



(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)



1-0031946

(51)⁸ C07K 14/575; C07K 14/605; A61K
38/26

(13) B

(21) 1-2017-02288

(22) 05/01/2016

(86) PCT/US2016/012124 05/01/2016

(87) WO2016/111971 14/07/2016

(30) 62/101,488 09/01/2015 US

(45) 25/05/2022 410

(43) 25/10/2017 355A

(73) ELI LILLY AND COMPANY (US)

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

(72) ALSINA-FERNANDEZ, Jorge (US); BOKVIST, Bengt Krister (US); COSKUN, Tamer (US); CUMMINS, Robert Chadwick (US).

(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) HỢP CHẤT ĐỒNG CHỦ VẬN GIP VÀ GLP-1 VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA HỢP CHẤT NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến hợp chất giả hai peptit incretin mà chủ vận các thụ thể cho cả peptit kích thích tiết insulin phụ thuộc glucoza (glucoza-dependent insulinotropic polypeptide - GIP) và peptit 1 giống glucagon (glucagon-like peptide-1 -GLP-1) của người, và có thể là hữu dụng trong điều trị bệnh tiểu đường typ 2 (bệnh tiểu đường typ 2 - T2D). Sáng chế cũng đề cập đến dược phẩm chứa hợp chất này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến lĩnh vực y tế. Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến hợp chất giả hai peptit incretin mà chủ vận các thụ thể cho cả peptit kích thích tiết insulin phụ thuộc glucoza (glucoza-dependent insulintropic polypeptide - GIP) và peptit 1 giống glucagon (glucagon-like peptide-1 - GLP-1) của người, và có thể là hữu dụng trong điều trị bệnh tiểu đường typ 2 (bệnh tiểu đường typ 2 - T2D).

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

T2D là dạng phổ biến nhất trong các bệnh tiểu đường 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. Các loại giả incretin được đưa ra thị trường hiện tại hoặc các chất ức chế dipeptidyl peptidaza IV (DPP-IV) chỉ sử dụng cơ chế hoạt động đơn được thiết lập để kiểm soát đường huyết. Cần có hợp chất cho T2D mà sử dụng cơ chế hoạt động kép.

GIP là peptit điều hòa thuộc dạ dày ruột gồm 42 axit amin đóng vai trò về mặt sinh lý trong việc cân bằng glucoza nội mô bằng cách kích thích tiết insulin từ các tế bào beta ở tụy với sự có mặt của glucoza và bảo vệ tế bào beta tụy. GLP-1 là peptit gồm 37 axit amin mà kích thích tiết insulin, bảo vệ các tế bào beta ở tụy, và ức chế tiết glucagon, làm rộng dạ dày và thức ăn tiêu thụ dẫn đến sút cân. GIP và GLP-1 đã được biết là các incretin; sự truyền tín hiệu thụ thể incretin tạo ra hoạt tính tương ứng về mặt sinh lý quan trọng cho sự cân bằng glucoza nội mô. Trong sinh lý học thông thường, GIP và GLP-1 được tiết từ ruột sau khi ăn, và các incretin này tăng cường đáp ứng sinh lý đối với thức ăn bao gồm cảm giác no, tiết insulin, và thải hồi dinh dưỡng. Các bệnh nhân T2D có các đáp ứng incretin bị suy giảm.

Việc dùng các thể tương tự GLP-1 đã được thấy là bị giới hạn bởi các tác dụng có hại, như buồn nôn và nôn, và là hậu quả của việc dùng quá thường xuyên là không thể đạt được hiệu quả đầy đủ trong việc kiểm soát đường huyết và sự sút cân. GIP một mình có khả năng làm giảm glucoza khiếm tốn ở người mắc bệnh tiểu đường typ 2. Cả

GIP và GLP-1 tự nhiên bị bất hoạt nhanh chóng bởi proteaza ở khắp nơi, DPP IV, và do đó, chỉ có thể được sử dụng để kiểm soát trao đổi chất trong thời gian ngắn.

Glucagon là peptit gồm 29 axit amin được sản xuất bởi tụy, và khi được liên kết với thụ thể glucagon, nó truyền tín hiệu cho gan để giải phóng glucoza dẫn đến sự tăng glucoza huyết. GLP-2, peptit tương tự GLP-1 được sản xuất từ sự xử lý proglucagon, được biết là liên quan đến sự tăng sinh tế bào ở ruột. Do đó, sự kích thích của các thụ thể glucagon và thụ thể GLP-2 nên được giảm thiểu trong quá trình điều trị mạn tính của các bệnh nhân T2D nhằm tối đa sự giảm glucoza và làm giảm nguy cơ gây ung thư tiềm tàng lâu dài.

Các dạng tương tự GIP đã được mô tả là thể hiện cả hoạt tính GIP và GLP-1 trong WO 2013/164483, WO 2014/192284, và WO 2011/119657.

DPP IV là thuộc lớp exopeptidaza của các enzym phân giải protein. Sự đưa các axit amin không tự nhiên vào trong trình tự có thể làm tăng sự ổn định phân giải protein của bất kỳ peptit nào. Trong khi sử dụng các axit amin không tự nhiên có thể giúp sự ổn định của các peptit chống lại sự phân giải protein DPP IV và các dạng phân hủy khác, đã phát hiện bởi các Chủ đơn trong một phần của sáng chế rằng các axit amin không tự nhiên có thể có các tác dụng không ngờ đối với sự cân bằng của hoạt tính chủ vật giữa GIP và GLP-1. Các axit amin không tự nhiên cũng làm tăng khả năng rằng peptit có thể được thấy như tác nhân ngoại và bắt đầu các phản ứng miễn dịch không mong muốn, như sự sinh miễn dịch của người và các phản ứng tại vị trí tiêm.

Các axit béo, thông qua motif liên kết albumin của chúng, có thể cải thiện các thông số dược động của peptit bằng cách, ví dụ, kéo dài thời gian bán hủy. Trong khi việc sử dụng các axit béo có thể cải thiện thời gian bán hủy của peptit, chủ đơn đã phát hiện ra trong một phần của sáng chế rằng chiều dài, thành phần và sự sắp xếp của chuỗi axit béo và cầu liên kết giữa peptit và chuỗi axit béo có thể có các hiệu quả không ngờ đối với sự cân bằng của hoạt tính chủ vật GIP và GLP-1.

Khả năng dung nạp của các dạng tương tự GLP-1 cụ thể đã được thấy là ngăn ngừa liều dùng của dạng tương tự GLP-1 mà đạt hiệu quả tốt hơn trong việc kiểm soát đường huyết và sự sút cân. Tác dụng phụ phổ biến nhất gắn với các dạng tương tự GLP-1 là buồn nôn và nôn nhưng một số hợp chất có thể tác động đến nhịp tim. Trục

HPA là một phần của đáp ứng căng thẳng sinh lý và GLP-1 đã thấy là kích thích trực tiếp HPA ở chuột cống dẫn đến mức corticosterone tăng tạo ra sự liên kết tiềm tàng đối với các sự kiện có hại như nhịp tim tăng. Là một phần của sáng chế, các chủ đơn đã bất ngờ phát hiện thấy rằng hợp chất theo sáng chế không dẫn đến mức corticosterone tăng lên như đã thấy với semaglutide ở mẫu chuột cống và do đó, có thể được phân liều đến mức hiệu quả cao hơn so với các tác nhân chọn lọc GLP-1R.

Vẫn có nhu cầu tìm ra hợp chất mà là chất đồng chủ vận cân bằng của các thụ thể GIP và GLP-1, nhưng chọn lọc chống lại các thụ thể glucagon và GLP-2 liên quan. Tương tự, có nhu cầu đối với hợp chất với hoạt tính đồng chủ vận cân bằng đối với các thụ thể GIP và GLP-1 mà có thể tạo ra hoạt tính gây sút cân đã thấy ở các mẫu động vật. Ngoài ra, có nhu cầu đối với hợp chất có hoạt tính đồng chủ vận cân bằng đối với các thụ thể GIP và GLP-1 mà có tính ổn định thích hợp chống lại PP IV và các dạng phân hủy khác, trong khi vẫn duy trì khả năng sinh miễn dịch thấp. Tương tự, cũng có nhu cầu đối với hợp chất có hoạt tính đồng chủ vận cân bằng đối với các thụ thể GIP và GLP-1 mà hỗ trợ khả năng phân liều dùng một lần/tuần ở người.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Do đó, các hợp chất cụ thể theo sáng chế có khả năng sinh miễn dịch và các phản ứng vị trí tiêm thấp hơn các chất đồng chủ vận GIP-GLP-1 cụ thể trong lĩnh vực kỹ thuật. Các hợp chất cụ thể theo sáng chế có khả năng dẫn đến sự sút cân ở bệnh nhân dựa trên dữ liệu tiêu thụ năng lượng ở động vật. Ngoài ra, các hợp chất cụ thể theo sáng chế có hoạt tính đồng chủ vận cân bằng chống lại các thụ thể GIP và GLP-1 và tính chọn lọc chống lại các thụ thể glucagon và GLP-2, khả năng sinh miễn dịch thấp, và các đặc tính dược động (pharmacokinetic - PK) mà hỗ trợ việc phân liều dùng một lần/tuần ở người.

Do đó, phương án của sáng chế đề xuất hợp chất có công thức I:



trong đó X_1 là Aib; X_2 là Aib; K ở vị trí 20 được biến đổi về mặt hóa học thông qua sự liên hợp với nhóm epsilon-amino của mạch bên K với $([2-(2\text{-Amino-etoxy})\text{-etoxy}]\text{-axetyl})_2-(\gamma\text{Glu})_a\text{-CO}-(\text{CH}_2)_b\text{-CO}_2\text{H}$ trong đó a là 1 đến 2 và b là 10 đến 20; X_3 là Phe hoặc 1-Nal; và axit amin đầu C tùy ý được amit hóa làm amit bậc một đầu C (SEQ ID NO: 11), hoặc muối được dụng của chúng.

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức I, trong đó X_1 là Aib; X_2 là Aib; K ở vị trí 20 được biến đổi về mặt hóa học thông qua sự liên hợp với nhóm epsilon-amino của mạch bên K với ([2-(2-Amino-etoxy)-etoxy]-axetyl) $_2$ -(γ Glu) $_a$ -CO-(CH $_2$) $_b$ -CO $_2$ H trong đó a là 1 đến 2 và b là 10 đến 18; X_3 là Phe; và axit amin đầu C tùy ý được amit hóa làm amit bậc một đầu C, hoặc muối được dụng của chúng.

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức I, trong đó X_1 là Aib; X_2 là Aib; K ở vị trí 20 được biến đổi về mặt hóa học thông qua sự liên hợp với nhóm epsilon-amino của mạch bên K với ([2-(2-Amino-etoxy)-etoxy]-axetyl) $_2$ -(γ Glu) $_a$ -CO-(CH $_2$) $_b$ -CO $_2$ H trong đó a là 1 đến 2 và b là 10 đến 18; X_3 là 1-Nal; và axit amin đầu C tùy ý được amit hóa làm amit bậc một đầu C, hoặc muối được dụng của chúng.

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức I, trong đó X_1 là Aib; X_2 là Aib; K ở vị trí 20 được biến đổi về mặt hóa học thông qua sự liên hợp với nhóm epsilon-amino của mạch bên K với ([2-(2-Amino-etoxy)-etoxy]-axetyl) $_2$ -(γ Glu) $_a$ -CO-(CH $_2$) $_b$ -CO $_2$ H trong đó a là 1 đến 2 và b là 14 đến 18; X_3 là Phe hoặc 1-Nal; và axit amin đầu C tùy ý được amit hóa làm amit bậc một đầu C, hoặc muối được dụng của chúng. Theo phương án khác, sáng chế đề xuất hợp chất trong đó b là 16 đến 18. Ngoài ra, sáng chế đề xuất hợp chất trong đó b là 18.

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức I, trong đó X_1 là Aib; X_2 là Aib; K ở vị trí 20 được biến đổi về mặt hóa học thông qua sự liên hợp với nhóm epsilon-amino của mạch bên K với ([2-(2-Amino-etoxy)-etoxy]-axetyl) $_2$ -(γ Glu) $_a$ -CO-(CH $_2$) $_b$ -CO $_2$ H trong đó a là 1 và b là 10 đến 18; X_3 là Phe hoặc 1-Nal; và axit amin đầu C tùy ý được amit hóa làm amit bậc một đầu C, hoặc muối được dụng của chúng.

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức I, trong đó X_1 là Aib; X_2 là Aib; K ở vị trí 20 được biến đổi về mặt hóa học thông qua sự liên hợp với nhóm epsilon-amino của mạch bên K với ([2-(2-Amino-etoxy)-etoxy]-axetyl) $_2$ -(γ Glu) $_a$ -CO-(CH $_2$) $_b$ -CO $_2$ H trong đó a là 2 và b là 10 đến 18; X_3 là Phe hoặc 1-Nal; và axit amin đầu C tùy ý được amit hóa làm amit bậc một đầu C, hoặc muối được dụng của chúng.

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức I, trong đó X_1 là Aib; X_2 là Aib; K ở vị trí 20 được biến đổi về mặt hóa học thông qua sự liên hợp với nhóm epsilon-amino của mạch bên K với ([2-(2-Amino-etoxy)-etoxy]-axetyl) $_2$ -(γ Glu) $_a$ -CO-(CH $_2$) $_b$ -CO $_2$ H trong đó a là 1 đến 2 và b là 10 đến 18; X_3 là Phe hoặc 1-Nal; và axit amin đầu C được amit hóa làm amit bậc một đầu C, hoặc muối được dụng của chúng.

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

YX $_1$ EGTFTSDYSIX $_2$ LDKIAQKAFVQWLIAGGPSSGAPPPS;

trong đó X_1 là Aib; X_2 là Aib; K ở vị trí 20 được biến đổi về mặt hóa học thông qua sự liên hợp với nhóm epsilon-amino của mạch bên K với ([2-(2-Amino-etoxy)-etoxy]-axetyl) $_2$ -(γ Glu) $_1$ -CO-(CH $_2$) $_{18}$ -CO $_2$ H; và axit amin đầu C được amit hóa làm amit bậc một đầu C (SEQ ID NO: 3), hoặc muối được dụng của chúng.

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

YX $_1$ EGTFTSDYSIX $_2$ LDKIAQKAX $_3$ VQWLIAGGPSSGAPPPS;

trong đó X_1 là Aib; X_2 là Aib; K ở vị trí 20 được biến đổi về mặt hóa học thông qua sự liên hợp với nhóm epsilon-amino của mạch bên K với ([2-(2-Amino-etoxy)-etoxy]-axetyl) $_2$ -(γ Glu) $_2$ -CO-(CH $_2$) $_{18}$ -CO $_2$ H; X_3 là 1-Nal; và axit amin đầu C được amit hóa làm amit bậc một đầu C (SEQ ID NO: 4), hoặc muối được dụng của chúng.

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

YX $_1$ EGTFTSDYSIX $_2$ LDKIAQKAFVQWLIAGGPSSGAPPPS;

trong đó X_1 là Aib; X_2 là Aib; K ở vị trí 20 được biến đổi về mặt hóa học thông qua sự liên hợp với nhóm epsilon-amino của mạch bên K với ([2-(2-Amino-etoxy)-etoxy]-axetyl) $_2$ -(γ Glu) $_1$ -CO-(CH $_2$) $_{16}$ -CO $_2$ H; và axit amin đầu C được amit hóa làm amit bậc một đầu C (SEQ ID NO: 5), hoặc muối được dụng của chúng.

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

YX $_1$ EGTFTSDYSIX $_2$ LDKIAQKAFVQWLIAGGPSSGAPPPS;

trong đó X_1 là Aib; X_2 là Aib; K ở vị trí 20 được biến đổi về mặt hóa học thông qua sự liên hợp với nhóm epsilon-amino của mạch bên K với ([2-(2-Amino-etoxy)-

etoxy]-axetyl)₂-(γ Glu)₂-CO-(CH₂)₁₆-CO₂H; và axit amin đầu C được amit hóa làm amit bậc một đầu C (SEQ ID NO: 6), hoặc muối được dụng của chúng.

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

YX₁EGTFTSDYSIX₂LDKIAQKAFVQWLIAGGPSSGAPPPS

trong đó X₁ là Aib; X₂ là Aib; K ở vị trí 20 được biến đổi về mặt hóa học thông qua sự liên hợp với nhóm epsilon-amino của mạch bên K với ([2-(2-Amino-etoxy)-etoxy]-axetyl)₂-(γ Glu)₂-CO-(CH₂)₁₈-CO₂H; và axit amin đầu C được amit hóa làm amit bậc một đầu C (SEQ ID NO: 7), hoặc muối được dụng của chúng.

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

YX₁EGTFTSDYSIX₂LDKIAQKAX₃VQWLIAGGPSSGAPPPS

trong đó X₁ là Aib; X₂ là Aib; K ở vị trí 20 được biến đổi về mặt hóa học thông qua sự liên hợp với nhóm epsilon-amino của mạch bên K với ([2-(2-Amino-etoxy)-etoxy]-axetyl)₂-(γ Glu)₁-CO-(CH₂)₁₆-CO₂H; X₃ là 1-Nal; và axit amin đầu C được amit hóa làm amit bậc một đầu C (SEQ ID NO: 8), hoặc muối được dụng của chúng.

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

YX₁EGTFTSDYSIX₂LDKIAQKAX₃VQWLIAGGPSSGAPPPS

trong đó X₁ là Aib; X₂ là Aib; K ở vị trí 20 được biến đổi về mặt hóa học thông qua sự liên hợp với nhóm epsilon-amino của mạch bên K với ([2-(2-Amino-etoxy)-etoxy]-axetyl)₂-(γ Glu)₂-CO-(CH₂)₁₆-CO₂H; X₃ là 1-Nal; và axit amin đầu C được amit hóa làm amit bậc một đầu C (SEQ ID NO: 9), hoặc muối được dụng của chúng.

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

YX₁EGTFTSDYSIX₂LDKIAQKAX₃VQWLIAGGPSSGAPPPS

trong đó X₁ là Aib; X₂ là Aib; K ở vị trí 20 được biến đổi về mặt hóa học thông qua sự liên hợp với nhóm epsilon-amino của mạch bên K với ([2-(2-Amino-etoxy)-etoxy]-axetyl)₂-(γ Glu)₁-CO-(CH₂)₁₈-CO₂H; X₃ là 1-Nal; và axit amin đầu C được amit hóa làm amit bậc một đầu C (SEQ ID NO: 10), hoặc muối được dụng của chúng.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất được phẩm chứa hợp chất theo sáng chế với chất mang, chất pha loãng hoặc tá được dụng.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị bệnh tiểu đường typ 2, bao gồm việc cho bệnh nhân cần điều trị sử dụng lượng hữu hiệu của hợp chất theo sáng chế. Theo phương án khác, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị bệnh tiểu đường typ 2 còn bao gồm việc cho dùng đồng thời, tách biệt hoặc nối tiếp phối hợp với lượng hữu hiệu của một hoặc nhiều tác nhân được chọn từ metformin, các thiazolidinedion, các sulfonylure, các chất ức chế dipeptidyl peptidaza 4, và các tác nhân đồng vận chuyển glucoza kết hợp natri.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp cải thiện sự kiểm soát đường huyết ở người lớn mắc bệnh tiểu đường typ 2, bao gồm việc cho bệnh nhân cần điều trị dùng lượng hữu hiệu của hợp chất theo sáng chế làm liệu pháp phụ trợ đối với chế độ ăn và luyện tập. Theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp kiểm soát cân nặng mạn tính ở người lớn có chỉ số khối cơ thể ban đầu ≥ 27 và bệnh tiểu đường typ 2, bao gồm việc cho bệnh nhân cần điều trị dùng, lượng hữu hiệu của hợp chất theo sáng chế làm liệu pháp phụ trợ ngoài chế độ ăn giảm calo và hoạt động thể dục tăng cường

Theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị hội chứng chuyển hóa, bao gồm việc cho bệnh nhân cần điều trị dùng, lượng hữu hiệu của hợp chất theo sáng chế. Theo phương án khác, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị bệnh rối loạn mỡ máu, bệnh béo phì, và/hoặc bệnh gan nhiễm mỡ liên quan đến sự kháng insulin và các bệnh tiểu đường, bao gồm việc cho bệnh nhân cần điều trị dùng, lượng hữu hiệu của hợp chất theo sáng chế. Ngoài ra, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị bệnh dễ bị tổn thương hoặc tăng cường độ xương, bao gồm việc cho bệnh nhân cần điều trị dùng, lượng hữu hiệu của hợp chất theo sáng chế.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất hợp chất theo sáng chế để dùng trong điều trị. Theo phương án khác, sáng chế đề xuất hợp chất theo sáng chế để dùng trong điều trị bệnh tiểu đường typ 2. Theo phương án khác, sáng chế đề xuất hợp chất theo sáng chế để dùng đồng thời, tách biệt hoặc nối tiếp phối hợp với một hoặc nhiều tác nhân được chọn từ metformin, các thiazolidinedion, các sulfonylure, các chất ức chế dipeptidyl peptidaza 4, và các tác nhân đồng vận chuyển glucoza kết hợp natri để dùng trong điều trị bệnh tiểu đường typ 2.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất hợp chất theo sáng chế để dùng trong kiểm soát ường huyết ở người lớn mắc bệnh tiểu đường typ 2 làm liệu pháp phụ trợ ngoài chế độ ăn và luyện tập. Theo một phương án, sáng chế đề xuất hợp chất theo sáng chế để dùng trong kiểm soát cân nặng mạn tính ở người lớn có chỉ số khối cơ thể ban đầu ≥ 27 và bệnh tiểu đường typ 2 làm liệu pháp phụ trợ ngoài chế độ ăn giảm calo và hoạt động thể chất tăng cường.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất việc sử dụng hợp chất theo sáng chế để sản xuất thuốc để điều trị bệnh tiểu đường typ 2. Theo phương án khác, sáng chế đề xuất việc sử dụng hợp chất theo sáng chế để dùng đồng thời, tách biệt hoặc nối tiếp phối hợp với một hoặc nhiều tác nhân được chọn từ metformin, các thiazolidinedion, các sulfonylure, các chất ức chế dipeptidyl peptidaza 4, và các tác nhân đồng vận chuyển glucoza kết hợp natri để sản xuất thuốc để điều trị bệnh tiểu đường typ 2.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề xuất các hợp chất thể hiện hoạt tính GIP và GLP-1 cân bằng. Hoạt tính cân bằng đối với GIP và GLP-1 như được sử dụng trong bản mô tả này đề cập đến hợp chất có ái lực đối với các thụ thể GIP và các thụ thể GLP-1 trong thử nghiệm liên kết *in vitro* ở tỷ lệ mol gần với 1:1, như 1:1 GLP-1/GIP, 2:1 GLP-1/GIP, 3:2 GLP-1/GIP, 1:2 GLP-1/GIP, hoặc 2:3 GLP-1/GIP.

Sáng chế đề xuất các hợp chất thể hiện tính chọn lọc đối với các thụ thể GIP và GLP-1 so với các thụ thể của glucagon và GLP-2. Thuật ngữ “tính chọn lọc” hoặc “chọn lọc chống lại” được sử dụng trong bản mô tả này đối với hoạt tính GIP và GLP-1 đối chứng so với hoạt tính của glucagon, đề cập đến hợp chất thể hiện hiệu lực cao hơn 1000, 500, hoặc khoảng 100 lần đối với GIP và GLP-1 so với glucagon khi dữ liệu được chuẩn hóa từ các thử nghiệm liên kết *in vitro* tương ứng. Thuật ngữ “tính chọn lọc” hoặc “chọn lọc chống lại” được sử dụng trong bản mô tả này đối với hoạt tính GIP và GLP-1 đối chứng so với hoạt tính của GLP-2, đề cập đến hợp chất thể hiện hiệu lực cao hơn 250, 200, 100 hoặc khoảng 50 lần đối với GIP và GLP-1 so với GLP-2 khi dữ liệu được chuẩn hóa từ các thử nghiệm chức năng *in vitro* tương ứng.

Sáng chế đề xuất phương pháp điều trị bệnh tiểu đường typ 2 ở bệnh nhân bao gồm việc cho bệnh nhân cần điều trị dùng lượng hữu hiệu điều trị của hợp chất theo sáng chế, hoặc muối được dụng của chúng. Sáng chế cũng đề xuất phương pháp điều trị

bệnh tiểu đường typ 2 ở bệnh nhân bao dùng việc cho bệnh nhân cần điều trị dùng lượng hữu hiệu điều trị của hợp chất theo sáng chế, hoặc muối được dụng của chúng, trong đó việc dùng là theo đường dưới da. Sáng chế cũng đề xuất phương pháp điều trị bệnh tiểu đường typ 2 ở bệnh nhân bao dùng việc cho bệnh nhân cần điều trị dùng lượng hữu hiệu điều trị của hợp chất theo sáng chế, hoặc muối được dụng của chúng, và đồng thời, tách biệt hoặc nối tiếp với lượng hữu hiệu của một hoặc nhiều thành phần hoạt tính khác. Theo một phương án, thành phần hoặc các thành phần hoạt tính khác là các thuốc làm giảm glucoza dùng theo đường miệng hiện có từ nhóm các thuốc được xem xét trước khi sử dụng tiêu chuẩn chăm sóc như được xác định bởi các hướng dẫn trong lĩnh vực như của Hiệp hội tiểu đường Hoa Kỳ (American Diabetes Association). Các hợp chất theo sáng chế sử dụng axit béo được liên hợp về mặt hóa học với nhóm epsilon-amino của mạch bên lysin. Axit béo được liên hợp với nhóm epsilon-amino của mạch bên lysin thông qua cầu liên kết. Cầu liên kết chứa [2-(2-Amino-etoxy)-etoxy]-axetyl)₂-(γGlu)_a trong đó a là 1 đến 2. Axit béo và axit gamma-glutamic trong cầu liên kết hoạt động như các cầu liên kết albumin, và mang lại khả năng tạo ra các hợp chất hoạt động lâu dài. Các hợp chất theo sáng chế chứa lysin ở vị trí 20 mà được biến đổi về mặt hóa học thông qua sự liên hợp với nhóm epsilon-amino của mạch bên K với ([2-(2-Amino-etoxy)-etoxy]-axetyl)₂-(γGlu)_a-CO-(CH₂)_b-CO₂H trong đó a là 1 đến 2 và b là 10 đến 20. Như thể hiện trên cấu trúc hóa học của Ví dụ 1 và 2, 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 amino của đơn vị thứ nhất của [2-(2-Amino-etoxy)-etoxy]-axetyl. Sau đó, đơn vị thứ nhất của γGlu 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 a = 2, đơn vị thứ hai của γGlu được gắn với nhóm α-amino của đơn vị thứ nhất của γGlu thông qua nhóm γ-carboxyl của mạch bên. Cuối cùng, axit béo đối xứng được gắn với nhóm α-amino của đơn vị thứ nhất (khi a = 1) hoặc đơn vị thứ hai (khi a = 2) của γGlu.

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). Các dược phẩm này và quy trình điều chế chúng đã được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này. (Xem, ví dụ, Remington: The Science and Practice

of Pharmacy (D.B. Troy, Editor, 21st Edition, Lippincott, Williams & Wilkins, 2006).
Đường dùng ưu tiên là đường dưới da.

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 và Use, 2nd Revised Edition (Wiley-VCH, 2011); S.M. Berge, *et al.*, “Pharmaceutical Salts,” Journal of Pharmaceutical Sciences, Vol. 66, No. 1, January 1977. Các muối được dụng theo sáng chế bao gồm muối trifloroaxetat, hydroclorua, và axetat.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “lượng hữu hiệu” chỉ lượng hoặc liều của hợp chất theo sáng chế, hoặc muối được dụng của nó mà, khi cho bệnh nhân sử dụng một hoặc nhiều liều, tạo ra tác dụng mong muốn ở bệnh nhân được chẩn đoán hoặc điều trị. Lượng hữu hiệu có thể dễ dàng được xác định bởi bác sỹ chẩn đoán, được xem là người có kỹ năng trong lĩnh vực, bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã biết và bằng cách quan sát kết quả thu được từ những ca tương tự. Khi xác định lượng có hiệu quả cho một bệnh nhân, nhiều yếu tố được cân nhắc bởi bác sỹ chẩn đoán, bao gồm, nhưng không bị giới hạn bởi: loại động vật; kích thước, tuổi tác và sức khỏe chung của đối tượng; bệnh hoặc rối loạn cụ thể liên quan; mức độ hoặc tình trạng liên quan hoặc mức độ nặng của bệnh hoặc rối loạn; đáp ứng của từng bệnh nhân; hợp chất cụ thể được sử dụng; phương thức sử dụng; các đặc trưng sinh khả dụng của chế phẩm được sử dụng; phác đồ liều lượng lựa chọn; việc sử dụng thuốc đồng thời; và các tình huống liên quan khác.

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.

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 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 dùng một lần/tuần.

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, và “1-Nal” là 1-Naphthylalanin.

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.

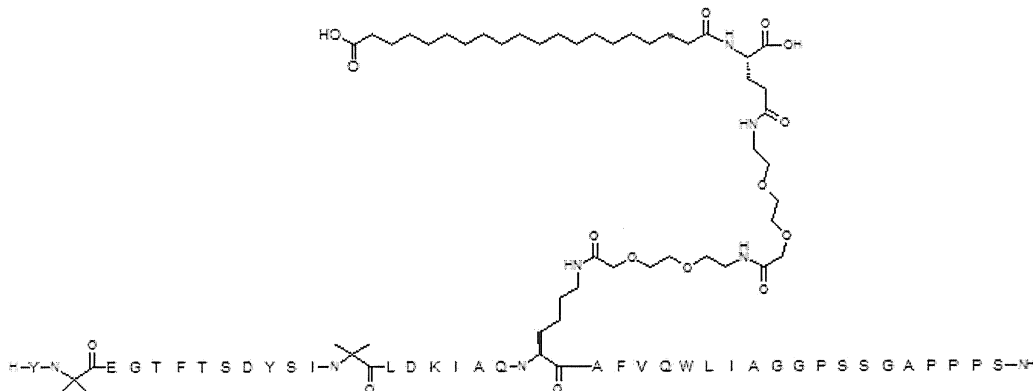
Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1

YX₁EGTFTSDYSIX₂LDKIAQKAFVQWLIAGGPSSGAPPPS

trong đó X₁ là Aib; X₂ là Aib; K ở vị trí 20 được biến đổi về mặt hóa học thông qua 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 C được amit hóa làm amit bậc một đầu C (SEQ ID NO: 3)

muối trifloroaxetat



Cấu trúc trên đây chứa mã một chữ số tiêu chuẩn của axit amin ngoại trừ các gốc Aib2, Aib13 và K20 trong đó các cấu trúc của các gốc axit amin này đã được mở rộng.

Peptit theo SEQ ID NO: 3 theo sáng chế được tạo ra bằng cách tổng hợp peptit pha rắn sử dụng phương pháp Fmoc/t-Bu thực hiện trên thiết bị tổng hợp peptit tự động Symphony (PTI Protein Technologies Inc.) bắt đầu từ nhựa amit RAPP AM-Rink và với các kết hợp sử dụng 6 đương lượng của axit amin được hoạt hóa với diisopropylcarbodiimide (DIC) và hydroxybenzotriazol (HOBt) (tỷ lệ mol 1:1:1) trong dimethylformamide (DMF) trong 90 phút ở 25°C.

Các kết hợp mở rộng (4 giờ mỗi lần) đối với Pro31, Trp25, Gln24, Val23, Phe22, Lys20, Gly4, Glu3 và Aib2 là cần thiết để cải thiện chất lượng của peptit thô. Khối xây dựng Fmoc-Lys(Alloc)-OH được sử dụng cho sự kết hợp Lys20 (nhóm bảo vệ trực giao) để cho phép sự gắn ở vị trí cụ thể của gốc axit béo sau đó trong quy trình tổng hợp. Các điều kiện sau được sử dụng cho việc liên kết của Fmoc-Ile-OH ở vị trí 12: Fmoc-Ile-OH (6 đương lượng), PyBOP (6 đương lượng), và DIEA (12 đương lượng) trong DMF trong 24 giờ ở 25°C. Gốc đầu N được kết hợp làm Boc-Tyr(tBu)-OH sử dụng các phương pháp DIC-HOBt như được mô tả trên đây.

Sau khi kết thúc sự kéo dài nhựa peptit mô tả trên đây, nhóm bảo vệ Alloc có mặt trong Lys20 được loại bỏ sử dụng lượng chất xúc tác $\text{Pd(PPh}_3)_4$ với sự có mặt của PhSiH_3 làm chất làm sạch. Các chu trình liên kết/khử bảo vệ bổ sung sử dụng phương pháp Fmoc/t-Bu để kéo dài mạch bên Lys20 có sự tham gia của Fmoc-NH-PEG2- CH_2COOH (ChemPep Catalog#280102), Fmoc-Glu(OH)-OtBu (ChemPep Catalog#100703) và $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_{18}-\text{COOtBu}$. Trong tất cả các liên kết, 3 đương lượng khối xây dựng được sử dụng với PyBOP (3 đương lượng) và DIEA (6 đương lượng) trong DMF trong 4 giờ ở 25°C.

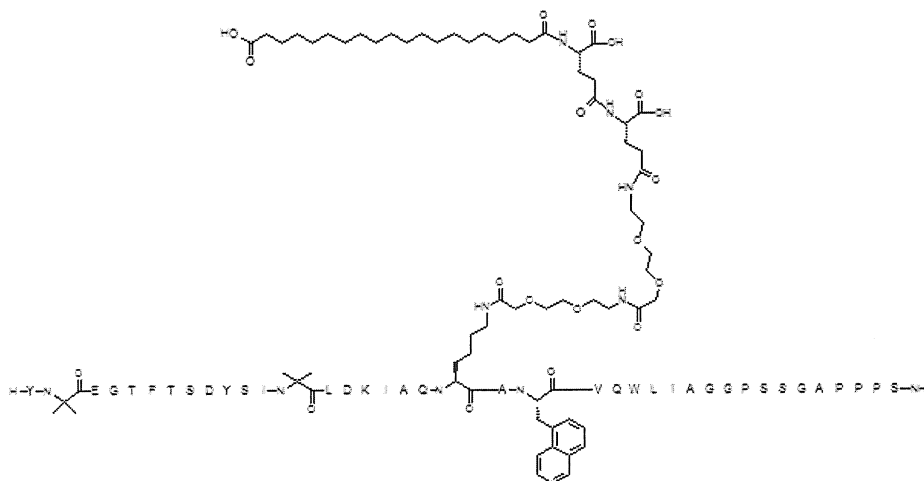
Việc tách ra khỏi nhựa và đồng thời loại bỏ nhóm bảo vệ mạch bên được tiến hành trong dung dịch chứa axit trifloaxetic (TFA): triisopropylsilan: 1,2-ethandithiol: nước : thioanisol 90:4:2:2:2 (thể tích/thể tích) trong 2 giờ ở 25°C sau khi kết tủa với ether lạnh. Peptit thô được tinh sạch đến độ tinh sạch > 99% (hiệu suất tinh sạch 15-20%) bằng sắc ký HPLC đảo pha với gradient nước/acetonitril (chứa 0,05% thể tích/thể tích TFA) trên cột C18, trong đó các phân thích hợp được tập hợp lại và làm đông khô.

Trong quy trình tổng hợp được thực hiện về cơ bản như được mô tả trên đây, độ tinh sạch của Ví dụ 1 được đo bằng HPLC pha đảo phân tích, và xác nhận đặc tính sử dụng LC/MS (quan sát thấy: $M+3H^+/3 = 1605,2$; Tính toán $M+3H^+/3 = 1605,5$; quan sát thấy: $M+4H^+/4 = 1204,3$; Tính toán $M+4H^+/4 = 1204,4$).

Ví dụ 2

YX₁EGTFTSDYSIX₂LDKIAQKAX₃VQWLIAGGPSSGAPPPS

trong đó X₁ là Aib; X₂ là Aib; K ở vị trí 20 được biến đổi về mặt hóa học thông qua 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; X₃ là 1-Nal; và axit amin đầu C được amit hóa làm amit bậc một đầu C (SEQ ID NO: 4) muối trifloroaxetat



Cấu trúc trên đây chứa mã một chữ số tiêu chuẩn của axit amin ngoại trừ các gốc Aib₂, Aib₁₃, K₂₀ và 1-Nal₂₂ trong đó các cấu trúc của các gốc axit amin này đã được mở rộng.

Peptit theo SEQ ID NO: 4 theo sáng chế được tổng hợp tương tự như được mô tả trên đây trong Ví dụ 1. Các điều kiện sau được sử dụng cho việc liên kết của Fmoc-1Nal-OH ở vị trí 22: Fmoc-1Nal-OH (6 đương lượng), PyBOP (6 đương lượng), và DIEA (12 đương lượng) trong DMF trong 4 giờ ở 25°C.

Ví dụ 3

YX₁EGTFTSDYSIX₂LDKIAQKAFVQWLIAGGPSSGAPPPS

trong đó X₁ là Aib; X₂ là Aib; K ở vị trí 20 được biến đổi về mặt hóa học thông qua 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 C được amit hóa làm amit bậc một đầu C (SEQ ID NO: 5)

muối trifloroaxetat

Hợp chất theo SEQ ID NO: 5 theo sáng chế được tổng hợp tương tự như được mô tả trên đây cho Ví dụ 1.

Ví dụ 4

YX₁EGTFTSDYSIX₂LDKIAQKAFVQWLIAGGPSSGAPPPS

trong đó X₁ là Aib; X₂ là Aib; K ở vị trí 20 được biến đổi về mặt hóa học thông qua 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 C được amit hóa làm amit bậc một đầu C (SEQ ID NO: 6)

muối trifloroaxetat

Hợp chất theo SEQ ID NO: 6 theo sáng chế được tổng hợp tương tự như được mô tả trên đây cho Ví dụ 1.

Ví dụ 5

YX₁EGTFTSDYSIX₂LDKIAQKAFVQWLIAGGPSSGAPPPS

trong đó X₁ là Aib; X₂ là Aib; K ở vị trí 20 được biến đổi về mặt hóa học thông qua 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 C được amit hóa làm amit bậc một đầu C (SEQ ID NO: 7)

muối trifloroaxetat

Hợp chất theo SEQ ID NO: 7 theo sáng chế được tổng hợp tương tự như được mô tả trên đây cho Ví dụ 1.

Ví dụ 6

YX₁EGTFTSDYSIX₂LDKIAQKAX₃VQWLIAGGPSSGAPPPS

trong đó X₁ là Aib; X₂ là Aib; K ở vị trí 20 được biến đổi về mặt hóa học thông qua 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; X₃ là 1-Nal; và axit amin đầu C được amit hóa làm amit bậc một đầu C (SEQ ID NO: 8)

muối trifloroaxetat

Hợp chất theo SEQ ID NO: 8 theo sáng chế được tổng hợp tương tự như được mô tả trên đây cho Ví dụ 1.

Ví dụ 7

YX₁EGTFTSDYSIX₂LDKIAQKAX₃VQWLIAGGPSSGAPPPS

trong đó X₁ là Aib; X₂ là Aib; K ở vị trí 20 được biến đổi về mặt hóa học thông qua 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; X₃ là 1-Nal; và axit amin đầu C được amit hóa làm amit bậc một đầu C (SEQ ID NO: 9)

muối trifloroaxetat

Hợp chất theo SEQ ID NO: 9 theo sáng chế được tổng hợp tương tự như được mô tả trên đây cho Ví dụ 1.

Ví dụ 8

YX₁EGTFTSDYSIX₂LDKIAQKAX₃VQWLIAGGPSSGAPPPS

trong đó X₁ là Aib; X₂ là Aib; K ở vị trí 20 được biến đổi về mặt hóa học thông qua 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; X₃ là 1-Nal; và axit amin đầu C được amit hóa làm amit bậc một đầu C (SEQ ID NO: 10)

muối trifloroaxetat

Hợp chất theo SEQ ID NO: 10 theo sáng chế được tổng hợp tương tự như được mô tả trên đây cho Ví dụ 1.

Các thử nghiệm

Dưới đây là các điều kiện và dữ liệu cho các Ví dụ và một vài thử nghiệm: *chức năng và tính chọn lọc in vitro*, profin sinh miễn dịch, các đặc tính dược động, và các mẫu bệnh tiểu đường typ 2 *in vivo*.

Chức năng và tính chọn lọc *in vitro*

Hiệu lực liên kết *in vitro* đối với các thụ thể GLP-1 và GIP của người

Hiệu lực liên kết *in vitro* của các hợp chất theo sáng chế đối với các thụ thể GIP và GLP-1 của người được đánh giá bằng cách đo ái lực liên kết, là K_i , sử dụng các màng tế bào thu được từ các dòng tế bào tách dòng biểu hiện quá mức cADN GLP1R của người hoặc cADN GIP-R của người.

Thử nghiệm liên kết thụ thể polypeptit kích thích tiết insulin phụ thuộc glucoza của người sử dụng hGIP-R (Usdin,T.B., Gruber,C., Modi,W. và Bonner,T.I., GenBank: AAA84418.1) được tách dòng thành plasmid pcDNA3.1 (Promega)-NeoR. Plasmid hGIP-R-pcDNA3.1/Neo được chuyển nhiễm vào các tế bào trứng chuột đồng Trung Quốc, CHO-S, cho môi trường nuôi cấy dạng huyền phù và được lựa chọn trong sự có mặt của 500 $\mu\text{g/mL}$ Geneticin (Invitrogen).

Màng sinh chất thô được điều chế bằng cách sử dụng tế bào từ huyền phù nuôi cấy. Các tế bào được dung giải trên đá trong đệm nhược trương chứa Tris Hcl 25 mM, pH 7,5, MgCl_2 1 mM, ADNaza1, 20 $\mu\text{g/mL}$, và các chất ức chế Roche Complete™ không có EDTA. Dịch huyền phù chứa tế bào được đồng hóa bằng thiết bị đồng hóa Dounce làm bằng thủy tinh bằng cách sử dụng chày Teflon® cho 25 nhíp. Dịch đồng hóa được ly tâm ở 4°C ở 1800 x g trong 15 phút. Dịch nổi được thu lại và các viên kết được tái tạo huyền phù trong đệm nhược trương và tái đồng hóa. Hỗn hợp được ly tâm ở 1800 x g trong 15 phút. Dịch nổi lần hai được kết hợp với dịch nổi lần một. Các dịch nổi kết hợp được ly tâm lại ở 1800 x g trong 15 phút để làm trong. Dịch nổi đã làm trong này được chuyển vào ống tốc độ cao và ly tâm ở 25,000 x g trong 30 phút ở 4°C. Các viên kết màng được tái tạo huyền phù trong đệm đồng hóa và được lưu dưới dạng phần đông trong máy làm đông -80 °C đến khi sử dụng.

GIP được đánh dấu phóng xạ bằng quy trình I-125-lactoperoxidaza (Markalonis, J.J., *Biochem. J.* 113:299 (1969)) và tinh sạch bằng sắc HPLC đảo pha (Perkin-Elmer Life and Analytical Sciences NEX-402). Hoạt độ riêng là 2200

Ci/mmol. Việc xác định K_D được thực hiện bằng liên kết cạnh tranh tương đồng sử dụng hGIP lạnh thay cho liên kết bão hòa. Thử nghiệm liên kết thụ thể được thực hiện sử dụng thử nghiệm độ cận nhấp nháy (Scintillation Proximity Assay -SPA) với hạt agglutinin mầm lúa mì (wheat germ agglutinin -WGA) (Perkin Elmer Life and Analytical Sciences) được phong bế trước bằng 1% BSA không chứa axit béo (Gibco, 7,5% BSA). Đệm liên kết chứa 25 mM HEPES, pH 7,4, 2,5 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 0,1% BSA không chứa axit béo, 0,003% Tween20, và các chất ức chế Roche Complete™ không có EDTA. hGIP và các hợp chất theo sáng chế được hòa tan trong 100% DMSO và được lưu ở -20°C . Các hợp chất được pha loãng hàng loạt vào đệm liên kết. Tiếp theo, 10 μL hợp chất được pha loãng hoặc 100% DMSO được chuyển vào đĩa thử nghiệm đáy trong Corning® 3632 chứa 40 μL đệm liên kết thử nghiệm hoặc GIP lạnh (NSB ở nồng độ cuối 0,1 μM). Sau đó, 90 μL màng (3 μg /giếng), 50 μL [^{125}I] GIP (Perkin Elmer Life and Analytical Sciences ở 0,15 nM nồng độ cuối trong phản ứng), và 50 μL hạt WGA (150 μg /giếng) được thêm vào, hàn kín, và trộn trên máy lắc đĩa trong 1 phút. Các đĩa được đọc bằng thiết bị đếm nhấp nháy MicroBeta® sau khi để yên trong 12 giờ ở nhiệt độ trong phòng.

Kết quả được tính toán là phần trăm của mức liên kết I-125-GIP đặc hiệu với sự có mặt của hợp chất. Nồng độ IC_{50} tuyệt đối được thu được từ phương trình hồi lưu không tuyến tính của phần trăm của mức gắn kết đặc hiệu của I-125-GIP so với nồng độ của hợp chất bổ sung. Nồng độ IC_{50} được chuyển thành Ki sử dụng phương trình Cheng-Prusoff.

Thử nghiệm liên kết thụ thể GLP-1 sử dụng thụ thể peptit 1 tương tự glucagon của người đã được tạo dòng (hGLP-1R) (Graziano MP, Hey PJ, Borkowski D, Chicchi GG, Strader CD, *Biochem Biophys Res Commun.* 196(1): 141-6, 1993) được phân lập từ màng 293HEK. cADN hGLP-1R cDNA được tạo dòng phụ thành plasmit 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 gamma, tác nhân chống huyết khối. Grinnell, B.W., Berg, D.T., Walls, J. and Yan, S.B. *Bio/Technology* 5: 1189-1192, 1987). ADN plasmit này được chuyển nhiễm vào các tế bào 293HEK và được chọn lọc bằng 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Hygromycin.

Màng sinh chất thô được điều chế bằng cách sử dụng tế bào từ huyền phù nuôi cấy. Các tế bào được dung giải trên đá trong đệm nhược trương chứa Tris HCl 25 mM,

pH 7,5, MgCl_2 1 mM, ADNaza1, 20 μmL , và các chất ức chế Roche Complete™ không có EDTA. Dịch huyền phù chứa tế bào được đồng hóa bằng thiết bị đồng hóa Dounce làm bằng thủy tinh bằng cách sử dụng chày Teflon® cho 25 nhíp. Dịch đồng hóa được ly tâm ở 4°C ở 1800 x g trong 15 phút. Dịch nổi được thu lại và các viên kết được tái tạo huyền phù trong đệm nhược trương và tái đồng hóa. Hỗn hợp được ly tâm ở 1800 x g trong 15 phút. Dịch nổi lần hai được kết hợp với dịch nổi lần một. Các dịch nổi kết hợp được ly tâm lại ở 1800 x g trong 15 phút để làm trong. Dịch nổi đã làm trong này được chuyển vào ống tốc độ cao và ly tâm ở 25,000 x g trong 30 phút ở 4°C. Các viên kết màng được tái tạo huyền phù trong đệm đồng hóa và được lưu dưới dạng phần đông trong máy làm đông -80 °C đến khi sử dụng.

Peptit 1 tương tự glucagon (GLP-1) được đánh dấu phóng xạ bằng quy trình I-125-lactoperoxidaza và được tinh sạch bằng HPLC đảo pha ở Perkin-Elmer Life and Analytical Sciences (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 0,329 nM và được sử dụng để tính toán giá trị K_i cho tất cả các hợp chất thử nghiệm.

Thử nghiệm liên kết thụ thể được thực hiện sử dụng thử nghiệm độ cận nhấp nháy (PA) với hạt agglutinin mầm lúa mì (WGA) được phong bế trước bằng 1% BSA không chứa axit béo (Gibco). Đệm liên kết chứa 25 mM HEPES, pH 7,4, 2,5 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 0,1% BSA không chứa axit béo, 0,003% Tween20, và các chất ức chế Roche Complete™ không có EDTA. Peptit 1 tương tự glucagon được hòa tan trong 100% DMSO ở 1 mg/mL và được lưu kết đông ở -20 °C trong phần phân ước 30 μL . Phần phân ước peptit 1 tương tự glucagon được hòa tan và được sử dụng trong các thử nghiệm liên kết trong vòng một giờ. Thử tương tự peptit được hòa tan trong 100% DMSO và được pha loãng hàng loạt trong 100% DMSO. Tiếp theo, 10 μL các hợp chất được pha loãng theo sáng chế hoặc 100% DMSO được chuyển vào đĩa thử nghiệm đáy trong Corning® 3632 chứa 40 μL đệm thử nghiệm hoặc glucagon lạnh (NSB ở nồng độ cuối 1 μM). Sau đó, 90 μL màng (0,5 μg /giếng), 50 μL peptit 1 tương tự glucagon I-125 (0,15 nM nồng độ cuối trong phản ứng), và 50 μL hạt WGA (150 μg /giếng) được thêm vào, được hàn kín và trộn trong máy trộn đĩa trong 1 phút. Các đĩa được đọc bằng thiết bị đếm nhấp nháy PerkinElmer Life and Analytical Sciences Trilux MicroBeta® sau thời gian lắng là 12 giờ ở nhiệt độ trong phòng.

Các kết quả được tính toán là phần trăm của mức liên kết đặc hiệu peptit 1 tương tự glucagon I-125 trong sự có mặt của các hợp chất. Nồng độ IC_{50} tuyệt đối của hợp chất được thu được từ phương trình hồi lưu không tuyến tính của phần trăm mức liên kết đặc hiệu của peptit 1 tương tự glucagon I-125 so với nồng độ hợp chất bổ sung. Nồng độ IC_{50} được chuyển thành K_i sử dụng phương trình Cheng-Prusoff.

Các thử nghiệm được thực hiện về cơ bản được mô tả trong thử nghiệm này, các hợp chất cụ thể theo sáng chế thể hiện tỉ lệ hGLP-1R/hGIPR xấp xỉ 0,5-4,0 (Bảng 1). Tỷ lệ liên kết mol được chuẩn hóa thành tỷ lệ mol tương ứng của hỗn hợp của GIP và GLP-1 tự nhiên. Yếu tố chuẩn hóa là 4,53 dựa trên dữ liệu liên kết cho GIP ($K_i=0,175$ nM) và GLP-1 ($K_i=0,793$ nM). Giá trị 1,48 chứng minh hoạt tính đồng chủ vận cân bằng của ví dụ 1.

Bảng 1: Ái lực liên kết thụ thể, K_i , nM (SEM, n)

Hợp chất	GIP-R của người	GLP-1R người	Tỷ lệ tuyệt đối của hGLP-1R/hGIP-R	Tỷ lệ mol của hGLP-1R/hGIP-R
Ví dụ 1	34,4 (5,0, n=8)	232 (40, n=8)	6,7	1,48
GIP, 1-42	0,175 (0,022, n=8)	>175 (n=14)	>1000	
GLP-1, 7-36-NH ₂	>100 (n=15)	0,793 (0,099, n=8)	<0,008	
Ví dụ 3	26,7 (2,3, n=17)	427 (33, n=17)	16	3,53
Ví dụ 6	44,2 (3,6, n=14)	365 (28, n=14)	8,3	1,83
Ví dụ 7	46,1 (5,9, n=11)	352 (39, n=11)	7,6	1,68
Ví dụ 8	67,5 (9,9, n=6)	307 (35, n=6)	4,5	0,99
Ví dụ 4	40,7 (5,1, n=7)	714 (76, n=7)	17,5	3,86
Ví dụ 2	63,9 (11,8, n=8)	344 (60, n=8)	5,4	1,19
Ví dụ 5	17,8 (3,0, n=5)	158 (32, n=5)	8,9	1,96

Các giá trị trung bình được thể hiện là các giá trị trung bình hình học với sai số chuẩn của giá trị trung bình (SEM) và số bản sao (n) thể hiện trong ngoặc đơn. Dấu (>)

thể hiện dữ liệu không đạt đến 50% ức chế và K_i được tính toán sử dụng nồng độ cao nhất được thử nghiệm trong thử nghiệm.

Các thử nghiệm hGIP-R, hGLP-1R, và hGCGR chức năng

Hoạt tính chức năng *in vitro* đối với các thụ thể GIP, GLP-1, và glucagon của người đối với các hợp chất theo sáng chế được xác định trong các dòng tế bào tạo dòng HEK-293 biểu hiện các thụ thể này. Mỗi dòng tế bào biểu hiện quá mức thụ thể được xử lý bằng các hợp chất theo sáng chế trong DMEM (Gibco Cat# 31053) được bổ sung bằng 1X GlutaMAX™ (Gibco Cat# 35050), 0,25% FBS, 0,05% phần V BSA, 250 μ M IBMX và 20 mM HEPES trong 40 μ l thể tích thử nghiệm. Sau khi ủ trong 60 phút ở nhiệt độ phòng, sự tăng cAMP nội bào thu được được định lượng sử dụng kit thử nghiệm CisBio cAMP Dynamic 2 HTRF (Bedford, MA). Tóm lại, các mức cAMP trong tế bào được phát hiện bằng cách thêm thể liên hợp cAMP-d2 trong đệm dung giải tế bào (20 μ l) sau đó là kháng thể kháng-cAMP-Eu³⁺-Cryptate, cũng ở trong đệm dung 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 giếng sử dụng đường cong tiêu chuẩn cAMP. Lượng cAMP được tạo (nM) trong mỗi giếng được chuyển thành phần trăm của đáp ứng tối đa quan sát thấy với các đối chứng GIP(1-42)NH₂ của người, GLP-1(7-36)NH₂ của người, hoặc glucagon của người. Giá trị EC₅₀ tương đối và phần trăm cao nhất (E_{max}) thu được bằng cách phân tích hồi qua không tuyến tính sử dụng đáp ứng tối đa theo phần trăm theo nồng độ của hợp chất theo sáng chế, được hiệu chỉnh thành phương trình logic bốn thông số.

Trong các thử nghiệm được thực hiện chủ yếu như được mô tả trong thử nghiệm này, các hợp chất cụ thể theo sáng chế minh họa hoạt tính chống lại các thụ thể GIP và GLP-1 của người, trong khi cũng chứng minh sự chọn lọc đối với thụ thể glucagon. Trong Bảng 2, hiệu lực chức năng chống lại các thụ thể được thể hiện đối với các đối chứng hGIP(1-42)NH₂, hGLP-1(7-36)NH₂ và hGlucagon tự nhiên, và các hợp chất cụ thể theo sáng chế.

Bảng 2. Hiệu lực chức năng (EC_{50}) chống lại các thụ thể GIP, GLP-1, và glucagon của người.

Hợp chất	GIP-R của người		GLP-1R người		GCGR của người	
	EC_{50} , nM $\pm$ SEM (n)	E_{max} , %	EC_{50} , nM $\pm$ SEM (n)	E_{max} , %	EC_{50} , nM $\pm$ SEM, (n)	E_{max} , %
Ví dụ 1	11,0 $\pm$ 0,9 (17)	97,9 $\pm$ 3, 0	71,2 $\pm$ 7,2 (17)	85,2 $\pm$ 4, 4	>1000 (13)	Không xác định
Ví dụ 3	3,15 $\pm$ 0,34 (14)	106 $\pm$ 3	33,9 $\pm$ 3,2 (14)	96,2 $\pm$ 6, 2	>1000 (10)	Không xác định
Ví dụ 6	4,40 $\pm$ 0,71 (13)	106 $\pm$ 3	28,4 $\pm$ 4,2 (13)	104 $\pm$ 4	>1000 (9)	Không xác định
Ví dụ 7	8,07 $\pm$ 0,70 (17)	106 $\pm$ 3	35,5 $\pm$ 2,6 (17)	97,2 $\pm$ 3, 4	>1000 (13)	Không xác định
Ví dụ 8	21,1 $\pm$ 2,7 (14)	108 $\pm$ 4	57,9 $\pm$ 6,8 (13)	88,4 $\pm$ 2, 3	>1000 (10)	Không xác định
Ví dụ 4	3,76 $\pm$ 0,83 (6)	102 $\pm$ 3	66,9 $\pm$ 14,9 (6)	100 $\pm$ 5	>1000 (2)	Không xác định
Ví dụ 2	17,5 $\pm$ 2,0 (13)	94,7 $\pm$ 2, 0	75,7 $\pm$ 6,0 (13)	98,2 $\pm$ 5, 5	>1000 (9)	Không xác định
Ví dụ 5	8,76 $\pm$ 0,86 (10)	105 $\pm$ 2	70,9 $\pm$ 9,7 (10)	105 $\pm$ 4	>1000 (10)	Không xác định
hGLP-1(7-36)NH ₂			0,176 $\pm$ 0,015 (17)	102 $\pm$ 2		
hGIP(1-42)NH ₂	0,135 $\pm$ 0,010 (17)	100 $\pm$ 1				
hGlucagon					0,0208 $\pm$ 0,0024 (13)	115 $\pm$ 2

Các giá trị trung bình của EC_{50} được thể hiện là các giá trị trung bình hình học $\pm$ sai số tiêu chuẩn của giá trị trung bình (SEM) với số bản sao (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 +/- sai số tiêu chuẩn. ND biểu thị rằng hoạt tính chủ vận là không phát hiện được. Dấu (>) thể hiện rằng EC₅₀ không thể xác định được. Các giá trị được thể hiện là đến ba chữ số có nghĩa

Hoạt hóa chức năng của các tế bào hGIP-R để tạo ra cAMP nội bào trong các dòng tế bào tiết incretin

Hoạt tính chức năng của các hợp chất hGIP-R theo sáng chế được chứng minh bởi khả năng của các hợp chất trong việc tạo ra cAMP nội bào trong các tế bào GLUTag, dòng tế bào nội tiết ruột của chuột được biệt hóa tương đối bất tử, ổn định mà biểu hiện gen proglucagon và tiết các peptit tương tự glucagon theo cách điều hòa. Các tế bào này được duy trì ở 37°C, 5% CO₂, 95% độ ẩm trong môi trường DMEM được bổ sung bằng 5,5 mM glucoza, 10% FBS, và 2 mM glutamin. Trước thử nghiệm, các tế bào được xử lý bằng trypsin, được tạo viên, và cấy vào các đĩa thử nghiệm nuôi cấy mô 96 giếng ở mật độ 20,000 tế bào/giếng. Các tế bào được cho gắn và được ủ trong 48 giờ ở 37°C, 5% CO₂. Vào ngày thử nghiệm, môi trường được gạn từ các tế bào và 50 µl đệm EBSS (0,1% BSA, 2 mM glucoza và 0,25 mM IBMX) chứa khoảng nồng độ hợp chất (0,001 – 3 µM) được thêm vào các tế bào. Đĩa được ủ ở 37°C trong một giờ và mức cAMP được xác định sử dụng kit Cisbio Dynamic 2 cAMP HTRF (Bedford, MA). 25 µl kháng thể kháng cAMP cryptate và 25 µl cAMP d2 được thêm vào mỗi giếng và các đĩa được ủ trong một giờ ở nhiệt độ phòng. Các đĩa được đọc ở 620nm và 665nm trên Tecan Genios Pro. Các kết quả được tính toán từ tỷ lệ 665nm/620nm nhân với 10000, và chuyển thành nM cAMP trên giếng sử dụng đường cong tiêu chuẩn cAMP. Dữ liệu được phân tích bằng GraphPad sử dụng thuật toán logic không tuyến tính 4 thông số.

Trong các thử nghiệm được thực hiện về bản chất như được mô tả trong thử nghiệm này, các hợp chất cụ thể theo sáng chế thể hiện sự tích lũy cAMP tăng cường, phụ thuộc liều của các tế bào GLUTag (Bảng 3). Đối chứng GLP-1 tự nhiên không gây bất kỳ thay đổi nào trong cAMP ở tất cả các nồng độ thử nghiệm và chỉ ra rằng hệ thống tế bào này chỉ biểu hiện thụ thể GIP; do đó, các hợp chất cụ thể theo sáng chế được thấy là tạo ra tác dụng thông qua thụ thể GIP.

Bảng 3: EC50 trong các tế bào GLUTag.

Hợp chất	EC50 trung bình, nM (n)
Ví dụ 3	1610 (1)
Ví dụ 7	2746 (1)
Ví dụ 4	2186 (1)
Ví dụ 2	2918 (1)
Ví dụ 1	1494 (2)
GIP tự nhiên	11,62 (3)

Đo cAMP nội bào trong các tế bào HEK293 biểu hiện tạm thời thụ thể GLP-2 của người

Hoạt tính chức năng của hGLP-2R với sự có mặt của các hợp chất theo sáng chế được chứng minh bằng cách đo cAMP nội bào trong các tế bào HEK293. Các tế bào này được chuyển vào môi trường đầy đủ, được chuyển nhiễm trong huyền phù với chất phản ứng Promega Fugene6 và cADN GLP-2R chiều dài đầy đủ của người trong vector biểu hiện pcDNA3.1, và cho bám vào các bình nuôi cấy mô trong môi trường 5% CO₂ được làm ẩm ở 37°C. Sau xấp xỉ 48 giờ nhân giống, các tế bào được lấy ra, để ráo nước và được bảo quản lạnh đông với tỷ lệ đông được kiểm soát và 10% DMSO làm chất bảo quản lạnh đông. Trong các thử nghiệm tiếp theo, lọ sẵn sàng thử nghiệm từ tế bào lạnh đông được làm tan đông để tối thiểu hóa sự khác biệt giữa các thử nghiệm. Vào ngày thử nghiệm tế bào, môi trường làm đông được thay bằng Invitrogen 31053 DMEM chứa 0,5% FBS.

Các tế bào được đếm về khả năng sống và được làm cân bằng trong xấp xỉ một đến hai giờ ở 37°C trước khi xử lý. Các hợp chất theo sáng chế được hòa tan trong DMSO và được pha loãng ngay lập tức trong môi trường DMEM chứa 0,1% phần V BSA và chất ức chế phosphodiesteraza không đặc hiệu, IBMX. Thời gian xử lý là 30 phút ở 37°C. Nồng độ DMSO cuối không vượt quá 1,1%, và nồng độ IBMX cuối là 250 µM. AMP vòng được đo sử dụng thử nghiệm động học 2 với kỹ thuật phát huỳnh quang thời gian phân giải đồng nhất (Cisbio Bioassays, Bedford, MA). Nồng độ cAMP tương ứng được suy ra từ phương pháp tính toán tỉ lệ và các ngoại chuẩn. Các

đáp ứng liều xích ma của các hợp chất thử nghiệm được xem xét sử dụng phương trình logic bốn thông số và so sánh với phối tử C₁₈- được axyl hóa tự nhiên.

Trong các thử nghiệm được thực hiện về bản chất như được mô tả trong thử nghiệm này, đối chứng GLP-2 của người C₁₈- được axyl hóa có giá trị EC₅₀ đối với việc hoạt hóa thụ thể là 1,71 nM trong khi các hợp chất cụ thể theo sáng chế có giá trị EC₅₀ từ xấp xỉ cao hơn 100x đến 1000x. Các giá trị EC₅₀ đối với các hợp chất cụ thể theo sáng chế chứng minh tính chọn lọc chống lại thụ thể GLP-2.

Bảng 4: Đo hoạt tính chức năng GLP-2R trong các tế bào HEK293.

Hợp chất	Rel EC ₅₀ (nM)	n
GLP2-C ₁₈ - diaxit hóa	1,857	4
Ví dụ 3	199,3	4
Ví dụ 7	1.800	4
Ví dụ 4	405	2
Ví dụ 1	238	4
Ví dụ 2	1612	2

Tiểu đảo của loài gặm nhấm tiết insulin

Để đánh giá hoạt động của hợp chất theo sáng chế trong hệ đại diện mức biểu hiện GLP-1R và GIP-R sinh lý tiết insulin, các hợp chất được thử nghiệm hiệu quả trong việc tiết insulin từ các tiểu đảo loài gặm nhấm hoang dã.

Sau khi đặt ống thông ống mật thông thường ở chuột nhắt đực C57Bl/6 (22-26 g) hoặc chuột cống đực Sprague-Dawley (xấp xỉ 250 g), tụy làm sưng bằng đệm Hank (3 ml cho chuột nhắt hoặc 10 ml cho chuột cống, chứa 2% BSA và 0,75 mg/ml collagenaza Clzyme (VitaCyte). Sau đó, mô được tiêu trong đệm Hank ở 37°C trong 11–13 phút (chuột nhắt) hoặc 14-16 phút cho chuột cống pancreata. Các tiểu đảo được tinh sạch (Histopaque-1100 gradient [Sigma-Aldrich], 18 phút ở 750x trọng lượng) được nuôi cấy qua đêm trong môi trường RPMI-1640 (Invitrogen) chứa 10% FBS, 100 U/ml penicillin và 100 µg/ml streptomycin, và đặt bỏ đói trước trong dung dịch muối cân bằng của Earle (Earle's Balanced Salt Solution - EBSS) được bổ sung 0,1% BSA và 2,8 mM glucoza. Sau đó, các tiểu đảo được ủ trong EBSS (Invitrogen) được bổ

sung bằng 0,1% BSA, 2,8–11,2 mM glucoza và làm tăng mức hợp chất (6 mẻ gồm 4 tiểu đảo/điều kiện). GLP-1(7-36)amit (30 nM) được dùng làm đối chứng dương. Insulin được đo trong 90 phút trong dịch nổi sử dụng thử nghiệm MSD Insulin (Meso Scale, Gaithersburg, MD).

Các hợp chất cụ thể theo sáng chế làm tăng sự tiết insulin phụ thuộc liều từ các tiểu đảo của chuột cống và chuột nhắt như được minh họa trong Bảng 5.

Bảng 5. Sự tiết insulin của tiểu đảo của loài gặm nhấm

Sự tiết insulin của tiểu đảo của chuột cống		
Hợp chất	ED50 trung bình (nM)	N
Ví dụ 3	34,9	2
Ví dụ 1	15,5	3
Sự tiết insulin của tiểu đảo của chuột nhắt		
Hợp chất	ED50 trung bình (nM)	N
Ví dụ 3	58,9	2
Ví dụ 6	51,4	1
Ví dụ 7	11,3	1
Ví dụ 4	3,5	1
Ví dụ 2	30,0	1
Ví dụ 1	47,2	2

Tạo profin tính sinh miễn dịch

Rủi ro của tính sinh miễn dịch của các hợp chất theo sáng chế được đánh giá sử dụng chương trình dự đoán *in silico*, như phân tích Epivax *in silico*. Rủi ro của tính sinh miễn dịch của các hợp chất theo sáng chế cũng được đánh giá bằng phương pháp *ex-vivo* để đo các đáp ứng tế bào T được nuôi cấy (lượng ^3H -thymidin đầu vào và sự tiết IL-2 xytokin) với sự có mặt của các hợp chất theo sáng chế.

Với công cụ thông tin miễn dịch, đánh giá *in silico* được thực hiện trên các hợp chất theo sáng chế để dự đoán đáp ứng miễn dịch sau khi dùng. Sự phân tích sử dụng xác suất của khung 9-me để liên kết với alen kháng nguyên bạch cầu người (Human leukocyte antigen - HLA) và sau đó phát hiện các Epi-Bar này. Ví dụ 1, điểm số

EpiMatrix xấp xỉ là +1,13 chỉ ra khả năng thấp hơn nhiều trong việc gây ra đáp ứng miễn dịch đối với khung xương peptit GIP tự nhiên với điểm số EpiMatrix là + 15,4. Ví dụ về đồng chủ vận GIP/GLP-1 từ WO 2011/119657 có điểm số là + 29,5.

Việc đo tính sinh miễn dịch lâm sàng dự đoán cũng được xem xét cho các hợp chất theo sáng chế bằng cách sử dụng các đặc tính của sự tăng sinh CD4+ tế bào T và sự tiết IL-2 xytokin trong tập hợp gồm 50 đối tượng cho khỏe mạnh đại diện của tập hợp người có alotyp HLA trên thế giới. Các hợp chất cụ thể theo sáng chế chứng minh mức kích thích tế bào T và sự tiết IL-2 sau khi tiếp xúc không vượt quá ngưỡng liên quan đến các hợp chất sinh miễn dịch đã biết hoặc tích cực, chỉ ra nguy cơ thấp trong việc tạo ra tính sinh miễn dịch lâm sàng.

Thông số dược động

Dược động học ở khỉ *Cynomolgus*.

Các đặc tính dược động *in vivo* cho các hợp chất theo sáng chế được chứng minh sử dụng khỉ *cynomolgus*. Các hợp chất được dùng bằng liều đơn trong tĩnh mạch hoặc dưới da (0,2 mg/kg) trong đệm xitrat 20 mM (pH 7,0) ở thể tích là 0,21 ml/kg. Máu được lấy từ mỗi động vật ở 2, 4, 8, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 204, 240, và 312 giờ sau khi phân liều dùng. Nồng độ huyết tương của các hợp chất theo sáng chế được xác định bằng phương pháp LC/MS. Tóm lại, hợp chất theo sáng chế được chiết từ 100% mẫu huyết tương khỉ (50 µl) pha loãng bằng 1X PBS (150 µl) và được trộn với N-butanol (400 µl). Ba lớp chất lỏng khác nhau được tạo thành với hợp chất nằm trong lớp trên cùng. Thể tích 200 µl được chuyển vào đĩa 96 giếng đáy chữ V, được làm khô sử dụng khí nitơ đun nóng và tổ chức lại bằng 100 µl of 30% axetonitril/ 0,1% axit formic. 20 µl mẫu đã tổ chức lại được nạp vào cột Supelco Analytical Discovery bio wide C5 3 µm. Dòng ra từ cột được đưa vào máy đo phổ khối Thermo Q-Exactive để phát hiện và định lượng.

Trong các thử nghiệm được thực hiện về cơ bản như được mô tả cho thử nghiệm này, Ví dụ 1 đạt đến nồng độ huyết tương tối đa trung bình xấp xỉ 8 giờ sau liều dùng dưới da. Thời gian bán hủy trung bình là 55 giờ và mức độ thanh thải trung bình là 0,73 mL/giờ/kg. Độ sinh khả dụng xấp xỉ là 83%. Dữ liệu này củng cố khả năng phân liều một lần/tuần cho Ví dụ 1. Dữ liệu cho các hợp chất khác theo sáng chế được tóm tắt trong Bảng 6.

Bảng 6: Các thông số dược động học trung bình sau liều dùng đơn dưới da là 0,2 mg/kg đối với khỉ đực *Cynomolgus*

Hợp chất	T _{1/2} trung bình (giờ)	T _{max} trung bình (giờ)	C _{max} trung bình (µg/mL)	AUC _{0-inf} trung bình (giờ*µg/mL)	CL/F trung bình (mL/giờ/kg)
Ví dụ 3	34	8	3,0	153	1,3
Ví dụ 7	31	6	2,9	136	1,5
Ví dụ 6	23	4	2,2	72,3	2,8
Ví dụ 8	23	10	1,0	42,8	4,7
Ví dụ 2	43	24	2,1	173	1,2

n = 2, AUC_{0-inf} = vùng dưới đường cong từ 0 đến vô cùng, CL/F = độ thanh thải / độ sinh khả dụng, T_{max} = thời gian đến nồng độ tối đa, C_{max} = nồng độ huyết tương tối đa, T_{1/2} = thời gian bán hủy.

Nghiên cứu hiệu lực của liều dùng

Thử nghiệm dung nạp glucoza trong tĩnh mạch (ivGTT) ở chuột cống được sử dụng để ước lượng hiệu lực tương đối của các hợp chất theo sáng chế so với semaglutide. Các liều đơn dưới da (Single subcutaneous -SC) từ 0,1-10 nmol/kg của mỗi hợp chất được dùng cho chuột cống và ivGTT được dùng cho mỗi chuột cống 16 giờ sau khi phân liều dùng. Sự phơi nhiễm được đo ở thời gian của ivGTT, và đối với mẫu đáp ứng phơi nhiễm, insulin AUC đáp ứng với ivGTT được sử dụng làm điểm cuối chính

Mẫu E_{max} được sử dụng để so sánh profin đáp ứng phơi nhiễm cho Ví dụ 1 so với semaglutide. Trong các thử nghiệm được thực hiện về cơ bản như được mô tả cho thử nghiệm này, sự phơi nhiễm về cơ bản là giống với Ví dụ 1 và semaglutide đối với các mức liều mà có mức hàm lượng thuốc cao hơn giới hạn định lượng của thử nghiệm. Cả hai tập dữ liệu được hiệu chỉnh đồng thời và các giá trị E₀ và E_{max} được điều chỉnh để giống nhau đối với cả hai hợp chất. Chỉ các giá trị ED₅₀ được hiệu chỉnh riêng rẽ cho các hợp chất. Giá trị ED₅₀ cho semaglutide được ước lượng là 0,6 +/- 0,2 nmol/kg. Hiệu lực của Ví dụ 1 được ước lượng là hiệu lực tương đối đối với semaglutide, và bằng 1,7 +/- 0,6 lần hiệu lực của semaglutide. Điều chỉnh cho độ khác biệt CL/F (thanh thải rõ ràng) giữa hai phân tử ở khỉ và cũng cho sự khác biệt ở khối

lượng phân tử, liều tương đương trung bình ở người được thử nghiệm đối với 1 mg semaglutide là xấp xỉ 1,3 mg/tuần cho Ví dụ 1.

Các bệnh tiểu đường typ 2

Sự tiết insulin in vivo ở chuột cống sau khi dùng glucoza trong tĩnh mạch (IVGTT)

Chuột cống đực Wistar (Harlan Labs, Indianapolis, IN) được chia ngẫu nhiên theo khối lượng cơ thể và được phân liều 1,5 ml/kg dưới da. 16 giờ trước khi dùng glucoza và sau đó bỏ đói. Các liều dùng là tá dược, 0,1, 0,3, 1, 3 và 10 nmol/kg. Các động vật được cân, và sau đó được gây mê bằng natri pentobarbital (Nembutal Sodium solution; Ovation Pharmaceuticals) được dùng theo đường trong màng bụng. (65 mg/kg, 30 mg/ml). Mẫu máu ở thời điểm không A được thu vào các ống EDTA sau đó glucoza được dùng (0,5 mg/kg, 5 ml/kg). Các mẫu máu được lấy ở thời điểm 2, 4, 6, 10, 20, và 30 phút sau khi dùng glucoza. Các mức glucoza trong huyết tương được xác định sử dụng máy phân tích Hitachi (Roche) và insulin huyết tương được đo bằng thử nghiệm insulin MSD (Meso Scale, Gaithersburg, MD).

Như thể hiện trong Bảng 7, các hợp chất cụ thể theo sáng chế tăng cường sự tiết insulin phụ thuộc liều sau khi tiêm glucoza trong tĩnh mạch. ED₅₀ cho insulin và sự tăng tiết insulin tối đa (được đo là vùng dưới đường cong insulin) được đưa ra trong Bảng 7.

Bảng 7. Sự tăng tiết insulin trong thử nghiệm IVGTT ở chuột cống

Hợp chất	ED ₅₀ (nmol/kg)	% tăng tối đa của insulin AUC
Ví dụ 3	1,00	314 +/- 38%
Ví dụ 3	1,42	219 +/- 19%
Ví dụ 6	2,58	289 +/- 4%
Ví dụ 7	4,33	335 +/- 35%
Ví dụ 7	1,10	278 +/- 26%
Ví dụ 8	6,13	324 +/- 30%
semaglutide	0,70	231 +/- 13%
Ví dụ 2	1,62	233 +/- 19%
Ví dụ 1	0,87	298 +/- 17%
Ví dụ 5	1,02	349 +/- 39%

Tác dụng giảm cân, cấu tạo cơ thể và bệnh gan nhiễm mỡ ở chuột nhất béo phì được cảm ứng bởi chế độ ăn (Diet-Induced Obese -DIO)

Tác dụng đối với việc giảm cân, cấu tạo cơ thể và bệnh gan nhiễm mỡ ở chuột nhất DIO của các hợp chất theo sáng chế được đánh giá trong chuột nhất C57/BL6 DIO. Các động vật này, mặc dù không bị tiểu đường, thể hiện sự kháng insulin, bệnh rối loạn mỡ máu, và bệnh gan nhiễm mỡ, chúng là tất cả các đặc điểm của hội chứng chuyển hóa, sau khi được đặt chế độ ăn với lượng béo cao (60% Kcal từ chất béo) trong 12 tuần.

Trong thử nghiệm này, chuột nhất đực DIO C57/BL6 từ 23-24 tuần tuổi được sử dụng, với mỗi con nặng từ 41-49 g và có hàm lượng mỡ ban đầu nằm trong khoảng từ 10,5-17,5 g. Các động vật được nuôi giữ riêng trong khu vực nuôi giữ được kiểm soát nhiệt độ (24°C) với chu trình sáng/tối 12 giờ (sáng vào lúc 22:00), và để tự do tiếp cận với thức ăn và nước uống. Sau 2 tuần thích nghi khí hậu của khu vực nuôi giữ, chuột nhất được chia ngẫu nhiên vào các nhóm điều trị (n=5/nhóm) dựa trên khối lượng cơ thể và mỗi nhóm có khối lượng cơ thể trung bình khởi điểm tương tự nhau.

Đối chứng tá được, các hợp chất theo sáng chế (với liều trong phạm vi từ 10 đến 100 nmol/kg), hoặc semaglutide tương tự GLP1 hoạt động kéo dài (30 nmol/kg), được hòa tan trong tá được (đệm xitrat 20 mM ở pH 7,0), được dùng bằng cách tiêm dưới da vào chuột nhất DIO được cho ăn tùy thích 30-90 phút trước khi bắt đầu chu trình tối cứ mỗi ba ngày trong 15 ngày. Sự tiêm dưới da được thực hiện vào ngày 1, 4, 7, 10, và 13. Thể trọng và lượng thức ăn hàng ngày được đo trong suốt thử nghiệm. Sự thay đổi tuyệt đối của thể trọng được tính toán bằng cách trừ đi thể trọng của cùng động vật trước khi tiêm hợp chất. Vào ngày 0 và 14, khối lượng chất béo tổng được đo bằng cộng hưởng từ hạt nhân (Nuclear Magnetic Resonance - NMR) sử dụng dụng cụ Echo Medical System (Houston, TX).

Vào ngày 15, glucoza trong máu được đo bằng máy đo glucoza Accu-Chek (Roche) từ tĩnh mạch máu ở đuôi và sau đó giết động vật và gan được tách ra và làm đông. Triglycerit của gan được xác định từ dịch đồng nhất của gan được thu khi giết, và cholesterol huyết tương được đo trên thiết bị phân tích lâm sàng Hitachi Modular P. Sự so sánh thống kê giữa các nhóm được thực hiện sử dụng ANOVA một chiều sau thử nghiệm so sánh bội của Dunnett. ED₅₀ để làm giảm sự sút cân được xác định trong GraphPad Prism sử dụng công cụ hiệu chỉnh không tuyến tính.

Trong các thử nghiệm được thực hiện về cơ bản như được mô tả trong thử nghiệm này, các hợp chất cụ thể theo sáng chế làm giảm thể trọng và khối lượng mỡ theo cách phụ thuộc liều (Bảng 8-13), và so với semaglutide, có thể là có hiệu quả hơn 3-5x trong việc làm giảm thể trọng. ED₅₀ của Ví dụ 1 theo phần trăm giảm thể trọng là 5,422 nmol/kg (95% mức độ khoảng tin cậy [nmol/kg] = 2,2 đến 13,6). Thể trọng giảm được thấy là trước tiên là do sự giảm khối lượng mỡ.

Bảng 8. Phần trăm mức thay đổi thể trọng hoặc chất béo ở chuột nhắt DIO.

Xử lý	Liều (nmol/kg)	% Thay đổi từ thể trọng ban đầu	% Thay đổi từ lượng mỡ ban đầu
Đối chứng	0	-3,14 ± 0,88	-4,84 ± 1,79
Semaglutide	10	-12,36 ± 1,00****	-18,21 ± 2,24**
Semaglutide	30	-14,20 ± 1,01****	-21,90 ± 2,07****
Semaglutide	100	-19,30 ± 1,38****	-33,51 ± 3,30***
Ví dụ 3	10	-13,38 ± 0,88****	-20,76 ± 2,42****
Ví dụ 3	30	-18,13 ± 1,44****	-30,90 ± 2,06****
Ví dụ 3	100	-25,84 ± 1,93****	-45,92 ± 2,15****
Ví dụ 6	10	-15,31 ± 1,25****	-24,75 ± 1,89****
Ví dụ 6	30	-21,62 ± 0,92****	-36,30 ± 2,47****
Ví dụ 6	100	-33,95 ± 1,93****	-64,64 ± 4,04****

p<0,01, *p<0,001, ****p<0,0001 từ nhóm đối chứng (One-Way ANOVA, Dunnett's). Các kết quả được biểu diễn là Trung bình ± SEM của 5 chuột nhắt trên nhóm.

Bảng 9. Phần trăm mức thay đổi thể trọng hoặc chất béo ở chuột nhắt DIO.

Xử lý	Liều (nmol/kg)	% Thay đổi từ thể trọng ban đầu	% Thay đổi từ lượng mỡ ban đầu
Đối chứng	0	$-0,74 \pm 1,49$	$3,04 \pm 3,65$
Semaglutide	30	$-17,03 \pm 0,98^{****}$	$-35,94 \pm 4,09^{****}$
Ví dụ 2	10	$-23,27 \pm 1,72^{****}$	$-49,89 \pm 5,62^{****}$
Ví dụ 2	30	$33,07 \pm 1,65^{****}$	$-72,80 \pm 4,04^{****}$
Ví dụ 2	100	$-34,66 \pm 1,80^{****}$	$-76,20 \pm 3,78^{****}$
Ví dụ 5	10	$-23,42 \pm 1,43^{****}$	$-51,28 \pm 1,89^{****}$
Ví dụ 5	30	$-26,84 \pm 3,14^{****}$	$-62,77 \pm 5,49^{****}$
Ví dụ 5	100	$-37,86 \pm 2,25^{****}$	$-81,08 \pm 1,68^{****}$
Ví dụ 1	10	$-25,18 \pm 1,82^{****}$	$-50,98 \pm 2,87^{****}$
Ví dụ 1	30	$-26,58 \pm 2,49^{****}$	$-59,98 \pm 6,60^{****}$
Ví dụ 1	100	$-38,14 \pm 1,67^{****}$	$-79,79 \pm 3,10^{****}$

****p<0,0001 từ nhóm đối chứng (One-Way ANOVA, Dunnett's). Các kết quả được biểu diễn là Trung bình $\pm$ SEM của 5 chuột nhắt trên nhóm.

Bảng 10. Phần trăm mức thay đổi thể trọng hoặc chất béo ở chuột nhắt DIO.

Xử lý	Liều (nmol/kg)	% Thay đổi từ thể trọng ban đầu	% Thay đổi từ lượng mỡ ban đầu
Đối chứng	0	$-2,43 \pm 2,06$	$-1,49 \pm 3,69$
Ví dụ 6	10	$-17,54 \pm 1,17^{****}$	$-34,30 \pm 1,20^{****}$
Ví dụ 6	30	$-19,52 \pm 1,18^{****}$	$-39,52 \pm 3,18^{****}$
Ví dụ 6	100	$-29,36 \pm 2,62^{****}$	$-56,66 \pm 4,96^{****}$
Ví dụ 7	10	$-15,08 \pm 1,22^{****}$	$-26,46 \pm 2,31^{****}$
Ví dụ 7	30	$-20,70 \pm 1,95^{****}$	$-43,49 \pm 5,47^{****}$
Ví dụ 7	100	$-24,36 \pm 2,06^{****}$	$-49,92 \pm 3,40^{****}$
Ví dụ 8	10	$-17,13 \pm 0,81^{****}$	$-34,20 \pm 1,62^{****}$
Ví dụ 8	30	$-25,27 \pm 0,70^{****}$	$-54,24 \pm 2,35^{****}$
Ví dụ 8	100	$-29,91 \pm 2,03^{****}$	$-65,23 \pm 6,69^{****}$

****p<0,001 từ nhóm đối chứng (One-Way ANOVA, Dunnett's). Các kết quả được biểu diễn là Trung bình $\pm$ SEM của 5 chuột nhất trên nhóm.

Bảng 11. Glucoza huyết, cholesterol huyết tương và triglyxerit huyết tương trong chuột nhất DIO.

Xử lý	Liều (nmol/kg)	Glucoza huyết (mg/dl)	Cholesterol huyết tương (mg/dl)	Triglyxerit (mg/dl)
Đối chứng	0	141,6 $\pm$ 5,59	303,2 $\pm$ 13,97	54,2 $\pm$ 11,14
Semaglutide	10	147,6 $\pm$ 6,13	226,8 $\pm$ 13,86**	27,36 $\pm$ 3,56*
Semaglutide	30	146,8 $\pm$ 8,43	229,8 $\pm$ 10,96**	27,9 $\pm$ 6,01*
Semaglutide	100	134,3 $\pm$ 9,22	218,4 $\pm$ 18,70**	36,46 $\pm$ 5,34
Ví dụ 3	10	109,5 $\pm$ 2,35****	213,2 $\pm$ 15,54****	30,38 $\pm$ 8,23
Ví dụ 3	30	107,6 $\pm$ 1,32****	177,4 $\pm$ 16,58****	21,32 $\pm$ 2,48**
Ví dụ 3	100	102,00 $\pm$ 0,50****	194,00 $\pm$ 14,40****	20,55 $\pm$ 4,60**
Ví dụ 6	10	105,8 $\pm$ 2,10****	198,4 $\pm$ 6,76****	20,78 $\pm$ 4,40**
Ví dụ 6	30	100,1 $\pm$ 3,29****	186,4 $\pm$ 17,04****	26,12 $\pm$ 6,85*
Ví dụ 6	100	103,6 $\pm$ 3,20****	151,4 $\pm$ 14,32****	17,26 $\pm$ 1,67***

*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001 từ nhóm đối chứng (One-Way ANOVA, Dunnett's). Các kết quả được biểu diễn là Trung bình $\pm$ SEM của 5 chuột nhất trên nhóm.

Bảng 12. Glucoza huyết, cholesterol huyết tương và triglyxerit gan trong chuột nhắt DIO.

Xử lý	Liều (nmol/kg)	Glucoza huyết (mg/dl)	Cholesterol huyết tương (mg/dl)	Triglyxerit gan (mg/g mô)
Đối chứng	0	144,30 ± 8,16	233,6 ± 12,99	206,65 ± 29,47
Semaglutide	30	136,3 ± 3,81	161,0 ± 13,92***	67,63 ± 23,40****
Ví dụ 2	10	110,8 ± 3,87**	121,8 ± 13,64****	60,77 ± 13,24****
Ví dụ 2	30	110,8 ± 3,20**	114,00 ± 9,70****	65,78 ± 17,07****
Ví dụ 2	100	113,2 ± 4,86**	109,4 ± 8,83****	56,74 ± 17,76****
Ví dụ 5	10	111,00 ± 6,56**	126,6 ± 9,67****	48,30 ± 8,14****
Ví dụ 5	30	104,5 ± 5,30***	108,2 ± 13,84****	39,60 ± 4,71****
Ví dụ 5	100	105,3 ± 6,16***	108,6 ± 4,83****	67,96 ± 13,53****
Ví dụ 1	10	102,3 ± 5,59****	120,6 ± 8,55****	60,74 ± 5,33****
Ví dụ 1	30	110,7 ± 5,85**	118,2 ± 10,11****	45,24 ± 5,87****
Ví dụ 1	100	106,7 ± 7,33***	107,6 ± 10,43****	66,98 ± 17,29****

*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001 từ nhóm đối chứng (One-Way ANOVA, Dunnett's). Các kết quả được biểu diễn là Trung bình ± SEM của 5 chuột nhắt trên nhóm.

Bảng 13. Glucoza huyết và cholesterol huyết tương ở chuột nhắt DIO.

Xử lý	Liều (nmol/kg)	Glucoza huyết (mg/dl)	Cholesterol huyết tương (mg/dl)
Đối chứng	0	152,4 ± 3,63	243,6 ± 13,12
Ví dụ 6	10	121,4 ± 2,74***	167,8 ± 15,59****
Ví dụ 6	30	121,9 ± 6,65**	159,8 ± 9,99****
Ví dụ 6	100	116,1 ± 4,67****	144,2 ± 7,12****
Ví dụ 7	10	113,6 ± 4,16****	161,8 ± 6,2****
Ví dụ 7	30	114,7 ± 4,70****	153,6 ± 13,47****
Ví dụ 7	100	114 ± 2,36****	145,4 ± 9,48****
Ví dụ 8	10	114,7 ± 4,61****	158,8 ± 7,57****
Ví dụ 8	30	117,1 ± 8,26***	139,4 ± 6,83****
Ví dụ 8	100	125,4 ± 6,30**	127,8 ± 6,34****

*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001 từ nhóm đối chứng (One-Way ANOVA, Dunnett's). Các kết quả được biểu diễn là Trung bình ± SEM của 5 chuột nhắt trên nhóm.

Hiệu quả đối với sự chuyển hóa năng lượng ở chuột nhắt DIO

Hiệu quả đối với sự chuyển hóa năng lượng ở chuột nhắt DIO của các hợp chất theo sáng chế được đánh giá ở chuột nhắt đực DIO C57/Bl6 DIO 26 tuần tuổi, nặng 43-50 g. Chuột được nuôi giữ riêng trong khu vực nuôi giữ được kiểm soát nhiệt độ (24°C) với chu trình sáng/tối 12 giờ (sáng vào lúc 22:00), và tự do tiếp cận với thức ăn TD95217 (Teklad) và 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 3 ngày thích nghi khí hậu. Đối chứng tá được (đệm xitrat 20 mM ở pH 7,0, 10 ml/kg), các hợp chất theo sáng chế, hoặc semaglutide tương tự GLP1 hoạt động kéo dài (30 nmol/kg) được dùng dưới da cho chuột nhắt DIO đã được cho ăn tùy thích 30-90 phút trước khi bắt đầu chu trình tối cứ mỗi ba ngày trong 22 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 của thể tích của CO₂ tạo ra

(V_{CO_2}) đối với thể tích của O_2 tiêu thụ (V_{O_2}). Nhiệt được tính với toàn bộ thể trọng xem xét:

$$VO_2 = Flow_{ML} * (V_1 + V_2) / N_2Ref * thể\ trọng\ động\ vật * 100)$$

$$VCO_2 = Flow_{ML} * dCO_2 / thể\ trọng\ động\ vật * 100)$$

$$Nhiệt = (CVO_2 * VO_2 + CVCO_2 * VCO_2) / 1000;$$

$$trong\ đó\ CVO_2 = 3,941; CVCO_2 = 1,106$$

Trong các thử nghiệm được thực hiện về cơ bản như được mô tả trong thử nghiệm này, chuột được xử lý bằng Ví dụ 1 làm tăng đáng kể tỷ lệ trao đổi chất từ 10 đến 15 % so với nhóm đối chứng, bắt đầu từ tuần 2, và duy trì hiệu quả trong suốt thời gian điều trị. Tuy nhiên, semaglutide không có hiệu quả đối với tỷ lệ trao đổi chất. Sự tăng tỷ lệ trao đổi chất cho Ví dụ 1 chiếm một phần thể trọng giảm bổ sung với điều trị bằng Ví dụ 1 so với nhóm điều trị bằng semaglutide.

Hiệu quả đối với việc làm rỗng dạ dày ở chuột nhắt DIO

Hiệu quả đối với việc làm rỗng dạ dày ở chuột nhắt DIO của các hợp chất theo sáng chế được đánh giá ở chuột nhắt đực DIO 23 tuần tuổi (Harlan). Chuột được cho nhịn ăn trong 16-17 giờ. Trong khi bắt đầu giai đoạn cho nhịn ăn, chuột được cho dùng liều dưới da bằng đối chứng tá được (đệm xitrat 20 mM ở pH 7,0); các liều tăng dần của các hợp chất theo sáng chế (3, 10, 30 và 100 nmol/kg), hoặc semaglutide tương tự GLP1 hoạt động kéo dài (30 nmol/kg). Ngày tiếp theo, chuột được cho dùng 0,5 ml (0,5 gram) thức ăn dạng bán lỏng mới chuẩn bị (cách 2 phút) bằng ống thông qua miệng. Nước được loại bỏ ở thời điểm này để ngăn sự làm loãng thức ăn đã ăn. Hai giờ sau khi dùng thức ăn, chuột được gây chết nhẹ nhàng cách hai phút bởi khí CO_2 . Dạ dày được loại bỏ trong khi kẹp ở lỗ tim và môn vị, sau đó bỏ kẹp và dạ dày đầy đủ được cân trong đĩa cân thuyền. Dạ dày sau đó được rạch và loại bỏ thức ăn bên trong. Dạ dày được rửa và làm khô và cân lại để đánh giá lượng thức ăn trong dạ dày. % làm rỗng dạ dày bằng $100 \times (1 - (\text{thức ăn còn lại trong dạ dày} / \text{thức ăn đã ăn qua đường miệng}))$.

Trong các thử nghiệm được thực hiện về cơ bản như được mô tả trong thử nghiệm này, Ví dụ 1 làm chậm tỷ lệ làm rỗng dạ dày của thức ăn bán lỏng theo cách

phụ thuộc liều. Sự ức chế tối đa sự làm rộng dạ dày được quan sát thấy ở liều dùng là 10 nmol/kg +/- liều (Bảng 14).

Bảng 14. Việc làm rộng thức ăn bán lỏng trong dạ dày ở chuột DIO C57/BL6 DIO gầy

Xử lý	Liều (nmol/kg)	Phần trăm làm rộng dạ dày (Trung bình $\pm$ SEM)
Tá dược (n=5)	0	69,50 $\pm$ 6,60
Semaglutide (n=5)	30	30,56 $\pm$ 7,53**
Ví dụ 1 (n=4)	3	49,11 $\pm$ 8,52
Ví dụ 1 (n=5)	10	9,76 $\pm$ 7,69****
Ví dụ 1 (n=5)	30	26,53 $\pm$ 8,14**
Ví dụ 1 (n=5)	100	18,45 $\pm$ 6,87***

Sự so sánh thống kê giữa các nhóm được thực hiện sử dụng ANOVA một chiều sau thử nghiệm so sánh bội của Dunnett. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ từ nhóm đối chứng. Các kết quả được biểu diễn là Trung bình $\pm$ SEM của 4-5 chuột nhất trên nhóm.

Đo corticosterone huyết tương ở chuột cống Sprague Dawley

Như gợi ý trong các thử nghiệm nhất định đã công bố, mức corticosterone huyết tương tăng là chỉ thị của khả năng dung nạp giảm đối với các dạng tương tự GIP và GLP-1. Mức corticosterone huyết tương được đánh giá sử dụng chuột cống Sprague Dawley (Harlan, Indianapolis), cân nặng xấp xỉ 220 g và được làm thích nghi khí hậu trong ít nhất 72 giờ trước khi thử nghiệm. Sau đó, chuột cống được phân liều bằng tá dược (đệm xitrat 20 mM, pH 7), semaglutide (10 nmol/kg), hoặc các hợp chất theo sáng chế ở 3, 10 hoặc 30 nmol/kg dưới da với 8 chuột cống trên nhóm dùng Chuột cống được chặt đầu 16 giờ sau. Máu được thu vào ống EDTA trên đá, sau đó ly tâm 5 phút ở 8000 vòng/phút trong máy ly tâm để bàn Eppendorf 5402. Huyết tương được lưu ở -80°C cho đến khi phân tích.

Để phân tích corticosterone, các corticosterone chuẩn (Sigma, 27840) được chuẩn bị bằng cách pha loãng hàng loạt trong metanol tiêu chuẩn HPLC, H₂O và thêm 5% huyết tương chuột cống được tách bằng than (Bioreclamation, RATSRM-STRPD-HEV). Các mẫu huyết tương chuột cống được pha loãng bằng PBS, được kết tủa bằng

metanol lạnh, được ủ trong 20 phút ở -20°C , và sau đó ly tâm ở 14,000 RPM bằng Eppendorf 5417R ở 4°C . Dịch nổi được tách, được làm bay hơi trong dòng khí N_2 , và được tổ chức lại trong dung dịch $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (1:1). Các mẫu được phân tích trên LC/MS được trang bị cột HPLC XSelect CSH C18 3,5 μm (2,1 mm x 30 mm) (Waters #186005254).

Trong các thử nghiệm được thực hiện về cơ bản như được mô tả cho thử nghiệm này, Ví dụ 1 chứng minh rằng không có sự tăng mức corticosterone huyết tương ở bất kỳ liều dùng thử nghiệm nào trong khi semaglutide có sự tăng xấp xỉ 4x so với đối chứng.

Bảng 15: Phân tích corticosterone huyết tương ở chuột cống Sprague Dawley

Hợp chất	Corticosterone (ng/ml)	
	Trung bình	SEM
Chất dẫn	60,78	8,41
10 nmol/kg Semaglutide	274,57	42,06
3 nmol/kg Ví dụ 1	52,21	19,39
10 nmol/kg Ví dụ 1	32,46	9,78
30 nmol/kg Ví dụ 1	31,35	5,86

Các trình tự axit amin

SEQ ID NO: 1 (GIP người)

Y A E G T F I S D Y S I A M D K I H Q Q D F V N W L L A Q K G K K N D W K H N I T Q

SEQ ID NO: 2 (GLP-1 người)

H A E G T F T S D V S S Y L E G Q A A K E F I A W L V K G R

SEQ ID NO: 3

YX₁E G T F T S D Y S I X₂L D K I A Q K A F V Q W L I A G G P S S G A P P P S

trong đó X₁ là Aib; X₂ là Aib; K ở vị trí 20 được biến đổi về mặt hóa học thông qua 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 C được amit hóa làm amit bậc một đầu C.

SEQ ID NO: 4

YX₁E G T F T S D Y S I X₂L D K I A Q K A X₃V Q W L I A G G P S S G A P P P S

trong đó X₁ là Aib; X₂ là Aib; K ở vị trí 20 được biến đổi về mặt hóa học thông qua 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; X₃ là 1-Nal; và axit amin đầu C được amit hóa làm amit bậc một đầu C.

SEQ ID NO: 5

YX₁E G T F T S D Y S I X₂L D K I A Q K A F V Q W L I A G G P S S G A P P P S

trong đó X₁ là Aib; X₂ là Aib; K ở vị trí 20 được biến đổi về mặt hóa học thông qua 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 C được amit hóa làm amit bậc một đầu C.

SEQ ID NO: 6

YX₁E G T F T S D Y S I X₂L D K I A Q K A F V Q W L I A G G P S S G A P P P S

trong đó X₁ là Aib; X₂ là Aib; K ở vị trí 20 được biến đổi về mặt hóa học thông qua sự liên hợp với nhóm epsilon-amino của mạch bên K với ([2-(2-Amino-etoxy)-

etoxy]-axetyl)₂-(γ Glu)₂-CO-(CH₂)₁₆-CO₂H; và axit amin đầu C được amit hóa làm amit bậc một đầu C.

SEQ ID NO: 7

YX₁EGTFTSDYSIX₂LDKIAQKAFVQWLIAGGPSSGAPPPS

trong đó X₁ là Aib; X₂ là Aib; K ở vị trí 20 được biến đổi về mặt hóa học thông qua sự liên hợp với nhóm epsilon-amino của mạch bên K với ([2-(2-Amino-etoxy)-etoxy]-axetyl)₂-(γ Glu)₂-CO-(CH₂)₁₈-CO₂H; và axit amin đầu C được amit hóa làm amit bậc một đầu C.

SEQ ID NO: 8

YX₁EGTFTSDYSIX₂LDKIAQKAX₃VQWLIAGGPSSGAPPPS

trong đó X₁ là Aib; X₂ là Aib; K ở vị trí 20 được biến đổi về mặt hóa học thông qua sự liên hợp với nhóm epsilon-amino của mạch bên K với ([2-(2-Amino-etoxy)-etoxy]-axetyl)₂-(γ Glu)₁-CO-(CH₂)₁₆-CO₂H; X₃ là 1-Nal; và axit amin đầu C được amit hóa làm amit bậc một đầu C.

SEQ ID NO: 9

YX₁EGTFTSDYSIX₂LDKIAQKAX₃VQWLIAGGPSSGAPPPS

trong đó X₁ là Aib; X₂ là Aib; K ở vị trí 20 được biến đổi về mặt hóa học thông qua sự liên hợp với nhóm epsilon-amino của mạch bên K với ([2-(2-Amino-etoxy)-etoxy]-axetyl)₂-(γ Glu)₂-CO-(CH₂)₁₆-CO₂H; X₃ là 1-Nal; và axit amin đầu C được amit hóa làm amit bậc một đầu C.

SEQ ID NO: 10

YX₁EGTFTSDYSIX₂LDKIAQKAX₃VQWLIAGGPSSGAPPPS

trong đó X₁ là Aib; X₂ là Aib; K ở vị trí 20 được biến đổi về mặt hóa học thông qua sự liên hợp với nhóm epsilon-amino của mạch bên K với ([2-(2-Amino-etoxy)-etoxy]-axetyl)₂-(γ Glu)₁-CO-(CH₂)₁₈-CO₂H; X₃ là 1-Nal; và axit amin đầu C được amit hóa làm amit bậc một đầu C.

SEQ ID NO: 11

YX₁EGTFTSDYSIX₂LDKIAQKAX₃VQWLIAGGPSSGAPPPS

trong đó X₁ là Aib; X₂ là Aib; K ở vị trí 20 được biến đổi về mặt hóa học thông qua sự liên hợp với nhóm epsilon-amino của mạch bên K với ([2-(2-Amino-etoxy)-etoxy]-axetyl)₂-(γGlu)_a-CO-(CH₂)_b-CO₂H trong đó a là 1 đến 2 và b là 10 đến 20; X₃ là Phe hoặc 1-Nal; và axit amin đầu C tùy ý được amit hóa làm amit bậc một đầu C.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Hợp chất có công thức:

$YX_1EGTFTSDYSIX_2LDKIAQKAX_3VQWLIAGGPSSGAPPPS$;

trong đó:

X_1 là Aib;

X_2 là Aib;

K ở vị trí 20 được biến đổi về mặt hóa học thông qua sự liên hợp với nhóm epsilon-amino của mạch bên K với $([2-(2\text{-amino-etoxy})\text{-etoxy}]\text{-axetyl})_2-(\gamma\text{Glu})_a\text{-CO}-(\text{CH}_2)_b\text{-CO}_2\text{H}$ trong đó a là 1 đến 2 và b là 10 đến 20;

X_3 là Phe hoặc 1-Nal;

và axit amin đầu C tùy ý được amit hóa làm amit bậc một đầu C (SEQ ID NO: 11), hoặc muối được dụng của nó.

2. Hợp chất theo điểm 1, trong đó X_3 là Phe.

3. Hợp chất theo điểm 1, trong đó X_3 là 1-Nal.

4. Hợp chất theo điểm 2, trong đó b là 14 đến 18.

5. Hợp chất theo điểm 4, trong đó b là 16 đến 18.

6. Hợp chất theo điểm 5, trong đó b là 18.

7. Hợp chất theo điểm 4, trong đó a là 1.

8. Hợp chất theo điểm 4, trong đó a là 2.

9. Hợp chất theo điểm 4, trong đó axit amin đầu C được amit hóa làm amit bậc một đầu C.

10. Hợp chất theo điểm 1, trong đó:

X_1 là Aib

X_2 là Aib;

K ở vị trí 20 được biến đổi về mặt hóa học thông qua sự liên hợp với nhóm epsilon-amino của mạch bên K với $([2-(2\text{-amino-etoxy})\text{-etoxy}]\text{-axetyl})_2-(\gamma\text{Glu})_1\text{-CO}-(\text{CH}_2)_{18}\text{-CO}_2\text{H}$;

X_3 là Phe;

và axit amin đầu C được amit hóa làm amit bậc một đầu C (SEQ ID NO: 3),

hoặc muối được dụng của nó.

11. Hợp chất theo điểm 1, trong đó:

X_1 là Aib

X_2 là Aib;

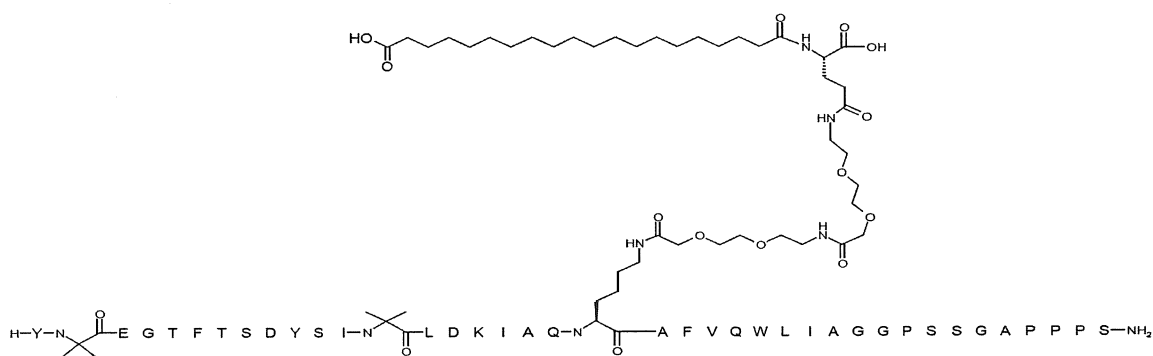
K ở vị trí 20 được biến đổi về mặt hóa học thông qua sự liên hợp với nhóm epsilon-amino của mạch bên K với $[(2-(2\text{-amino-etoxy})\text{-etoxy})\text{-axetyl}]_2-(\gamma\text{Glu})_2\text{-CO}-(\text{CH}_2)_{18}\text{-CO}_2\text{H}$;

X_3 là 1-Nal;

và axit amin đầu C được amit hóa làm amit bậc một đầu C (SEQ ID NO: 4), hoặc muối được dụng của nó.

12. Dược phẩm chứa hợp chất theo điểm 10 với chất mang, chất pha loãng hoặc tá dược được dụng.

13. Hợp chất theo điểm 1, trong đó công thức là:



14. Dược phẩm chứa hợp chất theo điểm 13 với chất mang, chất pha loãng hoặc tá dược được dụng.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Eli Lilly and Company

<120> Hợp chất đồng chủ vận GIP và GLP-1 và dược phẩm chứa hợp chất này

<130> X20448

<150> 62/101488

<151> 2015-01-09

<160> 11

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 42

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 1

Tyr	Ala	Glu	Gly	Thr	Phe	Ile	Ser	Asp	Tyr	Ser	Ile	Ala	Met	Asp	Lys
1				5					10					15	

Ile	His	Gln	Gln	Asp	Phe	Val	Asn	Trp	Leu	Leu	Ala	Gln	Lys	Gly	Lys
		20					25						30		

Lys	Asn	Asp	Trp	Lys	His	Asn	Ile	Thr	Gln
	35						40		

<210> 2

<211> 30

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 2

His	Ala	Glu	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Val	Ser	Ser	Tyr	Leu	Glu	Gly
1				5					10					15	

Gln	Ala	Ala	Lys	Glu	Phe	Ile	Ala	Trp	Leu	Val	Lys	Gly	Arg
		20					25					30	

<210> 3
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<220>
 <221> YẾU TỔ HỖN HỢP
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa ở vị trí 2 là axit amin axit 2-Aminoisobutyric không có tự nhiên

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

<220>
 <221> YẾU TỔ HỖN HỢP
 <222> (13)..(13)
 <223> Xaa ở vị trí 13 là axit amin axit 2-Aminoisobutyric không có tự nhiên

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (13)..(13)
 <223> Aib

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (20)..(20)
 <223> Lys ở vị trí 20 được biến đổi hóa học thông qua sự liên hợp với
 nhóm epsilon-amino của mạch bên K với
 ([2-(2-Amino-etoxy)-etoxy]-axetyl)2-(gamma-Glu)1-CO-(CH2)18-CO2
 H

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (39)..(39)
 <223> Ser ở vị trí 39 được amit hóa làm amit bậc một đầu C

<400> 3

Tyr Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Xaa Leu Asp Lys

1

5

10

15

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

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
 35

<210> 4

<211> 39

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<220>

<221> YẾU TỐ HỖN HỢP

<222> (2)..(2)

<223> Xaa ở vị trí 2 là axit amin axit 2-Aminoisobutyric không có tự nhiên

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Aib

<220>

<221> YẾU TỐ HỖN HỢP

<222> (13)..(13)

<223> Xaa ở vị trí 13 là axit amin axit 2-Aminoisobutyric không có tự nhiên

<220>

<221> MOD_RES

<222> (13)..(13)

<223> Aib

<220>

<221> MOD_RES

<222> (20)..(20)

<223> Lys ở vị trí 20 được biến đổi hóa học thông qua sự liên hợp với
 nhóm epsilon-amino của mạch bên K với
 ([2-(2-Amino-etoxy)-etoxy]-axetyl)2-(gamma-Glu)2-CO-(CH₂)₁₈-CO₂
 H

<220>

<221> YẾU TỔ HỖN HỢP

<222> (22)..(22)

<223> Xaa ở vị trí 22 là 1-Nal

<220>

<221> MOD_RES

<222> (39)..(39)

<223> Ser ở vị trí 39 được amit hóa làm amit bậc một đầu C

<400> 4

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

Ile	Ala	Gln	Lys	Ala	Xaa	Val	Gln	Trp	Leu	Ile	Ala	Gly	Gly	Pro	Ser
		20					25						30		

Ser	Gly	Ala	Pro	Pro	Pro	Ser
			35			

<210> 5

<211> 39

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<220>

<221> YẾU TỔ HỖN HỢP

<222> (2)..(2)

<223> Xaa ở vị trí 2 là axit amin axit 2-Aminoisobutyric không có tự nhiên

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Aib

<220>

<221> YẾU TỔ HỖN HỢP

<222> (13)..(13)

<223> Xaa ở vị trí 13 là axit amin axit 2-Aminoisobutyric không có tự nhiên

<220>

<221> MOD_RES

<222> (13)..(13)

<223> Aib

<220>

<221> MOD_RES

<222> (20)..(20)

<223> Lys ở vị trí 20 được biến đổi hóa học thông qua sự liên hợp với nhóm epsilon-amino của mạch bên K với

$$([2-(2\text{-Amino-etoxy})\text{-etoxy}]\text{-axetyl})2-(\gamma\text{-Glu})1\text{-CO}-(\text{CH}_2)_{16}\text{-CO}_2\text{H}$$

<220>

<221> MOD_RES

<222> (39)..(39)

<223> Ser ở vị trí 39 được amit hóa làm amit bậc một đầu C

<400> 5

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

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

Ser	Gly	Ala	Pro	Pro	Pro	Ser
			35			

<210> 6

<211> 39

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<220>

<221> YẾU TỐ HỖN HỢP

<222> (2)..(2)

<223> Xaa ở vị trí 2 là axit amin axit 2-Aminoisobutyric không có tự nhiên

$\langle 220 \rangle$

```
<221> MOD RES
```

$$\langle 222 \rangle \quad (2) \cdot (2)$$

<223> Aib

 $\langle 220 \rangle$

<221> YẾU TỔ HỖN HỢP

$$\langle 222 \rangle \quad (13) \dots (13)$$

<223> Xaa ở vị trí 13 là axit amin axit 2-Aminoisobutyric không có tự nhiên

 $\langle 220 \rangle$

<221> MOD RES

$$\langle 222 \rangle \quad (13) \dots (13)$$

<223> Aib

 $\langle 220 \rangle$

<221> MOD RES

$$\langle 222 \rangle \quad (20) \dots (20)$$

<223> Lys ở vị trí 20 được biến đổi hóa học thông qua sự liên hợp với nhóm epsilon-amino của mạch bên K với
 ([2-(2-Amino-etoxy)-etoxy]-axetyl)2-(gamma-Glu)2-CO-(CH2)16-CO2
 H

 $\langle 220 \rangle$

<221> MOD RES

$\langle 222 \rangle$ (39) . . (39)

<223> Ser ở vị trí 39 được amit hóa làm amit bậc một đầu C

<400> 6

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

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

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
35

$\langle 210 \rangle$ 7

<211> 39

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<220>

<221> YẾU TỐ HỖN HỢP

<222> (2)..(2)

<223> Xaa ở vị trí 2 là axit amin axit 2-aminoisobutyric không có tự nhiên
2-Aminoisobutyric Acid

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Aib

<220>

<221> YẾU TỐ HỖN HỢP

<222> (13)..(13)

<223> Xaa ở vị trí 13 là axit amin axit 2-aminoisobutyric không có tự nhiên
2-Aminoisobutyric Acid

<220>

<221> MOD_RES

<222> (13)..(13)

<223> Aib

<220>

<221> MOD_RES

<222> (20)..(20)

<223> Lys ở vị trí 20 được biến đổi hóa học thông qua sự liên hợp với
nhóm epsilon-amino của mạch bên K với
([2-(2-Amino-etoxy)-etoxy]-axetyl)2-(gamma-Glu)2-CO-(CH₂)₁₈-CO₂
H

<220>

<221> MOD_RES

<222> (39)..(39)

<223> Ser ở vị trí 39 được amit hóa làm amit bậc một đầu C

<400> 7

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

Ile	Ala	Gln	Lys	Ala	Phe	Val	Gln	Trp	Leu	Ile	Ala	Gly	Gly	Pro	Ser
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

20

25

30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser

35

<210> 8

<211> 39

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<220>

<221> YẾU TỔ HỖN HỢP

<222> (2)..(2)

<223> Xaa ở vị trí 2 là axit amin axit 2-Aminoisobutyric không có tự nhiên

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Aib

<220>

<221> YẾU TỔ HỖN HỢP

<222> (13)..(13)

<223> Xaa ở vị trí 13 là axit amin axit 2-Aminoisobutyric không có tự nhiên

<220>

<221> MOD_RES

<222> (13)..(13)

<223> Aib

<220>

<221> MOD_RES

<222> (20)..(20)

<223> Lys ở vị trí 20 được biến đổi hóa học thông qua sự liên hợp với
nhóm epsilon-amino của mạch bên K với
([2-(2-Amino-etoxy)-etoxy]-axetyl)2-(gamma-Glu)1-CO-(CH₂)₁₆-CO₂
H

<220>

<221> YẾU TỔ HỖN HỢP

<222> (22)..(22)

<223> Xaa ở vị trí 22 is 1-Nal

<220>

<221> MOD_RES

<222> (39)..(39)

<223> Ser ở vị trí 39 được amit hóa làm amit bậc một đầu C

<400> 8

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

Ile	Ala	Gln	Lys	Ala	Xaa	Val	Gln	Trp	Leu	Ile	Ala	Gly	Gly	Pro	Ser
		20					25					30			

Ser	Gly	Ala	Pro	Pro	Pro	Ser
			35			

<210> 9

<211> 39

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<220>

<221> YẾU TỐ HỖN HỢP

<222> (2)..(2)

<223> Xaa ở vị trí 2 là axit amin axit 2-Aminoisobutyric không có tự nhiên

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Aib

<220>

<221> YẾU TỐ HỖN HỢP

<222> (13)..(13)

<223> Xaa ở vị trí 13 là axit amin axit 2-aminoisobutyric không có tự nhiên

<220>

<221> MOD_RES

<222> (13)..(13)

<223> Aib

<220>

<221> MOD_RES

<222> (20)..(20)

<223> Lys ở vị trí 20 được biến đổi hóa học thông qua sự liên hợp với nhóm epsilon-amino của mạch bên K với
 ([2-(2-Amino-etoxy)-etoxy]-axetyl)2-(gamma-Glu)2-CO-(CH₂)₁₆-CO₂H

<220>

<221> YẾU TỔ HỖN HỢP

<222> (22)..(22)

<223> Xaa ở vị trí 22 is 1-Nal

<220>

<221> MOD_RES

<222> (39)..(39)

<223> Ser ở vị trí 39 được amit hóa làm amit bậc một đầu C

<400> 9

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

Ile	Ala	Gln	Lys	Ala	Xaa	Val	Gln	Trp	Leu	Ile	Ala	Gly	Gly	Pro	Ser
		20					25					30			

Ser	Gly	Ala	Pro	Pro	Pro	Ser
			35			

<210> 10

<211> 39

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<220>

<221> YẾU TỔ HỖN HỢP

<222> (2)..(2)

<223> Xaa ở vị trí 2 là axit amin axit 2-aminoisobutyric không có tự nhiên

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Aib

<220>

<221> YẾU TỐ HỖN HỢP

<222> (13)..(13)

<223> Xaa ở vị trí 13 là axit amin axit 2-aminoisobutyric không có tự nhiên

<220>

<221> MOD_RES

<222> (13)..(13)

<223> Aib

<220>

<221> MOD_RES

<222> (20)..(20)

<223> Lys ở vị trí 20 được biến đổi hóa học thông qua sự liên hợp với nhóm epsilon-amino của mạch bên K với
 ([2-(2-Amino-etoxy)-etoxy]-axetyl)2-(gamma-Glu)1-CO-(CH₂)₁₈-CO₂H

<220>

<221> YẾU TỐ HỖN HỢP

<222> (22)..(22)

<223> Xaa ở vị trí 22 is 1-Nal

<220>

<221> MOD_RES

<222> (39)..(39)

<223> Ser ở vị trí 39 được amit hóa làm amit bậc một đầu C

<400> 10

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

Ile	Ala	Gln	Lys	Ala	Xaa	Val	Gln	Trp	Leu	Ile	Ala	Gly	Gly	Pro	Ser
		20					25					30			

Ser	Gly	Ala	Pro	Pro	Pro	Ser
			35			

<210> 11
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<220>
 <221> YẾU TỔ HỖN HỢP
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa ở vị trí 2 là axit amin axit 2-aminoisobutyric không có tự nhiên

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

<220>
 <221> YẾU TỔ HỖN HỢP
 <222> (13)..(13)
 <223> Xaa ở vị trí 13 là axit amin axit 2-aminoisobutyric không có tự nhiên

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (13)..(13)
 <223> Aib

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (20)..(20)
 <223> Lys ở vị trí 20 được biến đổi hóa học thông qua sự liên hợp với
 nhóm epsilon-amino của mạch bên K với
 $[(2-(2\text{-Amino-etoxy})\text{-etoxy})\text{-axetyl})2-(\gamma\text{-Glu})a\text{-CO}-(\text{CH}_2)b\text{-CO}_2\text{H}$
 Trong đó a là 1 đến 2 và b là 10 đến 20

<220>
 <221> YẾU TỔ HỖN HỢP
 <222> (22)..(22)
 <223> Xaa ở vị trí 22 là Phe hoặc 1-Nal

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (39)..(39)

<223> Ser ở vị trí 39 tùy ý được amit hóa làm amit bậc một đầu C

<400> 11

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

Ile	Ala	Gln	Lys	Ala	Xaa	Val	Gln	Trp	Leu	Ile	Ala	Gly	Gly	Pro	Ser
		20					25						30		

Ser	Gly	Ala	Pro	Pro	Pro	Ser
		35				