-biến thể (6,5mL, 0,090 μ mol) sau đó thêm TGase (0,136mL, 0,179 μ mol). Trộn hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ phòng trong ba ngày và quan sát được sự chuyển hóa 90% thành loại +1 (LCMS Phương pháp Q, R_t = 7,24 phút, M+H 26616). Trao đổi hỗn hợp phản ứng vào chất đệm PBS 1X sử dụng thiết bị lọc ly tâm Amicon MWCO 10kDa bằng cách pha loãng và cô đặc phản ứng 6 lần đến thể tích 2mL. Đo nồng độ bằng A280 (18730 $cm^{-1}M^{-1}$, 26617g/mol) là 0,125mg/mL (LCMS Phương pháp Q, R_t = 7,24 phút, M+H 26616).

Ví dụ 28C: Sự liên hợp của h-FGF23 R179 + ZQG-PEG11-axit béo:

Đối với ví dụ này, thể liên hợp được điều chế sử dụng biến thể FGF23 “hFGF23 R179”. Biến thể này thiếu peptit tín hiệu và có đột biến ở R179. Trình tự được đề xuất là SEQ ID NO: 10.

Khối lượng tính toán được: 25463

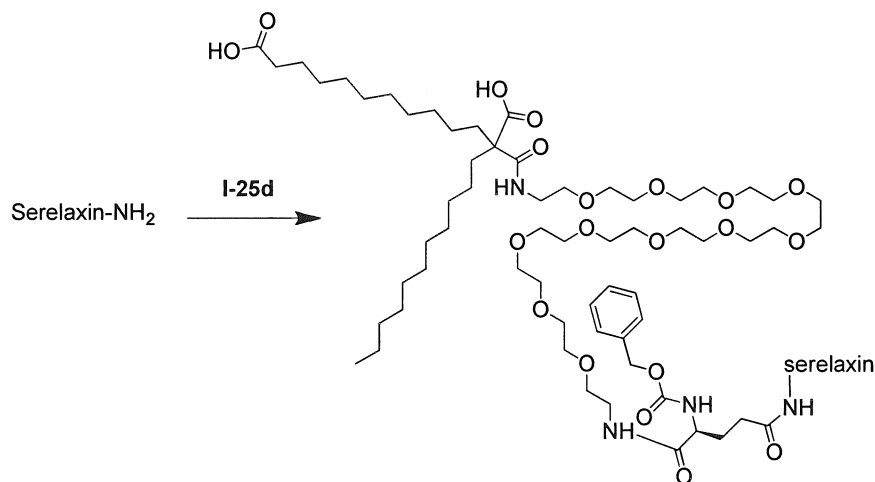
Điều chế dung dịch chất trung gian 25d 8mg/mL trong chất đệm tris 100mM có pH = 8. Điều chế dung dịch TGase 50mg/mL trong H_2O . Thêm chất trung gian 25d (750 μ L, 4,87 μ mol) vào dung dịch hFGF23 R179 (2,50E+04 μ L, 0,393 μ mol) sau đó thêm TGase (597 μ L, 0,785 μ mol). Trộn hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ phòng trong hai ngày ở thời điểm mà phân tích LCMS cho thấy sự chuyển hóa hoàn toàn của nguyên liệu ban đầu (Phương pháp P, R_t = 1,58 phút, M+H 26674). Tinh chế hỗn hợp phản ứng qua sắc ký trao đổi ion để cho ra thể liên hợp +1 (Phương pháp R, R_t = 3,87 phút, M+H 26674):



trong đó $-\text{NH}_2$ trong hFGF23 R179-NH_2 nghĩa là nhóm chức amino của gốc lysin.

Các ví dụ 29A và 29B liên quan đến thể liên hợp của serelaxin.

Ví dụ 29A: Thể liên hợp serelaxin-axit béo (thể liên hợp +1 axit béo)



Serelaxin + ZQG-PEG₁₁-axit béo (ví dụ 25d):

Trình tự serelaxin:

DSWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWSCFRALSRKTCGVHCCKNALASYLE
(SEQ ID NO: 24); và

–NH₂ trong “serelaxin-NH₂” nghĩa là nhóm chức amino phản ứng ở chuỗi bên của lysin K17 thể hiện qua thí nghiệm lập bản đồ sau đây; MW 5963g/mol.

Điều chế dung dịch ZQG-PEG₁₁-axit béo 8mg/mL (ví dụ 25d) trong chất đệm tris 100mM có pH = 8. Điều chế dung dịch mTGaza 50mg/mL trong H₂O. Thêm ví dụ 25d (516μL, 3,35μmol) vào dung dịch serelaxin (211μL, 0,168μmol) trong tris 100mM có pH = 8 (phản ứng 1,018mL, 0,5mg/mL) sau đó thêm mTGaza (Ajinomoto, 255μL, 0,335μmol). Trộn hỗn hợp phản ứng ở 37°C trong 3 ngày và sau đó thêm một lượng bổ sung là 100μL ZQG-PEG₁₁-axit béo. Trộn hỗn hợp phản ứng ở 37°C trong 18 giờ và sau đó trao đổi vào chất đệm PBS 1X sử dụng thiết bị lọc ly tâm Amicon MWCO 10kDa bằng cách pha loãng và cô đặc phản ứng 5 lần đến thể tích 0,7mL. Tinh chế nguyên liệu này qua phương pháp K và gộp các phân đoạn với nguyên liệu mong muốn lại, đông lạnh rồi đông khô để cho ra bột màu trắng. Hòa tan nguyên liệu trong 1mL chất đệm NaOAc 30mM có pH = 5 và nồng độ đo được bằng

A280 (5969cm⁻¹M⁻¹, 7178 g/mol) là 0,25mg/mL (25%). LCMS Phương pháp L: R_t = 1,65 phút; MS [M+1 +1FA]: quan sát được: 7180, tính toán được: 7178.

Quy trình thí nghiệm lập bản đồ serelaxin

Quá trình ly giải protein mẫu

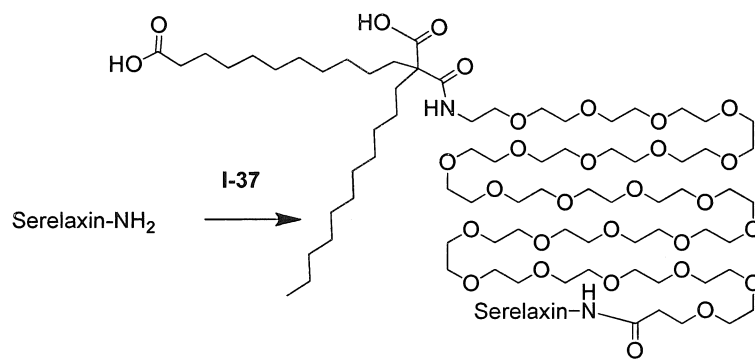
Hòa tan khoảng 10µg protein đến thể tích cuối là 25µL trong ure 6M, dithiothreitol 10mM, EDTA 5mM, và Tris_HCl 50mM (pH = 8,0) và duy trì ở 37°C trong 1 giờ để làm giảm các liên kết disulfua. Thêm iodoacetamid (500mM, 1µL) vào thiol không chứa alkylat và để dung dịch đứng yên ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ trong bóng tối. Tiếp đó pha loãng dung dịch 6 lần với Tris_HCl 50mM (pH = 8,0), thêm LysC (1µg, Promega V107A) vào và duy trì dung dịch này ở 37°C qua đêm để phân hủy protein. Thêm axit formic (98%, 2µL) vào để dập tắt quá trình ly giải protein và phân tích hỗn hợp peptit tạo thành bằng LC-MS/MS.

Phân tích LC-MS/MS

Thực hiện lập bản đồ peptit sử dụng Thermo Dionex Ultimate 3000 HPLC kết hợp với khối phổ kế Bruker Maxis Impact Q-TOF. Kiểm soát MS sử dụng Bruker Compass v. 1,7 và phần mềm Bruker otofControl v. 3.4, với các thông số thiết bị được cài đặt như sau: khoảng khối lượng 300–2,000 Da; điện áp phun 4,0 kV; nhiệt độ mao mạch 200°C; lưu lượng khí sấy khô 5,0 L/phút. Thực hiện quá trình phân đoạn với cột Waters ACQUITY UPLC BEH130 C18 (2,1x100mM, 1,7µm) được duy trì ở 40°C. Các pha di động lần lượt là axit formic 0,1% trong nước và axetonitril, và lưu lượng dòng là 100 µL/phút. Gradient được sử dụng là 0-2 phút, 2% B; 2-3 phút, 2%-8% B; 3-10 phút, 8%-29% B; 10-14 phút, 29%-33% B; 14-16 phút, 33%-37% B; 16-20 phút, 37%-73% B; 20-22 phút, 73%-95% B; 22-25 phút, 95% B; 25-26 phút, 95%-2% B; 26-30 phút, 2% B. Thực hiện xử lý dữ liệu sử dụng Bruker DataAnalysis v. 4.2 .

Thí nghiệm lập bản đồ chỉ ra rằng axit béo ngoài serelaxin xảy ra chủ yếu ở Lysin K17 dựa trên peptit được xác định là [CCHVGCTK₁₇(fa)RSLARFC – 2H₂O]; SEQ ID NO: 34], khối lượng: 3088,56 Da, điện tích: 5, Rt = 13,4 phút, m/z quan sát được 618,71, m/z dự kiến 618,72.

Ví dụ 29B: Thể liên hợp serelaxin-axit béo (hỗn hợp của thể liên hợp +1FA, +2FA và +3FA như được mô tả sau đây)



trong đó –NH₂ trong “serelaxin-NH₂” nghĩa là nhóm chức amino phản ứng ở chuỗi bên của lysin.

Serelaxin + chất trung gian 37: Ví dụ 29B được thử nghiệm là hỗn hợp sau đây

Mức độ đánh dấu	Tính toán được	Quan sát được	%
serelaxin	5963	5964	3
serelaxin +1 FA	7517	7516	19
serelaxin +2 FA	9071	9069	52
serelaxin +3 FA	10625	10622	25

Trình tự:

DSWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWSCFRALSRKTCGVHCCKNALASYLpE
(SEQ ID NO: 24)

Điều chế dung dịch axit béo chất trung gian 37 10mg/mL trong H₂O. Thêm axit béo chất trung gian 37 (140μL, 0,839μmol) vào dung dịch serelaxin (105μL, 0,084μmol, 4,75mg/mL) trong chất đệm NaOAc 30mM có pH = 4 (755μL). Trộn hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ phòng trong 16 giờ ở thời điểm mà phân tích LCMS cho thấy sự chuyển hóa 90% của nguyên liệu ban đầu. Thêm một lượng bổ sung 70μL chất trung gian 37 và trộn hỗn hợp phản ứng trong 16 giờ ở nhiệt độ phòng ở thời điểm mà phân tích MALDI chỉ ra sự chuyển hóa >95%. Trao đổi dung dịch vào chất đệm PBS 1 lần sử dụng thiết bị lọc ly tâm Amicon MWCO 3kDa bằng cách pha loãng và cô đặc phản ứng 4 lần đến thể tích 0,2mL. Nồng độ đo được bằng A₂₈₀ (5969M-1cm-1; 9068g/mol) là 2,61mg/mL. LCMS Phương pháp L: R_t = 1,56 phút; MS [M+1 +1 FA]: quan sát được: 7516, tính toán được: 7517; R_t = 1,65 phút; MS [M+1 +2 FA]: quan sát được: 9069, tính toán được: 9071; R_t = 1,74 phút; MS [M+1 +3 FA]: quan sát được: 10622, tính được: 10625.

Ví dụ 30: Sự liên hợp của M-His-hPIP với cấu trúc axit béo (I-37)- (hỗn hợp của thể liên hợp +1 FA, và thể liên hợp +2 FA như được mô tả sau đây)

Trình tự M-His-hPIP (29-146):

MHHHHHHQDNTRKIIKNFDIPKSVRPNDEVTAVLAVQTELKECMVVKTYLISSIP
LQGAFNYKYTACLCDDNPKTFYWDFYTNRTVQIAAVVDVIRELGICPDDAAVPIK
NNRFYTIEILKVE (SEQ ID NO:13)

Được biểu hiện từ

Trình tự protein được biểu hiện:

METDTLLLWVLLLWVPGSTGMHHHHHHQDNTRKIIKNFDIPKSVRPNDEVTA VL
 AVQTELKECMVVKTYLISSIP LQGAFNYKYTACL CDDNP KTFYWDFYTNRTVQIA
 AVVDVIRELGICPD DAAVIPIKNNRFYTIEILKVE (SEQ ID NO: 25)

Trình tự nucleotit:

GCTAGCCACCATGGAGACTGATACTTTGTTGTTGTGGGTACTGTTGCTTTGGGT
 GCCCGGTAGTACCGGTATGCATCACCACCACCATCACCAGGACAACACCCGGA
 AGATCATCATCAAGAACTTCGACATCCCTAAGAGCGTGCGCCCAAACGATGAA
 GTCACCGCGGTGCTGGCAGTGCAGACTGAGCTGAAGGAGTGCATGGTGGTCAA
 GACGTACCTGATTTTCGTCCATCCCGCTGCAAGGCGCCTTCAACTACAAGTACA
 CTGCCTGCCTCTGTGACGACAACCCCAAGACCTTTTACTGGGACTTCTACACCA
 ATAGAACTGTCCAGATTGCTGCCGTGGTGGATGTGATCAGGGAATTGGGAATT
 TGCCCCGACGATGCGGCCGTGATTCCGATCAAGAACAACCGCTTCTATACCAT
 CGAGATCCTTAAAGTGGAATGAGAATTC (SEQ ID NO: 26)

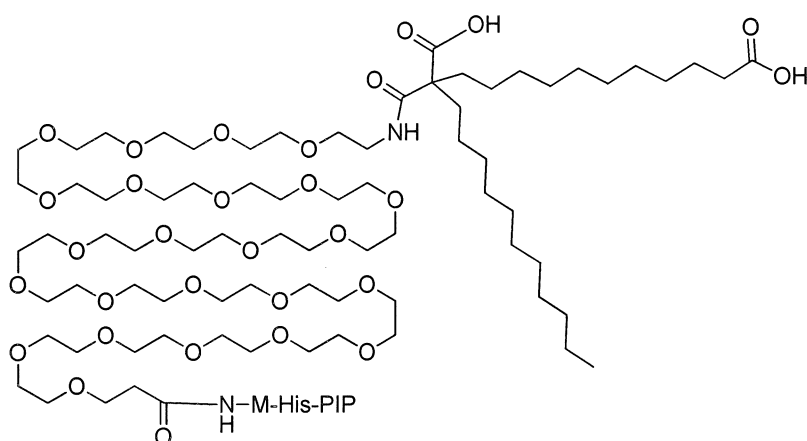
Vector biểu hiện PIP:

Vector biểu hiện ở động vật có vú mã hóa PIP của người được tạo ra theo phương pháp tách dòng chuẩn. Mảnh bao gồm trình tự tín hiệu của chuỗi kappa trên Ig của chuột theo sau bởi trình tự MHHHHH (SEQ ID NO: 27), sau đó PIP trưởng thành chứa các vị trí 5'-NheI (theo sau là trình tự Kozak) và 3'-EcoRI được tối ưu hóa codon và tổng hợp (ADN2.0). Trình tự này sau đó được tách dòng vào các vị trí 5'-NheI và 3'-EcoRI duy nhất của vector gốc pcDNA3,1 (Invitrogen) xuôi dòng với promoter CMV.

Sự biểu hiện PIP và quá trình tinh chế:

ADN plasmit biểu hiện PIP được chuyển nạp vào các tế bào HEK293T ở mật độ 1×10^6 tế bào/ml sử dụng các phương pháp polyetylenimin tiêu chuẩn. 500ml môi trường nuôi cấy sau

đó được phát triển trong môi trường FreeStyle 293 (Life Technologies) trong các bình thốt cổ 3L trong 4 ngày ở 37°C với không khí ẩm chứa 8% CO₂. Protein PIP được tinh chế từ môi trường điều hòa được làm sạch.



trong đó M-His-PIP có trình tự SEQ ID NO: 12 và “M-his” là MHHHHHHH (SEQ ID NO: 16).

Sự liên hợp:

Điều chế dung dịch 10mg/mL cấu trúc axit béo-cầu nối #1 trong H₂O. Pha loãng M-His-hPIP (0,700mL, 0,048μmol) bằng chất đệm NaOAc 30mM có pH = 4 (619μL, phản ứng 0,5mg/mL) và thêm chất trung gian 37 (0,081mL, 0,484μmol) vào. Trộn hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ phòng trong 18 giờ ở thời điểm mà phân tích LCMS cho thấy sự chuyển hóa 70% thành các sản phẩm +1 (50%) và +2 (20%). Tiếp đó trao đổi nguyên liệu này vào chất đệm PBS 1 lần sử dụng thiết bị lọc ly tâm Amicon MWCO 3kDa bằng cách pha loãng và cô đặc phản ứng 5 lần đến thể tích 350μL. Nồng độ đo bằng A₂₈₀ (13850 cm⁻¹M⁻¹, 14472g/mol) là 1,7mg/mL (70%). LCMS Phương pháp L, R_t = 1,46 phút; MS [M+1]: quan sát được: 14472,

tính toán được: 14476. $R_t = 1,57$ phút; MS [M+1 +1FA được khử glycosyl hóa]: quan sát được: 16025, tính toán được: 16030. $R_t = 1,69$ phút; MS [M+1 +2FA được khử glycosyl hóa]: quan sát được: 17578, tính toán được: 17584.

Cấu trúc M-His-hPIP + axit béo-cấu nối I-37: Ví dụ 30 được thử nghiệm là hỗn hợp sau đây

Mức độ đánh dấu	Tính được	Quan sát được	%
M-His-PIP	14476	14472	4
M-His-PIP + glycosyl hóa		18139	30
M-His-PIP +1 FA	16030	16031	7
M-His-PIP +1 FA+ glycosyl hóa		19692	37
M-His-PIP +2 FA	17584	17578	15
M-His-PIP +2 FA+ glycosyl hóa		21242	7

Quy trình thí nghiệm lập bản đồ PIP

Sự ly giải protein mẫu

Hòa tan khoảng 10 μ g protein đến thể tích cuối cùng là 25 μ L trong ure 6M, dithiothreitol 10mM, EDTA 5mM, và Tris_HCl 50mM (pH = 8,0) và duy trì ở 37°C trong 1 giờ để làm giảm các liên kết disulfua. Thêm iodoacetamid (500mM, 1 μ L) vào thiol không chứa alkylat và để dung dịch đứng yên ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ trong bóng tối. Tiếp đó pha loãng

dung dịch này 6 lần với Tris_HCl 50mM (pH = 8,0), thêm hỗn hợp LysC (1ug, Promega) hoặc Trypsin/Lys C (1ug, Promega) và duy trì dung dịch này ở 37°C qua đêm để phân hủy protein. Thêm axit formic (98%, 2uL) vào để dập tắt quá trình ly giải protein và phân tích hỗn hợp peptit tạo thành bằng LC-MS/MS.

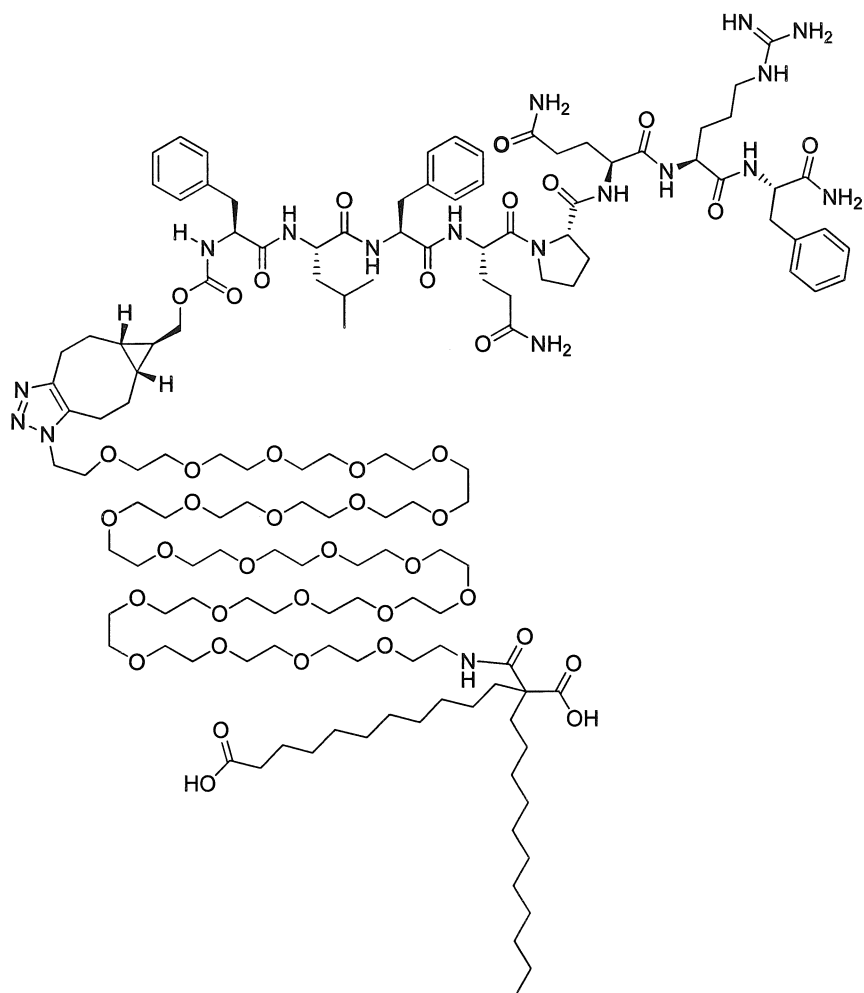
Phân tích LC-MS/MS

Thực hiện lập bản đồ peptit sử dụng Thermo Dionex Ultimate 3000 HPLC kết hợp với khối phổ kế Bruker Maxis Impact Q-TOF. MS được kiểm soát sử dụng phần mềm Bruker Compass v. 1,7 và Bruker otofControl v. 3.4, với các thông số thiết bị được cài đặt như sau: dải khối lượng 300–2,000 Da; điện áp phun 4,0 kV; nhiệt độ mao mạch 200°C; lưu lượng khí sấy khô 5,0 L/phút. Thực hiện quá trình phân đoạn với cột Waters ACQUITY UPLC BEH130 C18 (2,1x100mM, 1,7µm) được duy trì ở 40°C. Các pha di động lần lượt là axit formic 0,1% trong nước và axetonitril, và lưu lượng dòng là 100 uL/phút. Gradient được sử dụng là 0-2 phút, 2% B; 2-3 phút, 2%-8% B; 3-10 phút, 8%-29% B; 10-14 phút, 29%-33% B; 14-16 phút, 33%-37% B; 16-20 phút, 37%-73% B; 20-22 phút, 73%-95% B; 22-25 phút, 95% B; 25-26 phút, 95%-2% B; 26-30 phút, 2% B. Xử lý dữ liệu bằng cách sử dụng Bruker DataAnalysis v. 4.2 .

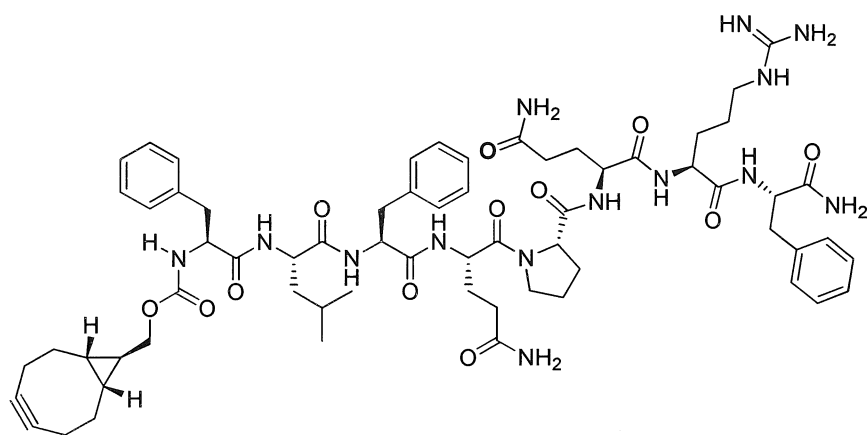
Thí nghiệm lập bản đồ chỉ ra rằng axit béo ngoài MH₆-PIP xảy ra tốt hơn ở ở đầu N như được thể hiện qua trình tự [fa-MHHHHHHQDNTRK]; SEQ ID NO: 35], khối lượng: 3265,76 Da, điện tích: 4, Rt = 23,4 phút, quan sát được m/z: 817,44, m/z dự kiến: 817,45.

Mức độ nhỏ bổ sung axit béo xảy ra ở lysin K42 như được thể hiện qua mảnh peptit [SVRPNDEVTAFLAVQTELK(fa)ECMVVK; SEQ ID NO: 36], khối lượng: 4366,45 Da, điện tích 3, Rt= 23,5 phút, m/z quan sát được: 1456,49, m/z dự kiến: 1456,49. Sự bổ sung axit béo ở phần phân cắt trypsin khối K42 liền kề lysin này, phục vụ cho việc xác nhận vị trí của sự bổ sung.

Ví dụ 31: Sự liên hợp của NPFF với axit béo sử dụng hóa click



Bước 1: Quy trình điều chế NPFF xử lý với hóa click



MH⁺ tính được: 1258,8

Thêm triethylamin (5,32 μ L, 0,038mmol) vào dung dịch NPFF (Alfa Aesar, J66509, 5mg, 3,82 μ mol) trong DMSO (1mL) và sau đó là (1R,8S,9r)-bicyclo[6.1.0]non-4-yn-9-ylmethyl (2,5-dioxopyrrolidin-1-yl) cacbonat (1,335mg, 4,58 μ mol). Khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ phòng. Khi phản ứng hoàn thành, hỗn hợp được đưa sang bước tiếp theo như là nguyên liệu thô.

Bước 2: Sự liên hợp

Thêm chất trung gian 6 (I-6) và hỗn hợp phản ứng thô từ bước 1. Lắc hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ phòng. Khi phản ứng kết thúc, tinh chế hỗn hợp sử dụng phương pháp sắc ký pha đảo (hệ thống: Agilent Bioinert System Date; Cột: Cột Waters Protein BEH C4, 300 Angstrom, 5 μ m, 10x250mm; Cột để phát triển phương pháp UPLC là BEH C4m, 300A, 1,7 μ m, 2,1x50mm; Pha di động: gradien 46-56% ACN trong 6 phút, được biến đổi bằng TFA 0,1%; A: Nước, B: Axetonitril; Lưu lượng dòng: 2,0mL/phút; thời gian hoạt động: 15 phút; quá trình thu hồi phân đoạn: UV 210nm) để tạo ra hợp chất nêu trong đề mục, là chất rắn màu trắng dạng muối TFA;

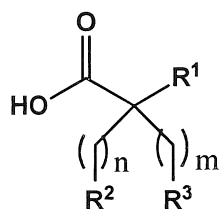
LCMS: Phương pháp S: ELSD: Rt 1,46 phút; MS m/z 928,3 [(M/3)⁺H]⁺

Có thể thấy rằng các thể liên hợp theo sáng chế có hiệu quả tương tự hoặc được cải thiện khi so sánh với phân tử sinh học không được liên hợp nhưng ngoài ra các thể liên hợp theo sáng chế cải thiện tính ổn định trong huyết tương so với phân tử sinh học không được liên hợp. Thể liên hợp trong các ví dụ ở trên được phát hiện là có tính ổn định trong huyết tương nhiều hơn 5 giờ, nhiều hơn 10 giờ, nhiều hơn 20 giờ, nhiều hơn 30 giờ, nhiều hơn 40 giờ, và trong một số trường hợp nhiều hơn 50 giờ.

Do đó, từ các phương án minh họa theo sáng chế được mô tả, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực có thể nhận thấy rằng các nội dung bộc lộ chỉ để minh họa và rất nhiều các phương án thay thế khác, các điều chỉnh, và cải biến có thể được thực hiện trong phạm vi theo sáng chế. Như vậy, sáng chế không chỉ giới hạn ở các phương án như được minh họa ở đây.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Thẻ liên hợp bao gồm phân tử sinh học được nối với axit béo qua cầu nối, trong đó phân tử sinh học này là yếu tố biệt hóa tăng trưởng của người 15 (GDF15), chất tương tự, biến thể, đột biến hoặc mảnh của nó hoặc đime của nó, và trong đó axit béo có công thức A1 sau đây:



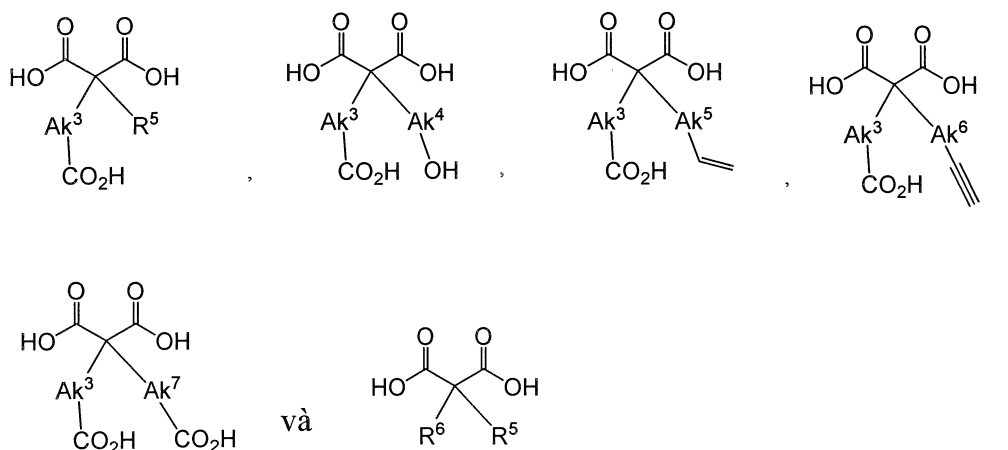
A1

R^1 là CO_2H ;

R^2 và R^3 độc lập với nhau là H, OH, CO_2H , $-\text{CH}=\text{CH}_2$ hoặc $-\text{C}\equiv\text{CH}$;

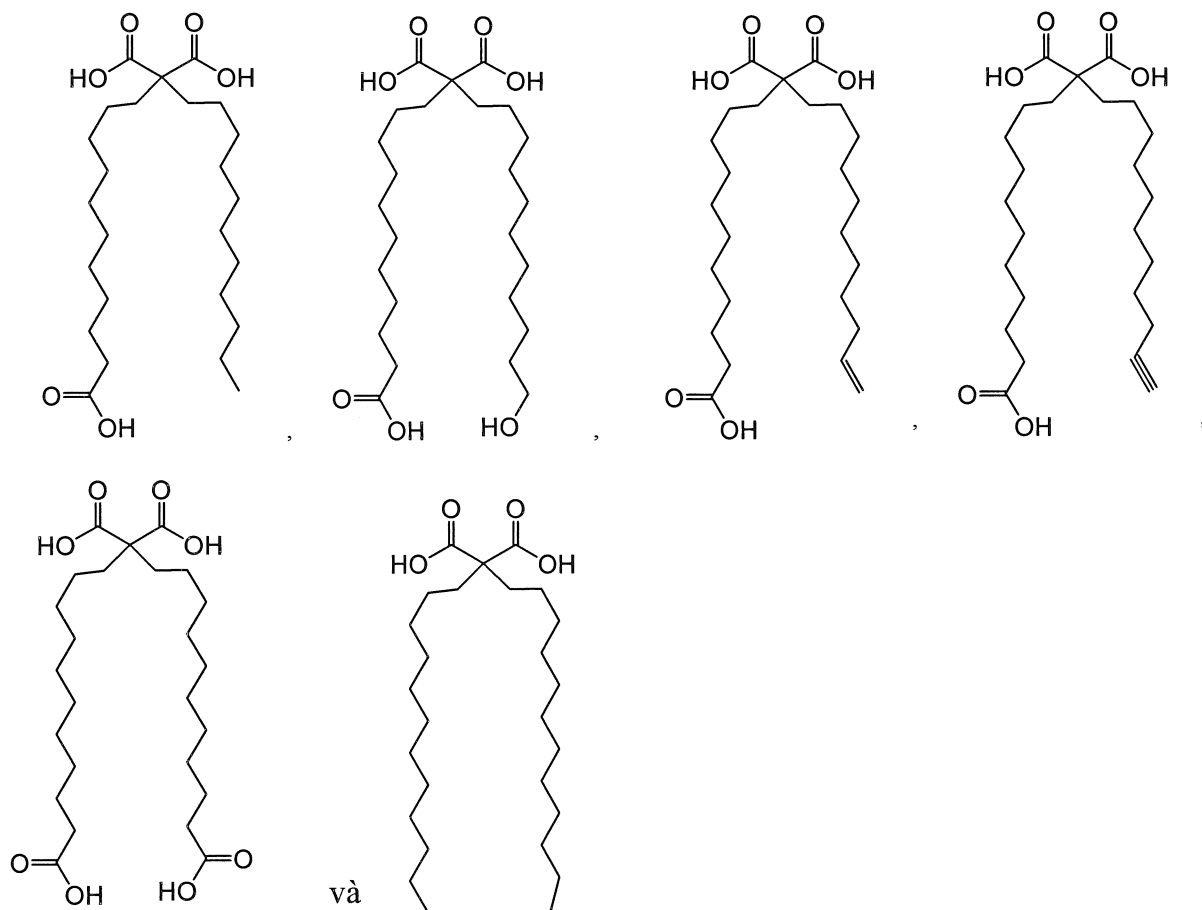
n và m độc lập với nhau là số nguyên từ 6 đến 30; hoặc amit, este hoặc muối được dụng của nó.

2. Thẻ liên hợp theo điểm 1, trong đó axit béo được chọn từ:



trong đó Ak^3 , Ak^4 , Ak^5 , Ak^6 và Ak^7 độc lập là $(\text{C}_8\text{-20})$ alkylen mạch thẳng, R^5 và R^6 độc lập là $(\text{C}_8\text{-20})$ alkyl mạch thẳng, hoặc amit, este hoặc muối được dụng của nó.

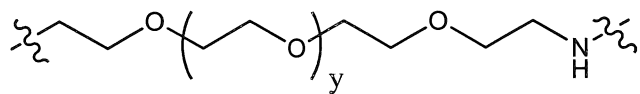
3. Thẻ liên hợp theo điểm 1 hoặc điểm 2, trong đó axit béo được chọn từ:



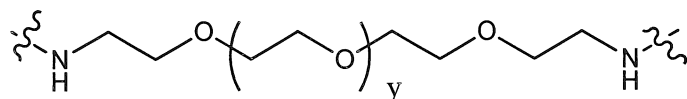
hoặc amit, este hoặc muối được dùng của nó.

4. Thẻ liên hợp theo điểm 1, 2 hoặc 3 trong đó cầu nối bao gồm alkyl, alkenyl, xycloalkyl, aryl, heteroaryl, heteroxyclyl, polyetylen glycol, một hoặc nhiều axit amin có trong tự nhiên hoặc axit amin không có trong tự nhiên, hoặc tổ hợp của chúng, trong đó mỗi alkyl, alkenyl, xycloalkyl, aryl, heteroaryl, heteroxyclyl, polyetylen glycol và/hoặc axit amin có trong tự nhiên hoặc axit amin không có trong tự nhiên tùy ý được kết hợp và nối với nhau hoặc nối vào phân tử sinh học và/hoặc vào gốc axit béo qua nhóm hóa học được chọn từ—C(O)O-, -OC(O)-, -NHC(O)-, -C(O)NH-, -O-, -NH-, -S-, -C(O)-, -OC(O)NH-, -NHC(O)-O-, =NH-O-, =NH-NH- hoặc =NH-N(alkyl)-; hoặc amit, este hoặc muối được dùng của nó.

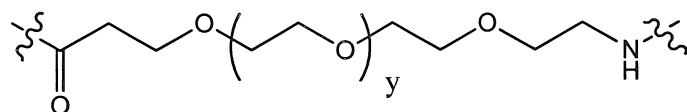
5. Thẻ liên hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1 đến 4, trong đó cầu nối bao gồm gốc oligo etylen glycol không phân nhánh có công thức:



,

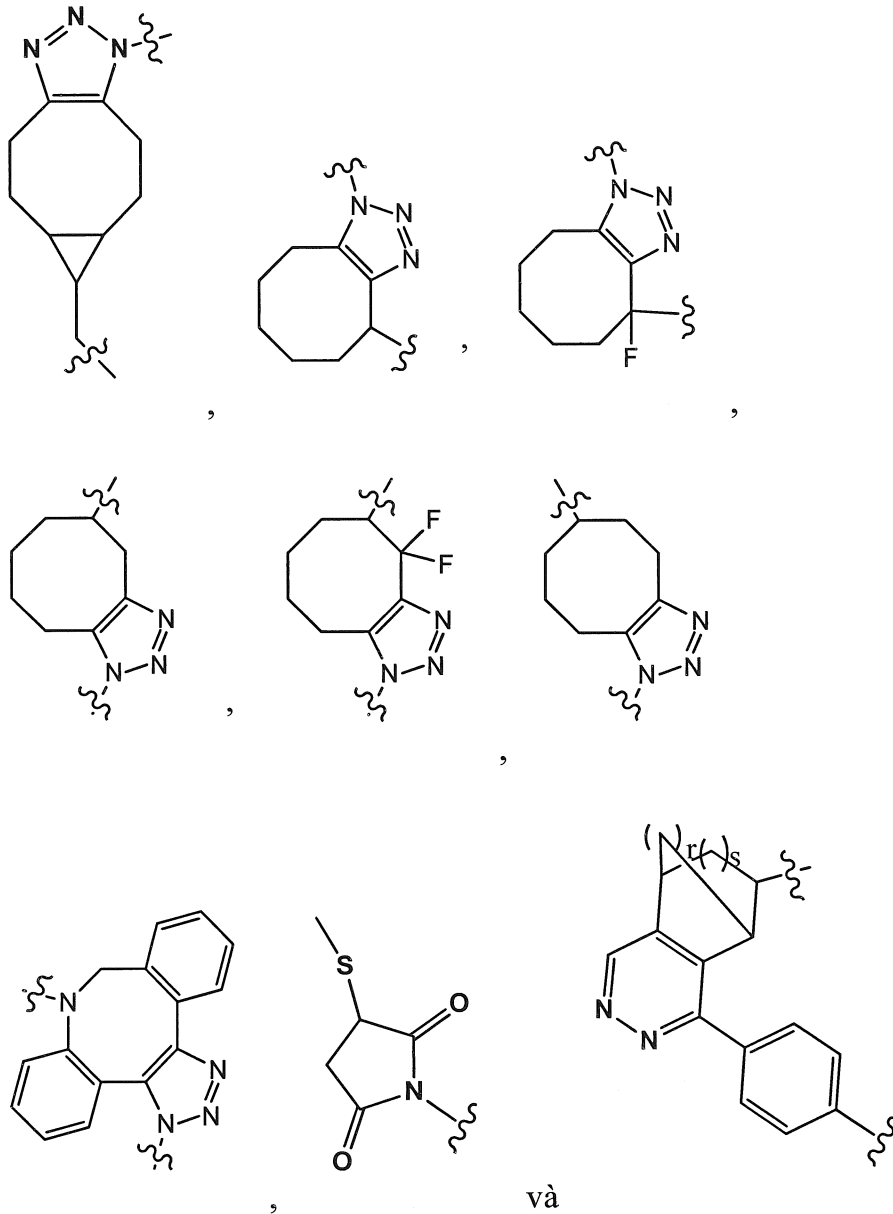


hoặc,



trong đó y là 0 đến 34; hoặc amit, este hoặc muối được dụng của nó.

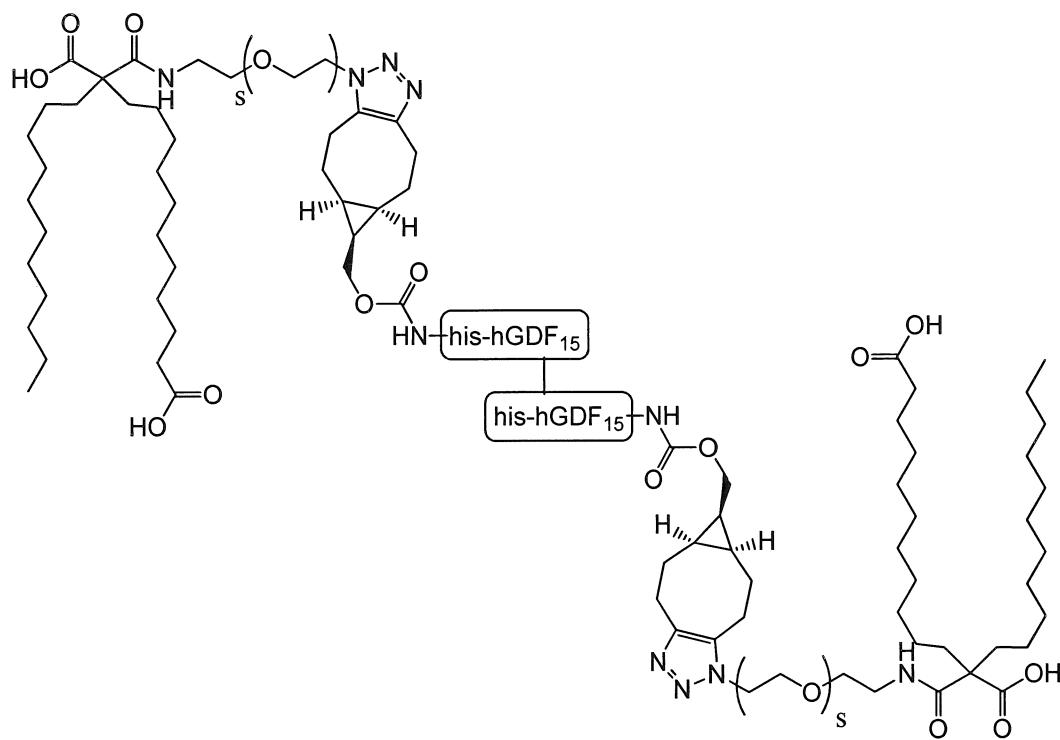
6. Thẻ liên hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong đó cầu nối bao gồm gốc dị vòng được chọn từ các công thức sau:



trong đó r là số nguyên 0 đến 2 và s là số nguyên từ 0 đến 3; hoặc amit, este hoặc muối được dựng của nó.

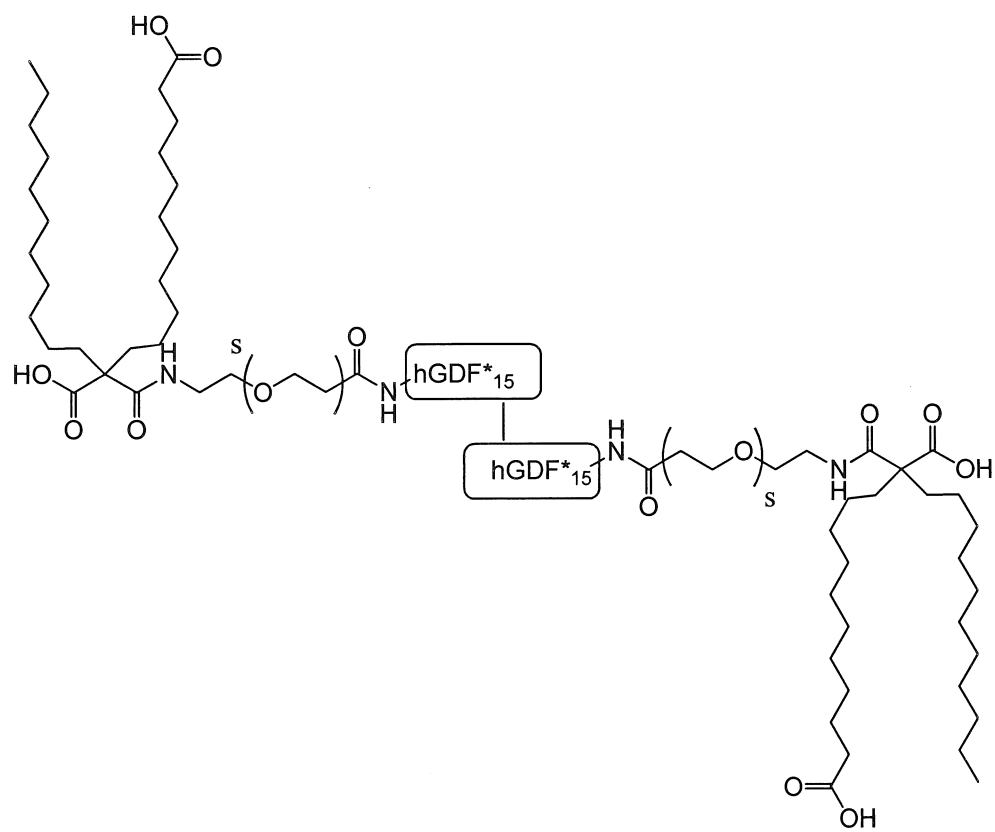
7. Thể liên hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó cầu nối bao gồm một hoặc nhiều axit amin độc lập được chọn từ histidin, methionin, alanin, glutamin, asparagin và glyxin; hoặc amit, este hoặc muối được dụng của nó.

8. Thẻ liên hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, hoặc amit, este hoặc muối được dụng của nó, trong đó thẻ liên hợp này có một trong các công thức sau:



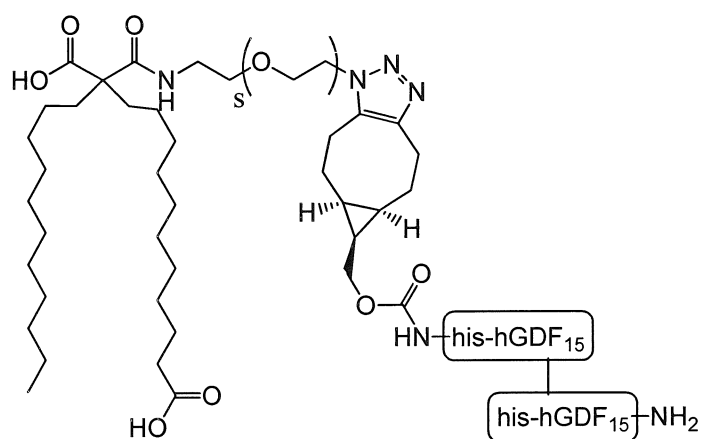
công

thức C

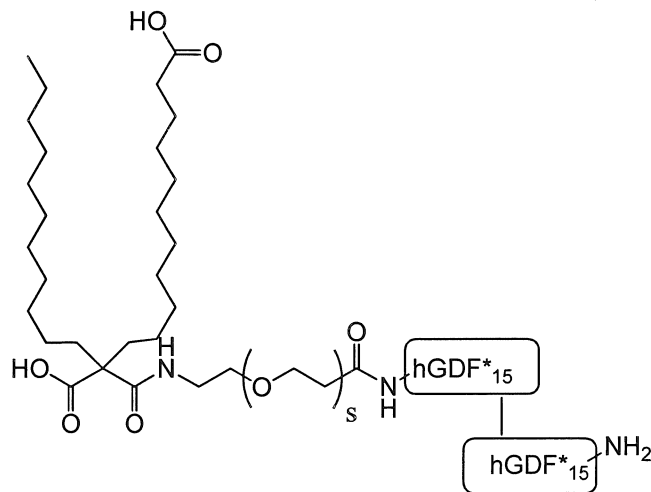


công thức D

trong đó trong công thức C và công thức D; cả hai đơn vị monome của his-hGDF15 hoặc của hGDF15* được nối với gốc axit béo qua cầu nối ở cả hai đầu N; hoặc



công thức E



công thức F

trong đó trong công thức E và công thức F, duy nhất một trong số đơn vị monome của his-hGDF15 hoặc của hGDF15* được nối với gốc axit béo qua cầu nối ở đầu N; và trong đó hGDF15* là hGDF15 trong đó 2 hoặc 3 axit amin ở đầu N được thay lần lượt bằng trình tự axit amin XH- hoặc XHX'-, trong đó H là histidin và X và X' độc lập được chọn từ M và A; và

his-hGDF15 là hGDF15 trong đó nhãn đánh dấu bao gồm 1 đến 6 axit amin histidin và tùy ý 1 hoặc 2 axit amin methionin, được thêm vào đầu N của hGDF15; s là số nguyên trong khoảng 20-30; và đường kẻ giữa 2 đơn vị monome của his-hDGF15 hoặc 2 đơn vị monome của hGDF15* là liên kết disulfua.

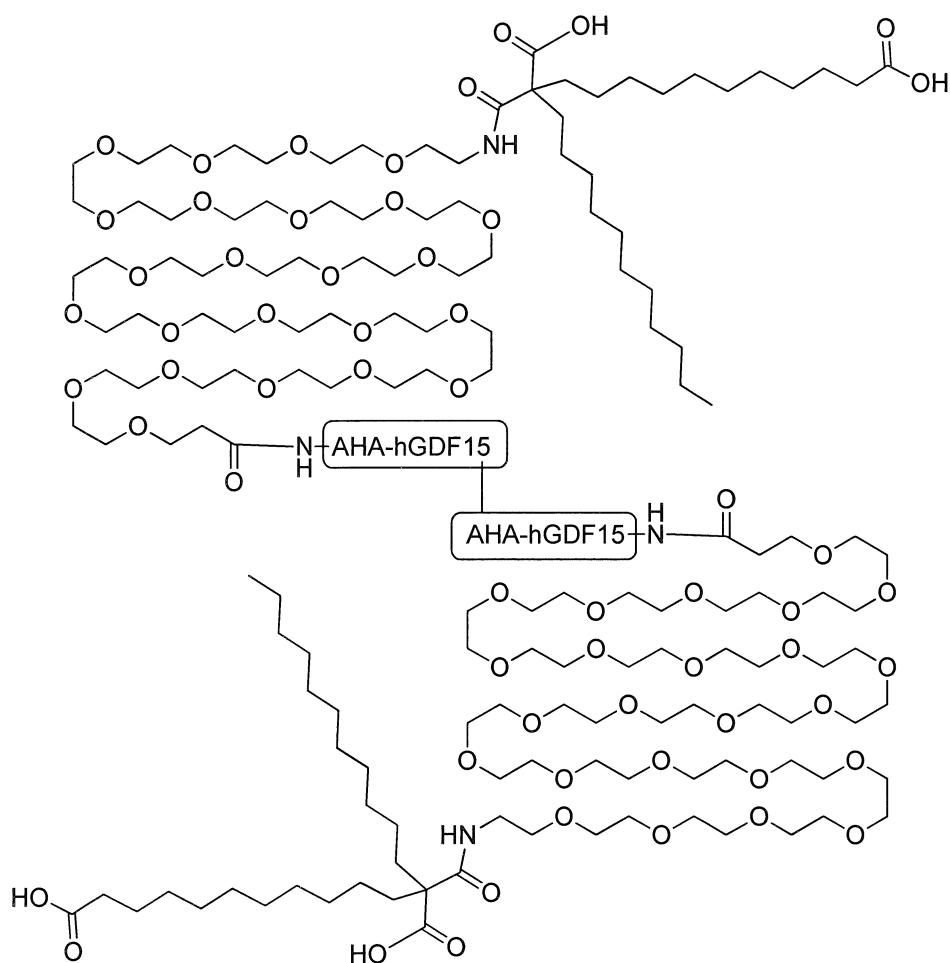
9. Hỗn hợp bao gồm thể liên hợp theo điểm 8 có công thức C, hoặc amit, este hoặc muối được dụng của nó, và thể liên hợp theo điểm 8 có công thức E, hoặc amit, este hoặc muối được dụng của nó; hoặc hỗn hợp bao gồm thể liên hợp theo điểm 8 có công thức D, hoặc amit, este hoặc muối được dụng của nó, và thể liên hợp theo điểm 8 có công thức F, hoặc amit, este hoặc muối được dụng của nó.

10. Thể liên hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1 đến 7, hoặc amit, este hoặc muối được dụng của nó, trong đó phân tử sinh học là MH(199-308)hGDF15, MHA(200-

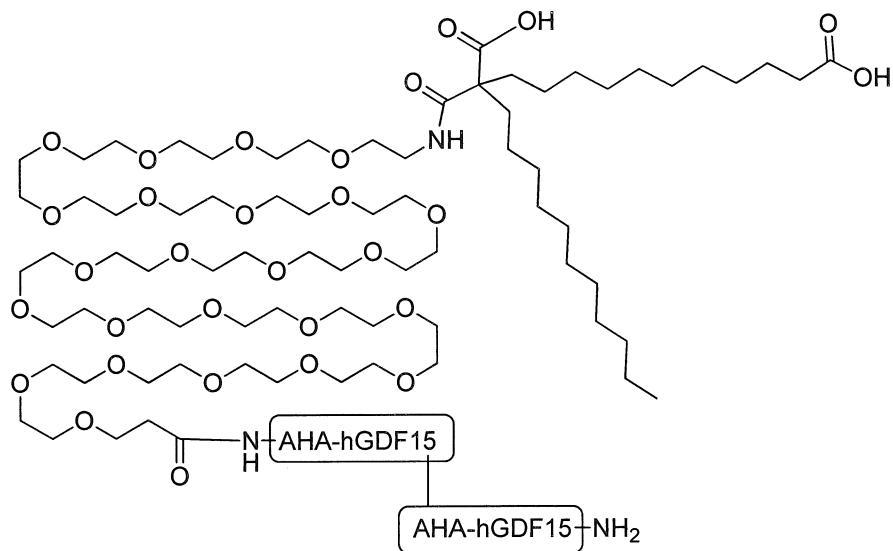
308)hGDF15, AHA(200-308)hGDF15 hoặc AH(199-308)GDF15, MHHHHHHM-hGDF15 và MHHHHHHH-hGDF15, hoặc dime của nó.

11. Thễ liên hợp theo điểm 8, hoặc amit, este hoặc muối được dựng của nó, trong đó hGDF15* là MH(199-308)hGDF15, MHA(200-308)hGDF15, AHA(200-308)hGDF15 hoặc AH(199-308)GDF15; và his-hGDF15 là MHHHHHHM-hGDF15 hoặc MHHHHHHH-hGDF15.

12. Thễ liên hợp theo điểm 8 hoặc 10, hoặc amit, este hoặc muối được dựng của nó, trong đó thễ liên hợp này có công thức G hoặc công thức H:



công thức G



công thức H

trong đó AHA-hGDF15 là SEQ ID NO: 7 và axit béo được nối qua cầu nối ở đầu N của một hoặc của hai đơn vị monome AHA-hGDF15 và trong đó đường kẻ giữa hai đơn vị AHA-hGDF15 là cầu disulfua.

13. Hỗn hợp bao gồm thể liên hợp theo điểm 12 có công thức G, hoặc amit, este hoặc muối được dụng của nó, và thể liên hợp theo điểm 12 có công thức H, hoặc amit, este hoặc muối được dụng của nó.

14. Hỗn hợp theo điểm 13, trong đó hỗn hợp này có tỷ lệ mol 1:1 của thể liên hợp có công thức G, hoặc amit, este hoặc muối được dụng của nó, và thể liên hợp có công thức H, hoặc amit, este hoặc muối được dụng của nó.

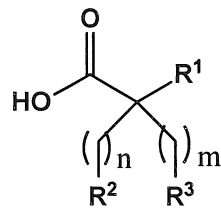
15. Tổ hợp bao gồm lượng có hiệu quả điều trị bệnh của thể liên hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1 đến 8, 10, 11 hoặc 12, hoặc amit, este hoặc muối được dụng của nó, hoặc hỗn hợp của thể liên hợp theo điểm 9, 13 hoặc 14, hoặc amit, este hoặc muối được dụng của nó; và một hoặc nhiều đồng hoạt chất có hoạt tính điều trị bệnh.

16. Tổ hợp theo điểm 15, trong đó đồng hoạt chất được chọn từ chất chống tiểu đường, chất giảm lipid, chất chống béo phì, chất chống tăng huyết áp, và chất chủ vận của thụ thể chất hoạt hóa -chất tăng sinh peroxisom.

17. Tổ hợp theo điểm 16, trong đó đồng hoạt chất được chọn từ insulin, chất dẫn xuất insulin và chất bắt chước insulin; chất kích thích bài tiết insulin; glyburit, amaryl; phối tử thụ thể sulfonylure kích thích tiết insulin; thiazolidindion, pioglitazon, balaglitazon, rivoglitazon, netoglitazon, troglitazon, englitazon, ciglitazon, adaglitazon, darglitazon, chất ức chế protein chuyển este colesteryl (CETP), chất ức chế GSK3 (glycogen syntaza kinaza-3); phối tử RXR; chất ức chế đồng vận chuyển glucoza phụ thuộc natri; chất ức chế glycogen phosphorylaza A; biguanit; chất ức chế alpha-glucosidaza, GLP-1 (peptit tương tự glucagon-1), chất tương tự GLP-1, chất bắt chước GLP-1; chất ức chế DPPIV (dipeptidyl peptidaza IV), chất ức chế 3-hydroxy-3-metyl-glutaryl coenzym A (HMG-CoA) reductaza; chất ức chế squalen syntaza; FXR (thụ thể farnesoit X), phối tử LXR (thụ thể X của gan); cholestyramin; fibrat; axit nicotinic, aspirin; orlistat hoặc rimonabant; chất lợi niệu vòng, furosemit, torsemit; chất ức chế enzym chuyển hóa angiotensin (ACE); chất ức chế bơm màng Na-K-ATPaza; chất ức chế neutralendopeptidaza (NEP); chất ức chế ACE/NEP; chất đối kháng angiotensin II; chất ức chế renin; chất chặn thụ thể tiết adrenalin β ; chất co cơ, dobutamin, milrinon; chất chặn kênh canxi; chất đối kháng thụ thể aldosteron; chất ức chế aldosteron syntaza; fenofibrat, pioglitazon, rosiglitazon, tesaglitazar, BMS-298585 và L-796449.

18. Dược phẩm bao gồm lượng có hiệu quả điều trị bệnh của thể liên hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1 đến 8, 10, 11 hoặc 12, hoặc amit, este hoặc muối được dụng của nó; hoặc hỗn hợp của thể liên hợp theo điểm 9, 13 hoặc 14, hoặc amit, este hoặc muối được dụng của nó, và một hoặc nhiều chất mang được dụng.

19. Hợp chất có công thức:



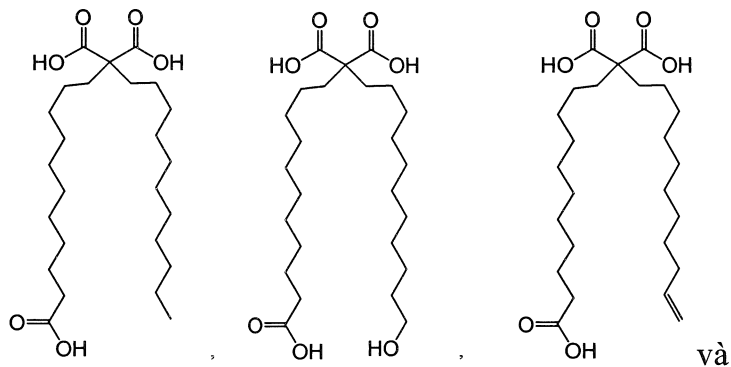
A1

R^1 là CO_2H ;

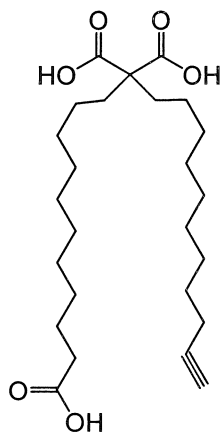
R^2 và R^3 độc lập với nhau là H, OH, CO_2H , $-\text{CH}=\text{CH}_2$ or $-\text{C}=\text{CH}$; với điều kiện là R^2 và R^3 không giống nhau;

n và m độc lập với nhau là số nguyên từ 6 đến 30; hoặc amit, este hoặc muối được dựng của nó.

20. Hợp chất theo điểm 19, trong đó hợp chất này được chọn từ nhóm bao gồm:

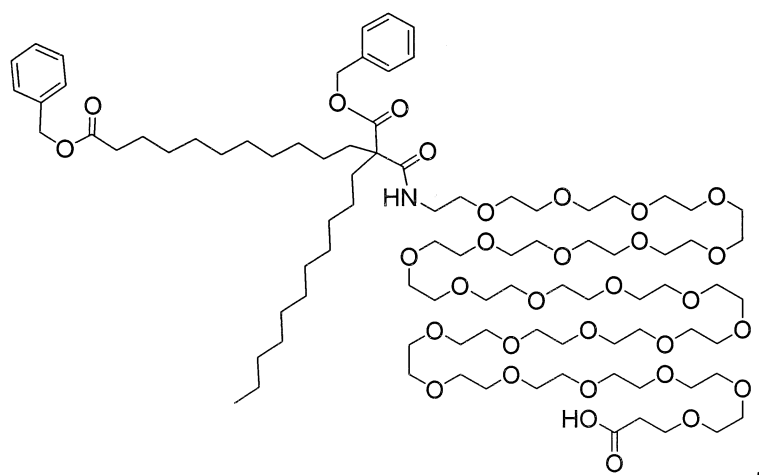
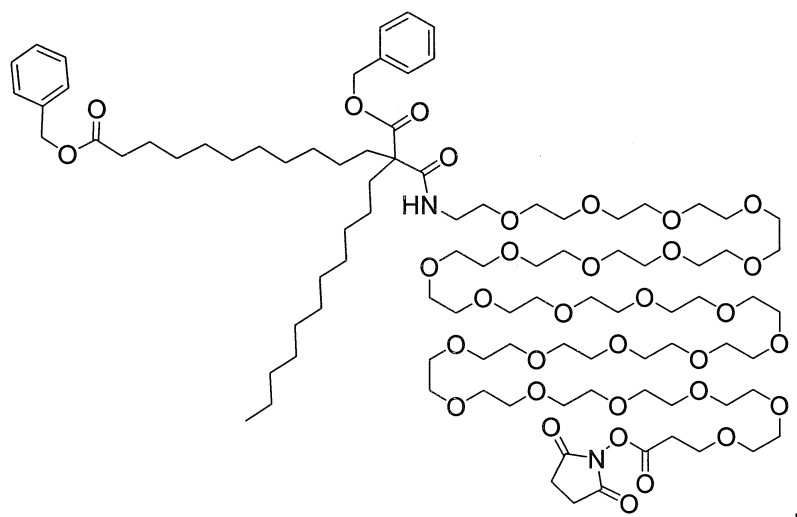
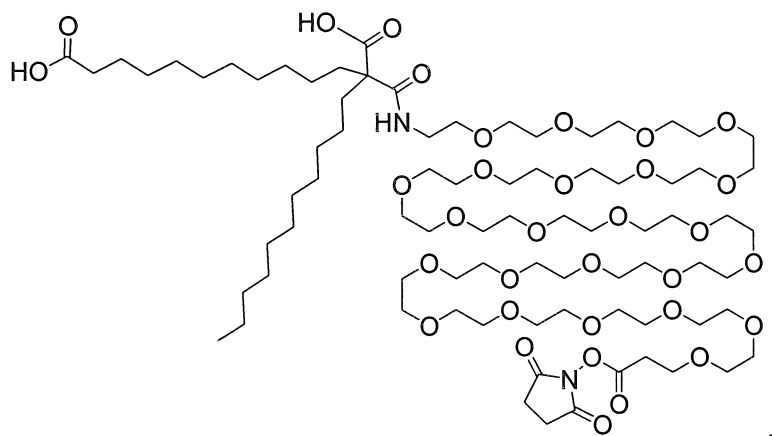


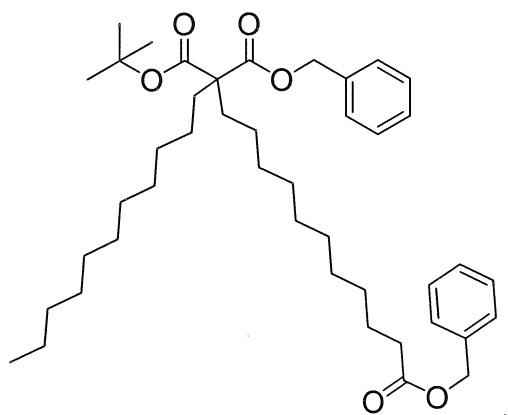
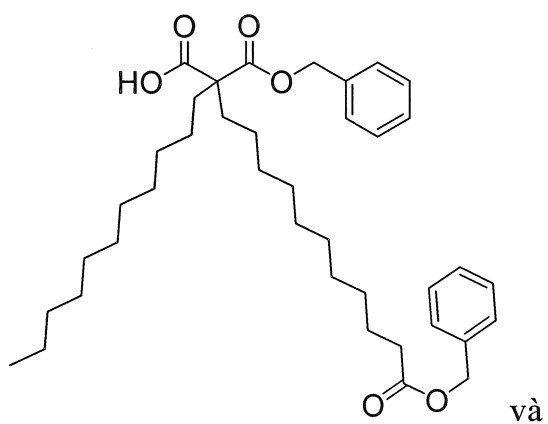
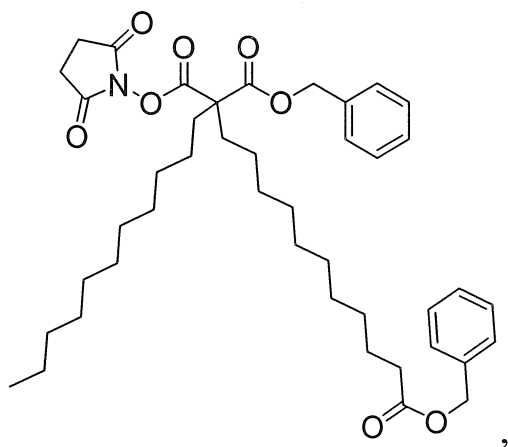
và



hoặc amit, este hoặc muối được dựng của nó.

21. Hợp chất được chọn từ:





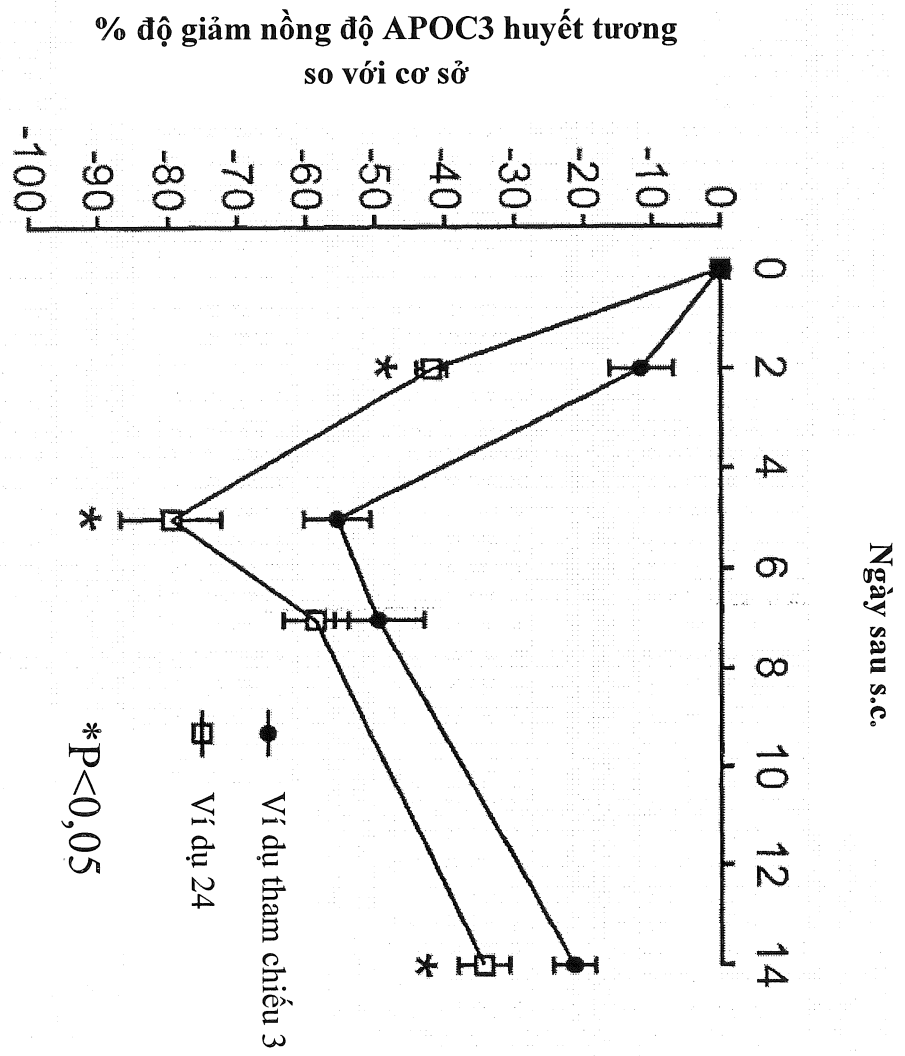


FIG. 1

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> NOVARTIS AG

<120> Thể liên hợp bao gồm phân tử sinh học được nối với axit béo, được phẩm và tổ hợp chứa thể liên hợp này

<130> PAT056274

<140>

<141>

<150> PCT/US2015/036328

<151> 2015-06-18

<150> 62/107,016

<151> 2015-01-23

<150> 62/082,327

<151> 2014-11-20

<150> 62/015,862

<151> 2014-06-23

<160> 36

<170> PatentIn version 3.5

 $\langle 210 \rangle$ 1

<211> 119

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

 $\langle 220 \rangle$

<223> Mô tả Trình tự Nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

 $\langle 400 \rangle$ 1

Met His His His His His His Ala Arg Asn Gly Asp His Cys Pro
Leu

1 5 10 15

Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg Leu His Thr Val Arg Ala Ser Leu
Glu

20 25 30

Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln
Val

35 40 45

Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn
Met
50 55 60

His Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr
Val
65 70 75 80

Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu
Ile
85 90 95

Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu
Leu
100 105 110

Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
115

<210> 2
<211> 120
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Mô tả Trình tự Nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<400> 2
Met His His His His His His Met Ala Arg Asn Gly Asp His Cys
Pro
1 5 10 15

Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg Leu His Thr Val Arg Ala Ser
Leu
20 25 30

Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser Pro Arg Glu Val
Gln
35 40 45

Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala
Asn
50 55 60

Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg Leu Lys Pro Asp
 Thr
 65 70 75 80

Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val
 Leu
 85 90 95

Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp
 Leu
 100 105 110

Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
 115 120

<210> 3
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Trình tự Nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả Trình tự Nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<400> 3
 Met His His His His His His Ala His Ala Arg Asp Gly Cys Pro
 Leu
 1 5 10 15

Gly Glu Gly Arg Cys Cys Arg Leu Gln Ser Leu Arg Ala Ser Leu
 Gln
 20 25 30

Asp Leu Gly Trp Ala Asn Trp Val Val Ala Pro Arg Glu Leu Asp
 Val
 35 40 45

Arg Met Cys Val Gly Ala Cys Pro Ser Gln Phe Arg Ser Ala Asn
 Thr
 50 55 60

His Ala Gln Met Gln Ala Arg Leu His Gly Leu Asn Pro Asp Ala
 Ala
 65 70 75 80

Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr Glu Pro Val Val Leu
Met
85 90 95

His Gln Asp Ser Asp Gly Arg Val Ser Leu Thr Pro Phe Asp Asp
Leu
100 105 110

Val Ala Lys Asp Cys His Cys Val
115 120

<210> 4
<211> 112
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Mô tả Trình tự Nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<400> 4
Met His Asn Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys
Arg
1 5 10 15

Leu His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp
Trp
20 25 30

Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala
Cys
35 40 45

Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr
Ser
50 55 60

Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val
Pro
65 70 75 80

Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly
Val
85 90 95

Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys
 Ile
 100 105 110

<210> 5
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Trình tự Nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả Trình tự Nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<400> 5
 Ala His Asn Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys
 Arg
 1 5 10 15

Leu His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp
 Trp
 20 25 30

Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala
 Cys
 35 40 45

Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr
 Ser
 50 55 60

Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val
 Pro
 65 70 75 80

Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly
 Val
 85 90 95

Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys
 Ile
 100 105 110

<210> 6
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Mô tả Trình tự Nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<400> 6

Met His Ala Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys
Arg

1 5 10 15

Leu His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp
Trp

20 25 30

Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala
Cys

35 40 45

Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr
Ser

50 55 60

Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val
Pro

65 70 75 80

Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly
Val

85 90 95

Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys
Ile

100 105 110

<210> 7

<211> 112

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Mô tả Trình tự Nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<400> 7

Ala His Ala Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys
Arg

1 5 10 15

Leu His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp
 Trp
 20 25 30

Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala
 Cys
 35 40 45

Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr
 Ser
 50 55 60

Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val
 Pro
 65 70 75 80

Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly
 Val
 85 90 95

Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys
 Ile
 100 105 110

<210> 8
 <211> 227
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 8
 Tyr Pro Asn Ala Ser Pro Leu Leu Gly Ser Ser Trp Gly Gly Leu
 Ile
 1 5 10 15

His Leu Tyr Thr Ala Thr Ala Arg Asn Ser Tyr His Leu Gln Ile
 His
 20 25 30

Lys Asn Gly His Val Asp Gly Ala Pro His Gln Thr Ile Tyr Ser
 Ala
 35 40 45

Leu Met Ile Arg Ser Glu Asp Ala Gly Phe Val Val Ile Thr Gly
 Val
 50 55 60

Met Ser Arg Arg Tyr Leu Cys Met Asp Phe Arg Gly Asn Ile Phe
 Gly
 65 70 75 80

Ser His Tyr Phe Asp Pro Glu Asn Cys Arg Phe Gln His Gln Thr
 Leu
 85 90 95

Glu Asn Gly Tyr Asp Val Tyr His Ser Pro Gln Tyr His Phe Leu
 Val
 100 105 110

Ser Leu Gly Arg Ala Lys Arg Ala Phe Leu Pro Gly Met Asn Pro
 Pro
 115 120 125

Pro Tyr Ser Gln Phe Leu Ser Arg Arg Asn Glu Ile Pro Leu Ile
 His
 130 135 140

Phe Asn Thr Pro Ile Pro Arg Arg His Thr Arg Ser Ala Glu Asp
 Asp
 145 150 155
 160

Ser Glu Arg Asp Pro Leu Asn Val Leu Lys Pro Arg Ala Arg Met
 Thr
 165 170 175

Pro Ala Pro Ala Ser Cys Ser Gln Glu Leu Pro Ser Ala Glu Asp
 Asn
 180 185 190

Ser Pro Met Ala Ser Asp Pro Leu Gly Val Val Arg Gly Gly Arg
 Val
 195 200 205

Asn Thr His Ala Gly Gly Thr Gly Pro Glu Gly Cys Arg Pro Phe
 Ala

```

210                               215                               220

Lys Phe Ile
225

<210> 9
<211> 251
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 9
Met Leu Gly Ala Arg Leu Arg Leu Trp Val Cys Ala Leu Cys Ser
Val
1                               5                               10                               15

Cys Ser Met Ser Val Leu Arg Ala Tyr Pro Asn Ala Ser Pro Leu
Leu
                               20                               25                               30

Gly Ser Ser Trp Gly Gly Leu Ile His Leu Tyr Thr Ala Thr Ala
Arg
                               35                               40                               45

Asn Ser Tyr His Leu Gln Ile His Lys Asn Gly His Val Asp Gly
Ala
                               50                               55                               60

Pro His Gln Thr Ile Tyr Ser Ala Leu Met Ile Arg Ser Glu Asp
Ala
65                               70                               75                               80

Gly Phe Val Val Ile Thr Gly Val Met Ser Arg Arg Tyr Leu Cys
Met
                               85                               90                               95

Asp Phe Arg Gly Asn Ile Phe Gly Ser His Tyr Phe Asp Pro Glu
Asn
                               100                              105                              110

Cys Arg Phe Gln His Gln Thr Leu Glu Asn Gly Tyr Asp Val Tyr
His
                               115                              120                              125

```

Ser Pro Gln Tyr His Phe Leu Val Ser Leu Gly Arg Ala Lys Arg
Ala
130 135 140

Phe Leu Pro Gly Met Asn Pro Pro Pro Tyr Ser Gln Phe Leu Ser
Arg
145 150 155
160

Arg Asn Glu Ile Pro Leu Ile His Phe Asn Thr Pro Ile Pro Arg
Arg
165 170 175

His Thr Arg Ser Ala Glu Asp Asp Ser Glu Arg Asp Pro Leu Asn
Val
180 185 190

Leu Lys Pro Arg Ala Arg Met Thr Pro Ala Pro Ala Ser Cys Ser
Gln
195 200 205

Glu Leu Pro Ser Ala Glu Asp Asn Ser Pro Met Ala Ser Asp Pro
Leu
210 215 220

Gly Val Val Arg Gly Gly Arg Val Asn Thr His Ala Gly Gly Thr
Gly
225 230 235
240

Pro Glu Gly Cys Arg Pro Phe Ala Lys Phe Ile
245 250

<210> 10
<211> 228
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Mô tả Trình tự Nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<400> 10
Met Tyr Pro Asn Ala Ser Pro Leu Leu Gly Ser Ser Trp Gly Gly
Leu
1 5 10 15

Ile His Leu Tyr Thr Ala Thr Ala Arg Asn Ser Tyr His Leu Gln
Ile

20

25

30

His Lys Asn Gly His Val Asp Gly Ala Pro His Gln Thr Ile Tyr
Ser

35

40

45

Ala Leu Met Ile Arg Ser Glu Asp Ala Gly Phe Val Val Ile Thr
Gly

50

55

60

Val Met Ser Arg Arg Tyr Leu Cys Met Asp Phe Arg Gly Asn Ile
Phe

65

70

75

80

Gly Ser His Tyr Phe Asp Pro Glu Asn Cys Arg Phe Gln His Gln
Thr

85

90

95

Leu Glu Asn Gly Tyr Asp Val Tyr His Ser Pro Gln Tyr His Phe
Leu

100

105

110

Val Ser Leu Gly Arg Ala Lys Arg Ala Phe Leu Pro Gly Met Asn
Pro

115

120

125

Pro Pro Tyr Ser Gln Phe Leu Ser Arg Arg Asn Glu Ile Pro Leu
Ile

130

135

140

His Phe Asn Thr Pro Ile Pro Arg Arg His Thr Gln Ser Ala Glu
Asp

145

150

155

160

Asp Ser Glu Arg Asp Pro Leu Asn Val Leu Lys Pro Arg Ala Arg
Met

165

170

175

Thr Pro Ala Pro Ala Ser Cys Ser Gln Glu Leu Pro Ser Ala Glu
 Asp
 180 185 190

Asn Ser Pro Met Ala Ser Asp Pro Leu Gly Val Val Arg Gly Gly
 Arg
 195 200 205

Val Asn Thr His Ala Gly Gly Thr Gly Pro Glu Gly Cys Arg Pro
 Phe
 210 215 220

Ala Lys Phe Ile
 225

<210> 11
 <211> 146
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 11
 Met Arg Leu Leu Gln Leu Leu Phe Arg Ala Ser Pro Ala Thr Leu
 Leu
 1 5 10 15

Leu Val Leu Cys Leu Gln Leu Gly Ala Asn Lys Ala Gln Asp Asn
 Thr
 20 25 30

Arg Lys Ile Ile Ile Lys Asn Phe Asp Ile Pro Lys Ser Val Arg
 Pro
 35 40 45

Asn Asp Glu Val Thr Ala Val Leu Ala Val Gln Thr Glu Leu Lys
 Glu
 50 55 60

Cys Met Val Val Lys Thr Tyr Leu Ile Ser Ser Ile Pro Leu Gln
 Gly
 65 70 75 80

Ala Phe Asn Tyr Lys Tyr Thr Ala Cys Leu Cys Asp Asp Asn Pro
 Lys
 85 90 95

Thr Phe Tyr Trp Asp Phe Tyr Thr Asn Arg Thr Val Gln Ile Ala
Ala

100

105

110

Val Val Asp Val Ile Arg Glu Leu Gly Ile Cys Pro Asp Asp Ala
Ala

115

120

125

Val Ile Pro Ile Lys Asn Asn Arg Phe Tyr Thr Ile Glu Ile Leu
Lys

130

135

140

Val Glu
145

<210> 12

<211> 118

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

Gln Asp Asn Thr Arg Lys Ile Ile Ile Lys Asn Phe Asp Ile Pro
Lys

1

5

10

15

Ser Val Arg Pro Asn Asp Glu Val Thr Ala Val Leu Ala Val Gln
Thr

20

25

30

Glu Leu Lys Glu Cys Met Val Val Lys Thr Tyr Leu Ile Ser Ser
Ile

35

40

45

Pro Leu Gln Gly Ala Phe Asn Tyr Lys Tyr Thr Ala Cys Leu Cys
Asp

50

55

60

Asp Asn Pro Lys Thr Phe Tyr Trp Asp Phe Tyr Thr Asn Arg Thr
Val

65

70

75

80

Gln Ile Ala Ala Val Val Asp Val Ile Arg Glu Leu Gly Ile Cys
Pro
85 90 95

Asp Asp Ala Ala Val Ile Pro Ile Lys Asn Asn Arg Phe Tyr Thr
Ile
100 105 110

Glu Ile Leu Lys Val Glu
115

<210> 13
<211> 125
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Mô tả Trình tự Nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<400> 13
Met His His His His His His Gln Asp Asn Thr Arg Lys Ile Ile
Ile
1 5 10 15

Lys Asn Phe Asp Ile Pro Lys Ser Val Arg Pro Asn Asp Glu Val
Thr
20 25 30

Ala Val Leu Ala Val Gln Thr Glu Leu Lys Glu Cys Met Val Val
Lys
35 40 45

Thr Tyr Leu Ile Ser Ser Ile Pro Leu Gln Gly Ala Phe Asn Tyr
Lys
50 55 60

Tyr Thr Ala Cys Leu Cys Asp Asp Asn Pro Lys Thr Phe Tyr Trp
Asp
65 70 75 80

Phe Tyr Thr Asn Arg Thr Val Gln Ile Ala Ala Val Val Asp Val
Ile
85 90 95

Arg Glu Leu Gly Ile Cys Pro Asp Asp Ala Ala Val Ile Pro Ile
Lys
100 105 110

Asn Asn Arg Phe Tyr Thr Ile Glu Ile Leu Lys Val Glu
115 120 125

<210> 14
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 14
Cys Tyr Ile Gln Asn Cys Pro Leu Gly
1 5

<210> 15
<211> 126
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Mô tả Trình tự Nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<400> 15
Met His His His His His His His Gln Asp Asn Thr Arg Lys Ile
Ile
1 5 10 15

Ile Lys Asn Phe Asp Ile Pro Lys Ser Val Arg Pro Asn Asp Glu
Val
20 25 30

Thr Ala Val Leu Ala Val Gln Thr Glu Leu Lys Glu Cys Met Val
Val
35 40 45

Lys Thr Tyr Leu Ile Ser Ser Ile Pro Leu Gln Gly Ala Phe Asn
Tyr
50 55 60

Lys Tyr Thr Ala Cys Leu Cys Asp Asp Asn Pro Lys Thr Phe Tyr
Trp
65 70 75 80

Asp Phe Tyr Thr Asn Arg Thr Val Gln Ile Ala Ala Val Val Asp
Val
85 90 95

Ile Arg Glu Leu Gly Ile Cys Pro Asp Asp Ala Ala Val Ile Pro
Ile
100 105 110

Lys Asn Asn Arg Phe Tyr Thr Ile Glu Ile Leu Lys Val Glu
115 120 125

<210> 16
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Mô tả Trình tự Nhân tạo: polyhistidin tag tổng hợp
<400> 16
Met His His His His His His Met
1 5

<210> 17
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Mô tả Trình tự Nhân tạo: polyhistidin tag tổng hợp
<400> 17
Met His His His His His His
1 5

<210> 18
<211> 13
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Mô tả Trình tự Nhân tạo: Peptit tổng hợp

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> Pyroglutamat

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (6)..(12)
 <223> Liên kết disulfua giữa các gốc

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (11)..(11)
 <223> Norleuxin

<220>
 <223> OH đầu C

<400> 18
 Xaa Arg Pro Arg Leu Cys His Lys Gly Pro Xaa Cys Phe
 1 5 10

<210> 19
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Trình tự Nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả Trình tự Nhân tạo: Peptit tổng hợp

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Pyroglutamat

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (6)..(12)
 <223> Liên kết disulfua giữa các gốc

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (8)..(8)
 <223> Lys-N6-[[(1-alpha,8-alpha,9-alpha)-bixyclo[6.1.0]non-4-yn-9-ylmetoxy]carbonyl]

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (11)..(11)
 <223> Norleuxin

<220>
 <223> OH đầu C

<400> 19

Xaa Arg Pro Arg Leu Cys His Lys Gly Pro Xaa Cys Phe
 1 5 10

<210> 20

<211> 19

<212> ARN

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Mô tả Trình tự Nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp

<220>

<223> 5'-phosphat

<220>

<221> bazơ được cải biến

<222> (1)..(2)

<223> nucleotit được cải biến 2'-floro

<220>

<221> bazơ được cải biến

<222> (3)..(3)

<223> nucleotit được cải biến 2'-O

<220>

<221> bazơ được cải biến

<222> (4)..(4)

<223> nucleotit được cải biến 2'-floro

<220>

<221> bazơ được cải biến

<222> (5)..(5)

<223> nucleotit được cải biến 2'-O

<220>

<221> bazơ được cải biến

<222> (6)..(6)

<223> nucleotit được cải biến 2'-floro

<220>

<221> bazơ được cải biến

<222> (7)..(7)

<223> nucleotit được cải biến 2'-O

<220>

<221> bazơ được cải biến

<222> (8)..(8)

<223> nucleotit được cải biến 2'-floro

<220>

<221> bazơ được cải biến

<222> (9)..(9)
 <223> nucleotit được cải biến 2'-O

 <220>
 <221> bazơ được cải biến
 <222> (10)..(10)
 <223> nucleotit được cải biến 2'-floro

 <220>
 <221> bazơ được cải biến
 <222> (11)..(11)
 <223> nucleotit được cải biến 2'-O

 <220>
 <221> bazơ được cải biến
 <222> (12)..(12)
 <223> nucleotit được cải biến 2'-floro

 <220>
 <221> bazơ được cải biến
 <222> (13)..(13)
 <223> nucleotit được cải biến 2'-O

 <220>
 <221> bazơ được cải biến
 <222> (14)..(14)
 <223> nucleotit được cải biến 2'-floro

 <220>
 <221> bazơ được cải biến
 <222> (15)..(15)
 <223> nucleotit được cải biến 2'-O

 <220>
 <221> bazơ được cải biến
 <222> (16)..(16)
 <223> nucleotit được cải biến 2'-floro

 <220>
 <221> bazơ được cải biến
 <222> (17)..(18)
 <223> nucleotit được cải biến 2'-MOE

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (17)..(18)
 <223> Liên kết phosphorothioat

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (18)..(19)
 <223> Liên kết phosphorothioat

<220>
 <221> bazơ được cải biến
 <222> (19)..(19)
 <223> nucleotit ribitol mất bazơ

<220>
 <223> đầu mũ 3'-X058

<400> 20
 uagagcaaga acacuguun
 19

<210> 21
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Trình tự Nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả Trình tự Nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp

<220>
 <221> bazơ được cải biến
 <222> (1)..(3)
 <223> nucleotit được cải biến 2'-O

<220>
 <221> bazơ được cải biến
 <222> (4)..(4)
 <223> nucleotit được cải biến 2'-floro

<220>
 <221> bazơ được cải biến
 <222> (5)..(5)
 <223> nucleotit được cải biến 2'-O

<220>
 <221> bazơ được cải biến
 <222> (6)..(6)
 <223> nucleotit được cải biến 2'-floro

<220>
 <221> bazơ được cải biến
 <222> (7)..(7)
 <223> nucleotit được cải biến 2'-O

<220>
 <221> bazơ được cải biến
 <222> (8)..(8)
 <223> nucleotit được cải biến 2'-floro

<220>

<221> bazơ được cải biến
 <222> (9)..(9)
 <223> nucleotit được cải biến 2'-O

 <220>
 <221> bazơ được cải biến
 <222> (10)..(10)
 <223> nucleotit được cải biến 2'-floro

 <220>
 <221> bazơ được cải biến
 <222> (11)..(11)
 <223> nucleotit được cải biến 2'-O

 <220>
 <221> bazơ được cải biến
 <222> (12)..(12)
 <223> nucleotit được cải biến 2'-floro

 <220>
 <221> bazơ được cải biến
 <222> (13)..(13)
 <223> nucleotit được cải biến 2'-O

 <220>
 <221> bazơ được cải biến
 <222> (14)..(14)
 <223> nucleotit được cải biến 2'-floro

 <220>
 <221> bazơ được cải biến
 <222> (15)..(15)
 <223> nucleotit được cải biến 2'-O

 <220>
 <221> bazơ được cải biến
 <222> (16)..(16)
 <223> nucleotit được cải biến 2'-floro

 <220>
 <221> bazơ được cải biến
 <222> (17)..(18)
 <223> nucleotit được cải biến 2'-MOE

 <220>
 <221> bazơ được cải biến
 <222> (19)..(19)
 <223> Nucleotit ribitol mất bazơ

 <220>
 <223> đầu mũ 3'-C6OH

 <400> 21

aacaguguuc uugcucuan
19

<210> 22
<211> 500
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Mô tả Trình tự Nhân tạo: Synthetic
polypeptide

<400> 22
Gly Ala Asp Asp Val Val Asp Ser Ser Lys Ser Phe Val Met Glu
Asn
1 5 10 15

Phe Ser Ser Tyr His Gly Thr Lys Pro Gly Tyr Val Asp Ser Ile
Gln
20 25 30

Lys Gly Ile Gln Lys Pro Lys Ser Gly Thr Gln Gly Asn Tyr Asp
Asp
35 40 45

Asp Trp Lys Glu Phe Tyr Ser Thr Asp Asn Lys Tyr Asp Ala Ala
Gly
50 55 60

Tyr Ser Val Asp Asn Glu Asn Pro Leu Ser Gly Lys Ala Gly Gly
Val
65 70 75 80

Val Lys Val Thr Tyr Pro Gly Leu Thr Lys Val Leu Ala Leu Lys
Val
85 90 95

Asp Asn Ala Glu Thr Ile Lys Lys Glu Leu Gly Leu Ser Leu Thr
Glu
100 105 110

Pro Leu Met Glu Gln Val Gly Thr Glu Glu Phe Ile Lys Arg Phe
Gly
115 120 125

Asp Gly Ala Ser Arg Val Val Leu Ser Leu Pro Phe Ala Glu Gly
 Ser
 130 135 140

Ser Ser Val Glu Tyr Ile Asn Asn Trp Glu Gln Ala Lys Ala Leu
 Ser
 145 150 155
 160

Val Glu Leu Glu Ile Asn Phe Glu Thr Arg Gly Lys Arg Gly Gln
 Asp
 165 170 175

Ala Met Tyr Glu Tyr Met Ala Gln Ala Cys Ala Gly Asn Arg Val
 Arg
 180 185 190

Arg Ser Val Gly Ser Ser Leu Ser Cys Ile Asn Leu Asp Trp Asp
 Val
 195 200 205

Ile Arg Asp Lys Thr Lys Thr Lys Ile Glu Ser Leu Lys Glu His
 Gly
 210 215 220

Pro Ile Lys Asn Lys Met Ser Glu Ser Pro Asn Lys Thr Val Ser
 Glu
 225 230 235
 240

Glu Lys Ala Lys Gln Tyr Leu Glu Glu Phe His Gln Thr Ala Leu
 Glu
 245 250 255

His Pro Glu Leu Ser Glu Leu Lys Thr Val Thr Gly Thr Asn Pro
 Val
 260 265 270

Phe Ala Gly Ala Asn Tyr Ala Ala Trp Ala Val Asn Val Ala Gln
 Val
 275 280 285

Ile Asp Ser Glu Thr Ala Asp Asn Leu Glu Lys Thr Thr Ala Ala
 Leu
 290 295 300

Ser Ile Leu Pro Gly Ile Gly Ser Val Met Gly Ile Ala Asp Gly
 Ala
 305 310 315
 320

Val His His Asn Thr Glu Glu Ile Val Ala Gln Ser Ile Ala Leu
 Ser
 325 330 335

Ser Leu Met Val Ala Gln Ala Ile Pro Leu Val Gly Glu Leu Val
 Asp
 340 345 350

Ile Gly Phe Ala Ala Tyr Asn Phe Val Glu Ser Ile Ile Asn Leu
 Phe
 355 360 365

Gln Val Val His Asn Ser Tyr Asn Arg Pro Ala Tyr Ser Pro Gly
 His
 370 375 380

Lys Thr Gln Pro Phe Leu His Asp Gly Tyr Ala Val Ser Trp Asn
 Thr
 385 390 395
 400

Val Glu Asp Ser Ile Ile Arg Thr Gly Phe Gln Gly Glu Ser Gly
 His
 405 410 415

Asp Ile Lys Ile Thr Ala Glu Asn Thr Pro Leu Pro Ile Ala Gly
 Val
 420 425 430

Leu Leu Pro Thr Ile Pro Gly Lys Leu Asp Val Asn Lys Ser Lys
 Thr
 435 440 445

His Ile Ser Val Asn Gly Arg Lys Ile Arg Met Arg Cys Arg Ala
 Ile
 450 455 460

Asp Gly Asp Val Thr Phe Cys Arg Pro Lys Ser Pro Val Tyr Val
 Gly
 465 470 475
 480

Asn Gly Val His Ala Asn Leu His Val Ala Phe His Arg Ser Ser
 Ser
 485 490 495

Glu Lys Ile His
 500

<210> 23
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự Nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả Trình tự Nhân tạo: Peptit tổng hợp

<220>
 <223> đầu N- butyrat

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (6)..(6)
 <223> Gly(N-CH₂CH₂CH₂NH₂)

<220>
 <223> đầu C- NH₂

<400> 23
 Tyr Ile Gln Asn Cys Gly Leu Gly
 1 5

<210> 24
 <211> 50
 <212> PRT
 <213> Chưa biết

<220>
 <223> Mô tả chưa biết:

Trình tự peptit liên quan đến Agouti

<400> 24

Ser Ser Arg Arg Cys Val Arg Leu His Glu Ser Cys Leu Gly Gln
Gln

1 5 10 15

Val Pro Cys Cys Asp Pro Cys Ala Thr Cys Tyr Cys Arg Phe Phe
Asn

20 25 30

Ala Phe Cys Tyr Cys Arg Lys Leu Gly Thr Ala Met Asn Pro Cys
Ser

35 40 45

Arg Thr

50

<210> 25

<211> 20

<212> PRT

<213> Chưa biết

<220>

<223> Mô tả chưa biết:

Trình tự peptit liên quan đến Agouti

<400> 25

Ser Ser Arg Arg Cys Val Arg Leu His Glu Ser Cys Leu Gly Gln
Gln

1 5 10 15

Val Pro Cys Cys

20

<210> 26

<211> 53

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Mô tả Trình tự Nhân tạo: polypeptit tổng hợp

<400> 26

Asp Ser Trp Met Glu Glu Val Ile Lys Leu Cys Gly Arg Glu Leu
Val

1	5	10	15
Arg	Ala	Gln	Ile
Ala	Ile	Cys	Gly
Met	Ser	Thr	Trp
Ser	Cys	Phe	
Arg			
20	25	30	
Ala	Leu	Ser	Arg
Lys	Thr	Cys	Gly
Val	His	Cys	Cys
Lys	Asn	Ala	
Leu			
35	40	45	
Ala	Ser	Tyr	Leu
Glu			
50			

<210> 27
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Trình tự Nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả Trình tự Nhân tạo: Peptit tổng hợp

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (8)..(8)
 <223> Axit béo Lys

<400> 27
Cys Cys His Val Gly Cys Thr Lys Arg Ser Leu Ala Arg Phe Cys
1 5 10 15

<210> 28
 <211> 53
 <212> PRT
 <213> Trình tự Nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả Trình tự Nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (53)..(53)
 <223> Pyroglutamat

<400> 28

Asp Ser Trp Met Glu Glu Val Ile Lys Leu Cys Gly Arg Glu Leu
Val
1 5 10 15

Arg Ala Gln Ile Ala Ile Cys Gly Met Ser Thr Trp Ser Cys Phe
Arg
20 25 30

Ala Leu Ser Arg Lys Thr Cys Gly Val His Cys Cys Lys Asn Ala
Leu
35 40 45

Ala Ser Tyr Leu Xaa
50

<210> 29
<211> 145
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Mô tả Trình tự Nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<400> 29
Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val
Pro
1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Met His His His His His His Gln Asp Asn Thr
Arg
20 25 30

Lys Ile Ile Ile Lys Asn Phe Asp Ile Pro Lys Ser Val Arg Pro
Asn
35 40 45

Asp Glu Val Thr Ala Val Leu Ala Val Gln Thr Glu Leu Lys Glu
Cys
50 55 60

Met Val Val Lys Thr Tyr Leu Ile Ser Ser Ile Pro Leu Gln Gly
Ala
65 70 75 80

Phe Asn Tyr Lys Tyr Thr Ala Cys Leu Cys Asp Asp Asn Pro Lys
 Thr
 85 90 95

Phe Tyr Trp Asp Phe Tyr Thr Asn Arg Thr Val Gln Ile Ala Ala
 Val
 100 105 110

Val Asp Val Ile Arg Glu Leu Gly Ile Cys Pro Asp Asp Ala Ala
 Val
 115 120 125

Ile Pro Ile Lys Asn Asn Arg Phe Tyr Thr Ile Glu Ile Leu Lys
 Val
 130 135 140

Glu
 145

<210> 30
 <211> 454
 <212> DNA
 <213> Trình tự Nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả Trình tự Nhân tạo: Polynucleotit tổng hợp

<400> 30
 gctagccacc atggagactg atactttgtt gttgtgggta ctgttgcttt
 gggtagcccg 60

tagtaccggt atgcatcacc accaccatca ccaggacaac acccggaaga
 tcatcatcaa 120

gaacttcgac atccctaaga gcgtgcgccc aaacgatgaa gtcaccgcgg
 tgctggcagt 180

gcagactgag ctgaaggagt gcatgggtgt caagacgtac ctgatttcgt
 ccatcccgct 240

gcaaggcgcc ttcaactaca agtacactgc ctgcctctgt gacgacaacc
 ccaagacctt 300

ttactgggac ttctacacca atagaactgt ccagattgct gccgtgggtgg
 atgtgatcag 360

ggaattggga atttgccccg acgatgcggc cgtgattccg atcaagaaca
accgcttcta 420

taccatcgag atccttaaag tggaatgaga attc
454

<210> 31

<211> 6

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Mô tả Trình tự Nhân tạo: tag polyhistidin tổng hợp

<400> 31

Met His His His His His
1 5

<210> 32

<211> 13

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Mô tả Trình tự Nhân tạo: Peptit tổng hợp

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> Axit béo Met-

<400> 32

Met His His His His His His Gln Asp Asn Thr Arg Lys
1 5 10

<210> 33

<211> 25

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Mô tả Trình tự Nhân tạo: Peptit tổng hợp

<220>

<221> MOD_RES
 <222> (19)..(19)
 <223> Axit béo Lys-

<400> 33
 Ser Val Arg Pro Asn Asp Glu Val Thr Ala Val Leu Ala Val Gln
 Thr
 1 5 10 15

Glu Leu Lys Glu Cys Met Val Val Lys
 20 25

<210> 34
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Chưa biết

<220>
 <223> Mô tả chưa biết:
 Trình tự peptit liên quan đến Agouti

<400> 34
 Asp Pro Cys Ala Thr Cys Tyr Cys Arg Phe Phe Asn Ala Phe Cys
 Tyr
 1 5 10 15

Cys Arg Lys Leu Gly Thr Ala Met Asn Pro Cys Ser Arg Thr
 20 25 30

<210> 35
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Chưa biết

<220>
 <223> Mô tả chưa biết:
 Trình tự peptit liên quan đến Agouti

<220>
 <223> Xem Bản mô tả đã nộp cho sự mô tả chi tiết về các phần tử thể và các phương án ưu tiên

<400> 35
 Ser Ser Arg Arg Cys Val Arg Leu His Glu Ser Cys Leu Gly Gln
 Gln
 1 5 10 15

Val Pro Cys Cys

20

<210> 36

<211> 30

<212> PRT

<213> Chưa biết

<220>

<223> Mô tả chưa biết:

Trình tự peptit liên quan đến Agouti

<220>

<223> Xem Bản mô tả như đã được nộp cho sự mô tả chi tiết các phần tử thể và các phương án ưu tiên

<400> 36

Asp Pro Cys Ala Thr Cys Tyr Cys Arg Phe Phe Asn Ala Phe Cys
Tyr

1

5

10

15

Cys Arg Lys Leu Gly Thr Ala Met Asn Pro Cys Ser Arg Thr
20 25 30