



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

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ



1-0048355

(51)^{2020.01} C07K 14/575; A61K 38/17; A61K 47/54 (13) B

(21) 1-2021-02978 (22) 28/10/2019
(86) PCT/US2019/058259 28/10/2019 (87) WO 2020/092191 07/05/2020
(30) 62/754,244 01/11/2018 US; 62/793,544 17/01/2019 US
(45) 25/07/2025 448 (43) 25/08/2021 401A
(73) ELI LILLY AND COMPANY (US)
Lilly Corporate Center, Indianapolis, Indiana 46285, United States of America
(72) BRIERE, Daniel Anthony (US); LOPES, Daniel Christopher (US); MUPPIDI,
Avinash (IN).
(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) CHẤT TƯƠNG TỰ PEPTIT TYROSIN-TYROSIN VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA
CHẤT NÀY

(21) 1-2021-02978

(57) Sáng chế đề cập đến chất tương tự Peptit Tyrosin-Tyrosin (PYY) bao gồm các cải biến làm tăng thời gian bán thải khi so sánh với PYY nguyên thể của người, cũng như các cải biến bổ sung làm tăng hiệu lực và tính chọn lọc đối với thụ thể NPY2. Sáng chế cũng đề cập đến dược phẩm bao gồm một hoặc nhiều chất tương tự PYY được mô tả ở đây trong chất mang dược dụng. Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp điều chế chất tương tự PYY. Chất tương tự PYY này hữu ích để điều trị bệnh béo phì và các bệnh và rối loạn liên quan đến bệnh béo phì như bệnh tiểu đường typ II.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập chung đến lĩnh vực sinh học và y học, và cụ thể hơn là đề cập đến các chất tương tự Peptit Tyrosin-Tyrosin (PYY) có thể gắn kết thụ thể peptit thần kinh Y (NPY) như thụ thể NPY2, cũng như được phẩm chứa chúng và sử dụng chúng trong điều trị bệnh béo phì và các bệnh và rối loạn liên quan đến bệnh béo phì như bệnh tiểu đường typ II (T2DM).

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

PYY là một thành viên thuộc họ polypeptit (PP) tuyến tụy và có liên quan đến việc điều chỉnh mức hấp thụ thức ăn và mức tiêu thụ năng lượng sau bữa ăn (xem, Tatemoto (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79:2514-2518). PYY được tiết ra bởi các tế bào L của đường tiêu hóa và có hai dạng nội sinh chính là – PYY₁₋₃₆ (SEQ ID NO:1) và PYY₃₋₃₆ (SEQ ID NO:2). PYY₁₋₃₆ chiếm ưu thế hơn PYY₃₋₃₆ trong khi nhin ăn, trong khi đó PYY₃₋₃₆ chiếm ưu thế hơn PYY₁₋₃₆ sau khi ăn. Dipeptidyl peptidaza-IV (DPP-IV) thủy phân PYY₁₋₃₆ ở Pro²-Ile³ gắn kết để sản xuất PYY₃₋₃₆, mà chọn lọc hơn đối với thụ thể NPY2 so với PYY₁₋₃₆.

Nồng độ PYY₃₋₃₆ trong huyết tương thường tăng trong vòng 15 phút sau khi ăn, đạt đỉnh trong vòng 60-90 phút và vẫn tăng trong tối đa 6 giờ trước khi trở lại mức ban đầu (xem, Adrian *et al.* (1985) *Gastroenterology* 89:1070-1077; và De Silva & Bloom (2012) *Gut Liver* 6:10-20). Theo cách này, tin rằng PYY₃₋₃₆ tác động đến sự thèm ăn thông qua tác dụng trung tâm trực tiếp của nó và cũng thông qua tác động lên nhu động ruột của nó (tức là tác dụng gây chán ăn của nó). Ngoài ra, tin rằng PYY₃₋₃₆ làm trung gian cho tính nhạy insulin, do đó giúp giảm glucoza huyết (tức là hiệu quả nhạy cảm của nó).

PYY₃₋₃₆ đã được nghiên cứu làm tác nhân điều trị tiềm năng để điều chỉnh thể trọng xét về tác dụng gây chán ăn của nó, đặc biệt là để điều trị bệnh béo phì và các bệnh và rối loạn liên quan, bao gồm bệnh tiểu đường typ 2 và bệnh tim mạch (xem, ví dụ, Công bố đơn quốc tế số 2002/47712; và Schwartz & Morton (2002) *Nature* 418:595-597).

Không may là, PYY₃₋₃₆ được dùng ngoại sinh có thời gian bán thải ngắn (ví dụ, khoảng 10-15 phút) do proteaza và các cơ chế thanh thải khác (xem, Lluís *et al.* (1989) *Rev. Esp. Fisiol.* 45:377-384; và Torang *et al.* (2016) *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 310:R866-R874), điều này đưa ra những thách thức khi sử dụng nó làm tác nhân điều trị. Với thời gian bán thải ngắn như vậy, PYY₃₋₃₆ nên được sử dụng ít nhất một lần mỗi ngày để phát huy tác dụng điều trị, điều này gây bất tiện cho cá thể cần điều trị. Do đó, các nỗ lực đã được thực hiện để tăng thời gian bán thải của PYY₃₋₃₆ và/hoặc để tăng tính chọn lọc thụ thể NPY2 của nó. Ví dụ, Rubinstein *et al.* mô tả các chất tương tự PYY có nhóm 9-fluorenylmethoxy-carbonyl (Fmoc) hoặc 2-sulfo-9-fluorenylmethoxycarbonyl (FMS) để tăng thời gian bán thải (xem, Công bố đơn quốc tế số WO 2004/089279). Hơn nữa, DeCarr *et al.* mô tả các chất tương tự PYY có các gốc PEG đã được liên kết đầu tận cùng với amino để tăng thời gian bán thải (xem, DeCarr *et al.* (2007) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 17:1916-1919; Xem thêm, Ortiz *et al.* (2007) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 323:692-700). Hơn nữa, Kofoed *et al.* mô tả các chất tương tự PYY có chuỗi bên gắn kết với albumin, ít nhất một gốc đã được cải biến gần vị trí phân cắt của PYY (ví dụ, chất tương tự axit amin N-metyl của gốc axit amin quan tâm), N-glyxin và/hoặc chất bắt chức arginin để tăng thời gian bán thải (xem, Công bố đơn quốc tế số WO 2011/033068).

Mặc dù sự hiểu biết về vai trò của PYY₃₋₃₆ trong quá trình trao đổi chất đã tăng lên đáng kể, vẫn cần các chất tương tự PYY bổ sung, đặc biệt là các chất tương tự PYY có hiệu lực và tính chọn lọc được cải thiện tại thụ thể NPY2.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Như đã lưu ý trên đây, cần các chất tương tự PYY bổ sung để sử dụng trong điều trị. Để giải quyết nhu cầu này, trước tiên, sáng chế mô tả các chất tương tự PYY bao gồm trình tự axit amin cơ bản (liên quan đến việc đánh số PYY₁₋₃₆ nguyên thể của người (SEQ ID NO:1)):

³PKPEX₇PX₉X₁₀DASPEEX₁₇X₁₈RYXX₂₂X₂₃LRHYLN₃₀LTRQRY³⁶ (Công thức I), trong đó X₇ là axit amin bất kỳ với nhóm chức sẵn có để liên hợp và nhóm chức được liên hợp với axit béo C₁₆-C₂₂, X₉ là E hoặc G, X₁₀ là E hoặc K, X₁₇ là L hoặc W, X₁₈ là N hoặc Q, X₂₂ là A hoặc I, X₂₃ là E, D hoặc S, và X₃₀ là E hoặc W (SEQ ID NO:3), và trong đó axit amin đầu tận cùng carboxy (đầu tận cùng C) tùy ý được amit hóa.

Trong các trường hợp nhất định, axit amin với nhóm chức sẵn có để liên hợp ở vị trí X₇ có thể là C, D, E, K hoặc Q. Trong các trường hợp đặc biệt, axit amin với nhóm chức sẵn có để liên hợp ở vị trí X₇ là K, và trình tự axit amin có thể là một trong các trình tự sau:

³PKPEKPGEDASPEEWQRYYAELRHLYLNWLTRQRY³⁶ (SEQ ID NO:4),

³PKPEKPGEDASPEEWQRYYAELRHLYNELTRQRY³⁶ (SEQ ID NO:5),

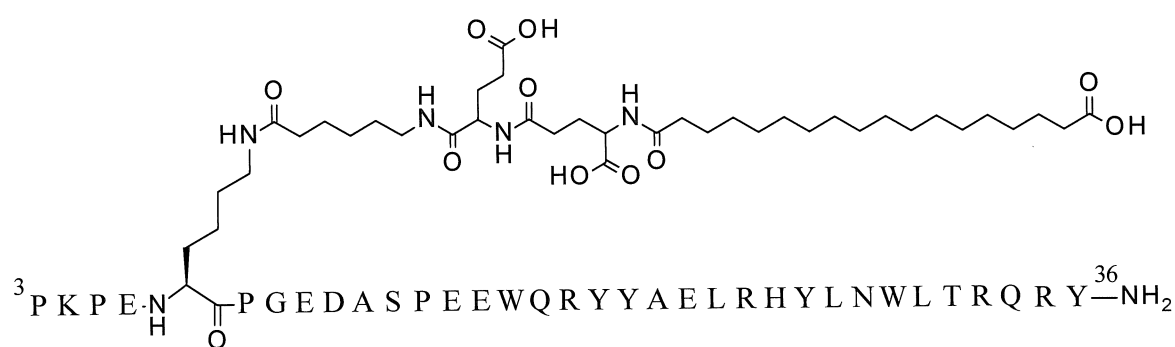
³PKPEKPEEDASPEEWQRYYIELRHLYLNWLTRQRY³⁶ (SEQ ID NO:6),

³PKPEKPGKDASPEEWNRYYADLRHLYLNWLTRQRY³⁶ (SEQ ID NO:7), hoặc

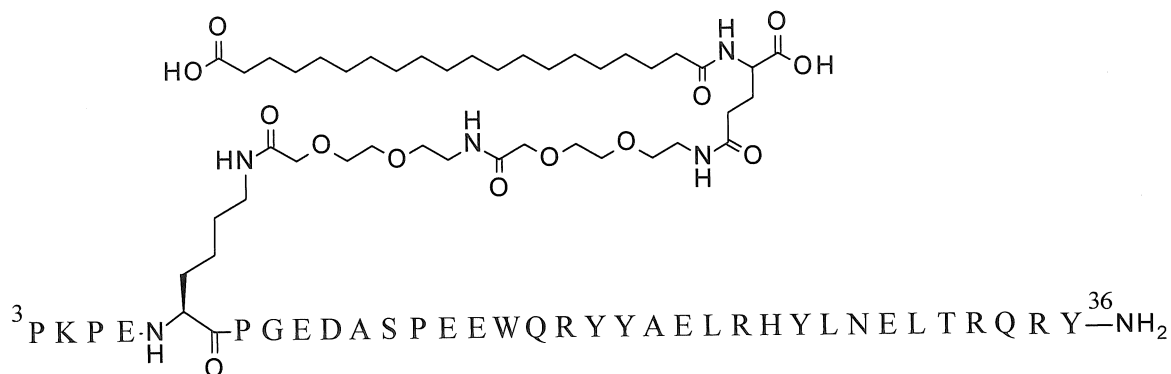
³PKPEKPGEDASPEELQRYYASLRHLYLNWLTRQRY³⁶ (SEQ ID NO:8).

Trong một số trường hợp, axit béo C₁₆-C₂₂ được liên hợp với axit amin với nhóm chức sẵn có để liên hợp thông qua cầu nối. Trong các trường hợp nhất định, axit béo C₁₆-C₂₂ có cấu trúc là -CO-(CH₂)_a-CO₂H, trong đó a là số nguyên nằm trong khoảng từ 16 đến 22. Trong các trường hợp đặc biệt, axit béo là diacid có 18 nguyên tử cacbon hoặc diacid có 20 nguyên tử cacbon như axit palmitic, axit stearic, axit arachidic hoặc axit eicosanoic, đặc biệt là diacid có 18 nguyên tử cacbon hoặc diacid có 20 nguyên tử cacbon bão hòa. Tương tự và trong một số trường hợp, cầu nối có thể là một hoặc nhiều đơn vị của axit [2-(2-amino-etoxy)-etoxy]-axetic (AEEA), axit aminohexanoic (Ahx), axit glutamic (E), axit γ-glutamic (γE) hoặc tổ hợp của chúng.

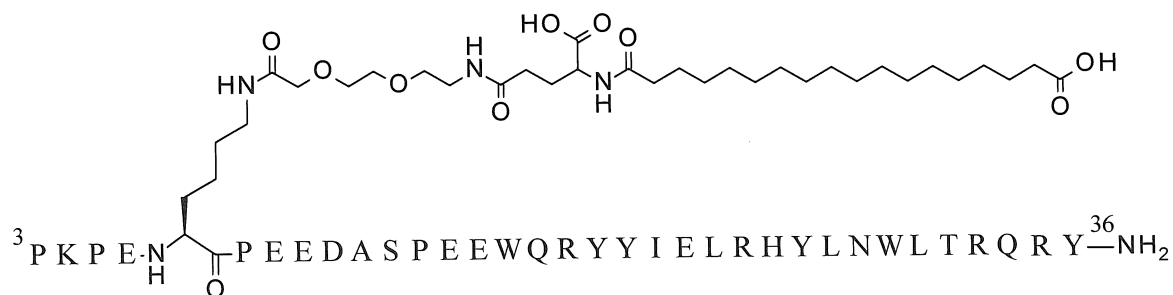
Trong các trường hợp đặc biệt, chất tương tự PYY có thể là một trong các chất sau:



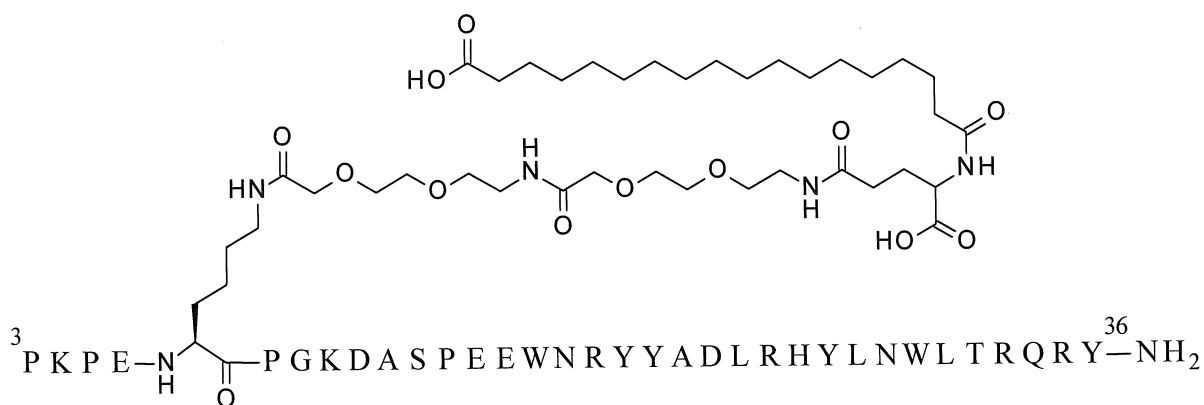
(SEQ ID NO:9),



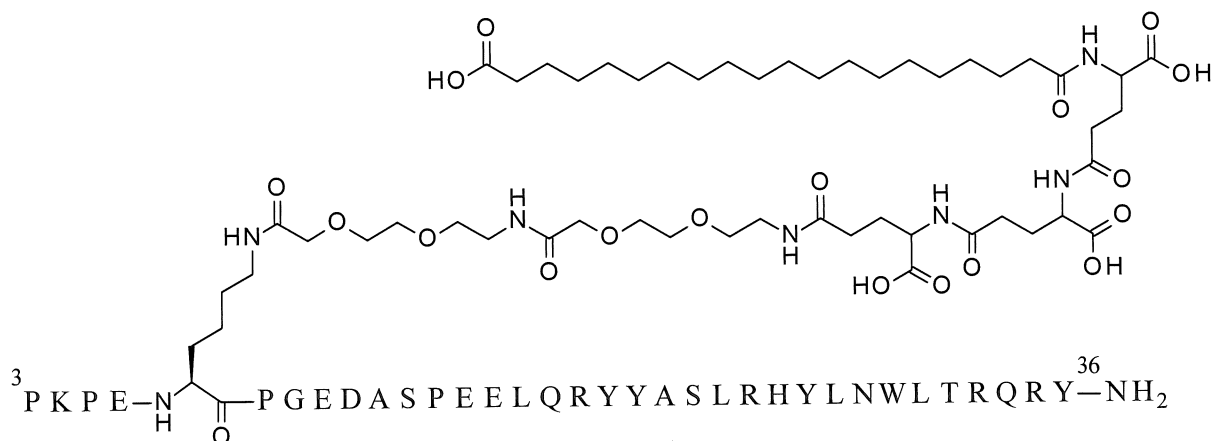
(SEQ ID NO:10),



(SEQ ID NO:11),



(SEQ ID NO:12), hoặc



(SEQ ID NO:13).

Trong một số trường hợp, cấu trúc cơ bản của chất tương tự PYY theo sáng chế còn có thể bao gồm hai axit amin đầu tận cùng amino (đầu tận cùng N) của PYY₁₋₃₆ nguyên thể của người (SEQ ID NO:1), mà sau đó có thể được xử lý *in vivo* thành chất tương tự PYY₃₋₃₆ (tức là, gốc “YP” đầu tận cùng N có trình tự nêu trong SEQ ID NO:1 có thể được phân tách *in vivo* từ chất bất kỳ trong số các chất tương tự PYY).

Trong một số trường hợp, chất tương tự PYY có điện tích lớn hơn -2, đặc biệt là -3 hoặc -4.

Trong một số trường hợp, chất tương tự PYY có ái lực gắn kết ở thụ thể NPY2 của người lớn hơn ái lực gắn kết của PYY₃₋₃₆ của người (SEQ ID NO:2), như từ lớn hơn khoảng 2 lần đến lớn hơn khoảng 10 lần, đặc biệt là lớn hơn khoảng 2 lần đến lớn hơn khoảng 3 lần.

Trong một số trường hợp, chất tương tự PYY có thời gian bán thải dài hơn thời gian bán thải của PYY₃₋₃₆ của người (SEQ ID NO:2), như dài hơn từ khoảng 5 giờ đến khoảng 24 giờ, đặc biệt là dài hơn khoảng 12 giờ.

Thứ hai là, dược phẩm được mô tả chứa ít nhất một chất tương tự PYY theo sáng chế hoặc muối dược dụng của nó (ví dụ, muối trifloaxetat, muối axetat hoặc muối hydroclorua) và chất mang dược dụng. Trong một số trường hợp, dược phẩm còn có thể chứa chất mang, chất pha loãng và/hoặc tá dược.

Hơn nữa, dược phẩm có thể chứa tác nhân điều trị bổ sung như, ví dụ, thuốc trị tiểu đường hoặc giảm cân khác, đặc biệt là incretin. Trong một số trường hợp, incretin có thể là glucagon (GCG) hoặc chất tương tự GCG. Trong các trường hợp khác, incretin có thể là peptit-1 giống glucagon (GLP-1), GLP-1 (7-36)_{amit} hoặc chất tương tự GLP-1. Trong các trường hợp khác, incretin có thể là peptit ức chế dạ dày (GIP) hoặc chất tương tự GIP. Trong các trường hợp khác, incretin có thể là chất chủ vận thụ thể kép như oxyntomodulin (OXM) hoặc chất tương tự OXM, GLP-1/GCG hoặc GIP/GLP-1. Trong các trường hợp khác, incretin có thể là chất tương tự incretin có hoạt tính ba thụ thể (tức là các chất tương tự incretin có hoạt tính ở từng thụ thể GIP, GLP-1 và GCG). Trong các trường hợp khác, tác nhân điều trị bổ sung có thể là chất ức chế DPP-IV.

Thứ ba là, phương pháp được mô tả để sử dụng chất tương tự PYY theo sáng chế, đặc biệt là để sử dụng chất tương tự PYY trong điều trị bệnh béo phì và các bệnh và rối loạn liên quan đến bệnh béo phì như T2DM. Phương pháp này bao gồm ít nhất

bước cho cá thể cần điều trị dùng lượng hữu hiệu của chất tương tự PYY như được mô tả ở đây hoặc muối được dụng của chúng.

Trong một số trường hợp, chất tương tự PYY có thể được dùng dưới da (SQ) cho cá thể. Tương tự, và trong một số trường hợp, chất tương tự PYY có thể được dùng hàng ngày, cách ngày, ba lần một tuần, hai lần một tuần, một lần một tuần (tức là, hàng tuần), hai tuần một lần (tức là, cách tuần) hoặc hàng tháng. Trong các trường hợp nhất định, chất tương tự PYY có thể được dùng dưới da cách ngày, dưới da ba lần một tuần, dưới da hai lần một tuần, dưới da một lần một tuần, dưới da cách tuần hoặc dưới da mỗi tháng một lần. Trong các trường hợp đặc biệt, chất tương tự PYY được dùng dưới da một lần một tuần (QW).

Theo cách khác, chất tương tự PYY có thể được dùng qua đường miệng cho cá thể. Như nêu trên, chất tương tự PYY có thể được dùng hàng ngày, cách ngày, ba lần một tuần, hai lần một tuần, một lần một tuần (tức là, hàng tuần), hai tuần một lần (tức là, cách tuần) hoặc hàng tháng. Trong các trường hợp nhất định, chất tương tự PYY có thể được dùng qua đường miệng cách ngày hoặc kết hợp ba lần một tuần, hoặc kết hợp hai lần một tuần, hoặc kết hợp một lần một tuần, hoặc kết hợp mỗi tuần, hoặc qua đường miệng mỗi tháng một lần. Trong các trường hợp đặc biệt, chất tương tự PYY được dùng qua đường miệng một lần một tuần.

Phương pháp này cũng có thể bao gồm bước dùng ít nhất một chất tương tự PYY kết hợp với lượng hữu hiệu của tác nhân điều trị bổ sung như chất ức chế DPP-IV hoặc incretin (ví dụ, GCG hoặc chất tương tự GCG, GLP-1, GLP-1 (7-36)_{amit} hoặc chất tương tự GLP-1, GIP hoặc chất tương tự GIP, OXM hoặc chất tương tự OXM, GIP/GLP-1, GLP-1/GCG hoặc incretin có hoạt tính ba thụ thể). Chất ức chế DPP-IV hoặc incretin có thể được dùng đồng thời, tách biệt hoặc lần lượt với chất tương tự PYY.

Trong một số trường hợp, chất ức chế DPP-IV hoặc incretin có thể được dùng với tần suất giống như chất tương tự PYY (tức là, cách ngày, hai lần một tuần, hoặc thậm chí hàng tuần). Trong các trường hợp khác, chất ức chế DPP-IV hoặc incretin được dùng với tần suất khác biệt với chất tương tự PYY. Trong các trường hợp khác, chất ức chế DPP-IV hoặc incretin được dùng QW. Trong các trường hợp khác nữa, chất tương tự PYY được dùng dưới da, và chất ức chế DPP-IV hoặc incretin có thể được dùng qua đường miệng.

Trong một số trường hợp, cá thể bị béo phì hoặc thừa cân. Trong các trường hợp khác, cá thể là người mắc bệnh tiểu đường (PwD), đặc biệt là T2DM. Trong các trường hợp nhất định, cá thể béo phì mắc bệnh tiểu đường typ 2 hoặc cá thể thừa cân mắc bệnh tiểu đường typ 2.

Phương pháp cũng có thể bao gồm các bước như đo hoặc thu nhận thể trọng của cá thể và/hoặc glucoza huyết và/hoặc hemoglobin A1c (HbA1c) và so sánh các giá trị thu được như vậy với một hoặc nhiều giá trị cơ sở hoặc giá trị thu được trước đó để đánh giá hiệu quả của việc điều trị.

Phương pháp cũng có thể được kết hợp với chế độ ăn và tập thể dục và/hoặc có thể được kết hợp với tác nhân điều trị bổ sung ngoài các tác nhân được mô tả trên đây.

Thứ tư, việc sử dụng được mô tả đối với chất tương tự PYY theo sáng chế trong điều trị bệnh béo phì và các bệnh và rối loạn liên quan đến bệnh béo phì như T2DM, tùy ý có thể được dùng đồng thời, tách biệt hoặc lần lượt (tức là, kết hợp) với chất ức chế DPP-IV và/hoặc incretin như GCG hoặc chất tương tự GCG, GLP-1, GLP-1 (7-36)_{amit} hoặc chất tương tự GLP-1, GIP hoặc chất tương tự GIP, OXM hoặc chất tương tự OXM, GIP/GLP-1, GLP-1/GCG, hoặc thậm chí incretin có hoạt tính ba thụ thể.

Thứ năm, việc sử dụng được mô tả đối với chất tương tự PYY theo sáng chế trong sản xuất thuốc để điều trị bệnh béo phì và các bệnh và rối loạn liên quan đến bệnh béo phì như T2DM, trong đó thuốc này tùy ý có thể còn chứa chất ức chế DPP-IV và/hoặc incretin như GCG hoặc chất tương tự GCG, GLP-1, GLP-1 (7-36)_{amit} hoặc chất tương tự GLP-1, GIP hoặc chất tương tự GIP, OXM hoặc chất tương tự OXM, GIP/GLP-1, GLP-1/GCG, hoặc thậm chí incretin có hoạt tính ba thụ thể.

Một lợi thế của chất tương tự PYY theo sáng chế là chúng không chỉ có thể giúp giảm cân mà còn có thể làm giảm glucoza. Theo cách này, các cá thể, đặc biệt là các cá thể dễ bị hoặc mắc bệnh tiểu đường typ 2, có thể trì hoãn sự tiến triển thành insulin ngoại sinh và có thể duy trì mục tiêu HbA1c đích. Hơn nữa, chất tương tự PYY theo sáng chế có thể tăng cường kiểm soát glucoza huyết bằng cách cải thiện tính nhạy insulin. Kết hợp lại, GIP/GLP-1 và chất tương tự PYY có thể được sử dụng để kiểm soát cả glucoza (incretin + chất nhạy hóa insulin tiềm năng) và giảm cân (hiệp đồng). Đặc biệt, chất tương tự PYY theo sáng chế một mình có thể gây giảm đến khoảng 12% trọng lượng khi được dùng cho cá thể có nhu cầu và có thể làm giảm đến khoảng 25% trọng

lượng khi kết hợp với tác nhân điều trị bổ sung như incretin khi được dùng cho cá thể có nhu cầu này.

Một lợi thế khác của chất tương tự PYY theo sáng chế là chúng có thể có thời gian bán thải lên đến khoảng 24 giờ, nhờ đó cho phép dùng một lần hàng tuần.

Một lợi thế khác nữa của chất tương tự PYY theo sáng chế là chúng làm tăng tính ổn định và tương hợp hóa lý khi so sánh với PYY₃₋₃₆ nguyên thể của người (SEQ ID NO:2) và tăng khả năng tương hợp ở dạng bào chế với incretin khi so sánh với PYY₃₋₃₆ nguyên thể của người (SEQ ID NO:2).

Mô tả chi tiết sáng chế

Trừ khi có quy định khác, tất cả các thuật ngữ khoa học và kỹ thuật được sử dụng ở đây có cùng nghĩa như thường được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật mà sáng chế liên quan. Mặc dù phương pháp và vật liệu bất kỳ tương tự hoặc tương đương với các phương pháp được mô tả ở đây đều có thể được sử dụng trong thực hành hoặc thử nghiệm chất tương tự PYY, được phẩm và các phương pháp, nhưng các phương pháp và vật liệu được ưu tiên được mô tả ở đây.

Hơn nữa, việc tham chiếu đến một phần tử trong mạo từ không xác định tiếng Anh “a” hoặc “an” không loại trừ khả năng có nhiều hơn một phần tử, trừ khi ngữ cảnh yêu cầu rõ ràng rằng có một và chỉ một phần tử. Do đó, mạo từ không xác định “a” hoặc “an” thường có nghĩa là “ít nhất một.”

Định nghĩa

Như được sử dụng ở đây, "khoảng" có nghĩa là trong một khoảng có ý nghĩa thống kê của một giá trị hoặc các giá trị như, ví dụ, nồng độ, độ dài, khối lượng phân tử, pH, mức độ đồng nhất trình tự, khung thời gian, nhiệt độ, thể tích, v.v. được nêu. Giá trị hoặc khoảng như vậy có thể nằm trong một mức lớn thường trong khoảng 20%, thông thường hơn là trong khoảng 10%, và thậm chí còn thông thường hơn là trong khoảng 5% của một giá trị hoặc khoảng được nêu. Sự biến thiên cho phép được bao gồm bởi từ "khoảng" sẽ phụ thuộc vào hệ thống cụ thể đang được nghiên cứu và có thể được đánh giá dễ dàng bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Như được sử dụng ở đây, “axit amin” có nghĩa là phân tử, theo quan điểm hóa học, được đặc trưng bởi sự có mặt của một hoặc nhiều nhóm amin và một hoặc nhiều

nhóm axit carboxylic và có thể chứa các nhóm chức khác. Như đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, có một tập hợp gồm hai mươi axit amin được chỉ định là axit amin tiêu chuẩn và được sử dụng làm khối xây dựng cho hầu hết các peptit/protein được tạo ra bởi sinh vật bất kỳ.

Như được sử dụng ở đây, “axit amin với nhóm chức sẵn có để liên hợp” có nghĩa là axit amin tự nhiên hoặc không tự nhiên bất kỳ có nhóm chức có thể được liên hợp với axit béo bằng, ví dụ, cầu nối. Ví dụ về các nhóm chức như vậy bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, nhóm alkynyl, alkenyl, amino, azido, bromo, carboxyl, chloro, iodo và thiol. Ngoài ra, ví dụ về axit amin tự nhiên có các nhóm chức như vậy bao gồm C (thiol), D (carboxyl), E (carboxyl), K (amino) và Q (amit).

Như được sử dụng ở đây, “chất tương tự” có nghĩa là một hợp chất, như peptit hoặc polypeptit tổng hợp, hoạt hóa thụ thể đích và gây ra ít nhất một hiệu quả *in vivo* hoặc *in vitro* được gây ra bởi chất chủ vận nguyên thể đối với thụ thể đó.

Như được sử dụng ở đây, “hiệu quả gây biếng ăn” có nghĩa là khả năng chất tương tự PYY theo sáng chế trong việc làm giảm sự thèm ăn, dẫn đến mức tiêu thụ thức ăn ít hơn và cuối cùng dẫn đến sự giảm cân. Hiệu quả gây biếng ăn cũng có thể đề chỉ khả năng của chất tương tự PYY theo sáng chế trong việc làm tăng nhu động ruột.

Như được sử dụng ở đây, “axit béo C₁₆-C₂₂” có nghĩa là axit carboxylic có từ 16 đến 22 nguyên tử cacbon. Axit béo C₁₆-C₂₂ thích hợp để sử dụng ở đây có thể là monoaxit bão hòa hoặc diaxit bão hòa (“diaxit” có một nhóm carboxyl ở mỗi đầu).

Như được sử dụng ở đây, “AUC” có nghĩa là diện tích dưới đường cong (area under the curve).

Như được sử dụng ở đây, “lượng hữu hiệu” có nghĩa là lượng, nồng độ hoặc liều lượng của một hoặc nhiều chất tương tự PYY theo sáng chế, hoặc muối được dùng của chúng mà, khi dùng một liều duy nhất hoặc dùng nhiều liều cho cá thể cần điều trị bệnh này, tạo ra hiệu quả mong muốn ở cá thể như vậy trong điều kiện chẩn đoán hoặc điều trị (tức là, có thể tạo ra sự khác biệt có thể đo được về mặt lâm sàng về tình trạng của cá thể như, ví dụ, giảm glucoza huyết, giảm HbA1c, và/hoặc giảm thể trọng hoặc mỡ của cơ thể). Lượng hữu hiệu có thể dễ dàng được xác định bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã biết và bằng cách quan sát các kết quả thu được trong các trường hợp tương tự. Trong việc xác định lượng hữu hiệu đối với cá thể, một số yếu tố được xem xét, bao gồm, nhưng không chỉ

giới hạn ở, loài động vật có vú, kích thước, độ tuổi và sức khỏe chung của nó, bệnh hoặc rối loạn cụ thể liên quan, mức độ hoặc sự liên quan hoặc mức độ nghiêm trọng của bệnh hoặc rối loạn, đáp ứng của cá thể, chất tương tự PYY cụ thể được dùng, cách dùng, các đặc điểm sinh khả dụng của dược phẩm được dùng, phác đồ liều lượng đã chọn, việc sử dụng thuốc đồng thời, và các trường hợp liên quan khác.

Như được sử dụng ở đây, “nồng độ hiệu quả bán tối đa” hoặc “EC₅₀” có nghĩa là nồng độ của hợp chất dẫn đến làm hoạt hóa/kích thích 50% điểm cuối của thử nghiệm, như đường cong đáp ứng liều lượng (ví dụ, cAMP).

Như được sử dụng ở đây, “kết hợp với” có nghĩa là việc dùng ít nhất một chất tương tự PYY theo sáng chế đồng thời, lần lượt hoặc ở dạng bào chế kết hợp duy nhất với một hoặc nhiều tác nhân điều trị bổ sung.

Như được sử dụng ở đây, “chất tương tự incretin” nghĩa là peptit hoặc polypeptit có các điểm tương đồng về cấu trúc, nhưng có nhiều điểm khác biệt với mỗi trong số GIP, GLP-1, GCG và OXM, đặc biệt là GIP, GLP-1, GCG và OXM nguyên thể của người. Một số chất tương tự incretin cũng có ái lực và hoạt tính ở hai hoặc thậm chí mỗi trong số các thụ thể GIP, GLP-1 và GCG (tức là, hoạt tính chủ vận ở hai thụ thể như trong OXM, GIP/GLP-1 hoặc GLP-1/GCG, hoặc thậm chí hoạt tính chủ vận ở cả ba thụ thể).

Như được sử dụng ở đây, “cá thể có nhu cầu” có nghĩa là động vật có vú như người, với tình trạng bệnh, bệnh lý, rối loạn hoặc triệu chứng cần điều trị hoặc trị liệu, bao gồm, ví dụ, các loài được liệt kê ở đây. Đặc biệt, cá thể được ưu tiên được điều trị là người.

Như được sử dụng ở đây, “tác động lâu dài” có nghĩa là ái lực gắn kết và hoạt tính của chất tương tự PYY theo sáng chế tiếp tục trong một khoảng thời gian dài hơn so với PYY₁₋₃₆ nguyên thể của người (SEQ ID NO:1) và/hoặc PYY₃₋₃₆ nguyên thể của người (SEQ ID NO:2), cho phép dùng liều ít nhất là kèm thường xuyên như một lần mỗi ngày hoặc thậm chí ba lần một tuần, hai lần một tuần, một lần mỗi tuần hoặc hàng tháng. Profin tác động theo thời gian của chất tương tự PYY theo sáng chế có thể được đo bằng các phương pháp thử nghiệm dược động học đã biết như các phương pháp được mô tả trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế dưới đây.

Như được sử dụng ở đây, “axit amin không tiêu chuẩn” nghĩa là axit amin có thể xuất hiện tự nhiên trong tế bào nhưng không tham gia vào quá trình tổng hợp peptit.

Axit amin không tiêu chuẩn có thể là thành phần của một peptit và thường được tạo ra bằng cách cải biến các axit amin tiêu chuẩn trong peptit (tức là, thông qua sự cải biến sau dịch mã). Axit amin không tiêu chuẩn có thể bao gồm D-axit amin, có tính đối xứng tuyệt đối trái ngược với các axit amin tiêu chuẩn nêu trên.

Như được sử dụng ở đây, "béo phì" hoặc "sự béo phì" có nghĩa là tình trạng một cá nhân có chỉ số khối lượng cơ thể (BMI) $>30,0 \text{ kg/m}^2$. Nói chung, xem "Overweight & Obesity" của Trung tâm Kiểm soát và Phòng ngừa bệnh sẩn có tại cdc.gov/obesity/adult/defining.html; và "Definitions & Facts for Adult Overweight & Obesity" của Viện Sức khỏe Quốc gia tại iddk.nih.gov/health-information/weight-management/adult-overweight-obesity/definition-facts.

Như được sử dụng ở đây, "bệnh hoặc rối loạn liên quan đến béo phì" có nghĩa là bệnh hoặc rối loạn bất kỳ bị gây ra/trầm trọng thêm do béo phì bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, cơn đau thắt ngực, bệnh tim mạch, viêm túi mật, sỏi mật, suy tim sung huyết, rối loạn lipid huyết, bệnh gan nhiễm mỡ, biến chứng sinh sản, chứng không dung nạp glucoza, bệnh gút, bệnh cao huyết áp, chứng suy giáp, chứng tăng insulin huyết, chứng kháng insulin, bệnh viêm xương khớp, hội chứng buồng trứng đa nang (PCOS), biến chứng thai kỳ, rối loạn tâm lý, chứng ngưng thở khi ngủ và các vấn đề hô hấp khác, đột quỵ tiểu không kiểm soát do căng thẳng, bệnh tiểu đường typ 2, bệnh sỏi thận do axit uric (sỏi thận), và ung thư vú, ruột kết, nội mạc tử cung, thực quản, túi mật, thận, tuyến tiền liệt và trực tràng.

Như được sử dụng ở đây, "thừa cân" có nghĩa là tình trạng trong đó cá thể có chỉ số BMI nằm trong khoảng từ $25,0 \text{ kg/m}^2$ đến $<30 \text{ kg/m}^2$. Xem, *id*.

Như được sử dụng ở đây, "PYY" có nghĩa là peptit YY thu được hoặc có nguồn gốc từ loài bất kỳ, như động vật có vú, đặc biệt là người. PYY bao gồm cả PYY nguyên thể (tức là, có chiều dài đầy đủ) và biến thể của chúng (tức là, dạng bổ sung, dạng khuyết đoạn và/hoặc dạng thay thế PYY nguyên thể). PYY cụ thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, PYY₁₋₃₆ nguyên thể của người (SEQ ID NO:1) và PYY₃₋₃₆ nguyên thể của người (SEQ ID NO:2).

Như được sử dụng ở đây, "chất tương tự PYY" hoặc "các chất tương tự PYY" nghĩa là peptit hoặc polypeptit giống PYY mà tạo ra một hoặc nhiều hiệu quả của PYY nguyên thể ở một hoặc nhiều thụ thể NPY như thụ thể NPY₂. Trong một số trường hợp, chất tương tự PYY theo sáng chế có thể gắn kết với thụ thể NPY, đặc biệt là thụ thể

NPY2 của người, với ái lực cao hơn hoặc thấp hơn nhưng chứng minh được thời gian bán thải *in vivo* hoặc *in vitro* dài hơn khi so sánh với PYY nguyên thể, đặc biệt là PYY của người như PYY₁₋₃₆ nguyên thể của người (SEQ ID NO:1) và PYY₃₋₃₆ nguyên thể của người (SEQ ID NO:2). Theo cách này, chất tương tự PYY theo sáng chế là các hợp chất tổng hợp hoạt động như chất chủ vận thụ thể NPY2.

Như được sử dụng ở đây, “bão hòa” có nghĩa là axit béo không chứa liên kết đôi hoặc liên kết ba cacbon-cacbon.

Như được sử dụng ở đây, “hiệu quả nhạy hóa” có nghĩa là khả năng của chất tương tự PYY theo sáng chế để làm tăng hiệu quả của insulin và nhờ đó giúp làm giảm glucoza huyết.

Như được sử dụng ở đây, “điều trị” hoặc “để điều trị” có nghĩa là làm giảm bớt, hạn chế, đảo ngược, làm chậm hoặc ngừng sự tiến triển hoặc mức độ nghiêm trọng của tình trạng bệnh, bệnh, rối loạn hoặc triệu chứng hiện có.

Một số từ viết tắt nhất định được định nghĩa như sau: “ACR” để chỉ tỷ lệ albumin nước tiểu/creatinin nước tiểu; “amu” để chỉ đơn vị khối lượng nguyên tử; “tBoc” để chỉ tert-butoxycarbonyl; “cAMP” để chỉ adenosin monophosphat vòng; “DMF” để chỉ dimetylformamit; “DMSO” để chỉ dimetyl sulfoxit; “EIA/RIA” để chỉ thử nghiệm miễn dịch enzym/thử nghiệm miễn dịch phóng xạ; “hr” để chỉ giờ; “HTRF” để chỉ huỳnh quang phân giải thời gian đồng nhất (homogenous time-resolved fluorescent); “IV” để chỉ đường dùng tĩnh mạch; “kDa” để chỉ kilodalton; “LC-MS” để chỉ sắc ký lỏng-khối phổ; “MS” để chỉ khối phổ; “OtBu” để chỉ O-tert-butyl; “Pbf” để chỉ NG-2,2,4,6,7-pentametyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl; “RP-HPLC” để chỉ sắc ký lỏng hiệu năng cao pha đảo; “SQ” để chỉ dưới da; “SEM” để chỉ sai số chuẩn của giá trị trung bình; “TFA” để chỉ axit trifloaxetic; và “Trt” để chỉ Trityl.

Chất tương tự PYY

Chất tương tự PYY theo sáng chế có tính tương tự về cấu trúc, nhưng cũng có nhiều điểm khác biệt về cấu trúc, so với peptit PYY nguyên thể. Ví dụ, khi so sánh với PYY₁₋₃₆ nguyên thể của người (SEQ ID NO:1) và/hoặc PYY₃₋₃₆ nguyên thể của người (SEQ ID NO:2), chất tương tự PYY được mô tả ở đây bao gồm các cải biến ở một hoặc nhiều vị trí 3, 7, 9, 10, 17, 18, 22, 23, 30 và 31 liên quan đến việc đánh số của PYY₁₋₃₆ nguyên thể của người (SEQ ID NO:1). Trong các trường hợp nhất định, trình tự axit

amin được lấy làm ví dụ của chất tương tự PYY theo sáng chế bao gồm (các thay đổi cụ thể liên quan đến gốc tương ứng của PYY nguyên thể của người (SEQ ID NO:1) được in đậm):

³PKPEX₇PX₉X₁₀DASPEEX₁₇X₁₈RYYX₂₂X₂₃LRHYLN_{X30}LTRQRY³⁶ (SEQ ID NO:3),

³PKPEKPGEDASPEEWQRYYAELRHYLNWLTRQRY³⁶ (SEQ ID NO:4),

³PKPEKPGEDASPEEWQRYYAELRHYLNELTRQRY³⁶ (SEQ ID NO:5),

³PKPEKPEEDASPEEWQRYYIELRHYLNWLTRQRY³⁶ (SEQ ID NO:6),

³PKPEKPGKDASPEEWNRYYADLRHYLNWLTRQRY³⁶ (SEQ ID NO:7), và

³PKPEKPGEDASPEELQRYYASLRHYLNWLTRQRY³⁶ (SEQ ID NO:8).

Chất tương tự PYY theo sáng chế dẫn đến hoạt tính đủ ở thụ thể NPY2 của người nhưng hoạt tính không đủ ở các thụ thể NPY1, NPY4 và NPY5. Tương tự, chất tương tự PYY theo sáng chế có các thuộc tính có lợi liên quan đến khả năng phát triển của chúng khi dùng trong điều trị, bao gồm cải thiện độ hòa tan trong các dung dịch nước, cải thiện độ ổn định của dạng bào chế hóa học và vật lý, mở rộng profin được động học, và giảm thiểu tiềm năng sinh miễn dịch.

Trong một số trường hợp, chất tương tự PYY theo sáng chế được amit hóa ở axit amin đầu tận cùng C để tác động đến độ ổn định. Ngoài các thay đổi được mô tả ở đây, các chất tương tự có thể bao gồm một hoặc nhiều cải biến axit amin bổ sung, tuy nhiên, với điều kiện các chất tương tự duy trì khả năng gắn kết với và khả năng hoạt hóa thụ thể NPY2 của người.

Chất tương tự PYY theo sáng chế còn bao gồm axit béo được liên hợp, ví dụ, bằng cầu nối với axit amin tự nhiên hoặc không tự nhiên với nhóm chức sẵn có để liên hợp (tức là, “axyl hóa”). Trong một số trường hợp, axit amin với nhóm chức sẵn có để liên hợp có thể là C, D, E, K và Q. Trong các trường hợp đặc biệt, axit amin với nhóm chức sẵn có để liên hợp là K, trong đó sự liên hợp là với nhóm ε-amino của chuỗi bên K.

Ở đây, axyl hóa chất tương tự PYY là ở vị trí 7 khi so sánh với PYY₁₋₃₆ nguyên thể của người (SEQ ID NO:1). Theo cách này, axit béo có thể hoạt động như chất kết dính albumin để tạo ra các chất tương tự tác động lâu dài hơn.

Về axit béo, nó có thể được liên hợp hóa học với nhóm chức của axit amin sẵn có để liên hợp bằng liên kết trực tiếp hoặc bằng cầu nối. Độ dài và thành phần của axit

béo ảnh hưởng đến thời gian bán thải của chất tương tự PYY, hiệu lực *in vivo* của chất tương tự PYY, và độ hòa tan và độ ổn định của chất tương tự PYY. Sự liên hợp với monoaxit hoặc diaxit béo bão hòa C₁₆-C₂₂ nhờ đó dẫn đến chất tương tự PYY có thời gian bán thải mong muốn, hiệu lực *in vivo* mong muốn, và đặc tính độ hòa tan và độ ổn định mong muốn.

Axit béo C₁₆-C₂₂ bão hòa được lấy làm ví dụ để sử dụng ở đây bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, axit hexadecanoic (tức là, axit palmitic, monoaxit có 16 nguyên tử cacbon), axit hexadecanedioic (diaxit có 16 nguyên tử cacbon), axit heptadecanoic (tức là, axit margaric, monoaxit có 17 nguyên tử cacbon), axit heptadecanedioic (diaxit có 17 nguyên tử cacbon), axit stearic (monoaxit có 18 nguyên tử cacbon), axit octadecanedioic (diaxit có 18 nguyên tử cacbon), axit nonadexylic (tức là, axit nonadecanoic, monoaxit có 19 nguyên tử cacbon), axit nonadecanedioic (diaxit có 19 nguyên tử cacbon), axit eicosanoic (tức là, axit arachidonic, monoaxit có 20 nguyên tử cacbon), axit eicosanedioic (diaxit có 20 nguyên tử cacbon), axit heneicosanoic (tức là, axit heneicosylic, monoaxit có 21 nguyên tử cacbon), axit heneicosanedioic (diaxit có 21 nguyên tử cacbon), axit docosanoic (tức là, axit behenic, monoaxit có 22 nguyên tử cacbon), axit docosanedioic (diaxit có 22 nguyên tử cacbon), và các dẫn xuất mạch nhánh và được thể của chúng. Trong các trường hợp nhất định, axit béo C₁₆-C₂₂ có thể là monoaxit bão hòa có 18 nguyên tử cacbon, diaxit có 18 nguyên tử cacbon bão hòa, monoaxit bão hòa có 19 nguyên tử cacbon, diaxit bão hòa có 19 nguyên tử cacbon, monoaxit bão hòa có 20 nguyên tử cacbon, diaxit có 20 nguyên tử cacbon bão hòa, và các dẫn xuất mạch nhánh và được thể của chúng. Trong các trường hợp đặc biệt, axit béo C₁₆-C₂₂ có thể là axit palmitic hoặc axit hexadeconic, axit stearic hoặc axit octadeconic, hoặc axit arachidic hoặc axit eicosanoic.

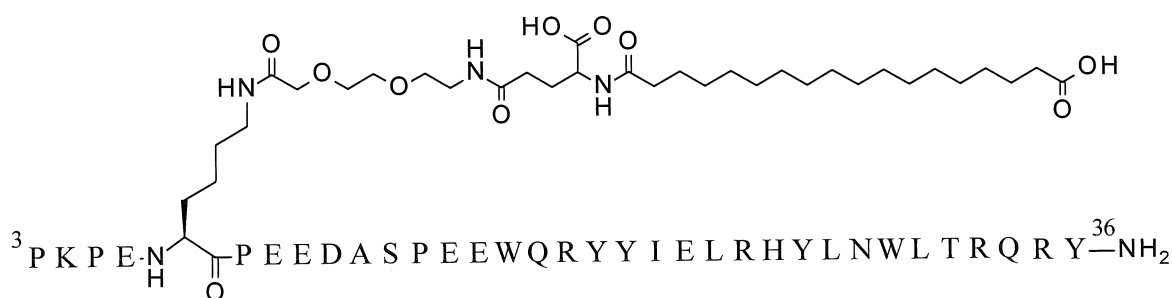
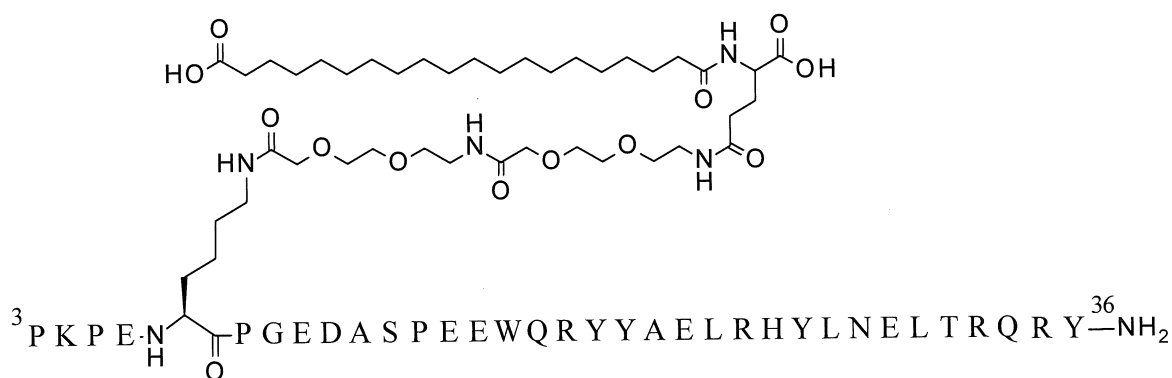
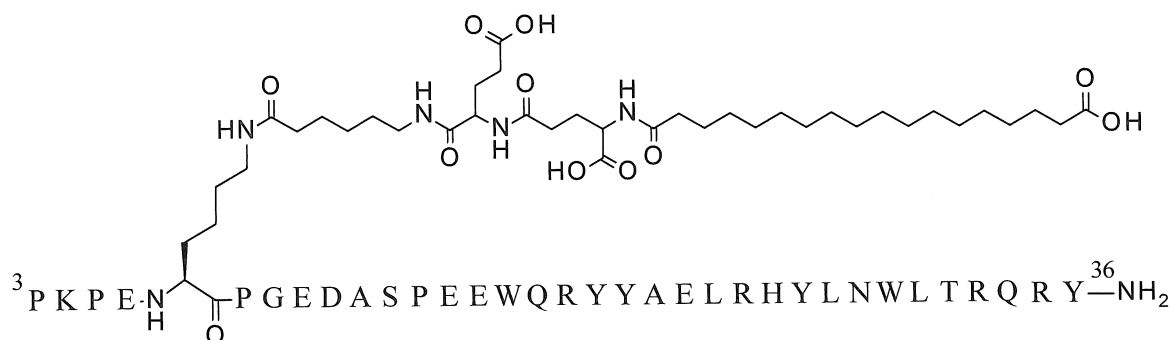
Để hỗ trợ liên hợp axit béo với axit amin tự nhiên hoặc không tự nhiên với nhóm chức sẵn có để liên hợp, chất tương tự PYY theo sáng chế có thể bao gồm cầu nối. Trong một số trường hợp, cầu nối có thể là ít nhất một trong số AEEA, Ahx, E hoặc γ E, cũng như tổ hợp của chúng.

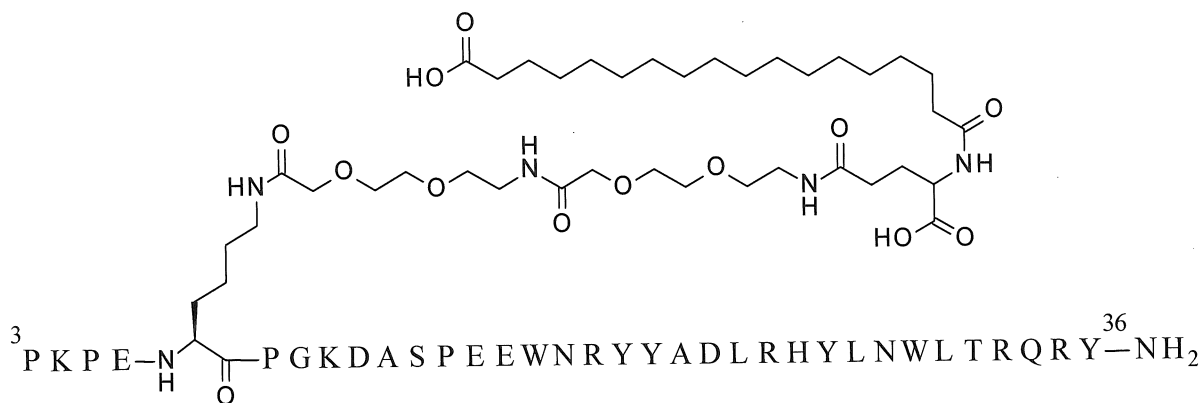
Khi cầu nối bao gồm axit amin, nó có thể có một đến bốn gốc axit amin E hoặc γ E. Trong một số trường hợp, cầu nối có thể bao gồm một hoặc hai gốc axit amin E và/hoặc γ E. Ví dụ, cầu nối có thể bao gồm một hoặc hai gốc axit amin E và/hoặc γ E. Trong các trường hợp khác, cầu nối có thể bao gồm một đến bốn gốc axit amin (như, ví

dự, axit amin E hoặc γ E) được sử dụng kết hợp với AEEA hoặc Ahx. Đặc biệt, cần nói có thể là tổ hợp của các gốc axit amin E và γ E với AEEA hoặc Ahx. Trong các trường hợp khác nữa, cần nói có thể là tổ hợp của một hoặc hai gốc axit amin γ E và một hoặc hai AEEA hoặc Ahx. Trong các trường hợp đặc biệt, cần nói có thể là gốc $(AEEA)_2 \cdot \gamma E$, gốc $Ahx \cdot E \cdot \gamma E$, hoặc gốc $AEEA \cdot \gamma E$.

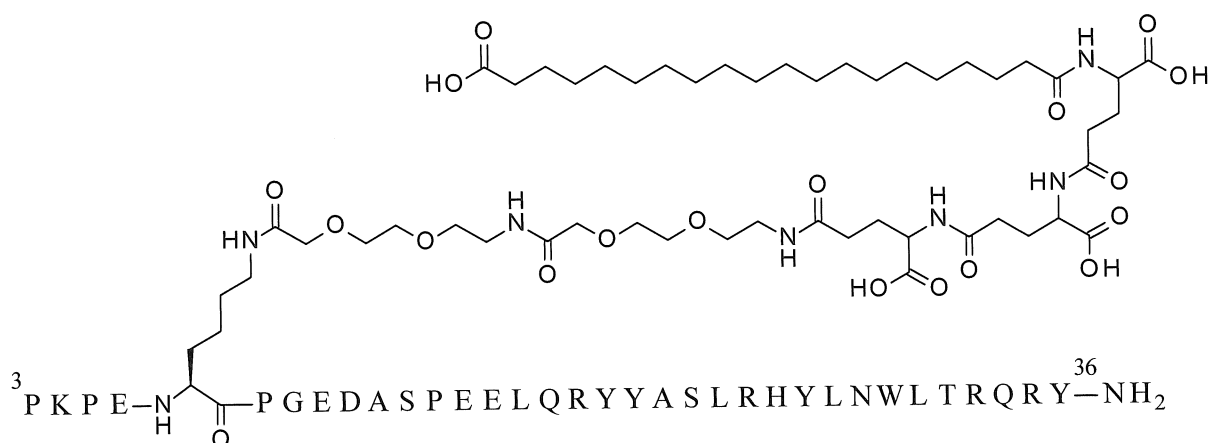
Gốc cầu nối-axit béo được lấy làm ví dụ có thể bao gồm $(AEEA)_2 \cdot \gamma E \cdot \text{di axit}$ có 20 nguyên tử cacbon, $Ahx \cdot E \cdot \gamma E \cdot \text{di axit}$ có 18 nguyên tử cacbon, hoặc $AEEA \cdot \gamma E \cdot \text{di axit}$ có 18 nguyên tử cacbon. Các đặc điểm cấu trúc của các gốc cầu nối-axit béo này dẫn đến các chất tương tự có thời gian bán thải cải thiện khi so sánh với PYY₁₋₃₆ nguyên thể của người (SEQ ID NO:1) hoặc PYY₃₋₃₆ nguyên thể của người (SEQ ID NO:2).

Tổng hợp lại, chất tương tự PYY được lấy làm ví dụ là:





(SEQ ID NO:12), hoặc



(SEQ ID NO:13).

Mặc dù chất tương tự PYY được mô tả là có ba mươi tư axit amin giống như của PYY₃₋₃₆ nguyên thể của người (SEQ ID NO:2), nhưng dự tính rằng chất tương tự PYY theo sáng chế có thể có trình tự axit amin dựa trên PYY₁₋₃₆ nguyên thể của người (SEQ ID NO:1). Tức là, chất tương tự PYY có thể bao gồm hai axit amin đầu tận cùng N (tức là, các gốc “YP” của các vị trí 1 và 2 của SEQ ID NO:1) của PYY₁₋₃₆ nguyên thể của người (SEQ ID NO:1), mà sau đó có thể được phân cắt *in vivo* khi được dùng cho cá thể như sẽ xảy ra khi PYY₁₋₃₆ nguyên thể của người (SEQ ID NO:1) được giải phóng nội sinh.

Thời gian bán thải của chất tương tự PYY theo sáng chế có thể được đo bằng các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này bao gồm, ví dụ, các kỹ thuật mô tả trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế dưới đây. Tương tự, ái lực của chất tương tự PYY theo sáng chế đối với mỗi thụ thể NPY khác nhau của người (ví dụ, NPY2R, NPY5R) có thể được đo bằng cách sử dụng kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này để đo mức gắn kết thụ thể bao gồm, ví dụ, các mức gắn kết mô tả trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế dưới đây, và thường được biểu thị dưới dạng giá trị hằng số ức chế (K_i). Hơn nữa, hoạt

tính của chất tương tự PYY theo sáng chế tại mỗi thụ thể cũng có thể được đo bằng cách sử dụng kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, bao gồm, ví dụ, thử nghiệm hoạt tính *in vitro* mô tả dưới đây, và thường được biểu thị bằng giá trị EC₅₀.

Do các cải biến được mô tả trên đây, chất tương tự PYY theo sáng chế có thời gian bán thải dài hơn so với thời gian bán thải của PYY₃₋₃₆ nguyên thể của người (SEQ ID NO:2). Ví dụ, chất tương tự PYY có thể có thời gian bán thải từ khoảng 5 giờ đến khoảng 24 giờ, từ khoảng 6 giờ đến khoảng 23 giờ, từ khoảng 7 giờ đến khoảng 22 giờ, từ khoảng 8 giờ đến khoảng 21 giờ, từ khoảng 9 giờ đến khoảng 20 giờ, từ khoảng 10 giờ đến khoảng 19 giờ, từ khoảng 11 giờ đến khoảng 18 giờ, từ khoảng 12 giờ đến khoảng 17 giờ, từ khoảng 13 giờ đến khoảng 16 giờ, hoặc thậm chí từ khoảng 14 giờ đến khoảng 15 giờ. Theo cách khác, chất tương tự PYY ở đây có thể có thời gian bán thải là khoảng 5 giờ, khoảng 6 giờ, khoảng 7 giờ, khoảng 8 giờ, khoảng 9 giờ, khoảng 10 giờ, khoảng 11 giờ, khoảng 12 giờ, khoảng 13 giờ, khoảng 14 giờ, khoảng 15 giờ, khoảng 16 giờ, khoảng 17 giờ, khoảng 18 giờ, khoảng 19 giờ, khoảng 20 giờ, khoảng 21 giờ, khoảng 22 giờ, khoảng 23 giờ, hoặc thậm chí khoảng 24 giờ, đặc biệt là khoảng 12 giờ.

Tương tự, chất tương tự PYY theo sáng chế có ái lực gắn kết ở thụ thể NPY₂ lớn hơn so với ái lực gắn kết của PYY₃₋₃₆ nguyên thể của người (SEQ ID NO:2), như nằm trong khoảng từ 2 lần đến khoảng 10 lần. Theo cách khác, chất tương tự PYY theo sáng chế có thể có ái lực gắn kết lên đến khoảng lớn hơn 2 lần, lớn hơn khoảng 3 lần, lớn hơn khoảng 4 lần, lớn hơn khoảng 5 lần, lớn hơn khoảng 6 lần, lớn hơn khoảng 7 lần, lớn hơn khoảng 8 lần, lớn hơn khoảng 9 lần, hoặc thậm chí lớn hơn khoảng 10 lần, đặc biệt là lớn hơn 2 lần đến lớn hơn 3 lần, so với ái lực gắn kết của PYY₃₋₃₆ nguyên thể của người (SEQ ID NO:2).

Dược phẩm

Chất tương tự PYY theo sáng chế có thể được bào chế dưới dạng dược phẩm, có thể được dùng ngoài đường tiêu hóa (ví dụ, qua đường tĩnh mạch, trong phúc mạc, trong bắp, dưới da hoặc qua da). Dược phẩm như vậy và kỹ thuật để bào chế chúng là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Xem, ví dụ, Remington, “The Science and Practice of Pharmacy” (D.B. Troy ed., 21st Edition, Lippincott, Williams & Wilkins, 2006). Trong các trường hợp đặc biệt, chất tương tự PYY được dùng dưới da. Theo cách khác,

tuy nhiên, chất tương tự PYY có thể được bào chế dưới các dạng cho các đường dùng được dụng khác như, ví dụ, viên nén hoặc các dạng rắn khác để dùng qua đường miệng; viên nang giải phóng theo thời gian; và dạng bất kỳ khác hiện đang được sử dụng, bao gồm kem, thuốc xức, thuốc hít và các dạng tương tự.

Để cải thiện tính tương hợp và hiệu quả *in vivo* của chúng, chất tương tự PYY theo sáng chế có thể được phản ứng với một số axit/bazơ vô cơ và hữu cơ bất kỳ để tạo thành các muối cộng axit/bazơ được dụng. Muối được dụng và các phương pháp chung để điều chế chúng là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này (xem, ví dụ, Stahl *et al.*, “Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection and Use,” 2nd Revised Edition (Wiley-VCH, 2011)). Muối được dụng để sử dụng ở đây bao gồm muối natri, trifloaxetat, hydroclorua và axetat.

Chất tương tự PYY theo sáng chế có thể được dùng bởi bác sĩ điều trị hoặc tự dùng bằng cách tiêm. Cần hiểu rằng kích thước máy đo và lượng thể tích tiêm có thể được xác định dễ dàng bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Tuy nhiên, lượng thể tích tiêm có thể $\leq$ khoảng 2 mL hoặc thậm chí $\leq$ khoảng 1 mL, và thước đo kim có thể $\geq$ khoảng 27 G hoặc thậm chí $\geq$ khoảng 29 G.

Sáng chế cũng đề xuất và do đó bao hàm các chất trung gian mới và phương pháp hữu ích để tổng hợp chất tương tự PYY theo sáng chế, hoặc muối được dụng của chúng. Chất trung gian và chất tương tự PYY theo sáng chế có thể được điều chế bằng nhiều phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, phương pháp sử dụng tổng hợp hóa học được minh họa trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế dưới đây. Các bước tổng hợp cụ thể cho từng con đường được mô tả có thể được kết hợp theo nhiều cách khác nhau để điều chế chất tương tự PYY mô tả ở đây. Chất phản ứng và nguyên liệu ban đầu là sẵn có đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Chất tương tự PYY theo sáng chế thường có hiệu quả trên khoảng liều lượng rộng. Liều lượng được lấy làm ví dụ về chất tương tự PYY theo sáng chế hoặc về được phẩm chứa nó có thể là lượng theo miligam (mg), microgam (μ g), nanogam (ng) hoặc picrogam (pg) trên kilogam (kg) của một cá thể. Theo cách này, liều hàng ngày có thể từ khoảng 1 μ g đến khoảng 100 mg.

Ở đây, lượng hữu hiệu của chất tương tự PYY trong được phẩm có thể là liều lượng từ khoảng 0,25 mg đến khoảng 5,0 mg. Tuy nhiên, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này cần hiểu rằng trong một số trường hợp lượng hữu hiệu (tức

là, liều dùng/liều lượng) có thể dưới giới hạn dưới của khoảng nêu trên và đầy đủ hơn, trong khi trong các trường hợp khác lượng hữu hiệu có thể là liều lượng lớn hơn và có thể được dùng với các phản ứng phụ có thể chấp nhận được.

Ngoài chất tương tự PYY, dược phẩm cũng có thể chứa tác nhân điều trị bổ sung, đặc biệt là thuốc trị tiểu đường hoặc giảm cân khác. Trong một số trường hợp, tác nhân điều trị bổ sung có thể là ít nhất một trong số incretin hoặc chất ức chế DPP-IV. Incretin được lấy làm ví dụ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, GCG, GLP-1, GLP-1 (7-36)_{amit}, GIP, OXM, chất tương tự GCG, chất tương tự GLP-1, chất tương tự GIP, chất tương tự OXM, GIP/GLP-1, GLP-1/GCG, hoặc thậm chí chất tương tự incretin có hoạt tính ba thụ thể.

Theo cách này, dược phẩm có thể chứa lượng hữu hiệu của chất tương tự PYY có trình tự nêu trong SEQ ID NO:9 và incretin hoặc chất ức chế DPP-IV, lượng hữu hiệu của chất tương tự PYY có trình tự nêu trong SEQ ID NO:10 và incretin hoặc chất ức chế DPP-IV, lượng hữu hiệu của chất tương tự PYY có trình tự nêu trong SEQ ID NO:11 và incretin hoặc chất ức chế DPP-IV, lượng hữu hiệu của chất tương tự PYY có trình tự nêu trong SEQ ID NO:12 và incretin hoặc chất ức chế DPP-IV, hoặc lượng hữu hiệu của chất tương tự PYY có trình tự nêu trong SEQ ID NO:13 và incretin hoặc chất ức chế DPP-IV.

Trong các trường hợp trong đó incretin là GLP -1 hoặc chất tương tự GLP-1, nó có thể là GLP-1 hoặc chất tương tự GLP-1 như albiglutide, dulaglutide, liraglutide, semaglutide, hoặc tổ hợp của chúng, đặc biệt là dulaglutide.

Phương pháp điều chế và sử dụng chất tương tự PYY

Chất tương tự PYY theo sáng chế có thể được tổng hợp qua một số phương pháp tổng hợp peptit đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này bằng cách sử dụng quy trình tổng hợp pha rắn thủ công hoặc tự động tiêu chuẩn. Bộ tổng hợp peptit tự động có sẵn trên thị trường của, ví dụ, Applied Biosystems (Foster City, CA) và Protein Technologies Inc. (Tucson, AZ). Chất phản ứng để tổng hợp pha rắn có sẵn từ các nguồn thương mại. Bộ tổng hợp pha rắn có thể được sử dụng theo hướng dẫn của nhà sản xuất để phong bế các nhóm can thiệp, bảo vệ các axit amin trong quá trình phản ứng, kết đôi, khử bảo vệ và giới hạn các axit amin chưa phản ứng.

Thông thường, axit amin được bảo vệ bởi N- α -carbamoyl và axit amin đầu tận cùng N trên chuỗi peptit đang phát triển được gắn với một loại nhựa được kết đôi ở nhiệt độ trong phòng trong dung môi trơ như DMF, N-methylpyrrolidon hoặc metylen clorua với sự có mặt của chất kết đôi như diisopropyl-carbodiimide và 1-hydroxybenzotriazol. Nhóm bảo vệ N- α -carbamoyl được loại bỏ ra khỏi nhựa peptit thu được bằng cách sử dụng chất phản ứng như TFA hoặc piperidin, và phản ứng kết đôi được lặp lại với axit amin được bảo vệ N- α mong muốn tiếp theo để được bổ sung vào chuỗi peptit. Các nhóm bảo vệ amin thích hợp là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và được mô tả, ví dụ, trong Green & Wuts, "Protecting Groups in Organic Synthesis," (John Wiley và Sons, 1991). Các ví dụ được sử dụng phổ biến nhất bao gồm tBoc và Fmoc. Sau khi tổng hợp xong, peptit được phân tách ra khỏi nền pha rắn với việc khử bảo vệ chuỗi bên đồng thời bằng cách sử dụng phương pháp xử lý tiêu chuẩn trong điều kiện axit.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ hiểu rằng chuỗi peptit mô tả ở đây được tổng hợp với một carboxamid đầu tận cùng C. Để tổng hợp peptit amid đầu tận cùng C, nhựa kết hợp Rink amid MBHA hoặc cầu nối Rink amid AM thường được sử dụng với tổng hợp Fmoc, trong khi nhựa MBHA thường được sử dụng với tổng hợp tBoc.

Peptit thô thường được tinh chế bằng cách sử dụng RP-HPLC trên cột C8 hoặc C18 bằng cách sử dụng gradient nước-acetonitril trong TFA 0,05% đến 0,1%. Độ tinh khiết có thể được xác minh bằng phân tích RP-HPLC. Nhận diện của peptit có thể được xác minh bằng MS. Peptit có thể được hòa tan trong dung dịch đệm dạng nước trong khoảng pH rộng.

Một ứng dụng của chất tương tự PYY theo sáng chế là để làm giảm glucoza huyết và/hoặc thể trọng ở cá thể, đặc biệt là cá thể thừa cân hoặc béo phì và mắc bệnh tiểu đường typ 2. Việc dùng chất tương tự PYY như được mô tả ở đây có thể dẫn đến việc kiểm soát được glucoza huyết bằng cách cải thiện sự nhạy hóa insulin và giảm cân. Như vậy, chất tương tự PYY theo sáng chế cho thấy hiệu quả giảm glucoza với lợi ích bổ sung là giảm cân, để các cá thể có thể trì hoãn sự tiến triển thành insulin và duy trì mục tiêu HbA1c đích.

Phương pháp có thể bao gồm các bước được mô tả ở đây, và có thể, nhưng không nhất thiết, được thực hiện theo trình tự như được mô tả. Tuy nhiên, các trình tự khác cũng có thể hiểu được. Hơn nữa, bước riêng lẻ hoặc nhiều bước có thể được thực

hiện song song và/hoặc trùng lặp trong một thời gian và/hoặc bước riêng lẻ hoặc trong nhiều bước lặp lại. Hơn nữa, phương pháp có thể bao gồm các bước bổ sung, không xác định.

Do đó, các phương pháp như vậy có thể bao gồm bước chọn lọc cá thể thừa cân và mắc bệnh tiểu đường typ 2 hoặc có khuynh hướng mắc các bệnh này. Theo cách khác, phương pháp có thể bao gồm bước chọn lọc cá thể béo phì và mắc bệnh tiểu đường typ 2 hoặc có khuynh hướng mắc các bệnh này.

Phương pháp cũng có thể bao gồm bước dùng cho cá thể lượng hữu hiệu của ít nhất một chất tương tự PYY như được mô tả ở đây, có thể là ở dạng dược phẩm như được mô tả ở đây. Trong một số trường hợp, ít nhất một chất tương tự PYY/dược phẩm có thể chứa tác nhân điều trị bổ sung như incretin hoặc chất ức chế DPP-IV.

Nồng độ/liều dùng/liều lượng của ít nhất một chất tương tự PYY và incretin hoặc chất ức chế DPP-IV tùy ý được nêu trong các đoạn khác trong bản mô tả này.

Liên quan đến đường dùng, ít nhất một chất tương tự PYY hoặc dược phẩm chứa chúng có thể được dùng phù hợp với các phương pháp đã biết như, ví dụ, hoặc qua đường miệng; bằng cách tiêm (tức là, trong động mạch, tiêm tĩnh mạch, trong phúc mạc, trong não, trong não tủy, tiêm bắp, nội nhãn, trong cổ hoặc trong thương tổn); bằng hệ giải phóng kéo dài, hoặc bằng thiết bị cấy ghép. Trong các trường hợp nhất định, ít nhất một chất tương tự PYY hoặc dược phẩm chứa chúng có thể được dùng dưới da bằng cách tiêm liều lớn hoặc liên tục.

Liên quan đến tần suất dùng liều, ít nhất một chất tương tự PYY hoặc dược phẩm chứa chúng có thể được dùng hàng ngày, cách ngày, ba lần một tuần, hai lần một tuần, một lần một tuần (tức là, hàng tuần), hai tuần một lần (tức là, cách tuần một lần), hoặc hàng tháng. Trong các trường hợp nhất định, ít nhất một chất tương tự PYY hoặc dược phẩm chứa chúng được dùng dưới da cách ngày, dưới da ba lần một tuần, dưới da hai lần một tuần, dưới da một lần một tuần, dưới da cách tuần hoặc dưới da hàng tháng. Trong các trường hợp đặc biệt, ít nhất một chất tương tự PYY hoặc dược phẩm chứa chúng được dùng dưới da một lần một tuần (QW). Theo cách khác, ít nhất một chất tương tự PYY hoặc dược phẩm chứa chúng có thể được dùng qua đường miệng. Như nêu trên, và liên quan đến tần suất dùng liều, ít nhất một chất tương tự PYY hoặc dược phẩm chứa chúng có thể được dùng hàng ngày, cách ngày, ba lần một tuần, hai lần một tuần, một lần một tuần (tức là, hàng tuần), hai tuần một lần (tức là, cách tuần) hoặc hàng

tháng. Trong các trường hợp nhất định, ít nhất một chất tương tự PYY hoặc dược phẩm chứa chúng được dùng qua đường miệng cách ngày, hoặc qua đường miệng ba lần một tuần, hoặc qua đường miệng hai lần một tuần, hoặc qua đường miệng một lần một tuần, hoặc qua đường miệng hai tuần một lần. Trong các trường hợp đặc biệt, chất tương tự PYY được dùng qua đường miệng một lần một tuần.

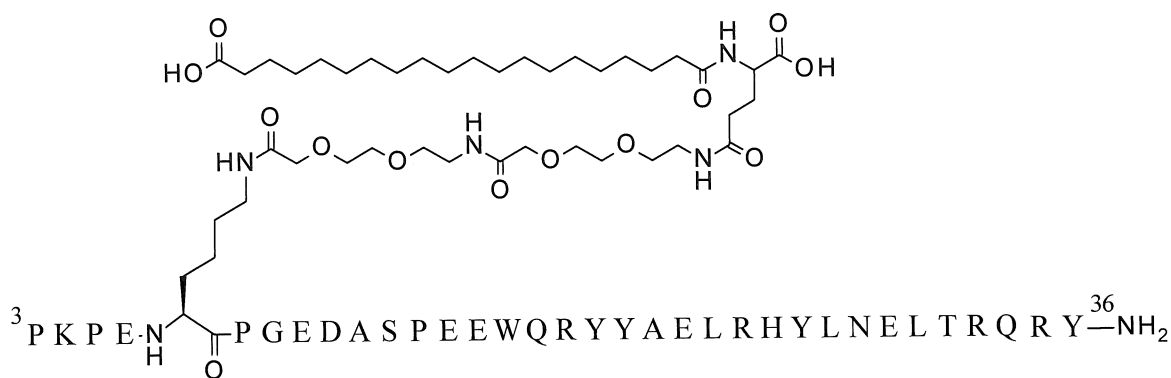
Liên quan đến các trường hợp trong đó ít nhất một chất tương tự PYY hoặc dược phẩm chứa chúng được dùng kết hợp với lượng hữu hiệu của incretin, incretin có thể là GCG hoặc chất tương tự GCG, GLP-1, GLP-1 (7-36)_{amit} hoặc chất tương tự GLP-1, GIP hoặc chất tương tự GIP, OXM hoặc chất tương tự OXM, GIP/GLP-1, GLP-1/GCG, hoặc thậm chí incretin có hoạt tính ba thụ thể. GCG, chất tương tự GCG, GLP-1, GLP-1 (7-36)_{amit}, chất tương tự GLP-1, GIP, chất tương tự GIP, OXM, chất tương tự OXM, GIP/GLP-1, GLP-1/GCG, hoặc incretin có hoạt tính ba thụ thể có thể được dùng đồng thời, tách biệt hoặc lần lượt với ít nhất một chất tương tự PYY hoặc dược phẩm chứa chúng.

Hơn nữa, GCG, chất tương tự GCG, GLP-1, GLP-1 (7-36)_{amit}, chất tương tự GLP-1, GIP, chất tương tự GIP, OXM, chất tương tự OXM, GIP/GLP-1, GLP-1/GCG, hoặc incretin có hoạt tính ba thụ thể có thể được dùng với tần suất giống như ít nhất một chất tương tự PYY hoặc dược phẩm chứa chúng (tức là, cách ngày, hai lần một tuần hoặc thậm chí hàng tuần). Theo cách khác, GCG, chất tương tự GCG, GLP-1, GLP-1 (7-36)_{amit}, chất tương tự GLP-1, GIP, chất tương tự GIP, OXM, chất tương tự OXM, GIP/GLP-1, GLP-1/GCG, hoặc incretin có hoạt tính ba thụ thể có thể được dùng với tần suất khác với ít nhất một chất tương tự PYY hoặc dược phẩm chứa chúng. Trong các trường hợp khác, GCG, chất tương tự GCG, GLP-1, GLP-1 (7-36)_{amit}, chất tương tự GLP-1, GIP, chất tương tự GIP, OXM, chất tương tự OXM, GIP/GLP-1, GLP-1/GCG, hoặc incretin có hoạt tính ba thụ thể được dùng QW. Trong các trường hợp khác nữa, chất tương tự PYY được dùng dưới da, và GCG, chất tương tự GCG, GLP-1, GLP-1 (7-36)_{amit}, chất tương tự GLP-1, GIP, chất tương tự GIP, OXM, chất tương tự OXM, GIP/GLP-1, GLP-1/GCG, hoặc incretin có hoạt tính ba thụ thể có thể được dùng qua đường miệng.

Cũng dự tính tiếp rằng phương pháp này có thể được kết hợp với chế độ ăn và tập thể dục và/hoặc có thể được kết hợp với tác nhân điều trị bổ sung ngoài các tác nhân được mô tả trên đây.

Độ tinh khiết của chất tương tự PYY được kiểm tra bằng RP-HPLC phân tích, và sự nhận dạng được xác nhận bằng cách sử dụng LC/MS (quan sát: $M+3H^+/3 = 1659,2$ ($\pm 0,2$); tính toán: $M+3H^+/3 = 1659,2$; quan sát: $M+4H^+/4 = 1244,6$ ($\pm 0,2$); tính toán: $M+4H^+/4 = 1244,6$; quan sát: $M+5H^+/5 = 995,9$ ($\pm 0,2$); tính toán: $M+5H^+/5 = 995,9$).

Một chất tương tự PPY kết hợp khái niệm theo sáng chế có thể có cấu trúc:



Như trong Ví dụ 1, đầu tận cùng N là tự do, và axit amin đầu tận cùng C được amit hóa dưới dạng amit bậc một đầu tận cùng C. Tuy nhiên, ngược lại, K ở vị trí 7 được cải biến hóa học thông qua sự liên hợp với nhóm ϵ -amino của chuỗi bên K với ([2-(2-amino-etoxy)-etoxy]-axetyl)₂-(γ E)-CO-(CH₂)₁₈-COOH.

Độ tinh khiết của chất tương tự PYY được kiểm tra bằng RP-HPLC phân tích, và sự nhân dạng được xác nhận bằng cách sử dụng LC/MS (quan sát: $M+3H^+/3 = 1665,4$



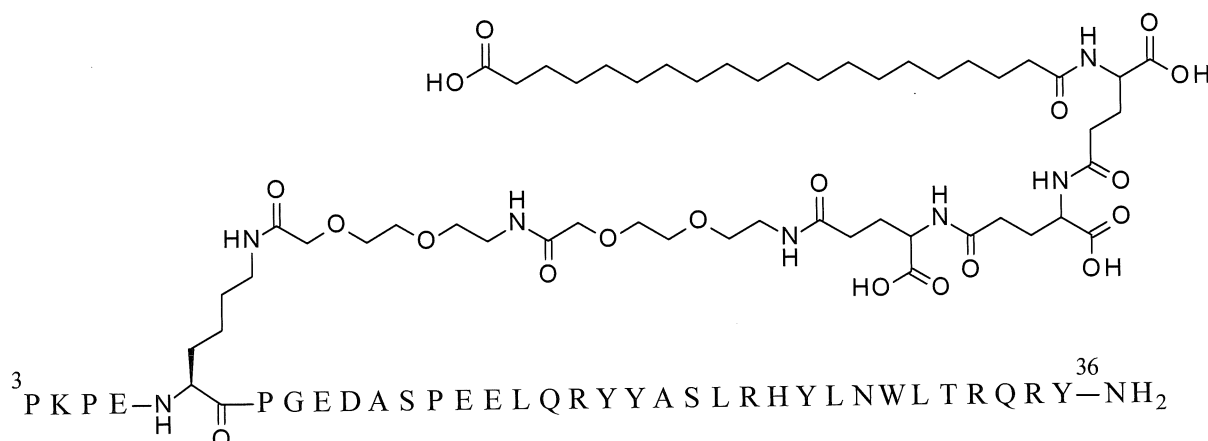
Như trong Ví dụ 1, đầu tận cùng N là tự do, và axit amin đầu tận cùng C được amit hóa dưới dạng amit bậc một đầu tận cùng C. Tuy nhiên, ngược lại, K ở vị trí 7 được cải biến hóa học thông qua sự liên hợp với nhóm ϵ -amino của chuỗi bên K với ([2-(2-amino-etoxy)-etoxy]-axetyl)₂-(γ E)-CO-(CH₂)₁₆-COOH.

Chất tương tự PYY theo SEQ ID NO:12 được tạo ra bằng peptit pha rắn, tương tự với phương pháp như được mô tả trên đây trong Ví dụ 1. Do đó, FMOC-NHPEG₂-CH₂COOH và HOOC-(CH₂)₁₆-COOtBu được gắn với chuỗi bên sau khi phân tách MTT bằng cách sử dụng 3 đương lượng của khối xây dựng với PyBOP (3 đương lượng) và DIEA (6 đương lượng) trong DMF trong 3 giờ ở 25°C.

Độ tinh khiết của chất tương tự PYY được kiểm tra bằng RP-HPLC phân tích, và sự nhận dạng được xác nhận bằng cách sử dụng LC/MS (quan sát: $M+3H^+/3 = 1664,8$ ($\pm 0,2$); tính toán: $M+3H^+/3 = 1665,5$; quan sát: $M+4H^+/4 = 1248,9$ ($\pm 0,2$); tính toán: $M+4H^+/4 = 1249,4$; quan sát: $M+5H^+/5 = 998,9$ ($\pm 0,2$); tính toán: $M+5H^+/5 = 995,7$).

Ví dụ 5: Chất tương tự PYY 5.

Một chất tương tự PYY kết hợp khái niệm theo sáng chế có thể có cấu trúc:



(SEQ ID NO:13).

Như trong Ví dụ 1, đầu tận cùng N là tự do, và axit amin đầu tận cùng C được amit hóa dưới dạng amit bậc một đầu tận cùng C. Ngược lại, tuy nhiên, K ở vị trí 7 được cải biến hóa học thông qua sự liên hợp với nhóm ϵ -amino của chuỗi bên K với ([2-(2-amino-etoxy)-etoxy]-axetyl)₂-(γ E)₃-CO-(CH₂)₁₈-COOH.

Chất tương tự PYY theo SEQ ID NO:13 được tạo ra bằng peptit pha rắn, tương tự với phương pháp như được mô tả trên đây trong Ví dụ 1. Do đó, Fmoc-NHPEG₂-CH₂COOH và HOOC-(CH₂)₁₈-COOtBu được gắn với chuỗi bên sau khi phân tách MTT bằng cách sử dụng 3 đương lượng của khối xây dựng với PyBOP (3 đương lượng) và DIEA (6 đương lượng) trong DMF trong 3 giờ ở 25°C.

Độ tinh khiết của chất tương tự PYY được kiểm tra bằng RP-HPLC phân tích, và sự nhận dạng được xác nhận bằng cách sử dụng LC/MS (quan sát: $M+3H^+/3 = 1732,2$ (+/-0,2); tính toán: $M+3H^+/3 = 1732,3$; quan sát: $M+4H^+/4 = 1299,4$ (+/-0,2); tính toán: $M+4H^+/4 = 1299,5$; quan sát: $M+5H^+/5 = 1039,7$ (+/-0,2); tính toán: $M+5H^+/5 = 1039,8$).

Ví dụ 6: Hoạt tính *in vitro* của chất tương tự PYY.

(1) Gắn kết *in vitro* với thụ thể hNPY1, hNPY2, hNPY4, và hNPY5

Mục đích:

Để đánh giá ái lực gắn kết *in vitro* (K_i) của chất tương tự PYY của Ví dụ 1 đến 5 khi không có mặt của albumin huyết thanh bò (BSA) đối với các thụ thể (h) của người sau đây: hNPY1R, hNPY2R, hNPY4R và hNPY5R. Thử nghiệm gắn kết phối tử phóng xạ cạnh tranh với các màng được tạo ra từ các dòng tế bào biểu hiện quá mức từng thụ thể tái tổ hợp và peptit được dán nhãn [¹²⁵I]- liên quan được sử dụng trong phương pháp thử nghiệm gần nhấp nháy (SPA - scintillation proximity assay). Ái lực gắn kết cho peptit nguyên thể liên quan, PYY₁₋₃₆ (SEQ ID NO:1), PYY₃₋₃₆ (SEQ ID NO:2) và Polypeptit₁₋₃₆ tuyến tụy (PP₁₋₃₆; SEQ ID NO:14), được xác định trong mỗi thử nghiệm làm đối chứng.

Phương pháp:

Chất tương tự PYY, PYY₁₋₃₆ nguyên thể của người và PYY₃₋₃₆ đối chứng được tổng hợp tại Lilly Research Laboratories (Indianapolis, IN, USA) và được đặc trưng hóa bằng phân tích LC/MS, NMR, và LC/UV (độ tinh khiết 99,5%). Hàm lượng peptit được

ước tính bằng 80% khối lượng bột. Peptit được chuẩn bị dưới dạng dung dịch gốc 10 mM trong 100% DMSO và được giữ đông lạnh ở -20°C cho đến ngay trước khi thử nghiệm trong các thử nghiệm.

Đối với hNPY1R, biểu hiện quá mức tạm thời được thực hiện bằng cách sử dụng tế bào CHO. Dòng tế bào đã chuyển nhiễm ổn định được chuẩn bị cho hNPY2R và hNPY4R bằng tách dưới dòng vô tính cDNA thụ thể vào plasmit biểu hiện pcDNA3.1 và chuyển nạp vào tế bào thận phôi người (HEK) 293 tiếp theo là chọn lọc với Geneticin. Việc tách dòng vô tính hNPY5R được thực hiện tại Multispan, Inc. (Hayward, CA).

Để điều chế màng tế bào thô hNPY1R, hNPY2R, mNPY2R và hNPY4R, hai phương pháp khác nhau (mô tả dưới đây) được sử dụng. Màng hNPY5R được mua từ Multispan, Inc. (#MCG1275).

Phương pháp 1 - Đối với màng hNPY2R và hNPY4R, viên tế bào đông lạnh được ly giải trên đá trong 10 mL dung dịch đệm đồng nhất hóa nhược trương chứa 50 mM Tris HCl, pH 7,5, và chất ức chế proteaza Roche Complete™ với EDTA (#1169749001) trên mỗi gam huyền phù đặc chứa tế bào ướt. Huyền phù chứa tế bào được phá vỡ bằng cách sử dụng thiết bị đồng nhất hóa Potter-Elvehjem bằng thủy tinh được trang bị chày Teflon® cho 25 lần giã. Sản phẩm đồng nhất được ly tâm ở 4°C ở $1100 \times g$ trong 10 phút. Phần nổi trên bề mặt được thu gom và cất giữ trên đá trong khi các viên kết được tái tạo huyền phù trong dung dịch đệm đồng nhất hóa và đồng nhất hóa lại như được mô tả trên đây. Sản phẩm đồng nhất được ly tâm ở $1100 \times g$ trong 10 phút. Phần nổi trên bề mặt thứ hai được kết hợp với phần nổi trên bề mặt thứ nhất và ly tâm ở $35000 \times g$ trong 1 giờ ở 4°C . Viên kết màng thu được được tạo lại huyền phù trong dung dịch đệm đồng nhất hóa chứa chất ức chế proteaza ở mức xấp xỉ 1 đến 3 mg/mL, đông lạnh nhanh trong nitơ lỏng, và được bảo quản dưới dạng các lượng nhỏ trong tủ đông -80°C cho đến khi sử dụng. Nồng độ protein được xác định bằng cách sử dụng kit thử nghiệm protein BCA (Pierce, # 23225) với BSA làm tiêu chuẩn.

Phương pháp 2 – Đối với màng hNPY1R, viên tế bào đông lạnh được ly giải trên đá trong 5 mL dung dịch đệm đồng nhất hóa nhược trương chứa 25 mM Tris HCl, pH 7,5, 1 mM MgCl_2 , 25 đơn vị/mL DNase I (Invitrogen, #18047-019) và chất ức chế proteaza Roche Complete™ không có EDTA (# 11836170001) trên mỗi gam huyền phù đặc chứa tế bào ướt. Huyền phù tế bào được phá vỡ bằng cách sử dụng thiết bị đồng nhất hóa Potter-Elvehjem bằng thủy tinh được trang bị chày Teflon® cho 25 lần giã.

Sản phẩm đồng nhất được ly tâm ở 4°C ở 1800 x g trong 15 phút trong ống hình nón dung tích 50 mL. Phần nổi trên bề mặt được thu gom và cất giữ trên đá trong khi các viên kết được tái tạo huyền phù trong dung dịch đệm đồng nhất hóa và tái đồng nhất hóa như được mô tả trên đây, ngoại trừ DNaza I không được sử dụng trong dung dịch đệm đồng nhất hóa. Sản phẩm đồng nhất được ly tâm ở 1800 x g trong 15 phút. Phần nổi trên bề mặt thứ hai được kết hợp với phần nổi trên bề mặt thứ nhất và ly tâm ở 25000 x g trong 30 phút ở 4°C. Viên kết màng thu được được tái tạo huyền phù trong dung dịch đệm đồng nhất hóa chứa chất ức chế proteaza ở mức xấp xỉ 2 mg/mL, được phân ước, và được bảo quản trong tủ đông -80°C cho đến khi sử dụng. Nồng độ protein được xác định bằng cách sử dụng kit nghiệm protein BCA (Pierce, # 23225) với BSA làm tiêu chuẩn.

Phương pháp thử nghiệm gắn kết chung – Các hằng số phân ly cân bằng (K_d) đối với các tương tác thụ thể/phối tử phóng xạ khác nhau được xác định từ phân tích gắn kết bão hòa bằng cách sử dụng cùng chất phản ứng và dung dịch đệm như được mô tả dưới đây để thử nghiệm hợp chất. Giá trị K_d được xác định cho các dạng điều chế thụ thể được sử dụng trong nghiên cứu này là như sau: hNPY2R, 0,0047 nM; hNPY1R, 0,07 nM; hNPY4R, 0,084 nM; và hNPY5R, 0,896 nM.

Quy trình gắn kết thụ thể hNPY1R – Ái lực gắn kết thụ thể (K_i) của peptit tương tự PYY và PYY₁₋₃₆ đối với hNPY1R được xác định từ thử nghiệm gắn kết phối tử phóng xạ cạnh tranh với [¹²⁵I]-PYY₁₋₃₆ tái tổ hợp của người (#NEX341, 2200 Ci/mmol) thu được từ Perkin Elmer (Waltham, MA). Thử nghiệm được thực hiện với phương pháp SPA bằng cách sử dụng các giọt SPA kết đôi với agglutinin của mầm lúa mì polyvinyltoluen (PVT) (#RPNQ0001, Perkin Elmer). Dung dịch đệm thử nghiệm (25 mM HEPES, pH 7,5, 1 mM MgCl₂, 2,5 mM CaCl₂, và 0,2% khối lượng/thể tích Bacitracin (RPI, #32000)) được sử dụng để điều chế chất phản ứng. Chất tương tự PYY và PYY₁₋₃₆ được rửa đông và được pha loãng theo chuỗi 3 lần trong DMSO 100% (đường cong đáp ứng nồng độ 10 điểm) bằng cách sử dụng bộ xử lý chất lỏng Tecan Evo. Pha loãng peptit theo từng bước 20 lần thành dung dịch đệm thử nghiệm được thực hiện để làm giảm mức DMSO và nồng độ peptit trước khi bổ sung vào đĩa thử nghiệm. Tiếp theo, 5 µL peptit được pha loãng theo chuỗi hoặc DMSO được chuyển vào đĩa thử nghiệm đáy trong suốt Corning® 3632 chứa 45 µL dung dịch đệm thử nghiệm hoặc mẫu đối chứng PYY₁₋₃₆ không được dán nhãn (gắn kết không đặc hiệu hoặc NSB, ở nồng độ

cuối 10 nM). Sau đó, 50 μL [^{125}I]-PYY₁₋₃₆ (nồng độ cuối 0,05 nM) và 50 μL màng hNPY1R (1,0 $\mu\text{g}/\text{lỗ}$) được bổ sung. Phần bổ sung cuối cùng là 50 μL giọt WGA SPA (50 $\mu\text{g}/\text{lỗ}$). Nồng độ DMSO cuối cùng là 0,125%. Các đĩa được đậy kín và trộn trên máy lắc đĩa (cài đặt 6) trong 1 phút và đọc bằng máy đếm nhấp nháy PerkinElmer Trilux MicroBeta® sau thời gian 10 giờ ủ/lắng giọt ở nhiệt độ trong phòng. Khoảng nồng độ thử nghiệm cuối cùng đối với peptit được thử nghiệm trong đường cong đáp ứng là: Chất tương tự PYY (2,5 μM đến 0,13 nM) và PYY₁₋₃₆ (10 nM đến 0,5 pM).

Quy trình gắn kết thụ thể hNPY2 – Ái lực gắn kết thụ thể (K_i) của peptit tương tự PYY và PP₁₋₃₆ đối với hNPY2R được xác định từ thử nghiệm gắn kết phối tử phóng xạ cạnh tranh như được mô tả trên đây đối với hNPY1R. Khoảng nồng độ thử nghiệm cuối cùng đối với các peptit được thử nghiệm trong các đường cong đáp ứng là: Chất tương tự PYY (0,1 μM đến 5 pM) và PYY₃₋₃₆ (10 nM đến 0,5 pM).

Quy trình gắn kết thụ thể hNPY4R – Ái lực gắn kết thụ thể (K_i) của peptit tương tự PYY và PP₁₋₃₆ đối với hNPY4R được xác định từ thử nghiệm gắn kết phối tử phóng xạ cạnh tranh như được mô tả trên đây đối với hNPY1R. Khoảng nồng độ thử nghiệm cuối cùng đối với peptit được thử nghiệm trong đường cong đáp ứng là: Chất tương tự PYY (2,5 μM đến 0,13 nM) và PYY₁₋₃₆ (10 nM đến 0,5 pM).

Quy trình gắn kết thụ thể hNPY5R – Ái lực gắn kết thụ thể (K_i) của peptit tương tự PYY và PYY₁₋₃₆ đối với hNPY5R được xác định từ thử nghiệm gắn kết phối tử phóng xạ cạnh tranh như được mô tả trên đây đối với hNPY1R. Khoảng nồng độ thử nghiệm cuối cùng đối với peptit được thử nghiệm trong đường cong đáp ứng là: Chất tương tự PYY (1 μM đến 10 pM) và PYY₁₋₃₆ (1 μM đến 10 pM).

Phân tích dữ liệu đối với thử nghiệm gắn kết thụ thể NPY – Dữ liệu đếm thô trên mỗi phút (CPM) đối với các đường cong nồng độ của chất tương tự PYY, PYY₁₋₃₆, PYY₃₋₃₆, hoặc PP₁₋₃₆ được chuyển đổi thành phần trăm ức chế cụ thể bằng cách trừ gắn kết không đặc hiệu (NSB (non specific binding), gắn kết với sự có mặt của lần lượt PYY₁₋₃₆, PYY₃₋₃₆, hoặc PP₁₋₃₆ dư không được dán nhãn) ra khỏi các giá trị CPM riêng lẻ và chia cho tổng tín hiệu gắn kết, cũng được hiệu chỉnh bằng cách trừ đi gắn kết không đặc hiệu, như thể hiện trong phương trình dưới đây:

$$\% \text{ mức ức chế đặc hiệu} = 100 -$$

$$\left[\frac{\text{CPM đối với chất tương tự hoặc chất đối chứng} - \text{CPM đối với NSB}}{\text{CPM đối với tổng gắn kết} - \text{CPM đối với NSB}} \times 100 \right].$$

Dữ liệu được phân tích bằng cách sử dụng quy trình hồi quy phi tuyến bốn tham số (đường cong tối đa, đường cong tối thiểu, IC_{50} , độ dốc Hill) (Genedata Screener, phiên bản 13.0.5, Genedata AG, Basal, Thụy Sĩ). Ái lực (K_i) được tính toán từ giá trị IC_{50} tương đối dựa trên phương trình $K_i = IC_{50}/(1 + D/K_d)$ trong đó D = nồng độ của phối tử phóng xạ trong thử nghiệm, IC_{50} là nồng độ gây ức chế gắn kết 50%, và K_d là hằng số ái lực gắn kết cân bằng của phối tử phóng xạ xác định từ phân tích gắn kết bão hòa (liệt kê trên đây). Dấu hiệu định tính ($>$) chỉ ra rằng dữ liệu đã không đạt đến mức ức chế 50%, so với gắn kết tối đa khi không có mặt của đối thủ cạnh tranh, theo đó K_i được tính bằng cách sử dụng nồng độ cao nhất của hợp chất được kiểm tra trong thử nghiệm.

Các giá trị được báo cáo cho K_i được tính bằng giá trị trung bình hình học như được thể hiện dưới đây:

$$\text{Giá trị trung bình hình học} = 10^{(\text{Giá trị trung bình số học của giá trị Log}_{10} K_i)}$$

Sai số chuẩn của giá trị trung bình (SEM) được tính toán bằng cách sử dụng phương pháp delta như được thể hiện dưới đây:

$$SEM = \text{Giá trị trung bình hình học} \times \frac{SD \text{ của dữ liệu được chuyển đổi log}}{\text{Căn bậc hai của } n} \times \ln(10),$$

trong đó SD là độ lệch chuẩn, n là số lần chạy độc lập, và $\ln(10)$ là logarit tự nhiên của 10.

Tính chọn lọc của peptit đối với hNPY2R (Y2) và hNPY5R (Y5), hNPY4R (Y4), và/hoặc hNPY1R (Y1) được tính bằng cách chia cho kết quả hNPY2R theo nM.

Kết quả:

Bảng 1: Gắn kết *in vitro* (K_i) với hNPY1R, hNPY2R, hNPY4R và hNPY5R.

Peptit	hNPY2R (nM)	hNPY5R (nM)	hNPY4R (nM)	hNPY1R (nM)	Số lần (Y5/Y2)	Số lần (Y4/Y2)	Số lần (Y1/Y2)
PP ₁₋₃₆	--	--	0,07	--	--	--	--
PYY ₁₋₃₆	0,007	0,37	5	0,06	52	714	8,6
PYY ₃₋₃₆	0,008	3,6	27	7	450	3375	875
Ví dụ 1	0,011	59	626	256	5363	56909	23272
Ví dụ 2	0,070	>1000	>1840	>1460	>14285	>26286	>20857
Ví dụ 3	0,009	36,4	112	>1550	4044	12444	>193750
Ví dụ 4	0,005	ND	280	>148	NA	56000	>29600
Ví dụ 5	0,030	ND	560	>1530	NA	18666	>51000

Tham chiều 1*	0,016	189	--	--	11812	--	--
Tham chiều 2*	0,021	112	--	--	5333	--	--
Tham chiều 3*	0,013	469	--	--	36076	--	--

* Chất tương tự PYY đã biết để so sánh; xem, Công bố đơn quốc tế số WO 2016/198682, trong đó Tham chiều 1 tương đương với Hợp chất 4 trong công bố đơn này, Tham chiều 2 tương đương với Hợp chất 21 trong công bố đơn này, và Tham chiều 3 tương đương với Hợp chất 32 trong công bố đơn này.

ND - không được phát hiện

NA - không khả dụng

Như được thể hiện trên đây, chất tương tự PYY của Ví dụ 1-5 rất chọn lọc cho thụ thể hNPY2, thậm chí còn chứng minh việc giảm ái lực gắn kết với các thụ thể hNPY5, hNPY4 và hNPY1 so với PYY₃₋₃₆ nguyên thể của người (SEQ ID NO:2).

(2) Hoạt tính cAMP *in vitro* đối với thụ thể NPY2 của người

Mục đích:

Để xác định hoạt tính chức năng *in vitro* của chất tương tự PYY của Ví dụ 1 đến 5 so với PYY₃₋₃₆ nguyên thể của người bằng cách đo sự ức chế sản xuất cAMP nội bào do forskolin gây ra ở các tế bào HEK 293 biểu hiện quá mức thụ thể NPY2 tái tổ hợp của người.

Phương pháp:

Chất tương tự PYY và PYY₃₋₃₆ của người (SEQ ID NO:2) được tổng hợp, được xác định đặc điểm và cất giữ như được mô tả trên đây trong thử nghiệm gắn kết thụ thể.

Tách dòng vô tính thụ thể – Dòng tế bào đã được chuyển nạp ổn định được tạo ra thụ thể hNPY2 bằng cách tách dưới dòng vô tính cDNA thụ thể vào plasmit biểu hiện pcDNA3.1 và chuyển nạp nó vào tế bào HEK 293 tiếp theo là chọn lọc với Geneticin. Các phân ước tế bào (1×10^7 tế bào/mL) ở lần cấy chuyển thứ 9 được tạo ra và giữ đông lạnh trong pha hơi của thùng nitơ lỏng. Các phân ước đông lạnh này được sử dụng tại thời điểm thử nghiệm. Tế bào duy trì khả năng tồn tại hơn 95% trong vài tháng.

Thử nghiệm cAMP hNPY2R - Ức chế sản xuất cAMP gây ra bởi forskolin nhờ chất tương tự PYY hoặc PYY₃₋₃₆ được đo bằng cách sử dụng tế bào HEK 293 biểu hiện

quá mức hNPY2R tái tổ hợp. Các phân uóctê bào đông lạnh được giã đông trong bể nước 37°C. Tế bào được chuyển vào ống dung tích 50 mL với 10 mL môi trường nuôi cấy (Môi trường nuôi cấy tế bào MEM từ Life Tech 11090-081 với FBS 10% từ Life Tech 10082-147, 1 mM L-Glutamin từ Life Tech 25030-081, 1xNEAA từ Life Tech 11140-050, 1 mM natri pyruvat từ Life Tech 11360-070, 1x chất kháng sinh-chất diệt nấm từ Life Tech 15240-062) và được ly tâm 5 phút ở tốc độ 1500 vòng/phút trong máy ly tâm đặt bàn Beckman. Phần nổi trên bề mặt được loại bỏ và viên kết tế bào được tái tạo huyền phù trong 10 mL môi trường nuôi cấy tế bào tiếp theo là đi qua bộ lọc 40 μ m. Đếm chính xác số tế bào và khả năng tồn tại của tế bào được xác định bằng cách sử dụng thiết bị phân tích Vi-Cell từ Beckman-Coulter (Vi-Cell XR 2.03). 8000 tế bào trên mỗi lỗ được dàn vào đĩa thử nghiệm 384 lỗ màu trắng (Corning, được phủ Poly-D-Lysin, màu trắng/đục, cat# 356661) bằng cách sử dụng thiết bị phân tán Combi-Tip (Thermo Scientific). Các đĩa được ly tâm 1 giây ở 1000 vòng/phút và ủ 18 đến 20 giờ ở 37°C trong tủ ẩm có kiểm soát CO₂ 5%. Môi trường nuôi cấy được loại bỏ ra khỏi đĩa thử nghiệm bằng cách vuốt nhẹ trên khăn giấy. 10 μ L dung dịch đệm thử nghiệm [1X HBSS (Hyclone, #SH3026801), 20 mM HEPES, pH 7,5 (Hyclone #SH30237,01), 0,1% khối lượng/thể tích Casein (CTL Scientific Supply Corp., #440203H), 500 μ M IBMX (Sigma-Aldrich #I5876)] được bổ sung vào các lỗ bằng cách sử dụng thiết bị phân tán Combi-Tip tiếp theo là ly tâm trong 10 giây với tốc độ 1500 vòng/phút. Đường cong đáp ứng nồng độ (20 điểm) ở độ pha loãng 2 lần được tạo ra trong DMSO 100% bằng cách sử dụng công nghệ phân tán bằng âm thanh (Labcyte Echo 550). Các tế bào được xử lý bằng chất tương tự PYY hoặc PYY₃₋₃₆ của người trong 45 phút ở 37°C (nồng độ DMSO cuối cùng = 1%), sau đó được kích thích bằng 1 μ M forskolin (Sigma-Aldrich, #F6886) trong 45 phút ở 37°C. CAMP nội bào được định lượng bằng cách sử dụng kit CisBio cAMP-G_i Dynamic (#62AM9PEB). Tóm lại, mức cAMP trong tế bào được phát hiện bằng cách sử dụng chất phản ứng kit HTRF bằng cách bổ sung thể liên hợp cAMP-d2 trong dung dịch ly giải tế bào (10 μ L) tiếp theo là bổ sung kháng thể kháng cAMP - Eu³⁺-Cryptate, cũng trong dung dịch ly giải tế bào (10 μ L). Thử nghiệm cạnh tranh thu được được ủ trong ít nhất 60 phút ở nhiệt độ trong phòng, sau đó đọc trên thiết bị PerkinElmer Envision™ với kích thích ở 320 nm và phát xạ ở 665 nm và 620 nm. Khoảng nồng độ thử nghiệm cuối cùng đối với peptit được thử nghiệm trong đường cong đáp ứng là: Chất tương tự PYY (0,1 μ M đến 0,2 pM) và PYY₃₋₃₆ của người (10 nM

đến 0,02 pM). Đường cong tiêu chuẩn của nồng độ cAMP đã biết (0,5 μ M đến 1 pM) được tạo ra trong dung dịch đệm thử nghiệm. Các lỗ khi không có mặt của chất cạnh tranh đã được bổ sung hoặc với một lượng dư của PYY₃₋₃₆ của người đã được bổ sung được bao gồm trên mỗi đĩa lần lượt dưới dạng đối chứng đáp ứng tối đa và đối chứng ức chế.

Phân tích dữ liệu đối với thử nghiệm cAMP thụ thể hNPY2 – Phát xạ huỳnh quang phân giải theo thời gian được sử dụng để tính toán tỷ lệ huỳnh quang (665 nm/620 nm), tỷ lệ nghịch với lượng cAMP có mặt. Các tín hiệu đối với chất tương tự PYY và PYY₃₋₃₆ của người được chuyển đổi thành nM cAMP trên mỗi lỗ bằng cách sử dụng đường cong chuẩn cAMP được vẽ dưới dạng các đơn vị đáp ứng tương đối (phát xạ ở 665 nm/620 nm * 10.000, trục y) theo nồng độ cAMP (trục x).

Lượng cAMP được tạo ra (nM) trong mỗi lỗ được chuyển đổi thành phần trăm của đáp ứng tối đa quan sát được chỉ với forskolin như được thể hiện trong phương trình dưới đây:

$$\% \text{ mức ức chế đặc hiệu} = \frac{\text{Mức peptit} - \text{Mức đối chứng chất ức chế}}{\text{Mức đáp ứng tối đa} - \text{Mức đối chứng chất ức chế}}$$

trong đó Mức đối chứng chất ức chế là cAMP được tạo ra với sự có mặt của lượng dư PYY₃₋₃₆ của người đã được bổ sung, Mức đáp ứng tối đa là cAMP được tạo ra chỉ với sự có mặt của forskolin, và mức peptit là cAMP được tạo ra với sự có mặt của peptit thử nghiệm.

Phần trăm ức chế đặc hiệu (trục y) được vẽ biểu đồ theo nồng độ của chất cạnh tranh (trục x) và được phân tích bằng cách sử dụng quy trình hồi quy phi tuyến bốn tham số (đỉnh đường cong, đáy đường cong, IC₅₀, độ dốc Hill) (Genedata Screener, phiên bản 13.0.5, Genedata AG, Basal, Thụy Sĩ) như được xác định dưới đây:

$$y = \text{đáy} + \frac{\text{đỉnh} - \text{đáy}}{1 + \left(\frac{x}{\text{IC}_{50}}\right)^{\text{Độ dốc Hill}}}$$

Giá trị IC₅₀ tương đối đại diện cho nồng độ gây ra mức ức chế 50% sự sản xuất cAMP cảm ứng bởi forskolin.

Các giá trị được báo cáo cho IC₅₀ được tính làm giá trị trung bình hình học như được thể hiện dưới đây:

$$\text{Giá trị trung bình hình học} = 10^{(\text{Giá trị trung bình số học của các giá trị Log}_{10} \text{ IC}_{50})}$$

Sai số chuẩn của giá trị trung bình (SEM) được tính toán bằng cách sử dụng phương pháp delta như được thể hiện dưới đây:

$$SEM = \text{Giá trị trung bình hình học} \times \frac{\text{SD của dữ liệu đã chuyển đổi log}}{\text{Căn bậc hai của } n} \times \ln(10),$$

trong đó SD là độ lệch chuẩn, n là số lần chạy độc lập và $\ln(10)$ là logarit tự nhiên của 10.

Kết quả:

Bảng 2: Hoạt tính cAMP *in vitro* đối với thụ thể hNPY2.

Peptit	hNPY2R EC ₅₀ (nM)
PYY ₁₋₃₆	0,12
PYY ₃₋₃₆	0,15
Ví dụ 1	0,07
Ví dụ 2	1,23
Ví dụ 3	0,15
Ví dụ 4	0,06
Ví dụ 5	0,55
Tham chiếu 1 *	0,30
Tham chiếu 2 *	0,23
Tham chiếu 3 *	0,32

* Chất tương tự PYY đã biết để so sánh; xem, Công bố đơn quốc tế số WO 2016/198682, trong đó Tham chiếu 1 tương đương với Hợp chất 4 trong công bố đơn này, Tham chiếu 2 tương đương với Hợp chất 21 trong công bố đơn này, và Tham chiếu 3 tương đương với Hợp chất 32 trong công bố đơn này.

Như được thể hiện trên đây, kết quả từ thử nghiệm cAMP chứng minh hoạt tính chức năng của chất tương tự PYY của Ví dụ 1-5 đối với thụ thể hNPY2, với Ví dụ 2 thể hiện hiệu lực yếu nhất ở hiệu lực thấp hơn 12 lần so với PYY₃₋₃₆ của người.

(3) Hoạt tính GTPγS *in vitro* đối với thụ thể hNPR2

Mục đích:

Để đánh giá sự hoạt hóa qua trung gian thụ thể của G-proteins bằng chất tương tự PYY của Ví dụ 1 đến 5. Sự hoạt hóa qua trung gian thụ thể có thể được đo bằng cách sử dụng chất tương tự GTP không thủy phân được, GTPγ[³⁵S]. Sự kích thích qua trung gian chất chủ vận của thụ thể được kết đôi protein G dẫn đến sự hoạt hóa phức hợp

heterotrimeric $G\alpha\beta\gamma$ -protein được liên kết với màng. Đây là bước đầu tiên trong việc tải nạp các tín hiệu ngoại bào để cải biến các con đường nội bào. Ở đây, thử nghiệm chức năng $GTP\gamma[^{35}S]$ được sử dụng để đánh giá hiệu lực của các chất tương tự PYY khác nhau ở thụ thể hNPY2.

Phương pháp:

Chất tương tự PYY, PYY₁₋₃₆ của người (SEQ ID NO:1) và peptit PYY₃₋₃₆ đối chứng (SEQ ID NO:2) được tổng hợp, được xác định đặc điểm và cất giữ như được mô tả trên đây trong thử nghiệm gắn kết thụ thể.

Đối với mỗi peptit thử nghiệm, đường cong đáp ứng nồng độ (CRC) với độ pha loãng 1/3 log (nồng độ logarit từ -6,52 đến -12,52) được hoàn thành với thiết bị xử lý chất lỏng Hamilton NIMBUS trong dung dịch đệm thử nghiệm (20mM HEPES, pH 7,4, 100mM NaCl, 6mM $MgCl_2$, 1 mM EDTA) được bổ sung 0,2% Bacitracin (U.S. Biologicals #11805) và 0,5% DMSO. Nồng độ thử nghiệm cuối cùng của Bacitracin và DMSO lần lượt là 0,05% và 0,125%. Màng hNPY2R (Multispan #HTS066M) được tạo ra đến nồng độ 7,5ug/mL trong dung dịch đệm thử nghiệm được bổ sung 20 uM GDP (Sigma #G-7127) và 6 ug/mL Saponin (Sigma #S-4521) và màng hNPY2R được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 20 phút trước khi bổ sung vào thử nghiệm. $GTP\gamma S[^{35}S]$ (PerkinElmer #NEG030H) được chuẩn bị trong dung dịch đệm thử nghiệm đến nồng độ 0,6nM. Các giọt WGA SPA (PerkinElmer #RPNQ0001) được chuẩn bị ở nồng độ là 12mg/mL trong dung dịch đệm thử nghiệm. Thử nghiệm được thực hiện trong đĩa 96 lỗ (Costar #3604) bằng cách bổ sung trước tiên 100 uL vào màng hNPY2R, sau đó 50 uL dung dịch CRC, sau đó là 50 uL dung dịch $GTP\gamma S[^{35}S]$ để thể tích cuối cùng là 200 uL. Đĩa được đậy và đặt trên máy lắc quỹ đạo (175 vòng/phút trong 45 phút) ở nhiệt độ trong phòng. Sau đó, 25 uL giọt SPA được bổ sung và đĩa được bịt kín lại và xoay để trộn, sau đó đặt trở lại máy lắc quỹ đạo trong 3 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Sau đó, đĩa được ly tâm trong 5 phút với tốc độ 500 vòng/phút và được đếm trên thiết bị đếm vi đĩa PerkinElmer 2450 trong 1 phút trên mỗi lỗ. Mức gắn kết cơ bản (CPM) được xác định khi không có mặt của chất tương tự PYY hoặc PYY₃₋₃₆ của người và được sử dụng để tính toán phần trăm trên giá trị cơ bản cho mỗi nồng độ của peptit với phương trình sau: $(CPM \text{ của chất tương tự PYY, hoặc của PYY}_{3-36} \text{ của người} - CPM \text{ cơ bản}) / (CPM \text{ cơ bản}) * 100$. Giá trị EC_{50} (nM) được xác định bằng cách đưa logarit của nồng độ và phần trăm giá trị cơ bản vào phân tích hồi quy phi tuyến tính ($\log$ (chất chủ vận) so với đáp

ứng - độ dốc thay đổi (bốn tham số)) trong GraphPad Prism 7.0 bằng cách sử dụng phương trình:

$$Y = \text{Đáy} + (\text{Đỉnh} - \text{Đáy}) / (1 + 10^{((\text{LogEC}_{50} - X) * \text{Độ dốc Hill}))}$$

Giá trị trung bình hình học và sai số chuẩn của giá trị trung bình được tính toán từ các giá trị EC_{50} (nM) bằng cách sử dụng chức năng thống kê cột trong GraphPad Prism 7.0.

Kết quả:

Bảng 3: Hoạt tính $\text{GTP}\gamma\text{S}$ *in vitro* đối với thụ thể hNPY2.

Peptit	hNPY2R EC_{50} (nM)
PYY ₁₋₃₆	0,42
PYY ₃₋₃₆	0,43
Ví dụ 1	0,08
Ví dụ 2	1,83
Ví dụ 3	0,06
Ví dụ 4	0,04
Ví dụ 5	0,16
Tham chiếu 1*	0,22
Tham chiếu 2*	0,13
Tham chiếu 3*	0,11

* Chất tương tự PYY đã biết để so sánh; xem, Công bố đơn quốc tế số WO 2016/198682, trong đó Tham chiếu 1 tương đương với Hợp chất 4 trong công bố đơn này, Tham chiếu 2 tương đương với Hợp chất 21 trong công bố đơn này, và Tham chiếu 3 tương đương với Hợp chất 32 trong công bố đơn này.

Như được thể hiện trên đây, kết quả từ thử nghiệm chức năng $\text{GTP}\gamma[^{35}\text{S}]$ chứng minh hoạt tính của chất tương tự PYY đối với thụ thể hNPY2, với Ví dụ 2 thể hiện hiệu lực yếu nhất ở mức hiệu lực thấp hơn 4 lần so với PYY₃₋₃₆ của người.

(4) Dược động học

Mục đích:

Để điều tra các đặc tính dược động học của chất tương tự PYY.

Phương pháp:

LC/MS – Nồng độ huyết tương của các chất tương tự PYY khác nhau được xác định bằng phương pháp LC/MS. Phương pháp đo toàn bộ hợp chất; peptit cộng với phần mở rộng thời gian được liên kết. Đối với thử nghiệm này, chất tương tự PYY và tiêu chuẩn nội bộ được chiết xuất từ huyết tương chuột nhắt, chuột đồng hoặc khỉ (50 μ L) bằng cách sử dụng metanol với axit fomic 0,1%. Các mẫu được ly tâm và phần nổi trên bề mặt được chuyển sang đĩa kết tủa protein nhiệt. Các mẫu được nạp trên đĩa Sep-Pak tC18 SPE μ Elution, đĩa này được điều hòa với metanol và axit fomic 0,1% trong nước. Các cột SPE được rửa hai lần bằng axit formic 0,1% trong nước. Các hợp chất sau đó được rửa giải bằng cách sử dụng Axit formic/Nước/Axetronitil (0,1:15:85), sau đó được làm khô và hoàn nguyên trước khi tiêm phân ước (10 μ L) vào cột bẫy Thermo Acclaim PepMap100 C18, 300 μ m x 5 mm và cột Thermo Easy Spray PepMap C18, 75 μ m x 15 cm để phân tích LC/MS. Dòng thoát ra từ cột được dẫn vào thiết bị đo khối phổ Thermo Q-Exactive Plus để phát hiện và định lượng.

Dược động học của chất tương tự PYY ở chuột nhắt CD-1 – Dược động học huyết tương của chất tương tự PYY được đánh giá ở chuột nhắt CD-1 sau khi tiêm một liều duy nhất dưới da 200 nmol/kg. Mẫu máu được thu thập từ 2 con vật mỗi thời điểm trong 168 giờ. Do việc lấy mẫu không theo kiểu chuỗi được sử dụng để đánh giá động học của chất tương tự PYY ở chuột nhắt, dữ liệu nồng độ trung bình theo thời gian được sử dụng để lập bảng các thông số dược động học đối với chất tương tự PYY sau một liều duy nhất dưới da 200 nmol/kg. Nồng độ huyết tương của chất tương tự PYY được phát hiện qua 120 giờ sau một lần tiêm dưới da 200 nmol/kg.

Dược động học của chất tương tự PYY ở chuột đồng SD – Dược động học huyết tương của chất tương tự PYY được đánh giá ở chuột đồng Sprague Dawley đực sau khi tiêm một liều duy nhất dưới da 50 nmol/kg. Mẫu máu được thu thập từ 2 con vật mỗi thời điểm trong 168 giờ. Do việc lấy mẫu theo kiểu chuỗi được sử dụng để đánh giá động học của chất tương tự PYY ở chuột đồng, dữ liệu về nồng độ trong động vật riêng rẽ theo thời gian được sử dụng để lập bảng các thông số dược động học đối với chất tương tự PYY sau một liều duy nhất dưới da 50 nmol/kg. Nồng độ trong huyết tương của chất tương tự PYY được phát hiện qua 120 giờ sau khi tiêm dưới da một lần 50 nmol/kg.

Dược động học của chất tương tự PYY ở khỉ Cynomolgus – Dược động học huyết tương của chất tương tự PYY được đánh giá ở khỉ Cynomolgus đực và cái sau khi

tiêm một liều duy nhất dưới da 50 nmol/kg. Mẫu máu được thu thập trong hơn 504 giờ. Do việc lấy mẫu theo kiểu chuỗi được sử dụng để đánh giá động học của chất tương tự PYY ở khí, dữ liệu nồng độ trong động vật riêng rẽ theo thời gian được sử dụng để lập bảng các thông số dược động học đối với chất tương tự PYY sau một liều duy nhất dưới da 50 nmol/kg. Nồng độ trong huyết tương của chất tương tự PYY được phát hiện qua 504 giờ sau một lần tiêm dưới da 50 nmol/kg.

Kết quả:

Bảng 4: Các thông số dược động học trung bình sau một liều tiêm dưới da cho chuột nhắt đực CD-1.

Peptit	Liều lượng (nmol/kg)	T _{1/2} (giờ)	T _{max} (giờ)	C _{max} (nmol/L)	AUC _{inf} (giờ*nmol/L)	CL/F (mL/giờ/kg)
Ví dụ 1	200	15	6	1140	29795	6,71
Ví dụ 2	200	27	12	1014	56198	3,56
Ví dụ 3	200	26	12	1360	52751	3,79
Ví dụ 4	200	15	12	916	31257	6,40

Các từ viết tắt: AUC_{inf} = diện tích dưới đường cong từ 0 đến vô cùng; CL/F = độ thanh thải chia cho mức sinh khả dụng (F); C_{max} = nồng độ tối đa; T_{max} = thời gian ở nồng độ tối đa; T_{1/2} = thời gian bán thải.

Bảng 5: Các thông số dược động học trung bình sau một liều tiêm dưới da cho chuột đồng đực SD.

Peptit	Liều lượng (nmol/kg)	T _{1/2} (giờ)	T _{max} (giờ)	C _{max} (nmol/L)	AUC _{inf} (giờ*nmol/L)	CL/F (mL/giờ/kg)
Ví dụ 1	50	22	12	221	8621	5,83
Ví dụ 3	50	38	12	399	21094	2,39
Ví dụ 4	50	19	8	219	8289	6,41

Các từ viết tắt: AUC_{inf} = diện tích dưới đường cong từ 0 đến vô cùng; CL/F = độ thanh thải chia cho mức sinh khả dụng (F); C_{max} = nồng độ tối đa; T_{max} = thời gian ở nồng độ tối đa; T_{1/2} = thời gian bán thải.

Bảng 6: Các thông số dược động học trung bình sau một liều tiêm dưới da cho khỉ *Cynomolgus*.

Peptit	Liều lượng (nmol/kg)	T _{1/2} (giờ)	T _{max} (giờ)	C _{max} (nmol/L)	AUC _{inf} (giờ*nmol/L)	CL/F (mL/giờ/kg)
Ví dụ 1	50	101	9	500	64552	0,775
Ví dụ 2	50	131	18	583	123173	0,408
Ví dụ 3	50	148	9	599	105839	0,509

Các từ viết tắt: AUC_{inf} = diện tích dưới đường cong từ 0 đến vô cùng; CL/F = độ thanh thải chia cho mức sinh khả dụng (F); C_{max} = nồng độ tối đa; T_{max} = thời gian ở nồng độ tối đa; T_{1/2} = thời gian bán thải.

Kết quả:

Các dữ liệu này chứng minh rằng các hợp chất nêu trên có đặc điểm dược động học thích hợp để sử dụng mỗi tuần một lần.

(5) Độ hòa tan & độ ổn định

Mục đích:

Để xác định khoảng pH hòa tan và độ ổn định của chất tương tự PYY

Phương pháp:

Đánh giá khoảng giá trị hòa tan trực quan – Bột chất tương tự PYY đông khô được hoàn nguyên trong nước ở nồng độ 4 mg/mL, và độ pH được điều chỉnh bằng axit xitric/dung dịch đệm photphat đến độ pH 4. Độ pH của hệ thống được chuẩn độ lên đến độ pH 8 bằng NaCl 0,5 N và sau đó chuẩn độ xuống đến pH 4 bằng HCl 0,5 N.

Đánh giá độ ổn định nhiệt – Dung dịch chất tương tự PYY trong natri photphat 10 mM hoặc 20 mM, độ pH 7,0 ở nồng độ 1 mg/mL hoặc 2 mg/mL được chuẩn bị và ủ ở 4°C và 40°C trong 4 tuần. Các mẫu ở thời điểm 4 tuần được phân tích bằng sắc ký loại trừ kích thước (SEC) và RP-HPLC.

Phương pháp SEC – được thực hiện bằng cách sử dụng cột TOSOH TSKgelG2000SWxl, 7,8 mm ID x 30 cm, 5 um, với thành phần pha động là 50 mM natri photphat, 300 mM NaCl, độ pH 7,0 với axetonitril 20% trong 30 phút với tốc độ dòng 0,5 mL / phút, λ – 214 nm.

Phương pháp RP – được thực hiện bằng cách sử dụng cột Cortecs C18, 2,7 μm , 4,6 x 50 mm, 20% - 45% axetonitril / nước với 0,085% TFA trong 10 phút với tốc độ dòng 1 mL / phút, λ - 214 nm.

Kết quả:

Bảng 7: Độ hòa tan và độ ổn định nhiệt của chất tương tự PYY.

Peptit	Độ hòa tan (khoảng giá trị pH)	Độ ổn định nhiệt (Phosphat 10 hoặc 20 mM, độ pH 7,0)			
		% đỉnh chính RP		% đỉnh chính SEC	
		4°C	40°C	4°C	40°C
Ví dụ 1	> 5,7	95,8	92,9	98,9	95,7
Ví dụ 2	> 5,5	99,7	99,3	99,9	99,6
Ví dụ 3	> 6,1	99,5	97,1	95,2	92,4
Ví dụ 4	> 6,8	96,8	97,5	99,6	98,7
Ví dụ 5	> 5,8	96,8	95,2	99,7	97,5

Như được thể hiện trên đây, tất cả các peptit đều hòa tan ở pH > 7,0. Độ ổn định, được đánh giá bởi RP và SEC, cho thấy rằng các peptit này tương đối ổn định trong điều kiện ứng suất nhiệt mạnh.

Ví dụ 7: Hiệu quả *in vivo* của PYY.

(1) Hiệu quả *in vivo* đối với mức hấp thu thức ăn và thể trọng ở chuột nhắt bình thường

Mục đích:

Để so sánh tác dụng của chất tương tự PYY của Ví dụ 1 đến 5 trong việc làm giảm thể trọng và ức chế mức hấp thu thức ăn ở chuột nhắt bình thường sau một lần tiêm duy nhất.

Phương pháp:

Chuột nhắt đực C57Bl/6 từ Envigo RMS (Indianapolis, IN) được duy trì theo chế độ ăn chow (5008; LabDiet, St. Louis, MO) và được nhốt một mình trong điều kiện có kiểm soát nhiệt độ (74,0°F; 23,3°C) với chu kỳ ánh sáng bình thường 12: 12 giờ và tiếp cận thức ăn và nước uống tự do. Ở 9-10 tuần tuổi, thể trọng không nhịn ăn và khối lượng thực phẩm ban đầu được ghi lại, và các con chuột được dùng một mũi tiêm dưới da duy nhất của tá dược hoặc peptit, tiếp theo là đo hàng ngày của thể trọng và mức hấp

thu thức ăn trong 3 ngày sau khi dùng liều. Phân tích diện tích đường cong (AUC) được tính toán đối với cả thể trọng và mức hấp thu thức ăn so với tá dược. Ví dụ 4 ở 30 nmol/kg được sử dụng làm tiêu chuẩn đánh giá hiệu quả 100% đối với thể trọng và mức hấp thu thức ăn trong mỗi lần chạy của thử nghiệm.

Kết quả:

Bảng 8: Các thay đổi về thể trọng và mức hấp thu thức ăn trong 3 ngày ở chuột C57 / B16 sau một liều dùng duy nhất chất tương tự PYY.

Peptit	Liều lượng (nmol/kg, SC)	Δ Thể trọng (%)*	Δ Mức hấp thu thức ăn (%)*
Ví dụ 1	30	89	103
	100	108	105
Ví dụ 2	100	71	71
	300	117	78
Ví dụ 3	30	98	93
	100	111	100
Ví dụ 4	3	22	12
	10	41	48
	30	100	100
Ví dụ 5	100	70	99
	300	129	118
Tham chiếu 1*	100	87	79
	300	127	104
Tham chiếu 2*	100	62	67
	300	110	85
Tham chiếu 3*	100	50	78
	300	104	99

* Chất tương tự PYY đã biết để so sánh; xem, Công bố đơn quốc tế số WO 2016/198682, trong đó Tham chiếu 1 tương đương với Hợp chất 4 trong đó, Tham chiếu 2 tương đương với Hợp chất 21 trong đó, và Tham chiếu 3 tương đương với Hợp chất 32 trong đó.

** Ví dụ 4 ở 30 nmol/kg (AUC) được đặt ở hiệu quả 100%

Như được thể hiện trên đây, sự giảm về cả thể trọng và mức hấp thu thức ăn chứng minh hiệu quả của chất tương tự PYY *in vivo*, trong đó so sánh về liều lượng cần thiết để có hiệu quả đầy đủ chứng minh sự cải thiện về hiệu quả.

(2) Hiệu quả *in vivo* đối với mức hấp thu thức ăn và thể trọng ở chuột nhắt béo phì do chế độ ăn uống

Mục đích:

Để điều tra hiệu quả của việc dùng liều hàng ngày chất tương tự PYY của Ví dụ 1-5 trong việc làm giảm thể trọng, hoặc một mình hoặc kết hợp với chất chủ vận thụ thể GLP-1, trong khoảng thời gian hai tuần ở chuột béo phì do chế độ ăn (DIO) gây ra.

Phương pháp:

Chuột nhắt đực C57Bl / 6 DIO (Taconic) ở 20 tuần tuổi được duy trì chế độ ăn 60% chất béo khi đưa đến (D12492; Research Diets, New Brunswick, NJ). Các con chuột được nhốt riêng rẽ trong điều kiện có kiểm soát nhiệt độ (74,0°F; 23,3°C) với chu kỳ sáng/tối 12 giờ (đèn vào 22:00) và được tiếp cận thức ăn và nước uống tự do. Sau khoảng thời gian một tuần làm quen với liều lượng tá dược hàng ngày, thể trọng không nhịn ăn được đo, và các con chuột được phân loại ngẫu nhiên theo thể trọng thành các nhóm thử nghiệm (n=6) và tiêm dưới da hàng ngày: tá dược, chất chủ vận thụ thể GLP-1 (GLP-1 RA; SEQ ID NO:15), chất tương tự PYY, hoặc hỗn hợp của chất tương tự PYY cộng với GLP-1 RA. Sau 2 tuần dùng liều, thể trọng không nhịn ăn được ghi lại và các thay đổi về thể trọng trung bình so với tá dược được tính toán. Để xác định hiệu quả bổ sung hoặc hiệp đồng của chất tương tự PYY kết hợp với GLP-1 RA, hiệu quả cao hơn hiệu quả của GLP-1 RA một mình (hiệu quả thực) được tính toán.

Kết quả:

Bảng 9: Các thay đổi về thể trọng trong nghiên cứu kéo dài 2 tuần về chuột béo phì do chế độ ăn với chất tương tự PYY một mình hoặc kết hợp với chất chủ vận thụ thể GLP-1.

Peptit	Liều lượng (nmol/kg, SC)	Δ Thể trọng (%)	
		Một mình PYY	PYY + GLP-1RA*
Ví dụ 1	1	-4	-18
	3	-6	-26
	10	-15	-31

Ví dụ 2	3	ND	-1
	10	ND	-6
	30	2	-11
Ví dụ 3	1	-3	-16
	3	-6	-28
	10	-23	-30
Ví dụ 4	0,3	0	-3
	1	-1	-12
	3	-4	-17
	10	-12	-21
Ví dụ 5	1	-2	-2
	3	0	-11
	10	-2	-18
	30	-3	ND

* Hiệu quả cao hơn hiệu quả của chất chủ vận thụ thể GLP-1 (GLP-1 RA)

Như được thể hiện trên đây, sự giảm về thể trọng với chất tương tự PYY, cả một mình và kết hợp với GLP-1 RA, chứng minh hiệu quả của chất tương tự PYY *in vivo*, trong đó các so sánh về mức độ giảm cân được thực hiện.

(3) Hiệu quả *in vivo* đối với thể trọng và glucoza ở chuột nhất mắc bệnh tiểu đường và béo phì (db/db)

Mục đích:

Để điều tra hiệu quả của việc dùng liều hàng ngày chất tương tự PYY của Ví dụ 1 đến 5 trong việc làm giảm thể trọng và mức glucoza huyết trong thời gian mười ngày ở chuột nhất mắc bệnh tiểu đường và béo phì (db/db).

Phương pháp:

Chuột nhất đực Lepr^{db/db} (db/db) từ Envigo RMS (Indianapolis, IN) được duy trì theo chế độ ăn kiểu chow (5008; LabDiet, St. Louis, MO) và nhốt 5 con mỗi lồng trong điều kiện có kiểm soát nhiệt độ (74,0°F; 23,3°C) với chu kỳ ánh sáng bình thường 12: 12 giờ và tiếp cận thức ăn và nước uống tự do. Ở 8-9 tuần tuổi, thể trọng và mức glucoza huyết được đo bằng cách sử dụng Accu-Check® Glucometers (Roche Diabetes Care, Inc., Indianapolis, IN), tiếp theo là tiêm dưới da hàng ngày tá dược hoặc peptit.

Sau 10 ngày dùng liều, thể trọng và mức glucoza huyết được đo và các thay đổi so với việc xử lý bằng tá được được tính toán.

Kết quả:

Bảng 10: Hiệu quả đối với thể trọng và glucoza huyết ở chuột nhất db/db được xử lý trong 10 ngày.

Peptit	Liều lượng (nmol/kg, SC)	Δ Thể trọng (%)	Δ Glucoza (%)
Ví dụ 1	1	-1	7
	3	-1	-10
	10	-10	-56
	30	-14	-59
Ví dụ 2	30	-5	-40
	100	-9	-60
	300	-17	-67
Ví dụ 3	1	0	0
	3	-5	-7
	10	-9	-50
	30	-15	-53
Ví dụ 4	3	-2	-23
	10	-12	-61
	30	-17	-62
Ví dụ 5	10	-4	-24
	30	-11	-59
	100	-17	-66

Như được thể hiện trên đây, sự giảm về thể trọng và mức glucoza huyết với chất tương tự PYY chứng minh hiệu quả của chất tương tự PYY *in vivo*, trong đó các so sánh về mức độ giảm cân và giảm glucoza được thực hiện.

Kết luận, chất tương tự PYY theo sáng chế thể hiện tính chọn lọc đối với NPY2R. Chúng cũng cho thấy giảm thể trọng phụ thuộc vào liều lượng, như được phản ánh ở chuột bình thường, chuột béo phì do chế độ chế độ ăn và chuột db/db, cũng như

cải thiện glucoza huyết phụ thuộc vào liều lượng ở chuột db/db, với chất tương tự PYY của Ví dụ 1, 3 và 4 đạt hiệu quả nhất, phù hợp với profin *in vitro*.

TRÌNH TỰ

SEQ ID NO:1 – PYY₁₋₃₆ của người

YPIKPEAPGEDASPEELNRYYASLRHYLNLVTRQRY

SEQ ID NO:2 – PYY₃₋₃₆ của người

IKPEAPGEDASPEELNRYYASLRHYLNLVTRQRY

SEQ ID NO:3 – Chất tương tự PYY

PKPEX₇PX₉X₁₀DASPEEX₁₇X₁₈RYYX₂₂X₂₃LRHYLN₃₀LTRQRY

SEQ ID NO:4 – Chất tương tự PYY

PKPEKPGEDASPEEWQRYYAELRHYLNWLTRQRY

SEQ ID NO:5 – Chất tương tự PYY

PKPEKPGEDASPEEWQRYYAELRHYLNELTRQRY

SEQ ID NO:6 – Chất tương tự PYY

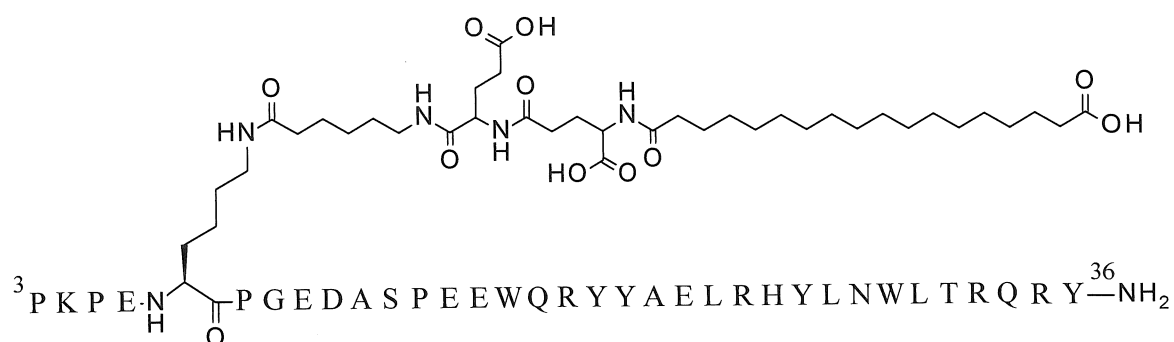
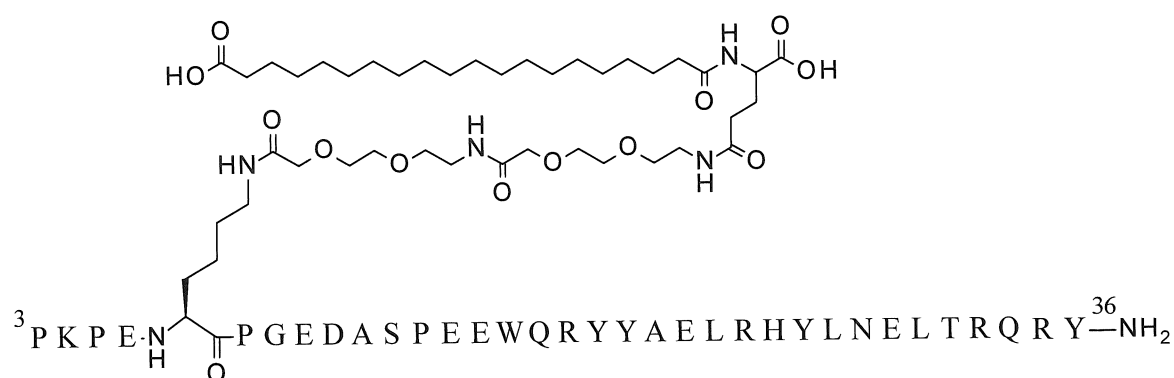
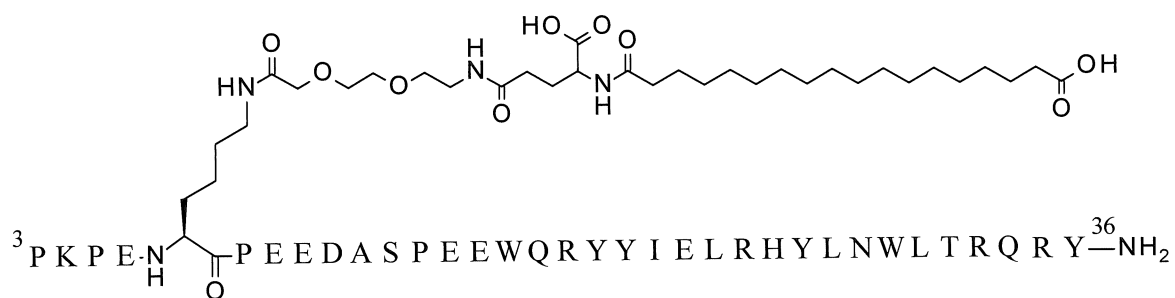
PKPEKPEEDASPEEWQRYYIELRHYLNWLTRQRY

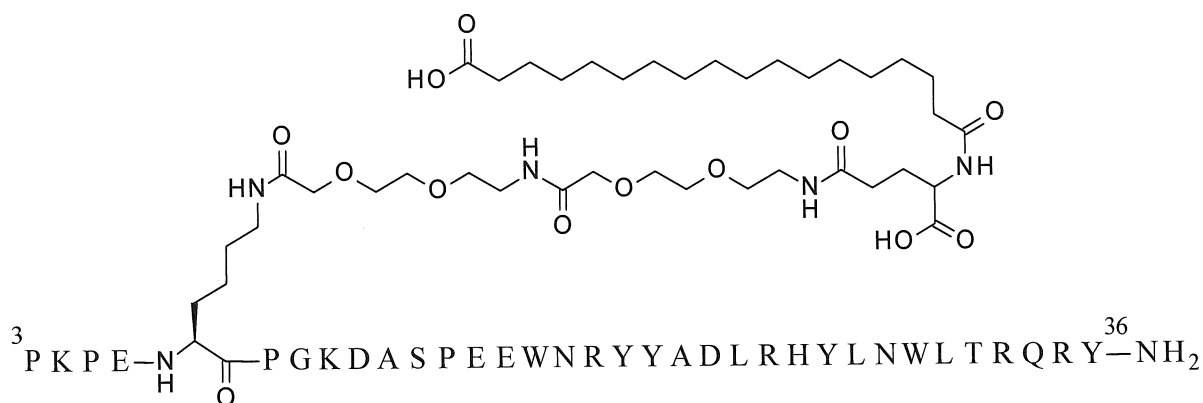
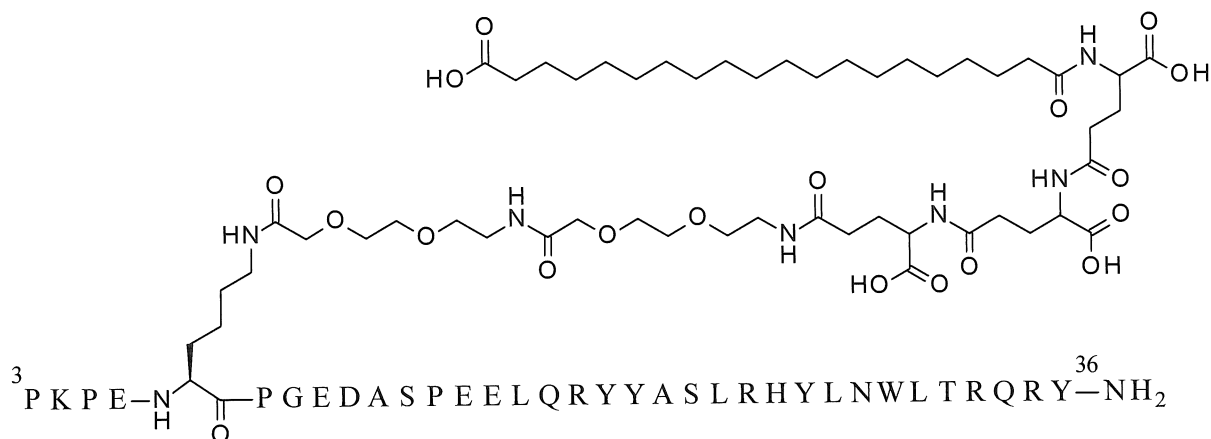
SEQ ID NO:7 – Chất tương tự PYY

PKPEKPGKDASPEEWNRYYADLRHYLNWLTRQRY

SEQ ID NO:8 – Chất tương tự PYY

PKPEKPGEDASPEELQRYYASLRHYLNWLTRQRY

SEQ ID NO:9 – Chất tương tự PYYSEQ ID NO:10 – Chất tương tự PYYSEQ ID NO:11 – Chất tương tự PYY

SEQ ID NO:12 – Chất tương tự PYYSEQ ID NO:13 – Chất tương tự PYYSEQ ID NO:14 – PP₁₋₃₆

APLEPVYPGDNATPEQMAQYAADLRRYINMLTRPRY

SEQ ID NO:15 – GLP-1 RA

HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIWLVKGRGGGGSGGGGSGGGGSESKYGP
 PCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNW
 YVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGL
 PSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE
 SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHN
 HYTQKSLSLSLG

YÊU CẦU BẢO HỘ

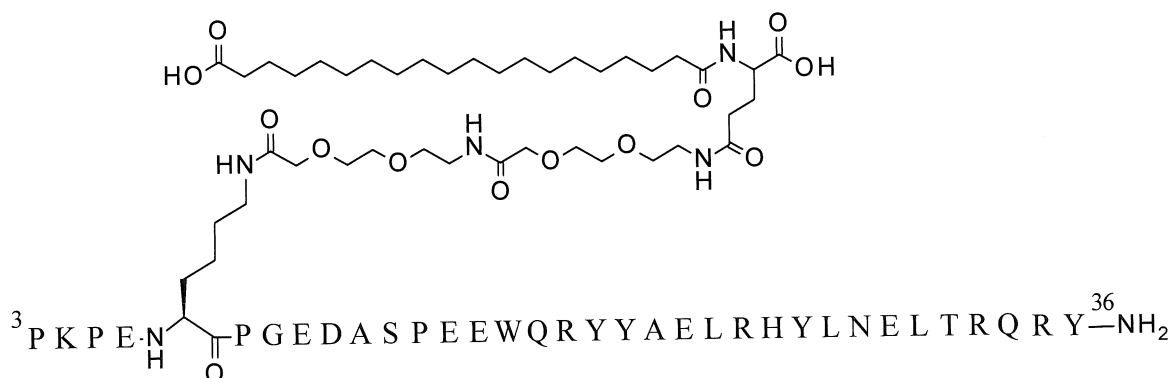
1. Chất tương tự Peptit Tyrosin-Tyrosin (PYY) bao gồm trình tự axit amin:
 PKPEX₇PX₉X₁₀DASPEEX₁₇X₁₈RYYX₂₂X₂₃LRHYLN₃₀LTRQRY (Công thức I),
 trong đó X₇ là axit amin bất kỳ với nhóm chức sẵn có để liên hợp và nhóm chức này
 được liên hợp với axit béo C₁₆-C₂₂, trong đó axit béo C₁₆-C₂₂ được liên hợp với axit amin
 với nhóm chức sẵn có để liên hợp thông qua cầu nối, và trong đó cầu nối có thể là một
 hoặc nhiều đơn vị được chọn từ nhóm bao gồm axit [2-(2-amino-etoxy)-etoxy]-axetic
 (AEEA), axit aminohexanoic (Ahx), axit glutamic (E), axit gamma glutamic (γE) và tổ
 hợp của chúng,
 trong đó X₉ là E hoặc G,
 trong đó X₁₀ là E hoặc K,
 trong đó X₁₇ là L hoặc W,
 trong đó X₁₈ là N hoặc Q,
 trong đó X₂₂ là A hoặc I,
 trong đó X₂₃ là E, D hoặc S,
 trong đó X₃₀ là E hoặc W (SEQ ID NO:3), và
 trong đó axit amin đầu tận cùng C tùy ý được amit hóa.
2. Chất tương tự PYY theo điểm 1, trong đó X₇ được chọn từ nhóm bao gồm C, D, E, K
 và Q.
3. Chất tương tự PYY theo điểm 1, trong đó X₇ là K và sự liên hợp với axit béo C₁₆-C₂₂
 là thông qua nhóm epsilon-amino của chuỗi bên K.
4. Chất tương tự PYY theo điểm 1, trong đó trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao
 gồm:
 PKPEKPGEDASPEEWQRYYAELRHYLNWLTRQRY (SEQ ID NO:4);
 PKPEKPGEDASPEEWQRYYAELRHYLNELTRQRY (SEQ ID NO:5);
 PKPEKPEEDASPEEWQRYYIELRHYLNWLTRQRY (SEQ ID NO:6);
 PKPEKPGKDASPEEWNRYYADLRHYLNWLTRQRY (SEQ ID NO:7); và
 PKPEKPGEDASPEELQRYYASLRHYLNWLTRQRY (SEQ ID NO:8).

6. Chất tương tự PYY theo điểm 5, trong đó axit béo C₁₆-C₂₂ là axit béo C₁₈-C₂₀.

8. Chất tương tự PYY theo điểm 1, trong đó axit béo C₁₆-C₂₂ được chọn từ nhóm bao gồm axit palmitic, axit stearic, axit arachidic và axit eicosanoic.

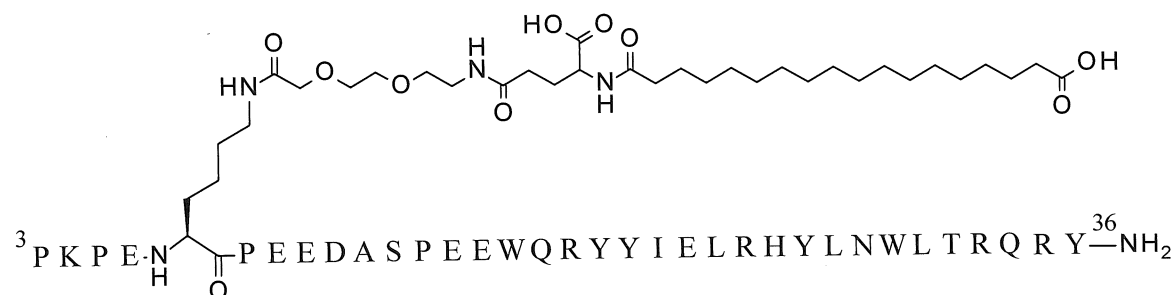
NC(=O)C[C@H](CCCCNC(=O)CCCCNC(=O)C[C@@H](NC(=O)C[C@@H](NC(=O)CCCCCCCCCCCCCCCCCCCC(=O)O)C(=O)O)C(=O)O)C(=O)O

10. Chất tương tự PYY theo điểm 1, trong đó trình tự axit amin là:



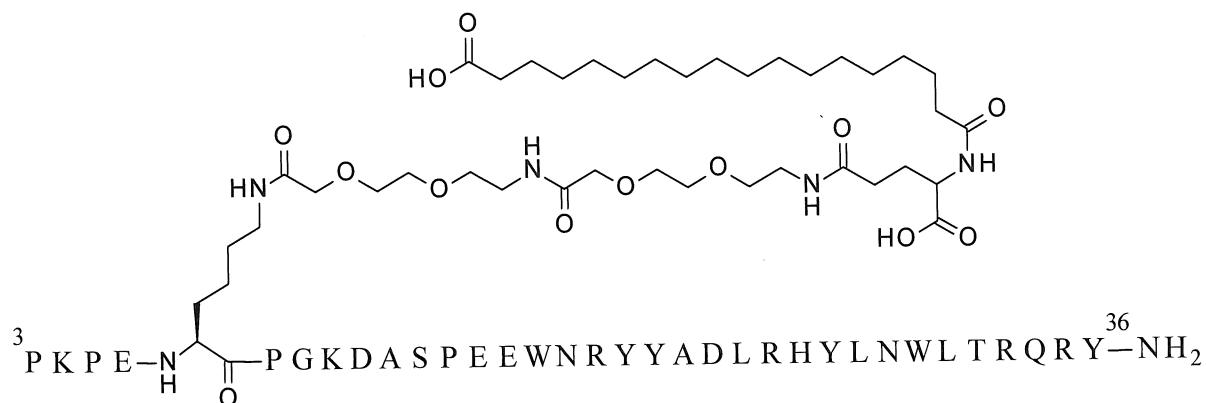
(SEQ ID NO:10).

11. Chất tương tự PYY theo điểm 1, trong đó trình tự axit amin là:



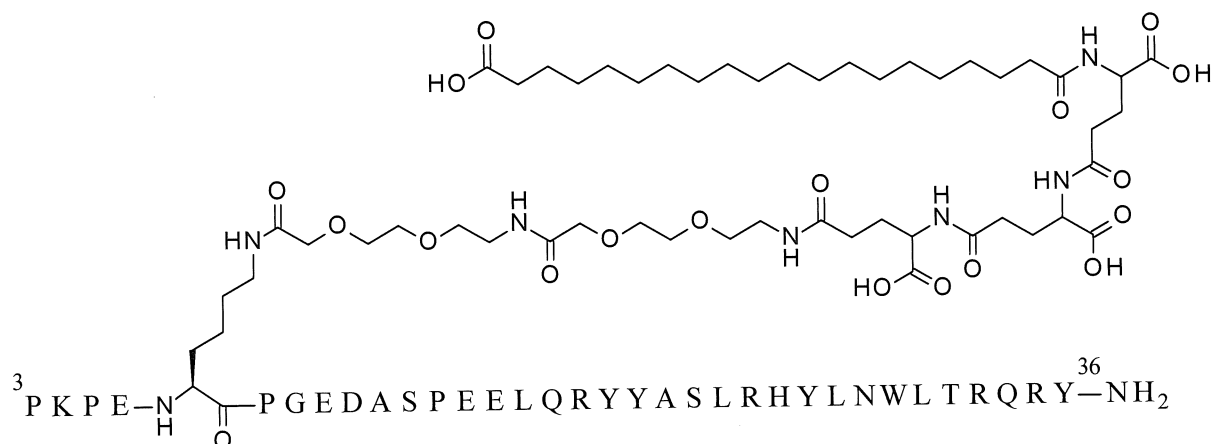
(SEQ ID NO:11).

12. Chất tương tự PYY theo điểm 1, trong đó trình tự axit amin là:



(SEQ ID NO:12).

13. Chất tương tự PYY theo điểm 1, trong đó trình tự axit amin là:



(SEQ ID NO:13).

14. Chất tương tự PYY theo điểm 1, trong đó cầu nối và axit béo cùng nhau được chọn từ nhóm bao gồm $(AEEA)_2 \cdot \gamma E \cdot \text{diaxit}$ có 20 nguyên tử cacbon, $Ahx \cdot E \cdot \gamma E \cdot \text{diaxit}$ có 18 nguyên tử cacbon, và $AEEA \cdot \gamma E \cdot \text{diaxit}$ có 18 nguyên tử cacbon.

15. Dược phẩm chứa:

ít nhất một chất tương tự Peptit Tyrosin-Tyrosin (PYY) theo điểm 1 hoặc muối của nó; và

một hoặc nhiều chất mang, chất pha loãng và tá dược được dụng.

16. Dược phẩm theo điểm 15, trong đó dược phẩm này còn chứa tác nhân điều trị bổ sung.

17. Dược phẩm theo điểm 16, trong đó tác nhân điều trị bổ sung là incretin được chọn từ nhóm bao gồm glucagon (GCG), chất tương tự GCG, peptit-1 giống glucagon (GLP-1), GLP-1₇₋₃₆-amit, chất tương tự GLP-1, peptit ức chế dạ dày (GIP), chất tương tự GIP, oxyntomodulin (OXM), chất tương tự OXM, GIP/GLP-1, GLP-1/GCG, hoặc chất tương tự incretin có hoạt tính ba thụ thể.

18. Dược phẩm theo điểm 16, trong đó tác nhân điều trị bổ sung là chất ức chế dipeptidyl peptidaza-IV (DPP-IV).

19. Chất tương tự PYY theo điểm 14, trong đó $(AEEA)_2 \cdot \gamma E \cdot \text{diaxit}$ có 20 nguyên tử cacbon là $(AEEA)_2 - (\gamma E) - CO - (CH_2)_{18} - COOH$, trong đó $Ahx \cdot E \cdot \gamma E \cdot \text{diaxit}$ có 18 nguyên tử cacbon là $(Ahx - E - (\gamma E) - CO - (CH_2)_{16} - COOH$, và trong đó $AEEA \cdot \gamma E \cdot \text{diaxit}$ có 18 nguyên tử cacbon là $(AEEA) - (\gamma E) - CO - (CH_2)_{16} - COOH$.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Eli Lilly and Company

<120> CHẤT TƯƠNG TỰ PEPTIT TYROSIN-TYROSIN VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA CHẤT NÀY

<130> X21917

<160> 15

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 36

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 1

Tyr	Pro	Ile	Lys	Pro	Glu	Ala	Pro	Gly	Glu	Asp	Ala	Ser	Pro	Glu	Glu
1				5					10					15	

Leu	Asn	Arg	Tyr	Tyr	Ala	Ser	Leu	Arg	His	Tyr	Leu	Asn	Leu	Val	Thr
			20					25					30		

Arg	Gln	Arg	Tyr
			35

<210> 2

<211> 34

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 2

Ile	Lys	Pro	Glu	Ala	Pro	Gly	Glu	Asp	Ala	Ser	Pro	Glu	Glu	Leu	Asn
1				5					10					15	

Arg	Tyr	Tyr	Ala	Ser	Leu	Arg	His	Tyr	Leu	Asn	Leu	Val	Thr	Arg	Gln
			20					25					30		

Arg	Tyr
-----	-----

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

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<220>
<221> DẤU HIỆU HỖN HỢP
<222> (5)..(5)
<223> Xaa ở vị trí 5 là axit amin bất kỳ với nhóm chức có sẵn để liên hợp và nhóm chức này được liên hợp với axit béo C16-C22

<220>
<221> DẤU HIỆU HỖN HỢP
<222> (7)..(7)
<223> Xaa ở vị trí 7 là E hoặc G

<220>
<221> DẤU HIỆU HỖN HỢP
<222> (8)..(8)
<223> Xaa ở vị trí 8 là E hoặc K

<220>
<221> DẤU HIỆU HỖN HỢP
<222> (15)..(15)
<223> Xaa ở vị trí 15 là L hoặc W

<220>
<221> DẤU HIỆU HỖN HỢP
<222> (16)..(16)
<223> Xaa ở vị trí 16 là N hoặc Q

<220>
<221> DẤU HIỆU HỖN HỢP
<222> (20)..(20)
<223> Xaa ở vị trí 20 là A hoặc I

<220>
<221> DẤU HIỆU HỖN HỢP
<222> (21)..(21)
<223> Xaa ở vị trí 21 là E, D, hoặc S

<220>
<221> DẤU HIỆU HỖN HỢP

<222> (28)..(28)

<223> Xaa ở vị trí 28 là E hoặc W

<400> 3

Pro	Lys	Pro	Glu	Xaa	Pro	Xaa	Xaa	Asp	Ala	Ser	Pro	Glu	Glu	Xaa	Xaa
1				5					10					15	

Arg	Tyr	Tyr	Xaa	Xaa	Leu	Arg	His	Tyr	Leu	Asn	Xaa	Leu	Thr	Arg	Gln
			20					25					30		

Arg Tyr

<210> 4

<211> 34

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 4

Pro	Lys	Pro	Glu	Lys	Pro	Gly	Glu	Asp	Ala	Ser	Pro	Glu	Glu	Trp	Gln
1				5					10					15	

Arg	Tyr	Tyr	Ala	Glu	Leu	Arg	His	Tyr	Leu	Asn	Trp	Leu	Thr	Arg	Gln
			20					25					30		

Arg Tyr

<210> 5

<211> 34

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 5

Pro Lys Pro Glu Lys Pro Gly Glu Asp Ala Ser Pro Glu Glu Trp Gln
 1 5 10 15

Arg Tyr Tyr Ala Glu Leu Arg His Tyr Leu Asn Glu Leu Thr Arg Gln
 20 25 30

Arg Tyr

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

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 6

Pro Lys Pro Glu Lys Pro Glu Glu Asp Ala Ser Pro Glu Glu Trp Gln
 1 5 10 15

Arg Tyr Tyr Ile Glu Leu Arg His Tyr Leu Asn Trp Leu Thr Arg Gln
 20 25 30

Arg Tyr

<210> 7
 <211> 34
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 7

Pro Lys Pro Glu Lys Pro Gly Lys Asp Ala Ser Pro Glu Glu Trp Asn
 1 5 10 15

Arg Tyr Tyr Ala Asp Leu Arg His Tyr Leu Asn Trp Leu Thr Arg Gln

20

25

30

Arg Tyr

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

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 8

Pro	Lys	Pro	Glu	Lys	Pro	Gly	Glu	Asp	Ala	Ser	Pro	Glu	Glu	Leu	Gln
1				5					10					15	

Arg	Tyr	Tyr	Ala	Ser	Leu	Arg	His	Tyr	Leu	Asn	Trp	Leu	Thr	Arg	Gln
			20					25					30		

Arg Tyr

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

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<220>
 <221> GỐC BIẾN ĐỔI
 <222> (5)..(5)
 <223> Lys ở vị trí 5 được biến đổi hóa học bằng sự liên hợp của nhóm epsilon-amino của chuỗi bên Lys với Ahx-axit glutamic-axit gamma glutamic-CO-(CH₂)₁₆-CO₂H

<220>
 <221> GỐC BIẾN ĐỔI
 <222> (34)..(34)
 <223> AMIT HÓA

<400> 9

Pro Lys Pro Glu Lys Pro Gly Glu Asp Ala Ser Pro Glu Glu Trp Gln
 1 5 10 15

Arg Tyr Tyr Ala Glu Leu Arg His Tyr Leu Asn Trp Leu Thr Arg Gln
 20 25 30

Arg Tyr

<210> 10

<211> 34

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<220>

<221> GỐC BIẾN ĐỔI

<222> (5)..(5)

<223> Lys ở vị trí 5 được biến đổi hóa học bằng sự liên hợp của nhóm epsilon-amino chuỗi bên Lys với (AEEA)2-axit gamma glutamic-CO-(CH₂)₁₈-CO₂H

<220>

<221> GỐC BIẾN ĐỔI

<222> (34)..(34)

<223> AMIT HÓA

<400> 10

Pro Lys Pro Glu Lys Pro Gly Glu Asp Ala Ser Pro Glu Glu Trp Gln
 1 5 10 15

Arg Tyr Tyr Ala Glu Leu Arg His Tyr Leu Asn Glu Leu Thr Arg Gln
 20 25 30

Arg Tyr

<210> 11
 <211> 34
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<220>
 <221> GỐC BIẾN ĐỔI
 <222> (5)..(5)
 <223> Lys ở vị trí 5 được biến đổi hóa học bằng sự liên hợp của nhóm epsilon-amino của chuỗi bên Lys với AEEA-axit gamma glutamic-CO-(CH₂)₁₆-CO₂H

<220>
 <221> GỐC BIẾN ĐỔI
 <222> (34)..(34)
 <223> AMIT HÓA

<400> 11

Pro	Lys	Pro	Glu	Lys	Pro	Glu	Glu	Asp	Ala	Ser	Pro	Glu	Glu	Trp	Gln
1				5					10					15	

Arg	Tyr	Tyr	Ile	Glu	Leu	Arg	His	Tyr	Leu	Asn	Trp	Leu	Thr	Arg	Gln
			20					25					30		

Arg Tyr

<210> 12
 <211> 34
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<220>
 <221> GỐC BIẾN ĐỔI
 <222> (5)..(5)

<223> Lys ở vị trí 5 được biến đổi hóa học bằng sự liên hợp của nhóm epsilon-amino của chuỗi bên Lys với (AEEA)2-axit gamma glutamic-CO-(CH₂)₁₆-CO₂H

<220>

<221> GỐC BIẾN ĐỔI

<222> (34)..(34)

<223> AMIT HÓA

<400> 12

Pro	Lys	Pro	Glu	Lys	Pro	Gly	Lys	Asp	Ala	Ser	Pro	Glu	Glu	Trp	Asn
1				5					10					15	

Arg	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Leu	Arg	His	Tyr	Leu	Asn	Trp	Leu	Thr	Arg	Gln
			20					25					30		

Arg Tyr

<210> 13

<211> 34

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<220>

<221> GỐC BIẾN ĐỔI

<222> (5)..(5)

<223> Lys ở vị trí 5 được biến đổi hóa học bằng sự liên hợp của nhóm epsilon-amino của chuỗi bên Lys với (AEEA)2-(axit gamma glutamic)3-CO-C₁₈-CO₂H

<220>

<221> GỐC BIẾN ĐỔI

<222> (34)..(34)

<223> AMIT HÓA

<400> 13

Pro	Lys	Pro	Glu	Lys	Pro	Gly	Glu	Asp	Ala	Ser	Pro	Glu	Glu	Leu	Gln
1				5					10					15	

Arg Tyr Tyr Ala Ser Leu Arg His Tyr Leu Asn Trp Leu Thr Arg Gln
 20 25 30

Arg Tyr

<210> 14
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 14

Ala Pro Leu Glu Pro Val Tyr Pro Gly Asp Asn Ala Thr Pro Glu Gln
 1 5 10 15

Met Ala Gln Tyr Ala Ala Asp Leu Arg Arg Tyr Ile Asn Met Leu Thr
 20 25 30

Arg Pro Arg Tyr
 35

<210> 15
 <211> 274
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 15

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

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

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ser
 35 40 45

Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly
 50 55 60

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 65 70 75 80

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln
 85 90 95

Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 100 105 110

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr
 115 120 125

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 130 135 140

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile
 145 150 155 160

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 165 170 175

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
 180 185 190

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 195 200 205

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 210 215 220

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val
 225 230 235 240

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
245 250 255

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
260 265 270

Leu Gly