



(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)



1-0024921

$$(51)^7 \quad \mathbf{A61K \ 38/26; \ A61K \ 38/17; \ A61P \ 3/10; \ A61P \ 3/00; \ A61P \ 3/04; \ A61K \ 38/16} \quad (13) \quad \mathbf{B}$$

(21) 1-2013-04014

(22) 12/06/2012

(86) PCT/US2012/042084 12/06/2012

(87) WO2012/177443 27/12/2012

(30) 61/500,027 22/06/2011 US; 61/547,360 14/10/2011 US

(45) 25/08/2020 389

(43) 25/07/2014 316A

(73) Indiana University Research and Technology Corporation (US)

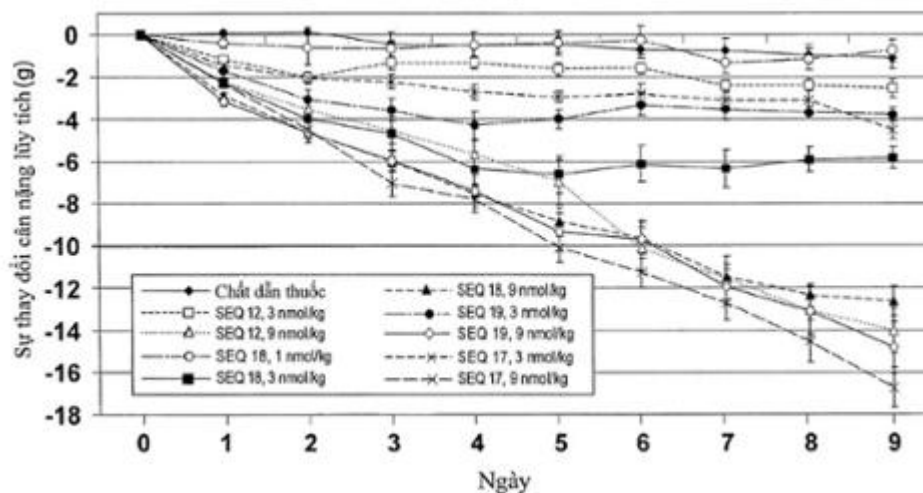
518 Indiana Avenue, Indianapolis, Indiana 46202, United States of America

(72) DIMARCHI, Richard, D. (US); SMILEY, David, L. (US).

(74) Công ty TNHH Tâm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) BIẾN THỂ PEPTIT CÓ HOẠT TÍNH ĐƯỢC TĂNG CƯỜNG Ở THỤ THỂ GLUCAGON/GLP-1 VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA PEPTIT NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến biến thể peptit có hoạt tính được tăng cường ở thụ thể GLP-1 so với glucagon tự nhiên. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến thể tiếp hợp, dime, multime và dược phẩm chứa biến thể peptit này.



Ngày

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến peptit và biến thể peptit có hoạt tính được tăng cường ở thụ thể glucagon/GLP-1 so với glucagon tự nhiên.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Pre-proglucagon là polypeptit tiền chất gồm 158 axit amin, polypeptit này được xử lý trong các mô khác nhau để tạo thành một số peptit có nguồn gốc từ proglucagon khác nhau, bao gồm glucagon, peptit giống glucagon-1 (GLP-1), peptit giống glucagon-2 (GLP-2) và oxyntomodulin (OXM), các peptit này có liên quan đến nhiều chức năng sinh lý khác nhau, bao gồm tính nội cân bằng glucoza, sự tiết insulin, làm rỗng dạ dày, và sự phát triển trong ruột, cũng như điều tiết sự hấp thụ thức ăn. Glucagon là peptit gồm 29 axit amin tương ứng với các axit amin từ 33 đến 61 của pre-proglucagon, trong khi GLP-1 được tạo ra dưới dạng peptit gồm 37 axit amin tương ứng với các axit amin từ 72 đến 108 của pre-proglucagon. Amit GLP-1(7-36) hoặc axit GLP-1(7-37) là các dạng có hiệu lực về mặt sinh học của GLP-1, các dạng này chứng tỏ hoạt tính gần như tương đương ở thụ thể GLP-1.

Trong chứng tăng glucoza huyết, khi mức glucoza trong máu giảm xuống dưới mức bình thường, glucagon truyền tín hiệu tới gan làm phá vỡ glycogen và giải phóng glucoza, làm cho mức glucoza trong máu tăng lên đến mức bình thường. Chứng tăng glucoza huyết là tác dụng phụ phổ biến của liệu pháp insulin ở các bệnh nhân mắc chứng tăng glucoza huyết (mức glucoza trong máu tăng) do bệnh tiểu đường. Như vậy, vai trò được biết đến nhiều nhất của glucagon trong việc điều hoà glucoza là làm cân bằng tác động của insulin và duy trì mức glucoza trong máu.

GLP-1 có các hoạt tính sinh học khác nhau so với glucagon. Các tác động của nó bao gồm kích thích sự tổng hợp và tiết insulin, ức chế sự tiết glucagon, và ức chế sự hấp thụ thức ăn. GLP-1 đã cho thấy là làm giảm chứng tăng glucoza huyết ở bệnh tiểu đường. Exendin-4, một peptit từ nọc độc của con rắn hổ có độ đồng nhất axit amin với GLP-1 khoảng 50%, hoạt hóa thụ thể GLP-1 và cũng đã cho thấy là làm giảm chứng tăng glucoza huyết ở bệnh tiểu đường.

Cũng có bằng chứng rằng GLP-1 và exendin-4 có thể làm giảm sự hấp thụ thức ăn và kích thích giảm cân, một tác dụng mà sẽ có lợi không chỉ cho bệnh tiểu đường mà còn cho các bệnh nhân bị mắc chứng béo phì. Các bệnh nhân mắc chứng béo phì có nguy cơ mắc bệnh tiểu đường, huyết áp cao, chứng tăng lipit huyết, bệnh tim mạch, và các bệnh cơ xương cao hơn.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất peptit và biến thể peptit có hoạt tính ở thụ thể glucagon, hoạt tính ở thụ thể GLP-1, hoặc hoạt tính ở mỗi trong số thụ thể glucagon và thụ thể GLP-1. Theo các phương án ví dụ, peptit và biến thể peptit được bộc lộ trong bản mô tả này thể hiện hoạt tính được tăng cường ở thụ thể GLP-1, so với glucagon tự nhiên. Theo các khía cạnh ví dụ, peptit và biến thể peptit có độ chọn lọc đối với thụ thể GLP-1 ở người ít nhất là bằng 100 lần so với thụ thể GIP.

Sáng chế còn đề xuất thể tiếp hợp chứa peptit và biến thể peptit bất kỳ được nêu trong bản mô tả này được tiếp hợp với gốc khác loại. Theo các khía cạnh ví dụ, gốc khác loại là peptit hoặc protein và thể tiếp hợp là peptit dung hợp hoặc peptit khảm. Theo các khía cạnh ví dụ, gốc khác loại là polyme, ví dụ, polyetylen glycol. Sáng chế còn đề xuất các dime và multime chứa peptit và biến thể peptit bất kỳ được nêu trong bản mô tả này.

Ngoài ra, sáng chế còn đề xuất được phẩm chứa peptit và biến thể peptit bất kỳ được nêu trong bản mô tả này và chất mang được dụng. Sáng chế cũng mô tả phương pháp điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh hoặc tình trạng bệnh (ví dụ, hội chứng chuyển hoá, bệnh tiểu đường, chứng béo phì, chứng gan nhiễm mỡ, bệnh thoái hóa thần kinh, chứng tăng glucoza huyết) ở bệnh nhân. Phương pháp bao gồm bước cho bệnh nhân sử dụng peptit hoặc biến thể peptit được bộc lộ trong bản mô tả này, tùy ý được bào chế theo công thức thành được phẩm, ở lượng hữu hiệu để điều trị bệnh hoặc tình trạng bệnh.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 là đồ thị thể hiện sự thay đổi cân nặng lũy tích (g) của chuột DIO được điều trị bằng đối chứng chất dẫn thuốc hoặc liều peptit được nêu trong SEQ ID NO: 12, 17, 18, hoặc 19, như được mô tả chi tiết trong Ví dụ 7.

Fig.2 là đồ thị thể hiện mức glucoza cơ sở (mg/dl) của chuột DIO được điều trị bằng đối chứng chất dẫn thuốc hoặc liều peptit được nêu trong SEQ ID NO: 12, 17, 18, hoặc 19, như được mô tả chi tiết trong Ví dụ 7.

Fig.3A là đồ thị thể hiện sự thay đổi cân nặng lũy tích (%) của khi rezut béo phì được điều trị bằng đối chứng chất dẫn thuốc, Liraglutit (Lira), hoặc liều peptit được nêu trong SEQ ID NO: 17 hoặc 20, như được mô tả chi tiết trong Ví dụ 8.

Fig.3B là đồ thị thể hiện sự hấp thụ thức ăn lũy tích (được biểu diễn theo tỷ lệ phần trăm của sự hấp thụ thức ăn vào ngày 0) của khi rezut béo phì được điều trị bằng đối chứng chất dẫn thuốc, Liraglutit, hoặc liều peptit được nêu trong SEQ ID NO: 17 hoặc 20, như được mô tả chi tiết trong Ví dụ 8.

Fig.4 là đồ thị thể hiện mức glucoza trong máu (mg/dL) của khi rezut mắc bệnh tiểu đường được điều trị bằng đối chứng chất dẫn thuốc hoặc liều peptit được nêu trong SEQ ID NO: 17, như được mô tả chi tiết trong Ví dụ 9.

Mô tả chi tiết sáng chế

Định nghĩa

Thuật ngữ "khoảng" trong bản mô tả này chỉ giá trị lớn hơn hoặc nhỏ hơn so với giá trị hoặc khoảng giá trị được nêu 10%, nhưng không được dự định để chỉ định giá trị hoặc khoảng giá trị bất kỳ này vào định nghĩa rộng này. Mỗi giá trị hoặc khoảng giá trị đứng sau thuật ngữ "khoảng" được dự định để bao hàm phương án của giá trị hoặc khoảng giá trị tuyệt đối được nêu.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “chất mang dược dụng” gồm chất mang bất kỳ trong số các chất mang chuẩn trong lĩnh vực dược, như dung dịch nước muối đậm phosphat, nước, nhũ tương như nhũ tương dầu/nước hoặc nhũ tương nước/dầu, và các loại chất thẩm ướt khác nhau. Thuật ngữ này cũng bao gồm bất kỳ tác nhân được phê chuẩn bởi Cơ quan điều tiết của chính phủ liên bang Mỹ hoặc được liệt kê trong Dược điển Mỹ để sử dụng ở động vật, kể cả người.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "muối dược dụng" được dùng để chỉ muối của hợp chất mà giữ được hoạt tính sinh học của hợp chất gốc, và không phải là không mong muốn về mặt sinh học hoặc không mong muốn theo cách khác. Nhiều hợp chất được bộc lộ trong bản mô tả này có khả năng tạo thành muối axit và/hoặc muối bazơ

do sự có mặt của nhóm amino và/hoặc nhóm carboxyl hoặc nhóm tương tự với các nhóm này.

Muối cộng bazơ được dùng có thể được điều chế từ bazơ vô cơ và bazơ hữu cơ. Muối thu được từ bazơ vô cơ, bao gồm, ví dụ, muối natri, muối kali, muối lithi, muối amoni, muối canxi và muối magie. Muối thu được từ bazơ hữu cơ bao gồm, nhưng không giới hạn ở, muối của amin bậc một, bậc hai và bậc ba.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "điều trị" bao gồm việc phòng ngừa đối với tình trạng bệnh hoặc rối loạn cụ thể, hoặc làm giảm bớt triệu chứng có liên quan đến tình trạng bệnh hoặc rối loạn cụ thể và/hoặc ngăn ngừa hoặc loại bỏ các triệu chứng này. Ví dụ, như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "điều trị bệnh tiểu đường" thường được dùng để chỉ mức glucoza trong máu thay đổi theo hướng về mức bình thường và có thể bao gồm mức glucoza trong máu tăng hoặc giảm tùy thuộc vào trường hợp xác định.

Trong bản mô tả này, lượng "hữu hiệu" hoặc "lượng hữu hiệu để điều trị" của peptit glucagon được dùng để chỉ lượng peptit không độc nhưng đủ để tạo ra tác dụng mong muốn. Ví dụ, một tác dụng mong muốn là ngăn ngừa hoặc điều trị chứng tăng glucoza huyết, ví dụ, như được xác định bởi sự thay đổi mức glucoza trong máu về gần mức bình thường hơn, hoặc kích thích sự giảm cân/ngăn ngừa sự tăng cân, ví dụ, như được xác định bởi sự giảm cân nặng, hoặc ngăn ngừa hoặc làm giảm sự tăng cân nặng, hoặc bình thường hóa sự phân phối chất béo của cơ thể. Lượng "hữu hiệu" sẽ thay đổi từ đối tượng này sang đối tượng khác, tùy vào độ tuổi và tình trạng chung của từng đối tượng, cách thức điều trị, và các yếu tố tương tự. Do đó, thường không thể xác định chính xác "lượng hữu hiệu". Tuy nhiên, lượng "hữu hiệu" thích hợp trong trường hợp riêng bất kỳ có thể được xác định bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này bằng cách sử dụng quy trình thử nghiệm thông thường.

Thuật ngữ "ngoài đường tiêu hóa" có nghĩa là không thông qua ống cấp dưỡng mà bằng một số đường khác, ví dụ, dưới da, trong cơ, trong cột sống, hoặc trong tĩnh mạch.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "peptit" dùng để chỉ mạch có 3 hoặc nhiều hơn 3 axit amin và thường ít hơn 100 axit amin, trong đó axit amin là axit amin có trong tự nhiên hoặc được mã hoá hoặc không có trong tự nhiên hoặc không được mã hoá. Axit

amin không có trong tự nhiên chỉ các axit amin không có trong tự nhiên *in vivo* nhưng, tuy nhiên, có thể được kết hợp vào cấu trúc peptit được nêu trong bản mô tả này. “Không được mã hoá” trong bản mô tả này dùng để chỉ axit amin không phải là chất đồng phân L của axit amin bất kỳ trong số 20 axit amin sau đây: Ala, Cys, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp, Tyr. “Được mã hoá” trong bản mô tả này chỉ axit amin à chất đồng phân L của axit amin bất kỳ trong số 20 axit amin sau đây: Ala, Cys, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp, Tyr. Theo một số phương án, peptit và biến thể peptit được nêu trong bản mô tả này có chiều dài gần giống với chiều dài của SEQ ID NO: 1 (mà có chiều dài là 29 axit amin), ví dụ có chiều dài là 25-35 axit amin. Chiều dài lấy ví dụ bao gồm 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 hoặc 50 axit amin.

Thông thường, polypeptit và protein có chiều dài polyme lớn hơn chiều dài polyme của "peptit".

Trong toàn bộ bản mô tả sáng chế này, tất cả các lần đề cập đến vị trí axit amin cụ thể bằng số (ví dụ, vị trí 28) chỉ axit amin ở vị trí đó trong glucagon tự nhiên (SEQ ID NO: 1) hoặc vị trí axit amin tương ứng trong chất tương tự bất kỳ của chúng. Ví dụ, trong bản mô tả này đề cập đến “vị trí 28” có nghĩa là vị trí tương ứng 27 đối với chất tương tự glucagon trong đó axit amin thứ nhất được nêu trong SEQ ID NO: 1 được xóa. Tương tự, trong bản mô tả này đề cập đến “vị trí 28” có nghĩa là vị trí tương ứng 29 đối với chất tương tự glucagon trong đó một axit amin được bổ sung trước đầu tận N của SEQ ID NO: 1. Trong bản mô tả này, “sự cải biến axit amin” được dùng để chỉ (i) sự thế hoặc thay thế axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 1 bằng các axit amin khác nhau (axit amin có trong tự nhiên hoặc được mã hoá hoặc không được mã hoá hoặc không có trong tự nhiên), (ii) sự bổ sung axit amin (axit amin có trong tự nhiên hoặc được mã hoá hoặc không được mã hoá hoặc không có trong tự nhiên), vào SEQ ID NO: 1 hoặc (iii) sự xóa một hoặc nhiều axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 1.

“Phân trăm đồng nhất” đối với hai trình tự axit amin chỉ số lượng axit amin của trình tự thứ nhất mà bắt cặp (giống với) axit amin trong trình tự tham chiếu thứ hai, chia cho chiều dài của trình tự tham chiếu, khi hai trình tự được sắp thẳng hàng để đạt được sự tương ứng tối đa (ví dụ, các khoảng trống có thể được đưa vào để có sự sắp thẳng hàng tối ưu).

“Sự cải biến” axit amin chỉ sự cài xen, sự xóa hoặc sự thế một axit amin bằng một axit amin khác. Theo một số phương án, sự thế hoặc thay thế axit amin là sự thế axit amin bảo toàn, ví dụ, sự thế axit amin bảo toàn tại một hoặc nhiều vị trí 2, 5, 7, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 24, 27, 28 hoặc 29. Trong bản mô tả này, thuật ngữ "sự thế axit amin bảo toàn" được dùng để chỉ sự thay thế một axit amin này bằng một axit amin khác có tính chất tương tự, ví dụ, kích thước, điện tích, tính kỵ nước, tính ưa nước, và/hoặc tính thơm, và bao gồm các trao đổi nằm trong một trong số năm nhóm sau:

I. Gốc không phân cực hoặc phân cực yếu, béo, kích thước nhỏ:

Ala, Ser, Thr, Pro, Gly;

II. Gốc tích điện âm, phân cực và amit và este của chúng:

Asp, Asn, Glu, Gln, axit xysteic và axit homoxysteic;

III. Gốc tích điện dương, phân cực:

His, Arg, Lys; Ornithin (Orn)

IV. Gốc không phân cực, béo, kích thước lớn:

Met, Leu, Ile, Val, Cys, Norleuxin (Nle), homoxystein

V. Gốc thơm, kích thước lớn:

Phe, Tyr, Trp, axetyl phenylalanin

Theo một số phương án, sự thế axit amin không phải sự thế axit amin bảo toàn, ví dụ, là sự thế axit amin không bảo toàn.

Trong bản mô tả này thuật ngữ "axit amin tích điện" hoặc “gốc tích điện” chỉ axit amin mà chứa mạch bên tích điện âm (tức là, được khử proton) hoặc tích điện dương (tức là, được cộng proton) trong dung dịch chứa nước ở độ pH sinh lý. Ví dụ, axit amin tích điện âm bao gồm axit aspartic, axit glutamic, axit xysteic, axit homoxysteic, và axit homoglutamic, trong khi đó axit amin tích điện dương bao gồm arginin, lysin và histidin. Axit amin tích điện bao gồm axit amin tích điện trong số 20 axit amin được mã hoá, cũng như axit amin không điển hình hoặc không có trong tự nhiên hoặc không được mã hoá.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "axit amin có tính axit" dùng để chỉ axit amin chứa gốc axit thứ hai (khác với axit carboxylic của axit amin), gồm ví dụ, nhóm axit carboxylic hoặc axit sulfonic.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "axit amin được axyl hoá" dùng để chỉ axit amin chứa nhóm axyl mà không phải là tự nhiên đối với axit amin có trong tự nhiên, bất kể phương thức tạo ra nó là gì (ví dụ, axyl hoá trước khi kết hợp axit amin vào peptit, hoặc axyl hoá sau khi kết hợp vào peptit).

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "axit amin được alkyl hoá" dùng để chỉ axit amin chứa nhóm alkyl mà không phải là tự nhiên đối với axit amin có trong tự nhiên, bất kể phương thức tạo ra nó là gì. Vì vậy, axit amin được axyl hoá và axit amin được alkyl hoá trong bản mô tả này là axit amin không được mã hoá.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "độ chọn lọc" của phân tử đối với thụ thể thứ nhất so với thụ thể thứ hai dùng để chỉ tỷ lệ sau đây: EC50 của phân tử ở thụ thể thứ hai chia cho EC50 của phân tử ở thụ thể thứ nhất. Ví dụ, phân tử có EC50 bằng 1nM ở thụ thể thứ nhất và EC50 bằng 100nM ở thụ thể thứ hai có độ chọn lọc đối với thụ thể thứ nhất so với thụ thể thứ hai là 100 lần.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "glucagon tự nhiên" dùng để chỉ peptit có trình tự SEQ ID NO: 1 và thuật ngữ "GLP-1 tự nhiên" là thuật ngữ chung dùng để chỉ amit GLP-1(7-36), axit GLP-1(7-37) hoặc hỗn hợp của hai hợp chất này.

Trong bản mô tả này, "hiệu lực glucagon" hoặc "hiệu lực so với glucagon tự nhiên" của phân tử dùng để chỉ tỷ lệ nghịch đảo của EC50 của phân tử ở thụ thể glucagon chia cho EC50 của glucagon tự nhiên ở thụ thể glucagon.

Trong bản mô tả này, "hiệu lực GLP-1" hoặc "hiệu lực so với GLP-1 tự nhiên" của phân tử dùng để chỉ tỷ lệ nghịch đảo của EC50 của phân tử ở thụ thể GLP-1 chia cho EC50 của GLP-1 tự nhiên ở thụ thể GLP-1.

Các phương án của sáng chế

Sáng chế đề xuất peptit và biến thể peptit có hoạt tính ở thụ thể GLP-1, ở thụ thể glucagon, hoặc ở cả thụ thể GLP-1 và thụ thể glucagon. Liên quan đến vấn đề này, sáng chế đề xuất peptit chủ vận thụ thể GLP-1, peptit chủ vận thụ thể glucagon, và peptit đồng chủ vận thụ thể GLP-1/glucagon. Theo các phương án ví dụ, peptit và biến

thể peptit được bộc lộ trong bản mô tả này có hoạt tính được tăng cường hoặc hiệu lực lớn hơn ở thụ thể GLP-1, so với glucagon tự nhiên ở người (SEQ ID NO: 1). Theo các phương án ví dụ, peptit và biến thể peptit trong bản mô tả này có hiệu lực lớn hơn ở thụ thể GLP-1 so với GLP-1 tự nhiên ở người (SEQ ID NO: 2) hoặc một trong số các dạng hoạt tính của chúng (SEQ ID NO: 5 và 6). Theo các phương án ví dụ, peptit và biến thể peptit có hiệu lực lớn hơn ở thụ thể glucagon so với GLP-1 tự nhiên ở người. Theo các phương án ví dụ, peptit và biến thể peptit có hiệu lực lớn hơn ở thụ thể glucagon so với glucagon tự nhiên ở người.

Theo các phương án ví dụ, peptit và biến thể peptit được nêu trong bản mô tả này có các cải thiện khác về tính chất so với glucagon tự nhiên hoặc GLP-1 tự nhiên, như độ ổn định lớn hơn, khả năng hòa tan lớn hơn, thời gian bán hủy dài hơn trong hệ tuần hoàn, thời điểm bắt đầu tác động được làm trễ, thời gian tác động kéo dài, đỉnh giảm (ví dụ, nồng độ trong huyết tương đỉnh trung bình giảm tương đối), và tính kháng proteaza như DPP-IV được cải thiện.

Peptit và biến thể peptit được nêu trong bản mô tả này được dựa trên trình tự axit amin của glucagon tự nhiên ở người (SEQ ID NO: 1), và được nêu trong bản mô tả này dưới dạng “peptit”, “biến thể peptit”, “chất tương tự glucagon”, “chất tương tự”, hoặc “peptit glucagon”. Cần hiểu rằng các thuật ngữ như “chất tương tự” hoặc “biến thể” hoặc “cải biến” bao hàm các peptit hoặc protein được tổng hợp *de novo* và không cần thực hiện bước cải biến cụ thể bất kỳ. Theo một số khía cạnh, peptit và biến thể peptit được nêu trong bản mô tả này chứa trình tự axit amin biến đổi được nêu trong SEQ ID NO: 1 gồm 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 cải biến axit amin so với SEQ ID NO: 1, và trong một số ví dụ, 16 hoặc nhiều hơn (ví dụ, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26) cải biến axit amin, như được mô tả thêm trong bản mô tả này. Do đó, phần mô tả về chất tương tự glucagon và/hoặc peptit glucagon sau đây áp dụng cho peptit và biến thể peptit bất kỳ được bộc lộ trong bản mô tả này, bất kể mức độ tương tự giữa glucagon tự nhiên ở người (SEQ ID NO: 1) và peptit hoặc biến thể peptit trong bản mô tả này.

Dự định rằng trình tự peptit bất kỳ được nêu trong bản mô tả này có thể được thay đổi thêm bằng cách kết hợp cải biến axit amin khác nữa; ví dụ, bằng cách bao gồm cải biến bất kỳ được nêu trong bản mô tả này, ví dụ, ở vị trí được nêu trong bản mô tả này, hoặc bằng cách kết hợp các phần thể bảo toàn, hoặc bằng cách quay trở lại

glucagon axit amin tự nhiên (xem SEQ ID NO: 1) ở vị trí đó. Theo các phương án ví dụ, các cải biến gồm, ví dụ, sự axyl hoá, sự alkyl hoá, sự PEG hoá, sự cắt bỏ ở đầu tận C, sự thế axit amin tại một hoặc nhiều vị trí 1, 2, 3, 7, 10, 12, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 23, 24, 27, 28 và 29. Ví dụ, khi trình tự peptit bất kỳ được bộc lộ trong bản mô tả này bao gồm Cys nhằm mục đích PEG hoá, biến thể peptit có thể sử dụng axit amin khác để PEG hoá. Theo ví dụ khác, biến thể peptit có thể được PEG hoá ở vị trí khác (ví dụ, thay thế Cys hiện tại bằng axit amin khác, cài xen Cys mới ở vị trí PEG hoá dự định, và PEG hoá Cys mới). Ví dụ khác nữa là, khi trình tự peptit bất kỳ được bộc lộ trong bản mô tả này bao gồm Lys nhằm mục đích axyl hoá, Lys có thể được chuyển sang vị trí khác và vị trí mới được axyl hoá. Theo phương án bất kỳ được nêu trong bản mô tả này, biến thể peptit có thể có độ đồng nhất trình tự là, ví dụ, 80%, 85%, 90% hoặc 95% so với peptit gốc trên chiều dài của peptit gốc hoặc trên các axit amin 1-29 của peptit gốc (ví dụ, có thể kết hợp 1, 2, 3, 4, hoặc 5 cải biến khác so với peptit gốc).

Thể tiếp hợp, protein dung hợp và multimer của trình tự peptit bất kỳ được bộc lộ trong bản mô tả này cũng được dự tính.

Hoạt tính của peptit và biến thể peptit

Hoạt tính chất chủ vận ở thụ thể glucagon

Theo các phương án ví dụ, peptit và biến thể peptit trong bản mô tả này có EC₅₀ ở thụ thể glucagon là khoảng 1000 μ M hoặc thấp hơn (ví dụ, khoảng 750 μ M hoặc thấp hơn, khoảng 500 μ M hoặc thấp hơn, khoảng 250 μ M hoặc thấp hơn, khoảng 100 μ M hoặc thấp hơn, khoảng 75 μ M hoặc thấp hơn, khoảng 50 μ M hoặc thấp hơn, khoảng 25 μ M hoặc thấp hơn, khoảng 10 μ M hoặc thấp hơn, khoảng 5 μ M hoặc thấp hơn, hoặc khoảng 1 μ M hoặc thấp hơn). Theo các phương án ví dụ, peptit và biến thể peptit có EC₅₀ đối với sự hoạt hoá thụ thể glucagon mà nằm trong giới hạn nanomol. Ví dụ, peptit và biến thể peptit được bộc lộ trong bản mô tả này có EC₅₀ ở thụ thể glucagon bằng khoảng 1000nM hoặc thấp hơn (ví dụ, khoảng 750nM hoặc thấp hơn, khoảng 500nM hoặc thấp hơn, khoảng 250nM hoặc thấp hơn, khoảng 100nM hoặc thấp hơn, khoảng 75nM hoặc thấp hơn, khoảng 50nM hoặc thấp hơn, khoảng 25nM hoặc thấp hơn, khoảng 10nM hoặc thấp hơn, khoảng 5nM hoặc thấp hơn, hoặc khoảng 1nM hoặc thấp hơn). Theo các phương án ví dụ, peptit và biến thể peptit có EC₅₀ ở thụ thể glucagon nằm trong giới hạn picomol. Do đó, theo các khía cạnh ví dụ, peptit

và biến thể peptit có EC50 đối với sự hoạt hoá thụ thể glucagon là khoảng 1000pM hoặc thấp hơn (ví dụ, khoảng 750pM hoặc thấp hơn, khoảng 500pM hoặc thấp hơn, khoảng 250pM hoặc thấp hơn, khoảng 100pM hoặc thấp hơn, khoảng 75pM hoặc thấp hơn, khoảng 50pM hoặc thấp hơn, khoảng 25pM hoặc thấp hơn, khoảng 10pM hoặc thấp hơn, khoảng 5pM hoặc thấp hơn, hoặc khoảng 1pM hoặc thấp hơn). Cần hiểu rằng EC50 càng thấp chỉ ra hoạt tính hoặc hiệu lực ở thụ thể càng cao.

Theo một số phương án, chất tương tự glucagon được nêu trong bản mô tả này có EC50 ở thụ thể glucagon là khoảng 0,001pM hoặc cao hơn, khoảng 0,01pM hoặc cao hơn, hoặc khoảng 0,1pM hoặc cao hơn. Sự hoạt hoá thụ thể glucagon (hoạt tính thụ thể glucagon) có thể được đo bằng thử nghiệm *in vitro* bằng cách đo sự cảm ứng cAMP ở tế bào HEK293 biểu hiện quá mức thụ thể glucagon, ví dụ, thử nghiệm tế bào HEK293 được đồng chuyển nhiễm với ADN mã hoá cho thụ thể glucagon và gen luxiferaza được liên kết với yếu tố đáp ứng cAMP như nêu trong Ví dụ 2.

Theo các phương án ví dụ, peptit và biến thể peptit được bộc lộ trong bản mô tả này có hoạt tính bằng khoảng 0,001% hoặc lớn hơn, khoảng 0,01% hoặc lớn hơn, khoảng 0,1% hoặc lớn hơn, khoảng 0,5% hoặc lớn hơn, khoảng 1% hoặc lớn hơn, khoảng 5% hoặc lớn hơn, khoảng 10% hoặc lớn hơn, khoảng 20% hoặc lớn hơn, khoảng 30% hoặc lớn hơn, khoảng 40% hoặc lớn hơn, khoảng 50% hoặc lớn hơn, khoảng 60% hoặc lớn hơn, khoảng 75% hoặc lớn hơn, khoảng 100% hoặc lớn hơn, khoảng 125% hoặc lớn hơn, khoảng 150% hoặc lớn hơn, khoảng 175% hoặc lớn hơn, khoảng 200% hoặc lớn hơn, khoảng 250% hoặc lớn hơn, khoảng 300% hoặc lớn hơn, khoảng 350% hoặc lớn hơn, khoảng 400% hoặc lớn hơn, khoảng 450% hoặc lớn hơn, hoặc khoảng 500% hoặc cao hơn ở thụ thể glucagon so với glucagon tự nhiên (hiệu lực glucagon). Theo một số phương án, peptit và biến thể peptit được nêu trong bản mô tả này có hoạt tính bằng khoảng 5000% hoặc nhỏ hơn, hoặc khoảng 10.000% hoặc nhỏ hơn ở thụ thể glucagon so với glucagon tự nhiên. Hoạt tính của chất tương tự glucagon ở thụ thể so với phối tử tự nhiên của thụ thể được tính dưới dạng tỷ lệ nghịch đảo của EC50 đối với chất tương tự glucagon so với phối tử tự nhiên.

Theo một số phương án, peptit và biến thể peptit có hoạt tính (hiệu lực) đáng kể chỉ ở thụ thể glucagon và có rất ít hoặc không có hoạt tính ở thụ thể GLP-1. Theo đó, theo một số phương án, peptit và biến thể peptit được coi như là “chất chủ vận thụ thể glucagon tinh khiết” hoặc không được coi là “chất đồng chủ vận thụ thể

glucagon/GLP-1". Theo một số phương án, các peptit và biến thể peptit này có mức hoạt tính hoặc hiệu lực bất kỳ ở thụ thể glucagon được nêu trong bản mô tả này nhưng có hoạt tính (hiệu lực) nhỏ hơn đáng kể ở thụ thể GLP-1. Theo một số phương án, chất tương tự glucagon có EC50 ở thụ thể GLP-1 bằng hoặc lớn hơn 100 lần so với EC50 ở thụ thể glucagon.

Hoạt tính chất chủ vận ở thụ thể GLP-1

Theo các phương án ví dụ, peptit và biến thể peptit có EC50 đối với sự hoạt hoá thụ thể GLP-1 là khoảng 1000 μ M hoặc thấp hơn (ví dụ, khoảng 750 μ M hoặc thấp hơn, khoảng 500 μ M hoặc thấp hơn, khoảng 250 μ M hoặc thấp hơn, khoảng 100 μ M hoặc thấp hơn, khoảng 75 μ M hoặc thấp hơn, khoảng 50 μ M hoặc thấp hơn, khoảng 25 μ M hoặc thấp hơn, khoảng 10 μ M hoặc thấp hơn, khoảng 5 μ M hoặc thấp hơn, hoặc khoảng 1 μ M hoặc thấp hơn). Theo các phương án ví dụ, peptit và biến thể peptit có EC50 ở thụ thể GLP-1 là khoảng 1000nM hoặc thấp hơn (ví dụ, khoảng 750nM hoặc thấp hơn, khoảng 500nM hoặc thấp hơn, khoảng 250nM hoặc thấp hơn, khoảng 100nM hoặc thấp hơn, khoảng 75nM hoặc thấp hơn, khoảng 50nM hoặc thấp hơn, khoảng 25nM hoặc thấp hơn, khoảng 10nM hoặc thấp hơn, khoảng 5nM hoặc thấp hơn, hoặc khoảng 1nM hoặc thấp hơn). Theo các phương án ví dụ, peptit và biến thể peptit có EC50 ở thụ thể GLP-1 nằm trong giới hạn picomol. Vì vậy, theo một số phương án, peptit và biến thể peptit có EC50 đối với sự hoạt hoá thụ thể GLP-1 là khoảng 1000pM hoặc thấp hơn (ví dụ, khoảng 750pM hoặc thấp hơn, khoảng 500pM hoặc thấp hơn, khoảng 250pM hoặc thấp hơn, khoảng 100pM hoặc thấp hơn, khoảng 75pM hoặc thấp hơn, khoảng 50pM hoặc thấp hơn, khoảng 25pM hoặc thấp hơn, khoảng 10pM hoặc thấp hơn, khoảng 5pM hoặc thấp hơn, hoặc khoảng 1pM hoặc thấp hơn). Cần hiểu rằng EC50 thấp hơn cho thấy hoạt tính hoặc hiệu lực cao hơn ở thụ thể.

Theo các phương án ví dụ, peptit và biến thể peptit được nêu trong bản mô tả này có EC50 ở thụ thể GLP-1 bằng khoảng 0,001pM hoặc cao hơn, khoảng 0,01pM hoặc cao hơn, hoặc khoảng 0,1pM hoặc cao hơn. Sự hoạt hoá thụ thể GLP-1 (hoạt tính thụ thể GLP-1) có thể được đo bằng thử nghiệm *in vitro* đo sự cảm ứng cAMP trong tế bào HEK293 biểu hiện quá mức thụ thể GLP-1, ví dụ, thử nghiệm tế bào HEK293 được đồng chuyển nhiễm với ADN mã hoá thụ thể GLP-1 và gen luxiferaza được liên kết với yếu tố đáp ứng cAMP như nêu trong Ví dụ 2.

Theo một số phương án, peptit và biến thể peptit trong bản mô tả này có hoạt tính ở thụ thể GLP-1 bằng khoảng 0,001% hoặc lớn hơn, khoảng 0,01% hoặc lớn hơn, khoảng 0,1% hoặc lớn hơn, khoảng 0,5% hoặc lớn hơn, khoảng 1% hoặc lớn hơn, khoảng 5% hoặc lớn hơn, khoảng 10% hoặc lớn hơn, khoảng 20% hoặc lớn hơn, khoảng 30% hoặc lớn hơn, khoảng 40% hoặc lớn hơn, khoảng 50% hoặc lớn hơn, khoảng 60% hoặc lớn hơn, khoảng 75% hoặc lớn hơn, khoảng 100% hoặc lớn hơn, khoảng 125% hoặc lớn hơn, khoảng 150% hoặc lớn hơn, khoảng 175% hoặc lớn hơn, khoảng 200% hoặc lớn hơn, khoảng 250% hoặc lớn hơn, khoảng 300% hoặc lớn hơn, khoảng 350% hoặc lớn hơn, khoảng 400% hoặc lớn hơn, khoảng 450% hoặc lớn hơn, hoặc khoảng 500% hoặc lớn hơn so với GLP-1 tự nhiên (hiệu lực GLP-1). Theo một số phương án, peptit và biến thể peptit được nêu trong bản mô tả này có hoạt tính ở thụ thể GLP-1 bằng khoảng 5000% hoặc nhỏ hơn hoặc khoảng 10.000% hoặc nhỏ hơn so với GLP-1 tự nhiên (hiệu lực GLP-1).

Theo một số phương án, peptit và biến thể peptit có hoạt tính (hiệu lực) đáng kể chỉ ở thụ thể GLP-1 và có rất ít hoặc không có hoạt tính ở thụ thể glucagon. Theo một số phương án, peptit và biến thể peptit được coi như là “chất chủ vận thụ thể GLP-1 tinh khiết” hoặc không được coi là “chất đồng chủ vận thụ thể glucagon/GLP-1”. Theo một số phương án, các peptit và biến thể peptit này có mức độ hoạt tính hoặc hiệu lực bất kỳ ở thụ thể GLP-1 được nêu trong bản mô tả này nhưng có hoạt tính (hiệu lực) nhỏ hơn đáng kể ở thụ thể glucagon. Theo một số phương án, peptit và biến thể peptit có EC50 ở thụ thể glucagon bằng hoặc lớn hơn 100 lần so với EC50 ở thụ thể GLP-1.

Hoạt tính chất chủ vận ở thụ thể GLP-1 và thụ thể glucagon

Theo các phương án ví dụ, peptit và biến thể peptit có hoạt tính ở cả thụ thể GLP-1 và thụ thể glucagon và có thể được coi như là “chất đồng chủ vận thụ thể glucagon/GLP-1”. Theo các phương án ví dụ, hoạt tính (ví dụ, EC50 hoặc hoạt tính hoặc hiệu lực tương đối) của peptit và biến thể peptit ở thụ thể glucagon khác khoảng 50 lần, khoảng 40 lần, khoảng 30 lần, khoảng 20 lần, khoảng 10 lần, hoặc khoảng 5 lần (cao hơn hoặc thấp hơn) so với hoạt tính của nó (ví dụ, EC50 hoặc hoạt tính hoặc hiệu lực tương đối) ở thụ thể GLP-1. Theo các khía cạnh ví dụ, hiệu lực glucagon của peptit hoặc biến thể peptit khác khoảng 25, khoảng 20, khoảng 15, khoảng 10, hoặc khoảng 5 lần (cao hơn hoặc thấp hơn) so với hiệu lực GLP-1 của nó. Theo các khía cạnh ví dụ, hiệu lực glucagon của peptit hoặc biến thể peptit là thấp hơn trong khoảng

25, khoảng 20, khoảng 15, khoảng 10, hoặc khoảng 5 lần so với hiệu lực GLP-1 của nó.

Theo các phương án ví dụ, chất đồng chủ vận xấp xỉ đẳng năng hoặc có hiệu lực ở thụ thể GLP-1 tương đối lớn hơn so với thụ thể glucagon. Ví dụ, tỷ lệ của hoạt tính tương đối hoặc EC50 hoặc hiệu lực của peptit hoặc biến thể peptit ở thụ thể glucagon chia cho hoạt tính tương đối hoặc EC50 hoặc hiệu lực của peptit hoặc biến thể peptit ở thụ thể GLP-1 nhỏ hơn hoặc bằng khoảng, X, trong đó X được chọn từ 100, 75, 60, 50, 40, 30, 20, 15, 10 hoặc 5. Theo các phương án ví dụ, tỷ lệ của EC50 hoặc hiệu lực hoặc hoạt tính tương đối của peptit hoặc biến thể peptit ở thụ thể glucagon chia cho EC50 hoặc hiệu lực hoặc hoạt tính tương đối của peptit hoặc biến thể peptit ở thụ thể GLP-1 là khoảng 1 và nhỏ hơn 5 (ví dụ, khoảng 4, khoảng 3, khoảng 2, khoảng 1). Theo các phương án ví dụ, tỷ lệ của EC50 hoặc hiệu lực hoặc hoạt tính tương đối của peptit hoặc biến thể peptit ở thụ thể GLP-1 chia cho EC50 hoặc hiệu lực hoặc hoạt tính tương đối của peptit hoặc biến thể peptit ở thụ thể glucagon nhỏ hơn 5 (ví dụ, khoảng 4, khoảng 3, khoảng 2, khoảng 1). Theo các phương án ví dụ, tỷ lệ của hiệu lực glucagon của peptit hoặc biến thể peptit so với hiệu lực GLP-1 của peptit hoặc biến thể peptit nhỏ hơn hoặc bằng khoảng, Y, trong đó Y được chọn từ 100, 75, 60, 50, 40, 30, 20, 15, 10 và 5. Theo các phương án ví dụ, tỷ lệ của hiệu lực glucagon của peptit hoặc biến thể peptit so với hiệu lực GLP-1 của peptit hoặc biến thể peptit nhỏ hơn 5 (ví dụ, khoảng 4, khoảng 3, khoảng 2, khoảng 1). Theo một số phương án, chất tương tự glucagon có EC50 ở thụ thể glucagon lớn hơn EC50 ở thụ thể GLP-1 từ 2 đến 10 lần (ví dụ, 2 lần, 3 lần, 4 lần, 5 lần, 6 lần, 7 lần, 8 lần, 9 lần, 10 lần).

Theo các phương án ví dụ, peptit về cơ bản là chất chủ vận glucagon và có hiệu lực ở thụ thể glucagon tương đối lớn hơn so với thụ thể GLP-1 (ví dụ peptit có hiệu lực ở thụ thể glucagon bằng 5 lần hoặc cao hơn so với ở thụ thể GLP-1). Ví dụ, tỷ lệ của hoạt tính hoặc hiệu lực tương đối hoặc EC50 của peptit hoặc biến thể peptit ở thụ thể GLP-1 chia cho hoạt tính hoặc hiệu lực tương đối hoặc EC50 của peptit hoặc biến thể peptit ở thụ thể glucagon nhỏ hơn hoặc bằng khoảng, V, trong đó V được chọn từ 100, 75, 60, 50, 40, 30, 20, 15, 10 hoặc 5. Theo một số phương án, tỷ lệ của hiệu lực GLP-1 của peptit hoặc biến thể peptit so với hiệu lực glucagon của peptit hoặc biến thể peptit nhỏ hơn hoặc bằng khoảng, W, trong đó W được chọn từ 100, 75, 60, 50, 40, 30,

20, 15, 10 và 5. Theo một số phương án, peptit hoặc biến thể peptit có ít nhất 0,1% (ví dụ, khoảng 0,5% hoặc lớn hơn, khoảng 1% hoặc lớn hơn, khoảng 5% hoặc lớn hơn, khoảng 10 % hoặc lớn hơn, hoặc lớn hơn nữa) hoạt tính của GLP-1 tự nhiên ở thụ thể GLP-1 (hiệu lực GLP-1) và có ít nhất 0,1% (ví dụ, khoảng 0,5% hoặc lớn hơn, khoảng 1% hoặc lớn hơn, khoảng 5% hoặc lớn hơn, khoảng 10% hoặc lớn hơn, hoặc lớn hơn) hoạt tính của glucagon tự nhiên ở thụ thể glucagon (hiệu lực glucagon).

Hoạt tính ở thụ thể GIP

Ngoài việc có hoạt tính ở thụ thể glucagon và/hoặc thụ thể GLP-1, theo một số khía cạnh, peptit và biến thể peptit được nêu trong bản mô tả này còn có hoạt tính chủ vận thấp ở thụ thể GIP. Theo các khía cạnh này, tốt hơn nếu các peptit và biến thể peptit này có tính chọn lọc đối với thụ thể GLP-1 ít nhất là 100 lần so với thụ thể GIP.

Tuy nhiên, theo khía cạnh khác, peptit hoặc biến thể peptit có hoạt tính đáng kể ở thụ thể GIP, ví dụ EC50 của chất tương tự ở thụ thể GIP khác ít hơn khoảng 50 lần so với EC50 của nó ở thụ thể GLP-1, tùy ý, trong đó hiệu lực GIP của chất tương tự bằng khoảng 50 lần hiệu lực GLP-1 của chất tương tự. Theo các phương án ví dụ, peptit có EC50 đối với hoạt tính hoạt hoá thụ thể GIP là khoảng 1 μ M hoặc thấp hơn, hoặc 100nM hoặc thấp hơn, hoặc khoảng 75, 50, 25, 10, 8, 6, 5, 4, 3, 2 hoặc 1nM hoặc thấp hơn. Cần hiểu rằng EC50 càng thấp nghĩa là hoạt tính hoặc hiệu lực ở thụ thể càng cao. Theo một số phương án, peptit và biến thể peptit được nêu trong bản mô tả này có EC50 ở thụ thể GIP bằng khoảng 0,001 nM, 0,01 nM hoặc 0,1 nM. Theo một số phương án, peptit và biến thể peptit được nêu trong bản mô tả này có EC50 ở thụ thể GIP không cao hơn khoảng 100 nM. Sự hoạt hoá thụ thể có thể được đo bằng thử nghiệm *in vitro* đo sự cảm ứng cAMP trong tế bào HEK293 biểu hiện quá mức thụ thể, ví dụ thử nghiệm tế bào HEK293 được đồng chuyển nhiễm với ADN mã hoá thụ thể và gen luxiferaza được liên kết với yếu tố đáp ứng cAMP như nêu trong Ví dụ 2.

Theo một số phương án, peptit và biến thể peptit được bộc lộ trong bản mô tả này có hoạt tính ở thụ thể GIP bằng ít nhất khoảng 0,1%, 1%, 10%, 50%, 100%, 150%, hoặc 200% hoặc cao hơn so với GIP tự nhiên (hiệu lực GIP). Theo một số phương án, peptit và biến thể peptit được nêu trong bản mô tả này có hoạt tính ở thụ thể GIP không lớn hơn 1000%, 10.000%, 100.000%, hoặc 1.000.000% so với GIP tự nhiên. Hoạt tính (hiệu lực) của peptit glucagon ở thụ thể so với phối tử tự nhiên của

thụ thể được tính dưới dạng tỷ lệ nghịch đảo của EC50 đối với peptit so với phối tử tự nhiên.

Như vậy, một khía cạnh trong bản mô tả này đề xuất peptit và biến thể peptit có hoạt tính ở cả thụ thể glucagon và thụ thể GIP (“chất đồng chủ vận glucagon/GIP”). Theo một số phương án, EC50 của peptit ở thụ thể GIP khác ít hơn khoảng 50 lần, 40 lần, 30 lần hoặc 20 lần (cao hơn hoặc thấp hơn) so với EC50 của nó ở thụ thể glucagon. Theo một số phương án, hiệu lực GIP của peptit khác ít hơn khoảng 500, 450, 400, 350, 300, 250, 200, 150, 100, 75, 50, 25, 20, 15, 10 hoặc 5 lần (cao hơn hoặc thấp hơn) so với hiệu lực glucagon của nó. Theo một số phương án, hoạt tính GLP-1 được làm giảm đáng kể hoặc bị triệt tiêu, ví dụ, bằng sự cải biến axit amin ở vị trí 7, sự xóa (các) axit amin đầu tận C đến axit amin ở vị trí 27 hoặc 28, hoặc kết hợp của chúng.

Theo khía cạnh khác trong bản mô tả này, peptit và biến thể peptit trong bản mô tả này có hoạt tính ở thụ thể GLP-1 và GIP, nhưng không có hoạt tính đáng kể ở thụ thể glucagon (“chất đồng chủ vận GIP/GLP-1”), ví dụ, do sự cải biến axit amin Gln ở vị trí 3. Ví dụ, sự thế ở vị trí này bằng axit amin có tính axit, có tính bazơ, hoặc kỵ nước (axit glutamic, ornithin, norleuxin) làm giảm hoạt tính glucagon. Theo khía cạnh khác, peptit và biến thể peptit có hoạt tính ở mỗi trong số glucagon, thụ thể GIP và GLP-1 (“chất chủ vận ba thành phần glucagon/GIP/GLP-1”). Ví dụ, theo một khía cạnh trong số các khía cạnh sau, EC50 của peptit ở thụ thể GIP khác ít hơn khoảng 50 lần, 40 lần, 30 lần hoặc 20 lần (cao hơn hoặc thấp hơn) so với EC50 của nó ở thụ thể GLP-1. Theo một số phương án, hiệu lực GIP của peptit khác ít hơn khoảng 25, 20, 15, 10 hoặc 5 lần (cao hơn hoặc thấp hơn) so với hiệu lực GLP-1 của nó. Theo một số phương án, các peptit này có hoạt tính của glucagon tự nhiên ở thụ thể glucagon bằng khoảng 10% hoặc nhỏ hơn, ví dụ khoảng 1-10%, hoặc khoảng 0,1-10%, hoặc lớn hơn khoảng 0,1% nhưng nhỏ hơn khoảng 10%.

Hoạt tính của thể tiếp hợp

Theo một số phương án, peptit và biến thể peptit được nêu trong bản mô tả này có hoạt tính hoặc hiệu lực ở thụ thể glucagon và/hoặc hoạt tính ở thụ thể GLP-1 và/hoặc hoạt tính ở thụ thể GIP, như nêu trên và, khi peptit hoặc biến thể peptit là một phần của thể tiếp hợp (ví dụ, được tiếp hợp với gốc khác loại, ví dụ, gốc ưa nước như

polyetylen glycol), peptit hoặc biến thể peptit có hoạt tính thấp hơn (tức là hiệu lực thấp hơn hoặc EC50 cao hơn) so với khi peptit hoặc biến thể peptit không phải là một phần của thể tiếp hợp. Theo một số khía cạnh, peptit hoặc biến thể peptit khi không phải là một phần của thể tiếp hợp có hiệu lực ở thụ thể glucagon và/hoặc thụ thể GLP-1 bằng khoảng 10 lần hoặc lớn hơn hiệu lực của peptit hoặc biến thể peptit khi là một phần của thể tiếp hợp. Theo một số khía cạnh, peptit hoặc biến thể peptit khi không được tiếp hợp có hiệu lực ở thụ thể glucagon và/hoặc thụ thể GLP-1 bằng khoảng 10 lần, khoảng 15 lần, khoảng 20 lần, khoảng 25 lần, khoảng 30 lần, khoảng 35 lần, khoảng 40 lần, khoảng 45 lần, khoảng 50 lần, khoảng 100 lần, hoặc thậm chí lớn hơn hiệu lực của peptit hoặc biến thể peptit khi được tiếp hợp.

Cấu trúc của các chất tương tự glucagon

Axyl hoá

Theo một số phương án, chất tương tự glucagon chứa axit amin được axyl hoá (ví dụ, axit amin được axyl hoá không được mã hoá (ví dụ, axit amin chứa nhóm axyl mà không phải là tự nhiên đối với axit amin có trong tự nhiên)). Axit amin được axyl hoá theo một số phương án làm cho chất tương tự glucagon có một hoặc nhiều tính chất sau (i) thời gian bán huỷ trong hệ tuần hoàn dài hơn, (ii) thời điểm bắt đầu tác động được làm trễ, (iii) thời gian tác động kéo dài, (iv) tính kháng đối với proteaza được cải thiện, như DPP-IV, và (v) hiệu lực tăng lên ở một trong hai hoặc cả hai GLP-1 và thụ thể glucagon. Như được thể hiện trong bản mô tả này, chất tương tự glucagon được axyl hoá không thể hiện hoạt tính giảm ở glucagon và thụ thể GLP-1 so với chất tương tự glucagon không được axyl hoá tương ứng. Đúng hơn là, trong một số ví dụ, chất tương tự glucagon được axyl hoá thực sự có hoạt tính tăng ở các thụ thể GLP-1 và glucagon. Vì vậy, hiệu lực của chất tương tự glucagon được axyl hoá là có thể tương đương với dạng không được axyl hoá của chất tương tự glucagon, nếu không được tăng cường.

Theo một phương án, chất tương tự glucagon chứa nhóm axyl mà được gắn vào chất tương tự glucagon thông qua liên kết este, thioeste, hoặc amit nhằm mục đích kéo dài thời gian bán huỷ trong hệ tuần hoàn và/hoặc làm trễ thời điểm bắt đầu tác động và/hoặc kéo thời gian tác động và/hoặc cải thiện tính kháng đối với proteaza như DPP-IV.

Axyl hoá có thể được tiến hành ở vị trí bất kỳ bên trong chất tương tự glucagon, gồm vị trí bất kỳ trong số các vị trí 1-29, từ vị trí đầu tận C đến axit amin thứ 29 (ví dụ, axit amin ở vị trí 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, v.v., ở vị trí bên trong đoạn kéo dài đầu tận C hoặc ở đầu tận C), với điều kiện là hoạt tính glucagon và/hoặc GLP-1 không bị mất, nếu không được tăng cường. Ví dụ không làm giới hạn sáng chế gồm vị trí 5, 7, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 24, 27, 28 hoặc 29. Theo các phương án ví dụ, chất tương tự glucagon chứa axit amin được axyl hoá tại một hoặc nhiều vị trí được chọn từ nhóm gồm: 9, 10, 12, 16 và 20. Theo các phương án ví dụ, chất tương tự glucagon chứa axit amin được axyl hoá tại một hoặc nhiều vị trí được chọn từ nhóm gồm: 10, 12 và 16. Theo các phương án ví dụ, chất tương tự glucagon chứa axit amin được axyl hoá tại một hoặc nhiều vị trí được chọn từ nhóm gồm: 9, 10, 12, 16 và 20. Theo các phương án ví dụ, chất tương tự glucagon chứa axit amin được axyl hoá tại một hoặc nhiều vị trí 10 và 12. Theo các phương án ví dụ, chất tương tự glucagon chứa axit amin được axyl hoá ở vị trí 12. Theo các phương án ví dụ, chất tương tự glucagon chứa đoạn kéo dài đầu tận C và axit amin được axyl hoá tại một hoặc nhiều vị trí được chọn từ nhóm gồm 9, 10, 12, 16, 20, và 37-43 (ví dụ, 40). Theo các phương án cụ thể, sự axyl hoá xảy ra ở vị trí 10 của chất tương tự glucagon và chất tương tự glucagon thiếu cầu nối nội phân tử, ví dụ, cầu nối nội phân tử cộng hoá trị (ví dụ, cầu lactam). Chất tương tự glucagon được axyl hoá thiếu cầu nối nội phân tử này cho thấy hoạt tính tăng ở các thụ thể GLP-1 và glucagon so với chất tương tự không được axyl hoá thiếu cầu nối nội phân tử cộng hoá trị tương ứng và so với chất tương tự thiếu cầu nối nội phân tử tương ứng được axyl hoá ở vị trí không phải là vị trí 10. Như được thể hiện trong bản mô tả này, sự axyl hoá ở vị trí 10 có thể thậm chí làm biến đổi chất tương tự glucagon có rất ít hoạt tính ở thụ thể glucagon thành chất tương tự glucagon có hoạt tính ở cả thụ thể glucagon và thụ thể GLP-1. Vì vậy, vị trí tại đó xảy ra sự axyl hoá có thể làm thay đổi profin hoạt tính chung của chất tương tự glucagon.

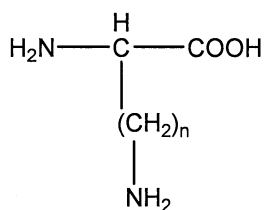
Chất tương tự glucagon theo một số phương án được axyl hoá ở cùng vị trí axit amin tại đó gốc ưa nước được liên kết, hoặc ở các vị trí axit amin khác nhau. Ví dụ không làm giới hạn sáng chế gồm sự axyl hoá ở vị trí 10 và PEG hoá tại một hoặc nhiều vị trí ở phần đầu tận C của chất tương tự glucagon, ví dụ, vị trí 24, 28 hoặc 29,

trong đoạn kéo dài đầu tận C, hoặc ở đầu tận C (ví dụ, bằng cách bổ sung Cys đầu tận C).

Nhóm axyl có thể được liên kết cộng hoá trị trực tiếp với axit amin của chất tương tự glucagon, hoặc gián tiếp với axit amin của chất tương tự glucagon qua vùng đệm, trong đó vùng đệm được bố trí giữa các axit amin của chất tương tự glucagon và nhóm axyl.

Theo các khía cạnh cụ thể, chất tương tự glucagon được biến đổi để chứa nhóm axyl bằng cách axyl hoá trực tiếp amin, hydroxyl, hoặc thiol của mạch bên của axit amin của chất tương tự glucagon. Theo một số phương án, sự axyl hoá là ở vị trí 10, 20, 24 hoặc 29 của chất tương tự glucagon. Liên quan đến vấn đề này, chất tương tự glucagon được axyl hoá có thể chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 1, hoặc trình tự axit amin được biến đổi của chúng gồm một hoặc nhiều cải biến axit amin được nêu trong bản mô tả này, với ít nhất một trong số các axit amin ở vị trí 10, 20, 24 và 29 của chất tương tự được biến đổi thành axit amin bất kỳ có mạch bên amin, hydroxyl, hoặc thiol. Theo một số phương án cụ thể, sự axyl hoá trực tiếp chất tương tự glucagon xảy ra thông qua mạch bên amin, hydroxyl hoặc thiol của axit amin ở vị trí 10.

Theo một số phương án, axit amin chứa mạch bên amin là axit amin có công thức I:

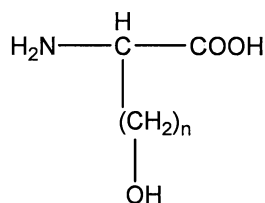


trong đó $n = 1$ đến 4

[Công thức I]

Theo một số phương án ví dụ, axit amin có công thức I, là axit amin trong đó n là 4 (Lys) hoặc n là 3 (Orn).

Theo phương án khác, axit amin chứa mạch bên hydroxyl là axit amin có công thức II:

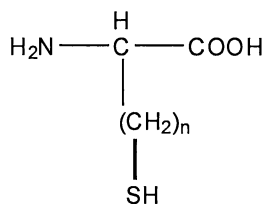


trong đó $n = 1$ đến 4

[Công thức II]

Theo một số phương án ví dụ, axit amin có công thức II là axit amin trong đó n là 1 (Ser).

Theo các phương án khác nữa, axit amin chứa mạch bên thiol là axit amin có công thức III:



trong đó $n = 1$ đến 4

[Công thức III]

Theo một số phương án ví dụ, axit amin có công thức III là axit amin trong đó n là 1 (Cys).

Theo các phương án khác nữa, axit amin chứa mạch bên amin, hydroxyl, hoặc thiol là axit amin được thể hai lần chứa cùng cấu trúc có công thức I, công thức II, hoặc công thức III, ngoại trừ việc hydro được liên kết vào cacbon alpha của axit amin có công thức I, công thức II, hoặc công thức III được thể bằng mạch bên thứ hai.

Theo một số phương án, glucagon được axyl hoá chứa vùng đệm giữa chất tương tự và nhóm axyl. Theo một số phương án, chất tương tự glucagon được liên kết cộng hoá trị với vùng đệm, mà được liên kết cộng hoá trị với nhóm axyl.

Theo một số phương án, vùng đệm là axit amin chứa mạch bên amin, hydroxyl, hoặc thiol, hoặc dipeptit hoặc tripeptit chứa axit amin chứa mạch bên amin, hydroxyl, hoặc thiol. Axit amin có vùng đệm được gắn vào có thể là axit amin bất kỳ (ví dụ, axit amin được thể α một lần hoặc hai lần) chứa gốc cho phép liên kết với vùng đệm. Ví dụ, axit amin chứa mạch bên NH_2 , $-\text{OH}$, hoặc $-\text{COOH}$ (ví dụ, Lys, Orn, Ser, Asp,

hoặc Glu) là thích hợp. Theo khía cạnh này, chất tương tự glucagon được axyl hoá có thể chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 1, hoặc trình tự axit amin được biến đổi của chúng gồm một hoặc nhiều cải biến axit amin được nêu trong bản mô tả này, với ít nhất một trong số các axit amin ở vị trí 10, 20, 24 và 29 được biến đổi thành axit amin bất kỳ có mạch bên amin, hydroxyl hoặc carboxylat.

Theo một số phương án, vùng đệm là axit amin chứa mạch bên amin, hydroxyl, hoặc thiol, hoặc dipeptit hoặc tripeptit gồm axit amin chứa mạch bên amin, hydroxyl, hoặc thiol.

Khi axyl hoá xảy ra thông qua nhóm amin của vùng đệm, sự axyl hoá này có thể xảy ra qua amin alpha của axit amin hoặc amin mạch bên. Trong trường hợp amin alpha được axyl hoá, axit amin của vùng đệm có thể là axit amin bất kỳ. Ví dụ, axit amin của vùng đệm có thể là axit amin kỵ nước, ví dụ, Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Trp, Met, Phe, Tyr, axit 6-aminohexanoic, axit 5-aminovaleric, axit 7-aminoheptanoic, và axit 8-aminooctanoic. Theo cách khác, axit amin của vùng đệm có thể là gốc có tính axit, ví dụ, Asp, Glu, axit homoglutamic, axit homoxysteic, axit xysteic, axit gamma-glutamic.

Trong trường hợp mạch bên amin của axit amin của vùng đệm được axyl hoá, axit amin của vùng đệm là axit amin chứa amin mạch bên, ví dụ, axit amin có công thức I (ví dụ, Lys hoặc Orn). Trong trường hợp này, có thể cả amin alpha và amin mạch bên của axit amin của vùng đệm đều được axyl hoá, sao cho chất tương tự glucagon được axyl hoá hai lần. Các phương án của sáng chế gồm phân tử được axyl hoá hai lần này.

Khi axyl hoá xảy ra thông qua nhóm hydroxyl của vùng đệm, axit amin hoặc một trong số các axit amin của dipeptit hoặc tripeptit có thể là axit amin có công thức II. Theo phương án ví dụ cụ thể, axit amin là Ser.

Khi axyl hoá xảy ra thông qua nhóm thiol của vùng đệm, axit amin hoặc một trong số các axit amin của dipeptit hoặc tripeptit có thể là axit amin có công thức III. Theo phương án ví dụ cụ thể, axit amin là Cys.

Theo một số phương án, vùng đệm là vùng đệm hai chức ưa nước. Theo phương án nhất định, vùng đệm hai chức ưa nước chứa hai hoặc nhiều hơn hai nhóm có tính phản ứng, ví dụ, amin, hydroxyl, thiol, và nhóm carboxyl hoặc các kết hợp bất

kỳ của chúng. Theo phương án nhất định, vùng đệm hai chức ưa nước chứa nhóm hydroxyl và carboxylat. Theo phương án khác, vùng đệm hai chức ưa nước chứa nhóm amin và carboxylat. Theo phương án khác, vùng đệm hai chức ưa nước chứa nhóm thiol và carboxylat. Theo phương án cụ thể, vùng đệm chứa amino poly(alkyloxy)carboxylat. Liên quan đến vấn đề này, vùng đệm có thể chứa, ví dụ, $\text{NH}_2(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n(\text{CH}_2)_m\text{COOH}$, trong đó m là số nguyên bất kỳ từ 1 đến 6 và n là số nguyên bất kỳ từ 2 đến 12, như, ví dụ, axit 8-amino-3,6-dioxaoctanoic, có bán trên thị trường từ Peptide International, Inc. (Louisville, KY).

Theo một số phương án, vùng đệm là vùng đệm hai chức kỵ nước. Vùng đệm hai chức kỵ nước là đã biết trong lĩnh vực. Xem tài liệu, ví dụ, *Bioconjugate Techniques*, G. T. Hermanson (Academic Press, San Diego, CA, 1996), được kết hợp vào bản mô tả bằng cách viện dẫn. Theo phương án nhất định, vùng đệm hai chức kỵ nước chứa hai hoặc nhiều hơn hai nhóm có tính phản ứng, ví dụ, amin, hydroxyl, thiol, và nhóm carboxyl hoặc các kết hợp bất kỳ của chúng. Theo phương án nhất định, vùng đệm hai chức kỵ nước chứa nhóm hydroxyl và carboxylat. Theo phương án khác, vùng đệm hai chức kỵ nước chứa nhóm amin và carboxylat. Theo phương án khác, vùng đệm hai chức kỵ nước chứa nhóm thiol và carboxylat. Vùng đệm hai chức kỵ nước thích hợp gồm carboxylat và nhóm hydroxyl hoặc nhóm thiol là đã biết trong lĩnh vực và gồm, ví dụ, axit 8-hydroxyoctanoic và axit 8-mercaptooctanoic.

Theo một số phương án, vùng đệm hai chức không phải là axit dicarboxylic chứa metylen không phân nhánh có 1 đến 7 nguyên tử cacbon giữa các nhóm carboxylat. Theo một số phương án, vùng đệm hai chức là axit dicarboxylic chứa metylen không phân nhánh có 1 đến 7 nguyên tử cacbon giữa các nhóm carboxylat.

Vùng đệm (ví dụ, axit amin, dipeptit, tripeptit, vùng đệm hai chức ưa nước, hoặc vùng đệm hai chức kỵ nước) theo phương án cụ thể có chiều dài gồm từ 3 đến 10 nguyên tử (ví dụ, từ 6 đến 10 nguyên tử (ví dụ, 6, 7, 8, 9, hoặc 10 nguyên tử)). Theo phương án cụ thể hơn, vùng đệm có chiều dài gồm khoảng từ 3 đến 10 nguyên tử (ví dụ, từ 6 đến 10 nguyên tử) và nhóm axyl là nhóm C12-C18 axyl béo, ví dụ, nhóm C14 axyl béo, nhóm C16 axyl béo, sao cho tổng chiều dài của vùng đệm và nhóm axyl là từ 14 đến 28 nguyên tử, ví dụ, khoảng 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 hoặc 28 nguyên tử. Theo một số phương án, chiều dài của vùng đệm và nhóm axyl là từ 17 đến 28 (ví dụ, từ 19 đến 26, từ 19 đến 21) nguyên tử.

Theo các phương án nhất định nêu trên, vùng đệm hai chức có thể là axit amin tổng hợp hoặc có trong tự nhiên (gồm, nhưng không giới hạn ở, axit amin bất kỳ được nêu trong bản mô tả này) gồm khung axit amin có chiều dài gồm từ 3 đến 10 nguyên tử (ví dụ, axit 6-aminoheptanoic, axit 5-aminovaleric, axit 7-aminoheptanoic, và axit 8-aminooctanoic). Theo cách khác, vùng đệm có thể là vùng đệm dipeptit hoặc tripeptit có khung peptit có chiều dài gồm từ 3 đến 10 nguyên tử (ví dụ, từ 6 đến 10 nguyên tử). Mỗi axit amin của vùng đệm dipeptit hoặc tripeptit có thể là giống hoặc khác (các) axit amin khác của dipeptit hoặc tripeptit và có thể được chọn độc lập từ nhóm gồm: axit amin có trong tự nhiên hoặc được mã hoá và/hoặc không được mã hoá hoặc không có trong tự nhiên, gồm, ví dụ, chất đồng phân D hoặc L bất kỳ của axit amin có trong tự nhiên (Ala, Cys, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Arg, Ser, Thr, Val, Trp, Tyr), hoặc chất đồng phân D hoặc L bất kỳ của axit amin không có trong tự nhiên hoặc không được mã hoá được chọn từ nhóm gồm: β -alanin (β -Ala), N- α -metyl-alanin (Me-Ala), axit aminobutyric (Abu), axit γ -aminobutyric (γ -Abu), axit aminoheptanoic (ϵ -Ahx), axit aminoisobutyric (Aib), axit aminomethylpyrrol carboxylic, axit aminopiperidincarboxylic, aminoserin (Ams), axit aminotetrahydropyran-4-carboxylic, arginin N-metoxymetyl amit, axit β -aspartic (β -Asp), axit azetidin carboxylic, 3-(2-benzothiazolyl)alanin, α -*tert*-butylglyxin, axit 2-amino-5-ureido-n-valeric (xitrulin, Cit), β -xyclohexylalanin (Cha), axetamidometyl-cystein, axit diaminobutanoic (Dab), axit diaminopropionic (Dpr), dihydroxyphenylalanin (DOPA), dimethylthiazolidin (DMTA), axit γ -glutamic (γ -Glu), homoserin (Hse), hydroxyprolin (Hyp), isoleuxin N-metoxymetyl amit, metyl-isoleuxin (MeIle), axit isonipecotic (Isn), metyl-leuxin (MeLeu), metyl-lysin, dimetyl-lysin, trimetyl-lysin, methanoprolin, methionin-sulfoxit (Met(O)), methionin-sulfon (Met(O₂)), norleuxin (Nle), metyl-norleuxin (Me-Nle), norvalin (Nva), ornithin (Orn), axit para-aminobenzoic (PABA), penicillamin (Pen), metylphenylalanin (MePhe), 4-clophenylalanin (Phe(4-Cl)), 4-flophenylalanin (Phe(4-F)), 4-nitrophenylalanin (Phe(4-NO₂)), 4-xyanophenylalanin ((Phe(4-CN))), phenylglyxin (Phg), piperidinyalanin, piperidinyglyxin, 3,4-dehydroprolin, pyrrolidinyalanin, sarcosin (Sar), selenoxystein (Sec), O-Benzyl-phosphoserin, axit 4-amino-3-hydroxy-6-metylheptanoic (Sta), axit 4-amino-5-xyclohexyl-3-hydroxypentanoic (ACHPA), axit 4-amino-3-hydroxy-5-phenylpentanoic (AHPPA), axit 1,2,3,4,-tetrahydro-isoquinolin-3-carboxylic (Tic),

tetrahydropyranglyxin, thienylalanin (Thi), O-benzyl-phosphotyrosin, O-phosphotyrosin, metoxytyrosin, etoxytyrosin, O-(bis-dimethylamino-phosphono)-tyrosin, tyrosin sulfat tetrabutylamin, metyl-valin (MeVal), và axit 3-mercaptopropionic được alkyl hoá.

Theo một số phương án, vùng đệm có điện tích âm toàn phần, ví dụ, chứa một hoặc hai axit amin tích điện âm. Theo một số phương án, dipeptit không phải là dipeptit bất kỳ có cấu trúc chung A-B, trong đó được chọn từ nhóm gồm Gly, Gln, Ala, Arg, Asp, Asn, Ile, Leu, Val, Phe, và Pro, trong đó B được chọn từ nhóm gồm Lys, His, Trp. Theo một số phương án, vùng đệm dipeptit được chọn từ nhóm gồm: Ala-Ala, β -Ala- β -Ala, Leu-Leu, Pro-Pro, axit γ -aminobutyric- axit γ -aminobutyric, Glu-Glu, và γ -Glu- γ -Glu.

Theo một số phương án ví dụ, chất tương tự glucagon được biến đổi để chứa nhóm axyl bằng cách axyl hoá amin, hydroxyl, hoặc thiol của vùng đệm, vùng đệm này được gắn vào mạch bên của axit amin ở vị trí 10, 20, 24 hoặc 29, hoặc ở axit amin đầu tận C của chất tương tự glucagon.

Theo phương án cụ thể khác nữa, nhóm axyl được gắn vào axit amin ở vị trí 10 của chất tương tự glucagon và chiều dài của vùng đệm và nhóm axyl là từ 14 đến 28 nguyên tử. Axit amin ở vị trí 10, theo một số khía cạnh, là axit amin có công thức I, ví dụ, Lys, hoặc axit amin được thể hai lần liên quan đến Công thức I. Theo phương án cụ thể hơn, chất tương tự glucagon thiếu cầu nối nội phân tử, ví dụ, cầu nối nội phân tử cộng hoá trị. Chất tương tự glucagon, ví dụ, có thể là chất tương tự glucagon gồm một hoặc nhiều axit amin được thể hai lần alpha, alpha, ví dụ, AIB, để làm ổn định xoắn alpha của chất tương tự.

Phương pháp thích hợp để axyl hoá peptit thông qua amin, hydroxyl, và thiol là đã biết trong lĩnh vực. Xem tài liệu, ví dụ, Ví dụ 19 (đối với phương pháp axyl hoá thông qua amin), Miller, *Biochem Biophys Res Commun* 218: 377-382 (1996); Shimohigashi and Stammer, *Int J Pept Protein Res* 19: 54-62 (1982); và Previero et al., *Biochim Biophys Acta* 263: 7-13 (1972) (đối với phương pháp axyl hoá thông qua hydroxyl); và San and Silvius, *J Pept Res* 66: 169-180 (2005) (đối với phương pháp axyl hoá thông qua thiol); Bioconjugate Chem. "Chemical Modifications of Proteins: History and Applications" pages 1, 2-12 (1990); Hashimoto et al., *Pharmacuetical Res.*

"Synthesis Palmitoyl Derivatives of Insulin and their Biological Activity " Vol. 6, No: 2 pp.171-176 (1989).

Nhóm axyl của axit amin được axyl hoá có thể có kích thước bất kỳ, ví dụ, chiều dài mạch cacbon bất kỳ, và có thể là mạch thẳng hoặc mạch nhánh. Theo một số phương án cụ thể, nhóm axyl là axit béo C4 đến C30. Ví dụ, nhóm axyl có thể là nhóm bất kỳ trong số axit béo C4, axit béo C6, axit béo C8, axit béo C10, axit béo C12, axit béo C14, axit béo C16, axit béo C18, axit béo C20, axit béo C22, axit béo C24, axit béo C26, axit béo C28, hoặc axit béo C30. Theo một số phương án, nhóm axyl là axit béo C8 đến C20, ví dụ, axit béo C14 hoặc axit béo C16.

Theo phương án thay thế khác, nhóm axyl là axit mật. Axit mật có thể là axit mật thích hợp bất kỳ, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, axit cholic, axit chenodeoxycholic, axit deoxycholic, axit lithocholic, axit taurocholic, axit glycocholic, và axit cholesterol.

Theo một số phương án, chất tương tự glucagon chứa axit amin được axyl hoá bằng cách axyl hoá alkan mạch dài bằng chất tương tự glucagon. Theo các khía cạnh cụ thể, alkan mạch dài chứa nhóm amin, hydroxyl, hoặc thiol (ví dụ, octadexylamin, tetradecanol, và hexadecanthiol) mà phản ứng với nhóm carboxyl, hoặc dạng được hoạt hoá của nó, của chất tương tự glucagon. Nhóm carboxyl, hoặc dạng được hoạt hoá của nó, của chất tương tự glucagon có thể là một phần của mạch bên của axit amin (ví dụ, axit glutamic, axit aspartic) của chất tương tự glucagon hoặc có thể là một phần khung của chất tương tự.

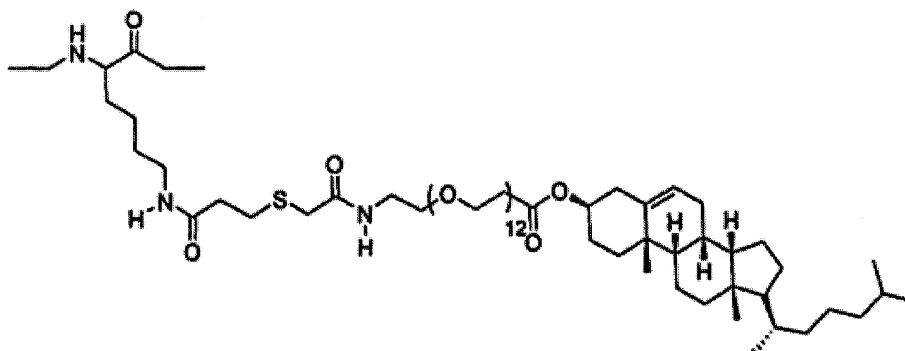
Theo phương án nhất định, chất tương tự glucagon được biến đổi để chứa nhóm axyl bằng cách axyl hoá alkan mạch dài bằng vùng đệm mà được gắn vào chất tương tự glucagon. Theo các khía cạnh cụ thể, alkan mạch dài chứa nhóm amin, hydroxyl, hoặc thiol phản ứng với nhóm carboxyl, hoặc dạng được hoạt hoá của nó, của vùng đệm. Vùng đệm thích hợp chứa nhóm carboxyl, hoặc dạng được hoạt hoá của nó, được nêu trong bản mô tả này và gồm, ví dụ, vùng đệm hai chức, ví dụ, axit amin, dipeptit, tripeptit, vùng đệm hai chức ưa nước và vùng đệm hai chức kỵ nước.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “dạng được hoạt hoá của nhóm carboxyl” chỉ nhóm carboxyl có công thức chung $R(C=O)X$, trong đó X là nhóm rời chuyển và R là chất tương tự glucagon hoặc vùng đệm. Ví dụ, dạng được hoạt hoá của nhóm carboxyl

có thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở, axyl clorua, anhydrit, và este. Theo một số phương án, nhóm carboxyl được hoạt hoá là este có nhóm rời chuyển N-hydroxysuxinimit este (NHS).

Liên quan đến các khía cạnh này, trong đó alkan mạch dài được axyl hoá bằng chất tương tự glucagon hoặc vùng đệm, alkan mạch dài có thể có kích thước bất kỳ và có thể có chiều dài mạch cacbon bất kỳ. Alkan mạch dài có thể là mạch thẳng hoặc mạch nhánh. Theo các khía cạnh này, alkan mạch dài là alkan C4 đến C30. Ví dụ, alkan mạch dài có thể là mạch bất kỳ trong số alkan C4, alkan C6, alkan C8, alkan C10, alkan C12, alkan C14, alkan C16, alkan C18, alkan C20, alkan C22, alkan C24, alkan C26, alkan C28, hoặc alkan C30. Theo một số phương án, alkan mạch dài chứa alkan C8 đến C20, ví dụ, alkan C14, alkan C16, hoặc alkan C18.

Ngoài ra, theo một số phương án, nhóm amin, hydroxyl, hoặc thiol của chất tương tự glucagon được axyl hoá với axit cholesterol. Theo phương án cụ thể, chất tương tự glucagon được liên kết với axit cholesterol thông qua vùng đệm des-amino Cys được alkyl hoá, tức là, vùng đệm axit 3-mercaptopropionic được alkyl hoá. Vùng đệm des-amino Cys được alkyl hoá có thể là, ví dụ, vùng đệm des-amino-Cys chứa gốc dodecaetylen glycol. Theo một phương án, chất tương tự glucagon có cấu trúc:



Chất tương tự glucagon được axyl hoá được nêu trong bản mô tả này có thể được biến đổi thêm để chứa gốc ưa nước. Theo một số phương án cụ thể, gốc ưa nước có thể chứa mạch polyetylen glycol (PEG). Sự kết hợp của gốc ưa nước có thể được thực hiện bằng phương thức thích hợp bất kỳ, như phương pháp bất kỳ được nêu trong bản mô tả này. Liên quan đến vấn đề này, chất tương tự glucagon được axyl hoá có thể chứa SEQ ID NO: 1, gồm cả biến bất kỳ được nêu trong bản mô tả này, trong đó ít nhất một trong số các axit amin ở vị trí 10, 20, 24 và 29 của chất tương tự chứa nhóm

axyl và ít nhất một trong số các axit amin ở vị trí 16, 17, 21, 24 hoặc 29, vị trí ở trong đoạn kéo dài đầu tận C, hoặc axit amin đầu tận C được biến đổi thành Cys, Lys, Orn, homo-Cys, hoặc Ac-Phe, và mạch bên của axit amin được liên kết cộng hoá trị vào gốc ưa nước (ví dụ, PEG). Theo một số phương án, nhóm axyl được gắn vào vị trí 10, tùy ý thông qua vùng đệm chứa Cys, Lys, Orn, homo-Cys, hoặc Ac-Phe, và gốc ưa nước được kết hợp ở gốc Cys ở vị trí 24.

Theo cách khác, chất tương tự glucagon được axyl hoá có thể chứa vùng đệm, trong đó vùng đệm được axyl hoá và được biến đổi để chứa gốc ưa nước. Ví dụ không làm giới hạn sáng chế về vùng đệm thích hợp gồm vùng đệm chứa một hoặc nhiều axit amin được chọn từ nhóm gồm Cys, Lys, Orn, homo-Cys và Ac-Phe.

Alkyl hoá

Theo một số phương án, chất tương tự glucagon chứa axit amin được alkyl hoá (ví dụ, axit amin được alkyl hoá không được mã hoá (ví dụ, axit amin chứa nhóm alkyl mà không phải là tự nhiên đối với axit amin có trong tự nhiên)). Không bị giới hạn bởi lý thuyết cụ thể bất kỳ, tin rằng việc alkyl hoá chất tương tự glucagon đạt được các tác dụng tương tự, nếu như không phải là tác dụng giống hệt, như sự axyl hoá chất tương tự glucagon, ví dụ, thời gian bán huỷ dài hơn trong hệ tuần hoàn, thời điểm bắt đầu tác động được làm trễ, thời gian tác động kéo dài, tính kháng đối với proteaza được cải thiện, như DPP-IV, và hiệu lực tăng lên ở các thụ thể GLP-1 và glucagon.

Alkyl hoá có thể được tiến hành ở vị trí bất kỳ trong chất tương tự glucagon, gồm vị trí bất kỳ trong số các vị trí được nêu trong bản mô tả này như là vị trí để axyl hoá, bao gồm nhưng không giới hạn ở, vị trí bất kỳ trong số các vị trí axit amin 1-29, từ vị trí axit amin đầu tận C đến gốc thứ 29, ví dụ, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, v.v., ở vị trí bên trong đoạn kéo dài đầu tận C, hoặc ở đầu tận C, với điều kiện là hoạt tính glucagon hoặc hoạt tính GLP-1 được giữ lại. Ví dụ không làm giới hạn sáng chế gồm vị trí 5, 7, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 24, 27, 28, hoặc 29. Theo các phương án ví dụ, chất tương tự glucagon chứa axit amin được alkyl hoá tại một hoặc nhiều vị trí được chọn từ nhóm gồm: 9, 10, 12, 16, và 20. Theo các phương án ví dụ, chất tương tự glucagon chứa axit amin được alkyl hoá tại một hoặc nhiều vị trí được chọn từ nhóm gồm: 10, 12, và 16. Theo các phương án ví dụ, chất tương tự glucagon chứa axit amin được alkyl hoá tại một hoặc nhiều vị

trí được chọn từ nhóm gồm: 9, 10, 12, 16 và 20. Theo các phương án ví dụ, chất tương tự glucagon chứa axit amin được alkyl hoá tại một hoặc nhiều vị trí 10 và 12. Theo các phương án ví dụ, chất tương tự glucagon chứa axit amin được alkyl hoá ở vị trí 12. Theo các phương án ví dụ, chất tương tự glucagon chứa đoạn kéo dài đầu tận C và axit amin được alkyl hoá tại một hoặc nhiều vị trí được chọn từ nhóm gồm 9, 10, 12, 16, 20 và 37-43 (ví dụ, 40). Nhóm alkyl có thể được liên kết cộng hoá trị trực tiếp với axit amin của chất tương tự glucagon, hoặc gián tiếp với axit amin của chất tương tự glucagon qua vùng đệm, trong đó vùng đệm được bố trí giữa các axit amin của chất tương tự glucagon và nhóm alkyl. Chất tương tự glucagon có thể được alkyl hoá ở cùng vị trí axit amin mà gốc ưa nước được liên kết, hoặc ở các vị trí axit amin khác nhau. Ví dụ không làm giới hạn sáng chế gồm sự alkyl hoá ở vị trí 10 và sự PEG hoá tại một hoặc nhiều vị trí trong phần đầu tận C của chất tương tự glucagon, ví dụ, vị trí 24, 28 hoặc 29, ở trong đoạn kéo dài đầu tận C, hoặc ở đầu tận C (ví dụ, bằng cách bổ sung Cys đầu tận C).

Theo các khía cạnh cụ thể, chất tương tự glucagon được biến đổi để chứa nhóm alkyl bằng cách alkyl hoá trực tiếp amin, hydroxyl, hoặc thiol của mạch bên của axit amin của chất tương tự glucagon. Theo một số phương án, sự alkyl hoá là ở vị trí 10, 20, 24 hoặc 29 của chất tương tự glucagon. Liên quan đến vấn đề này, chất tương tự glucagon được alkyl hoá có thể chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 2, hoặc trình tự axit amin được biến đổi của chúng gồm một hoặc nhiều cải biến axit amin được nêu trong bản mô tả này, với ít nhất một trong số các axit amin ở vị trí 10, 20, 24 và 29 được biến đổi thành axit amin bất kỳ có mạch bên amin, hydroxyl, hoặc thiol. Theo một số phương án cụ thể, sự alkyl hoá trực tiếp chất tương tự glucagon xảy ra thông qua mạch bên amin, hydroxyl, hoặc thiol của axit amin ở vị trí 10.

Theo một số phương án, axit amin chứa amin mạch bên là axit amin có công thức I. Theo một số phương án ví dụ, axit amin có công thức I, là axit amin trong đó n là 4 (Lys) hoặc n là 3 (Orn).

Theo phương án khác, axit amin chứa hydroxyl mạch bên là axit amin có công thức II. Theo một số phương án ví dụ, axit amin có công thức II là axit amin trong đó n là 1 (Ser).

Theo các phương án khác nữa, axit amin chứa thiol mạch bên là axit amin có công thức III. Theo một số phương án ví dụ, axit amin có công thức III là axit amin trong đó n là 1 (Cys).

Theo các phương án khác nữa, axit amin chứa amin, hydroxyl, hoặc thiol mạch bên là axit amin được thế hai lần chứa cùng cấu trúc có công thức I, Công thức II, hoặc Công thức III, ngoại trừ việc hydro được liên kết với cacbon alpha của axit amin có công thức I, Công thức II, hoặc Công thức III được thế bằng mạch bên thứ hai.

Theo một số phương án, chất tương tự glucagon được alkyl hoá chứa vùng đệm nằm giữa chất tương tự và nhóm alkyl. Theo một số phương án, chất tương tự glucagon được liên kết cộng hoá trị với vùng đệm, mà được liên kết cộng hoá trị với nhóm alkyl. Theo một số phương án ví dụ, chất tương tự glucagon được biến đổi để chứa nhóm alkyl bằng cách alkyl hoá amin, hydroxyl, hoặc thiol của vùng đệm, vùng đệm này được gắn vào mạch bên của axit amin ở vị trí 10, 20, 24, hoặc 29 của chất tương tự glucagon. Axit amin có vùng đệm được gắn vào có thể là axit amin bất kỳ có gốc cho phép liên kết với vùng đệm. Ví dụ, axit amin chứa mạch bên NH_2 , $-\text{OH}$, hoặc $-\text{COOH}$ (ví dụ, Lys, Orn, Ser, Asp, hoặc Glu) là thích hợp. Theo khía cạnh này, chất tương tự glucagon được alkyl hoá có thể chứa trình tự axit amin được biến đổi của SEQ ID NO: 1, gồm một hoặc nhiều cải biến axit amin được nêu trong bản mô tả này, với ít nhất một trong số các axit amin ở vị trí 10, 20, 24 và 29 được biến đổi thành axit amin bất kỳ có amin, hydroxyl hoặc carboxylat mạch bên.

Theo một số phương án, vùng đệm là axit amin chứa amin, hydroxyl, hoặc thiol mạch bên hoặc dipeptit hoặc tripeptit gồm axit amin chứa amin, hydroxyl, hoặc thiol mạch bên.

Khi sự alkyl hoá xảy ra thông qua nhóm amin của vùng đệm, sự alkyl hoá có thể xảy ra thông qua amin alpha của axit amin hoặc amin mạch bên. Trong trường hợp amin alpha được alkyl hoá, axit amin của vùng đệm có thể là axit amin bất kỳ. Ví dụ, axit amin của vùng đệm có thể là axit amin kỵ nước, ví dụ, Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Trp, Met, Phe, Tyr, axit 6-aminoheptanoic, axit 5-aminovaleric, axit 7-aminoheptanoic, và axit 8-aminooctanoic. Theo cách khác, axit amin của vùng đệm có thể là gốc có tính axit, ví dụ, Asp và Glu, với điều kiện là sự alkyl hoá xảy ra trên amin alpha của gốc có tính axit. Trong trường hợp amin mạch bên của axit amin của vùng đệm được alkyl

hoá, axit amin của vùng đệm là axit amin chứa amin mạch bên, ví dụ, axit amin có công thức I (ví dụ, Lys hoặc Orn). Trong trường hợp này, có thể là cả amin alpha và mạch bên amin của axit amin của vùng đệm đều được alkyl hoá, sao cho chất tương tự glucagon được alkyl hoá hai lần (có hai nhóm alkyl). Các phương án của sáng chế gồm các phân tử được alkyl hoá hai lần này.

Khi sự alkyl hoá xảy ra thông qua nhóm hydroxyl của vùng đệm, axit amin hoặc một trong số các axit amin của dipeptit hoặc tripeptit có thể là axit amin có công thức II. Theo phương án ví dụ cụ thể, axit amin là Ser.

Khi sự alkyl hoá xảy ra thông qua nhóm thiol của vùng đệm, axit amin hoặc một trong số các axit amin của dipeptit hoặc tripeptit có thể là axit amin có công thức III. Theo phương án ví dụ cụ thể, axit amin là Cys.

Theo một số phương án, vùng đệm là vùng đệm hai chức ưa nước. Theo phương án nhất định, vùng đệm hai chức ưa nước chứa hai hoặc nhiều hơn hai nhóm có tính phản ứng, ví dụ, amin, hydroxyl, thiol, và nhóm carboxyl hoặc các kết hợp bất kỳ của chúng. Theo phương án nhất định, vùng đệm hai chức ưa nước chứa nhóm hydroxyl và carboxylat. Theo phương án khác, vùng đệm hai chức ưa nước chứa nhóm amin và carboxylat. Theo phương án khác, vùng đệm hai chức ưa nước chứa nhóm thiol và carboxylat. Theo phương án cụ thể, vùng đệm chứa amino poly(alkyloxy)carboxylat. Liên quan đến vấn đề này, vùng đệm có thể chứa, ví dụ, $\text{NH}_2(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n(\text{CH}_2)_m\text{COOH}$, trong đó m là số nguyên bất kỳ từ 1 đến 6 và n là số nguyên bất kỳ từ 2 đến 12, như, ví dụ, axit 8-amino-3,6-dioxaoctanoic, có bán trên thị trường từ Peptide International, Inc. (Louisville, KY).

Theo một số phương án, vùng đệm là vùng đệm hai chức kỵ nước. Theo phương án nhất định, vùng đệm hai chức kỵ nước chứa hai hoặc nhiều hơn hai nhóm có tính phản ứng, ví dụ, amin, hydroxyl, thiol, và nhóm carboxyl hoặc các kết hợp bất kỳ của chúng. Theo phương án nhất định, vùng đệm hai chức kỵ nước chứa nhóm hydroxyl và carboxylat. Theo phương án khác, vùng đệm hai chức kỵ nước chứa nhóm amin và carboxylat. Theo phương án khác, vùng đệm hai chức kỵ nước chứa nhóm thiol và carboxylat. Vùng đệm hai chức kỵ nước thích hợp gồm carboxylat và nhóm hydroxyl hoặc nhóm thiol là đã biết trong lĩnh vực và gồm, ví dụ, axit 8-hydroxyoctanoic và axit 8-mercaptooctanoic.

Vùng đệm (ví dụ, axit amin, dipeptit, tripeptit, vùng đệm hai chức ưa nước, hoặc vùng đệm hai chức kỵ nước) theo phương án cụ thể có chiều dài từ 3 đến 10 nguyên tử (ví dụ, từ 6 đến 10 nguyên tử (ví dụ, 6, 7, 8, 9 hoặc 10 nguyên tử)). Theo phương án cụ thể hơn, vùng đệm có chiều dài khoảng từ 3 đến 10 nguyên tử (ví dụ, từ 6 đến 10 nguyên tử) và alkyl là nhóm C12 đến C18 alkyl, ví dụ, nhóm C14 alkyl, nhóm C16 alkyl, sao cho tổng chiều dài của vùng đệm và nhóm alkyl là từ 14 đến 28 nguyên tử, ví dụ, khoảng 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, hoặc 28 nguyên tử. Theo một số phương án, chiều dài của vùng đệm và alkyl là từ 17 đến 28 (ví dụ, từ 19 đến 26, từ 19 đến 21) nguyên tử.

Theo các phương án nêu trên, vùng đệm hai chức có thể là axit amin tổng hợp hoặc không có trong tự nhiên hoặc không được mã hoá chứa khung axit amin có chiều dài từ 3 đến 10 nguyên tử (ví dụ, axit 6-aminoheptanoic, axit 5-aminovaleric, axit 7-aminoheptanoic, và axit 8-aminooctanoic). Theo cách khác, vùng đệm có thể là vùng đệm dipeptit hoặc tripeptit có khung peptit có chiều dài từ 3 đến 10 nguyên tử (ví dụ, từ 6 đến 10 nguyên tử). Vùng đệm dipeptit hoặc tripeptit có thể là gồm axit amin có trong tự nhiên hoặc được mã hoá và/hoặc không được mã hoá hoặc không có trong tự nhiên, gồm, ví dụ, axit amin bất kỳ được nêu trong bản mô tả này. Theo một số phương án, vùng đệm có điện tích âm toàn phần, ví dụ, chứa một hoặc hai axit amin tích điện âm. Theo một số phương án, vùng đệm dipeptit được chọn từ nhóm gồm: Ala-Ala, β -Ala- β -Ala, Leu-Leu, Pro-Pro, axit γ -aminobutyric- axit γ -aminobutyric, và γ -Glu- γ -Glu.

Phương pháp alkyl hoá peptit thích hợp thông qua amin, hydroxyl, và thiol là đã biết trong lĩnh vực. Ví dụ, phương pháp tổng hợp ete Williamson có thể được sử dụng để tạo thành liên kết ete giữa nhóm hydroxyl của chất tương tự glucagon và nhóm alkyl. Ngoài ra, phản ứng thế ưa nhân của peptit với alkyl halogenua có thể tạo ra liên kết bất kỳ trong số ete, thioete, hoặc amino.

Nhóm alkyl của chất tương tự glucagon được alkyl hoá có thể có kích thước bất kỳ, ví dụ, chiều dài mạch cacbon bất kỳ, và có thể là mạch thẳng hoặc mạch nhánh. Theo một số phương án, nhóm alkyl là C4 đến C30 alkyl. Ví dụ, nhóm alkyl có thể là nhóm bất kỳ trong số C4 alkyl, C6 alkyl, C8 alkyl, C10 alkyl, C12 alkyl, C14 alkyl, C16 alkyl, C18 alkyl, C20 alkyl, C22 alkyl, C24 alkyl, C26 alkyl, C28 alkyl, hoặc C30

alkyl. Theo một số phương án, nhóm alkyl là C8 đến C20 alkyl, ví dụ, C14 alkyl hoặc C16 alkyl.

Theo một số phương án cụ thể, nhóm alkyl chứa gốc steroid của axit mật, ví dụ, axit cholic, axit chenodeoxycholic, axit deoxycholic, axit lithocholic, axit taurocholic, axit glycocholic, và axit cholesterol.

Theo một số phương án của sáng chế, chất tương tự glucagon chứa axit amin được alkyl hoá bằng cách cho alkan mạch dài, ưa nhân phản ứng với chất tương tự glucagon, trong đó chất tương tự glucagon chứa nhóm rời chuyển thích hợp cho sự thể ưa nhân. Theo các khía cạnh cụ thể, nhóm ưa nhân của alkan mạch dài chứa nhóm amin, hydroxyl, hoặc thiol (ví dụ, octadexylamin, tetradecanol, và hexadecanthiol). Nhóm rời chuyển của chất tương tự glucagon có thể là một phần của mạch bên của axit amin hoặc có thể là một phần của khung peptit. Nhóm rời chuyển thích hợp gồm, ví dụ, N-hydroxysuxinimit, halogen, và sulfonat este.

Theo phương án nhất định, chất tương tự glucagon được biến đổi để chứa nhóm alkyl bằng cách cho alkan mạch dài, ưa nhân phản ứng với vùng đệm được gắn vào chất tương tự glucagon, trong đó vùng đệm chứa nhóm rời chuyển. Theo các khía cạnh cụ thể, alkan mạch dài chứa nhóm amin, hydroxyl, hoặc thiol. Theo phương án nhất định, vùng đệm chứa nhóm rời chuyển có thể là vùng đệm bất kỳ được thảo luận trong bản mô tả này, ví dụ, axit amin, dipeptit, tripeptit, vùng đệm hai chức ưa nước và vùng đệm hai chức kỵ nước còn chứa nhóm rời chuyển thích hợp.

Liên quan đến các khía cạnh này theo sáng chế, trong đó alkan mạch dài được alkyl hoá bằng chất tương tự glucagon hoặc vùng đệm, alkan mạch dài có thể có kích thước bất kỳ và có thể có chiều dài mạch cacbon bất kỳ. Alkan mạch dài có thể là mạch thẳng hoặc mạch nhánh. Theo các khía cạnh này, alkan mạch dài là C4 đến C30 alkan. Ví dụ, alkan mạch dài có thể là mạch bất kỳ trong số C4 alkan, C6 alkan, C8 alkan, C10 alkan, C12 alkan, C14 alkan, C16 alkan, C18 alkan, C20 alkan, C22 alkan, C24 alkan, C26 alkan, C28 alkan, hoặc C30 alkan. Theo một số phương án, alkan mạch dài chứa C8 đến C20 alkan, ví dụ, C14 alkan, C16 alkan, hoặc C18 alkan.

Ngoài ra, theo một số phương án, sự alkyl hoá có thể xảy ra giữa chất tương tự glucagon và gốc cholesterol. Ví dụ, nhóm hydroxyl của cholesterol có thể thay thế

nhóm rời chuyển trên alkan mạch dài để tạo thành sản phẩm là chất tương tự cholesterol-glucagon.

Chất tương tự glucagon được alkyl hoá được nêu trong bản mô tả này có thể được biến đổi thêm để chứa gốc ưa nước. Theo một số phương án cụ thể, gốc ưa nước có thể chứa mạch polyetylen glycol (PEG). Sự kết hợp của gốc ưa nước có thể được thực hiện bằng phương thức thích hợp bất kỳ, như phương pháp bất kỳ được nêu trong bản mô tả này. Liên quan đến vấn đề này, chất tương tự glucagon được alkyl hoá có thể chứa SEQ ID NO: 1 được biến đổi gồm một hoặc nhiều cải biến axit amin được nêu trong bản mô tả này, trong đó ít nhất một trong số các axit amin ở vị trí 10, 20, 24 và 29 chứa nhóm alkyl và ít nhất một trong số các axit amin ở vị trí 16, 17, 21, 24 và 29, vị trí ở trong đoạn kéo dài đầu tận C hoặc axit amin đầu tận C được biến đổi thành Cys, Lys, Orn, homo-Cys, hoặc Ac-Phe, và mạch bên của axit amin được liên kết cộng hoá trị với gốc ưa nước (ví dụ, PEG). Theo một số phương án, nhóm alkyl được gắn vào vị trí 10, tùy ý thông qua vùng đệm chứa Cys, Lys, Orn, homo-Cys, hoặc Ac-Phe, và gốc ưa nước được kết hợp ở gốc Cys ở vị trí 24.

Theo cách khác, chất tương tự glucagon được alkyl hoá có thể chứa vùng đệm, trong đó vùng đệm được alkyl hoá và được biến đổi để chứa gốc ưa nước. Ví dụ không làm giới hạn sáng chế về vùng đệm thích hợp gồm vùng đệm chứa một hoặc nhiều axit amin được chọn từ nhóm gồm Cys, Lys, Orn, homo-Cys và Ac-Phe.

Làm ổn định xoắn alpha và axit amin tăng cường xoắn alpha

Không bị giới hạn bởi lý thuyết cụ thể bất kỳ, chất tương tự glucagon được nêu trong bản mô tả này chứa cấu trúc xoắn, ví dụ, xoắn alpha. Theo một số phương án, chất tương tự glucagon chứa axit amin làm ổn định cấu trúc xoắn alpha. Vì vậy, theo một số khía cạnh, chất tương tự glucagon chứa một hoặc nhiều axit amin tăng cường xoắn alpha. Trong bản mô tả này, thuật ngữ “axit amin tăng cường xoắn alpha” chỉ axit amin tạo ra độ ổn định tăng đối với xoắn alpha của chất tương tự glucagon mà nó là một phần của chất tương tự này. Axit amin tăng cường xoắn alpha là đã biết trong lĩnh vực. Xem tài liệu, ví dụ, Lyu et al., *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 88: 5317-5320 (1991); Branden & Tooze, *Introduction to Protein Structure*, Garland Publishing, New York, NY, 1991; Fasman, *Prediction of Protein Structure and Principles of Protein Conformation*, ed. Fasman, Plenum, NY, 1989). Axit amin tăng cường xoắn alpha

thích hợp nhằm đạt được mục đích nêu trong bản mô tả này bao gồm, nhưng không giới hạn ở: alanin, norvalin, norleuxin, axit alpha aminobutyric, axit alpha-aminoisobutyric, leuxin, isoleuxin, valin, và các axit amin tương tự. Theo một số phương án, axit amin tăng cường xoắn alpha là axit amin bất kỳ mà là một phần của xoắn alpha được tìm thấy trong protein có trong tự nhiên, ví dụ, Leu, Phe, Ala, Met, Gly, Ile, Ser, Asn, Glu, Asp, Lys, Arg.

Theo một số phương án, axit amin tăng cường xoắn alpha tạo ra độ ổn định đối với xoắn alpha lớn hơn so với glyxin hoặc alanin. Theo một số phương án, axit amin tăng cường xoắn alpha là axit amin được thế hai lần alpha, alpha.

Xoắn alpha: Vị trí của axit amin tăng cường xoắn alpha

Theo một số phương án, chất tương tự glucagon chứa trình tự axit amin tương tự với glucagon tự nhiên (SEQ ID NO: 1) và chất tương tự glucagon chứa ít nhất một axit amin tăng cường xoắn alpha. Theo một số phương án, axit amin tăng cường xoắn alpha được bố trí ở vị trí bất kỳ trong số các vị trí từ 12 đến 29 (theo cách đánh số của glucagon tự nhiên (SEQ ID NO: 1)). Theo một số phương án, chất tương tự glucagon chứa trình tự axit amin được biến đổi của SEQ ID NO: 1 và chứa ít nhất một axit amin tăng cường xoắn alpha, ví dụ, tại một hoặc nhiều vị trí 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29. Theo một số phương án, chất tương tự glucagon chứa axit amin tăng cường xoắn alpha tại một, hai, ba, hoặc tất cả các vị trí 16, 17, 20, và 21.

Xoắn alpha: Axit amin được thế hai lần alpha, alpha

Theo một số phương án, axit amin tăng cường xoắn alpha là axit amin được thế hai lần alpha, alpha. Theo các phương án cụ thể, axit amin được thế hai lần alpha, alpha chứa R^1 và R^2 , mỗi nhóm này liên kết với cacbon alpha, trong đó mỗi R^1 và R^2 được chọn độc lập từ nhóm gồm C1-C4 alkyl, tùy ý được thế bằng hydroxyl, amit, thiol, halo, hoặc R^1 và R^2 cùng với cacbon alpha mà chúng được gắn vào tạo thành vòng (ví dụ, vòng C3-C8). Theo một số phương án, mỗi R^1 và R^2 được chọn từ nhóm gồm: metyl, etyl, propyl, và n-butyl, hoặc R^1 và R^2 cùng nhau tạo thành xyclooctan hoặc xycloheptan (ví dụ, axit 1-aminoxyclooctan-1-carboxylic). Theo một số phương án, R^1 và R^2 là giống nhau. Theo một số phương án, R^1 khác R^2 . Theo các khía cạnh nhất định, mỗi trong số R^1 và R^2 là C1-C4 alkyl. Theo một số khía cạnh, mỗi trong số

R^1 và R^2 là C1 hoặc C2 alkyl. Theo một số phương án, mỗi trong số R^1 và R^2 là methyl, sao cho axit amin được thế hai lần alpha, alpha là axit alpha-aminoisobutyric (AIB).

Theo một số khía cạnh, chất tương tự glucagon được nêu trong bản mô tả này chứa một hoặc nhiều axit amin được thế hai lần alpha, alpha và chất tương tự glucagon cụ thể thiếu cầu nối nội phân tử cộng hoá trị (ví dụ, lactam), do axit amin được thế hai lần alpha, alpha có khả năng làm ổn định xoắn alpha khi vắng mặt cầu nối cộng hoá trị. Theo một số khía cạnh, chất tương tự glucagon chứa một hoặc nhiều axit amin được thế hai lần alpha, alpha ở đầu tận C (quanh các vị trí 12-29). Theo một số phương án, một, hai, ba, bốn hoặc nhiều hơn bốn vị trí trong số các vị trí 16, 17, 18, 19, 20, 21, 24, 28, hoặc 29 của chất tương tự glucagon được thế bằng axit amin được thế hai lần α , α , ví dụ, axit amin iso-butyric (AIB), axit amin được thế hai lần bằng các nhóm giống nhau hoặc khác nhau được chọn từ methyl, ethyl, propyl, và n-butyl, hoặc bằng xyclooctan hoặc xycloheptan (ví dụ, axit 1-aminoxyclooctan-1-carboxylic). Ví dụ, sự thế của vị trí 16 với AIB làm tăng cường hoạt tính GLP-1, khi vắng mặt cầu nối nội phân tử, ví dụ, cầu nối nội phân tử không cộng hoá trị (ví dụ, cầu muối) hoặc cầu nối nội phân tử cộng hoá trị (ví dụ, lactam). Theo một số phương án, một, hai, ba hoặc nhiều hơn ba vị trí trong số các vị trí 16, 20, 21 hoặc 24 được thế bằng AIB. Theo các phương án cụ thể, một hoặc cả hai axit amin tương ứng với vị trí 2, 16, của glucagon tự nhiên ở người (SEQ ID NO: 1) được thế bằng axit amin được thế hai lần alpha, alpha như AIB.

Theo một số phương án, chất tương tự glucagon thiếu cầu nối nội phân tử chứa một hoặc nhiều sự thế bên trong vị trí axit amin 12-29 bằng axit amin được thế hai lần α , α và nhóm axyl hoặc alkyl được gắn cộng hoá trị vào mạch bên của axit amin ở vị trí 10 của chất tương tự glucagon. Theo các phương án cụ thể, nhóm axyl hoặc alkyl không phải là axit amin có trong tự nhiên. Theo các khía cạnh này, nhóm axyl hoặc alkyl không phải là tự nhiên đối với axit amin ở vị trí 10. Peptit glucagon thiếu cầu nối nội phân tử được axyl hoá hoặc được alkyl hoá này làm tăng cường hoạt tính ở các thụ thể GLP-1 và glucagon so với peptit đối chiếu không được axyl hoá. Sự tăng cường hơn nữa hoạt tính ở các thụ thể GLP-1 và glucagon có thể đạt được bằng peptit glucagon thiếu cầu nối nội phân tử được axyl hoá bằng cách kết hợp vùng đệm giữa nhóm axyl hoặc alkyl và mạch bên của axit amin ở vị trí 10 của chất tương tự. Sự axyl

hoá và alkyl hoá, kết hợp hoặc không kết hợp vùng đệm, được nêu thêm trong bản mô tả này.

Xoắn alpha: Cầu nối nội phân tử

Theo một số phương án, axit amin tăng cường xoắn alpha là axit amin được liên kết với axit amin khác của chất tương tự glucagon qua cầu nối nội phân tử. Theo các phương án này, mỗi axit amin trong số hai axit amin được liên kết qua cầu nối nội phân tử này được coi là axit amin tăng cường xoắn alpha. Theo một số phương án, chất tương tự glucagon chứa một hoặc hai cầu nối nội phân tử. Theo một số phương án cụ thể, chất tương tự glucagon chứa một cầu nối nội phân tử ở dạng hỗn hợp với ít nhất một axit amin tăng cường xoắn alpha khác, ví dụ, axit amin được thế hai lần alpha, alpha.

Theo một số phương án, cầu nối nội phân tử là cầu mà nối hai phần của chất tương tự glucagon thông qua liên kết không cộng hóa trị, gồm, ví dụ, tương tác van der Waals, liên kết hydro, liên kết ion, tương tác kỵ nước, tương tác lưỡng cực-lưỡng cực, và tương tự. Liên quan đến vấn đề này, chất tương tự glucagon theo các khía cạnh nhất định chứa cầu nối nội phân tử không cộng hóa trị. Theo một số phương án, cầu nối nội phân tử không cộng hóa trị là cầu muối.

Theo một số phương án, cầu nối nội phân tử là cầu mà nối hai phần của chất tương tự qua liên kết cộng hóa trị. Liên quan đến vấn đề này, chất tương tự glucagon theo các khía cạnh nhất định chứa cầu nối nội phân tử cộng hóa trị.

Theo một số phương án, cầu nối nội phân tử (ví dụ, cầu nối nội phân tử không cộng hóa trị, cầu nối nội phân tử cộng hóa trị) được tạo thành giữa hai axit amin mà cách nhau 3 axit amin, ví dụ, axit amin ở vị trí i và $i+4$, trong đó i là số nguyên bất kỳ nằm trong khoảng từ 12 đến 25 (ví dụ, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 và 25). Cụ thể hơn, mạch bên của các cặp axit amin 12 và 16, 16 và 20, 20 và 24 hoặc 24 và 28 (các cặp axit amin trong đó $i = 12, 16, 20$, hoặc 24) được liên kết với nhau và như vậy làm ổn định glucagon xoắn alpha. Theo cách khác, i có thể là 17. Theo một số phương án cụ thể, chất tương tự glucagon chứa cầu nối nội phân tử giữa các axit amin 17 và 21. Theo một số phương án cụ thể, chất tương tự glucagon chứa cầu nối nội phân tử giữa các axit amin ở vị trí 16 và 20 hoặc 12 và 16 và cầu nối nội phân tử thứ hai giữa các axit amin ở vị trí 17 và 21. Chất tương tự glucagon chứa một hoặc nhiều

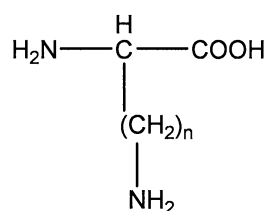
cầu nối nội phân tử được nêu trong bản mô tả này. Theo các phương án cụ thể, trong đó các axit amin ở vị trí i và $i+4$ được kết hợp bằng cầu nối nội phân tử, kích thước của liên kết là khoảng 8 nguyên tử, hoặc khoảng 7-9 nguyên tử.

Theo phương án khác, cầu nối nội phân tử được tạo thành giữa hai axit amin mà cách nhau hai axit amin, ví dụ, axit amin ở vị trí j và $j+3$, trong đó j là số nguyên bất kỳ nằm trong khoảng từ 12 đến 26 (ví dụ, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 và 26). Theo một số phương án cụ thể, j là 17. Theo các phương án cụ thể, trong đó axit amin ở vị trí j và $j+3$ được kết hợp bằng cầu nối nội phân tử, kích thước của liên kết là khoảng 6 nguyên tử, hoặc khoảng 5 đến 7 nguyên tử.

Theo các phương án khác nữa, cầu nối nội phân tử được tạo thành giữa hai axit amin mà cách nhau 6 axit amin, ví dụ, axit amin ở vị trí k và $k+7$, trong đó k là số nguyên bất kỳ nằm trong khoảng từ 12 đến 22 (ví dụ, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 và 22). Theo một số phương án cụ thể, k là 12, 13 hoặc 17. Theo phương án ví dụ, k là 17.

Xoắn alpha: Axit amin tham gia vào cầu nối nội phân tử

Ví dụ về cặp axit amin có khả năng liên kết (cộng hoá trị hoặc không cộng hoá trị) để tạo thành cầu liên kết sáu nguyên tử gồm Orn và Asp, Glu và axit amin có công thức I, trong đó n là 2, và axit homoglutamic và axit amin có công thức I, trong đó n là 1, trong đó Công thức I là:



trong đó $n = 1$ đến 4

[Công thức I]

Ví dụ về cặp axit amin mà có khả năng liên kết để tạo thành cầu liên kết bảy nguyên tử gồm Orn-Glu (vòng lactam); Lys-Asp (lactam); hoặc Homoser-Homoglu (lacton). Ví dụ về cặp axit amin mà có thể tạo thành vùng liên kết tám nguyên tử gồm Lys-Glu (lactam); Homolys-Asp (lactam); Orn-Homoglu (lactam); 4-aminoPhe-Asp (lactam); hoặc Tyr-Asp (lacton). Ví dụ về cặp axit amin mà có thể tạo thành vùng liên

kết chín nguyên tử gồm Homolys-Glu (lactam); Lys-Homoglu (lactam); 4-aminoPhe-Glu (lactam); hoặc Tyr-Glu (lacton). Mạch bên bất kỳ trên các axit amin này có thể được thể thêm bằng nhóm hóa học khác, miễn là cấu trúc ba chiều của xoắn alpha không bị phá vỡ. Người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này có thể dự tính các ghép cặp khác hoặc các chất tương tự axit amin khác, gồm các dẫn xuất được biến đổi hóa học, mà sẽ tạo ra cấu trúc làm ổn định có kích thước tương tự và tác dụng mong muốn. Ví dụ, cầu disulfua homoxystein-homoxystein có chiều dài 6 nguyên tử và có thể được biến đổi thêm để thu được tác dụng mong muốn.

Ngay cả khi không có liên kết cộng hoá trị, các cặp axit amin nêu trên (hoặc các ghép cặp tương tự mà người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này có thể dự tính) có thể còn mang lại độ ổn định được bổ sung cho xoắn alpha thông qua liên kết không cộng hoá trị, ví dụ, bằng cách tạo thành cầu muối hoặc tương tác liên kết hydro. Theo đó, cầu muối có thể được tạo thành giữa: Orn và Glu; Lys và Asp; Homo-serin và Homo-glutamat; Lys và Glu; Asp và Arg; Homo-Lys và Asp; Orn và Homo-Glutamat; 4-aminoPhe và Asp; Tyr và Asp; Homo-Lys và Glu; Lys và Homo-Glu; 4-aminoPhe và Glu; hoặc Tyr và Glu. Theo một số phương án, chất tương tự chứa cầu muối nằm giữa các cặp bất kỳ trong số các cặp axit amin sau đây: Orn và Glu; Lys và Asp; Lys và Glu; Asp và Arg; Homo-Lys và Asp; Orn và Homo-Glutamat; Homo-Lys và Glu; và Lys và Homo-Glu. Cầu muối có thể được tạo thành giữa các cặp khác của các mạch bên tích điện trái dấu. Xem tài liệu, ví dụ, Kallenbach et al., *Role of the Peptide Bond in Protein Structure and Folding*, in *The Amide Linkage: Structural Significance in Chemistry, Biochemistry, and Materials Science*, John Wiley & Sons, Inc. (2000).

Theo một số phương án, cầu nối nội phân tử không cộng hoá trị là cầu kỵ nước. Theo một phương án, xoắn alpha của chất tương tự được làm ổn định thông qua sự kết hợp của axit amin kỵ nước ở vị trí j và $j+3$ hoặc i và $i+4$. Ví dụ, i có thể là Tyr và $i+4$ có thể là Val hoặc Leu; i có thể là Phe và $i+4$ có thể là Met; hoặc i có thể là Phe và $i+4$ có thể là Ile. Cần hiểu rằng, nhằm đạt được mục đích nêu trong bản mô tả này, cặp axit amin nêu trên có thể được đảo ngược, sao cho axit amin được chỉ ra ở vị trí i có thể theo cách khác được bố trí ở $i+4$, trong khi axit amin $i+4$ có thể được bố trí ở vị trí i . Cũng cần hiểu rằng cặp axit amin thích hợp có thể được tạo thành đối với j và $j+3$.

Xoắn alpha: Cầu nối nội phân tử cộng hoá trị

Theo một số phương án, cầu nối nội phân tử cộng hoá trị là vòng lactam hoặc cầu lactam. Kích thước của vòng lactam có thể thay đổi tùy thuộc vào chiều dài của mạch bên axit amin, và theo một phương án, lactam được tạo thành bằng cách liên kết mạch bên của ornithin với mạch bên axit aspartic. Cầu lactam và phương pháp tạo ra chúng là đã biết trong lĩnh vực. Xem tài liệu, ví dụ, Houston, Jr., et al., *J Peptide Sci* 1: 274-282 (2004), và Ví dụ 1 trong bản mô tả này. Theo một số phương án, chất tương tự chứa trình tự được biến đổi của SEQ ID NO: 1 và cầu lactam nằm giữa i và $i+4$, trong đó i là như được xác định ở trên. Theo một số phương án, chất tương tự glucagon chứa hai cầu lactam: một cầu nằm giữa các axit amin ở vị trí 16 và 20 và cầu còn lại nằm giữa các axit amin ở vị trí 17 và 21. Theo một số phương án, chất tương tự glucagon chứa một cầu lactam và một cầu muối. Phương án ví dụ khác, được nêu trong bản mô tả này trong phần “Ví dụ thực hiện sáng chế”. Phương án ví dụ khác bao gồm các ghép cặp sau đây, tùy ý với cầu lactam: Glu ở vị trí 12 với Lys ở vị trí 16; Lys tự nhiên ở vị trí 12 với Glu ở vị trí 16; Glu ở vị trí 16 với Lys ở vị trí 20; Lys ở vị trí 16 với Glu ở vị trí 20; Glu ở vị trí 20 với Lys ở vị trí 24; Lys ở vị trí 20 với Glu ở vị trí 24; Glu ở vị trí 24 với Lys ở vị trí 28; Lys ở vị trí 24 với Glu ở vị trí 28.

Theo một số phương án, cầu nối nội phân tử cộng hoá trị là lacton. Phương pháp thích hợp sản xuất cầu lacton là đã biết trong lĩnh vực. Xem tài liệu, ví dụ, Sheehan et al., *J Am Chem Soc* 95: 875-879 (1973).

Theo một số khía cạnh, sự trao đổi olefin được sử dụng để liên kết ngang một hoặc hai vòng của xoắn alpha của chất tương tự bằng cách sử dụng hệ liên kết ngang hoàn toàn là hydrocacbon. Chất tương tự glucagon trong trường hợp này chứa axit amin được α -metyl hoá mang mạch bên olefin có chiều dài thay đổi và được thiết kế cấu trúc với cấu hình hoá học lập thể R hoặc S ở vị trí j và $j+3$ hoặc i và $i+4$. Theo một số phương án, mạch bên olefin chứa $(CH_2)_n$, trong đó n là số nguyên bất kỳ nằm trong khoảng từ 1 đến 6. Theo một số phương án, n là 3 đối với chiều dài liên kết ngang là 8 nguyên tử. Theo một số phương án, n là 2 đối với chiều dài liên kết ngang là 6 nguyên tử. Ví dụ về chất tương tự glucagon gồm liên kết ngang olefin được nêu trong bản mô tả này dưới dạng SEQ ID NO: 17. Phương pháp thích hợp tạo ra cầu nối nội phân tử là đã biết trong lĩnh vực. Xem tài liệu, ví dụ, Schafmeister et al., *J. Am. Chem. Soc.* 122: 5891-5892 (2000) và Walensky et al., *Science* 305: 1466-1470 (2004). Theo các

phương án khác, chất tương tự chứa gốc *O*-allyl Ser được bố trí trên các vòng xoắn liên kề, mà được bắc cầu cùng nhau thông qua sự trao đổi đóng vòng được xúc tác bằng ruteni. Các trình tự của phản ứng liên kết ngang được nêu trong tài liệu, ví dụ, Blackwell et al., *Angew. Chem., Int. Ed.* 37: 3281-3284 (1998).

Theo các khía cạnh cụ thể, việc sử dụng axit thio-dialanin amin không tự nhiên, lanthionin, mà đã được chấp nhận rộng rãi là giả peptit của xystin, được sử dụng để liên kết ngang một vòng của xoắn alpha. Phương pháp tạo vòng dựa trên lanthionin thích hợp là đã biết trong lĩnh vực. Xem, ví dụ, Matteucci et al., *Tetrahedron Letters* 45: 1399-1401 (2004); Mayer et al., *J. Peptide Res.* 51: 432-436 (1998); Polinsky et al., *J. Med. Chem.* 35: 4185-4194 (1992); Osapay et al., *J. Med. Chem.* 40: 2241-2251 (1997); Fukase et al., *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 65: 2227-2240 (1992); Harpp et al., *J. Org. Chem.* 36: 73-80 (1971); Goodman and Shao, *Pure Appl. Chem.* 68: 1303-1308 (1996); và Osapay and Goodman, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1599-1600 (1993).

Theo một số phương án, mạch α , ω -diaminoalkan, ví dụ, 1,4-diaminopropan và 1,5-diaminopentan) giữa hai gốc Glu ở vị trí *i* và *i* +7 được sử dụng để làm ổn định xoắn alpha của chất tương tự. Các mạch này dẫn đến sự tạo thành cầu có chiều dài 9 nguyên tử hoặc dài hơn, tùy thuộc vào chiều dài của mạch diaminoalkan. Phương pháp thích hợp để sản xuất peptit được liên kết ngang với mạch này là đã biết trong lĩnh vực. Xem tài liệu, ví dụ, Phelan et al., *J. Am. Chem. Soc.* 119: 455-460 (1997).

Theo các phương án khác nữa, cầu disulfua được sử dụng để liên kết ngang một hoặc hai vòng của xoắn alpha của chất tương tự. Theo cách khác, cầu disulfua được biến đổi trong đó một hoặc cả hai nguyên tử lưu huỳnh được thay thế bằng nhóm metylen dẫn đến sự tạo vòng lớn cùng vị trí được sử dụng để làm ổn định xoắn alpha của chất tương tự. Phương pháp cải biến peptit thích hợp bằng cầu disulfua hoặc sự tạo vòng dựa trên lưu huỳnh được nêu trong tài liệu, ví dụ, Jackson et al., *J. Am. Chem. Soc.* 113: 9391-9392 (1991) và Rudinger and Jost, *Experientia* 20: 570-571 (1964).

Theo các phương án khác nữa, xoắn alpha của chất tương tự được làm ổn định thông qua liên kết của nguyên tử kim loại bằng hai gốc His hoặc cặp His và Cys được bố trí ở *j* và *j*+3, hoặc *i* và *i* +4. Nguyên tử kim loại có thể là, ví dụ, Ru(III), Cu(II), Zn(II) hoặc Cd(II). Phương pháp làm ổn định xoắn alpha dựa trên liên kết kim loại này là đã biết trong lĩnh vực. Xem tài liệu, ví dụ, Andrews and Tabor, *Tetrahedron* 55:

11711-11743 (1999); Ghadiri et al., *J. Am. Chem. Soc.* 112: 1630-1632 (1990); và Ghadiri et al., *J. Am. Chem. Soc.* 119: 9063-9064 (1997).

Theo cách khác, xoắn alpha của chất tương tự có thể được làm ổn định bằng phương pháp tạo vòng peptit khác, các phương pháp này được nêu trong tài liệu Davies, J. *Peptide. Sci.* 9: 471-501 (2003). Xoắn alpha có thể được làm ổn định bằng cách tạo thành cầu amit, cầu thioete, cầu thioeste, cầu ure, cầu cacbamat, cầu sulfonamit, và các cầu tương tự. Ví dụ, cầu thioeste có thể được tạo thành giữa đầu tận C và mạch bên của gốc Cys. Theo cách khác, thioeste có thể được tạo thành qua mạch bên của axit amin có thiol (Cys) và axit carboxylic (ví dụ, Asp, Glu). Theo phương pháp khác, chất liên kết ngang, như axit dicarboxylic, ví dụ, axit suberic (axit octandioic), v.v. có thể đưa liên kết vào giữa hai nhóm chức của mạch bên axit amin, như nhóm amino tự do, hydroxyl, thiol và các kết hợp của chúng.

Peptit kháng DPP-IV

Theo một số phương án, chất tương tự glucagon chứa, ở vị trí 1 hoặc 2, hoặc ở cả hai vị trí 1 và 2, axit amin mà đạt được tính kháng đối với sự phân cắt dipeptidyl peptidaza IV (DPP IV) của chất tương tự glucagon. Theo một số phương án, chất tương tự glucagon chứa axit amin ở vị trí 1 được chọn từ nhóm gồm: D-histidin, desaminohistidin, hydroxyl-histidin, axetyl-histidin, homo-histidin, N-metyl histidin, alpha-metyl histidin, axit imidazol axetic, hoặc axit alpha, alpha-dimetyl imidiazol axetic (DMIA). Theo một số phương án, chất tương tự glucagon chứa axit amin ở vị trí 2 được chọn từ nhóm gồm: D-serin, D-alanin, valin, glyxin, N-metyl serin, N-metyl alanin, hoặc alpha, axit aminoisobutyric. Theo một số phương án, chất tương tự glucagon chứa, ở vị trí 2, axit amin mà đạt được tính kháng đối với DPP IV của chất tương tự glucagon và axit amin mà đạt được tính kháng đối với DPP IV của chất tương tự glucagon không phải là D-serin.

Theo một số khía cạnh, chất tương tự glucagon chứa axit amin mà đạt được tính kháng đối với DPP IV của chất tương tự glucagon còn chứa phần cải biến axit amin mà làm ổn định xoắn alpha được tìm thấy ở phần đầu tận C của glucagon, ví dụ, thông qua liên kết cộng hóa trị giữa các axit amin ở vị trí "i" và "i+4", ví dụ, 12 và 16, 16 và 20, hoặc 20 và 24. Theo một số phương án, liên kết cộng hóa trị này là cầu lactam giữa axit glutamic ở vị trí 16 và lysin ở vị trí 20. Theo một số phương án, liên kết cộng hóa

trị này là cầu nối nội phân tử không phải là cầu lactam. Ví dụ, phương pháp liên kết cộng hóa trị thích hợp gồm một hoặc nhiều phương pháp bất kỳ trong số phương pháp hoán vị olefin, tạo vòng dựa trên lanthionin, cầu disulfua hoặc sự tạo thành cầu chứa lưu huỳnh được biến đổi, sử dụng mạch α , ω -diaminoalkan, tạo thành cầu nối nguyên tử kim loại, và phương pháp tạo vòng peptit khác.

Sự cải biến vị trí 1

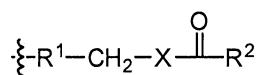
Theo một số phương án cụ thể, chất tương tự glucagon chứa (a) sự thể axit amin của His ở vị trí 1 bằng axit amin thơm, lớn và (b) cầu nối nội phân tử làm ổn định xoắn alpha trong phần đầu tận C của phân tử (ví dụ, quanh các vị trí 12-29). Theo các phương án cụ thể, axit amin ở vị trí 1 được thể bằng Tyr, Phe, Trp, amino-Phe, nitro-Phe, clo-Phe, sulfo-Phe, 4-pyridyl-Ala, metyl-Tyr, hoặc 3-amino Tyr. Cầu nối nội phân tử, theo một số phương án, là cầu bất kỳ được nêu trong bản mô tả này. Theo một số khía cạnh, cầu nối nội phân tử nằm giữa các mạch bên của hai axit amin mà được tách riêng bằng ba axit amin xen kẽ, tức là, nằm giữa mạch bên của axit amin i và $i+4$. Theo một số phương án, cầu nối nội phân tử là cầu lactam. Theo một số phương án, chất tương tự glucagon chứa axit amin thơm, lớn ở vị trí 1 và cầu lactam giữa các axit amin ở vị trí 16 và 20 của chất tương tự. Chất tương tự glucagon theo một số khía cạnh còn chứa một hoặc nhiều (ví dụ, hai, ba, bốn, năm hoặc nhiều hơn) cải biến khác được nêu trong bản mô tả này. Ví dụ, chất tương tự glucagon có thể chứa amit thay cho carboxylat đầu tận C. Ngoài ra, theo một số phương án, chất tương tự glucagon này còn chứa một hoặc nhiều axit amin béo, lớn ở vị trí 17, imidazol chứa axit amin ở vị trí 18, và axit amin tích điện dương ở vị trí 19. Theo một số phương án, chất tương tự glucagon gồm sự cải biến ở vị trí 1 và cầu nối nội phân tử còn chứa trình tự axit amin Ile-His-Gln ở vị trí 17-19. Cải biến này có thể được tạo ra mà không làm mất hoạt tính của chất tương tự glucagon ở thụ thể GLP-1 và thụ thể glucagon. Theo một số phương án, chất tương tự glucagon chứa thêm gốc axit amin được axyl hoá hoặc được alkyl hoá.

Cải biến vị trí 3

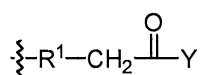
Theo một số phương án, axit amin thứ ba được nêu trong SEQ ID NO: 1 (Gln3) được thể bằng gốc axit amin có tính axit, tính bazơ, hoặc kỵ nước và sự cải biến này làm giảm hoạt tính thụ thể glucagon. Theo một số phương án, axit amin có tính axit,

tính bazơ, hoặc kỵ nước là axit glutamic, ornithin, norleuxin. Theo một số khía cạnh, sự cải biến với một trong số các gốc này làm cho chất tương tự glucagon có hoạt tính thụ thể glucagon về cơ bản bị giảm hoặc bị triệt tiêu. Chất tương tự glucagon mà được thể bằng, ví dụ, axit glutamic, ornithin, hoặc norleuxin theo một số khía cạnh có hoạt tính của glucagon tự nhiên ở thụ thể glucagon bằng khoảng 10% hoặc nhỏ hơn, ví dụ, khoảng 1-10%, hoặc khoảng 0,1-10%, hoặc lớn hơn khoảng 0,1% nhưng nhỏ hơn khoảng 10%, trong khi có hoạt tính của GLP-1 ở thụ thể GLP-1 bằng ít nhất 20%. Theo một số phương án, chất tương tự glucagon có hoạt tính của glucagon tự nhiên bằng khoảng 0,5%, khoảng 1% hoặc khoảng 7%, trong khi có hoạt tính của GLP-1 bằng ít nhất 20% ở thụ thể GLP-1.

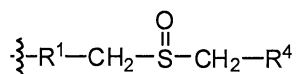
Theo một số phương án, glutamin ở vị trí 3 của SEQ ID NO: 1 của chất tương tự glucagon được thể bằng chất tương tự glutamin mà không bị mất đáng kể hoạt tính ở thụ thể glucagon, và trong một số trường hợp, có sự tăng cường của hoạt tính thụ thể glucagon. Theo một số phương án, chất tương tự glutamin là axit amin có trong tự nhiên hoặc không có trong tự nhiên hoặc không được mã hoá chứa mạch bên có cấu trúc I, II hoặc III:



Cấu trúc I



Cấu trúc II



Cấu trúc III

trong đó R¹ là C₀₋₃ alkyl hoặc C₀₋₃ heteroalkyl; R² là NHR⁴ hoặc C₁₋₃ alkyl; R³ là C₁₋₃ alkyl; R⁴ là H hoặc C₁₋₃ alkyl; X là NH, O, hoặc S; và Y là NHR⁴, SR³, hoặc OR³. Theo một số phương án, X là NH hoặc Y là NHR⁴. Theo một số phương án, R¹ là C₀₋₂ alkyl hoặc C₁ heteroalkyl. Theo một số phương án, R² là NHR⁴ hoặc C₁ alkyl. Theo một số phương án, R⁴ là H hoặc C¹ alkyl. Theo các phương án ví dụ, axit amin chứa mạch bên có cấu trúc I được đề xuất trong đó, R¹ là CH₂-S, X là NH, và R² là

CH₃ (axetamidometyl-xystein, C(Acm)); R¹ là CH₂, X là NH, và R² là CH₃ (axit axetyldiaminobutanoic, Dab(Ac)); R¹ là C₀ alkyl, X là NH, R² là NHR⁴, và R⁴ là H (axit carbamoyldiaminopropanoic, Dap(ure)); hoặc R¹ là CH₂-CH₂, X là NH, và R² là CH₃ (axetylornithin, Orn(Ac)). Theo các phương án ví dụ, axit amin chứa mạch bên có cấu trúc II được đề xuất trong đó, R¹ là CH₂, Y là NHR⁴, và R⁴ là CH₃ (metylglutamin, Q(Me)); Theo các phương án ví dụ, axit amin chứa mạch bên có cấu trúc III được đề xuất trong đó, R¹ là CH₂ và R⁴ là H (methionin-sulfoxit, M(O)); Theo các phương án cụ thể, axit amin ở vị trí 3 được thế bằng Dab(Ac). Ví dụ, các chất chủ vận glucagon có thể chứa trình tự axit amin được biến đổi của SEQ ID NO: 595, SEQ ID NO: 601, SEQ ID NO: 603, SEQ ID NO: 604, SEQ ID NO: 605 và SEQ ID NO: 606 của danh mục trình tự của đơn sáng chế quốc tế số PCT/US2009/047438, nộp ngày 16 tháng 6 năm 2009, được kết hợp vào bản mô tả bằng cách viện dẫn, trong đó các trình tự axit amin được biến đổi như được nêu trong bản mô tả này, ví dụ, được biến đổi để chứa ít nhất ba axit amin tăng cường xoắn alpha, được biến đổi để chứa (i) axit amin được axyl hoá hoặc được alkyl hoá ở vị trí 10, (ii) axit amin tăng cường xoắn alpha ở vị trí 16, (iii) axit amin béo ở vị trí 17 và/hoặc 18, và (iv) ít nhất một axit amin tích điện được bố trí từ đầu tận C đến vị trí 27, và, tùy ý, được cải biến thêm; được biến đổi để chứa ít nhất ba axit amin của các axit amin 18-24 của Exendin-4 (SEQ ID NO: 8) ở vị trí tương ứng của chất tương tự glucagon.

Cải biến vị trí 7

Theo một số phương án, chất tương tự glucagon chứa SEQ ID NO: 1 được biến đổi với sự cải biến axit amin ở vị trí 7. Theo một số khía cạnh, axit amin ở vị trí 7 của SEQ ID NO: 1 (Thr) được thế bằng axit amin béo, lớn, ví dụ, Ile, Leu, Ala, và các axit amin tương tự. Cải biến này được tin là làm giảm mạnh hoạt tính ở thụ thể GLP-1 của chất tương tự glucagon.

Cải biến vị trí 15

Theo một số phương án, chất tương tự glucagon chứa SEQ ID NO: 1 được biến đổi với sự cải biến axit amin ở vị trí 15 giúp cải thiện độ ổn định. Theo một số khía cạnh, axit amin ở vị trí 15 của SEQ ID NO: 1 được xóa hoặc được thế bằng axit glutamic, axit homoglutamic, axit xysteic hoặc axit homoxysteic. Cải biến này làm giảm quá trình phân hủy hoặc sự phân cắt của chất tương tự theo thời gian, đặc biệt là

trong chất đậm có tính axit hoặc có tính kiềm, ví dụ, chất đậm ở pH nằm trong khoảng từ 5,5 đến 8. Theo một số phương án, chất tương tự glucagon chứa cải biến này giữ lại ít nhất 75%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% chất tương tự ban đầu sau 24 giờ ở 25°C.

Cải biến vị trí 16

Theo một phương án, chất tương tự của glucagon được đề xuất làm tăng cường hiệu lực và tùy ý cải thiện khả năng hòa tan và độ ổn định. Theo một phương án, hiệu lực glucagon và GLP-1 được tăng cường được tạo ra nhờ sự cải biến axit amin ở vị trí 16 của glucagon tự nhiên (SEQ ID NO: 1). Ví dụ không làm giới hạn sáng chế là, hiệu lực được tăng cường này có thể được tạo ra bằng cách thay thế serin có trong tự nhiên ở vị trí 16 bằng axit glutamic hoặc bằng axit amin tích điện âm khác có mạch bên có chiều dài là 4 nguyên tử, hoặc theo cách khác bằng axit amin bất kỳ trong số glutamin, axit homoglutamic, hoặc axit homoxysteic, hoặc axit amin tích điện có mạch bên chứa ít nhất một nguyên tử khác loại (ví dụ, N, O, S, P) và có chiều dài mạch bên là khoảng 4 (hoặc 3-5) nguyên tử. Theo một số phương án, chất tương tự glucagon chứa SEQ ID NO: 1 được biến đổi có Ser ở vị trí 16 được thế bằng axit amin được chọn từ nhóm gồm axit glutamic, glutamin, axit homoglutamic, axit homoxysteic, threonin hoặc glyxin. Theo một số khía cạnh, gốc serin ở vị trí 16 được thế bằng axit amin được chọn từ nhóm gồm axit glutamic, glutamin, axit homoglutamic và axit homoxysteic. Theo một số khía cạnh cụ thể, gốc serin ở vị trí 16 được thế bằng axit glutamic hoặc phần thế bảo toàn của chúng (ví dụ axit amin Exendin-4).

Theo các phương án khác, chất tương tự glucagon chứa trình tự được biến đổi của SEQ ID NO: 1 được biến đổi bằng cách thế Ser ở vị trí 16 bằng Thr hoặc AIB hoặc axit amin tăng cường xoắn alpha khác như nêu trên. Theo một số phương án, axit amin tăng cường xoắn alpha tạo thành cầu nối nội phân tử không cộng hoá trị với axit amin ở $j+3$ hoặc $i+4$.

Cải biến ở vị trí 17-18

Theo một số phương án, chất tương tự glucagon chứa SEQ ID NO: 1 được biến đổi trong đó vị trí Arg-Arg điaxit (dibasic) ở vị trí 17 và 18 bị loại bỏ. Không bị giới hạn bởi lý thuyết cụ thể bất kỳ, tin rằng sự loại bỏ vị trí điaxit theo một số phương án sẽ cải thiện hiệu quả *in vivo* của chất tương tự glucagon. Theo một số khía cạnh, chất

tương tự glucagon được biến đổi trong trường hợp này bằng cách thay thế một hoặc cả hai axit amin ở vị trí 17 và 18 của SEQ ID NO: 1 bằng axit amin không có tính bazơ, ví dụ, bằng axit amin béo. Theo một số phương án, một trong số các axit amin ở vị trí 17 hoặc 18 được xóa hoặc axit amin được cài xen vào giữa vị trí 17 và 18. Theo một số phương án, Arg ở vị trí 17 được thế bằng axit amin khác như nêu trong bản mô tả này, ví dụ, Gln, axit amin chứa gốc ưa nước, axit amin tăng cường xoắn alpha. Theo một số phương án, axit amin tăng cường xoắn alpha tạo thành cầu nối nội phân tử không cộng hoá trị với axit amin ở $j+3$ hoặc $i+4$. Theo một số phương án, Arg ở vị trí 18 được thế bằng axit amin khác như nêu trong bản mô tả này. Theo các khía cạnh ví dụ, axit amin ở vị trí 18 là axit amin được thế hai lần alpha, alpha, ví dụ, AIB. Theo một số khía cạnh, axit amin ở vị trí 18 là axit amin béo, nhỏ, ví dụ, Ala. Theo một số khía cạnh cụ thể, axit amin ở vị trí 18 là axit amin béo, nhỏ, ví dụ, Ala, và Arg ở vị trí 17 vẫn không bị biến đổi.

Cải biến vị trí 20

Hoạt tính được tăng cường ở thụ thể GLP-1 còn được tạo ra bằng sự cải biến axit amin ở vị trí 20. Theo một số phương án, glutamin ở vị trí 20 được thay thế bằng axit amin tăng cường xoắn alpha, ví dụ AIB, như nêu trên. Theo một số phương án, axit amin tăng cường xoắn alpha tạo thành cầu nối nội phân tử không cộng hoá trị với axit amin ở $j-3$ hoặc $i-4$. Theo một số phương án cụ thể, axit amin là axit amin ưa nước có mạch bên hoặc được tích điện hoặc có khả năng liên kết hydro, và có chiều dài ít nhất là khoảng 5 (hoặc khoảng 4-6) nguyên tử, ví dụ, lysin, xitruclin, arginin, hoặc ornithin, và tùy ý tạo nên cầu muối với axit amin tăng xoắn alpha khác ở vị trí 16, ví dụ axit amin tích điện âm. Cải biến này theo một số khía cạnh cụ thể làm giảm quá trình phân hủy mà xảy ra thông qua sự khử amin của Gln và theo một số phương án, làm tăng hoạt tính của chất tương tự glucagon ở thụ thể GLP-1. Theo một số khía cạnh, axit amin ở vị trí 20 là Glu hoặc Lys hoặc AIB.

Cải biến ở vị trí 21, 23, 24, và 28

Theo một số phương án, vị trí 21 và/hoặc vị trí 24 được biến đổi bằng cách thế bằng axit amin tăng cường xoắn alpha. Theo một số phương án, axit amin tăng cường xoắn alpha tạo thành cầu nối nội phân tử không cộng hoá trị với axit amin ở $j-3$ hoặc $i-4$. Theo một số khía cạnh, axit amin tăng cường xoắn alpha là AIB.

Theo các phương án ví dụ, axit amin ở vị trí 23 là Ile.

Theo các khía cạnh ví dụ, axit amin ở vị trí 28 là axit amin được thế hai lần alpha, alpha, ví dụ, AIB.

Đầu tận C tích điện

Theo một số phương án, chất tương tự glucagon được biến đổi bằng cách thế và/hoặc thêm axit amin giúp đưa axit amin tích điện vào phần đầu tận C của chất tương tự. Theo một số phương án, các cải biến này tăng cường độ ổn định và khả năng hòa tan. Trong bản mô tả này, thuật ngữ "axit amin tích điện" hoặc "gốc tích điện" chỉ axit amin mà chứa mạch bên tích điện âm (tức là, được loại proton) hoặc tích điện dương (tức là, được cộng proton) trong dung dịch nước ở độ pH sinh lý. Theo một số khía cạnh, sự thế và/hoặc thêm axit amin mà đưa axit amin tích điện cải biến vào là ở vị trí từ đầu tận C đến vị trí 27 của SEQ ID NO: 1. Theo một số phương án, một, hai hoặc ba (và trong một số ví dụ, nhiều hơn ba) axit amin tích điện được đưa vào trong phần đầu tận C (ví dụ, (các) vị trí từ đầu tận C đến vị trí 27). Theo một số phương án, (các) axit amin tự nhiên ở vị trí 28 và/hoặc 29 được thế bằng axit amin tích điện, và/hoặc theo phương án khác, từ một đến ba axit amin tích điện được bổ sung thêm vào đầu tận C của chất tương tự. Theo các phương án ví dụ, một, hai hoặc tất cả các axit amin tích điện tích điện âm. Axit amin tích điện âm theo một số phương án là axit aspartic, axit glutamic, axit xysteic, axit homoxysteic, hoặc axit homoglutamic. Theo một số khía cạnh, các cải biến này làm tăng khả năng hòa tan, ví dụ, tạo ra khả năng hòa tan bằng ít nhất 2 lần, 5 lần, 10 lần, 15 lần, 25 lần, 30 lần hoặc lớn hơn so với glucagon tự nhiên ở độ pH nhất định nằm trong khoảng từ khoảng 5,5 đến 8, ví dụ, pH=7, khi được đo sau 24 giờ ở 25°C.

Cắt bỏ đầu tận C

Theo một số phương án, chất tương tự glucagon được bộc lộ trong bản mô tả này được biến đổi bằng cách cắt bỏ đầu tận C bằng một hoặc hai gốc axit amin. Peptit glucagon được biến đổi, như được thể hiện trong bản mô tả này, giữ lại hoạt tính và hiệu lực tương tự ở thụ thể glucagon và thụ thể GLP-1. Liên quan đến vấn đề này, peptit glucagon có thể chứa các axit amin 1-27 hoặc 1-28 của chất tương tự glucagon tự nhiên (SEQ ID NO: 1), tùy ý có các cải biến khác bất kỳ được nêu trong bản mô tả này.

Đầu tận C trung hòa điện tích

Theo một số phương án, chất tương tự glucagon chứa SEQ ID NO: 1 được biến đổi trong đó axit carboxylic của axit amin đầu tận C được thế bằng nhóm trung hòa điện tích, như amit hoặc este. Không bị giới hạn bởi lý thuyết cụ thể bất kỳ, các cải biến theo các khía cạnh này làm tăng hoạt tính của chất tương tự glucagon ở thụ thể GLP-1. Do đó, theo một số phương án, chất tương tự glucagon là peptit được amit hoá, sao cho gốc đầu tận C chứa amit thay cho alpha carboxylat của axit amin. Như được sử dụng trong bản mô tả này, việc đề cập chung đến peptit hoặc chất tương tự được dự định để bao hàm peptit có đầu tận amino, đầu tận carboxy, hoặc cả đầu tận amino và carboxy được biến đổi. Ví dụ, chuỗi axit amin chứa nhóm amit thay cho axit carboxylic đầu tận được dự định để được bao hàm bởi trình tự axit amin chỉ định các axit amin tiêu chuẩn.

Các cải biến khác

Theo một số phương án, ngoài ra hoặc theo cách khác, chất tương tự glucagon còn chứa các cải biến axit amin sau đây:

- (i) Thế Ser ở vị trí 2 bằng Ala;
- (ii) Thế Tyr ở vị trí 10 bằng Val hoặc Phe, hoặc Trp;
- (iii) Thế Lys ở vị trí 12 bằng Arg;
- (iv) Thế Arg ở vị trí 17 bằng Gln hoặc axit amin béo, nhỏ, ví dụ, Ala, hoặc axit amin béo, lớn, ví dụ, Ile;
- (v) Thế Arg ở vị trí 18 bằng axit amin béo, nhỏ, ví dụ, Ala; hoặc axit amin chứa imidazol, ví dụ, His;
- (vi) Thế Ala ở vị trí 19 bằng axit amin tích điện dương, ví dụ, Gln;
- (vii) Thế Val ở vị trí 23 bằng Ile, và
- (viii) Thế Thr ở vị trí 29 bằng Gly hoặc Gln.

Theo một số phương án, độ ổn định của chất tương tự glucagon được làm tăng bằng sự cải biến methionin ở vị trí 27, ví dụ, bằng cách thế bằng leuxin hoặc norleuxin. Các cải biến này có thể làm giảm sự phân hủy do oxy hoá. Độ ổn định có thể còn được làm tăng bằng sự cải biến Gln ở vị trí 20 hoặc 24 hoặc 28, ví dụ, bằng

cách thế bằng Ala, Ser, Thr hoặc AIB. Cải biến này có thể làm giảm quá trình phân hủy xảy ra thông qua sự khử amit của Gln. Độ ổn định có thể được làm tăng bằng sự cải biến Asp ở vị trí 21, ví dụ, bằng cách thế bằng gốc khác có tính axit, ví dụ, Glu. Cải biến này có thể làm giảm quá trình phân hủy xảy ra thông qua sự khử nước của Asp để tạo thành hợp chất trung gian suxinimit dạng vòng, sau đó là sự đồng phân hoá thành iso-aspartat.

Theo một số phương án, chất tương tự glucagon được nêu trong bản mô tả này được glycosyl hoá, được amit hoá, được carboxyl hoá, được phosphoryl hoá, được este hoá, được N-axyl hoá, được đóng vòng bằng, ví dụ, cầu disulfua, hoặc được chuyển hóa thành muối (ví dụ, muối cộng axit, muối cộng bazơ), và/hoặc tùy ý được dime hoá, được multime hoá, hoặc được polyme hoá, hoặc được tiếp hợp.

Cải biến bất kỳ được nêu trong bản mô tả này, gồm, ví dụ, cải biến mà làm tăng hoặc làm giảm hoạt tính thụ thể glucagon và làm tăng hoạt tính thụ thể GLP-1, có thể được sử dụng độc lập hoặc ở dạng kết hợp. Kết hợp các cải biến mà làm tăng hoạt tính thụ thể GLP-1 có thể tạo ra hoạt tính GLP-1 cao hơn so với cải biến bất kỳ này được tạo ra riêng lẻ.

Các phương án ví dụ

Sáng chế đề xuất peptit chứa cấu trúc tương tự với cấu trúc của glucagon tự nhiên ở người và có hoạt tính chất chủ vận được tăng cường ở thụ thể GLP-1, so với glucagon tự nhiên ở người. Glucagon thường có khoảng 1% hoạt tính của GLP-1 tự nhiên ở thụ thể GLP-1, trong khi GLP-1 thường có hoạt tính nhỏ hơn khoảng 0,01% hoạt tính của glucagon tự nhiên ở thụ thể glucagon. Vì vậy, peptit trong bản mô tả này có hoạt tính lớn hơn 1% hoạt tính của GLP-1 tự nhiên ở thụ thể GLP-1. Theo các phương án ví dụ, peptit trong bản mô tả này có hoạt tính lớn hơn hoặc bằng khoảng 5%, lớn hơn hoặc bằng khoảng 10%, lớn hơn hoặc bằng khoảng 15%, lớn hơn hoặc bằng khoảng 20%, lớn hơn hoặc bằng khoảng 25%, lớn hơn hoặc bằng khoảng 30%, lớn hơn hoặc bằng khoảng 35%, lớn hơn hoặc bằng khoảng 40%, lớn hơn hoặc bằng khoảng 45%, lớn hơn hoặc bằng khoảng 50%, lớn hơn hoặc bằng khoảng 55%, lớn hơn hoặc bằng khoảng 60%, lớn hơn hoặc bằng khoảng 65%, lớn hơn hoặc bằng khoảng 70%, lớn hơn hoặc bằng khoảng 75%, lớn hơn hoặc bằng khoảng 80%, lớn hơn hoặc bằng khoảng 85%, lớn hơn hoặc bằng khoảng 90%, hoặc lớn hơn hoặc bằng

khoảng 95% hoạt tính của GLP-1 tự nhiên ở thụ thể GLP-1. Theo các khía cạnh ví dụ, peptit trong bản mô tả này có hoạt tính ở thụ thể GLP-1 lớn hơn hoạt tính ở thụ thể GLP-1 của GLP-1 tự nhiên. Vì vậy, theo các khía cạnh ví dụ, peptit trong bản mô tả này có hoạt tính lớn hơn hoặc bằng khoảng 100% hoạt tính của GLP-1 tự nhiên ở thụ thể GLP-1. Theo các khía cạnh ví dụ, peptit trong bản mô tả này có hoạt tính lớn hơn hoặc bằng khoảng 150%, lớn hơn hoặc bằng khoảng 200%, lớn hơn hoặc bằng khoảng 250%, lớn hơn hoặc bằng khoảng 300%, lớn hơn hoặc bằng khoảng 350%, lớn hơn hoặc bằng khoảng 400%, lớn hơn hoặc bằng khoảng 450%, lớn hơn hoặc bằng khoảng 500%, lớn hơn hoặc bằng khoảng 550%, lớn hơn hoặc bằng khoảng 600%, lớn hơn hoặc bằng khoảng 650%, lớn hơn hoặc bằng khoảng 700%, lớn hơn hoặc bằng khoảng 750%, lớn hơn hoặc bằng khoảng 800%, lớn hơn hoặc bằng khoảng 850%, lớn hơn hoặc bằng khoảng 900%, lớn hơn hoặc bằng khoảng 950%, hoặc lớn hơn hoặc bằng khoảng 1000% hoạt tính của GLP-1 tự nhiên ở thụ thể GLP-1.

Theo các phương án ví dụ, peptit chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 12.

Theo các phương án ví dụ, peptit chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 13.

Theo các phương án ví dụ, peptit chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 14.

Theo các phương án ví dụ, peptit chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 15.

Theo các phương án ví dụ, peptit chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 16 và có độ chọn lọc đối với thụ thể GLP-1 ở người ít nhất là bằng 100 lần so với thụ thể GIP.

Theo các phương án ví dụ, peptit chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 17.

Sáng chế còn đề xuất biến thể peptit chứa trình tự axit amin có độ tương đồng cao với trình tự axit amin của một trong số các peptit được bộc lộ trong bản mô tả này. Theo các phương án ví dụ, biến thể peptit trong bản mô tả này chứa trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 80%, 85%, 90% hoặc 95% đối với axit amin 1-29

của trình tự axit amin của peptit có trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 12-17, trong đó biến thể peptit giữ lại hoạt tính của peptit gốc ở thụ thể GLP-1, thụ thể glucagon, và thụ thể GIP (ví dụ, có độ chọn lọc đối với thụ thể GLP-1 ở người ít nhất là bằng 100 lần so với thụ thể GIP), và tùy ý hiệu lực GLP-1 bằng ít nhất 1%; hoặc trong đó EC50 của peptit ở thụ thể GIP nhỏ hơn 100 lần so với EC50 của nó ở thụ thể GLP-1). Theo các phương án ví dụ, biến thể peptit trong bản mô tả này có độ chọn lọc đối với thụ thể GLP-1 ở người lớn hơn ít nhất 100 lần so với thụ thể GIP.

Theo các phương án ví dụ, biến thể peptit trong bản mô tả này chứa trình tự axit amin dựa trên trình tự axit amin của peptit trong bản mô tả này nhưng khác ở một hoặc nhiều vị trí axit amin, bao gồm, nhưng không giới hạn ở vị trí 1, vị trí 2, vị trí 3, vị trí 7, vị trí 10, vị trí 12, vị trí 15, vị trí 16, vị trí 17, vị trí 18, vị trí 20, vị trí 21, vị trí 23, vị trí 24, vị trí 27, vị trí 28, vị trí 29. Theo các khía cạnh ví dụ, biến thể peptit có thể chứa sự thể bảo toàn so với peptit gốc, có thể chứa cải biến axit amin bất kỳ được nêu trong bản mô tả này, hoặc có thể chứa cải biến axit amin mà quay trở lại axit amin có mặt ở vị trí đó trong trình tự glucagon tự nhiên (SEQ ID NO: 1). Theo các khía cạnh ví dụ, biến thể peptit trong bản mô tả này chứa trình tự axit amin dựa trên trình tự axit amin của peptit trong bản mô tả này nhưng khác ở một hoặc nhiều điểm sau đây:

- a) biến thể peptit chứa axit amin được axyl hoá hoặc axit amin được alkyl hoá;
- b) axit amin được axyl hoá hoặc axit amin được alkyl hoá được thể bằng axit amin tương ứng của glucagon tự nhiên (SEQ ID NO: 1) ở vị trí đó hoặc phần thể bảo toàn của axit amin tự nhiên, và tùy ý axit amin được axyl hoá hoặc được alkyl hoá mới được đưa vào ở các vị trí khác nhau;
- c) biến thể peptit chứa axit amin được gắn cộng hoá trị vào gốc ưa nước;
- d) axit amin được gắn cộng hoá trị vào gốc ưa nước được thể bằng axit amin tương ứng của glucagon tự nhiên (SEQ ID NO: 1) ở vị trí đó, và tùy ý axit amin mới được gắn cộng hoá trị vào gốc ưa nước được đưa vào ở các vị trí khác nhau;

- e) axit amin đầu tận C của biến thể peptit chứa amit đầu tận C thay cho alpha carboxylat đầu tận C;
- f) axit amin ở vị trí bất kỳ trong số các vị trí từ 1 đến 29 được thay thế bằng axit amin tương ứng của glucagon tự nhiên (SEQ ID NO: 1) ở vị trí đó;
- g) hoặc các kết hợp bất kỳ của chúng.

Đối với biến thể peptit bất kỳ nêu trên, trong phương án ví dụ, biến thể peptit chứa gốc ưa nước được gắn cộng hoá trị vào axit amin ở vị trí 16, 17, 21, 24, 29, vị trí ở trong đoạn kéo dài đầu tận C, hoặc ở đầu tận C. Theo các khía cạnh ví dụ, biến thể peptit chứa Cys, Lys, Orn, homoxystein và Ac-Phe được gắn cộng hoá trị vào gốc ưa nước, tùy ý, trong đó Cys, Lys, Orn, homoxystein, hoặc Ac-Phe được bố trí ở vị trí 16, 17, 21, 24, 29, vị trí ở trong đoạn kéo dài đầu tận C, hoặc ở đầu tận C của biến thể peptit. Theo các khía cạnh ví dụ, gốc ưa nước là polyetylen glycol.

Theo các khía cạnh ví dụ, biến thể peptit chứa axit amin được axyl hoá hoặc được alkyl hoá, tùy ý, ở vị trí 10. Theo các khía cạnh ví dụ, biến thể peptit chứa axit amin được axyl hoá hoặc được alkyl hoá chứa mạch C8 đến C20 alkyl, mạch C12 đến C18 alkyl, hoặc mạch C14 hoặc C16 alkyl. Theo các khía cạnh ví dụ, biến thể peptit chứa axit amin được axyl hoá hoặc được alkyl hoá mà axit amin được axyl hoá hoặc được alkyl hoá này có công thức I, Công thức II, hoặc Công thức III, tùy ý, trong đó axit amin có công thức I là Lys.

Theo các khía cạnh ví dụ, biến thể peptit trong bản mô tả này chứa axit amin được axyl hoá hoặc được alkyl hoá, trong đó nhóm axyl hoặc nhóm alkyl được gắn cộng hoá trị vào axit amin qua vùng đệm, tùy ý, trong đó vùng đệm là axit amin hoặc dipeptit. Theo các phương án ví dụ, vùng đệm chứa một hoặc hai gốc có tính axit.

Theo phương án ví dụ bất kỳ nêu trên, peptit hoặc biến thể peptit trong bản mô tả này có (EC50 ở thụ thể glucagon)/(EC50 ở thụ thể GLP-1) bằng khoảng 20 hoặc thấp hơn (ví dụ, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, 0,5, 0,25, 0,10, 0,05, 0,025, 0,01, 0,001).

Theo phương án ví dụ bất kỳ nêu trên, peptit hoặc biến thể peptit trong bản mô tả này có (EC50 ở thụ thể glucagon)/(EC50 ở thụ thể GLP-1) cao hơn 20 (ví dụ, 21, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 250, 500, 750, 1000 hoặc cao hơn).

Theo phương án ví dụ bất kỳ nêu trên, peptit hoặc biến thể peptit trong bản mô tả này có EC50 ở thụ thể GLP-1 lớn hơn từ hai đến mười lần (ví dụ, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 lần) so với EC50 ở thụ thể glucagon.

Các loại trừ

Theo các phương án ví dụ, peptit bất kỳ trong số các peptit sau đây được loại trừ ra khỏi chất tương tự glucagon được nêu trong bản mô tả này, mặc dù peptit bất kỳ trong số các peptit sau đây chứa một hoặc nhiều cải biến khác như nêu trong bản mô tả này có hoạt tính GLP-1 hoặc hoạt tính đồng chủ vận, được phẩm, kit, và phương pháp điều trị bằng cách sử dụng hợp chất này có thể được bao gồm trong sáng chế: peptit được nêu trong SEQ ID NO: 1 có phần thể [Arg12] và có amit đầu tận C; peptit được nêu trong SEQ ID NO: 1 có phần thể [Arg12,Lys20] và có amit đầu tận C; peptit được nêu trong SEQ ID NO: 1 có phần thể [Arg12,Lys24] và có amit đầu tận C; peptit được nêu trong SEQ ID NO: 1 có phần thể [Arg12,Lys29] và có amit đầu tận C; peptit được nêu trong SEQ ID NO: 1 có phần thể [Glu9]; peptit được nêu trong SEQ ID NO: 1 thiếu His1, có phần thể [Glu9, Glu16, Lys29] và amit đầu tận C; peptit được nêu trong SEQ ID NO: 1 có phần thể [Glu9, Glu16, Lys29] và có amit đầu tận C; peptit được nêu trong SEQ ID NO: 1 có phần thể [Lys13, Glu17] được liên kết qua cầu lactam và có amit đầu tận C; peptit được nêu trong SEQ ID NO: 1 có phần thể [Lys17, Glu21] được liên kết qua cầu lactam và có amit đầu tận C; peptit được nêu trong SEQ ID NO: 1 thiếu His1, có phần thể [Glu20, Lys24] được liên kết qua cầu lactam. Theo một số phương án, chất tương tự glucagon không phải là peptit bất kỳ được bộc lộ trong tài liệu bất kỳ trong số đơn sáng chế quốc tế số PCT/US2009/034448, nộp ngày 19 tháng 2 năm 2009, và được công bố vào ngày 26 tháng 8 năm 2010, với số công bố WO 2010/096052; đơn sáng chế quốc tế số PCT/US2009/068678, nộp ngày 18 tháng 12 năm 2009, và được công bố vào ngày 26 tháng 8 năm 2010, với số công bố WO 2010/096142; đơn sáng chế quốc tế số PCT/US2009/047438, nộp ngày 16 tháng 6 năm 2009, và được công bố ngày 23 tháng 12 năm 2009, với số công bố WO 2009/155258; đơn sáng chế quốc tế số PCT/US2008/053857, nộp ngày 13 tháng 2 năm 2008, và được công bố ngày 21 tháng 8 năm 2008, với số công bố WO

2008/101017; đơn sáng chế quốc tế số PCT/US2010/059724, nộp ngày 9 tháng 12 năm 2010; đơn sáng chế quốc tế số PCT/US2009/047447, nộp ngày 16 tháng 6 năm 2009, và được công bố ngày 28 tháng 1 năm 2010, với số công bố WO2010/011439; đơn sáng chế quốc tế số PCT/US2010/38825, nộp ngày 16 tháng 6 năm 2010, và được công bố ngày 23 tháng 12 năm 2010, với số công bố WO2010/148089; đơn sáng chế quốc tế số PCT/US2011/022608, nộp ngày 26 tháng 1 năm 2011; và đơn tạm thời Mỹ số 61/426,285, nộp ngày 22 tháng 12 năm 2010; mỗi tài liệu được nêu ở đây chỉ nhằm mục đích tham khảo. Theo một số phương án, chất tương tự glucagon không gồm tất cả hoặc một phần của trình tự KRNRNNIA được liên kết với đầu tận C sau vị trí 29, ví dụ KRNR.

Phương pháp tạo ra peptit

Chất tương tự glucagon theo sáng chế có thể thu được bằng phương pháp đã biết trong lĩnh vực. Phương pháp tổng hợp peptit de novo thích hợp được nêu trong tài liệu, ví dụ, Chan et al., *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis*, Oxford University Press, Oxford, United Kingdom, 2005; *Peptide and Protein Drug Analysis*, ed. Reid, R., Marcel Dekker, Inc., 2000; *Epitope Mapping*, ed. Westwood et al., Oxford University Press, Oxford, United Kingdom, 2000; và patent Mỹ số 5,449,752.

Ngoài ra, trong trường hợp mà chất tương tự theo sáng chế không chứa axit amin không được mã hoá hoặc axit amin không tự nhiên bất kỳ, chất tương tự glucagon có thể được tạo ra theo cách tái tổ hợp bằng cách sử dụng axit nucleic mã hoá trình tự axit amin của chất tương tự sử dụng phương pháp tái tổ hợp tiêu chuẩn. Xem, ví dụ, Sambrook et al., *Molecular Cloning: Laboratory Manual*. 3rd ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY 2001; và Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons, NY, 1994.

Theo một số phương án, chất tương tự glucagon theo sáng chế được phân tách. Theo một số phương án, chất tương tự glucagon theo sáng chế được tinh chế. Cần hiểu rằng “độ tinh khiết” là thuật ngữ tương đối, và không được hiểu là độ tinh khiết tuyệt đối hoặc sự làm giàu tuyệt đối hoặc sự chọn lọc tuyệt đối. Theo một số khía cạnh, độ tinh khiết là ít nhất hoặc khoảng 50%, ít nhất hoặc khoảng 60%, ít nhất hoặc khoảng 70%, ít nhất hoặc khoảng 80%, hoặc ít nhất hoặc khoảng 90% (ví dụ, ít nhất hoặc

khoảng 91%, ít nhất hoặc khoảng 92%, ít nhất hoặc khoảng 93%, ít nhất hoặc khoảng 94%, ít nhất hoặc khoảng 95%, ít nhất hoặc khoảng 96%, ít nhất hoặc khoảng 97%, ít nhất hoặc khoảng 98%, ít nhất hoặc khoảng 99% hoặc xấp xỉ 100%).

Theo một số phương án, peptit được nêu trong bản mô tả này được tổng hợp thương mại bởi các công ty, như Synpep (Dublin, CA), Peptide Technologies Corp. (Gaithersburg, MD), và Multiple Peptide Systems (San Diego, CA). Về mặt này, peptit có thể được tổng hợp, được tái tổ hợp, được phân tách, và/hoặc được tinh chế.

Thể tiếp hợp

Sáng chế còn đề xuất thể tiếp hợp chứa một hoặc nhiều chất tương tự glucagon được nêu trong bản mô tả này được tiếp hợp với gốc khác loại, trong đó thể tiếp hợp có hoạt tính tăng ở thụ thể GLP-1, so với glucagon tự nhiên, và có độ chọn lọc đối với thụ thể GLP-1 ở người lớn hơn ít nhất 100 lần so với thụ thể GIP. Trong bản mô tả này, thuật ngữ “gốc khác loại” đồng nghĩa với thuật ngữ “gốc tiếp hợp” và chỉ phân tử bất kỳ (hóa học hoặc hoá sinh, có trong tự nhiên hoặc không được mã hoá) khác so với chất tương tự glucagon được nêu trong bản mô tả này. Ví dụ về các gốc tiếp hợp có thể được liên kết với chất tương tự bất kỳ được nêu trong bản mô tả này gồm nhưng không giới hạn ở peptit hoặc polypeptit khác loại (gồm ví dụ, protein huyết tương), chất hướng đích, globulin miễn dịch hoặc phần của nó (ví dụ, vùng biến đổi, CDR, hoặc vùng Fc), dấu chẩn đoán như chất đồng vị phóng xạ, chất huỳnh quang hoặc dấu enzym, polyme gồm polyme tan được trong nước, hoặc chất trị liệu hoặc chẩn đoán khác. Theo một số phương án, thể tiếp hợp được đề xuất gồm chất tương tự theo sáng chế và protein huyết tương, trong đó protein huyết tương được chọn từ nhóm gồm albumin, transferin, fibrinogen và globulin. Theo một số phương án, gốc protein huyết tương của thể tiếp hợp là albumin hoặc transferin. Thể tiếp hợp theo một số phương án chứa một hoặc nhiều chất tương tự glucagon được nêu trong bản mô tả này và một hoặc nhiều trong số: peptit (khác biệt với chất tương tự glucagon có hoạt tính thụ thể glucagon và/hoặc GLP-1 được nêu trong bản mô tả này), polypeptit, phân tử axit nucleic, kháng thể hoặc mảnh của nó, polyme, chấm lượng tử, phân tử nhỏ, độc tố, chất chẩn đoán, hydrate cacbon, axit amin.

Theo một số phương án, gốc khác loại là peptit khác biệt với chất tương tự có hoạt tính thụ thể glucagon và/hoặc GLP-1 được nêu trong bản mô tả này và thể tiếp

hợp là peptit dung hợp hoặc peptit khảm. Theo một số phương án, gốc khác loại là phần kéo dài peptit có 1-21 axit amin. Theo các phương án cụ thể, phần kéo dài được gắn vào đầu tận C của chất tương tự glucagon, ví dụ, vào axit amin ở vị trí 29.

Theo một số khía cạnh cụ thể, phần kéo dài là một axit amin hoặc dipeptit. Theo các phương án cụ thể, phần kéo dài chứa axit amin được chọn từ nhóm gồm: axit amin tích điện (ví dụ, axit amin tích điện âm (ví dụ, Glu), axit amin tích điện dương), axit amin chứa gốc ưa nước. Theo một số khía cạnh, phần kéo dài là Gly, Glu, Cys, Gly-Gly, Gly-Glu.

Theo một số phương án, phần kéo dài chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 9 (GPSSGAPPPS), SEQ ID NO: 10 (GGPSSGAPPPS), SEQ ID NO: 8 (KRNRNNIA), hoặc SEQ ID NO: 11 (KRNR). Theo các khía cạnh cụ thể, trình tự axit amin được gắn qua axit amin đầu tận C của chất tương tự glucagon, ví dụ, axit amin ở vị trí 29. Theo một số phương án, trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 13-16 được liên kết với axit amin 29 của chất tương tự glucagon qua peptit liên kết. Theo một số phương án cụ thể, axit amin ở vị trí 29 của chất tương tự glucagon là Gly, và Gly được dung hợp với một trong số các trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 8-11.

Theo một số phương án, gốc khác loại là polyme. Theo một số phương án, polyme được chọn từ nhóm gồm: polyamit, polycacbonat, polyalkylen và dẫn xuất của chúng gồm, polyalkylen glycol, polyalkylen oxit, polyalkylen terephthalat, polyme của acrylic và metacrylic este, gồm poly(metyl metacrylat), poly(etyl metacrylat), poly(butylmetacrylat), poly(isobutyl metacrylat), poly(hexylmetacrylat), poly(isodexyl metacrylat), poly(lauryl metacrylat), poly(phenyl metacrylat), poly(metyl acrylat), poly(isopropyl acrylat), poly(isobutyl acrylat), và poly(octadexyl acrylat), polyme polyvinyl gồm rượu polyvinyl, polyvinyl ete, polyvinyl este, polyvinyl halogenua, poly(vinyl axetat), và polyvinylpyrrolidon, polyglycolit, polysiloxan, polyuretan và copolyme của chúng, xenluloza gồm alkyl xenluloza, hydroxyalkyl xenluloza, xenluloza ete, xenluloza este, nitro xenluloza, metyl xenluloza, etyl xenluloza, hydroxypropyl xenluloza, hydroxy-propyl metyl xenluloza, hydroxybutyl metyl xenluloza, xenluloza axetat, xenluloza propionat, xenluloza axetat butyrat, xenluloza axetat phtalat, carboxyletyl xenluloza, xenluloza triaxetat, và muối xenluloza sulphat natri,

polypropylen, polyetylen gồm poly(etylen glycol), poly(etylen oxit), và poly(etylen terephtalat), và polystyren.

Theo một số khía cạnh, polyme là polyme có thể bị phân hủy sinh học, gồm polyme có thể bị phân hủy sinh học tổng hợp (ví dụ, polyme của axit lactic và axit glycolic, polyanhydrit, poly(ortho)este, polyuretan, poly(axit butic), poly(axit valeric), và poly(lactit-cocaprolacton)), và polyme có thể bị phân hủy sinh học tự nhiên (ví dụ, alginat và polysacarit khác gồm dextran và xenluloza, collagen, dẫn xuất hóa học của chúng (thể, bổ sung nhóm hóa học, ví dụ, alkyl, alkylen, hydroxyl hoá, oxy hóa, và cải biến khác thường được tạo ra bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này), albumin và protein ưa nước khác (ví dụ, zein và prolamin và protein kỵ nước khác)), cũng như copolyme hoặc hỗn hợp bất kỳ của chúng. Nhìn chung, các nguyên liệu này phân hủy thông qua việc thủy phân bằng enzym hoặc tiếp xúc với nước *in vivo*, thông qua sự ăn mòn bề mặt hoặc khối.

Theo một số khía cạnh, polyme là polyme kết dính sinh học, như hydrogel có thể bị ăn mòn sinh học được mô tả bởi H. S. Sawhney, C. P. Pathak và J. A. Hubbell trong tài liệu *Macromolecules*, 1993, 26, 581-587, hướng dẫn của nó được nêu trong bản mô tả này, axit polyhyaluronic, casein, gelatin, gluten, polyanhydrit, axit polyacrylic, alginat, chitosan, poly(metyl metacrylat), poly(etyl metacrylat), poly(butylmetacrylat), poly(isobutyl metacrylat), poly(hexylmetacrylat), poly(isodexyl metacrylat), poly(lauryl metacrylat), poly(phenyl metacrylat), poly(metyl acrylat), poly(isopropyl acrylat), poly(isobutyl acrylat), và poly(octadexyl acrylat).

Theo một số phương án, polyme là polyme tan được trong nước hoặc polyme ưa nước. Polyme ưa nước được nêu trong bản mô tả này dưới dạng “gốc ưa nước”. Polyme tan được trong nước thích hợp là đã biết trong lĩnh vực và gồm, ví dụ, polyvinylpyrrolidon, hydroxypropyl xenluloza (HPC; Klucel), hydroxypropyl metylxenluloza (HPMC; Methocel), nitroxenluloza, hydroxypropyl etylxenluloza, hydroxypropyl butylxenluloza, hydroxypropyl pentylxenluloza, metyl xenluloza, etylxenluloza (Ethocel), hydroxyetyl xenluloza, các alkyl xenluloza và hydroxyalkyl xenluloza khác nhau, các xenluloza ete khác nhau, xenluloza axetat, carboxymetyl xenluloza, natri carboxymetyl xenluloza, canxi carboxymetyl xenluloza, copolyme vinyl axetat/axit crotonic, poly-hydroxyalkyl metacrylat, hydroxymetyl metacrylat, copolyme axit metacrylic, axit polymetacrylic, polymethylmetacrylat, copolyme maleic

anhydrit/metyl vinyl ete, rượu poly vinyl, axit natri và canxi polyacrylic, axit polyacrylic, polyme carboxy có tính axit, carboxypolymetylen, polyme carboxyvinyl, copolyme polyoxyetylen polyoxypropylen, polymetylvinylete co-maleic anhydrit, carboxymetylamit, co-polyme kali metacrylat divinylbenzen, polyoxyetylen glycol, polyetylen oxit, và dẫn xuất, muối, và dạng kết hợp của chúng.

Theo các phương án cụ thể, polyme là polyalkylen glycol, gồm, ví dụ, polyetylen glycol (PEG).

Theo một số phương án, gốc khác loại là hydratcacbon. Theo một số phương án, hydratcacbon là monosacarit (ví dụ, glucoza, galactoza, fructoza), disacarit (ví dụ, sucroza, lactoza, maltoza), oligosacarit (ví dụ, rafinoza, stachyoza), polysacarit (tinh bột, amylaza, amylopectin, xenluloza, kitin, calloza, laminarin, xylan, mannan, fucoidan, galactomannan).

Theo một số phương án, gốc khác loại là lipit. Lipit, theo một số phương án, là axit béo, eicosanoit, prostaglandin, leukotrien, thromboxan, N-axyl etanolamin), glyxerolipit (ví dụ, glyxerol được thể mono, di, tri), glyxerophospholipit (ví dụ, phosphatidylcholin, phosphatidylinositol, phosphatidyletanolamin, phosphatidylserin), sphingolipit (ví dụ, sphingosin, ceramit), sterol lipit (ví dụ, steroid, cholesterol), prenol lipit, sacarolipit, hoặc polyketit, dầu, sáp, cholesterol, sterol, vitamin tan được trong chất béo, monoglyxerit, diglyxerit, triglyxerit, phospholipit.

Theo một số phương án, gốc khác loại được gắn vào chất tương tự theo sáng chế qua liên kết không cộng hoá trị hoặc cộng hóa trị. Theo các khía cạnh này, gốc khác loại được gắn vào chất tương tự theo sáng chế qua thành phần liên kết. Việc liên kết có thể được thực hiện bằng liên kết hóa học cộng hoá trị, lực vật lý như tương tác tĩnh điện, hydro, ion, van der Waals, hoặc kỵ nước hoặc ưa nước. Nhiều hệ ghép cặp không cộng hoá trị khác nhau có thể được sử dụng, gồm biotin-avidin, phối tử/thụ thể, enzym/cơ chất, axit nucleic/protein liên kết axit nucleic, lipit/protein liên kết lipit, đối tác phân tử đích tế bào; hoặc đối tác liên kết bất kỳ hoặc mảnh của chúng mà có ái lực với nhau.

Chất tương tự glucagon theo một số phương án được liên kết với các gốc tiếp hợp qua liên kết cộng hoá trị trực tiếp bằng cách cho gốc axit amin đích của chất tương tự phản ứng với chất tạo dẫn xuất hữu cơ có khả năng phản ứng với mạch bên được

chọn hoặc gốc đầu tận N hoặc C của axit amin đích. Nhóm có tính phản ứng trên chất tương tự hoặc gốc tiếp hợp gồm, ví dụ, nhóm aldehyt, amino, este, thiol, α -haloaxetyl, maleimido hoặc hydrazino. Chất tạo dẫn xuất gồm, ví dụ, maleimidobenzoyl sulfosuxinimit este (tiếp hợp qua gốc xystein), N-hydroxysuxinimit (qua gốc lysin), glutaraldehyt, suxinic anhydrit hoặc chất khác đã biết trong lĩnh vực. Theo cách khác, các gốc tiếp hợp có thể được liên kết với chất tương tự gián tiếp qua chất mang trung gian, như chất mang polysacarit hoặc polypeptit. Ví dụ về chất mang polysacarit gồm aminodextran. Ví dụ về chất mang polypeptit thích hợp gồm polylysin, polyaxit glutamic, axit polyaspartic, co-polyme của chúng, và polyme hỗn hợp của các axit amin này và các chất khác, ví dụ, serin, để mang lại tính chất hòa tan mong muốn cho chất mang được tải thu được.

Gốc xysteinyll được cho phản ứng nhiều nhất là với α -haloaxetat (và amin tương ứng), như axit cloaxetic, cloaxetamit để tạo ra carboxymetyl hoặc dẫn xuất carboxyamidometyl. Gốc xysteinyll còn được tạo dẫn xuất bằng phản ứng với bromotrifloaxeton, axit α -bromo- β -(5-imidozoyl)propionic, cloaxetyl phosphat, N-alkylmaleimit, 3-nitro-2-pyridyl disulfua, metyl 2-pyridyl disulfua, p-clomercuribenzoat, 2-clomercuri-4-nitrophenol, hoặc clo-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol.

Gốc histidyl được tạo dẫn xuất bằng phản ứng với diethylpyrocacbonat ở pH nằm trong khoảng 5,5-7,0 vì chất này tương đối đặc hiệu với mạch bên histidyl. Para-bromophenaxyl bromua cũng hữu dụng; phản ứng này tốt hơn được tiến hành trong natri cacodylat 0,1M ở pH=6,0.

Gốc lysinyl và gốc đầu tận amino được cho phản ứng với axit suxinic hoặc axit carboxylic anhydrit khác. Việc tạo dẫn xuất bằng các chất này có tác dụng đảo ngược điện tích của gốc lysinyl. Chất phản ứng thích hợp khác để tạo dẫn xuất gốc chứa α -amino gồm imidoeste như metyl picolinimidat, pyridoxal phosphat, pyridoxal, cloborohydrit, axit trinitrobenzensulfonic, O-metylisoure, 2,4-pentandion, và phản ứng được xúc tác bởi transaminaza với glyoxylat.

Gốc arginyl được biến đổi bằng phản ứng với một hoặc một vài chất phản ứng thông thường, trong số chúng là phenylglyoxal, 2,3-butandion, 1,2-xyclohexandion, và ninhydrin. Sự tạo dẫn xuất của gốc arginin đòi hỏi phản ứng được tiến hành trong điều

kiện kiềm do pKa cao của nhóm chức guanidin. Ngoài ra, các chất phản ứng này có thể phản ứng với nhóm của lysin cũng như nhóm arginin epsilon-amino.

Sự cải biến cụ thể của gốc tyrosyl có thể được tạo ra, với mong muốn đặc biệt trong việc đưa nhãn đánh dấu phổ vào gốc tyrosyl bằng phản ứng với hợp chất diazonium thơm hoặc tetranitrometan. Thông thường nhất, N-axetylimidizol và tetranitrometan được sử dụng lần lượt để tạo thành các loại O-axetyl tyrosyl và dẫn xuất 3-nitro.

Nhóm bên carboxyl (aspartyl hoặc glutamyl) được biến đổi chọn lọc bằng phản ứng với carbodiimide ($R-N=C=N-R'$), trong đó R và R' là khác nhóm alkyl, như 1-xyclohexyl-3-(2-morpholinyl-4-etyl) carbodiimide hoặc 1-etyl-3-(4-azonia-4,4-dimethylpentyl) carbodiimide. Ngoài ra, các gốc aspartyl và glutamyl được chuyển hóa thành các gốc asparaginyll và glutaminyll bằng phản ứng với ion amoni.

Cải biến khác gồm sự hydroxyl hoá prolin và lysin, sự phosphoryl hoá nhóm hydroxyl của các gốc seryl hoặc threonyl, sự metyl hoá nhóm alpha-amino của mạch bên lysin, arginin, và histidin (T. E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W.H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 (1983)), sự khử amin của asparagin hoặc glutamin, sự axetyl hoá amin đầu tận N, và/hoặc sự amit hoá hoặc sự este hoá nhóm axit carboxylic đầu tận C.

Dạng cải biến cộng hoá trị khác gồm glycosit ghép cặp hoá học hoặc enzym với chất tương tự. (Các) đường có thể được gắn vào (a) arginin và histidin, (b) nhóm carboxyl tự do, (c) nhóm sulfhydryl tự do như nhóm sulfhydryl của xystein, (d) nhóm hydroxyl tự do như nhóm hydroxyl của serin, threonin, hoặc hydroxyprolin, (e) gốc thơm như gốc thơm của tyrosin, hoặc tryptophan, hoặc (f) nhóm amit của glutamin. Các phương pháp này được nêu trong WO87/05330 được công bố ngày 11 tháng 9 năm 1987, và trong tài liệu Aplin and Wriston, *CRC Crit. Rev. Biochem.*, pp. 259-306 (1981).

Theo một số phương án, chất tương tự glucagon được tiếp hợp với gốc khác loại qua liên kết cộng hoá trị giữa mạch bên của axit amin của chất tương tự glucagon với gốc khác loại. Theo một số phương án, chất tương tự glucagon được tiếp hợp với gốc khác loại qua mạch bên của axit amin ở vị trí 16, 17, 21, 24, hoặc 29, vị trí ở trong đoạn kéo dài đầu tận C, hoặc axit amin đầu tận C, hoặc kết hợp của các vị trí này.

Theo một số khía cạnh, axit amin cộng hoá trị được liên kết với gốc khác loại (ví dụ, axit amin chứa gốc khác loại) là Cys, Lys, Orn, homo-Cys, hoặc Ac-Phe, và mạch bên của axit amin được liên kết cộng hoá trị vào gốc khác loại.

Theo một số phương án, thể tiếp hợp chứa thành phần liên kết nối chất tương tự glucagon với gốc khác loại. Theo một số khía cạnh, thành phần liên kết chứa chuỗi nguyên tử dài từ 1 đến khoảng 60, hoặc từ 1 đến 30 nguyên tử hoặc dài hơn, dài từ 2 đến 5 nguyên tử, từ 2 đến 10 nguyên tử, từ 5 đến 10 nguyên tử, hoặc từ 10 đến 20 nguyên tử. Theo một số phương án, nguyên tử chuỗi này đều là nguyên tử cacbon. Theo một số phương án, nguyên tử chuỗi trong khung của thành phần liên kết được chọn từ nhóm gồm C, O, N và S. Nguyên tử chuỗi và thành phần liên kết có thể được chọn theo khả năng hòa tan được mong đợi của chúng (tính ưa nước) sao cho thu được thể tiếp hợp tan được nhiều hơn. Theo một số phương án, thành phần liên kết tạo ra nhóm chức mà là mục tiêu cho sự phân cắt bằng enzym hoặc chất xúc tác khác hoặc điều kiện thủy phân được tìm thấy trong mô hoặc cơ quan hoặc tế bào đích. Theo một số phương án, chiều dài của thành phần liên kết là đủ dài để làm giảm hiệu lực đối với chương ngại không gian. Nếu thành phần liên kết là liên kết cộng hóa trị hoặc liên kết peptidyl và thể tiếp hợp là polypeptit, thể tiếp hợp hoàn chỉnh có thể là protein dung hợp. Liên kết peptidyl này có thể có chiều dài bất kỳ. Thành phần liên kết ví dụ có chiều dài nằm trong khoảng từ 1 đến 50 axit amin, từ 5 đến 50, từ 3 đến 5, từ 5 đến 10, từ 5 đến 15, hoặc từ 10 đến 30 axit amin. Theo cách khác, protein dung hợp này có thể được tạo ra bằng phương pháp thiết kế di truyền tái tổ hợp đã biết với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này.

Thể tiếp hợp: thể dung hợp Fc

Như nêu trên, theo một số phương án, chất tương tự được tiếp hợp, ví dụ, được dung hợp với globulin miễn dịch hoặc phần của nó (ví dụ, vùng biến đổi, CDR, hoặc vùng Fc). Các loại globulin miễn dịch (Ig) đã biết gồm IgG, IgA, IgE, IgD hoặc IgM. Vùng Fc là vùng đầu tận C của chuỗi nặng Ig, chịu trách nhiệm liên kết với thụ thể Fc mà thực hiện các hoạt động như đóng vòng (dẫn đến thời gian bán huỷ dài hơn), độc tính tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC), và độc tính tế bào phụ thuộc bổ thể (CDC).

Ví dụ, theo một số định nghĩa, vùng Fc chuỗi nặng IgG của người kéo dài từ Cys226 đến đầu tận C của chuỗi nặng. "Vùng bản lề" thường kéo dài từ Glu216 đến Pro230 của IgG1 của người (vùng bản lề của chất đồng phân IgG khác có thể được sắp thẳng hàng với trình tự IgG1 bằng cách sắp thẳng hàng các xystein có liên quan trong liên kết xystein). Vùng Fc của IgG gồm hai miền không đối, CH2 và CH3. Miền CH2 của vùng Fc IgG của người thường kéo dài từ axit amin 231 đến axit amin 341. Miền CH3 của vùng Fc IgG của người thường kéo dài từ axit amin 342 đến 447. Việc viện dẫn đến cách đánh số axit amin của globulin miễn dịch hoặc mảnh globulin miễn dịch, hoặc vùng, đều dựa theo Kabat et al. 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Department of Public Health, Bethesda, Md. Theo các phương án liên quan, vùng Fc có thể chứa một hoặc nhiều vùng không đối tự nhiên hoặc được biến đổi từ chuỗi nặng globulin miễn dịch, không phải là CH1, ví dụ, vùng CH2 và CH3 của IgG và IgA, hoặc vùng CH3 và CH4 của IgE.

Các gốc tiếp hợp thích hợp bao gồm các phần của trình tự globulin miễn dịch mà gồm vị trí liên kết FcRn. FcRn, thụ thể thu hồi, chịu trách nhiệm tuần hoàn globulin miễn dịch và đưa chúng quay trở lại hệ tuần hoàn trong máu. Vùng của phần Fc của IgG mà liên kết với thụ thể FcRn được mô tả dựa vào tinh thể học tia X (Burmeister et al. 1994, Nature 372:379). Vùng tiếp xúc chính của Fc với FcRn là ở gần chỗ nối của miền CH2 và miền CH3. Tất cả các tiếp xúc Fc-FcRn đều ở trong chuỗi nặng Ig đơn. Vị trí tiếp xúc chính gồm các gốc axit amin 248, 250-257, 272, 285, 288, 290-291, 308-311 và 314 của miền CH2 và các gốc axit amin 385-387, 428 và 433-436 của miền CH3.

Một số gốc tiếp hợp có thể bao gồm hoặc không bao gồm (các) vị trí liên kết FcγR. FcγR chịu trách nhiệm đối với ADCC và CDC. Ví dụ về vị trí trong vùng Fc mà tạo ra sự tiếp xúc trực tiếp với FcγR là các axit amin 234-239 (vùng bản lề phía dưới), axit amin 265-269 (vòng B/C), axit amin 297-299 (vòng C'/E), và axit amin 327-332 (vòng F/G) (Sondermann et al., Nature 406: 267-273, 2000). Vùng bản lề phía dưới của IgE còn được bao hàm trong việc liên kết FcRI (Henry, et al., Biochemistry 36, 15568-15578, 1997). Các gốc có liên quan đến liên kết thụ thể IgA được nêu trong tài liệu Lewis et al., (J Immunol. 175:6694-701, 2005). Gốc axit amin có liên quan trong việc liên kết thụ thể IgE được nêu trong tài liệu Sayers et al. (J Biol Chem. 279(34):35320-5, 2004).

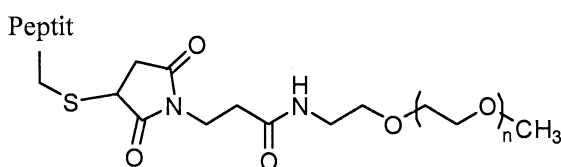
Cải biến axit amin có thể được tạo ra đối với vùng Fc của globulin miễn dịch. Vùng Fc biến thể này chứa ít nhất một cải biến axit amin trong miền CH3 của vùng Fc (các gốc 342-447) và/hoặc ít nhất một cải biến axit amin trong miền CH2 của vùng Fc (các gốc 231-341). Các đột biến được tin là mang lại ái lực tăng cho FcRn bao gồm T256A, T307A, E380A và N434A (Shields et al. 2001, *J. Biol. Chem.* 276:6591). Các đột biến khác có thể làm giảm liên kết của vùng Fc với FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB, và/hoặc FcγRIIIA mà không làm giảm đáng kể ái lực đối với FcRn. Ví dụ, sự thế của Asn ở vị trí 297 của vùng Fc bằng Ala hoặc axit amin khác sẽ loại bỏ vị trí N-glycosyl hoá bảo toàn cao và có thể làm giảm tính miễn dịch đi kèm với thời gian bán huỷ dài hơn của vùng Fc, cũng như làm giảm liên kết với các FcγR (Routledge et al. 1995, *Transplantation* 60:847; Friend et al. 1999, *Transplantation* 68:1632; Shields et al. 1995, *J. Biol. Chem.* 276:6591). Cải biến axit amin ở vị trí 233-236 của IgG1 được tạo ra làm giảm liên kết với FcγR (Ward and Ghetie 1995, *Therapeutic Immunology* 2:77 và Armour et al. 1999, *Eur. J. Immunol.* 29:2613). Một số ví dụ về sự thế axit amin được nêu trong patent Mỹ 7,355,008 và 7,381,408, mỗi tài liệu này được kết hợp vào bản mô tả bằng cách viện dẫn.

Thế tiếp hợp: Các gốc ưa nước

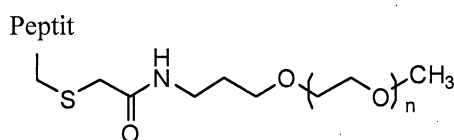
Chất tương tự glucagon được nêu trong bản mô tả này có thể được biến đổi thêm để cải thiện khả năng hòa tan và độ ổn định của nó trong dung dịch trong nước ở độ pH sinh lý, trong khi vẫn giữ lại hoạt tính sinh học cao so với glucagon tự nhiên. Các gốc ưa nước như nhóm PEG có thể được gắn vào chất tương tự trong điều kiện thích hợp bất kỳ được sử dụng cho phản ứng protein với phân tử polyme được hoạt hoá. Phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực có thể được sử dụng, bao gồm phản ứng axyl hoá, phản ứng alkyl hoá khử, phản ứng cộng Michael, phản ứng alkyl hoá thiol hoặc phương pháp tiếp hợp/nối chọn lọc hoá học khác thông qua nhóm hoạt tính trên gốc PEG (ví dụ, nhóm aldehyt, amino, este, thiol, α-haloaxetyl, maleimido hoặc hydrazino) với nhóm hoạt tính trên hợp chất đích (ví dụ, nhóm aldehyt, amino, este, thiol, α-haloaxetyl, maleimido hoặc hydrazino). Nhóm hoạt hoá mà có thể được sử dụng để liên kết polyme tan được trong nước với một hoặc nhiều protein bao gồm, nhưng không giới hạn ở sulfon, maleimit, sulfhydryl, thiol, triflat, tresylat, azidirin, oxiran, 5-pyridyl, và nhóm axyl được halogen hoá alpha (ví dụ, axit alpha-iodo axetic, axit alpha-bromoaxetic, axit alpha-cloaxetic). Nếu được gắn vào chất tương tự bằng sự

alkyl hoá khử, polyme được chọn cần có một aldehyt phản ứng sao cho mức độ polyme hoá được kiểm soát. Xem tài liệu, ví dụ, Kinstler et al., *Adv. Drug. Delivery Rev.* 54: 477-485 (2002); Roberts et al., *Adv. Drug Delivery Rev.* 54: 459-476 (2002); và Zalipsky et al., *Adv. Drug Delivery Rev.* 16: 157-182 (1995).

Theo các khía cạnh cụ thể, gốc axit amin của chất tương tự có thiol được biến đổi bằng gốc ưa nước như PEG. Theo một số phương án, thiol được biến đổi bằng PEG được hoạt hoá maleimit trong phản ứng cộng Michael để tạo ra chất tương tự được PEG hoá có liên kết thioete được thể hiện dưới đây:



Theo một số phương án, thiol được biến đổi với PEG được hoạt hoá haloaxetyl trong phản ứng thế ưa nhân tạo ra chất tương tự được PEG hoá có liên kết thioete được thể hiện dưới đây:



Các gốc ưa nước thích hợp gồm polyetylen glycol (PEG), polypropylen glycol, các polyol polyoxyetyl hóa (ví dụ, POG), sorbitol polyoxyetyl hóa, glucoza polyoxyetyl hóa, glyxerol polyoxyetyl hóa (POG), các polyoxyalkylen, polyetylen glycol propionaldehyt, copolyme của etylen glycol/propylen glycol, monometoxy-polyetylen glycol, mono-(C1-C10) alkoxy- hoặc aryloxy-polyetylen glycol, carboxymetylxenluloza, polyaxetal, rượu polyvinyl (PVA), polyvinyl pyrrolidon, poly-1,3-dioxolan, poly-1,3,6-trioxan, copolyme etylen/maleic anhydrit, poly (.beta.-axit amin) (hoặc homopolyme hoặc copolyme ngẫu nhiên), poly(n-vinyl pyrrolidon)polyetylen glycol, propopylen glycol homopolyme (PPG) và polyaktylen oxit khác, copolyme polypropylen oxit/etylen oxit, axit colonic hoặc polyme polysacarit khác, Ficoll hoặc dextran và hỗn hợp của chúng. Dextran là polyme polysacarit của dưới đơn vị glucoza, được liên kết chủ yếu bằng liên kết α 1-6. Dextran có sẵn trên thị trường trong nhiều giới hạn khối lượng phân tử, ví dụ, từ khoảng 1 kD đến khoảng 100 kD, hoặc từ khoảng 5, 10, 15 hoặc 20 kD đến khoảng 20, 30, 40, 50,

60, 70, 80 hoặc 90 kD. Polyme mạch thẳng hoặc mạch nhánh được dự tính. Các chế phẩm thu được của thể tiếp hợp có thể là gần như phân tán đơn hoặc phân tán poly, và có thể có khoảng 0,5, 0,7, 1, 1,2, 1,5 hoặc 2 gốc polyme cho mỗi chất tương tự.

Theo một số phương án, chất tương tự glucagon được tiếp hợp với gốc ưa nước qua liên kết cộng hoá trị giữa mạch bên của axit amin của chất tương tự glucagon với gốc ưa nước. Theo một số phương án, chất tương tự glucagon được tiếp hợp với gốc ưa nước qua mạch bên của axit amin ở vị trí 16, 17, 21, 24, hoặc 29, vị trí ở bên trong đoạn kéo dài đầu tận C, hoặc axit amin đầu tận C, hoặc hỗn hợp của các vị trí này. Theo một số khía cạnh, axit amin cộng hoá trị được liên kết với gốc ưa nước (ví dụ, axit amin chứa gốc ưa nước) là Cys, Lys, Orn, homo-Cys, hoặc Ac-Phe, và mạch bên của axit amin được liên kết cộng hoá trị vào gốc ưa nước (ví dụ, PEG).

Thể tiếp hợp: rPEG

Theo một số phương án, thể tiếp hợp theo sáng chế chứa chất tương tự có hoạt tính chất chủ vận glucagon và/hoặc GLP-1 được dung hợp với chất tương tự bổ sung mà có khả năng tạo ra hình dạng kéo dài tương tự với PEG hóa học (ví dụ, phân tử PEG tái tổ hợp (rPEG)), như các chất được nêu trong đơn sáng chế quốc tế số công bố WO2009/023270 và đơn sáng chế Mỹ số công bố US20080286808. Phân tử rPEG theo một số khía cạnh là polypeptit chứa một hoặc nhiều glyxin, serin, axit glutamic, axit aspartic, alanin, hoặc prolin. Theo một số khía cạnh, rPEG là homopolyme, ví dụ, poly-glyxin, poly-serin, poly-axit glutamic, poly-axit aspartic, poly-alanin, hoặc poly-prolin. Theo phương án khác, rPEG chứa hai loại axit amin được lặp lại, ví dụ, poly(Gly-Ser), poly(Gly-Glu), poly(Gly-Ala), poly(Gly-Asp), poly(Gly-Pro), poly(Ser-Glu), v.v.. Theo một số khía cạnh, rPEG chứa ba loại axit amin khác nhau, ví dụ, poly(Gly-Ser-Glu). Theo các khía cạnh cụ thể, rPEG làm tăng thời gian bán hủy của chất tương tự chất chủ vận glucagon và/hoặc GLP-1. Theo một số khía cạnh, rPEG có điện tích dương thực hoặc điện tích âm thực. rPEG theo một số khía cạnh thiếu cấu trúc bậc hai. Theo một số phương án, rPEG có chiều dài lớn hơn hoặc bằng 10 axit amin và theo một số phương án có chiều dài là khoảng 40 đến khoảng 50 axit amin. Peptit bổ sung theo một số khía cạnh được dung hợp với đầu tận N hoặc C của chất tương tự theo sáng chế qua liên kết peptit hoặc vị trí cắt proteinaza, hoặc được cài xen vào vòng của chất tương tự theo sáng chế. rPEG theo một số khía cạnh chứa nhân ái lực hoặc được liên kết với PEG mà là lớn hơn 5 kDa. Theo một số phương án, rPEG

giúp chất tương tự theo sáng chế có bán kính thủy động lực học, thời gian bán hủy trong huyết thanh, tính kháng proteaza tăng, hoặc khả năng hòa tan tăng và theo một số khía cạnh làm cho chất tương tự có tính miễn dịch giảm.

Thể tiếp hợp: Multime

Sáng chế còn đề cập đến multime hoặc dime của chất tương tự được bộc lộ trong bản mô tả này, gồm homo- hoặc hetero- multime hoặc homo- hoặc hetero- dime. Hai hoặc nhiều hơn hai chất tương tự có thể được liên kết với nhau bằng cách sử dụng chất liên kết và trình tự tiêu chuẩn đã biết với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, dime có thể được tạo thành giữa hai peptit trong toàn bộ đơn sáng chế này bằng cách sử dụng chất liên kết ngang thiol hai chức và chất liên kết ngang amin hai chức, cụ thể là đối với chất tương tự mà được thể bằng các gốc xystein, lysin ornithin, homoxystein hoặc axetyl phenylalanin. Dime có thể là homodime hoặc theo cách khác có thể là heterodime. Theo phương án nhất định, liên kết nối hai (hoặc nhiều hơn) chất tương tự là PEG, ví dụ, 5 kDa PEG, 20 kDa PEG. Theo một số phương án, liên kết là liên kết disulfua. Ví dụ, mỗi monome của dime có thể chứa gốc Cys (ví dụ, Cys ở đầu tận hoặc nằm ở bên trong) và nguyên tử lưu huỳnh của mỗi gốc Cys tham gia vào sự tạo thành liên kết disulfua. Theo một số khía cạnh, monome được nối qua axit amin đầu tận (ví dụ, đầu tận N hoặc đầu tận C), thông qua axit amin ở bên trong, hoặc thông qua axit amin đầu tận của ít nhất một monome và axit amin ở bên trong của ít nhất một monome khác. Theo các khía cạnh cụ thể, monome không được nối qua axit amin đầu tận N. Theo một số khía cạnh, monome của multime được gắn với nhau theo hướng “đuôi với đuôi” trong đó axit amin đầu tận C của mỗi monome được gắn với nhau.

Dược phẩm, sử dụng và bộ kit

Muối

Theo một số phương án, chất tương tự glucagon là ở dạng muối, ví dụ, muối được dụng. Trong bản mô tả này thuật ngữ "muối được dụng" chỉ muối của hợp chất mà giữ lại hoạt tính sinh học của hợp chất bố mẹ, và không phải là không mong muốn theo cách sinh học hoặc không mong muốn theo cách khác. Muối này có thể được điều chế *in situ* trong quá trình tách và tinh chế cuối cùng chất tương tự, hoặc được điều chế riêng rẽ bằng cách cho chức bazơ tự do phản ứng với axit thích hợp. Nhiều hợp chất

được bộc lộ trong bản mô tả này có khả năng tạo thành muối axit và/hoặc bazơ do sự có mặt của nhóm amino và/hoặc carboxyl hoặc nhóm tương tự.

Muối cộng axit được dụng có thể được điều chế từ axit vô cơ và hữu cơ. Muối cộng axit tiêu biểu gồm, nhưng không giới hạn ở axetat, adipat, alginat, xitrat, aspartat, benzoat, benzensulfonat, bisulfat, natri bisulfat, butyrat, camphorat, camphor sulfonat, digluconat, glyxerophosphat, hemisulfat, heptanoat, hexanoat, fumarat, hydroclorua, hydrobromua, hydroiodua, 2-hydroxyetansulfonat (isothionat), lactat, maleat, metan sulfonat, nicotinat, 2-naphtalen sulfonat, oxalat, palmitoat, pectinat, persulfat, 3-phenylpropionat, picrat, pivalat, propionat, suxinat, sulfat, tartrat, thioxyanat, phosphat, glutamat, bicacbonat, p-toluensulfonat, và undecanoat. Muối có nguồn gốc từ axit vô cơ gồm axit clohydric, axit bromhydric, axit sulfuric, axit nitric, axit phosphoric, và các axit tương tự. Muối có nguồn gốc từ axit hữu cơ gồm axit axetic, axit trifloaxetic, axit propionic, axit glycolic, axit pyruvic, axit oxalic, axit malic, axit malonic, axit suxinic, axit maleic, axit fumaric, axit tartaric, axit xitric, axit benzoic, axit xinnamic, axit mandelic, axit metansulfonic, axit etansulfonic, axit p-toluen-sulfonic, axit salixylic, và các axit tương tự. Ví dụ về axit mà có thể được sử dụng để tạo thành muối cộng axit được dụng gồm, ví dụ, axit vô cơ, ví dụ, axit clohydric, axit bromhydric, axit sulphuric, và axit phosphoric, và axit hữu cơ, ví dụ, axit oxalic, axit maleic, axit suxinic, và axit xitric.

Muối cộng bazơ còn có thể được điều chế *in situ* trong quá trình tách và tinh chế cuối cùng nguồn axit salixylic, hoặc bằng cách cho gốc chứa axit carboxylic phản ứng với bazơ thích hợp như hydroxit, cacbonat, hoặc bicacbonat của cation kim loại được dụng hoặc với amoniac hoặc amin hữu cơ bậc một, bậc hai, hoặc bậc ba. Muối được dụng gồm, nhưng không giới hạn ở, các cation gốc kim loại kiềm hoặc kim loại kiềm thổ như muối lithi, natri, kali, canxi, magie, và nhôm, và các chất tương tự, và các cation amoniac và amin bậc bốn không độc gồm amoni, tetrametylmoni, tetraetylmoni, metylmoni, dimetylmoni, trimetylmoni, trietylmoni, dietylamoni, và etylmoni, cùng với các chất khác. Amin hữu cơ tiêu biểu khác hữu dụng đối với sự tạo thành muối cộng bazơ gồm, ví dụ, etylendiamin, etanolamin, dietanolamin, piperidin, piperazin, và các chất tương tự. Muối có nguồn gốc từ bazơ hữu cơ gồm, nhưng không giới hạn ở, muối của amin bậc một, bậc hai và bậc ba.

Ngoài ra, nhóm chứa nitơ bazơ có thể được tạo thành bậc bốn bằng chất tương tự theo sáng chế dưới dạng các alkyl bậc thấp halogenua như metyl, etyl, propyl, và butyl clorua, bromua, và iodua; halogenua mạch dài như dexyl, lauryl, myristyl, và stearyl clorua, bromua, và iodua; arylalkyl halogenua như benzyl và phentyl bromua và các chất khác. Nhờ đó, thu được sản phẩm tan được trong nước hoặc trong dầu hoặc phân tán được.

Chế phẩm

Theo một số phương án, dược phẩm được đề xuất trong đó dược phẩm này chứa chất tương tự glucagon theo sáng chế, hoặc muối được dụng của chúng, và chất mang được dụng. Dược phẩm này có thể chứa thành phần được dụng bất kỳ, gồm, ví dụ, chất axit hoá, chất phụ gia, chất hấp thụ, chất nở đầy sol khí, chất thay thế không khí, chất alkal hoá, chất chống tạo bánh, chất chống đông tụ, chất bảo quản kháng khuẩn, chất chống oxy hóa, chất khử trùng, bazơ, chất liên kết, chất đệm, chất chelat hoá, chất phủ, chất tạo màu, chất làm khô, chất tẩy rửa, chất pha loãng, chất tẩy uế, chất phân rã, chất phân tán, chất tăng cường hoà tan, thuốc nhuộm, chất làm mềm, chất nhũ hoá, chất làm ổn định nhũ tương, chất độn, chất tạo màng, chất tăng cường hương vị, chất tạo hương vị, chất tăng cường tan chảy, chất tạo gel, chất tạo hạt, chất thấm ướt, chất bôi trơn, chất kết dính nhầy, bazơ mỡ, thuốc mỡ, môi trường dẫn thuốc nhón, bazơ hữu cơ, bazơ ngậm, sắc tố, chất làm dẻo, chất đánh bóng, chất bảo quản, chất càngh hoá, chất thấm qua da, chất hoà tan, dung môi, chất làm ổn định, bazơ thuốc đạn, chất có hoạt tính bề mặt, chất hoạt động bề mặt, chất tạo huyền phù, chất làm ngọt, chất trị liệu, chất làm đặc, chất bổ, chất độc, chất làm tăng độ nhón, chất hấp thụ nước, đồng dung môi có thể trộn lẫn với nước, chất làm mềm nước, hoặc chất thấm ướt.

Theo một số phương án, dược phẩm chứa thành phần bất kỳ hoặc hỗn hợp của các thành phần sau đây: acaxia, axesulfame kali, axetyltributyl xitrat, axetyltrietyl xitrat, aga, albumin, rượu, rượu khử nước, rượu biến tính, rượu loãng, axit aleuritic, axit alginic, polyeste béo, alumina, nhôm hydroxit, nhôm stearat, amylopectin, α -amyloza, axit ascorbic, ascorbyl palmitat, aspartam, nước kim vi khuẩn dùng để tiêm, bentonit, bentonit magma, benzalkoni clorua, benzethoni clorua, axit benzoic, rượu benzyl, benzyl benzoat, bronopol, butylat hydroxyanisol, butylat hydroxytoluen, butylparaben, butylparaben natri, canxi alginat, canxi ascorbat, canxi cacbonat, canxi xyclamat, canxi phosphat dibazơ khan, dibazơ dehydrat canxi phosphat, tribazơ canxi

phosphat, canxi propionat, canxi silic oxit, canxi sorbat, canxi stearat, canxi sulfat, canxi sulfat hemihydrat, dầu hạt cải dầu, cacbome, cacbon dioxit, carboxymetyl xenluloza canxi, carboxymetyl xenluloza natri, β -caroten, carrageenan, dầu thầu dầu, dầu thầu dầu được hydro hoá, sáp nhũ hoá cation, xenluloza axetat, xenluloza axetat phtalat, etyl xenluloza, xenluloza vi tinh thể, xenluloza bột, xenluloza vi tinh thể được silic hoá, natri carboxymetyl xenluloza, rượu cetostearyl, cetrimit, rượu xetyl, clohexidin, clobutanol, clocrezol, cholesterol, clohexidin axetat, clohexidin gluconat, clohexidin hydroclorua, clodifloetan (HCFC), clodifloetan, cloflocacbon (CFC)clophenoxyetanol, cloxylenol, chất rắn sirô ngũ cốc, axit xitric khan, axit xitric monohydrat, bơ ca cao, chất tạo màu, dầu ngô, dầu hạt bông, crezol, m-crezol, o-crezol, p-crezol, croscarmelloza natri, crospovidon, axit xyclamic, xyclodextrin, dextrat, dextrin, dextroza, dextroza khan, diazolidinyl ure, dibutyl phtalat, dibutyl sebacat, dietanolamin, dietyl phtalat, difloetan (HFC), dimetyl- β -yclodextrin, hợp chất dạng xyclodextrin như Captisol®, dimetyl ete, dimetyl phtalat, dikali edentat, dinatri edentat, dinatri hydro phosphat, docusat canxi, docusat kali, docusat natri, dodexyl galat, dodexyltrimetylamoni bromua, edentat canxi dinatri, axit edtic, eglumin, rượu etyl, etylxenluloza, etyl galat, etyl laurat, etyl maltol, etyl oleat, etylparaben, etylparaben kali, etylparaben natri, etyl vanillin, fructoza, dịch lỏng fructoza, fructoza được nghiền, fructoza không chứa pyrogen, fructoza bột, axit fumaric, gelatin, glucoza, dịch lỏng glucoza, hỗn hợp glyxerit của axit béo thực vật no, glyxerin, glyxeryl behenat, glyxeryl monooleat, glyxeryl monostearat, glyxeryl monostearat tự nhũ hoá, glyxeryl palmitostearat, glyxin, glycol, glycofurol, gồm guar, heptaflopropan (HFC), hexadexyltrimetylamoni bromua, sirô fructoza bậc cao, albumin huyết thanh của người, hydrocacbon (HC), axit clohydric loãng, dầu thực vật được hydro hoá, typ II, hydroxyetyl xenluloza, 2-hydroxyetyl- β -yclodextrin, hydroxypropyl xenluloza, hydroxypropyl xenluloza được thể thấp, 2-hydroxypropyl- β -yclodextrin, hydroxypropyl metylxenluloza, hydroxypropyl metylxenluloza phtalat, imidure, indigo carmin, chất trao đổi ion, sắt oxit, rượu isopropyl, isopropyl myristat, isopropyl palmitat, nước muối đẳng trương, cao lạnh, axit lactic, lactitol, lactoza, lanolin, rượu lanolin, lanolin khan, lexithin, magie nhôm silic oxit, magie cacbonat, bình thường magie cacbonat, magie cacbonat khan, magie cacbonat hydroxit, magie hydroxit, magie lauryl sulfat, magie oxit, magie silic oxit, magie stearat, magie trisilic

oxit, magie trisilic oxit khan, axit malic, mạch nha, maltitol, dung dịch maltitol, maltodextrin, maltol, maltoza, manitol, triglyxerit mạch trung bình, meglumin, menthol, metylxenluloza, metyl metacrylat, metyl oleat, metylparaben, metylparaben kali, metylparaben natri, xenluloza vi tinh thể và carboxymetylxenluloza natri, dầu khoáng, dầu khoáng nhẹ, dầu khoáng và rượu lanolin, dầu, dầu ô liu, monoetanolamin, montmorillonit, octyl galat, axit oleic, axit palmitic, parafin, dầu lạc, dầu mỡ, dầu mỡ và rượu lanolin, men dược phẩm, phenol, phenol hoá lỏng, phenoxyetanol, phenoxypropanol, rượu phenyletyl, phenylmercuric axetat, phenylmercuric borat, phenylmercuric nitrat, polacrilin, polacrilin kali, poloxame, polydextroza, polyetylen glycol, polyetylen oxit, polyacrylat, polyme khối polyetylen-polyoxypropylen, polymetacrylat, polyoxyetylen alkyl ete, dẫn xuất dầu thầu polyoxyetylen, este của polyoxyetylen sorbitol axit béo, polyoxyetylen stearat, rượu polyvinyl, polyvinyl pyrrolidon, kali alginat, kali benzoat, kali bicacbonat, kali bisulfit, kali clorua, kali xitrat, kali xitrat khan, kali hydro phosphat, kali metabisulfit, mono bazơ kali phosphat, kali propionat, kali sorbat, povidon, propanol, axit propionic, propylen cacbonat, propylen glycol, propylen glycol alginat, propyl galat, propylparaben, propylparaben kali, propylparaben natri, protamin sulfat, dầu hạt nhỏ, dung dịch Ringer, sacarin, sacarin amoni, sacarin canxi, sacarin natri, dầu rum, saponit, protein huyết thanh, dầu vùng, silic oxit keo, keo silicon dioxit, natri alginat, natri ascorbat, natri benzoat, natri bicacbonat, natri bisulfit, natri clorua, khan natri xitrat, natri xitrat dehydrat, natri clorua, natri xyclamat, natri edentat, natri dodexyl sulfat, natri lauryl sulfat, natri metabisulfit, natri phosphat, dibazơ, natri phosphat, mono bazơ, natri phosphat, tribazơ, natri propionat khan, natri propionat, natri sorbat, natri glycolat tinh bột, natri stearyl fumarat, natri sulfit, axit sorbic, este sorbitan (este sorbitan béo), sorbitol, dung dịch sorbitol 70%, dầu đậu tương, sáp spermaxeti, tinh bột, tinh bột ngô, tinh bột khoai tây, tinh bột được đông keo sơ bộ, tinh bột ngô khử trùng, axit stearic, axit stearic được tinh chế, rượu stearyl, sucroza, đường, đường nén được, đường dùng để làm kẹo, đường hình cầu, đường chuyển đổi, *Sugartab*, màu vàng cam Sunset Yellow FCF, parafin tổng hợp, bột talc, axit tartric, tartrazin, tetrafloetan (HFC), dầu theobroma, thimerosal, titan dioxit, alpha tocopherol, tocopheryl axetat, axit alpha tocopheryl suxinat, beta-tocopherol, delta-tocopherol, gamma-tocopherol, tragacanth, triaxetin, tributyl xitrat, trietanolamin, trietyl xitrat, trimetyl- β -xyclodextrin,

trimetyltetradexylamoni bromua, chất đệm tris, trinati edentat, vanillin, dầu thực vật được hydro hoá typ I, nước, nước mềm, nước cứng, nước không chứa cacbon dioxit, nước không chứa pyrogen, nước để tiêm, nước vô trùng để xông, nước vô trùng để tiêm, nước vô trùng để tưới, sáp, sáp nhũ hoá anion, sáp carnauba, sáp nhũ hoá cation, sáp xetyl este, sáp vi tinh thể, sáp nhũ hoá không ion, sáp thuốc đạn, sáp trắng, sáp vàng, dầu mỡ trắng, chất béo len, gôm xantan, xylitol, zein, kẽm propionat, muối kẽm, kẽm stearat, hoặc tá dược bất kỳ trong *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, Third Edition, A. H. Kibbe (Pharmaceutical Press, London, UK, 2000), mà được viện dẫn ở đây chỉ nhằm mục đích tham khảo. *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Sixteenth Edition, E. W. Martin (Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1980), mà được viện dẫn ở đây chỉ nhằm mục đích tham khảo, bộc lộ các thành phần khác nhau được sử dụng để tạo chế phẩm hợp phần dược dụng và kỹ thuật điều chế đã biết của chúng. Ngoài phạm vi mà chất thông thường bất kỳ không tương hợp với dược phẩm, việc sử dụng chúng trong dược phẩm được bao hàm. Thành phần hoạt tính bổ sung cũng có thể được kết hợp vào hợp phần.

Theo một số phương án, (các) thành phần nêu trên có thể có mặt trong dược phẩm ở hàm lượng bất kỳ, như, ví dụ, ít nhất là A, trong đó A là 0,0001% khối lượng/thể tích, 0,001% khối lượng/thể tích, 0,01% khối lượng/thể tích, 0,1% khối lượng/thể tích, 1% khối lượng/thể tích, 2% khối lượng/thể tích, 5% khối lượng/thể tích, 10% khối lượng/thể tích, 20% khối lượng/thể tích, 30% khối lượng/thể tích, 40% khối lượng/thể tích, 50% khối lượng/thể tích, 60% khối lượng/thể tích, 70% khối lượng/thể tích, 80% khối lượng/thể tích, hoặc 90% khối lượng/thể tích. Theo một số phương án, (các) thành phần nêu trên có thể có mặt trong dược phẩm ở hàm lượng bất kỳ, như, ví dụ, nhiều nhất là B, trong đó B là 90% khối lượng/thể tích, 80% khối lượng/thể tích, 70% khối lượng/thể tích, 60% khối lượng/thể tích, 50% khối lượng/thể tích, 40% khối lượng/thể tích, 30% khối lượng/thể tích, 20% khối lượng/thể tích, 10% khối lượng/thể tích, 5% khối lượng/thể tích, 2% khối lượng/thể tích, 1% khối lượng/thể tích, 0,1% khối lượng/thể tích, 0,001% khối lượng/thể tích, hoặc 0,0001%. Theo phương án khác, (các) thành phần nêu trên có thể là có mặt trong dược phẩm ở hàm lượng bất kỳ trong giới hạn, như, ví dụ từ khoảng A đến khoảng B. Theo một số phương án, A là 0,0001% và B là 90%.

Dược phẩm có thể được bào chế theo công thức để đạt được độ pH thích hợp về mặt sinh lý. Theo một số phương án, độ pH của dược phẩm có thể là ít nhất 5, ít nhất 5,5, ít nhất 6, ít nhất 6,5, ít nhất 7, ít nhất 7,5, ít nhất 8, ít nhất 8,5, ít nhất 9, ít nhất 9,5, ít nhất 10, hoặc ít nhất 10,5 lên tới và bao gồm cả pH=11, tùy thuộc vào chế phẩm và đường dùng. Theo phương án nhất định, dược phẩm có thể chứa chất đệm để đạt được độ pH thích hợp về mặt sinh lý. Chất đệm có thể bao gồm hợp chất bất kỳ có khả năng tạo đệm ở độ pH mong muốn như, ví dụ, đệm phosphat (ví dụ, PBS), trietanolamin, Tris, bixin, TAPS, trixin, HEPES, TES, MOPS, PIPES, cacodylat, MES, và các chất khác. Theo phương án nhất định, nồng độ của chất đệm ít nhất là 0,5mM, ít nhất là 1mM, ít nhất là 5mM, ít nhất là 10mM, ít nhất là 20mM, ít nhất là 30mM, ít nhất là 40mM, ít nhất là 50mM, ít nhất là 60mM, ít nhất là 70mM, ít nhất là 80mM, ít nhất là 90mM, ít nhất là 100mM, ít nhất là 120mM, ít nhất là 150mM, hoặc ít nhất là 200mM. Theo một số phương án, nồng độ của chất đệm không lớn hơn 300mM (ví dụ, nhiều nhất là 200mM, nhiều nhất là 100mM, nhiều nhất là 90mM, nhiều nhất là 80mM, nhiều nhất là 70mM, nhiều nhất là 60mM, nhiều nhất là 50mM, nhiều nhất là 40mM, nhiều nhất là 30mM, nhiều nhất là 20mM, nhiều nhất là 10mM, nhiều nhất là 5mM, nhiều nhất là 1mM).

Đường dùng

Phần thảo luận dưới đây về đường dùng chỉ nhằm minh họa các phương án ví dụ và không được hiểu là làm giới hạn phạm vi của sáng chế theo bất kỳ cách nào.

Chế phẩm thích hợp để dùng qua đường miệng có thể chứa (a) dung dịch lỏng, như lượng hữu hiệu của chất tương tự theo sáng chế được hòa tan trong chất pha loãng, như nước, nước muối, hoặc nước cam ép; (b) viên nang, gói, viên nén, viên hình thoi, và viên ngậm dẹt, mỗi viên chứa lượng định trước của thành phần hoạt tính, dưới dạng chất rắn hoặc hạt cốm; (c) bột; (d) hỗn dịch trong dịch lỏng thích hợp; và (e) nhũ tương thích hợp. Chế phẩm lỏng có thể bao gồm chất pha loãng, như nước và rượu, ví dụ, etanol, rượu benzylic, và rượu polyetylen, hoặc có bổ sung hoặc không bổ sung chất hoạt động bề mặt dược dụng. Dạng viên nang có thể là ở dạng gelatin có vỏ cứng hoặc mềm thông thường chứa, ví dụ, chất hoạt động bề mặt, chất bôi trơn, và chất độn trợ, như lactoza, sucroza, canxi phosphat, và tinh bột ngô. Dạng viên nén có thể bao gồm một hoặc nhiều trong số lactoza, sucroza, manitol, tinh bột ngô, tinh bột khoai tây, axit alginic, xenluloza vi tinh thể, acaxia, gelatin, gôm guar, keo silicon

dioxit, croscarmelloza natri, bột talc, magie stearat, canxi stearat, kẽm stearat, axit stearic, và tá dược khác, chất tạo màu, chất pha loãng, chất đệm, chất phân huỷ, chất thấm ướt, chất bảo quản, chất tạo hương vị, và tá dược được dụng khác. Dạng viên hình thoi có thể chứa chất tương tự theo sáng chế trong hương vị, thường là sucroza và acaxia hoặc tragacanth, cũng như viên ngậm chứa chất tương tự theo sáng chế trong chất nền trợ, như gelatin và glyxerin, hoặc sucroza và acaxia, nhũ tương, gel, và các dạng tương tự chứa, ngoài ra, các tá dược như đã biết trong lĩnh vực.

Chất tương tự theo sáng chế, một mình hoặc ở dạng kết hợp với thành phần thích hợp khác, có thể được phân phối qua phổi và có thể được tạo thành chế phẩm sol khí để được sử dụng bằng cách xông. Các chế phẩm sol khí có thể được đặt vào chất nổ đẩy chấp nhận được được nén, như diclodiflometan, propan, nitơ, và các chất tương tự. Chúng còn có thể được tạo chế phẩm dưới dạng được phẩm cho các chế phẩm không nén, như trong ống phun hoặc máy phun. Chế phẩm phun này còn có thể được sử dụng để phun niêm mạc. Theo một số phương án, chất tương tự được tạo chế phẩm thành hỗn hợp bột hoặc vào vi hạt hoặc hạt nano. Chế phẩm dùng qua đường phổi thích hợp là đã biết trong lĩnh vực. Xem tài liệu, ví dụ, Qian et al., *Int J Pharm* 366: 218-220 (2009); Adjei and Garren, *Pharmaceutical Research*, 7(6): 565-569 (1990); Kawashima et al., *J Controlled Release* 62(1-2): 279-287 (1999); Liu et al., *Pharm Res* 10 (2): 228-232 (1993); đơn sáng chế quốc tế số công bố WO 2007/133747 và WO 2007/141411.

Chế phẩm thích hợp để sử dụng ngoài đường tiêu hóa gồm dung dịch tiêm vô trùng đẳng trương chứa nước và không chứa nước, mà có thể chứa chất chống oxy hoá, chất đệm, chất kìm hãm vi khuẩn, và chất hoà tan mà làm cho chế phẩm đẳng trương với máu của thể nhận dự kiến, và hỗn dịch vô trùng chứa nước và không chứa nước mà có thể bao gồm chất tạo huyền phù, chất làm tan, chất làm đặc, chất làm ổn định, và chất bảo quản. Thuật ngữ "ngoài đường tiêu hóa" nghĩa là không qua đường dinh dưỡng mà qua một số đường khác như dưới da, trong cơ, trong cột sống, hoặc trong tĩnh mạch. Chất tương tự theo sáng chế có thể được sử dụng với chất pha loãng chấp nhận được về mặt sinh lý trong chất mang được dụng, như dịch lỏng vô trùng hoặc hỗn hợp của các chất lỏng, gồm nước, nước muối, dextroza chứa nước và dung dịch đường liên quan, rượu, như etanol hoặc rượu hexadexyl, glycol, như propylen glycol hoặc polyetylen glycol, dimetylsulfoxit, glyxerol, ketal như 2,2-dimetyl-153-

dioxolan-4-metanol, etc, poly(etylenglycol) 400, dầu, axit béo, este axit béo hoặc glyxerit, hoặc chất hoạt động bề mặt được dùng bổ sung hoặc không bổ sung glyxerit axit béo được axetyl hoá, như xà phòng hoặc chất sát trùng, chất tạo huyền phù, như pectin, cacbome, metylxenluloza, hydroxypropylmetylxenluloza, hoặc carboxymetylxenluloza, hoặc chất nhũ hoá và chất bổ trợ khác.

Dầu, mà có thể được sử dụng trong chế phẩm dùng ngoài đường tiêu hóa gồm dầu mỏ, dầu động vật, dầu thực vật, hoặc dầu tổng hợp. Ví dụ cụ thể về dầu gồm dầu lạc, dầu đậu nành, dầu vừng, dầu hạt bông, dầu ngô, dầu ô liu, dầu mỏ, và dầu khoáng. Axit béo thích hợp để sử dụng trong chế phẩm dùng ngoài đường tiêu hóa gồm axit oleic, axit stearic và axit isostearic. Etyl oleat và isopropyl myristat là ví dụ về este axit béo thích hợp.

Xà phòng thích hợp để sử dụng trong chế phẩm dùng ngoài đường tiêu hóa gồm muối kim loại kiềm béo, muối amoni, và muối trietanolamin, và chất tẩy rửa thích hợp gồm (a) chất tẩy rửa cation như, ví dụ, dimetyl dialkyl amoni halogenua, và alkyl pyridinium halogenua, (b) chất tẩy rửa anion như, ví dụ, alkyl, aryl, và olefin sulfonat, alkyl, olefin, etc, và monoglyxerit sulfat, và sulfosuxinat, (c) chất tẩy rửa không ion như, ví dụ, amin oxit béo, axit béo alkanolamit, và copolyme polyoxyetylenpolypropylen, (d) chất tẩy rửa lưỡng tính như, ví dụ, alkyl- β -aminopropionat, và muối amoni bậc bốn 2-alkyl-imidazolin, và (e) hỗn hợp của chúng.

Chế phẩm gốc có thể được trình bày ở trong đồ chứa được bịt kín dạng liều đơn vị hoặc đa liều, như ống thuốc tiêm và lọ nhỏ, và có thể được bảo quản ở điều kiện sấy thăng hoa (được làm đông khô) chỉ cần bổ sung tá dược lỏng vô trùng, ví dụ, nước, để tiêm, ngay trước khi sử dụng. Dung dịch và hỗn dịch tiêm chế ngay lúc dùng có thể được điều chế từ loại bột, hạt cơm, và viên nén vô trùng đã biết trong lĩnh vực.

Chế phẩm tiêm được là thuộc phạm vi của sáng chế. Yêu cầu về chất mang được dùng hữu hiệu dùng cho hợp phần tiêm là đã biết với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này (Xem tài liệu, ví dụ, *Pharmaceutics and Pharmacy Practice*, J. B. Lippincott Company, Philadelphia, PA, Banker and Chalmers, eds., pages 238-250 (1982), và *ASHP Handbook on Injectable Drugs*, Toissel, 4th ed., pages 622-630 (1986)).

Ngoài ra, chất tương tự theo sáng chế có thể được tạo thành thuốc đạn để dùng qua đường trực tràng bằng cách trộn với các loại chất nền khác nhau, như chất nền nhũ hoá hoặc chất nền tan được trong nước. Chế phẩm thích hợp để dùng qua âm đạo có thể ở dạng thuốc đặt âm đạo, nút thấm, kem, gel, bột nhão, bột, hoặc chế phẩm phun chứa, ngoài thành phần hoạt tính, các chất mang như đã biết trong lĩnh vực khi thích hợp.

Người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này hiểu rõ rằng, ngoài được phẩm nêu trên, chất tương tự theo sáng chế có thể được tạo chế phẩm dưới dạng phức hệ bao thể, như phức hệ bao thể cyclodextrin, hoặc liposom.

Liều dùng

Chất tương tự theo sáng chế được tin là hữu dụng trong phương pháp điều trị bệnh hoặc tình trạng bệnh trong đó có vai trò của cơ chế chủ vận thụ thể glucagon, cơ chế chủ vận thụ thể GLP-1, hoặc cơ chế đồng chủ vận thụ thể glucagon/thụ thể GLP-1. Nhằm thực hiện mục đích của sáng chế, lượng hoặc liều của chất tương tự theo sáng chế được dùng cần phải đủ để có hiệu quả, ví dụ, đáp ứng việc trị liệu hoặc phòng bệnh, ở đối tượng hoặc động vật trong khung thời gian hợp lý. Ví dụ, liều dùng của chất tương tự theo sáng chế phải đủ để kích thích sự tiết cAMP từ tế bào như nêu trong bản mô tả này hoặc đủ để làm giảm mức glucoza trong máu, hàm lượng chất béo, hàm lượng hấp thụ thức ăn, hoặc cân nặng của động vật có vú, trong khoảng thời gian từ khoảng 1 đến 4 phút, 1 đến 4 giờ hoặc 1 đến 4 tuần hoặc lâu hơn, ví dụ, từ 5 đến 20 tuần hoặc nhiều tuần hơn, tính từ thời gian dùng thuốc. Theo phương án nhất định, khoảng thời gian có thể thậm chí là dài hơn. Liều lượng sẽ được xác định bằng hiệu quả của chất tương tự cụ thể trong bản mô tả này và tình trạng bệnh của động vật (ví dụ, người), cũng như cân nặng của động vật (ví dụ, người) cần được điều trị.

Nhiều thử nghiệm để xác định liều dùng là đã biết trong lĩnh vực. Nhằm đạt được mục đích nêu trong bản mô tả này, thử nghiệm, mà bao gồm việc so sánh mức độ giảm lượng glucoza trong máu khi sử dụng liều xác định của chất tương tự theo sáng chế cho động vật có vú trong số các động vật có vú mà mỗi con vật được cho dùng liều khác nhau của chất tương tự, có thể được sử dụng để xác định liều bắt đầu cần dùng cho động vật có vú. Mức độ giảm lượng glucoza trong máu khi dùng liều có thể được

làm thử nghiệm bằng phương pháp đã biết trong lĩnh vực, gồm, ví dụ, phương pháp được nêu trong bản mô tả này dưới dạng Ví dụ 4.

Liều của chất tương tự theo sáng chế sẽ còn được xác định bởi sự tồn tại, bản chất và mức độ của tác dụng phụ bất lợi bất kỳ mà có thể đi kèm việc sử dụng chất tương tự cụ thể theo sáng chế. Thông thường, bác sĩ tham gia sẽ quyết định liều dùng của chất tương tự theo sáng chế để điều trị cho mỗi bệnh nhân, xem xét đến nhiều yếu tố, như tuổi tác, cân nặng, tình trạng sức khỏe chung, chế độ ăn, giới tính, chất tương tự được sử dụng theo sáng chế, đường dùng, và mức độ nghiêm trọng của tình trạng bệnh được điều trị. Bằng cách lấy ví dụ và không nhằm giới hạn sáng chế, liều của chất tương tự theo sáng chế có thể nằm trong khoảng từ 0,0001 đến 1 g/kg cân nặng của đối tượng được điều trị/ngày, từ khoảng 0,0001 đến 0,001 g/kg cân nặng/ngày, hoặc khoảng 0,01 mg đến 1 g/kg cân nặng/ngày.

Theo một số phương án, dược phẩm chứa chất tương tự bất kỳ được bộc lộ trong bản mô tả này ở mức độ tinh khiết thích hợp để sử dụng cho bệnh nhân. Theo một số phương án, chất tương tự có mức độ tinh khiết là ít nhất khoảng 90%, khoảng 91%, khoảng 92%, khoảng 93%, khoảng 94%, khoảng 95%, khoảng 96%, khoảng 97%, khoảng 98% hoặc khoảng 99%, và chất pha loãng, chất mang hoặc tá dược được dùng. Theo một số khía cạnh, dược phẩm chứa chất tương tự theo sáng chế ở nồng độ ít nhất là A, trong đó A là khoảng 0,001 mg/ml, khoảng 0,01 mg/ml, khoảng 0,1 mg/ml, khoảng 0,5 mg/ml, khoảng 1 mg/ml, khoảng 2 mg/ml, khoảng 3 mg/ml, khoảng 4 mg/ml, khoảng 5 mg/ml, khoảng 6 mg/ml, khoảng 7 mg/ml, khoảng 8 mg/ml, khoảng 9 mg/ml, khoảng 10 mg/ml, khoảng 11 mg/ml, khoảng 12 mg/ml, khoảng 13 mg/ml, khoảng 14 mg/ml, khoảng 15 mg/ml, khoảng 16 mg/ml, khoảng 17 mg/ml, khoảng 18 mg/ml, khoảng 19 mg/ml, khoảng 20 mg/ml, khoảng 21 mg/ml, khoảng 22 mg/ml, khoảng 23 mg/ml, khoảng 24 mg/ml, khoảng 25 mg/ml hoặc cao hơn. Theo một số phương án, dược phẩm chứa chất tương tự ở nồng độ nhiều nhất là B, trong đó B là khoảng 30 mg/ml, khoảng 25 mg/ml, khoảng 24 mg/ml, khoảng 23 mg/ml, khoảng 22 mg/ml, khoảng 21 mg/ml, khoảng 20 mg/ml, khoảng 19 mg/ml, khoảng 18 mg/ml, khoảng 17 mg/ml, khoảng 16 mg/ml, khoảng 15 mg/ml, khoảng 14 mg/ml, khoảng 13 mg/ml, khoảng 12 mg/ml, khoảng 11 mg/ml, khoảng 10 mg/ml, khoảng 9 mg/ml, khoảng 8 mg/ml, khoảng 7 mg/ml, khoảng 6 mg/ml, khoảng 5 mg/ml, khoảng 4 mg/ml, khoảng 3 mg/ml, khoảng 2 mg/ml, khoảng 1 mg/ml, hoặc

khoảng 0,1 mg/ml. Theo một số phương án, dược phẩm có thể chứa chất tương tự ở khoảng nồng độ từ A đến B mg/ml, ví dụ, khoảng từ 0,001 đến 30,0 mg/ml.

Dạng hướng đích

Người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này sẽ hiểu rằng chất tương tự theo sáng chế có thể được biến đổi theo nhiều cách, sao cho hiệu quả trị liệu hoặc phòng bệnh của chất tương tự theo sáng chế được tăng lên nhờ sự biến đổi này. Ví dụ, chất tương tự theo sáng chế có thể được tiếp hợp hoặc trực tiếp hoặc gián tiếp thông qua liên kết với gốc hướng đích. Việc thực hiện tiếp hợp các hợp chất, ví dụ, chất tương tự glucagon được nêu trong bản mô tả này, với các gốc hướng đích là đã biết trong lĩnh vực. Xem, ví dụ, Wadhwa et al., *J Drug Targeting*, 3, 111-127 (1995) và patent Mỹ số 5,087,616. Thuật ngữ "gốc hướng đích" trong bản mô tả này, chỉ phân tử bất kỳ hoặc chất bất kỳ mà nhận diện và liên kết đặc hiệu với thụ thể bề mặt tế bào, sao cho gốc hướng đích hướng sự chuyển chất tương tự theo sáng chế đến quần thể tế bào mà trên bề mặt này thụ thể (thụ thể glucagon, thụ thể GLP-1) được biểu hiện. Các gốc hướng đích bao gồm, nhưng không giới hạn ở, kháng thể, hoặc mảnh của chúng, peptit, hormon, yếu tố tăng trưởng, xytokin, và các phối tử tự nhiên hoặc không tự nhiên bất kỳ, mà liên kết với thụ thể bề mặt tế bào (ví dụ, thụ thể yếu tố tăng trưởng biểu mô (EGFR), thụ thể tế bào T (TCR), thụ thể tế bào B (BCR), CD28, thụ thể yếu tố tăng trưởng có nguồn gốc tiểu cầu (PDGF), thụ thể axetylcholin nicotin (nAChR), v.v.). Trong bản mô tả này "phần liên kết" là liên kết, phân tử hoặc nhóm phân tử mà liên kết hai thực thể riêng biệt với nhau. Các phần liên kết có thể tạo ra khoảng không gian tối ưu của hai thực thể hoặc có thể cung cấp thêm liên kết không bền mà cho phép hai thực thể được tách riêng ra. Liên kết không bền bao gồm các nhóm cắt được bằng ánh sáng, các gốc không bền với axit, các gốc không bền với bazơ và nhóm phân cắt được bằng enzym. Thuật ngữ "phần liên kết" theo một số phương án chỉ chất hoặc phân tử bất kỳ mà bắc cầu chất tương tự theo sáng chế với gốc hướng đích. Người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này hiểu rằng vị trí trên chất tương tự theo sáng chế, mà không cần thiết cho chức năng của chất tương tự theo sáng chế, là vị trí lý tưởng để gắn phần liên kết và/hoặc gốc hướng đích, với điều kiện là phần liên kết và/hoặc gốc hướng đích, khi được gắn với chất tương tự theo sáng chế, không can thiệp vào chức năng của chất tương tự theo sáng chế, tức là, khả năng kích thích sự tiết cAMP từ tế bào, để điều trị bệnh tiểu đường hoặc chứng béo phì.

Chế phẩm giải phóng có kiểm soát

Theo cách khác, chất tương tự glucagon được nêu trong bản mô tả này có thể được biến đổi thành dạng nền, sao cho phương thức giải phóng chất tương tự theo sáng chế vào cơ thể bằng cách sử dụng chất này được kiểm soát về thời gian và vị trí trong cơ thể (xem, ví dụ, patent Mỹ số 4,450,150). Dạng nền của chất tương tự theo sáng chế có thể là, ví dụ, chế phẩm có thể cấy ghép chứa chất tương tự theo sáng chế và vật liệu xếp hoặc không xếp, như polyme, trong đó chất tương tự theo sáng chế được bao bởi hoặc được khuếch tán qua vật liệu này và/hoặc sự phân hủy vật liệu không xếp. Sau đó, nền được cấy vào vị trí mong muốn trong cơ thể và chất tương tự theo sáng chế được giải phóng từ vật cấy ở tốc độ định trước.

Theo khía cạnh nhất định, dược phẩm được biến đổi để có kiểu profin giải phóng *in vivo*. Theo một số khía cạnh, dược phẩm là chế phẩm giải phóng tức thì, giải phóng có kiểm soát, giải phóng duy trì, giải phóng kéo dài, giải phóng muộn, hoặc giải phóng hai pha. Phương pháp tạo chế phẩm peptit để giải phóng có kiểm soát là đã biết trong lĩnh vực. Xem tài liệu, ví dụ, Qian et al., *J Pharm* 374: 46-52 (2009) và đơn sáng chế quốc tế số công bố WO 2008/130158, WO2004/033036; WO2000/032218; và WO 1999/040942.

Các chế phẩm dùng ngay có thể còn chứa, ví dụ, mixen hoặc liposom, hoặc một số dạng được bao khác, hoặc có thể được sử dụng ở dạng giải phóng kéo dài để thu được tác dụng bảo quản và/hoặc phân phối kéo dài. Dược phẩm được bọc lỏ có thể được sử dụng theo chế độ bất kỳ gồm, ví dụ, hàng ngày (1 lần một ngày, 2 lần một ngày, 3 lần một ngày, 4 lần một ngày, 5 lần một ngày, 6 lần một ngày), hai ngày một lần, ba ngày một lần, bốn ngày một lần, năm ngày một lần, sáu ngày một lần, hàng tuần, hai tuần một lần, ba tuần một lần, hàng tháng, hoặc hai tháng một lần.

Dạng kết hợp

Chất tương tự glucagon được nêu trong bản mô tả này có thể được sử dụng một mình hoặc ở dạng kết hợp với chất trị liệu khác mà nhằm để điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh hoặc tình trạng bệnh bất kỳ được nêu trong bản mô tả này. Ví dụ, chất tương tự glucagon được nêu trong bản mô tả này có thể được dùng cùng với (đồng thời hoặc nối tiếp) chất chống tiểu đường hoặc chất chống béo phì. Chất chống tiểu đường đã biết trong lĩnh vực hoặc đang được nghiên cứu gồm insulin, leptin, peptit YY (PYY), peptit

tụy (PP), yếu tố tăng trưởng nguyên bào sợi 21 (FGF21), các chất chủ vận thụ thể Y2Y4, sulfonylure, như tolbutamit (orinaza), axetohexamit (Dymelor), tolazamit (Tolinase), clopropamit (Diabinese), glipizit (Glucotrol), glyburit (Diabeta, Micronase, Glynase), glimepirit (Amaryl), hoặc gliclazit (Diamicron); meglitin, như repaglinit (Prandin) hoặc nateglinit (Starlix); biguanit như metformin (Glucophage) hoặc phenformin; thiazolidindion như rosiglitazon (Avandia), pioglitazon (Actos), hoặc troglitazon (Rezulin), hoặc chất ức chế PPAR γ khác; chất ức chế alpha glucosidaza mà ức chế sự phân cắt hydratcacbon, như miglitol (Glyset), acarboza (Precose/Glucobay); exenatit (Byetta) hoặc pramlintit; chất ức chế dipeptidyl peptidaza-4 (DPP-4) như vildagliptin hoặc sitagliptin; chất ức chế SGLT (chất vận chuyển glucoza phụ thuộc natri 1); chất hoạt hoá glucokinaza (GKA); chất đối kháng thụ thể glucagon (GRA); hoặc chất ức chế FBPaza (fructoza 1,6-bisphosphataza).

Chất chống béo phì đã biết trong lĩnh vực hoặc đang được nghiên cứu gồm chất ức chế sự ngon miệng, gồm chất kích thích loại phenetylamin, phentermin (tùy ý với fenfluramin hoặc dexfenfluramin), diethylpropion (Tenuate®), phendimetrazin (Prelu-2®, Bontril®), benzphetamin (Didrex®), sibutramin (Meridia®, Reductil®); rimonabant (Acomplia®), chất đối kháng thụ thể cannabinoit khác; oxyntomodulin; fluoxetin hydroclorua (Prozac); Qnexa (topiramet và phentermin), Excalia (bupropion và zonisamit) hoặc Contrave (bupropion và naltrexon); hoặc chất ức chế lipaza, tương tự với XENICAL (Orlistat) hoặc Cetilistat (còn gọi là ATL-962), hoặc GT 389-255.

Peptit được nêu trong bản mô tả này theo một số phương án được dùng cùng với chất để điều trị bệnh gan nhiễm mỡ không do rượu hoặc NASH. Các chất được sử dụng để điều trị bệnh gan nhiễm mỡ không do rượu gồm axit ursodeoxycholic (a.k.a., Actigall, URSO, và Ursodiol), Metformin (Glucophage), rosiglitazon (Avandia), Clofibrat, Gemfibrozil, Polymixin B và Betain.

Peptit được nêu trong bản mô tả này theo một số phương án được dùng cùng với chất để điều trị bệnh thoái hóa thần kinh, ví dụ, bệnh Parkinson. Ngoài ra, chất chống bệnh Parkinson là đã biết trong lĩnh vực và gồm, nhưng không giới hạn ở, levodopa, carbidopa, chất chống tiết cholin, bromocriptin, pramipexol, và ropinirol, amantadin và rasagilin.

Trong phần trên đây, sáng chế cũng đề xuất được phẩm và bộ kit còn chứa thêm một trong số các chất trị liệu khác. Chất trị liệu khác có thể được sử dụng đồng thời hoặc nối tiếp với chất tương tự theo sáng chế. Theo một số khía cạnh, chất tương tự được sử dụng trước chất trị liệu khác, trong khi theo khía cạnh khác, chất tương tự được sử dụng sau chất trị liệu khác.

Sử dụng

Được dự định rằng chất tương tự glucagon được nêu trong bản mô tả này và được phẩm liên quan là hữu dụng để điều trị bệnh hoặc tình trạng bệnh, trong đó ví dụ, sự thiếu hoạt tính ở thụ thể glucagon, thụ thể GLP-1, hoặc cả hai thụ thể, là yếu tố ở giai đoạn khởi phát và/hoặc tiến triển của bệnh hoặc tình trạng bệnh. Theo đó, sáng chế mô tả phương pháp điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh hoặc tình trạng bệnh ở bệnh nhân, trong đó bệnh hoặc tình trạng bệnh là bệnh có tình trạng thiếu sự hoạt hoá thụ thể GLP-1 và/hoặc sự hoạt hoá thụ thể glucagon là có liên quan đến sự khởi phát và/hoặc sự tiến triển của bệnh có tình trạng này. Phương pháp bao gồm bước cung cấp cho bệnh nhân chất tương tự bất kỳ được nêu trong bản mô tả này ở lượng hữu hiệu để điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh hoặc tình trạng bệnh.

Theo một số phương án, bệnh hoặc tình trạng bệnh là hội chứng chuyển hoá. Hội chứng chuyển hoá, còn gọi là hội chứng chuyển hoá X, hội chứng kháng insulin hay hội chứng Reaven, là rối loạn ảnh hưởng tới hơn 50 triệu người Mỹ. Hội chứng chuyển hoá thường đặc trưng ở sự hợp nhóm của ít nhất ba hoặc nhiều hơn ba trong số các yếu tố nguy cơ sau: (1) chứng béo bụng (mô mỡ dư thừa ở xung quanh bụng), (2) chứng rối loạn chuyển hoá mỡ gây ra chứng xơ vữa động mạch (rối loạn mỡ máu gồm triglycerit cao, HDL cholesterol thấp và LDL cholesterol cao mà làm tăng sự tích lũy của mảng bám trong thành động mạch), (3) huyết áp cao, (4) tính kháng insulin hoặc không dung nạp glucoza, (5) trạng thái prothrombotic (ví dụ, chất ức chế chất hoạt hoá fibrinogen hoặc plasminogen-1 trong máu cao), và (6) tình trạng tiền viêm (ví dụ, protein phản ứng C tăng trong máu trong máu). Các yếu tố nguy cơ khác có thể bao gồm sự lão hóa, sự mất cân bằng hormon và bẩm chất di truyền.

Hội chứng chuyển hoá có liên quan đến nguy cơ mắc bệnh tim động mạch vành tăng và rối loạn khác liên quan đến sự tích lũy của mảng bám mạch, như chứng đột quỵ và bệnh mạch ngoại vi, được gọi là bệnh tim mạch do xơ vữa động mạch

(ASCVD). Bệnh nhân mắc hội chứng chuyển hoá có thể tiến triển từ trạng thái kháng insulin trong giai đoạn sớm của nó thành bệnh tiểu đường typ II phát triển mạnh với nguy cơ mắc ASCVD tăng. Không bị giới hạn bởi lý thuyết bất kỳ, mối liên hệ giữa tính kháng insulin, hội chứng chuyển hoá với bệnh về mạch có thể bao gồm một hoặc nhiều cơ chế gây bệnh đồng thời gồm sự giãn mạch được kích thích bởi insulin suy yếu, sự giảm tính có sẵn NO liên quan đến tính kháng insulin do sức ép oxy hoá tăng, và sự bất thường trong hormon có nguồn gốc tế bào tạo mỡ như adiponectin (Lteif and Mather, Can. J. Cardiol. 20 (suppl. B):66B-76B (2004)).

Theo Bảng điều trị cho người trưởng thành theo chương trình giáo dục cholesterol quốc gia 2001 (2001 National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel (ATP III), đặc điểm bất kỳ trong số ba đặc điểm sau đây ở cùng một cá thể đáp ứng tiêu chuẩn của hội chứng chuyển hoá: (a) chứng béo bụng (vòng eo vượt quá 102cm ở nam và vượt quá 88cm ở nữ); (b) triglyxerit trong huyết thanh (150 mg/dl hoặc cao hơn); (c) HDL cholesterol (40 mg/dl hoặc thấp hơn ở nam và 50 mg/dl hoặc thấp hơn ở nữ); (d) huyết áp (130/85 hoặc cao hơn); và (e) glucoza trong máu khi đói (110 mg/dl hoặc cao hơn). Theo Tổ chức Y tế Thế giới (WHO), cá thể có hàm lượng insulin cao (glucoza trong máu khi đói tăng hoặc chỉ glucoza sau bữa ăn tăng một) với ít nhất hai tiêu chuẩn sau đây đáp ứng tiêu chuẩn của hội chứng chuyển hoá: (a) chứng béo bụng (tỷ lệ vòng eo so với vòng hông lớn hơn 0,9, chỉ số khối cơ thể ít nhất là 30 kg/m^2 , hoặc số đo vòng eo vượt quá 37 inxơ (94cm)); (b) bảng cholesterol thể hiện hàm lượng triglyxerit ít nhất là 150 mg/dl hoặc HDL cholesterol thấp hơn 35 mg/dl; (c) huyết áp là 140/90 hoặc cao hơn, hoặc khi điều trị huyết áp cao). (Mathur, Ruchi, "Metabolic Syndrome," ed. Shiel, Jr., William C., MedicineNet.com, May 11, 2009).

Nhằm đạt được mục đích nêu trong bản mô tả này, nếu cá thể đáp ứng một trong hai tiêu chuẩn hoặc cả hai tiêu chuẩn đặt ra bởi Bảng điều trị cho người trưởng thành theo chương trình giáo dục cholesterol quốc gia 2001 (2001 National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel) hoặc WHO, cá thể đó được coi là bị mắc hội chứng chuyển hoá.

Không bị giới hạn bởi lý thuyết cụ thể bất kỳ, peptit được nêu trong bản mô tả này là hữu dụng để điều trị hội chứng chuyển hoá. Vì vậy, sáng chế mô tả phương pháp ngăn ngừa hoặc điều trị hội chứng chuyển hoá, hoặc làm giảm một, hai, ba hoặc

nhiều hơn ba yếu tố nguy cơ của chúng, ở đối tượng, bao gồm bước cung cấp cho đối tượng chất tương tự được nêu trong bản mô tả này ở lượng hữu hiệu để ngăn ngừa hoặc điều trị hội chứng chuyển hoá, hoặc yếu tố nguy cơ của chúng.

Theo một số phương án, phương pháp nêu trên điều trị tình trạng bệnh tăng glucoza huyết. Theo các khía cạnh này, tình trạng bệnh tăng glucoza huyết là bệnh tiểu đường, bệnh tiểu đường typ I, bệnh tiểu đường typ II, hoặc bệnh tiểu đường thời kỳ thai nghén, phụ thuộc insulin hoặc không phụ thuộc insulin. Theo một số khía cạnh, phương pháp nêu trên điều trị tình trạng bệnh tăng glucoza huyết bằng cách làm giảm một hoặc nhiều biến chứng của bệnh tiểu đường gồm bệnh thận, bệnh màng lưới và bệnh mạch.

Theo một số khía cạnh, bệnh hoặc tình trạng bệnh là chứng béo phì. Theo một số khía cạnh, chứng béo phì là chứng béo phì do thuốc gây ra. Theo một số khía cạnh, phương pháp nêu trên điều trị chứng béo phì bằng cách ngăn ngừa hoặc làm giảm sự tăng cân hoặc làm tăng sự giảm trọng lượng ở bệnh nhân. Theo một số khía cạnh, phương pháp nêu trên điều trị chứng béo phì bằng cách làm giảm sự ngon miệng, làm giảm sự hấp thụ thức ăn, làm giảm hàm lượng chất béo ở bệnh nhân, hoặc làm giảm tốc độ vận chuyển thức ăn qua hệ dạ dày-ruột.

Vì chứng béo phì có liên quan đến sự khởi phát hoặc sự tiến triển của các bệnh khác, phương pháp điều trị chứng béo phì còn hữu dụng trong phương pháp làm giảm các biến chứng có liên quan đến chứng béo phì gồm bệnh về mạch (bệnh động mạch vành, chứng đột quỵ, bệnh mạch ngoại vi, tổn thương tái đầy máu do thiếu máu cục bộ, v.v.), chứng tăng huyết áp, sự khởi phát của bệnh tiểu đường typ II, chứng tăng lipit huyết và bệnh cơ xương. Vì vậy, sáng chế mô tả phương pháp điều trị hoặc ngăn ngừa biến chứng liên quan đến chứng béo phì.

Theo một số phương án, bệnh hoặc tình trạng bệnh là bệnh gan nhiễm mỡ không do rượu (NAFLD). NAFLD là phổ rộng của bệnh gan bao gồm từ gan nhiễm mỡ đơn giản (chứng nhiễm mỡ), đến bệnh viêm gan do mỡ không do rượu (NASH), đến bệnh xơ gan (sự tạo sẹo tăng cường, không thể đảo ngược của gan). Tất cả các giai đoạn của NAFLD thường có sự tích lũy của chất béo (sự xâm nhập chất béo) trong các tế bào gan. Gan nhiễm mỡ đơn giản là sự tích lũy bất thường của một loại chất béo nhất định, triglyxerit, trong tế bào gan khi không xuất hiện viêm hoặc tạo sẹo. Trong

NASH, sự tích lũy chất béo có liên quan đến mức độ khác nhau của chứng viêm (bệnh viêm gan) và sự tạo sẹo (chứng xơ hóa) của gan. Tế bào viêm có thể phá hủy tế bào gan (sự hoại tử tế bào gan). Trong các thuật ngữ "bệnh viêm gan do mỡ" và "sự hoại tử mỡ", mỡ dùng để chỉ sự xâm nhập chất béo, bệnh viêm gan chỉ chứng viêm ở trong gan, và hoại tử chỉ sự phá hủy tế bào gan. NASH cuối cùng có thể dẫn đến sự tạo sẹo của gan (chứng xơ hóa) và sau đó là sự tạo sẹo tăng cường, không thể đảo ngược (bệnh xơ gan). Bệnh xơ gan do NASH gây ra là giai đoạn cuối cùng và nghiêm trọng nhất trong phổ NAFLD. (Mendler, Michel, "Fatty Liver: Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) and Nonalcoholic Steatohepatitis (NASH)," ed. Schoenfield, Leslie J., MedicineNet.com, August 29, 2005).

Bệnh gan do rượu, hoặc bệnh gan bị kích ứng bởi rượu, bao gồm ba bệnh gan khác nhau theo bệnh học liên quan đến hoặc gây ra bởi sự hấp thụ rượu quá mức: gan nhiễm mỡ (chứng nhiễm mỡ), bệnh viêm gan mạn tính hoặc cấp tính, và bệnh xơ gan. Bệnh viêm gan do rượu có thể là từ bệnh viêm gan nhẹ, với thử nghiệm trong phòng thí nghiệm bất thường là chỉ báo duy nhất về bệnh, đến rối loạn chức năng gan nghiêm trọng có biểu chứng như bệnh vàng da (da vàng gây ra do sự giữ lại bilirubin), bệnh não do gan (sự rối loạn chức năng thần kinh gây ra bởi sự hư hỏng gan), cổ trướng (sự tích lũy dịch lỏng trong bụng), chứng giãn tĩnh mạch thực quản chảy máu (tĩnh mạch bị giãn trong thực quản), sự đông tụ máu bất thường và hôn mê. Về mặt mô học, bệnh viêm gan do rượu có đặc điểm bề ngoài với sự thoái hóa phồng căng của tế bào gan, chứng viêm với bạch cầu trung tính và đôi khi có các thể Mallory (sự kết tụ bất thường của protein sợi chất trung gian tế bào). Bệnh xơ gan được đặc trưng về mặt giải phẫu bởi cục u nhỏ lan rộng trong gan kết hợp với chứng xơ hóa. (Worman, Howard J., "Alcoholic Liver Disease", Columbia University Medical Center website).

Không bị giới hạn bởi lý thuyết cụ thể bất kỳ, chất tương tự được nêu trong bản mô tả này là hữu dụng để điều trị bệnh gan do rượu, NAFLD, hoặc giai đoạn bất kỳ của chúng, gồm, ví dụ, chứng nhiễm mỡ, bệnh viêm gan do mỡ, bệnh viêm gan, chứng viêm gan, NASH, bệnh xơ gan, hoặc biến chứng của chúng. Vì vậy, sáng chế mô tả phương pháp ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh gan do rượu, NAFLD, hoặc giai đoạn bất kỳ của chúng, ở đối tượng bao gồm bước cung cấp cho đối tượng chất tương tự được nêu trong bản mô tả này ở lượng hữu hiệu để ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh gan do rượu, NAFLD, hoặc giai đoạn của chúng. Phương pháp điều trị này bao gồm việc làm

giảm một, hai, ba hoặc nhiều hơn ba yếu tố sau: lượng mỡ ở gan, phạm vi tác động hoặc sự tiến triển của bệnh xơ gan, phạm vi tác động của ung thư biểu mô tế bào gan, dấu hiệu của chứng viêm, ví dụ, mức enzym ở gan bất thường (ví dụ, aspartat aminotransferaza AST và/hoặc alanin aminotransferaza ALT, hoặc LDH), ferritin trong huyết thanh tăng, bilirubin trong huyết thanh tăng, và/hoặc dấu hiệu của chứng xơ hóa, ví dụ, mức TGF-beta tăng. Theo các phương án được ưu tiên, peptit được sử dụng để điều trị cho bệnh nhân mắc bệnh gan nhiễm mỡ đơn giản đã tiến triển (chứng nhiễm mỡ) và có dấu hiệu viêm hoặc viêm gan. Phương pháp này có thể dẫn đến, ví dụ, việc giảm mức AST và/hoặc ALT.

GLP-1 và exendin-4 đã được thể hiện là có tác dụng bảo vệ thần kinh nhất định. Sáng chế còn mô tả việc sử dụng chất tương tự glucagon được nêu trong bản mô tả này trong việc điều trị bệnh thoái hóa thần kinh, bao gồm nhưng không giới hạn ở bệnh Alzheimer, bệnh Parkinson, bệnh đa xơ cứng, bệnh xơ cứng phần bên teo cơ, rối loạn liên quan đến sự mất myelin khác, bệnh sa sút trí tuệ tuổi già, bệnh sa sút trí tuệ dưới vỏ, bệnh sa sút trí tuệ xơ cứng động mạch, bệnh sa sút trí tuệ liên quan đến bệnh SIDA, hoặc bệnh sa sút trí tuệ khác, ung thư hệ thần kinh trung ương, tổn thương não do chấn thương, tổn thương tuỷ sống, chứng đột quỵ hoặc chứng thiếu máu cục bộ não, viêm mạch não, bệnh động kinh, bệnh Huntington, hội chứng chứng Tourette, hội chứng Guillain Barre, bệnh Wilson, bệnh Pick, rối loạn viêm thần kinh, viêm não, bệnh viêm não và dây cột sống hoặc bệnh viêm màng não có nguồn gốc virus, nấm hoặc vi khuẩn, hoặc bệnh nhiễm khuẩn hệ thần kinh trung ương khác, bệnh prion, sự mất điều hoà tiểu não, sự thoái hoá tiểu não, hội chứng thoái hoá tuỷ sống tiểu não, sự mất điều hoà Friedreichs, chứng giãn mao mạch mất điều hoà, loạn dinh dưỡng cơ tuỷ sống, chứng liệt trên nhân tiến triển, rối loạn trương lực, tình trạng co cứng cơ, tình trạng chạy, sự nhiễm sắc tố võng mạc, sự thoái hoá chất xám có vân, bệnh não-cơ ty thể, sự tích trữ bất thường sắc tố béo xeroit ở neuron, bệnh não gan, bệnh não thận, bệnh não chuyển hoá, bệnh về não do độc tố gây ra, và tổn thương não do bức xạ gây ra.

Theo một số phương án, bệnh hoặc tình trạng bệnh là chứng tăng glucoza huyết. Theo một số phương án, bệnh nhân là bệnh nhân mắc bệnh tiểu đường và chứng tăng glucoza huyết gây ra bởi việc sử dụng insulin. Theo các khía cạnh cụ thể, phương pháp bao gồm bước cung cấp chất tương tự theo sáng chế ở dạng kết hợp với insulin

sao cho chất tương tự đệm cho tác dụng giảm glucoza huyết của việc sử dụng viên thuốc insulin.

Theo một số phương án, chất tương tự glucagon được sử dụng kết hợp với việc sử dụng chất dinh dưỡng ngoài đường tiêu hóa cho bệnh nhân không mắc bệnh tiêu đường theo sắp đặt bệnh viện, ví dụ, cho bệnh nhân tiếp nhận chất dinh dưỡng ngoài đường tiêu hóa hoặc toàn bộ chất dinh dưỡng ngoài đường tiêu hóa. Ví dụ không làm giới hạn sáng chế gồm bệnh nhân phẫu thuật, bệnh nhân hôn mê, bệnh nhân mắc bệnh đường tiêu hóa, hoặc mất chức năng đường dạ dày-ruột (ví dụ do sự cắt bỏ bằng phẫu thuật, khả năng hấp thụ bị phong bế hoặc suy yếu, bệnh Crohn, viêm loét đại tràng, sự cản trở đường dạ dày-ruột, lỗ rò đường dạ dày-ruột, viêm tụy cấp tính, bệnh ruột thiếu máu cục bộ, phẫu thuật dạ dày-ruột chủ yếu, dị thường đường dạ dày-ruột bẩm sinh, bệnh tiêu chảy kéo dài, hoặc hội chứng ruột ngắn do phẫu thuật, bệnh nhân bị sốc, và bệnh nhân đang trong quá trình lành vết thương thường tiếp nhận việc dùng hydratecarbon ngoài đường tiêu hóa cùng với các hỗn hợp khác nhau của lipid, chất điện phân, chất khoáng, vitamin và axit amin. Chất tương tự glucagon và chế phẩm dinh dưỡng dùng ngoài đường tiêu hóa có thể được sử dụng đồng thời, ở các thời điểm khác nhau, trước, hoặc sau nhau, với điều kiện là chất tương tự glucagon gây ra tác dụng sinh học mong muốn ở thời điểm chế phẩm dinh dưỡng dùng ngoài đường tiêu hóa đang được tiêu hóa. Ví dụ, chất dinh dưỡng dùng ngoài đường tiêu hóa có thể được sử dụng, 1, 2 hoặc 3 lần mỗi ngày, trong khi chất tương tự glucagon được sử dụng khi hai ngày một lần, ba lần một tuần, hai lần một tuần, một lần một tuần, 2 tuần một lần, 3 tuần một lần, hoặc một tháng một lần.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "điều trị" và "ngăn ngừa" cũng như các từ bắt nguồn từ nó, không nhất thiết phải ngụ ý là điều trị hoặc ngăn ngừa 100% hoặc hoàn toàn. Hơn nữa, có các mức độ điều trị hoặc ngăn ngừa khác nhau mà người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này nhận biết là có lợi ích hoặc tác dụng trị liệu tiềm tàng. Về mặt này, phương pháp theo sáng chế có thể tạo ra lượng bất kỳ của mức độ bất kỳ của việc điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh hoặc tình trạng bệnh ở động vật có vú. Ngoài ra, việc điều trị hoặc ngăn ngừa bằng phương pháp này có thể bao gồm điều trị hoặc ngăn ngừa một hoặc nhiều tình trạng bệnh hoặc triệu chứng của bệnh hoặc tình trạng bệnh. Ví dụ, đối với phương pháp điều trị chứng béo phì, phương pháp theo một số phương án, đạt được sự giảm khả năng hấp thụ thức ăn hoặc lượng mỡ ở bệnh nhân.

Ngoài ra, nhằm đạt được mục đích nêu trong bản mô tả này, "sự ngăn ngừa" có thể bao hàm việc làm trễ thời điểm khởi phát bệnh, hoặc triệu chứng hoặc tình trạng bệnh của chúng.

Đối với phương pháp điều trị nêu trên, bệnh nhân là vật chủ bất kỳ. Theo một số phương án, vật chủ là động vật có vú. Trong bản mô tả này, thuật ngữ "động vật có vú" chỉ động vật có xương sống bất kỳ thuộc lớp động vật có vú, bao gồm nhưng không giới hạn ở, động vật đơn huyệt, thú có túi, và thú có nhau (placental taxas) bất kỳ. Theo một số phương án, động vật có vú là một trong số các động vật có vú thuộc bộ Gặm nhấm (Rodentia), như chuột và chuột đồng, và động vật có vú thuộc bộ Thỏ (Lagomorpha), như thỏ. Theo phương án nhất định, động vật có vú là từ bộ Ăn thịt (Carnivora), gồm loài mèo (Felines) và loài chó (Canines). Theo phương án nhất định, động vật có vú là từ bộ Guốc chẵn (Artiodactyla), gồm bò và lợn hoặc bộ Guốc lẻ (Perissodactyla), gồm ngựa. Trong một số ví dụ, động vật có vú thuộc bộ Linh trưởng (Primates), Ceboid, hoặc Simoid (khỉ) hoặc bộ Anthropoids (người và khỉ). Theo phương án cụ thể, động vật có vú là người.

Bộ kit

Chất tương tự glucagon trong bản mô tả này có thể được đề xuất theo một phương án dưới dạng một phần của bộ kit. Vì vậy, theo một số phương án, bộ kit để sử dụng chất tương tự glucagon, ví dụ, peptit chất chủ vận glucagon, cho bệnh nhân trong cần chúng được đề xuất trong đó bộ kit chứa chất tương tự glucagon như nêu trong bản mô tả này.

Theo một phương án, bộ kit được đề xuất có thiết bị để sử dụng chế phẩm glucagon cho bệnh nhân, ví dụ, kim tiêm, dụng cụ dạng bút, dụng cụ tiêm có vòi hoặc dụng cụ tiêm không có kim khác. Bộ kit có thể theo cách khác hoặc còn bao gồm một hoặc nhiều đồ chứa, ví dụ, lọ nhỏ, ống, chai, xy lanh đã được đổ đầy sẵn một hoặc nhiều ngăn, hộp chứa, bơm truyền (bên ngoài hoặc cấy ghép được), dụng cụ tiêm có vòi, dụng cụ dạng bút đã được làm đầy trước và các dụng cụ tương tự, tùy ý chứa chất tương tự glucagon ở dạng đông khô hoặc trong dung dịch chứa nước. Bộ kit theo một số phương án chứa hướng dẫn sử dụng. Theo một phương án, thiết bị của bộ kit là thiết bị phân tán sol khí, trong đó chế phẩm được đóng gói trước trong thiết bị sol khí.

Theo phương án khác, bộ kit chứa xy lanh và kim, và theo một phương án, dược phẩm glucagon vô trùng được đóng gói trước trong xy lanh.

Các ví dụ sau đây được đưa ra chỉ để minh họa cho sáng chế và không làm giới hạn phạm vi của nó.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1

Tổng hợp mảnh peptit của glucagon

Nguyên liệu:

Tất cả các peptit được nêu trong bản mô tả này trong các ví dụ đều được amit hoá trừ khi có chỉ dẫn khác.

Nhựa MBHA (nhựa 4-methylbenzhydrylamin polystyren) được sử dụng trong quá trình tổng hợp peptit. Nhựa MBHA, mắt lưới 100-180, 1% polystyren được liên kết ngang DVB; nạp 0,7-1,0 mmol/g), axit amin được bảo vệ bằng Boc và được bảo vệ bằng Fmoc được mua từ hãng Midwest Biotech. Tổng hợp peptit pha rắn bằng cách sử dụng axit amin được bảo vệ bằng Boc được tiến hành trên bộ tổng hợp Applied Biosystem 430A Peptide Synthesizer. Tổng hợp axit amin được bảo vệ bằng Fmoc được tiến hành bằng cách sử dụng bộ tổng hợp Applied Biosystem Model 433 Peptide Synthesizer.

Tổng hợp peptit (sự phân cắt axit amin Boc/ HF):

Tổng hợp các chất tương tự này được tiến hành trên bộ tổng hợp Applied Biosystem Model 430A Peptide Synthesizer. Peptit tổng hợp được tạo cấu trúc bằng cách bổ sung lần lượt các axit amin vào hộp chứa chứa 2 mmol axit amin được bảo vệ bằng Boc. Cụ thể, việc tổng hợp được thực hiện bằng cách sử dụng các ghép nối đơn được hoạt hoá DEPBT Boc. Ở cuối bước ghép nối, nhựa peptidyl được xử lý bằng TFA để loại bỏ nhóm bảo vệ Boc ở đầu tận N. Nó được rửa lặp đi lặp lại bằng DMF và chu kỳ lặp lại này được lặp với số bước ghép nối mong muốn. Sau khi lắp ráp, sự bảo vệ mạch bên, Fmoc, được loại bỏ bằng cách xử lý bằng piperidin 20% và sự axyl hoá được thực hiện bằng cách sử dụng DIC. Nhựa peptidyl ở cuối quá trình tổng hợp hoàn chỉnh được làm khô bằng cách sử dụng DCM, và peptit được phân cắt khỏi nhựa bằng HF khan.

Để lactam hoá, nhóm bảo vệ trực giao được chọn đối với Glu và Lys (ví dụ, Glu(Fm), Lys(Fmoc)). Sau khi loại bỏ nhóm bảo vệ và trước khi phân cắt HF, sự đóng vòng được tiến hành như đã nêu trước đó (xem tài liệu, ví dụ, công bố đơn sáng chế quốc tế số WO2008/101017).

Xử lý HF đối với nhựa peptidyl

Nhựa peptidyl được xử lý bằng HF khan, và thường thu được xấp xỉ 350mg (hiệu suất ~50%) của peptit được khử bảo vệ thô. Cụ thể, nhựa peptidyl (từ 30mg đến 200mg) được đặt vào bình phản ứng hydro florua (HF) để phân cắt. 500µL p-crezol được bổ sung vào bình phản ứng dưới dạng chất chống muối ion cacbon. Bình phản ứng được gắn vào hệ thống HF và được làm ngập trong hỗn hợp metanol/đá khô. Bình phản ứng được hút chân không bằng bơm chân không và 10ml HF được chưng cất vào bình phản ứng. Hỗn hợp phản ứng này của nhựa peptidyl và HF được khuấy trong một giờ ở 0°C, sau đó độ chân không được thiết lập và HF được rút nhanh (10-15 phút). Bình phản ứng được lấy ra cẩn thận và làm đầy bằng xấp xỉ 35ml ete để làm kết tủa peptit và chiết p-crezol và nhóm bảo vệ hữu cơ phân tử nhỏ thu được từ việc xử lý HF. Hỗn hợp này được lọc bằng cách sử dụng thiết bị lọc teflon và được lặp lại hai lần để loại bỏ tất cả crezol dư. Dịch lọc được loại bỏ. Peptit kết tủa tan trong xấp xỉ 20ml axit axetic 10% (chứa nước). Dịch lọc, mà chứa peptit mong muốn, được gom lại và làm khô lạnh.

Phân tích bằng HPLC phân tích đối với peptit hoà tan thô được thực hiện trong các điều kiện sau [4,6 X 30 mm Xterra C8, 1,50 mL/phút, 220 nm, chất đệm A TFA 0,1%/ACN 10%, chất đệm B TFA 0,1%/ACN 100%, gradien 5-95% B trong 15 phút]. Chất chiết được pha loãng hai lần bằng nước và được tải lên cột đảo pha điều chế Vydac C4 2,2 X 25 cm và được giải hấp bằng cách sử dụng gradien axetonitril trên hệ Waters HPLC (chất đệm A TFA 0,1%/ACN 10%, chất đệm B TFA 0,1%/ACN 10% và gradien 0-100% B trong thời gian 120 phút ở tốc độ dòng 15,00 ml/phút. Phân tích HPLC của peptit được tinh chế chứng tỏ độ tinh khiết lớn hơn 95% và phân tích khối phổ ion hoá phun điện tử được sử dụng để xác nhận độ đồng nhất của peptit.

Axyl hoá peptit

Peptit được axyl hoá được điều chế như sau. Peptit được tổng hợp trên nhựa đỡ rắn bằng cách sử dụng hoặc CS Bio 4886 Peptide Synthesizer hoặc Applied Biosystem

430A Peptide Synthesizer. Hóa học trung hoà *in situ* được sử dụng như được nêu bởi Schnolzer et al., Int. J. Peptide Protein Res. 40: 180-193 (1992). Đối với peptit được axyl hoá, gốc axit amin đích cần được axyl hoá (ví dụ, vị trí 10, so với cách đánh số vị trí axit amin của SEQ ID NO: 3) được thế bằng gốc lysin N ϵ -Fmoc. Việc xử lý peptit được bảo vệ bằng Boc đầu tận N hoàn toàn bằng piperidin 20% trong DMF trong 30 phút loại bỏ nhóm Fmoc/formyl. Việc ghép nối với gốc ϵ -amino Lys tự do đạt được bằng cách ghép nối lượng dư 10 lần theo mol của vùng đệm axit amin được bảo vệ bằng Fmoc (ex. Fmoc-Glu-OtBu) hoặc mạch axyl (ex. $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{-COOH}$) và chất ghép nối PyBOP hoặc DEPBT trong DMF/DIEA. Việc loại bỏ tiếp theo nhóm Fmoc của vùng đệm axit amin được theo sau bởi việc lặp lại bước ghép nối với mạch axyl. Bước xử lý cuối cùng bằng TFA 100% dẫn đến việc loại bỏ nhóm bảo vệ mạch bên bất kỳ và nhóm BOC đầu tận N. Nhựa peptit được làm trung hòa bằng DIEA/DMF 5%, được làm khô, và sau đó được phân cắt khỏi chất đỡ bằng cách sử dụng HF/p-crezol, 95:5, ở 0°C trong một giờ. Sau khi chiết bằng ete, dung dịch HOAc 5% được sử dụng để solvat hoá peptit thô. Mẫu của dung dịch sau đó được kiểm tra lại để chứa peptit có phân tử lượng chính xác bằng ESI-MS. Peptit chính xác được tinh chế bằng RP-HPLC bằng cách sử dụng gradien tuyến tính CH_3CN 10%/TFA 0,1% đến TFA 0,1% trong CH_3CN 100%. Cột protein Vydac C18 22 mm x 250 mm được sử dụng để tinh chế. Chất tương tự peptit được axyl hoá nhìn chung được hoàn thành việc giải hấp với tỷ lệ chất đệm là 20:80. Các phần được tập hợp cùng nhau và được kiểm tra độ tinh khiết trên RP-HPLC phân tích. Các phân đoạn tinh khiết được làm khô lạnh để thu được peptit rắn màu trắng.

Nếu peptit chứa cầu lactam và gốc đích cần được axyl hoá, sự axyl hoá được thực hiện như nêu trên khi bổ sung axit amin đó vào khung peptit.

PEG hoá peptit

Đối với sự PEG hoá peptit, metoxy poly(etylen glycol) idoaxetamit (NOF) 40kDa được cho phản ứng với đương lượng mol của peptit trong ure 7M, đệm Tris-HCl 50mM sử dụng lượng tối thiểu của dung môi cần để hòa tan cả peptit và PEG thành dung dịch trong (thường là nhỏ hơn 2mL cho phản ứng sử dụng 2-3 mg peptit). Khuấy mạnh ở nhiệt độ trong phòng bắt đầu trong 4-6 giờ và phản ứng được phân tích bằng RP-HPLC phân tích. Sản phẩm PEG hoá xuất hiện rõ ràng từ nguyên liệu ban đầu với thời gian lưu giảm. Sự tinh chế được tiến hành trên cột Vydac C4 với điều

kiện tương tự với điều kiện được sử dụng cho sự tinh chế peptit ban đầu. Quá trình giải hấp xảy ra xung quanh tỷ lệ chất đệm là 50:50. Các phân đoạn của peptit được PEG hoá tinh khiết được tìm thấy và được làm khô lạnh. Hiệu suất cao hơn 50%, thay đổi đối với mỗi phản ứng.

Phân tích bằng cách sử dụng phép đo khối phổ

Khối phổ thu được bằng cách sử dụng máy đo khối phổ bốn cực phun điện tử Sciex API-III với nguồn ion ESI tiêu chuẩn. Điều kiện ion hoá được sử dụng là như sau: ESI ở chế độ ion dương; điện áp phun ion, 3,9 kV; điện thế vòi phun, 60 V. Khí phun và khí chắn được sử dụng là nitơ ở tốc độ dòng là 9 L/phút. Khối phổ được ghi lại từ 600-1800 Thompson ở 0,5 Th cho mỗi bước và thời gian dừng 2 mili giây. Mẫu (khoảng 1mg/mL) được hòa tan trong axetonitril chứa nước 50% với axit axetic 1% và được đưa vào bằng bơm tiêm bên ngoài ở tốc độ 5 μ L/phút.

Khi peptit được phân tích trong dung dịch PBS bằng ESI MS, trước hết chúng được khử muối bằng cách sử dụng đầu chiết pha rắn ZipTip chứa 0,6 μ L nhựa C4, theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Millipore Corporation, Billerica, MA, xem trang web của Millipore ở địa chỉ millipore.com/catalogue.nsf/docs/C5737).

Phân tích sắc ký lỏng cao áp (HPLC):

Phân tích sơ bộ được tiến hành với các peptit thô này để thu được con số xấp xỉ của tốc độ chuyển hóa tương đối của chúng trong đệm nước muối đệm phosphat (PBS) (pH=7,2) bằng cách sử dụng sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) và phân tích MALDI. Mẫu peptit thô được hòa tan trong đệm PBS ở nồng độ 1 mg/ml. 1ml dung dịch thu được được bảo quản trong lọ HPLC 1,5ml mà sau đó được bịt kín và được ủ ở 37°C. Các phần nhỏ gồm 100 μ l được rút ra ở các khoảng thời gian khác nhau, được làm nguội đến nhiệt độ trong phòng và phân tích bằng HPLC.

Phân tích HPLC được tiến hành bằng cách sử dụng hệ sắc ký Beckman System Gold Chromatography sử dụng đầu dò UV ở bước sóng 214 nm. Phân tích HPLC được tiến hành trên cột C18 Vydac 150 mm x 4,6 mm. Tốc độ dòng là 1 ml/phút. Dung môi A chứa TFA 0,1% trong nước cất, và dung môi B chứa TFA 0,1% trong CH₃CN 90%. Gradient tuyến tính được sử dụng (từ 40% đến 70% B trong 15 phút). Dữ liệu được thu gom và được phân tích bằng cách sử dụng phần mềm Peak Simple Chromatography.

Tốc độ thủy phân ban đầu được sử dụng để đo hằng số tốc độ đối với sự phân ly của tiền dược chất tương ứng. Nồng độ của tiền dược chất và thuốc được ước lượng lần lượt từ diện tích đỉnh của chúng. Hằng số tốc độ phân ly bậc một của tiền dược chất được xác định bằng cách dựng đồ thị logarit của nồng độ tiền dược chất ở các khoảng thời gian khác nhau. Độ dốc của đồ thị này là hằng số tốc độ 'k'. Sau đó, chu kỳ bán rã của quá trình phân hủy của các tiền dược chất khác nhau được tính bằng cách sử dụng công thức $t_{1/2} = 0,693/k$.

Ví dụ 2

Tổng hợp peptit có SEQ ID NO. 17

Peptit SEQ ID NO. 17 được tổng hợp bằng pha rắn bằng cách sử dụng hóa học Fmoc/t-Bu. Để điều chế peptit này, 0,5g 2-clotrityl-nhựa (mắt lưới 100-200, 1,18 mmol/g) (GL Biochem) trước hết được tạo dẫn xuất bằng cách ủ với 0,8 đương lượng (eq.) Fmoc-Gln(Trt)-OH, 4 eq. so với axit amin diisopropyletylamin (DIPEA) trong DCM khô (diclometan) trong 2 giờ. Sau đó, sự lắp ráp trình tự peptit được tiến hành trên thiết bị tổng hợp peptit phức hợp APEX396 (Advanced Biotech). Tất cả các axit amin được hòa tan ở nồng độ 0,5M trong DMF (N,N-dimetyl formamit). Phản ứng axyl hoá được tiến hành trong thời gian 60 phút với lượng dư 6 lần của axit amin được hoạt hoá trên nhóm amino tự do của nhựa. Phản ứng axyl hoá kép được tiến hành đối với Aib2, Aib16, Asp15, His1. Axit amin được hoạt hoá với lượng bằng mol của HATU (2-(1H-7-Azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetrametyl uroni hexaflophosphat), dung dịch 0,5M trong DMF, và lượng dư 2 lần theo mol của DIEA (N,N-diisopropyletylamin), dung dịch 2M trong NMP (1-metyl-2-pyrrolidinon).

Nhóm bảo vệ mạch bên là: tert-butyl đối với Asp và Glu, Ser, Thr và Tyr; trityl đối với Asn, Gln và His; tert-butoxy-cacbonyl đối với Lys, Trp; và, 2,2,4,6,7-pentametyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl đối với Arg; Boc-His(Trt)-OH được sử dụng trong bước tổng hợp này.

Lysin ở vị trí 10, cần được tạo dẫn xuất trên mạch bên, được kết hợp dưới dạng Lys(Alloc). Khi kết thúc việc lắp ráp, nhóm bảo vệ Alloc được loại bỏ và quá trình tổng hợp được hoàn thành bằng cách ngưng tụ hai gốc axit γ -carboxyglutamic (4 eq.) và axit palmitic (4 eq.) bằng cách sử dụng HBTU (4 eq.; (O-benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetrametyluroni hexaflophosphat), và DIPEA (8 eq.) làm chất hoạt hoá.

Khi kết thúc việc tổng hợp, nhựa peptit khô độc lập được xử lý bằng 25mL hỗn hợp phân cắt, 88% axit trifloaxetic (TFA), 5% phenol, 2% triisopropylsilan và 5% nước trong 2 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Nhựa được lọc và thể tích dung dịch được làm giảm sau đó được bổ sung vào metyl-t-butyl ete lạnh theo thứ tự để làm kết tủa peptit. Sau khi ly tâm, các viên peptit được rửa bằng metyl-t-butyl ete lạnh mới để loại bỏ chất chống muối hữu cơ. Quy trình được lặp lại hai lần. Các viên cuối cùng được làm khô, tái tạo huyền phù trong H₂O, axetonitril 20%, và được làm khô lạnh.

Peptit thô được tinh chế bằng HPLC đảo pha bằng cách sử dụng Waters XBridge C18 điều chế (50 x 150 mm, 5 µm) và sử dụng làm chất giải hấp (A) TFA 0,1% trong nước và (B) TFA 0,1% trong axetonitril. UPLC phân tích được tiến hành trên Waters Chromatograph, với BEH130, C18 Acquity, cột 1,7 µm, 2,1 x 100 mm, (Waters), ở 45°C, sử dụng H₂O, TFA 0,1% (A) và CH₃CN, TFA 0,1% (B) làm dung môi. Peptit sau khi được tinh chế được xác định đặc điểm bằng phép đo khối phổ phun điện tử trên Waters SQ Detector.

Ví dụ 3

Khả năng gây ra cAMP của mỗi peptit được đo trong thử nghiệm chỉ thị dựa trên luxiferaza đom đóm. Việc sản xuất cAMP mà đã được gây ra tỷ lệ thuận với mảnh glucagon liên kết với thụ thể glucagon hoặc thụ thể GLP-1. Tế bào HEK293 được đồng chuyển nhiễm với thụ thể glucagon hoặc thụ thể GLP-1, theo thứ tự, và gen luxiferaza được liên kết với yếu tố đáp ứng cAMP được sử dụng cho thử nghiệm sinh học.

Các tế bào được lấy khỏi huyết thanh bằng cách nuôi cấy 16 giờ trong môi trường thiết yếu tối thiểu cải biến Dulbecco (Invitrogen, Carlsbad, CA) được bổ sung huyết thanh sinh trưởng bò 0,25% (HyClone, Logan, UT) và sau đó được ủ với các dung dịch pha loãng theo dãy của mảnh glucagon trong 5 giờ ở 37°C, 5% CO₂ trong đĩa "Biocoat" được phủ poly-D-Lysin 96 giếng (BD Biosciences, San Jose, CA). Khi kết thúc quá trình ủ, 100µL chất phản ứng cơ chất phát quang LucLite (Perkin Elmer, Wellesley, MA) được bổ sung vào mỗi giếng. Đĩa này được lắc nhanh, được ủ trong 10 phút trong tối và sáng, sản phẩm được đo trên máy đếm nhấp nháy dịch lỏng MicroBeta-1450 (Perkin-Elmer, Wellesley, MA). Nồng độ hiệu quả 50% (EC50) được tính bằng cách sử dụng phần mềm Origin (OriginLab, Northampton, MA).

Ví dụ 4

Hiệu lực chất chủ vận *in vitro* của peptit có SEQ ID NO. 17 được xác định bằng cách sử dụng tế bào buồng trứng chuột đồng Trung Quốc (CHO-K1) biểu hiện ổn định GLP-1R, GCGR hoặc GIPR của người. Nhóm cùng nguồn gốc dòng tế bào ổn định GLP-1R và GCGR được tạo ra bởi Invitrogen™ bằng cách sử dụng công nghệ kết hợp hướng đích Jump-In™ của chúng, trong khi đó các dòng CHO/GIPR ổn định được tạo ra bằng cách kỹ thuật tách dòng và chuyển nhiễm truyền thống (kết hợp ngẫu nhiên) với sự pha loãng giới hạn để chọn lọc dòng. Peptit được thử nghiệm *in vitro* về khả năng tương đối của chúng trong việc kích thích sự sản xuất cAMP trong các dòng tế bào khác nhau bằng cách sử dụng bộ kit thử nghiệm DiscoverX Hithunter™ cAMP XS+ (cat# 90-0075L) theo hướng dẫn sử dụng bộ kit. Nồng độ hữu hiệu 50% peptit (EC50) được tính bằng phương pháp khớp đường cong 4 tham số phân tích hồi quy không tuyến tính với phần mềm GraphPad Prism 4 (GraphPad Software, San Diego, CA) bằng cách dựng đồ thị các giá trị phát quang so với liều lượng peptit.

Ví dụ 5

Peptit có trình tự axit amin như nêu trong danh mục trình tự được tạo ra về cơ bản như được nêu trong Ví dụ 1 hoặc 2 và sau đó được thử nghiệm về hoạt tính chất chủ vận *in vitro* ở mỗi thụ thể glucagon và thụ thể GLP-1 về cơ bản như được nêu trong Ví dụ 3 hoặc 4. Trong một số ví dụ, hoạt tính chất chủ vận *in vitro* ở thụ thể GIP cũng được thử nghiệm. Kết quả được thể hiện trong bảng 1 dưới đây.

Bảng 1

SEQ NO	ID	Trình tự	EC50 (nM) ở thụ thể glucagon	EC50 (nM) ở thụ thể GLP-1	EC50 (nM) ở thụ thể GIP
12		HaibQGTFSTSDK(γ Glu- γ Glu- C16)SKYLDaibRAAQDFVQWLMMDTK γ Glu-amit	0,010	0,003	12,763
13		HaibQGTFSTSDYSKYLDERRAaibEFVC(40K-TE PEG)WLLDTK γ E-amit	2,806	0,567	139,639
14		HsQGTFSTSDK(γ Glu- C16)SKYLDERRAAQDFVQWLLDTK γ Glu-amit	0,003	0,003	976
15		HaibQGTFSTSDK(γ Glu- γ Glu- C16)SKYLDaibRAAQDFVQWLMomDTKQ-axit	0,006	0,005	1,901
16		HaibQGTFSTSDK(γ Glu- γ Glu- C16)SKYLDaibRAAQDFVQWLLDTKQ-axit	0,015	0,019	1,038
17		H aib QGTFTSD K(γ Glu- γ Glu-C16) SKYLD aib RAAQDFVQWLMNTK γ Glu-amit	0,11	0,075	> 2000

Các giá trị EC_{50} đối với peptit có SEQ ID NO. 12 – 16 thu được bằng cách sử dụng trình tự của Ví dụ 3. Giá trị EC_{50} đối với peptit có SEQ ID NO 17 thu được bằng cách sử dụng trình tự của Ví dụ 4.

Như được thể hiện trên bảng 1, nhiều trong số các peptit này có EC_{50} ở thụ thể GLP-1 trong khoảng nanomol hoặc picomol.

Ví dụ 6

Các con chuột mắc chứng béo phì do chế độ ăn gây ra (DIO) được chia thành các nhóm, mỗi nhóm có tám con và cân nặng trung bình ban đầu của mỗi nhóm được xác định. Mỗi nhóm chuột được tiêm dưới da hàng ngày với liều của peptit hoặc đối chứng chất dẫn thuốc trong một tuần. Peptit được thử nghiệm trong nghiên cứu này là peptit có SEQ ID NO.: 12-16. Liều dùng thay đổi trong khoảng từ 1 đến 10 nmol/kg đối với mỗi peptit được thử nghiệm. Cân nặng, thành phần cơ thể, sự hấp thụ thức ăn, và mức glucoza trong máu được xác định định kỳ trong suốt giai đoạn thử nghiệm.

Để xác định tốt hơn tác dụng của các peptit này lên mức glucoza trong máu, thí nghiệm thứ hai với chuột db/db được tiến hành. Trong thí nghiệm này, chuột db/db được chia thành các nhóm gồm tám con mỗi nhóm và cân nặng trung bình ban đầu của mỗi nhóm được xác định. Mỗi nhóm chuột được tiêm dưới da với một liều peptit của một trong số các SEQ ID NO.: 12-16, trong đó liều này nằm trong khoảng từ 3 đến 30 nmol/kg. Cân nặng, thành phần cơ thể, sự hấp thụ thức ăn, và mức glucoza trong máu được xác định định kỳ trong giai đoạn thử nghiệm.

Ví dụ 7

Tác dụng *in vivo* của peptit theo sáng chế được xác nhận trong con chuột mắc bệnh béo phì do chế độ ăn gây ra (DIO) mà được duy trì trên chế độ ăn có hàm lượng chất béo cao trong 16 tuần và có cân nặng ban đầu ~ 47 g. Chuột được dùng đối chứng chất dẫn thuốc hoặc liều của peptit hàng ngày trong chín ngày. Peptit được thử nghiệm trong nghiên cứu này gồm peptit có SEQ ID NO: 12, peptit có SEQ ID NO: 17, peptit có SEQ ID NO: 18, và peptit có SEQ ID NO: 19. Liều của mỗi peptit được thay đổi – mỗi trong số các peptit có SEQ ID NO: 12, 17, và 19 được dùng ở liều 3 nmol/kg hoặc 9 nmol/kg, trong khi peptit có SEQ ID NO: 18 được dùng ở liều 1 nmol/kg, 3 nmol/kg, hoặc 9 nmol/kg. Sự thay đổi cân nặng tích lũy (theo gam) được đo vào mỗi ngày

nghiên cứu và kết quả được thể hiện trên Fig.1. Dữ liệu được thể hiện dưới dạng giá trị trung bình $\pm$ SEM.

Mỗi peptit được thử nghiệm trong nghiên cứu này đã chứng tỏ được tác dụng giảm cân. Mỗi nhóm chuột được dùng peptit ở liều 3 nmol/kg hoặc liều 9 nmol/kg đã cho thấy có sự giảm cân nặng (so với chuột được điều trị bằng chất dẫn thuốc) từ sớm vào ngày 1 của nghiên cứu. Vào ngày 9 của nghiên cứu, chuột mà được dùng 3 nmol/kg peptit có SEQ ID NO: 12 thể hiện sự giảm cân nặng xấp xỉ 5,3%, trong khi chuột được dùng liều 9 nmol/kg peptit có SEQ ID NO: 12 có sự giảm cân xấp xỉ 29,8%. Vào ngày 9 của nghiên cứu, chuột được dùng 3 nmol/kg peptit có SEQ ID NO: 17 có sự giảm cân nặng xấp xỉ 9,6%, trong khi chuột mà được dùng 9 nmol/kg peptit có SEQ ID NO: 17 đã cho thấy sự giảm khối lượng xấp xỉ 35,5%. Vào ngày 9 của nghiên cứu, chuột được dùng 3 nmol/kg peptit có SEQ ID NO: 18 có sự giảm cân nặng xấp xỉ 12,3%, trong khi chuột được dùng 9 nmol/kg peptit có SEQ ID NO: 18 đã cho thấy sự giảm cân nặng xấp xỉ 26,8%. Vào ngày 9 của nghiên cứu này, chuột được dùng 3 nmol/kg peptit có SEQ ID NO: 19 đã cho thấy sự giảm cân nặng xấp xỉ 8,1%, trong khi đó chuột được dùng 9 nmol/kg peptit có SEQ ID NO: 19 có sự giảm cân nặng xấp xỉ 31,5%.

Ngoài sự thay đổi cân nặng tích lũy, hàm lượng glucoza xung quanh của chuột DIO được đo. Như được thể hiện trên Fig.2, chuột được dùng liều 3 nmol/kg hoặc liều 9 nmol/kg peptit có SEQ ID NO: 18 đã cho thấy sự giảm đáng kể glucoza xung quanh vào ngày 4 (-29% so với chất dẫn thuốc; $P < 0,05$). Chuột được dùng 9 nmol/kg peptit có SEQ ID NO: 19 đã cho thấy sự giảm hàm lượng glucoza xấp xỉ 40% vào ngày 4 (so với chuột dùng đối chứng chất dẫn thuốc; $P < 0,05$), sự giảm hàm lượng glucoza xấp xỉ 39% vào ngày 7 (so với chuột dùng đối chứng chất dẫn thuốc; $P < 0,05$), và sự giảm hàm lượng glucoza xấp xỉ 26% vào ngày 9 (so với chuột dùng đối chứng chất dẫn thuốc; $P < 0,05$).

Chuột được dùng 9 nmol/kg peptit có SEQ ID NO: 17 đã cho thấy sự giảm hàm lượng glucoza xấp xỉ 48% vào ngày 4 và 7 (so với chuột dùng đối chứng chất dẫn thuốc; $P < 0,05$), sự giảm hàm lượng glucoza xấp xỉ 45% vào ngày 9 (so với chuột dùng đối chứng chất dẫn thuốc; $P < 0,05$). Chuột được dùng 3 nmol/kg peptit có SEQ ID NO: 17 đã cho thấy sự giảm hàm lượng glucoza xấp xỉ 28% vào ngày 7 (so với

chuột dùng đối chứng chất dẫn thuốc; $P < 0,05$) và sự giảm hàm lượng glucoza xấp xỉ 19% vào ngày 9 (so với chuột dùng đối chứng chất dẫn thuốc; $P < 0,05$).

Ví dụ 8

Tác dụng *in vivo* của peptit theo sáng chế được xác nhận ở khi rezut béo phì bằng cách sử dụng đối chứng chất dẫn thuốc hàng ngày trong 21 ngày, sản phẩm có trên thị trường (Liraglutit), peptit có SEQ ID NO: 20, hoặc peptit có SEQ ID NO: 17. Liraglutit được dùng ở liều 20 $\mu\text{g/kg}$ s.c., trong khi mỗi trong số các peptit có SEQ ID NO: 17 và SEQ ID NO: 20 được dùng ở liều 3 $\mu\text{g/kg}$ s.c. Tất cả các peptit có được động học tương đương ($t_{1/2} \sim 10$ h) và liên kết protein huyết tương tương tự ở khi rezut ($> 98\%$). Cân nặng và sự hấp thụ thức ăn được đo.

Như được thể hiện trên Fig.3A, khi béo phì được dùng peptit có SEQ ID NO: 17 có sự giảm cân nặng vượt trội (-1,2 kg so với đường cơ sở và chất dẫn thuốc, $P < 0,05$), so với Liraglutit và với peptit có SEQ ID NO: 20.

Sự giảm đáng kể mức hấp thụ thức ăn (được thể hiện dưới dạng % thay đổi so với đường cơ sở trên Fig.3B), được quan sát thấy sau khi điều trị bằng liraglutit (-13,1 $\pm$ 1,9%) hoặc bằng peptit có SEQ ID NO: 17 (-25,7% $\pm$ 3,2%, $P < 0,05$ so với Liraglutit). Sau khi rửa một tuần, các con vật được điều trị bằng peptit có SEQ ID NO: 17 lấy lại nhiều cân nặng đã mất đi trong quá trình điều trị kéo dài (Ngày 28). Trên các hình vẽ Fig. 3A và Fig.3B, dữ liệu được thể hiện dưới dạng giá trị trung bình $\pm$ SEM. * $P < 0,05$ so với chất dẫn thuốc, ^ $P < 0,05$ peptit có SEQ ID NO: 17 so với Liraglutit.

Ví dụ 9

Tác dụng *in vivo* của peptit theo sáng chế được thử nghiệm ở khi rezut mắc bệnh tiểu đường ($n=7$) mà có tuổi trong khoảng 16-26 tuổi và có cân nặng trung bình ~ 22 kg. Khi rezut mắc bệnh tiểu đường ($n=7$) mà có tuổi trong khoảng 16-26 tuổi có cân nặng trung bình ~ 22 kg được dùng đối chứng chất dẫn thuốc, Liraglutit ở liều 10 $\mu\text{g/kg}$ s.c, hoặc peptit có SEQ ID NO: 17 ở liều 1 $\mu\text{g/kg}$ s.c. trong 10 ngày.

Cân nặng được đo trong quá trình nghiên cứu và được thấy rằng không quan sát thấy hiệu quả cân nặng ở các con vật này trong khoảng thời gian điều trị.

Khi kết thúc mỗi điều trị, trước hết glucoza trong máu khi đói (FBG) được đo, sau đó là thử nghiệm khả năng dung nạp thức ăn (Meal Tolerance Test - MTT) để

đánh giá khả năng dung nạp glucoza. Như được thể hiện trên Fig.4, khi mắc bệnh tiểu đường được điều trị bằng peptit có SEQ ID NO: 17 đã cho thấy sự giảm đáng kể FBG (120 ± 20 so với 158 ± 15 mg/mL, peptit có SEQ ID NO: 17 so với chất dẫn thuốc (-25%), $P < 0,05$; Fig.4). Ngoài ra, khi được điều trị bằng peptit có SEQ ID NO: 17 đã cho thấy khả năng dung nạp glucoza được cải thiện trong quá trình MTT so với khi dùng đối chứng chất dẫn thuốc (Fig.4). Dữ liệu được thể hiện ở Fig.4 dưới dạng giá trị trung bình $\pm$ SEM. $*P < 0,05$ so với chất dẫn thuốc.

Tất cả các tài liệu tham khảo, bao gồm các công bố, đơn sáng chế, và bằng sáng chế, được viện dẫn trong bản mô tả này chỉ nhằm mục đích tham khảo như thể mỗi tài liệu tham khảo được nêu độc lập và cụ thể để kết hợp để tham khảo.

Việc sử dụng các mạo từ và các từ ám chỉ tương tự trong nội dung của sáng chế (đặc biệt là trong các điểm yêu cầu bảo hộ sau đây) được hiểu là bao gồm cả số ít và số nhiều, trừ khi có chỉ dẫn khác trong bản mô tả này hoặc mâu thuẫn rõ ràng bởi ngữ cảnh. Thuật ngữ "gồm", "có", "bao gồm" và "chứa" cần được hiểu là các thuật ngữ mở (tức là, có nghĩa là "bao gồm, nhưng không giới hạn ở") trừ khi có chỉ dẫn khác.

Việc nêu các giới hạn của các giá trị trong bản mô tả này chỉ nhằm đáp ứng với phương pháp ghi nhanh độc lập để chỉ mỗi giá trị riêng biệt nằm trong giới hạn đó và mỗi điểm nút, trừ khi có chỉ dẫn khác trong bản mô tả này, và mỗi giá trị riêng biệt và điểm nút được kết hợp vào bản mô tả như là khi nó đứng độc lập được chỉ ra trong bản mô tả này.

Tất cả các phương pháp được nêu trong bản mô tả này có thể được tiến hành theo thứ tự thích hợp bất kỳ trừ khi có chỉ dẫn khác trong bản mô tả này hoặc mâu thuẫn rõ ràng theo cách khác trong ngữ cảnh. Việc sử dụng ví dụ bất kỳ và tất cả các ví dụ, hoặc ngôn ngữ ví dụ (ví dụ, "như") được nêu trong bản mô tả này, là nó chỉ nhằm mục đích minh họa rõ hơn cho sáng chế và không làm giới hạn phạm vi của sáng chế trừ khi có chỉ dẫn khác. Không có ngôn ngữ nào trong bản mô tả được hiểu là thể hiện yếu tố không được yêu cầu bảo hộ bất ý cần thiết để thực hiện sáng chế.

Các phương án ưu tiên của sáng chế được nêu trong bản mô tả này, gồm phương pháp tốt nhất đã biết đối với tác giả sáng chế để thực hiện sáng chế. Các thay đổi của các phương án ưu tiên này có thể trở nên rõ ràng đối với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này khi đọc phần mô tả trên đây. Tác giả sáng chế

trông đợi rằng người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này sử dụng các thay đổi này khi thích hợp, và tác giả sáng chế dự định rằng sáng chế được thực hiện theo cách khác với cách được nêu cụ thể trong bản mô tả này. Vì vậy, sáng chế này bao gồm tất cả các cải biến và dạng tương đương của đối tượng được chỉ ra trong các yêu cầu bảo hộ kèm theo khi được phép bởi luật pháp hiện hành. Ngoài ra, dạng kết hợp bất kỳ của các yếu tố nêu trên trong tất cả các thay đổi có thể có của chúng được bao hàm bởi sáng chế trừ khi có chỉ dẫn khác trong bản mô tả này hoặc mâu thuẫn một cách rõ ràng theo cách khác bởi ngữ cảnh.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Biến thể peptit được nêu trong SEQ ID NO: 1 chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 1 được biến đổi bởi:

- a) axit amino isobutyric (Aib) ở vị trí 2;
- b) Lys ở vị trí 10, trong đó Lys này được axyl hóa với mạch C8 đến C20 alkyl;
- c) axit amino isobutyric (Aib) hoặc Gln ở vị trí 16;
- d) Ala ở vị trí 18;
- e) Leu hoặc Met ở vị trí 27;
- f) Asp hoặc Asn ở vị trí 28;
- g) bổ sung dipeptit Lys-gammaGlu-amit ở đầu tận cùng carboxy;

hoặc muối được dụng của nó.

2. Biến thể peptit được nêu trong SEQ ID NO: 1 chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 17, hoặc muối được dụng của nó.

3. Biến thể peptit được nêu trong SEQ ID NO: 1 chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 12 hoặc muối được dụng của nó.

4. Biến thể peptit theo điểm 1, trong đó nhóm alkyl được gắn cộng hóa trị vào axit amin qua vùng đệm, hoặc muối được dụng của nó.

5. Biến thể peptit theo điểm 4, trong đó vùng đệm là axit amin hoặc dipeptit hoặc muối được dụng của nó.

6. Biến thể peptit theo điểm 4, trong đó vùng đệm chứa một hoặc hai gốc axit, hoặc muối được dụng của nó.

7. Biến thể peptit theo điểm 1, trong đó (i)

(EC50 ở thụ thể glucagon)

(EC50 ở thụ thể GLP-1)

bằng 20 hoặc thấp hơn, hoặc muối được dụng của nó, và/hoặc (ii) trong đó biến thể peptit có EC50 ở thụ thể GLP-1 lớn hơn từ hai đến mười lần so với EC50 ở thụ thể glucagon, hoặc muối được dụng của nó.

8. Thễ tiếp hợp chứa biến thể peptit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7, được tiếp hợp với gốc khác loại, hoặc muối được dụng của nó, trong đó thễ tiếp hợp này có hoạt tính ở thụ thể GLP-1 được tăng cường so với glucagon tự nhiên, và có tính chọn lọc đối với thụ thể GLP-1 của người lớn hơn ít nhất 100 lần so với thụ thể GIP, hoặc muối được dụng của nó.
9. Thễ tiếp hợp theo điểm 8, trong đó gốc khác loại chứa một hoặc nhiều trong số: peptit, phân tử axit nucleic, kháng thể hoặc mảnh của nó, polyme, chấm lượng tử, phân tử nhỏ, độc tố, chất chẩn đoán hoặc muối được dụng của nó.
10. Thễ tiếp hợp theo điểm 8, trong đó gốc khác loại là peptit và thễ tiếp hợp là peptit dung hợp hoặc peptit khảm, hoặc muối được dụng của nó.
11. Thễ tiếp hợp theo điểm 10, trong đó gốc khác loại chứa phần kéo dài của 1-21 axit amin đầu C đến axit amin ở vị trí 31 của biến thể peptit, hoặc muối được dụng của nó.
12. Thễ tiếp hợp theo điểm 11, trong đó phần kéo dài được chọn từ nhóm bao gồm: Gly, Glu, Cys, Gly-Gly, Gly-Glu, GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 9) hoặc GGPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 10).
13. Đime chứa biến thể peptit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7, hoặc muối được dụng của nó.
14. Multime chứa biến thể peptit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7, hoặc muối được dụng của nó.
15. Dược phẩm chứa biến thể peptit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7, hoặc muối được dụng của nó, và chất mang được dụng.
16. Dược phẩm chứa thễ tiếp hợp theo điểm 8 hoặc muối được dụng của nó, và chất mang được dụng.
17. Dược phẩm chứa đime hoặc multime theo điểm 13 hoặc 14 hoặc muối được dụng của nó, và chất mang được dụng.
18. Dược phẩm theo điểm 15, trong đó dược phẩm này chứa chất chống bệnh tiểu đường hoặc chống bệnh béo phì.
19. Dược phẩm theo điểm 16 hoặc 17, trong đó dược phẩm này chứa chất chống bệnh tiểu đường hoặc chống bệnh béo phì.

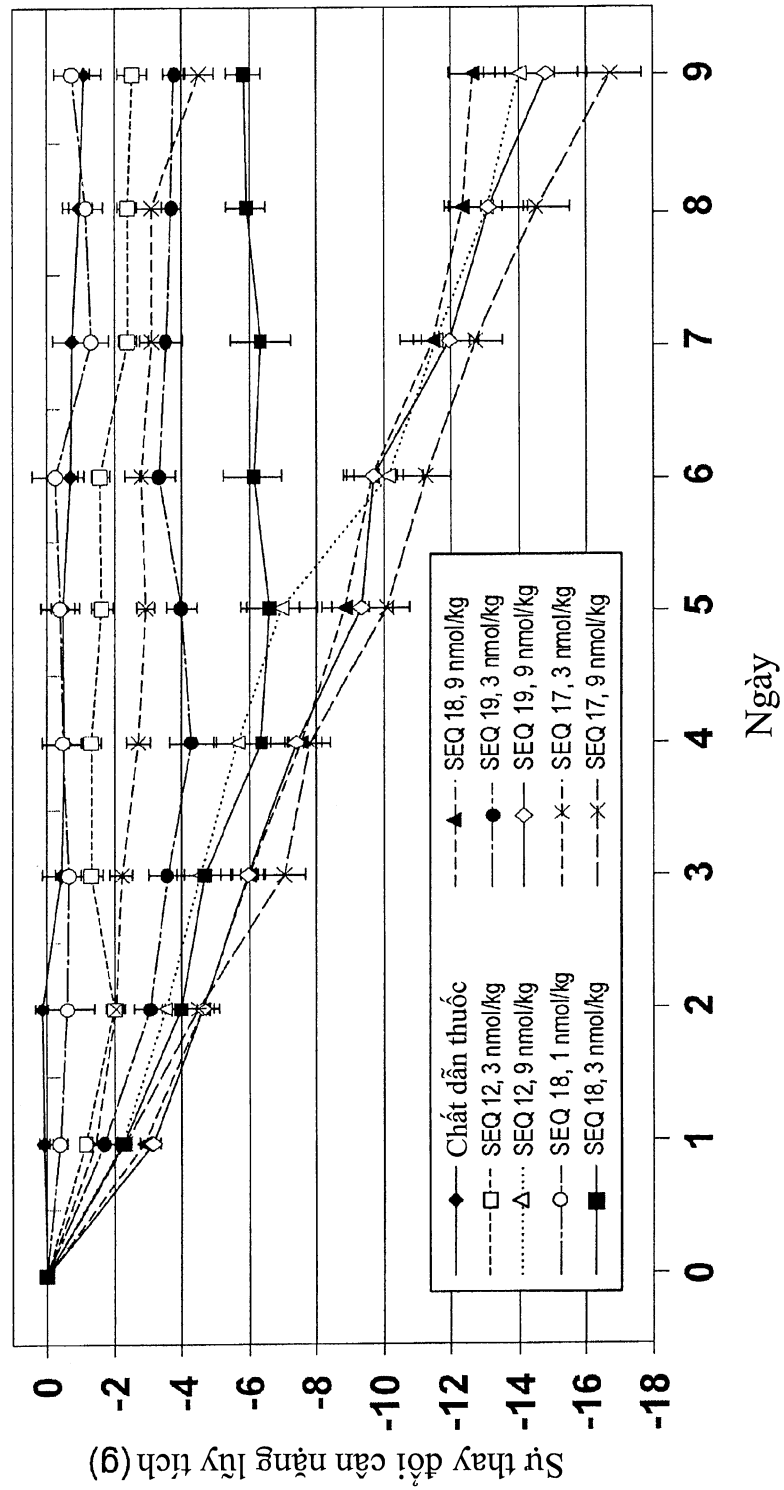
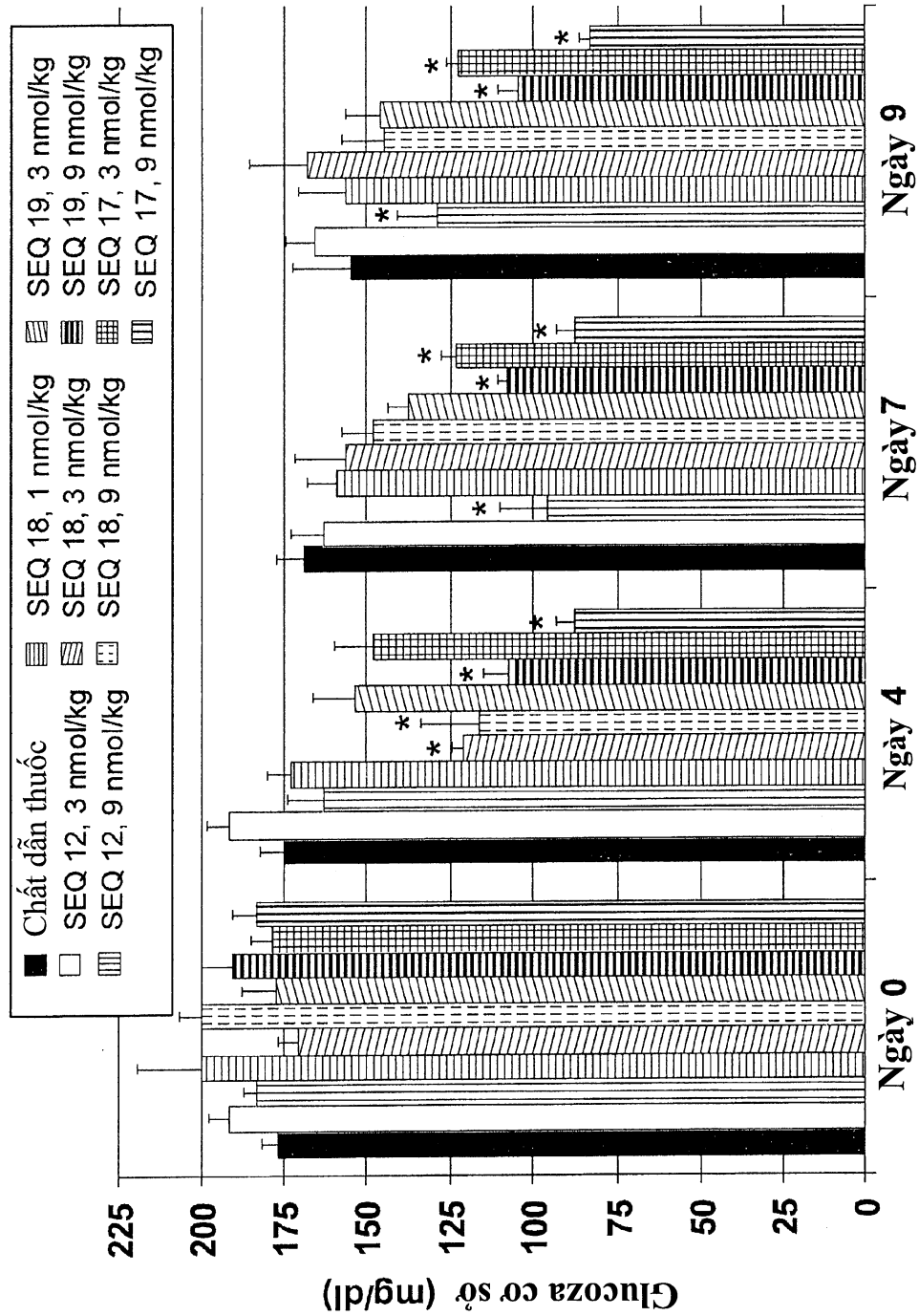
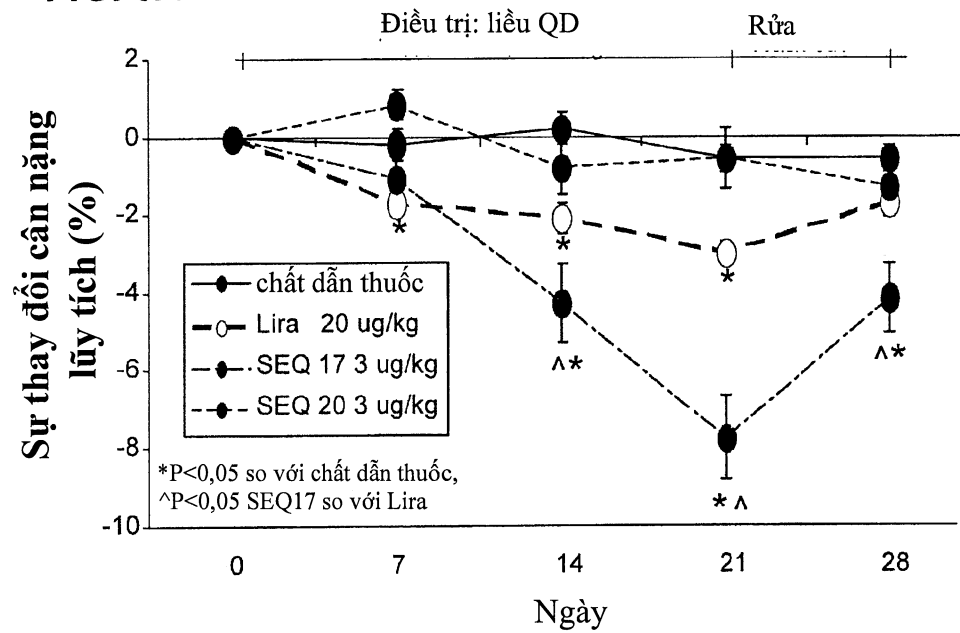
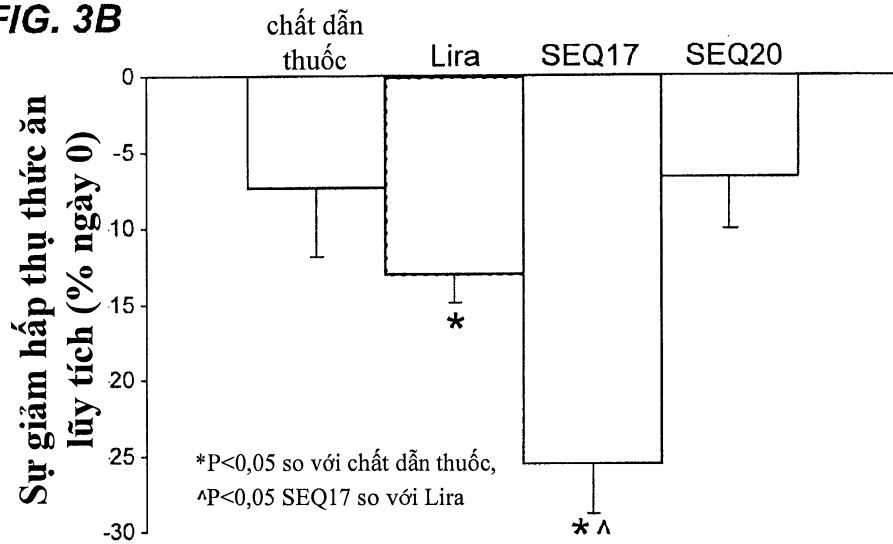


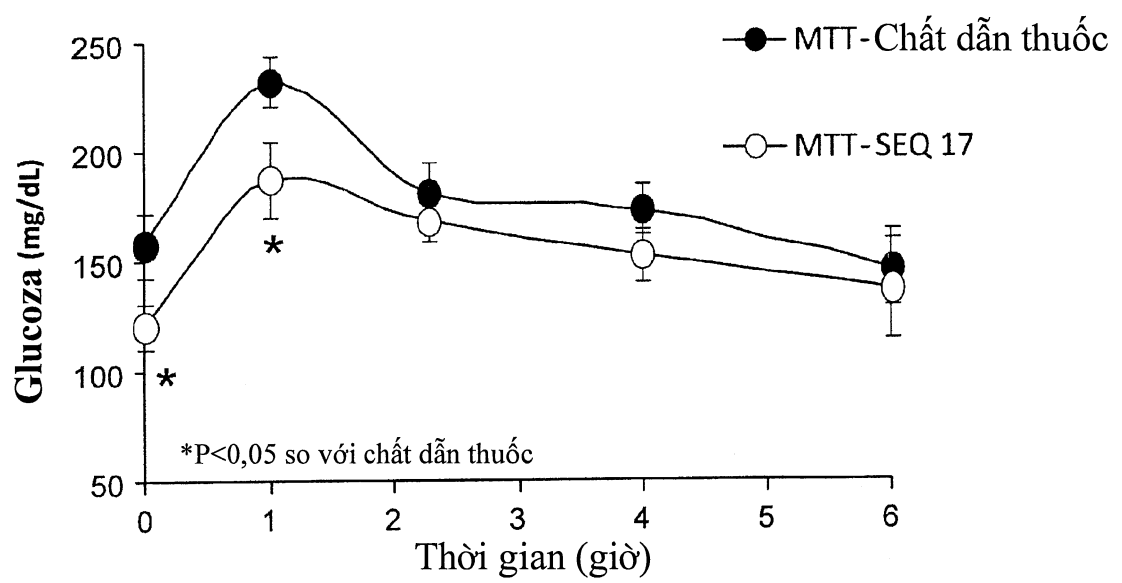
FIG. 1



* P < 0,05 so với chất dẫn thuốc

FIG. 2

FIG. 3A**FIG. 3B**

**FIG. 4**

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> DiMarchi, Richard

<120> Biến thể peptit có hoạt tính được tăng cường ở thụ thể glucagon/GLP-1 và được phẩm chứa peptit này

<130> 31135/46342 PCT

<150> US-61/500,027

<151> 2011-06-22

<150> US-61/547,360

<151> 2011-10-14

<160> 22

<170> PatentIn phiên bản 3.5

<210> 1

<211> 29

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> ĐẶC ĐIỂM MISC

<223> Glucagon tự nhiên ở người

<400> 1

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

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

<210> 2

<211> 37

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> ĐẶC ĐIỂM MISC

<223> GLP-1

<400> 2

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

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

Val Lys Gly Arg Gly
 35

<210> 3
 <211> 33
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> ĐẶC ĐIỂM MISC
 <223> GLP-2

<400> 3

His Ala Asp Gly Ser Phe Ser Asp Glu Met Asn Thr Ile Leu Asp Asn
 1 5 10 15

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

Asp

<210> 4
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> ĐẶC ĐIỂM MISC
 <223> Oxyntomodulin

<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 Asp Thr Lys Arg Asn
 20 25 30

Arg Asn Asn Ile Ala
 35

<210> 5
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> ĐẶC ĐIỂM MISC
 <223> GLP1 (7-36 amit)

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (30)..(30)
 <223> Sự amit hoá đầu tận C

<400> 5

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> 6
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> ĐẶC ĐIỂM MISC
 <223> GLP-1 (7-37 axit)

<400> 6

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 Gly
 20 25 30

<210> 7
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> Heloderma suspectum

<220>
 <221> ĐẶC ĐIỂM MISC
 <223> Exendin-4

<400> 7

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

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
35

<210> 8

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Peptit tổng hợp

<400> 8

Lys Arg Asn Arg Asn Asn Ile Ala
1 5

<210> 9

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Peptit tổng hợp

<400> 9

Gly Pro Ser Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
1 5 10

<210> 10

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Peptit tổng hợp

<400> 10

Gly Gly Pro Ser Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
 1 5 10

<210> 11
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Peptit tổng hợp

<400> 11

Lys Arg Asn Arg
 1

<210> 12
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Peptit tổng hợp

<220>
 <221> ĐẶC ĐIỂM MISC
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa là AIB

<220>
 <221> ĐẶC ĐIỂM MISC
 <222> (10)..(10)
 <223> Được axyl hoá bằng nhóm axyl béo C16 thông qua vùng đệm gamma-Glu-gamma-Glu

<220>
 <221> ĐẶC ĐIỂM MISC
 <222> (16)..(16)
 <223> Xaa là AIB

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (31)..(31)
 <223> Xaa là gamma-Glu

<220>
 <221> ĐẶC ĐIỂM MISC
 <222> (31)..(31)
 <223> Sự amit hoá đầu tận C

<400> 12

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

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

<210> 13

<211> 31

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Peptit tổng hợp

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Xaa là AIB

<220>

<221> MOD_RES

<222> (20)..(20)

<223> Xaa là AIB

<220>

<221> ĐẶC ĐIỂM MISC

<222> (24)..(24)

<223> Liên kết cộng hóa trị với PEG

<220>

<221> ĐẶC ĐIỂM MISC

<222> (31)..(31)

<223> Xaa là gamma-Glu

<220>

<221> ĐẶC ĐIỂM MISC

<222> (31)..(31)

<223> Sự amit hoá đầu tận C

<400> 13

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

Arg	Arg	Ala	Xaa	Glu	Phe	Val	Cys	Trp	Leu	Leu	Asp	Thr	Lys	Xaa
			20					25					30	

<210> 14
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Peptit tổng hợp

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> D-Ser

<220>
 <221> ĐẶC ĐIỂM MISC
 <222> (10)..(10)
 <223> Được axyl hoá bằng nhóm axyl béo C16 thông qua vùng đệm gamma-Glu

<220>
 <221> ĐẶC ĐIỂM MISC
 <222> (31)..(31)
 <223> Xaa là gamma-Glu

<220>
 <221> ĐẶC ĐIỂM MISC
 <222> (31)..(31)
 <223> Sự amit hoá đầu tận C

<400> 14

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

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

<210> 15
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Peptit tổng hợp

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa là AIB

<220>
 <221> ĐẶC ĐIỂM MISC
 <222> (10)..(10)
 <223> Được axyl hoá bằng nhóm axyl béo C16 thông qua vùng đệm gamma-Glu-gamma-Glu

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (16)..(16)
 <223> Xaa là AIB

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (27)..(27)
 <223> Xaa là Metionin sulfoxit

<400> 15

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

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

<210> 16
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Peptit tổng hợp

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa là AIB

<220>
 <221> ĐẶC ĐIỂM MISC
 <222> (10)..(10)
 <223> Được axyl hoá bằng nhóm axyl béo C16 thông qua vùng đệm gamma-Glu-gamma-Glu

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (16)..(16)
 <223> Xaa là AIB

<400> 16

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

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

<210> 17
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Peptit tổng hợp

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa là AIB

<220>
 <221> ĐẶC ĐIỂM MISC
 <222> (10)..(10)
 <223> Được axyl hoá bằng nhóm axyl béo C16 thông qua vùng đệm gamma-Glu-gamma-Glu

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (16)..(16)
 <223> Xaa là AIB

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (31)..(31)
 <223> Xaa là gamma-Glu

<220>
 <221> ĐẶC ĐIỂM MISC
 <222> (31)..(31)
 <223> Sự amit hoá đầu tận C

<400> 17

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

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

<210> 18

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

<220>
 <223> Peptit tổng hợp

<220>
 <221> ĐẶC ĐIỂM MISC
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa là AIB

<220>
 <221> ĐẶC ĐIỂM MISC
 <222> (10)..(10)
 <223> Được axyl hoá bằng nhóm axyl béo C16 thông qua vùng đệm gamma-Glu-gamma-Glu

<220>
 <221> ĐẶC ĐIỂM MISC
 <222> (29)..(29)
 <223> Sự amit hoá đầu tận C

<400> 18

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

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

<210> 19
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Peptit tổng hợp

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> D-Ser

<220>
 <221> ĐẶC ĐIỂM MISC
 <222> (10)..(10)
 <223> Được axyl hoá bằng nhóm axyl béo C16 thông qua vùng đệm gamma-Glu

<220>
 <221> ĐẶC ĐIỂM MISC
 <222> (29)..(29)
 <223> Sự amit hoá đầu tận C

<400> 19

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

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

<210> 20
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Peptit tổng hợp

<220>
 <221> ĐẶC ĐIỂM MISC
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa là AIB

<220>
 <221> ĐẶC ĐIỂM MISC
 <222> (10)..(10)
 <223> Được axyl hoá bằng nhóm axyl béo C16 thông qua vùng đệm gamma-Glu-gamma-Glu

<220>
 <221> ĐẶC ĐIỂM MISC
 <222> (16)..(16)
 <223> Xaa là AIB

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (31)..(31)
 <223> D-Glu

<400> 20

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

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

<210> 21
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Peptit tổng hợp

<220>
 <221> ĐẶC ĐIỂM MISC
 <223> Liraglutit

<220>
 <221> ĐẶC ĐIỂM MISC
 <222> (20)..(20)
 <223> Được axyl hoá bằng nhóm axyl béo C16 thông qua vùng đệm gamma-Glu

<400> 21

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	Arg	Gly	Arg	Gly
			20					25					30	

<210> 22
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Peptit tổng hợp

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa là AIB

<220>
 <221> ĐẶC ĐIỂM MISC
 <222> (10)..(10)
 <223> Được axyl hoá bằng nhóm axyl béo C16 thông qua vùng đệm gamma-Glu-gamma-Glu

<220>
 <221> MOD_RES

<222> (16)..(16)
 <223> Xaa là AIB

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (28)..(28)
 <223> Xaa là Orn

<400> 22

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

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