



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

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

(11)



1-0045226

(51)^{2020.01} A61K 38/26; C07K 14/605; A61P 3/00 (13) B

(21) 1-2020-03567

(22) 14/12/2018

(86) PCT/US2018/065605 14/12/2018

(87) WO2019/125929 27/06/2019

(30) 62/608,644 21/12/2017 US

(45) 25/04/2025 445

(43) 25/09/2020 390A

(71) ELI LILLY AND COMPANY (US)

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

(72) ALSINA-FERNANDEZ, Jorge (US); COSKUN, Tamer (US); GUO, Lili (CN); QU, Hongchang (CN).

(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) CHẤT TƯƠNG TỰ INCRETIN VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA CHẤT NÀY

(21) 1-2020-03567

(57) Sáng chế đề cập đến chất tương tự incretin có hoạt tính ở mỗi thụ thể trong số các thụ thể polypeptit tiết insulin phụ thuộc glucoza (GIP), peptit-1 giống glucagon (GLP-1) và glucagon. Các chất tương tự incretin có các dấu hiệu cấu trúc tạo nên hoạt tính cân bằng và thời gian tác động kéo dài ở mỗi thụ thể trong số các thụ thể này. Các chất tương tự incretin này là hữu ích để điều trị các bệnh như bệnh đái tháo đường, bệnh rối loạn mỡ máu, bệnh gan nhiễm mỡ, hội chứng chuyển hóa, bệnh viêm gan nhiễm mỡ không do rượu và bệnh béo phì. Sáng chế còn đề cập đến dược phẩm chứa các chất tương tự incretin này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến các chất tương tự incretin có hoạt tính ở mỗi thụ thể trong số thụ thể polypeptit tiết insulin phụ thuộc glucoza (glucose-dependent insulinotropic polypeptide - GIP), thụ thể peptit-1 giống glucagon (glucagon-like peptide-1 - GLP-1) và thụ thể glucagon. Các chất tương tự incretin được mô tả ở đây có thể có các dấu hiệu cấu trúc tạo ra hoạt tính cân bằng và có thời gian tác động kéo dài ở mỗi thụ thể trong số các thụ thể này. Các chất tương tự incretin như vậy có thể hữu dụng để điều trị các rối loạn như bệnh đái tháo đường typ 2 (type 2 diabetes mellitus - T2DM), rối loạn mỡ máu, hội chứng chuyển hóa, 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) và/hoặc bệnh béo phì.

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 số các bệnh tiểu đường, chiếm khoảng 90% trong tất cả các bệnh tiểu đường. T2DM được phân biệt bởi mức glucoza trong máu cao do sự kháng insulin gây ra. Tiêu chuẩn chăm sóc hiện nay đối với bệnh T2DM bao gồm chế độ ăn và tập luyện, cũng như điều trị bằng thuốc dùng qua đường miệng và các thuốc làm giảm glucoza dùng đường tiêm, bao gồm các liệu pháp trên cơ sở incretin, như chất chủ vận thụ thể GLP-1.

GLP-1 là peptit gồm 36 axit amin, đoạn có hoạt tính sinh học chính của peptit này được tạo ra dưới dạng peptit gồm 30 axit amin được amid hóa ở đầu tận cùng C (GLP-1₇₋₃₆; SEQ ID NO:2) mà kích thích sự tiết insulin phụ thuộc glucoza và ngăn ngừa sự tăng đường huyết ở bệnh tiểu đường. Nhiều chất tương tự GLP-1 khác nhau hiện có để điều trị T2DM, bao gồm dulaglutide, exenatide và liraglutide. Tuy nhiên, nhiều chất chủ vận thụ thể GLP-1 thương mại bị giới hạn về liều do tác dụng phụ đến dạ dày ruột, như buồn nôn và nôn. Khi điều trị bằng thuốc dùng qua đường miệng và các liệu pháp trị liệu trên cơ sở incretin là không đủ, thì việc điều trị bằng insulin được xem xét. Bất kể nhiều lựa chọn điều trị hiện có, một số lượng đáng kể cá thể được điều

trị bằng các liệu pháp đã được chấp thuận không đạt đến mục đích kiểm soát glucoza huyết (*xem, ví dụ, Casagrande et al. (2013) Diabetes Care 36:2271-2279*).

Bệnh tiểu đường không được kiểm soát có thể dẫn đến một hoặc nhiều tình trạng mà ảnh hưởng đến bệnh tật và tỷ lệ tử vong của các cá thể như vậy. Một trong số các yếu tố nguy cơ chính đối với T2DM là bệnh béo phì, và phần lớn những cá thể mắc T2DM (~90%) bị thừa 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 biến cố tăng glucoza huyết và các biến cố tim mạch. Vì vậy, các liệu pháp hữu hiệu trong kiểm soát mức glucoza và giảm thể trọng là cần thiết để kiểm soát bệnh tốt hơn.

Về mặt này, các liệu pháp mới đang được nghiên cứu bao gồm các hợp chất không chỉ có hoạt tính ở thụ thể GLP-1 mà còn có hoạt tính ở một hoặc nhiều thụ thể khác, như thụ thể GIP và/hoặc glucagon. Trên thực tế, các hợp chất nhất định được mô tả là có hoạt tính chủ vận bộ ba (tức là, hoạt tính ở mỗi thụ thể trong số các thụ thể glucagon, GLP-1 và GIP). Ví dụ, Công bố đơn sáng chế quốc tế số WO 2015/067716 mô tả các chất tương tự glucagon có hoạt tính đối kháng trên ba thụ thể. Tương tự, Công bố đơn quốc tế số WO 2016/198624 mô tả các chất tương tự exendin-4, bản thân nó là một chất tương tự GLP-1, có hoạt tính chủ vận bộ ba. Tương tự, mỗi Công bố đơn quốc tế số WO 2014/049610 và WO 2017/116204 mô tả nhiều chất tương tự khác nhau có hoạt tính chủ vận bộ ba. Ngoài ra, Công bố đơn quốc tế số WO 2017/153375 mô tả các chất đồng chủ vận glucagon và GLP-1 cũng có thể được cho là có hoạt tính GIP.

Tuy nhiên, vẫn có nhu cầu để điều trị, đặc biệt là T2DM, có thể tạo ra tác dụng kiểm soát glucoza hiệu quả, kèm theo các lợi ích giảm cân và profin tác dụng phụ thích hợp. Cũng có nhu cầu về các chất điều trị để sử dụng với khoảng thời gian tác động kéo dài đủ để 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.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Các chất tương tự incretin được mô tả trong bản mô tả này được trình bày là giải quyết được những nhu cầu nêu trên. Theo đó, bản mô tả bộc lộ các chất tương tự

incretin với hoạt tính ở mỗi thụ thể trong số các thụ thể GIP, GLP-1 và glucagon. Có lợi là, các chất tương tự incretin được mô tả trong bản mô tả này có hoạt tính cân bằng cho phép sử dụng liều mà tạo ra hoạt tính đủ ở mỗi thụ thể để tạo ra những lợi ích chủ vận thụ thể đó trong khi tránh được các tác dụng phụ không mong muốn có liên quan đến hoạt tính quá mức. Hơn nữa, các chất tương tự incretin được mô tả trong bản mô tả này có thời gian tác động kéo dài ở từng thụ thể trong số các thụ thể GIP, GLP-1 và glucagon 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. Theo cách này, các chất tương tự incretin tăng cường kiểm soát mức glucoza, lợi ích chuyển hóa như giảm thể trọng và/hoặc cải thiện thành phần cơ thể, các lợi ích về chất béo như giảm proprotein convertaza subtilisin/kexin typ 9 (PCSK9), và/hoặc những lợi ích khác như tăng khối lượng xương hoặc sự hình thành xương hoặc giảm tái hấp thụ xương. Bản mô tả cũng bộc lộ việc điều trị hiệu quả các rối loạn hoặc tình trạng khác, bao gồm bệnh béo phì, NAFLD, NASH, rối loạn mỡ máu, và/hoặc rối loạn chuyển hóa.

Theo một phương án, chất tương tự incretin được đề xuất có công thức:

$\text{YX}_2\text{X}_3\text{GTX}_6\text{TSDYSIX}_{13}\text{LDKX}_{17}\text{AQX}_{20}\text{AFIEYLLEGGPSSGAPPPS}$, trong đó X_2 là Aib, X_3 là Q hoặc H, X_6 là αMeF hoặc $\alpha\text{MeF}(2\text{F})$, X_{13} là L hoặc αMeL , X_{17} là axit amin bất kỳ có nhóm chức có sẵn để liên hợp, trong đó nhóm chức được liên hợp với axit béo $\text{C}_{16}\text{-C}_{22}$, X_{20} là Aib, Q hoặc H (SEQ ID NO:5), và axit amin có đầu tận cùng C được amit hóa tùy ý, hoặc muối được dụng của nó.

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị bệnh như bệnh rối loạn mỡ máu, bệnh gan nhiễm mỡ, hội chứng chuyển hóa, NASH, bệnh béo phì và T2DM. Các phương pháp như vậy có thể bao gồm ít nhất bước cho cá thể cần điều trị sử dụng lượng hữu hiệu của chất tương tự incretin được mô tả trong bản mô tả này. Trong một số trường hợp, bệnh là bệnh gan nhiễm mỡ, bệnh béo phì, NASH hoặc T2DM.

Theo một phương án khác, chất tương tự incretin như được mô tả trong bản mô tả này được đề xuất để dùng trong điều trị. Ví dụ, chất tương tự incretin như được mô tả trong bản mô tả được đề xuất để dùng trong điều trị bệnh như rối loạn mỡ máu, bệnh gan nhiễm mỡ, hội chứng chuyển hóa, NASH, bệnh béo phì và T2DM. Trong một số trường hợp, bệnh là bệnh gan nhiễm mỡ, bệnh béo phì, NASH hoặc T2DM.

Theo một phương án khác, chất tương tự incretin như được mô tả trong bản mô tả này được đề xuất để dùng trong sản xuất thuốc để điều trị rối loạn mỡ máu, bệnh gan nhiễm mỡ, hội chứng chuyển hóa, NASH, bệnh béo phì và T2DM. Trong một số trường hợp, bệnh là bệnh gan nhiễm mỡ, bệnh béo phì, NASH hoặc T2DM.

Theo một phương án khác, dược phẩm được đề xuất chứa chất tương tự incretin như được mô tả trong bản mô tả và chất mang, chất pha loãng hoặc tá dược được dùng.

Mô tả chi tiết sáng chế

Trừ khi có quy định khác, tất cả các thuật ngữ kỹ thuật và khoa học được sử dụng trong bản mô tả này có cùng nghĩa như thường được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực của sáng chế này. Mặc dù các phương pháp và vật liệu bất kỳ tương tự hoặc tương đương với các phương pháp và vật liệu được mô tả trong bản mô tả này có thể được dùng để thực hiện hoặc thử nghiệm các chất tương tự incretin, dược phẩm và phương pháp, nhưng các phương pháp và vật liệu được ưu tiên sẽ được mô tả ở đây.

Hơn nữa, việc tham chiếu đến một yếu tố bằng mạo từ không xác định “một” không loại trừ khả năng nhiều hơn một yếu tố có mặt, trừ khi ngữ cảnh rõ ràng đòi hỏi rằng có một và chỉ một yếu tố. Mạo từ không xác định “một” do đó luôn có nghĩa là “ít nhất một”.

GIP là peptit gồm 42 axit amin (SEQ ID NO:4) và là incretin, đóng vai trò sinh lý trong việc cân bằng glucoza nội môi bằng cách kích thích tiết insulin từ các tế bào beta tuyến tụy với sự có mặt của glucoza.

GLP-1 là peptit gồm 36 axit amin (SEQ ID NO:2) và cũng là incretin, mà kích thích sự tiết insulin phụ thuộc glucoza và đã thể hiện là ngăn ngừa tăng glucoza huyết ở bệnh tiểu đường.

Glucagon là peptit gồm 29 axit amin (SEQ ID NO:1) mà hỗ trợ việc duy trì glucoza huyết bằng cách gắn kết với và hoạt hóa các thụ thể glucagon trên tế bào gan, làm cho gan giải phóng glucoza được dự trữ ở dạng glycogen qua quá trình phân giải glycogen.

Oxyntomodulin (OXM) là peptit gồm 37 axit amin không chỉ bao gồm trình tự 29 axit amin của glucagon mà còn đoạn kéo dài octapeptit ở đầu tận cùng carboxy (SEQ ID NO:3) mà hoạt hóa cả thụ thể glucagon và thụ thể GLP-1, với hiệu lực với thụ thể glucagon cao hơn chút ít so với thụ thể GLP-1.

Ngoài T2DM, các incretin và chất tương tự của chúng có hoạt tính ở một hoặc nhiều trong số các thụ thể GIP, GLP-1 và/hoặc glucagon được mô tả là có tiềm năng để điều trị nhiều tình trạng bệnh, bệnh hoặc rối loạn khác, bao gồm, ví dụ, bệnh béo phì, NAFLD và NASH, bệnh rối loạn mỡ máu, hội chứng chuyển hóa, rối loạn liên quan đến xương, bệnh Alzheimer và bệnh Parkinson. Xem, ví dụ, Jall *et al.* (2017) *Mol. Metab.* 6:440-446; Carbone *et al.* (2016) *J. Gastroenterol. Hepatol.* 31:23-31; Finan *et al.* (2016) *Trends Mol. Med.* 22:359-376; Choi *et al.* (2017) *Potent body weight loss and efficacy in a NASH animal model by a novel long-acting GLP-1/Glucagon/GIP triple-agonist (HMI5211)*, ADA Poster 1139-P; Ding (2008) *J. Bone Miner. Res.* 23:536-543; Tai *et al.* (2018) *Brain Res.* 1678:64-74; Müller *et al.* (2017) *Physiol. Rev.* 97:721-766; Finan *et al.* (2013) *Sci. Transl. Med.* 5:209; Hölscher (2014) *Biochem. Soc. Trans.* 42:593-600.

Như được sử dụng ở đây, “khoảng” nghĩa là trong khoảng ý nghĩa thống kê của giá trị hoặc các giá trị như, ví dụ, nồng độ, chiều dài, phân tử lượng, độ pH, mã nhận dạng trình tự, khung thời gian, nhiệt độ hoặc thể tích được đưa ra. Giá trị hoặc khoảng như vậy có thể nằm trong loại độ lớn thường trong khoảng 20%, thông thường hơn là 10%, và còn thông thường hơn nữa là trong khoảng 5% giá trị hoặc khoảng đã đưa ra. Các biến đổi được phép thuộc phạm vi của “khoảng” sẽ phụ thuộc vào hệ cụ thể được nghiên cứu, và có thể được người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực này sẵn sàng thừa nhận.

Như được sử dụng ở đây, và tham chiếu đến một hoặc nhiều thụ thể GIP, GLP-1 hoặc glucagon, “hoạt tính”, “hoạt hóa”, “việc hoạt hóa” và các thuật ngữ tương tự chỉ khả năng liên kết với và gây đáp ứng ở (các) thụ thể của hợp chất, như các chất tương tự incretin được mô tả trong bản mô tả, như được xác định bằng các thử nghiệm đã biết trong lĩnh vực này, như các thử nghiệm *in vitro* được mô tả sau đây.

Như được sử dụng ở đây, “axit amin với nhóm chức khả dụng để liên hợp” nghĩa là axit amin bất kỳ tự nhiên hoặc không tự nhiên với nhóm chức mà có thể được

liên hợp với axit béo bằng, ví dụ, phân tử liên kết. Ví dụ về các nhóm chức như vậy bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các nhóm alkynyl, alkenyl, amino, azido, bromo, carboxyl, cloro, iodo, và thiol. Ví dụ về các axit amin tự nhiên bao gồm các nhóm chức như vậy bao gồm K (amino), C (thiol), E (carboxyl) và D (carboxyl).

Như được sử dụng ở đây, “axit béo C₁₆-C₂₂” nghĩa là axit carboxylic có từ 16 đến 22 nguyên tử cacbon. Axit béo C₁₆-C₂₂ thích hợp để dùng trong sáng chế này có thể là monoaxit no hoặc diaxit no. Như được sử dụng ở đây, “no” nghĩa là axit béo không chứa liên kết đôi hoặc liên kết ba cacbon-cacbon.

Như được sử dụng ở đây, “lượng hữu hiệu” nghĩa là lượng, nồng độ hoặc liều một hoặc nhiều chất tương tự incretin được mô tả trong bản mô tả, hoặc muối được dùng của nó mà khi sử dụng liều đơn hoặc nhiều liều cho đối tượng cần sử dụng, sẽ tạo ra tác dụng mong muốn ở đối tượng được chẩn đoán hoặc điều trị. Lượng hữu hiệu có thể dễ dàng được xác định bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực này bằng 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 cá thể, cần cân nhắc một số yếu tố bao gồm, nhưng không giới hạn ở, loài động vật; kích thước, độ tuổi và sức khỏe chung của nó; 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 tương tự incretin 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.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, “thời gian tác động kéo dài” nghĩa là ái lực gắn kết và hoạt tính đối với chất tương tự incretin tiếp tục trong khoảng thời gian lớn hơn so với của các peptit GIP, GLP-1 và glucagon tự nhiên của người, cho phép việc định liều không thường xuyên ở mức một lần một ngày hoặc thậm chí ba lần một tuần, hai lần một tuần hoặc một lần một tuần. Profin tác động theo thời gian của chất tương tự incretin có thể được xác định bằng cách sử dụng các phương pháp thử nghiệm được động học đã biết như các phương pháp được sử dụng trong phần ví dụ dưới đây.

Như được sử dụng ở đây, “chất tương tự incretin” nghĩa là hợp chất có sự tương đồng về mặt cấu trúc với mỗi chất GIP, GLP-1 và glucagon, đặc biệt là GIP (SEQ ID

NO:4), GLP-1 (SEQ ID NO:2) và glucagon (SEQ ID NO:1) của người, nhưng có nhiều khác biệt với các chất này. Các chất tương tự incretin được mô tả trong bản mô tả này bao gồm các trình tự axit amin khiến cho hợp chất có sai lệch đối với và hoạt tính ở từng thụ thể trong số các thụ thể GIP, GLP-1 và glucagon (*tức là*, hoạt tính chủ vận bộ ba).

Như được sử dụng ở đây, “cá thể cần điều trị” nghĩa là động vật có vú, như người, mắc phải tình trạng, bệnh, rối loạn hoặc triệu chứng cần điều trị hoặc liệu pháp, bao gồm ví dụ, các tình trạng, bệnh, rối loạn hoặc triệu chứng được liệt kê trong bản mô tả.

Như được sử dụng ở đây, “phép điều trị”, “việc điều trị”, “điều trị” và các thuật ngữ tương tự chỉ việc ngăn chặn, làm chậm, chấm dứt hoặc đảo ngược sự tiến triển hoặc mức độ nghiêm trọng của triệu chứng, tình trạng bệnh, bệnh, rối loạn hoặc triệu chứng hiện có.

Như được sử dụng ở đây, và tham chiếu đến chất tương tự incretin, “hoạt tính chủ vận bộ ba” nghĩa là chất tương tự incretin có hoạt tính ở mỗi thụ thể trong số các thụ thể GIP, GLP-1 và glucagon, đặc biệt là chất tương tự có hoạt tính cân bằng và đủ ở mỗi thụ thể để tạo ra những lợi ích chủ vận của thụ thể đó trong khi tránh được các tác dụng phụ không mong muốn khi hoạt tính quá lớn. Hơn nữa, các chất tương tự incretin có hoạt tính chủ vận bộ ba có thời gian tác động kéo dài ở từng thụ thể trong số các thụ thể GIP, GLP-1 và glucagon 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 một cách thuận lợi.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, “điều trị” hoặc “để điều trị” có nghĩa là ngăn cản, làm chậm, dừng hoặc đảo ngược sự tiến triển hoặc mức độ trầm trọng của tình trạng bệnh, bệnh, rối loạn hoặc triệu chứng đang xuất hiện.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, và tham chiếu đến chất tương tự incretin, “hoạt tính chủ vận bộ ba” có nghĩa là chất tương tự incretin có hoạt tính ở mỗi thụ thể trong số các thụ thể glucagon, GIP và GLP-1, đặc biệt là chất tương tự có hoạt tính cân bằng và đủ ở mỗi thụ thể để tạo ra lợi ích chủ vận của thụ thể đó đồng thời tránh được các tác dụng phụ không mong muốn liên quan đến hoạt tính quá lớn. Hơn nữa, các chất tương tự incretin có hoạt tính chủ vận bộ ba có thời gian tác động kéo dài

ở mỗi thụ thể trong số các thụ thể GIP, GLP-1 và glucagon 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 một cách thuận lợi.

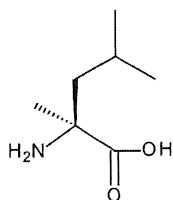
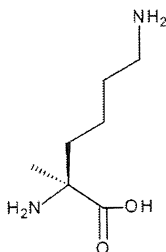
Các dấu hiệu cấu trúc của các chất tương tự incretin được mô tả trong bản mô tả này làm cho các chất tương tự có hoạt tính đủ ở mỗi thụ thể trong số các thụ thể GIP, GLP-1 và glucagon để thu được hiệu quả hoạt tính thích hợp ở mỗi thụ thể (*tức là*, hoạt tính chủ vận bộ ba), nhưng hoạt tính không quá lớn ở một thụ thể bất kỳ để lần ít hoạt tính ở cả hai thụ thể còn lại hoặc tạo ra các tác dụng phụ không mong muốn khi được dùng với liều đủ để tạo ra hoạt tính ở cả ba thụ thể. Các ví dụ không giới hạn về các dấu hiệu cấu trúc như vậy theo các phương án nhất định, và tham chiếu đến SEQ ID NO:5, bao gồm α MeF hoặc α MeF(2F) ở vị trí 6, được phát hiện là góp phần vào hoạt tính glucagon tối ưu, L hoặc α MeL ở vị trí 13, được phát hiện là góp phần vào hoạt tính glucagon và GIP tối ưu; Aib ở vị trí 20, nhận thấy rằng nó góp phần tạo ra hoạt tính GIP tối ưu; axyl hóa ở vị trí 17, được phát hiện là góp phần vào hoạt tính glucagon tối ưu; và Y ở vị trí 25, được phát hiện là góp phần vào hoạt tính glucagon và/hoặc GIP tối ưu. Ví dụ khác về các dấu hiệu cấu trúc như vậy bao gồm các axit amin được mô tả trong bản mô tả ở vị trí số 22, 24 và 28-39, được phát hiện là góp phần vào liên kết và hiệu lực tối ưu ở cả ba thụ thể.

Các dấu hiệu cấu trúc về các chất tương tự incretin mô tả trong bản mô tả này cũng làm cho các chất tương tự có nhiều thuộc tính có lợi khác liên quan đến khả năng phát triển của chúng như các liệu pháp điều trị, bao gồm cải thiện độ hòa tan của các chất tương tự trong các dung dịch nước, cải thiện độ ổn định bào chế hóa học và vật lý, kéo dài profin được động học, và giảm thiểu khả năng sinh miễn dịch. Các ví dụ không giới hạn về các dấu hiệu cấu trúc cụ thể tạo nên các thuộc tính như vậy bao gồm việc axyl hóa ở vị trí 17 với axit béo C_{20} , góp phần vào profin được động học (pharmacokinetic - PK) và khả năng phát triển tối ưu; Aib hoặc H ở vị trí 20, góp phần vào các profin PK và khả năng phát triển tối ưu; và các axit amin được mô tả trong bản mô tả này ở các vị trí 22, 24 và 28-39, góp phần vào PK, tính sinh miễn dịch, khả năng phát triển và độ ổn định tối ưu.

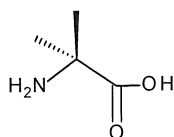
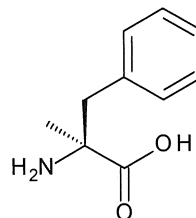
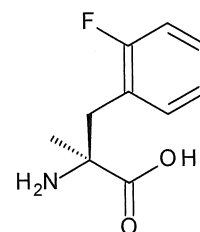
Cần lưu ý rằng các danh mục trên đây về các dấu hiệu cấu trúc chỉ là để minh họa, và không bao hàm toàn diện, và tổ hợp các đặc tính có lợi của các chất tương tự

làm ví dụ được mô tả trong bản mô tả này không phải là kết quả của cải biến bất kỳ khi phân tách, mà thay vào đó đạt được thông qua những tổ hợp mới về các dấu hiệu cấu trúc được mô tả trong bản mô tả này. Ngoài ra, những tác dụng được mô tả trên đây của danh mục đã nêu về các cải biến không mang tính loại trừ, vì nhiều cải biến trong số này cũng có những tác dụng khác quan trọng đối với đặc tính của các hợp chất được mô tả trong bản mô tả, như được mô tả sau đây.

Các trình tự axit amin của các chất tương tự incretin được mô tả trong bản mô tả này kết hợp với các axit amin xuất hiện trong tự nhiên, thường được biểu thị trong bản mô tả này bằng cách sử dụng một mã chữ cái tiêu chuẩn (ví dụ, L = leuxin), cũng như các gốc được thế alpha-metyl của các axit amin tự nhiên (ví dụ, α -metyl leuxin (α MeL), α -metyl lysin (α MeK), α -metyl phenylalanin (α MeF), and α -metyl 2-fluorophenylalanin (α MeF(2F)), và các axit amin không có trong tự nhiên nhất định khác, như axit alpha amino isobutyric (Aib). Cấu trúc của các axit amin này được minh họa dưới đây:

 α MeL α MeK

Aib

 α MeF α MeF(2F)

Như đã lưu ý trên đây, các chất tương tự incretin được mô tả trong bản mô tả có độ tương tự về mặt cấu trúc với, các peptit tự nhiên của người bất kỳ, nhưng cũng có nhiều khác biệt về cấu trúc. Ví dụ, so với GIP tự nhiên của người (SEQ ID NO:4), các chất tương tự incretin được mô tả trong bản mô tả bao gồm các cải biến ở một hoặc nhiều vị trí trong số các vị trí 2, 3, 7, 13, 14, 17, 18-21, 23-25, 28-29 và 30-42. Trong một số trường hợp, các chất tương tự incretin được mô tả trong bản mô tả bao gồm các cải biến axit amin so với GIP tự nhiên của người (SEQ ID NO:4) ở từng vị trí trong số các vị trí 2, 3, 6, 7, 13, 14, 17, 18, 21, 23-25, 29 và 30-42. Trong các trường hợp nhất định, các chất tương tự incretin được mô tả trong bản mô tả bao gồm các cải biến axit amin sau: Aib ở vị trí 2; Q hoặc H ở vị trí 3; α MeF hoặc α MeF(2F) ở vị trí 6; T ở vị trí 7; L hoặc α MeL ở vị trí 13; L ở vị trí 14; gốc K được cải biến ở vị trí 17 mà được cải

biến thông qua quá trình liên hợp với nhóm epsilon-amino của chuỗi bên K với axit béo có C₁₆ đến C₂₂, tùy ý thông qua việc sử dụng liên kết; A ở vị trí 18; Q ở vị trí 19; Aib, Q hoặc H ở vị trí 20; A ở vị trí 21; I ở vị trí 23; E ở vị trí 24; Y ở vị trí 25; E ở vị trí 28; G ở vị trí 29; và thay thế các axit amin ở các vị trí 30-42 bằng trình tự axit amin sau: GPSSGAPPPS (SEQ ID NO:12) (và các chất tương tự cắt cụt của phần đuôi). Trong các trường hợp khác nữa, các chất tương tự incretin được mô tả trong bản mô tả này được amit hóa. Tuy nhiên, ngoài các cải biến được mô tả trong bản mô tả, các chất tương tự incretin được mô tả trong bản mô tả có thể bao gồm một hoặc nhiều cải biến axit amin bổ sung, miễn là các chất tương tự giữ được khả năng liên kết và hoạt hóa mỗi thụ thể trong số các thụ thể GIP, GLP-1 và glucagon.

Như đã lưu ý trên đây, các chất tương tự incretin được mô tả trong bản mô tả bao gồm gốc axit béo được liên hợp, ví dụ, bằng liên kết với axit amin tự nhiên hoặc không tự nhiên với nhóm chức khả dụng để liên hợp. Đôi khi, sự liên hợp như vậy gọi là sự axyl hóa. Trong các trường hợp nhất định, axit amin với nhóm chức khả dụng để liên hợp có thể là K, C, E và D. Trong các trường hợp cụ thể, axit amin với nhóm chức khả dụng để liên hợp là K, trong đó thể liên hợp là với nhóm epsilon-amino của mạch bên K.

Việc axyl hóa các chất tương tự incretin được mô tả trong bản mô tả là ở vị trí số 17 trong SEQ ID NO:5, mà được xác định là vị trí tối ưu để đưa cấu trúc này vào. Axit béo, và theo các phương án nhất định, phần tử liên kết tác động như chất gắn kết albumin, và tạo ra khả năng gắn kết để tạo ra các hợp chất có tác dụng kéo dài.

Các chất tương tự incretin được mô tả trong bản mô tả sử dụng axit béo C₁₆-C₂₂ được liên hợp hóa học với nhóm chức của axit amin bằng liên kết trực tiếp hoặc bằng phần tử liên kết. Chiều dài và thành phần của axit béo ảnh hưởng tới thời gian bán thải của các chất tương tự incretin, hiệu lực của chúng ở mô hình động vật *in vivo* và độ hòa tan và độ ổn định của chúng. Việc liên hợp với monoaxit hoặc diaxit béo bão hòa C₁₆-C₂₂ làm cho các chất tương tự incretin có thời gian bán thải mong muốn, hiệu lực mong muốn trong mô hình động vật *in vivo*, và các đặc tính về độ hòa tan và độ ổn định mong muốn.

Ví dụ về các axit béo bão hòa C₁₆-C₂₂ để sử dụng trong bản mô tả bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, axit palmitic (axit hexadecanoic) (monoaxit C₁₆), axit

hexadecandioic (diaxit C₁₆), axit margaric (axit heptadecanoic)(monoaxit C₁₇), axit heptadecandioic (diaxit C₁₇), axit stearic (monoaxit C₁₈), axit octadecandioic (diaxit C₁₈), axit nonadexylic (axit nonadecanoic)(monoaxit C₁₉), axit nonadecandioic (diaxit C₁₉), axit arachadic (axit eicosanoic) (monoaxit C₂₀), axit eicosandioic (diaxit C₂₀), axit heneicosylic (axit heneicosanoic)(monoaxit C₂₁), axit heneicosandioic (diaxit C₂₁), axit behenic (axit docosanoic)(monoaxit C₂₂), axit docosandioic (diaxit C₂₂), bao gồm các dẫn xuất phân nhánh và được thể của chúng.

Trong các trường hợp nhất định, axit béo C₁₆-C₂₂ có thể là monoaxit C₁₈ no, diaxit C₁₈ no, monoaxit C₁₉ no, diaxit C₁₉ no, monoaxit C₂₀ no, diaxit C₂₀ no, và các dẫn xuất phân nhánh và được thể của chúng. Trong các trường hợp cụ thể hơn, axit béo C₁₆-C₂₂ có thể là axit stearic, axit arachadic hoặc axit eicosanedioic, đặc biệt là axit arachadic.

Trong một số trường hợp, phần tử liên kết có thể có một đến bốn axit amin, amino polyetylen glycol carboxylat, hoặc hỗn hợp của chúng. Trong các trường hợp nhất định, amino polyetylen glycol carboxylat có cấu trúc sau đây:

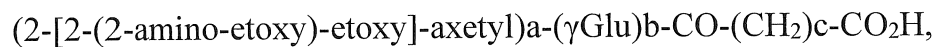


trong đó m là số nguyên bất kỳ từ 1 đến 12, n là số nguyên bất kỳ từ 1 đến 12, và p bằng 1 hoặc 2.

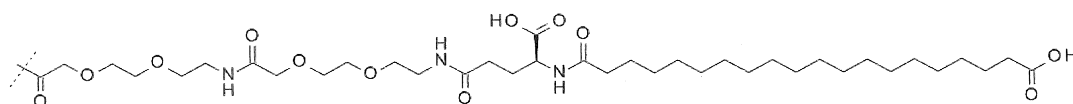
Trong các trường hợp nhất định, phần tử liên kết có thể là một hoặc nhiều gốc (2-[2-(2-amino-etoxy)-etoxy]-axetyl), tùy ý kết hợp với một đến bốn axit amin.

Trong các trường hợp mà phần tử liên kết bao gồm ít nhất một axit amin, axit amin này có thể là một đến bốn gốc axit amin Glu hoặc γ Glu. Trong một số trường hợp, phần tử liên kết có thể bao gồm một hoặc hai gốc axit amin Glu hoặc γ Glu, bao gồm các dạng D của chúng. Ví dụ, phần tử liên kết có thể bao gồm một hoặc hai gốc axit amin γ Glu. Theo cách khác, phần tử liên kết có thể bao gồm một đến bốn gốc axit amin (như, ví dụ, các axit amin Glu hoặc γ Glu) được sử dụng kết hợp với không quá ba mươi sáu gốc (2-[2-(2-amino-etoxy)-etoxy]-axetyl). Đặc biệt, phần tử liên kết có thể là dạng kết hợp của một đến bốn axit amin E hoặc γ E và một đến bốn gốc (2-[2-(2-amino-etoxy)-etoxy]-axetyl). Trong các trường hợp khác, phần tử liên kết có thể là dạng kết hợp của một hoặc hai axit amin γ Glu và một hoặc hai gốc (2-[2-(2-amino-etoxy)-etoxy]-axetyl).

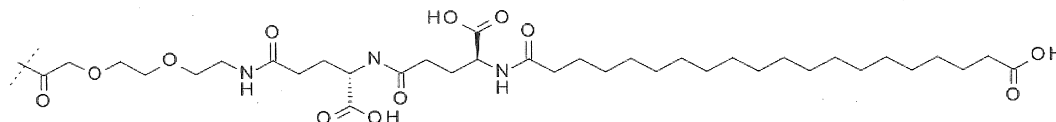
Trong trường hợp đặc biệt, các chất tương tự incretin được mô tả trong bản mô tả này có phần tử liên kết và thành phần axit béo có cấu trúc theo công thức sau:



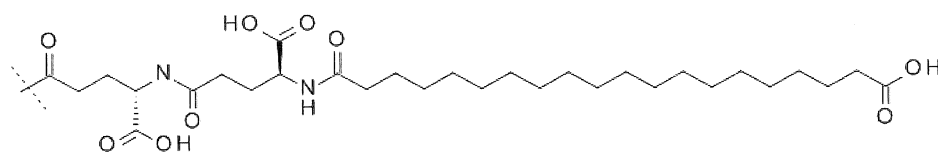
Trong đó a bằng 0, 1 hoặc 2, b bằng 1 hoặc 2, và c bằng 16 hoặc 18. Trong trường hợp cụ thể, a bằng 2, b bằng 1, và c bằng 18, cấu trúc của trường hợp này được minh họa như sau:



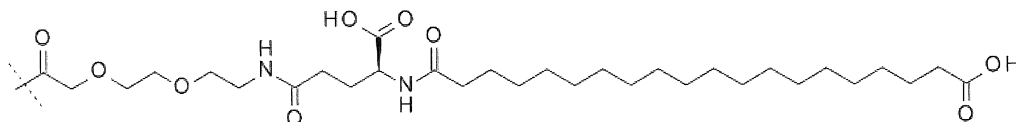
Trong trường hợp đặc biệt khác, a bằng 1, b bằng 2, và c bằng 18, cấu trúc của trường hợp này được minh họa như sau:



Trong trường hợp đặc biệt khác, a bằng 0, b bằng 2, và c bằng 18, cấu trúc của trường hợp này được minh họa như sau:



Trong trường hợp đặc biệt khác, a bằng 1, b bằng 1, và c bằng 18, cấu trúc của trường hợp này được minh họa như sau:



Như được thể hiện ở cấu trúc hóa học của các Ví dụ 1-6 dưới đây, các gốc phần tử liên kết-axit béo mô tả ở trên có thể được liên kết với nhóm epsilon (ϵ)-amino của mạch bên lysin (K).

Ái lực của các chất tương tự incretin được mô tả trong bản mô tả này đối với từng thụ thể trong số các thụ thể GIP, GLP-1 và glucagon có thể được xác định bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực này để xác định mức gắn kết thụ thể,

bao gồm, ví dụ, các kỹ thuật được mô tả trong các ví dụ sau đây, và thường được biểu thị bằng giá trị hằng số ức chế (K_i). Hoạt tính của các chất tương tự incretin được mô tả trong bản mô tả ở mỗi thụ thể cũng có thể đo được bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực này, bao gồm, ví dụ, thử nghiệm hoạt tính *in vitro* được mô tả sau đây, và thường được biểu thị bằng giá trị nồng độ hữu hiệu 50 (EC_{50}), là nồng độ của hợp chất gây ra sự kích thích bán tối đa trong đường cong đáp ứng liều.

Các chất tương tự incretin được mô tả trong bản mô tả có thể được bào chế thành dược phẩm, mà dược phẩm này có thể được dùng ngoài đường tiêu hóa (ví dụ, dưới da, trong tĩnh mạch, trong màng bụng, trong cơ hoặc qua da). Các dược phẩm như vậy và các kỹ thuật để bào chế chúng là đã được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này. Xem, ví dụ, Remington: The Science and Practice of Pharmacy (Troy, Ed., 21st Edition, Lippincott, Williams & Wilkins, 2006). Trong những trường hợp cụ thể, các chất tương tự incretin được sử dụng dưới da.

Các chất tương tự incretin được mô tả trong bản mô tả này có thể phản ứng với số lượng axit/bazơ vô cơ và hữu cơ bất kỳ để tạo ra các muối cộng axit/bazơ được dụng. Các muối được dụng và các kỹ thuật thông thường để điều chế chúng là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật (xem, ví dụ, Stahl, *et al.* Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection and Use, 2nd Revised Edition (Wiley-VCH, 2011)). Các muối được dụng để sử dụng trong bản mô tả bao gồm muối natri, trifloaxetat, hydroclorua, và axetat.

Bản mô tả này cũng đề xuất và do đó bao hàm các hợp chất trung gian mới và phương pháp tổng hợp các chất tương tự incretin được mô tả trong bản mô tả này, hoặc muối được dụng của chúng. Các hợp chất trung gian và các chất tương tự incretin được mô tả trong bản mô tả này có thể được điều chế bằng nhiều kỹ thuật khác nhau đã biết trong lĩnh vực này. Ví dụ, phương pháp tổng hợp hóa học được minh họa trong các ví dụ sau đây. Các bước tổng hợp đặc biệt đối với mỗi con đường trong số các con đường được mô tả có thể được kết hợp theo các cách khác nhau để điều chế các chất tương tự incretin được mô tả trong bản mô tả này. Các chất phản ứng và các nguyên liệu ban đầu đều sẵn có đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Các chất tương tự incretin nhất định được mô tả trong bản mô tả này nhìn chung là hữu hiệu trong khoảng liều lượng rộng. Ví dụ, liều lượng để dùng một lần một tuần có thể nằm trong khoảng từ 0,01 đến khoảng 30 mg/người/tuần, trong khoảng từ 0,1 đến khoảng 10 mg/người/tuần hoặc thậm chí là trong khoảng từ 0,1 đến khoảng 3 mg/người/tuần. Do đó, các chất tương tự incretin được mô tả trong bản mô tả này có thể được định liều hằng ngày, ba lần một tuần, hai lần một tuần hoặc một lần một tuần, đặc biệt là sử dụng một lần một tuần.

Các chất tương tự incretin được mô tả trong bản mô tả này có thể được sử dụng để điều trị nhiều tình trạng bệnh lý, rối loạn, bệnh hoặc triệu chứng khác nhau. Cụ thể, các phương pháp được đề xuất để điều trị T2DM cho cá thể, trong đó phương pháp như vậy bao gồm ít nhất bước cho cá thể cần điều trị sử dụng lượng hữu hiệu chất tương tự incretin được mô tả trong bản mô tả này, hoặc muối được dụng của nó.

Ngoài ra, các phương pháp được đề xuất để điều trị bệnh béo phì cho cá thể, trong đó phương pháp như vậy bao gồm ít nhất bước cho cá thể cần điều trị sử dụng lượng hữu hiệu chất tương tự incretin được mô tả trong bản mô tả này, hoặc muối được dụng của nó.

Ngoài ra, các phương pháp được đề xuất để tạo ra tình trạng giảm cân mà không điều trị cho cá thể, trong đó phương pháp như vậy bao gồm ít nhất bước cho cá thể cần điều trị sử dụng lượng hữu hiệu chất tương tự incretin được mô tả trong bản mô tả, hoặc muối được dụng của nó.

Ngoài ra, các phương pháp được đề xuất để điều trị hội chứng chuyển hóa cho cá thể, trong đó phương pháp như vậy bao gồm ít nhất bước cho cá thể cần điều trị sử dụng lượng hữu hiệu chất tương tự incretin được mô tả trong bản mô tả, hoặc muối được dụng của nó.

Ngoài ra, các phương pháp được đề xuất để điều trị NASH cho cá thể, trong đó phương pháp như vậy bao gồm ít nhất bước cho cá thể cần điều trị sử dụng lượng hữu hiệu chất tương tự incretin được mô tả trong bản mô tả này, hoặc muối được dụng của nó.

Ngoài ra, các phương pháp được đề xuất để điều trị FLD ở cá thể, trong đó các phương pháp này bao gồm ít nhất bước cho đối tượng có nhu cầu điều trị dùng lượng

hữu hiệu của chất tương tự incretin được mô tả trong bản mô tả này, hoặc muối được dụng của nó.

Trong các phương pháp này, độ hữu hiệu của các chất tương tự incretin có thể được đánh giá, ví dụ, bằng cách quan sát sự giảm đáng kể glucoza huyết, quan sát sự tăng đáng kể insulin, quan sát sự giảm đáng kể HbA1c và/hoặc quan sát sự giảm đáng kể về thể trọng.

Theo cách khác, các chất tương tự incretin được mô tả trong bản mô tả này hoặc muối được dụng của chúng có thể được sử dụng để cải thiện độ bền xương ở cá thể cần cải thiện. Trong một số trường hợp, cá thể cần cải thiện độ bền xương mắc chứng giảm tạo xương (hypo-ostosis) hoặc giảm sản xương (hypo-osteoidosis), hoặc đang phục hồi sau gãy xương, quá trình chỉnh hình, cấy ghép bộ phận giả, cấy ghép răng, và/hoặc nổi đốt sống. Các chất tương tự incretin được mô tả trong bản mô tả này cũng có thể được sử dụng để điều trị các rối loạn khác như bệnh Parkinson hoặc bệnh Alzheimer.

Ví dụ thực hiện sáng chế

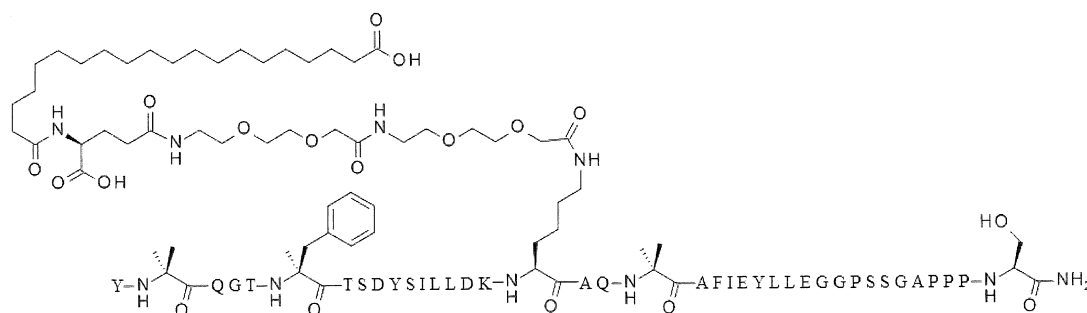
Tổng hợp peptit

Ví dụ 1:

Hợp chất ví dụ 1 là hợp chất được mô tả như sau:

Y-Aib-QGT- α MeF-TSDYSILLDKK((2-[2-(2-amino-etoxy)-etoxy]-axetyl)₂-(γ Glu)-CO-(CH₂)₁₈-CO₂H)AQ-Aib-AFIEYLLEGGPSSGAPPPS-NH₂ (SEQ ID NO:6).

Dưới đây mô tả cấu trúc của hợp chất ví dụ 1 bằng cách sử dụng các mã axit amin một chữ cái tiêu chuẩn ngoại trừ các gốc Aib2, α MeF6, K17 và Aib20, trong đó cấu trúc của các gốc axit amin này đã được mở rộng:



Khung peptit của hợp chất ví dụ 1 được tổng hợp bằng cách sử dụng chất hóa học Florenyimetyloxycarbonyl (Fmoc)/tert-Butyl (t-Bu) trong thiết bị tổng hợp Symphony X Peptit (Protein Technologies, Inc. Tucson, AZ).

Nhựa chứa 1% DVB polystyren liên kết ngang (nhựa mang Fmoc-Rink-MBHA thấp, cỡ rây 100-200, EMD Millipore) ở mức thay thế 0,3-0,4 meq/g. Các nhóm bảo vệ mạch bên tiêu chuẩn được sử dụng. Fmoc-Lys(Mtt)-OH được dùng cho lysin ở vị trí số 17, và Boc-Tyr(tBu)-OH được dùng cho tyrosin ở vị trí 1. Các nhóm Fmoc được loại bỏ trước mỗi bước kết hợp (2 x 7 phút) bằng cách sử dụng piperidin 20% trong DMF. Tất cả các phản ứng kết hợp axit amin tiêu chuẩn được thực hiện trong 1 giờ đối với amin bậc nhất và 3 giờ đối với amin bậc hai, bằng cách sử dụng tỷ lệ mol axit amin Fmoc (0,3mM), diisopropylcarbodiimide (0,9mM) và Oxyma (0,9mM) bằng nhau, ở mức mol dư 9 lần so với tải lượng peptit lý thuyết. Ngoại trừ các phản ứng kết hợp với các amin được C α -methyl hóa, chúng được kết hợp trong 3 giờ. Sau khi hoàn thành việc tổng hợp khung peptit, nhựa được rửa kỹ bằng DCM 6 lần để loại bỏ DMF còn lại. Nhóm bảo vệ Mtt trên lysin ở vị trí 17 được loại bỏ một cách có chọn lọc khỏi nhựa peptit bằng hai lần xử lý bằng hexafluoroisopropanol 30% (Oakwood Chemicals) trong DCM (2 lần xử lý 40 phút mỗi lần).

Việc gắn tiếp theo của gốc axit béo-phần tử liên kết được thực hiện bằng cách kết hợp axit 2-[2-(2-Fmoc-amino-etoxy)-etoxy]-axetic (Fmoc-AEEA-OH, ChemPep, Inc.), α -t-butyl este của axit Fmoc-glutamic (Fmoc-Glu-OtBu, Ark Pharm, Inc.), axit mono-OtBu-eicosanedioic (WuXi AppTec, Shanghai, China). Chất phản ứng với lượng dư gấp 3 lần (AA: PyAOP: DIPEA = 1:1:1 mol/mol) được sử dụng cho mỗi lần kết hợp kéo dài trong 1 giờ.

Sau khi hoàn thành việc tổng hợp, nhựa peptit được rửa bằng DCM, và sau đó làm khô kỹ bằng không khí. Nhựa khô được xử lý bằng 10 mL hỗn hợp phân cắt (axit trifluoroaxetic:nước:triisopropylsilan, 95:2,5:2,5 thể tích/thể tích) trong 2 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Nhựa này được lọc ra, rửa hai lần, mỗi lần bằng 2 mL bằng TFA nguyên chất, và dịch lọc kết hợp được xử lý bằng diethyl ete lạnh 5 lần (-20°C) để kết tủa peptit thô. Sau đó, huyền phù peptit/ete được ly tâm ở 3500 vòng/phút trong 2 phút để tạo thành viên kết rắn, phần dịch nổi được gạn ra, và viên kết rắn được nghiền tinh chế với ete hai lần nữa và được làm khô trong chân không. Peptit thô được hòa tan

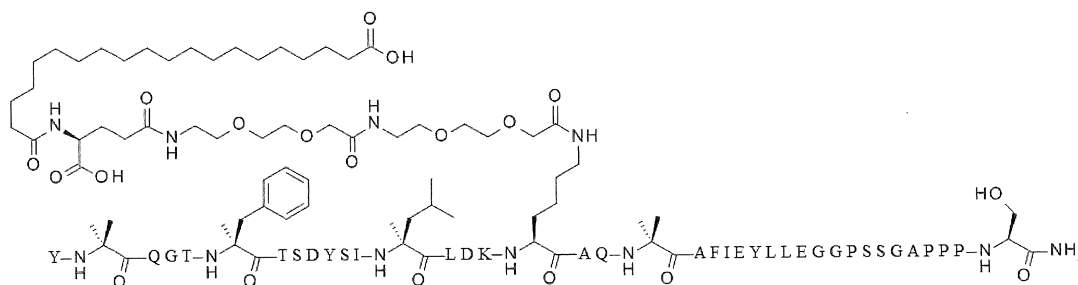
trong 20% axetonitril/20% axit axetic/60% nước và tinh chế bằng RP-HPLC trên cột Luna 5 μ m Phenyl-Hexyl điều chế (21 x 250 mm, Phenomenex) với gradien tuyến tính 100% axetonitril và 0,1% hệ đệm TFA/nước (30-50% axetonitril trong 60 phút). Độ tinh khiết của peptit được đánh giá bằng cách sử dụng RP-HPLC phân tích và tiêu chuẩn gộp chung là >95%. Độ tinh khiết của phần gộp chung chính của hợp chất theo ví dụ 1 được phát hiện là 99,2%. Đông khô sau đó sản phẩm chính cuối thu được muối TFA peptit được đông khô. Phân tử lượng được xác định bằng LC-MS (quan sát: $M+4H+/4 = 1219,9$; tính toán: $M+4H+/4 = 1220,1$).

Ví dụ 2:

Hợp chất ví dụ 2 là hợp chất được mô tả như sau:

Y-Aib-QGT- α MeF-TSDYSI- α MeL-LDKK((2-[2-(2-amino-etoxy)-etoxy]-axetyl)₂-(γ Glu)-CO-(CH₂)₁₈-CO₂H)AQ-Aib-AFIEYLLEGGPSSGAPPPS-NH₂ (SEQ ID NO:7).

Dưới đây mô tả cấu trúc của hợp chất ví dụ 2 bằng cách sử dụng các mã axit amin một chữ cái tiêu chuẩn ngoại trừ các gốc Aib2, α MeF6, α MeL13, K17 và Aib20, trong đó cấu trúc của các gốc axit amin này đã được mở rộng:



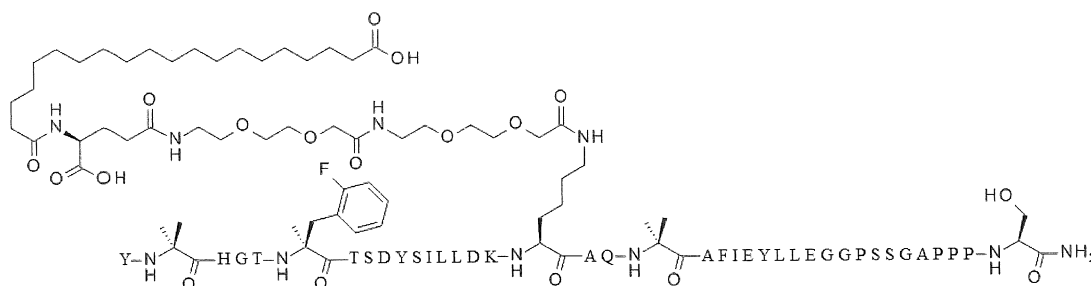
Các quy trình tương tự như các quy trình được mô tả trên đây trong ví dụ 1 được dùng để tổng hợp khung peptit, để liên hợp gốc axit béo-phần tử liên kết, để kiểm tra độ tinh khiết, và để xác nhận phân tử lượng của hợp chất ví dụ 2.

Ví dụ 3:

Hợp chất ví dụ 3 là hợp chất được mô tả như sau:

Y-Aib-HGT- α MeF(2F)-TSDYSILLDKK((2-[2-(2-amino-etoxy)-etoxy]-axetyl)₂-(γ Glu)-CO-(CH₂)₁₈-CO₂H)AQ-Aib-AFIEYLLEGGPSSGAPPPS-NH₂ (SEQ ID NO:8).

Dưới đây mô tả cấu trúc của hợp chất ví dụ 3 bằng cách sử dụng các mã axit amin một chữ cái tiêu chuẩn với ngoại trừ các gốc Aib2, α MeF(2F)6, K17, và Aib20, trong đó các cấu trúc của các gốc axit amin này đã được mở rộng:



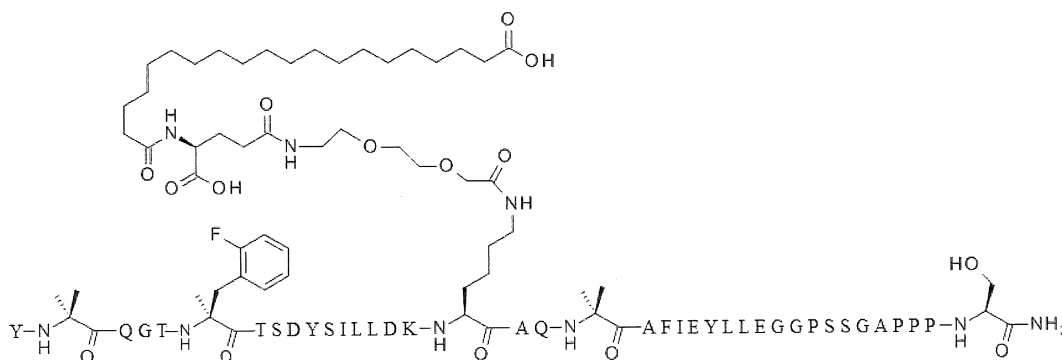
Các quy trình tương tự như các quy trình được mô tả trên đây trong ví dụ 1 được dùng để tổng hợp khung peptit, để liên hợp gốc axit béo-phần tử liên kết, để kiểm tra độ tinh khiết, và để xác nhận phân tử lượng của hợp chất ví dụ 3.

Ví dụ 4:

Hợp chất ví dụ 4 là hợp chất được mô tả như sau:

Y-Aib-QGT- α MeF(2F)-TSDYSILLDKK((2-[2-(2-amino-etoxy)-etoxy]-axetyl)-(γ Glu)-CO-(CH₂)₁₈-CO₂H)AQ-Aib-AFIEYLLEGGPSSGAPPPS-NH₂ (SEQ ID NO:9).

Dưới đây mô tả cấu trúc của hợp chất ví dụ 4 bằng cách sử dụng các mã axit amin một chữ cái tiêu chuẩn với ngoại trừ các gốc Aib2, α MeF(2F)6, K17, và Aib20, trong đó các cấu trúc của các gốc axit amin này đã được mở rộng:



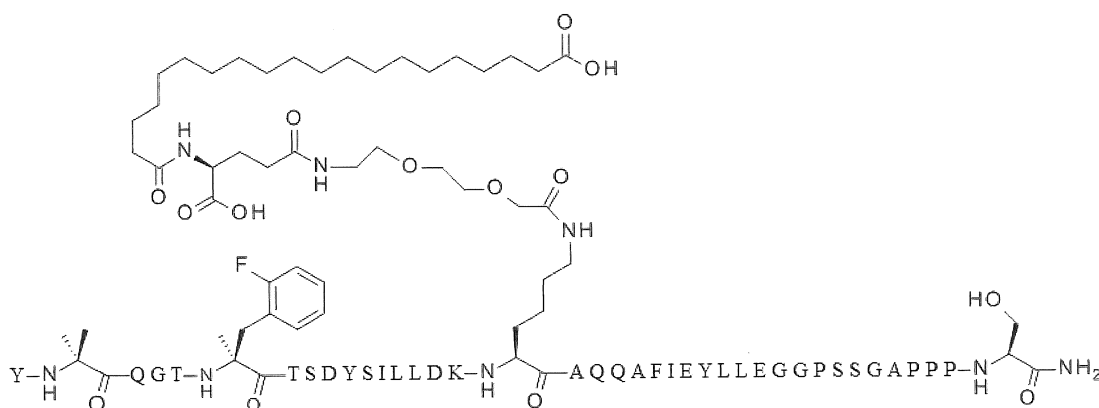
Các quy trình tương tự như các quy trình được mô tả trên đây trong ví dụ 1 được dùng để tổng hợp khung peptit, để liên hợp gốc axit béo-phần tử liên kết, để kiểm tra độ tinh khiết, và để xác nhận phân tử lượng của hợp chất ví dụ 4.

Ví dụ 5:

Hợp chất ví dụ 5 là hợp chất được mô tả như sau:

Y-Aib-QGT- α MeF(2F)-TSDYSILLDKK((2-[2-(2-amino-etoxy)-etoxy]-axetyl)-
(γ Glu)-CO-(CH₂)₁₈-CO₂H)AQQAFIEYLLGGPSSGAPPPS-NH₂ (SEQ ID NO:10).

Dưới đây mô tả cấu trúc của hợp chất ví dụ 5 bằng cách sử dụng các mã axit amin một chữ cái tiêu chuẩn với ngoại trừ các gốc Aib2, α MeF(2F)6 và K17, trong đó các cấu trúc của các gốc axit amin này đã được mở rộng:



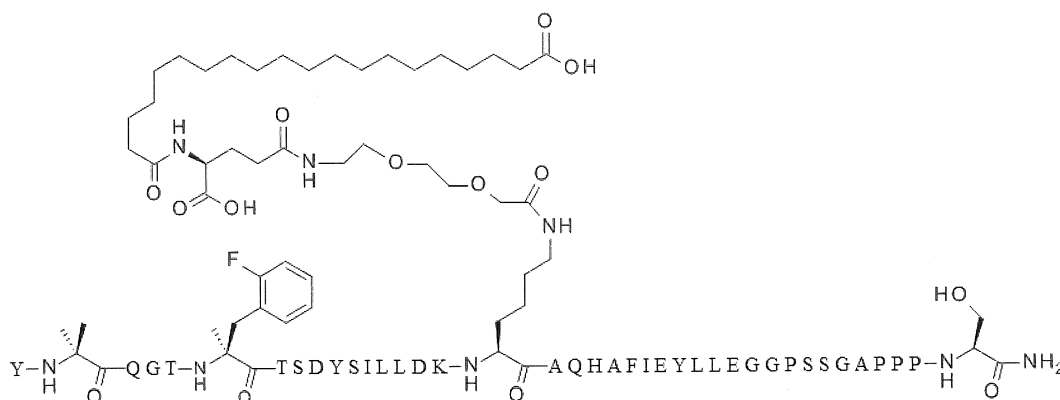
Các quy trình tương tự như các quy trình được mô tả trên đây trong ví dụ 1 được dùng để tổng hợp khung peptit, để liên hợp gốc axit béo-phần tử liên kết, để kiểm tra độ tinh khiết, và để xác nhận phân tử lượng của hợp chất ví dụ 5.

Ví dụ 6:

Hợp chất ví dụ 6 là hợp chất được mô tả như sau:

Y-Aib-QGT- α MeF(2F)-TSDYSILLDKK((2-[2-(2-amino-etoxy)-etoxy]-axetyl)-
(γ Glu)-CO-(CH₂)₁₈-CO₂H)AQHAFIEYLLGGPSSGAPPPS-NH₂ (SEQ ID NO:11).

Dưới đây mô tả cấu trúc của hợp chất ví dụ 6 bằng cách sử dụng các mã axit amin một chữ cái tiêu chuẩn với ngoại trừ các gốc Aib2, α MeF(2F)6, và K17, trong đó các cấu trúc của các gốc axit amin này đã được mở rộng:



Các quy trình tương tự như các quy trình được mô tả trên đây trong ví dụ 1 được dùng để tổng hợp khung peptit, để liên hợp gốc axit béo-phần tử liên kết, để kiểm tra độ tinh khiết, và để xác nhận phân tử lượng của hợp chất ví dụ 6.

Chức năng *in vitro*

Ái lực gắn kết

Thử nghiệm gắn kết cạnh tranh phối tử phóng xạ được tiến hành để xác định hằng số phân ly cân bằng đối với các hợp chất ví dụ và phân tử so sánh. Các thử nghiệm này sử dụng phương pháp thử nghiệm độ lân cận nhấp nháy (scintillation proximity assay - SPA) và màng được chuẩn bị từ các tế bào HEK293 đã chuyển nhiễm biểu hiện quá mức thụ thể GIP người (GIPR), thụ thể GLP-1 (GLP-1R) hoặc thụ thể glucagon người (GcgR).

Các thử nghiệm này được tiến hành với sự có mặt của bacitracin làm chất phong bế không đặc hiệu để ngăn các gốc được axyl hóa của các chất tương tự thử nghiệm gắn kết với các thành phần protein được sử dụng trong các đệm thử nghiệm chuẩn (ví dụ, albumin).

Các đường cong cạnh tranh được xây dựng đồ thị dưới dạng tỷ lệ phần trăm ức chế đặc hiệu (trục y) so với nồng độ log của hợp chất (trục x) và phân tích bằng cách sử dụng phương pháp hồi quy làm khớp với bốn thông số với độ dốc thay đổi (ABase hoặc Genedata). Các trị số K_i được tính toán theo phương trình $K_i = IC_{50}/(1+(D/K_d))$, trong đó IC_{50} là nồng độ hợp chất tạo ra mức ức chế liên kết 50%, D là nồng độ phối tử phóng xạ được sử dụng trong thử nghiệm, và K_d là hằng số phân ly cân bằng đối với thụ thể và phối tử phóng xạ, được xác định bằng cách phân tích gắn kết bão hòa (được thể hiện trong bảng 1 sau đây).

Bảng 1. Hằng số phân ly cân bằng (K_d) được xác định bằng cách phân tích gắn kết bão hòa

K_d , nM		
GLP-1R	GcgR	GIPR
1,2	3,9	0,14

Các trị số K_i của các chất tương tự làm ví dụ và các phân tử so sánh được thể hiện trong Bảng 2.

Bảng 2. Ái lực gắn kết *in vitro* (K_i) của các hợp chất ví dụ và các hợp chất so sánh đối với GIPR người, GLP-1R và GcgR.

	K_i , nM (SEM, n)		
Phân tử	GcgR	GIPR	GLP-1R
hGcg	3,1 (0,5, 4)		
hGIP		0,12 (0,02, 4)	
hGLP-1			1,2 (0,2, 4)
Ví dụ 1	0,955 (0,182, 3)	0,0278 (0,00297, 3)	2,51 (0,930, 3)
Hợp chất ví dụ 2	1,49 (0,201, 3)	0,0413 (0,0129, 3)	2,41 (se=0,720, 3)
Hợp chất ví dụ 3	0,469 (0,121, 5)	0,0684 (0,0193, 5)	1,66 (se=0,950, 5)
Hợp chất ví dụ 4	0,637 (0,0319, 3)	0,0832 (0,0273, 3)	1,21 (se=0,0737, 3)
Hợp chất ví dụ 5	0,419 (0,0430, 4)	0,0347 (0,0112, 4)	1,17 (se=0,674, 4)
Hợp chất ví dụ 6	0,382 (0,0587, 4)	0,0388 (0,00813, 4)	0,822 (se=0,379, 4)

Lưu ý: Dấu định tính (>) thể hiện dữ liệu không đạt đến mức 50% ức chế so với mức gắn kết tối đa, do đó K_i được tính toán bằng cách sử dụng nồng độ cao nhất được thử nghiệm trong thử nghiệm. $N=1/x$ nghĩa là chỉ một trị số trong số tổng số lần lặp lại (x) được sử dụng để biểu thị giá trị trung bình. SEM chỉ được tính toán khi tồn tại $n=2$ hoặc kết quả không được định tính hoặc lớn hơn.

Như được thấy ở Bảng 2, các chất tương tự làm ví dụ có ái lực gắn kết ở mỗi thụ thể trong số các thụ thể GIP, GLP-1 và Gcg.

Hoạt tính chức năng:

Hoạt tính chức năng được xác định ở các dòng tế bào HEK-293 đơn dòng biểu hiện GIP-R, GLP-1R và GcgR. Mỗi dòng tế bào biểu hiện quá mức thụ thể được xử lý bằng peptit (CRC 20 điểm, dung dịch gốc 2,75 lần Labcyte Echo) trong DMEM (Gibco Cat# 31053) có bổ sung 1X GlutaMAXTM (Gibco Cat# 35050), 0,25% FBS

(Fetal Bovine Serum, Gibco Cat# 26400), 0,05% BSA phân đoạn V (albumin huyết thanh bò, Gibco Cat# 15260), 250 μ M IBMX và 20 mM HEPES (Gibco Cat# 15630) trong thể tích thử nghiệm 20 μ l.

Sau khi ủ trong 60 phút ở nhiệt độ phòng, mức gia tăng cAMP nội bào thu được được định lượng bằng cách sử dụng kit thử nghiệm CisBio cAMP Dynamic 2 HTRF (62AM4PEJ). Một cách vắn tắt, mức cAMP trong tế bào được phát hiện bằng cách bổ sung thể liên hợp cAMP-d2 vào đệm phân giải tế bào sau đó là kháng thể kháng cAMP-Eu³⁺-Cryptat, cũng vào đệm phân giải tế bào. Hỗn hợp thử nghiệm cạnh tranh thu được được ủ trong ít nhất 60 phút ở nhiệt độ phòng và sau đó được phát hiện bằng dụng cụ PerkinElmer Envision® với bước sóng kích thích ở 320 nm và bước sóng phát xạ ở 665 nm và 620 nm. Các đơn vị hiện hình ảnh (bước sóng phát xạ ở 665nm/620nm*10.000) là tỷ lệ nghịch với lượng cAMP có mặt và được chuyển thành nM cAMP/lỗ bằng cách sử dụng đường cong chuẩn cAMP.

Lượng cAMP được tạo (nM) trong mỗi lỗ được chuyển thành tỷ lệ phần trăm đáp ứng tối đa quan sát thấy với GLP-1(7-36)NH₂ người, Gcg người, hoặc GIP(1-42)NH₂ người. Trị số EC₅₀ tương đối thu được bằng cách phân tích hồi quy phi 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 đối với các chất tương tự làm ví dụ và hGIP(1-42)NH₂, hGLP-1(7-36)NH₂ và hGcg được thể hiện trong bảng 3 sau đây.

Bảng 3. Hiệu lực cAMP chức năng (EC₅₀) đối với các chất tương tự làm ví dụ và các chất so sánh với sự có mặt của FBS và BSA.

	cAMP EC ₅₀ ,nM (SEM, n)		
	GcgR	GIPR	GLP-1R
hGcg	0,0114 (0,0014, 12)		
gGIP amit		0,0979 (0,0088, 12)	
hGLP-1 amit			0,0424 (0,0043, 12)
Hợp chất ví dụ 1	6,33 (0,905, 3)	1,82 (0,332, 3)	12,6 (1,42, 3)
Hợp chất ví dụ 2	4,75 (0,827, 3)	1,34 (0,216, 3)	11,6 (2,26, 3)
Hợp chất ví dụ 3	3,46 (0,835, 7)	1,37 (0,518, 7)	13,1 (3,06, 7)
Hợp chất ví dụ 4	1,78 (0,400, 5)	1,37 (0,422, 5)	10,6 (3,29, 5)

Hợp chất ví dụ 5	1,87 (0,254, 5)	1,91 (0,618, 5)	13,0 (2,59, 5)
Hợp chất ví dụ 6	1,76 (0,218, 4)	1,41 (0,363, 4)	8,94 (2,76, 4)

Lưu ý: Việc xác định EC_{50} của GLP-1(7-36)NH₂ người ở GLP-1R người, Gcg người ở GcgR người, và GIP(1-42)NH₂ người ở GIP-R người: khoảng nồng độ peptit là từ 448 pM đến 99,5 nM. Việc xác định EC_{50} của các hợp chất ví dụ ở GLP-1R người, GcgR người, và GIP-R người: khoảng nồng độ peptit là từ 51,5 fM đến 11,4 μ M.

Như thấy ở Bảng 3, khi có mặt FBS và BSA, các chất tương tự làm ví dụ có hoạt tính chủ vận như được xác định bởi các thử nghiệm GIP-R, GLP-1R, và GcgR cAMP người, là nhỏ hơn so với các phối tử tự nhiên.

Tập hợp thử nghiệm cAMP bổ sung được thực hiện trong tế bào HEK293 biểu hiện các thụ thể GLP-1 người, GIP và glucagon. Bằng cách sử dụng phương pháp huỳnh quang phân giải thời gian đồng nhất, các thử nghiệm được tiến hành để xác định hiệu lực nội tại của các chất tương tự làm ví dụ và các phân tử so sánh được thực hiện với sự có mặt của casein (thay cho albumin huyết thanh) làm chất phong bế không đặc hiệu, chất này không tương tác với các gốc axit béo của các phân tử được phân tích.

Mức cAMP nội bào được xác định bằng cách ngoại suy từ đường cong chuẩn. Các đường cong đáp ứng liều của các hợp chất được xây dựng đồ thị dưới dạng tỷ lệ phần trăm kích thích đã chuẩn hóa so với các trị số tối thiểu (chỉ có đệm) và tối đa (nồng độ tối đa của ứng phối tử đối chứng) và phân tích bằng cách sử dụng phương pháp khớp hồi quy phi tuyến tính bốn thông số với độ dốc thay đổi (Genedata Screener 13). EC_{50} là nồng độ hợp chất gây ra mức kích thích bán tối đa trong đường cong đáp ứng liều.

Dữ liệu được đưa ra trong bảng 4.

Bảng 4. Hoạt hóa chức năng của hGLP-1R, hGIPR, hGcgR với sự có mặt của 0,1% casein.

	cAMP EC_{50} , nM (SEM, n)		
	GcGR	GIPR	GLP-1R
hGcg	0,0119 (0,00356, 163)		
hGIP amit		0,154 (0,037, 118)	
gGLP-1 amit			0,063 (0,022, 197)
Ví dụ 1	0,158 (0,0464, 6)	0,0226 (0,00787, 5)	0,112 (0,0250, 5)
Hợp chất ví dụ 2	0,0960 (0,0295, 7)	0,0329 (0,0136, 7)	0,106 (0,0155, 7)
Hợp chất ví dụ 3	0,0301 (0,00811, 5)	0,0215 (0,00338, 4)	0,104 (0,0300, 4)

dụ 3			
Hợp chất ví dụ 4	0,0296 (0,00628, 5)	0,0321 (0,0110, 4)	0,145 (0,0309, 4)
Hợp chất ví dụ 5	0,0343 (0,00555, 4)	0,0306 (0,00998, 5)	0,103 (0,0263, 4)
Hợp chất ví dụ 6	0,0293 (0,00562, 4)	0,0349 (0,00643, 4)	0,115 (0,0305, 4)

Như được thể hiện trong bảng 4, các chất tương tự làm ví dụ kích thích cAMP từ các thụ thể GIP người, GLP-1 và glucagon với sự có mặt của 0,1% casein.

SEQ ID NO:1 – glucagon người

HSQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNT

SEQ ID NO:2 – amit GLP-1 (7-36) người

HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGR-NH₂

SEQ ID NO:3 – OXM người

HSQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNTKRNRNNIA

SEQ ID NO:4 – GIP người

YAEGTFISDYSIAMDKIHQQDFVNWLLAQKGKKNDWKHNITQ

SEQ ID NO:5 – chất tương tự incretin

YX₂X₃GTX₆TSDYSIX₁₃LDKX₁₇AQX₂₀AFIEYLLEGPPSSGAPPPS

trong đó,

X₂ là Aib;

X₃ là Q HOẶC H;

X₆ là αMeF hoặc αMeF(2F);

X₁₃ là L hoặc αMeL;

X₁₇ là axit amin bất kỳ có nhóm chức có sẵn để liên hợp, trong đó nhóm chức được liên hợp với axit béo C₁₆-C₂₂;

X₂₀ là Aib, Q hoặc H

SEQ ID NO:6 – chất tương tự incretin

Y-Aib-QGT- α MeF-TSDYSILLDKK((2-[2-(2-amino-etoxy)-etoxy]-axetyl)₂-(γ Glu)-CO-(CH₂)₁₈-CO₂H)AQ-Aib-AFIEYLLEGGPSSGAPPPS-NH₂

SEQ ID NO:7 – chất tương tự incretin

Y-Aib-QGT- α MeF-TSDYSI- α MeL-LDKK((2-[2-(2-amino-etoxy)-etoxy]-axetyl)₂-(γ Glu)-CO-(CH₂)₁₈-CO₂H)AQ-Aib-AFIEYLLEGGPSSGAPPPS-NH₂

SEQ ID NO:8 – chất tương tự incretin

Y-Aib-HGT- α MeF(2F)-TSDYSILLDKK((2-[2-(2-amino-etoxy)-etoxy]-axetyl)₂-(γ Glu)-CO-(CH₂)₁₈-CO₂H)AQ-Aib-AFIEYLLEGGPSSGAPPPS-NH₂

SEQ ID NO:9 – chất tương tự incretin

Y-Aib-QGT- α MeF(2F)-TSDYSILLDKK((2-[2-(2-amino-etoxy)-etoxy]-axetyl)₂-(γ Glu)-CO-(CH₂)₁₈-CO₂H)AQ-Aib-AFIEYLLEGGPSSGAPPPS-NH₂

SEQ ID NO:10 – chất tương tự incretin

Y-Aib-QGT- α MeF(2F)-TSDYSILLDKK((2-[2-(2-amino-etoxy)-etoxy]-axetyl)₂-(γ Glu)-CO-(CH₂)₁₈-CO₂H)AQAFIEYLLEGGPSSGAPPPS-NH₂

SEQ ID NO:11 – chất tương tự incretin

Y-Aib-QGT- α MeF(2F)-TSDYSILLDKK((2-[2-(2-amino-etoxy)-etoxy]-axetyl)₂-(γ Glu)-CO-(CH₂)₁₈-CO₂H)AQHAFIEYLLEGGPSSGAPPPS-NH₂

SEQ ID NO:12 – Trình tự nhân tạo

GPSSGAPPPS

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chất tương tự incretin bao gồm:

$\text{YX}_2\text{X}_3\text{GTX}_6\text{TSDYSIX}_{13}\text{LDKX}_{17}\text{AQX}_{20}\text{AFIEYLLEGPGSSGAPPPS}$,

trong đó:

X_2 là Aib,

X_3 là Q hoặc H,

X_6 là αMeF hoặc $\alpha\text{MeF}(2\text{F})$,

X_{13} là L hoặc αMeL ,

X_{17} là K được cải biến hóa học bằng cách liên hợp với nhóm epsilon-amino của mạch bên K có cấu trúc sau:

$(2-[2-(2\text{-amino-etoxy})\text{-etoxy}]\text{-axetyl})_a-(\gamma\text{Glu})_b\text{-CO}-(\text{CH}_2)_c\text{-CO}_2\text{H}$, trong đó a bằng 0, 1 hoặc 2; b bằng 1 hoặc 2; và c là số nguyên nằm trong khoảng từ 16 đến 18,

X_{20} là Aib, Q hoặc H,

(SEQ ID NO:5), và axit amin có đầu tận cùng C được amit hóa tùy ý; hoặc muối được dụng của nó.

2. Chất tương tự incretin theo điểm 1, trong đó a bằng 1.
3. Chất tương tự incretin theo điểm 2, trong đó a bằng 2.
4. Chất tương tự incretin theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó b bằng 1.
5. Chất tương tự incretin theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó b bằng 2.
6. Chất tương tự incretin theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong đó c bằng 18.

7. Chất tương tự incretin theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, trong đó X_{13} là α MeL.
8. Chất tương tự incretin theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, trong đó X_{13} là L.
9. Chất tương tự incretin theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8, trong đó X_3 là Q.
10. Chất tương tự incretin theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8, trong đó X_3 là H.
11. Chất tương tự incretin theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 10, trong đó X_6 là α MeF.
12. Chất tương tự incretin theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 10, trong đó X_6 là α MeF(2F).
13. Chất tương tự incretin có công thức được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NOS:5-11.
14. Dược phẩm chứa:
chất tương tự incretin theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 13; và
chất mang, chất pha loãng, hoặc tá dược được dụng.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Eli Lilly and Company

<120> CHẤT TƯƠNG TỰ INCRETIN VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA CHẤT NÀY

<130> X21791

<150> 62/608,644

<151> 2017-12-21

<160> 12

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 29

<212> PRT

<213> Loài người

<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> Loài người

<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> Loài người

<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> Loài người

<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> 39
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<220>
<221> DẤU HIỆU MISC
<222> (2)..(2)
<223> Xaa ở vị trí 2 là Aib

<220>
<221> DẤU HIỆU MISC
<222> (3)..(3)
<223> Xaa ở vị trí 3 là Gln hoặc His

<220>
<221> DẤU HIỆU MISC
<222> (6)..(6)
<223> Xaa ở vị trí 6 là alpha-metyl-phenylalanin hoặc
alpha-metyl-2-flophenylalanin

<220>
<221> DẤU HIỆU MISC
<222> (13)..(13)

<223> Xaa ở vị trí 13 là alpha-metyl-Leu hoặc Leu

<220>

<221> MOD_RES

<222> (17)..(17)

<223> Xaa ở vị trí 17 là axit amin có nhóm chức
có sẵn để liên hợp trong đó nhóm chức
được liên hợp với axit béo C16-C22

<220>

<221> DẤU HIỆU MISC

<222> (20)..(20)

<223> Xaa ở vị trí 2 là Aib, Gln, hoặc His

<400> 5

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

Xaa	Ala	Gln	Xaa	Ala	Phe	Ile	Glu	Tyr	Leu	Leu	Glu	Gly	Gly	Pro	Ser
			20					25					30		

Ser	Gly	Ala	Pro	Pro	Pro	Ser
						35

<210> 6

<211> 39

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<220>

<221> DẤU HIỆU MISC

<222> (2)..(2)

<223> Xaa ở vị trí 2 là axit alpha-amino-isobutyric

<220>

<221> DẤU HIỆU MISC

<222> (6)..(6)

<223> Xaa ở vị trí 6 là alpha-metyl-phenylalanin

<220>

<221> MOD_RES

<222> (17)..(17)

<223> Lys ở vị trí 17 được cải biến hóa học bằng cách liên hợp nhóm epsilon-amino của mạch bên Lys với

(2-[2-(2-Amino-etoxy)-etoxy]-axetyl)2-(gamma-Glu)-CO-(CH₂)₁₈-

CO

2H

<220>

<221> DẤU HIỆU MISC

<222> (20)..(20)

<223> Xaa ở vị trí 20 là axit alpha-amino-isobutyric

<220>

<221> MOD_RES

<222> (39)..(39)

<223> Ser ở vị trí 39 được amit hóa tùy ý

<400> 6

Tyr Xaa Gln Gly Thr Xaa Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Leu Leu Asp Lys

1

5

10

15

Lys Ala Gln Xaa Ala Phe Ile Glu Tyr Leu Leu Glu Gly 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 MISC

<222> (2)..(2)

<223> Xaa ở vị trí 2 là axit alpha-amino-isobutyric

<220>

<221> DẤU HIỆU MISC

<222> (6)..(6)

<223> Xaa ở vị trí 6 là alpha-methyl-phenylalanin

<220>

<221> DẤU HIỆU MISC

<222> (13)..(13)

<223> Xaa ở vị trí 13 là alpha-methyl-Leu

<220>

<221> MOD_RES

<222> (17)..(17)

<223> Lys ở vị trí 17 được cải biến hóa học bằng cách liên hợp nhóm epsilon-amino của mạch bên Lys với

(2-[2-(2-Amino-etoxy)-ethoxy]-axetyl)2-(gamma-Glu)-CO-

(CH₂)₁₈-HC

O2H

<220>

<221> DẤU HIỆU MISC

<222> (20)..(20)

<223> Xaa ở vị trí 2 là axit alpha-amino-isobutyric

<220>

<221> MOD_RES

<222> (39)..(39)

<223> Ser ở vị trí 39 được amit hóa tùy ý

<400> 7

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

Lys	Ala	Gln	Xaa	Ala	Phe	Ile	Glu	Tyr	Leu	Leu	Glu	Gly	Gly	Pro	Ser
			20				25						30		

Ser	Gly	Ala	Pro	Pro	Pro	Ser
			35			

<210> 8

<211> 39

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<220>

<221> DẤU HIỆU MISC

<222> (2)..(2)

<223> Xaa ở vị trí 2 là axit alpha-amino-isobutyric

<220>

<221> DẤU HIỆU MISC

<222> (6)..(6)

<223> Xaa ở vị trí 6 là alpha-metyl-2-flophenylalanin

<220>

<221> MOD_RES

<222> (17)..(17)

<223> Lys ở vị trí 17 được cải biến hóa học bằng cách liên hợp nhóm epsilon-amino của mạch bên Lys với
(2-[2-(2-Amino-etoxy)-ethoxy]-axetyl)2-(gamma-Glu)-CO-(CH₂)₁₈-CO
2H

<220>

<221> DẤU HIỆU MISC

<222> (20)..(20)

<223> Xaa ở vị trí 20 là axit alpha-amino-isobutyric

<220>

<221> MOD_RES

<222> (39)..(39)

<223> Ser ở vị trí 39 được amit hóa tùy ý

<400> 8

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

Lys	Ala	Gln	Xaa	Ala	Phe	Ile	Glu	Tyr	Leu	Leu	Glu	Gly	Gly	Pro	Ser
				20				25					30		

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser

35

<210> 9

<211> 39

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<220>

<221> DẤU HIỆU MISC

<222> (2)..(2)

<223> Xaa ở vị trí 2 là axit alpha-amino-isobutyric

<220>

<221> DẤU HIỆU MISC

<222> (6)..(6)

<223> Xaa ở vị trí 6 là alpha-metyl-2-flophenylalanin

<220>

<221> MOD_RES

<222> (17)..(17)

<223> Lys ở vị trí 17 được cải biến hóa học bằng cách liên hợp nhóm epsilon-amino của mạch bên Lys với

(2-[2-(2-Amino-etoxy)-ethoxy]-axetyl)-(gamma-Glu)-CO-(CH₂)₁₈-CO₂

H

<220>

<221> DẤU HIỆU MISC

<222> (20)..(20)

<223> Xaa ở vị trí 20 là axit alpha-amino-isobutyric

<220>

<221> MOD_RES

<222> (39)..(39)

<223> Ser ở vị trí 39 được amit hóa tùy ý

<400> 9

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

Lys Ala Gln Xaa Ala Phe Ile Glu Tyr Leu Leu Glu Gly Gly Pro Ser
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
35

<210> 10

<211> 39

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<220>

<221> DẤU HIỆU MISC

<222> (2)..(2)

<223> Xaa ở vị trí 2 là axit alpha-amino-isobutyric

<220>

<221> DẤU HIỆU MISC

<222> (6)..(6)

<223> Xaa ở vị trí 6 là alpha-methyl-2-phenylalanine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (17)..(17)

<223> Lys ở vị trí 17 được cải biến hóa học bằng cách liên hợp nhóm epsilon-amino của mạch bên Lys với
(2-[2-(2-Amino-etoxy)-ethoxy]-axetyl)-(gamma-Glu)-CO-(CH₂)₁₈-CO₂

H

<220>

<221> MOD_RES

<222> (39)..(39)

<223> Ser ở vị trí 39 được amit hóa tùy ý

<400> 10

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

Lys	Ala	Gln	Gln	Ala	Phe	Ile	Glu	Tyr	Leu	Leu	Glu	Gly	Gly	Pro	Ser
				20				25						30	

Ser	Gly	Ala	Pro	Pro	Pro	Ser
						35

<210> 11

<211> 39

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<220>

<221> DẤU HIỆU MISC

<222> (2)..(2)

<223> Xaa ở vị trí 2 là axit alpha-amino-isobutyric

<220>

<221> DẤU HIỆU MISC

<222> (6)..(6)

<223> Xaa ở vị trí 6 là alpha-metyl-2-flophenylalanin

<220>

<221> MOD_RES

<222> (17)..(17)

<223> Lys ở vị trí 17 được cải biến hóa học bằng cách liên hợp nhóm epsilon-amino của mạch bên Lys với

(2-[2-(2-Amino-etoxy)-ethoxy]-axetyl)-(gamma-Glu)-CO-(CH₂)₁₈-

CO₂

H

<220>

<221> MOD_RES

<222> (39)..(39)

<223> Ser ở vị trí 39 được amit hóa tùy ý

<400> 11

Tyr Xaa Gln Gly Thr Xaa Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Leu Leu Asp Lys

1

5

10

15

Lys Ala Gln His Ala Phe Ile Glu Tyr Leu Leu Glu Gly Gly Pro Ser

20

25

30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser

35

<210> 12

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 12

Gly Pro Ser Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser

1

5

10