



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

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

(11)



1-0031492

(51)⁸ A61K 38/00; C07K 14/605; A61P 3/00; (13) B
C07K 14/00; A61K 38/26; A61P 1/00

(21) 1-2017-04830

(22) 16/06/2016

(86) PCT/US2016/037818 16/06/2016

(87) WO2016/209707 29/12/2016

(30) 62/182,847 22/06/2015 US

(45) 25/04/2022 409

(43) 25/06/2018 363A

(73) ELI LILLY AND COMPANY (US)

Lilly Corporate Center, Indianapolis, Indiana 46285, United States of America

(72) CHEN, Yanyun (US); MEZO, Adam Robert (US); QU, Hongchang (CN);
VALENZUELA, Francisco Alcides (US).

(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) HỢP CHẤT ĐỒNG CHỦ VẬN GLUCAGON VÀ PEPTIT-1 GIỐNG GLUCAGON (GLP-1), QUY TRÌNH SẢN XUẤT CHÚNG, HỢP CHẤT TRUNG GIAN ĐƯỢC DÙNG TRONG QUY TRÌNH NÀY, VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA HỢP CHẤT NÀY

(57) Sáng chế đề xuất hợp chất đồng chủ vận glucagon và GLP-1 hữu hiệu trong điều trị bệnh tiểu đường typ 2, béo phì, bệnh gan nhiễm mỡ không do rượu (nonalcoholic fatty liver disease- NAFLD) và/hoặc viêm gan nhiễm mỡ không do rượu (nonalcoholic steatohepatitis - NASH). Sáng chế cũng đề xuất quy trình sản xuất các hợp chất này, các hợp chất trung gian được sử dụng trong quy trình này và dược phẩm chứa các hợp chất này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế thuộc lĩnh vực y tế. Cụ thể hơn, sáng chế thuộc lĩnh vực điều trị bệnh tiểu đường và béo phì và đề cập đến các hợp chất chủ vận đồng thời cả thụ thể glucagon (Gcg) và thụ thể peptit-1 giống glucagon (GLP-1). Cụ thể là, các chất tương tự oxyntomodulin/glucagon với các cải biến axit amin được đưa vào để điều chỉnh hoạt tính đối với cả thụ thể Gcg và thụ thể GLP-1.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Trong vài thập kỷ qua, tỷ lệ mắc bệnh tiểu đường tiếp tục gia tăng. Bệnh tiểu đường type 2 (T2D) là dạng bệnh tiểu đường phổ biến nhất chiếm xấp xỉ 90% trong tất cả các bệnh tiểu đường. T2D được phân biệt bởi mức glucoza trong máu cao do sự kháng insulin. Tiêu chuẩn chăm sóc hiện tại đối với T2D bao gồm chế độ ăn và tập luyện cùng với thuốc làm giảm mức glucoza hiện có dùng qua đường miệng hoặc tiêm. Tuy nhiên, nhiều bệnh nhân mắc T2D vẫn được kiểm soát một cách chưa thỏa đáng. Bệnh tiểu đường không được kiểm soát dẫn đến một số tình trạng bệnh ảnh hưởng đến tình trạng bệnh tật và tỷ lệ tử vong của bệnh nhân. Nguyên nhân hàng đầu gây tử vong cho bệnh nhân tiểu đường là biến chứng tim mạch. Một trong số các yếu tố nguy cơ chính đối với bệnh tiểu đường type 2 là béo phì. Phần lớn các bệnh nhân T2D (~90%) là quá cân hoặc béo phì. Đã chứng minh được rằng giảm sự phát phì cơ thể sẽ dẫn đến cải thiện các tình trạng bệnh tật xảy ra đồng thời có liên quan đến béo phì bao gồm các trường hợp tăng glucoza huyết và các trường hợp tim mạch. Vì vậy, các liệu pháp hữu hiệu trong điều chỉnh mức glucoza và giảm thể trọng là cần thiết để kiểm soát bệnh tốt hơn.

Một số peptit dẫn xuất từ tiền proglucagon, và các chất tương tự nó, đã được dự định dùng làm các chất trị liệu để điều trị T2D và béo phì, cụ thể là, Gcg, GLP-1 và oxyntomodulin (OXM). Pre-proglucagon là polypeptit tiền chất gồm 158 axit amin được tạo ra nhờ biệt hóa trong các mô để tạo thành một số peptit được tạo dẫn xuất từ proglucagon có liên quan về mặt cấu trúc, bao gồm Gcg, GLP-1, peptit-2

giống glucagon (GLP-2), và oxyntomodulin (OXM). Các phân tử này có liên quan đến nhiều chức năng sinh lý khác nhau, bao gồm sự cân bằng glucoza nội mô, sự tiết insulin, làm rộng dạ dày và sự sinh trưởng bên trong ruột, cũng như là điều chỉnh sự hấp thu thức ăn.

Gcg là peptit gồm 29 axit amin tương ứng với các axit amin từ 53 đến 81 của preproglucagon. OXM là peptit gồm 37 axit amin và bao gồm toàn bộ trình tự gồm 29 axit amin của Gcg với một đoạn mở rộng octapeptit ở đầu tận cùng carboxy (các axit amin từ 82 đến 89 của pre-proglucagon và được gọi là "peptit 1 xen giữa" hoặc IP-1). Đoạn có hoạt tính sinh học chính của GLP-1 (GLP-1₇₋₃₆) được tạo ra dưới dạng peptit gồm 30 axit amin, được amit hóa ở đầu tận cùng C, tương ứng với các axit amin từ 98 đến 127 của pre-proglucagon.

Gcg giúp duy trì mức glucoza trong máu bằng cách gắn kết với thụ thể Gcgs trên tế bào gan, khiến cho gan giải phóng glucoza - đã được dự trữ ở dạng glycogen - thông qua quá trình phân giải glycogen. Khi những lượng dự trữ này trở nên suy kiệt, Gcg kích thích gan tổng hợp tiếp glucoza bằng cách kích thích tạo glucoza. Glucoza này được giải phóng vào dòng máu, ngăn ngừa sự phát triển hạ đường huyết.

GLP-1 có các hoạt tính sinh học khác so với Gcg. Hoạt động của nó bao gồm kích thích tổng hợp và tiết insulin, ức chế sự tiết Gcg và ức chế sự hấp thu thức ăn. GLP-1 đã được nhận thấy là làm giảm sự tăng glucoza huyết ở những người mắc bệnh tiểu đường. Một vài chất chủ vận GLP-1 đã được phê chuẩn để dùng trong điều trị T2D ở người, bao gồm exenatide, liraglutide, lixisenatide, albiglutide và dulaglutide. Các chất chủ vận GLP-1 như vậy là hữu hiệu trong điều chỉnh lượng glucoza huyết với tác động có lợi đến thể trọng mà không gây ra nguy cơ hạ đường huyết. Tuy nhiên, sự giảm thể trọng ở mức phải chăng do các tác dụng phụ ở dạ dày-ruột theo cách phụ thuộc liều.

OXM được giải phóng cùng với GLP-1 từ các tế bào L của ruột non tương xứng với sự tiêu thụ chất dinh dưỡng. OXM hoạt hóa cả thụ thể Gcg và GLP-1, với khả năng hoạt hóa đối với thụ thể Gcg cao hơn một chút so với thụ thể GLP-1. Nó ít có hiệu lực hơn Gcg và GLP-1 nguyên thể trên các thụ thể tương ứng của chúng. Gcg người cũng có khả năng hoạt hóa cả hai thụ thể, mặc dù có sự ưu tiên hơn đối với thụ thể Gcg so với thụ thể GLP-1. GLP-1 không có khả năng hoạt hóa các thụ

thể Gcg. OXM tham gia vào việc điều chỉnh sự hấp thu thức ăn và thể trọng. Nó được thể hiện là ngăn chặn sự thèm ăn và ức chế sự hấp thu thức ăn ở người. Trong nghiên cứu trong 4 tuần với các đối tượng thừa cân và béo phì, việc dùng OXM dưới da ba lần mỗi ngày trước bữa ăn tạo ra sự giảm trọng lượng 2,3 kg so với 0,5 kg ở nhóm giả dược. Trong thử nghiệm này, buồn nôn, tác dụng phụ thường gặp nhất có liên quan đến liệu pháp trên cơ sở GLP-1 (như exenatide và liraglutide), là ít xảy ra hơn. Trong một nghiên cứu ngắn gọn hơn, OXM được chỉ ra là làm giảm lượng calo lấy vào và gia tăng mức tiêu thụ năng lượng có liên quan đến hoạt động ở các đối tượng thừa cân và béo phì.

Dữ liệu này gợi ý rằng OXM có khả năng trở thành chất chống tiểu đường/béo phì được dung nạp tốt. Tuy nhiên, OXM bộc lộ một số khó khăn để có thể phát triển thành chất trị liệu có thể tồn tại về phương diện thương mại. OXM nội sinh bị phân hủy nhanh chóng *in vivo* bởi dipeptidyl peptidaza IV và các peptidaza khác cũng như bị thanh thải nhanh chóng qua thận do kích cỡ nhỏ của nó. Vì vậy, mong muốn nhận diện các peptit mà hoạt hóa các thụ thể Gcg và GLP-1 với độ ổn định chuyển hóa tốt hơn và tốc độ thanh thải là giảm.

Các peptit OXM với các thay thế axit amin để cải thiện độ ổn định và với các cải biến khác nữa để làm chậm sự thanh thải, như PEGyl hóa hoặc lipit hóa, được bộc lộ trước đây. Các peptit khác đã được chỉ ra là gắn kết với và hoạt hóa cả hai thụ thể Gcg và thụ thể GLP-1 và ngăn chặn sự gia tăng thể trọng (xem tài liệu WO 2011/075393 A2 và WO 2012/177444 A2 chẳng hạn).

Mặc dù các peptit khác mà chủ vận cả hai thụ thể Gcg và GLP-1 là sẵn có, vẫn có nhu cầu đối với các hợp chất hiệu lực hơn, ổn định hơn, có tác dụng lâu hơn, và/hoặc dung nạp tốt hơn có tỷ lệ hoạt tính thụ thể Gcg (Gcg-R)/thụ thể GLP-1 (GLP-1-R) đã được tối ưu hóa sao cho hiệu lực và hoạt tính kích thích tiết insulin của các hợp chất giúp điều trị hiệu quả bệnh tiểu đường, tốt hơn là T2D, và các rối loạn liên quan. Cụ thể là, vẫn có nhu cầu đối với các hợp chất có tỷ lệ hoạt tính đồng chủ vận Gcg-R/GLP-1-R cân đối mà làm giảm thể trọng. Ngoài ra, vẫn có nhu cầu tạo ra các hợp chất với tỷ lệ hoạt tính đồng chủ vận Gcg-R/GLP-1-R cân đối giúp cho việc phân liều hằng ngày, hai lần mỗi tuần, một lần mỗi tuần hoặc hằng tháng ở người.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vì vậy, sáng chế nhằm đề xuất các phương pháp điều trị hữu hiệu bệnh tiểu đường, béo phì, bệnh gan nhiễm mỡ không do rượu (nonalcoholic fatty liver disease - NAFLD) và/hoặc viêm gan nhiễm mỡ không do rượu (nonalcoholic steatohepatitis - NASH).

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức sau:

His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Lys-Ala-Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Xaa28-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly

trong đó

Xaa2 là Aib;

Xaa28 là Glu hoặc Ser;

Lys ở vị trí 20 được cải biến hóa học nhờ sự liên hợp của nhóm epsilon-amino của mạch bên Lys với axit béo C14-C24 thông qua (i) liên kết trực tiếp hoặc (ii) đoạn liên kết giữa Lys ở vị trí 20 và axit béo C14-C24; và

axit amin đầu tận cùng C tùy ý được amit hóa (SEQ ID NO: 2),

hoặc muối được dụng của nó.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức sau:

His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Lys-Ala-Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Glu-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly

trong đó

Xaa2 là Aib;

Lys ở vị trí 20 được cải biến hóa học nhờ sự liên hợp của nhóm epsilon-amino của mạch bên Lys với axit béo C14-C24 thông qua (i) liên kết trực tiếp hoặc (ii) đoạn liên kết giữa Lys ở vị trí 20 và axit béo C14-C24; và

axit amin đầu tận cùng C tùy ý được amit hóa (SEQ ID NO: 3),

hoặc muối được dụng của nó.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức sau:

His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-
Lys-Ala-Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Ser-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly

trong đó

Xaa2 là Aib;

Lys ở vị trí 20 được cải biến hóa học nhờ sự liên hợp của nhóm epsilon-amino của mạch bên Lys với axit béo C14-C24 thông qua (i) liên kết trực tiếp hoặc (ii) đoạn liên kết giữa Lys ở vị trí 20 và axit béo C14-C24; và

axit amin đầu tận cùng C tùy ý được amit hóa (SEQ ID NO: 4), hoặc muối được dụng của nó.

Theo một khía cạnh được ưu tiên của hợp chất theo sáng chế, hoặc muối được dụng của nó, Lys ở vị trí 20 được cải biến hóa học bằng cách kết hợp với axit béo C14-C24 thông qua đoạn liên kết giữa Lys ở vị trí 20 và axit béo C14-C24.

Tốt hơn nữa là, đoạn liên kết này được chọn từ nhóm gồm:

(a) amino polyetylen glycol carboxylat có công thức I:

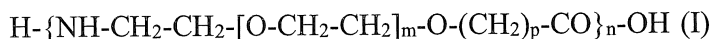


trong đó m là số nguyên bất kỳ từ 1 đến 12, n là số nguyên bất kỳ từ 1 đến 12, và p bằng 1 hoặc 2;

- (b) axit amin được chọn từ nhóm gồm arginin (Arg), asparagin (Asn), axit aspartic (Asp), glutamin (Gln), axit glutamic (Glu), histidin (His), lysin (Lys), serin (Ser), threonin (Thr), xitruilin (Cit), ornithin (Orn), sarcosin (Sar), glyxin (Gly), axit γ -aminobutyric (γ -Abu) và axit γ -glutamic (γ -Glu);
- (c) dipeptit được chọn từ nhóm gồm Ala-Ala, β -Ala- β -Ala, Glu-Glu, Gly-Gly, Leu-Leu, Ser-Ser, Thr-Thr, γ -Glu- γ -Glu, Glu- γ -Glu, γ -Glu-Glu, γ -Abu- γ -Abu, axit 6-aminoheptanoic-axit 6-aminoheptanoic, axit 5-aminovaleric-axit 5-aminovaleric, axit 7-aminoheptanoic-axit 7-aminoheptanoic và axit 8-aminooctanoic-axit 8-aminooctanoic;

- (d) tripeptit được chọn từ nhóm gồm Ala-Ala-Ala, β -Ala- β -Ala- β -Ala, Glu-Glu-Glu, γ -Glu- γ -Glu- γ -Glu, Glu- γ -Glu- γ -Glu, γ -Glu- γ -Glu-Glu, γ -Glu-Glu- γ -Glu, Gly-Gly-Gly, Gly-Gly-Ser, Ser-Gly-Gly, Gly-Ser-Gly, Gly-Gly-Glu, Glu-Gly-Gly, Gly-Glu-Gly, Gly-Gly- γ -Glu, γ -Glu-Gly-Gly, Gly- γ -Glu-Gly, Leu-Leu-Leu và γ -Abu- γ -Abu- γ -Abu;
- (e) polypeptit được chọn từ nhóm gồm (Gly-Gly-Ser)_q (Gly-Gly-Gly-Ser)_r và (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)_r, (axit 6-aminohexanoic)_s, (axit 5-aminovaleric)_s, (axit 7-aminoheptanoic)_s, và (axit 8-aminooctanoic)_s, trong đó q là số nguyên bất kỳ từ 2 đến 5, r là số nguyên bất kỳ từ 1 đến 3, và s là số nguyên bất kỳ từ 4 đến 15; và
- (f) đoạn liên kết liên hợp trong đó amino polyetylen glycol carboxylat có công thức I như được xác định ở (a) được liên hợp với:
- (i) axit amin được chọn từ nhóm gồm Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, His, Lys, Ser, Thr, Cit, Orn, Sar, Gly, γ -Abu và γ -Glu;
 - (ii) dipeptit được chọn từ nhóm gồm Ala-Ala, β -Ala- β -Ala, Glu-Glu, Gly-Gly, Leu-Leu, Ser-Ser, Thr-Thr, γ -Glu- γ -Glu, Glu- γ -Glu, γ -Glu-Glu, γ -Abu- γ -Abu, axit 6-aminohexanoic-axit 6-aminohexanoic, axit 5-aminovaleric-axit 5-aminovaleric, axit 7-aminoheptanoic-axit 7-aminoheptanoic và axit 8-aminooctanoic-axit 8-aminooctanoic;
 - (iii) tripeptit được chọn từ nhóm gồm Ala-Ala-Ala, β -Ala- β -Ala- β -Ala, Glu-Glu-Glu, γ -Glu- γ -Glu- γ -Glu, Glu- γ -Glu- γ -Glu, γ -Glu- γ -Glu-Glu, γ -Glu-Glu- γ -Glu, Gly-Gly-Gly, Gly-Gly-Ser, Ser-Gly-Gly, Gly-Ser-Gly, Gly-Gly-Glu, Glu-Gly-Gly, Gly-Glu-Gly, Gly-Gly- γ -Glu, γ -Glu-Gly-Gly, Gly- γ -Glu-Gly, Leu-Leu-Leu và γ -Abu- γ -Abu- γ -Abu; hoặc
 - (iv) polypeptit được chọn từ nhóm gồm (Gly-Gly-Ser)_q (Gly-Gly-Gly-Ser)_r và (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)_r, (axit 6-aminohexanoic)_s, (axit 5-aminovaleric)_s, (axit 7-aminoheptanoic)_s, và (axit 8-aminooctanoic)_s, trong đó q là số nguyên bất kỳ từ 2 đến 5, r là số nguyên bất kỳ từ 1 đến 3, và s là số nguyên bất kỳ từ 4 đến 15.

Theo một khía cạnh được ưu tiên của hợp chất theo sáng chế, hoặc muối được dựng của nó, đoạn liên kết là amino polyetylen glycol carboxylat có công thức I:



trong đó m là số nguyên bất kỳ từ 1 đến 12, n là số nguyên bất kỳ từ 1 đến 12, và p bằng 1 hoặc 2.

Tốt hơn là, n bằng 1, 2, 3, 4, 5 hoặc 6 và m bằng 1 và p bằng 1 đối với amino polyetylen glycol carboxylat có công thức I.

Tốt hơn nữa là, n bằng 2, m bằng 1 và p bằng 1 đối với amino polyetylen glycol carboxylat có công thức I.

Theo một khía cạnh được ưu tiên hơn nữa của hợp chất theo sáng chế, hoặc muối được dụng của nó, đoạn liên kết là axit amin được chọn từ nhóm gồm Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, His, Lys, Ser, Thr, Cít, Orn, Sar, Gly, γ -Abu và γ -Glu.

Tốt hơn là, axit amin là γ -Glu.

Theo một khía cạnh còn tốt hơn nữa của hợp chất theo sáng chế, hoặc muối được dụng của nó, đoạn liên kết là dipeptit được chọn từ nhóm gồm Ala-Ala, β -Ala- β -Ala, Glu-Glu, Gly-Gly, Leu-Leu, Ser-Ser, Thr-Thr, γ -Glu- γ -Glu, Glu- γ -Glu, γ -Glu-Glu, γ -Abu- γ -Abu, axit 6-aminoheptanoic-axit 6-aminoheptanoic, axit 5-aminovaleric-axit 5-aminovaleric, axit 7-aminoheptanoic-axit 7-aminoheptanoic và axit 8-aminooctanoic-axit 8-aminooctanoic.

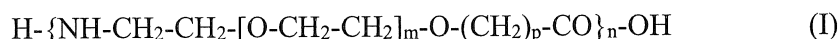
Tốt hơn là, dipeptit là γ -Glu- γ -Glu.

Theo một khía cạnh còn tốt hơn nữa của hợp chất theo sáng chế, hoặc muối được dụng của nó, đoạn liên kết là tripeptit được chọn từ nhóm gồm Ala-Ala-Ala, β -Ala- β -Ala- β -Ala, Glu-Glu-Glu, γ -Glu- γ -Glu- γ -Glu, Glu- γ -Glu- γ -Glu, γ -Glu- γ -Glu-Glu, γ -Glu-Glu- γ -Glu, Gly-Gly-Gly, Gly-Gly-Ser, Ser-Gly-Gly, Gly-Ser-Gly, Gly-Gly-Glu, Glu-Gly-Gly, Gly-Glu-Gly, Gly-Gly- γ -Glu, γ -Glu-Gly-Gly, Gly- γ -Glu-Gly, Leu-Leu-Leu và γ -Abu- γ -Abu- γ -Abu.

Theo một khía cạnh còn tốt hơn nữa của hợp chất theo sáng chế, hoặc muối được dụng của nó, đoạn liên kết là polypeptit được chọn từ nhóm gồm (Gly-Gly-Ser)_q (Gly-Gly-Gly-Ser)_r và (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)_r, (axit 6-aminoheptanoic)_s, (axit 5-aminovaleric)_s, (axit 7-aminoheptanoic)_s, và (axit 8-aminooctanoic)_s, trong đó q là

số nguyên bất kỳ từ 2 đến 5, r là số nguyên bất kỳ từ 1 đến 3, và s là số nguyên bất kỳ từ 4 đến 15.

Theo một khía cạnh còn tốt hơn nữa của hợp chất theo sáng chế, hoặc muối được dụng của nó, đoạn liên kết là đoạn liên kết liên hợp, trong đó amino polyetylen glycol carboxylat có công thức I:



trong đó m là số nguyên bất kỳ từ 1 đến 12, n là số nguyên bất kỳ từ 1 đến 12, và p bằng 1 hoặc 2,

được liên hợp với:

- (i) axit amin được chọn từ nhóm gồm Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, His, Lys Ser, Thr, Cit, Orn, Sar, Gly, γ -Abu và γ -Glu;
- (ii) dipeptit được chọn từ nhóm gồm Ala-Ala, β -Ala- β -Ala, Glu-Glu, Gly-Gly, Leu-Leu, Ser-Ser, Thr-Thr, γ -Glu- γ -Glu, Glu- γ -Glu, γ -Glu-Glu, γ -Abu- γ -Abu, axit 6-aminohexanoic-axit 6-aminohexanoic, axit 5-aminovaleric-axit 5-aminovaleric, axit 7-aminoheptanoic-axit 7-aminoheptanoic và axit 8-aminooctanoic-axit 8-aminooctanoic;
- (iii) tripeptit được chọn từ nhóm gồm Ala-Ala-Ala, β -Ala- β -Ala- β -Ala, Glu-Glu-Glu, γ -Glu- γ -Glu- γ -Glu, Glu- γ -Glu- γ -Glu, γ -Glu- γ -Glu-Glu, γ -Glu-Glu- γ -Glu, Gly-Gly-Gly, Gly-Gly-Ser, Ser-Gly-Gly, Gly-Ser-Gly, Gly-Gly-Glu, Glu-Gly-Gly, Gly-Glu-Gly, Gly-Gly- γ -Glu, γ -Glu-Gly-Gly, Gly- γ -Glu-Gly, Leu-Leu-Leu và γ -Abu- γ -Abu- γ -Abu; hoặc
- (iv) polypeptit được chọn từ nhóm gồm $(\text{Gly-Gly-Ser})_q$ $(\text{Gly-Gly-Gly-Ser})_r$ và $(\text{Gly-Gly-Gly-Gly-Ser})_s$, (axit 6-aminohexanoic) $_s$, (axit 5-aminovaleric) $_s$, (axit 7-aminoheptanoic) $_s$, và (axit 8-aminooctanoic) $_s$, trong đó q là số nguyên bất kỳ từ 2 đến 5, r là số nguyên bất kỳ từ 1 đến 3, và s là số nguyên bất kỳ từ 4 đến 15.

Tốt hơn là, n bằng 1, 2, 3, 4, 5 hoặc 6 và m bằng 1 và p bằng 1 đối với amino polyetylen glycol carboxylat có công thức I.

Tốt hơn nữa là, n bằng 2, m bằng 1 và p bằng 1 đối với amino polyetylen glycol carboxylat có công thức I.

Cũng tốt hơn nữa là, axit amin là γ -Glu.

Cũng tốt hơn nữa là, dipeptit là γ -Glu- γ -Glu.

Theo một khía cạnh được ưu tiên của hợp chất theo sáng chế, đoạn liên kết là $[(2-(2\text{-aminoetoxy})\text{-etoxy})\text{-axetyl}]_2\text{-(}\gamma\text{-Glu)}_t$, trong đó t bằng 1 hoặc 2.

Tốt hơn là, t bằng 1.

Tốt hơn nữa là, t bằng 2.

Theo một khía cạnh còn tốt hơn nữa của hợp chất theo sáng chế, hoặc muối được dụng của nó, axit béo C14-C24 là monoaxit bão hòa hoặc diaxit bão hòa.

Tốt hơn là, axit béo là monoaxit bão hòa hoặc diaxit bão hòa được chọn từ nhóm gồm axit myristic (axit tetradecanoic)(C14 monoaxit), axit tetradecandioic (C14 diaxit), axit palmitic (axit hexadecanoic)(C16 monoaxit), axit hexadecandioic (C16 diaxit), axit margaric (axit heptadecanoic)(C17 monoaxit), axit heptadecandioic (C17 diaxit), axit stearic (axit octadecanoic)(C18 monoaxit), axit octadecandioic (C18 diaxit), axit nonadexylic (axit nonadecanoic)(C19 monoaxit), axit nonadecandioic (C19 diaxit), axit arachadic (axit eicosanoic)(C20 monoaxit), axit eicosandioic (C20 diaxit), axit heneicosylic (axit heneicosanoic)(C21 monoaxit), axit heneicosandioic (C21 diaxit), axit behenic (axit docosanoic)(C22), axit docosandioic (C22 diaxit), axit lignoxeric (axit tetracosanoic)(C24 monoaxit) và axit tetracosandioic (C24 diaxit).

Cũng tốt hơn nữa là, axit béo C14-C24 là axit myristic

Cũng tốt hơn nữa là, axit béo C14-C24 là axit tetradecandioic.

Cũng tốt hơn nữa là, axit béo C14-C24 là axit palmitic.

Cũng tốt hơn nữa là, axit béo C14-C24 là axit hexadecandioic.

Cũng tốt hơn nữa là, axit béo C14-C24 là axit stearic.

Cũng tốt hơn nữa là, axit béo C14-C24 là axit octadecandioic.

Cũng tốt hơn nữa là, axit béo C14-C24 là axit nonadecandioic.

Cũng tốt hơn nữa là, axit béo C14-C24 là axit arachadic.

Cũng tốt hơn nữa là, axit béo C14-C24 là axit eicosandioic.

Cũng tốt hơn nữa là, axit béo C14-C24 là axit docosandioic.

Theo một khía cạnh còn tốt hơn nữa của hợp chất theo sáng chế, hoặc muối được dụng của nó, axit amin đầu tận cùng C được amit hóa.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức sau:

His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-
Lys-Ala-Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Glu-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly

trong đó Xaa 2 là Aib;

Lys ở vị trí 20 được cải biến hóa học nhờ sự liên hợp của nhóm epsilon-amino của mạch bên Lys với ([2-(2-aminoethoxy)-ethoxy]-acetyl)₂-(γ-Glu)-CO-(CH₂)₁₆CO₂H; và axit amin đầu tận cùng C được amit hóa (SEQ ID NO: 5), hoặc muối được dụng của chúng.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức sau:

His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-
Lys-Ala-Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Glu-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly

trong đó Xaa 2 là Aib;

Lys ở vị trí 20 được cải biến hóa học nhờ sự liên hợp của nhóm epsilon-amino của mạch bên Lys với ([2-(2-aminoethoxy)-ethoxy]-acetyl)₂-(γ-Glu)-CO-(CH₂)₁₈CO₂H; và axit amin đầu tận cùng C được amit hóa (SEQ ID NO: 6); hoặc muối được dụng của nó.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức sau:

His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-
Lys-Ala-Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Ser-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly

trong đó Xaa 2 là Aib;

Lys ở vị trí 20 được cải biến hóa học nhờ sự liên hợp của nhóm epsilon-amino của mạch bên Lys với ([2-(2-aminoethoxy)-ethoxy]-acetyl)₂-(γ-Glu)₂-CO-(CH₂)₁₆CO₂H; và axit amin đầu tận cùng C được amit hóa (SEQ ID NO: 7);

hoặc muối được dụng của nó.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức sau:

His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-
Lys-Ala-Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Ser-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly

trong đó Xaa 2 là Aib;

Lys ở vị trí 20 được cải biến hóa học nhờ sự liên hợp của nhóm epsilon-amino của mạch bên Lys với $[2-(2\text{-aminoethoxy})\text{-ethoxy}]\text{-acetate}_2-(\gamma\text{-Glu})_2\text{-CO}-(\text{CH}_2)_{18}\text{CO}_2\text{H}$; và axit amin đầu tận cùng C được amit hóa (SEQ ID NO: 8);

hoặc muối được dụng của nó.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất được phẩm chứa hợp chất theo sáng chế, hoặc muối được dụng của nó, và chất mang, chất pha loãng hoặc tá được dụng.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất được phẩm chứa hợp chất theo sáng chế, hoặc muối được dụng của nó, cùng với chất mang, chất pha loãng hoặc tá được dụng và các thành phần trị liệu khác.

Cũng theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị bệnh tiểu đường typ 2 ở đối tượng cần điều trị, bao gồm bước cho đối tượng sử dụng lượng hữu hiệu của hợp chất theo sáng chế, hoặc muối được dụng của nó.

Cũng theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị béo phì ở đối tượng cần điều trị, bao gồm bước cho đối tượng sử dụng lượng hữu hiệu của hợp chất theo sáng chế, hoặc muối được dụng của nó.

Cũng theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị bệnh gan nhiễm mỡ không do rượu (NAFLD) ở đối tượng cần điều trị, bao gồm bước cho đối tượng sử dụng lượng hữu hiệu của hợp chất theo sáng chế, hoặc muối được dụng của nó.

Cũng theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị viêm gan nhiễm mỡ không do rượu (NASH) ở đối tượng cần điều trị, bao gồm bước cho đối tượng sử dụng lượng hữu hiệu của hợp chất theo sáng chế, hoặc muối được dụng của nó.

Cũng theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất a phương pháp gây ra sự giảm cân không nhằm mục đích trị liệu ở đối tượng bao gồm bước sử dụng lượng hữu hiệu của hợp chất theo sáng chế, hoặc muối được dụng của nó.

Cũng theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất hợp chất theo sáng chế để dùng trong trị liệu.

Cũng theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất hợp chất theo sáng chế để dùng trong điều trị bệnh tiểu đường typ 2.

Cũng theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất hợp chất theo sáng chế để dùng trong điều trị béo phì.

Cũng theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất hợp chất theo sáng chế để dùng trong điều trị bệnh gan nhiễm mỡ không do rượu (NAFLD).

Cũng theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất hợp chất theo sáng chế để dùng trong điều trị viêm gan nhiễm mỡ không do rượu (NASH).

Cũng theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất việc sử dụng hợp chất theo sáng chế để sản xuất thuốc để điều trị bệnh tiểu đường typ 2.

Cũng theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất việc sử dụng hợp chất theo sáng chế để sản xuất thuốc để điều trị béo phì.

Cũng theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất việc sử dụng hợp chất theo sáng chế để sản xuất thuốc để điều trị bệnh gan nhiễm mỡ không do rượu (NAFLD).

Cũng theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất việc sử dụng hợp chất theo sáng chế để sản xuất thuốc để điều trị viêm gan nhiễm mỡ không do rượu (NASH).

Cũng theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất hợp chất trung gian có công thức sau:

His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Lys-Ala-Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Xaa28-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly

trong đó Xaa 2 là Aib;

Xaa28 là Glu hoặc Ser (SEQ ID NO: 9); và
axit amin đầu tận cùng C tùy ý được amit hóa,
hoặc muối được dụng của nó.

Tốt hơn là, sáng chế đề xuất hợp chất trung gian có công thức sau:

His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-
Lys-Ala-Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Glu-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly

trong đó Xaa 2 là Aib; và
axit amin đầu tận cùng C tùy ý được amit hóa (SEQ ID NO: 10);
hoặc muối được dụng của nó.

Tốt hơn nữa là, sáng chế đề xuất hợp chất trung gian có công thức sau:

His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-
Lys-Ala-Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Ser-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly

trong đó Xaa 2 là Aib; và
axit amin đầu tận cùng C tùy ý được amit hóa (SEQ ID NO: 11),
hoặc muối được dụng của nó.

Cũng theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất quy trình điều chế hợp
chất có công thức sau:

His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-
Lys-Ala-Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Xaa28-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-
Gly

trong đó Xaa 2 là Aib; và
Xaa28 là Glu hoặc Ser;

Lys ở vị trí 20 được cải biến hóa học nhờ sự liên hợp của nhóm epsilon-amino của
mạch bên Lys với axit béo C14-C24 thông qua (i) liên kết trực tiếp hoặc (ii) đoạn
liên kết giữa Lys ở vị trí 20 và axit béo C14-C24; và

axit amin đầu tận cùng C tùy ý được amit hóa (SEQ ID NO: 2), hoặc muối được dụng của nó, quy trình này bao gồm bước:

(i) cải biến hợp chất trung gian có công thức sau:

His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-
Glu-Lys-Lys-Ala-Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Xaa28-Gly-Gly-
Pro-Ser-Ser-Gly

trong đó Xaa2 là Aib;

Xaa28 là Glu hoặc Ser; và

axit amin đầu tận cùng C tùy ý được amit hóa (SEQ ID NO: 9),
bằng cách liên hợp nhóm epsilon-amino của mạch bên Lys ở vị trí 20 của hợp chất trung gian với axit béo C14-C24, tùy ý nhờ đoạn liên kết.

Tốt hơn là, Lys ở vị trí 20 của hợp chất trung gian được cải biến bằng cách kết hợp với axit béo C14-C24 nhờ đoạn liên kết giữa Lys ở vị trí 20 và axit béo C14-C24.

Cũng theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất hợp chất được điều chế bởi quy trình nêu trên.

Mô tả chi tiết sáng chế

Hợp chất theo sáng chế có khả năng gắn kết với và hoạt hóa cả thụ thể GLP-1 và thụ thể Gcg. Hợp chất theo sáng chế có khả năng gây ra sự giảm hấp thu thức ăn ở các đối tượng thừa cân và béo phì. Hợp chất theo sáng chế có khả năng tạo ra tác dụng giảm trọng lượng tốt hơn so với OXM kiểu hoang ở người.

Hợp chất theo sáng chế có thể cải thiện khả năng dung nạp glucoza và profin lipit ở các đối tượng bị T2D và/hoặc rối loạn chuyển hóa liên quan và có thể hữu hiệu hơn so với OXM kiểu hoang ở người.

Một lợi thế đặc biệt của hợp chất theo sáng chế là ở chỗ tần số của các tác dụng phụ, như buồn nôn, mà thường đi kèm với liệu pháp GLP-1, như exenatide và liraglutide, có thể được giảm hoặc loại trừ. Vì vậy, hợp chất theo sáng chế có thể có các tác dụng phụ giảm so với liệu pháp GLP-1.

Hợp chất theo sáng chế chứa polypeptit liên hợp với axit béo. Các axit béo, thông qua motif gắn kết albumin của chúng, có thể cải thiện các thông số được động học của peptit bằng cách kéo dài thời gian bán hủy trong huyết tương và làm giảm tốc độ thanh thải. Mặc dù hợp chất theo sáng chế được mong đợi thể hiện profin được động học được cải thiện so với OXM kiểu hoang ở người, mức độ cải thiện không thể dự báo được. Các tác giả sáng chế đã khám phá ra rằng chiều dài, thành phần và vị trí của axit béo, và tùy ý, đoạn liên kết, trong hợp chất theo sáng chế dẫn đến hợp chất có profin được động học mong muốn mà có thể giúp cho việc dùng liều hằng ngày, hai lần mỗi tuần, một lần mỗi tuần hoặc hằng tháng.

Ngoài profin được động học được cải thiện, các tác giả sáng chế cũng đã khám phá ra rằng chiều dài, thành phần và vị trí của axit béo, và tùy ý, đoạn liên kết, là quan trọng để tối ưu hóa tỷ lệ hoạt tính đồng chủ vận Gcg-R/GLP-1-R.

OXM kiểu hoang ở người có đầy đủ hiệu lực và tiềm năng ở các thụ thể GLP-1-R người và Gcg-R người. Trình tự axit amin của OXM kiểu hoang ở người được nêu dưới đây:

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

Một số hợp chất theo sáng chế có tỷ lệ cân đối hoạt tính đồng chủ vận Gcg-R/GLP-1-R. Hoạt tính Gcg và GLP-1 cân đối như được sử dụng ở đây để chỉ hợp chất có ái lực đối với các thụ thể Gcg và GLP-1 trong thử nghiệm gắn kết *in vitro* gần với 1:1, như GLP-1/Gcg bằng 1:1, GLP-1/Gcg bằng 2:1, GLP-1/Gcg bằng 3:2, GLP-1/Gcg bằng 1:2, hoặc GLP-1/Gcg bằng 2:3. Nghiên cứu được thực hiện bởi các tác giả sáng chế đã bộc lộ rằng chiều dài, thành phần và vị trí của axit béo là quan trọng để đạt được tỷ lệ cân đối hoạt tính đồng chủ vận Gcg-R/GLP-1-R mà nó là một đặc trưng của hợp chất theo sáng chế, cũng như là ảnh hưởng đến chu kỳ bán hủy trong huyết tương, độ ổn định vật lý, độ tan và độ ổn định *in vivo* của hợp chất theo sáng chế.

Mặc dù sự liên hợp của peptit với axit béo có nhưng lợi ích về profin được động học được cải thiện và/hoặc tỷ lệ cân đối hoạt tính đồng chủ vận Gcg-R/GLP-1-R, người ta cũng dự kiến rằng hợp chất này có thể mất hoạt tính do có khả năng can

thiếp vào mặt phân giới liên kết của thụ thể Gcg hoặc thụ thể GLP-1. Tuy nhiên, đã phát hiện ra rằng sự liên hợp của gốc lysin ở vị trí 20 với axit béo vẫn giữ được hoạt tính *in vitro* và *in vivo* ở cả hai thụ thể ở mức độ lớn hơn mức độ trong trường hợp khi các axit amin ở các vị trí khác được liên hợp với axit béo.

Ngoài ra, một số thay thế axit amin tương ứng với OXM kiểu hoang ở người trong hợp chất được yêu cầu bảo hộ có khả năng gia tăng hiệu lực ở Gcg-R và/hoặc GLP-1-R, bằng cách đó bù đắp sự mất hiệu lực do sự liên hợp với axit béo trong khi duy trì được tỷ lệ thích hợp hoạt tính đồng chủ vận Gcg-R/GLP-1-R. Cần lưu ý rằng sự thay thế một gốc axit amin trong một protein cụ thể có thể ảnh hưởng đến đặc tính của toàn bộ protein, và lưu ý rằng tác động tổng thể này có thể có lợi hoặc có hại cho hiệu lực dược lý và/hoặc độ ổn định dược lý. Một số sự thay thế axit amin có thể làm tăng hiệu lực nhưng có ảnh hưởng bất lợi đến độ ổn định của phân tử và ngược lại. Các thay thế axit amin trong hợp chất theo sáng chế tương ứng với OXM kiểu hoang ở người (SEQ ID NO: 1) bao gồm S2Aib, S16E, R17K, R18K, Q20K, D21E, Q24E, M27L, N28E hoặc N28S và T29G. Ngoài ra, trình tự đầu tận cùng C của OXM, KRNRNNIA, được thay bằng trình tự đầu tận cùng C GPSSG.

Sự thay thế S2Aib bảo vệ peptit khỏi bị phân hủy bởi peptidaza, cụ thể là, dipeptidyl peptidaza IV. Sự thay thế S16E, R17K, R18K và Q20K có khả năng cải thiện hiệu lực của hợp chất theo sáng chế trong thử nghiệm *in vitro* và các mô hình động vật *in vivo*. Sự thay thế D21E và Q24E có khả năng cải thiện độ ổn định của hợp chất theo sáng chế và điều biến hoạt tính *in vitro*. Sự thay thế M27L có khả năng bảo vệ peptit khỏi sự oxy hóa gốc methionin. Sự thay thế N28E có khả năng cải thiện độ tan của hợp chất chứa sự thay thế này. Sự thay thế N28S cũng có khả năng cải thiện độ tan của hợp chất chứa sự thay thế này nhưng ở mức độ không giống với sự thay thế N28E. Tuy nhiên, độ tan của hợp chất chứa sự thay thế N28S có thể được cải thiện bằng cách lựa chọn đoạn liên kết thích hợp. Sự thay thế của gốc asparagin ở vị trí 28 tránh cho khả năng tách nhóm amit xảy ra ở vị trí này.

Việc loại bỏ các gốc thuộc trình tự đầu tận cùng C của OXM, KRNRNNIA, có thể cải thiện độ tan, mà điều này có thể là do việc loại bỏ các gốc arginin. Các tác giả sáng chế đã đánh giá các hợp chất (i) không có trình tự đầu tận cùng C, (ii) các hợp chất có trình tự đầu tận cùng C GPSSG và (iii) các hợp chất có trình tự đầu tận

cùng C GPSSGAPPPS. Bất ngờ đã phát hiện ra rằng một số hợp chất với trình tự đầu tận cùng C GPSSG thể hiện hiệu lực *in vivo* được cải thiện ở các mô hình động vật so với OXM kiểu hoang ở người, các hợp chất không có trình tự đầu tận cùng C và các hợp chất có trình tự đầu tận cùng C GPSSGAPPPS. Trình tự đầu tận cùng C GPSSG cũng cải thiện độ ổn định và độ tan của hợp chất theo sáng chế so với OXM kiểu hoang ở người và các hợp chất không có trình tự đầu tận cùng C.

Vì vậy, hợp chất theo sáng chế chứa sự thay thế axit amin mà, riêng biệt hoặc cùng nhau, không chỉ có khả năng cải thiện hiệu lực, mà còn có khả năng tạo ra độ ổn định vật lý và các đặc tính độ tan được cải thiện và *độ ổn định in vivo* gia tăng.

Theo một số khía cạnh của hợp chất theo sáng chế, axit béo C14-C24 được liên hợp với nhóm epsilon-amino của mạch bên lysin *thông qua* đoạn liên kết, trong đó đoạn liên kết này được chọn từ nhóm gồm:

(a) amino polyetylen glycol carboxylat có công thức I:



trong đó m là số nguyên bất kỳ từ 1 đến 12, n là số nguyên bất kỳ từ 1 đến 12, và p bằng 1 hoặc 2;

- (b) axit amin được chọn từ nhóm gồm Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, His, Lys, Pro, Ser, Thr, Cit, Orn, Sar, Gly, γ -Abu và γ -Glu;
- (c) dipeptit được chọn từ nhóm gồm Ala-Ala, β -Ala- β -Ala, Glu-Glu, Gly-Gly, Leu-Leu, Pro-Pro, Ser-Ser, Thr-Thr, γ -Glu- γ -Glu, Glu- γ -Glu, γ -Glu-Glu, γ -Abu- γ -Abu, axit 6-aminoheptanoic-axit 6-aminoheptanoic, axit 5-aminovaleric-axit 5-aminovaleric, axit 7-aminoheptanoic-axit 7-aminoheptanoic và axit 8-aminooctanoic-axit 8-aminooctanoic;
- (d) tripeptit được chọn từ nhóm gồm Ala-Ala-Ala, β -Ala- β -Ala- β -Ala, Glu-Glu-Glu, γ -Glu- γ -Glu- γ -Glu, Glu- γ -Glu- γ -Glu, γ -Glu- γ -Glu-Glu, γ -Glu-Glu- γ -Glu, Gly-Gly-Gly, Gly-Gly-Ser, Ser-Gly-Gly, Gly-Ser-Gly, Gly-Gly-Glu, Glu-Gly-Gly, Gly-Glu-Gly, Gly-Gly- γ -Glu, γ -Glu-Gly-Gly, Gly- γ -Glu-Gly, Leu-Leu-Leu, Pro-Pro-Pro và γ -Abu- γ -Abu- γ -Abu;
- (e) polypeptit được chọn từ nhóm gồm $(\text{Gly-Gly-Ser})_q$ $(\text{Gly-Gly-Gly-Ser})_r$ và $(\text{Gly-Gly-Gly-Gly-Ser})_r$, (axit 6-aminoheptanoic)_s, (axit 5-aminovaleric)_s, (axit 7-aminoheptanoic)_s, và (axit 8-aminooctanoic)_s, trong đó q là số nguyên bất

kỳ từ 2 đến 5, r là số nguyên bất kỳ từ 1 đến 3, và s là số nguyên bất kỳ từ 4 đến 15; và

- (f) đoạn liên kết liên hợp trong đó amino polyetylen glycol carboxylat có công thức I như được xác định ở (a) được liên hợp với:
- (i) axit amin được chọn từ nhóm gồm Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, His, Lys, Pro, Ser, Thr, Cit, Orn, Sar, Gly, γ -Abu và γ -Glu;
 - (ii) dipeptit được chọn từ nhóm gồm Ala-Ala, β -Ala- β -Ala, Glu-Glu, Gly-Gly, Leu-Leu, Pro-Pro, Ser-Ser, Thr-Thr, γ -Glu- γ -Glu, Glu- γ -Glu, γ -Glu-Glu, γ -Abu- γ -Abu, axit 6-aminoheptanoic-axit 6-aminoheptanoic, axit 5-aminovaleric-axit 5-aminovaleric, axit 7-aminoheptanoic-axit 7-aminoheptanoic và axit 8-aminooctanoic-axit 8-aminooctanoic;
 - (iii) tripeptit được chọn từ nhóm gồm Ala-Ala-Ala, β -Ala- β -Ala- β -Ala, Glu-Glu-Glu, γ -Glu- γ -Glu- γ -Glu, Glu- γ -Glu- γ -Glu, γ -Glu- γ -Glu-Glu, γ -Glu-Glu- γ -Glu, Gly-Gly-Gly, Gly-Gly-Ser, Ser-Gly-Gly, Gly-Ser-Gly, Gly-Gly-Glu, Glu-Gly-Gly, Gly-Glu-Gly, Gly-Gly- γ -Glu, γ -Glu-Gly-Gly, Gly- γ -Glu-Gly, Leu-Leu-Leu, Pro-Pro-Pro và γ -Abu- γ -Abu- γ -Abu; hoặc
 - (iv) polypeptit được chọn từ nhóm gồm $(\text{Gly-Gly-Ser})_q$ $(\text{Gly-Gly-Gly-Ser})_r$ và $(\text{Gly-Gly-Gly-Gly-Ser})_r$, (axit 6-aminoheptanoic)_s, (axit 5-aminovaleric)_s, (axit 7-aminoheptanoic)_s, và (axit 8-aminooctanoic)_s, trong đó q là số nguyên bất kỳ từ 2 đến 5, r là số nguyên bất kỳ từ 1 đến 3, và s là số nguyên bất kỳ từ 4 đến 15.

Theo các khía cạnh được ưu tiên của hợp chất theo sáng chế, đoạn liên kết là amino polyetylen glycol carboxylat có công thức I, hoặc đoạn liên kết liên hợp trong đó amino polyetylen glycol carboxylat có công thức I được liên hợp với axit amin, dipeptit, tripeptit hoặc polypeptit, như được xác định ở trên, trong đó n bằng 1, 2, 3, 4, 5 hoặc 6, m bằng 1 và p bằng 1.

Theo các khía cạnh được ưu tiên hơn của hợp chất theo sáng chế, đoạn liên kết là amino polyetylen glycol carboxylat có công thức I, hoặc đoạn liên kết liên hợp trong đó amino polyetylen glycol carboxylat có công thức I được liên hợp với axit

amin, dipeptit, tripeptit hoặc polypeptit, như được xác định ở trên, trong đó n bằng 2, m bằng 1 và p bằng 1.

Đoạn liên kết amino polyetylen glycol carboxylat có công thức I, hoặc đoạn liên kết liên hợp trong đó amino polyetylen glycol carboxylat có công thức I được liên hợp với axit amin, dipeptit, tripeptit hoặc polypeptit, như được xác định ở trên, chứa gốc polyetylen glycol nhỏ (polyetylen glycol - PEG) bao gồm cấu trúc $[-O-CH_2-CH_2-]_m$, trong đó m là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 12, (chẳng hạn, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12). Các PEG nhỏ như vậy trong bản mô tả này được gọi là "mini-PEG". Theo các khía cạnh được ưu tiên, mini-PEG có công thức cấu trúc I:



trong đó m là số nguyên bất kỳ từ 1 đến 12, n là số nguyên bất kỳ từ 1 đến 12 và p bằng 1 hoặc 2. Tốt hơn là, mini-PEG có công thức cấu trúc I, trong đó n bằng 1, 2, 3, 4, 5 hoặc 6, m bằng 1 và p bằng 1. Tốt hơn nữa là, miniPEG có công thức cấu trúc I trong đó n bằng 1, m bằng 1 và p bằng 1. Các chất phản ứng thích hợp để dùng trong phản ứng axyl hóa axit amin bằng mini-PEG là sẵn có trên thị trường từ các nhà cung cấp, như Peptides International (Louisville, KY) và ChemPep, Inc. (Wellington, FL). Ngoài ra, các kỹ thuật thích hợp để axyl hóa axit amin bằng mini-PEG được mô tả trong bản mô tả này (xem các ví dụ 1-4).

Mini-PEG có công thức I là miniPEG được tạo chức chứa một nhóm chức amin và một nhóm chức carboxyl. Nhóm chức carboxyl phản ứng với nhóm epsilon-amino của mạch bên lysin để tạo thành liên kết amit. Nhóm chức amin phản ứng với nhóm carboxyl của axit béo. Vì vậy, lysin ở vị trí 20 của peptit có trình tự SEQ ID NO: 2 được liên hợp với axit béo C14-C24 *thông qua* mini-PEG có công thức I.

Theo cách khác, khi mini-PEG có công thức I là một phần của đoạn liên kết liên hợp (nghĩa là mini-PEG có công thức I được liên hợp với axit amin, dipeptit, tripeptit hoặc polypeptit như được xác định ở trên), nhóm chức amin của mini-PEG có công thức I phản ứng với một nhóm chức của axit amin, dipeptit, tripeptit hoặc polypeptit này. Một nhóm chức nữa của axit amin, dipeptit, tripeptit hoặc polypeptit này phản ứng với nhóm carboxyl của axit béo. Vì vậy, lysin ở vị trí 20 của peptit có

trình tự SEQ ID NO: 2 được liên hợp với axit béo C14-C24 *thông qua* đoạn liên kết liên hợp như được xác định ở trên.

Tính ưa nước của mini-PEG có công thức I giúp gia tăng độ tan của hợp chất theo sáng chế chứa đoạn liên kết bao gồm amino polyetylen glycol carboxylat có công thức I hoặc đoạn liên kết liên hợp trong đó amino polyetylen glycol carboxylat có công thức I được liên hợp với axit amin, dipeptit, tripeptit hoặc polypeptit, như được xác định.

Các đoạn liên kết được ưu tiên chứa mini-PEG có công thức I bao gồm, nhưng không giới hạn ở, ([2-(2-aminoetoxy)-etoxy]-axetyl)₂ và axit 8-amino-3,6-dioxaoctanoic.

Đoạn liên kết này cũng có thể là một axit amin duy nhất nằm giữa nhóm epsilon-amino của mạch bên lysin và axit béo C14-C24. Theo một số khía cạnh được ưu tiên, axit amin là axit amin ưa nước. Các axit amin thích hợp bao gồm Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, His, Lys, Pro, Ser, Thr, Cit, Orn, Sar, Gly, γ -Abu và γ -Glu.

Theo một số khía cạnh được ưu tiên hơn, axit amin là γ -Glu.

Theo cách khác, đoạn liên kết là dipeptit được chọn từ nhóm gồm Ala-Ala, β -Ala- β -Ala, Glu-Glu, Gly-Gly, Leu-Leu, Pro-Pro, Ser-Ser, Thr-Thr, γ -Glu- γ -Glu, Glu- γ -Glu, γ -Glu-Glu, γ -Abu- γ -Abu, axit 6-aminoheptanoic-axit 6-aminoheptanoic, axit 5-aminovaleric-axit 5-aminovaleric, axit 7-aminoheptanoic-axit 7-aminoheptanoic và axit 8-aminooctanoic-axit 8-aminooctanoic.

Theo một khía cạnh khác nữa, mỗi axit amin của dipeptit có thể giống hoặc khác với axit amin khác của dipeptit, và có thể độc lập được chọn từ nhóm gồm Ala, β -Ala, Glu, Gly, Leu, Pro, Ser, Thr, γ -Glu, γ -Abu, axit 6-aminoheptanoic, axit 5-aminovaleric, axit 7-aminoheptanoic và axit 8-aminooctanoic.

Theo một số khía cạnh được ưu tiên hơn, đoạn liên kết là γ -Glu- γ -Glu.

Theo một số khía cạnh, đoạn liên kết là tripeptit trong đó các axit amin của tripeptit này độc lập được chọn từ nhóm gồm: Ala, β -Ala, Glu, Gly, Leu, Pro, Ser, Thr, axit γ -aminobutyric (γ -Abu), axit γ -glutamic (γ -Glu), axit 6-aminoheptanoic, axit 5-aminovaleric, axit 7-aminoheptanoic, và axit 8-aminooctanoic.

Theo các khía cạnh được ưu tiên, đoạn liên kết là tripeptit được chọn từ nhóm gồm Ala-Ala-Ala, β -Ala- β -Ala- β -Ala, Glu-Glu-Glu, γ -Glu- γ -Glu- γ -Glu, Glu- γ -Glu-

γ -Glu, γ -Glu- γ -Glu-Glu, γ -Glu-Glu- γ -Glu, Gly-Gly-Gly, Gly-Gly-Ser, Ser-Gly-Gly, Gly-Ser-Gly, Gly-Gly-Glu, Glu-Gly-Gly, Gly-Glu-Gly, Gly-Gly- γ -Glu, γ -Glu-Gly-Gly, Gly- γ -Glu-Gly, Leu-Leu-Leu, Pro-Pro-Pro và γ -Abu- γ -Abu- γ -Abu.

Theo một số khía cạnh, đoạn liên kết là polypeptit được chọn từ nhóm gồm (Gly-Gly-Ser)_q (Gly-Gly-Gly-Ser)_r và (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)_r, (axit 6-aminoheptanoic)_s, (axit 5-aminovaleric)_s, (axit 7-aminoheptanoic)_s, và (axit 8-aminooctanoic)_s, trong đó q là số nguyên bất kỳ từ 2 đến 5, r là số nguyên bất kỳ từ 1 đến 3, và s là số nguyên bất kỳ từ 4 đến 15.

Theo một khía cạnh được ưu tiên, đoạn liên kết là đoạn liên kết liên hợp trong đó amino polyetylen glycol carboxylat có công thức I:



trong đó m là số nguyên bất kỳ từ 1 đến 12, n là số nguyên bất kỳ từ 1 đến 12, và p bằng 1 hoặc 2,

được liên hợp với axit amin, dipeptit, tripeptit hoặc polypeptit, như được xác định ở trên.

Theo một khía cạnh được ưu tiên, amino polyetylen glycol carboxylat của đoạn liên kết liên hợp là ([2-(2-aminoetoxy)-etoxy]-axetyl)₂ hoặc axit 8-amino-3,6-dioxaoctanoic.

Theo một khía cạnh được ưu tiên hơn, đoạn liên kết bao gồm ([2-(2-aminoetoxy)-etoxy]-axetyl)₂-(γ -Glu)_t (còn được gọi là (AEEA)₂-(γ -Glu)_t), trong đó t bằng 1 hoặc 2. Axit béo và axit gamma-glutamic trong đoạn liên kết đóng vai trò là các chất gắn kết albumin, và cung cấp tiềm năng tạo ra các hợp chất có tác dụng kéo dài *in vivo*. Theo các khía cạnh được ưu tiên nhất, hợp chất theo sáng chế chứa lysin ở vị trí 20 mà được cải biến hóa học nhờ sự liên hợp của nhóm epsilon-amino của mạch bên lysin với ([2-(2-aminoetoxy)-etoxy]-axetyl)₂-(γ -Glu)_t-CO-(CH₂)_d-CO₂H, trong đó t bằng 1 hoặc 2 và d bằng 16 hoặc 18.

Như thể hiện trên cấu trúc hóa học của Ví dụ 1-4, đơn vị thứ nhất của [2-(2-amino-etoxy)-etoxy]-axetyl được liên kết với nhóm epsilon-amino của mạch bên lysin. Đơn vị thứ hai của [2-(2-Amino-etoxy)-etoxy]-axetyl sau đó được gắn với

nhóm amio của đơn vị thứ nhất của [2-(2-amino-etoxy)-etoxy]-axetyl. Sau đó, đơn vị thứ nhất của γ -Glu được gắn với nhóm amino của đơn vị thứ hai của [2-(2-amino-etoxy)-etoxy]-axetyl thông qua nhóm γ -carboxyl của mạch bên. Khi $t = 2$, đơn vị thứ hai của γ -Glu được gắn với nhóm α -amino của đơn vị thứ nhất của γ -Glu thông qua nhóm γ -carboxyl của mạch bên. Cuối cùng, axit béo được gắn với nhóm α -amino của đơn vị thứ nhất (khi $t = 1$) hoặc đơn vị thứ hai (khi $t = 2$) của γ -Glu.

Khi đoạn liên kết là một axit amin, dipeptit, tripeptit, hoặc polypeptit, như được xác định ở trên, tốt hơn là axit amin này, hoặc ít nhất một axit amin của dipeptit, tripeptit hoặc polypeptit, là axit amin ưa nước.

Tương tự, khi đoạn liên kết là đoạn liên kết liên hợp trong đó amino polyetylen glycol carboxylat có công thức I:



trong đó m là số nguyên bất kỳ từ 1 đến 12, n là số nguyên bất kỳ từ 1 đến 12, và p bằng 1 hoặc 2;

được liên hợp với axit amin, dipeptit, tripeptit hoặc polypeptit, như được xác định ở trên, tốt hơn là axit amin này/ít nhất một axit amin của axit amin/dipeptit/tripeptide/polypeptit này là axit amin ưa nước.

Các axit amin thích hợp bao gồm, nhưng không giới hạn ở, Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, His, Lys, Pro, Ser, Thr, Cit, Orn, Sar, Gly, γ -Abu và γ -Glu.

Các tác giả sáng chế đã khám phá ra rằng sự có mặt của một hoặc nhiều axit amin ưa nước trong đoạn liên kết giúp bù lại sự giảm độ tan mà nó có thể thường được cho là xảy ra do sự thay thế axit amin trong peptit có trình tự SEQ ID NO: 1. Chẳng hạn, trong phương án trong đó đoạn liên kết chứa ([2-(2-aminoetoxy)-etoxy]-axetyl)₂-(γ -Glu)_t, trong đó t bằng 1 hoặc 2, Xaa28 của peptit có trình tự SEQ ID NO: 1 có thể là serin hoặc axit glutamic. Việc lựa chọn axit glutamic ở vị trí 28 của peptit có SEQ ID NO: 2 giúp cải thiện độ tan của các hợp chất này. Việc lựa chọn serin ở vị trí 28 của peptit có trình tự SEQ ID NO: 2 có thể được cho là làm giảm độ tan của các hợp chất này so với độ tan của các hợp chất mà chỉ khác ở chỗ chứa gốc axit

glutamic ở vị trí 28. Tuy nhiên, axit amin γ -Glu thứ hai trong đoạn liên kết đã mô tả ở trên (nghĩa là t bằng 2) giúp bù lại sự giảm độ tan được dự báo.

Hợp chất theo sáng chế sử dụng axit béo C14-C24 được liên hợp về mặt hóa học với nhóm epsilon-amino của mạch bên lysin bằng một liên kết trực tiếp hoặc bằng một đoạn liên kết. Thuật ngữ “axit béo C14-C24” như được sử dụng trong bản mô tả này có nghĩa là axit carboxylic với từ 14 đến 24 nguyên tử cacbon. Axit béo C14-C24 thích hợp để dùng trong sáng chế này có thể là monoaxit bão hòa hoặc diaxit bão hòa. Thuật ngữ “bão hòa” có nghĩa là axit béo không chứa các liên kết đôi hoặc liên kết ba cacbon-cacbon.

Ví dụ về các axit béo C14-C24 bão hòa cụ thể mà thích hợp cho các hợp chất và việc sử dụng các hợp chất này được bộc lộ trong bản mô tả bao gồm, nhưng không giới hạn ở, axit myristic (axit tetradecanoic)(C14 monoaxit), axit tetradecandioic (C14 diaxit), axit palmitic (axit hexadecanoic)(C16 monoaxit), axit hexadecandioic (C16 diaxit), axit margaric (axit heptadecanoic)(C17 monoaxit), axit heptadecandioic (C17 diaxit), axit stearic (axit octadecanoic)(C18 monoaxit), axit octadecandioic (C18 diaxit), axit nonadexylic (axit nonadecanoic)(C19 monoaxit), axit nonadecandioic (C19 diaxit), axit arachadic (axit eicosanoic)(C20 monoaxit), axit eicosandioic (C20 diaxit), axit heneicosylic (axit heneicosanoic)(C21 monoaxit), axit heneicosandioic (C21 diaxit), axit behenic (axit docosanoic)(C22), axit docosandioic (C22 diaxit), axit lignoxeric (axit tetracosanoic)(C24 monoaxit), axit tetracosandioic (C24 diaxit), bao gồm cả các dẫn xuất mạch nhánh và được thể của nó.

Theo các khía cạnh được ưu tiên của hợp chất theo sáng chế, axit béo C14-C24 được chọn từ nhóm gồm C14 monoaxit bão hòa, C14 diaxit bão hòa, C16 monoaxit bão hòa, C16 diaxit bão hòa, C18 monoaxit bão hòa, C18 diaxit bão hòa, C19 diaxit bão hòa, C20 monoaxit bão hòa, C20 diaxit bão hòa, C22 diaxit bão hòa, và các dẫn xuất mạch nhánh và được thể của nó.

Theo các khía cạnh được ưu tiên hơn của hợp chất theo sáng chế, axit béo C14-C24 được chọn từ nhóm gồm axit myristic, axit tetradecandioic, axit palmitic, axit hexadecandioic, axit stearic, axit octadecandioic, axit nonadecandioic, axit arachadic, axit eicosandioic và axit docosandioic.

Tốt hơn là, axit béo C14-C24 là axit octadecandioic hoặc axit eicosandioic.

Các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng vị trí của axit béo là quan trọng để thu được hợp chất với tỷ lệ hoạt tính đồng chủ vận Gcg-R/GLP-1-R mong muốn. Chiều dài và thành phần của axit béo ảnh hưởng đến chu kỳ bán hủy của hợp chất trong huyết tương, hiệu lực của hợp chất trong các mô hình động vật *in vivo* và cũng ảnh hưởng đến độ tan và độ ổn định của hợp chất. Sự liên hợp của peptit được xác định trong SEQ ID NO: 2 với C14-C24 monoaxit hoặc diacid béo bão hòa tạo ra hợp chất có chu kỳ bán hủy mong muốn trong huyết tương, hiệu lực mong muốn trong các mô hình động vật *in vivo* và cũng có các đặc tính về độ tan và độ ổn định mong muốn. Axit myristic, axit tetradecandioic, axit palmitic, axit hexadecandioic, axit stearic, axit octadecandioic, axit nonadecandioic, axit arachadic, axit eicosandioic và axit docosandioic là các axit béo được đặc biệt ưu tiên.

Cụ thể là, sự liên hợp của peptit được xác định trong SEQ ID NO: 2 ở gốc lysin ở vị trí 20 với axit octadecandioic hoặc axit eicosandioic tạo ra các hợp chất mà: (i) có khả năng đạt được tỷ lệ hoạt tính đồng chủ vận Gcg-R/GLP-1-R mong muốn, (ii) có khả năng cải thiện hiệu lực trong các mô hình động vật *in vivo* và/hoặc (iii) có khả năng cải thiện các đặc tính về độ ổn định vật lý và độ tan.

Các hợp chất theo sáng chế được tạo dạng bào chế theo cách ưu tiên là được phẩm được dùng theo đường ngoài ruột (ví dụ, dưới da, trong tĩnh mạch, trong màng bụng, trong cơ hoặc qua da).

Hợp chất theo sáng chế điển hình sẽ được dùng ngoài đường tiêu hóa. Việc dùng ngoài đường tiêu hóa bao gồm, ví dụ, dùng toàn thân, như bằng cách tiêm trong cơ, trong tĩnh mạch, trong da, hoặc trong màng bụng. Đường dùng ưu tiên là tiêm dưới da. Hợp chất theo sáng chế được dùng cho đối tượng cùng với chất mang, chất pha loãng, hoặc tá dược được dùng như một phần của dược phẩm để điều trị bệnh tiểu đường typ 2, béo phì, NAFLD và/hoặc NASH. Dược phẩm này có thể là dung dịch hoặc hỗn dịch như dung dịch hoặc hỗn dịch trong đó hợp chất theo sáng chế được tạo phức với cation kim loại hóa trị hai như kẽm. Hợp chất theo sáng chế cũng có thể được bào chế thành chế phẩm rắn như bằng cách đông khô hoặc sấy phun, mà sau đó được then được hoàn nguyên trong dung dịch pha loãng thích hợp trước khi sử dụng. Các chất mang được dùng thích

hợp có thể chứa các thành phần trơ mà không phản ứng với peptit hoặc dẫn xuất peptit. Các chất mang được dụng thích hợp để dùng ngoài đường tiêu hóa bao gồm, ví dụ, nước vô trùng, nước muối sinh lý, nước muối kim khuẩn (nước muối chứa khoảng 0,9% mg/ml rượu benzylic), nước muối đệm phosphat, dung dịch Hank's, Ringer's-lactat và các dung dịch tương tự. Một số ví dụ về các tá được thích hợp bao gồm lactoza, dextroza, sucroza, trehaloza, sorbitol, và manitol và các chất bảo quản như phenol và m-cresol.

Các kỹ thuật bào chế được phẩm tiêu chuẩn, như các kỹ thuật được mô tả trong tài liệu của Remington: The Science and Practice of Pharmacy (D.B. Troy, Editor, 21st Edition, Lippincott, Williams & Wilkins, 2006), có thể được sử dụng. Hợp chất theo sáng chế có thể được bào chế theo cách khác để dùng trong má, qua đường miệng, dùng qua da, trong mũi, hoặc dùng qua đường phổi.

Các hợp chất theo sáng chế có thể phản ứng với bất kỳ axit trong số các axit hữu cơ và axit vô cơ để tạo thành các muối cộng axit được dụng. Các muối được dụng và các phương pháp thông thường để điều chế chúng là đã được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật. *Xem, ví dụ, P. Stahl, et al. Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection and Use, 2nd Revised Edition (Wiley-VCH, 2011).* Các muối được dụng theo sáng chế bao gồm muối trifloroaxetat, hydroclorua, và axetat.

Hợp chất theo sáng chế có thể được sử dụng để điều trị bệnh tiểu đường, đặc biệt là bệnh tiểu đường typ 2. Các đối tượng khác mà có thể có lợi khi điều trị bằng hợp chất theo sáng chế, bao gồm các đối tượng bị suy giảm dung nạp glucoza hoặc suy giảm glucoza khi đói, các đối tượng mà thể trọng cao hơn thể trọng thông thường là 25% hoặc lớn hơn theo chiều cao và cân nặng của đối tượng, các đối tượng mà có một hoặc cả hai bố mẹ mắc bệnh tiểu đường typ 2, các đối tượng mà mắc bệnh tiểu đường trong thời kỳ mang thai, và các đối tượng mắc các rối loạn chuyển hóa như các rối loạn gây ra do sự giảm tiết insulin nội sinh. Hợp chất theo sáng chế có thể được sử dụng để ngăn ngừa cho các đối tượng bị suy giảm dung nạp glucoza khỏi bị phát triển bệnh tiểu đường typ 2, ngăn ngừa sự hư hỏng tế bào β thuộc tuyến tụy, gây ra sự tăng sinh tế bào β , cải thiện chức năng tế bào β , hoạt hóa các tế bào β đang ngủ yên, thúc đẩy sự biệt hóa của các tế bào thành các tế bào β , kích thích sự

sao chép tế bào β , và ức chế sự chết có lập trình từ trước của các tế bào β . Các bệnh và tình trạng bệnh khác mà có thể được điều trị hoặc phòng ngừa bằng cách sử dụng hợp chất theo sáng chế trong các phương pháp theo sáng chế bao gồm: Bệnh tiểu đường khởi phát khi trưởng thành của thanh niên (Maturity-Onset of the Young - MODY) (Herman, et al., *Diabetes* 43:40, 1994); bệnh tiểu đường tự miễn tiềm tàng ở người lớn (Latent Autoimmune Diabetes Adult - LADA) (Zimmet, et al., *Diabetes Med.* 11:299, 1994); suy giảm dung nạp glucoza (impaired glucose tolerance - IGT) (Expert Committee on Classification of Diabetes Mellitus, *Diabetes Care* 22 (Supp. 1):S5, 1999); suy giảm glucoza khi đói (impaired fasting glucose - IFG) (Charles, et al., *Diabetes* 40:796, 1991); bệnh tiểu đường trong thời kỳ mang thai (Metzger, *Diabetes*, 40:197, 1991); hội chứng chuyển hóa X, rối loạn mỡ máu, tăng glucoza huyết, tăng insulin huyết, tăng triglycerit huyết, và kháng insulin.

Hợp chất theo sáng chế cũng có thể được sử dụng trong các phương pháp theo sáng chế để điều trị nguyên nhân thứ phát của bệnh tiểu đường (Expert Committee on Classification of Diabetes Mellitus, *Diabetes Care* 22 (Supp. 1):S5, 1999). Các nguyên nhân thứ phát như vậy bao gồm sự dư thừa glucocorticoid, sự dư thừa hormon sinh trưởng, u tủy thượng thận, và bệnh tiểu đường gây ra do thuốc. Thuốc mà có thể gây ra bệnh tiểu đường bao gồm, nhưng không giới hạn ở, pyriminil, axit nicotinic, glucocorticoid, phenytoin, hormon tuyến giáp, các chất tiết β -adrenalin, α -interferon và các thuốc được dùng để điều trị nhiễm HIV.

Hợp chất theo sáng chế có thể hữu hiệu trong ngăn chặn sự hấp thu thức ăn và điều trị béo phì.

"Lượng hữu hiệu" của hợp chất theo sáng chế là lượng mà tạo ra tác dụng trị liệu và/hoặc phòng ngừa mong muốn mà không gây ra các tác dụng phụ không chấp nhận được khi được dùng cho đối tượng. "Tác dụng trị liệu mong muốn" bao gồm một hoặc nhiều tác dụng trong số các tác dụng sau: 1) cải thiện các triệu chứng có liên quan đến bệnh hoặc tình trạng bệnh; 2) làm chậm sự khởi phát của các triệu chứng có liên quan đến bệnh hoặc tình trạng bệnh; 3) làm tăng tuổi thọ so với khi không điều trị; và 4) làm cho chất lượng cuộc sống tốt hơn so với khi không điều trị. Ví dụ, "lượng hữu hiệu" của hợp chất theo sáng chế để điều trị T2D là lượng mà sẽ tạo ra sự kiểm soát nồng độ glucoza trong máu tốt hơn so với khi không điều trị, nhờ đó

làm chậm sự khởi phát các biến chứng của bệnh tiểu đường như bệnh võng mạc, bệnh thần kinh, hoặc bệnh thận. “Lượng hữu hiệu” của hợp chất theo sáng chế để phòng ngừa bệnh tiểu đường typ 2, ví dụ ở những đối tượng bị suy giảm dung nạp glucoza hoặc suy giảm glucoza khi đói, là lượng mà sẽ làm chậm, so với khi không điều trị, sự khởi phát của sự gia tăng nồng độ glucoza huyết mà cần phải điều trị bằng các thuốc chống tăng glucoza huyết như sulfonylure, thiazolidindion, insulin, và/hoặc bisguanidin.

“Lượng hữu hiệu” của hợp chất theo sáng chế được dùng cho đối tượng cũng sẽ phụ thuộc vào loại và mức độ nghiêm trọng của bệnh và phụ thuộc vào các đặc điểm của đối tượng, như sức khỏe nói chung, tuổi, giới tính, thể trọng và độ dung nạp thuốc. Liều lượng của hợp chất theo sáng chế hữu hiệu để bình thường hóa mức glucoza huyết của đối tượng sẽ phụ thuộc vào một số yếu tố, trong số chúng được bao hàm, mà không giới hạn ở, giới tính, thể trọng và tuổi của đối tượng, mức độ nghiêm trọng của việc không có khả năng điều chỉnh mức glucoza huyết, đường dùng và độ sinh khả dụng, profin được động học của peptit, hiệu lực, và việc bào chế.

Các hợp chất cụ thể theo sáng chế nhìn chung có hiệu quả với một phạm vi liều lượng rộng. Ví dụ, liều dùng là một lần/tuần có thể nằm trong khoảng từ 0,05 đến khoảng 30 mg/người/tuần. Các hợp chất cụ thể theo sáng chế có thể được phân liều dùng hàng ngày. Ngoài ra, các hợp chất cụ thể theo sáng chế có thể được phân liều hai lần mỗi tuần, một lần mỗi tuần hoặc hàng tháng.

“Đối tượng” là động vật có vú, tốt hơn là người, nhưng cũng có thể là động vật, bao gồm động vật bầu bạn (chẳng hạn, chó, mèo, và các động vật tương tự), động vật trang trại (chẳng hạn, bò, cừu, lợn, ngựa, và các động vật tương tự) và động vật phòng thí nghiệm (chẳng hạn, chuột cống, chuột nhắt, chuột lang, và các động vật tương tự).

Như được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ “điều trị” hoặc “để điều trị” bao gồm việc ngăn chặn, làm chậm, chấm dứt, hoặc đảo ngược sự tiến triển hoặc mức độ nghiêm trọng của triệu chứng hoặc rối loạn đã có.

Thuật ngữ “chu kỳ bán hủy trong huyết tương” dùng để chỉ thời gian cần thiết để một nửa lượng hợp chất tương ứng được thanh thải khỏi huyết tương. Thuật ngữ

được sử dụng thay thế là “chu kỳ bán thải”. Thuật ngữ “được kéo dài” hoặc “dài hơn” được sử dụng đối với chu kỳ bán hủy trong huyết tương hoặc chu kỳ bán thải để chỉ ra rằng có sự tăng đáng kể về chu kỳ bán hủy của hợp chất theo sáng chế so với that phân tử tham chiếu (chẳng hạn dạng không được liên hợp axit béo của peptit này, OXM kiểu hoang ở người hoặc semaglutide) như được xác định trong tình trạng bệnh tương đương.

Mức độ thanh thải là tiêu chuẩn để đánh giá khả năng của cơ thể loại bỏ thuốc ra khỏi hệ tuần hoàn. Khi mức độ thanh thải giảm do, chẳng hạn, sự cải biến đối với thuốc, chu kỳ bán thải sẽ được cho là gia tăng. Tuy nhiên, mối quan hệ thuận nghịch này chỉ chính xác khi không có sự thay đổi về thể tích phân bố. Mối quan hệ gần đúng hữu hiệu giữa chu kỳ bán hủy log tuyến tính cuối cùng ($T_{1/2}$), độ thanh thải (C) và thể tích phân bố (V) được đưa ra bởi biểu thức: $T_{1/2} \approx 0,693 (V/C)$. Độ thanh thải không chỉ ra bao nhiêu thuốc cần phải được loại bỏ mà chỉ ra thể tích của dịch sinh học như máu hoặc huyết tương that sẽ phải được giải phóng hoàn toàn khỏi thuốc để lý giải cho sự thải loại. Độ thanh thải được biểu thị dưới dạng thể tích trên một đơn vị thời gian.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “ưa nước” dùng để chỉ đặc tính có khả năng hấp thu hơi ẩm một cách dễ dàng và mang các nhóm phân cực mạnh dễ dàng tương tác với nước.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, “semaglutide” đề cập đến dạng tương tự GLP-1 được tổng hợp hóa học mà có khung peptit và cấu trúc hóa học chung thấy trong số đăng kí CAS 910463-68-2.

Các trình tự axit amin theo sáng chế chứa chữ cái riêng rẽ tiêu chuẩn hoặc bộ ba chữ cái dùng cho hai mươi axit amin có trong tự nhiên. Ngoài ra, “Aib” là axit alpha amino isobutyric, “Abu” là axit aminobutyric, “Orn” là ornithin, “Cit” là xitrulin và “Sar” là sarcosin.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “axit amin đầu tận cùng C” dùng để chỉ axit amin cuối cùng trong trình tự của peptit mà chứa một nhóm carboxyl tự do. Axit amin đầu tận cùng C của hợp chất theo sáng chế là Gly ở vị trí 34.

Sáng chế cũng bao gồm các chất trung gian mới và các quy trình hữu dụng để tổng hợp các hợp chất theo sáng chế, hoặc muối được dụng của chúng. Các chất trung gian và các hợp chất theo sáng chế có thể được điều chế theo nhiều quy trình đã biết trong lĩnh vực. Cụ thể, quy trình sử dụng tổng hợp hóa học được minh họa trong các Ví dụ dưới đây. Các bước tổng hợp cụ thể cho mỗi quy trình được mô tả có thể được kết hợp theo các cách khác nhau để điều chế các hợp chất theo sáng chế, hoặc muối của nó. Các chất phản ứng và nguyên liệu ban đầu là dễ dàng có được đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Cần hiểu rằng các Ví dụ này không được dự định để giới hạn phạm vi của sáng chế theo cách bất kỳ.

Ví dụ thực hiện sáng chế

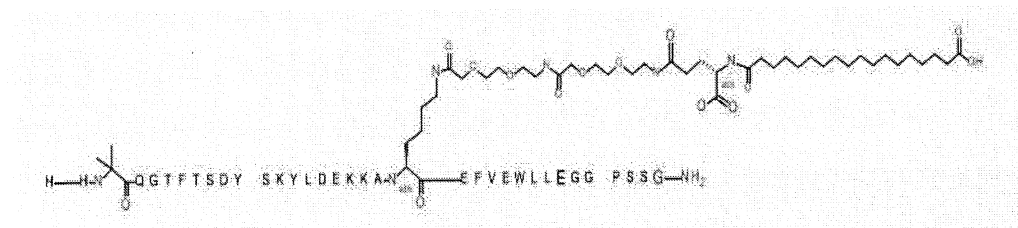
Ví dụ 1

HXaa2QGTFTSDY SKYLDEKKAKEFVEWLLEGGPSSG

trong đó Xaa2 là Aib;

K ở vị trí 20 được cải biến hóa học nhờ sự liên hợp với nhóm epsilon-amino của mạch bên K với ([2-(2-amino-etoxy)-etoxy]-axetyl)₂-(γGlu)₁-CO-(CH₂)₁₆-CO₂H; và

axit amin đầu tận cùng C được amit hóa ở dạng amit bậc một đầu tận cùng C (SEQ ID NO: 5).



Biểu đồ nêu trên mô tả cấu trúc của hợp chất có trình tự SEQ ID NO: 5 (dưới đây được đề cập đến như là “hợp chất 1”) bằng cách sử dụng mã chữ cái tiêu chuẩn dùng cho axit amin ngoại trừ các gốc Aib2 và K20 ở đó cấu trúc của các axit amin này đã được mở rộng.

Hợp phần peptit của hợp chất 1 được tổng hợp bằng cách tổng hợp tự động pha rắn có sử dụng phương pháp tổng hợp hóa học florenylmetyloxycarbonyl (Fmoc)/tert-Butyl (t-Bu) trên thiết bị tổng hợp peptit đa thành phần 12 kênh Symphony (Protein Technologies, Inc. Tucson, AZ).

Nhựa tổng hợp chứa 1% DVB polystyren lên kết ngang (Fmoc-Rink-MBHA Low Loading resin, 100-200 mesh, EMD Millipore, Temecula, CA) ở mức thay thế 0,3-0,4 meq/g. Các nhóm bảo vệ mạch bên tiêu chuẩn là như sau: tert-butyloxycarbonyl (Boc) đối với Trp và Lys; tert-butyl este (OtBu) đối với Asp và Glu; tBu đối với Ser, Thr và Tyr; và triphenylmetyl (Trt) đối với Gln; N- α -Fmoc-N- ϵ -4-methyltrityl-L-lysine (Fmoc-Lys(Mtt)-OH) được sử dụng cho lysine ở vị trí 20 của SEQ ID NO: 3 và N- α ,N-(im)-di-Boc-L-histidine (Boc-His(Boc)-OH) được sử dụng cho histidine ở vị trí 1. Các nhóm Fmoc được loại bỏ trước mỗi bước kết hợp (2 x 7 phút) bằng cách sử dụng 20% piperidine trong dimethylformamide (DMF). Tất cả các bước kết hợp axit amin tiêu chuẩn được thực hiện trong 1 giờ, bằng cách sử dụng tỷ lệ phân tử gam bằng nhau của axit amin Fmoc (EMD Millipore, Temecula, CA), diisopropylcarbodiimide (DIC)(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) và Oxyma (Oxyma Pure, Iris Biotech, Marktredwitz, Germany), ở lượng dư phân tử gam gấp 9 lần so với lượng nạp peptit theo lý thuyết và ở nồng độ cuối là 0,18 M trong DMF.

Hai trường hợp ngoại lệ là gốc glutamine ở vị trí 3 của SEQ ID NO: 5, mà nó được kết hợp gấp đôi (2 x 1 giờ), và gốc histidine ở vị trí 1 của SEQ ID NO: 5, mà nó được kết hợp ở lượng dư phân tử gam gấp 6 lần bằng cách sử dụng 1-Hydroxy-7-azabenzotriazole (HOAt) thay cho Oxyma trong 18 giờ. Sau khi hoàn tất việc tổng hợp peptit mạch thẳng, nhựa được chuyển đến xiranh polypropylen 25 mL đã được nấu chảy dùng một lần (Torviq, Niles, MI) được lắp với một van khóa polytetrafluorethylen (PTFE) (Biotage, Charlotte, NC) và nhóm bảo vệ 4-methyltrityl (Mtt) trên lysine ở vị trí 20 của SEQ ID NO: 5 được loại bỏ một cách chọn lọc từ nhựa peptit bằng cách sử dụng ba chu trình xử lý với 20% hexafluoroisopropanol (Oakwood Chemicals, West Columbia, SC) trong DCM (2 x 10 phút và 1 x 45 phút) để lộ ra epsilon amin tự do của lysine ở vị trí 20 khiến cho nó sẵn sàng tham gia phản ứng tiếp theo.

Việc gắn tiếp theo của gốc axit béo-đoạn liên kết này được hoàn tất bằng cách thực hiện hai phản ứng kết hợp liên tiếp của axit [2-(2-(Fmoc-amino)etoxy)etoxy]acetic (Fmoc-AEEA-OH) (ChemPep, Inc. Wellington, FL; lượng dư axit amin gấp 3 lần (AA):1-[Bis(dimethylamino)metylen]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridin-3-oxit hexaflophosphat (HATU): *N,N*-diisopropyletylamin (DIPEA) [1:1:5 mol/mol] trong thời gian kết hợp 3 giờ), sau đó là phản ứng kết hợp giữa Fmoc-axit glutamic α -t-butyl este (Fmoc-Glu-OtBu)(Ark Pharm, Inc. Libertyville IL, lượng dư AA gấp 3 lần:HATU:DIPEA [1:1:5 mol/mol] trong thời gian kết hợp 3 giờ). Trong mỗi trường hợp, gốc Fmoc được loại bỏ như đã mô tả trên đây. Cuối cùng, axit mono-OtBu-octadecandioic (WuXi AppTec, Shanghai, China) được kết hợp vào nhựa trong 18 giờ bằng cách sử dụng lượng dư axit:HATU:DIPEA gấp 3 lần (1:1:5 mol/mol).

Sau khi quá trình tổng hợp hoàn tất, nhựa peptit được rửa bằng diclometan (DCM), dietyl ete và được làm khô kỹ bằng không khí bằng cách hút chân không xiranh trong 5 phút. Nhựa khô được xử lý bằng hỗn hợp tách (axit trifloaxetic (TFA): anisol: nước: triisopropylsilan, 88:5:5:2 v/v) trong 2 giờ ở nhiệt độ trong phòng để giải phóng peptit khỏi chất mang rắn và loại bỏ tất cả các nhóm bảo vệ mạch bên. Nhựa này được lọc khỏi, được rửa hai lần bằng TFA nguyên chất, và dịch lọc kết hợp được xử lý bằng dietyl ete lạnh để kết tủa peptit thô. Sau đó, hỗn dịch peptit/ete được ly tâm ở 4000 vòng/phút để tạo thành viên kết rắn, phần dịch nổi được gạn, và viên kết rắn được nghiền với ete hai lần nữa và được làm khô trong chân không. Peptit thô được hòa tan trong 20% axetonitril/nước và được tinh chế bằng RP-HPLC trên cột điều chế C8 (Luna 21 x 250 mm, Phenomenex, Torrance, CA) với gradien tuyến tính gồm axetonitril và nước bằng cách sử dụng ba hệ đệm khác nhau:

- 1) 0,1 M amoni axetat trong nước, pH 5,0;
- 2) 0,1 % TFA trong nước; và
- 3) 5% axit axetic trong nước.

Đồng khô tiếp theo phần gom sản phẩm chính cuối cùng thu được muối peptit axetat đã đông khô.

Trong quá trình tổng hợp được thực hiện về cơ bản như đã mô tả trên đây, độ tinh khiết của hợp chất 1 được đánh giá bằng cách sử dụng RP-HPLC phân tích và được nhận thấy là >97%.

Khối lượng phân tử được xác định bằng MS phun điện phân tích. Khối lượng phân tử của hợp chất 1 được tính là 4535,0 Dalton trong khi khối lượng phân tử trung bình đã được xoắn lại quan sát được là 4535,0 Dalton và quan sát thấy các ion sau đây: 1512,3 (M+3H), 1134,3 (M+4H), 908 (M+5H).

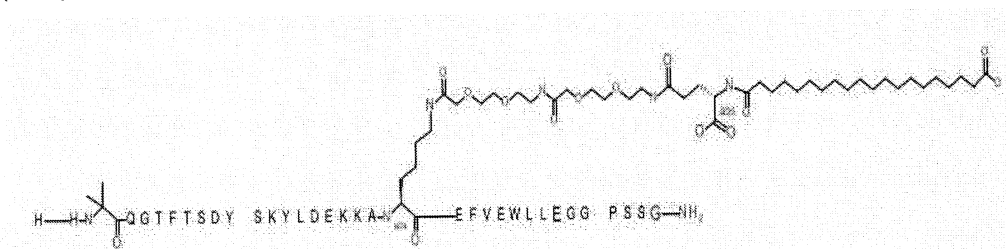
Ví dụ 2

HXaa2QGTFTSDY SKYLDEKKAKEFVEWLLEGGPSSG

trong đó Xaa2 là Aib;

K ở vị trí 20 được cải biến hóa học nhờ sự liên hợp với nhóm epsilon-amino của mạch bên K với ([2-(2-amino-etoxy)-etoxy]-axetyl)₂-(γGlu)₁-CO-(CH₂)₁₈-CO₂H; và

axit amin đầu tận cùng C được amit hóa ở dạng amit bậc một đầu tận cùng C (SEQ ID NO: 6).



Biểu đồ nêu trên mô tả cấu trúc của hợp chất có trình tự SEQ ID NO: 6 (dưới đây được đề cập đến như là “hợp chất 2”) bằng cách sử dụng mã chữ cái tiêu chuẩn dùng cho axit amin ngoại trừ các gốc Aib2 và K20 ở đó cấu trúc của các axit amin này đã được mở rộng.

Hợp chất 2 được tổng hợp như trong ví dụ 1, chỉ khác là axit mono-OtBu-eicosandioic (WuXi AppTec, Shanghai, China) được kết hợp với nhựa trong 18 giờ

bằng cách sử dụng lượng dư AA gấp 3 lần:HATU:DIPEA (1:1:5 mol/mol), mà không phải là axit mono-OtBu-octadecandioic như trong ví dụ 1.

Khối lượng phân tử của hợp chất 2 được tính là 4563,1 Dalton trong khi khối lượng phân tử trung bình đã được xoắn lại quan sát được là 4562,9 Dalton và quan sát thấy các ion sau đây: 1521,7 (M+3H), 1141,3 (M+4H), 913,5 (M+5H).

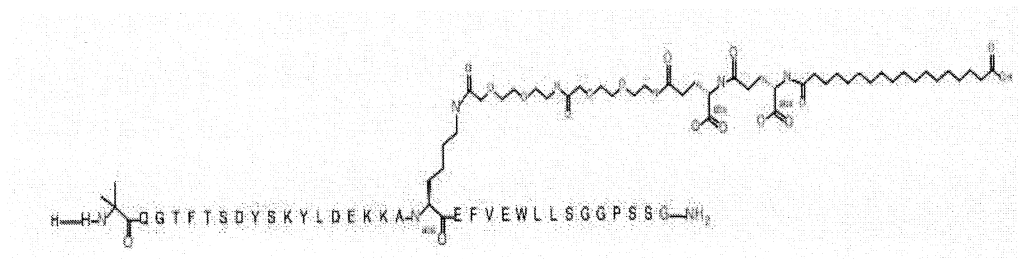
Ví dụ 3

HXaa2QGTFTSDYSKYLDEKKAKEFVEWLLSGGPSSG

trong đó Xaa2 là Aib;

K ở vị trí 20 được cải biến hóa học nhờ sự liên hợp với nhóm epsilon-amino của mạch bên K với ([2-(2-amino-etoxy)-etoxy]-axetyl)₂-(γGlu)₂-CO-(CH₂)₁₆-CO₂H; và

axit amin đầu tận cùng C được amit hóa ở dạng amit bậc một đầu tận cùng C (SEQ ID NO: 7).



Biểu đồ nêu trên mô tả cấu trúc của hợp chất có trình tự SEQ ID NO: 7 (dưới đây được đề cập đến như là “hợp chất 3”) bằng cách sử dụng mã chữ cái tiêu chuẩn dùng cho axit amin ngoại trừ các gốc Aib2 và K20 ở đó cấu trúc của các axit amin này đã được mở rộng.

Hợp chất 3 được tổng hợp như trong ví dụ 1, chỉ khác là một gốc Fmoc-Glu-OtBu nữa được bổ sung vào chu trình tổng hợp đoạn liên kết.

Khối lượng phân tử của hợp chất 3 được tính là 4622,1 Dalton trong khi khối lượng phân tử trung bình đã được xoắn lại quan sát được là 4621,9 Dalton và quan sát thấy các ion sau đây: 1541,3 (M+3H), 1156,2 (M+4H), 925,2 (M+5H).

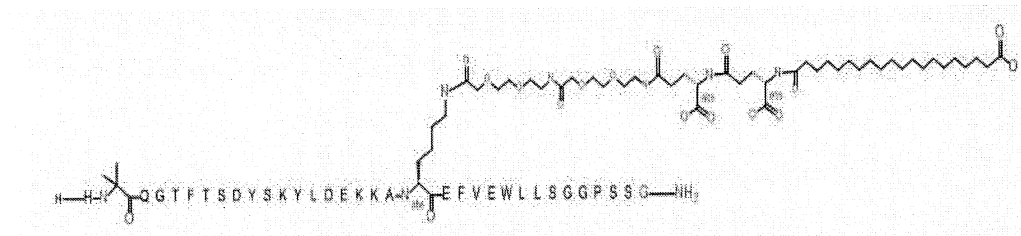
Ví dụ 4

HXaa2QGTFTSDYSKYLDEKKAKEFVEWLLSGGPSSG

trong đó Xaa2 là Aib;

K ở vị trí 20 được cải biến hóa học nhờ sự liên hợp với nhóm epsilon-amino của mạch bên K với ([2-(2-amino-etoxy)-etoxy]-axetyl)₂-(γGlu)₂-CO-(CH₂)₁₈-CO₂H; và

axit amin đầu tận cùng C được amit hóa ở dạng amit bậc một đầu tận cùng C (SEQ ID NO: 8).



Biểu đồ nêu trên mô tả cấu trúc của hợp chất có trình tự SEQ ID NO: 8 (dưới đây được đề cập đến như là “hợp chất 4”) bằng cách sử dụng mã chữ cái tiêu chuẩn dùng cho axit amin ngoại trừ các gốc Aib2 và K20 ở đó cấu trúc của các axit amin này đã được mở rộng.

Hợp chất 4 được tổng hợp như trong ví dụ 1, chỉ khác là axit mono-OtBu-eicosandioic (WuXi AppTec, Shanghai, China) được kết hợp với nhựa trong 18 giờ bằng cách sử dụng lượng dư AA gấp 3 lần: HATU:DIPEA (1:1:5 mol/mol), mà không phải là axit mono-OtBu-octadecandioic được sử dụng trong ví dụ 1. Ngoài ra, một gốc axit amin Fmoc-Glu-OtBu nữa được bổ sung vào chu trình tổng hợp đoạn liên kết.

Khối lượng phân tử của peptit được tính là 4650,1 Dalton trong khi khối lượng phân tử trung bình đã được xoắn lại quan sát được được xác định là 4650,1 Dalton và quan sát thấy các ion sau đây: 1550,7 (M+3H), 1163,3 (M+4H), 930,8 (M+5H).

Đặc tính vật lý

Độ nhớt

Độ nhớt của hợp chất theo sáng chế được xác định trong nhớt kế Rheosense mVroc Viscometer với các cài đặt sau đây:

- (a) Cỡ xyranh: xyranh 500 μL
- (b) Tốc độ dòng: Tốc độ dòng 100 $\mu\text{L/phút}$
- (c) Nhiệt độ trung bình: 25°C
- (d) Tốc độ cắt: 1934 s^{-1}

Bột khô (hợp chất) được cân, hòa tan trong nước ở dạng kết tủa đục, và chuẩn độ đến khoảng độ pH 8,0 bằng NaOH 1N. Dung dịch được siêu âm và được lắc xoáy bằng tay cho đến khi peptit tan trong dung dịch. Các mẫu được lọc vô trùng (thiết bị lọc PVDF cỡ lỗ 0,22 μm). Tiếp theo, các mẫu được phân tích bằng UV-Vis để xác định nồng độ dung dịch gốc. Các dung dịch được pha loãng đến nồng độ cuối bằng cách sử dụng 3x m-cresol trong dung dịch đệm 10 mM Tris pH 8.0 đến nồng độ cuối bằng khoảng 10 mg peptit/mL theo khối lượng trong 10 mM Tris + 3 mg/mL m-cresol ở pH 8.0. Các mẫu được lọc qua thiết bị lọc cỡ lỗ 0,22 μm ngay trước khi phân tích độ nhớt. 25 μL mẫu được lấy ra để xác định nồng độ bằng RP-HPLC trước và sau khi phân tích.

Các mẫu đối chứng nước dung dịch đệm được xác định trước và sau khi mỗi mẫu được phân tích. Dụng cụ được rửa bằng dung dịch đệm (3x) giữa mỗi lần phân tích mỗi mẫu. Các mẫu được nạp vào các xyranh riêng rẽ và được phân tích. Lần đo thứ nhất không được dùng để tính toán để cho phép hệ thống cân bằng. Tiếp theo, các mẫu được phân tích lặp lại ba lần ($n=3$).

Độ nhớt của các hợp chất 1-4 được đo về cơ bản như được mô tả trong thử nghiệm này. Dữ liệu độ nhớt của các hợp chất 1-4 được tóm tắt trong bảng 1.

Bảng 1: Dữ liệu độ nhớt đối với các hợp chất 1-4

Mẫu	Độ nhớt xyranh 500 μL (cP hoặc mPa-s)
Mẫu đối chứng đệm	0,99
Hợp chất 1	1,06
Hợp chất 2	1,04
Hợp chất 3	1,03
Hợp chất 4	1,05

Độ tan

Độ tan của các hợp chất theo sáng chế được đo trong các thiết bị Agilent 1100 HPLC, Agilent 1200 HPLC và Nanodrop 2000. Các cột HPLC sau đây được sử dụng:

- (a) RP-HPLC: Waters Symmetry Shield C18, 3,6 μm , 4,6 x 100 mm
- (b) HPLC-SEC: Tosoh Biosciences, TSK2000_{SWXL} 7,8 cm x 30 mm

Tất cả các nồng độ peptit được tạo ra ở 10 mg/mL trong các dung dịch sau:

- (a) 10 mM Tris pH 8,0 + 3 mg/mL m-cresol
- (b) 10 mM Tris pH 8,0 + 3 mg/mL m-cresol + 150 mM NaCl
- (c) 10 mM Tris pH 8,0 + 3 mg/mL m-cresol + 0,02% Tween-20
- (d) PBS pH 7,4

5mL 10 mg/mL peptit hòa tan trong 10 mM Tris ở pH 8,0 được cô đặc đến khoảng 20 mg/mL bằng cách sử dụng thiết bị Amicon-ultra 3kDa MWCO. Dung dịch được lọc bằng cách sử dụng thiết bị lọc Millivex cỡ lỗ 0,22 μm (màng PVDF) và nồng độ cuối được xác định bằng cách sử dụng quang phổ kế NanoDrop. Dung dịch gốc này được sử dụng để bào chế thành dung dịch cuối được chỉ ra ở trên bằng cách sử dụng 3x m-cresol, 10x NaCl, và 100x dung dịch gốc Tween-20. Dung dịch

PBS 10 mg/mL cũng được điều chế bằng cách hòa tan trực tiếp ở 5 mg/mL và cô đặc bằng cách sử dụng thiết bị Amicon-ultra 3kDa MWCO.

Mỗi dung dịch được đặt trong tủ lạnh ở 4°C trong 1 tuần, phân tích bằng RP-HPLC để đánh giá nồng độ và phân tích bằng HPLC-SEC để đánh giá sự tạo thành to các loại HMW. Các phương pháp phân tích được hoàn tất ở tuần T-0 và tuần T-1.

Độ tan của các hợp chất 1-4 được xác định như đã mô tả trong thử nghiệm này. Dữ liệu độ tan của các hợp chất 1-4 được tóm tắt trong bảng 2(a)-(d).

Bảng 2(a): Dữ liệu độ tan của hợp chất 1

Thông số	Tóm tắt
Độ tan / Độ hòa tan	Độ tan 10 mg/mL trong Tris pH 8 + 3mg/mL m-cresol (T8m); Độ tan 10 mg/mL trong Tris pH 8 + 3mg/mL m-cresol + 150 mM NaCl (T8Nm); Độ tan 10 mg/mL trong Tris pH 8 + 3mg/mL m-cresol + 0,02% Tween-20(T8Tm); Độ tan 10 mg/mL trong PBS, pH 7,4; Không quan sát thấy sự kết tủa hoặc sự tách pha có thể nhìn thấy được sau khi bảo quản trong 1 tuần ở 4°C; Không quan sát thấy sự tạo thành các loại HMW bởi SEC-HPLC; RP-HPLC cho thấy nồng độ 10 mg/mL được duy trì trong suốt 1 tuần nghiên cứu.

Bảng 2(b): Dữ liệu độ tan của hợp chất 2

Thông số	Tóm tắt
Độ tan / Độ hòa tan	Độ tan 10 mg/mL trong Tris pH 8 + 3mg/mL m-cresol (T8m); Độ tan 10 mg/mL trong Tris pH 8 + 3mg/mL m-cresol + 150 mM NaCl (T8Nm); Độ tan 10 mg/mL trong Tris pH 8 + 3mg/mL m-cresol + 0,02% Tween-20(T8Tm); Độ tan 10 mg/mL trong PBS, pH 7,4; Không quan sát thấy sự kết tủa hoặc sự tách pha có thể nhìn thấy được sau khi bảo quản trong 1 tuần ở 4°C; Không quan sát thấy sự tạo thành các loại HMW bởi SEC-HPLC; RP-HPLC cho thấy nồng độ 10 mg/mL được duy trì trong suốt 1 tuần nghiên cứu.

Bảng 2(c): Dữ liệu độ tan của hợp chất 3

Thông số	Tóm tắt
Độ tan / Độ hòa tan	Độ tan 10 mg/mL trong Tris pH 8 + 3mg/mL m-cresol (T8m); Độ tan 10 mg/mL trong Tris pH 8 + 3mg/mL m-cresol + 150 mm NaCl (T8Nm); Độ tan 10 mg/mL trong Tris pH 8 + 3mg/mL m-cresol + 0,02% Tween-20(T8Tm); Độ tan 10 mg/mL trong PBS, pH 7,4; Không quan sát thấy sự kết tủa hoặc sự tách pha có thể nhìn thấy được sau khi bảo quản trong 1 tuần ở 4°C; Không quan sát thấy sự tạo thành các loại HMW bởi SEC-HPLC; RP-HPLC cho thấy nồng độ 10 mg/mL được duy trì trong suốt 1 tuần nghiên cứu.

Bảng 2(d): Dữ liệu độ tan của hợp chất 4

Thông số	Tóm tắt
Độ tan / Độ hòa tan	Độ tan 10 mg/mL trong Tris pH 8 + 3mg/mL m-cresol (T8m); Độ tan 10 mg/mL trong Tris pH 8 + 3mg/mL m-cresol + 150 mm NaCl (T8Nm); Độ tan 10 mg/mL trong Tris pH 8 + 3mg/mL m-cresol + 0,02% Tween-20(T8Tm); Độ tan 10 mg/mL trong PBS, pH 7,4; Không quan sát thấy sự kết tủa hoặc sự tách pha có thể nhìn thấy được sau khi bảo quản trong 1 tuần ở 4°C; Không quan sát thấy sự tạo thành các loại HMW bởi SEC-HPLC; RP-HPLC cho thấy nồng độ 10 mg/mL được duy trì trong suốt 1 tuần nghiên cứu.

Chức năng in vitro

Ái lực gắn kết của các hợp chất 1-4 với thụ thể Gcg người (hGcg-R) tái tổ hợp và thụ thể GLP-1 người (hGLP-1-R)

Thử nghiệm gắn kết cạnh tranh khỏi từ phóng xạ bằng cách sử dụng phương pháp thử nghiệm cận nhấp nháy (scintillation proximity assay - SPA) và các màng được điều chế từ các tế bào đã chuyển nhiễm ổn định 293HEK biểu hiện quá mức

hGcg-R hoặc hGLP-1-R được thực hiện để xác định hằng số phân ly cân bằng (K_i) đối với các hợp chất 1-4. Quy trình và kết quả thí nghiệm được mô tả dưới đây.

Thử nghiệm gắn kết hGLP-1R

Thử nghiệm gắn kết thụ thể GLP-1 sử dụng hGLP-1-R đã được tạo dòng (Graziano MP, Hey PJ, Borkowski D, Chicchi GG, Strader CD, *Biochem Biophys Res Commun.* 196(1): 141-6, 1993) được phân lập từ các tế bào 293HEK biểu hiện quá mức hGLP-1R tái tổ hợp. cADN hGLP-1R cDNA được tạo dòng phụ thành plasmid biểu hiện pHĐ (sự biểu hiện được hoạt hóa bởi Trans của protein C tái tổ hợp của người chiều dài đầy đủ được carboxy hóa ở vị trí gama, yếu tố chống huyết khối. Grinnell, B.W., Berg, D.T., Walls, J. and Yan, S.B. *Bio/Technology* 5:1189-1192, 1987). ADN plasmid này được chuyển nhiễm vào các tế bào 293HEK và được chọn lọc bằng 200 $\mu\text{g/mL}$ Hygromycin.

Màng sinh chất thô được điều chế bằng cách sử dụng tế bào từ dịch nuôi cấy bám dính. Các tế bào được dung giải trên đá trong dung dịch đệm nhược trương chứa 50 mM Tris HCl, pH 7,5 và chất ức chế proteaza Roche Complete™ với EDTA. Huyền phù chứa tế bào được phá vỡ bằng cách sử dụng thiết bị đồng hóa Potter-Elvehjem làm bằng thủy tinh được lắp với chày Teflon® cho 25 nhíp. Dịch đồng hóa được ly tâm ở 4 °C ở 1100 x g trong 10 phút. Phần dịch nổi được gom lại và bảo quản trên đá trong khi các viên kết được tái tạo huyền phù trong dung dịch đệm nhược trương và được đồng hóa lại. Hỗn hợp được ly tâm ở 1100 x g trong 10 phút. Phần dịch nổi thứ hai được kết hợp với phần dịch nổi thứ nhất và được ly tâm ở 35000 x g trong 1 giờ ở 4 °C. Viên kết màng ddwwocj tái tạo huyền phù trong dung dịch đệm đồng hóa chứa chất ức chế proteaza, được làm lạnh nhanh trong nitơ lỏng và được bảo quản ở dạng các phần phân ước trong tủ đông ở -80 °C cho đến khi sử dụng.

GLP-1 được tạo đồng vị iot bằng quy trình I-125-lactoperoxidaza và được tinh chế bằng HPLC pha đảo ở Perkin-Elmer (NEX308). Hoạt độ riêng là 2200 Ci/mmol. Việc xác định K_D được thực hiện bằng cách cạnh tranh tương đồng thay vì liên kết bão hòa do hàm lượng propanol cao trong vật liệu I-125 GLP-1. K_D được

ước tính là 1,24 nM và được sử dụng để tính toán các giá trị K_i đối với tất cả các hợp chất thử nghiệm.

Thử nghiệm gắn kết thụ thể được thực hiện bằng cách sử dụng định dạng thử nghiệm cận nhấp nháy (Scintillation Proximity Assay - SPA) với hạt agglutinin mầm lúa mì (wheat germ agglutinin - WGA) (Perkin Elmer). Dung dịch đệm gắn kết chứa 25 mM axit 4-(2-hydroxyetyl)-1-piperazinetsulfonic (HEPES), pH 7,4, 2,5 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 0,1% (w/v) bacitracin (Affymetrix), 0,003% (w/v) Polyoxyetylenesorbitan monolaurate (TWEEN®-20) và chất ức chế Proteaza Roche Complete™ không cùng với EDTA. GLP-1 được hòa tan trong DMSO ở 0,339 mg/mL (0,1 mM) và được bảo quản lạnh đông ở -20 °C trong nhiều phần phân ước 100 μL . Phần phân ước GLP-1 được pha loãng và được sử dụng trong thử nghiệm gắn kết trong vòng 1 giờ. Chất tương tự peptit được hòa tan trong dimetyl sulfoxit (DMSO) và được pha loãng theo dãy nồng độ gấp 3 lần trong 100% DMSO. Tiếp theo, 5 μL hợp chất đã pha loãng theo dãy nồng độ hoặc DMSO được chuyển vào trong đĩa thử nghiệm đáy bằng trong suốt Corning® 3632 chứa 45 μL dung dịch đệm gắn kết thử nghiệm hoặc mẫu đối chứng GLP-1 chưa đánh dấu (gắn kết không đặc hiệu (non-specific binding - NSB) ở nồng độ cuối 0,25 μM). Tiếp theo, 50 μL màng hGLP-1R (0,5 $\mu\text{g}/\text{lỗ}$), 50 μL I-125 GLP-1 (nồng độ cuối 0,15 nM), và 50 μL hạt WGA (150 $\mu\text{g}/\text{lỗ}$) được thêm vào, các đĩa được đập và trộn trên thiết bị lắc đĩa (đặt ở mức 6) trong 1 phút. Các đĩa được đọc bằng thiết bị đếm nhấp nháy PerkinElmer Trilux MicroBeta® sau khi để yên trong 12 giờ ở nhiệt độ trong phòng.

Kết quả được tính toán là tỷ lệ phần trăm của mức gắn kết I-125-GLP-1 đặc hiệu với sự có mặt của hợp chất. Nồng độ IC_{50} tuyệt đối của hợp chất thu được từ phương trình hồi quy không tuyến tính giữa tỷ lệ phần trăm mức gắn kết đặc hiệu của I-125-GLP-1 theo nồng độ của hợp chất bổ sung. Nồng độ IC_{50} được chuyển thành K_i bằng cách sử dụng phương trình Cheng-Prusoff (Cheng, Y., Prusoff, W. H., Biochem. Pharmacol. 22, 3099-3108, (1973)).

K_i của các hợp chất 1-4, Gcg người và GLP-1(7-36) NH_2 người ở hGLP-1-R được chỉ ra trong bảng 3 dưới đây. Số lần lặp lại (n) được chỉ ra trong ngoặc đơn. Dấu (>) chỉ ra rằng % ức chế không đạt 50% và thu được K_i tính toán được bằng cách sử dụng nồng độ thử nghiệm cao nhất. $n=1/n$ chỉ ra rằng giá trị trung bình

không được tính toán khi tất cả các giá trị có ký hiệu > và giá trị được chỉ ra là giá trị cao nhất itnhs toán được.

Bảng 3: K_i của các hợp chất 1-4, Gcg người và GLP-1(7-36)NH₂ người ở hGLP-1-R

Hợp chất	K_i , nM $\pm$ SEM, (n)
Hợp chất 1	$23,0 \pm 5,5$ (n=6)
Hợp chất 2	$28,6 \pm 4,8$ (n=4)
Hợp chất 3	$8,68 \pm 1,60$ (n=4)
Hợp chất 4	$20,2 \pm 8,2$ (n=4)
Gcg người	>4940 (n=1/2)
GLP-1 (7-36)NH ₂ người	$0,75 \pm 0,056$ (n=67)

Thử nghiệm gắn kết hGcg-R

Thử nghiệm gắn kết thụ thể Gcg sử dụng hGcg-R đã được tạo dòng (Lok, S, *et. al.*, *Gene* 140 (2), 203-209 (1994)) được phân lập từ các tế bào 293HEK biểu hiện quá mức hGcg-R tái tổ hợp. ADN bổ trợ hGcg-R được tạo dòng phụ vào pHĐ biểu hiện plasmid (sự biểu hiện được hoạt hóa bởi trans của protein C ở người tái tổ hợp được gama-carboxyl hóa hoàn toàn, yếu tố chống huyết khối. Grinnell, B.W., *et. al.*, *Bio/Technology* 5: 1189-1192 (1987)). ADN plasmid này được chuyển nhiễm vào các tế bào 293HEK và được chọn lọc bằng 200 μ g/mL Hygromycin.

Màng sinh chất thô được điều chế bằng cách sử dụng tế bào từ dịch nuôi cấy bám dính. Các tế bào được dung giải trên đá trong dung dịch đệm nhuộc trương chứa 50 mM Tris HCl, pH 7,5 và chất ức chế proteaza Roche Complete™ với EDTA. Huyền phù chứa tế bào được phá vỡ bằng cách sử dụng thiết bị đồng hóa Potter-Elvehjem làm bằng thủy tinh được lắp với chày Teflon® cho 25 nhíp. Dịch đồng hóa được ly tâm ở 4 °C ở 1100 x g trong 10 phút. Phần dịch nổi được gom lại và bảo quản trên đá trong khi ccas viên kết được tái tạo huyền phù trong dung dịch đệm nhuộc trương và được đồng hóa lại. Hỗn hợp được ly tâm ở 1100 x g trong 10 phút. Phần dịch nổi thứ hai được kết hợp với phần dịch nổi thứ nhất và được ly tâm ở 35000 x g trong 1 giờ ở 4 °C. Viên kết màng ddwwocj tái tạo huyền phù trong dung dịch đệm đồng hóa chứa chất ức chế proteaza, được làm lạnh nhanh trong nitơ lỏng

và được bảo quản ở dạng các phần phân ước trong tủ đông ở -80°C cho đến khi sử dụng.

Gcg được tạo đồng vị iot bằng quy trình I-125-lactoperoxidaza và được tinh chế bằng HPLC pha đảo ở Perkin-Elmer (NEX207). Hoạt độ riêng là 2200 Ci/mmol. Việc xác định K_D được thực hiện bằng cách cạnh tranh tương đồng thay vì gắn kết bão hòa do hàm lượng propanol cao trong vật liệu I-125 Gcg. K_D được ước tính là 3,92 nM và được sử dụng để tính toán các giá trị K_i đối với tất cả các hợp chất thử nghiệm.

Thử nghiệm gắn kết thụ thể được thực hiện bằng cách sử dụng định dạng thử nghiệm cận nhấp nháy (Scintillation Proximity Assay - SPA) với hạt agglutinin mầm lúa mỳ (wheat germ agglutinin - WGA) (Perkin Elmer). Dung dịch đệm gắn kết chứa 25 mM HEPES, pH 7,4, 2,5 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 0,1% (w/v) bacitracin (Affymetrix), 0,003% (w/v) Polyoxyetylenesorbitan monolaurat (TWEEN®-20) và chất ức chế Proteaza Roche Complete™ cùng với EDTA. Gcg được hòa tan trong DMSO ở 3,48 mg/mL (1 mM) và được bảo quản lạnh đông ở -20°C trong nhiều phần phân ước 100 μL . Phần phân ước Gcg được pha loãng và được sử dụng trong thử nghiệm gắn kết trong vòng 1 giờ. Chất tương tự peptit được hòa tan trong DMSO và được pha loãng theo dãy nồng độ gấp 3 lần trong 100% DMSO. Tiếp theo, 5 μL hợp chất đã pha loãng theo dãy nồng độ hoặc DMSO được chuyển vào trong đĩa thử nghiệm đáy bằng trong suốt Corning® 3632 chứa 45 μL dung dịch đệm gắn kết thử nghiệm hoặc mẫu đối chứng Gcg chưa đánh dấu (NSB ở nồng độ cuối 1 μM). Tiếp theo, 50 μL màng hGcg-R (0,5 $\mu\text{g}/\text{lỗ}$), 50 μL I-125 Gcg (nồng độ cuối 0,15 nM trong phản ứng), và 50 μL hạt WGA (150 $\mu\text{g}/\text{lỗ}$) được thêm vào, các đĩa được đậy và trộn trên thiết bị lắc đĩa (đặt ở mức 6) trong 1 phút. Các đĩa được đọc bằng thiết bị đếm nhấp nháy PerkinElmer Trilux MicroBeta® sau khi để yên trong 12 giờ ở nhiệt độ trong phòng.

Kết quả được tính toán là tỷ lệ phần trăm của mức gắn kết I-125-Gcg đặc hiệu với sự có mặt của hợp chất. Nồng độ IC_{50} tuyệt đối của hợp chất thu được từ phương trình hồi quy không tuyến tính giữa tỷ lệ phần trăm mức gắn kết đặc hiệu của I-125-Gcg theo nồng độ của hợp chất bổ sung. Nồng độ IC_{50} được chuyển thành K_i bằng cách sử dụng phương trình Cheng-Prusoff) Cheng, Y., Prusoff, W. H., Biochem.

Pharmacol. 22, 3099-3108, (1973)). K_i của các hợp chất 1-4, Gcg người và GLP-1(7-36)NH₂ người ở hGcg-R được chỉ ra trong bảng 4 dưới đây. Số lần lặp lại (n) được chỉ ra trong ngoặc đơn. Dấu (>) chỉ ra rằng % ức chế không đạt 50% và thu được K_i tính toán được bằng cách sử dụng nồng độ thử nghiệm cao nhất. n=1/2 chỉ ra rằng giá trị trung bình không được tính toán khi tất cả các giá trị có ký hiệu > và giá trị thu được được chỉ ra là giá trị cao nhất tính toán được.

Bảng 4: K_i của các hợp chất 1-4, Gcg người và GLP-1(7-36)NH₂ người ở hGcg-R

Hợp chất	K_i , nM $\pm$ SEM, (n)
Hợp chất 1	14,6 $\pm$ 4,4 (n=6)
Hợp chất 2	17,7 $\pm$ 5,0 (n=4)
Hợp chất 3	37,3 $\pm$ 4,2 (n=4)
Hợp chất 4	27,4 $\pm$ 3,3 (n=4)
Gcg người	2,49 $\pm$ 0,24 (n=73)
GLP-1(7-36)NH ₂ người	>2420 (n=1/2)

Thử nghiệm hGLP-1-R và hGcg-R chức năng

Hoạt tính chức năng được xác định ở các dòng tế bào đơn dòng HEK-293 biểu hiện hGLP-1-R và hGcg-R. Quy trình và kết quả thí nghiệm được mô tả dưới đây.

Mỗi dòng tế bào biểu hiện quá mức thụ thể được xử lý với peptit trong DMEM (Môi trường Eagle được cải biến bởi Dulbecco, Gibco Cat# 31053) được bổ sung 1X GlutaMAX™ (L-alanyl-L-glutamin dipeptit trong 0,85% NaCl, Gibco Cat# 35050), 0,25% FBS (huyết thanh bào thai bò đã được thẩm tách, Gibco Cat# 26400), 0,05% BSA phân đoạn V (albumin bò phân đoạn V, Gibco Cat# 15260), 250 μ M IBMX (3-Isobutyl-1-methylxantin) và 20 mM HEPES [N-(2-Hydroxyetyl)piperazin-N'-(axit 2-etansulfonic), HyClone Cat# SH30237.01] trong 40 μ l thể tích thử nghiệm. Sau khi ủ trong 60 phút ở nhiệt độ trong phòng, sự gia tăng cAMP nội bào thu được (adenosin 3',5'-monophosphat vòng) được xác định định lượng bằng cách sử dụng kit thử nghiệm CisBio cAMP Dynamic 2 HTRF (62AM4PEJ). Các lượng

cAMP trong tế bào được phát hiện bằng cách bổ sung thể liên hợp cAMP-d2 trong dung dịch đệm phân giải tế bào (20 μ l) sau đó thêm kháng thể kháng cAMP-Eu³⁺-Cryptate, cũng trong dung dịch đệm phân giải tế bào (20 μ l). Thử nghiệm cạnh tranh thu được được ủ trong ít nhất 60 phút ở nhiệt độ phòng, sau đó được phát hiện sử dụng dụng cụ PerkinElmer Envision® với kích thích ở 320 nm và phát xạ ở 665 nm và 620 nm. Các đơn vị hình ảnh (phát ra ở 665nm/620nm*10,000) là tỷ lệ nghịch đối với lượng cAMP có mặt và được chuyển thành nM cAMP trên lỗ sử dụng đường cong tiêu chuẩn cAMP. Lượng cAMP tạo ra (nM) trong mỗi lỗ được chuyển thành tỷ lệ phần trăm đảo ứng tối đa quan sát được với 10 nM GLP-1(7-36)NH₂ người hoặc 10 nM Gcg người.

Giá trị EC₅₀ tương đối và tỷ lệ phần trăm cao nhất (E_{max}) thu được bằng cách phân tích hồi quy không tuyến tính có sử dụng tỷ lệ phần trăm đáp ứng cực đại theo nồng độ của peptid được bổ sung, được khớp vào phương trình logic bốn thông số (Genedata Screener®).

Dữ liệu chức năng của các hợp chất 1-4, GLP-1(7-36)NH₂ người, Gcg người và OXM kiểu hoang ở người được chỉ ra trong bảng 5 dưới đây. Các giá trị trung bình của EC₅₀ được thể hiện là các giá trị trung bình hình học $\pm$ sai số tiêu chuẩn của giá trị trung bình (SEM) với số lần lặp lại (n) được thể hiện trong ngoặc đơn. Giá trị trung bình đối với E_{max} được thể hiện là giá trị trung bình số học $\pm$ sai số tiêu chuẩn. ND biểu thị rằng hoạt tính chủ vận là không phát hiện được. Các giá trị được thể hiện là đến ba (3) chữ số có nghĩa

Bảng 5: Hiệu lực chức năng (EC₅₀) và Hiệu quả (E_{max}) của các hợp chất 1-4, GLP-1(7-36)NH₂ người, Gcg người và OXM kiểu hoang ở người

Hợp chất	GLP-1-R người		Gcg-R người	
	EC ₅₀ , nM $\pm$ SEM (n)	E _{max} , %	EC ₅₀ , nM $\pm$ SEM, (n)	E _{max} , %
Hợp chất 1	23,9 $\pm$ 4,5 (13)	104 $\pm$ 7	7,21 $\pm$ 1,06 (13)	112 $\pm$ 3
Hợp chất 2	83,1 $\pm$ 16,8 (15)	107 $\pm$ 7	26,5 $\pm$ 2,2 (15)	114 $\pm$ 5
Hợp chất 3	34,3 $\pm$ 9,4 (13)	105 $\pm$ 5	15,3 $\pm$ 2,2 (13)	104 $\pm$ 5
Hợp chất 4	106 $\pm$ 18 (13)	85,2 $\pm$ 6,0	68,8 $\pm$ 7,2 (15)	116 $\pm$ 4

Gcg người	Không xác định	Không xác định	$0,023 \pm 0,014$ (47)	113 ± 1
GLP-1(7-36)NH ₂ người	$0,168 \pm 0,008$ (51)	101 ± 1	Không xác định	Không xác định
OXM kiểu hoang ở người	$9,54 \pm 1,34$ (8)	$96,9 \pm 5,7$	$0,757 \pm 0,090$ (8)	121 ± 7

Hoạt tính chức năng của GLP-1-R chuột cống trong dòng tế bào u đảo tụy INS1 832-3

Dòng tế bào beta từ tuyến tụy của chuột cống, tế bào INS1 832-3, được sử dụng để xác định hoạt tính chức năng của các hợp chất 1-4 trong việc kích thích sự sản sinh cAMP ở các thụ thể GLP-1 nội sinh. Các tế bào được giữ trong môi trường RPMI 1640 (HyClone, Cat# SH30027) được bổ sung 10% huyết thanh bào thai bò, 10 mM HEPES, 1 mM natri pyruvat, 2 mM L-Glutamin, 50 μ M 2-Mercaptoetanol, và 100U/ml Penicillin/100 μ g/ml Streptomycin trong tủ ủ ở 37°C, 5% CO₂ và được hợp quy hai lần mỗi tuần.

Việc thực hiện thử nghiệm đòi hỏi việc tách riêng các tế bào ra khỏi bình nuôi cấy bằng cách sử dụng dụng cụ tách tế bào không chứa enzym (Enzyme Free Cell Stripper) và được kết viên bằng cách ly tâm ở 1000 vòng/phút trong 5 phút ở nhiệt độ trong phòng. Viên kết tế bào được tái tạo huyền phù trong dung dịch muối được cân bằng bởi Earle (Earle's Balanced Salt Solution - EBSS) có bổ sung 11,2 mM glucoza & 0,1% BSA. 40 μ l huyền phù chứa tế bào ở mật độ 1×10^6 /ml được đưa vào các đĩa màu đen nửa diện tích 96 lỗ (Costar 3875) và được ủ trong thiết bị ủ ở 37°C, 5% CO₂ trong 2 giờ để phục hồi & bỏ đói. Dịch pha loãng theo dãy nồng độ của các hợp chất thử nghiệm được điều chế ở nồng độ thử nghiệm cuối cùng 100X trong 100% DMSO, và được pha loãng tiếp theo 20 lần trong EBSS có bổ sung 11,2 mM glucoza, 0,1% BSA, và 1,25 mM IBMX (Sigma I-7816). Sau 2 giờ bỏ đói, các tế bào được xử lý bằng hợp chất bằng cách bổ sung 10 μ l dịch pha loãng hợp chất 5X vào các đĩa chứa tế bào ($n = 2$) và được ủ trong thiết bị ủ ở 37°C, 5% CO₂ trong 30 phút.

Nồng độ cAMP được xác định bằng cách sử dụng kit thử nghiệm HTRF cAMP (Cisbio): thể liên hợp cAMP-d2 trong dung dịch đệm phân giải tế bào (20 μ l) sau đó là kháng thể kháng cAMP-Eu³⁺-Cryptate, cũng trong dung dịch đệm phân giải

tế bào (20 μ l), được bổ sung vào các tế bào trên đĩa. Thử nghiệm cạnh tranh thu được được ủ trong ít nhất 60 phút ở nhiệt độ phòng, và sau đó được phát hiện bằng cách sử dụng dụng cụ PerkinElmer Envision® với kích thích ở 320 nm và phát xạ ở 665 nm và 620 nm. Các đơn vị hình ảnh (phát ra ở 665nm/620nm*10,000) tỷ lệ nghịch với lượng cAMP có mặt và được chuyển thành nM cAMP trên lỗ bằng cách sử dụng đường cong tiêu chuẩn cAMP.

Nồng độ của cAMP trong mỗi lỗ (nM) được tính toán bằng cách sử dụng a đường cong tiêu chuẩn cAMP và được chuyển thành a tỷ lệ phần trăm đáp ứng tối đa quan sát được đối với peptit GLP-1 nguyên thể ở 300 nM để phù hợp với đường cong.

Giá trị EC_{50} tương đối và tỷ lệ phần trăm cao nhất (% E_{max}) are thu được bằng cách phân tích hồi quy không tuyến tính có sử dụng tỷ lệ phần trăm đáp ứng cực đại theo nồng độ của peptit được bổ sung, được khớp vào phương trình logic bốn thông số (phần mềm GraphPad Prism (Version 6.05)). Thử nghiệm này được thực hiện với 2 đĩa giống hệt nhau. Số lần lặp lại (n) được chỉ ra trong ngoặc đơn.

EC_{50} và % E_{max} đối với OXM kiểu hoang ở người, semaglutide và các hợp chất 1 và 2 được tính toán về cơ bản là như đã mô tả trên đây. Dữ liệu EC_{50} và % E_{max} đối với các hợp chất này được chỉ ra trong bảng 6. Ngoài ra, các hợp chất 1 và 2 làm gia tăng sự sản sinh cAMP theo cách phụ thuộc liều (dữ liệu không được chỉ ra).

Bảng 6: EC_{50} của OXM kiểu hoang ở người, semaglutide và các hợp chất 1 và 2 ở GLP-1-R chuột cống trong dòng tế bào u đảo tụy INS1 832-3

Hợp chất	EC_{50} (nM)	E_{max} (%)
OXM kiểu hoang ở người	7,3 (n=1)	121,1
Semaglutide	5,8 (n=1)	107,2
Hợp chất 1	26,1 (n=1)	112,3
Hợp chất 2	62 (n=1)	104,5

Sự hoạt hóa chức năng của hGcg-R trong tế bào gan người nguyên phát

Tế bào gan người nguyên phát được sử dụng để xác định hoạt tính chức năng của các hợp chất trong việc kích thích sản sinh cAMP ở các thụ thể Gcg nội sinh. Các lọ chứa tế bào gan người nguyên phát ở người được làm lạnh đông trong thùng nitơ lỏng. Ngay khi lấy ra, các lọ được làm tan giá ngay lập tức trong chậu nước có nhiệt độ 37°C. Tiếp theo, hỗn dịch chứa tế bào được chuyển vào 50 ml CHRM (môi trường phụ hồi tế bào gan đã được bảo quản lạnh đông Gibco/Life Technologies cat# CM7000).

Huyền phù chứa tế bào được ly tâm ở 1.000 x g trong 10 phút. Viên kết tế bào được tái tạo huyền phù trong 5ml môi trường đĩa Plating Media sau khi loại bỏ CHRM bằng cách hút khỏi. Môi trường đĩa Plating Media được điều chế bằng cách bổ sung toàn bộ lượng CM3000 Supplement Packs vào 500ml môi trường Williams Media (Gibco/Life Technologies), sau đó lọc vô trùng qua màng lọc cỡ lỗ 0,22µm.

Mật độ tế bào được đếm trên huyết tốc kế, bằng cách bổ sung 100µl huyền phù chứa tế bào vào 100µl Trypan Blue (HyClone Trypan Blue 0,04%, catalog number SV30084.01). Tiếp theo, huyền phù chứa tế bào được pha loãng trong môi trường đĩa Plating Media đến mật độ tế bào cuối cùng là $0,8 \times 10^6$ tế bào trên một ml. 65 ml môi trường đĩa Plating Media được bổ sung vào mỗi lỗ của đĩa 96 lỗ được phủ collagen (Corning BioCoat, catalog number 354649, Lot# 22314033). Tiếp theo, 65 ml huyền phù chứa tế bào được bổ sung vào mỗi lỗ của đĩa 96 lỗ được phủ collagen đến mật độ tế bào cuối cùng là 50.000 tế bào trên mỗi lỗ. Đĩa chứa tế bào được ủ trong tủ ủ ở 37°C, 5% CO₂ trong 3-4 giờ.

Sau khi ủ 3-4 giờ, môi trường được hút ra và được thay bằng 100 ml môi trường duy trì Maintenance Media. Môi trường duy trì được điều chế bằng cách bổ sung toàn bộ lượng CM4000 Supplement Packs vào 500ml môi trường Williams Media (Gibco/Life Technologies), sau đó lọc vô trùng qua màng lọc cỡ lỗ 0,22µm. Đĩa chứa tế bào được đưa quay trở lại tủ ủ ở 37°C, 5% CO₂ qua đêm để chuẩn bị cho thử nghiệm cAMP.

Để chuẩn bị cho thử nghiệm, các hợp chất 1 và 2 và OXM kiểu hoang ở người được đưa đi pha loãng theo dãy nồng độ gấp 3 lần trong dung dịch đệm thử nghiệm

đối với hợp chất (HBSS chứa 20 mM HEPES và 1% FBS đã được làm vô hoạt bởi nhiệt) thành 10 nồng độ.

Đĩa chứa tế bào được lấy ra từ tủ ủ và môi trường được lấy đi bằng cách hút nhẹ mà không làm xáo trộn lớp đơn tế bào. Các tế bào được xử lý bằng cách bổ sung 40µl dung dịch đệm thử nghiệm tế bào và 40µl dung dịch thử nghiệm (nghĩa là hợp chất 1, hợp chất 2 hoặc OXM kiểu hoang ở người được pha loãng trong dung dịch đệm thử nghiệm hợp chất) vào các đĩa chứa tế bào và ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ có khuấy nhẹ.

Nồng độ cAMP được xác định bằng cách sử dụng kit thử nghiệm HTRF cAMP (Cisbio): thể liên hợp cAMP-d2 trong dung dịch đệm phân giải tế bào (40 µl) sau đó là kháng thể kháng cAMP-Eu³⁺-Cryptate, cũng trong dung dịch đệm phân giải tế bào (40 µl), được bổ sung vào các tế bào trên đĩa. Thử nghiệm cạnh tranh thu được được ủ trong ít nhất 60 phút ở nhiệt độ phòng, sau đó được phát hiện sử dụng dụng cụ PerkinElmer Envision® với kích thích ở 320 nm và phát xạ ở 665 nm và 620 nm. Các đơn vị hình ảnh (phát ra ở 665nm/620nm*10,000) là tỷ lệ nghịch đối với lượng cAMP có mặt và được chuyển thành nM cAMP trên giếng sử dụng đường cong tiêu chuẩn cAMP.

Nồng độ của cAMP trong mỗi lỗ (nM) được tính toán bằng cách sử dụng đường cong tiêu chuẩn cAMP và được chuyển thành tỷ lệ phần trăm đáp ứng tối đa quan sát được đối với chất tương tự Gcg được liên hợp với axit béo bão hòa C18 (diacxit) để phù hợp với đường cong.

Giá trị EC₅₀ tương đối và tỷ lệ phần trăm cao nhất (% E_{max}) are thu được bằng cách phân tích hồi quy không tuyến tính có sử dụng tỷ lệ phần trăm đáp ứng cực đại theo nồng độ của peptit được bổ sung, được khớp vào phương trình logic bốn thông số (phần mềm GraphPad Prism (Version 6.05)).

EC₅₀ và % E_{max} đối với các hợp chất 1 và 2 và OXM kiểu hoang ở người được tính toán về cơ bản là như đã mô tả trên đây. Dữ liệu EC₅₀ và % E_{max} đối với các hợp chất này được chỉ ra trong bảng 7. Ngoài ra, các hợp chất 1 và 2 làm gia tăng sự sản sinh cAMP theo cách phụ thuộc liều (dữ liệu không được chỉ ra). Số lần lặp lại (n) được chỉ ra trong ngoặc đơn.

Bảng 7: EC₅₀ của các hợp chất 1 và 2 và OXM kiểu hoang ở người ở hGcg-R trong tế bào gan người nguyên phát

Hợp chất	EC ₅₀ (nM)	E _{max} (%)
OXM kiểu hoang ở người	29,8 (n=1)	90,0
Hợp chất 1	99,9 (n=1)	100,0
Hợp chất 2	159,4 (n=1)	101,2

Dược động học

Dược động học ở khỉ Cynomolgus

Các đặc tính dược động *in vivo* của các hợp chất theo sáng chế được chứng minh bằng cách sử dụng khỉ cynomolgus.

Các hợp chất được dùng bằng cách dùng liều đơn 50 nmol/kg hoặc 250 nmol/kg qua đường tĩnh mạch hoặc dùng dưới da. Máu được lấy từ mỗi động vật ở 4, 8, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 240, 288, 208, 480, 576 và 672 giờ sau khi phân liều dùng.

Nồng độ huyết tương của các hợp chất được xác định bằng phương pháp LC/MS. Tóm lại, hợp chất theo sáng chế được chiết từ 100% huyết tương khi (25 µl) bằng cách sử dụng axetonitril. Hai lớp khác biệt được tạo thành nhờ việc ly tâm với hợp chất có trong lớp lỏng này. Phần phân ước 80 µl của phần dịch nổi được chuyển đến đĩa 96 lỗ, được pha loãng bằng 150 µl nước và 25 µl axit formic. Mẫu đã pha loãng (10 µl) được bơm lên cột Supelco Analytical Discovery BIO Wide Pore C5-3, 5 cm X 1 mm, 3 µm. Dòng ra từ cột được đưa vào máy đo phổ khối Thermo Q-Exactive để phát hiện và định lượng.

Trong các thí nghiệm được thực hiện về cơ bản như đã mô tả đối với thử nghiệm này, khỉ cynomolgus được cho dùng liều đơn dưới da (50 nmol/kg) hợp chất 1 trong 40 mM Tris HCl (pH 8,0) ở thể tích 0,20 mL/kg. Máu được lấy từ mỗi động vật sau ở 2 (chỉ IV), 7, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 168, 192, 240, 336, 480, 576, và 672 giờ sau khi dùng liều.

Các khỉ cynomolgus khác được cho dùng liều đơn qua đường tĩnh mạch (50 nmol/kg) hoặc dùng dưới da (50 hoặc 250 nmol/kg) hợp chất 2 trong 40 mM Tris

HCl (pH 8,0) ở thể tích 0,20 mL/kg. Máu được lấy từ mỗi động vật sau ở 2 (chỉ IV), 7, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 168, 192, 240, 336, 480, 576, và 672 giờ sau khi dùng liều.

Dữ liệu đối với hợp chất 1 được nêu trong bảng 9 và dữ liệu đối với hợp chất 2 được nêu trong bảng 10.

Hợp chất 1 đạt nồng độ trung bình cực đại trong huyết tương ở khoảng 12 giờ sau khi dùng liều 50 nmol/kg dưới da. Thời gian bán hủy trung bình là 57 giờ và độ thanh thải trung bình là 2,16 mL/giờ/kg (bảng 8).

Hợp chất 2 đạt nồng độ trung bình cực đại trong huyết tương ở khoảng 24 giờ sau khi dùng liều 50 nmol/kg dưới da. Thời gian bán hủy trung bình là 122 giờ và độ thanh thải trung bình là 0,55 mL/giờ/kg (bảng 9).

Bảng 8: Các thông số dược động học riêng rẽ và trung bình sau khi dùng hợp chất 1 với liều đơn 50 nmol/kg dưới da cho khỉ cynomolgus đực

Hợp chất	ID động vật	T _{1/2} (giờ)	T _{max} (giờ)	C _{max} (nmol/L)	AUC _{0-inf} (hr*nmol/L)	CL/F (mL/giờ/kg)
Hợp chất 1: SC 50nmol/kg	I07762	47	12	253	21672	2,31
	I07763	67	12	236	24865	2,01
	Trung bình	57	12	244	23268	2,16

Các chữ viết tắt AUC_{0-inf} = diện tích dưới đường cong từ 0 đến vô cực, CL/F = độ thanh thải/độ sinh khả dụng, T_{max} = thời gian đạt đến nồng độ cực đại, C_{max} = nồng độ cực đại trong huyết tương, T_{1/2} = thời gian bán hủy.

Bảng 9: Các thông số dược động học riêng rẽ và trung bình của hợp chất 2 sau khi dùng liều đơn qua đường tĩnh mạch hoặc dùng dưới da cho khỉ cynomolgus đực

Hợp chất/Đường dùng/Liều	ID động vật	T _{1/2} (giờ)	T _{max} (giờ)	C ₀ hoặc C _{max} (nmol/L)	AUC _{0-inf} (giờ*nmol/L)	CL/F (mL/giờ/kg)
Hợp chất 2: IV 50nmol/kg	I07772	88	Không khả dụng	1017	94828	0,53

	I07773	131	Không khả dụng	1105	93174	0,54
	Trung bình	110	Không khả dụng	1061	94001	0,53
Hợp chất 2: SC 50nmol/kg	I07764	137	24	474	100967	0,50
	I07765	106	24	452	82792	0,60
	Trung bình	122	24	463	91879	0,55
Hợp chất 2: SC 250nmol/kg	I07766	115	12	3640	429859	0,58
	I07767	104	12	3615	540175	0,46
	Trung bình	110	12	3628	485017	0,52

Các chữ viết tắt AUC_{0-inf} = diện tích dưới đường cong từ 0 đến vô cực, CL = độ thanh thải, CL/F = độ thanh thải/độ sinh khả dụng, T_{max} = thời gian đạt đến nồng độ cực đại, C_0 = nồng độ ngoại suy thành thời điểm 0 giờ, C_{max} = nồng độ cực đại trong huyết tương, $T_{1/2}$ = chu kỳ bán hủy, NA = không áp dụng được.

Các nghiên cứu in vivo

Thử nghiệm khả năng dung nạp glucoza qua đường miệng (Oral Glucose Tolerance Test - OGTT) ở chuột nhắt DIO

Mô hình chuột nhắt béo phì do chế độ ăn uống (Diet- induced obese - DIO) là mô hình kháng insulin. Chuột nhắt đực DIO năm đến sáu tháng tuổi (C57BL/6) từ Taconic Biosciences được sử dụng trong nghiên cứu này. Các động vật được nhốt riêng rẽ trong môi trường có điều chỉnh nhiệt độ (24°C) với chu trình 12 giờ sáng/tối (chiếu sáng từ 06:00), và được cho tự do ăn và uống. Khoảng thời gian thích nghi với môi trường là hai tuần. Một ngày trước khi nghiên cứu, các động vật được chia ngẫu nhiên thành các nhóm dựa trên thể trọng của chúng. Vào cùng buổi chiều hôm đó, các động vật được cho nhịn ăn trong các lồng sạch và được dùng tá dược lỏng (40 mM Tris-HCl, pH 8,0) hoặc các hợp chất thử nghiệm bằng cách tiêm dưới da. Sáng hôm sau, 16 giờ sau khi tiêm peptit, thể trọng khi đói được xác định để tính toán liều lượng glucoza. Các mẫu máu được lấy để xác định mức glucoza ở thời điểm

0. Tiếp theo, các động vật được cho dùng glucoza bằng ống thông qua đường miệng vào dạ dày (2 g/kg). Thu được hai nồng độ glucoza đọc được nhờ đường kế ở 15, 30, 60 và 120 phút sau khi dùng glucoza qua đường miệng. Giá trị trung bình của hai nồng độ glucoza đo được được báo cáo ở mỗi thời điểm và diện tích dưới đường cong được tính toán. Số liệu thống kê được phân tích bằng cách sử dụng ANOVA với phép so sánh của Dunnett bởi JMP 6; mức có nghĩa được biểu thị ở $p \leq 0,05$ so với tá dược lỏng.

Trong các thí nghiệm được thực hiện về cơ bản như đã mô tả trong thử nghiệm này, hợp chất 2 thể hiện sự giảm glucoza theo cách phụ thuộc liều trong toàn bộ thử nghiệm dung nạp, và AUC của glucoza giảm ở tất cả ba liều lượng thử nghiệm 1, 3 và 10 nmol/kg (bảng 10).

Bảng 10: AUC của glucoza của chuột nhắt DIO được điều trị bằng hợp chất 2 và semaglutide để đáp ứng với OGTT (2g/kg)

Hợp chất	Liều (nmol/kg)	AUC Glucoza (% tá dược lỏng)
Hợp chất 2	1	76*
Hợp chất 2	3	50*
Hợp chất 2	10	39*
Semaglutide	1	59*
Semaglutide	3	51*
Semaglutide	10	38*

% tá dược lỏng được tính là $100 \times$ (giá trị tính được đối với nhóm hợp chất/giá trị tính được đối với nhóm tá dược lỏng)

* $p \leq 0,05$

OGTT ở chuột nhắt DIO được điều trị bằng Streptozotocin (STZ)

Mô hình chuột nhắt được điều trị bằng STZ là mô hình bệnh tiểu đường sớm. Chuột nhắt DIO năm đến sáu tháng tuổi (C57BL/6) từ Taconic Biosciences được sử dụng trong nghiên cứu này. Các động vật được nhốt riêng rẽ trong môi

trường có điều chỉnh nhiệt độ (24°C) với chu trình 12 giờ sáng/tối (chiếu sáng từ 06:00), và được cho tự do ăn và uống. Sau hai tuần thích nghi với môi trường sống, chuột nhắt được tiêm trong màng bụng 50mg/kg STZ vào ngày thứ Ba và thứ Sáu. Hai tuần sau khi tiêm, các động vật có mức glucoza nằm trong khoảng 180-300mg/dL ở 09:00 được chọn cho nghiên cứu OGTT. Một ngày trước khi nghiên cứu, các động vật được chia ngẫu nhiên thành các nhóm dựa trên thể trọng và mức glucoza của chúng. Các động vật được điều trị bằng tá được lỏng hoặc các hợp chất thử nghiệm bằng cách tiêm dưới da ngay trước khi lấy đi thức ăn qua đêm (16:00). Sáng hôm sau vào lúc 08:00, 16 giờ sau khi tiêm hợp chất, các mẫu máu được lấy để xác định lượng glucoza ở thời điểm 0. Các động vật được cho dùng liều glucoza 2 g/kg qua đường miệng. Glucoza được xác định ở 15, 30, 60, và 120 phút sau khi cho dùng glucoza qua đường miệng. Các số liệu thống kê được phân tích bằng cách sử dụng ANOVA với phép so sánh của Dunnett bởi JMP 6. Mức có nghĩa được chỉ ra ở $p \leq 0,05$ so với tá được lỏng.

Trong các thí nghiệm được thực hiện về cơ bản như đã mô tả trong thử nghiệm này, hợp chất 2 thể hiện sự giảm dao động glucoza theo cách phụ thuộc liều trong thử nghiệm dung nạp. AUC của glucoza giảm ở cả ba liều lượng thử nghiệm 1, 3 và 10 nmol/kg (bảng 11).

Bảng 11: AUC của glucoza của chuột nhắt STZ đực được điều trị bằng hợp chất 2 và semaglutide để đáp ứng với OGTT (2g/kg)

Hợp chất	Liều (nmol/kg)	AUC Glucoza (% tá được lỏng)
Hợp chất 2	1	70*
Hợp chất 2	3	48*
Hợp chất 2	10	35*
Semaglutide	1	72*
Semaglutide	3	53*
Semaglutide	10	35*

% tá dược lỏng được tính là $100 \times$ (giá trị tính được đối với nhóm hợp chất/giá trị tính được đối với nhóm tá dược lỏng)

* $p \leq 0,05$

Kiểm soát glucoza huyết ở chuột nhắt DIO

Chuột nhắt đực DIO năm đến sáu tháng tuổi (C57BL/6) từ Taconic Biosciences được sử dụng trong nghiên cứu này. Các động vật được nhốt riêng rẽ trong môi trường có điều chỉnh nhiệt độ (24°C) với chu trình 12 giờ sáng/tối (chiếu sáng từ 06:00), và được cho tự do ăn và uống. Sau 2 tuần thích nghi với điều kiện sống, chuột nhắt được chia ngẫu nhiên thành các nhóm điều trị ($n=7$ /nhóm) dựa trên thể trọng và mức glucoza huyết. Chuột nhắt được tiêm dưới da một lần bằng tá dược lỏng hoặc các hợp chất (25 nmol/kg). Glucoza huyết được theo dõi 2 và 8 giờ sau khi tiêm và sau đó theo dõi một lần mỗi ngày ở 08:00 trong 4 ngày. OGTT được thực hiện ở 44 và 78 giờ sau khi tiêm peptit. Các số liệu thống kê được phân tích bằng cách sử dụng ANOVA với phép so sánh của Dunnett bởi JMP 6. Mức có nghĩa được chỉ ra ở $p \leq 0,05$ so với tá dược lỏng.

Trong các thí nghiệm được thực hiện về cơ bản như được mô tả trong thử nghiệm này, chuột nhắt được điều trị bằng hợp chất 2 và hợp chất 4 có mức glucoza thấp hơn các mẫu đối chứng điều trị bằng tá dược lỏng lên tới 96 giờ sau khi tiêm. Chuột nhắt được điều trị bằng hợp chất 2 và hợp chất 4 có mức dao động glucoza thấp hơn sau khi dùng glucoza qua đường miệng ở cả hai thời điểm khi OGTT được thực hiện.

Hợp chất 1 và hợp chất 3 làm giảm mức glucoza huyết trong thời gian lên đến 72 giờ (bảng 12). Chuột nhắt được điều trị bằng hợp chất 1 và hợp chất 3 có mức dao động glucoza thấp hơn sau khi dùng glucoza qua đường miệng ở 44 giờ sau khi tiêm peptit (bảng 13).

Bảng 12: Glucoza huyết đo được ở 2, 8, 24, 48, 72 và 96 giờ sau khi tiêm ở chuột nhắt DIO đực

Thời gian	Glucoza huyết (mg/dL) sau khi tiêm Tá dược lỏng		Glucoza huyết (mg/dL) sau khi tiêm Hợp chất 1		Glucoza huyết (mg/dL) sau khi tiêm Hợp chất 2		Glucoza huyết (mg/dL) sau khi tiêm Hợp chất 3		Glucoza huyết (mg/dL) sau khi tiêm Hợp chất 4	
	Trung bình	SEM	Trung bình	SEM	Trung bình	SEM	Trung bình	SEM	Trung bình	SEM
2	155,7	5,0	168,5	21,4	112,7	8,5	173,4	19,0	110,2	2,3
8	164,5	6,7	79,4	3,4	87,4	1,2	81,4	3,8	91,5	4,4
24	189,1	5,1	90,6	4,0	101,1	3,1	96,6	2,8	87,4	1,6
48	142,6	2,5	101,9	4,1	101,3	3,1	95,8	5,3	102,9	4,7
72	154,2	4,2	113,4	5,6	97,6	3,8	104,7	5,6	115,7	2,8
96	159,4	4,3	150,0	10,4	115,0	5,5	141,1	7,2	104,6	2,6

Bảng 13: Dao động glucoza trong suốt OGTT ở 44 giờ và 78 giờ sau khi tiêm hợp chất

Hợp chất	44 giờ	78 giờ
	AUC Glucoza (% tá dược lỏng)	AUC Glucoza (% tá dược lỏng)
Hợp chất 1	42*	90
Hợp chất 2	39*	66*
Hợp chất 3	35*	76*
Hợp chất 4	41*	60*

% tá dược lỏng được tính là $100 \times$ (giá trị tính được đối với nhóm hợp chất/giá trị tính được đối với nhóm tá dược lỏng)

* $p \leq 0,05$

Điều trị mạn tính ở chuột nhắt DIO

Ảnh hưởng của sự hấp thu thức ăn và thể trọng/chất béo được đánh giá ở chuột nhắt DIO. Chuột nhắt DIO năm đến sáu tháng tuổi (C57BL/6) từ Taconic Biosciences được sử dụng trong nghiên cứu này. Các động vật được nhốt riêng rẽ trong môi trường có điều chỉnh nhiệt độ (24°C) với chu trình 12 giờ sáng/tối (chiếu sáng từ 06:00), và được cho tự do ăn và uống. Chuột nhắt được cho thích nghi với điều kiện sống trong hai tuần. Một ngày trước khi bắt đầu nghiên cứu, khối lượng chất béo được xác định theo phương pháp cộng hưởng từ hạt nhân (Nuclear Magnetic Resonance - NMR) có sử dụng dụng cụ Echo Medical System (Houston, TX). Chuột nhắt được chia ngẫu nhiên thành các nhóm điều trị (N=7/nhóm) dựa trên thể trọng và khối lượng chất béo sao cho mỗi nhóm có thể trọng và khối lượng chất béo trung bình ban đầu là tương tự nhau. Tả được lỏng (40mM Tris-HCl, pH 8,0), hợp chất thử nghiệm, hoặc semaglutide đối chứng dương tính được dùng bằng cách tiêm dưới da (SC) cho chuột nhắt tùy ý giữa khoảng thời gian từ 8-10 giờ sáng, ba ngày một lần trong 15 ngày. Việc tiêm dưới da được thực hiện vào ngày 1, 4, 7, 10, và 13. Thể trọng và sự hấp thu thức ăn được xác định ngay trước mỗi lần tiêm trong toàn bộ nghiên cứu. Sự thay đổi thể trọng theo phần trăm được tính toán như sau:

$$\frac{100 \times (\text{Thể trọng cuối cùng của động vật} - \text{Thể trọng ban đầu của động vật})}{\text{Thể trọng ban đầu của động vật}}$$

Thể trọng ban đầu của động vật

Ở thời điểm kết thúc nghiên cứu, tổng khối lượng chất béo được xác định lại bằng NMR. Các số liệu thống kê được phân tích bằng cách sử dụng ANOVA với phép so sánh của Dunnett bởi JMP 6. Mức có nghĩa được chỉ ra ở $p \leq 0,05$ so với tá được lỏng.

Trong các thí nghiệm được thực hiện về cơ bản như được mô tả trong thử nghiệm này, các hợp chất 1-4 làm giảm mức hấp thu thức ăn và thể trọng/chất béo như được chỉ ra trong bảng 14 dưới đây:

Bảng 14: Sự thay đổi thể trọng theo % và sự thay đổi chất béo trong cơ thể theo % ở chuột nhắt DIO

Hợp chất	Liều (nmol/kg)	Thể trọng (% thay đổi so với tá được lỏng từ ngày 1)	Chất béo trong cơ thể (% thay đổi so với tá được lỏng từ ngày 1)
Hợp chất 1	15	-19*	-49*
	30	-29*	-66*
Hợp chất 2	15	-19*	-43*
	30	-33*	-70*
Hợp chất 3	15	-17*	-32*
	30	-37*	-67*
Hợp chất 4	15	-15*	-26*
	30	-39*	-69*
Semaglutide	30	-8	-20*
	60	-12*	-29*

* $p \leq 0,05$

Điều trị cấp tính ở chuột nhắt DIO

Để khảo sát con đường chuyển hóa tham gia vào việc điều trị bằng hợp chất theo sáng chế không phụ thuộc vào sự giảm trọng lượng, các hợp chất được thử nghiệm ở chuột nhắt DIO (C57BL/6) theo cách cấp tính. Chuột nhắt được sử dụng là chuột nhắt ba đến bốn tháng tuổi có chế độ ăn giàu chất béo trong ít nhất 4 tuần. Các động vật được nhốt riêng rẽ trong môi trường có điều chỉnh nhiệt độ (24°C) với chu trình 12 giờ sáng/tối (chiếu sáng từ 06:00), và được cho tự do ăn và uống. Tá được lỏng hoặc các hợp chất thử nghiệm được dùng cho chuột nhắt bằng cách tiêm dưới da vào lúc 16:00 vào ngày trước ngày nghiên cứu. Các động vật được giết 16 giờ sau khi lấy máu bằng cách chích dưới dạ dày. Các số liệu thống kê được phân tích bằng cách sử dụng ANOVA với phép so sánh của Dunnett đối với JMP-6. Mức có nghĩa được chỉ ra ở $p \leq 0,05$ so với tá được lỏng.

Trong các thí nghiệm được thực hiện về cơ bản như được mô tả trong thử nghiệm này, các hợp chất 1-3 làm giảm mức cholesterol và mức PCSK9 trong huyết tương và làm tăng mức FGF-21 như được chỉ ra trong bảng 15. Ngược lại, điều trị bằng semaglutide không làm giảm mức cholesterol và PCSK9 trong huyết tương và làm tăng mức FGF-21. Sự hấp thu thức ăn giảm đến mức tương tự như trong tất cả các nhóm đối chứng, điều này có thể chỉ ra rằng sự thay đổi về hàm lượng cholesterol, PCSK9 và FGF-21 là không phụ thuộc vào sự hấp thu thức ăn.

Bảng 15: Ảnh hưởng cấp tính đối với mức PCSK9, FGF-21 và cholesterol

Hợp chất	Liều (nmol/kg)	PCSK9 (% tá được lỏng)	FGF-21 (% tá được lỏng)	Cholesterol (% tá được lỏng)
Hợp chất 1	30	14,6*	1770*	60,9*
Hợp chất 2	30	12,8*	465*	80,6*
Hợp chất 3	30	15,6*	1124*	55,6*
Semaglutide	30	115,3	75	117,6

% tá được lỏng được tính là $100 \times$ (giá trị tính được đối với nhóm hợp chất/giá trị tính được đối với nhóm tá được lỏng)

* $p \leq 0,05$

Ảnh hưởng đối với mức tiêu thụ năng lượng ở chuột nhắt DIO

Chuột nhắt DIO được từ bảy đến tám tháng tuổi (C57BL/6) cân nặng 45-50g được sử dụng trong nghiên cứu này để đánh giá ảnh hưởng của các hợp chất theo sáng chế đối với sự chuyển hóa năng lượng. Các động vật được nhốt riêng rẽ trong môi trường có điều chỉnh nhiệt độ (24°C) với chu trình 12 giờ sáng/tối (chiếu sáng từ 22:00), và được cho tự do ăn (TD95217)(Teklad) và uống nước. Sau 2 tuần thích nghi khí hậu của khu vực nuôi giữ, chuột nhắt được chia ngẫu nhiên vào các nhóm điều trị (N=6/nhóm) dựa trên khối lượng cơ thể và mỗi nhóm có khối lượng cơ thể trung bình khởi điểm tương tự nhau. Động vật được đặt vào máy đo calo PhenoMaster/LabMaster (TSE Systems, Chesterfield, MO) trong 8 ngày thích nghi khí hậu. Tá được lỏng (dung dịch đệm Tris HCl 40 mM ở độ pH 8,0, 10 ml/kg), các hợp chất thử nghiệm (15 nmol/kg) hoặc semaglutide (60 nmol/kg) được dùng dưới

da cho chuột nhất DIO được cho ăn tùy thích 30-90 phút trước khi bắt đầu chu trình tối ba ngày một lần trong 15 ngày.

Thương số nhiệt và hô hấp (Heat và respiratory quotient -RER) được đo bằng đo calo gián tiếp như được mô tả sử dụng hệ đo calo mạch mở. RER là tỷ lệ giữa thể tích CO₂ tạo ra (VCO₂) với thể tích O₂ tiêu thụ (VO₂). Nhiệt được tính với thể trọng nạc xem xét: Tiêu hao năng lượng là kcal/kg/3 ngày và được biểu thị ở dạng giá trị trung bình $\pm$ SEM của 6 chuột nhất trên mỗi nhóm. Mức có nghĩa về mặt thống kê được đánh giá bằng ANOVA hai yếu tố theo sau bởi thử nghiệm so sánh đa mục tiêu của Tukey.

Trong các thí nghiệm được thực hiện về cơ bản như được mô tả trong thử nghiệm này, chuột nhất được điều trị bằng các hợp chất 1 và 2 tăng tỷ lệ chuyển hóa của chúng bắt đầu từ tuần thứ 2 và kéo dài ảnh hưởng này trong toàn bộ quá trình điều trị như được chỉ ra trong bảng 16. Tuy nhiên, semaglutide không ảnh hưởng đến tỷ lệ chuyển hóa. Mức gia tăng về tỷ lệ chuyển hóa này có thể góp phần vào sự giảm trọng lượng tiếp theo quan sát được khi sử dụng các hợp chất 1 và 2 so với khi sử dụng semaglutide.

Bảng 16: Ảnh hưởng của việc điều trị mạn tính bằng hợp chất 1, hợp chất 2 hoặc semaglutide lên tỷ lệ chuyển hóa ở chuột nhất DIO

Khoảng thời gian điều trị	Nhiệt lũy tích (Kcal/kg khối lượng nạc/3 ngày)			
	Tá dược lỏng	Semaglutide	Hợp chất 1	Hợp chất 2
Ngày 1 đến ngày 4	2184 $\pm$ 27	1973 $\pm$ 51	1749 $\pm$ 136**	1746 $\pm$ 96**
Ngày 4 đến ngày 7	2154 $\pm$ 36	2018 $\pm$ 54	1822 $\pm$ 173	1778 $\pm$ 132*
Ngày 7 đến ngày 10	2239 $\pm$ 28	2151 $\pm$ 48	2349 $\pm$ 129	2549 $\pm$ 129**
Ngày 10 đến ngày 13	2207 $\pm$ 16	2138 $\pm$ 46	2351 $\pm$ 144	2568 $\pm$ 147*

* $p \leq 0,05$ so với tá dược lỏng

** $p \leq 0,05$ so với semaglutide

Trình tự axit amin**SEQ ID NO: 1 (OXM người)**

His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-
Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr-Lys-Arg-Asn-Arg-Asn-Asn-Ile-Ala
(HSQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNTKRNRNNIA)

SEQ ID NO: 2 (Trình tự nhân tạo)

His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Lys-
Ala-Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Xaa28-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly
(HXaa2QGTFTSDYSKYLDEKKAKEFVEWLLXaa28GGPSSG)

trong đó Xaa2 là Aib;

Xaa28 là Glu (E) hoặc Ser (S);

Lys ở vị trí 20 được cải biến hóa học nhờ sự liên hợp của nhóm epsilon-amino của mạch bên Lys với axit béo C14-C24 thông qua (i) liên kết trực tiếp hoặc (ii) đoạn liên kết giữa Lys ở vị trí 20 và axit béo C14-C24; và axit amin đầu tận cùng C tùy ý được amit hóa.

SEQ ID NO: 3 (Trình tự nhân tạo)

His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Lys-
Ala-Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Glu-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly
(HXaa2QGTFTSDYSKYLDEKKAKEFVEWLLEGPPSSG)

trong đó Xaa2 là Aib;

Lys ở vị trí 20 được cải biến hóa học nhờ sự liên hợp của nhóm epsilon-amino của mạch bên Lys với axit béo C14-C24 thông qua (i) liên kết trực tiếp hoặc (ii) đoạn liên kết giữa Lys ở vị trí 20 và axit béo C14-C24; và axit amin đầu tận cùng C tùy ý được amit hóa.

SEQ ID NO: 4 (Trình tự nhân tạo)

His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Lys-
 Ala-Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Ser-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly
 (HXaa2QGTFTSDYSKYLDEKKAKEFVEWLLSGGPSSG)

trong đó Xaa2 là Aib;

Lys ở vị trí 20 được cải biến hóa học nhờ sự liên hợp của nhóm epsilon-amino của mạch bên Lys với axit béo C14-C24 thông qua (i) liên kết trực tiếp hoặc (ii) đoạn liên kết giữa Lys ở vị trí 20 và axit béo C14-C24; và axit amin đầu tận cùng C tùy ý được amit hóa.

SEQ ID NO: 5 (Trình tự nhân tạo)

His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Lys-
 Ala-Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Glu-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly
 (HXaa2QGTFTSDYSKYLDEKKAKEFVEWLLEGGPSSG)

trong đó Xaa2 là Aib;

Lys ở vị trí 20 được cải biến hóa học nhờ sự liên hợp của nhóm epsilon-amino của mạch bên Lys với ([2-(2-aminoetoxy)-etoxy]-axetyl)₂-(γ-Glu)-CO-(CH₂)₁₆CO₂H; và axit amin đầu tận cùng C được amit hóa.

SEQ ID NO: 6 (Trình tự nhân tạo)

His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Lys-
 Ala-Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Glu-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly
 (HXaa2QGTFTSDYSKYLDEKKAKEFVEWLLEGGPSSG)

trong đó Xaa2 là Aib;

Lys ở vị trí 20 được cải biến hóa học nhờ sự liên hợp của nhóm epsilon-amino của mạch bên Lys với $[(2-(2\text{-aminoetoxy})\text{-etoxy})\text{-axetyl}]_2\text{-(}\gamma\text{-Glu)}\text{-CO-(CH}_2\text{)}_{18}\text{CO}_2\text{H}$; và axit amin đầu tận cùng C được amit hóa.

SEQ ID NO: 7 (Trình tự nhân tạo)

His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Lys-Ala-Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Ser-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly
(HXaa2QGTFTSDYSKYLDEKKAKEFVEWLLSGGPSSG)

trong đó Xaa2 là Aib;

Lys ở vị trí 20 được cải biến hóa học nhờ sự liên hợp của nhóm epsilon-amino của mạch bên Lys với $[(2-(2\text{-aminoetoxy})\text{-etoxy})\text{-axetyl}]_2\text{-(}\gamma\text{-Glu)}_2\text{-CO-(CH}_2\text{)}_{16}\text{CO}_2\text{H}$; và axit amin đầu tận cùng C được amit hóa.

SEQ ID NO: 8 (Trình tự nhân tạo)

His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Lys-Ala-Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Ser-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly
(HXaa2QGTFTSDYSKYLDEKKAKEFVEWLLSGGPSSG)

trong đó Xaa2 là Aib;

Lys ở vị trí 20 được cải biến hóa học nhờ sự liên hợp của nhóm epsilon-amino của mạch bên Lys với $[(2-(2\text{-aminoetoxy})\text{-etoxy})\text{-axetyl}]_2\text{-(}\gamma\text{-Glu)}_2\text{-CO-(CH}_2\text{)}_{18}\text{CO}_2\text{H}$; và axit amin đầu tận cùng C được amit hóa.

SEQ ID NO: 9 (Trình tự nhân tạo)

His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Lys-Ala-Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Xaa28-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly

(HXaa2QGTFTSDYSKYLDEKKAKEFVEWLLXaa28GGPSSG)

trong đó Xaa2 là Aib;

Xaa28 là Glu (E) hoặc Ser (S); và

axit amin đầu tận cùng C tùy ý được amit hóa.

SEQ ID NO: 10 (Trình tự nhân tạo)

His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Lys-

Ala-Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Glu-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly

(HXaa2QGTFTSDYSKYLDEKKAKEFVEWLLEGGPSSG)

trong đó Xaa2 là Aib; và

axit amin đầu tận cùng C tùy ý được amit hóa.

SEQ ID NO: 11 (Trình tự nhân tạo)

His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Lys-

Ala-Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Ser-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly

(HXaa2QGTFTSDYSKYLDEKKAKEFVEWLLSGGPSSG)

trong đó Xaa2 là Aib; và

axit amin đầu tận cùng C tùy ý được amit hóa.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Hợp chất có công thức sau:

His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-
Lys-Ala-Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Xaa28-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-
Gly

trong đó

Xaa2 là Aib;

Xaa28 là Glu hoặc Ser;

Lys ở vị trí 20 được cải biến hóa học nhờ sự liên hợp của nhóm epsilon-amino của mạch bên Lys với axit béo C14-C24 thông qua đoạn liên kết giữa Lys ở vị trí 20 và axit béo C14-C24, trong đó đoạn liên kết này là $[(2\text{-aminoetoxy})\text{-etoxy}]\text{-axetyl})_2\text{-(}\gamma\text{-Glu)}_t$, trong đó t bằng 1 hoặc 2; và axit amin đầu tận cùng C tùy ý được amit hóa;

hoặc muối được dụng của nó.

2. Hợp chất theo điểm 1, hoặc muối được dụng của nó, trong đó Xaa28 là Glu.

3. Hợp chất theo điểm 1, hoặc muối được dụng của nó, trong đó Xaa28 là Ser.

4. Hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1-3, hoặc muối được dụng của nó, trong đó t bằng 1.

5. Hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1-3, hoặc muối được dụng của nó, trong đó t bằng 2.

6. Hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1-5, hoặc muối được dụng của nó, trong đó axit béo C14-C24 là monoaxit bão hòa hoặc diaxit bão hòa.

7. Hợp chất theo điểm 6, hoặc muối được dụng của nó, trong đó axit béo là monoaxit bão hòa hoặc diaxit bão hòa được chọn từ nhóm gồm axit myristic (axit tetradecanoic)(C14 monoaxit), axit tetradecandioic (C14 diaxit), axit palmitic (axit hexadecanoic)(C16 monoaxit), axit hexadecandioic (C16 diaxit), axit margaric (axit

heptadecanoic)(C17 monoaxit), axit heptadecandioic (C17 diaxit), axit stearic (axit octadecanoic)(C18 monoaxit), axit octadecandioic (C18 diaxit), axit nonadexylic (axit nonadecanoic)(C19 monoaxit), axit nonadecandioic (C19 diaxit), axit arachadic (axit eicosanoic)(C20 monoaxit), axit eicosandioic (C20 diaxit), axit heneicosylic (axit heneicosanoic)(C21 monoaxit), axit heneicosandioic (C21 diaxit), axit behenic (axit docosanoic)(C22), axit docosandioic (C22 diaxit), axit lignoxeric (axit tetracosanoic)(C24 monoaxit) và axit tetracosandioic (C24 diaxit).

8. Hợp chất theo điểm 6 hoặc 7, hoặc muối được dụng của nó, trong đó axit béo C14-C24 là axit octadecandioic.

9. Hợp chất theo điểm 6 hoặc 7, hoặc muối được dụng của nó, trong đó axit béo C14-C24 là axit eicosandioic.

10. Hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, hoặc muối được dụng của nó, trong đó axit amin đầu tận cùng C được amit hóa.

11. Hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8 và 10, trong đó hợp chất là hợp chất có công thức sau:

His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Lys-Ala-Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Glu-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly

trong đó Xaa 2 là Aib;

Lys ở vị trí 20 được cải biến hóa học nhờ sự liên hợp của nhóm epsilon-amino của mạch bên Lys với $[(2-(2\text{-aminoetoxy})\text{-etoxy})\text{-axetyl}]_2\text{-(}\gamma\text{-Glu)-CO-(CH}_2\text{)}_{16}\text{CO}_2\text{H}$; và

axit amin đầu tận cùng C được amit hóa (SEQ ID NO: 5),

hoặc muối được dụng của nó.

12. Hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1-8 và 10, trong đó hợp chất này là hợp chất có công thức sau:

His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Lys-Ala-Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Ser-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly

trong đó Xaa 2 là Aib;

Lys ở vị trí 20 được cải biến hóa học nhờ sự liên hợp của nhóm epsilon-amino của mạch bên Lys với $[(2-(2\text{-aminoethoxy})\text{-ethoxy})\text{-acetyl}]_2-(\gamma\text{-Glu})_2\text{-CO}-(\text{CH}_2)_{16}\text{CO}_2\text{H}$; và axit amin đầu tận cùng C được amit hóa (SEQ ID NO: 7);

hoặc muối được dụng của nó.

13. Hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1-7 và 9-10, trong đó hợp chất này là hợp chất có công thức sau:

His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Lys-Ala-Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Glu-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly

trong đó Xaa 2 là Aib;

Lys ở vị trí 20 được cải biến hóa học nhờ sự liên hợp của nhóm epsilon-amino của mạch bên Lys với $[(2-(2\text{-aminoethoxy})\text{-ethoxy})\text{-acetyl}]_2-(\gamma\text{-Glu})\text{-CO}-(\text{CH}_2)_{18}\text{CO}_2\text{H}$; và

axit amin đầu tận cùng C được amit hóa (SEQ ID NO: 6);

hoặc muối được dụng của nó.

14. Hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1-7 và 9-10, trong đó hợp chất này là hợp chất có công thức sau:

His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Lys-Ala-Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Ser-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly

trong đó Xaa 2 là Aib;

Lys ở vị trí 20 được cải biến hóa học nhờ sự liên hợp của nhóm epsilon-amino của mạch bên Lys với $[(2-(2\text{-aminoethoxy})\text{-ethoxy})\text{-acetyl}]_2-(\gamma\text{-Glu})_2\text{-CO}-(\text{CH}_2)_{18}\text{CO}_2\text{H}$; và

axit amin đầu tận cùng C được amit hóa (SEQ ID NO: 8);

hoặc muối được dụng của nó.

15. Dược phẩm chứa hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 14, hoặc muối được dụng của nó, và chất mang, chất pha loãng hoặc tá dược được dụng.

16. Hợp chất trung gian có công thức sau:

His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-
Glu-Lys-Lys-Ala-Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Xaa28-Gly-Gly-
Pro-Ser-Ser-Gly

trong đó

Xaa2 là Aib;

Xaa28 là Glu hoặc Ser; và

axit amin đầu tận cùng C tùy ý được amit hóa (SEQ ID NO: 9),

hoặc muối được dụng của nó.

17. Hợp chất trung gian theo điểm 16, trong đó Xaa28 là Glu.

18. Hợp chất trung gian theo điểm 16, trong đó Xaa28 là Ser.

19. Quy trình sản xuất hợp chất có công thức sau:

His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-
Glu-Lys-Lys-Ala-Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Xaa28-Gly-Gly-
Pro-Ser-Ser-Gly

trong đó

Xaa2 là Aib;

Xaa28 là Glu hoặc Ser;

Lys ở vị trí 20 được cải biến hóa học nhờ sự liên hợp của nhóm epsilon-amino của mạch bên Lys với axit béo C14-C24 thông qua đoạn liên kết giữa Lys ở vị trí 20 và axit béo C14-C24, trong đó đoạn liên kết này là ([2-(2-aminoetoxy)-etoxy]-axetyl)₂-(γ-Glu)_t, trong đó t bằng 1 hoặc 2; và

axit amin đầu tận cùng C tùy ý được amit hóa, quy trình này bao gồm bước:

(i) cải biến hợp chất trung gian có công thức sau:

His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-
Glu-Lys-Lys-Ala-Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Xaa28-Gly-Gly-
Pro-Ser-Ser-Gly

trong đó

Xaa2 là Aib;

Xaa28 là Glu hoặc Ser; và

axit amin đầu tận cùng C tùy ý được amit hóa (SEQ ID NO: 9) bằng cách liên hợp nhóm epsilon-amino của mạch bên Lys ở vị trí 20 của hợp chất trung gian với axit béo C14-C24 thông qua đoạn liên kết, trong đó đoạn liên kết này là $([2-(2\text{-aminoetoxy})\text{-etoxy}]\text{-axetyl})_2\text{-(}\gamma\text{-Glu)}_t$, trong đó t bằng 1 hoặc 2.

Danh mục trình tự

<110> Eli Lilly and Company

<120> Hợp chất đồng chủ vận glucagon và peptit-1 giống glucagon (GLP-1), quy trình sản xuất chúng, hợp chất trung gian được dùng trong quy trình này, và được phẩm chứa hợp chất này

<130> X-20637

<150> 62/182847

<151> 2015-06-22

<160> 11

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 37

<212> PRT

<213> Homo sapien

<400> 1

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

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

Arg	Asn	Asn	Ile	Ala
				35

<210> 2

<211> 34

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<220>

<221> DẤU HIỆU HỖN TẠP

<222> (2)..(2)

<223> Xaa ở vị trí 2 là axit amin không xuất hiện trong tự nhiên
Axit 2-Aminoisobutyric

<220>

<221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> Aib

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (20)..(20)
 <223> Lys ở vị trí 20 được cải biến hóa học nhờ sự liên hợp của nhóm epsilon-amino của mạch bên Lys với axit béo C14-C24 thông qua (i) liên kết trực tiếp hoặc (ii) đoạn liên kết giữa Lys ở vị trí 20 và axit béo C14-C24

<220>
 <221> DẤU HIỆU HỖN TẠP
 <222> (28)..(28)
 <223> Xaa ở vị trí 28 là Glu hoặc Ser

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (34)..(34)
 <223> Gly ở vị trí 34 tùy ý được amit hóa

<400> 2

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

Lys	Lys	Ala	Lys	Glu	Phe	Val	Glu	Trp	Leu	Leu	Xaa	Gly	Gly	Pro	Ser
			20					25					30		

Ser Gly

<210> 3
 <211> 34
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<220>
 <221> DẤU HIỆU HỖN TẠP
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa ở vị trí 2 là axit amin không xuất hiện trong tự nhiên
 Axit 2-Aminoisobutyric

<220>

<221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> Aib

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (20)..(20)
 <223> Lys ở vị trí 20 được cải biến hóa học nhờ sự liên hợp của nhóm epsilon-amino của mạch bên Lys với axit béo C14-C24 thông qua (i) liên kết trực tiếp hoặc (ii) đoạn liên kết giữa Lys ở vị trí 20 và axit béo C14-C24

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (34)..(34)
 <223> Gly ở vị trí 34 tùy ý được amit hóa

<400> 3

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

Lys	Lys	Ala	Lys	Glu	Phe	Val	Glu	Trp	Leu	Leu	Glu	Gly	Gly	Pro	Ser
			20					25					30		

Ser Gly

<210> 4
 <211> 34
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<220>
 <221> DẤU HIỆU HỖN TẠP
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa ở vị trí 2 là axit amin không xuất hiện trong tự nhiên
 Axit 2-Aminoisobutyric

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> Aib

<220>

<221> MOD_RES
 <222> (20)..(20)
 <223> Lys ở vị trí 20 được cải biến hóa học nhờ sự liên hợp của
 nhóm epsilon-amino của mạch bên Lys với axit béo C14-C24 thông
 qua (i) liên kết trực tiếp hoặc (ii) đoạn liên kết giữa Lys ở vị trí
 20 và axit béo C14-C24

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (34)..(34)
 <223> Gly ở vị trí 34 tùy ý được amit hóa

<400> 4

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

Lys	Lys	Ala	Lys	Glu	Phe	Val	Glu	Trp	Leu	Leu	Ser	Gly	Gly	Pro	Ser
			20					25					30		

Ser Gly

<210> 5
 <211> 34
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<220>
 <221> DẤU HIỆU HỖN TẬP
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa ở vị trí 2 là axit amin không xuất hiện trong tự nhiên
 Axit 2-Aminoisobutyric

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> Aib

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (20)..(20)
 <223> Lys ở vị trí 20 được cải biến hóa học nhờ sự liên hợp của
 nhóm epsilon-amino của mạch bên Lys với
 ([2-(2-aminoethoxy)-ethoxy]-acetetyl)2-(γ-Glu)-CO-(CH₂)₁₆CO₂H

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (34)..(34)
 <223> Gly ở vị trí 34 được amit hóa

<400> 5

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

Lys Lys Ala Lys Glu Phe Val Glu Trp Leu Leu Glu Gly Gly Pro Ser
 20 25 30

Ser Gly

<210> 6
 <211> 34
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<220>
 <221> DẤU HIỆU HỖN TẠP
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa ở vị trí 2 là axit amin không xuất hiện trong tự nhiên
 Axit 2-Aminoisobutyric

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> Aib

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (20)..(20)
 <223> Lys ở vị trí 20 được cải biến hóa học nhờ sự liên hợp của
 nhóm epsilon-amino của mạch bên Lys với
 ([2-(2-aminoetoxy)-etoxy]-axetyl)2-(γ-Glu)-CO-(CH₂)₁₈CO₂H

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (34)..(34)
 <223> Gly ở vị trí 34 được amit hóa

<400> 6

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

Lys Lys Ala Lys Glu Phe Val Glu Trp Leu Leu Glu Gly Gly Pro Ser
20 25 30

Ser Gly

<210> 7

<211> 34

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<220>

<221> DẤU HIỆU HỖN TẠP

<222> (2)..(2)

<223> Xaa ở vị trí 2 là axit amin không xuất hiện trong tự nhiên
Axit 2-Aminoisobutyric

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Aib

<220>

<221> MOD_RES

<222> (20)..(20)

<223> Lys ở vị trí 20 được cải biến hóa học nhờ sự liên hợp của
nhóm epsilon-amino của mạch bên Lys với
([2-(2-aminoetoxy)-etoxy]-axetyl)2-(γ-Glu)2-CO-(CH₂)₁₆CO₂H

<220>

<221> MOD_RES

<222> (34)..(34)

<223> Gly ở vị trí 34 được amit hóa

<400> 7

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

Lys Lys Ala Lys Glu Phe Val Glu Trp Leu Leu Ser Gly Gly Pro Ser
 20 25 30

Ser Gly

<210> 8
 <211> 34
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<220>
 <221> DẤU HIỆU HỖN TẠP
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa ở vị trí 2 là axit amin không xuất hiện trong tự nhiên
 Axit 2-Aminoisobutyric

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> Aib

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (20)..(20)
 <223> Lys ở vị trí 20 được cải biến hóa học nhờ sự liên hợp của
 nhóm epsilon-amino của mạch bên Lys với
 ([2-(2-aminoetoxy)-etoxy]-axetyl)2-(γ-Glu)2-CO-(CH₂)₁₈CO₂H

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (34)..(34)
 <223> Gly ở vị trí 34 được amit hóa

<400> 8

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

Lys Lys Ala Lys Glu Phe Val Glu Trp Leu Leu Ser Gly Gly Pro Ser
 20 25 30

Ser Gly

<210> 9
 <211> 34
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<220>
 <221> DẤU HIỆU HỖN TẠP
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa ở vị trí 2 là axit amin không xuất hiện trong tự nhiên
 Axit 2-Aminoisobutyric

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> Aib

<220>
 <221> DẤU HIỆU HỖN TẠP
 <222> (28)..(28)
 <223> Xaa ở vị trí 28 is Glu or Ser

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (34)..(34)
 <223> Gly ở vị trí 34 tùy ý được amit hóa

<400> 9

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

Lys	Lys	Ala	Lys	Glu	Phe	Val	Glu	Trp	Leu	Leu	Xaa	Gly	Gly	Pro	Ser
			20					25					30		

Ser Gly

<210> 10
 <211> 34
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<220>

<221> DẤU HIỆU HỖN TẠP

<222> (2)..(2)

<223> Xaa ở vị trí 2 là axit amin không xuất hiện trong tự nhiên
Axit 2-Aminoisobutyric

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Aib

<220>

<221> MOD_RES

<222> (34)..(34)

<223> Gly ở vị trí 34 tùy ý được amit hóa

<400> 10

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

Lys	Lys	Ala	Lys	Glu	Phe	Val	Glu	Trp	Leu	Leu	Glu	Gly	Gly	Pro	Ser
			20					25					30		

Ser Gly

<210> 11

<211> 34

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<220>

<221> DẤU HIỆU HỖN TẠP

<222> (2)..(2)

<223> Xaa ở vị trí 2 là axit amin không xuất hiện trong tự nhiên
Axit 2-Aminoisobutyric

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Aib

<220>

<221> MOD_RES

<222> (34)..(34)

<223> Gly ở vị trí 34 tùy ý được amit hóa

<400> 11

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

Lys	Lys	Ala	Lys	Glu	Phe	Val	Glu	Trp	Leu	Leu	Ser	Gly	Gly	Pro	Ser
			20					25					30		

Ser Gly