



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

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

(11)



1-0048434

(51)^{2021.01} C07K 14/605; A61K 38/26

(13) B

(21) 1-2022-04410

(22) 11/12/2020

(86) PCT/US2020/064512 11/12/2020

(87) WO2021/126695 24/06/2021

(30) 62/949,661 18/12/2019 US

(45) 25/07/2025 448

(43) 26/09/2022 414A

(73) ELI LILLY AND COMPANY (US)

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

(72) ABRAHAM, Milata Mary (US); ALSINA-FERNANDEZ, Jorge (US); COSKUN, Tamer (US); QU, Hongchang (CN); WALLIS, James Lincoln (US).

(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) HỢP CHẤT TƯƠNG TỰ INCRETIN VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA CHÚNG

(21) 1-2022-04410

(57) Sáng chế đề cập đến các chất tương tự incretin có hoạt tính ở từng thụ thể trong số các thụ thể polypeptit hướng insulin phụ thuộc glucoza (GIP), peptit giống glucagon-1 (GLP-1) và glucagon (GCG). Các chất tương tự incretin này có các đặc điểm cấu trúc dẫn đến hoạt tính cân bằng và thời gian tác động kéo dài ở từng thụ thể trong số các thụ thể này. Sáng chế cũng đề cập đến dược phẩm chứa các chất tương tự incretin này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Bản mô tả đề cập đến các chất tương tự incretin có hoạt tính ở từng thụ thể trong số thụ thể polypeptit tiết insulin phụ thuộc glucoza (glucose-dependent insulintropic polypeptide - GIP), thụ thể peptit-1 giống glucagon (glucagon-like peptide-1 - GLP-1) và thụ thể glucagon (GCG). Các chất tương tự incretin ở đây có các đặc điểm cấu trúc đem lại hạt tính cân bằng ở từng thụ thể trong số các thụ thể này và có khoảng thời gian tác động kéo dài. Các chất tương tự incretin như vậy có thể hữu dụng để điều trị các tình trạng, bệnh và rối loạn bao gồm tiểu đường typ 2 (T2DM), rối loạn lipid máu, hội chứng chuyển hóa, bệnh gan nhiễm mỡ không do rượu (NAFLD), viêm gan nhiễm mỡ không do rượu (NASH) và/hoặc bệnh béo phì, cũng như các bệnh tim mạch không được coi là các bệnh chuyển hóa và các bệnh thoái hóa thần kinh.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Trong vài thập kỷ qua, tỷ lệ mắc bệnh tiểu đường tiếp tục gia tăng. T2DM là dạng phổ biến nhất của bệnh tiểu đường, chiếm khoảng 90% tất cả các bệnh tiểu đường. T2DM đặc trưng bởi mức glucoza trong máu cao bắt nguồn từ sự kháng insulin. Tiêu chuẩn chăm sóc hiện nay đối với bệnh T2DM bao gồm chế độ ăn và tập luyện, cũng như điều trị bằng thuốc dùng đường miệng và các thuốc làm giảm glucoza dùng đường tiêm, bao gồm các liệu pháp trên cơ sở incretin, như chất chủ vận thụ thể GLP-1.

GLP-1 là peptit gồm 36 axit amin, đoạn có chức năng sinh học chính của peptit này được tạo ra dưới dạng peptit gồm 30 axit amin, được amit hóa ở đầu tận cùng C (GLP-1₇₋₃₆; SEQ ID NO:2) mà kích thích sự tiết insulin phụ thuộc glucoza và ngăn ngừa sự tăng đường huyết ở bệnh tiểu đường. Nhiều chất tương tự GLP-1 khác nhau hiện có để điều trị T2DM, bao gồm dulaglutide, exenatide và liraglutide. Tuy nhiên, nhiều chất tương tự GLP-1 hiện được thương mại hóa bị giới hạn về liều do tác dụng phụ đến dạ dày ruột, như buồn nôn và nôn. Khi điều trị bằng các thuốc dùng qua đường miệng và các liệu pháp trên cơ sở incretin là không đủ, việc điều trị bằng insulin được xem xét. Mặc dù có nhiều lựa chọn điều trị, một số lượng đáng kể cá thể được điều trị bằng các liệu pháp đã được chấp thuận không đạt được mục đích kiểm soát glucoza huyết (*xem, ví dụ, Casagrande et al. (2013) Diabetes Care 36:2271-2279*).

Bệnh tiểu đường không được kiểm soát có thể dẫn đến một hoặc nhiều tình trạng mà ảnh hưởng đến tỷ lệ mắc bệnh và tỷ lệ tử vong của các cá thể như vậy. Một trong số các yếu tố nguy cơ chính đối với T2DM là bệnh béo phì, và nhiều cá thể mắc T2DM (~90%) bị thừa cân hoặc béo phì. Đã chứng minh được rằng giảm sự phát phì cơ thể sẽ dẫn đến cải thiện tỷ lệ mắc bệnh đồng thời có liên quan đến béo phì bao gồm các trường hợp tăng glucoza huyết và các biến cố tim mạch. Vì vậy, các liệu pháp hữu hiệu trong kiểm soát mức glucoza và giảm thể trọng là cần thiết để kiểm soát bệnh tốt hơn.

Về mặt này, các liệu pháp mới đang được nghiên cứu bao gồm các hợp chất không chỉ có hoạt tính ở thụ thể GLP-1 mà còn có hoạt tính ở một hoặc nhiều thụ thể khác, như thụ thể GIP và/hoặc GCG. Trên thực tế, các hợp chất nhất định đã được mô tả là có hoạt tính chủ vận bộ ba (*tức là*, hoạt tính ở từng thụ thể trong số các thụ thể GIP, GLP-1 và GCG). Chẳng hạn, công bố đơn quốc tế số WO 2015/067716 mô tả các chất tương tự GCG có hoạt tính chủ vận bộ ba. Tương tự, công bố đơn quốc tế số WO 2016/198624 mô tả các chất tương tự exendin-4 có hoạt tính chủ vận bộ ba. Tương tự, công bố đơn quốc tế số WO 2014/049610 và WO 2017/116204 mô tả nhiều hợp chất khác nhau có hoạt tính chủ vận bộ ba. Hơn nữa, công bố đơn quốc tế số WO 2017/153575 mô tả các chất đồng chủ vận GCG và GLP-1 mà cũng được cho là có hoạt tính chủ vận thụ thể GIP.

Mặc dù thường được sử dụng để điều trị T2DM, các incretin và các chất tương tự của chúng có hoạt tính ở một hoặc nhiều thụ thể trong số các thụ thể GIP, GLP-1 và/hoặc GCG cũng đã được mô tả là có tiềm năng về giá trị điều trị ở một số tình trạng, bệnh hoặc rối loạn khác, chẳng hạn bao gồm bệnh Alzheimer, các rối loạn liên quan đến xương, rối loạn lipid máu, hội chứng chuyển hóa, NAFLD và NASH, bệnh béo phì và bệnh Parkinson. Xem, ví dụ., Jall *et al.* (2017) *Mol. Metab.* 6:440-446; Carbone *et al.* (2016) *J. Gastroenterol. Hepatol.* 31:23-31; Finan *et al.* (2016) *Trends Mol. Med.* 22:359-376; Choi *et al.* (2017) *Potent body weight loss and efficacy in a NASH animal model by a novel long-acting GLP-1/Glucagon/GIP triple-agonist (HM15211)*, ADA Poster 1139-P; Ding (2008) *J. Bone Miner. Res.* 23:536-543; Tai *et al.* (2018) *Brain Res.* 1678:64-74; Müller *et al.* (2017) *Physiol. Rev.* 97:721-766; Finan *et al.* (2013) *Sci. Transl. Med.* 5:209; Hölscher (2014) *Biochem. Soc. Trans.* 42:593-600.

Tuy nhiên, vẫn có nhu cầu điều trị các tình trạng, bệnh và rối loạn như vậy, đặc biệt là T2DM, mà có thể tạo ra tác dụng kiểm soát glucoza hiệu quả, với các lợi ích về

giảm cân và/hoặc profin tác dụng phụ có lợi. Cũng có nhu cầu về các tác nhân điều trị sẵn có để sử dụng trong khoảng thời gian tác động kéo dài đủ để cho phép định liều không thường xuyên như một lần một ngày, ba lần một tuần, hai lần một tuần hoặc một lần một tuần.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Các chất tương tự incretin ở đây được trình bày là giải quyết được những nhu cầu nêu trên. Theo đó, bản mô tả bộc lộ các chất tương tự incretin với hoạt tính ở từng thụ thể trong số các thụ thể GIP, GLP-1 và GCG. Có lợi là, các chất tương tự incretin ở đây có hoạt tính cân bằng ở những thụ thể này, nhờ đó cho phép sử dụng liều mà tạo ra đủ hoạt tính ở từng thụ thể để cung cấp những lợi ích chủ vận thụ thể đó trong khi tránh được các tác dụng phụ không mong muốn có liên quan đến hoạt tính quá mức. Hơn nữa, các chất tương tự incretin ở đây có thời gian tác động kéo dài ở từng thụ thể trong số các thụ thể GIP, GLP-1 và GCG cho phép định liều không thường xuyên như một lần một ngày, ba lần một tuần, hai lần một tuần hoặc một lần một tuần. Theo cách này, các chất tương tự incretin tăng cường kiểm soát mức glucoza, các lợi ích chuyển hóa như giảm thể trọng và/hoặc cải thiện thành phần cơ thể, các lợi ích về chất béo như giảm proprotein convertaza subtilisin/kexin typ 9 (PCSK9), và/hoặc những lợi ích khác như tăng khối lượng xương hoặc hình thành xương hoặc giảm tái hấp thụ xương. Bản mô tả cũng đề cập đến các phép điều trị hữu hiệu các tình trạng, bệnh và rối loạn bao gồm T2DM, rối loạn lipid máu, hội chứng chuyển hóa, NAFLD, NASH và/hoặc bệnh béo phì.

Theo đó, trước hết phần mô tả đề cập đến các chất tương tự incretin bao gồm các trình tự axit amin cơ sở:

YX₂QGTX₆TSDX₁₀SIX₁₃LDX₁₆X₁₇AQX₂₀X₂₁FIX₂₄X₂₅LLEGGPSSGEPPPX₃₉,

trong đó X₂ là Aib, X₆ là αMeF(2F), X₁₀ là Y hoặc 4Pal, X₁₃ là L hoặc αMeL, X₁₆ là O, X₁₇ là axit amin bất kỳ với nhóm chức khả dụng để liên hợp và nhóm chức này được liên hợp với gốc axit béo C₁₆-C₂₂, X₂₀ là 4Pal, Iva hoặc αMeL, X₂₁ là A hoặc Aib, X₂₄ là E hoặc e, X₂₅ là Y hoặc αMeY, và X₃₉ là E hoặc S (SEQ ID NO:5), và trong đó axit amin đầu tận cùng carboxy (đầu tận cùng C) tùy ý được amit hóa, hoặc muối được dụng của nó.

Trong một số trường hợp, axit amin với nhóm chức khả dụng để liên hợp ở vị trí X_{17} là C, D, E, K hoặc Q. Trong các trường hợp nhất định, axit amin với nhóm chức khả dụng để liên hợp ở vị trí X_{17} là K.

Trong các trường hợp nhất định, X_2 là Aib, X_6 là α MeF(2F), X_{10} là Y, X_{13} là L, X_{16} là O, X_{17} là K, X_{20} là 4Pal, X_{21} là A, X_{24} là E, X_{25} là Y và X_{39} là E, sao cho chất tương tự incretin bao gồm trình tự axit amin cơ sở:

Y-Aib-QGT- α MeF(2F)-TSDYSILLDOKAQ-4Pal-AFIEYLLEGGPSSGEPPE
(SEQ ID NO:6).

Trong các trường hợp nhất định, X_2 là Aib, X_6 là α MeF(2F), X_{10} là Y, X_{13} là α MeL, X_{16} là O, X_{17} là K, X_{20} là Iva, X_{21} là A, X_{24} là E, X_{25} là α MeY và X_{39} là S, sao cho chất tương tự incretin bao gồm trình tự axit amin cơ sở:

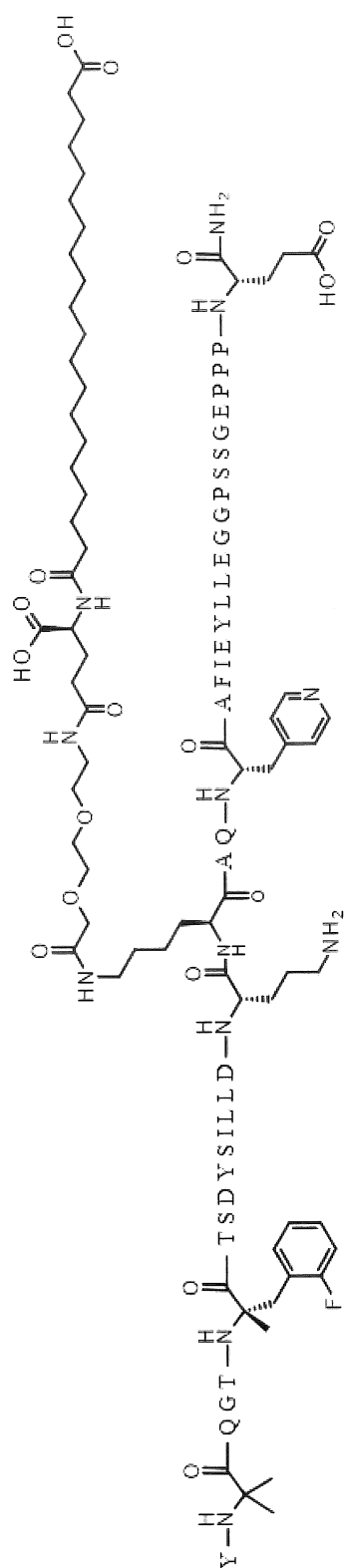
Y-Aib-QGT- α MeF(2F)-TSDYSI- α MeL-LDOKAQ-Iva-AFIE- α MeY-
LLEGGPSSGEP PPS (SEQ ID NO:7).

Trong các trường hợp nhất định, X_2 là Aib, X_6 là α MeF(2F), X_{10} là 4Pal, X_{13} là α MeL, X_{16} là O, X_{17} là K, X_{20} là α MeL, X_{21} là Aib, X_{24} là e, X_{25} là α MeY và X_{39} là S, sao cho chất tương tự incretin bao gồm trình tự axit amin cơ sở:

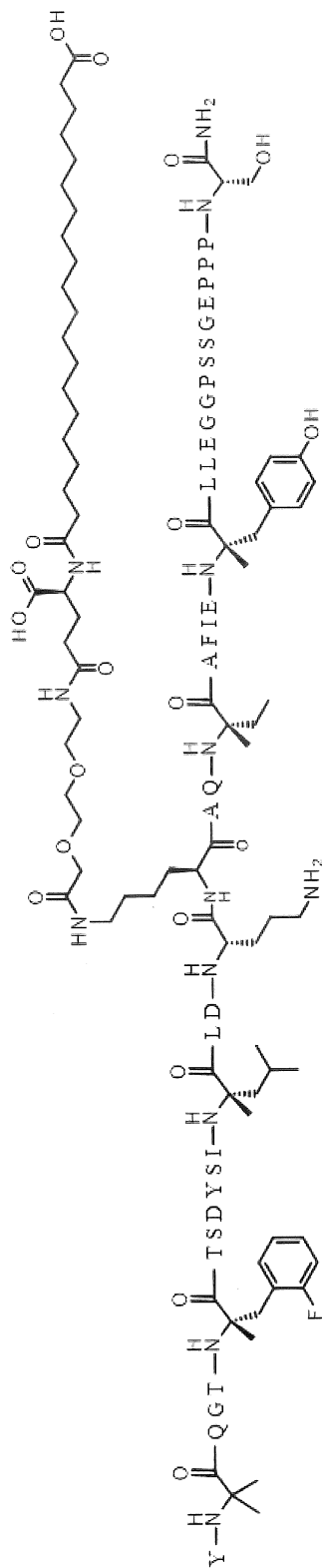
Y-Aib-QGT- α MeF(2F)-TSD-4Pal-SI- α MeL-LDOKAQ- α MeL-Aib-FIe- α MeY-
LLEGGP SSGEP PPS (SEQ ID NO:8).

Trong một số trường hợp, gốc axit béo C_{16} - C_{22} được liên hợp với axit amin với nhóm chức khả dụng để liên hợp thông qua cầu liên kết. Trong các trường hợp nhất định, gốc axit béo C_{16} - C_{22} có cấu trúc $-\text{CO}-(\text{CH}_2)_a-\text{CO}_2\text{H}$, trong đó a là số nguyên từ 16 đến 22. Trong các trường hợp nhất định, gốc axit béo là diacid C_{18} hoặc C_{20} . Tương tự, và trong một số trường hợp, cầu liên kết là một hoặc nhiều đơn vị trong số [2-(2-amino-etoxy)-etoxy]-axetyl (AEEA), axit aminohexanoic (Ahx), E, axit γ -glutamic (γ E) hoặc tổ hợp của chúng.

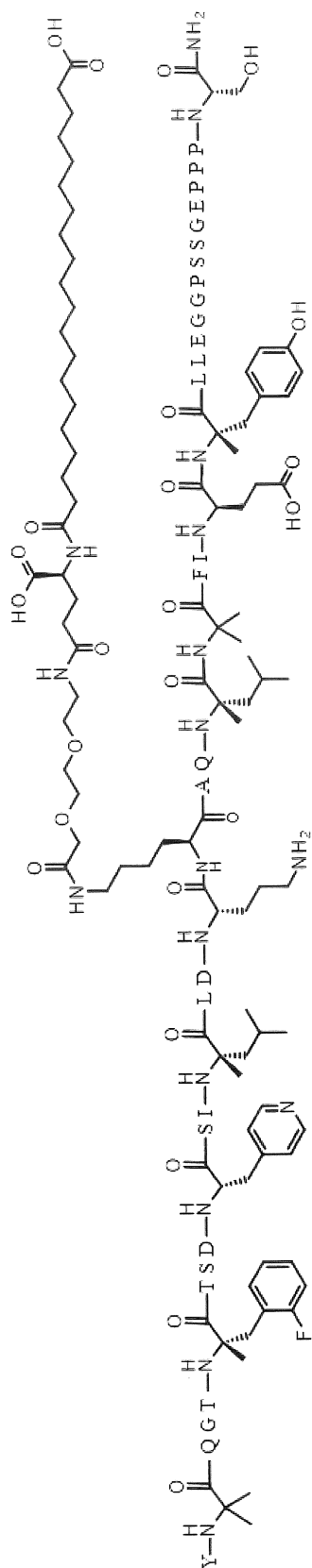
Trong các trường hợp cụ thể, chất tương tự incretin ở đây, bao gồm cầu liên kết và gốc axit béo, có thể là một trong số các trình tự:



(SEQ ID NO:9),



(SEQ ID NO:10), hoặc



(SEQ ID NO:11).

Thứ hai, được phẩm được mô tả mà bao gồm ít nhất một chất tương tự incretin ở đây hoặc muối được dụng của nó (ví dụ, các muối trifluroaxetat, muối axetat hoặc muối

hydroclorua) và chất mang được dụng. Trong một số trường hợp, được phẩm còn có thể bao gồm các chất mang, chất pha loãng và/hoặc tá dược.

Thứ ba, các phương pháp được mô tả để điều trị bệnh như T2DM, rối loạn lipid máu, hội chứng chuyển hóa, NAFLD, NASH và bệnh béo phì. Các phương pháp như vậy có thể bao gồm ít nhất bước cho cá thể cần điều trị sử dụng lượng hữu hiệu chất tương tự incretin được mô tả trong bản mô tả. Trong một số trường hợp, bệnh là T2DM, NAFLD, NASH hoặc bệnh béo phì. Trong các trường hợp khác, bệnh là bệnh tim mạch mà không được xem là bệnh chuyển hóa hoặc bệnh thoái hóa thần kinh.

Trong một số trường hợp, ít nhất một chất tương tự incretin ở đây có thể được sử dụng dưới da (SQ) cho cá thể. Tương tự, và trong một số trường hợp, ít nhất một chất tương tự incretin có thể được sử dụng hằng ngày, hai ngày một lần, ba lần một tuần, hai lần một tuần, một lần một tuần (*tức là*, hằng tuần), hai tuần một lần (*tức là*, dùng một lần cách tuần) hoặc hằng tháng. Trong các trường hợp nhất định, ít nhất một chất tương tự incretin có thể được sử dụng SQ hai ngày một lần, SQ ba lần một tuần, SQ hai lần một tuần, SQ một lần một tuần, SQ hai tuần một lần, hoặc SQ một tháng một lần. Trong các trường hợp cụ thể, ít nhất một chất tương tự incretin được sử dụng SQ một lần một tuần (QW).

Các phương pháp này cũng có thể bao gồm các bước như đo hoặc thu thập thể trọng hoặc thành phần cơ thể của cá thể và/hoặc mức glucoza huyết và/hoặc mức insulin huyết và/hoặc mức hemoglobin A1c (HbA1c) và/hoặc mức lipid máu, và sau đó so sánh các giá trị thu được với một hoặc nhiều giá trị cơ sở hoặc các giá trị thu được trước đó để đánh giá mức độ hữu hiệu của điều trị.

Trong một số trường hợp, cá thể mắc chứng 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 mắc chứng béo phì với T2DM hoặc thừa cân với T2DM.

Các phương pháp này cũng có thể được kết hợp với chế độ ăn và tập luyện và/hoặc có thể được kết hợp với các chất trị liệu bổ sung.

Thứ tư, các chất tương tự incretin được mô tả để sử dụng trong trị liệu, như để dùng trong điều trị bệnh như T2DM, rối loạn lipid máu, hội chứng chuyển hóa, NAFLD, NASH và bệnh béo phì. Trong một số trường hợp, bệnh là T2DM, NAFLD, NASH hoặc

bệnh béo phì. Trong các trường hợp khác, bệnh là bệnh tim mạch mà không được xem là bệnh chuyển hóa hoặc bệnh thoái hóa thần kinh.

Thứ năm, việc sử dụng được mô tả đối với các chất tương tự incretin ở đây trong sản xuất thuốc để điều trị T2DM, rối loạn lipid máu, hội chứng chuyển hóa, NAFLD, NASH và bệnh béo phì. Trong một số trường hợp, bệnh là T2DM, NAFLD, NASH hoặc bệnh béo phì. Trong các trường hợp khác, bệnh là bệnh tim mạch mà không được xem là bệnh chuyển hóa hoặc bệnh thoái hóa thần kinh.

Mô tả chi tiết sáng chế

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

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

Các định nghĩa

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

Như được sử dụng ở đây, và tham chiếu đến một hoặc nhiều thụ thể GIP, GLP-1 hoặc GCG, “hoạt tính,” “hoạt hóa,” “việc hoạt hóa” và các thuật ngữ tương tự chỉ khả năng liên kết với và gây đáp ứng ở (các) thụ thể của hợp chất, như các chất tương tự

incretin trong bản mô tả, như được xác định bằng các thử nghiệm đã biết trong lĩnh vực này, như các thử nghiệm *in vitro* được mô tả sau đây.

Như được sử dụng ở đây, “axit amin” nghĩa là phân tử mà, từ quan điểm hóa học, đặc trưng bởi việc chứa 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 mà được gọi là các axit amin tiêu chuẩn và được sử dụng làm các khối xây dựng cho hầu hết các peptit/polypeptit/protein được tạo ra bởi cơ thể sống bất kỳ.

Như được sử dụng ở đây, “axit amin với nhóm chức khả dụng để liên hợp” nghĩa là axit amin bất kỳ tiêu chuẩn hoặc không tiêu chuẩn với nhóm chức mà có thể được liên hợp với axit béo bằng, ví dụ, cầu liên kết. Ví dụ về các nhóm chức như vậy bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở các nhóm alkynyl, alkenyl, amino, azido, bromo, carboxyl, cloro, iodo, và thiol. Ngoài ra, ví dụ về các axit amin tiêu chuẩn bao gồm 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” nghĩa là hợp chất, như peptit hoặc polypeptit tổng hợp, mà hoạt hóa thụ thể đích và tạo ra ít nhất một tác dụng *in vivo* hoặc *in vitro* được tạo ra bởi chất chủ vận thụ thể tự nhiên.

Như được sử dụng ở đây, “bệnh tim mạch mà không được xem là bệnh chuyển hóa” và tương tự nghĩa là bệnh như, chẳng hạn, xơ vữa động mạch hoặc suy tim.

Như được sử dụng ở đây, “axit béo C₁₆-C₂₂” nghĩa là axit carboxylic có từ 16 đến 22 nguyên tử cacbon. Axit béo C₁₆-C₂₂ thích hợp để sử dụng ở đây có thể là monoaxit no hoặc diaxit no (các “diaxit” có nhóm carboxyl ở mỗi đầu của nó).

Như được sử dụng ở đây, “lượng hữu hiệu” nghĩa là lượng, nồng độ hoặc liều của một hoặc nhiều chất tương tự incretin ở đây, hoặc muối được dụng của chúng mà, khi dùng một liều đơn hoặc nhiều liều cho cá thể cần điều trị, tạo ra hiệu quả mong muốn ở cá thể được chẩn đoán hoặc điều trị đó (*tức là*, có thể tạo ra khác biệt đáng kể về mặt lâm sàng trong tình trạng của cá thể như, chẳng hạn, giảm glucoza huyết, giảm HbA1c, giảm thể trọng hoặc chất béo trong cơ thể và/hoặc thay đổi thành phần cơ thể). Lượng hữu hiệu có thể dễ dàng xác định được bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực này bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã biết và bằng cách quan sát kết quả thu được từ

các trường hợp tương tự. Khi xác định lượng hữu hiệu cho một cá thể, cần cân nhắc một số yếu tố bao gồm, nhưng không giới hạn ở, loài động vật có vú; kích thước, độ tuổi và sức khỏe chung của nó; bệnh hoặc rối loạn cụ thể liên quan; mức độ hoặc tình trạng liên quan hoặc mức độ nghiêm trọng của bệnh hoặc rối loạn; đáp ứng của từng cá thể; chất tương tự incretin cụ thể được sử dụng; phương thức sử dụng; các đặc trưng sinh khả dụng của chế phẩm được sử dụng; phác đồ liều lượng lựa chọn; việc sử dụng thuốc đồng thời; và các trường hợp liên quan khác.

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

Như được sử dụng ở đây, “polypeptit hướng insulin phụ thuộc glucoza” hay “GIP” nghĩa là peptit gồm 42 axit amin (SEQ ID NO:1), tức là một incretin, đóng vai trò sinh lý trong việc cân bằng glucoza nội môi bằng cách kích thích sự tiết insulin từ các tế bào beta tuyến tụy với sự có mặt của glucoza.

Như được sử dụng ở đây, “peptit-1 giống glucagon” hay “GLP-1” nghĩa là peptit gồm 36 axit amin (SEQ ID NO:2) cũng là một incretin, mà kích thích sự tiết insulin phụ thuộc glucoza và đã thể hiện là ngăn ngừa sự tăng glucoza huyết ở bệnh tiểu đường.

Như được sử dụng ở đây, “glucagon” hoặc “GCG” nghĩa là peptit gồm 29 axit amin (SEQ ID NO:3) mà hỗ trợ việc duy trì glucoza huyết bằng cách liên kết với và hoạt hóa các thụ thể GCG trên các tế bào gan, làm cho gan giải phóng glucoza được dự trữ ở dạng glycogen thông qua quá trình phân giải glycogen.

Như được sử dụng ở đây, “oxyntomodulin” hoặc “OXM” nghĩa là peptit gồm 37 axit amin (SEQ ID NO:4) không chỉ bao gồm trình tự gồm 29 axit amin của GCG mà còn cả đoạn kéo dài octapeptit ở đầu tận cùng carboxy mà hoạt hóa cả thụ thể GCG và thụ thể GLP-1, với hiệu lực đối với thụ thể GCG cao hơn chút ít so với thụ thể GLP-1.

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

Như được sử dụng ở đây, “chất tương tự incretin” nghĩa là hợp chất có sự tương đồng về mặt cấu trúc với mỗi chất GIP, GLP-1 và GCG, đặc biệt là GIP người (SEQ ID NO:1), GLP-1 người (SEQ ID NO:2) và GCG người (SEQ ID NO:3), nhưng có nhiều khác biệt với các chất này. Các chất tương tự incretin ở đây bao gồm các trình tự axit amin khiến cho các hợp chất này có ái lực đối với và hoạt tính ở từng thụ thể trong số các thụ thể GIP, GLP-1 và GCG (*tức là*, hoạt tính chủ vận thụ thể bộ ba).

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

Như được sử dụng ở đây, “tác động kéo dài” nghĩa là ái lực liên kết và hoạt tính của chất tương tự incretin ở đây tiếp tục trong khoảng thời gian dài hơn so với peptit tham chiếu như GIP tự nhiên của người (SEQ ID NO:1), GLP-1 người (SEQ ID NO:2) và/hoặc GCG người (SEQ ID NO:3), cho phép việc định liều ít nhất ít thường xuyên như một lần một ngày, ba lần một tuần, hai lần một tuần, một lần một tuần hoặc thậm chí một tháng một lần. Profin tác động theo thời gian của các chất tương tự incretin ở đây có thể được xác định bằng cách sử dụng các phương pháp dược động học đã biết như các phương pháp được mô tả trong phần ví dụ dưới đây.

Như được sử dụng ở đây, “axit amin không tiêu chuẩn” nghĩa là axit amin mà có thể xuất hiện tự nhiên trong tế bào nhưng không tham gia vào sự tổng hợp peptit. Các axit amin không tiêu chuẩn có thể là thành phần cấu thành của peptit và có thể được tạo ra bằng cách cải biến các axit amin tiêu chuẩn trong peptit (*tức là*, thông qua sự cải biến sau dịch mã). Các axit amin không chuẩn có thể bao gồm các D-axit amin, mà có tính bất đối xứng tuyệt đối đối lập của các axit amin chuẩn, L-axit amin nêu trên.

Như được sử dụng ở đây, “no” nghĩa là axit béo không chứa liên kết đôi hoặc liên kết ba cacbon-cacbon.

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

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

Các chữ viết tắt nhất định được định nghĩa dưới đây: “4Pal” chỉ 3-(4-pyridyl)-L-alanin; “ACR” chỉ tỷ lệ albumin nước tiểu/creatinin nước tiểu; “Aib” chỉ axit α -aminoisobutyric; “ α MeL” chỉ α -metyl leuxin; “ α MeK” chỉ α -metyl lysin; “ α MeF” chỉ α -metyl phenylalanin; “ α MeF(2F)” chỉ α -metyl 2-flopheynylalanin; “ α MeY” chỉ α -metyl tyrosin; “amu” chỉ đơn vị khối lượng nguyên tử; “AUC” chỉ diện tích dưới đường cong; “Boc” chỉ tert-butoxycarbonyl; “cAMP” chỉ adenosin monophosphat vòng; “DMSO” chỉ dimethyl sulfoxit; “EIA/RIA” chỉ thử nghiệm miễn dịch enzym/thử nghiệm miễn dịch phóng xạ; “Fmoc” chỉ fluorenylmethyloxycarbonyl; “hr” chỉ giờ hoặc nhiều giờ; “HTRF” chỉ huỳnh quang phân giải thời gian đồng nhất; “IV” chỉ trong tĩnh mạch; “Iva” chỉ isovalin; “kDa” chỉ kilodalton; “LC-MS” chỉ phổ khối sắc ký lỏng; “min” chỉ phút hoặc nhiều phút; “MS” chỉ phổ khối; “Orn” hoặc “O” chỉ ornithin; “OtBu” chỉ O-tert-butyl; “Pbf” chỉ NG-2,2,4,6,7-pentametyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl; “RP-HPLC” chỉ sắc ký lỏng hiệu năng cao đảo pha; “sec” chỉ giây hoặc nhiều giây; “SEM” chỉ sai số chuẩn của giá trị trung bình; “SPA” chỉ thử nghiệm lân cận nhấp nháy; “SQ” chỉ dưới da; “TFA” chỉ axit trifloaxetic; “tBu” chỉ tert-butyl; và “Trt” chỉ Trityl.

Các chất tương tự incretin

Các đặc điểm về cấu trúc của các chất tương tự incretin ở đây làm cho các hợp chất này có đủ hoạt tính ở từng thụ thể trong số các thụ thể GIP, GLP-1 và GCG để thu được hiệu quả mong muốn về hoạt tính ở từng thụ thể (*tức là*, hoạt tính chủ vận thụ thể bộ

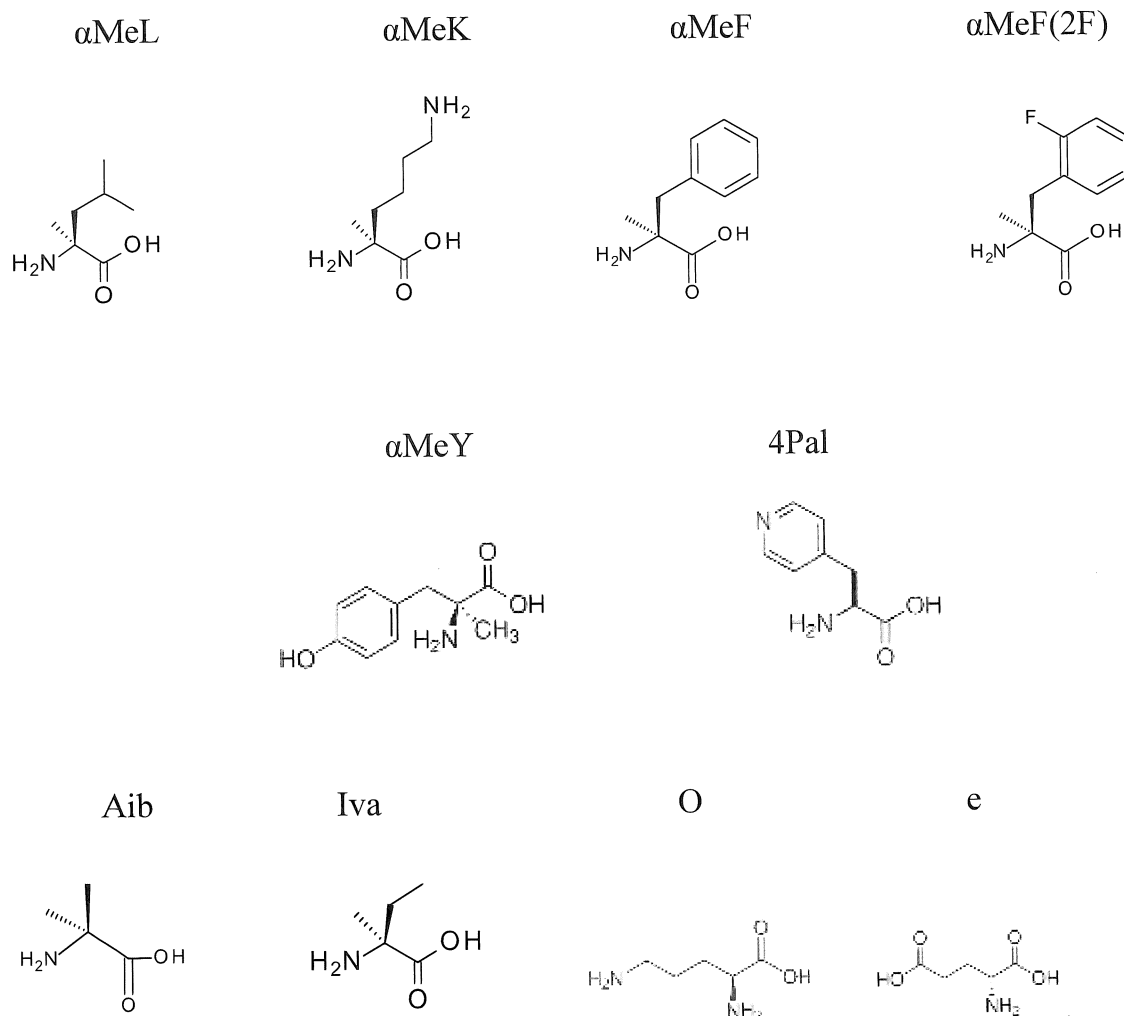
ba), nhưng không có hoạt tính quá lớn ở thụ thể bất kỳ để lấn át hoạt tính ở hai thụ thể kia hoặc gây ra các tác dụng phụ không mong muốn khi dùng ở liều đủ để tạo ra hoạt tính ở cả ba thụ thể. Ví dụ về các đặc điểm cấu trúc theo các phương án nhất định, và với tham chiếu đến SEQ ID NO:5, bao gồm α MeF(2F) ở vị trí 6, mà góp phần vào hoạt tính tối ưu của GCG, GIP và GLP-1; Y hoặc 4Pal ở vị trí 10, mà góp phần vào hoạt tính cân bằng; L hoặc α MeL ở vị trí 13, mà góp phần vào hoạt tính tối ưu của GCG và GIP; O ở vị trí 16, mà góp phần vào hoạt tính cân bằng; axyl hóa ở vị trí 17, mà góp phần vào hoạt tính cân bằng; 4Pal, Iva hoặc α MeL ở vị trí 20, mà góp phần vào hoạt tính tối ưu của GCG; A hoặc Aib ở vị trí 21, mà góp phần vào hoạt tính tối ưu của GCG; Y hoặc α MeY ở vị trí 25, mà góp phần vào hoạt tính cân bằng. Ví dụ khác về các đặc điểm cấu trúc như vậy bao gồm các axit amin được mô tả ở đây ở các vị trí 28-39, mà góp phần vào khả năng liên kết và hiệu lực tối ưu ở cả ba thụ thể.

Các đặc điểm cấu trúc của các chất tương tự incretin ở đây cũng làm cho các chất tương tự này có nhiều thuộc tính có lợi khác liên quan đến khả năng phát triển của chúng thành các liệu pháp điều trị, bao gồm cải thiện độ hòa tan của các chất tương tự này trong các dung dịch nước, cải thiện độ ổn định bào chế hóa học và vật lý, kéo dài profin được động học, và giảm thiểu khả năng sinh miễn dịch. Ví dụ không giới hạn về các đặc điểm cấu trúc cụ thể mà dẫn đến các thuộc tính như vậy bao gồm axyl hóa ở vị trí 17 bằng axit béo C_{20} , mà góp phần vào profin được động học (PK) tối ưu và khả năng phát triển; 4Pal ở vị trí 10 hoặc 20, mà góp phần vào độ hòa tan và độ ổn định hóa học tối ưu; O ở vị trí 16, mà góp phần vào độ hòa tan và PK tối ưu; E hoặc e ở vị trí 24, mà góp phần vào độ hòa tan và độ ổn định tối ưu; Y hoặc α MeY ở vị trí 25, mà góp phần vào độ ổn định hóa học tối ưu; và E hoặc S ở vị trí 39, mà góp phần vào độ hòa tan tối ưu; và các axit amin được mô tả ở đây ở vị trí 6, 13, 16 và 28-39 mà góp phần vào PK, tính sinh miễn dịch, khả năng phát triển và độ ổn định tối ưu.

Cần lưu ý rằng các danh mục trên đây về các đặc điểm cấu trúc chỉ là để minh họa, và không bao hàm toàn diện, và tổ hợp các đặc tính có lợi của các chất tương tự làm ví dụ được mô tả trong bản mô tả không phải là kết quả của cải biến bất kỳ khi phân tách, mà thay vào đó đạt được thông qua những tổ hợp mới của các đặc điểm cấu trúc được mô tả trong bản mô tả. Ngoài ra, những tác dụng được mô tả trên đây của danh mục cải biến đã nêu không mang tính loại trừ, vì nhiều cải biến trong số này cũng có những tác

dụng khác quan trọng đối với đặc tính của các hợp chất được mô tả trong bản mô tả, như được mô tả sau đây.

Trình tự axit amin của các chất tương tự incretin ở đây kết hợp các axit amin có trong tự nhiên (tiêu chuẩn), thường được mô tả ở đây bằng các mã một chữ cái (ví dụ, L = leuxin; K = lysin), cũng như các gốc không tiêu chuẩn và/hoặc các gốc được thế α -methyl của các axit amin tiêu chuẩn (ví dụ, α MeL, α MeK, α MeF, α MeF(2F) và α MeY, và các axit amin không tiêu chuẩn nhất định khác, như 4Pal, Aib, Iva, O và axit D-glutamic (e)). Để rõ ràng, cấu trúc của các axit amin khác này được mô tả dưới đây:



Như đã lưu ý trên đây, các chất tương tự incretin ở đây có độ tương tự về mặt cấu trúc với các peptit tự nhiên của người bất kỳ, nhưng cũng có nhiều khác biệt về cấu trúc. Ví dụ, so với GIP tự nhiên của người (SEQ ID NO:1), các chất tương tự incretin bao gồm các cải biến ở một hoặc nhiều vị trí trong số các vị trí 2-3, 6-7, 13-4, 16-18, 20-21, 23-25 và 28-42. Trong một số trường hợp, các chất tương tự incretin bao gồm các cải biến đối với các axit amin của GIP tự nhiên của người (SEQ ID NO:1) ở từng vị trí trong

số các vị trí 2-3, 6-7, 13-14, 16-18, 20-21, 23-25 và 28-42. Trong các trường hợp nhất định, các chất tương tự incretin bao gồm các cải biến axit amin sau đây: Aib ở vị trí 2; Q ở vị trí 3; α MeF(2F) ở vị trí 6; T ở vị trí 7; Y hoặc 4Pal ở vị trí 10; L hoặc α MeL ở vị trí 13; L ở vị trí 14; gốc K được cải biến ở vị trí 17, mà được cải biến thông qua việc liên hợp với nhóm epsilon-amino của chuỗi bên K bằng axit béo C₁₆ đến C₂₂, tùy ý sử dụng cầu liên kết; A ở vị trí 18; 4Pal, Iva hoặc α MeL ở vị trí 20; A hoặc Aib ở vị trí 21; I ở vị trí 23; E hoặc e ở vị trí 24; Y hoặc α MeY ở vị trí 25; E ở vị trí 28; G ở vị trí 29; và thay thế các axit amin ở các vị trí 30-42 bằng các trình tự axit amin sau đây: GPSSGAPPPE (SEQ ID NO:12) hoặc GPSSGAPPPS (SEQ ID NO:13) (và các đoạn tương tự được cắt cụt của một trong số các đuôi này). Trong các trường hợp khác nữa, các chất tương tự incretin được amit hóa. Ngoài các cải biến được mô tả ở đây, các chất tương tự incretin có thể bao gồm một hoặc nhiều cải biến axit amin khác như bổ sung, xóa bỏ, chèn và/hoặc thay thế, nhưng duy trì khả năng liên kết với và hoạt hóa từng thụ thể trong số các thụ thể GIP, GLP-1 và GCG.

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

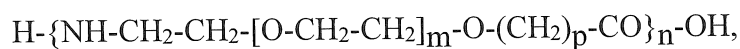
Việc axyl hóa các chất tương tự incretin ở đây là ở vị trí số 17 trong SEQ ID NO:5, mà được xác định là vị trí tối ưu để đưa cấu trúc này vào. Gốc axit béo, và trong các trường hợp nhất định cầu liên kết, hoạt động như cầu liên kết albumin và mang lại khả năng tạo ra các hợp chất tác động kéo dài.

Các chất tương tự incretin ở đây sử dụng gốc axit béo C₁₆-C₂₂ được liên hợp hóa học với nhóm chức của axit amin bằng liên kết trực tiếp hoặc bằng cầu liên kết. Độ dài và thành phần của gốc axit béo ảnh hưởng đến thời gian bán thải của các chất tương tự incretin, hiệu lực của các chất tương tự incretin trong mô hình động vật *in vivo*, và độ hòa tan và độ ổn định của các chất tương tự incretin. Việc liên hợp monoaxit hoặc diacid béo no C₁₆-C₂₂ dẫn đến các chất tương tự incretin mà thể hiện được thời gian bán thải mong muốn, hiệu lực mong muốn trong các mô hình động vật *in vivo*, các đặc tính độ hòa tan và độ ổn định mong muốn.

Ví dụ về các axit béo no C₁₆-C₂₂ để sử dụng trong bản mô tả bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, axit palmitic (axit hexadecanoic) (monoaxit C₁₆), axit hexadecandioic (di axit C₁₆), axit margaric (axit heptadecanoic) (monoaxit C₁₇), axit heptadecandioic (di axit C₁₇), axit stearic (monoaxit C₁₈), axit octadecandioic (di axit C₁₈), axit nonadexylic (axit nonadecanoic)(monoaxit C₁₉), axit nonadecandioic (di axit C₁₉), axit arachadic (axit eicosanoic) (monoaxit C₂₀), axit eicosandioic (di axit C₂₀), axit heneicosylic (axit heneicosanoic)(monoaxit C₂₁), axit heneicosandioic (di axit C₂₁), axit behenic (axit docosanoic) (monoaxit C₂₂), axit docosandioic (di axit C₂₂), bao gồm các dẫn xuất phân nhánh và được thể của chúng.

Trong các trường hợp nhất định, axit béo C₁₆-C₂₂ có thể là monoaxit C₂₀ no, di axit C₂₀ no, và các dẫn xuất phân nhánh và được thể của chúng. Trong các trường hợp cụ thể hơn, axit béo C₁₆-C₂₂ có thể là axit eicosandioic.

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

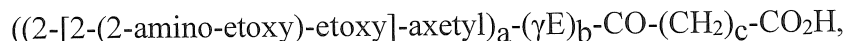


trong đó m là số nguyên bất kỳ từ 1 đến 12, n là số nguyên bất kỳ từ 1 đến 12, và p bằng 1 hoặc 2.

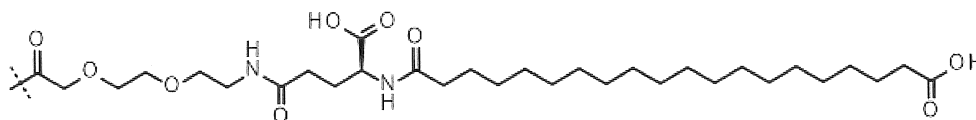
Trong các trường hợp nhất định, cầu liên kết có thể có một hoặc nhiều gốc AEEA, tùy ý kết hợp với một đến bốn axit amin.

Trong các trường hợp trong đó cầu liên kết bao gồm ít nhất một axit amin, axit amin này có thể là một đến bốn gốc axit amin E hoặc γE. Trong một số trường hợp, cầu liên kết có thể bao gồm một hoặc hai gốc axit amin E hoặc γE, bao gồm các dạng D của chúng. Ví dụ, cầu liên kết có thể bao gồm một hoặc hai gốc axit amin γE. Theo cách khác, cầu liên kết có thể bao gồm một đến bốn gốc axit amin (chẳng hạn như các axit amin E hoặc γE) được sử dụng kết hợp với không quá ba mươi sáu gốc AEEA. Cụ thể, cầu liên kết có thể là tổ hợp của một đến bốn axit amin E hoặc γE và một đến bốn gốc AEEA. Trong các trường hợp khác, cầu liên kết có thể là tổ hợp của một hoặc hai axit amin γE và một hoặc hai gốc AEEA.

Trong trường hợp cụ thể, các chất tương tự incretin ở đây có gốc cầu liên kết-axit béo có cấu trúc sau:



trong đó a là 0, 1 hoặc 2, b là 1 hoặc 2, và c là 16 hoặc 18. Trong trường hợp cụ thể, a là 1, b là 1 và c là 18, có cấu trúc sau:



Như được thể hiện trong các cấu trúc hóa học theo ví dụ 1-3 dưới đây, các gốc cầu liên kết-axit béo được mô tả trên đây có thể được liên kết với nhóm epsilon (ϵ)-amino của chuỗi bên K.

Ái lực của các chất tương tự incretin ở đây đối với từng thụ thể trong số các thụ thể GIP, GLP-1 và GCG có thể được xác định bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực này để xác định mức liên kết thụ thể, bao gồm, ví dụ, các kỹ thuật được mô tả trong các ví dụ sau đây, và thường được biểu thị bằng giá trị hằng số ức chế (K_i). Hoạt tính của các chất tương tự incretin ở từng thụ thể cũng có thể xác định được bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực này, bao gồm, ví dụ, thử nghiệm hoạt tính *in vitro* được mô tả sau đây, và thường được biểu thị bằng giá trị nồng độ hữu hiệu 50 (EC_{50}), là nồng độ của hợp chất gây ra sự kích thích bán tối đa trong đường cong đáp ứng liều.

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

Các chất tương tự incretin ở đây có thể phản ứng với một số axit/bazơ vô cơ và hữu cơ bất kỳ để tạo ra các muối cộng axit/bazơ dược dụng. Các muối dược dụng và các

kỹ thuật thông thường để điều chế chúng là đã biết rõ 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)). Các muối được dùng để sử dụng ở đây bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các muối natri, trifloaxetat, hydroclorua, và axetat.

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

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

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

Ngoài ra, các phương pháp được đề xuất để điều trị rối loạn lipid máu cho cá thể, trong đó các phương pháp như vậy bao gồm ít nhất bước cho cá thể cần điều trị sử dụng lượng hữu hiệu chất tương tự incretin ở đây, hoặc muối được dùng của nó.

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

Ngoài ra, các phương pháp được đề xuất để điều trị NAFLD ở cá thể, trong đó các phương pháp như vậy bao gồm ít nhất bước cho đối tượng cần điều trị sử dụng lượng hữu hiệu của chất tương tự incretin ở đây, hoặc muối được dụng của nó.

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

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

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

Ngoài ra, các phương pháp được đề xuất để điều trị bệnh tim mạch mà không được xem là bệnh chuyển hóa, trong đó các phương pháp như vậy bao gồm ít nhất bước cho cá thể cần điều trị sử dụng lượng hữu hiệu chất tương tự incretin ở đây, hoặc muối được dụng của nó.

Ngoài ra, các phương pháp được đề xuất để điều trị bệnh thoái hóa thần kinh, trong đó các phương pháp như vậy bao gồm ít nhất bước cho cá thể cần điều trị sử dụng lượng hữu hiệu chất tương tự incretin ở đây, hoặc muối được dụng của nó.

Trong các phương pháp này, độ hữu hiệu của các chất tương tự incretin ở đây có thể được đánh giá bằng cách, ví dụ, quan sát sự giảm đáng kể glucoza huyết, quan sát sự tăng đáng kể insulin, quan sát sự giảm đáng kể HbA1c, quan sát sự giảm đáng kể lipit máu, quan sát sự giảm đáng kể thể trọng hoặc lượng mỡ của cơ thể và/hoặc quan sát sự thay đổi về thành phần cơ thể.

Theo cách khác, các chất tương tự incretin ở đây hoặc muối được dụng của chúng có thể được sử dụng để cải thiện độ bền xương ở cá thể cần cải thiện. Trong một số trường hợp, cá thể cần cải thiện độ bền xương mắc chứng giảm tạo xương (hypoostosis) hoặc giảm sản xương (hypoosteoidosis), hoặc đang phục hồi sau gãy xương, quá trình chỉnh hình, cấy ghép bộ phận giả, cấy ghép răng, và/hoặc nói đốt sống. Các chất tương

tự incretin cũng có thể được sử dụng để điều trị các rối loạn khác như bệnh Alzheimer hoặc bệnh Parkinson.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ không giới hạn sau đây được đưa ra để nhằm mục đích minh họa, không phải để giới hạn.

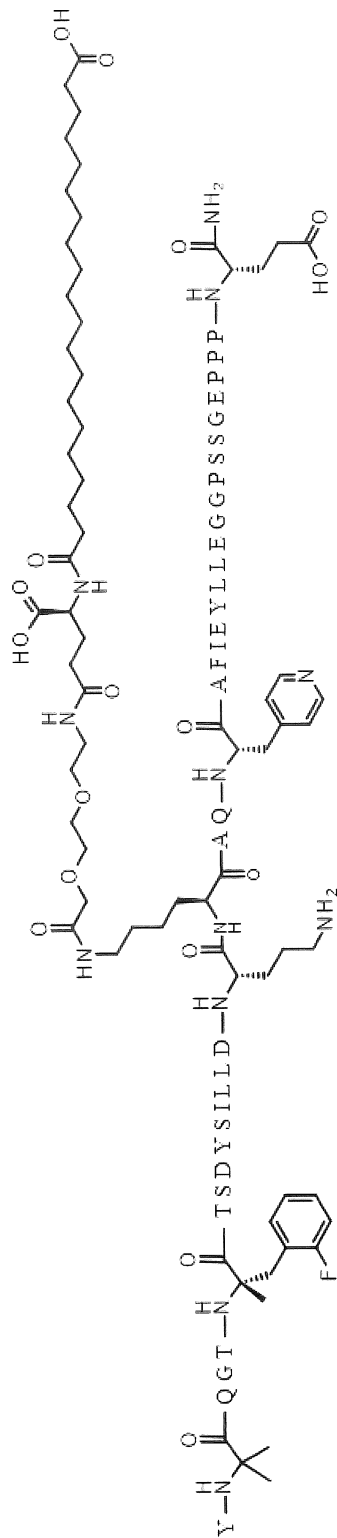
Tổng hợp polypeptit

Ví dụ 1: Tổng hợp chất tương tự incretin 1

Hợp chất ví dụ 1 là hợp chất được thể hiện bằng phần mô tả sau đây:

YAibQGT- α MeF(2F)-TSDYSILLDOK(2-[2-(2-amino-etoxy)-etoxy]-axetyl- γ E-CO-(CH₂)₁₈-CO₂H)AQ-4Pal-AFIEYLLEGGPSSGEPPPE-NH₂ (SEQ ID NO:9).

Dưới đây là mô tả cấu trúc của hợp chất ví dụ 1 bằng cách sử dụng các mã axit amin một chữ cái tiêu chuẩn ngoại trừ các gốc Aib₂, α MeF(2F)₆, O₁₆, K₁₇, 4Pal₂₀ và E₃₉, trong đó cấu trúc của các gốc axit amin này đã được mở rộng:



Nhựa là 1% polystyren liên kết ngang DVB (Fmoc-Rink-MBHA low-loading resin, 100-200 mesh; EMD Millipore) ở mức thay thế là 0,3-0,4 meq/g. Các nhóm bảo

vệ mạch bên tiêu chuẩn được sử dụng với các ngoại lệ sau. Fmoc-Lys(Mtt)-OH được dùng cho K ở vị trí 17, và Boc-Tyr(tBu)-OH) được dùng cho Y ở vị trí 1. Các nhóm Fmoc được loại bỏ trước mỗi bước kết hợp (2 x 7 phút) bằng cách sử dụng piperidin 20% trong DMF. Tất cả việc kết hợp axit amin tiêu chuẩn được thực hiện trong 1 giờ thành amin bậc một và trong 3 giờ thành amin bậc hai, sử dụng tỉ lệ mol bằng nhau của axit amin Fmoc (0,3 M), diisopropylcarbodiimide (0,9 M) và Oxyma (0,9 M), ở nồng độ mol cao gấp chín lần so với tải lượng peptit lý thuyết. Ngoại trừ các phản ứng kết hợp với các amin được C α -methyl hóa, chúng được kết hợp trong 3 giờ. Sau khi hoàn thành việc tổng hợp khung peptit, nhựa được rửa kỹ bằng DCM sáu lần để loại bỏ DMF còn lại. Nhóm bảo vệ Mtt trên K ở vị trí số 17 được loại bỏ một cách có chọn lọc khỏi nhựa peptit bằng hai lần xử lý bằng hexafluoroisopropanol 30% (Oakwood Chemicals) trong DCM (2 lần xử lý 40 phút mỗi lần).

Việc gắn gốc axit béo-cầu liên kết sau đó được thực hiện bằng cách kết hợp axit 2-[2-(2-Fmoc-amino-etoxy)-etoxy]-axetic (Fmoc-AEEA-OH, ChemPep, Inc.), α -butyl este của axit Fmoc-glutamic (Fmoc-E-OtBu, Ark Pharm, Inc.), axit mono-OtBu-eicosanedioic (WuXi AppTec, Shanghai, China). Gấp ba lần chất phản ứng (AA: PyAOP: DIPEA=1: 1 :1 mol/mol) được dùng cho mỗi lần kết hợp trong 1 giờ.

Sau khi hoàn thành việc tổng hợp, nhựa peptit được rửa bằng DCM, và sau đó làm khô kỹ bằng không khí. Nhựa khô được xử lý bằng 10 mL hỗn hợp phân cắt (TFA:triisopropylsilan:nước, tỷ lệ thể tích 92,5:2,5:5) trong 30 phút ở 40°C. Nhựa được lọc ra, rửa hai lần, mỗi lần bằng 2 mL TFA nguyên chất, và các dịch lọc kết hợp được xử lý bằng gấp năm lần thể tích diethyl ete lạnh (-20°C) để kết tủa peptit thô. Sau đó, huyền phù peptit/ete được ly tâm ở 3500 vòng/phút trong 2 phút để tạo thành viên kết rắn, phần dịch nổi được gạn ra, và viên kết rắn được nghiền tinh chế với ete lạnh hai lần nữa và được làm khô trong chân không. Peptit thô được hòa tan trong 20% axetonitril/20% axit axetic/60% nước và tinh chế bằng RP-HPLC trên cột Luna 5 μ m Phenyl-Hexyl điều chế (21 x 250 mm, Phenomenex) với gradien tuyến tính 100% axetonitril và hệ đệm 0,1% TFA/nước (30-50% axetonitril trong 60 phút). Độ tinh khiết của peptit được đánh giá bằng cách sử dụng RP-HPLC phân tích và tiêu chuẩn góp chung là >95%. Độ tinh khiết của phần góp chung chính của hợp chất ví dụ 1 được phát hiện là > 98,0%. Sau đó, việc đông khô phần góp chung sản phẩm chính cuối cùng tạo

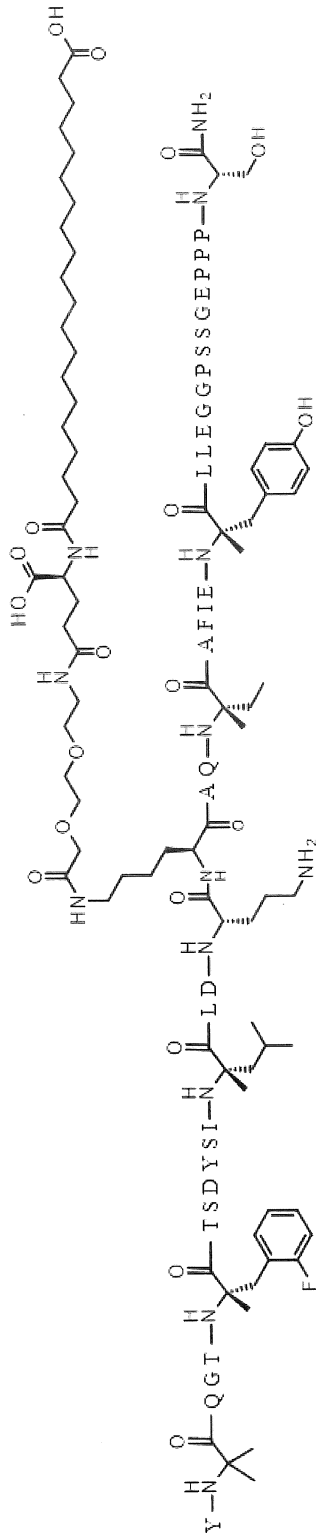
ra muối peptit TFA đã đông khô. Khối lượng phân tử được xác định bằng LC- MS (theo quan sát: $M+3 = 1633,7$; theo tính toán $M+3 = 1633,8$).

Ví dụ 2: Tổng hợp chất tương tự incretin 2

Hợp chất ví dụ 2 là hợp chất được thể hiện bằng phân mô tả sau đây:

YAibQGT- α MeF(2F)-TSDYSI- α MeL-LDOK(2-[2-(2-amino-etoxy)-etoxy]-axetyl- γ E-CO-(CH₂)₁₈-CO₂H)AQ-Iva-AFIE- α MeY-LLEGGPSSGEPPPS-NH₂ (SEQ ID NO:10).

Sau đây, cấu trúc của hợp chất ví dụ 2 được mô tả bằng các mã axit amin một chữ cái tiêu chuẩn trừ các gốc Aib2, α MeF(2F)6, α MeL13, O16, K17, Iva20, α MeY25 và S39 trong đó cấu trúc của các gốc axit amin này được mở rộng:



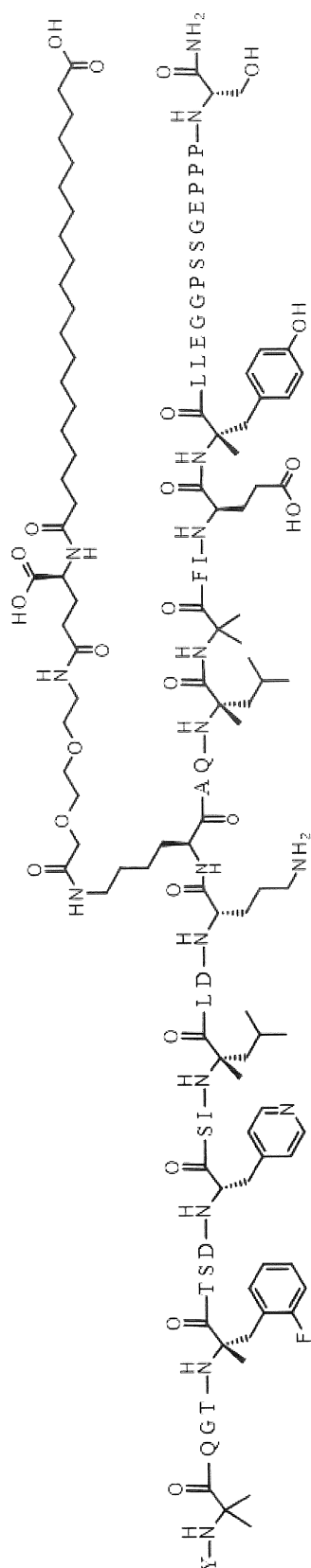
Các quy trình tương tự như các quy trình được mô tả trên đây trong ví dụ 1 được dùng để tổng hợp khung peptit, để liên hợp gốc axit béo-cầu liên kết, để kiểm tra độ tinh khiết, và để xác nhận phân tử lượng của hợp chất ví dụ 2.

Ví dụ 3: Tổng hợp chất tương tự incretin 3

Hợp chất ví dụ 3 là hợp chất được thể hiện bằng phần mô tả sau đây:

YAibQGT- α MeF(2F)-TSD-4Pal-SI- α MeL-LDOK(2-[2-(2-amino-etoxy)-etoxy]-axetyl- γ E-CO-(CH₂)₁₈-CO₂H)AQ- α MeL-Aib-FIe- α MeY-LLEGGPSSGEPPPS-NH₂ (SEQ ID NO:11).

Sau đây, cấu trúc của hợp chất ví dụ 3 được mô tả bằng các mã axit amin một chữ cái tiêu chuẩn trừ các gốc Aib2, α MeF(2F)6, 4Pal10, α MeL13, O16, K17, α MeL20, Aib21, e24, α MeY25 và S39 trong đó cấu trúc của các gốc axit amin này được mở rộng:



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

Chức năng in vitro

Ví dụ 4: Ải lực liên kết

Thử nghiệm liên kết cạnh tranh phối tử phóng xạ được sử dụng để xác định hằng số phân ly cân bằng đối với các hợp chất ví dụ và các hợp chất so sánh. Các thử nghiệm như vậy sử dụng phương pháp SPA và màng được chuẩn bị từ các tế bào HEK293 được chuyển nhiễm biểu hiện quá mức thụ thể GIP người (hGIPR; SEQ ID NO:14), GLP-1 người (hGLP-1R; SEQ ID NO:15) hoặc thụ thể GCG người (hGCGR; SEQ ID NO:16).

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

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

Bảng 1: K_d được xác định bằng phân tích liên kết bão hòa.

K_d , nM		
hGIPR	hGLP-1R	hGCGR
0,14	1,2	3,9

Các giá trị K_i của các hợp chất ví dụ và các hợp chất so sánh được thể hiện trong bảng 2.

Bảng 2: K_i *in vitro* của các hợp chất ví dụ và các hợp chất so sánh đối với hGIPR, hGLP-1R và hGCGR.

	K_i , nM (SEM, n)		
Hợp chất	hGIPR	hGLP-1R	hGCGR
hGIP	0,186 (0,001, 101)	--	--
hGLP-1	--	0,844 (0,023, 93)	--
hGCG	--	--	3,00 (0,12, 76)
Hợp chất ví dụ 1	0,111 (0,021, 7)	4,53 (0,855, 7)	0,629 (0,0415, 7)
Hợp chất ví dụ 2	0,158 (0,029, 7)	2,54 (0,501, 7)	0,950 (0,350, 7)
Hợp chất ví dụ 3	0,114 (0,007, 5)	3,63 (0,386, 5)	1,73 (0,296, 5)

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

Như thấy trong bảng 2, các hợp chất ví dụ có ái lực liên kết ở từng thụ thể hGIPR, hGLP-1R và hGCGR.

Ví dụ 5: Các thử nghiệm chức năng hGIPR, hGLP-1R và hGCGR

Phương pháp: Hoạt tính chức năng được xác định bằng sự tạo thành cAMP trong các dòng tế bào HEK-293 tách dòng biểu hiện hGIPR, hGLP-1R hoặc hGCGR. Các tế bào biểu hiện thụ thể hGIPR, hGLP-1R hoặc hGCGR được xử lý bằng polypeptit đối chứng hoặc một trong số các hợp chất ví dụ 1 đến 3 (đường cong nồng độ-đáp ứng 20 điểm trong DMSO, pha loãng trực tiếp 2,75 lần trong Labcyte Echo, đĩa 384 giếng Corning Cat# 3570) trong DMEM (Gibco Cat# 31053) có bổ sung GlutaMAX™ 1X (Gibco Cat# 35050), casein bò 0,1% (Sigma C4765-10ML), IBMX 250 μ M (3-Isobutyl-1-methylxanthin, Acros Cat# 228420010) và HEPES 20 mM (Gibco Cat# 15630) trong thể tích thử nghiệm 20 μ L (nồng độ DMSO cuối là 0,5%). Các thử nghiệm cũng được

thực hiện trong các điều kiện thử nghiệm giống nhau với việc bổ sung 1,0% albumin huyết thanh người không chứa axit béo, không chứa globulin (Sigma Cat# A3782).

Sau khi ủ 30 phút ở 37°C, sự gia tăng cAMP nội bào thu được được xác định theo cách định lượng sử dụng kit thử nghiệm CisBio cAMP Dynamic 2 HTRF (62AM4PEJ). Một cách vắn tắt, mức cAMP trong tế bào được phát hiện bằng cách bổ sung thể liên hợp cAMP-d2 vào đệm phân giải tế bào (10 µL) sau đó là kháng thể kháng cAMP-Eu³⁺-Cryptate cũng vào đệm phân giải tế bào (10 µL). Thử nghiệm cạnh tranh thu được được ủ trong ít nhất 60 phút ở nhiệt độ phòng, và sau đó được phát hiện bằng thiết bị PerkinElmer Envision® với bước sóng kích thích ở 320 nm và phát xạ ở 665 nm và 620 nm. Các đơn vị hình ảnh (phát xạ ở 665nm/620nm*10.000) tỷ lệ nghịch với lượng cAMP có mặt và được chuyển thành nM cAMP trên mỗi giếng bằng cách sử dụng đường cong cAMP tiêu chuẩn. Lượng cAMP được tạo ra (nM) trong mỗi giếng được chuyển thành tỷ lệ phần trăm đáp ứng tối đa quan sát được với GIP(1-42)NH₂ người, hGLP-1(7-36)NH₂ hoặc hGCG. Giá trị EC₅₀ tương đối và tỷ lệ phần trăm cao nhất (E_{max}) thu được bằng cách phân tích hồi quy không tuyến tính bằng cách sử dụng tỷ lệ phần trăm đáp ứng tối đa so với nồng độ peptit được bổ sung, được khớp với phương trình logistic bốn thông số.

Kết quả: Dữ liệu chức năng cho hGIP(1-42)NH₂, hGLP-1(7-36)NH₂, hGCG và các hợp chất ví dụ được đưa ra dưới đây trong bảng 3 (0,1% casein bò) và bảng 4 (0,1% casein bò, 1,0% albumin huyết thanh người).

Bảng 3: Hiệu lực cAMP chức năng (EC₅₀) và hiệu quả (E_{max}) đối với các peptit được ủ ở 37°C (với sự có mặt của 0,1% casein bò).

Hợp chất	hGLP-1R ^a		hGCGR ^a		hGIPR ^a	
	EC ₅₀ , nM, SEM (n) ^b	E _{max} , % ± SEM ^c	EC ₅₀ , nM, SEM (n) ^b	E _{max} , % ± SEM ^c	EC ₅₀ , nM, SEM (n) ^b	E _{max} , % ± SEM ^c
hGLP-1 (7-36)NH ₂	0,395 0,032 (62)	103 ± 2	--	--	--	--
hGCG	--	--	2,17 0,17 (63)	103 ± 2	--	--
hGIP (1-42)NH ₂	--	--	--	--	1,08 0,14 (60)	98 ± 2

Hợp chất ví dụ 1	0,345 0,033 (10)	106 ± 4	1,20 0,12 (10)	101 ± 3	0,0513 0,0099 (10)	102 ± 2
Hợp chất ví dụ 2	0,383 0,089 (10)	103 ± 3	1,02 0,19 (10)	103 ± 2	0,0256 0,0052 (10)	101 ± 2
Hợp chất ví dụ 3	0,451 0,079 (11)	107 ± 2	2,49 0,37 (10)	99 ± 4	0,0306 0,0061 (10)	103 ± 2

Lưu ý: ^a Mật độ biểu hiện được xác định bằng liên kết cạnh tranh tương đồng của [¹²⁵I]GLP-1(7-36)NH₂ ở hGLP-1R (112 fmol/mg protein), [¹²⁵I]GCG ở hGCGR (98 fmol/mg protein) và [¹²⁵I]GIP(1-42) ở hGIPR (124 fmol/mg protein). ^b EC₅₀, nM = giá trị trung bình hình học với sai số chuẩn của giá trị trung bình tiếp theo là số lần quan sát trong ngoặc. ^c E_{max}, % = Giá trị trung bình số học ± sai số chuẩn của giá trị trung bình đối với tỷ lệ phần trăm đáp ứng tối đa với GLP-1(7-36)NH₂ ở hGLP-1R, GCG ở hGCGR hoặc GIP(1-42)NH₂ ở hGIPR. Tất cả các giá trị được thể hiện là đến ba (3) chữ số có nghĩa.

Bảng 4: Hiệu lực cAMP chức năng (EC₅₀) và hiệu quả (E_{max}) của các peptit được ủ ở 37°C (với sự có mặt của 0,1% casein bò và 1,0% albumin huyết thanh người).

Hợp chất	hGLP-1R a		hGCGR a		hGIPR a	
	EC ₅₀ , nM, SEM (n) ^b	E _{max} , % ± SEM ^c	EC ₅₀ , nM, SEM (n) ^b	E _{max} , % ± SEM ^c	EC ₅₀ , nM, SEM (n) ^b	E _{max} , % ± SEM ^c
hGLP-1 (7-36)NH ₂	0,368 0,030 (45)	104 ± 3	--	--	--	--
hGCG	--	--	2,54 0,30 (45)	102 ± 3	--	--
hGIP (1-42)NH ₂	--	--	--	--	0,756 0,090 (45)	96 ± 2
Hợp chất ví dụ 1	180 17 (7)	102 ± 4	899 118 (6)	103 ± 8	22,3 5,4 (7)	100 ± 3
Hợp chất ví dụ 2	119 15 (7)	116 ± 4	537 99 (8)	112 ± 10	2,91 0,46 (7)	99 ± 2
Hợp chất ví dụ 3	114 12 (6)	111 ± 5	480 178 (6)	97 ± 9	3,72 0,83 (7)	± 5

Lưu ý: ^a Mật độ biểu hiện được xác định bằng liên kết cạnh tranh tương đồng của [¹²⁵I]GLP-1(7-36)NH₂ ở hGLP-1R (112 fmol/mg protein), [¹²⁵I]GCG ở hGCGR (98

fmol/mg protein) và [125 I]GIP(1-42) ở hGIPR (124 fmol/mg protein). ^b EC₅₀, nM = giá trị trung bình hình học với sai số chuẩn của giá trị trung bình tiếp theo là số lần quan sát trong ngoặc. ^c E_{max}, % = Giá trị trung bình số học $\pm$ sai số chuẩn của giá trị trung bình đối với tỷ lệ phần trăm đáp ứng tối đa với GLP-1(7-36)NH₂ ở hGLP-1R, GCG ở hGCGR hoặc GIP(1-42)NH₂ ở hGIPR. Tất cả các giá trị được thể hiện là đến ba (3) chữ số có nghĩa.

Như thấy trong bảng 3, các hợp chất ví dụ kích thích cAMP từ hGLP-1R, hGCGR và hGIPR với sự có mặt của 0,1% casein.

Như thấy trong bảng 4, các hợp chất ví dụ kích thích cAMP từ hGLP-1R, hGCGR và hGIPR với sự có mặt của 0,1% casein bò và 1% albumin huyết thanh người.

Chức năng *in vivo*

Ví dụ 6: Dược động học ở chuột nhắt đực béo phì do chế độ ăn (DIO)

Phương pháp: Chuột nhắt đực DIO được cho sử dụng liều đơn SQ 200 nmol/kg (0,98 mg/kg) các hợp chất ví dụ trong đệm Tris-HCL 40 mM độ pH=8 với 0,02% PS80 ở thể tích 10 mL/kg. Máu được thu thập ở 1, 3, 6, 12, 24, 48 và 72 giờ sau khi dùng liều để xác định đặc tính dược động học. Nồng độ trong huyết tương của các hợp chất ví dụ được xác định bằng phương pháp phổ khối sắc ký lỏng (LC/MS) định tính tại Q Squared Solutions BioSciences LLC (Ithaca, NY). Các hợp chất ví dụ và chất nội chuẩn được chiết từ huyết tương chuột 100% sử dụng phương pháp kết tủa protein tiếp theo là chiết pha rắn. Khối lượng nguyên vẹn của các hợp chất ví dụ, mà bao gồm peptit cộng với chuỗi axyl, được phát hiện bằng phổ khối kế Q-Exactive™ Orbitrap®.

Kết quả: Dữ liệu cho các hợp chất ví dụ được đưa ra trong bảng 5 sau đây.

Bảng 5: Các thông số dược động học huyết tương trung bình sau khi dùng liều đơn 200 nmol/kg SQ cho chuột nhắt đực DIO.

Hợp chất	t _{1/2} (giờ)	T _{max} (giờ)	C _{max} (nmol/L)	AUC _{0-inf} (giờ*nmol/L)	CL/F (ml/giờ/kg)
Hợp chất ví dụ 1	38	12	817	55550	3,6
Hợp chất ví dụ 2	18	12	1239	42479	4,7
Hợp chất ví dụ 3	13	12	1072	32800	6,1

Lưu ý: Các chữ viết tắt: $t_{1/2}$ = thời gian bán thải, $T_{\max}$ = thời gian để đạt đến nồng độ tối đa, $C_{\max}$ = nồng độ trong huyết tương tối đa quan sát được, $AUC_{0-\infty}$ = diện tích dưới đường cong từ thời điểm 0 đến vô cùng, CL/F = độ thanh thải/độ sinh khả dụng. $N=3$ động vật/nhóm/thời điểm.

Như thấy trên bảng 5, các hợp chất ví dụ thể hiện profin được động học kéo dài ở chuột nhắt DIO.

Ví dụ 7: Hiệu quả *in vivo* đến sự tiết insulin ở chuột cống Wistar đực

Phương pháp: Thử nghiệm độ dung nạp glucoza trong tĩnh mạch (ivGTT) ở chuột cống Wistar đực được dùng để đánh giá hiệu lực hướng insulin của các hợp chất ví dụ. Chất chủ vận GLP-1R, semaglutide, được sử dụng làm đối chứng dương. Các chuột cống với ống thông được cấy ghép bằng phẫu thuật trong tĩnh mạch cổ và động mạch cảnh (Envigo, Indianapolis, IN) 280-320 g được nhốt mỗi con một chuồng trong các chuồng bằng polycarbonat có bộ lọc ở nắp. Các chuột cống được giữ trong chu kỳ 12-giờ sáng-tối ở 21°C và được cho ăn thức ăn 2014 Teklad Global Diet (Envigo) và uống nước khử ion tùy nhu cầu. Các chuột cống được chia ngẫu nhiên theo thể trọng và cho dùng liều 1,5 mL/kg SQ của các hợp chất ví dụ 16 giờ trước khi dùng glucoza và sau đó cho nhịn đói. Nồng độ gốc 211 nM/mL của các hợp chất ví dụ được pha loãng trong đệm Tris-HCl 40mM độ pH=8,0 với 0,02% PS80 đến các nồng độ định liều mong muốn; các liều được thử nghiệm là chất dẫn, 0,1, 0,3, 1, 3, 10 và 30 nM/kg. Semaglutide được sử dụng làm đối chứng dương kết hợp với mỗi lần chạy các hợp chất ví dụ (liều 10 nM/kg).

Mẫu máu ở thời điểm 0 được thu thập vào các ống EDTA sau đó glucoza được sử dụng (0,5 mg/kg, 5 mL/kg). Các mẫu máu được thu thập để xác định mức glucoza và insulin ở thời điểm 2, 4, 6, 10, 20, và 30 phút sau khi dùng glucoza trong tĩnh mạch. Mức insulin trong huyết tương được xác định bằng thử nghiệm điện hóa phát quang (Meso Scale; Rockville, MD). AUC của insulin được thử nghiệm so với đối chứng chất dẫn với $n = 6$ động vật mỗi nhóm.

Phân tích thống kê được thực hiện bằng cách sử dụng JMP với ANOVA một chiều tiếp theo là so sánh Dunnett với đối chứng chất dẫn.

Kết quả: Dữ liệu cho các hợp chất ví dụ được đưa ra trong bảng 6 sau đây.

Bảng 6: Hiệu quả của chất dẫn, semaglutide (Sema ở 10 nmol/kg) và các hợp chất ví dụ đến sự tiết insulin trong thử nghiệm ivGTT ở chuột cống Wistar.

Hợp chất	AUC _{30 phút} của insulin sau khi dùng liều lớn glucoza IV							
	Liều (nmol/kg)							
	Chất dẫn	0,1	0,3	1	3	10	30	Sema
Hợp chất ví dụ 1	27,8 ±4,8	36,1 ±5,0	45,5 ±8,4	70,4 ±8,4	115,7± 6,0	145,9 ±14,9	134,5± 16,6	80,9 ±8,2
Hợp chất ví dụ 2	28,9 ±7,2	69,0 ±7,4	62,6 ±5,1	72,6 ±4,7	101,5± 18,2	128,8 ±11,7	159,0± 14,9	76,4 ±5,6
Hợp chất ví dụ 3	37,3 ±4,1	67,0 ±10,2	77,6 ±6,7	86,9 ±9,1	97,2± 7,5	119,8 ±10,2	174,8± 22,1	76,6 ±7,1

Lưu ý: Kết quả được biểu thị dưới dạng giá trị trung bình ± sai số chuẩn của giá trị trung bình (SEM) của 6 chuột cống trong mỗi nhóm. Kiểm định thống kê là ANOVA một chiều tiếp theo là Dunnett * $p < 0,05$ so với chất dẫn; + $p < 0,05$ so với semaglutide.

Như thấy trên bảng 6, các hợp chất ví dụ làm tăng sự tiết insulin theo cách phụ thuộc liều.

Ví dụ 8: Nghiên cứu *in vivo* về giảm cân, chuyển hóa và thành phần cơ thể ở chuột nhắt DIO C57/B16

Phương pháp: Để nghiên cứu hiệu quả của các hợp chất ví dụ đến các thông số như sự giảm cân, chuyển hóa và thành phần cơ thể, các hợp chất ví dụ được sử dụng liều cho chuột nhắt C57Bl6 DIO. Các động vật này, mặc dù không bị tiểu đường, thể hiện sự kháng insulin và rối loạn lipid máu, cả các đặc trưng của hội chứng chuyển hóa, sau khi được cho ăn chế độ ăn giàu béo trong 20 tuần.

Ở đây, chuột nhắt đực DIO C57/Bl6 ở 20 tuần tuổi được duy trì chế độ ăn giàu calo được sử dụng trong các nghiên cứu sau đây. Các động vật được nhốt riêng trong phương tiện được kiểm soát nhiệt độ (23°C đến 26°C) với chu kỳ sáng/tối 12 giờ (chiếu sáng vào 2100) và tự do tiếp cận thức ăn (TD95217) và nước. Sau 3 tuần thích nghi với phương tiện, ba gồm 1 tuần dùng liều thích nghi với chất dẫn, các chuột được chia ngẫu nhiên theo thể trọng của chúng, sao cho mỗi nhóm động vật thử nghiệm có thể trọng tương tự nhau. Thể trọng nằm trong khoảng từ 40 g đến 51 g.

Tất cả các nhóm đều có 6 chuột nhắt. Các hợp chất ví dụ và semaglutide được hòa tan trong chất dẫn (Tris-HCl 40 mM ở độ pH=8,0 với 0,02% PS-80) và được sử dụng bằng cách tiêm SQ (10 mL/kg) cho chuột nhắt DIO được cho ăn *tùy nhu cầu* 30 phút đến 120 phút trước khi khởi động chu kỳ tối mỗi ngày trong 14 ngày (ngày 1 đến ngày 14). Thể trọng và lượng ăn được đo hằng ngày trong ngày suốt nghiên cứu, bao gồm 1 ngày sau ngày cuối cùng (ngày 15).

Sự thay đổi tuyệt đối về thể trọng được tính toán bằng cách trừ đi thể trọng của chính động vật trước khi tiêm phân tử lần thứ nhất. Vào ngày 0 và ngày 15, tổng khối lượng chất béo được đo bằng cộng hưởng từ hạt nhân (Nuclear Magnetic Resonance - NMR) sử dụng thiết bị Echo Medical System (Houston, TX). Vào ngày 15, các thông số chuyển hóa được xác định sử dụng đường kế Accu-Chek® Aviva® (Roche; Indianapolis, IN) hoặc dụng cụ phân tích máu lâm sàng Hitachi (Roche, Indianapolis, IN). Mức insulin trong huyết tương được xác định bằng thử nghiệm điện hóa phát quang (Meso Scale Discovery, Rockville, MD).

Dữ liệu được biểu thị bằng giá trị trung bình $\pm$ SEM của 6 động vật trong mỗi nhóm trong bảng 7 và bảng 8 sau đây. Thực hiện phân tích thống kê sử dụng phương pháp ANOVA số đo lặp lại, tiếp theo là phương pháp Dunnett để so sánh nhiều lần. Khác biệt đáng kể được xác định là * với $p < 0,05$.

Kết quả: Dữ liệu cho các hợp chất ví dụ được đưa ra sau đây trong bảng 7 và bảng 8.

Bảng 7. Mức thay đổi thể trọng sau khi điều trị bằng semaglutide và các hợp chất ví dụ sau 15 ngày.

Hợp chất	Liều (nmol/kg)	Δ thể trọng (g)	Δ thể trọng (%)	Khối lượng chất béo (%)
Sema	10	$-9,23 \pm 0,58^*$	$-21,98 \pm 2,58^*$	$-15,14 \pm 1,93^*$
Hợp chất ví dụ 1	0,15625	$-1,20 \pm 0,15$	$-4,31 \pm 0,75$	$-2,44 \pm 0,63$
	0,625	$-4,37 \pm 0,08^*$	$-11,40 \pm 0,92^*$	$-7,38 \pm 1,05^*$
	2,5	$-10,42 \pm 1,40^*$	$-24,43 \pm 3,84^*$	$-17,05 \pm 2,47^*$
	10	$-18,97 \pm 0,81^*$	$-43,71 \pm 2,32^*$	$-30,07 \pm 1,69^*$
	20	$-21,30 \pm 0,94^*$	$-48,88 \pm 2,00^*$	$-32,15 \pm 1,93^*$
	0,15625	$-1,72 \pm 0,04$	$-2,65 \pm 0,55$	$-1,91 \pm 0,84$

Hợp chất ví dụ 2	0,625	$-4,48 \pm 0,26^*$	$-8,90 \pm 1,38^*$	$-5,87 \pm 0,94^*$
	2,5	$-8,62 \pm 0,21^*$	$-17,90 \pm 1,01^*$	$-11,96 \pm 0,88^*$
	10	$-20,10 \pm 0,54^*$	$-43,44 \pm 1,30^*$	$-28,53 \pm 1,24^*$
	20	$-21,77 \pm 0,50^*$	$-46,79 \pm 1,40^*$	$-28,80 \pm 0,81^*$
Hợp chất ví dụ 3	0,15625	$-1,95 \pm 0,13$	$-4,60 \pm 0,71$	$-3,34 \pm 0,60$
	0,625	$-5,18 \pm 0,25^*$	$-11,91 \pm 0,99^*$	$-8,03 \pm 0,84^*$
	2,5	$-11,65 \pm 1,68^*$	$-25,98 \pm 3,85^*$	$-18,55 \pm 2,41^*$
	10	$-18,43 \pm 0,68^*$	$-41,10 \pm 1,51^*$	$-28,50 \pm 1,55^*$
	20	$-19,92 \pm 0,34^*$	$-44,22 \pm 1,01^*$	$-29,23 \pm 1,29^*$

Lưu ý: “ Δ thể trọng (g)” chỉ chênh lệch giữa thể trọng vào ngày 15 giữa nhóm thử nghiệm và nhóm chất dẫn. “ Δ thể trọng (%)” chỉ độ giảm thể trọng theo phần trăm giữa ngày 1 và ngày 15 trong các nhóm thử nghiệm. “Khối lượng chất béo (%)” chỉ chênh lệch giữa khối lượng chất béo giữa ngày 0 và ngày 15 trong các nhóm thử nghiệm. “Sema” là semaglutide. Toàn bộ dữ liệu là từ nghiên cứu đơn đại diện. Mức thay đổi thể trọng theo phần trăm và khối lượng chất béo của các động vật được cho dùng chất dẫn được ghi lại và là nhỏ hơn 2% trong từng nghiên cứu. “ Δ thể trọng (g)”, “ Δ thể trọng (%)”, và “ Δ khối lượng chất béo (%)” và khác biệt đáng kể về mặt thống kê (*, $p < 0,05$) so với đối chứng cho semaglutide và tất cả các hợp chất ví dụ ở toàn bộ liều được thử nghiệm, trừ các peptit ví dụ ở liều thấp, 0,15625 nmol/kg.

Như thấy trên bảng 7, các hợp chất ví dụ làm giảm theo cách phụ thuộc liều thể trọng và khối lượng chất béo.

Bảng 8: Hiệu quả điều trị bằng các hợp chất ví dụ đến glucoza huyết, insulin, tổng cholesterol và các triglycerit sau 15 ngày.

Hợp chất	Liều (nmol/kg)	Δ Glucoza (mg/dL)	Δ Insulin (ng/mL)	Δ Cholesterol (mg/dL)	Δ Trigs (mg/dL)
Sema	10	$-18,33 \pm 2,81^*$	$-4,15 \pm 2,23$	$-73,33 \pm 4,17^*$	$16,00 \pm 0,38$
Hợp chất ví dụ 1	0,15625	$-18,58 \pm 1,04$	$-4,48 \pm 1,70$	$-14,33 \pm 4,37$	$-27,83 \pm 0,44$
	0,625	$-24,42 \pm 4,44^*$	$-6,03 \pm 0,94$	$-39,17 \pm 0,08$	$15,33 \pm 2,75$

	2,5	-14,67 ± 0,77	-10,13 ± 4,21	-118,17 ± 1,57*	-2,83 ± 4,13
	10	-35,08 ± 1,47*	-11,14 ± 4,41*	-164,00 ± 1,85*	-43,00 ± 0,50
	20	-56,00 ± 2,12*	-11,40 ± 4,55*	-179,17 ± 7,73*	-52,50 ± 3,95*
Hợp chất ví dụ 2	0,15625	-9,50 ± 5,21	14,64 ± 3,28	-22,00 ± 4,71	9,67 ± 7,80
	0,625	-6,17 ± 7,12	-9,35 ± 5,61	-43,50 ± 3,47*	-3,50 ± 3,73
	2,5	-13,50 ± 3,92	-14,01 ± 7,49	-150,33 ± 1,70*	-2,33 ± 3,07
	10	-41,00 ± 4,18*	-14,52 ± 7,39	-199,33 ± 7,02*	-9,00 ± 5,09
	20	-46,08 ± 4,21*	-14,73 ± 7,52	-198,00 ± 5,46*	-15,83 ± 6,63
Hợp chất ví dụ 3	0,15625	-26,97 ± 6,52*	0,48 ± 1,80	-14,50 ± 5,03	40,67 ± 1,75
	0,625	-19,47 ± 6,65*	-4,49 ± 3,03	-37,83 ± 4,80*	40,33 ± 1,58
	2,5	-33,47 ± 1,69*	-7,25 ± 3,60*	-136,50 ± 5,42*	-7,17 ± 6,52
	10	-48,72 ± 6,41*	-7,61 ± 3,80*	-162,50 ± 4,09*	29,00 ± 21,71
	20	-55,97 ± 6,74*	-7,69 ± 3,79*	-186,83 ± 7,59*	-16,50 ± 1,60

Lưu ý: Toàn bộ dữ liệu chỉ chênh lệch vào ngày 15 giữa nhóm thử nghiệm và nhóm chất dẫn và là từ nghiên cứu đơn đại diện. “Sema” là semaglutide. * $p < 0,05$ so với nhóm chất dẫn; ANOVA một chiều, Dunnett.

Như thấy trên bảng 8, các hợp chất ví dụ cũng làm giảm glucoza huyết, insulin (là dấu hiệu tăng độ nhạy insulin), cholesterol và các triglyxerit.

Danh mục trình tự

Các trình tự axit nucleic và/hoặc axit amin sau được đề cập đến trong bản mô tả này và được đưa ra dưới đây để tham khảo.

SEQ ID NO:1 – GIP người

YAEGTFISDYSIAMDKIHQQDFVNWLLAQKGKKNDWKHNITQ

SEQ ID NO:2 – GLP-1₇₋₃₆ amit người

HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGR-NH₂

SEQ ID NO:3 – glucagon người

HSQGTFTSDYSKYLDSSRAQDFVQWLMNT

SEQ ID NO:4 – OXM người

HSQGTFTSDYSKYLDSSRAQDFVQWLMNTKRNRNNIA

SEQ ID NO:5 – chất tương tự incretin

YX₂QGTX₆TSDX₁₀SIX₁₃LDX₁₆X₁₇AQX₂₀X₂₁FIX₂₄X₂₅LLEGGPSSGEPPPX₃₉,

trong đó:

X₂ là Aib,

X₆ là αMeF(2F),

X₁₀ có thể là Y hoặc 4Pal,

X₁₃ có thể là L hoặc αMeL,

X₁₆ là Orn,

X₁₇ là axit amin bất kỳ với nhóm chức khả dụng để liên hợp,

X₂₀ có thể là 4Pal, Iva hoặc αMeL,

X₂₁ có thể là A hoặc Aib,

X₂₄ có thể là E hoặc e,

X₂₅ có thể là Y hoặc αMeY, và

X₃₉ có thể là E hoặc S

SEQ ID NO:6 – chất tương tự incretin

Y-Aib-QGT- α MeF(2F)-TSDYSILLDOKAQ-4Pal-AFIEYLLEGGPSSGEPPPE

SEQ ID NO:7 – chất tương tự incretin

Y-Aib-QGT- α MeF(2F)-TSDYSI- α MeL-LDOKAQ-Iva-AFIE- α MeY-LLEGGPSSGEPPPS

SEQ ID NO:8 – chất tương tự incretin

Y-Aib-QGT- α MeF(2F)-TSD-4Pal-SI- α MeL-LDOKAQ- α MeL-Aib-Flu- α MeY-LLEGGPSSGEPPPS

SEQ ID NO:9 – chất tương tự incretin

Y-Aib-QGT- α MeF(2F)-TSDYSILLDOK(2-[2-(2-amino-etoxy)-etoxy]-axetyl- γ E-CO-(CH₂)₁₈-CO₂H)AQ-4Pal-AFIEYLLEGGPSSGEPPPE-NH₂

SEQ ID NO:10 – chất tương tự incretin

Y-Aib-QGT- α MeF(2F)-TSDYSI- α MeL-LDOK(2-[2-(2-amino-etoxy)-etoxy]-axetyl- γ E-CO-(CH₂)₁₈-CO₂H)AQ-Iva-AFIE- α MeY-LLEGGPSSGEPPPS-NH₂

SEQ ID NO:11 – chất tương tự incretin

Y-Aib-QGT- α MeF(2F)-TSD-4Pal-SI- α MeL-LDOK(2-[2-(2-amino-etoxy)-etoxy]-axetyl- γ E-CO-(CH₂)₁₈-CO₂H)AQ- α MeL-Aib-Flu- α MeY-LLEGGPSSGEPPPS-NH₂

SEQ ID NO:12 – trình tự nhân tạo

GPSSGEPPPE

SEQ ID NO:13 – trình tự nhân tạo

GPSSGEPPPS

SEQ ID NO:14 – thụ thể GIP người

MTTSPILQLLLRLSLCGLLLQRAETGSKGQTAGELYQRWERYRRECQETL
AAAEPPSGLACNGSFDMYVCWDYAAPNATARASCPWYLPWHHHVAAGFVL
RQCGSDGQWGLWRDHTQCENPEKNEAFLDQRLILERLQVMYTVGYSLSLAT
LLLALLILSLFRRLHCTRNYIHINLFTSFMLRAAAILSRDRLLPRPGPYLGDQAL
ALWNQALAAACRTAQIVTQYCVGANYTWLLVEGVYLHSLLVLVGGSEEGHFR
YYLLLGGWAPALFVIPWVIVRYLYENTQCWERNEVKAIWWIIRTPILMTILINF

LIFIRILGILLSKLRTRQMRCRDYRLRLARSTLTLVPLLGVHEVVFAPVTEEQAR
 GALRFAKLGFEIFLSSFQGFLLSVLYCFINKEVQSEIRRGWHHCRLRRSLGEEQ
 RQLPERAFRALPSGSGPGEVPTSRLSSGTLPGPGNEASRELESYC

SEQ ID NO:15 – thu thể GLP-1 người

MAGAPGPLRLALLLLGMVGRAGPRPQGATVSLWETVQKWREYRRQCQ
 RSLTEDPPPATDLFCNRTFDEYACWPDGEPGSFVNVSCPWYLPWASSVPQGH
 VYRFCTAEGLWLQKDNSSLPWRDLSECEESKRGERSSPEEQLFLYIIYTVGYA
 LSFSALVIASAILLGFRHLHCTRNYIHLNLFASFILRALSVFIKDAALKWMYSTA
 AQQHQWDGLLSYQDSLSCRLVFLLMQYCVAANYYWLLVEGVYLYTLLAFSV
 LSEQWIFRLYVSIGWGVPLLFFVVPWGIVKYL YEDEGCWTRNSNMNYWLIIRLP
 ILFAIGVNFLIFVRVICIVVSKLKANLMCKTDIKCRLAKSTLTLIPLLGTHEVIFA
 FVMDEHARGTLRFIKLFTELSFTSFQGLMVAILYCFVNNEVQLEFRKSWERWR
 LEHLHIQRDSSMKPLKCPTSSLSSGATAGSSMYTATCQASCS

SEQ ID NO:16 – thu thể GCG người

MPPCQPQRPLLLLLLLLLLACQPQVPSAQVMDFLFEKWKL YGDQCHHNSL
 LPPPTLVCNRTFDKYSCWPDTPANTTANISCPWYLPWHHKVQHRFVFKRCGP
 DGQWVRGPRGQPWRDASQCQMDGEEIEVQKEVAKMYSSFQVMYTVGYSL
 LGALLALAILGGLSKLHCTRNAIHANLFAFVLKASSVLVIDGLLRTRYSQKI
 GDDL SVSTWLS DGAVAGCRVA AVFMQYGIVANYCWLLVEGLYLHNLLGLAT
 LPERSFFSLYL GIGWGAPMLFVVPWAVVKCLFENVQCWTSNDNMGFWWILR
 FPFVFLAILINFFIFVRIVQLLVAKLRARQMHTDYKFRLAKSTLTLIPLLGVHEV
 VFAFVTDEHAQGTLRS AKLFFDLFLSSFQGLLVAVLYCFLNKEVQSELRRRWH
 RWRLGKVLWEERNTSNHRASSSPGHGPPSKELQFGRGGGSQDSSAETPLAGG
 LPRLAESPF

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Hợp chất chứa:

$YX_2QGT X_6TSDX_{10}SIX_{13}LDX_{16}X_{17}AQX_{20}X_{21}FIX_{24}X_{25}LLEG GPSSGEPPP X_{39}$,

trong đó X_2 là Aib,

X_6 là α MeF(2F),

X_{10} là Y hoặc 4Pal,

X_{13} là L hoặc α MeL,

X_{16} là Orn,

X_{17} là axit amin bất kỳ với nhóm chức khả dụng để liên hợp và nhóm chức này được liên hợp với gốc axit béo $C_{16}-C_{22}$,

X_{20} là 4Pal, Iva hoặc α MeL,

X_{21} là A hoặc Aib,

X_{24} là E hoặc e,

X_{25} là Y hoặc α MeY, và

X_{39} là E hoặc S

(SEQ ID NO:5), và

trong đó axit amin đầu tận cùng carboxy (đầu tận cùng C) tùy ý được amit hóa; hoặc muối được dụng của chúng.

2. Hợp chất theo điểm 1, trong đó axit amin với nhóm chức khả dụng để liên hợp ở vị trí X_{17} được chọn từ nhóm gồm C, D, E, K và Q.

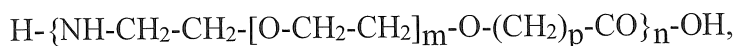
3. Hợp chất theo điểm 1, trong đó axit amin với nhóm chức khả dụng để liên hợp ở vị trí X_{17} là K.

4. Hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó axit amin với nhóm chức khả dụng để liên hợp ở vị trí X_{17} và gốc axit béo $C_{16}-C_{22}$ được liên hợp bằng cầu liên kết giữa axit amin và gốc axit béo.

5. Hợp chất theo điểm 4, trong đó cầu liên kết chứa một đến bốn axit amin.

6. Hợp chất theo điểm 5, trong đó các axit amin là E hoặc γ E.

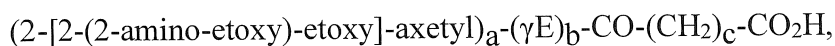
7. Hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 4 đến 6, trong đó cầu liên kết còn chứa cấu trúc sau:



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

8. Hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 4 đến 7, trong đó cầu liên kết còn chứa một đến bốn gốc (2-[2-(2-amino-etoxy)-etoxy]-axetyl).

9. Hợp chất theo điểm 1, trong đó X_{17} là K được cải biến hóa học thông qua sự liên hợp với nhóm epsilon-amino của chuỗi bên K với cấu trúc sau:



trong đó a là 0, 1 hoặc 2; b là 1 hoặc 2; và c là số nguyên từ 16 đến 20.

10. Hợp chất theo điểm 9, trong đó a là 1.

11. Hợp chất theo điểm 9, trong đó a là 2.

12. Hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 9 đến 11, trong đó b là 1.

13. Hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 9 đến 11, trong đó b là 2.

14. Hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 9 đến 13, trong đó c là 20.

15. Hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 14, trong đó X_{10} là Y.

16. Hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 14, trong đó X_{10} là 4Pal.

17. Hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 16, trong đó X_{13} là L.

18. Hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 16, trong đó X_{13} là αMeL .

19. Hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 18, trong đó X_{20} là 4Pal.

20. Hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 18, trong đó X_{20} là Iva.

21. Hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 18, trong đó X_{20} là αMeL .

22. Hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 21, trong đó X_{21} là A.

23. Hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 21, trong đó X_{21} là Aib.

24. Hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 23, trong đó X_{24} là E.

25. Hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 23, trong đó X_{24} là e.
26. Hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 25, trong đó X_{25} là Y.
27. Hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 25, trong đó X_{25} là α MeY.
28. Hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 27, trong đó X_{39} là E.
29. Hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 27, trong đó X_{39} là S.
30. Hợp chất có công thức được chọn từ nhóm gồm các SEQ ID NO: 6-11, hoặc muối được dụng của chúng.
31. Thuốc để điều trị bệnh được chọn từ nhóm bao gồm tiểu đường typ 2, rối loạn lipid máu, hội chứng chuyển hóa, bệnh gan nhiễm mỡ không do rượu, viêm gan nhiễm mỡ không do rượu và bệnh béo phì, thuốc này chứa hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 30.
32. Dược phẩm chứa:
- hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 30; và
- chất mang, chất pha loãng, hoặc tá dược được dụng.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Eli Lilly and Company

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

<130> P22622

<160> 16

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 42

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 1

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

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

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

<210> 2

<211> 30

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<220>

<221> MOD_RES

<222> (30)..(30)

<223> Amit hóa

<400> 2

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

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

<210> 3

<211> 29

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 3

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

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

<210> 4
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 4

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

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

Arg Asn Asn Ile Ala
 35

<210> 5
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<220>
 <221> Dấu hiệu hỗn tạp
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa ở vị trí 2 là Aib

<220>
 <221> Dấu hiệu hỗn tạp
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa ở vị trí 6 là alpha-MeF(2F)

<220>
 <221> Dấu hiệu hỗn tạp
 <222> (10)..(10)
 <223> Xaa ở vị trí 10 là Y hoặc 4Pal

<220>
 <221> Dấu hiệu hỗn tạp
 <222> (13)..(13)
 <223> Xaa ở vị trí 13 là L hoặc alpha-MeL

<220>
 <221> Dấu hiệu hỗn tạp
 <222> (16)..(16)
 <223> Xaa ở vị trí 16 là Orn

<220>
 <221> Dấu hiệu hỗn tạp
 <222> (17)..(17)

<223> Xaa ở vị trí 17 là axit amin bất kỳ với nhóm chức khả dụng để liên hợp

<220>

<221> Dấu hiệu hỗn tạp

<222> (20)..(20)

<223> Xaa ở vị trí 20 là 4Pal, Iva, hoặc alpha-MeL

<220>

<221> Dấu hiệu hỗn tạp

<222> (21)..(21)

<223> Xaa ở vị trí 21 là A hoặc Aib

<220>

<221> Dấu hiệu hỗn tạp

<222> (24)..(24)

<223> Xaa ở vị trí 24 là E hoặc D-Glu

<220>

<221> Dấu hiệu hỗn tạp

<222> (25)..(25)

<223> Xaa ở vị trí 25 là Y hoặc alpha-MeY

<220>

<221> Dấu hiệu hỗn tạp

<222> (39)..(39)

<223> Xaa ở vị trí 39 là E hoặc S

<400> 5

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

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

Ser	Gly	Glu	Pro	Pro	Pro	Xaa
			35			

<210> 6

<211> 39

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<220>

<221> Dấu hiệu hỗn tạp

<222> (2)..(2)

<223> Xaa ở vị trí 2 là Aib

<220>

<221> Dấu hiệu hỗn tạp

<222> (6)..(6)

<223> Xaa ở vị trí 6 là alpha-MeF(2F)

<220>
 <221> Dấu hiệu hỗn tạp
 <222> (16)..(16)
 <223> Xaa ở vị trí 16 là Orn

<220>
 <221> Dấu hiệu hỗn tạp
 <222> (20)..(20)
 <223> Xaa ở vị trí 20 là 4Pal

<400> 6

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

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

Ser	Gly	Glu	Pro	Pro	Pro	Glu
			35			

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

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<220>
 <221> Dấu hiệu hỗn tạp
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa ở vị trí 2 là Aib

<220>
 <221> Dấu hiệu hỗn tạp
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa ở vị trí 6 là alpha-MeF(2F)

<220>
 <221> Dấu hiệu hỗn tạp
 <222> (13)..(13)
 <223> Xaa ở vị trí 13 là alpha-MeL

<220>
 <221> Dấu hiệu hỗn tạp
 <222> (16)..(16)
 <223> Xaa ở vị trí 16 là Orn

<220>
 <221> Dấu hiệu hỗn tạp
 <222> (20)..(20)
 <223> Xaa ở vị trí 20 là Iva

<220>

<221> Dấu hiệu hỗn tạp
 <222> (25)..(25)
 <223> Xaa ở vị trí 25 là alpha-MeY

<400> 7

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

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

Ser Gly Glu Pro Pro Pro Ser
 35

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

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<220>
 <221> Dấu hiệu hỗn tạp
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa ở vị trí 2 là Aib

<220>
 <221> Dấu hiệu hỗn tạp
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa ở vị trí 6 là alpha-MeF(2F)

<220>
 <221> Dấu hiệu hỗn tạp
 <222> (10)..(10)
 <223> Xaa ở vị trí 10 là 4Pal

<220>
 <221> Dấu hiệu hỗn tạp
 <222> (13)..(13)
 <223> Xaa ở vị trí 13 là alpha-MeL

<220>
 <221> Dấu hiệu hỗn tạp
 <222> (16)..(16)
 <223> Xaa ở vị trí 16 là Orn

<220>
 <221> Dấu hiệu hỗn tạp
 <222> (20)..(20)
 <223> Xaa ở vị trí 20 là alpha-MeL

<220>
 <221> Dấu hiệu hỗn tạp
 <222> (21)..(21)

<223> Xaa ở vị trí 21 là Aib

<220>

<221> Dấu hiệu hỗn tạp

<222> (24)..(24)

<223> Xaa ở vị trí 24 là D-Glu

<220>

<221> Dấu hiệu hỗn tạp

<222> (25)..(25)

<223> Xaa ở vị trí 25 là alpha-MeY

<400> 8

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

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

Ser	Gly	Glu	Pro	Pro	Pro	Ser
			35			

<210> 9

<211> 39

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<220>

<221> Dấu hiệu hỗn tạp

<222> (2)..(2)

<223> Xaa ở vị trí 2 là Aib

<220>

<221> Dấu hiệu hỗn tạp

<222> (6)..(6)

<223> Xaa ở vị trí 6 là alpha-MeF(2F)

<220>

<221> Dấu hiệu hỗn tạp

<222> (16)..(16)

<223> Xaa ở vị trí 16 là Orn

<220>

<221> MOD_RES

<222> (17)..(17)

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

<220>

<221> Dấu hiệu hỗn tạp

<222> (20)..(20)

<223> Xaa ở vị trí 20 là 4Pal

<220>

<221> MOD_RES

<222> (39)..(39)

<223> Axit glutamic ở vị trí 39 được amit hóa

<400> 9

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

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

Ser	Gly	Glu	Pro	Pro	Pro	Glu
			35			

<210> 10

<211> 39

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<220>

<221> Dấu hiệu hỗn tạp

<222> (2)..(2)

<223> Xaa ở vị trí 2 là Aib

<220>

<221> Dấu hiệu hỗn tạp

<222> (6)..(6)

<223> Xaa ở vị trí 6 là alpha-MeF(2F)

<220>

<221> Dấu hiệu hỗn tạp

<222> (13)..(13)

<223> Xaa ở vị trí 13 là alpha-MeL

<220>

<221> Dấu hiệu hỗn tạp

<222> (16)..(16)

<223> Xaa ở vị trí 16 là Orn

<220>

<221> MOD_RES

<222> (17)..(17)

<223> K ở vị trí 17 được cải biến hóa học bằng cách liên hợp với nhóm epsilon-amino của chuỗi bên K với (2-[2-(2-Amino-etoxy)-etoxy]-axetyl)-(gamma-Glu)-CO-(CH₂)₁₈-CO₂H

<220>

<221> Dấu hiệu hỗn tạp

<222> (20)..(20)

<223> Xaa ở vị trí 20 là Iva

<220>

<221> Dấu hiệu hỗn tạp

<222> (25)..(25)

<223> Xaa ở vị trí 25 là alpha-MeY

<220>

<221> MOD_RES

<222> (39)..(39)

<223> Ser ở vị trí 39 được amit hóa

<400> 10

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

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

Ser	Gly	Glu	Pro	Pro	Pro	Ser
			35			

<210> 11

<211> 39

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<220>

<221> Dấu hiệu hỗn tạp

<222> (2)..(2)

<223> Xaa ở vị trí 2 là Aib

<220>

<221> Dấu hiệu hỗn tạp

<222> (6)..(6)

<223> Xaa ở vị trí 6 là alpha-MeF(2F)

<220>

<221> Dấu hiệu hỗn tạp

<222> (10)..(10)

<223> Xaa ở vị trí 10 là 4Pal

<220>

<221> Dấu hiệu hỗn tạp

<222> (13)..(13)

<223> Xaa ở vị trí 13 là alpha-MeL

<220>

<221> Dấu hiệu hỗn tạp

<222> (16)..(16)

<223> Xaa ở vị trí 16 là Orn

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (17)..(17)
 <223> K ở vị trí 17 được cải biến hóa học bằng cách liên hợp với
 nhóm epsilon-amino của chuỗi bên K với (2-[2-(2-Amino-etoxy)-
 etoxy]-axetyl)-(gamma-Glu)-CO-(CH₂)₁₈-CO₂H

<220>
 <221> Dấu hiệu hỗn tạp
 <222> (20)..(20)
 <223> Xaa ở vị trí 20 là alpha-MeL

<220>
 <221> Dấu hiệu hỗn tạp
 <222> (21)..(21)
 <223> Xaa ở vị trí 21 là Aib

<220>
 <221> Dấu hiệu hỗn tạp
 <222> (24)..(24)
 <223> Xaa ở vị trí 24 là D-Glu

<220>
 <221> Dấu hiệu hỗn tạp
 <222> (25)..(25)
 <223> Xaa ở vị trí 25 là alpha-MeY

<220>
 <221> Dấu hiệu hỗn tạp
 <222> (39)..(39)
 <223> Ser ở vị trí 39 được amit hóa

<400> 11

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

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

Ser	Gly	Glu	Pro	Pro	Pro	Ser
			35			

<210> 12
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 12

Gly	Pro	Ser	Ser	Gly	Glu	Pro	Pro	Pro	Glu
1				5					10

<210> 13
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 13

Gly Pro Ser Ser Gly Glu Pro Pro Pro Ser
 1 5 10

<210> 14
 <211> 466
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 14

Met Thr Thr Ser Pro Ile Leu Gln Leu Leu Leu Arg Leu Ser Leu Cys
 1 5 10 15

Gly Leu Leu Leu Gln Arg Ala Glu Thr Gly Ser Lys Gly Gln Thr Ala
 20 25 30

Gly Glu Leu Tyr Gln Arg Trp Glu Arg Tyr Arg Arg Glu Cys Gln Glu
 35 40 45

Thr Leu Ala Ala Ala Glu Pro Pro Ser Gly Leu Ala Cys Asn Gly Ser
 50 55 60

Phe Asp Met Tyr Val Cys Trp Asp Tyr Ala Ala Pro Asn Ala Thr Ala
 65 70 75 80

Arg Ala Ser Cys Pro Trp Tyr Leu Pro Trp His His His Val Ala Ala
 85 90 95

Gly Phe Val Leu Arg Gln Cys Gly Ser Asp Gly Gln Trp Gly Leu Trp
 100 105 110

Arg Asp His Thr Gln Cys Glu Asn Pro Glu Lys Asn Glu Ala Phe Leu
 115 120 125

Asp Gln Arg Leu Ile Leu Glu Arg Leu Gln Val Met Tyr Thr Val Gly
 130 135 140

Tyr Ser Leu Ser Leu Ala Thr Leu Leu Leu Ala Leu Leu Ile Leu Ser
 145 150 155 160

Leu Phe Arg Arg Leu His Cys Thr Arg Asn Tyr Ile His Ile Asn Leu
 165 170 175

Phe Thr Ser Phe Met Leu Arg Ala Ala Ala Ile Leu Ser Arg Asp Arg
 180 185 190

Leu Leu Pro Arg Pro Gly Pro Tyr Leu Gly Asp Gln Ala Leu Ala Leu
 195 200 205
 Trp Asn Gln Ala Leu Ala Ala Cys Arg Thr Ala Gln Ile Val Thr Gln
 210 215 220
 Tyr Cys Val Gly Ala Asn Tyr Thr Trp Leu Leu Val Glu Gly Val Tyr
 225 230 235 240
 Leu His Ser Leu Leu Val Leu Val Gly Gly Ser Glu Glu Gly His Phe
 245 250 255
 Arg Tyr Tyr Leu Leu Leu Gly Trp Gly Ala Pro Ala Leu Phe Val Ile
 260 265 270
 Pro Trp Val Ile Val Arg Tyr Leu Tyr Glu Asn Thr Gln Cys Trp Glu
 275 280 285
 Arg Asn Glu Val Lys Ala Ile Trp Trp Ile Ile Arg Thr Pro Ile Leu
 290 295 300
 Met Thr Ile Leu Ile Asn Phe Leu Ile Phe Ile Arg Ile Leu Gly Ile
 305 310 315 320
 Leu Leu Ser Lys Leu Arg Thr Arg Gln Met Arg Cys Arg Asp Tyr Arg
 325 330 335
 Leu Arg Leu Ala Arg Ser Thr Leu Thr Leu Val Pro Leu Leu Gly Val
 340 345 350
 His Glu Val Val Phe Ala Pro Val Thr Glu Glu Gln Ala Arg Gly Ala
 355 360 365
 Leu Arg Phe Ala Lys Leu Gly Phe Glu Ile Phe Leu Ser Ser Phe Gln
 370 375 380
 Gly Phe Leu Val Ser Val Leu Tyr Cys Phe Ile Asn Lys Glu Val Gln
 385 390 395 400
 Ser Glu Ile Arg Arg Gly Trp His His Cys Arg Leu Arg Arg Ser Leu
 405 410 415
 Gly Glu Glu Gln Arg Gln Leu Pro Glu Arg Ala Phe Arg Ala Leu Pro
 420 425 430
 Ser Gly Ser Gly Pro Gly Glu Val Pro Thr Ser Arg Gly Leu Ser Ser
 435 440 445
 Gly Thr Leu Pro Gly Pro Gly Asn Glu Ala Ser Arg Glu Leu Glu Ser
 450 455 460
 Tyr Cys
 465

<210> 15
 <211> 463

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 15

Met Ala Gly Ala Pro Gly Pro Leu Arg Leu Ala Leu Leu Leu Leu Gly
 1 5 10 15

Met Val Gly Arg Ala Gly Pro Arg Pro Gln Gly Ala Thr Val Ser Leu
 20 25 30

Trp Glu Thr Val Gln Lys Trp Arg Glu Tyr Arg Arg Gln Cys Gln Arg
 35 40 45

Ser Leu Thr Glu Asp Pro Pro Pro Ala Thr Asp Leu Phe Cys Asn Arg
 50 55 60

Thr Phe Asp Glu Tyr Ala Cys Trp Pro Asp Gly Glu Pro Gly Ser Phe
 65 70 75 80

Val Asn Val Ser Cys Pro Trp Tyr Leu Pro Trp Ala Ser Ser Val Pro
 85 90 95

Gln Gly His Val Tyr Arg Phe Cys Thr Ala Glu Gly Leu Trp Leu Gln
 100 105 110

Lys Asp Asn Ser Ser Leu Pro Trp Arg Asp Leu Ser Glu Cys Glu Glu
 115 120 125

Ser Lys Arg Gly Glu Arg Ser Ser Pro Glu Glu Gln Leu Leu Phe Leu
 130 135 140

Tyr Ile Ile Tyr Thr Val Gly Tyr Ala Leu Ser Phe Ser Ala Leu Val
 145 150 155 160

Ile Ala Ser Ala Ile Leu Leu Gly Phe Arg His Leu His Cys Thr Arg
 165 170 175

Asn Tyr Ile His Leu Asn Leu Phe Ala Ser Phe Ile Leu Arg Ala Leu
 180 185 190

Ser Val Phe Ile Lys Asp Ala Ala Leu Lys Trp Met Tyr Ser Thr Ala
 195 200 205

Ala Gln Gln His Gln Trp Asp Gly Leu Leu Ser Tyr Gln Asp Ser Leu
 210 215 220

Ser Cys Arg Leu Val Phe Leu Leu Met Gln Tyr Cys Val Ala Ala Asn
 225 230 235 240

Tyr Tyr Trp Leu Leu Val Glu Gly Val Tyr Leu Tyr Thr Leu Leu Ala
 245 250 255

Phe Ser Val Leu Ser Glu Gln Trp Ile Phe Arg Leu Tyr Val Ser Ile
 260 265 270

Gly Trp Gly Val Pro Leu Leu Phe Val Val Pro Trp Gly Ile Val Lys
 275 280 285
 Tyr Leu Tyr Glu Asp Glu Gly Cys Trp Thr Arg Asn Ser Asn Met Asn
 290 295 300
 Tyr Trp Leu Ile Ile Arg Leu Pro Ile Leu Phe Ala Ile Gly Val Asn
 305 310 315 320
 Phe Leu Ile Phe Val Arg Val Ile Cys Ile Val Val Ser Lys Leu Lys
 325 330 335
 Ala Asn Leu Met Cys Lys Thr Asp Ile Lys Cys Arg Leu Ala Lys Ser
 340 345 350
 Thr Leu Thr Leu Ile Pro Leu Leu Gly Thr His Glu Val Ile Phe Ala
 355 360 365
 Phe Val Met Asp Glu His Ala Arg Gly Thr Leu Arg Phe Ile Lys Leu
 370 375 380
 Phe Thr Glu Leu Ser Phe Thr Ser Phe Gln Gly Leu Met Val Ala Ile
 385 390 395 400
 Leu Tyr Cys Phe Val Asn Asn Glu Val Gln Leu Glu Phe Arg Lys Ser
 405 410 415
 Trp Glu Arg Trp Arg Leu Glu His Leu His Ile Gln Arg Asp Ser Ser
 420 425 430
 Met Lys Pro Leu Lys Cys Pro Thr Ser Ser Leu Ser Ser Gly Ala Thr
 435 440 445
 Ala Gly Ser Ser Met Tyr Thr Ala Thr Cys Gln Ala Ser Cys Ser
 450 455 460
 <210> 16
 <211> 476
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại
 <400> 16
 Met Pro Pro Cys Gln Pro Gln Arg Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 Leu Ala Cys Gln Pro Gln Val Pro Ser Ala Gln Val Met Asp Phe Leu
 20 25 30
 Phe Glu Lys Trp Lys Leu Tyr Gly Asp Gln Cys His His Asn Leu Ser
 35 40 45
 Leu Leu Pro Pro Pro Thr Leu Val Cys Asn Arg Thr Phe Asp Lys Tyr
 50 55 60

Ser Cys Trp Pro Asp Thr Pro Ala Asn Thr Thr Ala Asn Ile Ser Cys
 65 70 75 80
 Pro Trp Tyr Leu Pro Trp His His Lys Val Gln His Arg Phe Val Phe
 85 90 95
 Lys Arg Cys Gly Pro Asp Gly Gln Trp Val Arg Gly Pro Arg Gly Gln
 100 105 110
 Pro Trp Arg Asp Ala Ser Gln Cys Gln Met Asp Gly Glu Glu Ile Glu
 115 120 125
 Val Gln Lys Glu Val Ala Lys Met Tyr Ser Ser Phe Gln Val Met Tyr
 130 135 140
 Thr Val Gly Tyr Ser Leu Ser Leu Gly Ala Leu Leu Leu Ala Leu Ala
 145 150 155 160
 Ile Leu Gly Gly Leu Ser Lys Leu His Cys Thr Arg Asn Ala Ile His
 165 170 175
 Ala Asn Leu Phe Ala Ser Phe Val Leu Lys Ala Ser Ser Val Leu Val
 180 185 190
 Ile Asp Gly Leu Leu Arg Thr Arg Tyr Ser Gln Lys Ile Gly Asp Asp
 195 200 205
 Leu Ser Val Ser Thr Trp Leu Ser Asp Gly Ala Val Ala Gly Cys Arg
 210 215 220
 Val Ala Ala Val Phe Met Gln Tyr Gly Ile Val Ala Asn Tyr Cys Trp
 225 230 235 240
 Leu Leu Val Glu Gly Leu Tyr Leu His Asn Leu Leu Gly Leu Ala Thr
 245 250 255
 Leu Pro Glu Arg Ser Phe Phe Ser Leu Tyr Leu Gly Ile Gly Trp Gly
 260 265 270
 Ala Pro Met Leu Phe Val Val Pro Trp Ala Val Val Lys Cys Leu Phe
 275 280 285
 Glu Asn Val Gln Cys Trp Thr Ser Asn Asp Asn Met Gly Phe Trp Trp
 290 295 300
 Ile Leu Arg Phe Pro Val Phe Leu Ala Ile Leu Ile Asn Phe Phe Ile
 305 310 315 320
 Phe Val Arg Ile Val Gln Leu Leu Val Ala Lys Leu Arg Ala Arg Gln
 325 330 335
 Met His His Thr Asp Tyr Lys Phe Arg Leu Ala Lys Ser Thr Leu Thr
 340 345 350
 Leu Ile Pro Leu Leu Gly Val His Glu Val Val Phe Ala Phe Val Thr
 355 360 365

Asp Glu His Ala Gln Gly Thr Leu Arg Ser Ala Lys Leu Phe Phe Asp
370 375 380

Leu Phe Leu Ser Ser Phe Gln Gly Leu Leu Val Ala Val Leu Tyr Cys
385 390 395 400

Phe Leu Asn Lys Glu Val Gln Ser Glu Leu Arg Arg Arg Trp His Arg
405 410 415

Trp Arg Leu Gly Lys Val Leu Trp Glu Glu Arg Asn Thr Ser Asn His
420 425 430

Arg Ala Ser Ser Ser Pro Gly His Gly Pro Pro Ser Lys Glu Leu Gln
435 440 445

Phe Gly Arg Gly Gly Gly Ser Gln Asp Ser Ser Ala Glu Thr Pro Leu
450 455 460

Ala Gly Gly Leu Pro Arg Leu Ala Glu Ser Pro Phe
465 470 475