



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

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

(11) 
1-0020736

(51)⁷ **A61K 38/17, C07K 14/605, A61K 38/26, (13) B**
A61P 3/04, 3/10

(21)	1-2012-02109	(22)	15.12.2010		
(86)	PCT/US2010/060390	15.12.2010	(87)	WO2011/087672	21.07.2011
(30)	61/288,888	22.12.2009	US		
	61/352,576	08.06.2010	US		
(45)	25.04.2019	373	(43)	25.01.2013	298
(73)	ELI LILLY AND COMPANY (US) Lilly Corporate Center, Indianapolis, Indiana 46285, United States of America				
(72)	ALSINA-FERNANDEZ, Jorge (US), KOHN, Wayne, David (CA)				
(74)	Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)				

(54) **CHẤT TƯƠNG TỰ PEPTIT OXYNTOMODULIN VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA CHẤT TƯƠNG TỰ NÀY**

(57) Sáng chế đề xuất chất tương tự peptit Oxyntomodulin hữu ích trong việc điều trị bệnh đái tháo đường và/hoặc béo phì. Sáng chế còn đề xuất dược phẩm chứa chất tương tự peptit Oxyntomodulin, và chất dẫn, chất pha loãng hoặc tá dược được dụng.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến các chất tương tự peptit Oxyntomodulin và đến các dẫn xuất được PEG hóa của chúng để sử dụng trong điều trị bệnh đái tháo đường và/hoặc béo phì.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Oxyntomodulin (OXM) là hormon peptit gồm 37 axit amin mà được giải phóng cùng với Peptit kiểu giống Glucagon 1 (GLP-1) từ các tế bào L của ruột non tỷ lệ với sự tiêu hóa chất dinh dưỡng. Nó bao gồm trình tự đầy đủ gồm 29 gốc của glucagon (Gcg) với sự kéo dài octapeptit tại đầu tận cùng C do việc xử lý luân phiên đặc hiệu mô của preproglucagon. OXM nội sinh bị thoái biến nhanh chóng *in vivo* bằng dipeptidyl peptidaza IV và các peptidaza khác.

Các thụ thể đặc trưng cho OXM vẫn chưa được xác định. OXM liên kết với và hoạt hóa hoàn toàn cả thụ thể GLP-1 (GLP-1R) và thụ thể glucagon (GcgR) *in vitro* với sự hiệu nghiệm tương tự tại hai thụ thể.

OXM tham gia vào sự điều tiết hấp thụ thức ăn và trọng lượng cơ thể. Việc sử dụng cấp OXM cho đối tượng là người có trọng lượng bình thường có tác dụng làm giảm đói và giảm cỡ bữa ăn 19%. Trong nghiên cứu 4 tuần với các đối tượng thừa cân và béo phì, việc sử dụng OXM dưới da trước bữa ăn tạo ra sự giảm 2,3kg trọng lượng so với 0,5 trọng lượng trong nhóm đối chứng. Trong thử nghiệm này, tác dụng phụ phổ biến nhất liên quan đến liệu pháp dựa vào GLP-1 (chẳng hạn exenatit và liraglutit) ít nghiêm trọng hơn. OXM làm tăng việc sử dụng năng lượng nhờ sự thúc đẩy hoạt động thể chất ở người thừa cân và béo phì, mặc dù cơ chế tác dụng không rõ ràng.

OXM thể hiện một vài thử thách phát triển thành chất trị liệu có thể tồn tại trên thị trường. Như đã đề cập ở trên, nó nhanh chóng bị thoái biến *in vivo* cũng như chịu sự thanh thải ở thận nhanh do kích thước nhỏ. Do đó, mong muốn xác định các chất tương tự peptit OXM với tính ổn định chuyển hóa được cải thiện và tốc độ thanh thải ở thận giảm. Hơn nữa, hoạt tính chủ vận GcgR vốn có trong OXM thể hiện nguy cơ tác

động bất lợi đối với đối chứng glyxemic. Do đó, cũng mong muốn tối ưu hóa hiệu lực của chất tương tự peptit OXM được thiết kế cho mục đích trị liệu trong khi vẫn duy trì sự cân bằng thích hợp giữa các hoạt tính tại GLP-1R và GcgR. Sự hoạt hóa của GLP-1R có tác dụng kích thích tiết insulin trong khi sự hoạt hóa của cả GLP-1R và GcgR có thể đóng vai trò trong tác dụng giảm cân. Do đó, mong muốn tạo ra chất tương tự peptit OXM mà có hoạt tính kích thích tiết insulin hiệu nghiệm và thúc đẩy sự giảm cân để có thể được sử dụng trong điều trị bệnh đái tháo đường không phụ thuộc insulin và/hoặc béo phì.

Các peptit OXM với sự thể axit amin để cải thiện tính ổn định và với những cải biến khác để làm chậm sự thanh thải ở thận, chẳng hạn sự PEG hóa hoặc lipit hóa được bộc lộ trong WO 2008101017, WO2006134340, WO2007100535, và Pocai et al. *Diabetes* 58:2258-2266, 2009. Mặc dù các peptit dẫn xuất từ OXM này có thể thể hiện sự cải thiện tiềm tàng so với peptit kiểu đại, nhưng liều lượng cần để đạt được sự giảm trọng lượng khá lớn ở mô hình chuột nhất bị béo phì do chế độ ăn (DIO) thường cao hơn có thể được coi là khả thi cho sự thương mại hóa trong ngành dược. Ví dụ, Pocai et al (2009) thông báo sự giảm cân trung bình 11g (~25 %) sau 13 ngày dùng liều 1900nmol/kg (~8 mg/kg) hàng ngày (QOD).

Bất kể tính khả dụng của các peptit OXM khác nhau và các chất tương tự của chúng, vẫn cần các chất tương tự peptit OXM hiệu nghiệm hơn, ổn định hơn, tác dụng lâu dài và dung nạp tốt hơn có tỷ lệ hoạt tính giữa GcgR/GLP-1R mà được tối ưu hóa để tính hiệu nghiệm và hoạt tính kích thích tiết insulin của peptit cung cấp phương pháp điều trị hữu hiệu đối với bệnh đái tháo đường, ưu tiên đái tháo đường typ 2 và các rối loạn liên quan. Ngoài ra, còn mong muốn cung cấp các chất tương tự peptit OXM mà cung cấp phương pháp điều trị hữu hiệu để giảm cân. Theo đó, sáng chế tìm kiếm phương pháp điều trị hữu hiệu cho bệnh đái tháo đường và/hoặc béo phì.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất chất tương tự peptit OXM với sự thể axit amin để tối ưu hóa tính ổn định chuyển hóa và điều biến hoạt tính GcgR/GLP-1R tương ứng trong khi vẫn tối ưu hóa hiệu lực tổng thể. Ngoài ra, chất tương tự peptit OXM theo sáng chế được

PEG hóa tại các vị trí chọn lọc để tăng cường thời gian tác dụng, từ đó cho phép dùng liều với tần xuất ít hơn.

Sáng chế đề xuất chất tương tự pepit Oxyntomodulin bao gồm trình tự axit amin:

```

1               5               10
His- (Aib) -Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-
      15               20               25
Leu-Asp-Ser-Lys-Lys-Ala-Gln-Glu-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Leu-Asn-
      30               35
(Aib) -Gly-Arg-Asn-Arg-Asn-Asn-Ile-Ala-Xaa38-Xaa39 (SEQ ID NO: 5)

```

trong đó Xaa₃₈ là Cys, Cys-PEG, hoặc không có mặt, Xaa₃₉ là Cys, Cys-PEG, hoặc không có mặt,

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

Sáng chế đề xuất chất tương tự pepit Oxyntomodulin bao gồm trình tự axit amin:

```

1               5               10
His- (Aib) -Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-
      15               20               25
Leu-Asp-Ser-Lys-Lys-Ala-Gln-Glu-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Leu-Asn-
      30               35
(Aib) -Gly-Arg-Asn-Arg-Asn-Asn-Ile-Ala (SEQ ID NO: 1).

```

Hơn nữa, sáng chế đề xuất chất tương tự pepit Oxyntomodulin bao gồm trình tự axit amin:

```

1               5               10
His- (Aib) -Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-
      15               20               25
Leu-Asp-Ser-Lys-Lys-Ala-Gln-Glu-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Leu-Asn-
      30               35
(Aib) -Gly-Arg-Asn-Arg-Asn-Asn-Ile-Ala-Cys-Cys (SEQ ID NO: 2).

```

trong đó gốc Cys ở vị trí 38 tùy ý được PEG hóa, và trong đó gốc Cys ở vị trí 39 tùy ý được PEG hóa, và nhóm carboxyl của Cys ở vị trí 39 tùy ý được amit hóa.

Ưu tiên, chất tương tự peptit Oxyntomodulin có SEQ ID NO: 2 được PEG hóa trên gốc Cys ở vị trí 38 hoặc gốc Cys ở vị trí 39 hoặc cả hai với phân tử PEG có kích thước 40 kDa được liên kết cộng hóa trị với nhóm thiol của gốc Cys tại các vị trí này. Ưu tiên hơn, peptit Oxyntomodulin được PEG hóa trên mỗi gốc Cys ở vị trí 38 và vị trí 39 với phân tử PEG có kích thước 20kDa được liên kết cộng hóa trị với mỗi nhóm thiol của mỗi gốc Cys ở các vị trí này. Tùy ý, gốc Cys ở vị trí 39 có thể không có mặt trong SEQ ID NO: 2, để lại một vị trí cho sự PEG hóa ở vị trí 38.

Chất tương tự pepit Oxyntomodulin ưu tiên hơn bao gồm trình tự axit amin:

1	5	10
His- (Aib) -Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-		
15	20	25
Leu-Asp-Ser-Lys-Lys-Ala-Gln-Glu-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Leu-Asn-		
30	35	
(Aib) -Gly-Arg-Asn-Arg-Asn-Asn-Ile-Ala-Cys (20kDa PEG) -Cys (PEG 20kDa) (SEQ ID NO: 3) .		

trong đó nhóm carboxyl của Cys được PEG hóa ở vị trí 39 tùy ý được amit hóa.

Chất tương tự pepit Oxyntomodulin được ưu tiên hơn bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 3, trong đó nhóm carboxyl của Cys được PEG hóa ở vị trí 39 được amit hóa.

Phân tử PEG được sử dụng trong sáng chế này có thể là mạch thẳng hoặc phân nhánh và được ưu tiên là phân tử PEG mạch thẳng.

Sáng chế đề xuất được phẩm bao gồm chất tương tự peptit Oxyntomodulin như đã xác định ở trên, và chất mang được dụng, chất pha loãng hoặc tá dược. Ngoài ra, sáng chế đề xuất được phẩm bao gồm chất tương tự peptit Oxyntomodulin như đã xác định ở trên, cùng với chất mang được dụng, chất pha loãng hoặc tá dược và tùy ý các thành phần trị liệu khác.

Hơn nữa, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị bệnh đái tháo đường (typ 2) không phụ thuộc insulin ở đối tượng cần điều trị, bao gồm cho đối tượng cần điều trị sử dụng một lượng hữu hiệu chất tương tự peptit Oxyntomodulin như đã xác định ở trên.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị bệnh đái tháo đường (typ 1) phụ thuộc insulin ở đối tượng cần điều trị, bao gồm cho đối tượng cần điều trị sử dụng một lượng hữu hiệu chất tương tự peptit Oxyntomodulin như đã xác định ở trên.

Sáng chế bao gồm phương pháp điều trị bệnh béo phì ở đối tượng cần điều trị, bao gồm cho đối tượng cần điều trị sử dụng một lượng hữu hiệu chất tương tự peptit Oxyntomodulin như đã xác định ở trên.

Hơn nữa, sáng chế bao gồm phương pháp điều trị bệnh đái tháo đường không phụ thuộc insulin và béo phì ở đối tượng cần điều trị, bao gồm cho đối tượng cần điều trị sử dụng một lượng hữu hiệu chất tương tự peptit Oxyntomodulin như đã xác định ở trên.

Sáng chế đề xuất chất tương tự peptit Oxyntomodulin như đã xác định ở trên để sử dụng làm thuốc.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất chất tương tự peptit Oxyntomodulin như đã xác định ở trên để sử dụng trong điều trị bệnh đái tháo đường không phụ thuộc insulin.

Hơn nữa, sáng chế đề xuất chất tương tự peptit Oxyntomodulin như đã xác định ở trên để sử dụng trong điều trị bệnh đái tháo đường phụ thuộc insulin.

Hơn nữa, sáng chế đề xuất chất tương tự peptit Oxyntomodulin như đã xác định ở trên để sử dụng trong điều trị bệnh béo phì.

Sáng chế đề xuất chất tương tự peptit Oxyntomodulin như đã xác định ở trên để sử dụng trong điều trị bệnh đái tháo đường không phụ thuộc insulin và béo phì.

Sáng chế đề xuất việc sử dụng chất tương tự peptit Oxyntomodulin như đã xác định ở trên để sản xuất thuốc điều trị bệnh đái tháo đường không phụ thuộc insulin.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất việc sử dụng chất tương tự peptit Oxyntomodulin như đã xác định ở trên để sản xuất thuốc điều trị bệnh đái tháo đường phụ thuộc insulin.

Hơn nữa, sáng chế đề xuất việc sử dụng chất tương tự peptit Oxyntomodulin như đã xác định ở trên để sản xuất thuốc điều trị bệnh béo phì.

Hơn nữa, sáng chế đề xuất việc sử dụng chất tương tự peptit Oxyntomodulin như đã xác định ở trên để sản xuất thuốc điều trị bệnh đái tháo đường không phụ thuộc insulin và béo phì.

Mô tả chi tiết sáng chế

Các chất tương tự peptit OXM theo sáng chế liên kết hữu hiệu với và hoạt hóa cả thụ thể GLP-1 và thụ thể glucagon (GcgR)..

Ngoài ra, đã phát hiện ra rằng chất tương tự peptit OXM theo sáng chế kháng sự thoái biến bởi peptidaza, cụ thể là dipeptidyl peptidaza IV hơn so với OXM tự nhiên ở người. Do đó, chất tương tự peptit OXM theo sáng chế có tính ổn định *in vivo* được cải thiện so với OXM tự nhiên ở người.

Các phương án khác nhau theo sáng chế có thể gây ra sự giảm hấp thụ thức ăn ở các đối tượng mắc bệnh thừa cân và béo phì.

Ưu điểm đặc biệt của sáng chế là ở chỗ tần suất các tác dụng phụ, chẳng hạn buồn nôn mà thường đi kèm với liệu pháp dựa vào GLP-1, chẳng hạn exenatid và liraglutid, được làm giảm hoặc loại bỏ. Do đó, sáng chế làm giảm tác dụng phụ so với liệu pháp dựa vào GLP-1.

Các chất tương tự peptit OXM theo sáng chế có tác dụng giảm cân vượt trội so với OXM kiểu đại ở người.

Theo một phương án của sáng chế, các chất tương tự peptit Oxyntomodulin có sự dung nạp glucoza và profin lipid được cải thiện trên các đối tượng mắc bệnh đái tháo đường typ 2 và/hoặc rối loạn chuyển hóa liên quan và thực hiện điều này hiệu quả hơn so với OXM kiểu đại ở người.

Oxyntomodulin (OXM) là chất đồng chủ vận yếu với tính hiệu quả đầy đủ và tính hiệu nghiệm được cân bằng tại hGLP-1R và hGcgR, với giá trị EC₅₀ tương ứng là $6,7 \pm 2,7\text{nM}$ và $4,1 \pm 1,7\text{nM}$, ở các tế bào HEK293 biểu hiện quá mức một cách ổn định các thụ thể tương ứng này. Trình tự của OXM tự nhiên ở người là:

His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr-Lys-Arg-Asn-Arg-Asn-Asn-Ile-Ala (SEQ ID NO: 4)

Chất tương tự peptit OXM có SEQ ID NO: 3, trong đó Cys(PEG20k) ở vị trí 39 được amit hóa là chất tương tự peptit Oxyntomodulin có hiệu quả đầy đủ và hiệu nghiệm với EC₅₀ là $59,9 \pm 4,14\text{nM}$ và $2,75 \pm 0,55\text{nM}$ đối với hGcgR và hGLP-1R. Do đó, chất tương tự peptit OXM có SEQ ID NO: 3, trong đó Cys(PEG20k) ở vị trí 39 được amit hóa có sự cân bằng hoạt tính chức năng *in vitro* mà chọn lọc hGLP-1R hơn

gấp ~22 lần so với hGcgR. Kết quả so sánh được quan sát đối với ái lực liên kết, K_i , trong đó chất tương tự peptit OXM có SEQ ID NO: 3 trong đó Cys(PEG20k) ở vị trí 39 được amit hóa chọn lọc đối với hGLP-1R hơn gấp 28 lần so với hGcgR, với giá trị K_i là $73 \pm 23\text{nM}$ và $2050 \pm 70\text{nM}$.

Sự gắn kết cộng hóa trị của một hoặc nhiều phân tử PEG vào các gốc cụ thể của chất tương tự peptit OXM dẫn đến chất tương tự peptit OXM được PEG hóa với thời gian bán hủy kéo dài và tốc độ thanh thải ở thận giảm, khi so sánh với thời gian bán hủy và tốc độ thanh thải ở thận của chất tương tự peptit OXM không được PEG hóa, và tính hiệu nghiệm *in vitro* tại GLP-1R tương tự tính hiệu nghiệm của OXM tự nhiên ở người. Với kích thước nhỏ của chất tương tự peptit OXM và kích thước lớn tương đối của (các) phân tử PEG, hi vọng rằng chất tương tự peptit OXM, một khi được PEG hóa, sẽ mất hoạt tính do trở lực không gian. Tuy nhiên, đã phát hiện ra rằng nếu được đặt tại đầu tận cùng của chất tương tự peptit Oxyntomodulin thay vì ở giữa, hoạt tính của chất tương tự peptit được giữ ở mức lớn hơn. Một vài vị trí thể trong trình tự làm tăng tính hiệu nghiệm, nhờ đó bù đắp sự mất tính hiệu nghiệm do sự PEG hóa trong khi duy trì tỷ lệ phù hợp của các hoạt tính tại GLP-1R và GcgR. Hơn nữa, đã phát hiện ra rằng sự có mặt của các phân tử PEG tại đầu tận cùng C của chất tương tự peptit Oxyntomodulin được ưu tiên đối với PEG đơn.

Các trình tự của sáng chế chứa chữ cái đơn chuẩn hoặc ba mã chữ cái cho 20 axit amin có trong tự nhiên. Các mã khác được sử dụng được xác định như ở dưới đây:

Aib = axit alpha amino isobutyric

PEG = polyetylen glycol

PEG20K = phân tử PEG với trọng lượng phân tử trung bình là 20000Da

Thuật ngữ "PEG" như được sử dụng ở đây có nghĩa là phân tử polyetylen glycol. Ở dạng điển hình, PEG là polyme mạch thẳng với các nhóm hydroxyl ở đầu tận cùng và có công thức $\text{HO-CH}_2\text{CH}_2\text{-(CH}_2\text{CH}_2\text{O)}_n\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{-OH}$, trong đó n là từ khoảng 8 đến khoảng 4000. Thông thường, n là giá trị rời rạc nhưng cấu thành nên khoảng với phân bố Gauss quanh giá trị trung bình. Hydro tận cùng có thể được thế bằng nhóm chạp, như nhóm alkyl hoặc alkanol. Tốt hơn, PEG có ít nhất một nhóm hydroxy, tốt hơn nữa nó là nhóm hydroxy tận cùng. Nhóm hydro này được ưu tiên gắn

vào gốc chất liên kết mà có thể phản ứng với peptit để tạo thành liên kết cộng hóa trị. Nhiều dẫn xuất của PEG tồn tại trong lĩnh vực kỹ thuật này. (Xem, ví dụ, Patent Mỹ số: US 5,445,090; 5,900,461; 5,932,462; 6,436,386; 6,448,369; 6,437,025; 6,448,369; 6,495,659; 6,515,100 và 6,514,491 và Zalipsky, S. *Bioconjugate Chem.* 6:150-165, 1995). Phân tử PEG được gắn kết cộng hóa trị vào peptit OXM theo sáng chế có thể có trọng lượng phân tử trung bình xấp xỉ 10000, 20000, 30000, hoặc 40000 dalton. Phân tử PEG tốt hơn là từ 18000 đến 22000 dalton. Tốt hơn là từ 19000 đến 21000 dalton. Tốt hơn là từ 20000 đến 21000 dalton. Thậm chí tốt hơn là xấp xỉ 20000 dalton. Các chất phản ứng PEG hóa có thể là các phân tử mạch thẳng hoặc phân nhánh và có thể tồn tại đơn lẻ hoặc tiếp nối. Các chất tương tự peptit OXM được PEG hóa theo sáng chế tốt hơn là có các phân tử PEG tiếp nối được gắn vào đầu tận cùng C của peptit này. Các phân tử PEG này tốt hơn là được gắn vào hai gốc xystein tại đầu tận cùng C của peptit bằng mPEG-20kDa maleimit (Fig.1) hoặc mPEG-20kDa iodoaxetamit (Fig.2). Trong Fig.1 và Fig.2, n là từ 10 đến 2500. Tốt hơn là n nằm trong khoảng từ 350 đến 600; Tốt hơn là n nằm trong khoảng từ 425 đến 475;

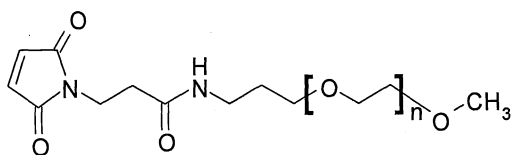


Fig.1

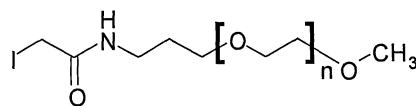


Fig.2

Cụ thể, các phân tử PEG tốt hơn là mPEG-20kDa maleimit ($\text{CH}_3\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n(\text{CH}_2)_3\text{NHCO}(\text{CH}_2)_2\text{-maleimit}$) (NOF Sunbright ME-200MA) và được gắn vào hai gốc xystein tại đầu tận cùng C của peptit. Chất tương tự pepit Oxyntomodulin được ưu tiên nhất bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 3, trong đó các phân tử PEG là mPEG-20kDa maleimit ($\text{CH}_3\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n(\text{CH}_2)_3\text{NHCO}(\text{CH}_2)_2\text{-maleimit}$) (NOF Sunbright ME-200MA) và trong đó nhóm carboxyl của Cys được PEG hóa ở vị trí 39 được amit hóa (FIG.3). Fig.3 chứa mã axit amin chữ cái đơn chuẩn với ngoại trừ ở vùng hộp trong đó cấu trúc đối với các gốc axit amin này được kéo dài.

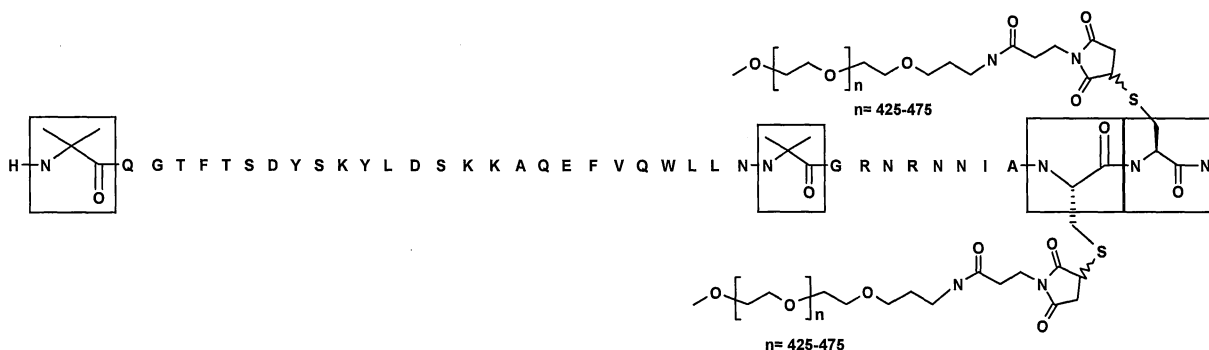


Fig.3

Thuật ngữ “sự PEG hóa” như được sử dụng ở đây có nghĩa là sự gắn kết cộng hóa trị của một hoặc nhiều phân tử PEG, như đã mô tả ở trên, vào phân tử chẳng hạn chất tương tự peptit OXM theo sáng chế.

Thuật ngữ "hoạt tính kích thích tiết insulin (Insulinotropic activity)" để chỉ khả năng thúc đẩy sự tiết insulin đáp ứng với mức glucoza tăng cao, từ đó gây ra sự hấp thụ glucoza bởi tế bào và mức glucoza huyết tương giảm. Hoạt tính kích thích tiết insulin có thể được đánh giá bởi các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, bao gồm các thử nghiệm *in vitro* mà đánh giá sự tiết insulin bởi các dòng tế bào u tụy nội tiết insulin hoặc các tiểu đảo, hoặc thử nghiệm *in vivo* như thử nghiệm dung nạp glucoza trong tĩnh mạch (IVGTT), thử nghiệm dung nạp glucoza trong màng bụng (IPGTT), và thử nghiệm dung nạp glucoza qua đường miệng. Hoạt tính kích thích tiết insulin được đánh giá thường xuyên ở người bằng cách đo mức insulin hoặc mức C-peptit. Các chất tương tự peptit OXM theo sáng chế có hoạt tính kích thích tiết insulin mạnh.

Thuật ngữ "tính hiệu nghiệm *in vitro*" như được sử dụng ở đây là sự đánh giá khả năng hoạt hóa GLP-1R hoặc GcgR của chất tương tự peptit OXM trong thử nghiệm trên cơ sở tế bào. Tính hiệu nghiệm *in vitro* được thể hiện là "EC₅₀", là nồng độ hữu hiệu của hợp chất dẫn đến sự tăng bán tối đa trong đáp ứng đo được (trong trường hợp này, sản xuất AMP mạch vòng) trong thử nghiệm đáp ứng liều lượng.

Thuật ngữ “thời gian bán hủy trong huyết tương” (“plasma half-life”) đề chỉ thời gian cần thiết cho một nửa phân tử thích hợp được thanh thải ra khỏi huyết tương. Thuật ngữ được sử dụng thay thế là “thời gian bán hủy loại trừ” (“elimination half-life”). Thuật ngữ “kéo dài” (“extended” hoặc “longer”) được sử dụng trong phạm vi

của "thời gian bán hủy trong huyết tương" hoặc "thời gian bán hủy loại trừ" để chỉ có sự tăng đáng kể ở thời gian bán hủy của chất tương tự peptit OXM được PEG hóa so với thời gian bán hủy của phân tử tham chiếu (ví dụ, dạng không được PEG hóa của peptit hoặc peptit tự nhiên) như được xác định dưới các điều kiện so sánh. Thời gian bán hủy của OXM tự nhiên ở khỉ, ví dụ, ưu tiên nhỏ hơn 1 giờ. Chất tương tự peptit OXM được PEG hóa theo sáng chế có thời gian bán hủy ít nhất là 24 giờ ở khỉ và ưu tiên nhất ít nhất 48 giờ. Thời gian bán hủy ở đây là thời gian bán hủy loại trừ, tương ứng với tốc độ loại trừ log-tuyến tính đầu tận cùng. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực cần phải biết rằng thời gian bán hủy là một thông số suy ra; thông số này thay đổi dưới dạng hàm của cả hệ số thanh thải và thể tích phân bố.

Thuật ngữ "chất chủ vận GLP-1R có tác dụng kéo dài" như được sử dụng ở đây để chỉ chất tương tự peptit GLP-1 được gắn kết cộng hóa trị với một hoặc nhiều phân tử của polyetylen glycol (PEG). Hợp chất GLP-1 được PEG hóa được bộc lộ trong Patent Mỹ số 7,557,183.

Hệ số thanh thải là phép đo khả năng loại bỏ thuốc ra khỏi hệ tuần hoàn máu của cơ thể. Khi hệ số thanh thải giảm do, ví dụ, những biến đổi ở thuốc, thời gian bán hủy sẽ tăng. Tuy nhiên, mối quan hệ thuận nghịch này chỉ chính xác khi không có sự thay đổi ở thể tích phân bố. Mối quan hệ gần đúng hữu ích giữa thời gian bán hủy log-tuyến tính cuối cùng ($t_{1/2}$), hệ số thanh thải (C), và thể tích phân bố (V) được đưa ra bởi phương trình: $t_{1/2} \approx 0,693 (V/C)$. Hệ số thanh thải không thể hiện lượng thuốc bị loại bỏ nhưng cho biết thể tích chất lỏng sinh học, chẳng hạn máu hoặc huyết tương mà phải được loại bỏ thuốc hoàn toàn. Hệ số thanh thải được biểu diễn là thể tích trên đơn vị thời gian. Các chất tương tự peptit OXM được PEG hóa theo sáng chế tốt hơn là có giá trị của hệ số thanh thải là 200ml/giờ/kg hoặc nhỏ hơn ở khỉ, tốt hơn là 180, 150, 120, 100, 80, 60ml/giờ/kg hoặc nhỏ hơn và tốt nhất là 50, 40 hoặc 20ml/h/kg hoặc nhỏ hơn.

Các chất tương tự peptit OXM theo sáng chế thường được sử dụng ngoài đường tiêu hóa. Việc sử dụng ngoài đường tiêu hóa bao gồm, ví dụ, sử dụng toàn thân, chẳng hạn trong cơ, trong tĩnh mạch, dưới da, trong da, hoặc tiêm vào trong màng bụng. Chất tương tự peptit OXM được sử dụng cho đối tượng kết hợp với chất mang, chất pha loãng hoặc tá dược được dùng là một phần của dược phẩm để điều trị bệnh đái tháo đường (typ 2) không phụ thuộc insulin, NIDDM, hoặc các rối

loạn khác được thảo luận ở dưới. Dược phẩm này có thể là dung dịch hoặc huyền phù, chẳng hạn dược phẩm trong đó chất tương tự peptit OXM được tạo phức với cation kim loại hóa trị hai chẳng hạn kẽm. Chất tương tự peptit cũng có thể được bào chế ở dạng chế phẩm rắn, chẳng hạn bằng cách đông khô hoặc sấy phun, mà sau đó được hoàn nguyên trong dung dịch pha loãng thích hợp trước khi sử dụng. Chất mang dược lý thích hợp có thể chứa các thành phần trơ mà không tương tác với peptit hoặc dẫn xuất của peptit. Chất mang dược lý thích hợp để sử dụng ngoài đường tiêu hóa bao gồm, ví dụ, nước vô trùng, nước muối sinh lý, nước muối kìm hãm vi khuẩn (nước muối chứa khoảng 0,9% mg/ml rượu benzyl), nước muối đệm phosphat, dung dịch Hank, Ringer's-lactat và tương tự. Một số ví dụ về tá dược thích hợp bao gồm lactoza, dextroza, sucroza, trehaloza, sorbitol, và manitol và các dẫn xuất chẳng hạn phenol và m-cresol.

Kỹ thuật bào chế dược phẩm chuẩn, chẳng hạn các kỹ thuật được mô tả trong Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Company, Easton, PA), có thể được sử dụng. Chất tương tự peptit OXM theo sáng chế có thể được bào chế theo cách khác để sử dụng qua đường miệng, đường uống, qua da, mũi, hoặc đường phổi. Chất tương tự peptit OXM theo sáng chế có thể được bào chế để kéo dài sự giải phóng sao cho mức huyết tương trong máu được duy trì trong khoảng thời gian kéo dài hữu hiệu sau khi sử dụng.

Chất tương tự peptit OXM theo sáng chế có thể được sử dụng để điều trị bệnh đái tháo đường, cụ thể là đái tháo đường typ 2 (đái tháo đường không phụ thuộc insulin, NIDDM). Các đối tượng khác mà có thể hưởng lợi từ phương pháp điều trị với chất tương tự peptit OXM theo sáng chế bao gồm những người bị rối loạn dung nạp glucoza hoặc rối loạn glucoza lúc đói, các đối tượng có trọng lượng cơ thể bằng khoảng 25% hoặc lớn hơn trọng lượng cơ thể bình thường so với chiều cao và cân nặng của họ, các đối tượng có bố hoặc mẹ hoặc cả hai mắc NIDDM, các đối tượng bị đái tháo đường trong thời kỳ thai nghén, và các đối tượng bị rối loạn chuyển hóa, chẳng hạn do sự tiết insulin nội sinh giảm. Chất tương tự peptit OXM có thể được sử dụng để ngăn các đối tượng bị rối loạn dung nạp glucoza phát triển thành đái tháo đường typ 2, ngăn làm hư hại tế bào β tuyến tụy, kích thích sự tăng sinh tế bào β , cải thiện chức năng tế bào β , hoạt hóa các tế bào β không hoạt động, thúc đẩy sự biệt hóa

của tế bào thành các tế bào β , kích thích sự sao chép tế bào β , và ức chế cơ chế gây chết tế bào β theo chương trình. Các bệnh hoặc tình trạng bệnh khác mà có thể được điều trị hoặc ngăn chặn bằng cách sử dụng hợp chất theo sáng chế trong phương pháp của sáng chế bao gồm: đái tháo đường khởi phát ở người trẻ tuổi (MODY) (Herman, et al., *Diabetes* 43:40, 1994); đái tháo đường tiềm ẩn tự miễn ở người lớn (LADA) (Zimmet, et al., *Diabetes Med.* 11:299, 1994); rối loạn dung nạp glucoza (IGT) (Expert Committee on Classification of Diabetes Mellitus, *Diabetes Care* 22 (Supp. 1):S5, 1999); rối loạn đường huyết lúc đói (IFG) (Charles, et al., *Diabetes* 40:796, 1991); đái tháo đường thai kỳ (Metzger, *Diabetes*, 40:197, 1991); hội chứng chuyển hóa X, rối loạn mỡ máu, chứng tăng glucoza huyết, chứng tăng insulin huyết, chứng tăng triglycerit huyết, và tính kháng insulin.

Chất tương tự peptit OXM theo sáng chế cũng có thể được sử dụng trong phương pháp điều trị nguyên nhân thứ cấp của đái tháo đường (Expert Committee on Classification of Diabetes Mellitus, *Diabetes Care* 22 (Supp. 1):S5, 1999). Các nguyên nhân thứ cấp này bao gồm dư thừa glucocorticoid, dư thừa hormon tăng trưởng, u tủy thượng thận và đái tháo đường do thuốc gây ra. Các loại thuốc mà có thể dẫn đến đái tháo đường bao gồm, nhưng không giới hạn ở, pyriminil, axit nicotinic, glucocorticoid, phenytoin, hormon tuyến giáp, các chất giải phóng adrenalin β , interferon α và các loại thuốc được sử dụng để điều trị sự lây nhiễm HIV.

Chất tương tự peptit OXM theo sáng chế có thể hữu hiệu trong việc ngăn sự hấp thụ thức ăn và điều trị bệnh béo phì.

Một "lượng hữu hiệu" chất tương tự peptit OXM là lượng dẫn đến tác dụng trị liệu và/hoặc phòng bệnh mong muốn mà không gây ra tác dụng phụ bất lợi khi được sử dụng cho đối tượng. "Tác dụng trị liệu mong muốn" bao gồm một hoặc nhiều tác dụng sau: 1) thuyên giảm triệu chứng liên quan đến bệnh hoặc tình trạng bệnh; 2) làm chậm sự khởi phát các triệu chứng liên quan đến bệnh hoặc tình trạng bệnh; 3) tăng tuổi thọ so với khi không điều trị; và 4) tăng chất lượng cuộc sống so với khi không điều trị. Ví dụ, "lượng hữu hiệu" chất tương tự peptit OXM để điều trị NIDDM là lượng dẫn đến sự kiểm soát nồng độ glucoza huyết lớn hơn so với khi không điều trị, từ đó dẫn đến làm chậm sự khởi phát của các biến chứng đái tháo đường như bệnh màng lưới, bệnh thần kinh hoặc bệnh thận. Một "lượng hữu hiệu" chất tương tự peptit

OXM để ngăn ngừa NIDDM, ví dụ ở các đối tượng bị rối loạn dung nạp glucoza hoặc rối loạn đường huyết lúc đói, là lượng làm chậm sự khởi phát mức glucoza huyết tăng cao mà cần phải điều trị bằng thuốc chống tăng glucoza huyết như sulfonylure, thiazolidinedion, insulin, và/hoặc các bisguanidin, so với khi không điều trị.

Một "lượng hữu hiệu" chất tương tự peptit OXM được sử dụng cho đối tượng sẽ phụ thuộc vào loại và mức độ nghiêm trọng của bệnh và vào đặc điểm của đối tượng chẳng hạn tình trạng sức khỏe nói chung, tuổi, giới tính, trọng lượng cơ thể và dung nạp thuốc. Liều dùng của chất tương tự peptit OXM hữu hiệu để bình thường hóa mức glucoza huyết của đối tượng sẽ phụ thuộc vào nhiều yếu tố, các yếu tố này bao gồm, nhưng không giới hạn ở, giới tính, trọng lượng và tuổi của đối tượng, mức độ trầm trọng của khả năng không thể điều tiết glucoza huyết, đường dùng và độ sinh khả dụng, profin động dược học của peptit, tính hiệu nghiệm và dạng bào chế.

Liều dùng tuần một lần thông thường cho các chất tương tự peptit OXM được PEG hóa theo sáng chế tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0,1mg đến 1000mg (tổng trọng lượng của thể tiếp hợp). Tốt hơn, liều dùng tuần một lần sẽ nằm trong khoảng từ 1mg đến 100mg, hoặc từ 1mg đến 30mg. Tốt nhất, liều dùng hàng ngày sẽ nằm trong khoảng từ 5mg đến 30mg, hoặc từ 1mg đến 5mg.

"Đối tượng" là động vật có vú, tốt hơn là người, nhưng cũng có thể là động vật, bao gồm động vật bầu bạn (ví dụ, chó, mèo, và tương tự), động vật trang trại (ví dụ, bò cái, cừu, lợn, ngựa và tương tự) và các động vật thí nghiệm (ví dụ, chuột hoang, chuột nhà, chuột lang, và tương tự).

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các đặc điểm và phương án ưu tiên khác nhau của sáng chế sẽ được mô tả qua các ví dụ.

Ví dụ 1: Tổng hợp peptit

Chất tương tự peptit theo SEQ ID NO: 1 và SEQ ID NO: 2 của sáng chế được tạo ra bằng cách tổng hợp peptit pha rắn trên thiết bị tổng hợp peptit tự động Protein Technologies Inc. Symphony hoặc Applied Biosystems 433A. Phương pháp tổng hợp được thực hiện trên nhựa polystyren amit Fmoc-Rink (Rapp Polymere Tubingen, Germany) với sự thể xấp xỉ 0,7mmol/g. Việc tổng hợp được thực hiện bằng cách sử

dụng chiến lược nhóm bảo vệ chuỗi chính Fmoc. Các dẫn xuất chuỗi bên của axit amin được sử dụng là: Arg(Pbf), Asn(Trt), Asp(OtBu), Cys(Trt), Gln(Trt), Glu(OtBu), His(Trt), Lys(Boc), Ser(OtBu), Thr(OtBu), Trp(Boc), and Tyr(OtBu). Việc kết hợp được thực hiện với xấp xỉ 10 đương lượng axit amin được hoạt hóa bằng diisopropylcarbodiimide (DIC) và hydroxybenzotriazol (HOBt) (tỷ lệ mol 1:1:1) trong dimethylformamide (DMF) hoặc N-methyl pyrrolidinon (NMP). Quy trình kết hợp được tiến hành trong khoảng thời gian từ 45 đến 90 phút ở nhiệt độ trong phòng.

Sự phân cắt đồng thời từ nhựa và sự loại bỏ nhóm bảo vệ chuỗi bên được tiến hành trong dung dịch chứa axit trifloacetic (TFA):triisopropylsilan: 3,6-dioxa-1,8-octan-dithiol: metanol : anisol 90:4:2:2:2 (thể tích/thể tích) trong khoảng thời gian 1,5 đến 2 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Dung dịch được lọc và cô đặc tới thể tích < 2mL, các peptit được kết tủa với diethyl ete lạnh, tái hòa tan trong 30-40mL axetonitril 10% và được tinh chế trên cột sắc ký lỏng hiệu năng cao pha đảo C₁₈ (HPLC) (thường là Waters SymmetryPrep 7 um, 19 x 300 mm) tại lưu lượng 12-15mL/phút. Các mẫu được rửa giải bằng gradien AB tuyến tính hai giai đoạn từ 0 đến 25% B trong khoảng thời gian 20 phút, tiếp đến bằng 25 đến 75 % B trong khoảng thời gian 100 phút trong đó A = 0,05% TFA/nước và B = 0,05% TFA/axetonitril. Sản phẩm thường rửa giải tại 30-35 % axetonitril. Độ tinh khiết của peptit và trọng lượng phân tử được xác nhận trên hệ thống khối phổ sắc ký lỏng (LC-MS) Agilent 1100 Series với thiết bị dò tìm MS mạch bốn cực đơn. Sự phân tách HPLC phân tích được thực hiện trên cột Zorbax Eclipse XDB-C8, 5 micron, 4,6mm i.d. x 15cm với gradien AB tuyến tính 6 đến 60 % B trong khoảng thời gian 15 phút trong đó A = 0,05 % TFA/H₂O và B = 0,05 % TFA/axetonitril và lưu lượng là 1ml/phút. Chất tương tự peptit được tinh chế tới độ tinh khiết >95% và được xác nhận là có trọng lượng phân tử tương ứng với giá trị tính toán trong 1 đơn vị khối lượng nguyên tử (amu).

Ví dụ 2: Sự PEG hóa của peptit chứa hai gốc Cys với mPEG-MAL-20kDa

Chất tương tự peptit đã được đông khô (SEQ ID NO 2) được tạo ra theo Ví dụ 1 được định lượng (thường từ 30-50mg). Đương lượng phân tử 2,1 lần của mPEG-20kDa maleimide ($\text{CH}_3\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-(\text{CH}_2)_3\text{NHCO}(\text{CH}_2)_2\text{-maleimide}$) (NOF Sunbright ME-200MA) được cân và kết hợp với peptit. Các chất phản ứng được hòa tan trong

hỗn hợp nước/axetonitril 50/50 (thể tích/thể tích) tới nồng độ peptit xấp xỉ 20mg/mL. Dung dịch chất tương tự peptit được pha loãng hai lần với amoni axetat 100nM, axit etylendiaminetetraaxetic 10mM (EDTA), pH 7. Hỗn hợp tạo thành sau đó được khuấy ở nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp phản ứng được kiểm soát bởi HPLC pha đảo phân tích (phân tách HPLC phân tích được thực hiện trên cột Waters SymmetryShield C18, 3,5 micron, 4,6 mm i.d. x 10cm ở nhiệt độ 50°C với gradien AB tuyến tính hai giai đoạn 0 đến 30 % B trong khoảng thời gian 5 phút và 30 đến 90 % B trong khoảng thời gian 30 phút tiếp theo trong đó A = 0,05 % TFA/H₂O và B = 0,05 % TFA/axetonitril và lưu lượng là 1ml/phút), và thông thường sau 1-2 giờ phản ứng, thể hiện sự biến mất gần như hoàn toàn của pic peptit. Hai pic do peptit được PEG hóa đơn và đôi xuất hiện với peptit PEG hóa đôi thường cấu thành nên 90-95% tổng diện tích pic. Mẫu sau đó được pha loãng tới khoảng 20mL với nước và được tinh chế như trong Ví dụ 1 với gradien AB tuyến tính hai giai đoạn 0 đến 30% B trong khoảng thời gian hơn 20 phút, tiếp đến là 30 đến 80% B trong khoảng thời gian hơn 100 phút. Sản phẩm này thường rửa giải tại axetonitril 30-40%. Peptit tinh chế được định lượng bằng sự hấp thụ cực tím (UV) tại bước sóng 280nm bằng cách sử dụng hệ số hấp thụ mol tính toán dựa vào trình tự peptit. Hiệu suất sau khi tinh chế nằm trong khoảng từ 70 đến 80% dựa vào lượng peptit ban đầu.

Ví dụ 3: Thử nghiệm liên kết thụ thể glucagon (hGcgR).

Thử nghiệm liên kết thụ thể Glucagon sử dụng thụ thể glucagon tách dòng ở người (hGcgR) (Lok S, Kuijper JL, Jelinek LJ, Kramer JM, Whitmore TE, Sprecher CA, Mathewes S, Grant FJ, Biggs SH, Rosenberg GB, et al. *Gene* 140 (2), 203-209 (1994)) mà được phân lập từ màng 293HEK. cADN của hGcgR được tách dòng vào plasmit biểu hiện pHD (Trans-activated expression of fully gamma-carboxylated recombinant human protein C, an antithrombotic factor, Grinnell, B.W., Berg, D.T., Walls, J. and Yan, S.B. *Bio/Technology* 5: 1189-1192 (1987)). ADN plasmit này được chuyển nhiễm vào các tế bào 293HEK và được chọn lọc bằng Hygromyxin 200µg/ml.

Màng huyết tương thô được điều chế bằng cách sử dụng các tế bào từ canh trường huyền phù. Các tế bào được ly giải trên đá trong đệm nhược trương chứa Tris HCl 25mM, pH 7,5, MgCl₂ 1mM, DNase1, 20ug/ml, và chất ức chế Roche Complete

không có EDTA. Huyền phù tế bào được đồng nhất bằng thiết bị đồng nhất Donce thủy tinh sử dụng chày Teflon cho 25 chu kỳ. Dịch đồng nhất được ly tâm ở nhiệt độ 4°C tại 1800 x g trong khoảng thời gian 15 phút. Phần dịch nổi trên bề mặt được thu và hạt được tái tạo huyền phù trong đệm nhược trương và tái đồng nhất. Hỗn hợp được ly tâm tại 1800 x g trong khoảng thời gian 15 phút. Phần dịch nổi trên bề mặt thứ hai được kết hợp với phần dịch nổi trên bề mặt thứ nhất. Các phần dịch nổi trên bề mặt kết hợp được ly tâm tại 1800 x g trong khoảng thời gian 15 phút để lọc. Phần dịch nổi trên bề mặt đã lọc được chuyển vào các ống tốc độ cao và được ly tâm tại 25000 x g trong khoảng thời gian 30 phút ở nhiệt độ 4°C. Hạt màng được tái tạo huyền phù trong đệm đồng nhất và được bảo quản dưới dạng các phần phân ước đông lạnh ở nhiệt độ -80°C cho đến khi sử dụng.

Glucagon được iot phóng xạ bởi quy trình ^{125}I -lactoperoxidaza và được tinh chế bằng HPLC pha đảo tại HPLC Perkin-Elmer/NEN (NEX207). Hoạt tính đặc trưng là khoảng 2200Ci/mmol. Việc xác định K_D được thực hiện bằng thử nghiệm cạnh tranh tương đồng thay vì thử nghiệm liên kết bão hòa do hàm lượng propanol cao trong vật liệu glucagon được đánh dấu ^{125}I . K_D được ước tính là 2,62nM và được sử dụng để tính giá trị K_i cho tất cả các hợp chất thử nghiệm.

Thử nghiệm liên kết thụ thể được tiến hành bằng cách sử dụng Thử nghiệm cận nhấp nháy (Scintillation proximity Assay - SPA) với hạt agglutinin mầm lúa mì (wheat germ agglutinin - WGA) đã được hãm trước đó với albumin huyết thanh bò không chứa axit béo 1% (BSA). Đệm liên kết chứa axit 4-(2-hydroxyetyl)-1-piperazinetansulfonic 25mM (HEPES), pH 7,4, CaCl_2 2,5mM, MgCl_2 1mM, BSA không chứa axit béo 0,1 %, Tween20 0,003%, và chất ức chế Roche Complete không có EDTA. Glucagon được hòa tan trong HCl 0,01N ở nồng độ 1mg/ml và được đông lạnh ngay lập tức ở nhiệt độ -80°C trong 30µl phần phân ước. Phần phân ước Glucagon được pha loãng và sử dụng trong thử nghiệm liên kết trong vòng 1 giờ. Chất tương tự peptit OXM được hòa tan trong nước muối được tạo đệm phosphat (PBS) và được pha loãng từng bậc trong đệm liên kết. Tiếp đến, 10µl hợp chất đã pha loãng hoặc PBS được chuyển vào trong các đĩa thử nghiệm đáy trong Corning 3632 chứa 40µl đệm liên kết thử nghiệm hoặc glucagon lạnh (liên kết không đặc hiệu (NSB) tại nồng độ cuối 1µM). Sau đó, 90µl màng (3µg/giếng), 50µl Glucagon được đánh dấu

^{125}I (nồng độ cuối 0,15nM trong phản ứng), và 50 μl hạt WGA (150 μg /giếng) được bổ sung. Các đĩa được bịt kín, trộn đều, và được đọc bằng máy đếm nhấp nháy MicroBeta sau 12 giờ của thời gian thiết lập ở nhiệt độ trong phòng.

Các kết quả được tính là tỷ lệ % liên kết glucagon được đánh dấu ^{125}I đặc hiệu với sự có mặt của hợp chất. Nồng độ IC_{50} tuyệt đối của hợp chất thu được bởi sự hồi quy không tuyến tính của liên kết đặc hiệu theo phần trăm của glucagon đánh dấu ^{125}I so với nồng độ của hợp chất bổ sung. Liều lượng IC_{50} được biến đổi thành Ki sử dụng phương trình Cheng-Prusoff (Cheng Y., Prusoff W. H., Biochem. Pharmacol. 22, 3099-3108, 1973). Ki của chất tương tự peptit OXM có SEQ ID NO: 3 trong đó Cys(PEG20k) ở vị trí 39 được amit hóa là $2050 \pm 70\text{nM}$ đối với liên kết hGcgR.

Ví dụ 4: Thử nghiệm liên kết thụ thể Peptit giống kiểu Glucagon 1 (hGLP-1-R)

Thử nghiệm liên kết thụ thể GLP-1 sử dụng thụ thể peptit giống kiểu glucagon tách dòng ở người 1 (hGLP-1R) (Graziano MP, Hey PJ, Borkowski D, Chicchi GG, Strader CD, Biochem Biophys Res Commun. 1993 Oct 15;196(1):141-6) mà được phân lập từ màng 293HEK. cADN của hGcgR được tách dòng thành plasmit biểu hiện pH D (Trans-activated expression of fully gamma-carboxylated recombinant human protein C, an antithrombotic factor, Grinnell, B.W., Berg, D.T., Walls, J. and Yan, S.B. Bio/Technology 5: 1189-1192 (1987)). ADN plasmit này được chuyển nhiễm vào các tế bào 293HEK và được chọn lọc bằng Hygromyxin 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Màng huyết tương thô được điều chế bằng cách sử dụng các tế bào từ canh trường huyền phù. Các tế bào được ly giải trên đá trong đệm nhược trương chứa Tris HCl 25mM, pH 7,5, MgCl_2 1mM, DNase1, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$, và chất ức chế Roche Complete không có EDTA. Huyền phù tế bào được đồng nhất bằng thiết bị đồng nhất Dounce thủy tinh sử dụng chày Teflon cho 25 chu kỳ. Dịch đồng nhất được ly tâm ở nhiệt độ 4°C tại 1800 x g trong khoảng thời gian 15 phút. Phần dịch nổi trên bề mặt được thu và hạt được tái tạo huyền phù trong đệm nhược trương và tái đồng nhất. Hỗn hợp được ly tâm tại 1800xg trong khoảng thời gian 15 phút. Phần dịch nổi trên bề mặt thứ hai được kết hợp với phần dịch nổi trên bề mặt thứ nhất. Các phần dịch nổi trên bề mặt kết hợp được ly tâm tại 1800 x g trong khoảng thời gian 15 phút để lọc. Phần dịch nổi trên bề mặt đã lọc được chuyển vào các ống tốc độ cao và được ly tâm tại 25000 x g trong

khoảng thời gian 30 phút ở nhiệt độ 4°C. Hạt màng được tái tạo huyền phù trong đệm đồng nhất và được bảo quản dưới dạng các phần phân ước đông lạnh ở nhiệt độ -80°C cho đến khi sử dụng.

Peptit giống kiểu glucagon (GLP-1) được gắn iot phóng xạ bằng quy trình ¹²⁵I-lactoperoxidaza và được tinh chế bằng HPLC pha đảo tại HPLC Perkin-Elmer/NEN (NEX308). Hoạt tính đặc trưng là khoảng 2200Ci/mmol. Việc xác định K_D được thực hiện bằng thử nghiệm cạnh tranh tương đồng thay vì thử nghiệm liên kết bão hòa do hàm lượng propanol cao trong vật liệu glucagon được đánh dấu ¹²⁵I. K_D được ước tính là 0,96nM và được sử dụng để tính giá trị K_i cho tất cả các hợp chất thử nghiệm.

Thử nghiệm liên kết thụ thể được tiến hành bằng cách sử dụng Thử nghiệm cạnh nhấp nháy (SPA) với hạt agglutinin mầm lúa mì (WGA) đã được hãm trước đó với BSA không chứa axit béo 1%. Đệm liên kết chứa HEPES, pH 7,4, CaCl₂ 2,5mM, MgCl₂ 1mM, BSA không chứa axit béo 0,1 %, Tween20 0,003%, và chất ức chế Roche Complete không có EDTA. GLP-1 được hòa tan trong PBS ở nồng độ 1mg/ml và được đông lạnh ngay lập tức ở nhiệt độ -80°C trong 30μl phần phân ước. Phần phân ước GLP-1 được làm tan bằng, pha loãng và sử dụng trong thử nghiệm liên kết trong vòng 1 giờ. Chất tương tự peptit OXM được hòa tan trong PBS và được pha loãng từng bậc trong đệm liên kết. Tiếp đến, 10μl hợp chất đã pha loãng hoặc PBS được chuyển vào trong các đĩa thử nghiệm đáy trong Corning 3632 chứa 40μl đệm liên kết thử nghiệm hoặc GLP-1 lạnh (NSB tại nồng độ cuối 1μM). Sau đó, 90μl màng (1μg/giếng), 50μl GLP-1 được đánh dấu ¹²⁵I (nồng độ cuối 0,15nM trong phản ứng), và 50μl hạt WGA (150μg/giếng) được bổ sung. Các đĩa được bịt kín, trộn đều, và được đọc bằng máy đếm nhấp nháy MicroBeta sau 12 giờ của thời gian thiết lập ở nhiệt độ trong phòng.

Các kết quả được tính là tỷ lệ % liên kết GLP-1 được đánh dấu ¹²⁵I đặc hiệu với sự có mặt của hợp chất. Nồng độ IC₅₀ tuyệt đối của hợp chất thu được bởi sự hồi quy không tuyến tính của phần trăm liên kết đặc hiệu của glucagon đánh dấu ¹²⁵I so với nồng độ của hợp chất bổ sung. Nồng độ IC₅₀ được biến đổi thành K_i sử dụng phương trình Cheng-Prusoff (Cheng Y., Prusoff W. H., Biochem. Pharmacol. 22, 3099-3108, 1973). K_i của chất tương tự peptit OXM có SEQ ID NO: 3 trong đó Cys(PEG20k) ở vị trí 39 được amit hóa là 73 ± 70nM đối với liên kết hGLP-1R.

Ví dụ 5: Thử nghiệm chức năng cAMP được kích thích bởi thụ thể Glucagon (hGcgR)

Thử nghiệm chức năng cAMP được kích thích bởi Glucagon sử dụng cùng dòng tế bào biểu hiện hGcgR tách dòng như được sử dụng cho thử nghiệm liên kết hGlucR đã mô tả ở trên trong Ví dụ 3. Các tế bào được kích thích bằng chất tương tự peptit OXM và cAMP được tạo ra bên trong tế bào được định lượng bằng cách sử dụng Thử nghiệm đồng nhất cận phát sáng khuếch đại (Alpha Screen) từ Perkin Elmer (6760625R). Tóm lại, cAMP được kích thích bên trong tế bào cạnh tranh để liên kết cAMP được biotinyl hóa từ kit với hạt chất nhận kháng thể kháng cAMP được phủ và hạt chất cho được phủ streptavidin. Do mức cAMP bên trong tế bào tăng nên xảy ra sự phá vỡ của phức hạt chất nhận- cAMP được biotinyl hóa- hạt chất cho và làm giảm tín hiệu quan sát được.

Các tế bào hGcgR-HEK293 được thu hoạch từ đĩa nuôi cấy mô nhập dòng phụ với dung dịch phân ly tế bào không chứa enzym, (Specialty Media 5-004-B). Các tế bào được tạo hạt tại tốc độ thấp và được rửa 3 lần với đệm thử nghiệm [HEPES 25mM trong dung dịch muối đệm Hank (HBSS)-với Mg và Ca (GIBCO, 14025-092) với BSA không chứa axit béo 0,1%] sau đó được pha loãng tới nồng độ cuối là 125000 tế bào cho mỗi ml. cAMP được biotinyl hóa từ kit Alpha Screen được bổ sung vào các tế bào đã pha loãng ở nồng độ cuối là 1 đơn vị/0,04ml. Chất ức chế phosphodiesteraza, IBMX (250mM trong dimetyl sulfoxit (DMSO)), cũng được bổ sung vào các tế bào đã pha loãng tới nồng độ cuối là 500uM. Glucagon ban đầu được hòa tan trong HCl 0,01N ở nồng độ 1mg/ml và được đông khô ngay lập tức ở nhiệt độ -80°C. Sau khi làm tan băng, glucagon được sử dụng trong vòng 1 giờ. Glucagon, chuẩn cAMP, và chất tương tự peptit OXM được pha loãng từng bậc trong đệm thử nghiệm tới nồng độ cuối 6X. Thử nghiệm chức năng được thực hiện trong các đĩa Costar polystyren 96 giếng, thể tích thấp, màu trắng. Phản ứng bắt đầu bằng cách bổ sung 0,01ml peptit đã pha loãng, glucagon, hoặc cAMP vào 0,04ml hỗn hợp tế bào. Sau 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng, phản ứng được dừng lại bằng cách bổ sung 0,03ml đệm phân giải [HEPES 10mM, pH=7,4, NP40 1%, và BSA không chứa axit béo 0,01% chứa mỗi 1 đơn vị/0,03ml hạt chất nhận và chất cho từ Kit Alpha Screen]. Việc bổ sung đệm phân giải được thực hiện trong bóng tối để ngăn tẩy trắng các hạt dò tìm. Các đĩa được bọc

thành cuộn, lắc nhẹ trong khoảng thời gian 1 phút sau đó được để cân bằng qua đêm ở nhiệt độ trong phòng. Các đĩa được đọc trên thiết bị Perkin-Elmer Envision. Các đơn vị Alpha screen được biến đổi thành pmol cAMP mà được tạo ra trên giếng dựa vào đường cong chuẩn cAMP. pmol cAMP tạo ra trong mỗi giếng được biến đổi theo tỷ lệ % đáp ứng tối đa quan sát được với đối chứng glucagon. Giá trị EC₅₀ thu được bằng phép phân tích hồi quy không tuyến tính sử dụng tỷ lệ phần trăm đáp ứng tối đa với nồng độ của peptit được bổ sung. Chất tương tự peptit OXM có SEQ ID NO: 3 trong đó Cys(PEG20k) ở vị trí 39 được amit hóa, giống OXM kiểu đại, đạt hiệu quả hoàn toàn và hiệu nghiệm tại hGcgR với EC₅₀ là $59,9 \pm 4,14\text{nM}$.

Ví dụ 6: Thử nghiệm chức năng cAMP được kích thích bởi thụ thể peptit giống kiểu glucagon 1 (hGLP-1R)

Thử nghiệm chức năng cAMP được kích thích bởi GLP-1 sử dụng cùng dòng tế bào biểu hiện hGLP-1R được tách dòng như được sử dụng cho thử nghiệm liên kết hGlucR đã mô tả ở trên trong Ví dụ 4. Các tế bào được kích thích bằng chất tương tự peptit OXM và cAMP được tạo ra bên trong tế bào được định lượng bằng cách sử dụng Thử nghiệm đồng nhất cận phát sáng (Alpha Screen) được khuếch đại từ Perkin Elmer (6760625R). Tóm lại, cAMP được kích thích bên trong tế bào cạnh tranh để liên kết cAMP được biotinyl hóa từ kit với hạt chất nhận kháng thể kháng cAMP được phủ và hạt chất cho được phủ streptavidin. Do mức cAMP bên trong tế bào tăng nên xảy ra sự phá vỡ của phức hạt chất nhận- cAMP được biotinyl hóa- hạt chất cho và làm giảm tín hiệu quan sát được.

Các tế bào hGLP-1R-HEK293 được thu hoạch từ đĩa nuôi cấy mô nhập dòng phụ với dung dịch phân ly tế bào không chứa enzym, (Specialty Media 5-004-B). Các tế bào được tạo hạt ở tốc độ thấp và được rửa 3 lần với đệm thử nghiệm [HEPES 25mM trong HBSS)-với Mg và Ca (GIBCO, 14025-092) với BSA không chứa axit béo 0,1%], sau đó được pha loãng tới nồng độ cuối là 125000 tế bào trên ml. cAMP được biotinyl hóa từ kit Alpha Screen được bổ sung vào các tế bào đã pha loãng ở nồng độ cuối là 1 đơn vị/0,04ml. Chất ức chế phosphodiesteraza, IBMX (250mM trong DMSO), cũng được bổ sung vào các tế bào đã pha loãng tới nồng độ cuối là 500μM. GLP-1 được bảo quản ở nồng độ 1mg/ml trong PBS dưới dạng phân phân ước

được đông lạnh ở nhiệt độ -80°C . GLP-1, chuẩn cAMP, và chất tương tự peptit OXM được pha loãng từng bậc trong đệm thử nghiệm tới nồng độ cuối 6X. Thử nghiệm chức năng được thực hiện trong các đĩa Costar polystyren 96 giếng, thể tích thấp, màu trắng. Phản ứng được bắt đầu bằng cách bổ sung 0,01ml chất tương tự peptit OXM đã pha loãng, GLP-1, hoặc cAMP vào 0,04ml hỗn hợp tế bào. Sau 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng, phản ứng được dừng lại bằng cách bổ sung 0,03ml đệm phân giải [HEPES 10mM, pH=7,4, NP40 1%, và BSA không chứa axit béo 0,01% chứa mỗi 1 đơn vị 1/0,03ml hạt Chất nhận và Chất cho từ Kit Alpha Screen]. Sự bổ sung đệm phân giải được thực hiện trong bóng tối để ngăn tẩy trắng các hạt dò tìm. Các đĩa được bọc thành cuộn, lắc nhẹ trong khoảng thời gian 1 phút sau đó được để cân bằng qua đêm ở nhiệt độ trong phòng. Các đĩa được đọc trên thiết bị Perkin-Elmer Envision. Các đơn vị Alpha screen được biến đổi thành pmol cAMP mà được tạo ra trên giếng dựa vào đường cong chuẩn cAMP. pmol cAMP được tạo ra trong mỗi giếng được biến đổi thành tỷ lệ % đáp ứng tối đa quan sát được với đối chứng GLP-1. Giá trị EC_{50} thu được bằng phép phân tích hồi quy không tuyến tính sử dụng tỷ lệ đáp ứng tối đa đối với nồng độ của peptit được bổ sung. Chất tương tự peptit OXM có SEQ ID NO: 3, trong đó Cys(PEG20k) ở vị trí 39 được amit hóa, OXM kiểu đại, đạt hiệu quả hoàn toàn và hiệu nghiệm tại hGLP-1R với EC_{50} là $2,75 \pm 0,55\text{nM}$.

Ví dụ 7: Tác dụng lên sự hấp thụ thức ăn, cân nặng và thành phần cơ thể ở chuột nhắt bị béo phì do chế độ ăn gây ra (DIO)

Thử nghiệm sử dụng chuột nhắt C57BL/6 đực, 3 đến 4 tháng tuổi bị béo phì do chế độ ăn gây ra. Các con chuột được giữ riêng trong môi trường được kiểm soát nhiệt độ (24°C) với chu kỳ 12 giờ sáng/tối (sáng vào lúc 22:00), và tự do tiếp cận thức ăn và nước. Sau 2 tuần thích nghi với môi trường, các con chuột được phân ngẫu nhiên thành các nhóm điều trị ($n=8-10/\text{nhóm}$), mỗi nhóm có cân nặng trung bình và khối lượng béo như nhau. Trước thử nghiệm, các con chuột được tiêm dưới da (sc) dung dịch chất dẫn và được cân trong khoảng thời gian 2 ngày để làm chúng thích nghi với quy trình.

Chất dẫn hoặc chất tương tự peptit OXM (khoảng liều dùng 6,7-20nmol/kg) được hòa tan trong chất dẫn được sử dụng bằng cách tiêm vào dưới da chuột DIO đã

được cho ăn tự do 30-90 phút trước khi bắt đầu chu kỳ tối 3 ngày một lần trong từ 2 đến 4 tuần. Cân nặng và trọng lượng thức ăn cộng với phễu được đo cùng lúc. Thức ăn đã tiêu thụ trong 24 giờ trước đó được tính toán bằng cách lấy trọng lượng thức ăn hiện tại cộng với phễu trừ đi trọng lượng thức ăn của ngày trước đó. Những thay đổi tuyệt đối ở cân nặng được tính bằng cách lấy cân nặng hiện tại của con vật trừ đi cân nặng của con vật trước lần tiêm đầu tiên. Vào các ngày 1, 14 và 28 tổng khối lượng chất béo được đo bằng cộng hưởng từ hạt nhân (NMR) sử dụng thiết bị Echo Medical System (Houston, TX). Khối lượng không chứa chất béo được tính toán bằng cách lấy tổng trọng lượng cơ thể trừ đi khối lượng chất béo.

Nghiên cứu 1. Điều trị hai tuần

Chất tương tự peptit OXM có SEQ ID NO: 3, trong đó Cys(PEG20k) ở vị trí 39 được amit hóa *in vivo*, được sử dụng bằng cách tiêm vào dưới da chuột C57BL/6 đực, 4 tháng tuổi bị béo phì do chế độ ăn gây ra (DIO). Chất tương tự peptit OXM được tiêm 3 ngày một lần trong khoảng thời gian 2 tuần tại liều dùng 7,5 và 15nmol/kg và so sánh với chuột được điều trị bằng chất dẫn và chuột được điều trị bằng đối chứng dương (được tiêm 7,5nmol/kg chất chủ vận GLP-1R có tác dụng kéo dài 3 ngày một lần).

Việc điều trị bằng chất tương tự peptit OXM có SEQ ID NO: 3, trong đó Cys(PEG20k) ở vị trí 39 được amit hóa làm giảm sự hấp thụ thức ăn và trọng lượng cơ thể theo kiểu phụ thuộc liều lượng. Cuối nghiên cứu 2 tuần, mức độ hấp thụ thức ăn tích lũy trong nhóm sử dụng 15 nmol/kg giảm đi 27% so với nhóm sử dụng chất dẫn. Mức độ giảm cân tích lũy của nhóm sử dụng 7,5nmol/kg tương tự sự giảm cân quan sát được với nhóm đối chứng dương; giảm khoảng 9% so với nhóm chất dẫn. Mức độ giảm cân tích lũy được kiểm soát bằng chất dẫn ở nhóm điều trị bằng 15nmol/kg là 18%. Phép phân tích thành phần cơ thể cho thấy rằng sự giảm cân chủ yếu là do giảm khối lượng chất béo (Bảng 1).

Bảng 1

Sự thay đổi trọng lượng ở chuột DIO trong khoảng thời gian điều trị hơn 14 ngày.

(giá trị trung bình $\pm$ SEM; n = 8)

Liều chất tương tự peptit OXM có SEQ ID NO: 3, trong đó Cys(PEG20k) ở vị trí 39 được amit hóa (nmol/kg)	Mức giảm cân tổng thể (mức thay đổi trọng lượng g trong khoảng thời gian 14 ngày)	Mức hấp thụ thức ăn tổng (tổng số g trong khoảng thời gian 14 ngày)	Mức giảm khối lượng chất béo (mức thay đổi trọng lượng chất béo g trong khoảng thời gian 14 ngày)
0 (Chất dẫn)	$1,0 \pm 0,5$	$40,7 \pm 1,3$	$0,3 \pm 0,3$
7,5	$-3,1 \pm 0,4^*$	$35,0 \pm 0,8^*$	$-2,2 \pm 0,3^*$
15	$-6,1 \pm 0,9^*$	$29,8 \pm 1,5^*$	$-3,9 \pm 0,7^*$

Những dữ liệu này cho thấy rằng chất tương tự peptit OXM có SEQ ID NO: 3, trong đó Cys(PEG20k) ở vị trí 39 được amit hóa, làm giảm sự hấp thụ thức ăn tích lũy và trọng lượng cơ thể trong các nghiên cứu ở chuột DIO 14 ngày, so với chuột được điều trị bằng chất dẫn. Trọng lượng cơ thể giảm chủ yếu là do giảm khối lượng chất béo. * $p < 0,05$ so với chất dẫn (Kiểm định Dunnett)

Nghiên cứu 2. Điều trị bốn tuần

Chất tương tự peptit OXM có SEQ ID NO: 3 trong đó Cys(PEG20k) ở vị trí 39 được amit hóa (6,7 hoặc 20 nmol/kg) và đối chứng dương (7,5 hoặc 22,5 nmol/kg chất chủ vận GLP-1R có tác dụng kéo dài) được sử dụng 3 ngày một lần bằng cách tiêm dưới da chuột C57BL/6 bị béo phì do chế độ ăn (DIO) C57BL/6 trong khoảng thời gian 4 tuần.

Việc điều trị với liều lượng cao chất tương tự peptit OXM có SEQ ID NO: 3, trong đó Cys(PEG20k) ở vị trí 39 được amit hóa (nmol/kg), làm giảm đáng kể sự hấp thụ thức ăn tích lũy. Tại các liều lượng thấp hơn, chất tương tự peptit OXM có SEQ ID NO: 3 trong đó Cys(PEG20k) ở vị trí 39 được amit hóa làm giảm trọng lượng cơ thể tới mức tương tự như được thấy trong nhóm đối chứng dương. Ở liều lượng

20nmol/kg, chất tương tự peptit OXM có SEQ ID NO: 3 trong đó Cys(PEG20k) ở vị trí 39 được amit hóa gây ra sự giảm cân lớn hơn đáng kể khi so sánh với liều lượng 22,5nmol/kg của đối chứng dương. Sự giảm trọng lượng tối đa (khoảng 25% trọng lượng cơ thể ban đầu) đạt được sau 15 ngày điều trị. Sự phân tích thành phần cơ thể xác nhận rằng sự giảm cân liên quan đến chất tương tự peptit OXM và đối chứng dương chủ yếu là do sự giảm khối lượng chất béo (Bảng 2).

Tác dụng của chất tương tự peptit OXM có SEQ ID NO: 3, trong đó Cys(PEG20k) ở vị trí 39 được amit hóa, tiếp tục được đánh giá với phép đo nhiệt lượng gián tiếp vào ngày từ 21 đến 23. Các con chuột được điều trị bằng chất tương tự peptit OXM có SEQ ID NO: 3, trong đó Cys(PEG20k) ở vị trí 39, được amit hóa (20nmol/kg) có sự tiêu hao năng lượng lớn hơn đáng kể so với đối chứng được điều trị bằng chất dẫn (sự tiêu hao năng lượng 24 giờ trung bình vào ngày 21 tăng lên 18%). Chất tương tự peptit OXM có SEQ ID NO: 3, trong đó Cys(PEG20k) ở vị trí 39 được amit hóa, không dẫn đến sự thay đổi đáng kể ở mức hoạt tính vận động đối với đối chứng chất dẫn.

Kết thúc nghiên cứu, mức insulin và cholesterol trong huyết tương thấp hơn đáng kể trong tất cả các nhóm được điều trị so với đối chứng được điều trị bằng chất dẫn với liều lượng cao của chất tương tự OXM có SEQ ID NO: 3, trong đó Cys(PEG20k) ở vị trí 39 được amit hóa, làm giảm đáng kể mức leptin. Tất cả các nhóm được điều trị bằng peptit có mức adiponectin trong huyết tương cao hơn so với đối chứng được điều trị bằng chất dẫn, nhưng chỉ nhóm được điều trị bằng liều lượng cao chất tương tự peptit OXM có SEQ ID NO: 3, trong đó Cys(PEG20k) ở vị trí 39 được amit hóa, có sự khác biệt đáng kể về mặt thống kê.

Bảng 2

Sự thay đổi trọng lượng ở chuột DIO trong khoảng thời gian điều trị hơn 28 ngày.

(giá trị trung bình $\pm$ SEM; n = 9)

Liều chất tương tự peptit OXM có SEQ ID NO: 3 trong đó Cys(PEG20k) ở vị trí 39 được amit hóa (nmol/kg)	Mức giảm cân tổng thể (mức thay đổi trọng lượng g trong khoảng thời gian 28 ngày)	Mức hấp thụ thức ăn tổng thể (tổng g trong khoảng thời gian 14 ngày đầu tiên)	Mức giảm khối lượng chất béo (mức thay đổi trọng lượng chất béo g trong khoảng thời gian 28 ngày)
0 (Chất dẫn)	$0,8 \pm 0,2$	$39,2 \pm 0,8$	$0,5 \pm 0,1$
6,7	$-2,0 \pm 0,4^*$	$36,0 \pm 1,1$	$-0,7 \pm 0,2^*$
20,0	$-11,1 \pm 0,9^*$	$26,1 \pm 1,4^*$	$-7,5 \pm 0,7^*$

Các dữ liệu này cho thấy chất tương tự peptit OXM có SEQ ID NO: 3, trong đó Cys(PEG20k) ở vị trí 39 được amit hóa, làm giảm sự hấp thụ thức ăn tích lũy và trọng lượng cơ thể trong các nghiên cứu ở chuột DIO 28 ngày, so với chuột được điều trị bằng chất dẫn. Trọng lượng cơ thể giảm chủ yếu là do giảm khối lượng chất béo. * $p < 0,05$ so với chất dẫn (Kiểm định Dunnett).

Ví dụ 8: Tác dụng lên sự thay đổi mức glucoza huyết trong quy trình thử nghiệm dung nạp glucoza qua đường miệng hoặc thử nghiệm dung nạp glucoza qua đường trong màng bụng sau khi điều trị 2 tuần hoặc 4 tuần ở chuột DIO

56 giờ sau lần tiêm cuối cùng như được mô tả trong Ví dụ 7 (nghiên cứu 1) ở chuột DIO, chuột bị bỏ đói trong khoảng thời gian 16 giờ trước khi bắt đầu thử nghiệm dung nạp glucoza. Tại thời điểm 0, các con chuột được sử dụng dextroza 2g/kg bằng ống thông qua đường miệng hoặc tiêm vào trong màng bụng (IP). Lấy máu ở tĩnh mạch tai tại 0, 15, 30, 60 và 120 phút sau khi dùng liều thử thách (challenge) glucoza. Nồng độ glucoza được đo bằng máy đo glucoza. Tất cả liều lượng của chất tương tự peptit OXM có SEQ ID NO: 3, trong đó Cys(PEG20k) ở vị trí 39 được amit hóa, cũng như đối chứng dương làm giảm đáng kể mức glucoza huyết tại tất cả thời điểm được

đo trước và sau thử nghiệm liều thử thách glucoza qua đường miệng khi so với đối chứng được điều trị bằng chất dẫn (Bảng 3).

Thử nghiệm dung nạp glucoza qua đường trong màng bụng (IPGTT) được thực hiện vào ngày 29, 3 ngày sau lần tiêm cuối cùng như được mô tả trong Ví dụ 7 (Thử nghiệm 2) ở chuột DIO. Liều lượng thấp của chất tương tự peptit OXM có SEQ ID NO: 3, trong đó Cys(PEG20k) ở vị trí 39 được amit hóa, làm giảm glucoza huyết lúc đối tượng ứng với mức giảm của đối chứng được điều trị bằng chất dẫn nhưng có ít tác dụng lên mức glucoza sau liều thử thách glucoza IP. Liều lượng cao của chất tương tự peptit OXM có SEQ ID NO: 3, trong đó Cys(PEG20k) ở vị trí 39 được amit hóa và cả hai liều lượng của đối chứng dương làm giảm đáng kể mức glucoza huyết tại tất cả thời điểm đo trước và sau liều thử thách glucoza IP khi so với đối chứng được điều trị bằng chất dẫn (Bảng 4).

Bảng 3

Tác dụng của chất tương tự peptit OXM có SEQ ID NO: 3, trong đó Cys(PEG20k) ở vị trí 39 được amit hóa, lên sự thay đổi mức glucoza huyết sau khi sử dụng glucoza qua đường miệng.

Dữ liệu được đưa ra ở dạng diện tích dưới đường cong glucoza

(= giá trị lấy tích phân từ $t + 0$ đến 120 phút) ($n = 8$)

Liều chất tương tự peptit OXM có SEQ ID NO: 3 trong đó Cys(PEG20k) ở vị trí 39 được amit hóa (nmol/kg)	AUC Glucoza (mg*phút/dL)	
	Giá trị trung bình	SEM
0 (Chất dẫn)	27771	1434
7,5	17722*	1009
15	17518*	1686

Các dữ liệu này cho thấy sau khi điều trị 2 tuần ở chuột DIO bằng chất tương tự peptit OXm có SEQ ID NO 3, trong đó Cys(PEG20k) ở vị trí 39 được amit hóa, làm giảm đáng kể sự thay đổi mức glucoza huyết sau tải lượng glucoza qua đường miệng. Ý nghĩa thống kê được đánh giá bởi kiểm định Dunnett. (* $p < 0,05$ so với chất dẫn).

Bảng 4

Tác dụng của chất tương tự peptit OXM có SEQ ID NO: 3, trong đó Cys(PEG20k) ở vị trí 39 được amit hóa, lên sự thay đổi mức glucoza huyết sau tải lượng glucoza qua đường trong màng bụng (ip).

Dữ liệu được đưa ra ở dạng diện tích dưới đường cong glucoza

(= giá trị lấy tích phân từ t + 0 đến 120 phút) (n = 6)

Liều chất tương tự peptit OXM có SEQ ID NO: 3 trong đó Cys(PEG20k) ở vị trí 39 được amit hóa (nmol/kg)	AUC Glucoza (mg*phút/dL)	
	Giá trị trung bình	SEM
0 (Chất dẫn)	35518	1969
6,7	30073	3389
20,0	19264*	1894

Các dữ liệu này cho thấy sau khi điều trị 4 tuần ở chuột DIO bằng chất tương tự peptit OXM có SEQ ID NO 3, trong đó Cys(PEG20k) ở vị trí 39 được amit hóa, làm giảm đáng kể sự thay đổi mức glucoza huyết sau tải lượng glucoza qua đường trong màng bụng (ip). Ý nghĩa thống kê được đánh giá bởi kiểm định Dunnett. (* $p < 0,05$ so với chất dẫn).

Ví dụ 9: Tác dụng lên sự thay đổi mức glucoza trong quá trình thử nghiệm dung nạp glucoza qua đường trong màng bụng ở chuột gầy

Chuột C57BL/6 đực 9 tuần tuổi được sử dụng trong thử nghiệm này. Các con chuột được phân ngẫu nhiên thành các nhóm dựa vào trọng lượng cơ thể sau khi ăn. Các con chuột được tiêm chất dẫn hoặc chất tương tự peptit OXm (liều lượng 5,0-15,0 nmol/kg) 16 giờ trước khi bắt đầu thử nghiệm. Thức ăn được loại bỏ tại thời điểm tiêm peptit hoặc chất dẫn. Tại thời điểm 0, các con chuột được sử dụng dextroza 2g/kg bằng cách tiêm IP. Lấy máu ở tĩnh mạch tai tại 0, 3, 6, 12 và 30 phút sau liều thử thách glucoza. Nồng độ glucoza được đo bằng máy đo glucoza. Insulin được đo bằng Mesoscale.

Liều cao chất tương tự peptit OXM có SEQ ID NO: 3, trong đó Cys(PEG20k) ở vị trí 39 được amit hóa, làm giảm đáng kể sự thay đổi mức glucoza huyết khi so sánh

với đối chứng được điều trị bằng chất dẫn (Bảng 5). Cả hai liều lượng của chất tương tự peptit OXM có SEQ ID NO: 3, trong đó Cys(PEG20k) ở vị trí 39 được amit hóa, đều làm tăng đáng kể nồng độ insulin trong huyết tương khi so sánh với đối chứng được điều trị bằng chất dẫn (Bảng 6).

Bảng 5

Tác dụng của chất tương tự peptit OXM có SEQ ID NO: 3, trong đó Cys(PEG20k) ở vị trí 39 được amit hóa, lên sự thay đổi mức glucoza huyết sau thử nghiệm dung nạp glucoza qua đường trong màng bụng (ip) ở chuột gầy

Dữ liệu được đưa ra ở dạng diện tích dưới đường cong glucoza

(= giá trị lấy tích phân từ t + 0 đến 30 phút) (n = 6)

Liều chất tương tự peptit OXM có SEQ ID NO: 3 trong đó Cys(PEG20k) ở vị trí 39 được amit hóa (nmol/kg)	AUC Glucoza (mg*phút/dL)	
	Giá trị trung bình	SEM
Chất dẫn	8718	496
5	7059	476
15	6103*	530

Các dữ liệu này cho thấy chất tương tự peptit OXM có SEQ ID NO: 3, trong đó Cys(PEG20k) ở vị trí 39 được amit hóa, làm giảm đáng kể sự thay đổi mức glucoza huyết sau thử nghiệm dung nạp glucoza qua đường trong màng bụng (ip) ở chuột gầy. Ý nghĩa thống kê được đánh giá bởi kiểm định Dunnett. (* $p < 0,05$ so với chất dẫn).

Bảng 6

Tác dụng của chất tương tự peptit OXM có SEQ ID NO: 3, trong đó Cys(PEG20k) ở vị trí 39 được amit hóa, lên mức insulin trong huyết tương sau thử nghiệm dung nạp glucoza qua đường trong màng bụng (ip) ở chuột gây.

Dữ liệu được đưa ra ở dạng diện tích dưới đường cong insulin

(= giá trị insulin trong huyết tương lấy tích phân từ $t + 0$ đến 30 phút) ($n = 6$)

Liều chất tương tự peptit OXM có SEQ ID NO: 3 trong đó Cys(PEG20k) ở vị trí 39 được amit hóa (nmol/kg)	AUC Insulin (ng*phút/mL)	
	Giá trị trung bình	SEM
0 (Chất dẫn)	8,14	1,13
5	30,67*	4,76
15	45,26*	6,78

Các dữ liệu này cho thấy chất tương tự peptit OXM có SEQ ID NO: 3, trong đó Cys(PEG20k) ở vị trí 39 được amit hóa, làm tăng đáng kể AUC insulin trong huyết tương sau thử nghiệm dung nạp glucoza qua đường trong màng bụng (ip) ở chuột gây. Ý nghĩa thống kê được đánh giá bởi kiểm định Dunnett. (* $p < 0,05$ so với chất dẫn).

Ví dụ 10: Tác dụng lên sự thay đổi mức glucoza huyết trong thử nghiệm dung nạp glucoza qua đường miệng (OGTT) hoặc thử nghiệm dung nạp glucoza qua đường trong màng bụng (ip) (IPGTT) ở chuột ob/ob.

Chuột ob/ob được từ hai đến ba tháng tuổi được nhốt riêng trong điều kiện được kiểm soát nhiệt độ (24°C) với chu kỳ 12 giờ sáng/tối (sáng vào lúc 22:00), và tự do tiếp cận thức ăn và nước theo tiêu chuẩn. Sau ít nhất 2 tuần thích nghi với điều kiện, glucoza huyết lúc đói sau 3 giờ được đo bằng cách lấy máu ở tĩnh mạch lúc 9 giờ sáng. Chuột có mức glucoza huyết dưới 180mg/dL không được sử dụng. Các con chuột còn lại được phân ngẫu nhiên thành các nhóm điều trị ($N=6-7$ /nhóm), mỗi nhóm có mức glucoza huyết trung bình tương tự nhau. Chuột được tiếp cận thức ăn cho đến thời điểm tiêm. Các con chuột được tiêm chất dẫn hoặc chất tương tự peptit OXM 7,5nmol/kg lúc 4 giờ chiều cùng ngày. Thức ăn được loại bỏ tại thời điểm tiêm. OGTT (Bảng 7) hoặc IPGTT (Bảng 8) được thực hiện 16 giờ sau khi tiêm peptit. Tại thời

điểm 0, các con chuột được sử dụng dextroza 2g/kg bằng ống thông qua đường miệng (Bảng 7) hoặc tiêm qua đường trong màng bụng (Bảng 8). Lấy máu ở tĩnh mạch tại thời điểm 0, 15, 30, 60 và 120 phút sau liều thử thách glucoza. Nồng độ glucoza được đo bằng máy đo glucoza.

Một lần tiêm chất tương tự peptit OXM có SEQ ID NO: 3, trong đó Cys(PEG20k) ở vị trí 39 được amit hóa, làm cho mức glucoza huyết của chuột ob/ob trở về bình thường. Mức glucoza huyết tại tất cả các thời điểm được đo sau khi dùng liều thử thách glucoza thấp hơn đáng kể so với nhóm đối chứng chất dẫn.

Bảng 7

Tác dụng của chất tương tự peptit OXM có SEQ ID NO: 3, trong đó Cys(PEG20k) ở vị trí 39 được amit hóa, lên sự thay đổi glucoza huyết sau thử nghiệm dung nạp glucoza qua đường miệng ở chuột ob/ob.

Dữ liệu được đưa ra ở dạng diện tích dưới đường cong glucoza

(= giá trị lấy tích phân từ t + 0 đến 120 phút) (n = 7)

Liều chất tương tự peptit OXM có SEQ ID NO: 3 trong đó Cys(PEG20k) ở vị trí 39 được amit hóa (nmol/kg)	AUC Glucoza (mg*phút/dL)	
	Giá trị trung bình	SEM
0 (Chất dẫn)	23938	1629
7,5	12266*	1215

Các dữ liệu này cho thấy chất tương tự peptit OXM có SEQ ID NO: 3, trong đó Cys(PEG20k) ở vị trí 39 được amit hóa, làm giảm đáng kể sự thay đổi mức glucoza huyết sau thử nghiệm dung nạp glucoza qua đường miệng ở chuột ob/ob. Ý nghĩa thống kê được đánh giá bởi kiểm định Dunnett. (* $p < 0,05$ so với chất dẫn).

Bảng 8

Tác dụng của chất tương tự peptit OXM có SEQ ID NO: 3, trong đó Cys(PEG20k) ở vị trí 39 được amit hóa, lên sự thay đổi mức glucoza huyết sau thử nghiệm dung nạp glucoza qua đường trong màng bụng (ip) ở chuột ob/ob.

Dữ liệu được đưa ra ở dạng diện tích dưới đường cong glucoza

(= giá trị lấy tích phân từ t + 0 đến 120 phút) (n = 6)

Liều chất tương tự peptit OXM có SEQ ID NO: 3 trong đó Cys(PEG20k) ở vị trí 39 được amit hóa (nmol/kg)	AUC Glucoza (mg*phút/dL)	
	Giá trị trung bình	SEM
0 (Chất dẫn)	37894	1482
7,5	18878*	3224

Các dữ liệu này cho thấy chất tương tự peptit OXM có SEQ ID NO: 3, trong đó Cys(PEG20k) ở vị trí 39 được amit hóa, làm giảm đáng kể sự thay đổi mức glucoza huyết sau thử nghiệm dung nạp glucoza qua đường trong màng bụng (ip) ở chuột ob/ob. Ý nghĩa thống kê được đánh giá bởi kiểm định Dunnett. (* p<0,05 so với chất dẫn).

Ví dụ 11: Tác dụng cấp tính lên FGF21 trong huyết tương, mức triglyxerit, và sự biểu hiện gen ở gan ở chuột C57BL/6 đực bị béo phì do chế độ ăn.

Để tìm hiểu con đường chuyển hóa mà được điều biến bởi việc điều trị bằng chất tương tự peptit OXM có SEQ ID NO 3, trong đó Cys(PEG20k) ở vị trí 39 được amit hóa không phụ thuộc vào sự giảm trọng lượng, chất tương tự peptit OXM và đối chứng dương (chất chủ vận GLP-1R có tác dụng kéo dài) được sử dụng bằng cách tiêm dưới da vào chuột đực 3 tháng tuổi bị béo phì do chế độ ăn (DIO). Vào ngày trước khi thử nghiệm, chuột được phân ngẫu nhiên thành các nhóm điều trị (N=7/nhóm), mỗi nhóm có cân nặng trung bình như nhau. Cùng đêm hôm đó (khoảng 10 giờ tối), các con chuột được đặt vào các lồng sạch và được định lượng chất dẫn hoặc chất tương tự peptit OXm bằng cách tiêm dưới da. Chất tương tự peptit OXM và các đối chứng được sử dụng ở liều 22,5nmol/kg. Thức ăn được loại bỏ tại thời điểm

tiêm peptit hoặc chất dẫn. Sáng ngày hôm sau (gần 10 giờ sáng), các con chuột bị giết để lấy huyết tương và mô gan. Nồng độ glucoza và triglyxerit được đo bằng cách sử dụng thiết bị phân tích sinh hóa Hitachi. Sự biểu hiện gen được xác định bởi RT-PCR. Mức Malonyl-CoA và axetyl-CoA được đo bằng HPLC.

Sau một lần tiêm, mức glucoza trong huyết tương giảm đáng kể so với đối chứng chất dẫn ở tất cả các nhóm điều trị. Mức triglycerit trong huyết tương giảm so với đối chứng chất dẫn chỉ ở chuột được điều trị bằng chất tương tự peptit OXM có SEQ ID NO: 3 trong đó Cys(PEG20k) ở vị trí 39 được amit hóa mà không ở chuột được điều trị bằng chất chủ vận GLP-1R có tác dụng kéo dài. Nồng độ malonyl-CoA và axetyl-CoA trong gan giảm đáng kể tương ứng 63% và 39% so với đối chứng chất dẫn, sau khi điều trị bằng chất tương tự peptit OXM có SEQ ID NO: 3, trong đó Cys(PEG20k) ở vị trí 39 được amit hóa. Việc điều trị bằng chất tương tự peptit OXM có SEQ ID NO: 3, trong đó Cys(PEG20k) ở vị trí 39 được amit hóa, làm thay đổi sự biểu hiện của một số gen ở gan bao gồm tăng sự biểu hiện gen *pgc-1 α* lên 7 lần và giảm sự biểu hiện gen *ChREBP* và *PCSK9* tương ứng là 52% và 61%. Ngoài ra, sự biểu hiện gen *FGF21* ở gan bị kích thích gấp 17 lần, tương ứng với sự tăng tuần hoàn *FGF21* gấp 6 lần sau khi điều trị cấp tính bằng chất tương tự peptit OXM có SEQ ID NO: 3, trong đó Cys(PEG20k) ở vị trí 39 được amit hóa. Tất cả những thay đổi này đều đặc hiệu đối với chuột nhất được điều trị bằng chất tương tự peptit OXM có SEQ ID NO 3, trong đó Cys(PEG20k) ở vị trí 39 được amit hóa.

Danh mục trình tự

His-(Aib)-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Lys-
Lys-Ala-Gln-Glu-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Leu-Asn-(Aib)-Gly-Arg-Asn-Arg-
Asn-Asn-Ile-Ala (SEQ ID NO:1)

His-(Aib)-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Lys-
Lys-Ala-Gln-Glu-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Leu-Asn-(Aib)-Gly-Arg-Asn-Arg-
Asn-Asn-Ile-Ala-Cys-Cys (SEQ ID NO: 2)

His-(Aib)-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Lys-
Lys-Ala-Gln-Glu-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Leu-Asn-(Aib)-Gly-Arg-Asn-Arg-
Asn-Asn-Ile-Ala-Cys(PEG20K)-Cys(PEG20K) (SEQ ID NO: 3)

trong đó Cys(PEG20K) ở vị trí 39 tùy ý được amit hóa.

His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-
Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr-Lys-Arg-Asn-Arg-Asn-
Asn-Ile-Ala (SEQ ID NO: 4)

His-(Aib)-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Lys-
Lys-Ala-Gln-Glu-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Leu-Asn-(Aib)-Gly-Arg-Asn-Arg-
Asn-Asn-Ile-Ala- Xaa₃₈-Xaa₃₉ (SEQ ID NO: 5)

trong đó Xaa₃₈ là Cys, Cys-PEG, hoặc không có mặt; và

Xaa₃₉ là Cys, Cys-PEG, hoặc không có mặt.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chất tương tự pepit Oxyntomodulin bao gồm trình tự axit amin:

His-(Aib)-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Lys-
Lys-Ala-Gln-Glu-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Leu-Asn-(Aib)-Gly-Arg-Asn-Arg-
Asn-Asn-Ile-Ala- Xaa₃₈-Xaa₃₉ (SEQ ID NO: 5)

trong đó Xaa₃₈ là Cys, Cys-PEG, hoặc không có mặt; Xaa₃₉ là Cys, Cys-PEG, hoặc không có mặt;

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

2. Chất tương tự pepit Oxyntomodulin theo điểm 1, trong đó chất tương tự này bao gồm trình tự axit amin:

His-(Aib)-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Lys-
Lys-Ala-Gln-Glu-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Leu-Asn-(Aib)-Gly-Arg-Asn-Arg-
Asn-Asn-Ile-Ala-Cys-Cys (SEQ ID NO: 2)

trong đó gốc Cys ở vị trí 38 tùy ý được PEG hóa; và trong đó gốc Cys ở vị trí 39 tùy ý được PEG hóa; và nhóm carboxyl của Cys ở vị trí 39 tùy ý được amit hóa.

3. Chất tương tự pepit Oxyntomodulin theo điểm 2, trong đó chất tương tự này được PEG hóa với phân tử PEG xấp xỉ 40kDa được gắn vào nhóm thiol của gốc Cys ở vị trí 38 hoặc vị trí 39.

4. Chất tương tự peptit Oxyntomodulin theo điểm 1 hoặc điểm 2, trong đó chất tương tự này được PEG hóa trên nhóm thiol của cả hai gốc Cys ở vị trí 38 và 39 với phân tử PEG xấp xỉ 20kDa trong mỗi trường hợp và bao gồm trình tự axit amin:

His-(Aib)-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Lys-
Lys-Ala-Gln-Glu-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Leu-Asn-(Aib)-Gly-Arg-Asn-Arg-
Asn-Asn-Ile-Ala-Cys(PEG20K)-Cys(PEG20K) (SEQ ID NO: 3)

trong đó nhóm carboxyl của Cys được PEG hóa ở vị trí 39 tùy ý được amit hóa.

5. Chất tương tự peptit Oxyntomodulin theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó phân tử PEG là mạch thẳng.
6. Chất tương tự peptit Oxyntomodulin theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong đó nhóm carboxyl của gốc Cys ở vị trí 39 được amit hóa.
7. Chất tương tự peptit Oxyntomodulin theo điểm 1, trong đó gốc Cys ở vị trí 39 không có mặt, gốc Cys ở vị trí 38 được PEG hóa với phân tử PEG xấp xỉ 40kDa và tùy ý được amit hóa.
8. Dược phẩm chứa chất tương tự peptit Oxyntomodulin theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7, và chất mang, chất pha loãng hoặc tá dược được dụng.
9. Dược phẩm theo điểm 8, trong đó dược phẩm này chứa chất tương tự peptit Oxyntomodulin theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7, và các thành phần trị liệu tùy ý khác.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Eli Lilly and Company

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

<130> X18946

<150> 61/288,888

<151> 2009-12-22

<150> 61/352,576

<151> 2010-06-08

<150> PCT/US2010/060390

<151> 2010-12-15

<160> 5

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 37

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Sản phẩm thiết kế tổng hợp

<220>

<221> ĐẶC TRUNG KHÁC_

<222> (2)..(2)

<223> Xaa tại vị trí 2 là Aib

<220>

<221> ĐẶC TRUNG KHÁC_

<222> (29)..(29)

<223> Xaa tại vị trí 29 là Aib

<400> 1

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

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

Arg	Asn	Asn	Ile	Ala
				35

<210> 2

<211> 39

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Sản phẩm thiết kế tổng hợp

<220>
 <221> ĐẶC TRUNG KHÁC_
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa tại vị trí 2 là Aib

<220>
 <221> ĐẶC TRUNG KHÁC_
 <222> (29)..(29)
 <223> Xaa tại vị trí 29 là Aib

<400> 2

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

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

Arg	Asn	Asn	Ile	Ala	Cys	Cys
			35			

<210> 3
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Sản phẩm thiết kế tổng hợp

<220>
 <221> ĐẶC TRUNG KHÁC_
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa tại vị trí 2 is Aib

<220>
 <221> ĐẶC TRUNG KHÁC_
 <222> (29)..(29)
 <223> Xaa tại vị trí 29 là Aib

<220>
 <221> ĐẶC TRUNG KHÁC_
 <222> (38)..(38)
 <223> Xaa tại vị trí 38 là Cys

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (38)..(38)
 <223> Xaa tại vị trí 38 được biến đổi bởi 20kDa PEG

<220>
 <221> ĐẶC TRUNG KHÁC_
 <222> (39)..(39)
 <223> Xaa tại vị trí 39 là Cys

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (39)..(39)
 <223> Xaa tại vị trí 39 được biến đổi bởi 20kDa PEG

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (39)..(39)
 <223> Xaa tại vị trí 39 có thể được amit hóa

<400> 3

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

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

Arg Asn Asn Ile Ala Xaa Xaa
 35

<210> 4
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Sản phẩm thiết kế tổng hợp

<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> Sản phẩm thiết kế tổng hợp

<220>
 <221> ĐẶC TRUNG KHÁC_
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa tại vị trí 2 là Aib

<220>
 <221> ĐẶC TRUNG KHÁC_
 <222> (29)..(29)
 <223> Xaa tại vị trí 29 là Aib

<220>
 <221> ĐẶC TRUNG KHÁC_

```

<222> (38)..(38)
<223> Xaa tại vị trí 38 là Cys hoặc không có mặt

<220>
<221> MOD_RES
<222> (38)..(38)
<223> Xaa tại vị trí 38 có thể được biến đổi bởi 20kDa PEG hoặc 40kDa PEG

<220>
<221> ĐẶC TRUNG KHÁC_
<222> (39)..(39)
<223> Xaa tại vị trí 39 là Cys hoặc không có mặt

<220>
<221> MOD_RES
<222> (39)..(39)
<223> Xaa tại vị trí 39 có thể được biến đổi bởi 20kDa PEG hoặc 40kDa PEG

<220>
<221> MOD_RES
<222> (39)..(39)
<223> Xaa tại vị trí 39 có thể được amit hóa

<400> 5

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

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

Arg Asn Asn Ile Ala Xaa Xaa
          35

```