



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

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

(11)



1-0036040

(51)⁸ A61K 38/26; C07K 14/605

(13) B

(21) 1-2018-01694

(22) 14/10/2016

(86) PCT/US2016/056969 14/10/2016

(87) WO2017/074715 04/05/2017

(30) 62/246,199 26/10/2015 US

(45) 26/06/2023 423

(43) 25/07/2018 364A

(73) ELANCO US INC. (US)

c/o ELI LILLY AND COMPANY, Lilly Corporate Center, Indianapolis, Indiana
46285, United States of America

(72) COSKUN, Tamer (US); ALSINA-FERNANDEZ, Jorge (US).

(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) CHẤT CHỦ VẬN THỤ THỂ GLUCAGON VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA CHẤT CHỦ VẬN NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến hợp chất với khoảng thời gian tác dụng kéo dài ở thụ thể glucagon so với glucagon tự nhiên. Cụ thể, sáng chế đề xuất chất chủ vận thụ thể glucagon với các cải biến về mặt cấu trúc đối với glucagon tự nhiên được đưa vào để chủ vận chọn lọc thụ thể glucagon trong khoảng thời gian kéo dài. Sáng chế cũng đề cập đến tổ hợp chứa chất chủ vận này và dược phẩm chứa chất chủ vận hoặc tổ hợp này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến hợp chất với khoảng thời gian tác dụng kéo dài ở thụ thể glucagon so với glucagon tự nhiên. Cụ thể, sáng chế đề xuất chất chủ vận thụ thể glucagon với các cải biến về mặt cấu trúc đối với glucagon tự nhiên được đưa vào để chủ vận chọn lọc thụ thể glucagon trong khoảng thời gian kéo dài. Chất chủ vận thụ thể glucagon có thể hữu hiệu cả khi kết hợp với các chất trị liệu khác để điều trị các rối loạn như bệnh tiểu đường typ 2 (type 2 diabetes mellitus - T2DM) và/hoặc bệnh béo phì, hoặc dưới dạng đơn trị liệu để điều trị nhiều rối loạn, như bệnh béo phì, bệnh gan nhiễm mỡ không do rượu (non-alcoholic fatty liver disease - NAFLD), bệnh viêm gan nhiễm mỡ không do rượu (non-alcoholic steatohepatitis - NASH), rối loạn mỡ máu, hội chứng chuyển hóa, tăng insulin huyết và/hoặc hạ đường huyết ban đêm, cũng như là hội chứng gan nhiễm mỡ ở bò sữa.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Trong vài thập kỷ qua, tỷ lệ mắc bệnh tiểu đường tiếp tục gia tăng. T2DM là dạng phổ biến nhất trong các bệnh tiểu đường chiếm xấp xỉ 90% trong tất cả các bệnh tiểu đường. T2DM được phân biệt bởi mức glucoza trong máu cao do sự kháng insulin. Tiêu chuẩn chăm sóc hiện nay đối với T2DM bao gồm chế độ ăn và tập luyện, và điều trị bằng thuốc dùng qua đường miệng, và các thuốc làm giảm glucoza có thể tiêm được, bao gồm các liệu pháp trên cơ sở incretin, như chất chủ vận thụ thể peptit-1 tương tự glucagon (GLP-1) và chất ức chế dipeptidyl peptidaza IV (DPP-IV). Khi điều trị bằng thuốc dùng qua đường miệng và các liệu pháp trên cơ sở incretin là không đủ, việc điều trị bằng insulin được xem xét. Các bệnh nhân mà bệnh của họ đã tiến triển đến mức cần dùng liệu pháp insulin thường bắt đầu bằng việc tiêm một lần mỗi ngày insulin cơ bản có tác dụng kéo dài, mặc dù có thể tiêm thêm insulin tác dụng nhanh trong khi ăn, nếu cần, trong một số trường hợp.

Mặc dù những liệu pháp này là có hiệu lực, mức đường huyết ở nhiều bệnh nhân mắc T2DM vẫn được kiểm soát một cách chưa thỏa đáng. Bệnh tiểu đường không được kiểm soát dẫn đến một số tình trạng bệnh ảnh hưởng đến tình trạng bệnh tật và tỷ lệ tử vong của bệnh nhân. Một trong số các yếu tố nguy cơ chính đối với T2DM là béo phì. Phần lớn các bệnh nhân T2DM (~90%) là quá cân hoặc béo phì. Đã chứng minh được rằng giảm sự phát phì cơ thể sẽ dẫn đến cải thiện các tình trạng bệnh tật xảy ra đồng thời có liên quan đến béo phì bao gồm các trường hợp tăng glucoza huyết và các trường hợp tim mạch. Vì vậy, các liệu pháp hữu hiệu trong điều chỉnh mức glucoza và giảm thể trọng là cần thiết để kiểm soát bệnh tốt hơn.

Ngoài ra, sự lan rộng và nhận biết bệnh gan nhiễm mỡ không do rượu (nonalcoholic fatty liver disease - NAFLD) – đề cập đến cụm các rối loạn ở gan có liên quan đến sự tích tụ chất béo trong gan, và bệnh viêm gan nhiễm mỡ không do rượu (NASH) – mà nó là dạng nghiêm trọng của NAFLD, được đặc trưng bởi các phát hiện ở mô như sự viêm, sự thương tổn và xơ hóa tế bào gan, cũng đã tiếp tục gia tăng. NASH là bệnh gan thường gặp nhất ở các nước phương Tây, và ảnh hưởng đến khoảng 3-5% người trưởng thành ở Mỹ. Việc điều trị thường bao gồm sự thay đổi chế độ ăn và tập luyện theo quy định, và có thể bao gồm phẫu thuật béo phì, liệu pháp pioglitazone, statin, omega 3 và vitamin E (trong trường hợp bệnh nhân NASH không béo phì) để làm giảm mỡ trong gan, nhưng không có chất trị liệu nào được phê chuẩn để điều trị sự viêm và/hoặc xơ hóa có liên quan đến NASH. Vì vậy, cần có các phương pháp trị liệu khác.

Một vài peptit có sẵn và/hoặc đang phát triển để làm tác nhân trị liệu, bao gồm glucagon, được tạo dẫn xuất từ pre-proglucagon, là polypeptit được xử lý trong mô để tạo thành vài peptit có liên quan về mặt cấu trúc. Glucagon là peptit gồm 29 axit amin tương ứng với các axit amin từ 53 đến 81 của pre-proglucagon, có trình tự axit amin sau đây: HSQGTFTSDYSKYLDSSRAQDFVQWLMNT (SEQ ID NO: 1). Glucagon giúp duy trì mức glucoza trong máu bằng cách gắn kết với và hoạt hóa thụ thể glucagon trên tế bào gan, khiến cho gan giải phóng glucoza - đã được dự trữ ở dạng glycogen – thông qua quá trình được gọi là phân giải glycogen. Khi những lượng dự trữ glycogen trở nên suy kiệt, glucagon kích thích gan tổng hợp tiếp

glucoza bằng cách kích thích tạo glucoza. Glucoza này được giải phóng vào dòng máu, ngăn ngừa sự hạ đường huyết. Việc sử dụng glucagon là phương pháp trị liệu đã được thiết lập để điều trị giảm đường huyết cấp tính, và việc sử dụng glucagon khẩn cấp có thể phục hồi mức đường thông thường trong vòng vài phút sử dụng. Một số chất tương tự glucagon đã được mô tả là có độ hòa tan và độ ổn định gia tăng. Xem, chẳng hạn, WO2015094875; WO2015094876; WO2015094878,

Các peptit khác được tạo dẫn xuất từ pre-proglucagon bao gồm GLP-1, peptit 2 tương tự glucagon (GLP-2), và oxyntomodulin (OXM). GLP-1 là peptit gồm 36 axit amin, đoạn có hoạt tính sinh học chính của nó (GLP-1₇₋₃₆) được sản xuất dưới dạng peptit gồm 30 axit amin được amid hóa ở đầu tận cùng C tương ứng với các axit amin từ 98 đến 127 của pre-proglucagon, có trình tự axit amin sau đây: HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGR (SEQ ID NO: 2). Nhưng ngược lại, glucagon kích thích sự giải phóng glucoza để ngăn ngừa hạ đường huyết, GLP-1 (SEQ ID NO: 2) kích thích sự tổng hợp và tiết insulin và đã được nhận thấy là ngăn ngừa sự tăng đường huyết ở bệnh tiểu đường. Nhiều chất tương tự GLP-1 hiện có sẵn, bao gồm exenatide, liraglutide, albiglutide và dulaglutide.

OXM là peptit gồm 37 axit amin bao gồm toàn bộ trình tự gồm 29 axit amin của glucagon với một đoạn mở rộng octapeptit ở đầu tận cùng carboxy (các axit amin từ 82 đến 89 của pre-proglucagon và được gọi là “peptide 1 xen giữa” hoặc IP-1), có trình tự axit amin sau đây: HSQGTFTSDYSKYLDSSRAQDFVQWLMNTKRNRNNIA (SEQ ID NO: 3). OXM hoạt hóa cả thụ thể glucagon và GLP-1, với khả năng hoạt hóa đối với thụ thể glucagon cao hơn một chút so với thụ thể GLP-1. Chất tương tự OXM có hoạt tính kép đối với thụ thể glucagon và thụ thể GLP-1 đã được mô tả. Xem, ví dụ, WO2011087672; WO2011087671.

Mặc dù không được tạo dẫn xuất từ pre-proglucagon, polypeptit kích thích tiết insulin phụ thuộc vào glucoza (glucose-dependent insulintropic polypeptide - GIP) là một peptit khác đóng vai trò sinh lý trong cân bằng glucoza nội môi bằng cách kích thích tiết insulin từ tế bào beta ở tụy với sự có mặt của glucoza. GIP là peptit gồm 42 axit amin có trình tự axit amin sau đây:

YAEGTFISDYSIAMDKIHQQDFVNWLLAQKGKKNDWKHNITQ (SEQ ID NO: 4). Một số chất tương tự GIP đã được mô tả là có hoạt tính đối với cả thụ thể GIP và thụ thể GLP-1, *Xem*, ví dụ, WO2015067715; WO2011119657; WO2013164483,

Ngoài ra, tương tự như hoạt tính kép của OXM được mô tả ở trên, một số chất tương tự glucagon đã được mô tả là có hoạt tính đồng chủ vận đối với cả thụ thể glucagon và một hoặc nhiều thụ thể GLP-1 hoặc GIP. Ví dụ, WO2011075393 và WO 2012177444, có ý mô tả chất tương tự glucagon có hoạt tính ở cả thụ thể glucagon và thụ thể GLP-1. Tương tự, WO2013192130 có ý mô tả chất tương tự glucagon cũng có hoạt tính ở thụ thể GIP. Ngoài ra, WO2015067716 có ý mô tả chất tương tự có hoạt tính chủ vận ba ở mỗi thụ thể trong số các thụ thể glucagon, GLP-1 và GIP.

Mặc dù nhiều peptit và protein được đề xuất dùng làm chất trị liệu T2DM và/hoặc bệnh béo phì, các chất trị liệu hiện có và/hoặc đang được phát triển có những hạn chế. Cụ thể là, trong khi các chất chủ vận kép hoặc chủ vận ba được mô tả ở trên có thể được chỉ ra là có các đặc tính giảm glucoza của cả chất chủ vận thụ thể GLP-1 và/hoặc GIP cùng với các lợi ích chuyển hóa của chất chủ vận thụ thể glucagon, mức hoạt tính của các peptit như vậy ở mỗi thụ thể khác nhau mà chúng chủ vận là cố định, khiến cho nó khó đạt được mức cân bằng hoạt tính thụ thể lý tưởng để thu được hiệu quả cao, *in vivo*, với tác dụng phụ tối thiểu. Và các liệu pháp mà không liên quan đến sự chủ vận thụ thể glucagon không có các lợi ích chuyển hóa tiềm năng của cơ chế tác dụng như vậy.

Mặc dù việc dùng đồng thời glucagon về mặt lý thuyết có thể có khả năng làm giảm bớt hạn chế này, các sản phẩm glucagon hiện có là không thể dùng được trong những ứng dụng như vậy. Cụ thể, thời gian bán thải trong huyết tương của glucagon là ngắn hơn một giờ, khiến cho nó không thể sử dụng thường xuyên, đặc biệt là trong các phương án mà có sự phối hợp với các liệu pháp khác sẵn có và/hoặc đang phát triển, do nhiều liệu pháp như vậy được định liều không thường xuyên như một lần mỗi ngày, và một số trong chúng được đề xuất để định liều không thường xuyên như một lần một tuần. Ngoài ra, glucagon kiểu hoang cũng có hoạt tính ở mức nào đó đối với thụ thể GLP-1, mà nó có thể làm phức tạp hơn những nỗ lực để tạo ra

sự cân bằng thích hợp giữa hoạt tính đối với thụ thể glucagon và hoạt tính đối với thụ thể GLP-1 trong các liệu pháp kết hợp mà ở đó hợp chất khác có hoạt tính của nó đối với thụ thể GLP-1 là giảm. Hơn nữa, các đặc tính độ hòa tan và độ ổn định hóa học và vật lý của các sản phẩm glucagon hiện có cũng không thích hợp để dùng thường xuyên trong những ứng dụng này, và sẽ không cho phép bào chế đồng thời với các chất trị liệu khác.

Vì vậy, cần có các chất chủ vận thụ thể glucagon có khoảng tác động kéo dài cho phép định liều không thường xuyên như một lần mỗi ngày, ba lần một tuần, hai lần một tuần hoặc một lần một tuần. Cũng cần có các chất chủ vận thụ thể glucagon mà có hoạt tính tiềm năng ở thụ thể glucagon, và hoạt tính chọn lọc ở mức cao ở thụ thể glucagon so với thụ thể GLP-1. Cũng cần có chất chủ vận thụ thể glucagon với các đặc tính thích hợp để bào chế đồng thời được với các chất trị liệu khác. Cũng cần có chất chủ vận thụ thể glucagon với các đặc tính về độ hòa tan và độ ổn định cho phép bảo quản và sử dụng trong thời gian dài.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Chất chủ vận thụ thể glucagon theo sáng chế tìm cách đáp ứng những nhu cầu này. Vì vậy, sáng chế đề xuất chất chủ vận thụ thể glucagon với khoảng thời gian tác dụng kéo dài, cho phép định liều không thường xuyên như một lần mỗi ngày, ba lần một tuần, hai lần một tuần hoặc một lần một tuần. Sáng chế đề xuất chất chủ vận thụ thể glucagon với hoạt tính chọn lọc và tối ưu ở thụ thể glucagon so với, ví dụ, thụ thể GLP-1 và/hoặc GIP. Sáng chế đề xuất chất chủ vận thụ thể glucagon có các đặc tính vật lý và hóa học thích hợp để dùng thường xuyên và đồng bào chế với các chất điều trị khác. Sáng chế đề xuất chất chủ vận thụ thể glucagon mà, khi được sử dụng kết hợp với các phương pháp điều trị tiểu đường khác, tạo ra sự kiểm soát glucoza gia tăng, các lợi ích chuyển hóa, như làm giảm thể trọng, và/hoặc các lợi ích đối với lipid, như làm giảm PCSK9, khi được sử dụng kết hợp với các phương pháp điều trị tiểu đường khác. Cụ thể, tổ hợp gồm chất chủ vận thụ thể glucagon theo sáng chế với chất chủ vận GLP-1R hoặc chất đồng chủ vận GIP-GLP-1 có tác dụng hiệp đồng có lợi đối với các số đo như mức giảm trọng lượng và thành phần cơ thể. Sáng chế cũng tìm cách đề xuất các phương pháp điều trị hữu hiệu cho các rối loạn khác khi được

dùng ở dạng đơn trị và/hoặc phối hợp với các phương pháp trị liệu khác, bao gồm bệnh béo phì, NAFLD, NASH, rối loạn mỡ máu, rối loạn chuyển hóa, tăng insulin huyết và/hoặc hạ đường huyết ban đêm.

Do đó, theo một phương án, sáng chế đề xuất chất chủ vận thụ thể glucagon bao gồm công thức I:



trong đó

X_1 là Aib;

X_2 là T hoặc L;

X_3 là Aib;

X_4 là K được cải biến hóa học nhờ sự liên hợp với nhóm epsilon-amino của mạch bên K với $[(2-(2\text{-Amino-etoxy})\text{-etoxy})\text{-axetyl}]_2\text{-(}\gamma\text{Glu)}_a\text{-CO-(CH}_2)_b\text{-CO}_2\text{H}$, trong đó a bằng 1 hoặc 2 và b bằng 14 đến 24;

X_5 là E hoặc A;

X_6 là T hoặc E;

X_7 không có mặt hoặc là peptit được chọn từ nhóm gồm GPSSGAPPPS và GPSSG;

và axit amin đầu tận cùng C tùy ý được amit hóa (SEQ ID NO: 5);

hoặc muối được dụng của nó.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất chất chủ vận thụ thể glucagon bao gồm công thức chứa công thức I:



trong đó

X_1 là Aib;

X_2 là T hoặc L;

X_3 là Aib;

X₄ là K được cải biến hóa học nhờ sự liên hợp với nhóm epsilon-amino của mạch bên K với ([2-(2-Amino-etoxy)-etoxy]-axetyl)₂-(γGlu)_a-CO-(CH₂)_b-CO₂H, trong đó a bằng 1 hoặc 2 và b bằng 14 đến 24;

X₅ là E hoặc A;

X₆ là T hoặc E;

X₇ không có mặt hoặc là peptit được chọn từ nhóm gồm GPSSGAPPPS và GPSSG;

và axit amin đầu tận cùng C tùy ý được amit hóa (SEQ ID NO: 5);

hoặc muối được dụng của nó.

Một phương án khác của sáng chế đề xuất chất chủ vận thụ thể glucagon bao gồm công thức I:

YX₁QGTFX₂SDYSKYLDX₃KKAX₄EFVX₅WLLEX₆X₇ [Công thức I]

trong đó

X₁ là Aib;

X₂ là T hoặc L;

X₃ là Aib;

X₄ là K được cải biến hóa học nhờ sự liên hợp với nhóm epsilon-amino của mạch bên K với ([2-(2-Amino-etoxy)-etoxy]-axetyl)₂-(γGlu)_a-CO-(CH₂)_b-CO₂H, trong đó a bằng 1 hoặc 2 và b bằng 14 đến 24;

X₅ là E hoặc A;

X₆ là T hoặc E;

X₇ không có mặt hoặc là peptit được chọn từ nhóm gồm GPSSGAPPPS và GPSSG;

và axit amin đầu tận cùng C tùy ý được amit hóa (SEQ ID NO: 5);

hoặc muối được dụng của nó.

Theo các phương án nhất định, chất chủ vận thụ thể glucagon có công thức cấu tạo I trong đó X_2 là T. Theo các phương án nhất định, chất chủ vận thụ thể glucagon có công thức cấu tạo I trong đó X_2 là L.

Theo các phương án nhất định, chất chủ vận thụ thể glucagon có cấu tạo bất kỳ trong số các phương án nêu trên trong đó X_5 là E. Theo các phương án nhất định, chất chủ vận thụ thể glucagon có cấu tạo bất kỳ trong số các phương án nêu trên trong đó X_5 là A.

Theo các phương án nhất định, chất chủ vận thụ thể glucagon có cấu tạo bất kỳ trong số các phương án nêu trên trong đó X_6 là T. Theo các phương án nhất định, chất chủ vận thụ thể glucagon có cấu tạo bất kỳ trong số các phương án nêu trên trong đó X_6 là E.

Theo các phương án nhất định, chất chủ vận thụ thể glucagon có cấu tạo bất kỳ trong số các phương án nêu trên trong đó X_7 là GPSSGAPPPS. Theo các phương án nhất định, chất chủ vận thụ thể glucagon có cấu tạo bất kỳ trong số các phương án nêu trên trong đó X_7 là GPSSG. Theo các phương án nhất định, chất chủ vận thụ thể glucagon có cấu tạo bất kỳ trong số các phương án nêu trên trong đó X_7 không có mặt.

Theo các phương án nhất định, chất chủ vận thụ thể glucagon có cấu tạo bất kỳ trong số các phương án nêu trên trong đó b bằng 16 đến 20. Theo các phương án nhất định, chất chủ vận thụ thể glucagon có cấu tạo bất kỳ trong số các phương án nêu trên trong đó b bằng 16 đến 18. Theo các phương án nhất định, chất chủ vận thụ thể glucagon có cấu tạo bất kỳ trong số các phương án nêu trên trong đó b bằng 16, Theo các phương án nhất định, chất chủ vận thụ thể glucagon có cấu tạo bất kỳ trong số các phương án nêu trên trong đó b bằng 18.

Theo các phương án nhất định, chất chủ vận thụ thể glucagon có công thức cấu tạo I trong đó: X_2 là T; a bằng 2; b bằng 16; X_5 là E; X_6 là T; và X_7 là GPSSGAPPPS; và trong đó axit amin đầu tận cùng C được amit hóa ở dạng amit bậc một có đầu tận cùng C (SEQ ID NO: 6).

Theo các phương án nhất định, chất chủ vận thụ thể glucagon có công thức cấu tạo I trong đó: X₂ là T; a bằng 2; b bằng 18; X₅ là E; X₆ là T; X₇ là GPSSGAPPPS; và trong đó axit amin đầu tận cùng C được amit hóa ở dạng amit bậc một có đầu tận cùng C (SEQ ID NO: 7).

Theo các phương án nhất định, chất chủ vận thụ thể glucagon có công thức cấu tạo I trong đó: X₂ là L; a bằng 2; b bằng 16; X₅ là E; X₆ là T; và X₇ là GPSSGAPPPS; và trong đó axit amin đầu tận cùng C được amit hóa ở dạng amit bậc một có đầu tận cùng C (SEQ ID NO: 8).

Theo các phương án nhất định, chất chủ vận thụ thể glucagon có công thức cấu tạo I trong đó: X₂ là T; a bằng 2; b bằng 16; X₅ là E; X₆ là T; và X₇ là GPSSG; và trong đó axit amin đầu tận cùng C được amit hóa ở dạng amit bậc một có đầu tận cùng C (SEQ ID NO: 9).

Theo các phương án nhất định, chất chủ vận thụ thể glucagon có công thức cấu tạo I trong đó: X₂ là T; a bằng 2; b bằng 18; X₅ là E; X₆ là T; và X₇ là GPSSG; và trong đó axit amin đầu tận cùng C được amit hóa ở dạng amit bậc một có đầu tận cùng C (SEQ ID NO: 10).

Theo các phương án nhất định, chất chủ vận thụ thể glucagon có công thức cấu tạo I trong đó: X₂ là T; a bằng 1; b bằng 16; X₅ là A; X₆ là E; và X₇ không có mặt (SEQ ID NO: 11).

Theo các phương án nhất định, chất chủ vận thụ thể glucagon có công thức cấu tạo I trong đó: X₂ là T; a bằng 1; b bằng 18; X₅ là A; X₆ là E; và X₇ không có mặt (SEQ ID NO: 12).

Theo các phương án nhất định, chất chủ vận thụ thể glucagon có công thức cấu tạo I trong đó: a bằng 2; X₅ là E; X₆ là T; X₇ là peptit được chọn từ nhóm gồm GPSSGAPPPS và GPSSG; và axit amin đầu tận cùng C được amit hóa (SEQ ID NO: 16).

Theo các phương án nhất định, chất chủ vận thụ thể glucagon có công thức cấu tạo I trong đó: X₂ là T; a bằng 1; X₅ là A; X₆ là E; và X₇ không có mặt (SEQ ID NO: 17).

Theo các phương án nhất định, hoạt tính của chất chủ vận thụ thể glucagon ở thụ thể glucagon cao hơn hoạt tính của chất chủ vận thụ thể glucagon ở thụ thể GLP-1 ít nhất 100 lần.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị bệnh được chọn từ nhóm gồm T2DM, bệnh béo phì, bệnh gan nhiễm mỡ, NASH, rối loạn mỡ máu, hội chứng chuyển hóa, tăng insulin huyết và hạ đường huyết ban đêm, bao gồm bước cho bệnh nhân cần điều trị sử dụng lượng hữu hiệu chất chủ vận thụ thể glucagon theo sáng chế.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị gan nhiễm mỡ bao gồm bước cho bệnh nhân cần điều trị sử dụng lượng hữu hiệu chất chủ vận thụ thể glucagon theo sáng chế. Theo các phương án nhất định, bệnh là bệnh gan nhiễm mỡ.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị bệnh được chọn từ nhóm gồm T2DM, bệnh béo phì, bệnh gan nhiễm mỡ, NASH, rối loạn mỡ máu, hội chứng chuyển hóa, tăng insulin huyết và hạ đường huyết ban đêm, bao gồm bước cho bệnh nhân cần điều trị sử dụng lượng hữu hiệu chất chủ vận thụ thể glucagon theo sáng chế kết hợp với lượng hữu hiệu của một hoặc nhiều chất trị liệu khác. Theo các phương án nhất định, bệnh là T2DM. Theo các phương án nhất định, bệnh là bệnh béo phì. Theo các phương án nhất định, bệnh là bệnh gan nhiễm mỡ. Theo các phương án nhất định, một hoặc nhiều chất trị liệu khác được chọn từ nhóm gồm chất chủ vận GLP-1R, chất đồng chủ vận GIP-GLP-1, chất chủ vận thụ thể insulin, oxyntomodulin, metformin, thiazolidindion, sulfonylure, chất ức chế dipeptidyl peptidaza-4 (“DPP-4”), và chất ức chế đồng vận chuyển natri glucoza 2 (“SGLT2”). Theo các phương án nhất định, chất trị liệu khác là chất chủ vận GLP-1R. Theo các phương án nhất định, chất chủ vận GLP-1R là dulaglutide. Theo các phương án nhất định, chất trị liệu khác là chất đồng chủ vận GIP-GLP-1. Theo các phương án nhất định, chất đồng chủ vận GIP-GLP-1 có cấu tạo SEQ ID NO: 15. Theo các phương án nhất định chất trị liệu khác là chất chủ vận thụ thể insulin.

Theo các phương án nhất định, chất chủ vận thụ thể glucagon có tác dụng hiệp đồng lên sự giảm thể trọng và thành phần cơ thể khi được sử dụng kết hợp với

một chất trị liệu khác, như chất chủ vận GLP-1R hoặc chất đồng chủ vận GIP-GLP-1,

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất việc sử dụng chất chủ vận thụ thể glucagon theo sáng chế trong trị liệu. Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất việc sử dụng chất chủ vận thụ thể glucagon theo sáng chế trong điều trị bệnh được chọn từ nhóm gồm T2DM, bệnh béo phì, bệnh gan nhiễm mỡ, NASH, rối loạn mỡ máu, hội chứng chuyển hóa, tăng insulin huyết và hạ đường huyết ban đêm. Theo các phương án nhất định, bệnh là T2DM. Theo các phương án nhất định, bệnh là bệnh béo phì. Theo các phương án nhất định, bệnh là bệnh gan nhiễm mỡ. Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất chất chủ vận thụ thể glucagon theo sáng chế để dùng trong điều trị gan nhiễm mỡ ở bò sữa.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất chất chủ vận thụ thể glucagon theo sáng chế để dùng đồng thời, riêng rẽ, hoặc lần lượt kết hợp với một hoặc nhiều chất trị liệu khác để dùng trong trị liệu. Theo các phương án nhất định một hoặc nhiều chất trị liệu khác được chọn từ nhóm gồm chất chủ vận GLP-1R, chất đồng chủ vận GIP-GLP-1, chất chủ vận thụ thể insulin, oxyntomodulin, metformin, thiazolidindion, sulfonilure, chất ức chế DPP-4, và chất ức chế đồng vận chuyển natri glucoza 2 (“SGLT2”). Theo các phương án nhất định, chất trị liệu khác là chất chủ vận GLP-1R. Theo các phương án nhất định, chất chủ vận GLP-1R là dulaglutide. Theo các phương án nhất định, chất trị liệu khác là chất đồng chủ vận GIP-GLP-1. Theo các phương án nhất định, chất đồng chủ vận GIP-GLP-1 có cấu tạo SEQ ID NO: 15.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất việc sử dụng chất chủ vận thụ thể glucagon theo sáng chế trong sản xuất thuốc để điều trị T2DM, bệnh béo phì, bệnh gan nhiễm mỡ, NASH, rối loạn mỡ máu, hội chứng chuyển hóa, tăng insulin huyết và hạ đường huyết ban đêm.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất dược phẩm chứa chất chủ vận thụ thể glucagon theo sáng chế và chất mang, chất pha loãng, hoặc tá dược được dùng. Theo các phương án nhất định, dược phẩm còn chứa một chất trị liệu khác. Theo các phương án nhất định chất trị liệu khác được chọn từ nhóm gồm chất chủ vận GLP-

1R, chất đồng chủ vận GIP-GLP-1, chất chủ vận thụ thể insulin, oxyntomodulin, metformin, thiazolidindion, sulfonyleure, chất ức chế DPP-4, và SGLT2 chất ức chế. Theo các phương án nhất định, chất trị liệu khác là chất chủ vận GLP-1R. Theo các phương án nhất định, chất chủ vận GLP-1R là dulaglutide. Theo các phương án nhất định, chất trị liệu khác là chất đồng chủ vận GIP-GLP-1. Theo các phương án nhất định, chất đồng chủ vận GIP-GLP-1 có cấu tạo SEQ ID NO: 15. Theo các phương án nhất định chất trị liệu khác là chất chủ vận thụ thể insulin.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất phương pháp gây ra sự giảm trọng lượng không nhằm mục đích trị liệu bao gồm bước sử dụng lượng hữu hiệu chất chủ vận thụ thể glucagon theo sáng chế.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị hội chứng gan nhiễm mỡ ở bò, bao gồm bước cho bò cần điều trị sử dụng lượng hữu hiệu chất chủ vận thụ thể glucagon theo sáng chế.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất chất chủ vận thụ thể glucagon theo sáng chế để dùng trong điều trị hội chứng gan nhiễm mỡ ở bò.

Mô tả chi tiết sáng chế

Khi được sử dụng ở đây, thuật ngữ “chất chủ vận thụ thể glucagon” có nghĩa là hợp chất chứa trình tự axit amin của glucagon tự nhiên của người (SEQ ID NO: 1), chất tương tự glucagon, dẫn xuất glucagon hoặc protein dung hợp glucagon, mà nó gắn kết với và hoạt hóa thụ thể glucagon, và duy trì hoạt tính chọn lọc ở thụ thể glucagon so với thụ thể GLP-1, làm gia tăng mức glucoza trong huyết thanh khi được dùng ở dạng đơn trị. Các đặc tính gắn kết và tác dụng dược lực học như vậy có thể được xác định bằng cách sử dụng các phương pháp *in vitro* và *in vivo* đã biết, như các phương pháp được mô tả trong nghiên cứu dưới đây. Chất tương glucagon là phân tử chứa cải biến bao gồm một hoặc nhiều sự thể đoạn, khuyết đoạn, đảo đoạn hoặc thêm đoạn axit amin so với trình tự axit amin của glucagon tự nhiên của người (SEQ ID NO: 1). Dẫn xuất glucagon là phân tử có trình tự axit amin của glucagon tự nhiên của người (SEQ ID NO:1) hoặc của chất tương tự glucagon, nhưng còn có thêm ít nhất một cải biến hóa học ở một hoặc nhiều nhóm bên axit amin của nó, các

nguyên tử α -cacbon, nhóm tận cùng amino, hoặc nhóm tận cùng axit carboxylic. Protein dung hợp glucagon là protein khác loài chứa glucagon, chất tương tự glucagon hoặc dẫn xuất glucagon và polypeptit thứ hai, như vùng globulin miễn dịch Fc.

Hoạt tính của chất chủ vận thụ thể glucagon theo sáng chế cũng chọn lọc đối với thụ thể glucagon so với thụ thể GLP-1. Khi được sử dụng ở đây, thuật ngữ “chọn lọc...so với” “độ chọn lọc” và “chọn lọc đối với” dùng để chỉ hợp chất thể hiện hiệu lực đối với thụ thể glucagon lớn hơn 50, 100, 200, 250, 500 hoặc 1000 lần so với thụ thể GLP-1. Độ chọn lọc như vậy có thể được xác định bằng cách sử dụng các phương pháp *in vitro* đã biết, như các phương pháp được mô tả trong các nghiên cứu dưới đây.

Chất chủ vận thụ thể glucagon theo sáng chế có profin thời gian tác dụng kéo dài cho phép định liều không thường xuyên như một lần mỗi ngày, ba lần một tuần, hai lần một tuần hoặc một lần một tuần. Profin thời gian tác dụng của chất chủ vận thụ thể glucagon có thể được xác định bằng cách sử dụng các phương pháp thử nghiệm được động học đã biết.

Profin thời gian tác dụng kéo dài của chất chủ vận thụ thể glucagon theo sáng chế có được nhờ việc sử dụng gốc axit béo liên hợp với nhóm epsilon-amino của mạch bên của axit amin lysin ở vị trí 20. Axit béo được liên hợp với nhóm epsilon-amino của mạch bên lysin thông qua đoạn liên kết, chứa [2-(2-Amino-etoxy)-etoxy]-axetyl)₂-(γ Glu)_a, trong đó a bằng 1 hoặc 2. Axit béo và axit gamma-glutamic trong cầu liên kết hoạt động như các cầu liên kết albumin, và mang lại khả năng tạo ra các hợp chất hoạt động lâu dài. Axit béo được liên hợp với nhóm epsilon-amino của mạch bên của axit amin lysin ở vị trí 20 bằng đoạn liên kết chứa -CO-(CH₂)_b-CO₂H trong đó b bằng từ 14 đến 24. Vì vậy, cấu trúc đoạn liên kết-axit béo đầy đủ bao gồm ([2-(2-Amino-etoxy)-etoxy]-axetyl)₂-(γ Glu)_a-CO-(CH₂)_b-CO₂H trong đó a bằng 1 hoặc 2 và b bằng 14 đến 24. Như được chỉ ra trong cấu tạo hóa học của các hợp chất nêu trong ví dụ 1-7 dưới đây, đơn vị [2-(2-Amino-etoxy)-etoxy]-axetyl đầu tiên được liên kết với nhóm epsilon-amino của mạch bên lysin. Đơn vị [2-(2-Amino-etoxy)-etoxy]-axetyl thứ hai sau đó được gắn với nhóm amino của đơn vị [2-(2-

Aminoetoxy)-etoxy]-axetyl đầu tiên. Tiếp theo, đơn vị γ Glu thứ nhất được gắn với nhóm amino của đơn vị [2-(2-Amino-etoxy)-etoxy]-axetyl thứ hai thông qua nhóm γ -carboxyl của mạch bên này. Khi $a = 2$, đơn vị γ Glu thứ hai được gắn với nhóm α -amino của đơn vị γ Glu thứ nhất thông qua nhóm γ -carboxyl của mạch bên này. Cuối cùng, axit béo được gắn với nhóm α -amino của đơn vị γ Glu thứ nhất (khi $a = 1$) hoặc đơn vị γ Glu thứ hai (khi $a=2$).

Tốt hơn là, chất chủ vận thụ thể glucagon theo sáng chế được bào chế ở dạng được phẩm được dùng ngoài đường tiêu hóa (ví dụ, dưới da, trong tĩnh mạch, trong màng bụng, trong cơ, hoặc qua da). Những được phẩm như vậy và các quy trình để bào chế chúng là đã biết trong lĩnh vực. (Xem, ví dụ, Remington: The Science and Practice of Pharmacy (D.B. Troy, Editor, 21st Edition, Lippincott, Williams & Wilkins, 2006). Đường dùng ưu tiên là đường dưới da.

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

Một lợi ích cụ thể có được bởi độ chọn lọc của chất chủ vận thụ thể glucagon theo sáng chế đối với thụ thể glucagon so với thụ thể GLP-1 là khả năng đưa ra những lựa chọn điều trị linh động khi chất chủ vận thụ thể glucagon theo sáng chế được dùng kết hợp với chất trị liệu khác, như tỷ lệ giữa hoạt tính ở thụ thể glucagon với hoạt tính ở các thụ thể khác (ví dụ, thụ thể GLP-1, GIP và/hoặc insulin). Vì vậy, theo các phương án được ưu tiên nhất định, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị T2DM ở bệnh nhân bao gồm bước cho bệnh nhân cần điều trị sử dụng lượng hữu hiệu chất chủ vận thụ thể glucagon theo sáng chế, hoặc muối được dụng của nó, kết hợp với một chất trị liệu khác. Theo các phương án nhất định, chất trị liệu khác được chọn từ nhóm gồm chất chủ vận GLP-1R, chất đồng chủ vận GIP-GLP-1 hoặc chất chủ vận thụ thể insulin.

Khi được sử dụng ở đây, thuật ngữ “chất trị liệu khác” có nghĩa hợp chất khác đã biết là có hiệu quả trị liệu có lợi, như điều trị T2DM và/hoặc bệnh béo phì, mà nó hiện có sẵn và/hoặc đang được phát triển, bao gồm chẳng hạn chất chủ vận GLP-1R, chất đồng chủ vận GIP-GLP-1, chất chủ vận thụ thể insulin, oxyntomodulin, metformin, thiazolidindion, sulfonylure, chất ức chế DPP-4, và chất ức chế SGLT2,

Khi được sử dụng ở đây, thuật ngữ “kết hợp với” có nghĩa là dùng chất chủ vận thụ thể glucagon theo sáng chế đồng thời, lần lượt hoặc trong một dạng bào chế kết hợp duy nhất với một hoặc nhiều chất trị liệu khác.

Khi được sử dụng ở đây, thuật ngữ “chất chủ vận GLP-1R” dùng để chỉ hợp chất chứa trình tự axit amin của GLP-1 tự nhiên của người (SEQ ID NO: 2), chất tương tự GLP-1, dẫn xuất GLP-1 hoặc protein dung hợp GLP-1, mà nó duy trì hoạt tính ở thụ thể GLP-1. Hoạt tính thụ thể GLP-1 có thể được xác định bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực, bao gồm việc sử dụng các thí nghiệm *in vivo* và các thử nghiệm *in vitro* xác định hoạt tính gắn kết thụ thể hoặc sự hoạt hóa thụ thể GLP-1. Chất tương tự GLP-1 là phân tử chứa cải biến bao gồm một hoặc nhiều phép thế, loại bỏ, đảo ngược hoặc bổ sung axit amin so với trình tự axit amin của GLP-1 tự nhiên của người (SEQ ID NO: 2). Dẫn xuất của GLP-1 là phân tử có trình tự axit amin của GLP-1 tự nhiên của người (SEQ ID NO:2) hoặc của chất tương tự GLP-1, nhưng còn có thêm ít nhất một cải biến về mặt hóa học ở một hoặc nhiều nhóm bên axit amin của nó, các nguyên tử α -cacbon, nhóm tận cùng amino, hoặc nhóm tận cùng axit carboxylic. Protein dung hợp GLP-1 là protein khác loài chứa GLP-1, chất tương tự GLP-1 hoặc dẫn xuất GLP-1 và polypeptit thứ hai, như vùng globulin miễn dịch Fc. Chất chủ vận GLP-1R là sẵn có hiện nay và/hoặc đang được phát triển bao gồm exenatide, liraglutide, lixisenatide, albiglutide, dulaglutide và semaglutide. Theo các phương án được ưu tiên nhất định trong đó chất chủ vận thụ thể glucagon theo sáng chế được dùng kết hợp với chất chủ vận GLP-1R, chất chủ vận GLP-1R là dulaglutide. Xem, ví dụ, US 7,452,966.

Khi được sử dụng ở đây, thuật ngữ “chất đồng chủ vận GIP-GLP-1” dùng để chỉ hợp chất có hoạt tính ở cả thụ thể GIP và GLP-1. Hoạt tính đối với thụ thể GIP và thụ thể GLP-1 có thể được xác định bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực,

bao gồm việc sử dụng các thí nghiệm *in vivo* và các thử nghiệm *in vitro* xác định hoạt tính gắn kết thụ thể hoặc sự hoạt hóa thụ thể GIP và/hoặc GLP-1. Mặc dù không có chất đồng chủ vận GIP-GLP-1 nào hiện có sẵn dùng để điều trị T2DM, nhiều chất tương tự GIP đã được mô tả là thể hiện hoạt tính đối với cả thụ thể GIP và thụ thể GLP-1, *xem*, ví dụ, WO2013164483; WO 2011119657.

Theo các phương án được ưu tiên nhất định trong đó chất chủ vận thụ thể glucagon theo sáng chế được dùng kết hợp với chất đồng chủ vận GIP-GLP-1, chất đồng chủ vận GIP-GLP-1 có công thức sau:

$\text{YX}_1\text{EGTFTSDYSIX}_2\text{LDKIAQX}_3\text{AX}_4\text{VQWLIAGGPSSGAPPPS};$

trong đó

X_1 là Aib;

X_2 là Aib;

X_3 là K được cải biến hóa học nhờ sự liên hợp giữa nhóm epsilon-amino của mạch bên K với $([2-(2\text{-amino-etoxy})\text{-etoxy}]\text{-axetyl})_2-(\gamma\text{Glu})_a\text{-CO}(\text{CH}_2)_b\text{-CO}_2\text{H}$ trong đó a bằng 1 hoặc 2 và b bằng 10 đến 20;

X_4 là Phe hoặc 1-naphtylalanin (1-Nal);

và axit amin đầu tận cùng C tùy ý được amit hóa (SEQ ID NO: 13),

hoặc muối được dùng của nó.

theo các phương án được ưu tiên nhất định, a bằng 2, b bằng 18; X_4 là 1-Nal; và axit amin đầu tận cùng C được amit hóa ở dạng amit bậc một có đầu tận cùng C. (SEQ ID NO: 14). Theo các phương án được ưu tiên nhất định a bằng 1, b bằng 18; X_4 là Phe; và axit amin đầu tận cùng C được amit hóa ở dạng amit bậc một có đầu tận cùng C. (SEQ ID NO: 15). Các chất đồng chủ vận GIP-GLP-1 như vậy có thể được điều chế bằng cách sử dụng các kỹ thuật như các kỹ thuật mà có thể được sử dụng để điều chế chất chủ vận thụ thể glucagon theo sáng chế, như được mô tả dưới đây trong các ví dụ tổng hợp peptit.

Khi được sử dụng ở đây, thuật ngữ “chất chủ vận thụ thể insulin” dùng để chỉ insulin ở người, hoặc chất tương tự hoặc dẫn xuất của nó, hoặc protein bất kỳ khác

có khả năng gắn kết với và hoạt hóa thụ thể insulin. Hoạt tính thụ thể insulin có thể được xác định bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực, bao gồm việc sử dụng các thí nghiệm *in vivo* và các thử nghiệm *in vitro* xác định hoạt tính gắn kết thụ thể hoặc sự hoạt hóa thụ thể insulin. Chất tương tự insulin là phân tử chứa cải biến bao gồm một hoặc nhiều phép thế, loại bỏ, đảo ngược hoặc bổ sung axit amin so với insulin tự nhiên ở người, cấu trúc của nó đã được biết rõ. Dẫn xuất insulin là phân tử có trình tự axit amin của insulin tự nhiên ở người, hoặc chất tương tự của nó, nhưng còn có thêm ít nhất một cải biến hóa học ở một hoặc nhiều nhóm bên axit amin của nó, các nguyên tử α -cacbon, nhóm tận cùng amino, hoặc nhóm tận cùng axit carboxylic. Protein dung hợp insulin là protein khác loài chứa phần insulin, chất tương tự insulin hoặc dẫn xuất insulin và polypeptit thứ hai. Mặc dù chất chủ vận thụ thể insulin bất kỳ có thể được xem xét để dùng trong các phương án trong đó chất chủ vận thụ thể glucagon theo sáng chế được dùng kết hợp với chất chủ vận thụ thể insulin, các chất chủ vận thụ thể insulin được ưu tiên là các chất có khoảng thời gian tác dụng cơ bản hoặc kéo dài. Chất chủ vận thụ thể insulin sẵn có với hoạt tính cơ bản bao gồm insulin glargine, insulin detemir, and insulin degludec, mỗi trong chúng được chỉ định để dùng một lần mỗi ngày.

Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị T2DM ở bệnh nhân bao gồm bước cho bệnh nhân cần điều trị sử dụng lượng hữu hiệu chất chủ vận thụ thể glucagon theo sáng chế, hoặc muối dược dụng của nó.

Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị bệnh béo phì ở bệnh nhân bao gồm bước cho bệnh nhân cần điều trị sử dụng lượng hữu hiệu chất chủ vận thụ thể glucagon theo sáng chế, hoặc muối dược dụng của nó.

Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị bệnh gan nhiễm mỡ ở bệnh nhân bao gồm bước cho bệnh nhân cần điều trị sử dụng lượng hữu hiệu chất chủ vận thụ thể glucagon theo sáng chế, hoặc muối dược dụng của nó.

Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị NASH ở bệnh nhân bao gồm bước cho bệnh nhân cần điều trị sử dụng lượng hữu hiệu chất chủ vận thụ thể glucagon theo sáng chế, hoặc muối dược dụng của nó.

Theo các phương án khác, sáng chế cũng đề xuất phương pháp điều trị T2DM ở bệnh nhân bao gồm bước cho bệnh nhân cần điều trị sử dụng lượng hữu hiệu chất chủ vận thụ thể glucagon theo sáng chế, hoặc muối dược dụng của nó, kết hợp với một hoặc nhiều chất trị liệu khác, như chất chủ vận GLP-1R, chất đồng chủ vận GIP-GLP-1, chất chủ vận thụ thể insulin, oxyntomodulin, metformin, thiazolidindion, sulfonylure, chất ức chế DPP-4, và chất ức chế SGLT2.

Khi được sử dụng ở đây, thuật ngữ “bệnh nhân cần điều trị” dùng để chỉ động vật có vú, tốt hơn là người hoặc bò, mắc bệnh hoặc tình trạng bệnh cần điều trị, bao gồm ví dụ, T2DM, bệnh béo phì, bệnh gan nhiễm mỡ, NASH và/hoặc hội chứng chuyển hóa.

Khi được sử dụng ở đây, thuật ngữ “lượng hữu hiệu” dùng để chỉ lượng hoặc liều chất chủ vận thụ thể glucagon theo sáng chế, hoặc muối dược dụng của nó mà, khi cho bệnh nhân dùng liều đơn hoặc đa liều, tạo ra hiệu quả mong muốn ở bệnh nhân được chẩn đoán hoặc điều trị. Lượng hữu hiệu có thể dễ dàng được xác định bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực nhờ việc sử dụng các kỹ thuật đã biết và bằng cách quan sát kết quả thu được từ những ca tương tự. Khi xác định lượng hữu hiệu cho một bệnh nhân, cần cân nhắc một số yếu tố, bao gồm, nhưng không giới hạn ở: loài động vật; kích thước, tuổi tác và sức khỏe chung; bệnh hoặc rối loạn cụ thể liên quan; mức độ hoặc tình trạng liên quan hoặc mức độ nghiêm trọng của bệnh hoặc rối loạn; đáp ứng của từng bệnh nhân; chất chủ vận thụ thể glucagon cụ thể được sử dụng; phương thức sử dụng; các đặc trưng sinh khả dụng của chế phẩm được sử dụng; phác đồ liều lượng lựa chọn; việc sử dụng thuốc đồng thời; và các trường hợp liên quan khác.

Chất chủ vận thụ thể glucagon nhất định theo sáng chế thường hữu hiệu trong khoảng liều lượng rộng. Ví dụ, liều dùng một lần một tuần có thể nằm trong khoảng từ 0,01 đến khoảng 30 mg/người/tuần. Chất chủ vận thụ thể glucagon theo sáng chế có thể được phân liều hằng ngày, ba lần một tuần, hai lần một tuần hoặc một lần một tuần. Việc dùng một lần một tuần là được ưu tiên.

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

Các trình tự axit amin theo sáng chế chứa chữ cái riêng rẽ tiêu chuẩn hoặc bộ ba chữ cái dùng cho hai mươi axit amin có trong tự nhiên. Ngoài ra, “Aib” là axit alpha amino isobutyric. Sáng chế cũng bao gồm các hợp chất trung gian mới và các quy trình hữu dụng để tổng hợp các chất chủ vận thụ thể glucagon theo sáng chế, hoặc muối được dụng của chúng. Các hợp chất trung gian và chất chủ vận thụ thể glucagon theo sáng chế có thể được điều chế bởi nhiều quy trình đã biết trong lĩnh vực. Cụ thể, quy trình sử dụng tổng hợp hóa học được minh họa trong các Ví dụ dưới đây. Các bước tổng hợp cụ thể đối với mỗi quy trình được mô tả có thể được kết hợp theo các cách khác nhau để điều chế chất chủ vận thụ thể glucagon theo sáng chế. Các chất phản ứng và nguyên liệu ban đầu là dễ dàng có được đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này.

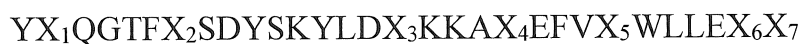
Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế được minh họa tiếp bằng các ví dụ sau đây, các ví dụ này không nhằm giới hạn phạm vi của sáng chế.

Tổng hợp peptit

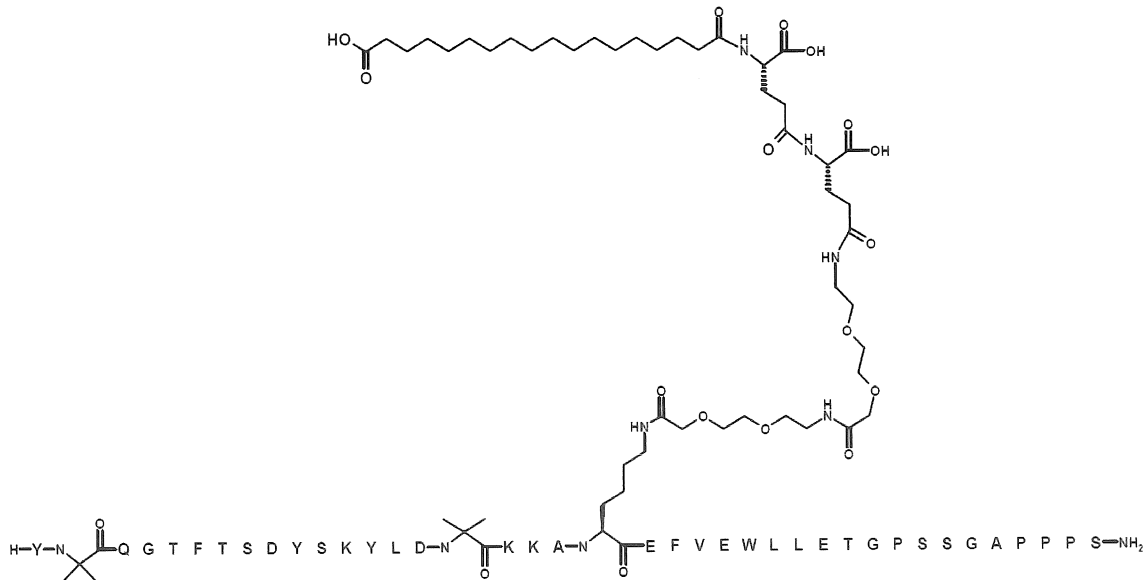
Ví dụ 1

Ví dụ 1 là chất chủ vận thụ thể glucagon được biểu thị bởi phần mô tả sau đây:



trong đó X_1 là Aib; X_2 là T; X_3 là Aib; X_4 là K được cải biến hóa học nhờ sự liên hợp giữa nhóm epsilon-amino của mạch bên K với ([2-(2-Amino-etoxy)-etoxy]-axetyl) $_2$ -(γ Glu) $_a$ -CO-(CH $_2$) $_b$ -CO $_2$ H trong đó a bằng 2 và b bằng 16; X_5 là E; X_6 là T; X_7 là GPSSGAPPPS; và axit amin đầu tận cùng C được amit hóa ở dạng amit bậc một có đầu tận cùng C (SEQ ID NO: 6).

Dưới đây là mô tả cấu trúc của hợp chất nêu trong ví dụ 1 bằng cách sử dụng các mã một chữ cái tiêu chuẩn của axit amin ngoại trừ các gốc Aib2, Aib16 và K20, trong đó các cấu trúc của các gốc axit amin này đã được mở rộng:



Peptit ở ví dụ 1 được tạo ra bằng cách tổng hợp peptit pha rắn sử dụng phương pháp Fmoc/t-Bu thực hiện trên thiết bị tổng hợp peptit tự động Symphony (PTI Protein Technologies Inc.) bắt đầu từ nhựa amit RAPP AM-Rink và với các chất kết hợp bằng cách sử dụng 6 đương lượng của axit amin được hoạt hóa với diisopropylcarbodiimide (DIC) và hydroxybenzotriazol (HOBt) (tỷ lệ mol 1:1:1) trong dimethylformamide (DMF) trong 90 phút ở 25°C.

Các chất kết hợp được mở rộng đối với Pro31 (4h), Trp25 (4h), Glu24 (4h), Val23 (10h), Glu21 (4h), Aib16 (4h), Asp15 (4h), Thr7 (4h), Thr5 (4h), Gly4 (4h), Gln3 (4h) và Aib2 (24h) là cần thiết để cải thiện chất lượng của peptit thô này. Khối xây dựng Fmoc-Lys(Alloc)-OH được sử dụng cho sự kết hợp Lys20 (nhóm bảo vệ trực giao) để cho phép sự gắn ở vị trí cụ thể của gốc axit béo sau đó trong quy trình tổng hợp. Gốc đầu tận cùng N được kết hợp dưới dạng Boc-Tyr(tBu)-OH bằng cách sử dụng các phương pháp DIC-HOBt như được mô tả trên đây (kết hợp 24h).

Sau khi kết thúc sự kéo dài mạch đối với nhựa peptit được mô tả trên đây, nhóm bảo vệ Alloc có mặt trong Lys20 được loại bỏ bằng cách sử dụng lượng chất xúc tác $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ với sự có mặt của PhSiH_3 làm chất làm sạch. Các chu trình liên

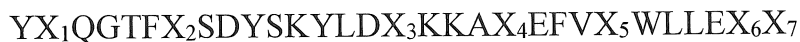
kết/khử bảo vệ bổ sung sử dụng phương pháp Fmoc/t-Bu để kéo dài mạch bên Lys20 có sự tham gia của Fmoc-NH-PEG₂-CH₂COOH (ChemPep Catalog#280102), Fmoc-Glu(OH)-OtBu (ChemPep Catalog#100703) và HOOC-(CH₂)₁₆-COOtBu. Trong tất cả các liên kết, 3 đương lượng khối xây dựng được sử dụng với PyBOP (3 đương lượng) và DIEA (6 đương lượng) trong DMF trong 4 giờ ở 25°C.

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

Trong quy trình tổng hợp được thực hiện về cơ bản như được mô tả trên đây, độ tinh khiết của hợp chất nêu trong Ví dụ 1 được xác định bằng HPLC phân tích pha đảo, và xác nhận đặc tính bằng cách sử dụng LC/MS (quan sát thấy: $M+3H^+/3 = 1713,6$; Tính toán $M+3H^+/3 = 1714,3$; quan sát thấy: $M+4H^+/4 = 1285,7$; Tính toán $M+4H^+/4 = 1285,9$).

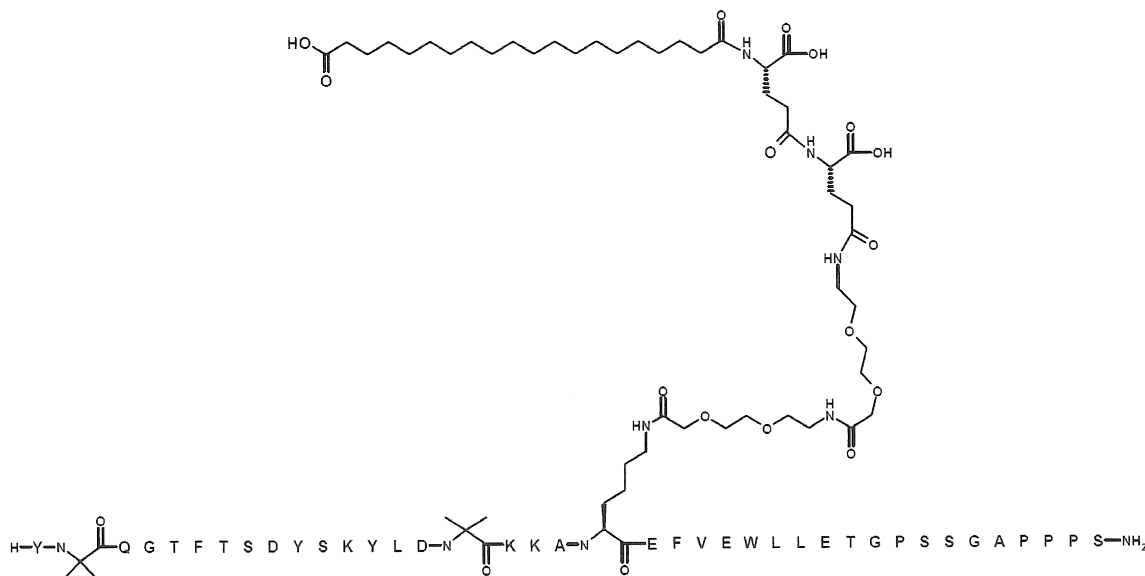
Ví dụ 2

Ví dụ 2 là chất chủ vận thụ thể glucagon được biểu thị bởi phân mô tả sau đây:



trong đó: X_1 là Aib, X_2 là T; X_3 là Aib; X_4 là K được cải biến hóa học nhờ sự liên hợp giữa nhóm epsilon-amino của mạch bên K với ([2-(2-Amino-etoxy)-etoxy]-axetyl)₂-(γGlu)_a-CO-(CH₂)_b-CO₂H; a bằng 2; b bằng 18; X_5 là E; X_6 là T; X_7 là GPSSGAPPPS; và trong đó axit amin đầu tận cùng C được amit hóa ở dạng amit bậc một có đầu tận cùng C (SEQ ID NO: 7).

Dưới đây là mô tả cấu trúc của hợp chất nêu trong ví dụ 2 bằng cách sử dụng các mã một chữ cái tiêu chuẩn của axit amin ngoại trừ các gốc Aib₂, Aib₁₆ và K₂₀, trong đó các cấu trúc của các gốc axit amin này đã được mở rộng:

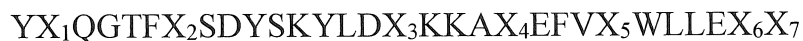


Peptit theo ví dụ 2 được tổng hợp tương tự như đã mô tả trên đây trong ví dụ 1, $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_{18}-\text{COOtBu}$ được kết hợp bằng cách sử dụng 3 đương lượng khối xây dựng với PyBOP (3 đương lượng) và DIEA (6 đương lượng) trong DMF trong 4h ở 25°C .

Trong quy trình tổng hợp được thực hiện về cơ bản như được mô tả trên đây đối với hợp chất nêu trong ví dụ 1, độ tinh khiết của hợp chất nêu trong Ví dụ 2 được xác định bằng HPLC phân tích pha đảo, và xác nhận đặc tính bằng cách sử dụng LC/MS (quan sát thấy: $M+3\text{H}^+/3 = 1723,2$; Tính toán $M+3\text{H}^+/3 = 1723,6$; quan sát thấy: $M+4\text{H}^+/4 = 1292,9$; Tính toán $M+4\text{H}^+/4 = 1293,0$).

Ví dụ 3

Ví dụ 3 là chất chủ vận thụ thể glucagon được biểu thị bởi phần mô tả sau đây:



trong đó: X_1 là Aib; X_2 là L; X_3 là Aib; X_4 là K được cải biến hóa học nhờ sự liên hợp giữa nhóm epsilon-amino của mạch bên K với $[(2-(2\text{-Amino-etoxy})\text{-etoxy})\text{-axetyl}]_2-(\gamma\text{Glu})_a\text{-CO}-(\text{CH}_2)_b\text{-CO}_2\text{H}$; a bằng 2; b bằng 16; X_5 là E; X_6 là T; và X_7 là GPSSGAPPPS; và trong đó axit amin đầu tận cùng C được amit hóa ở dạng amit bậc một ở đầu tận cùng C (SEQ ID NO: 8).

[illegible]

Trong quy trình tổng hợp được thực hiện về cơ bản như được mô tả trên đây đối với hợp chất nêu trong ví dụ 1, độ tinh khiết của hợp chất nêu trong Ví dụ 3 được xác định bằng HPLC phân tích pha đảo, và xác nhận đặc tính bằng cách sử dụng LC/MS (quan sát thấy: $M+3H^+/3 = 1717,4$; Tính toán $M+3H^+/3 = 1718,3$; quan sát thấy: $M+4H^+/4 = 1288,3$; Tính toán $M+4H^+/4 = 1289,0$).

YX₁OGTFX₂SDYSKYLDX₃KKAX₄EFVX₅WLLEX₆X₇

-24-

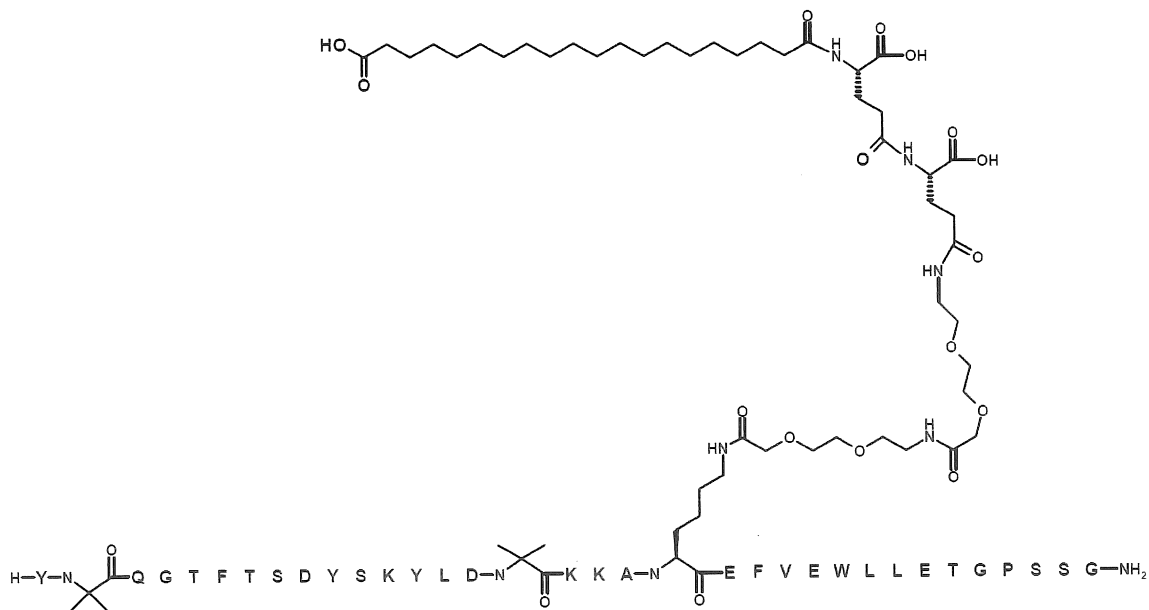
[illegible]

Trong quy trình tổng hợp được thực hiện về cơ bản như được mô tả trên đây đối với hợp chất nêu trong ví dụ 1, độ tinh khiết của hợp chất nêu trong Ví dụ 4 được xác định bằng HPLC phân tích pha đảo, và xác nhận đặc tính bằng cách sử dụng LC/MS (quan sát thấy: $M+3H^+/3 = 1563,7$; Tính toán $M+3H^+/3 = 1564,4$; quan sát thấy: $M+4H^+/4 = 1172,9$; Tính toán $M+4H^+/4 = 1173,6$).

Ví dụ 5 là chất chủ vận thụ thể glucagon được biểu thị bởi phần mô tả sau đây:

trong đó X₁ là Aib; X₂ là T; X₃ là Aib; X₄ là K được cải biến hóa học nhờ sự liên hợp giữa nhóm epsilon-amino của mạch bên K với ([2-(2-Amino-etoxy)-etoxy]-axetyl)₂-(γGlu)_a-CO-(CH₂)_b-CO₂H; a bằng 2; b bằng 18; X₅ là E; X₆ là T; và X₇ là

Dưới đây là mô tả cấu trúc của hợp chất nêu trong ví dụ 5 bằng cách sử dụng các mã một chữ cái tiêu chuẩn của axit amin ngoại trừ các gốc Aib2, Aib16 và K20, trong đó các cấu trúc của các gốc axit amin này đã được mở rộng:

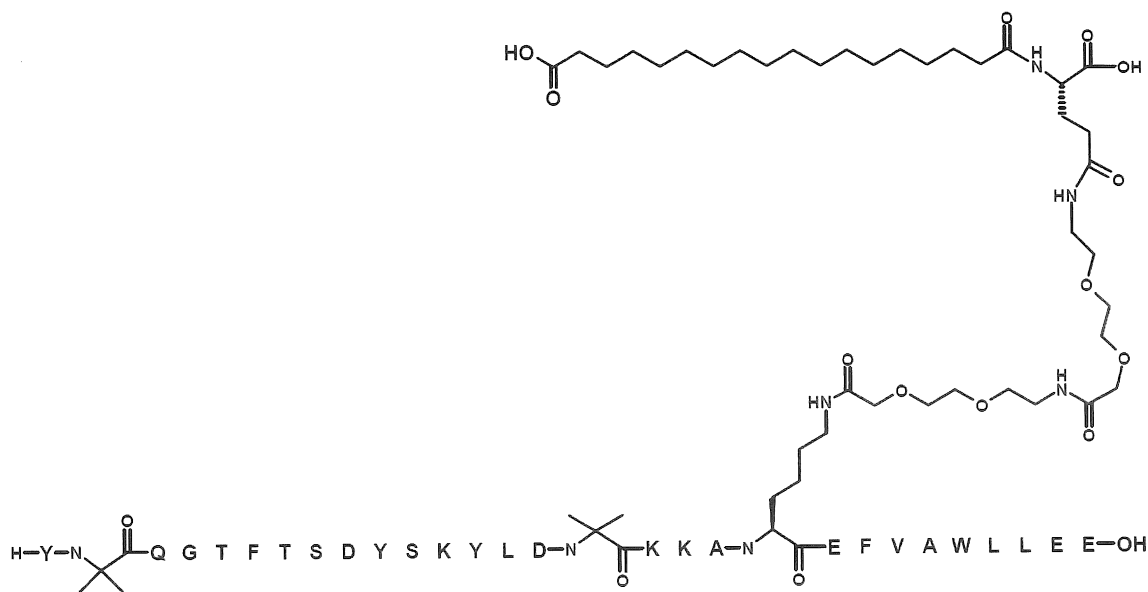


Trong quy trình tổng hợp được thực hiện về cơ bản như được mô tả trên đây đối với các hợp chất nêu trong các ví dụ 1 và 2, độ tinh khiết của hợp chất nêu trong Ví dụ 5 được xác định bằng HPLC phân tích pha đảo, và xác nhận đặc tính bằng cách sử dụng LC/MS (quan sát thấy: $M+3H^+/3 = 1572,9$; Tính toán $M+3H^+/3 = 1573,8$; quan sát thấy: $M+4H^+/4 = 1179,8$; Tính toán $M+4H^+/4 = 1180,6$).

trong đó X₁ là Aib; X₂ là T; X₃ là Aib; X₄ là K được cải biến hóa học nhờ sự liên hợp giữa nhóm epsilon-amino của mạch bên K với ([2-(2-Amino-etoxy)-etoxy]-

axetyl)₂-(γGlu)_a-CO-(CH₂)_b-CO₂H; a bằng 1; b bằng 16; X₅ là A; X₆ là E; và X₇ không có mặt; và axit amin đầu tận cùng C là axit đầu tận cùng C (SEQ ID NO: 11).

Dưới đây là mô tả cấu trúc của hợp chất nêu trong ví dụ 6 bằng cách sử dụng các mã một chữ cái tiêu chuẩn của axit amin ngoại trừ các gốc Aib₂, Aib₁₆ và K₂₀, trong đó các cấu trúc của các gốc axit amin này đã được mở rộng:



Peptit theo ví dụ 6 được tạo ra bằng cách tổng hợp peptit pha rắn sử dụng phương pháp Fmoc/t-Bu thực hiện trên thiết bị tổng hợp peptit tự động Symphony (PTI Protein Technologies Inc.) bắt đầu từ nhựa Fmoc-L-Glu(OtBu)-Wang (NovaBiochem catalog mục # 856008; lượng nạp ban đầu là 0,51 mmol/g) và với các chất kết hợp bằng cách sử dụng 6 đương lượng axit amin được hoạt hóa với diisopropylcarbodiimide (DIC) và hydroxybenzotriazole (HOBt) (tỷ lệ phân tử 1:1:1) trong dimethylformamide (DMF) trong 90 phút ở 25°C.

Các kết hợp mở rộng đối với Trp₂₅ (4h), Ala₂₄ (4h), Val₂₃ (10h), Glu₂₁ (4h), Aib₁₆ (4h), Asp₁₅ (4h), Thr₇ (4h), Thr₅ (4h), Gln₃ (4h) và Aib₂ (24h) là cần thiết để cải thiện chất lượng của peptit thô. Khối xây dựng Fmoc-Lys(Alloc)-OH được sử dụng cho sự kết hợp Lys₂₀ (nhóm bảo vệ trực giao) để cho phép sự gắn ở vị trí cụ thể của gốc axit béo sau đó trong quy trình tổng hợp (thời gian kết hợp là 4h). Gốc đầu tận cùng N được kết hợp dưới dạng Boc-Tyr(tBu)-OH bằng cách sử dụng các phương pháp DIC-HOBt như được mô tả trên đây (kết hợp 24h).

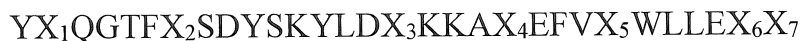
Sau khi kết thúc sự kéo dài mạch đối với nhựa peptit được mô tả trên đây, nhóm bảo vệ Alloc có mặt trong Lys20 được loại bỏ bằng cách sử dụng lượng chất xúc tác $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ với sự có mặt của PhSiH_3 làm chất làm sạch. Các chu trình liên kết/khử bảo vệ bổ sung sử dụng phương pháp Fmoc/t-Bu để kéo dài mạch bên Lys20 có sự tham gia của Fmoc-NH-PEG₂-CH₂COOH (ChemPep Catalog#280102), Fmoc-Glu(OH)-OtBu (ChemPep Catalog#100703) và HOOC-(CH₂)₁₆-COOtBu. Trong tất cả các liên kết, 3 đương lượng khối xây dựng được sử dụng với PyBOP (3 đương lượng) và DIEA (6 đương lượng) trong DMF trong 4 giờ ở 25°C.

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

Trong quy trình tổng hợp được thực hiện về cơ bản như được mô tả trên đây, độ tinh khiết của hợp chất nêu trong Ví dụ 6 được xác định bằng HPLC phân tích pha đảo, và xác nhận đặc tính bằng cách sử dụng LC/MS (quan sát thấy: $\text{M}+3\text{H}^+/3 = 1382,7$; Tính toán $\text{M}+3\text{H}^+/3 = 1383,3$; quan sát thấy: $\text{M}+4\text{H}^+/4 = 1036,6$; Tính toán $\text{M}+4\text{H}^+/4 = 1037,7$).

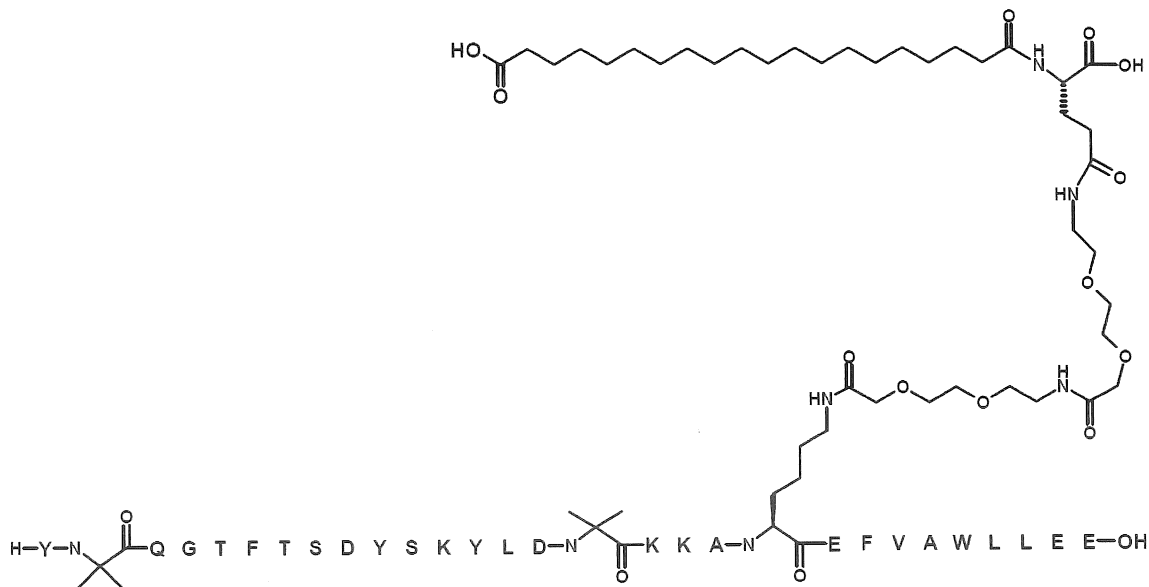
Ví dụ 7

Ví dụ 7 là chất chủ vận thụ thể glucagon được biểu thị bởi phần mô tả sau đây:



trong đó X_1 là Aib; X_2 là T; X_3 là Aib; X_4 là K được cải biến hóa học nhờ sự liên hợp giữa nhóm epsilon-amino của mạch bên K với ([2-(2-amino-etoxy)-etoxy]-axetyl)₂-(γGlu)_a-CO-(CH₂)_b-CO₂H; a bằng 1; b bằng 18; X_5 là A; X_6 là E; và X_7 không có mặt; và axit amin đầu tận cùng C là axit đầu tận cùng C (SEQ ID NO: 12).

Dưới đây là mô tả cấu trúc của hợp chất nêu trong ví dụ 7 bằng cách sử dụng các mã một chữ cái tiêu chuẩn của axit amin ngoại trừ các gốc Aib2, Aib16 và K20, trong đó các cấu trúc của các gốc axit amin này đã được mở rộng:



Peptit theo ví dụ 7 được tổng hợp tương tự như đã mô tả trên đây trong ví dụ 6, $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_{18}-\text{COOtBu}$ được kết hợp bằng cách sử dụng 3 đương lượng khối xây dựng với PyBOP (3 đương lượng) và DIEA (6 đương lượng) trong DMF trong 4h ở 25°C.

Trong quy trình tổng hợp được thực hiện về cơ bản như được mô tả trên đây trong ví dụ 6, độ tinh khiết của hợp chất nêu trong Ví dụ 7 được xác định bằng HPLC phân tích pha đảo, và xác nhận đặc tính bằng cách sử dụng LC/MS (quan sát thấy: $M+3\text{H}^+/3 = 1391,8$; Tính toán $M+3\text{H}^+/3 = 1392,6$; quan sát thấy: $M+4\text{H}^+/4 = 1044,3$; Tính toán $M+4\text{H}^+/4 = 1044,7$).

Chức năng in vitro

Ái lực gắn kết

Xác định ái lực gắn kết của các peptit ở các ví dụ 1-7 đối với thụ thể glucagon người tái tổ hợp (hGcg-R), thụ thể glucagon chuột nhắt (mGcg-R) và thụ thể glucagon chuột cống (rGcg-R). Thử nghiệm gắn kết cạnh tranh phối tử phóng xạ bằng cách sử dụng phương pháp thử nghiệm cận nhấp nháy (scintillation proximity assay - SPA) và các màng được điều chế từ các tế bào đã chuyển nhiễm ổn định

293HEK biểu hiện quá mức hGcg-R, mGcg-R hoặc rGcg-R được thực hiện để xác định hằng số phân ly cân bằng (K_i) đối với các peptit ở ví dụ 1-7. Quy trình và kết quả thí nghiệm được mô tả dưới đây.

Thử nghiệm gắn kết thụ thể Gcg ở người sử dụng hGcg-R đã được tạo dòng (Lok, S, et. al., Gene 140 (2), 203-209 (1994)) được phân lập từ các tế bào 293HEK biểu hiện quá mức hGcg-R tái tổ hợp. ADN bổ trợ hGcg-R được tạo dòng phụ vào pHĐ biểu hiện plasmid (Trans-activated expression of fully gamma-carboxylated recombinant human protein C, an antithrombotic factor. Grinnell, BW, et. al., Bio/Technology 5: 1189-1192 (1987)). ADN plasmid này được chuyển nhiễm vào các tế bào 293HEK và được chọn lọc bằng 200 μ g/mL Hygromycin.

Thử nghiệm gắn kết thụ thể Gcg chuột nhất sử dụng thụ thể glucagon chuột nhất đã được tạo dòng (mGcgR) (Burcelin R, Li J, Charron MJ. Gene 164 (2), 305-10 (1995) GenBank: L38613) được phân lập từ màng 293HEK. mGcgR cADN được tạo dòng phụ vào plasmid biểu hiện pcDNA3,1 (Promega)-ZeoR. ADN plasmid này được chuyển nhiễm vào các tế bào 293HEK và chọn lọc dòng được tạo dòng bằng cách sử dụng 100 μ g/mL Zeocin.

Thử nghiệm gắn kết thụ thể Gcg chuột cống sử dụng thụ thể glucagon chuột cống đã được tạo dòng (rGcg-R) (Svoboda, M, Ciccarelli, E, Tastenoy, M, Robberecht, P, Christophe, J. A cDNA construct allowing the expression of rat hepatic thụ thể glucagon. Biochem. Biophys. Res. Commun. 192 (1), 135-142 (1993), GenBank: L04796) trong các màng được phân lập từ tế bào 293HEK biểu hiện tạm thời rGcg-R. cADN của rGcg-R được tạo dòng phụ vào plasmid biểu hiện pcDNA3,1 (Promega)-ZeoR. ADN plasmid này được chuyển nhiễm vào tế bào 293HEK và được biểu hiện tạm thời trong 48 giờ.

Màng sinh chất thô được điều chế bằng cách sử dụng tế bào từ dịch nuôi cấy bám dính. Các tế bào được dung giải trên đá trong dung dịch đệm nhược trương chứa 50 mM Tris HCl, pH 7,5 và chất ức chế proteaza Roche Complete™ với EDTA. Huyền phù chứa tế bào được phá vỡ bằng cách sử dụng thiết bị đồng hóa Potter-Elvehjem làm bằng thủy tinh được lắp với chày Teflon® cho 25 nhịp. Dịch đồng hóa được ly tâm ở 4°C ở 1100 x g trong 10 phút. Phần dịch nổi được gom lại và bảo

quản trên đá trong khi các viên kết được tái tạo huyền phù trong dung dịch đệm nhược trương và được đồng hóa lại. Hỗn hợp được ly tâm ở 1100 x g trong 10 phút. Phần dịch nổi thứ hai được kết hợp với phần dịch nổi thứ nhất và được ly tâm ở 35000 x g trong 1 giờ ở 4°C. Viên kết màng được tái tạo huyền phù trong dung dịch đệm đồng hóa chứa chất ức chế proteaza, được làm lạnh nhanh trong nitơ lỏng và được bảo quản ở dạng các phần phân ước trong tủ đông ở -80°C cho đến khi sử dụng.

Gcg được tạo đồng vị iot bằng quy trình I-125-lactoperoxidaza và được tinh chế bằng HPLC pha đảo ở Perkin-Elmer (NEX207). Hoạt độ riêng là 2200 Ci/mmol. Thực hiện xác định KD bằng thử nghiệm gắn kết bão hòa hoặc cạnh tranh tương đồng. KD đối với Gcg-R người được ước tính là 3,92 nM và được dùng để tính toán các giá trị K_i cho tất cả các hợp chất được thử nghiệm trong thử nghiệm hGcg-R. KD đối với Gcg-R chuột nhắt được ước tính là 3,52 nM và được dùng để tính toán các giá trị K_i cho tất cả các hợp chất được thử nghiệm trong thử nghiệm mGcg-R. KD đối với Gcg-R chuột cống được ước tính là 21,4 nM và được dùng để tính toán các giá trị K_i đối với tất cả các hợp chất được thử nghiệm trong thử nghiệm rGcg-R.

Thử nghiệm gắn kết thụ thể được thực hiện bằng cách sử dụng định dạng thử nghiệm cận nhấp nháy (Scintillation Proximity Assay - SPA) với hạt agglutinin mầm lúa mì (wheat germ agglutinin - WGA) (Perkin Elmer). Dung dịch đệm gắn kết chứa 25 mM axit 4-(2-hydroxyetyl)-1-piperazinetansulfonic (HEPES), pH 7,4, 2,5 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 0,1% (w/v) bacitracin (Affymetrix), 0,003% (w/v) Polyoxyetylenesorbitan monolaurat (TWEEN®-20) và chất ức chế Roche Complete™ Proteaza không chứa EDTA. Gcg (Eli Lilly and Company) được hòa tan trong DMSO ở 3,48 mg/mL (1 mM) và được bảo quản lạnh đông ở -20°C trong các phần phân ước 100 μL . Phần phân ước Gcg được pha loãng và được sử dụng trong thử nghiệm gắn kết trong vòng 1 giờ. Các chất tương tự peptit được hòa tan trong DMSO và được pha loãng gấp ba lần theo dãy nồng độ trong 100% DMSO. Tiếp theo, 5 μL hợp chất đã pha loãng theo dãy nồng độ hoặc DMSO được chuyển vào trong đĩa thử nghiệm đáy bằng trong suốt Corning® 3632 chứa 45 μL dung dịch đệm gắn kết thử nghiệm hoặc mẫu đối chứng Gcg chưa đánh dấu (NSB ở nồng độ cuối 1

μM). Tiếp theo, bổ sung 50 μL hGcg-R (1,5 $\mu\text{g/l}$), mGcg-R (6,47 $\mu\text{g/l}$) hoặc màng rGcg-R (1,5 $\mu\text{g/l}$), 50 μL I-125 Gcg (nồng độ cuối trong phản ứng là 0,15 nM), và 50 μL hạt WGA (150 $\mu\text{g/l}$), đậy kín đĩa và trộn trên thiết bị lắc đĩa (đặt ở mức 6) trong 1 phút. Các đĩa được đọc bằng thiết bị đếm nhấp nháy PerkinElmer Trilux MicroBeta® sau khi để yên trong 12 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Kết quả được tính toán là tỷ lệ phần trăm của mức gắn kết I-125-Gcg đặc hiệu với sự có mặt của hợp chất. Nồng độ IC₅₀ tuyệt đối của hợp chất thu được từ phương trình hồi quy không tuyến tính giữa tỷ lệ phần trăm mức gắn kết đặc hiệu của I-125-Gcg theo nồng độ của hợp chất bổ sung. Nồng độ IC₅₀ được chuyển thành K_i bằng cách sử dụng phương trình Cheng-Prusoff (Cheng, Y., Prusoff, W. H., Biochem. Pharmacol. 22, 3099-3108, (1973)).

K_i của peptit ở ví dụ 1-7 và Gcg người ở hGcg-R, mGcg-R và rGcg-R được đưa ra dưới đây trong bảng 1.

Bảng 1

	hGcg-R K _i , nM $\pm$ SEM, (n)	mGcg-R K _i , nM $\pm$ SEM, (n)	rGcg-R K _i , nM $\pm$ SEM, (n)
Ví dụ 1	2,04 $\pm$ 1,02 (n=2)	1,92 $\pm$ 0,71 (n=2)	9,78 $\pm$ 0,22 (n=2)
Ví dụ 2	1,07 $\pm$ 0,16 (n=2)	0,991 $\pm$ 0,066 (n=2)	5,59 $\pm$ 0,24 (n=2)
Ví dụ 3	0,287 $\pm$ 0,171 (n=2)	0,174 (n=1)	1,56 $\pm$ 0,13 (n=2)
Ví dụ 4	0,738 (n=1)	0,774 (n=1)	5,86 (n=1)
Ví dụ 5	1,59 (n=1)	1,58 (n=1)	4,36 (n=1)
Ví dụ 6	0,316 (n=1)	0,123 (n=1)	0,98 (n=1)
Ví dụ 7	0,673 (n=1)	0,753 (n=1)	1,38 (n=1)
Glucagon người	3,64 $\pm$ 0,91 (n=3)	2,41 $\pm$ 0,22 (n=3)	23,3 $\pm$ 1,7 (n=3)

Các dữ liệu này chỉ ra rằng chất chủ vận thụ thể glucagon theo sáng chế gắn kết với thụ thể glucagon với ái lực tương tự với hoặc lớn hơn glucagon người ở ba loại thụ thể khác nhau (các thụ thể người, chuột nhắt và chuột cống).

Hoạt tính chức năng và tính chọn lọc

Hoạt tính chức năng và tính chọn lọc được xác định bằng cách định lượng cAMP nội bào trong các tế bào HEK293 biểu hiện thụ thể glucagon người (hGcg-R), thụ thể Peptit-1 tương tự Glucagon người (human Glucagon-Like Peptide-1 receptor-hGLP-1R) hoặc peptit ức chế ở dạ dày người (còn được biết đến như là thụ thể polypeptit kích thích tiết insulin phụ thuộc glucoza, hGIP-R). Quy trình và kết quả thí nghiệm được mô tả dưới đây.

Thử nghiệm cAMP chức năng ở hGcg-R sử dụng các tế bào 293HEK biểu hiện hGcg-R đã được tạo dòng (Lok, S, et. al., Gene 140 (2), 203-209 (1994)). cADN ở hGcg-R được tạo dòng phụ vào plasmid biểu hiện pH (Trans- activated expression of fully gamma-carboxylated recombinant human protein C, an antithrombotic factor. Grinnell, BW, et. al., Bio/Technology 5: 1189-1192 (1987)). ADN plasmid này được chuyển nhiễm vào các tế bào 293HEK và các tế bào được chọn lọc bằng 200 µg/mL Hygromycin.

Thử nghiệm cAMP chức năng ở hGLP-1-R sử dụng các tế bào 293HEK biểu hiện hGLP-1-R đã được tạo dòng (Graziano MP, Hey PJ, Borkowski D, Chicchi GG, Strader CD, Biochem Biophys Res Commun. 196(1): 141-6, 1993). cADN hGLP-1R cDNA được tạo dòng phụ thành plasmid biểu hiện pH (Trans-activated expression of fully gamma-carboxylated recombinant human protein C, an antithrombotic factor. Grinnell, B.W., Berg, D.T., Walls, J. and Yan, S.B. Bio/Technology 5:1189-1192, 1987). ADN plasmid này được chuyển nhiễm vào các tế bào 293HEK và các tế bào được chọn lọc bằng 200 µg/mL Hygromycin.

Thử nghiệm chức năng hGIP-R sử dụng hGIP-R (Usdin,T.B., Gruber,C., Modi,W. and Bonner,T.I., GenBank: AAA84418,1) được tách dòng thành plasmid pcDNA3,1 (Promega)-NeoR. Plasmid hGIP-R-pcDNA3,1/Neo được chuyển nhiễm vào các tế bào trứng chuột túi má Trung Quốc, CHO-S, cho môi trường nuôi cấy dạng huyền phù và được chọn lọc với sự có mặt của 500/mL Geneticin (Invitrogen).

Mỗi dòng tế bào biểu hiện quá mức thụ thể được xử lý với peptit trong DMEM (Môi trường Eagle được cải biến bởi Dulbecco, Gibco Cat# 31053) được bổ

sung 1X GlutaMAX™ (L-alanyl-L-glutamin dipeptit trong 0,85% NaCl, Gibco Cat# 35050), 0,1% casein (Sigma Cat# C4765), 250 μ M IBMX (3-Isobutyl-1-methylxantin) và 20 mM HEPES [N-(2-hydroxyethyl)piperazin-N'-(axit 2-etansulfonic), HyClone Cat# SH30237,01] trong 40 μ L thể tích thử nghiệm. Sau 60 phút ủ ở nhiệt độ trong phòng, sự gia tăng cAMP nội bào thu được (adenosin 3',5'-monophosphat vòng) được xác định định lượng bằng cách sử dụng kit thử nghiệm CisBio cAMP Dynamic 2 HTRF (CisBio 62AM4PEC). Lượng cAMP trong tế bào được phát hiện bằng cách bổ sung thể liên hợp cAMP-d2 trong dung dịch đệm phân giải tế bào (20 μ L) sau đó thêm kháng thể kháng cAMP-Eu3+-Cryptate, cũng trong dung dịch đệm phân giải tế bào (20 μ L). Dung dịch thử nghiệm cạnh tranh thu được được ủ trong ít nhất 60 phút ở nhiệt độ trong phòng, sau đó phát hiện bằng cách sử dụng dụng cụ PerkinElmer Envision® với kích thích ở 320 nm và phát xạ ở 665 nm và 620 nm. Các đơn vị hình ảnh (phát ra ở 665nm/620nm*10,000) tỷ lệ nghịch với lượng cAMP có mặt và được chuyển thành nM cAMP/lỗ bằng cách sử dụng đường cong tiêu chuẩn cAMP. Lượng cAMP được tạo ra (nM) trong mỗi lỗ được chuyển thành tỷ lệ phần trăm đáp ứng tối đa quan sát được với 10 nM GLP-1(7-36)NH₂ người (đối với thử nghiệm hGLP-1R), 10 nM Gcg người (đối với thử nghiệm hGcg-R) hoặc 10 nM GIP(1-42)NH₂ người (đối với thử nghiệm hGIP-R). Giá trị EC₅₀ tương đối và tỷ lệ phần trăm cao nhất (Emax) thu được bằng cách phân tích hồi quy không tuyến tính có sử dụng tỷ lệ phần trăm đáp ứng cực đại theo nồng độ của peptit được bổ sung, được khớp vào phương trình logic bốn thông số.

Dữ liệu chức năng đối với các ví dụ 1-7, GIP(1-42)NH₂ người, GLP-1(7-36)NH₂ người và Gcg người được chỉ ra trong bảng 2 dưới đây. Các giá trị trung bình của EC₅₀ được thể hiện là các giá trị trung bình hình học $\pm$ sai số tiêu chuẩn của giá trị trung bình này (SEM) với số lần lặp lại (n) được thể hiện trong ngoặc đơn. Dấu (>) chỉ ra rằng % hiệu lực không đạt đến 50% và EC₅₀ tính toán được bằng cách sử dụng nồng độ thử nghiệm cao nhất.

Bảng 2

	hGcg-R EC ₅₀ , nM ± SEM, (n)	hGlp-1R EC ₅₀ , nM ± SEM, (n)	hGIP-R EC ₅₀ , nM ± SEM, (n)
Ví dụ 1	0,00436 ± 0,00079 (n=4)	73,9 ± 19,6 (n=2)	>500 (n=3)
Ví dụ 2	0,0112 ± 0,0025 (n=3)	>100 (n=2)	>500 (n=3)
Ví dụ 3	0,00340 ± 0,00010 (n=2)	>100 (n=2)	>500 (n=3)
Ví dụ 4	0,00278 ± 0,00010 (n=2)	19,0 ± 8,2 (n=2)	>500 (n=3)
Ví dụ 5	0,0160 ± 0,0038 (n=2)	27,0 ± 4,5 (n=2)	>500 (n=3)
Ví dụ 6	0,00413 ± 0,00026 (n=2)	>100 (n=3)	>500 (n=3)
Ví dụ 7	0,0166 ± 0,0004 (n=2)	>100 (n=3)	>500 (n=3)
Glucagon người	0,00760 ± 0,00101 (n=7)	7,70 ± 1,03 (n=2)	>500 (n=3)
GLP-1 người	>10 (n=1)	0,076 ± 0,017 (n=2)	>500 (n=3)
GIP người	>10 (n=1)	>10 (n=1)	0,145 ± 0,041 (n=3)

Dữ liệu này chỉ ra rằng chất chủ vận thụ thể glucagon theo sáng chế có hiệu lực ở thụ thể glucagon tương tự như glucagon người với độ chọn lọc đối với thụ thể GLP-1 và thụ thể GIP gia tăng.

Dược động học

Dược động học ở chuột cống

Chuột cống đực Sprague Dawley được cho dùng liều đơn dưới da (100 nmol/kg) của hợp chất ví dụ trong dung dịch đệm Tris (pH 8,0) ở thể tích 1 mL/kg. Máu được lấy từ mỗi động vật ở 1, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, và 240 giờ sau khi dùng liều.

Nồng độ của các hợp chất trong huyết tương được xác định bằng phương pháp LC/MS. Mỗi phương pháp xác định peptit nguyên vẹn (peptit cộng đoạn mở rộng được liên kết). Đối với mỗi thử nghiệm, hợp chất và chất tương tự, được dùng làm chất chuẩn nội (IS), được chiết từ 100% huyết tương chuột cống hoặc khi (50 µl) bằng cách sử dụng metanol và axit formic 0,1%. Bằng cách ly tâm, tạo ra hai lớp khác biệt với hợp chất và IS nằm trong phần dịch nổi. Một phần phân ước 275 µl của dịch nổi được chuyển đến đĩa kết tủa protein nhờ nhiệt Thermo Protein Precipitation Plate trong điều kiện chân không để thu nhận dòng nước đi vào đĩa 96 lỗ.

Các mẫu được làm khô với khí nitơ đã được gia nhiệt để loại bỏ phần dịch nổi. Bổ sung thể tích gồm 150 µl axetonitril 30% và axit formic 5% vào các lỗ để hoàn nguyên mẫu. Các mẫu đã đưa vào bơm (20 µl) được nạp lên cột Supelco Analytical Discovery BIO Wide Pore C5-3, 5 cm X 0,1 mm, 3 µm. Dòng ra từ cột được đưa vào máy đo phổ khối Thermo Q-Exactive để phát hiện và định lượng.

Các thông số dược động học trung bình sau khi dùng liều đơn 100 nmol/kg dưới da cho chuột cống đực Sprague Dawley được nêu trong bảng 3 dưới đây (n=3 đối với các ví dụ 1, 2 và 5 và Tmax và Cmax đối với các ví dụ 3 và 4; n=2 đối với T_{1/2}, AUC_{0-inf} và CL/F đối với các ví dụ 3 và 4).

Bảng 3

Hợp chất	T _{1/2} (giờ)	Tmax (giờ)	Cmax (nmol/L)	AUC _{0-inf} (giờ*nmol/L)	CL/F (mL/giờ/kg)
Ví dụ 1	13	8	425	11692	8,8
Ví dụ 2	22	24	346	21329	4,7
Ví dụ 3	11	8	394	11133	9,2
Ví dụ 4	16	6	257	5948	17,0
Ví dụ 5	22	24	237	12948	7,8

Các chữ viết tắt: AUC_{0-inf} = diện tích dưới đường cong từ 0 đến vô cùng, CL/F = độ thanh thải/độ sinh khả dụng, Tmax = thời gian đạt đến nồng độ tối đa, Cmax = nồng độ tối đa trong huyết tương, T_{1/2} = thời gian bán thải, ND = không có dữ liệu.

Dữ liệu này chỉ ra rằng các ví dụ 1-5 có khoảng thời gian tác dụng kéo dài so với glucagon tự nhiên ở người, mà có $T_{1/2}$ bằng khoảng 30 phút.

Được động học ở khỉ *Cynomolgus*

Khỉ đực *Cynomolgus* được cho dùng liều đơn trong tĩnh mạch (50 nmol/kg) hoặc dưới da (50 nmol/kg) hợp chất thử nghiệm trong dung dịch đệm Tris (pH 8,0) ở thể tích 0,25 mL/kg. Máu được lấy từ mỗi động vật ở 0,5 (chỉ IV), 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 168, 192, 240, 336, 480, 576, và 672 giờ sau khi dùng liều. Nồng độ của các hợp chất trong huyết tương được xác định bằng phương pháp LC/MS thường được mô tả trên đây trong nghiên cứu đối với chuột cống Sprague dawley.

Các thông số được động học trung bình (n=2) được đưa ra dưới đây trong bảng 4.

Bảng 4

Hợp chất (Đường dùng/liều lượng)	ID động vật	$T_{1/2}$ (giờ)	T_{max} (giờ)	C_0 hoặc C_{max} (nmol/L)	AUC_{0-inf} (giờ*nmol/L)	CL hoặc CL/F (mL/giờ/kg)
Ví dụ 1 (IV 50 nmol/kg)	Trung bình	42	Không có	1182	37278	1,36
Ví dụ 1 (SC 50 nmol/kg)	Trung bình	44	9	425	31821	1,57
Ví dụ 2 (SC 50 nmol/k)	Trung bình	79	18	377	46292	1,08

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

Dữ liệu này chỉ ra rằng các ví dụ 1 và 2 có khoảng thời gian tác dụng kéo dài so với glucagon tự nhiên ở người, mà có $T_{1/2}$ nhỏ hơn một giờ.

Nghiên cứu *in vivo*

Giám sát liên tục lượng Glucoza ở chuột cống

Chuột cống đực Sprague-Dawley bình thường 12-14 tuần tuổi (HARLANTM, Indianapolis, IN) được nhốt riêng rẽ trong một hệ thống có điều chỉnh nhiệt độ (24 °C) với chu kỳ sáng/tối là 12 giờ và được cho tiếp cận tự do với thức ăn (TD2014 TEKLAB GLOBAL RODENT DIET®, HARLANTM Labs, Indianapolis, IN) và nước uống. Sau 2 tuần thích nghi với hệ thống này, chuột cống được cấy với vật truyền HD-XG (Data Sciences International, St Paul, MN).

Phẫu thuật cấy ghép vật truyền được thực hiện trong điều kiện gây mê bằng 2% đến 3% isofluran (2-clo-2-(diflometoxy)-1,1,1-trifloetan). Thiết bị cảm biến glucoza của vật truyền được đặt trong động mạch chủ hướng xuống. Thiết bị cảm biến nhiệt của vật truyền được đặt trong ổ bụng với vật truyền. Bảy ngày sau khi phẫu thuật cấy ghép vật truyền, tất cả chuột cống được đặt trong thiết bị nhận đo đặc từ xa để ghi liên tục các thông số về lượng glucoza huyết và thân nhiệt trung tâm ở các khoảng cách thời gian 1 phút trong khi chuột cống được chuyển động tự do trong chuồng của chúng. Dữ liệu thu được được kiểm soát và phân tích bằng phần mềm hệ thống DATAQUEST A.R.T.TM (Data Sciences International, St Paul, MN). Việc hiệu chỉnh ban đầu đối với cảm biến glucoza đạt được nhờ thử nghiệm khả năng dung nạp glucoza trong màng bụng (ipGTT) 7 ngày sau khi phẫu thuật và các lần hiệu chỉnh tiếp theo được thực hiện mỗi ngày nhờ việc xác định lượng glucoza huyết qua lấy máu ở đuôi. Bắt đầu ở các ngày 9-11 sau phẫu thuật, hợp chất thử nghiệm ở liều lượng 10 nmol/kg được cho dùng một lần bằng cách tiêm dưới da trong dung dịch đệm 20 mM Tris-HCl ở độ pH 8,0, 1mL/Kg thể trọng. Mức glucoza huyết được giám sát lên tới 7 ngày.

Dữ liệu glucoza huyết chỉ ra rằng mỗi ví dụ 1 – 7 đều dẫn đến sự gia tăng liên tục mức đường huyết theo cách phụ thuộc liều.

Ảnh hưởng đến nồng độ glucoza huyết ở ở bò sữa

Năm con bò sữa Holstein không đang trong thời kỳ tiết sữa, trung bình 1313 pao (595kg) và đã trải qua ít nhất một thời kỳ tiết sữa bình thường, được điều trị bằng hợp chất nêu ở ví dụ 6 với các liều tăng dần. Bò ban đầu được điều trị bằng cách tiêm dưới da 1,5 mg hợp chất nêu ở ví dụ 6/bò. Nồng độ glucoza huyết được xác định ở các khoảng cách thời gian khác nhau bằng cách sử dụng đường kế cầm tay trong suốt 168 giờ sau khi dùng liều. Trong khoảng thời gian dùng liều này và tất cả các khoảng thời gian dùng liều tiếp theo, nồng độ glucoza huyết được xác định ở thời gian zero đóng vai trò làm đường nền đối với khoảng thời gian đó. Một tuần sau khi dùng liều đầu tiên, bò được điều trị bằng 5,0 mg hợp chất nêu ở ví dụ 6/bò. Nồng độ glucoza huyết lại được giám sát trong suốt 168 giờ sau khi điều trị. Cuối cùng, hai tuần sau khi dùng liều 5,0 mg hợp chất nêu ở ví dụ 6/con bò, tất cả các con bò được điều trị bằng cách dùng dưới da 15 mg hợp chất nêu ở ví dụ 6/con bò và nồng độ glucoza huyết được giám sát trong suốt 336 giờ sau khi dùng liều.

Dữ liệu được đưa ra trong bảng 5, Tất cả các liều lượng của hợp chất nêu ở ví dụ 6 được thử nghiệm tạo ra sự gia tăng đột ngột nồng độ glucoza huyết so với nồng độ đường nền. Ngoài ra, việc sử dụng 1,5, 5,0 và 15,0 mg/con bò tạo ra sự gia tăng liên tục nồng độ glucoza huyết kéo dài trong suốt 96, 144 và 312 giờ, tương ứng.

Bảng 5

Nồng độ glucoza huyết (mg/dl) trong bò sữa không đang trong thời kỳ tiết sữa sau khi tiêm dưới da hợp chất nêu ở ví dụ 6			
Giờ	1,5 mg/con bò	5,0 mg/con bò	15,0 mg/con bò
Sau khi dùng liều	(n=5)	(n=5)	(n=5)
0	61,0	57,6	59,2
2	70,2**	75,6**	88,4**
4	76,8**	76,2**	71,0*
8	74,8**	75,2**	65,2

24	66,6 [^]	70,4 ^{**}	68,2 [^]
48	66,6 [^]	75,6 ^{**}	74,2 ^{**}
72	72,6 ^{**}	72,4 ^{**}	78,0 ^{**}
96	68,6 ^{**}	68,6 [*]	76,8 ^{**}
120	64,4	67,0 [*]	70,8 [*]
144	58,8	67,8 [*]	72,0 [*]
168	57,6	63,6	73,6 ^{**}
192			77,4 ^{**}
216			79,2 ^{**}
240			75,8 ^{**}
264			76,6 ^{**}
288			69,4
312			71,4 [*]
336			66,6
Sai số chuẩn	2,3	2,8	3,8
[^] P<.10, [*] P<.05, ^{**} P<.01 so với thời gian 0 (giá trị đường nền)			

Các đặc tính lý học và hóa học

Độ hòa tan và độ ổn định

Các mẫu hợp chất nêu ở các ví dụ 1-6 được điều chế ở 5 mg/mL trong H₂O và được thẩm tách như đã mô tả vào các dung dịch đệm C6N (10 mM xitrat, 100 mM NaCl, pH 6), C7N (10 mM xitrat, 100 mM NaCl, pH 7), H6,5N (10 mM Histidin, 100 mM NaCl, pH 6,5) và H7,5N (10 mM Histidin, 100 mM NaCl, pH 7,5). Các mẫu được cô đặc đến 10 mg/mL peptit như đã mô tả và được giữ ở 4°C trong một tuần. Các mẫu được đánh giá bằng mắt thường và bằng SEC-HPLC như đã mô tả.

Các hợp chất nêu ở ví dụ 1-6 trong tất cả các chế phẩm đều trong suốt và không màu sau một tuần ở 4°C. Dữ liệu SEC-HPLC được nêu trong bảng 6. Không

có sự gia tăng đáng kể về polyme có trọng lượng phân tử cao (HMW) hoặc sự giảm đỉnh chính. Việc thu hồi bằng SEC-HPLC là trong giới hạn 5% đối với các hợp chất nêu ở ví dụ 1-6.

Bảng 6

Dung dịch đậm	Δ % HMW đỉnh				
	Ví dụ 1	Ví dụ 2	Ví dụ 3	Ví dụ 4	Ví dụ 6
C6N	0,13	-0,03	-0,01	0,64	-0,03
C7N	0	-0,06	0,16	0,26	-0,26
H6,5N	-0,02	0,06	-0,03	0,35	0,11
H7,5N	0,35	-0,15	-0,09	0,44	0,14
Dung dịch đậm	Δ % đỉnh chính				
	Ví dụ 1	Ví dụ 2	Ví dụ 3	Ví dụ 4	Ví dụ 6
C6N	-0,02	0,08	0,08	-3,42	-0,98
C7N	0,26	-0,26	-0,18	-1,19	0,36
H6,5N	-0,39	-1,28	-0,58	-2,88	-1,17
H7,5N	-1,43	-0,87	-1,21	-0,79	-1,68

Độ hòa tan của các hợp chất nêu ở ví dụ 1-2 cũng được đánh giá trong ba công thức bào chế khác nhau: T7 (10 mM Tris-HCl, pH 7), T7Tm (10 mM Tris-HCl, 0,02% polysorbat-20, 29 mM m-cresol, pH 7), và T7Nm (10 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 29 mM m-cresol, pH 7). Các hợp chất được điều chế trong T7 nhờ thẩm tách như đã mô tả. Các mẫu được bào chế ở 2 mg/mL trong T7, T7Tm hoặc T7Nm sau đó được cô đặc đến nồng độ peptit 10 mg/mL như đã mô tả. Các chế phẩm được giữ trong một tuần ở 4°C và được đánh giá bằng mắt thường và bằng SEC-HPLC và RP-HPLC như đã mô tả.

Tất cả các chế phẩm đều trong suốt và không màu. Dữ liệu SEC-HPLC và RP-HPLC như trong bảng 7. Sự gia tăng polyme HMW không vượt quá 0,2% đối

với chế phẩm bất kỳ. Thu hồi đỉnh bởi RP-HPLC nằm trong giới hạn 5% đối với tất cả các chế phẩm.

Bảng 7

Peptit	Chế phẩm	% Δ HMW
Ví dụ 1	T7m	0,1
	T7Nm	0,05
	T7Tm	0,18
Ví dụ 2	T7m	0,1
	T7Nm	0,08
	T7Tm	0,07

Dữ liệu này chỉ ra rằng các hợp chất nêu ở ví dụ 1-6 có đặc tính độ hòa tan chấp nhận được trong các điều kiện dung dịch đệm khác nhau.

Độ ổn định hóa học

Độ ổn định hóa học đối với hợp chất nêu ở ví dụ 1 được xác định trong các dung dịch đệm khác nhau có các giá trị độ pH khác nhau. Các mẫu được điều chế trong H₂O đến nồng độ 5 mg/mL, được thẩm tách bằng cách sử dụng các catxet Slide-A-Lyzer Dialysis, 2000 MWCO (part number 66203) qua đêm ở 4°C vào dung dịch đệm cần nghiên cứu, lọc qua thiết bị lọc cỡ lỗ 0,22 μ m (Millex, SLGV013SL) sau đó pha loãng đến 1 mg/mL trong dung dịch đệm tương ứng. Các chế phẩm đệm là 10 mM Tris-HCl trong H₂O pH 8 (T8), 10 mM Tris-HCl trong H₂O pH 7 (T7), 10 mM Histidin trong H₂O pH 7 (H7), hoặc 10 mM Xitrat trong H₂O pH 6 (C6). Mỗi mẫu có nồng độ 1 mg/mL được chuyển vào ba lọ nhỏ. Các mẫu được giữ ở 4°C, 25°C và 40°C. Các mẫu được đánh giá 2 tuần một lần trong tổng số bốn tuần. Các mẫu được đánh giá độ đục và sự tách pha bằng mắt thường. Độ ổn định của hợp chất được đánh giá bằng HPLC phân tích pha đảo (RP-HPLC) trên cột Waters Symmetry Shield RP18, 3,5 μ m, 4,6 X 100 mm (part number 18600179) được gia nhiệt ở 60°C với gradient AB (A=0,1% TFA/H₂O, B=0,085% TFA/axetonitril) gồm 10% B đẳng dòng trong 3 phút, 30% B trong 3 phút, 30-60% B trong 30 phút, và 95% B trong 2

phút ở tốc độ dòng 0,9 mL/phút (chiều dài bước sóng 214 nm). Độ ổn định cũng được đánh giá bằng HPLC loại trừ theo kích thước (SEC-HPLC) trên cột Insulin HMWP, 7,8 X 300 mm (part number WAT2015549) với dung dịch đệm vận hành là 20 mM natri phosphat, 20% axetonitril, pH 7,2 vận hành ở tốc độ dòng là 0,5 mL/phút trong 40 phút.

Về bề ngoài vật lý là trong suốt đến không màu, không đục hoặc có những hạt nhỏ ở độ pH 7 và pH 8 đối với hợp chất nêu ở ví dụ 1. Kết quả RP-HPLC và SEC-HPLC được tóm tắt trong bảng 8 dưới đây. Việc thu hồi trong giới hạn 5% bởi RP-HPLC và SEC-HPLC là chấp nhận được.

Bảng 8

Nhiệt độ	%Δ đỉnh chính bởi RP ở 4 tuần			
	T8	T7	H7	C6
4°C	3,13%	2,52%	1,73%	2,01%
25°C	4,84%	2,92%	0,12%	3,05%
40°C	1,41%	1,74%	8,69%	3,61%
Nhiệt độ	%Δ đỉnh chính bởi SEC ở 4 tuần			
	T8	T7	H7	C6
4°C	0,21%	0,6%	1,77%	0,31%
25°C	0,17%	0,1%	3,1%	8,72%
40°C	0,65%	0,97%	1,22%	1,17%

Các mẫu trong dung dịch đệm T8 được giữ ở 4°C và 40°C trong bốn tuần cũng được phân tích bằng sắc lý lỏng-khối phổ (LC-MS). Không nhận thấy vị trí phân hủy chủ yếu nào đối với hợp chất nêu ở ví dụ 1 ở độ pH 8. Nhìn chung, độ ổn định hóa học đối với hợp chất nêu ở ví dụ 1 chỉ ra độ ổn định tuyệt vời trong các điều kiện đệm được thử nghiệm.

Độ ổn định vật lý

Các mẫu thử nghiệm chứa hợp chất nêu ở ví dụ 1 được điều chế nhờ thẩm tách trong dung dịch đệm T7 sau đó bào chế ở nồng độ peptit 2 mg/mL trong T7m, T7Nm, và T7Tm như đã mô tả. Mỗi chế phẩm được chuyển đến các lọ thủy tinh sạch

và được khuấy ở 400 vòng/phút nhờ thanh khuấy từ được bọc Teflon ở nhiệt độ trong phòng trong 6 giờ. Các phân phân ước 100 μ L được đưa đi đánh giá ở thời điểm 0, 1 giờ, 3 giờ và 6 giờ. Các mẫu được đánh giá bằng mắt thường và bằng SEC-HPLC như đã nêu ở trên.

Tất cả các chế phẩm đều trong suốt và không màu và không đục hoặc kết tủa. Như được chỉ ra trong bảng 9, tỷ lệ phân trăm peptit trong đỉnh chính của SEC-HPLC vẫn nằm trong giới hạn 5% đối với tất cả các chế phẩm. Dữ liệu chỉ ra rằng hợp chất nêu ở ví dụ 1 có các đặc tính ổn định vật lý tốt trong các điều kiện thử nghiệm.

Bảng 9

Chế phẩm	% đỉnh chính			
	Thời điểm 0	1 giờ	3 giờ	6 giờ
T7m	95,94	96,02	96,18	95,69
T7Nm	95,39	95,45	95,43	95,43
T7Tm	96,21	96,12	96,27	96,18

Nghiên cứu phối hợp

Hoạt tính trong đồng chế phẩm với chất đồng chủ vận GIP-GLP-1 hoặc chất chủ vận GLP-1R

Đồng chế phẩm giữa hợp chất nêu ở ví dụ 1 và 3 với chất đồng chủ vận GIP-GLP-1 có SEQ ID NO: 15 hoặc dulaglutide được bào chế như được mô tả dưới đây trong các nghiên cứu về độ ổn định, và hoạt tính của mỗi hợp chất riêng rẽ và các đồng chế phẩm được xác định bằng cách sử dụng các phương pháp đã mô tả trên đây. Dữ liệu được chỉ ra trong các bảng 10 và 11. Dấu (>) chỉ ra % hiệu lực không đạt đến 50% và EC₅₀ tính toán được bằng cách sử dụng nồng độ thử nghiệm cao nhất.

Bảng 10

		EC ₅₀ (trung bình của N = 2 ± độ lệch chuẩn, *N = 1)		
Điều trị	Điều kiện mẫu	Thử nghiệm thụ thể Gcg	Thử nghiệm thụ thể GLP-1	Thử nghiệm thụ thể GIP
Ví dụ 3	T7-4C-4wk	14,3 ± 3,4 pM	> 100 nM	> 100 nM
	T7-40C-4wk	24,9 ± 2,9 pM	> 100 nM	> 100 nM
	T7m-4C-4wk	21,1 ± 4,0 pM	> 100 nM	> 100 nM
	T7m-40C-4wk	21,1 ± 5,1 pM	> 100 nM	> 100 nM
Ví dụ 3 + chất đồng chủ vận GIP-GLP-1	T7-4C-4wk	21,3 ± 2,5 pM	1,47 nM*	0,65 nM*
	T7-40C-4wk	21,9 ± 0,4 pM	2,66 nM*	0,74 nM*
	T7m-4C-4wk	16,0 ± 3,4 pM	3,08 nM*	0,71 nM*
	T7m-40C-4wk	24,2 ± 0,5 pM	2,61 nM*	0,40 nM*
Ví dụ 1	T7-4C-4wk	20,3 ± 2,5 pM	> 100 nM	> 100 nM
	T7-40C-4wk	21,7 ± 3,4 pM	57,53 nM*	> 100 nM
	T7m-4C-4wk	23,0 ± 0,3 pM	43,83 nM*	> 100 nM
	T7m-40C-4wk	19,4 ± 5,0 pM	49,66 nM*	> 100 nM
Ví dụ 1 + chất đồng chủ vận GIP-GLP-1	T7-4C-4wk	23,7 ± 0,7 pM	1,78 nM*	0,49 ± 0,16 nM
	T7-40C-4wk	19,2 ± 2,4 pM	1,65 nM*	0,60 ± 0,21 nM
	T7m-4C-4wk	16,5 ± 1,8 pM	1,41 nM*	0,39 ± 0,06 nM
	T7m-40C-4wk	18,7 ± 0,6 pM	1,21 nM*	0,36 ± 0,34 nM
chất đồng chủ vận GIP-GLP-1	T7-4C-4wk	> 100 nM	2,56 nM*	0,70 nM*
	T7-40C-4wk	> 100 nM	2,76 nM*	0,41 nM*
	T7m-4C-4wk	> 100 nM	1,61 nM*	0,30 ± 0,19 nM
	T7m-40C-4wk	> 100 nM	0,73 nM*	0,15 ± 0,02 nM

Bảng 11

		EC ₅₀ (trung bình của N = 2 ± độ lệch chuẩn)		
Peptit	Điều kiện mẫu	Thử nghiệm thụ thể Gcg	Thử nghiệm thụ thể GLP-1	Thử nghiệm thụ thể GIP
Ví dụ 1	C6.5-4C-4wk	17,8 ± 6,8 pM	41,6 ± 5,0 nM	> 100 nM
	C6.5-40C-4wk	24,3 ± 11,1 pM	54,6 ± 46,2 nM	> 100 nM
	C6.5MT-4C-4wk	18,8 ± 1,8 pM	55,6 ± 9,2 nM	> 100 nM
	C6.5MT-40C-4wk	14,6 ± 5,0 pM	47,9 ± 5,8 nM	> 100 nM
Ví dụ 3	C6.5-4C-4wk	36,9 ± 29,6 pM	> 100 nM	> 100 nM
	C6.5-40C-4wk	25,7 ± 6,9 pM	> 100 nM	> 100 nM
	C6.5MT-4C-4wk	19,3 ± 1,1 pM	> 100 nM	> 100 nM
	C6.5MT-40C-4wk	21,4 ± 3,1 pM	> 100 nM	> 100 nM
Ví dụ 1 + Dulaglutide	C6.5MT-4C-4wk	14,6 ± 0,8 pM	0,36 ± 0,01 nM	> 100 nM
	C6.5MT-40C-4wk	15,2 ± 6,4 pM	0,37 ± 0,00 nM	> 100 nM
Ví dụ 3 + Dulaglutide	C6.5MT-4C-4wk	22,7 ± 5,2 pM	0,57 ± 0,25 nM	> 100 nM
	C6.5MT-40C-4wk	22,6 ± 2,1 pM	0,30 ± 0,01 nM	> 100 nM
Dulaglutide	C6.5-4C-4wk	51,9 ± 68,1 nM	0,37 ± 0,11 nM	> 100 nM
	C6.5-40C-4wk	> 100 nM	0,31 ± 0,17 nM	> 100 nM
	C6.5MT-4C-4wk	54,0 ± 65,0 nM	0,40 ± 0,14 nM	> 100 nM
	C6.5MT-40C-4wk	> 100 nM	0,29 ± 0,09 nM,	> 100 nM

Dữ liệu này cho thấy độ sinh khả dụng của các hợp chất nêu trong ví dụ 1 và 3 được duy trì trong điều kiện stress và không stress và/hoặc kết hợp với chất chủ vận GLP-1R hoặc chất đồng chủ vận GIP-GLP-1,

Nghiên cứu in vivo việc phối hợp với chất chủ vận GLP-1R hoặc chất đồng chủ vận GIP-GLP-1

Ảnh hưởng của tổ hợp gồm chất chủ vận thụ thể glucagon theo sáng chế với chất chủ vận GLP-1R hoặc chất đồng chủ vận GIP-GLP-1 tác dụng kéo dài được thử nghiệm trên chuột nhắt C57/BL6 bị béo phì do chế độ ăn (DIO). Chất đồng chủ vận GIP-GLP-1 có cấu tạo SEQ ID NO: 14, như đã mô tả ở trên. Chất chủ vận GLP-1R là thể dung hợp GLP-1-Fc được mô tả trong WO2005000892. Đồng chế phẩm được bào chế nói chung như được mô tả dưới đây trong các nghiên cứu về độ ổn định của đồng chế phẩm.

Các động vật C57/BL6 DIO, mặc dù không bị tiểu đường, thể hiện sự kháng insulin, bệnh rối loạn mỡ máu, và bệnh gan nhiễm mỡ, tất cả các đặc điểm của hội chứng chuyển hóa, sau khi được áp dụng chế độ ăn với lượng béo cao (60% Kcal từ chất béo) trong 12 tuần. Vì vậy, các nghiên cứu ở những động vật này có thể được dùng để nghiên cứu ảnh hưởng của các chất trị liệu được đề xuất đến các thông số như sự giảm cân, thành phần cơ thể và chứng nhiễm mỡ ở gan.

Chuột nhắt đực DIO C57/BL6 20-21 tuần tuổi có cân nặng 42-47 g và có khối lượng chất béo ban đầu từ 11,9 g đến 17,2 g được sử dụng. Các động vật được nhốt riêng rẽ trong môi trường có điều chỉnh nhiệt độ (24°C) với chu trình sáng/tối 12 giờ (sáng vào 22:00), và tự do ăn và uống. Sau 2 tuần thích nghi khí hậu của khu vực nuôi giữ, chuột nhắt được chia ngẫu nhiên vào các nhóm điều trị (n=5/nhóm) dựa trên khối lượng cơ thể và mỗi nhóm có khối lượng cơ thể trung bình khởi điểm tương tự nhau.

Tá được lỏng, hợp chất thử nghiệm (khoảng liều lượng từ 3 đến 10 nmol/kg), chất chủ vận GLP-1R (10 nmol/kg), chất đồng chủ vận GIP-GLP-1 (10 nmol/kg) hoặc tổ hợp của chúng (khoảng liều lượng từ 3 đến 10 nmol/kg) được hòa tan trong tá được lỏng (20 mM dung dịch đệm Tris-HCl, pH 8,0) được dùng bằng cách tiêm dưới da cho chuột nhắt được cho ăn tùy thích 30-90 phút trước khi bắt đầu chu trình tối cứ mỗi ba ngày trong 15 ngày. Việc tiêm dưới da được thực hiện vào ngày 1, 4, 7, 10, và 13. Thể trọng, tiêu thụ thức ăn và nồng độ glucoza được xác định hằng ngày trong suốt thời gian nghiên cứu. Sự thay đổi tuyệt đối về thể trọng được tính toán bằng cách trừ đi thể trọng của chính động vật trước khi tiêm phân tử lần thứ nhất. Vào ngày 0 và 14, khối lượng chất béo tổng được đo bằng cộng hưởng từ hạt nhân

(Nuclear Magnetic Resonance - NMR) sử dụng dụng cụ Echo Medical System (Houston, TX).

Nồng độ glucose huyết được xác định hằng ngày bằng đường kế Accu-Chek (Roche) từ máu lấy từ tĩnh mạch đuôi. Ở cuối nghiên cứu, động vật được giết và gan được lấy ra và làm lạnh đông. Triglycerit của gan được xác định từ dịch đồng nhất của gan được thu khi giết, và nồng độ cholesterol trong huyết tương được xác định trên thiết bị phân tích lâm sàng Hitachi Modular P. Sự so sánh thống kê giữa các nhóm được thực hiện bằng cách sử dụng ANOVA một chiều sau thử nghiệm so sánh bội của Dunnett. Giá trị ED₅₀ để làm giảm sự sút cân được xác định trong GraphPad Prism có sử dụng công cụ hiệu chỉnh không tuyến tính.

Dữ liệu về sự thay đổi đối với sự sút cân và tỷ lệ phần trăm khối lượng mỡ đối với các nghiên cứu được thực hiện như đã nêu trên đây được đưa ra dưới đây trong các bảng 12 (Ví dụ 1) và 13 (Ví dụ 1 và 2). Kết quả trong bảng 11 được biểu thị dưới dạng giá trị trung bình $\pm$ SEM của 5 chuột nhất trên mỗi nhóm, kết quả trong bảng 12 được biểu thị dưới dạng giá trị trung bình $\pm$ SEM của 6 chuột nhất trên mỗi nhóm.

Tổ hợp gồm các hợp chất nêu ở ví dụ 1 và 2 với chất chủ vận GLP-1R hoặc chất đồng chủ vận GIP-GLP-1 có tác dụng hiệp đồng lên thể trọng và khối lượng mỡ so với tác dụng của các hợp chất nêu ở ví dụ 1 hoặc 2, chất chủ vận GLP-1R hoặc chất đồng chủ vận GIP-GLP-1 riêng rẽ (Bảng 12 và 13).

Bảng 12

Điều trị	Liều (nmol/kg)	% Thay đổi so với thể trọng ban đầu	% Thay đổi so với lượng mỡ ban đầu
Tá dược lỏng	0	-3,72 $\pm$ 1,169	-4,39 $\pm$ 1,84
Ví dụ 1	3	-6,07 $\pm$ 1,81	-9,60 $\pm$ 3,35
Ví dụ 1	10	-10,56 $\pm$ 1,78	-18,12 $\pm$ 3,40*
Chất chủ vận GLP1-R	10	-15,54 $\pm$ 1,67**	-28,32 $\pm$ 2,94***
Chất chủ vận	10+3	-26,57 $\pm$ 2,05****	-49,88 $\pm$

GLP1-R + Ví dụ 1			3,87****
Chất chủ vận GLP1-R + Ví dụ 1	10+10	-30,78 ± 1,97****	-62,22 ± 4,10****
Chất đồng chủ vận GIP-GLP-1	10	-23,67 ± 1,83****	-48,21 ± 4,67****
Chất đồng chủ vận GIP-GLP-1 + Ví dụ 1	10+3	-34,83 ± 3,60****	-68,99 ± 4,05****
Chất đồng chủ vận GIP-GLP-1 + Ví dụ 1	10+10	-43,06 ± 2,49****	-82,06 ± 1,41****

*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 và ****p<0,0001 có nghĩa so với nhóm đối chứng dùng tá dược lỏng (thử nghiệm ANOVA một chiều, Dunnett's).

Bảng 13

Điều trị	Liều (nmol/kg)	% Thay đổi so với thể trọng ban đầu	% Thay đổi so với lượng mỡ ban đầu
Tá dược lỏng	0	1,14 ± 1,02	3,17 ± 1,61
Chất chủ vận GLP1-R	10	-10,74 ± 1,42*	-21,52 ± 3,51*
Chất đồng chủ vận GIP-GLP-1	10	-17,76 ± 4,52***	-33,30 ± 7,35****
Ví dụ 1	3	-1,77 ± 2,08	-2,08 ± 3,59
Ví dụ 1	10	-3,87 ± 1,41	-6,20 ± 2,90
Ví dụ 2	3	-0,85 ± 2,71	0,11 ± 5,11
Ví dụ 2	10	-5,29 ± 0,84	-6,03 ± 1,99
Chất chủ vận GLP1-R + Ví dụ 1	10+3	-17,49 ± 2,90***	-34,41 ± 7,38****
Chất chủ vận GLP1-R + Ví dụ 1	10+10	-23,49 ± 1,40****	-48,16 ± 4,14****
Chất chủ vận GLP1-R + Ví	10+3	-14,83 ± 2,43**	-27,21 ± 6,34**

dự 2			
Chất chủ vận GLP1-R + Ví dụ 2	10+10	-30,60 ± 4,33****	-55,55 ± 7,93****
Chất chủ vận GIP-GLP + Ví dụ 1	10+3	-18,41 ± 1,23****	-39,06 ± 4,13****
Chất chủ vận GIP-GLP + Ví dụ 1	10+10	-32,01 ± 3,81****	-65,66 ± 5,92****
Chất chủ vận GIP-GLP + Ví dụ 2	10+3	-15,94 ± 1,20***	-33,54 ± 3,43****
Chất chủ vận GIP-GLP + Ví dụ 2	10+10	-40,37 ± 4,03****	-76,34 ± 3,11****

*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 và ****p<0,0001 có nghĩa so với nhóm đối chứng dùng tá dược lỏng (thử nghiệm ANOVA một chiều, Dunnett's).

Dữ liệu về ảnh hưởng đến nồng độ glucoza huyết, cholesterol trong huyết tương và triglyxerit trong gan được đưa ra dưới đây trong bảng 14 (giá trị trung bình ± SEM, n=5) và 15 (giá trị trung bình ± SEM, n=6). Trong khi các hợp chất nêu ở ví dụ 1 và 2 được dùng riêng rẽ làm tăng nồng độ glucoza huyết theo cách phụ thuộc liều, tổ hợp của những chất chủ vận thụ thể glucagon được nêu làm ví dụ này với chất chủ vận GLP-1R hoặc chất đồng chủ vận GIP-GLP-1 làm giảm nồng độ glucoza huyết, cholesterol trong huyết tương và triglyxerit trong gan.

Bảng 14

Điều trị	Liều (nmol/kg)	Nồng độ glucoza huyết AUC (mg/dl/15 ngày)	Cholesterol trong huyết tương (mg/dl)	Triglyxerit trong gan (mg/g mô)
Tá dược lỏng	0	2224 ± 78,55	228,00 ± 6,50	200,29 ± 33,67
Ví dụ 1	3	2553 ± 112,5*	207,00 ± 6,43	68,83 ± 5,82****
Ví dụ 1	10	2607 ± 109,4**	157,80 ± 15,44****	32,94 ± 11,23****
Chất chủ vận	10	1565 ± 26,39****	153,40 ±	55,01 ±

GLP1-R			11,64****	12,62****
Chất chủ vận GLP1-R + Ví dụ 1	10+3	1452 ± 25,48****	96,20 ± 7,86****	20,89 ± 4,39****
Chất chủ vận GLP1-R + Ví dụ 1	10+10	1388 ± 80,92****	86,60 ± 3,47****	12,78 ± 1,57****
Chất đồng chủ vận GIP-GLP-1	10	1453 ± 27,96****	137,80 ± 9,05****	32,60 ± 6,70****
Chất đồng chủ vận GIP-GLP-1 + Ví dụ 1	10+3	1256 ± 111,5****	103,00 ± 3,56****	35,47 ± 15,78****
Chất đồng chủ vận GIP-GLP-1 + Ví dụ 1	10 + 10	1044 ± 63,37****	77,40 ± 10,10****	24,99 ± 13,43****

*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 so với nhóm đối chứng (ANOVA một chiều, Dunnett's).

Bảng 15

Điều trị	Liều (nmol/kg)	Nồng độ glucoza huyết AUC (mg/dl/15 ngày)	Cholesterol trong huyết tương (mg/dl)	Triglycerit trong gan (mg/g mô)
Tá dược lỏng	0	1806 ± 52,85	224,40 ± 5,12	174,72 ± 26,56
Chất chủ vận GLP1-R	10	1189 ± 28,83***	149,50 ± 12,02****	46,06 ± 12,31****
Chất đồng chủ vận GIP-GLP-1	10	1137 ± 63,27****	135,50 ± 7,11****	48,50 ± 7,18****
Ví dụ 1	3	2080 ± 103,2	230,50 ± 6,61	111,87 ± 22,43**

Ví dụ 1	10	2491 ± 110,9****	152,83 ± 8,82****	29,42 ± 3,54****
Ví dụ 2	3	2433 ± 124,7***	201,83 ± 10,11	75,45 ± 12,82****
Ví dụ 2	10	2641 ± 186,6****	117,67 ± 4,46****	16,33 ± 1,53****
Chất chủ vận GLP1-R + Ví dụ 1	10 + 3	1081 ± 56,68****	132,50 ± 19,56****	34,34 ± 6,48****
Chất chủ vận GLP1-R + Ví dụ 1	10 + 10	1031 ± 61,29****	83,33 ± 8,50****	25,57 ± 7,27****
Chất chủ vận GLP1-R + Ví dụ 2	10 + 3	1098 ± 52,69****	152,00 ± 9,32****	38,99 ± 5,96****
Chất chủ vận GLP1-R + Ví dụ 2	10 + 10	1008 ± 107,2****	78,50 ± 6,03****	34,42 ± 14,36****
Chất đồng chủ vận GIP-GLP-1 + Ví dụ 1	10 + 3	1142 ± 31,32****	131,83 ± 6,42****	22,48 ± 3,92****
Chất đồng chủ vận GIP-GLP-1 + Ví dụ 1	10 + 10	916,9 ± 97,73****	91,67 ± 4,75****	6,99 ± 1,29****
Chất đồng chủ vận GIP-GLP-1 + Ví dụ 2	10 + 3	1063 ± 20,89****	119,33 ± 5,79****	22,87 ± 5,94****
Chất đồng chủ vận GIP-GLP-1 + Ví dụ 2	10 + 10	801,8 ± 48,21****	90,33 ± 7,89****	17,99 ± 9,65****

*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 so với nhóm đối chứng (ANOVA một chiều, Dunnett's).

Độ ổn định trong đồng chế phẩm với chất đồng chủ vận GIP-GLP-1

Các mẫu chứa hợp chất nêu trong ví dụ 1 và 3 được điều chế và thẩm tách dựa vào T7 như đã mô tả. Tất cả các mẫu đều được bào chế riêng rẽ ở nồng độ peptit 1 mg/mL trong T7, T7m, T7N và T7Nm. Chất đồng chủ vận GIP-GLP-1 có SEQ ID NO: 15 cũng được bào chế và thẩm tách dựa trên T7 như đã mô tả đối với chất chủ vận thụ thể glucagon được nêu làm ví dụ. Chất đồng chủ vận GIP-GLP-1 được bào chế ở nồng độ peptit 1 mg/mL trong T7, T7m và T7Nm. Các mẫu được đồng bào chế chứa 1 mg/mL hợp chất nêu ở ví dụ 1 và 1 mg/mL chất đồng chủ vận GIP-GLP-1 hoặc 1 mg/mL hợp chất nêu ở ví dụ 3 và 1 mg/mL chất đồng chủ vận GIP-GLP-1 cũng được điều chế và được bào chế trong T7, T7m, T7N và T7Nm. Mỗi mẫu đã bào chế được chuyển đến ba lọ nhỏ. Các mẫu được giữ ở 4°C, 25°C và 40°C. Các mẫu được đánh giá 2 tuần một lần trong tổng số bốn tuần. Các mẫu được đánh giá độ đục và sự tách pha bằng mắt thường. Độ ổn định được đánh giá bằng RP-HPLC như được đánh giá trên đây đối với chế phẩm chỉ chứa một chất duy nhất. Phương pháp RP-HPLC đã nêu giúp tách một cách thích hợp các đỉnh chính của hợp chất nêu ở phần ví dụ và chất đồng chủ vận GIP-GLP-1 cũng như là tất cả các đỉnh thoái biến được tạo ra bằng cách đặt mẫu trong điều kiện stress ở độ pH 9 và nhiệt độ 40°C trong 3 ngày.

Tổng đỉnh thu hồi đối với tất cả các mẫu thuộc phạm vi 5% theo RP-HPLC. Tất cả các chế phẩm đều trong suốt và không màu và không đục hoặc kết tủa. Sự thay đổi về tỷ lệ phần trăm peptit trong đỉnh chính của chúng như được quan sát bởi RP-HPLC sau 4 tuần được tóm tắt trong bảng 16. Sự hao hụt tỷ lệ phần trăm đỉnh chính không thay đổi đáng kể đối với hợp chất nêu ở ví dụ 1 khi được bào chế ở dạng đơn chất so với đồng bào chế với chất đồng chủ vận GIP-GLP-1 trong tất cả các chế phẩm thử nghiệm. Chất đồng chủ vận GIP-GLP-1 thể hiện sự hao hụt nhất quán về tỷ lệ phần trăm của đỉnh chính khi được bào chế ở dạng đơn chất duy nhất so với đồng chế phẩm với hợp chất nêu ở ví dụ 1 hoặc ví dụ 3. Dữ liệu chỉ ra rằng hợp chất nêu ở ví dụ 1 và 3 có độ hòa tan chấp nhận được khi được bào chế ở dạng đơn chất duy nhất hoặc đồng chế phẩm với chất đồng chủ vận GIP-GLP-1, và chỉ ra rằng các hợp chất nêu ở ví dụ 1 và 3 không gây ảnh hưởng bất lợi đến độ ổn định của chất đồng chủ vận GIP-GLP-1 trong đồng chế phẩm.

Bảng 16

Hợp chất	Chế phẩm	Sự thay đổi đỉnh chính chất tương tự glucagon theo tỷ lệ %			Sự thay đổi đỉnh chính chất đồng chủ vận GIP-GLP-1 theo tỷ lệ %		
		4°C	25°C	40°C	4°C	25°C	40°C
Ví dụ 1	T7	-1,23	-2,91	-4,69	Không xác định		
	T7m	-0,6	-0,15	-2,36			
	T7N	-0,29	-1,39	-4,19			
	T7Nm	-0,38	-1,71	-3,93			
Ví dụ 1 + chất đồng chủ vận GIP-GLP-1	T7	-1,57	-0,26	-3,59	-0,37	-0,37	-3,35
	T7m	-1,19	-0,92	-2,67	0,54	0,35	-3,76
	T7N	-0,25	-0,89	-2,15	-0,21	-0,57	-4,42
	T7Nm	-1,22	-1,94	-3,78	-0,71	-1,07	-5,50
Ví dụ 3	T7	-2,23	-7,00	-1,78	Không xác định		
	T7m	0,92	1,23	-0,78			
	T7N	-1,78	-6,13	-2,15			
	T7Nm	0,11	-0,76	-2,02			
Ví dụ 3 + chất đồng chủ vận GIP-GLP-1	T7	-0,07	-7,51	-0,80	-0,40	-0,40	-4,14
	T7m	-3,17	-4,12	-5,08	-1,23	-1,23	-5,40
	T7N	-3,26	-7,50	-6,37	-0,22	-1,90	-6,12
	T7Nm	-2,75	-3,24	-3,35	-0,92	-0,87	-4,73
Chất đồng chủ vận GIP-GLP-1	T7	Không xác định			-0,59	-2,12	-5,25
	T7m				0,10	-0,50	-4,3
	T7Nm				-0,85	-1,14	-4,66

Các mẫu chứa hợp chất nêu ở ví dụ 1, chất đồng chủ vận GIP-GLP-1 và tổ hợp của chúng được bào chế trong T7Nm, và tổ hợp của hợp chất nêu trong ví dụ 1

và chất đồng chủ vận GIP-GLP-1 được bào chế trong T7, được ủ ở 4°C và 40°C trong bốn tuần cũng được đánh giá bởi LC-MS. Không nhận thấy vị trí phân hủy chủ yếu nào. Đối với cả hợp chất nêu ở ví dụ 1 và chất đồng chủ vận GIP-GLP-1, các cải biến hóa học không khác nhau đáng kể giữa các dạng bào chế đơn chất và các dạng đồng bào chế.

Độ ổn định trong dạng đồng bào chế với chất chủ vận GLP-1R

Các ví dụ 1 và 3 được bào chế và thẩm tách dựa trên C6.5 (10 mM xitrat pH 6,5) bằng cách sử dụng phương pháp giống với phương pháp đã mô tả ở trên để bào chế trong dung dịch đệm T7. Các hợp chất được bào chế riêng rẽ ở nồng độ peptit 1 mg/mL trong dung dịch đệm C6.5, C6.5M (10 mM xitrat, 46,4 mg/mL D-manitol, pH 6,5), C6.5T (10 mM xitrat, 0,02% polysorbat-80, pH 6,5), và C6.5MT (10 mM xitrat, 46,4 mg/mL D-manitol, 0,02% polysorbat-80, pH 6,5). Dịch cô đặc gốc chứa dulaglutide ở nồng độ 46,5 mg/mL trong C6.5 được sử dụng để bào chế dulaglutide ở nồng độ 3 mg/mL trong C6.5 và C6.5MT. Dạng đồng bào chế trong C6.5MT được điều chế chứa 3 mg/mL dulaglutide và 1 mg/mL hợp chất nêu ở ví dụ 1, hoặc 3 mg/mL dulaglutide và 1 mg/mL hợp chất nêu ở ví dụ 3. Mỗi mẫu bào chế được chuyển đến ba lọ nhỏ và được giữ ở 4°C, 25°C và 40°C. Các mẫu được đánh giá hai tuần trong tổng số bốn tuần. Các mẫu được đánh giá độ đục và sự tách pha bằng mắt thường. Độ ổn định được đánh giá bằng RP-HPLC và SEC-HPLC như đã mô tả ở trên. Cả hai phương pháp HPLC đã được mô tả đều giúp tách một cách thích hợp các đỉnh chính của hợp chất nêu ở ví dụ và dulaglutide cũng như là tất cả các đỉnh thoái biến được tạo ra bằng cách đặt mẫu trong điều kiện stress ở độ pH 9 và nhiệt độ 40°C trong 3 ngày.

Tổng đỉnh thu hồi đối với tất cả các mẫu ổn định là thuộc phạm vi 5% theo cả RP-HPLC và SEC-HPLC. Tất cả các chế phẩm đều trong suốt và không màu và không đục hoặc kết tủa. Sự thay đổi về tỷ lệ phần trăm của hợp chất trong các đỉnh chính tương ứng của chúng như được quan sát bởi SEC-HPLC sau bốn tuần được tóm tắt trong bảng 17. Các hợp chất nêu trong ví dụ 1 và 3 thường ổn định và không thể hiện sự hao hụt đáng kể của đỉnh chính. Hợp chất nêu trong ví dụ 1 không thể hiện độ ổn định kém khi được bào chế đồng thời với dulaglutide so với các dạng bào

chế đơn chất. Hợp chất nêu trong ví dụ 3 thể hiện độ ổn định kém hơn một chút khi bào chế đồng thời với dulaglutide so với các dạng bào chế đơn chất. Chất chủ vận GLP-1R không thể hiện độ ổn định kém khi được bào chế đồng thời với hợp chất nêu ở ví dụ 1 hoặc 3 so với các dạng bào chế đơn chất.

Bảng 17

Hợp chất	Chế phẩm	Chất tương tự glucagon Δ % Đỉnh chính			GLP-1-Fc Δ % Đỉnh chính		
		4°C	25°C	40°C	4°C	25°C	40°C
Ví dụ 1	C6.5	-1,32	-1,99	-2,35	Không xác định		
	C6.5M	0,70	-1,26	-1,67			
	C6.5T	-2,76	-3,97	-1,72			
	C6.5MT	-1,04	-2,65	-1,40			
Ví dụ 3	C6.5	1,03	-0,34	-0,37	Không xác định		
	C6.5M	0,49	-0,24	1,08			
	C6.5T	0,46	0,10	-0,02			
	C6.5MT	1,02	-0,07	0,64			
dulaglutide	C6.5	Không xác định			0,19	-0,54	>-10
	C6.5MT				0,29	-0,87	-0,83
Ví dụ 1 + dulaglutide	C6.5MT	-0,67	-0,75	-0,75	0,25	-0,16	-0,16
Ví dụ 3 + dulaglutide	C6.5MT	-1,04	-1,90	-1,90	0,21	-0,11	-0,11

Như được quan sát bởi RP-HPLC, xu hướng về độ ổn định là tương tự với xu hướng được quan sát bởi SEC-HPLC. Sự thay đổi về tỷ lệ phần trăm của hợp chất trong các đỉnh chính tương ứng của chúng như được quan sát bởi RP-HPLC sau bốn tuần được tóm tắt trong bảng 18. Các hợp chất nêu trong ví dụ 1 và 3 thường ổn định và không thể hiện sự hao hụt đáng kể của đỉnh chính. Hợp chất nêu trong ví dụ 1

không thể hiện độ ổn định kém khi được bào chế đồng thời với chất chủ vận GLP-1R so với các dạng bào chế đơn chất. Hợp chất nêu trong ví dụ 3 thể hiện độ ổn định kém hơn một chút khi bào chế đồng thời với chất chủ vận GLP-1R so với các dạng bào chế đơn chất. Chất chủ vận GLP-1R không thể hiện độ ổn định kém khi được bào chế đồng thời với hợp chất nêu ở phần ví dụ so với các dạng bào chế đơn chất.

Bảng 18

Hợp chất	Chế phẩm	Chất tương tự glucagon Δ % Đỉnh chính			GLP-1-Fc Δ % Đỉnh chính		
		4°C	25°C	40°C	4°C	25°C	40°C
Ví dụ 1	C6.5	-0,06	-0,47	-3,73	Không xác định		
	C6.5M	0,34	-2,61	-4,47			
	C6.5T	0,51	-0,35	-3,57			
	C6.5MT	-0,98	-0,69	-4,39			
Ví dụ 3	C6.5	1,06	0,17	0,24	Không xác định		
	C6.5M	2,43	0,64	1,86			
	C6.5T	-2,11	*	-3,18			
	C6.5MT	-1,22	*	-0,4			
Chất chủ vận GLP-1R	C6.5	Không xác định			-1,45	>-10	-9,96
	C6.5MT				-0,46	-0,8	-7,47
Ví dụ 1 + chất chủ vận GLP-1R	C6.5MT	0,62	*	-2,55	1,90	*	-8,18
Ví dụ 3 + chất chủ vận GLP-1R	C6.5MT	-0,82	-2,49	-1,39	0,27	-3,05	-9,64

*Không có dữ liệu do sai sót thiết bị

Trình tự**SEQ ID NO:1 – glucagon người**

HSQGTFTSDYSKYLDSSRAQDFVQWLMNT

SEQ ID NO:2 – GLP-1 người

HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGR

SEQ ID NO:3 – OXM người

HSQGTFTSDYSKYLDSSRAQDFVQWLMNTKRNRNNIA

SEQ ID NO:4 – GIP người

YAEGTFISDYSIAMDKIHQQDFVNWLLAQKGKKNDWKHNITQ

SEQ ID NO:5 – chất chủ vận thụ thể glucagonYX₁QGTFX₂SDYSKYLDX₃KKAX₄EFVX₅WLLEX₆X₇

trong đó

X₁ là Aib;X₂ là T hoặc L;X₃ là Aib;

X₄ là K được cải biến hóa học nhờ sự liên hợp với nhóm epsilon-amino của mạch bên K với $([2-(2\text{-amino-etoxy})\text{-etoxy}]\text{-axetyl})_2-(\gamma\text{Glu})_a\text{-CO}-(\text{CH}_2)_b\text{-CO}_2\text{H}$, trong đó a bằng 1 hoặc 2 và b bằng 14 đến 24;

X₅ là E hoặc A;X₆ là T hoặc E;

X₇ không có mặt hoặc là peptit được chọn từ nhóm gồm GPSSGAPPPS và GPSSG;

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

SEQ ID NO:6 – chất chủ vận thụ thể glucagonYX₁QGTFX₂SDYSKYLDX₃KKAX₄EFVX₅WLLEX₆X₇

trong đó

X_1 là Aib;

X_2 là T;

X_3 là Aib;

X_4 là K được cải biến hóa học nhờ sự liên hợp giữa nhóm epsilon-amino của mạch bên K với $[\text{2}-(\text{2-Amino-etoxy})\text{-etoxy}]\text{-axetyl})_2-(\gamma\text{Glu})_a\text{-CO}-(\text{CH}_2)_b\text{-CO}_2\text{H}$ trong đó a bằng 2 và b bằng 16;

X_5 là E;

X_6 là T;

X_7 là GPSSGAPPPS;

và axit amin đầu tận cùng C được amit hóa ở dạng amit bậc một có đầu tận cùng C.

SEQ ID NO:7 – chất chủ vận thụ thể glucagon

$\text{YX}_1\text{QGTFX}_2\text{SDYSKYLDX}_3\text{KKAX}_4\text{EFVX}_5\text{WLLEX}_6\text{X}_7$

trong đó:

X_1 là Aib,

X_2 là T;

X_3 là Aib;

X_4 là K được cải biến hóa học nhờ sự liên hợp giữa nhóm epsilon-amino của mạch bên K với $[\text{2}-(\text{2-amino-etoxy})\text{-etoxy}]\text{-axetyl})_2-(\gamma\text{Glu})_a\text{-CO}-(\text{CH}_2)_b\text{-CO}_2\text{H}$ trong đó a bằng 2 và b bằng 18;

X_5 là E;

X_6 là T;

X_7 là GPSSGAPPPS;

và trong đó axit amin đầu tận cùng C được amit hóa ở dạng amit bậc một có đầu tận cùng C.

SEQ ID NO:8 – chất chủ vận thụ thể glucagon

YX₁QGTFX₂SDYSKYLDX₃KKAX₄EFVX₅WLLEX₆X₇

trong đó:

X₁ là Aib;

X₂ là L;

X₃ là Aib;

X₄ là K được cải biến hóa học nhờ sự liên hợp giữa nhóm epsilon-amino của mạch bên K với ([2-(2-amino-etoxy)-etoxy]-axetyl)₂-(γGlu)_a-CO-(CH₂)_b-CO₂H trong đó a bằng 2 và b bằng 16;

X₅ là E;

X₆ là T; và

X₇ là GPSSGAPPPS;

và trong đó axit amin đầu tận cùng C được amit hóa ở dạng amit bậc một có đầu tận cùng C.

SEQ ID NO:9 – chất chủ vận thụ thể glucagon

YX₁QGTFX₂SDYSKYLDX₃KKAX₄EFVX₅WLLEX₆X₇

trong đó X₁ là Aib;

X₂ là T;

X₃ là Aib;

X₄ là K được cải biến hóa học nhờ sự liên hợp giữa nhóm epsilon-amino của mạch bên K với ([2-(2-amino-etoxy)-etoxy]-axetyl)₂-(γGlu)_a-CO-(CH₂)_b-CO₂H trong đó a bằng 2 và b bằng 16;

X₅ là E;

X₆ là T; và

X₇ là GPSSG;

và axit amin đầu tận cùng C được amit hóa ở dạng amit bậc một có đầu tận cùng C.

SEQ ID NO:10 – chất chủ vận thụ thể glucagon

YX₁QGTFX₂SDYSKYLDX₃KKAX₄EFVX₅WLLEX₆X₇

trong đó X₁ là Aib;

X₂ là T;

X₃ là Aib;

X₄ là K được cải biến hóa học nhờ sự liên hợp giữa nhóm epsilon-amino của mạch bên K với ([2-(2-amino-etoxy)-etoxy]-axetyl)₂-(γGlu)_a-CO-(CH₂)_b-CO₂H trong đó a bằng 2 và b bằng 18;

X₅ là E;

X₆ là T; và

X₇ là GPSSG;

và axit amin đầu tận cùng C được amit hóa ở dạng amit bậc một có đầu tận cùng C.

SEQ ID NO:11 – chất chủ vận thụ thể glucagon

YX₁QGTFX₂SDYSKYLDX₃KKAX₄EFVX₅WLLEX₆X₇

trong đó

X₁ là Aib;

X₂ là T;

X₃ là Aib;

X₄ là K được cải biến hóa học nhờ sự liên hợp giữa nhóm epsilon-amino của mạch bên K với ([2-(2-amino-etoxy)-etoxy]-axetyl)₂-(γGlu)_a-CO-(CH₂)_b-CO₂H trong đó a bằng 1 và b bằng 16;

X₅ là A;

X₆ là E;

X₇ không có mặt; và

axit amin đầu tận cùng C là axit đầu tận cùng C.

SEQ ID NO:12 – chất chủ vận thụ thể glucagon

YX₁QGTFX₂SDYSKYLDX₃KKAX₄EFVX₅WLLEX₆X₇

trong đó

X₁ là Aib;

X₂ là T;

X₃ là Aib;

X₄ là K được cải biến hóa học nhờ sự liên hợp giữa nhóm epsilon-amino của mạch bên K với ([2-(2-amino-etoxy)-etoxy]-axetyl)₂-(γGlu)_a-CO-(CH₂)_b-CO₂H trong đó a bằng 1 và b bằng 18;

X₅ là A;

X₆ là E;

X₇ không có mặt; và

axit amin đầu tận cùng C là axit đầu tận cùng C.

SEQ ID NO:13 – chất đồng chủ vận GIP-GLP

YX₁EGTFTSDYSIX₂LDKIAQX₃AX₄VQWLIAGGPSSGAPPPS;

trong đó

X₁ là Aib;

X₂ là Aib;

X₃ là K được cải biến hóa học nhờ sự liên hợp giữa nhóm epsilon-amino của mạch bên K với ([2-(2-amino-etoxy)-etoxy]-axetyl)₂-(γGlu)_a-CO (CH₂)_b-CO₂H trong đó a bằng 1 hoặc 2 và b bằng 10 đến 20;

X₄ là Phe hoặc 1-naphtylalanin (1-Nal);

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

SEQ ID NO:14 – chất đồng chủ vận GIP-GLP

YX₁EGTFTSDYSIX₂LDKIAQX₃AX₄VQWLIAGGPSSGAPPPS;

trong đó

X₁ là Aib;

X₂ là Aib;

X₃ là K được cải biến hóa học nhờ sự liên hợp giữa nhóm epsilon-amino của mạch bên K với ([2-(2-amino-etoxy)-etoxy]-axetyl)₂-(γGlu)_a-CO (CH₂)_b-CO₂H trong đó a bằng 2 và b bằng 18;

X₄ là 1-Nal;

và axit amin đầu tận cùng C được amit hóa ở dạng amit bậc một có đầu tận cùng C.

SEQ ID NO:15 – chất đồng chủ vận GIP-GLP

YX₁EGTFTSDYSIX₂LDKIAQX₃AX₄VQWLIAGGPSSGAPPPS;

trong đó

X₁ là Aib;

X₂ là Aib;

X₃ là K được cải biến hóa học nhờ sự liên hợp giữa nhóm epsilon-amino của mạch bên K với ([2-(2-amino-etoxy)-etoxy]-axetyl)₂-(γGlu)_a-CO (CH₂)_b-CO₂H trong đó a bằng 1 và b bằng 18;

X₄ là Phe;

và axit amin đầu tận cùng C được amit hóa ở dạng amit bậc một có đầu tận cùng C.

SEQ ID NO:16 – chất chủ vận thụ thể glucagon

YX₁QGTFX₂SDYSKYLDX₃KKAX₄EFVX₅WLLEX₆X₇

trong đó

X₁ là Aib;

X_2 là T hoặc L;

X_3 là Aib;

X_4 là K được cải biến hóa học nhờ sự liên hợp giữa nhóm epsilon-amino của mạch bên K với $([2-(2\text{-amino-etoxy})\text{-etoxy}]\text{-axetyl})_2\text{-(}\gamma\text{Glu)}_a\text{-CO-(CH}_2)_b\text{-CO}_2\text{H}$, trong đó a bằng 2 và b bằng 14 đến 24;

X_5 là E;

X_6 là T;

X_7 là peptit được chọn từ nhóm gồm GPSSGAPPPS và GPSSG;

và axit amin đầu tận cùng C được amit hóa.

SEQ ID NO:17 – chất chủ vận thụ thể glucagon

$\text{YX}_1\text{QGTFX}_2\text{SDYSKYLDX}_3\text{KKAX}_4\text{EFVX}_5\text{WLLEX}_6\text{X}_7$

trong đó

X_1 là Aib;

X_2 là T;

X_3 là Aib;

X_4 là K được cải biến hóa học nhờ sự liên hợp giữa nhóm epsilon-amino của mạch bên K với $([2-(2\text{-amino-etoxy})\text{-etoxy}]\text{-axetyl})_2\text{-(}\gamma\text{Glu)}_a\text{-CO-(CH}_2)_b\text{-CO}_2\text{H}$, trong đó a bằng 1 và b bằng 14 đến 24;

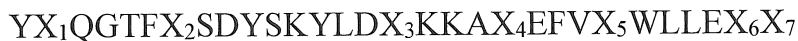
X_5 là A;

X_6 là E; và

X_7 không có mặt.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Hợp chất chủ vận thụ thể glucagon chứa công thức:



trong đó:

X_1 là Aib;

X_2 là T;

X_3 là Aib;

X_4 là K được cải biến hóa học nhờ sự liên hợp giữa nhóm epsilon-amino của mạch bên K với $([2-(2\text{-amino-etoxy})\text{-etoxy}]\text{-axetyl})_2\text{-(}\gamma\text{Glu)}_a\text{-CO-(CH}_2)_b\text{-CO}_2\text{H}$, trong đó a bằng 1 và b bằng 18;

X_5 là A;

X_6 là E; và

X_7 không có mặt;

(SEQ ID NO: 12);

hoặc muối được dụng của nó.

2. Hợp chất chủ vận thụ thể glucagon chỉ chứa công thức:



trong đó:

X_1 là Aib;

X_2 là T;

X_3 là Aib;

X_4 là K được cải biến hóa học nhờ sự liên hợp giữa nhóm epsilon-amino của mạch bên K với $([2-(2\text{-amino-etoxy})\text{-etoxy}]\text{-axetyl})_2\text{-(}\gamma\text{Glu)}_a\text{-CO-(CH}_2)_b\text{-CO}_2\text{H}$, trong đó a bằng 1 và b bằng 18;

X_5 là A;

X_6 là E; và

X_7 không có mặt;

(SEQ ID NO: 12);

hoặc muối được dụng của nó.

3. Hợp chất chủ vận thụ thể glucagon chứa công thức:

$YX_1QGTFX_2SDYSKYLDX_3KKAX_4EFVX_5WLLEX_6X_7$

trong đó

X_1 là Aib;

X_2 là T;

X_3 là Aib;

X_4 là K được cải biến hóa học nhờ sự liên hợp giữa nhóm epsilon-amino của mạch bên K với $([2-(2\text{-amino-etoxy})\text{-etoxy}]\text{-axetyl})_2-(\gamma\text{Glu})_a\text{-CO}-(\text{CH}_2)_b\text{-CO}_2\text{H}$, trong đó a bằng 1 và b bằng 16;

X_5 là A;

X_6 là E; và

X_7 không có mặt;

(SEQ ID NO: 11);

hoặc muối được dụng của nó.

4. Hợp chất chủ vận thụ thể glucagon chỉ chứa công thức:

$YX_1QGTFX_2SDYSKYLDX_3KKAX_4EFVX_5WLLEX_6X_7$

trong đó:

X_1 là Aib;

X_2 là T;

X_3 là Aib;

X_4 là K được cải biến hóa học nhờ sự liên hợp giữa nhóm epsilon-amino của mạch bên K với $([2-(2\text{-amino-etoxy})\text{-etoxy}]\text{-axetyl})_2-(\gamma\text{Glu})_a\text{-CO}-(\text{CH}_2)_b\text{-CO}_2\text{H}$, trong đó a bằng 1 và b bằng 16;

X_5 là A;

X_6 là E; và

X_7 không có mặt;

(SEQ ID NO: 11);

hoặc muối được dụng của nó.

5. Dược phẩm chứa chất chủ vận thụ thể glucagon theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4 và chất mang, chất pha loãng, hoặc tá dược được dụng.

6. Chất chủ vận thụ thể glucagon theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó hoạt tính của chất chủ vận thụ thể glucagon này ở thụ thể glucagon cao hơn ít nhất là 100 lần hiệu lực của chất chủ vận thụ thể glucagon ở thụ thể GLP-1.

7. Hợp chất chủ vận thụ thể glucagon chứa công thức:

$\text{YX}_1\text{QGTFX}_2\text{SDYSKYLDX}_3\text{KKAX}_4\text{EFVX}_5\text{WLLEX}_6\text{X}_7$

trong đó:

X_1 là Aib;

X_2 là T hoặc L;

X_3 là Aib;

X_4 là K được cải biến hóa học nhờ sự liên hợp giữa nhóm epsilon-amino của mạch bên K với $([2-(2\text{-amino-etoxy})\text{-etoxy}]\text{-axetyl})_2-(\gamma\text{Glu})_a\text{-CO}-(\text{CH}_2)_b\text{-CO}_2\text{H}$, trong đó a bằng 1 hoặc 2 và b bằng 14 đến 24;

X_5 là E hoặc A;

X_6 là T hoặc E;

X_7 không có mặt, hoặc là peptit được chọn từ nhóm gồm GPSSGAPPPS và GPSSG;

và axit amin đầu tận cùng C được amit hóa ở dạng amit bậc nhất ở đầu tận cùng C (SEQ ID NO: 5);

hoặc muối được dụng của nó.

8. Hợp chất chủ vận thụ thể glucagon chỉ chứa công thức:

$YX_1QGTFX_2SDYSKYLDX_3KKAX_4EFVX_5WLLEX_6X_7$

trong đó:

X_1 là Aib;

X_2 là T hoặc L;

X_3 là Aib;

X_4 là K được cải biến hóa học nhờ sự liên hợp giữa nhóm epsilon-amino của mạch bên K với $[(2-(2\text{-amino-etoxy})\text{-etoxy})\text{-axetyl}]_2-(\gamma\text{Glu})_a\text{-CO}-(\text{CH}_2)_b\text{-CO}_2\text{H}$, trong đó a bằng 1 hoặc 2 và b bằng 14 đến 24;

X_5 là E hoặc A;

X_6 là T hoặc E;

X_7 không có mặt, hoặc là peptit được chọn từ nhóm gồm GPSSGAPPPS và GPSSG;

và axit amin đầu tận cùng C được amit hóa ở dạng amit bậc nhất ở đầu tận cùng C (SEQ ID NO: 5);

hoặc muối được dụng của nó.

9. Chất chủ vận thụ thể glucagon theo điểm 7 hoặc điểm 8, trong đó hoạt tính của chất chủ vận thụ thể glucagon này ở thụ thể glucagon cao hơn ít nhất là 100 lần hiệu lực của chất chủ vận thụ thể glucagon ở thụ thể GLP-1.

10. Hợp chất kháng thụ thể glucagon có cấu trúc được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11 và SEQ ID NO:12.

11. Dược phẩm chứa chất chủ vận thụ thể glucagon theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 7 đến 10 và chất mang, chất pha loãng, hoặc tá dược được dùng.
12. Dược phẩm theo điểm 11, còn chứa tác nhân trị liệu khác.
13. Dược phẩm theo điểm 12, trong đó tác nhân trị liệu khác là chất chủ vận GLP-1R.
14. Dược phẩm theo điểm 13, trong đó chất chủ vận GLP-1R là dulaglutide.
15. Dược phẩm theo điểm 12, trong đó tác nhân trị liệu khác là chất đồng chủ vận GIP-GLP-1.
16. Dược phẩm theo điểm 15, trong đó chất đồng chủ vận GIP-GLP-1 có cấu trúc SEQ ID NO:15.

Danh mục trình tự

<110> ELI LILLY AND COMPANY

<120> Chất chủ vận thụ thể glucagon và dược phẩm chứa chất chủ vận này

<130> X21309

<150> 62/246,199

<151> 2015-10-26

<160> 17

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 29

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

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

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

<210> 2

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

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

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

<210> 3

<211> 37

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

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

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

Arg Asn Asn Ile Ala
 35

<210> 4
 <211> 42
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 4

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

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

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

<210> 5
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> cấu trúc tổng hợp

<220>
 <221> DẤU HIỆU HỖN TẠP
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa ở vị trí 2 là axit alpha aminoisobutyric

<220>
 <221> DẤU HIỆU HỖN TẠP
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa ở vị trí 7 là Thr hoặc Leu

<220>
 <221> DẤU HIỆU HỖN TẠP

<222> (16)..(16)
 <223> Xaa ở vị trí 16 là axit alpha aminoisobutyric

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (20)..(20)
 <223> Xaa ở vị trí 20 là Lys được cải biến hóa học nhờ sự liên hợp với nhóm epsilon-amino của mạch bên Lys với ([2-(2-Amino-etoxy)-etoxy]-axetyl)2-(gamma-Glu)a-CO-(CH₂)b-CO₂H, trong đó a bằng 1 hoặc 2 và b bằng 14 đến 24

 <220>
 <221> DẤU HIỆU HỖN TẠP
 <222> (24)..(24)
 <223> Xaa ở vị trí 24 là Glu hoặc Ala.

 <220>
 <221> DẤU HIỆU HỖN TẠP
 <222> (29)..(29)
 <223> Xaa ở vị trí 29 là Thr hoặc Glu.

 <220>
 <221> DẤU HIỆU HỖN TẠP
 <222> (30)..(30)
 <223> Xaa ở vị trí 30 hoặc không có mặt hoặc là polypeptit được chọn từ nhóm gồm GPSSGAPPPS và GPSSG, và amino axit đầu tận cùng C tùy ý được amit hóa

 <400> 5

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

 Lys Lys Ala Xaa Glu Phe Val Xaa Trp Leu Leu Glu Xaa Xaa
 20 25 30

 <210> 6
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> cấu trúc tổng hợp

 <220>
 <221> DẤU HIỆU HỖN TẠP
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa ở vị trí 2 là axit alpha aminoisobutyric


```

<220>
<221> DẤU HIỆU HỖN TẠP
<222> (16)..(16)
<223> Xaa ở vị trí 16 là axit alpha aminoisobutyric

<220>
<221> MOD_RES
<222> (20)..(20)
<223> Xaa ở vị trí 20 là Lys được cải biến hóa học nhờ
      sự liên hợp với nhóm epsilon-amino của mạch bên Lys với
      ([2-(2-Amino-etoxy)-etoxy]-axetyl)2-(gamma-Glu)a-CO-(CH2)b-CO2H
      trong đó a bằng 2 và b bằng 16.

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

<400> 6

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

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

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
      35

<210> 7
<211> 39
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> cấu trúc tổng hợp

<220>
<221> DẤU HIỆU HỖN TẠP
<222> (2)..(2)
<223> Xaa ở vị trí 2 là axit alpha aminoisobutyric

<220>
<221> DẤU HIỆU HỖN TẠP
<222> (16)..(16)
<223> Xaa ở vị trí 16 là axit alpha aminoisobutyric

```

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (20)..(20)
 <223> Xaa ở vị trí 20 là Lys được cải biến hóa học nhờ sự liên hợp với nhóm epsilon-amino của mạch bên Lys với ([2-(2-Amino-etoxy)-etoxy]-axetyl)2-(gamma-Glu)a-CO-(CH₂)b-CO₂H trong đó a bằng 2 và b bằng 18

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

<400> 7

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

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

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
 35

<210> 8
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> cấu trúc tổng hợp

<220>
 <221> DẤU HIỆU HỖN TẠP
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa ở vị trí 2 là axit alpha aminoisobutyric

<220>
 <221> DẤU HIỆU HỖN TẠP
 <222> (16)..(16)
 <223> Xaa ở vị trí 16 là axit alpha aminoisobutyric

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (20)..(20)
 <223> Xaa ở vị trí 20 là Lys được cải biến hóa học nhờ sự liên hợp với nhóm epsilon-amino của mạch bên Lys với

$[(2-(2\text{-Amino-etoxy})\text{-etoxy})\text{-axetyl})2-(\gamma\text{-Glu})a\text{-CO}-(\text{CH}_2)b\text{-CO}_2\text{H}$
trong đó a bằng 2 và b bằng 16

<220>

<221> MOD_RES

<222> (39)..(39)

<223> Ser ở vị trí 39 được amit hóa ở dạng amit bậc một có đầu tận cùng C

<400> 8

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

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

Ser	Gly	Ala	Pro	Pro	Pro	Ser
			35			

<210> 9

<211> 34

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> cấu trúc tổng hợp

<220>

<221> DẤU HIỆU HỖN TẠP

<222> (2)..(2)

<223> Xaa ở vị trí 2 là axit alpha aminoisobutyric

<220>

<221> DẤU HIỆU HỖN TẠP

<222> (16)..(16)

<223> Xaa ở vị trí 16 là axit alpha aminoisobutyric

<220>

<221> DẤU HIỆU HỖN TẠP

<222> (20)..(20)

<223> Xaa ở vị trí 20 là Lys được cải biến hóa học nhờ sự liên hợp với nhóm epsilon-amino của mạch bên Lys với $[(2-(2\text{-Amino-etoxy})\text{-etoxy})\text{-axetyl})2-(\gamma\text{-Glu})a\text{-CO}-(\text{CH}_2)b\text{-CO}_2\text{H}$ trong đó a bằng 2 và b bằng 16

<220>

<221> MOD_RES

<222> (34)..(34)

<223> Gly ở vị trí 34 được amit hóa ở dạng amit bậc một có đầu tận cùng C

<400> 9

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

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

Ser Gly

<210> 10

<211> 34

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> cấu trúc tổng hợp

<220>

<221> DẤU HIỆU HỖN TẠP

<222> (2)..(2)

<223> Xaa ở vị trí 2 là axit alpha aminoisobutyric

<220>

<221> DẤU HIỆU HỖN TẠP

<222> (16)..(16)

<223> Xaa ở vị trí 16 là axit alpha aminoisobutyric

<220>

<221> DẤU HIỆU HỖN TẠP

<222> (20)..(20)

<223> Xaa ở vị trí 20 là Lys được cải biến hóa học nhờ sự liên hợp với nhóm epsilon-amino của mạch bên Lys với ([2-(2-Amino-etoxy)-etoxy]-axetyl)2-(gamma-Glu)a-CO-(CH₂)b-CO₂H trong đó a bằng 2 và b bằng 18

<220>

<221> MOD_RES

<222> (34)..(34)

<223> Gly ở vị trí 34 được amit hóa ở dạng amit bậc một có đầu tận cùng C

<400> 10

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

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

Ser Gly

<210> 11
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> cấu trúc tổng hợp

<220>
 <221> DẤU HIỆU HỖN TẠP
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa ở vị trí 2 là axit alpha aminoisobutyric

<220>
 <221> DẤU HIỆU HỖN TẠP
 <222> (16)..(16)
 <223> Xaa ở vị trí 16 là axit alpha aminoisobutyric

<220>
 <221> DẤU HIỆU HỖN TẠP
 <222> (20)..(20)
 <223> Xaa ở vị trí 20 là Lys được cải biến hóa học nhờ
 sự liên hợp với nhóm epsilon-amino của mạch bên Lys với
 ([2-(2-Amino-etoxy)-etoxy]-axetyl)2-(gamma-Glu)a-CO-(CH₂)b-CO₂H
 trong đó a bằng 1 và b bằng 16

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (29)..(29)
 <223> Glu ở vị trí 29 là axit có đầu tận cùng C

<400> 11

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

Lys Lys Ala Xaa Glu Phe Val Ala Trp Leu Leu Glu Glu

20

25

<210> 12
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> cấu trúc tổng hợp

<220>
 <221> DẤU HIỆU HỖN TẠP
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa ở vị trí 2 là axit alpha aminoisobutyric

<220>
 <221> DẤU HIỆU HỖN TẠP
 <222> (16)..(16)
 <223> Xaa ở vị trí 16 là axit alpha aminoisobutyric

<220>
 <221> DẤU HIỆU HỖN TẠP
 <222> (20)..(20)
 <223> Xaa ở vị trí 20 là Lys được cải biến hóa học nhờ sự liên hợp với nhóm epsilon-amino của mạch bên Lys với ([2-(2-Amino-etoxy)-etoxy]-axetyl)2-(gamma-Glu)a-CO-(CH₂)b-CO₂H trong đó a bằng 1 và b bằng 18

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (29)..(29)
 <223> Glu ở vị trí 29 là axit có đầu tận cùng C.

<400> 12

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

Lys	Lys	Ala	Xaa	Glu	Phe	Val	Ala	Trp	Leu	Leu	Glu	Glu
			20					25				

<210> 13
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> cấu trúc tổng hợp

<220>
 <221> DẤU HIỆU HỖN TẠP
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa ở vị trí 2 là axit alpha aminoisobutyric

<220>
 <221> DẤU HIỆU HỖN TẠP
 <222> (13)..(13)
 <223> Xaa ở vị trí 13 is axit alpha aminoisobutyric

<220>
 <221> DẤU HIỆU HỖN TẠP
 <222> (20)..(20)
 <223> Xaa ở vị trí 20 là Lys được cải biến hóa học nhờ
 sự liên hợp với nhóm epsilon-amino của mạch bên Lys với
 ([2-(2-amino-etoxy)-etoxy]-axetyl)2-(gamma-Glu)a-CO(CH₂)_b-CO₂H
 trong đó a bằng 1 hoặc 2 và b bằng 10 to 20

<220>
 <221> DẤU HIỆU HỖN TẠP
 <222> (22)..(22)
 <223> Xaa ở vị trí 22 is Phe or 1-naphthylalanine (1-Nal)

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (39)..(39)
 <223> Ser ở vị trí 39 tùy ý được amit hóa

<400> 13

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

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

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
 35

<210> 14
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> cấu trúc tổng hợp

<220>
 <221> DẤU HIỆU HỖN TẠP
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa ở vị trí 2 là axit alpha aminoisobutyric

<220>
 <221> DẤU HIỆU HỖN TẠP
 <222> (13)..(13)
 <223> Xaa ở vị trí 13 is axit alpha aminoisobutyric

<220>
 <221> DẤU HIỆU HỖN TẠP
 <222> (20)..(20)
 <223> Xaa ở vị trí 20 là Lys được cải biến hóa học nhờ
 sự liên hợp với nhóm epsilon-amino của mạch bên Lys với
 ([2-(2-amino-etoxy)-etoxy]-axetyl)2-(gamma-Glu)a-CO(CH2)b-CO2H
 trong đó a bằng 2 và b bằng 18

<220>
 <221> DẤU HIỆU HỖN TẠP
 <222> (22)..(22)
 <223> Xaa ở vị trí 22 là 1-Nal

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

<400> 14

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

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

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
 35

<210> 15
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> cấu trúc tổng hợp

<220>
 <221> DẤU HIỆU HỖN TẠP
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa ở vị trí 2 là axit alpha aminoisobutyric

<220>
 <221> DẤU HIỆU HỖN TẠP
 <222> (13)..(13)
 <223> Xaa ở vị trí 13 là axit alpha aminoisobutyric

<220>
 <221> DẤU HIỆU HỖN TẠP
 <222> (20)..(20)
 <223> Xaa ở vị trí 20 là Lys được cải biến hóa học nhờ
 sự liên hợp với nhóm epsilon-amino của mạch bên Lys với
 ([2-(2-amino-etoxy)-etoxy]-axetyl)2-(gamma-Glu)a-CO(CH₂)b-CO₂H
 trong đó a bằng 1 và b bằng 18

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (39)..(39)
 <223> Ser ở vị trí 29 được amit hóa ở dạng amit bậc một có đầu tận
 cùng C

<400> 15

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

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

Ser	Gly	Ala	Pro	Pro	Pro	Ser
			35			

<210> 16
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> cấu trúc tổng hợp

<220>
 <221> DẤU HIỆU HỖN TẠP
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa ở vị trí 2 là axit alpha aminoisobutyric

<220>
 <221> DẤU HIỆU HỖN TẠP
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa ở vị trí 7 là Thr or Leu

<220>
 <221> DẤU HIỆU HỖN TẠP
 <222> (16)..(16)
 <223> Xaa ở vị trí 16 là axit alpha aminoisobutyric

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (20)..(20)
 <223> Xaa as pos. 20 is Lys được cải biến hóa học nhờ
 sự liên hợp với nhóm epsilon-amino của mạch bên Lys với
 ([2-(2-Amino-etoxy)-etoxy]-axetyl)2-(gamma
 Glu)a-CO-(CH2)b-CO2H, trong đó a bằng 2 và b bằng 14 đến 24

<220>
 <221> DẤU HIỆU HỖN TẠP
 <222> (24)..(24)
 <223> Xaa ở vị trí 24 là Glu

<220>
 <221> DẤU HIỆU HỖN TẠP
 <222> (29)..(29)
 <223> Xaa ở vị trí 29 là Thr

<220>
 <221> DẤU HIỆU HỖN TẠP
 <222> (30)..(30)
 <223> Xaa ở vị trí 30 là peptit được chọn từ nhóm gồm
 GPSSGAPPPS và GPSSG; và amino axit đầu tận cùng C được amit
 hóa

<400> 16

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

Lys	Lys	Ala	Xaa	Glu	Phe	Val	Xaa	Trp	Leu	Leu	Glu	Xaa	Xaa
			20					25					30

<210> 17
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> cấu trúc tổng hợp

<220>

<221> DẤU HIỆU HỖN TẠP

<222> (2)..(2)

<223> Xaa ở vị trí 2 là axit alpha aminoisobutyric

<220>

<221> DẤU HIỆU HỖN TẠP

<222> (7)..(7)

<223> Xaa ở vị trí 7 là Thr

<220>

<221> DẤU HIỆU HỖN TẠP

<222> (16)..(16)

<223> Xaa ở vị trí 16 là axit alpha aminoisobutyric

<220>

<221> MOD_RES

<222> (20)..(20)

<223> Xaa as pos. 20 is Lys được cải biến hóa học nhờ sự liên hợp với nhóm epsilon-amino of the K side-chain with ([2-(2-Amino-etoxy)-etoxy]-axetyl)2-(gamma Glu)a-CO-(CH2)b-CO2H, trong đó a bằng 1 và b bằng 14 đến 24

<220>

<221> DẤU HIỆU HỖN TẠP

<222> (24)..(24)

<223> Xaa ở vị trí 24 là Ala

<220>

<221> DẤU HIỆU HỖN TẠP

<222> (29)..(29)

<223> Xaa ở vị trí 29 là Glu

<220>

<221> DẤU HIỆU HỖN TẠP

<222> (30)..(30)

<223> Xaa ở vị trí 30 không có mặt

<400> 17

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

Lys	Lys	Ala	Xaa	Glu	Phe	Val	Xaa	Trp	Leu	Leu	Glu	Xaa	Xaa
			20					25					30