



(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)



1-0032220

(51)⁷ C07K 14/585; A61K 38/23

(13) B

(21) 1-2016-01721

(22) 10/11/2014

(86) PCT/EP2014/074207 10/11/2014

(87) WO2015/071229 21/05/2015

(30) 1320112.4 14/11/2013 GB; 1414706.0 19/08/2014 GB

(45) 25/06/2022 411

(43) 25/08/2016 341A

(73) KEYBIOSCIENCE AG (CH)

Spichermatt 30, CH-6370 Stans, Switzerland

(72) KARSDAL, Morten (DK); HENRIKSEN, Kim (DK); ANDREASSEN, Kim Vietz (DK).

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

(54) PEPTIT CÓ TÁC DỤNG GIỐNG CALCITONIN DÙNG ĐỂ ĐIỀU TRỊ BỆNH

(57) Sáng chế đề cập đến chất có tác dụng giống calcitonin là peptit có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:43, trình tự này có thể được carboxyl hóa ở đầu tận cùng N của nó hoặc theo cách khác được cải biến để khử điện tích dương của axit amin thứ nhất và ngoài ra có thể được amit hóa ở đầu tận cùng C của nó, và trong mỗi trình tự này, các gốc xystein ở các vị trí 1 và 7 có thể cùng được thế bằng axit α -aminosuberic (Asu) là hữu ích để dùng làm thuốc điều trị bệnh đái tháo đường (typ I và/hoặc typ II), chứng tăng cân, chứng tiêu thụ thức ăn quá mức, hội chứng trao đổi chất, bệnh viêm đa khớp dạng thấp, bệnh gan nhiễm mỡ không phải do rượu gây ra, chứng loãng xương, hoặc bệnh viêm xương khớp, khả năng điều chỉnh nồng độ glucoza trong máu kém, đáp ứng kém với các thử nghiệm dung nạp glucoza, hoặc khả năng hấp thu thức ăn kém.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến chất có tác dụng giống calcitonin, và mô tả việc dùng chúng để làm thuốc điều trị các bệnh và rối loạn khác nhau bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, bệnh đái tháo đường (typ I và typ II), chứng thừa cân, hội chứng tiêu thụ thực phẩm và trao đổi chất quá mức, khả năng điều chỉnh nồng độ glucoza trong máu, khả năng điều chỉnh đáp ứng với các thử nghiệm dung nạp glucoza, khả năng điều chỉnh mức hấp thu thức ăn, điều trị chứng loãng xương và điều trị bệnh viêm xương khớp.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Trên thế giới, có khoảng 250 triệu người mắc bệnh đái tháo đường và dự đoán rằng con số này sẽ tăng gấp đôi trong hai thập kỷ tiếp theo. Hơn 90% trong số này mắc bệnh đái tháo đường typ 2 (type 2 diabetes mellitus - T2DM). Ước tính rằng hiện chỉ có 50-60% người mắc T2DM hoặc trong các giai đoạn trước khi mắc T2DM được chẩn đoán.

T2DM là bệnh phức tạp được đặc trưng bởi sự bất thường trong quá trình chuyển hóa hydrat cacbon và chất béo. Có nhiều nguyên nhân gây ra bệnh T2DM và bao gồm cả yếu tố di truyền lẫn yếu tố môi trường mà ảnh hưởng tới chức năng của tế bào β và tính nhạy của insulin trong các mô như mô cơ, gan, tụy và mô mỡ. Kết quả là làm giảm sút việc tiết insulin và đồng thời làm suy giảm tiến triển chức năng của tế bào β và tính kháng insulin mạn tính. Tuyến tụy nội tiết không có khả năng bù mức độ kháng insulin ngoại vi, dẫn tới việc làm tăng đường huyết quá mức và khởi phát bệnh đái tháo đường trên lâm sàng. Hiện nay, nhận thấy rằng tính kháng của mô với quá trình hấp thu glucoza do insulin gây ra là yếu tố chính quyết định sinh bệnh học của bệnh T2DM.

Tiêu chuẩn thành công để can thiệp bệnh T2DM một cách tối ưu là làm giảm nồng độ glucoza trong máu, có thể làm giảm trong thời gian dài nồng độ glucoza trong máu và làm tăng khả năng dung nạp nồng độ glucoza cao sau khi hấp thu thức ăn, được mô tả bởi nồng độ glucoza tối đa giảm và mức độ thanh thải tăng nhanh. Cả hai tình trạng này đều có xu hướng làm giảm chức năng và khả năng sản sinh insulin của tế bào β .

Bệnh đái tháo đường typ I được đặc trưng bởi sự thiếu khả năng sản sinh insulin để đáp lại quá trình hấp thu thức ăn và do đó làm mất khả năng điều chỉnh nồng độ glucoza trong máu trở về nồng độ sinh lý bình thường.

Cấu trúc sinh lý của xương có thể bị tổn thương bởi nhiều yếu tố, bao gồm bệnh và thương tổn. Một trong số các bệnh về xương thường gặp nhất là chứng loãng xương, được đặc trưng bởi khối lượng xương giảm và phá hủy cấu trúc của mô xương, khiến cho xương trở nên dễ vỡ và tăng độ nhạy với sự rạn nứt, đặc biệt là trong vùng hông, cột sống và cổ tay. Chứng loãng xương sẽ phát triển khi có sự mất cân bằng khiến cho tốc độ tái hấp thu xương vượt quá

tốc độ tạo xương. Nhận thấy rằng việc dùng lượng hữu hiệu chất chống tái hấp thu, như calcitonin, có thể ngăn ngừa được quá trình tái hấp thu xương.

Bệnh viêm hoặc bệnh thoái hóa, kể cả các bệnh về khớp, ví dụ, viêm xương khớp (OA), bệnh viêm đa khớp dạng thấp (RA) hoặc bệnh viêm đa khớp dạng thấp ở vị thành niên (JRA), và kể cả bệnh viêm gây ra do đáp ứng tự miễn, ví dụ, bệnh luput, bệnh viêm cột sống dính khớp (AS) hoặc bệnh xơ cứng rải rác (MS), có thể làm giảm khả năng vận động cơ bản do đau đớn và phá hủy khớp gây ra. Sụn bao bọc và làm chức năng đệm cho xương nằm trong các khớp có thể bị thoái hóa theo thời gian, do đó khiến cho hai xương tiếp xúc trực tiếp với nhau theo cách không mong muốn, có thể hạn chế sự cử động của xương này đối với xương khác và/hoặc gây tổn thương cho xương này tới xương khác trong quá trình cử động của khớp. Xương dưới sụn nằm ngay bên dưới sụn cũng có thể bị thoái hóa. Việc dùng lượng hữu hiệu của chất chống tái hấp thu, như calcitonin, có thể ngăn ngừa quá trình tái hấp thu xương.

WO2013/067357 mô tả các biến thể tổng hợp của calcitonin tự nhiên có trình tự axit amin cải biến được dự định nhằm tạo ra được các tính chất được cải thiện.

Calcitonin được bảo toàn ở mức cao trong nhiều loài khác nhau. Calcitonin tự nhiên có chiều dài đầy đủ 32 axit amin. Các trình tự nêu trong Ví dụ về calcitonin tự nhiên được đưa ra dưới đây (trong mỗi trường hợp, trình tự này được amit hóa ở đầu tận cùng C - không được thể hiện):

Cá hồi	CSNLSTCVLGKLSQELHKLQTYPRNTGSGTP SEQ ID NO:1
Lươn	CSNLSTCVLGKLSQELHKLQTYPRTDVGAGTP SEQ ID NO:2
Gà	CASLSTCVLGKLSQELHKLQTYPRTDVGAGTP SEQ ID NO:3
Chuột nhắt	CGNLSTCMLGTYTQDLNKFHTFPQTSIGVEAP SEQ ID NO:13
Chuột	CGNLSTCMLGTYTQDLNKFHTFPQTSIGVGAP SEQ ID NO:14
Ngựa	CSNLSTCVLGTYTQDLNKFHTFPQTAIGVGAP SEQ ID NO:15
Giống chó-1	CSNLSTCVLGTYSKDLNNFHTFSGIGFGAETP SEQ ID NO:16
Giống chó-2	CSNLSTCVLGTYTQDLNKFHTFPQTAIGVGAP SEQ ID NO:17
Lợn	CSNLSTCVLSAYWRNLNNFHRFSGMGFGPETP SEQ ID NO:18
Người	CGNLSTCMLGTYTQDFNKFHTFPQTAIGVGAP SEQ ID NO:19

Việc so sánh trình tự axit amin của các calcitonin tự nhiên khác nhau và UGP302 từ WO2013/067357 là như sau:

Bảng 1

Tên	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
Calcitonin ¹ của cá hồi	C	S	N	L	S	T	C	V	L	G	K	L	S	Q	E	L	H	K	L	Q	T	Y	P	R	T	N	T	G	S	G	T	P-NH ₂
Calcitonin ² của lươn	C	S	N	L	S	T	C	V	L	G	K	L	S	Q	E	L	H	K	L	Q	T	Y	P	R	T	D	V	G	A	G	T	P-NH ₂
Calcitonin ³ của gà	C	A	S	L	S	T	C	V	L	G	K	L	S	Q	E	L	H	K	L	Q	T	Y	P	R	T	D	V	G	A	G	T	P-NH ₂
UGP302 ⁴	AcC	S	N	L	S	T	C	V	L	G	K	L	S	Q	E	L	H	K	L	Q	T	Y	P	R	T	D	V	G	A	N	A	P-NH ₂

¹SEQ ID NO:1

²SEQ ID NO:2

³SEQ ID NO:3

⁴SEQ ID NO:4

Peptit UGP302 của WO2013/067357 cũng được đề cập trong bản mô tả này với ký hiệu KBP-042.

Do đó, vẫn có nhu cầu phát triển các chất tương tự calcitonin vẫn duy trì được các tính chất được cải thiện khác, hoặc ít nhất có trình tự nhân tạo bổ sung có thể cải thiện được các tính chất của calcitonin có trong tự nhiên, đặc biệt là liên quan đến chất chủ vận thụ thể amylin và calcitonin, đồng thời loại trừ được chất chủ vận thụ thể CGRP, và nhờ đó đảm bảo được hiệu quả *in vivo* tối ưu ở tỷ lệ an toàn.

Trình tự peptit thích hợp bao gồm:

Bảng 2

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
SEQ ID NO:53	C	A	S	L	S	T	C	X ^a	L	G	X ^b	L	S	Q	X ^c	L	H	X ^d	L	Q	X ^e	X ^f	P	X ^g	T	D	V	G	A	N	A	X ^h
SEQ ID NO:8	C	S	N	L	S	T	C	M	L	G	R	L	S	Q	X ^c	L	H	R	L	Q	X ^e	X ^f	P	K	T	D	V	G	A	N	A	X ^h

trong đó X^a độc lập là V hoặc M; X^b là K hoặc R; X^c là D hoặc E; X^d là K hoặc R; X^e là T hoặc S; X^f là F hoặc Y; X^g là K hoặc R; và X^h là P hoặc Y, P được ưu tiên.

Các trình tự đáng quan tâm khác được thể hiện trong bảng sau:

Bảng 2a

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
SEQ ID NO:5	C	A	S	L	S	T	C	V	L	G	R	L	S	Q	X ^c	L	H	R	L	Q	T	X ^e	P	R	T	D	V	G	A	N	A	P
SEQ ID NO:6	C	A	S	L	S	T	C	M	L	G	K	L	T	Q	X ^c	L	H	K	L	Q	T	X ^e	P	R	T	D	V	G	A	N	A	P
SEQ ID NO:7 (KBP-056/057)	C	A	S	L	S	T	C	V	L	G	K	L	S	Q	X ^c	L	H	K	L	Q	T	X ^e	P	K	T	D	V	G	A	N	A	P
SEQ ID NO:8 (KBP-088/089)	C	S	N	L	S	T	C	M	L	G	R	L	S	Q	X ^c	L	H	R	L	Q	T	X ^e	P	K	T	D	V	G	A	N	A	P

SEQ ID NO:54	C	A	S	L	S	T	C	M	L	G	R	L	S	Q	X ^c	L	H	R	L	Q	T	X ^e	P	K	T	D	V	G	A	N	A	P
SEQ ID NO:55	C	A	S	L	S	T	C	M	L	G	K	L	T	Q	X ^c	L	H	K	L	Q	T	X ^e	P	K	T	D	V	G	A	N	A	P
SEQ ID NO:56	C	A	S	L	S	T	C	V	L	G	K	L	S	Q	X ^c	L	H	K	L	Q	T	X ^e	P	R	T	D	V	G	A	N	A	P
SEQ ID NO:57	C	S	N	L	S	T	C	V	L	G	R	L	S	Q	X ^c	L	H	R	L	Q	T	X ^e	P	K	T	D	V	G	A	N	A	P
SEQ ID NO:58 (KBP-017)	C	A	S	L	S	T	C	V	L	G	K	L	S	Q	X ^c	L	H	K	L	Q	S	X ^e	P	K	T	D	V	G	A	N	A	P
SEQ ID NO:59 (KBP-018)	C	A	S	L	S	T	C	V	L	G	K	L	S	Q	X ^c	L	H	K	L	Q	T	X ^e	P	K	T	D	V	G	A	N	A	P

trong đó X^c là D hoặc E và X^e độc lập là F hoặc Y và một trình tự này có thể được carboxyl hóa ở đầu tận cùng N của nó hoặc theo cách khác được cải biến để khử điện tích dương của axit amin thứ nhất và độc lập trong số chúng có thể được amit hóa ở đầu tận cùng C của nó, và trong mỗi trình tự này, các gốc xystein ở vị trí 1 và 7 có thể cùng được thế bằng axit α -aminosuberic (Asu).

Bảng 2b

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
SEQ ID NO:28 (KBP- 011)	C	A	S	L	S	T	C	V	L	G	R	L	S	Q	E	L	H	R	L	Q	T	F	P	R	T	D	V	G	A	N	A	P
SEQ ID NO:29	C	A	S	L	S	T	C	M	L	G	K	L	T	Q	E	L	H	K	L	Q	T	F	P	R	T	D	V	G	A	N	A	P
SEQ ID NO:30 (KBP- 018)	C	A	S	L	S	T	C	V	L	G	K	L	S	Q	E	L	H	K	L	Q	T	F	P	K	T	D	V	G	A	N	A	P
SEQ ID NO:31 (KBP- 088)	C	S	N	L	S	T	C	M	L	G	R	L	S	Q	E	L	H	R	L	Q	T	F	P	K	T	D	V	G	A	N	A	P
SEQ ID NO:32	C	A	S	L	S	T	C	V	L	G	R	L	S	Q	E	L	H	R	L	Q	T	Y	P	R	T	D	V	G	A	N	A	P
SEQ ID NO:33	C	A	S	L	S	T	C	M	L	G	K	L	T	Q	E	L	H	K	L	Q	T	Y	P	R	T	D	V	G	A	N	A	P
SEQ ID NO:34	C	A	S	L	S	T	C	V	L	G	K	L	S	Q	E	L	H	K	L	Q	T	Y	P	K	T	D	V	G	A	N	A	P

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
SEQ ID NO:35 (KBP- 021)	C	S	N	L	S	T	C	M	L	G	R	L	S	Q	E	L	H	R	L	Q	T	Y	P	K	T	D	V	G	A	N	A	P
SEQ ID NO:36	C	A	S	L	S	T	C	V	L	G	R	L	S	Q	D	L	H	R	L	Q	T	F	P	R	T	D	V	G	A	N	A	P
SEQ ID NO:37	C	A	S	L	S	T	C	M	L	G	K	L	T	Q	D	L	H	K	L	Q	T	F	P	R	T	D	V	G	A	N	A	P
SEQ ID NO:38 (KBP- 056)	C	A	S	L	S	T	C	V	L	G	K	L	S	Q	D	L	H	K	L	Q	T	F	P	K	T	D	V	G	A	N	A	P
SEQ ID NO:39	C	S	N	L	S	T	C	M	L	G	R	L	S	Q	D	L	H	R	L	Q	T	F	P	K	T	D	V	G	A	N	A	P
SEQ ID NO:40	C	A	S	L	S	T	C	V	L	G	R	L	S	Q	D	L	H	R	L	Q	T	Y	P	R	T	D	V	G	A	N	A	P
SEQ ID NO:41	C	A	S	L	S	T	C	M	L	G	K	L	T	Q	D	L	H	K	L	Q	T	Y	P	R	T	D	V	G	A	N	A	P
SEQ ID NO:42 (KBP-	C	A	S	L	S	T	C	V	L	G	K	L	S	Q	D	L	H	K	L	Q	T	Y	P	K	T	D	V	G	A	N	A	P

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
057)																																
089 SEQ ID NO:43	C	S	N	L	S	T	C	M	L	G	R	L	S	Q	D	L	H	R	L	Q	T	Y	P	K	T	D	V	G	A	N	A	P
SEQ ID NO:60	C	A	S	L	S	T	C	V	L	G	R	L	S	Q	E	L	H	R	L	Q	S	F	P	R	T	D	V	G	A	N	A	P
SEQ ID NO:61	C	A	S	L	S	T	C	M	L	G	K	L	T	Q	E	L	H	K	L	Q	S	F	P	R	T	D	V	G	A	N	A	P
SEQ ID NO:62	C	A	S	L	S	T	C	V	L	G	K	L	S	Q	E	L	H	K	L	Q	S	F	P	K	T	D	V	G	A	N	A	P
SEQ ID NO:63	C	S	N	L	S	T	C	M	L	G	R	L	S	Q	E	L	H	R	L	Q	S	F	P	K	T	D	V	G	A	N	A	P
SEQ ID NO:64	C	A	S	L	S	T	C	V	L	G	R	L	S	Q	E	L	H	R	L	Q	S	Y	P	R	T	D	V	G	A	N	A	P
SEQ ID NO:65	C	A	S	L	S	T	C	M	L	G	K	L	T	Q	E	L	H	K	L	Q	S	Y	P	R	T	D	V	G	A	N	A	P
SEQ ID NO:66	C	A	S	L	S	T	C	V	L	G	K	L	S	Q	E	L	H	K	L	Q	S	Y	P	K	T	D	V	G	A	N	A	P
SEQ ID	C	S	N	L	S	T	C	M	L	G	R	L	S	Q	E	L	H	R	L	Q	S	Y	P	K	T	D	V	G	A	N	A	P

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
NO:67																																
SEQ ID NO:68	C	A	S	L	S	T	C	V	L	G	R	L	S	Q	D	L	H	R	L	Q	S	F	P	R	T	D	V	G	A	N	A	P
SEQ ID NO:69	C	A	S	L	S	T	C	M	L	G	K	L	T	Q	D	L	H	K	L	Q	S	F	P	R	T	D	V	G	A	N	A	P
SEQ ID NO:70	C	A	S	L	S	T	C	V	L	G	K	L	S	Q	D	L	H	K	L	Q	S	F	P	K	T	D	V	G	A	N	A	P
SEQ ID NO:71	C	S	N	L	S	T	C	M	L	G	R	L	S	Q	D	L	H	R	L	Q	S	F	P	R	T	D	V	G	A	N	A	P
SEQ ID NO:72	C	A	S	L	S	T	C	V	L	G	R	L	S	Q	D	L	H	R	L	Q	S	Y	P	R	T	D	V	G	A	N	A	P
SEQ ID NO:73	C	A	S	L	S	T	C	M	L	G	K	L	T	Q	D	L	H	K	L	Q	S	Y	P	R	T	D	V	G	A	N	A	P
SEQ ID NO:74 (KBP-017)	C	A	S	L	S	T	C	V	L	G	K	L	S	Q	D	L	H	K	L	Q	S	Y	P	K	T	D	V	G	A	N	A	P
SEQ ID NO:75	C	S	N	L	S	T	C	M	L	G	R	L	S	Q	D	L	H	R	L	Q	S	Y	P	K	T	D	V	G	A	N	A	P
SEQ	C	S	N	L	S	T	C	V	L	G	K	L	S	Q	E	L	H	K	L	Q	T	Y	P	R	T	D	V	G	A	N	A	P

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
ID																																
NO:76																																
SEQ																																
ID																																
NO:77																																
(KBP-019)																																
	C	A	S	L	S	T	C	M	L	G	R	L	S	Q	D	L	H	R	L	Q	T	Y	P	K	T	D	V	G	A	N	A	P

Bảng 3

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
SEQ ID NO:9 (KBP- 011)	AcC	A	S	L	S	T	C	V	L	G	R	L	S	Q	E	L	H	R	L	Q	T	F	P	R	T	D	V	G	A	N	A	P- NH ₂
SEQ ID NO:78 (KBP- 017)	AcC	A	S	L	S	T	C	V	L	G	K	L	S	Q	D	L	H	K	L	Q	S	Y	P	K	T	D	V	G	A	N	A	P- NH ₂
(SEQ ID NO:79 (KBP- 018)	AcC	A	S	L	S	T	C	V	L	G	K	L	S	Q	E	L	H	K	L	Q	T	F	P	K	T	D	V	G	A	N	A	P- NH ₂
SEQ ID NO:10 (KBP- 023)	AcC	A	S	L	S	T	C	M	L	G	K	L	T	Q	E	L	H	K	L	Q	T	F	P	R	T	D	V	G	A	N	A	P- NH ₂
SEQ ID NO:11	AcC	A	S	L	S	T	C	V	L	G	K	L	S	Q	D	L	H	K	L	Q	T	F	P	K	T	D	V	G	A	N	A	P- NH ₂

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
(KBP-056)																																
SEQ ID NO:80 (KBP-057)	AcC	A	S	L	S	T	C	V	L	G	K	L	S	Q	D	L	H	K	L	Q	T	Y	P	K	T	D	V	G	A	N	A	P-NH ₂
SEQ ID NO:12 (KBP-088)	AcC	S	N	L	S	T	C	M	L	G	R	L	S	Q	E	L	H	R	L	Q	T	F	P	K	T	D	V	G	A	N	A	P-NH ₂
SEQ ID NO:44 (KBP-089)	AcC	S	N	L	S	T	C	M	L	G	R	L	S	Q	D	L	H	R	L	Q	T	Y	P	K	T	D	V	G	A	N	A	P-NH ₂

Bảng 4a

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
SEQ ID NO:4 5	C	A	S	L	S	T	C	V	L	G	R	L	S	Q	X ^c	L	H	R	L	Q	T	X ^c	P	K	T	D	V	G	A	N	A	Y
SEQ ID NO:4 6	C	A	S	L	S	T	C	M	L	G	K	L	T	Q	X ^c	L	H	K	L	Q	T	X ^c	P	K	T	D	V	G	A	N	A	Y
SEQ ID NO:4 7	C	A	S	L	S	T	C	V	L	G	K	L	S	Q	X ^c	L	H	K	L	Q	T	X ^c	P	K	T	D	V	G	A	N	A	Y
SEQ ID NO:4 8	C	S	N	L	S	T	C	M	L	G	R	L	S	Q	X ^c	L	H	R	L	Q	T	X ^c	P	K	T	D	V	G	A	N	A	Y
SEQ ID NO:4 9	C	A	S	L	S	T	C	V	L	G	R	L	S	Q	X ^c	L	H	R	L	Q	T	X ^c	P	R	T	D	V	G	A	N	A	Y
SEQ ID NO:5 0	C	A	S	L	S	T	C	M	L	G	K	L	T	Q	X ^c	L	H	K	L	Q	T	X ^c	P	R	T	D	V	G	A	N	A	Y

SEQ ID NO:5 1	C	A	S	L	S	T	C	V	L	G	R	L	S	Q	X ^e	L	H	R	L	Q	T	X ^e	P	K	T	D	V	G	A	N	A	P
SEQ ID NO:5 2	C	A	S	L	S	T	C	M	L	G	K	L	T	Q	X ^e	L	H	K	L	Q	T	X ^e	P	K	T	D	V	G	A	N	A	P

trong đó X^e là D hoặc E và X^e độc lập là F hoặc Y.

Bảng 4b

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
SEQ ID NO:20	C	A	S	L	S	T	C	V	L	G	R	L	S	Q	E	L	H	R	L	Q	T	F	P	K	T	D	V	G	A	N	A	Y
SEQ ID NO:21	C	A	S	L	S	T	C	M	L	G	K	L	T	Q	E	L	H	K	L	Q	T	F	P	K	T	D	V	G	A	N	A	Y
SEQ ID NO:22	C	A	S	L	S	T	C	V	L	G	K	L	S	Q	D	L	H	K	L	Q	T	F	P	K	T	D	V	G	A	N	A	Y
SEQ ID NO:23	C	S	N	L	S	T	C	M	L	G	R	L	S	Q	E	L	H	R	L	Q	T	F	P	K	T	D	V	G	A	N	A	Y
SEQ ID NO:24	C	A	S	L	S	T	C	V	L	G	R	L	S	Q	E	L	H	R	L	Q	T	F	P	R	T	D	V	G	A	N	A	Y

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
SEQ ID NO:25	C	A	S	L	S	T	C	M	L	G	K	L	T	Q	E	L	H	K	L	Q	T	F	P	R	T	D	V	G	A	N	A	Y
SEQ ID NO:26	C	A	S	L	S	T	C	V	L	G	R	L	S	Q	E	L	H	R	L	Q	T	F	P	K	T	D	V	G	A	N	A	P
SEQ ID NO:27	C	A	S	L	S	T	C	M	L	G	K	L	T	Q	E	L	H	K	L	Q	T	F	P	K	T	D	V	G	A	N	A	P

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Do đó, sáng chế đề xuất peptit có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 43, tùy ý được cacboxyl hóa ở đầu tận cùng N của nó hoặc được cải biến theo cách khác để làm giảm điện tích dương của axit amin thứ nhất và độc lập với trình tự đó tùy ý được amit hóa ở đầu tận cùng C của nó, và trong mỗi vị trí đó các gốc xystein ở vị trí 1 và 7 được tùy ý thay thế bằng axit α -aminosuberic (Asu).

Sáng chế cũng đề xuất peptit có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 44.

Sáng chế còn đề xuất peptit có trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin nêu trong Bảng 2a hoặc Bảng 4a, mỗi trình tự này có thể được carboxyl hóa ở đầu tận cùng N của nó hoặc theo cách khác được cải biến để khử điện tích dương của axit amin thứ nhất và ngoài ra có thể được amit hóa ở đầu tận cùng C của nó, và trong mỗi trình tự này, các gốc xystein ở các vị trí 1 và 7 có thể cùng được thế bằng axit α -aminosuberic (Asu).

Sáng chế cũng đề xuất peptit có trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin nêu trong Bảng 3.

Sáng chế cũng đề xuất peptit có trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin nêu trong Bảng 2b hoặc Bảng 4b, mỗi trình tự này có thể được carboxyl hóa ở đầu tận cùng N của nó hoặc theo cách khác được cải biến để khử điện tích dương của axit amin thứ nhất và ngoài ra có thể được amit hóa ở đầu tận cùng C của nó, và trong mỗi trình tự này, các gốc xystein ở các vị trí 1 và 7 có thể cùng được thế bằng axit α -aminosuberic (Asu).

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Các kết quả được thể hiện trong các hình vẽ kèm theo, là như sau:

Fig. 1: Dữ liệu thô thể hiện hoạt tính của KBP trong bảng 3 trên đầu tận cùng C TR đến đầu tận cùng C hứa sCT và UGP302/KBP-042 tại các thời điểm khác nhau.

Fig. 2: Sự hoạt hóa CTR là hàm theo thời gian, với nồng độ cố định của các phối tử khác nhau.

Fig. 3: Sự hoạt hóa đáp ứng liều của AMY-R đối với các phối tử khác nhau khi được bổ sung vào dòng tế bào biểu hiện AMY-R.

Fig. 4: Khả năng gắn kết cạnh tranh của các hợp chất thử nghiệm trên các tế bào biểu hiện CTR (ô bên trái) và AMY-R (ô bên phải), với các hình pIC50 trong bảng này.

Fig. 5: Sự hoạt hóa đáp ứng liều của CGRP-R đối với các phối tử khác nhau.

Fig. 6: Tác dụng của liều đơn KBP-056 đối với sự hấp thu thức ăn, cân nặng và PPG.

Fig. 7: Tác dụng của hợp chất được điều trị ba tuần bằng UGP302/KBP-042, KBP-023, KBP-056 và KBP.088 trên FPG và HbA1c.

Fig. 8: Tác dụng của các hợp chất KBP đối với sự tái hấp thu collagen typ I, ô trên cùng, và đối với sự tái hấp thu collagen typ II, ô dưới cùng.

Fig. 9 thể hiện các kết quả thu được trong Ví dụ 7 về việc so sánh giữa tác dụng của các hợp chất KBP-088 và KBP-089 đối với sự hấp thu thức ăn ở chuột béo phì.

Fig. 10 thể hiện việc xác định khả năng hấp thu thức ăn trong thời gian ngắn thu được trong Ví dụ 7 khi so sánh giữa peptit KBP-089 theo sáng chế và peptit KBP-042 đã biết.

Fig. 11 thể hiện việc xác định khả năng hấp thu thức ăn trong thời gian dài (ô ở trên) và mức thay đổi về cân nặng (ô phía dưới) đối với các peptit này.

Các Fig. 12A-12F thể hiện tiếp kết quả thu được trong Ví dụ 1 đối với việc cảm ứng cAMP bằng cách tác động lên thụ thể calcitonin (Các Fig. 12A, B và E) và lên thụ thể amylin (Các Fig. D và E) và thể hiện tiếp kết quả thu được trong Ví dụ 7 đối với việc xác định khả năng hấp thu thức ăn (Fig. 12F).

Mô tả chi tiết sáng chế

Đã có nghiên cứu rằng hoạt tính của nhiều chất tương tự calcitonin tự nhiên có 32 axit amin được kiểm tra một cách cụ thể xem liệu các axit amin này là cần thiết để hoạt hóa các đáp ứng do thụ thể gây ra hay không, các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng axit amin được đánh số: 11, 15, 18, 22, 24, 30 và 31 là nghiêm ngặt hơn về loại axit amin, với trị số được ưu tiên đối với axit amin 11 là K hoặc R, axit amin 15 là D hoặc E, axit amin 18 là K hoặc R, axit amin 22 là Y hoặc F, axit amin 24 tốt hơn là K mặc dù R hoạt động, axit amin 30 là N và axit amin 31 là A.

Peptit có thể được bào chế để dùng làm dược phẩm và có thể được bào chế để dùng qua đường tiêu hóa hoặc ngoài đường tiêu hóa. Tốt hơn, nếu dược phẩm này được dùng để tiêm, tốt hơn là để tiêm dưới da, tuy nhiên peptit này có thể được bào chế với chất mang để dùng qua đường miệng, và tùy ý trong đó chất mang này làm tăng độ sinh khả dụng qua đường miệng của peptit. Các chất mang thích hợp bao gồm các chất chứa 5-CNAC, SNAD, hoặc SNAC.

Tùy ý, peptit này được bào chế thành dược phẩm để dùng qua đường miệng chứa các hạt axit xitric bao, và trong đó các hạt axit xitric bao này làm tăng độ sinh khả dụng qua đường miệng của peptit này.

Sáng chế đề xuất peptit để dùng làm thuốc. Peptit này có thể được dùng để điều trị bệnh đái tháo đường (Typ I và/hoặc Typ II), chứng tăng cân, chứng tiêu thụ thức ăn quá mức, hội chứng trao đổi chất, bệnh viêm đa khớp dạng thấp, bệnh gan nhiễm mỡ không phải do rượu gây ra, chứng loãng xương, hoặc bệnh viêm xương khớp, chứng điều chỉnh kém nồng độ glucoza trong máu, đáp ứng kém với các thử nghiệm dung nạp glucoza, hoặc khả năng điều chỉnh mức hấp thu thức ăn kém. Cụ thể, các peptit này có thể được sử dụng để giảm nồng độ glucoza trong máu cao quá mức không mong muốn hoặc giảm HbA1c

cao không mong muốn hoặc làm giảm đáp ứng cao không mong muốn với thử nghiệm dung nạp glucoza.

Phía có đầu tận cùng N của chất có tác dụng giống calcitonin nêu trên có thể được cải biến để khử điện tích dương của axit amin thứ nhất. Ví dụ, nhóm axetyl, propionyl, hoặc succinyl có thể được thế trên xystein-1. Trong bảng 3, “Ac” được dùng để chỉ việc cải biến nhóm axetyl. Mỗi ‘Ac’ trong bảng 3 có thể được thế bằng “Pr” được dùng để chỉ việc cải biến nhóm propionyl, hoặc bằng “Succ” được dùng để chỉ việc cải biến nhóm succinyl. “NH₂” được dùng để chỉ nhóm axit carboxylic có đầu tận cùng C được amit hóa. Các cách khác để khử điện tích dương bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, PEG hóa trên cơ sở polyetylen glycol, hoặc bổ sung axit amin khác như axit glutamic hoặc axit aspartic ở đầu tận cùng N. Theo cách khác, các axit amin khác có thể được bổ sung vào đầu tận cùng N của peptit nêu trên bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, lysin, glyxin, formylglyxin, leuxin, alanin, axetyl alanin, và dialanyl. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này cần phải hiểu rằng peptit có nhiều gốc xystein thường tạo cầu disulfua giữa hai gốc xystein này. Tất cả các peptit như được nêu trong bản mô tả này được xác định do tùy ý bao gồm một hoặc nhiều cầu disulphua này, đặc biệt là ở các vị trí Xys1-Xys7. Để mô phỏng quá trình này, các xystein ở các vị trí 1 và 7 có thể được thế đồng thời bằng liên kết axit α -aminosuberic. Tất cả các peptit nêu trong bản mô tả này có số KBP-0## có cầu disulphua này.

Trong khi chất có tác dụng giống calcitonin theo sáng chế có thể tồn tại ở dạng axit tự do, thì tốt hơn nếu axit amin có đầu tận cùng C được amit hóa. Người nộp đơn mong muốn rằng quá trình amit hóa như vậy có thể góp phần vào hiệu quả và/hoặc độ sinh khả dụng của peptit. Kỹ thuật được ưu tiên để sản xuất các dạng amit hóa của chất có tác dụng giống calcitonin theo sáng chế là cho phản ứng với các tiền chất (có glyxin nằm ở nhóm amino có đầu tận cùng C của sản phẩm được amit hóa mong muốn) với sự có mặt của monooxygenaza được amit hóa ở vị trí alpha của peptidylglyxin theo kỹ thuật đã biết, trong đó các tiền chất này được chuyển hóa thành các sản phẩm amit hóa trong các phản ứng được mô tả, ví dụ, trong US4708934 và EP0308067 và EP0382403.

Quá trình sản xuất tái tổ hợp được ưu tiên đối với cả tiền chất và enzym xúc tác quá trình chuyển hóa tiền chất thành calcitonin của cá hồi. Quá trình sản xuất tái tổ hợp này được bàn luận trong Biotechnology, Vol. 11 (1993) pp. 64-70, by Ray MV, Van Duyne P, Bertelsen AH, Jackson-Matthews DE, Sturmer AM, Merkler DJ, Consalvo AP, Young SD, Gilligan JP, Shields PP. mô tả tiếp quá trình chuyển hoá tiền chất thành sản phẩm đã được amit hóa. Đã được báo cáo rằng sản phẩm tái tổ hợp là giống với calcitonin tự nhiên của cá

hồi, và giống với calcitonin của cá hồi đã được sản xuất bằng cách sử dụng quy trình tổng hợp peptit tổng hợp pha rắn và dung dịch.

Quá trình sản xuất các sản phẩm amit hóa cũng có thể được thực hiện bằng cách sử dụng quy trình và enzym amit hóa được nêu bởi Consalvo và các đồng tác giả trong US7445911; Miller et al, US2006/0292672; Ray et al, 2002, Protein Expression and Purification, 26:249-259; và Mehta, 2004, Biopharm. International, July, pp. 44-46.

Quá trình sản xuất các peptit amit hóa được ưu tiên có thể được tiến hành, ví dụ, bằng cách sản xuất tiền chất kéo dài glyxin ở *E. coli* làm protein dung hợp hòa tan với glutathion-S-transferaza, hoặc bằng cách biểu hiện trực tiếp tiền chất theo kỹ thuật được mô tả trong US6103495. Tiền chất kéo dài glyxin này có cấu trúc phân tử giống với sản phẩm được amit hóa mong muốn ngoại trừ ở đầu tận cùng C (trong đó sản phẩm kết thúc ở --X--NH₂, đồng thời tiền chất kết thúc ở --X-gly, X là gốc axit amin có đầu tận cùng C của sản phẩm). Enzym amit hóa ở vị trí alpha được mô tả trong các Công bố đơn yêu cầu cấp patent nêu trên xúc tác quá trình chuyển hoá tiền chất thành sản phẩm. Tốt hơn, nếu enzym này được sản xuất tái tổ hợp, ví dụ, trong các tế bào buồng trứng chuột đồng Trung Quốc (CHO)), như được mô tả trong ấn phẩm the Biotechnology and Biopharm. nêu trên.

Dạng axit tự do của hoạt chất peptit theo sáng chế có thể được sản xuất theo cách tương tự, ngoại trừ không bao gồm glyxin có đầu tận cùng C nằm trên "tiền chất", mà tiền chất là sản phẩm peptit cuối cùng thay thế và không cần có bước amit hóa.

Ngoại trừ khi được quy định theo cách khác, liều được ưu tiên của các chất có tác dụng giống calcitonin theo sáng chế là giống nhau nhằm mục đích điều trị lần phòng ngừa. Liều mong muốn được bàn luận chi tiết hơn, như nêu dưới đây, và khác nhau tùy thuộc vào đường dùng.

Ngoại trừ được quy định theo cách khác hoặc hiển nhiên từ bản mô tả này, liều lượng trong bản mô tả này dùng để chỉ khối lượng của hoạt chất không bị ảnh hưởng bởi hoặc không tính tới các tá dược, các chất pha loãng, chất mang được dùng hoặc các thành phần khác, mặc dù các thành phần khác này được bao gồm theo cách mong muốn. Dạng liều bất kỳ (viên nang, viên nén, dạng tiêm hoặc dạng bất kỳ) thường được sử dụng trong công nghiệp dược phẩm để phân phối hoạt chất peptit là thích hợp để dùng trong bản mô tả này, và các thuật ngữ "tá dược", "chất pha loãng", hoặc "chất mang" bao gồm các thành phần không có hoạt tính như vậy thường được bao gồm, cùng với các thành phần có hoạt tính ở dạng liều dùng trong công nghiệp. Dạng liều dùng qua đường miệng được ưu tiên được bàn luận chi tiết hơn, như được nêu dưới đây, nhưng không được coi là đường dùng hoạt chất loại trừ theo sáng chế.

Chất có tác dụng giống calcitonin theo sáng chế có thể được dùng cho bệnh nhân để điều trị nhiều bệnh hoặc rối loạn. Trong bản mô tả này, thuật ngữ "bệnh nhân" có nghĩa là sinh vật bất kỳ thuộc giới động vật. Theo một phương án, thuật ngữ "bệnh nhân" dùng để chỉ động vật có xương sống, tốt hơn nữa nếu động vật có vú bao gồm người.

Do đó, sáng chế mô tả việc sử dụng peptit trong phương pháp điều trị bệnh đái tháo đường typ I, bệnh đái tháo đường Typ II hoặc hội chứng trao đổi chất, bệnh béo phì, hoặc giảm sự ngon miệng, hoặc để làm giảm nhẹ tính kháng insulin, hoặc để làm giảm nồng độ glucoza trong huyết thanh tăng quá nhanh không mong muốn, hoặc để làm giảm nồng độ glucoza tối đa trong huyết thanh không mong muốn, hoặc để làm giảm nồng độ insulin tối đa trong huyết thanh không mong muốn, hoặc để làm giảm đáp ứng mạnh không mong muốn với thử nghiệm dung nạp glucoza, hoặc để điều trị chứng loãng xương, hoặc để điều trị bệnh viêm xương khớp.

Có nhiều cách đo khoảng cân nặng thông thường đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật liên quan tới các yếu tố như giới tính, độ tuổi và chiều cao. Bệnh nhân có nhu cầu điều trị hoặc ngăn ngừa nêu trên bao gồm các bệnh nhân mà thể trọng vượt quá tiêu chuẩn được chấp nhận hoặc người, do các yếu tố di truyền, môi trường hoặc yếu tố nguy cơ được chấp nhận khác, có nguy cơ cao hơn so với nhóm bệnh nhân bị tăng cân hoặc béo phì. Theo sáng chế, dự định rằng chất có tác dụng giống calcitonin có thể được sử dụng để điều trị bệnh đái tháo đường trong đó việc kiểm soát cân nặng là một khía cạnh trong việc điều trị.

Phương pháp này có thể bao gồm bước cho bệnh nhân có nhu cầu cần điều trị tình trạng bệnh dùng qua đường tiêu hóa lượng hữu hiệu được dụng của peptit bất kỳ trong số các peptit đã nêu trong bản mô tả này.

Theo cách khác, phương pháp này bao gồm bước cho bệnh nhân có nhu cầu cần điều trị tình trạng bệnh dùng ngoài đường tiêu hóa lượng hữu hiệu được dụng của peptit bất kỳ trong số các peptit được nêu trong bản mô tả này. Đối với ngoài đường tiêu hóa (bao gồm tiêm trong màng bụng (IP), dưới da, tĩnh mạch, trong da hoặc tiêm trong cơ), các dung dịch chứa peptit theo sáng chế trong vùng hoặc dầu đậu phộng hoặc trong propylen glycol trong nước có thể được dùng, chẳng hạn. Các dung dịch nước được đệm theo cách thích hợp (tốt hơn là độ pH lớn hơn 8) nếu cần và trước tiên chất pha loãng cần phải đẳng trương. Các dung dịch nước là thích hợp để tiêm tĩnh mạch. Các dung dịch dầu là thích hợp để tiêm trong khớp, trong cơ và tiêm dưới da. Việc điều chế toàn bộ các dung dịch này trong các điều kiện vô trùng được thực hiện một cách dễ dàng bởi các kỹ thuật tiêu chuẩn trong dược phẩm đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Để dùng ngoài đường tiêu hóa, ví dụ về các chế phẩm thích hợp bao gồm các dung dịch, tốt hơn là dung dịch dầu hoặc nước cũng như huyền phù, nhũ tương, hoặc vật cây

ghép, bao gồm các thuốc đạn. Peptit có thể được bào chế ở dạng vô trùng ở dạng đa liều hoặc đơn liều như được phân tán trong chất mang lỏng như nước muối sinh lý vô trùng hoặc dung dịch muối dextroza 5% thường được dùng để tiêm.

Phương pháp này có thể bao gồm bước xác định sơ bộ xem bệnh nhân có bị tình trạng bệnh hay không, và/hoặc bước xác định tiếp theo xem việc điều trị này có tác dụng thuyên giảm tình trạng bệnh ở bệnh nhân hay không, ví dụ, trong mỗi trường hợp, tiến hành thử nghiệm dung nạp glucoza qua đường miệng hoặc nồng độ đường còn lại trong máu.

Để kiểm soát cải thiện cân nặng của bệnh nhân, để làm giảm cân nặng hoặc hạn chế sự tăng cân, tốt hơn nếu hoạt chất được dùng một lần một ngày hoặc nhiều lần một ngày như ít nhất hai lần một ngày, ví dụ, từ 2-4 lần một ngày. Chế phẩm chứa hoạt chất có thể chứa liều đơn vị thích hợp đối với liệu trình dùng như vậy. Các hoạt chất có thể được dùng nhằm mục đích kiểm soát cân nặng của bệnh nhân trong quá trình điều trị bệnh đái tháo đường hoặc hội chứng trao đổi chất.

Chế phẩm dùng qua đường miệng được tiêu hóa bằng cách nuốt để giải phóng tiếp trong ruột nằm bên dưới dạ dày, và do đó phân phối qua tĩnh mạch cửa tới gan, đối lập với chế phẩm được giữ trong miệng để cho phép truyền vào dòng máu thông qua đường dưới lưỡi hoặc miệng.

Dạng liều lượng thích hợp để dùng trong sáng chế bao gồm viên nén, viên nén nhỏ, viên nang, hạt, viên tròn, bột, chế phẩm rắn sủi bọt và rắn nhai được. Các chế phẩm như vậy có thể bao gồm gelatin tốt hơn là gelatin được thủy phân hoặc gelatin có phân tử lượng nhỏ. Các chế phẩm như vậy có thể thu được bằng cách sấy ở nhiệt độ thấp dung dịch trong nước đồng nhất chứa calcitonin hoặc mảnh hoặc thể tiếp hợp của nó và gelatin được thủy phân hoặc gelatin có phân tử lượng nhỏ và xử lý tiếp nguyên liệu rắn thu được thành được phẩm dùng qua đường miệng, và trong đó gelatin có thể có phân tử lượng trung bình nằm trong khoảng từ 1000 đến 15000 Dalton. Các dược phẩm như vậy có thể bao gồm hợp chất mang bảo vệ như 5-CNAC hoặc các hợp chất khác như được nêu trong bản mô tả này.

Trong khi chế phẩm dùng qua đường miệng như viên nén và viên nang được ưu tiên, thì các thành phần để dùng trong sáng chế có thể ở dạng sirô, cồn ngọt hoặc các dạng tương tự và các thuốc đạn hoặc dạng tương tự. Nói chung, việc phân phối qua đường miệng là đường phân phối lựa chọn nếu thuận tiện, tương đối đơn giản và thường không gây đau đớn, làm tăng mức độ phục tùng của bệnh nhân đối với các đường phân phối khác. Tuy nhiên, các hàng rào sinh học, hóa học và vật lý như sự thay đổi độ pH trong đường dạ dày-ruột, enzym có khả năng tiêu hóa mạnh, và hoạt chất không thấm qua được màng dạ dày-ruột, khiến cho việc phân phối qua đường miệng của calcitonin tương tự peptit sẽ gây

khó khăn cho động vật có vú, ví dụ, việc phân phối qua đường miệng của calcitonin, là hormon polypeptit mạch dài được tiết bởi các tế bào cận nang của tuyến giáp ở động vật có vú và bởi tuyến mang cuối của chim và cá, ban đầu gặp khó khăn là do, ít nhất một phần, calcitonin không đủ ổn định trong đường dạ dày-ruột cũng như calcitonin không có khả năng vận chuyển một cách dễ dàng qua thành ruột vào dòng máu.

Tuy nhiên, chế phẩm dùng qua đường miệng thích hợp được mô tả dưới đây.

Điều trị cho bệnh nhân

Chất có tác dụng giống calcitonin theo sáng chế có thể được dùng với liều thích hợp để duy trì nồng độ của chất có tác dụng giống này trong huyết thanh ở các bệnh nhân nằm trong khoảng từ 5 picogam đến 500 nanogam trên một mililít, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 50 picogam đến 250 nanogam, ví dụ, nằm trong khoảng từ 1 đến 100 nanogam trên một mililít. Nồng độ trong huyết thanh có thể đo được bằng kỹ thuật thử nghiệm miễn dịch phóng xạ đã biết trong lĩnh vực này. Bác sĩ điều trị có thể kiểm tra đáp ứng của bệnh nhân, và sau đó có thể thay đổi liều lượng tới mức độ để tạo ra đáp ứng và chuyển hóa trên từng bệnh nhân. Quá trình giải phóng gần như đồng thời đạt được tốt nhất bằng cách cho sử dụng tất cả các hợp phần theo sáng chế ở dạng một viên tròn hoặc viên nang. Tuy nhiên, sáng chế cũng bao gồm, ví dụ, việc chia nhỏ lượng cần thiết của chất có tác dụng giống calcitonin trong số hai hoặc nhiều viên nén hoặc viên nang mà có thể được dùng cùng với nhau sao cho chúng cùng tạo ra lượng cần thiết của tất cả các thành phần. "Dược phẩm" như được sử dụng trong bản mô tả này bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở liều đủ thích hợp với việc dùng cụ thể cho bệnh nhân mà không cần xem xét tới một hoặc nhiều viên nén hoặc viên nang (hoặc dạng liều khác) được khuyến dùng ở mỗi lần dùng nhất định.

Chất có tác dụng giống calcitonin theo sáng chế có thể được bào chế để dùng qua đường miệng bằng cách sử dụng các phương pháp được dùng trong các sản phẩm Unigene Enteripep®. Các phương pháp này có thể bao gồm các phương pháp như được mô tả trong Patent Mỹ số 5,912,014, Patent Mỹ số 6,086,918, Patent Mỹ số 6,673,574, Patent Mỹ số 7,316,819, Patent Mỹ số 8,093,207, và Công bố đơn cấp patent Mỹ số 2009/0317462. Cụ thể, nó có thể bao gồm việc sử dụng thể tiếp hợp của hợp chất với chất chuyển vị màng như miền dẫn truyền protein chứa protein HIV TAT, việc bào chế đồng thời với một hoặc nhiều chất ức chế proteaza, và/hoặc chất làm giảm độ pH có thể được bao và/hoặc tá được bảo vệ bền với axit và/hoặc chất tăng cường hấp thu có thể là chất hoạt động bề mặt.

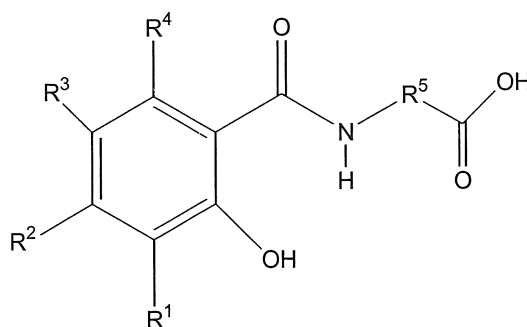
Theo một phương án, tốt hơn nếu chất có tác dụng giống calcitonin theo sáng chế được bào chế để dùng qua đường miệng theo cách đã biết trong Công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 2009/0317462. Một dạng liều dùng qua đường miệng được ưu tiên theo sáng chế được nêu trong Bảng 5 sau:

Bảng 5 – Thành phần của chế phẩm chứa liều dạng rắn

Hoạt chất hoặc tá dược	Chức năng
Chất có tác dụng giống calcitonin được chọn từ một trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO:1-8	Hoạt chất
Hạt axit xitric bao	Chất ức chế proteaza
Lauroylcarnitin	Chất tăng cường hấp thu
Polyme không ion	Chất bao phụ
Eudragit L30D-55	Chất bao tan trong ruột

Theo một phương án, chất có tác dụng giống calcitonin theo sáng chế có thể được bào chế để dùng qua đường tiêu hóa, nhất là đường miệng, được dùng bằng cách trộn với hợp chất mang thích hợp. Hợp chất mang thích hợp bao gồm các hợp chất được mô tả trong Patent Mỹ số 5,773,647 và Patent Mỹ số 5866536 và trong số chúng, axit 5-CNAC (N-(5-closalicyloyl)-8-aminocaprylic, thường ở dạng muối đinatri của nó) đặc biệt là hữu hiệu. Các chất mang hoặc chất phân phối được ưu tiên khác là SNAD (muối natri của axit 10-(2-hydroxybenzamido)decanoic) và SNAC (muối natri của axit N-(8-[2-hydroxybenzoyl]amino)caprylic). Theo một phương án, dược phẩm theo sáng chế chứa lượng dùng hữu hiệu của chất mang như 5-CNAC, tức là lượng đủ để dùng hợp chất nhằm thu được tác dụng mong muốn. Nói chung, chất mang như 5-CNAC có mặt với lượng nằm trong khoảng từ 2,5% đến 99,4% khối lượng, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 25% đến 50% khối lượng của toàn bộ chế phẩm.

Ngoài ra, WO 00/059863 mô tả muối đinatri có công thức I:



trong đó:

R^1 , R^2 , R^3 , và R^4 độc lập là hydro, -OH, -NR⁶R⁷, halogen, C₁-C₄ alkyl, hoặc C₁-C₄ alkoxy; R^5 là C₂-C₁₆ alkylen được thế hoặc không được thế, C₂-C₁₆ alkenylen được thế hoặc không được thế, C₁-C₁₂ alkyl(arylen) được thế hoặc không được thế, hoặc aryl(C₁-C₁₂ alkylen) được thế hoặc không được thế; và R^6 và R^7 độc lập là hydro, oxy, hoặc C₁-C₄ alkyl; và hydrat và các solvat của nó vì đặc biệt là hữu hiệu để dùng các hoạt chất qua đường miệng,

như calcitonin, ví dụ calcitonin của cá hồi, và các hợp chất này có thể được sử dụng trong sáng chế.

Các chế phẩm tan trong ruột được ưu tiên bằng cách sử dụng tùy ý 5-CNAC đã được siêu âm nói chung có thể được mô tả trong WO2005/014031.

Hợp chất có thể được bào chế để dùng qua đường miệng bằng cách sử dụng các phương pháp được dùng trong sản phẩm Capsitonin của Bone Medical Limited. Các hợp chất này có thể bao gồm các phương pháp được kết hợp trong chế phẩm Axxcess. Cụ thể hơn, hoạt chất có thể được bao nang trong viên nang tan trong ruột có khả năng đi qua được dạ dày. Hoạt chất này có thể chứa hoạt chất cùng với rượu thơm ưa nước tăng cường hấp thu, ví dụ như được mô tả trong WO02/028436. Theo cách đã biết, chất bao tan trong ruột có thể thấm qua được theo cách nhạy với pH, ví dụ, ở độ pH nằm trong khoảng từ 3 đến 7. WO2004/091584 cũng mô tả phương pháp bào chế thích hợp bằng cách sử dụng rượu thơm tăng cường hấp thu.

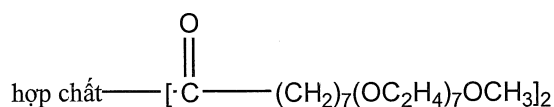
Hợp chất có thể được bào chế bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết trong các sản phẩm Oramed, có thể bao gồm chế phẩm chứa axit béo omega-3 như được mô tả trong WO2007/029238 hoặc như được mô tả trong US 5,102,666.

Nói chung, các muối được dùng (nhất là muối mono hoặc đi natri), các solvat (ví dụ, solvat rượu) và hydrat của các chất mang hoặc chất phân phối này có thể được sử dụng.

Việc dùng qua đường miệng được phẩm theo sáng chế có thể được tiến hành một cách đều đặn, ví dụ một hoặc nhiều lần hằng ngày hoặc hằng tuần; không liên tục, ví dụ đều đặn trong ngày hoặc tuần; hoặc theo chu kỳ, ví dụ đều đặn trong các ngày hoặc tuần sau khi dùng. Dạng liều của dược phẩm theo sáng chế có thể là dạng đã biết bất kỳ, ví dụ, dạng lỏng hoặc rắn. Dạng liều lỏng bao gồm nhũ tương dung dịch, huyền phù, sirô và cồn ngọt. Ngoài hoạt chất và chất mang như 5-CNAC, dược phẩm lỏng cũng có thể bao gồm các tá dược trợ thường được sử dụng trong lĩnh vực kỹ thuật này như, chất hoà tan, ví dụ, etanol; các dầu như dầu hạt bông, dầu thầu dầu và dầu hạt vừng; chất gây ẩm; chất tạo nhũ tương; chất tạo huyền phù; chất làm ngọt; hương liệu; và các dung môi như nước. Dạng liều rắn bao gồm viên nang, viên nang mềm dạng gel, viên nén, viên nén hình oval, bột, hạt hoặc dạng liều rắn khác để dùng qua đường miệng, tất cả các dạng này có thể được bào chế bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này. Các dược phẩm có thể còn chứa chất phụ gia với lượng thông thường được sử dụng bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, chất điều chỉnh độ pH, chất bảo quản, chất tạo hương, chất che giấu mùi vị, chất tạo mùi thơm, chất giữ ẩm, chất trương lực, chất tạo màu, chất hoạt động bề mặt, chất dẻo hoá, chất làm trơn như magie stearat, chất trợ chảy, chất trợ nén, chất hòa tan, tá dược, chất pha loãng như xenluloza dạng vi tinh thể, ví dụ, Avicel PH 102 được cung cấp bởi công ty FMC, hoặc

dạng kết hợp bất kỳ khác. Các chất phụ gia khác có thể bao gồm dung dịch đệm muối phosphat, axit xitric, glycol, và chất phân tán khác. Dược phẩm cũng có thể bao gồm một hoặc nhiều chất ức chế enzym, như actinonin hoặc epiactinonin và các dẫn xuất của chúng; aprotinin, chất ức chế Trasylol và Bowman-Birk. Ngoài ra, chất ức chế vận chuyển, tức là [rho]-glycoprotein như Ketoprofin, có thể có mặt trong dược phẩm theo sáng chế. Dược phẩm dạng rắn theo sáng chế có thể được bào chế bằng các phương pháp thông thường, ví dụ, bằng cách trộn hỗn hợp chứa hoạt chất, chất mang như 5-CNAC, và các thành phần bất kỳ khác, nhào trộn, và nạp vào viên nang hoặc, thay vì nạp vào viên nang, đổ khuôn tiếp đó là nén hoặc đổ khuôn nén để tạo ra viên nén. Ngoài ra, thể phân rã rắn có thể được tạo ra bởi các phương pháp đã biết tiếp đó là xử lý tiếp để tạo ra viên nén hoặc viên nang. Tốt hơn, nếu các thành phần trong dược phẩm theo sáng chế được trộn đồng nhất hoặc đồng đều trong dạng liều rắn.

Theo cách khác, hoạt chất có thể được bào chế ở dạng thể tiếp hợp với chất mang, có thể là oligome như được mô tả trong US2003/0069170, ví dụ



Thể tiếp hợp này có thể được dùng kết hợp với axit béo và muối mật như được nêu trong bản mô tả trên.

Thể tiếp hợp với polyetylen glycol (PEG) có thể được sử dụng, như được mô tả chẳng hạn trong ấn phẩm của Mansoor và các đồng tác giả.

Theo cách khác, hoạt chất có thể được trộn với nitroso-N-axetyl-D,L-penicillamin (SNAP) và dung dịch Carbopol hoặc với taurocholat và dung dịch Carbapol để tạo ra nhũ tương bám dính niêm mạc miệng.

Hoạt chất có thể được bào chế bằng cách nạp vào viên nang nano chitosan như được bộc lộ trong ấn phẩm của Prego và các đồng tác giả (tùy ý PEG được cải biến như trong Prego Prego C, Torres D, Fernandez-Megia E, Novoa-Carballal R, Quiñoá E, Alonso MJ.) hoặc chitosan hoặc hạt nano lipid đã bao PEG như được bộc lộ trong ấn phẩm của Garcia-Fuentes và các đồng tác giả. Các hạt nano chitosan được dùng nhằm mục đích này có thể được cải biến iminothiolan như được mô tả trong ấn phẩm của Guggi và các đồng tác giả. Chúng có thể được bào chế trong nhũ tương nước/dầu/nước như được mô tả trong ấn phẩm của Dogru và các đồng tác giả. Độ sinh khả dụng của hoạt chất có thể được tăng lên bằng cách sử dụng taurodeoxycholat hoặc lauroyl carnitin như được mô tả trong ấn phẩm của Sinko và các đồng tác giả hoặc trong ấn phẩm của Song và các đồng tác giả. Nói chung, các hạt nano thích hợp làm chất mang được bàn luận trong de la Fuente et al và có thể được sử dụng trong sáng chế.

Các chiến lược thích hợp khác đối với dược phẩm dùng qua đường miệng bao gồm việc sử dụng hệ tăng cường độ thấm tạm thời (TPE) như được mô tả trong WO2005/094785 của Chiasma Ltd. TPE sử dụng huyền phù trong dầu chứa các hạt rắn ưa nước trong môi trường kỵ nước để bảo vệ phân tử dược chất không bị bất hoạt bởi môi trường dải dạ dày-ruột non (GI) đối kháng và đồng thời tác động lên thành GI để khiến cho nó thấm các phân tử dược chất của nó.

Hơn nữa, sáng chế còn bao gồm việc sử dụng glutathion hoặc các hợp chất chứa nhiều nhóm thiol như được mô tả trong US2008/0200563 để ức chế tác động của bơm đẩy thuốc trên màng niêm dịch. Ví dụ thực hành về các kỹ thuật này cũng được mô tả trong Caliceti, P. Salmaso, S., Walker, G. và Bernkop-Schnürch, A. (2004) 'Development and *in vivo* evaluation of an oral insulin-PEG delivery system.' Eur. J. Pharm. Sci., 22, 315-323, trong Guggi, D., Krauland, A.H., và Bernkop-Schnürch, A. (2003) 'Systemic peptide delivery via the stomach: *in vivo* evaluation of an oral dosage form for salmon calcitonin'. J. Control. Rel. 92,125-135, và trong Bernkop-Schnürch, A., Pinter, Y., Guggi, D., Kahlbacher, H., Schöffmann, G., Schuh, M., Schmerold, I., Del Curto, M.D., D'Antonio, M., Esposito, P. và Huck, Ch. (2005) 'The use thiolated polymer as carrier matrix in oral peptide delivery' - Proof of concept. J. Control. Release, 106, 26-33.

Hoạt chất có thể được bào chế ở dạng vi cầu kín như được mô tả trong WO2004/084870 trong đó thành phần dược chất được hòa tan ở dạng nhũ tương, vi nhũ tương hoặc huyền phù được bào chế thành dạng cầu nhỏ; và được bao thay đổi bằng các kỹ thuật bao thông thường hoặc kỹ thuật bao mới. Kết quả là thu được dược chất bao nang ở dạng "đã hòa tan sẵn" khi được dùng qua đường miệng tạo ra để giải phóng ổn định theo cách xác định sẵn hoặc giải phóng kéo dài dược chất tới các vị trí cụ thể và với tốc độ cụ thể dọc qua đường dạ dày-ruột. Về bản chất, quá trình hòa tan sẵn dược chất làm gia tăng khả năng dự đoán profin động học của nó đồng thời gia tăng khả năng thấm và độ ổn định của dược chất.

Một phương pháp có thể dùng các viên nang nano bao chitosan như được mô tả trong US2009/0074824. Phân tử hoạt tính dùng theo kỹ thuật này được bảo vệ bên trong các viên nang nano do chúng ổn định với tác động của dịch vị. Ngoài ra, tính chất bám dính niêm mạc của hệ này làm tăng thời gian bám dính với thành ruột (điều này kiểm tra được rằng quá trình di chuyển trong dải dạ dày-ruột non của các hệ này có bị trì hoãn hay không), từ đó tạo điều kiện thuận lợi cho quá trình hấp thu phân tử hoạt tính một cách có hiệu quả hơn.

Các phương pháp phát triển bởi TSRI Inc. có thể được sử dụng. Các phương pháp này bao gồm Kỹ thuật hòa tan trong điều kiện ưa nước (Hydrophillic Solubilization

Technology - HST) trong đó gelatin là phần chiết collagen có nguồn gốc từ tự nhiên mang cả điện tích dương lẫn điện tích âm, bao các hạt hoạt chất chứa trong mixen lexitin và ngăn ngừa quá trình kết tụ hoặc vón cục của chúng. Từ đó cải thiện được khả năng thẩm âm của các hạt được chất kỵ nước thông qua quá trình tương tác phân cực. Ngoài ra, lexitin lưỡng cực còn làm giảm sức căng bề mặt giữa dịch lỏng hòa tan và bề mặt hạt.

Hoạt chất có thể được bào chế với tá dược cucurbituril (phân tử nano hình quả bí ngô).

Theo cách khác, một phương pháp có thể dùng kỹ thuật GIPET của Merriam Pharmaceuticals để tạo ra viên nén bao tan trong ruột chứa hoạt chất với chất tăng cường hấp thu có thể là axit béo có chuỗi trung bình hoặc dẫn xuất của axit béo có chuỗi trung bình như được mô tả trong US2007/0238707 hoặc peptit chuyển màng như được mô tả trong US7268214.

Một phương pháp có thể dùng kỹ thuật GIRESTM bao gồm dạng liều giải phóng kiểm soát nằm trong túi có thể phồng lên được, được đặt trong viên nang chứa dược chất để dùng qua đường miệng. Trong quá trình hòa tan viên nang này, hệ tạo khí làm phồng túi này trong dạ dày. Trong các thử nghiệm lâm sàng, nhận thấy rằng túi này được nằm trong dạ dày trong thời gian 16-24 giờ.

Theo cách khác, hoạt chất có thể được tiếp hợp với chất cải biến bảo vệ cho phép nó không bị thoái biến bởi enzym trong dạ dày và tạo điều kiện cho quá trình hấp thu hoạt chất này. Hoạt chất có thể được tiếp hợp đồng hóa trị với thể phân tán mono, dẫn xuất metoxy polyetylen glycol glycolipit mạch ngắn được kết tinh và đông khô nhanh thành thành phần dược chất khô sau khi tinh chế. Các phương pháp như vậy được mô tả trong US5438040 và trên trang điện tử www.biocon.com.

Một phương pháp cũng có thể dùng nang hướng gan (hepatic-directed vesicle - HDV) để phân phối dược chất. HDV có thể bao gồm hoạt chất bao nang liposom (đường kính ≤ 150 nm), còn chứa phân tử hướng đích tế bào gan nằm ở lớp lipid kép của chúng. Phân tử đích hướng việc phân phối hoạt chất bao nang tới các tế bào gan và do đó cần lượng hoạt chất nhỏ để tạo ra tác dụng. Kỹ thuật này được mô tả trong US2009/0087479 và mô tả tiếp trên trang điện tử www.diasome.com.

Hoạt chất có thể được kết hợp vào chế phẩm còn chứa về cơ bản là môi trường ưa nước không phải là nước bao gồm rượu và đồng dung môi, kết hợp với glyxerit một phần mạch trung bình, tùy ý trộn với các loại PEG mạch dài như được mô tả trong US2002/0115592 liên quan đến insulin.

Theo cách khác, có thể sử dụng các miếng dán trong ruột như được mô tả trong Shen Z, Mitragotri S, Pharm Res. 2002 Apr;19(4):391-5 'Intestinal patches for oral drug delivery'.

Hoạt chất có thể được kết hợp vào nền có thể ăn mòn được tạo ra từ hydrogel được trộn với polyme kỵ nước như được mô tả trong Patent Mỹ số 7189414.

Nồng độ liều thích hợp để dùng qua đường miệng cho người lớn cần điều trị có thể nằm trong khoảng từ 0,05 đến 5mg, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0,1 đến 2,5mg.

Số liều điều trị cho bệnh nhân có thể là từ 1 đến sáu lần một ngày, ví dụ từ hai đến bốn lần một ngày. Việc điều trị mong muốn duy trì được trong thời gian dài ít nhất là 6 tuần, tốt hơn là ít nhất 6 tháng, tốt hơn là ít nhất năm, và tùy ý trong cả cuộc đời.

Việc điều trị kết hợp trong các điều kiện liên quan có thể được thực hiện bằng cách sử dụng chế phẩm theo sáng chế và dùng riêng rẽ một hoặc nhiều phương pháp điều trị khác. Theo cách khác, chế phẩm theo sáng chế có thể được kết hợp một hoặc nhiều phương pháp điều trị khác để dùng kết hợp.

Các phương pháp điều trị kết hợp theo sáng chế bao gồm việc kết hợp hoạt chất như được mô tả với insulin, GLP-2, GLP-1, GIP, hoặc amylin, hoặc nói chung với các thuốc trị bệnh đái tháo đường khác. Do đó, các phương pháp điều trị kết hợp bao gồm cả việc bào chế đồng thời có thể được thực hiện với các chất nhạy với insulin bao gồm các biguanidua như Metformin, Buformin và Phenformin, TZD's (PPAR) như Balaglitazone, Pioglitazon, Rivoglitazone, Rosiglitazon và Troglitazone, các chất chủ vận PPAR kép như Aloglitazar, Muraglitazar và Tesaglitazar, hoặc các chất kích thích bài tiết bao gồm sulphonylure như Carbutamide, Chloropropamide, Gliclazide, Tolbutamide, Tolazamide, Glipizide, Glibenclamide, Glyburide, Gliquidone, Glyclopamide và Glimepiride, Meglitinide/glinide (K⁺) như Nateglinide, Repaglinide và Mitiglinide, các chất tương tự GLP-1 như Exenatide, Liraglutide và Albiglutide, các chất ức chế DPP-4 như Alogliptin, Linagliptin, Saxagliptin, Sitagliptin và Vildagliptin, các chất tương tự insulin hoặc các chế phẩm đặc biệt như (tác dụng nhanh) Insulin lispro, Insulin aspart, Insulin glulisin, (tác dụng kéo dài) Insulin glargine, Insulin detemir, insulin dùng để hít – insulin Exubra và NPH, và các chất khác bao gồm các chất ức chế alpha-glucosidaza như Acarbose, Miglitol và Voglibose, các chất tương tự amylin như Pramlintide, các chất ức chế SGLT2 như Dapagliflozin, Remogliflozin và Sergliflozin cũng như các chất hỗn tạp bao gồm Benfluorex và Tolrestat.

Các dạng kết hợp khác bao gồm việc dùng đồng thời hoặc bào chế đồng thời với leptin. Chất bền với leptin là thành phần đã biết của bệnh đái tháo đường typ 2; tuy nhiên, việc tiêm leptin không làm cải thiện tình trạng bệnh này. Trái lại, có bằng chứng chứng

minh rằng amylin, và nhờ đó các phân tử có tác dụng tương tự amylin, như chất có tác dụng giống calcitonin của cá hồi, có khả năng cải thiện độ nhạy của leptin. Việc kết hợp amylin/leptin có tác dụng hiệp đồng về mặt cân nặng và mức hấp thu thức ăn, và cũng có tính kháng insulin [Kusakabe T et al].

Các ví dụ sau được đưa ra nhằm giải thích cho sáng chế, và không nhằm giới hạn phạm vi của sáng chế theo cách bất kỳ như được xác định trong yêu cầu bảo hộ dưới đây. Các ví dụ sau được đưa ra sao cho người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này hoàn thành được sáng chế và mô tả cách thức thực hiện và sử dụng các phương án đã được mô tả, và không được dự định để giới hạn phạm vi của sáng chế cũng như không được dự định đưa ra các thử nghiệm dưới đây là toàn bộ các thử nghiệm hoặc chỉ có các thử nghiệm này được tiến hành. Cần đảm bảo độ chính xác đối với các số lượng đã dùng (ví dụ, lượng, nhiệt độ, v.v.) nhưng một vài sai số và độ lệch trong thử nghiệm cần được giải thích. Trừ khi có quy định khác, các phần là phần khối lượng, phân tử lượng là phân tử lượng trung bình, nhiệt độ là nhiệt độ °C, và áp suất là áp suất trong không khí hoặc giống với điều kiện trong không khí.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Trong các ví dụ sau, nguyên liệu và phương pháp sau được sử dụng.

Tế bào và dòng tế bào

Các dòng tế bào sau biểu hiện các thụ thể calcitonin, amylin và CGRP được mua và được nuôi cấy theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

1. Thụ thể calcitonin (CTR): U2OS-CALCR do DiscoveRx cung cấp (Số danh mục: 93-0566C3).
2. Thụ thể amylin (AMY-R): CHO-K1 CALCR + RAMP3 do DiscoveRx cung cấp (Số danh mục: 93-0268C2).
3. Thụ thể CGRP (CGRP-R): CHO-K1 CALCRL + RAMP1 do DiscoveRx cung cấp (Số danh mục: 93-0269C2).

Trong các thử nghiệm sinh học độc lập, các tế bào CTR, AMY-R và CGRP-R được điều trị bằng các liều tăng dần của sCT, UGP-302/KBP-042 hoặc KBP được xác định trong bảng 3 (0, 0,001, 0,01, 0,1, 1, 10, và 100 nM) đối với các thời điểm đã định.

Ví dụ 1: Thử nghiệm β -Arrestin

Thử nghiệm PathHunter β -Arrestin GPCR là thử nghiệm chức năng trên toàn bộ tế bào xác định trực tiếp khả năng của phối tử để hoạt hóa GPCR bằng cách phát hiện quá trình tương tác của β -Arrestin với GPCR hoạt hóa. Do việc phục hồi Arrestin là độc lập với việc truyền tín hiệu G-protein, nên các thử nghiệm này cho phép sàng lọc toàn bộ và có tác

động mạnh và việc xử lý có thể được sử dụng hầu như đối với thụ thể liên hợp với Gi, Gs, hoặc Gq bất kỳ.

Trong hệ thống này, GPCR được dung hợp trong khung với mảnh enzym nhỏ ProLink™ và được biểu hiện đồng thời trong các tế bào biểu hiện ổn định protein dung hợp chứa β -Arrestin và thể đột biến khuyết có đầu tận cùng N, kích thước lớn hơn của β -gal (được gọi là chất nhận enzym hoặc EA). Sự hoạt hóa GPCR sẽ kích thích quá trình gắn kết β -Arrestin với GPCR đã được đánh dấu bởi ProLink và thúc đẩy việc bổ sung hai mảnh enzym này, từ đó tạo ra enzyme β -gal hoạt hóa. Quá trình tương tác này làm tăng hoạt tính enzym có thể được đo bằng cách sử dụng các chất phản ứng phát hiện phát quang hóa học PathHunter®.

Thử nghiệm được thực hiện trong các đĩa có lỗ 384 màu trắng (Greiner Bio-One, 784080). Các tế bào được nuôi cấy thành 2500 tế bào/lỗ trong 10 μ L môi trường đặc hiệu loại tế bào một ngày trước khi thử nghiệm. Để định lượng mức phục hồi β -arrestin do GPCR gây ra, kit phát hiện Pathhunter™ (93-0001, DiscoverX) được sử dụng và thử nghiệm được tiến hành theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Kết quả được thể hiện trong các Fig. 1, 2 và 3. Trên Fig. 1, các peptit có hoạt tính tương đối giống nhau; tuy nhiên, khi thời gian tăng dần, KBP-056 có khả năng hoạt hóa và duy trì được quá trình hoạt hóa CTR vượt trội. Kết quả này được minh họa cụ thể hơn trên Fig. 2, trong đó các phối tử riêng rẽ được minh họa bằng đồ thị với một nồng độ nhất định và là hàm theo thời gian. Nhận thấy rằng KBP-056 có tính chất hoạt hóa thụ thể calcitonin vượt trội hơn so với các peptit khác.

Đặc điểm quan trọng khác của các nhóm phân tử này là khả năng hoạt hóa thụ thể amylin AMY-R, và như được thể hiện trên Fig. 3, KBP hoàn toàn có khả năng hoạt hóa thụ thể này, và KBP-088 có tác dụng mạnh hơn so với AMY-R kinh điển đối vận sCT.

Trong phần phụ của các Fig. này, thử nghiệm beta-arrestin được sử dụng để đánh giá quá trình hoạt hóa thụ thể kéo dài. Thử nghiệm này được thực hiện bằng cách sử dụng dòng tế bào của thụ thể calcitonin (CTR): U2OS-CALCR do DiscoverX cung cấp (Số danh mục: 93-0566C3), và đối lập với các kết quả trong 3 giờ, quá trình tích lũy beta-arrestin được tiến hành trong 24, 48 và 72 giờ và sau đó được phân tích.

Peptit để dùng trong sàng chế được sắp xếp theo khả năng hoạt hóa CTR và AMY-R in vitro theo thứ tự giảm dần, như sau:

Chất can thiệp	4 giờ	24 giờ	48 giờ	Sắp xếp (4 giờ)	Sắp xếp (24 giờ)	Sắp xếp (48 giờ)
KBP-089	1,8	0,7	5,4	+	+	+
KBP-021	2,1	0,6	6,9	+	+	+
KBP-019	1,3	0,2	11,8	+	+	+

KBP-088	1,9	0,4	11,4	+	+	+
KBP-042*	2,2	1,2	14,3	+	+	0
nf-hCT*	2,7	15,9	15,9	+	0	0
Tá dược*	8,5	16,6	19,3	0	0	0

* So sánh

Ví dụ 2: Gắn kết phối tử cạnh tranh

Trong ví dụ này, các tác giả sáng chế chứng minh được rằng các hợp chất thử nghiệm có khả năng gắn kết với các thụ thể calcitonin và amylin. Tương ứng với thử nghiệm cảm ứng beta-arrestin, các tác giả sáng chế tiến hành thử nghiệm gắn kết cạnh tranh phối tử bằng cách sử dụng các tế bào biểu hiện CTR và AMY-R. Trong khi nghiên cứu gắn kết phối tử trên các tế bào, 15.000 tế bào CTR hoặc AMY-R được nuôi cấy trong đĩa có 96 giếng và các tế bào được xử lý bằng sCT đã tạo tiếp hợp với ^{125}I 0,1 nM có hoặc không có mặt KBP chưa được đánh dấu khi liều tăng dần trong 60 phút ở nhiệt độ 37°C. Sau khi ủ, dịch nổi trên bề mặt được loại bỏ và các tế bào được rửa hai lần trong 200 μl PBS. Các tế bào này được phân giải bằng cách sử dụng dung dịch đệm RIPA† (NaCl 30mM, Tris-HCl 50mM, EDTA 5mM, axit deoxycholic 1%, SDS 10%, viên nén mini ức chế proteaza (1 viên nén:10mL)) và dịch phân giải được thu gom để xác định trên máy đếm γ .

Kết quả được thể hiện trên Fig.4. Trước tiên, các tác giả sáng chế nhận thấy rằng toàn bộ các phối tử gắn kết chặt chẽ với cả hai thụ thể này; tuy nhiên, ái lực của KBP-088 là mạnh hơn so với các phối tử khác, đặc biệt là trên AMY-R.

Ví dụ 3: Mức phục hồi β -arrestin được thử nghiệm trên thụ thể CGRP

Do các peptit có khả năng hoạt hóa thụ thể amylin nhận thấy cũng có thể hoạt hóa CGRP-R, nên tác dụng này có thể gây bất lợi cho tác dụng tổng thể của các hợp chất, các tác giả sáng chế đã đánh giá xem liệu các KBP có hoạt hóa được CGRP-thụ thể hay không. Như được thể hiện trên Fig. 5, không giống như calcitonin của cá hồi, không có hợp chất KBP nào hoạt hóa được CGRP-R.

Ví dụ 4: Thử nghiệm hoạt tính *in vivo* đối với cân nặng.

Để đảm bảo hoạt tính *in vivo* của nhóm peptit này, thử nghiệm cấp tính đối với KBP-056 về khả năng làm giảm quá trình hấp thu thức ăn, cân nặng và nồng độ glucoza sau bữa ăn được so sánh với UGP302/KBP-042 được tiến hành. Chuột đực Sprague-Dawley được cho ăn chế độ ăn giàu chất béo trong 8 tuần đến khi béo phì, và sau đó được cho dùng liều đơn dưới da 5 $\mu\text{g/kg}$ KBP-056, UGP302/KBP-042 hoặc tá dược (nước muối) (5 con/nhóm), và mức độ ảnh hưởng đến sự hấp thu thức ăn, cân nặng và nồng độ glucoza trong máu được đánh giá. Máu được lấy từ tĩnh mạch đuôi sau 18 giờ dùng. Nồng độ

glucoza toàn phần trong máu được xác định bằng máy đo nồng độ glucoza trong máu ACCU-CHEK® Avia (Roche Diagnostics, Rotkreuz, Switzerland).

Như được thể hiện trên Fig. 6, KBP-056 làm giảm mạnh khả năng hấp thu thức ăn trong thời gian 18 giờ, từ đó cũng chứng tỏ rằng cân nặng giảm xuống một cách đáng kể. Đáng quan tâm là, việc giảm cân nặng quá mức là do UGP302/KBP-042 gây ra. Cuối cùng, quan sát thấy nồng độ glucoza sau bữa ăn giảm một cách đáng kể, từ đó khẳng định rằng nhóm peptit mới có hoạt tính *in vivo* đáng kể.

Ví dụ 5: Thử nghiệm về hoạt tính *in vivo* đối với việc giảm nhanh nồng độ glucoza và HbA1c trong huyết tương

Để đánh giá tác dụng của peptit liên quan đến quá trình điều hòa nồng độ glucoza trong máu, chuột đực ZDF, là mô hình tiêu chuẩn vàng của bệnh đái tháo đường typ 2 được điều trị trong 3 tuần bằng 3 KBP có triển vọng nhất (023, 056 và 088) và chất so sánh hoạt tính (UGP302/KBP-042). Chuột đực ZDF (*fa/fa*) được lấy ở độ tuổi 7 tuần do Charles River Laboratories (Kisslegg, Deutschland) cung cấp. Tất cả các con chuột được nhốt trong điều kiện thích hợp ở Nordic Bioscience với nhiệt độ không đổi (21–23°C) và độ ẩm tương đối (55–65%) trong chu kỳ 12 giờ sáng/tối bằng cách cho ăn thức ăn cho chuột Purina 5008 (Brogaarden, Lynge, Đan mạch) và nước máy. Ở độ tuổi 8 tuần, các con chuột được chia ngẫu nhiên vào năm nhóm, mỗi nhóm gồm 8 con dựa vào việc tăng nhanh nồng độ glucoza trong máu và cân nặng (Tá được (nước muối), UGP302/KBP-042 5µg/kg/ngày, KBP-023 5µg/kg/ngày, KBP-056 5µg/kg/ngày và KBP-088 5µg/kg/ngày) và cho dùng liều dưới da một lần một ngày. Các con vật được điều trị trong tổng thời gian là 3 tuần để đánh giá tác dụng của các peptit trong quá trình tăng nhanh nồng độ glucoza trong máu. Nồng độ glucoza trong máu được kiểm tra bằng cách sử dụng hệ thống kiểm soát Accu-Check® Avia (Roche Diagnostics, Rotkreuz, Switzerland) và nồng độ HbA1c được kiểm tra bằng máy phân tích DCA Vantage™ (Siemens Healthcare Diagnostics, Deerfield, IL).

Việc tăng nhanh nồng độ glucoza và HbA1c trong máu được đánh giá sau ba tuần, và như được thể hiện trên Fig. 7, cả KBP-056 lẫn KBP-088 đều có hoạt tính mạnh đối với việc giảm FPG và HbA1c, và đáng ngạc nhiên là chúng có đặc tính vượt trội hơn so với UGP302/KBP-042, chứng tỏ rằng các chất thay thế aminoaxit có tác dụng cải thiện hiệu quả, như được thể hiện ở dữ liệu *in vitro*.

Ví dụ 6: Tác dụng của KBP-056 đối với sự tái hấp thu xương và thoái hóa sụn.

Trong mối liên quan giữa KBP và calcitonin khác nhau, và tác dụng bảo vệ xương và sụn đã biết của calcitonin của cá hồi, tác dụng của KBP-056 đối với sự tái hấp thu xương (đo được bằng CTX-I) và sự thoái hóa sụn (được đánh giá bởi CTX-II) được phân tích ở chuột đực trên HFD. Như được thể hiện trên Fig. 8, KBP-056 được dùng và giảm cả

CTX-I lẫn CTX-II theo cách độc lập với thời gian, với mức độ ức chế tối đa đạt được trong ba giờ sau khi dùng và ở các nồng độ vượt quá $1\mu\text{g/kg/ngày}$. Điều này khẳng định được rằng KBP có khả năng duy trì tác dụng có lợi của chúng trên xương và sụn mặc dù có sự thay đổi về amino-axit. Hơn thế nữa, dựa trên tính ưu việt của chúng trong các thử nghiệm khác, các tác giả sáng chế mong muốn các tác dụng này cũng vượt trội hơn.

Ví dụ 7: So sánh tác dụng của KBP 088 và KBP 089 đối với sự hấp thu thức ăn ở chuột béo phì.

Chuột được cho ăn chế độ ăn giàu chất béo trong thời gian 14 tuần trước khi thử nghiệm để khiến cho chuột bị béo phì. Sau đó, chúng được chia ngẫu nhiên vào 7 nhóm (Tá được (0,9% NaCl), KBP-089 (liều: 1,25, 2,5, $5\mu\text{g/kg}$) và KBP-088 (liều: 1,25, 2,5, $5\mu\text{g/kg}$). Chúng được cho nhịn ăn qua đêm và sau đó được điều trị bằng liều đơn của peptit hoặc tá được trong quá trình kiểm soát bằng cách dùng dưới da. Sự hấp thu thức ăn được kiểm tra trong các khoảng thời gian sau (0-4 giờ, 4-24 giờ và 24-48 giờ). Như được thể hiện trên Fig. 9, cả KBP-088 lẫn KBP-089 đều làm giảm sự hấp thu thức ăn trong thời gian cách nhau 4 giờ, và tác dụng này được duy trì tới 24 giờ. Trong khoảng thời gian từ 24 đến 48 giờ, chỉ có KBP-089 có tác dụng làm giảm sự hấp thu thức ăn, chứng tỏ rằng phân tử này có tính chất vượt trội so với KBP-088.

Trên Fig. 12F, các kết quả thử nghiệm tương tự được thể hiện đối với nhiều peptit theo sáng chế.

Hơn nữa, các nghiên cứu tương tự cũng được tiến hành trong các khoảng thời gian khác nhau và các peptit khác nhau và các kết quả này được thể hiện trên Fig. 10 và Fig. 11. KBP089 có tác dụng kìm hãm sự hấp thu thức ăn trong 72 giờ so với tác dụng của hợp chất đối chứng KBP042 và các kết quả này được thể hiện trên Fig. 10.

Để nghiên cứu tiếp hiệu quả của KBP-089 so với KBP-042 trên chuột béo phì đã dùng với liều KBP-089 hoặc KBP-042 là $2,5\mu\text{g/kg/ngày}$ bằng cách tiêm dưới da và sau đó hai nhóm đối chứng là nhóm dùng tá được và nhóm hạn chế calo, trong đó mức độ hấp thu thức ăn là tương đương với mức độ hấp thu thức ăn của nhóm KBP-089 được che sáng để xem có thể quan sát được tác dụng độc lập của quá trình hấp thu thức ăn hay không.

Trên Fig. 11, tác dụng của các peptit đối với sự hấp thu thức ăn và cân nặng trong tám tuần điều trị được thể hiện lần lượt ở ô phía trên và ô phía dưới. Có thể nhận thấy rằng cả hai peptit này đều làm giảm sự hấp thu thức ăn đột ngột ngay khi bắt đầu dùng như mong muốn, sau đó tác dụng này giảm dần và mức độ hấp thu thức ăn từ từ trở về mức bình thường. Mức độ ảnh hưởng đến cân nặng được thể hiện trên Fig. 11, ô phía dưới, trong đó rõ ràng nhận thấy rằng cả hai peptit đều làm giảm cân nặng một cách đáng kể; tuy nhiên, việc giảm cân nặng khi dùng KBP-089 là lớn hơn so với KBP-042, từ đó chứng tỏ

KBP-089 có tính chất ưu việt hơn. Ngoài ra, khi so sánh KBP-089 với nhóm kiểm soát hạn chế calo (cho ăn theo cặp), mà được nhận lượng thức ăn như nhóm KBP-089 trong quá trình nghiên cứu, thì rõ ràng rằng việc giảm cân nặng không những là do sự hạn chế quá trình hấp thu thức ăn gây ra, mà còn do các tác dụng khác.

Trong bản mô tả này, nếu không được đề cập theo cách khác, thì từ ‘hoặc’ được sử dụng trong với nghĩa toán tử mà trở lại trị số thực khi một trong hai hoặc cả hai điều kiện đã nêu được đáp ứng, là đối lập với toán tử ‘loại trừ hoặc’ yêu cầu chỉ một trong số các điều kiện được đáp ứng. Từ ‘bao gồm’ được sử dụng với nghĩa ‘kể cả’ chứ không phải với nghĩa ‘cấu thành’.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Peptit có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:43, tùy ý được carboxyl hóa ở đầu tận cùng N của nó hoặc theo cách khác được cải biến để khử điện tích dương của axit amin thứ nhất và độc lập được amit hóa ở đầu tận cùng C của nó, và trong mỗi trình tự này, các gốc xystein ở các vị trí 1 và 7 tùy ý được thế bằng axit α -aminosuberic (Asu).
2. Peptit theo điểm 1, trong đó peptit này có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 44.
3. Peptit theo điểm 1 hoặc 2, trong đó peptit này được bào chế để dùng qua đường tiêu hóa.
4. Peptit theo điểm 1 hoặc 2, trong đó peptit này được bào chế để dùng ngoài đường tiêu hóa.
5. Peptit theo điểm 4, trong đó peptit này được bào chế để dùng đường tiêm.
6. Peptit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó peptit này được bào chế với chất mang để dùng qua đường uống.
7. Peptit theo điểm 6, trong đó chất mang là 5-CNAC, SNAD, hoặc SNAC.
8. Peptit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, 6 hoặc 7, trong đó peptit này được bào chế trong dược phẩm để dùng qua đường uống chứa các hạt axit xitric bao, và trong đó các hạt axit xitric bao này làm tăng độ sinh khả dụng qua đường uống của peptit này.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> KeyBioscience AG

<120> PEPTIT CÓ TÁC DỤNG GIỐNG CALCITONIN DÙNG ĐỂ ĐIỀU TRỊ BỆNH

<130> PJS/P18961WO

<150> GB1320112.4

<151> 2013-11-14

<150> GB1414706.0

<151> 2014-08-19

<160> 80

<170> BiSSAP 1.2

<210> 1

<211> 32

<212> PRT

<213> Salmo sp.

<220>

<223> calcitonin

<220>

<221> MOD_RES

<222> 32

<223> Amit hóa

<400> 1

Cys	Ser	Asn	Leu	Ser	Thr	Cys	Val	Leu	Gly	Lys	Leu	Ser	Gln	Glu	Leu
1				5					10					15	
His	Lys	Leu	Gln	Thr	Tyr	Pro	Arg	Thr	Asn	Thr	Gly	Ser	Gly	Thr	Pro
			20					25					30		

<210> 2

<211> 32

<212> PRT

<213> Anguilla sp.

<220>

<223> Calcitonin

<220>

<221> MOD_RES

<222> 32

<223> Amit hóa

<400> 2

Cys	Ser	Asn	Leu	Ser	Thr	Cys	Val	Leu	Gly	Lys	Leu	Ser	Gln	Glu	Leu
1				5					10					15	
His	Lys	Leu	Gln	Thr	Tyr	Pro	Arg	Thr	Asp	Val	Gly	Ala	Gly	Thr	Pro
			20					25					30		

<210> 3

<211> 32

<212> PRT

<213> Gallus sp.

<220>

<223> Calcitonin

<220>

<221> MOD_RES

<222> 32

<223> Amit hóa

<400> 3

Cys	Ala	Ser	Leu	Ser	Thr	Cys	Val	Leu	Gly	Lys	Leu	Ser	Gln	Glu	Leu
1				5					10					15	
His	Lys	Leu	Gln	Thr	Tyr	Pro	Arg	Thr	Asp	Val	Gly	Ala	Gly	Thr	Pro
			20					25					30		

<210> 4

<211> 32

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chất có tác dụng giống calcitonin

<220>

<221> VỊ TRÍ

<222> 1

<223> Axetyl hóa

<220>

<221> VỊ TRÍ

<222> 32

<223> Amit hóa

<400> 4

Cys	Ser	Asn	Leu	Ser	Thr	Cys	Val	Leu	Gly	Lys	Leu	Ser	Gln	Glu	Leu
1				5					10					15	
His	Lys	Leu	Gln	Thr	Tyr	Pro	Arg	Thr	Asp	Val	Gly	Ala	Asn	Ala	Pro
			20					25					30		

<210> 5

<211> 32

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chất có tác dụng giống calcitonin

<220>

<221> VỊ TRÍ

<222> 15

<223> Xaa là Asp hoặc Glu

<220>

<221> VỊ TRÍ

<222> 22

<223> Xaa là Phe hoặc Tyr

<400> 5

Cys	Ala	Ser	Leu	Ser	Thr	Cys	Val	Leu	Gly	Arg	Leu	Ser	Gln	Xaa	Leu
1				5					10					15	
His	Arg	Leu	Gln	Thr	Xaa	Pro	Arg	Thr	Asp	Val	Gly	Ala	Asn	Ala	Pro

20

25

30

<210> 6

<211> 32

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chất có tác dụng giống calcitonin

<220>

<221> VỊ TRÍ

<222> 15

<223> Xaa là Asp hoặc Glu

<220>

<221> VỊ TRÍ

<222> 22

<223> Xaa là Phe hoặc Tyr

<400> 6

Cys Ala Ser Leu Ser Thr Cys Met Leu Gly Lys Leu Thr Gln Xaa Leu

1

5

10

15

His Lys Leu Gln Thr Xaa Pro Arg Thr Asp Val Gly Ala Asn Ala Pro

20

25

30

<210> 7

<211> 32

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chất có tác dụng giống calcitonin

<220>

<221> VỊ TRÍ

<222> 15

<223> Xaa là Asp hoặc Glu

<220>

<221> VỊ TRÍ

<222> 22

<223> Xaa là Phe hoặc Tyr

<400> 7

Cys	Ala	Ser	Leu	Ser	Thr	Cys	Val	Leu	Gly	Lys	Leu	Ser	Gln	Xaa	Leu
1				5					10					15	
His	Lys	Leu	Gln	Thr	Xaa	Pro	Lys	Thr	Asp	Val	Gly	Ala	Asn	Ala	Pro
			20					25						30	

<210> 8

<211> 32

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chất có tác dụng giống calcitonin

<220>

<221> VỊ TRÍ

<222> 15

<223> Xaa là Asp hoặc Glu

<220>

<221> VỊ TRÍ

<222> 22

<223> Xaa là Phe hoặc Tyr

<220>

<221> VỊ TRÍ

<222> 21

<223> Thr hoặc Ser

<220>

<221> VỊ TRÍ

<222> 32

<223> Pro hoặc Tyr

<400> 8

Cys Ser Asn Leu Ser Thr Cys Met Leu Gly Arg Leu Ser Gln Xaa Leu

1	5	10	15
His Arg Leu Gln Thr Xaa Pro Lys Thr Asp Val Gly Ala Asn Ala Pro			
20	25	30	

<210> 9

<211> 32

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chất có tác dụng giống calcitonin

<220>

<221> MOD_RES

<222> 1

<223> Axetyl hóa

<220>

<221> MOD_RES

<222> 32

<223> Amit hóa

<400> 9

Cys Ala Ser Leu Ser Thr Cys Val Leu Gly Arg Leu Ser Gln Glu Leu
1 5 10 15
His Arg Leu Gln Thr Phe Pro Arg Thr Asp Val Gly Ala Asn Ala Pro
20 25 30

<210> 10

<211> 32

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chất có tác dụng giống calcitonin

<220>

<221> MOD_RES

<222> 1

<223> Axetyl hóa

<220>

<221> MOD_RES

<222> 32

<223> Amit hóa

<400> 10

Cys Ala Ser Leu Ser Thr Cys Met Leu Gly Lys Leu Thr Gln Glu Leu

1

5

10

15

His Lys Leu Gln Thr Phe Pro Arg Thr Asp Val Gly Ala Asn Ala Pro

20

25

30

<210> 11

<211> 32

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chất có tác dụng giống calcitonin

<220>

<221> MOD_RES

<222> 1

<223> Axetyl hóa

<220>

<221> MOD_RES

<222> 32

<223> Amit hóa

<400> 11

Cys Ala Ser Leu Ser Thr Cys Val Leu Gly Lys Leu Ser Gln Asp Leu

1

5

10

15

His Lys Leu Gln Thr Phe Pro Lys Thr Asp Val Gly Ala Asn Ala Pro

20

25

30

<210> 12

<211> 32

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chất có tác dụng giống calcitonin

<220>

<221> MOD_RES

<222> 1

<223> Axetyl hóa

<220>

<221> MOD_RES

<222> 32

<223> Amit hóa

<400> 12

Cys	Ser	Asn	Leu	Ser	Thr	Cys	Met	Leu	Gly	Arg	Leu	Ser	Gln	Glu	Leu
1				5					10					15	
His	Arg	Leu	Gln	Thr	Phe	Pro	Lys	Thr	Asp	Val	Gly	Ala	Asn	Ala	Pro
			20					25						30	

<210> 13

<211> 32

<212> PRT

<213> Mus sp.

<220>

<223> Calcitonin

<220>

<221> MOD_RES

<222> 32

<223> Amit hóa

<400> 13

Cys	Gly	Asn	Leu	Ser	Thr	Cys	Met	Leu	Gly	Thr	Tyr	Thr	Gln	Asp	Leu
1				5					10					15	
Asn	Lys	Phe	His	Thr	Phe	Pro	Gln	Thr	Ser	Ile	Gly	Val	Glu	Ala	Pro
			20					25					30		

<210> 14

<211> 32

<212> PRT

<213> Rattus sp.

<220>

<223> Calcitonin

<220>

<221> MOD_RES

<222> 32

<223> Amit hóa

<400> 14

Cys	Gly	Asn	Leu	Ser	Thr	Cys	Met	Leu	Gly	Thr	Tyr	Thr	Gln	Asp	Leu
1				5					10					15	
Asn	Lys	Phe	His	Thr	Phe	Pro	Gln	Thr	Ser	Ile	Gly	Val	Gly	Ala	Pro
			20					25					30		

<210> 15

<211> 32

<212> PRT

<213> Equus sp.

<220>

<223> Calcitonin

<220>

<221> MOD_RES

<222> 32

<223> Amit hóa

<400> 15

Cys	Ser	Asn	Leu	Ser	Thr	Cys	Val	Leu	Gly	Thr	Tyr	Thr	Gln	Asp	Leu
1				5					10					15	
Asn	Lys	Phe	His	Thr	Phe	Pro	Gln	Thr	Ala	Ile	Gly	Val	Gly	Ala	Pro
			20					25					30		

<210> 16

<211> 32
 <212> PRT
 <213> Canis sp.

<220>
 <223> Biền thể Calcitonin 1

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> 32
 <223> Amit hóa

<400> 16
 Cys Ser Asn Leu Ser Thr Cys Val Leu Gly Thr Tyr Ser Lys Asp Leu
 1 5 10 15
 Asn Asn Phe His Thr Phe Ser Gly Ile Gly Phe Gly Ala Glu Thr Pro
 20 25 30

<210> 17
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Canis sp.

<220>
 <223> Biền thể 2

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> 32
 <223> Amit hóa

<400> 17
 Cys Ser Asn Leu Ser Thr Cys Val Leu Gly Thr Tyr Thr Gln Asp Leu
 1 5 10 15
 Asn Lys Phe His Thr Phe Pro Gln Thr Ala Ile Gly Val Gly Ala Pro
 20 25 30

<210> 18
 <211> 32

<212> PRT

<213> Sus sp.

<220>

<223> Calcitonin

<220>

<221> MOD_RES

<222> 32

<223> Amit hóa

<400> 18

Cys	Ser	Asn	Leu	Ser	Thr	Cys	Val	Leu	Ser	Ala	Tyr	Trp	Arg	Asn	Leu
1				5					10					15	
Asn	Asn	Phe	His	Arg	Phe	Ser	Gly	Met	Gly	Phe	Gly	Pro	Glu	Thr	Pro
			20					25					30		

<210> 19

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Calcitonin

<220>

<221> MOD_RES

<222> 32

<223> Amit hóa

<400> 19

Cys	Gly	Asn	Leu	Ser	Thr	Cys	Met	Leu	Gly	Thr	Tyr	Thr	Gln	Asp	Phe
1				5					10					15	
Asn	Lys	Phe	His	Thr	Phe	Pro	Gln	Thr	Ala	Ile	Gly	Val	Gly	Ala	Pro
			20					25					30		

<210> 20

<211> 32

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chất có tác dụng giống calcitonin

<400> 20

Cys	Ala	Ser	Leu	Ser	Thr	Cys	Val	Leu	Gly	Arg	Leu	Ser	Gln	Glu	Leu
1				5					10					15	
His	Arg	Leu	Gln	Thr	Phe	Pro	Lys	Thr	Asp	Val	Gly	Ala	Asn	Ala	Tyr
			20					25					30		

<210> 21

<211> 32

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chất có tác dụng giống calcitonin

<400> 21

Cys	Ala	Ser	Leu	Ser	Thr	Cys	Met	Leu	Gly	Lys	Leu	Thr	Gln	Glu	Leu
1				5					10					15	
His	Lys	Leu	Gln	Thr	Phe	Pro	Lys	Thr	Asp	Val	Gly	Ala	Asn	Ala	Tyr
			20					25					30		

<210> 22

<211> 32

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chất có tác dụng giống calcitonin

<400> 22

Cys	Ala	Ser	Leu	Ser	Thr	Cys	Val	Leu	Gly	Lys	Leu	Ser	Gln	Asp	Leu
1				5					10					15	
His	Lys	Leu	Gln	Thr	Phe	Pro	Lys	Thr	Asp	Val	Gly	Ala	Asn	Ala	Tyr
			20					25					30		

<210> 23

<211> 32

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chất có tác dụng giống calcitonin

<400> 23

Cys	Ser	Asn	Leu	Ser	Thr	Cys	Met	Leu	Gly	Arg	Leu	Ser	Gln	Glu	Leu
1				5					10					15	
His	Arg	Leu	Gln	Thr	Phe	Pro	Lys	Thr	Asp	Val	Gly	Ala	Asn	Ala	Tyr
			20					25					30		

<210> 24

<211> 32

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chất có tác dụng giống calcitonin

<400> 24

Cys	Ala	Ser	Leu	Ser	Thr	Cys	Val	Leu	Gly	Arg	Leu	Ser	Gln	Glu	Leu
1				5					10					15	
His	Arg	Leu	Gln	Thr	Phe	Pro	Arg	Thr	Asp	Val	Gly	Ala	Asn	Ala	Tyr
			20					25					30		

<210> 25

<211> 32

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chất có tác dụng giống calcitonin

<400> 25

Cys	Ala	Ser	Leu	Ser	Thr	Cys	Met	Leu	Gly	Lys	Leu	Thr	Gln	Glu	Leu
1				5					10					15	
His	Lys	Leu	Gln	Thr	Phe	Pro	Arg	Thr	Asp	Val	Gly	Ala	Asn	Ala	Tyr

20

25

30

<210> 26

<211> 32

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chất có tác dụng giống calcitonin

<400> 26

Cys Ala Ser Leu Ser Thr Cys Val Leu Gly Arg Leu Ser Gln Glu Leu

1

5

10

15

His Arg Leu Gln Thr Phe Pro Lys Thr Asp Val Gly Ala Asn Ala Pro

20

25

30

<210> 27

<211> 32

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chất có tác dụng giống calcitonin

<400> 27

Cys Ala Ser Leu Ser Thr Cys Met Leu Gly Lys Leu Thr Gln Glu Leu

1

5

10

15

His Lys Leu Gln Thr Phe Pro Lys Thr Asp Val Gly Ala Asn Ala Pro

20

25

30

<210> 28

<211> 32

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chất có tác dụng giống calcitonin

<400> 28

Cys	Ala	Ser	Leu	Ser	Thr	Cys	Val	Leu	Gly	Arg	Leu	Ser	Gln	Glu	Leu
1				5					10					15	
His	Arg	Leu	Gln	Thr	Phe	Pro	Arg	Thr	Asp	Val	Gly	Ala	Asn	Ala	Pro
			20					25					30		

<210> 29

<211> 32

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chất có tác dụng giống calcitonin

<400> 29

Cys	Ala	Ser	Leu	Ser	Thr	Cys	Met	Leu	Gly	Lys	Leu	Thr	Gln	Glu	Leu
1				5					10					15	
His	Lys	Leu	Gln	Thr	Phe	Pro	Arg	Thr	Asp	Val	Gly	Ala	Asn	Ala	Pro
			20					25					30		

<210> 30

<211> 32

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chất có tác dụng giống calcitonin

<400> 30

Cys	Ala	Ser	Leu	Ser	Thr	Cys	Val	Leu	Gly	Lys	Leu	Ser	Gln	Glu	Leu
1				5					10					15	
His	Lys	Leu	Gln	Thr	Phe	Pro	Lys	Thr	Asp	Val	Gly	Ala	Asn	Ala	Pro
			20					25					30		

<210> 31

<211> 32

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chất có tác dụng giống calcitonin

<400> 31

Cys	Ser	Asn	Leu	Ser	Thr	Cys	Met	Leu	Gly	Arg	Leu	Ser	Gln	Glu	Leu
1				5					10					15	
His	Arg	Leu	Gln	Thr	Phe	Pro	Lys	Thr	Asp	Val	Gly	Ala	Asn	Ala	Pro
			20					25						30	

<210> 32

<211> 32

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chất có tác dụng giống calcitonin

<400> 32

Cys	Ala	Ser	Leu	Ser	Thr	Cys	Val	Leu	Gly	Arg	Leu	Ser	Gln	Glu	Leu
1				5					10					15	
His	Arg	Leu	Gln	Thr	Tyr	Pro	Arg	Thr	Asp	Val	Gly	Ala	Asn	Ala	Pro
			20					25						30	

<210> 33

<211> 32

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chất có tác dụng giống calcitonin

<400> 33

Cys	Ala	Ser	Leu	Ser	Thr	Cys	Met	Leu	Gly	Lys	Leu	Thr	Gln	Glu	Leu
1				5					10					15	
His	Lys	Leu	Gln	Thr	Tyr	Pro	Arg	Thr	Asp	Val	Gly	Ala	Asn	Ala	Pro
			20					25						30	

<210> 34

<211> 32

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chất có tác dụng giống calcitonin

<400> 34

Cys	Ala	Ser	Leu	Ser	Thr	Cys	Val	Leu	Gly	Lys	Leu	Ser	Gln	Glu	Leu
1				5					10					15	
His	Lys	Leu	Gln	Thr	Tyr	Pro	Lys	Thr	Asp	Val	Gly	Ala	Asn	Ala	Pro
			20					25						30	

<210> 35

<211> 32

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chất có tác dụng giống calcitonin

<400> 35

Cys	Ser	Asn	Leu	Ser	Thr	Cys	Met	Leu	Gly	Arg	Leu	Ser	Gln	Glu	Leu
1				5					10					15	
His	Arg	Leu	Gln	Thr	Tyr	Pro	Lys	Thr	Asp	Val	Gly	Ala	Asn	Ala	Pro
			20					25						30	

<210> 36

<211> 32

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chất có tác dụng giống calcitonin

<400> 36

Cys	Ala	Ser	Leu	Ser	Thr	Cys	Val	Leu	Gly	Arg	Leu	Ser	Gln	Asp	Leu
1				5					10					15	
His	Arg	Leu	Gln	Thr	Phe	Pro	Arg	Thr	Asp	Val	Gly	Ala	Asn	Ala	Pro
			20					25						30	

<210> 37

<211> 32

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chất có tác dụng giống calcitonin

<400> 37

Cys	Ala	Ser	Leu	Ser	Thr	Cys	Met	Leu	Gly	Lys	Leu	Thr	Gln	Asp	Leu
1				5					10					15	
His	Lys	Leu	Gln	Thr	Phe	Pro	Arg	Thr	Asp	Val	Gly	Ala	Asn	Ala	Pro
			20					25						30	

<210> 38

<211> 32

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chất có tác dụng giống calcitonin

<400> 38

Cys	Ala	Ser	Leu	Ser	Thr	Cys	Val	Leu	Gly	Lys	Leu	Ser	Gln	Asp	Leu
1				5					10					15	
His	Lys	Leu	Gln	Thr	Phe	Pro	Lys	Thr	Asp	Val	Gly	Ala	Asn	Ala	Pro
			20					25						30	

<210> 39

<211> 32

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chất có tác dụng giống calcitonin

<400> 39

Cys Ser Asn Leu Ser Thr Cys Met Leu Gly Arg Leu Ser Gln Asp Leu

1

5

10

15

His Arg Leu Gln Thr Phe Pro Lys Thr Asp Val Gly Ala Asn Ala Pro

20

25

30

<210> 40

<211> 32

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chất có tác dụng giống calcitonin

<400> 40

Cys Ala Ser Leu Ser Thr Cys Val Leu Gly Arg Leu Ser Gln Asp Leu

1

5

10

15

His Arg Leu Gln Thr Tyr Pro Arg Thr Asp Val Gly Ala Asn Ala Pro

20

25

30

<210> 41

<211> 32

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chất có tác dụng giống calcitonin

<400> 41

Cys Ala Ser Leu Ser Thr Cys Met Leu Gly Lys Leu Thr Gln Asp Leu

1

5

10

15

His Lys Leu Gln Thr Tyr Pro Arg Thr Asp Val Gly Ala Asn Ala Pro
 20 25 30

<210> 42

<211> 32

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chất có tác dụng giống calcitonin

<400> 42

Cys Ala Ser Leu Ser Thr Cys Val Leu Gly Lys Leu Ser Gln Asp Leu
 1 5 10 15
 His Lys Leu Gln Thr Tyr Pro Lys Thr Asp Val Gly Ala Asn Ala Pro
 20 25 30

<210> 43

<211> 32

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chất có tác dụng giống calcitonin

<400> 43

Cys Ser Asn Leu Ser Thr Cys Met Leu Gly Arg Leu Ser Gln Asp Leu
 1 5 10 15
 His Arg Leu Gln Thr Tyr Pro Lys Thr Asp Val Gly Ala Asn Ala Pro
 20 25 30

<210> 44

<211> 32

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chất có tác dụng giống calcitonin

<220>

<221> VỊ TRÍ

<222> 1

<223> Axetyl hóa

<220>

<221> VỊ TRÍ

<222> 32

<223> Amit hóa

<400> 44

Cys	Ser	Asn	Leu	Ser	Thr	Cys	Met	Leu	Gly	Arg	Leu	Ser	Gln	Asp	Leu
1				5					10					15	
His	Arg	Leu	Gln	Thr	Tyr	Pro	Lys	Thr	Asp	Val	Gly	Ala	Asn	Ala	Pro
			20					25					30		

<210> 45

<211> 32

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chất có tác dụng giống calcitonin

<220>

<221> VỊ TRÍ

<222> 15

<223> Xaa là Asp hoặc Glu

<220>

<221> VỊ TRÍ

<222> 22

<223> Xaa là Phe hoặc Tyr

<400> 45

Cys	Ala	Ser	Leu	Ser	Thr	Cys	Val	Leu	Gly	Arg	Leu	Ser	Gln	Xaa	Leu
1				5					10					15	

His Arg Leu Gln Thr Xaa Pro Lys Thr Asp Val Gly Ala Asn Ala Tyr
 20 25 30

<210> 46

<211> 32

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chất có tác dụng giống calcitonin

<220>

<221> VỊ TRÍ

<222> 15

<223> Xaa là Asp hoặc Glu

<220>

<221> VỊ TRÍ

<222> 22

<223> Xaa là Phe hoặc Tyr

<400> 46

Cys Ala Ser Leu Ser Thr Cys Met Leu Gly Lys Leu Thr Gln Xaa Leu
 1 5 10 15
 His Lys Leu Gln Thr Xaa Pro Lys Thr Asp Val Gly Ala Asn Ala Tyr
 20 25 30

<210> 47

<211> 32

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chất có tác dụng giống calcitonin

<220>

<221> VỊ TRÍ

<222> 15

<223> Xaa là Asp hoặc Glu

<220>

<221> VỊ TRÍ

<222> 22

<223> Xaa là Phe hoặc Tyr

<400> 47

Cys	Ala	Ser	Leu	Ser	Thr	Cys	Val	Leu	Gly	Lys	Leu	Ser	Gln	Xaa	Leu
1				5					10					15	
His	Lys	Leu	Gln	Thr	Xaa	Pro	Lys	Thr	Asp	Val	Gly	Ala	Asn	Ala	Tyr
			20					25					30		

<210> 48

<211> 32

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chất có tác dụng giống calcitonin

<220>

<221> VỊ TRÍ

<222> 15

<223> Xaa là Asp hoặc Glu

<220>

<221> VỊ TRÍ

<222> 22

<223> Xaa là Phe hoặc Tyr

<400> 48

Cys	Ser	Asn	Leu	Ser	Thr	Cys	Met	Leu	Gly	Arg	Leu	Ser	Gln	Xaa	Leu
1				5					10					15	
His	Arg	Leu	Gln	Thr	Xaa	Pro	Lys	Thr	Asp	Val	Gly	Ala	Asn	Ala	Tyr
			20					25					30		

<210> 49

<211> 32

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

 $\langle 220 \rangle$

<223> Chất có tác dụng giống calcitonin

 $\langle 220 \rangle$

<221> VỊ TRÍ

<222> 15

<223> Xaa là Asp hoặc Glu

 $\langle 220 \rangle$

<221> VỊ TRÍ

<222> 22

<223> Xaa là Phe hoặc Tyr

<400> 49

Cys Ala Ser Leu Ser Thr Cys Val Leu Gly Arg Leu Ser Gln Xaa Leu

1 5 10 15

His Arg Leu Gln Thr Xaa Pro Arg Thr Asp Val Gly Ala Asn Ala Tyr

20

25

30

<210> 50

$\langle 211 \rangle$ 32

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

 $\langle 220 \rangle$

<223> Chất có tác dụng giống calcitonin

 $\langle 220 \rangle$

<221> VỊ TRÍ

<222> 15

<223> Xaa là Asp hoặc Glu

 $\langle 220 \rangle$

<221> VỊ TRÍ

<222> 22

<223> Xaa là Phe hoặc Tyr

<400> 50

Cys	Ala	Ser	Leu	Ser	Thr	Cys	Met	Leu	Gly	Lys	Leu	Thr	Gln	Xaa	Leu
1				5					10					15	
His	Lys	Leu	Gln	Thr	Xaa	Pro	Arg	Thr	Asp	Val	Gly	Ala	Asn	Ala	Tyr
			20					25					30		

<210> 51

<211> 32

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chất có tác dụng giống calcitonin

<220>

<221> VỊ TRÍ

<222> 15

<223> Xaa là Asp hoặc Glu

<220>

<221> VỊ TRÍ

<222> 22

<223> Xaa là Phe hoặc Tyr

<400> 51

Cys	Ala	Ser	Leu	Ser	Thr	Cys	Val	Leu	Gly	Arg	Leu	Ser	Gln	Xaa	Leu
1				5					10					15	
His	Arg	Leu	Gln	Thr	Xaa	Pro	Lys	Thr	Asp	Val	Gly	Ala	Asn	Ala	Pro
			20					25					30		

<210> 52

<211> 32

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chất có tác dụng giống calcitonin

<220>

<221> VỊ TRÍ

<222> 15

<223> Xaa là Asp hoặc Glu

<220>

<221> VỊ TRÍ

<222> 22

<223> Xaa là Phe hoặc Tyr

<400> 52

Cys	Ala	Ser	Leu	Ser	Thr	Cys	Met	Leu	Gly	Lys	Leu	Thr	Gln	Xaa	Leu
1				5					10					15	
His	Lys	Leu	Gln	Thr	Xaa	Pro	Lys	Thr	Asp	Val	Gly	Ala	Asn	Ala	Pro
			20					25						30	

<210> 53

<211> 32

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chất có tác dụng giống calcitonin

<220>

<221> VỊ TRÍ

<222> 8

<223> Val hoặc Met

<220>

<221> VỊ TRÍ

<222> 11

<220>

<221> VỊ TRÍ

<222> 15

<223> Asp hoặc Glu

<220>

<221> VỊ TRÍ

<222> 18

<223> Lys hoặc Arg

<220>

<221> VỊ TRÍ

<222> 21

<223> Ser hoặc Thr

<220>

<221> VỊ TRÍ

<222> 22

<223> Phe hoặc Tyr

<220>

<221> VỊ TRÍ

<222> 24

<223> Lys hoặc Arg

<220>

<221> VỊ TRÍ

<222> 32

<223> Pro hoặc Tyr

<400> 53

Cys Ala Ser Leu Ser Thr Cys Xaa Leu Gly Xaa Leu Ser Gln Xaa Leu

1

5

10

15

His Xaa Leu Gln Xaa Xaa Pro Xaa Thr Asp Val Gly Ala Asn Ala Xaa

20

25

30

<210> 54

<211> 32

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chất có tác dụng giống calcitonin

<220>

<221> VỊ TRÍ

<222> 15

<223> Asp hoặc Glu

<220>

<221> VỊ TRÍ

<222> 22

<223> Phe hoặc Tyr

<400> 54

Cys	Ala	Ser	Leu	Ser	Thr	Cys	Met	Leu	Gly	Arg	Leu	Ser	Gln	Xaa	Leu
1				5					10					15	
His	Arg	Leu	Gln	Thr	Xaa	Pro	Lys	Thr	Asp	Val	Gly	Ala	Asn	Ala	Pro
			20					25					30		

<210> 55

<211> 32

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chất có tác dụng giống calcitonin

<220>

<221> VỊ TRÍ

<222> 15

<223> Asp hoặc Glu

<220>

<221> VỊ TRÍ

<222> 22

<223> Phe hoặc Tyr

<400> 55

Cys	Ala	Ser	Leu	Ser	Thr	Cys	Met	Leu	Gly	Lys	Leu	Thr	Gln	Xaa	Leu
1				5					10					15	
His	Lys	Leu	Gln	Thr	Xaa	Pro	Lys	Thr	Asp	Val	Gly	Ala	Asn	Ala	Pro
			20					25					30		

<210> 56

<211> 32

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

 $\langle 220 \rangle$

<223> Chất có tác dụng giống calcitonin

 $\langle 220 \rangle$

<221> VỊ TRÍ

<222> 15

<223> Asp hoặc Glu

 $\langle 220 \rangle$

<221> VỊ TRÍ

<222> 22

<223> Phy hoặc Tyr

<400> 56

Cys Ala Ser Leu Ser Thr Cys Val Leu Gly Lys Leu Ser Gln Xaa Leu

1

5

10

15

His Lys Leu Gln Thr Xaa Pro Arg Thr Asp Val Gly Ala Asn Ala Pro

20

25

30

<210> 57

<211> 32

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

 $\langle 220 \rangle$

<223> Chất có tác dụng giống calcitonin

 $\langle 220 \rangle$

<221> VỊ TRÍ

<222> 15

<223> Asp hoặc Glu

 $\langle 220 \rangle$

<221> VỊ TRÍ

<222> 22

<223> Phe hoặc Tyr

<400> 57

Cys	Ser	Asn	Leu	Ser	Thr	Cys	Val	Leu	Gly	Arg	Leu	Ser	Gln	Xaa	Leu
1				5					10					15	
His	Arg	Leu	Gln	Thr	Xaa	Pro	Lys	Thr	Asp	Val	Gly	Ala	Asn	Ala	Pro
			20					25					30		

<210> 58

<211> 32

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chất có tác dụng giống calcitonin

<220>

<221> VỊ TRÍ

<222> 15

<223> Asp hoặc Glu

<220>

<221> VỊ TRÍ

<222> 22

<223> Phe hoặc Tyr

<400> 58

Cys	Ala	Ser	Leu	Ser	Thr	Cys	Val	Leu	Gly	Lys	Leu	Ser	Gln	Xaa	Leu
1				5					10					15	
His	Lys	Leu	Gln	Ser	Xaa	Pro	Lys	Thr	Asp	Val	Gly	Ala	Asn	Ala	Pro
			20					25					30		

<210> 59

<211> 32

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chất có tác dụng giống calcitonin

<220>

<221> VỊ TRÍ

<222> 15

<223> Asp hoặc Glu

<220>

<221> VỊ TRÍ

<222> 22

<223> Phe hoặc Tyr

<400> 59

Cys	Ala	Ser	Leu	Ser	Thr	Cys	Val	Leu	Gly	Lys	Leu	Ser	Gln	Xaa	Leu
1				5					10					15	
His	Lys	Leu	Gln	Thr	Xaa	Pro	Lys	Thr	Asp	Val	Gly	Ala	Asn	Ala	Pro
			20					25						30	

<210> 60

<211> 32

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chất có tác dụng giống calcitonin

<400> 60

Cys	Ala	Ser	Leu	Ser	Thr	Cys	Val	Leu	Gly	Arg	Leu	Ser	Gln	Glu	Leu
1				5					10					15	
His	Arg	Leu	Gln	Ser	Phe	Pro	Arg	Thr	Asp	Val	Gly	Ala	Asn	Ala	Pro
			20					25						30	

<210> 61

<211> 32

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chất có tác dụng giống calcitonin

<400> 61

Cys	Ala	Ser	Leu	Ser	Thr	Cys	Met	Leu	Gly	Lys	Leu	Thr	Gln	Glu	Leu
1				5					10					15	
His	Lys	Leu	Gln	Ser	Phe	Pro	Arg	Thr	Asp	Val	Gly	Ala	Asn	Ala	Pro
			20					25					30		

<210> 62

<211> 32

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chất có tác dụng giống calcitonin

<400> 62

Cys	Ala	Ser	Leu	Ser	Thr	Cys	Val	Leu	Gly	Lys	Leu	Ser	Gln	Glu	Leu
1				5					10					15	
His	Lys	Leu	Gln	Ser	Phe	Pro	Lys	Thr	Asp	Val	Gly	Ala	Asn	Ala	Pro
			20					25					30		

<210> 63

<211> 32

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chất có tác dụng giống calcitonin

<400> 63

Cys	Ser	Asn	Leu	Ser	Thr	Cys	Met	Leu	Gly	Arg	Leu	Ser	Gln	Glu	Leu
1				5					10					15	
His	Arg	Leu	Gln	Ser	Phe	Pro	Lys	Thr	Asp	Val	Gly	Ala	Asn	Ala	Pro
			20					25					30		

<210> 64

<211> 32

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chất có tác dụng giống calcitonin

<400> 64

Cys	Ala	Ser	Leu	Ser	Thr	Cys	Val	Leu	Gly	Arg	Leu	Ser	Gln	Glu	Leu
1				5					10					15	
His	Arg	Leu	Gln	Ser	Tyr	Pro	Arg	Thr	Asp	Val	Gly	Ala	Asn	Ala	Pro
			20					25					30		

<210> 65

<211> 32

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chất có tác dụng giống calcitonin

<400> 65

Cys	Ala	Ser	Leu	Ser	Thr	Cys	Met	Leu	Gly	Lys	Leu	Thr	Gln	Glu	Leu
1				5					10					15	
His	Lys	Leu	Gln	Ser	Tyr	Pro	Arg	Thr	Asp	Val	Gly	Ala	Asn	Ala	Pro
			20					25					30		

<210> 66

<211> 32

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chất có tác dụng giống calcitonin

<400> 66

Cys	Ala	Ser	Leu	Ser	Thr	Cys	Val	Leu	Gly	Lys	Leu	Ser	Gln	Glu	Leu
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

1	5	10	15
His	Lys	Leu	Gln
Ser	Tyr	Pro	Lys
Thr	Asp	Val	Gly
Ala	Asn	Ala	Pro
20	25	30	

<210> 67

<211> 32

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chất có tác dụng giống calcitonin

<400> 67

Cys	Ser	Asn	Leu	Ser	Thr	Cys	Met	Leu	Gly	Arg	Leu	Ser	Gln	Glu	Leu
1			5						10					15	
His	Arg	Leu	Gln	Ser	Tyr	Pro	Lys	Thr	Asp	Val	Gly	Ala	Asn	Ala	Pro
20								25					30		

<210> 68

<211> 32

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chất có tác dụng giống calcitonin

<400> 68

Cys	Ala	Ser	Leu	Ser	Thr	Cys	Val	Leu	Gly	Arg	Leu	Ser	Gln	Asp	Leu
1				5					10					15	
His	Arg	Leu	Gln	Ser	Phe	Pro	Arg	Thr	Asp	Val	Gly	Ala	Asn	Ala	Pro
20								25					30		

<210> 69

<211> 32

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chất có tác dụng giống calcitonin

<400> 69

Cys	Ala	Ser	Leu	Ser	Thr	Cys	Met	Leu	Gly	Lys	Leu	Thr	Gln	Asp	Leu
1				5					10					15	
His	Lys	Leu	Gln	Ser	Phe	Pro	Arg	Thr	Asp	Val	Gly	Ala	Asn	Ala	Pro
			20					25						30	

<210> 70

<211> 32

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chất có tác dụng giống calcitonin

<400> 70

Cys	Ala	Ser	Leu	Ser	Thr	Cys	Val	Leu	Gly	Lys	Leu	Ser	Gln	Asp	Leu
1				5					10					15	
His	Lys	Leu	Gln	Ser	Phe	Pro	Lys	Thr	Asp	Val	Gly	Ala	Asn	Ala	Pro
			20					25						30	

<210> 71

<211> 32

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chất có tác dụng giống calcitonin

<400> 71

Cys	Ser	Asn	Leu	Ser	Thr	Cys	Met	Leu	Gly	Arg	Leu	Ser	Gln	Asp	Leu
1				5					10					15	
His	Arg	Leu	Gln	Ser	Phe	Pro	Lys	Thr	Asp	Val	Gly	Ala	Asn	Ala	Pro
			20					25						30	

<210> 72

<211> 32

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chất có tác dụng giống calcitonin

<400> 72

Cys	Ala	Ser	Leu	Ser	Thr	Cys	Val	Leu	Gly	Arg	Leu	Ser	Gln	Asp	Leu
1				5					10					15	
His	Arg	Leu	Gln	Ser	Tyr	Pro	Arg	Thr	Asp	Val	Gly	Ala	Asn	Ala	Pro
			20					25						30	

<210> 73

<211> 32

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chất có tác dụng giống calcitonin

<400> 73

Cys	Ala	Ser	Leu	Ser	Thr	Cys	Met	Leu	Gly	Lys	Leu	Thr	Gln	Asp	Leu
1				5					10					15	
His	Lys	Leu	Gln	Ser	Tyr	Pro	Arg	Thr	Asp	Val	Gly	Ala	Asn	Ala	Pro
			20					25						30	

<210> 74

<211> 32

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chất có tác dụng giống calcitonin

<400> 74

Cys	Ala	Ser	Leu	Ser	Thr	Cys	Val	Leu	Gly	Lys	Leu	Ser	Gln	Asp	Leu
1				5					10					15	
His	Lys	Leu	Gln	Ser	Tyr	Pro	Lys	Thr	Asp	Val	Gly	Ala	Asn	Ala	Pro
			20					25					30		

<210> 75

<211> 32

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chất có tác dụng giống calcitonin

<400> 75

Cys	Ser	Asn	Leu	Ser	Thr	Cys	Met	Leu	Gly	Arg	Leu	Ser	Gln	Asp	Leu
1				5					10					15	
His	Arg	Leu	Gln	Ser	Tyr	Pro	Lys	Thr	Asp	Val	Gly	Ala	Asn	Ala	Pro
			20					25					30		

<210> 76

<211> 32

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chất có tác dụng giống calcitonin

<400> 76

Cys	Ser	Asn	Leu	Ser	Thr	Cys	Val	Leu	Gly	Lys	Leu	Ser	Gln	Glu	Leu
1				5					10					15	
His	Lys	Leu	Gln	Thr	Tyr	Pro	Arg	Thr	Asp	Val	Gly	Ala	Asn	Ala	Pro
			20					25					30		

<210> 77

<211> 32

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chất có tác dụng giống calcitonin

<400> 77

Cys	Ala	Ser	Leu	Ser	Thr	Cys	Met	Leu	Gly	Arg	Leu	Ser	Gln	Asp	Leu
1				5					10				15		
His	Arg	Leu	Gln	Thr	Tyr	Pro	Lys	Thr	Asp	Val	Gly	Ala	Asn	Ala	Pro
			20					25					30		

<210> 78

<211> 32

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chất có tác dụng giống calcitonin

<220>

<221> MOD_RES

<222> 1

<223> Axetyl hóa

<220>

<221> MOD_RES

<222> 32

<223> Amit hóa

<400> 78

Cys	Ala	Ser	Leu	Ser	Thr	Cys	Val	Leu	Gly	Lys	Leu	Ser	Gln	Asp	Leu
1				5					10				15		
His	Lys	Leu	Gln	Ser	Tyr	Pro	Lys	Thr	Asp	Val	Gly	Ala	Asn	Ala	Pro
			20					25					30		

<210> 79

<211> 32

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chất có tác dụng giống calcitonin

<220>

<221> MOD_RES

<222> 1

<223> Axetyl hóa

<220>

<221> MOD_RES

<222> 32

<223> Amit hóa

<400> 79

Cys	Ala	Ser	Leu	Ser	Thr	Cys	Val	Leu	Gly	Lys	Leu	Ser	Gln	Glu	Leu
1				5					10					15	
His	Lys	Leu	Gln	Thr	Phe	Pro	Lys	Thr	Asp	Val	Gly	Ala	Asn	Ala	Pro
			20					25					30		

<210> 80

<211> 32

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chất có tác dụng giống calcitonin

<220>

<221> MOD_RES

<222> 1

<223> Axetyl hóa

<220>

<221> MOD_RES

<222> 32

<223> Amit hóa

<400> 80

Cys	Ala	Ser	Leu	Ser	Thr	Cys	Val	Leu	Gly	Lys	Leu	Ser	Gln	Asp	Leu
1				5					10					15	
His	Lys	Leu	Gln	Thr	Tyr	Pro	Lys	Thr	Asp	Val	Gly	Ala	Asn	Ala	Pro
			20					25					30		

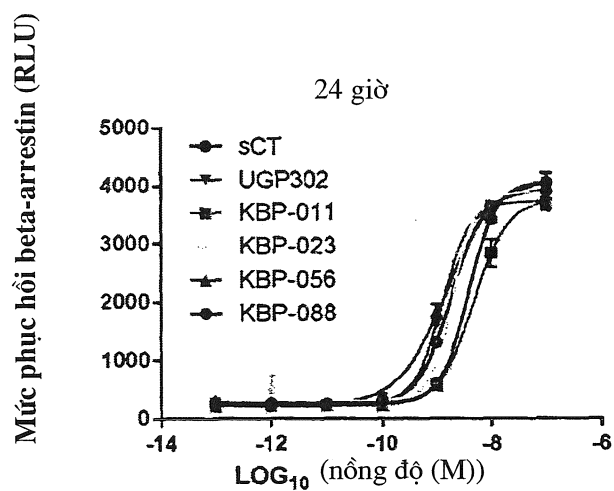
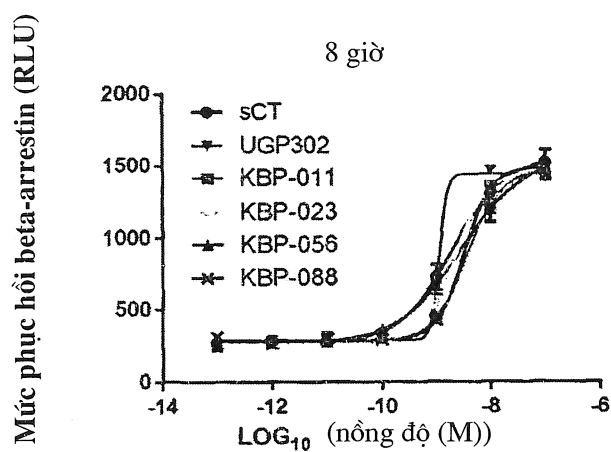
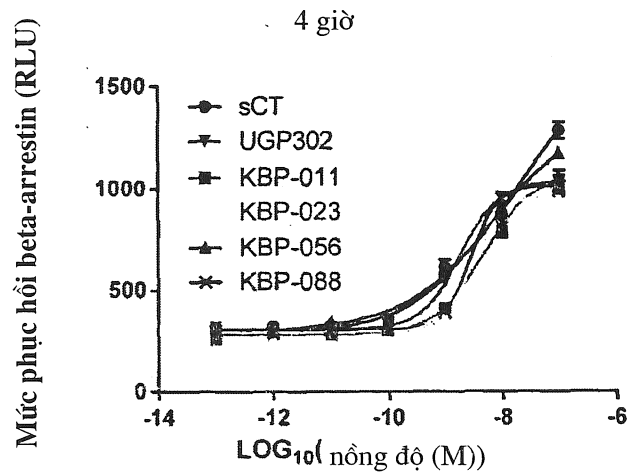


Fig.1

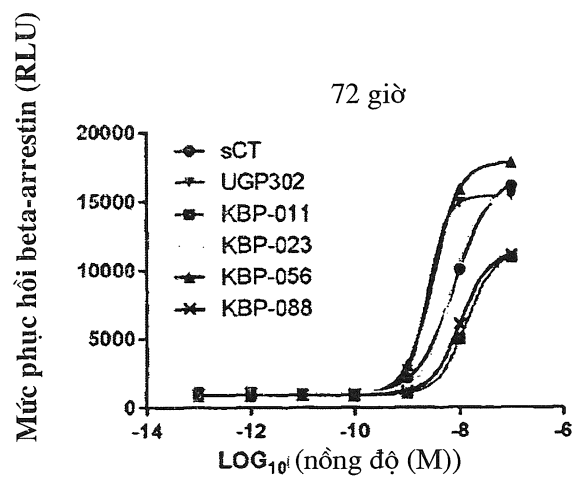
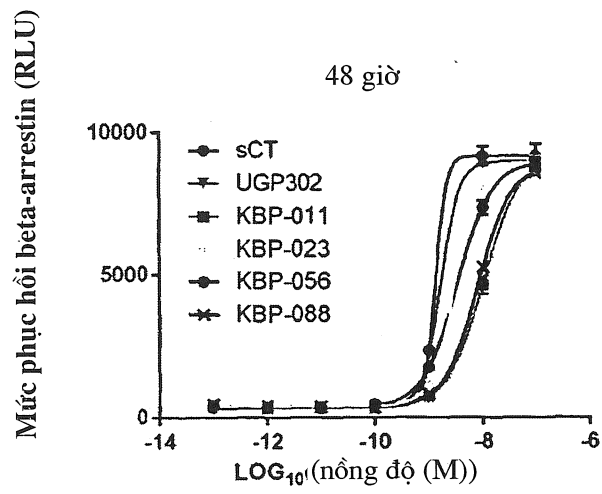


Fig.1 (tiếp)

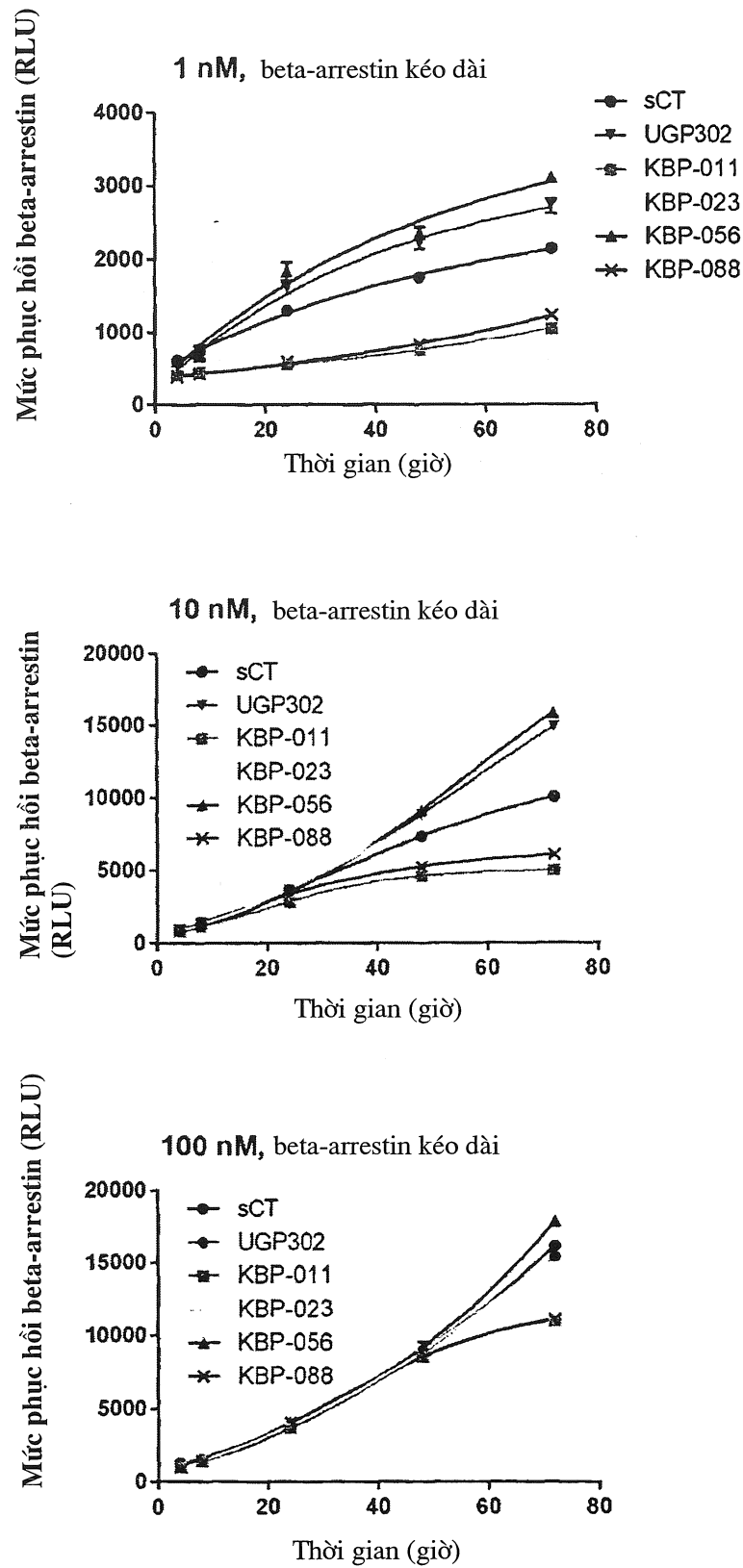


Fig.2

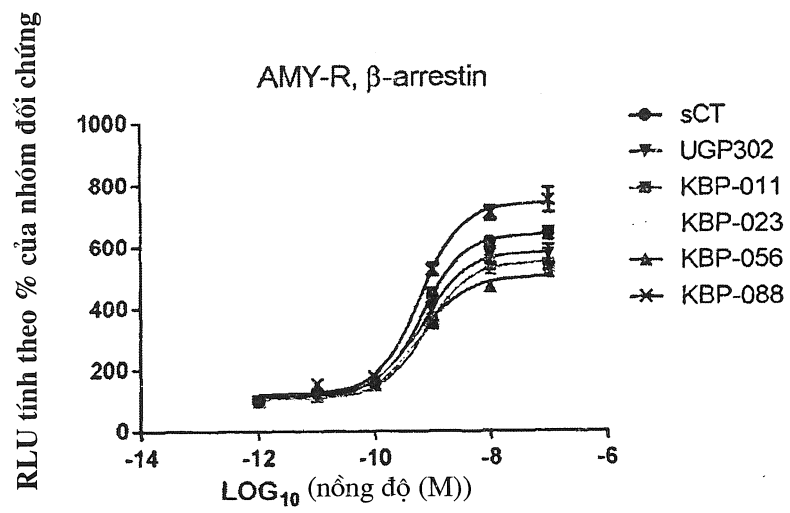
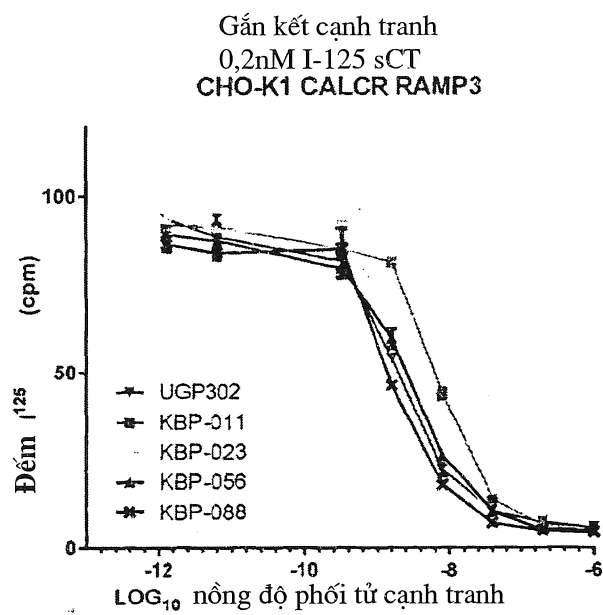
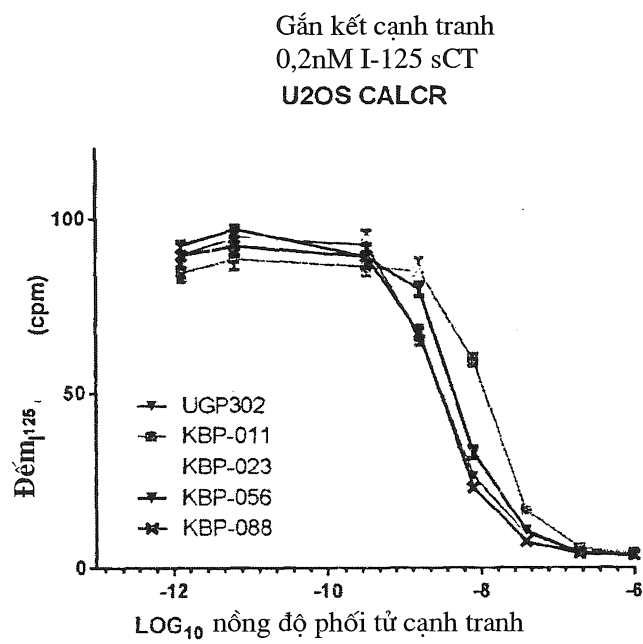


Fig.3



pIC50	UGP302	KBP-011	KBP-023	KBP-056	KBP-088
CTR	8,49	7,90	8,29	8,31	8,49
AMY-R	8,69	8,15	8,50	8,53	8,76

Fig.4

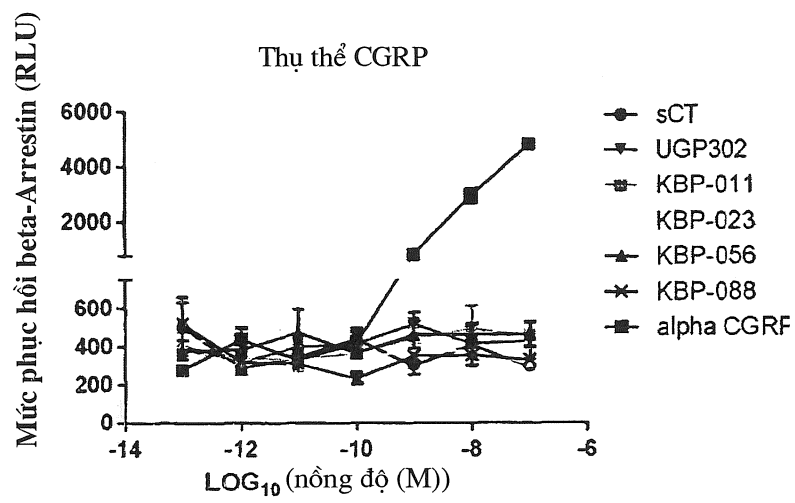


Fig.5

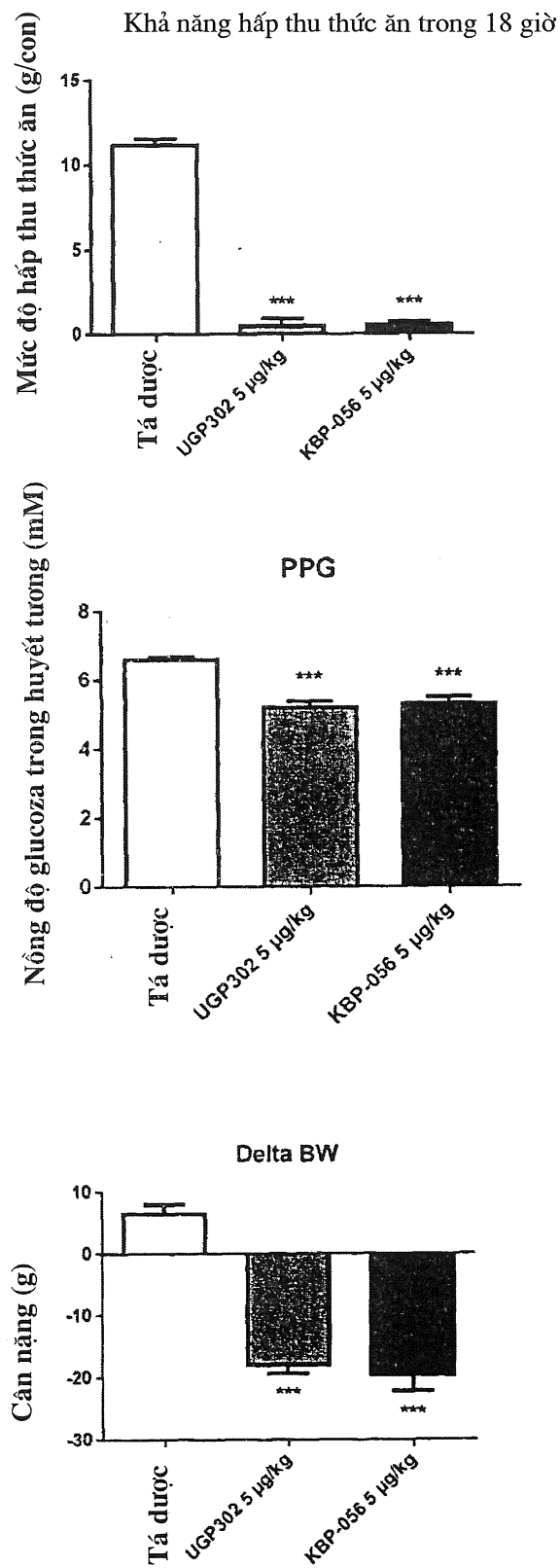


Fig.6

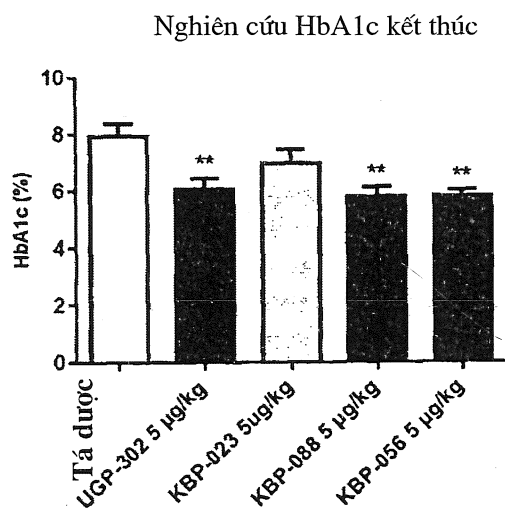
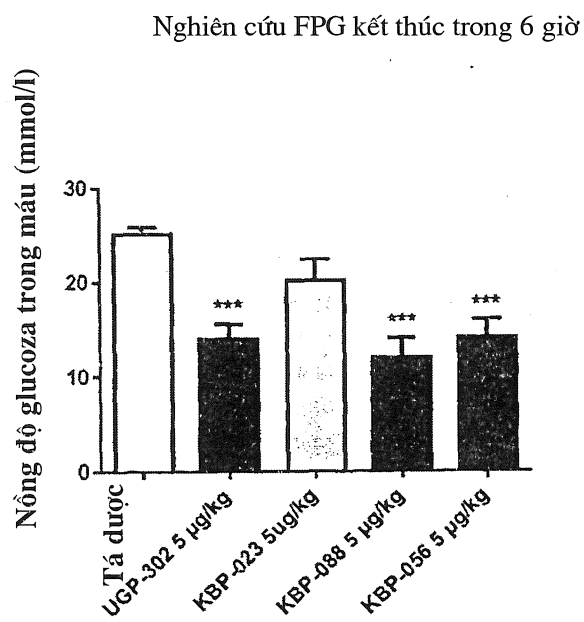


Fig.7

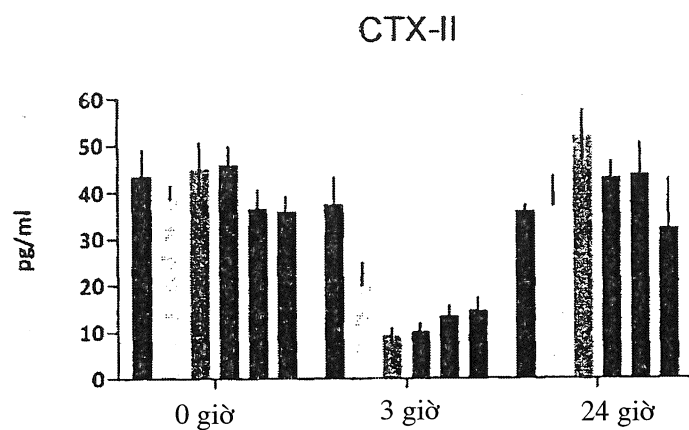
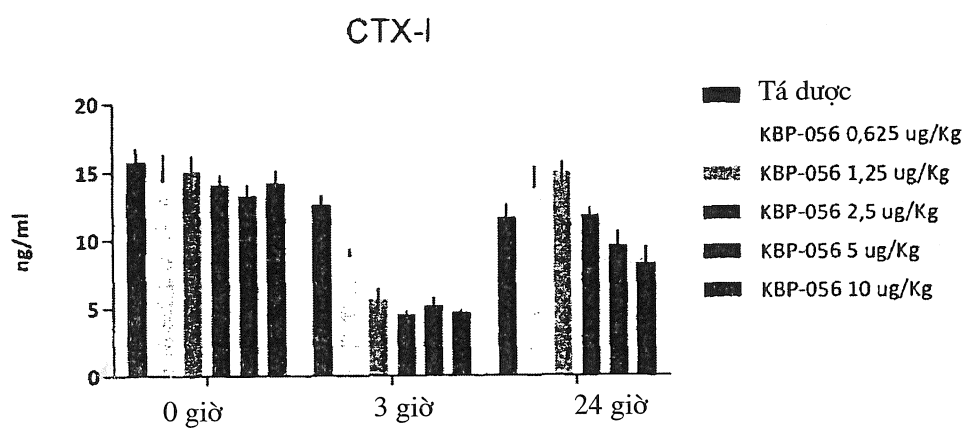


Fig.8

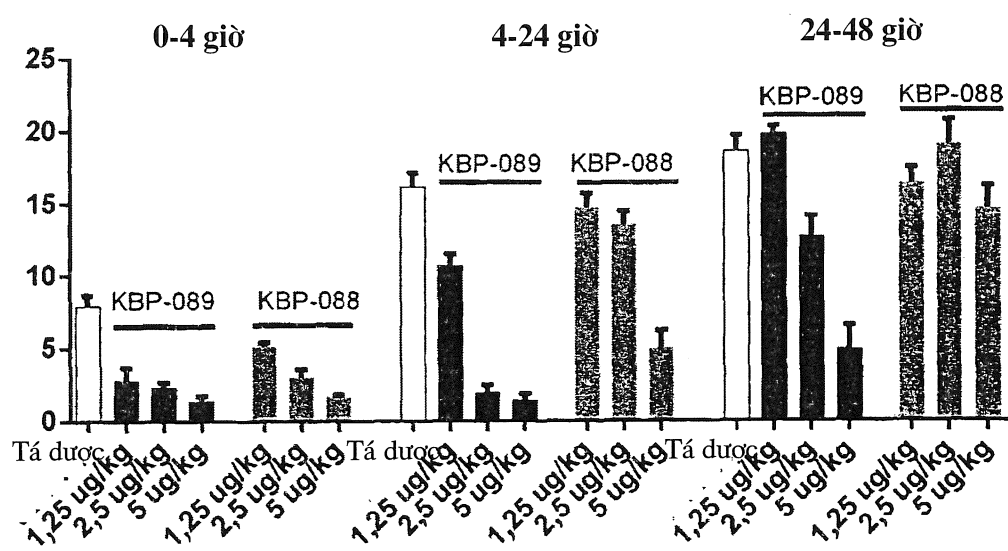


Fig.9

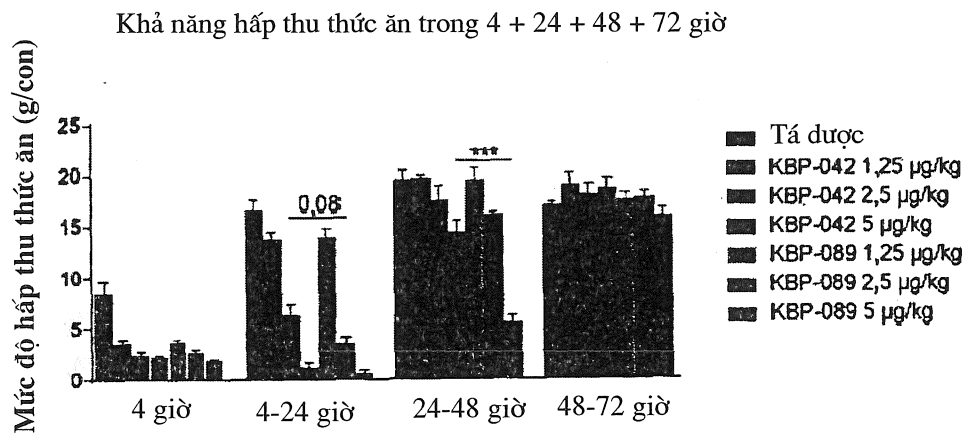


Fig.10

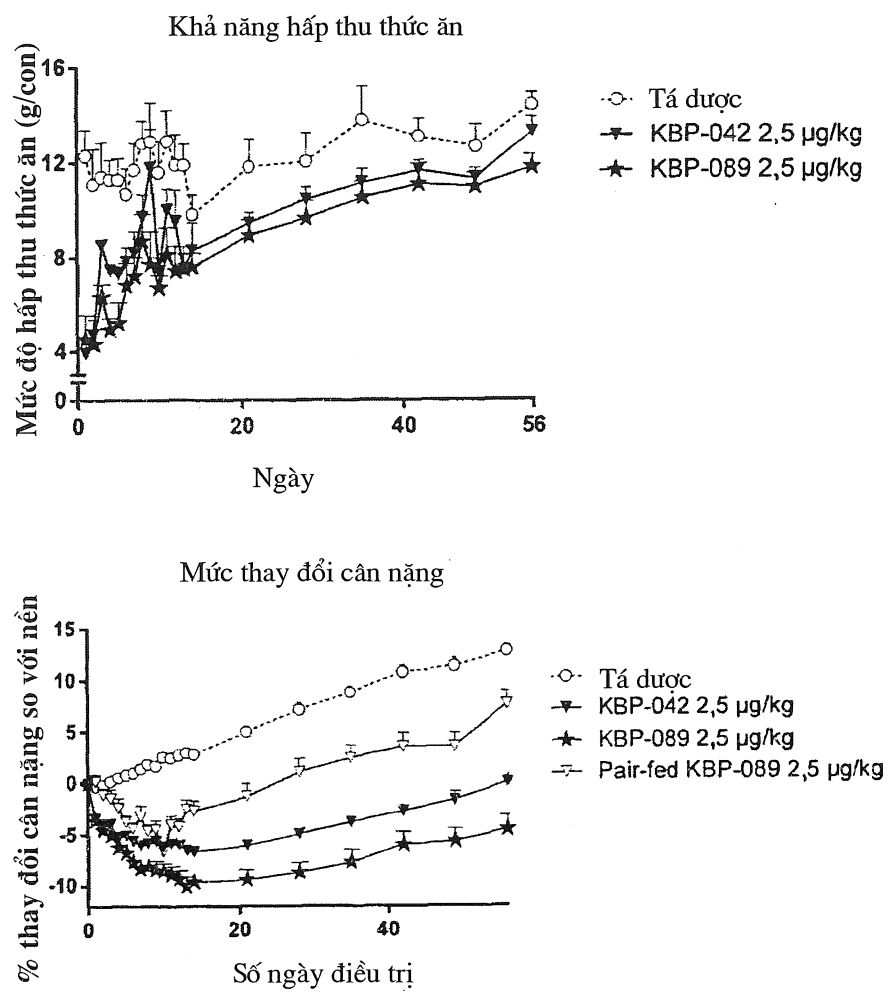


Fig.11

A

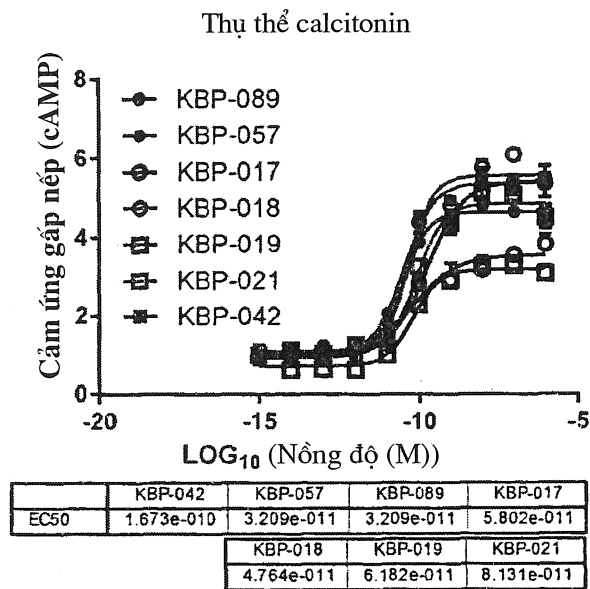


Fig.12A

B

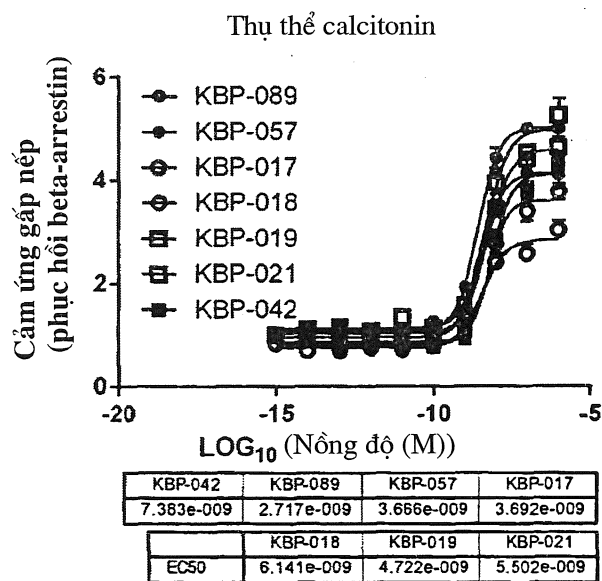


Fig.12B

C

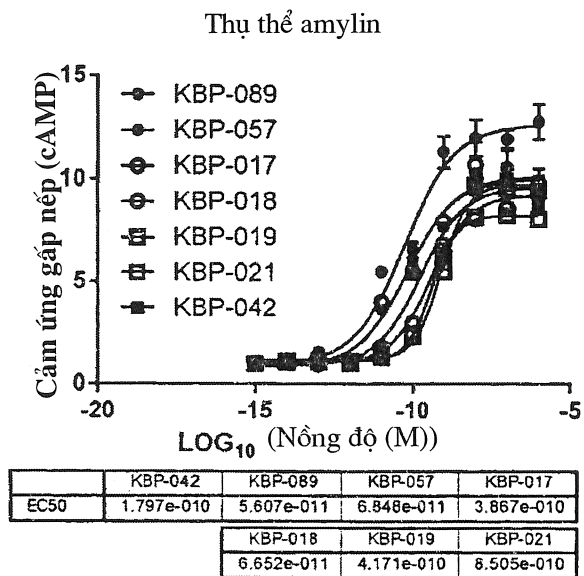


Fig.12C

D

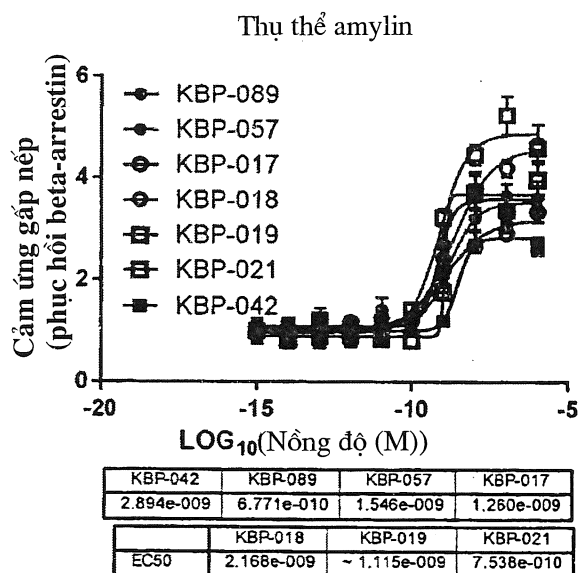
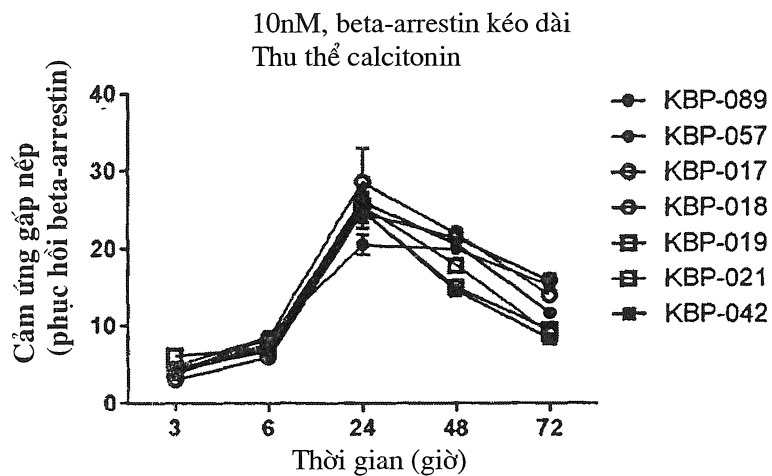


Fig.12D

E



KBP-042	KBP-089	KBP-057	KBP-017	KBP-018	KBP-019	KBP-021
52,89	62,13	59,16	61,50	66,04	53,59	58,08

Fig.12E

F

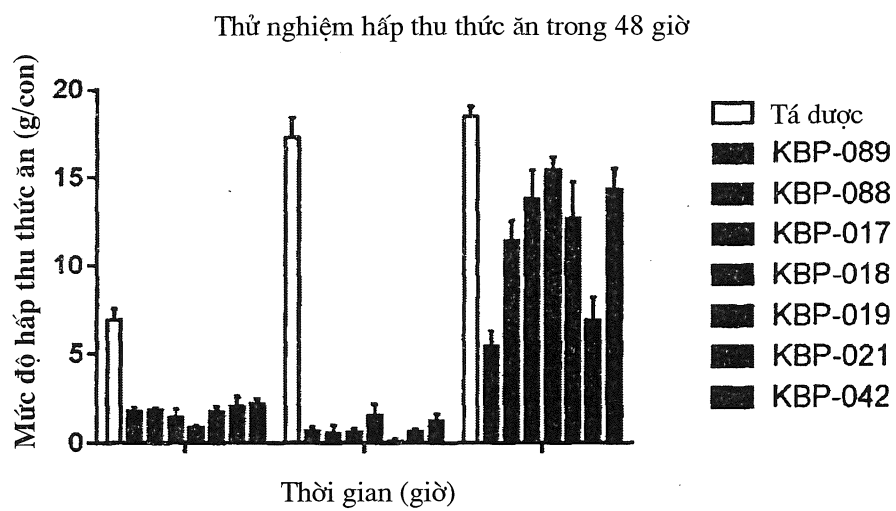


Fig.12F