



(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)



1-0026369

(51)⁷ C07D 241/04; C07D 295/13; A61K
31/495; A61P 7/00

(13) B

(21) 1-2014-02058

(22) 29/11/2012

(86) PCT/US2012/066938 29/11/2012

(87) WO2013/082210 06/06/2013

(30) 61/564,559 29/11/2011 US; 61/614,292 22/03/2012 US; 61/641,698 02/05/2012 US;
61/666,291 29/06/2012 US

(45) 25/11/2020 392

(43) 25/12/2014 321A

(73) Perosphere Pharmaceuticals Inc. (US)

20 Kenosia Avenue, Danbury, CT 06810, United States of America

(72) STEINER, Solomon, S. (US); LAULICHT, Bryan, E. (US); BAKHRU, Sasha, H.
(US); MATHIOWITZ, Edith (US).

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

(54) HỢP CHẤT ĐẢO NGƯỢC TÁC DỤNG CHỐNG ĐÔNG, DƯỢC PHẨM VÀ KIT
CHẨN ĐOÁN CHỨA HỢP CHẤT NÀY

(57) Sáng chế đề xuất hợp chất làm đảo ngược tác dụng chống đông máu, cũng như
phương pháp tạo ra hợp chất, dược phẩm chứa hợp chất, và kit chẩn đoán chứa hợp chất
này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến các hợp chất đảo ngược hoàn toàn hoặc đảo ngược một phần các tác dụng chống đông của các chất ức chế đông máu, như heparin không phân đoạn (unfractionated heparin - “UFH”), heparin phân tử lượng thấp (low molecular weight heparin - “LMWH”), fondaparinux, và các chất chống đông khác liên kết với chất kháng thrombin, cũng như các chất ức chế trực tiếp Xa và IIa.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Chu trình đông máu là một quá trình sinh lý bình thường nhằm ngăn chặn hiện tượng mất máu đáng kể hoặc chứng xuất huyết sau khi tổn thương mạch. Tuy nhiên, có các thời điểm cục máu (cục nghẽn) tạo ra khi không cần thiết. Ví dụ, một số tình trạng nguy cơ cao như bệnh cấp tính, tình trạng bất động kéo dài, phẫu thuật, hoặc bệnh ung thư có thể làm tăng nguy cơ hình thành cục máu mà có thể có tiềm năng dẫn đến hậu quả đáng kể như bệnh tim mạch do xơ vữa động mạch và/hoặc nhồi máu tim bất thường.

Chu trình đông máu bao gồm một loạt bước, trong đó proteaza phân cắt và tiếp theo hoạt hóa proteaza tiếp theo trong trình tự. Mỗi proteaza có thể hoạt hóa vài phân tử của proteaza tiếp theo trong nhóm, khuếch đại chu trình sinh học tiếp theo. Kết quả cuối cùng của các phản ứng này là chuyển hóa fibrinogen, là một protein hòa tan, thành sợi fibrin không hòa tan. Cùng với tiểu cầu, sợi fibrin tạo ra cục máu ổn định.

Kháng thrombin (antithrombin - AT), một chất ức chế serin proteaza, là chất ức chế chính đối với các proteaza đông tụ trong huyết tương. AT phong bế chu trình đông máu, ví dụ, bằng cách ức chế thrombin (yếu tố IIa) và hoạt hóa yếu tố X (yếu tố Xa). Heparin (heparin không phân đoạn) và các heparin phân tử lượng thấp (LMWH; heparin phân đoạn) ức chế quá trình đông tụ nhờ liên

kết với AT thông qua trình tự pentasacarit. Liên kết này dẫn đến sự thay đổi về mặt cấu hình đối với AT, mà thúc đẩy việc nó ức chế các yếu tố IIa, Xa, và các proteaza khác liên quan đến sự vón cục máu. Sau khi phân ly, heparin và LMWH tự do liên kết với phân tử kháng thrombin khác và tiếp đó ức chế thêm thrombin và yếu tố Xa.

Heparin không phân đoạn là hỗn hợp gồm các glycosaminoglycan (GAG) được McLean và Howell phát hiện thấy ở gan chó có các tính chất chống đông vào năm 1916 tại Johns Hopkins University. Ngoài việc chống đông, heparin không phân đoạn đã được thấy là có các tính chất khác bao gồm chống viêm và tạo mạch. LMWH là các heparin gồm polysacarit mạch ngắn, thường có phân tử lượng thấp hơn 8000Da. Cả LMWH và heparin đều được dùng để ngăn không cho máu đông bên trong cơ thể, nhưng được dùng trong các tình huống khác nhau trong bệnh viện.

Heparin hiện có ở dạng dung dịch lỏng được dùng ngoài đường tiêu hóa. LMWH, như enoxaparin, là phân đoạn có phân tử lượng thấp. Nó còn có mặt ở dạng dung dịch tiêm lỏng. Các loại LMWH đã được FDA ở Mỹ cấp phép lưu hành hiện là LOVENOX® (tên gốc là enoxaparin) và FRAGMIN® (tên gốc là dalteparin).

Heparin phân tử lượng thấp hoặc heparin phân đoạn có tính đặc hiệu với hoạt tính của yếu tố Xa và yếu tố IIa của máu cao hơn so với heparin không phân đoạn. Ngoài ra, LMWH có tác dụng lặp lại hơn đối với thời gian thromboplastin bán phần được hoạt hóa (aPTT), là số đo về thời gian đông tụ. LMWH có tỷ lệ mắc chứng giảm tiểu cầu do heparin gây ra (Heparin Induced Thrombocytopenia - HIT) thấp hơn. Vì LMWH có hiệu quả mang tính dự đoán cao hơn và tỷ lệ mắc tác dụng phụ như HIT thấp hơn, các bệnh nhân có thể tự tiêm LMWH ở nhà, mặc dù nó thường được dùng trong bệnh viện. Vì các lý do này, LMWH đã trở thành chất chống đông dẫn đầu trên thị trường.

Protamin, phân tử có điện tích dương, có thể được dùng để đảo ngược sự chống đông nhờ dùng heparin không phân đoạn có điện tích âm cao hoặc heparin phân tử lượng thấp (LMWH). Protamin là sản phẩm tự nhiên mà liên

quan đến vấn đề cung cấp, mà nhấn mạnh nhu cầu cần lựa chọn các chất đảo ngược bổ sung, lý tưởng là chất đảo ngược tổng hợp. Hoạt tính chống đông của LMWH có thể là đảo ngược một phần, chứ không hoàn toàn, bằng cách dùng protamin qua đường tĩnh mạch. Lý do giải thích hoạt tính đảo ngược tác dụng chống đông giảm của protamin trong trường hợp LMWH được tin là do ái lực liên kết với phân đoạn LMWH trong máu yếu hơn của heparin không phân đoạn. Protamin phải được dùng từ từ, do các tác dụng làm giảm huyết áp và các mối lo ngại về tình trạng quá mẫn.

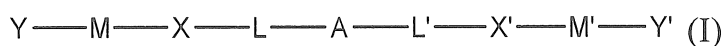
Gần đây, các chất chống đông bổ sung bắt đầu được cấp phép lưu hành. Các ví dụ về các chất chống đông này bao gồm dabigatran hoặc PRADAXA®, argatroban hoặc ARGATROBAN®, rivaroxaban hoặc XARELTO®, apixaban hoặc ELIQUIS®, edoxaban hoặc LIXIANA®, và fondaparinux hoặc ARIXTRA®. Các chất chống đông này ức chế yếu tố IIa hoặc yếu tố Xa không lan truyền sự đông tụ.

Các chất chống đông như dabigatran, fondaparinux, rivaroxaban và apixaban chưa có chất đảo ngược được cấp phép lưu hành. Cách đã biết để làm đảo ngược dabigatran hoặc PRADAXA® là dùng than hoạt tính để cố gắng loại bỏ dabigatran ra khỏi máu và để truyền máu. Khác với Eerenberg et al. Circulation. 2011 Oct 4;124(14):1573-9. Epub 2011 Sep 6., mà thông báo rằng trong thử nghiệm lâm sàng nhỏ, dịch cô phức prothrombin có khả năng đảo ngược dabigatran, chứ không đảo ngược rivaroxaban, không có dữ liệu hoặc không có chất giải sẵn có về mặt lâm sàng để đảo ngược chất ức chế bất kỳ trong số các chất ức chế yếu tố đông tụ IIa hoặc yếu tố đông tụ Xa. Do đó, khi bệnh nhân được chống đông bằng các tác nhân này, thì tác dụng phụ liên quan đến việc dùng quá liều, đặc biệt là chảy máu đáng kể hoặc chảy máu đến chết, là nguy hiểm hơn rất nhiều so với các tác dụng phụ liên quan đến việc dùng heparin không phân đoạn. Do đó, việc thiếu chất đảo ngược hạn chế việc sử dụng các thuốc này.

Vì các lý do này, từ lâu đã có nhu cầu mạnh mẽ và chưa đáp ứng được về mặt lâm sàng đối với các chất đảo ngược tác dụng chống đông.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Các chất ức chế heparin, các đoạn heparin, fondaparinux và các chất ức chế khác đối với yếu tố Xa hoặc yếu tố IIa đã được phát triển. Cấu trúc chung của các chất đảo ngược tác dụng chống đông đáng quan tâm là: R-Z-R', trong đó R và R' là các chất có điện tích dương ở độ pH sinh lý và có thể là các phân tử giống nhau hoặc khác nhau và Z là hợp chất vòng kỵ nước hoặc hợp chất nhân ngưng tụ. Cụ thể hơn, chất ức chế được thể hiện bởi hợp chất có công thức I hoặc muối được dụng của nó:



trong đó:

A là nhân vòng cacbon hoặc nhân dị vòng được thế hoặc không được thế thơm hoặc không thơm, hoặc gốc mạch thẳng;

L và L' là giống nhau hoặc khác nhau và là các nhóm liên kết;

X và X' là giống nhau hoặc khác nhau và không có mặt hoặc là nhóm chức mà lần lượt gắn nhóm liên kết L với M và nhóm liên kết L' với M';

M và M' là giống nhau hoặc khác nhau và không có mặt hoặc là nhóm liên kết mà lần lượt gắn X vào Y và X' vào Y'; và

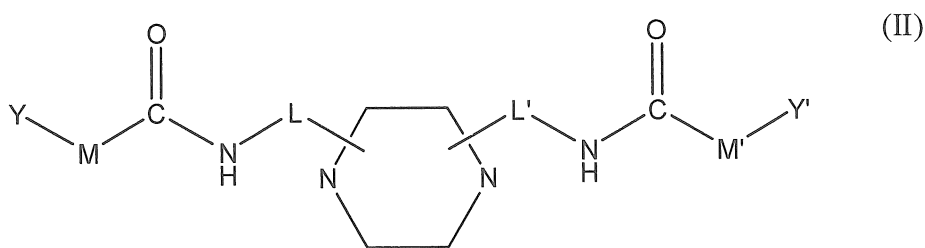
Y và Y' là giống nhau hoặc khác nhau và là gốc chứa một hoặc nhiều nguyên tử hoặc nhóm cation hoặc một hoặc nhiều nhóm trở thành cation trong các điều kiện sinh lý.

Các hợp chất này có thể là đối xứng hoặc không đối xứng; tức là, một hoặc nhiều nhóm trong số L, L', X, X', M, M', Y, hoặc Y' có thể là giống nhau hoặc khác nhau. Các hợp chất có thể là không đối xứng (tức là chứa một hoặc nhiều tâm không đối xứng) hoặc achiral.

Theo một số phương án, A là gốc dị vòng. Theo các phương án khác, A là gốc dị vòng và L và L' là mạch alkylen được thế hoặc không được thế. Theo các phương án khác nữa, A là gốc dị vòng, L và L' là mạch alkylen được thế hoặc không được thế, và X và X' là -NH-C(=O)-. Theo các phương án khác

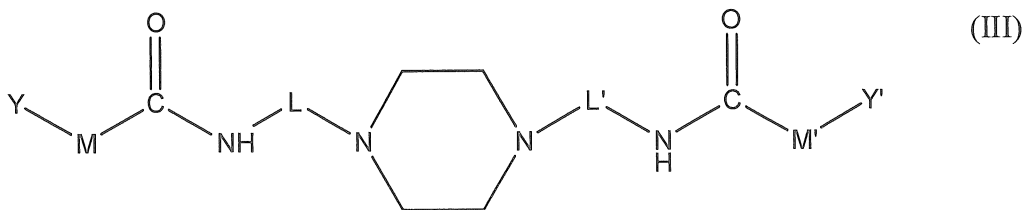
nữa, A là gốc dị vòng, L và L' là mạch alkylen được thế hoặc không được thế, X và X' là $-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-$, và M và M' là mạch alkylen được thế. Theo các phương án khác nữa, A là gốc dị vòng, L và L' là mạch alkylen được thế hoặc không được thế, X là $-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-$, M và M' là mạch alkylen được thế, và Y và Y' là gốc guanidin. Theo các phương án cụ thể, A là nhân piperazin đã được thế hai lần ở các vị trí 1,4 hoặc 2,5.

Theo phương án khác của sáng chế, chất ức chế là hợp chất có công thức II hoặc muối được dụng của nó:



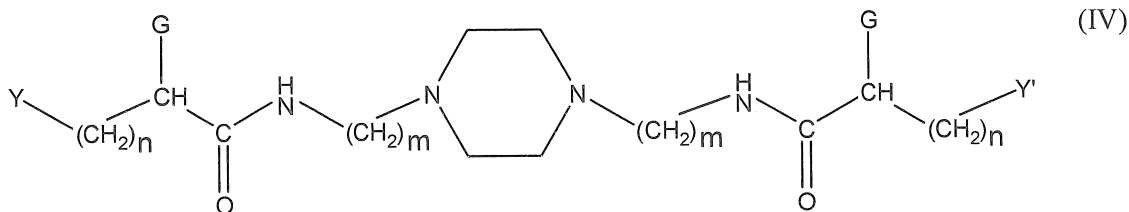
trong đó mỗi L, L', M, M', Y và Y' là như được bộc lộ trong bản mô tả này.

Theo phương án khác của sáng chế, chất ức chế là hợp chất có công thức III hoặc muối được dụng của nó:



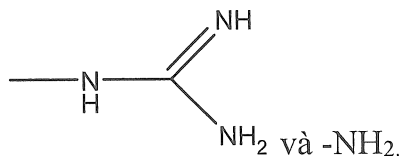
trong đó L, L', M, M', Y và Y' là như được bộc lộ trong bản mô tả này.

Theo phương án khác nữa của sáng chế, chất ức chế là hợp chất có công thức (IV) hoặc muối được dụng của nó:

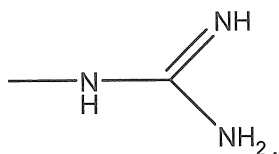


trong đó Y và Y' là như được bộc lộ trong bản mô tả này và n bằng 3 đến 5, m bằng 3 đến 6 và G được chọn từ -NH_2 và OH. Tốt nhất, nếu G là amino.

Theo phương án khác nữa của sáng chế, chất ức chế là hợp chất có công thức bất kỳ trong số các công thức II, III hoặc IV và Y và Y' độc lập được chọn từ nhóm bao gồm nhóm có công thức:

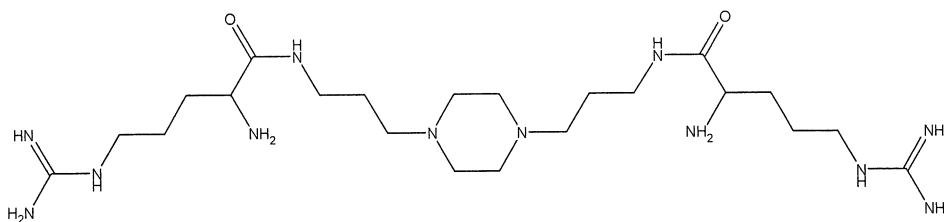


Tốt nhất, nếu G là -NH_2 và Y và Y' là nhóm có công thức:



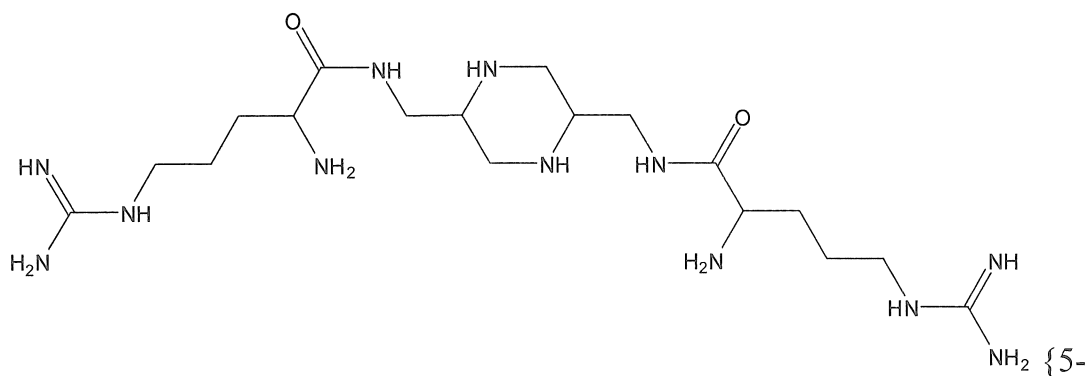
Theo phương án được ưu tiên, hợp chất này là đi-arginin piperazin (DAP), có công thức V, hoặc hợp chất có liên quan, có công thức VI, hoặc các muối được dựng của hợp chất bất kỳ trong số hai hợp chất này:

(V)



(3-{4-[3-(2-amino-5-guanidino-pentanoylamino)-propyl]-piperazin-1-yl}-propyl)-amit của axit 2-amino-5-guanidino-pentanoic; hoặc

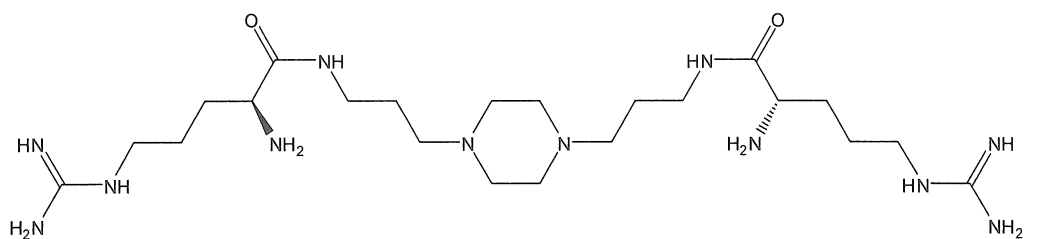
(VI)



[(2-amino-5-guanidino-pentanoylamino)-metyl]-piperazin-2-ylmetyl}-amit của axit 2-amino-5-guanidino-pentanoic.

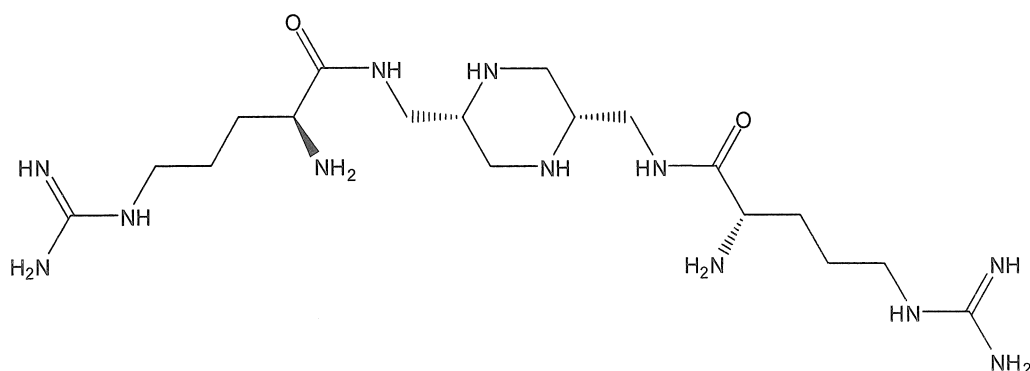
Theo khía cạnh cụ thể, hợp chất có công thức V là chất đồng phân lập thể như được thể hiện trong công thức VII:

(VII)



Theo phương án cụ thể khác, hợp chất có công thức VI là chất đồng phân lập thể như được thể hiện trong công thức VIII:

(VIII)



Các hợp chất theo sáng chế có thể được dùng trong dược phẩm ở dạng dung dịch nước như truyền nhanh và/hoặc truyền qua đường tĩnh mạch, tiêm dưới da, hoặc qua đường miệng. Theo phương án được ưu tiên, các hợp chất được dùng bằng cách tiêm (tiêm tĩnh mạch, tiêm bắp hoặc tiêm dưới da) trong chất mang như nước cất vô trùng, nước muối, nước muối đã được đệm, hoặc tá dược được dụng khác để tiêm. Theo một số phương án, chất ức chế có thể được dùng qua đường miệng, lên bề mặt màng nhầy (mũi, phổi, âm đạo, trực tràng hoặc má) hoặc ở dạng dược phẩm tác dụng chậm.

Các hợp chất theo sáng chế có thể được dùng trong dược phẩm cho bệnh nhân có nhu cầu đảo ngược heparin, LMWH hoặc việc chống đông do chất ức chế thrombin khác với lượng hữu hiệu để phục hồi sự đông máu và cầm máu bình thường. Các dược phẩm chứa hợp chất theo sáng chế là thích hợp để dùng trong bệnh viện hoặc trong trường hợp làm đảo ngược không khẩn cấp tại nhà. Nó được dùng cho bệnh nhân có nhu cầu đảo ngược heparin, LMWH hoặc quá trình chống đông do chất ức chế thrombin khác gây ra với lượng hữu hiệu để khôi phục quá trình đông máu. Các hợp chất và các dược phẩm theo sáng chế cũng có thể được sử dụng để làm giảm hoạt tính của các yếu tố sinh trưởng liên kết heparin và/hoặc để đảo ngược hoàn toàn hoặc một phần hỗn hợp gồm một hoặc nhiều chất chống đông Yếu tố IIa và/hoặc Yếu tố Xa.

Do đó, các hợp chất theo sáng chế có thể được dùng trong phương pháp đảo ngược hoàn toàn hoặc đảo ngược một phần tác dụng chống đông máu của chất ức chế đông máu. Các hợp chất theo sáng chế cũng có thể được dùng làm một phần của kit chẩn đoán, ví dụ, kit chẩn đoán để xác định nồng độ của chất chống đông máu trong máu.

Các ví dụ cho thấy rằng DAP liên kết một cách trực tiếp rivaroxaban, apixaban, heparin không phân đoạn, fondaparinux, và LMWH, đảo ngược hoạt tính chống đông máu. DAP đảo ngược tác dụng chống đông nhờ rivaroxaban qua đường miệng và LMWH dưới da *in vivo* như đo được nhờ aPTT và fondaparinux dưới da như đo được theo hoạt tính Xa ở chuột to. Tác dụng đảo ngược nhờ DAP, đã được xác nhận bởi hiện tượng giảm đáng kể về mặt thống

kê sự mất máu trong thử nghiệm cắt ngang đuôi chuột, đã được thể hiện đối với apixaban, dabigatran, edoxaban, và rivaroxaban. DAP đảo ngược hoàn toàn apixaban và rivaroxaban theo tỷ lệ liều lượng khối lượng DAP:chất chống đông máu trong máu người *ex vivo* khoảng 10:1 đo được bằng cách sử dụng kit chống Xa. DAP thể hiện sự đảo ngược phụ thuộc vào liều lượng apixaban và rivaroxaban trong máu người *ex vivo*. Sự đảo ngược bằng rivaroxaban trong máu toàn phần của người mới lấy ra được xác nhận theo các số đo aPTT *ex vivo*. DAP không liên kết argatroban ở nồng độ đến 1:1000 *in vitro*. DAP đảo ngược dabigatran qua đường miệng *in vivo* ở chuột to như đo được nhờ aPTT. Chuột to dùng liều argatroban vẫn được chống đông máu sau khi dùng liều DAP 200x qua đường tĩnh mạch (IV), cho thấy rằng DAP là an toàn và rằng tương tác đảo ngược là đặc hiệu với heparin và các chất chống đông mới dùng qua đường miệng. Tóm lại, các ví dụ thể hiện sự tạo phức giữa DAP và heparin và LMWH và rằng DAP là chất đảo ngược tốt đối với heparin, các hợp chất kiểu heparin và các chất ức chế thrombin khác bao gồm dabigatran, heparin phân tử lượng thấp đã được cấp phép lưu hành, cũng như rivaroxaban (XARELTO®), fondaparinux (ARIXTRA®), edoxaban (LIXIANA®), và apixaban (ELIQUIS®), như được thử trong các thử nghiệm *in vitro* với máu người, thử nghiệm kháng Xa và thử nghiệm aPTT và/hoặc *in vivo* trong thử nghiệm cắt ngang đuôi chuột.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 là đồ thị dòng nhiệt theo nhiệt độ như đo được nhờ phân tích đo nhiệt lượng quét vi phân (DCS), trong đó DAP được làm tăng nhiệt độ từ -20°C đến 200°C (“1” hoặc “nhiệt thứ nhất”), làm lạnh đến -20°C, và làm nóng lại đến 200°C (“2” hoặc “nhiệt thứ hai”).

Hình 2 là đồ thị của riêng DAP, riêng UFH, và kết hợp DAP-UFH, dưới dạng hàm số của phần trăm thể tích so với kích thước (d.nm) như đo được theo phân tán ánh sáng động học (Dynamic Light Scattering - DLS).

Hình 3 là đồ thị của riêng DAP, riêng rivaroxaban và kết hợp DAP-rivaroxaban theo tỷ lệ 1:1 và tỷ lệ 10:1, DAP:rivaroxaban, dưới dạng hàm số của thể tích (phần trăm) so với kích thước (d.nm) như đo được theo DLS.

Hình 4 là đồ thị của riêng DAP, riêng apixaban và DAP-apixaban liên kết theo tỷ lệ 1:1, 10:1 và 100:1, dưới dạng hàm số của thể tích (phần trăm) so với kích thước (d.nm) như đo được theo DLS.

Hình 5 là đồ thị của riêng DAP, riêng fondaparinux và DAP-fondaparinux liên kết theo tỷ lệ 1:1, 10:1 và 100:1, dưới dạng hàm số của thể tích (phần trăm) so với kích thước (d.nm) như đo được theo DLS.

Hình 6 là đồ thị của riêng DAP, riêng LMWH và DAP-LMWH liên kết theo tỷ lệ 1:1, 1:10 và 100:1, dưới dạng hàm số của thể tích (phần trăm) so với kích thước (d.nm) như đo được theo DLS.

Hình 7 là đồ thị của riêng DAP, riêng argatroban và DAP-argatroban liên kết theo tỷ lệ 1:1, 10:1, 100:1, và 1000:1, dưới dạng hàm số của thể tích (phần trăm) so với kích thước (d.nm) như đo được theo DLS.

Hình 8 là đồ thị thời gian thromboplastin bán phần được hoạt hóa (aPTT, giây) đo được sau một khoảng thời gian (tính theo giờ) trong năm giờ sau khi cho chuột dùng dưới da 10mg bemiparin (LMWH). Trong thời gian bốn giờ điều trị, chuột nhận DAP qua đường tĩnh mạch với liều 200mg/kg (100mg).

Hình 9 là đồ thị thời gian thromboplastin bán phần được hoạt hóa (aPTT, giây) đo được sau một khoảng thời gian (tính theo giờ) sau khi cho chuột dùng qua đường miệng PRADAXA® (dabigatran), tiếp theo dùng DAP qua đường tĩnh mạch với liều 200mg/kg và 100mg/kg (100mg và 50mg).

Hình 10 là đồ thị thời gian thromboplastin bán phần được hoạt hóa (aPTT) đo được sau một khoảng thời gian (tính theo giờ) sau khi cho chuột dùng dưới da heparin không phân đoạn (UFH), tiếp theo dùng DAP qua đường tĩnh mạch với liều 200mg/kg (100mg) và 400mg/kg (200mg).

Hình 11 là đồ thị aPTT (tính theo giây) đo được sau một khoảng thời gian (tính theo giờ) sau khi cho chuột dùng qua đường miệng 5mg/kg rivaroxaban, tiếp theo dùng DAP qua đường tĩnh mạch 5mg/kg (2mg).

Hình 12 là đồ thị nồng độ fondaparinux có hoạt tính ($\mu\text{g/ml}$) đo được sau một khoảng thời gian (tính theo phút sau khi đảo ngược) sau khi cho chuột dùng fondaparinux qua đường dưới da với liều 5mg/kg, tiếp theo là dùng DAP (tức là “đảo ngược”) qua đường tĩnh mạch với liều 200mg/kg.

Hình 13 là đồ thị aPTT (tính theo giây) đo được sau một khoảng thời gian (tính theo phút sau khi đảo ngược) sau khi cho chuột dùng PRADAXA® (dabigatran) với liều qua đường miệng 15,5mg/kg, tiếp theo dùng DAP (tức là “đảo ngược”) qua đường tĩnh mạch với liều 100mg/kg.

Hình 14 là đồ thị thời gian aPTT (tính theo giây) đối với việc dùng DAP qua đường tĩnh mạch với liều 0mg, 2mg, 10mg, 25mg, 50mg, và 100mg.

Hình 15 là đồ thị máu gom được (tức là mất máu lũy tích) trong thời gian 30 phút trong thử nghiệm làm chảy máu bằng cách cắt ngang đuôi chuột ở chuột to nhận 2mg rivaroxaban và 0mg DAP, 2mg rivaroxaban và 2,5mg DAP, 2mg rivaroxaban và 12,5mg DAP, hoặc liều đảo ngược và liều chống đông máu giả vờ (“giả vờ”). Với các nhóm gồm ba con chuột to có độ tuổi phù hợp, 12,5mg DAP làm giảm mất máu đến mức liều giả vờ tạo ra khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ($*p<0,05$) so với con chuột to chỉ nhận rivaroxaban.

Hình 16 là đồ thị máu gom được (tức là mất máu lũy tích) trong thời gian 30 phút trong thử nghiệm làm chảy máu bằng cách cắt ngang đuôi chuột ở chuột to nhận 1,25mg apixaban và 0mg DAP, 1,25mg apixaban và 5mg DAP, 1,25mg apixaban và 12,5mg DAP, hoặc liều đảo ngược và liều chống đông giả vờ (“giả vờ”). Với các nhóm gồm ba con chuột to có độ tuổi phù hợp, 5mg và 12,5mg DAP làm giảm mất máu đến mức liều giả vờ tạo ra khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ($*** p<0,01$) so với con chuột to chỉ nhận apixaban.

Hình 17 là đồ thị máu gom được (tức là mất máu lũy tích) trong thời gian 30 phút trong thử nghiệm làm chảy máu bằng cách cắt ngang đuôi chuột ở

chuột to nhận 1,25mg edoxaban và 0mg DAP, 1,25mg edoxaban và 12,5mg DAP, hoặc liều đảo ngược và liều chống đông giả vờ (“giả vờ”). Với các nhóm gồm ba con chuột to có độ tuổi phù hợp, 12,5mg DAP làm giảm mất máu đến mức liều giả vờ tạo ra khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê (* $p < 0,05$) so với con chuột to chỉ nhận edoxaban.

Hình 18 là đồ thị máu gom được (tức là mất máu lũy tích) trong thời gian 30 phút trong thử nghiệm làm chảy máu bằng cách cắt ngang đuôi chuột to nhận 15mg dabigatran etexilat và 0mg DAP, 15mg dabigatran etexilat và 5mg DAP, 15mg dabigatran etexilat và 12,5mg DAP, hoặc liều đảo ngược và liều chống đông giả vờ (“giả vờ”). Với các nhóm gồm ba con chuột to có độ tuổi phù hợp, 12,5mg DAP làm giảm mất máu đến mức liều giả vờ tạo ra khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê (***) $p < 0,01$) so với con chuột to chỉ nhận dabigatran etexilat.

Hình 19 là đồ thị aPTT (tính theo giây) đo được ở máu người vừa lấy đã được xử lý *ex vivo* bằng DAP 50 microgam/ml, rivaroxaban 0,25 microgam/ml, DAP 50 microgam/ml và rivaroxaban 0,25 microgam/ml, hoặc nước muối.

Hình 20 là đồ thị thể hiện nồng độ chống đông máu hữu hiệu đo được theo thử nghiệm về hoạt tính chống yếu tố Xa trong huyết tương của người đã được xử lý *ex vivo* bằng rivaroxaban riêng rẽ 218µg/l hoặc kết hợp với DAP 1,250mg/l, và rivaroxaban riêng rẽ 459µg/l hoặc kết hợp với DAP 6,250µg/l.

Hình 21 là đồ thị thể hiện nồng độ chống đông máu hữu hiệu đo được theo thử nghiệm về hoạt tính chống yếu tố Xa trong huyết tương của người đã được xử lý *ex vivo* bằng apixaban riêng rẽ 156µg/l hoặc kết hợp với DAP 1,156µg/l, và apixaban riêng rẽ 313µg/l hoặc kết hợp với DAP 3,125µg/l.

Hình 22 là đồ thị thể hiện nồng độ chống đông máu hữu hiệu đo được theo thử nghiệm về hoạt tính chống yếu tố Xa trong huyết tương của người đã được xử lý *ex vivo* bằng rivaroxaban 218µg/l, riêng rẽ hoặc kết hợp với DAP với lượng tăng dần (1,25µg/l, 12,5µg/l, 125µg/l, và 1,250µg/l).

Mô tả chi tiết sáng chế

I. Các chất đảo ngược tác dụng chống đông

Các chất đảo ngược tác dụng chống đông mới được bộc lộ. Các hợp chất theo sáng chế bao gồm các hợp chất được bộc lộ trong bản mô tả này, cũng như muối được dụng của chúng.

Các chất ức chế heparin, các đoạn heparin, fondaparinux và các chất ức chế yếu tố Xa hoặc yếu tố IIa (ví dụ, các chất ức chế yếu tố Xa hoặc yếu tố IIa qua đường miệng) đã được phát triển. Cấu trúc chung của các chất đảo ngược tác dụng chống đông máu đáng quan tâm là: $R-Z-R'$, trong đó R và R' là các chất có điện tích dương ở độ pH sinh lý và có thể là các phân tử giống nhau hoặc khác nhau và Z là hợp chất vòng kỵ nước hoặc hợp chất vòng ngưng tụ.

Cụ thể hơn, chất ức chế là hợp chất có công thức (I) hoặc muối được dụng của nó:



trong đó:

A là nhân vòng cacbon hoặc nhân dị vòng được thế hoặc không được thế, thơm hoặc không thơm, hoặc mạch thẳng;

L và L' là giống nhau hoặc khác nhau và là các nhóm liên kết;

X và X' là giống nhau hoặc khác nhau và không có mặt hoặc là nhóm chức mà lần lượt gắn nhóm liên kết L với M và nhóm liên kết L' với M';

M và M' là giống nhau hoặc khác nhau và không có mặt hoặc là nhóm liên kết mà lần lượt gắn X với Y và X' với Y'; và

Y và Y' là giống nhau hoặc khác nhau và là gốc chứa một hoặc nhiều nguyên tử hoặc nhóm cation hoặc một hoặc nhiều nhóm mà trở thành cation trong các điều kiện sinh lý.

Các hợp chất này có thể là đối xứng hoặc không đối xứng; tức là một hoặc nhiều L, L', X, X', M, M', Y, hoặc Y' có thể là giống nhau hoặc khác

nhau. Các hợp chất này có thể là không đối xứng (tức là chứa một hoặc nhiều tâm không đối xứng) hoặc achiral.

Theo một số phương án, A là gốc dị vòng. Theo các phương án khác, A là gốc dị vòng và L và L' là mạch alkylen được thế hoặc không được thế. Theo các phương án khác nữa, A là gốc dị vòng, L và L' là mạch alkylen được thế hoặc không được thế, và X và X' là $-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-$. Theo các phương án khác nữa, A là gốc dị vòng, L và L' là mạch alkylen được thế hoặc không được thế, X và X' là $-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-$, và M và M' là mạch alkylen được thế. Thuật ngữ mạch alkylen được dùng trong bản mô tả có nghĩa là gốc alkelen hóa trị hai mà có 1 đến 10 nguyên tử cacbon, tốt hơn là có 3 đến 6 nguyên tử cacbon, và có thể được thế hoặc không được thế. Các phần tử thế làm ví dụ bao gồm alkyl, hydroxyl, hydroxyl alkyl, amino, amino alkyl, alkoxy, alkyl alkoxy. Thuật ngữ alkyl được dùng trong bản mô tả này là hydrocacbon mạch thẳng hoặc mạch nhánh có 1 đến 10 nguyên tử cacbon, tốt hơn có 1 đến 6 nguyên tử cacbon. Theo các phương án khác nữa, A là gốc dị vòng, L và L' là mạch alkylen được thế hoặc không được thế, X là $-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-$, M và M' là mạch alkylen được thế, và Y và Y' là gốc guanidin.

Theo một số phương án, A là nhân không thơm, dị vòng, như piperazin hoặc diketopiperazin. Theo các phương án khác, A là gốc mạch thẳng, như điamin mạch thẳng hoặc gốc mạch thẳng khác chứa các nhóm chức có hoạt tính phản ứng mà có thể tạo liên kết với X và X', nếu có mặt, hoặc Y và Y'. Theo một số phương án, các nhóm liên kết L và L' được gắn vào các nguyên tử khác loại trên nhân A, như hai nguyên tử nitơ trên piperazin. Theo các phương án khác, nhóm liên kết L và L' được gắn vào các nguyên tử khác với các nguyên tử khác loại trên nhân, như nguyên tử cacbon. Theo các phương án cụ thể, A là nhân piperazin được thế hai lần ở các vị trí 1,4 hoặc 2,5. Theo một số phương án, L và L' và/hoặc M và M' là mạch alkylen được thế hoặc không được thế, như $-(\text{CH}_2)_n-$, trong đó n là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 10, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 1 đến 6, ví dụ, nằm trong khoảng từ 1 đến 3. Theo các

phương án cụ thể, n bằng 3. Theo một số phương án, L và/hoặc M không có mặt.

X và X' là nhóm chức mà gắn các nhóm liên kết L và L' với Y và Y'. Các nhóm chức làm ví dụ bao gồm, nhưng không giới hạn ở, este, amit, cacbonat, và keton. Theo các phương án cụ thể, X và X' là nhóm chức mà không bị thủy phân theo cách đơn giản, như nhóm amit.

Y và Y' là gốc chứa một hoặc nhiều nguyên tử hoặc nhóm mà là cation hoặc sẽ trở thành cation trong các điều kiện sinh lý. Các ví dụ bao gồm gốc amin và gốc guanidin cũng như các gốc chứa phospho, như gốc alkyltriphenylphosphoni, gốc tetraphenylphosphoni, gốc tetraphenylarsoni, gốc tribenzyl amoni, và gốc phosphoni. Các gốc cation bổ sung bao gồm các oligome cation và các polyme cation, như oligo- hoặc polylysin, oligo- hoặc polyarginin, polyetylen imin alkyl hóa ở nguyên tử N, và các gốc tương tự. Các gốc cation khác bao gồm các cation ưa béo đã chuyển vị chứa một đến ba đơn vị carbimino, sulfimino, hoặc phosphinimino như đã được bộc lộ trong tài liệu: Kolomeitsev et al., Tet. Let., Vol. 44, No. 33, 5795-5798 (2003).

Theo một số phương án, hợp chất này là chất dẫn xuất của piperazin, trong đó các mạch bên của axit amin chứa một hoặc nhiều nguyên tử có điện tích dương hoặc các nguyên tử mà sẽ có điện tích dương trong các điều kiện sinh lý. Các ví dụ bao gồm điarginin piperazin. Các axit amin khác mà có điện tích dương hoặc sẽ có điện tích dương trong các điều kiện sinh lý có thể được thế cho arginin.

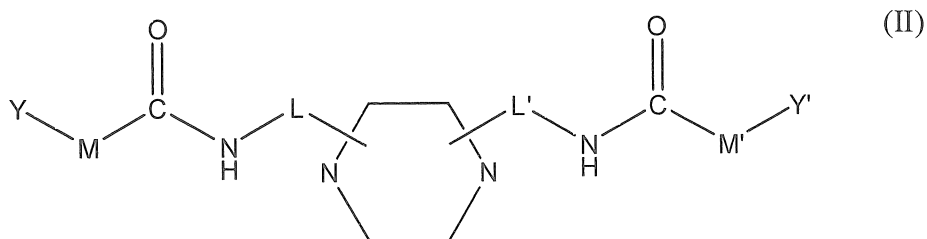
Thuật ngữ “thơm” được dùng trong bản mô tả này để chỉ các hệ nhân thơm, dị vòng, thơm ngưng tụ, dị vòng ngưng tụ, hai vòng thơm hoặc hai dị vòng có 5 đến 12 cạnh, tốt hơn là có 5 cạnh, 6 cạnh và 7 cạnh, tùy ý được thế. Định nghĩa một cách rộng, “Ar”, như được dùng trong bản mô tả này, bao gồm các nhóm thơm một nhân duy nhất có 5, 6 và 7 cạnh mà có thể chứa không đến bốn nguyên tử khác loại, ví dụ, benzen, pyrol, furan, thiophen, imidazol, oxazol, thiazol, triazol, pyrazol, pyridin, pyrazin, pyridazin và pyrimidin, và các nhóm tương tự. Các nhóm aryl này có các nguyên tử khác loại trong cấu

trúc nhân còn có thể được gọi là “dị vòng aryl” hoặc “thơm khác loại”. Nhân thơm có thể được thế ở một hoặc nhiều vị trí trên nhân bằng các phần tử thế như nêu trên, ví dụ, halogen, azit, alkyl, aralkyl, alkenyl, alkynyl, xycloalkyl, hydroxyl, alkoxy, amino, nitro, sulfhydryl, imino, amido, phosphonat, phosphinat, cacbonyl, carboxyl, silyl, ete, alkylthio, sulfonyl, sulfonamido, keton, aldehyt, este, heteroxyclyl, gốc thơm hoặc gốc thơm khác loại, --CF₃, --CN, hoặc các phần tử thế khác. Thuật ngữ “Ar” còn bao gồm các hệ nhân đa vòng có hai nhân vòng hoặc nhiều nhân vòng, trong đó hai hoặc nhiều nguyên tử cacbon là chung cho hai nhân liền kề (tức là “các nhân đã ngưng tụ”), trong đó ít nhất một trong số các nhân là thơm, ví dụ, nhân vòng còn lại hoặc các nhân có thể là xycloalkyl, xycloalkenyl, xycloalkynyl, aryl và/hoặc dị vòng. Các ví dụ về nhân dị vòng bao gồm, nhưng không giới hạn ở, benzimidazolyl, benzofuranyl, benzothiofuranyl, benzothiophenyl, benzoxazolyl, benzoxazolinyl, benzthiazolyl, benztriazolyl, benztetrazolyl, benzisoxazolyl, benzisothiazolyl, benzimidazolinyl, carbazolyl, 4aH carbazolyl, carbolinyl, chromanyl, chromenyl, xinnoliny, decahydroquinoliny, 2H,6H-1,5,2-dithiazinyl, dihydrofuro[2,3 b]tetrahydrofuran, furanyl, furazanyl, imidazolidinyl, imidazolinyl, imidazolyl, 1H-indazolyl, indolnyl, indoliny, indoliziny, indolyl, 3H-indolyl, isatinoyl, isobenzofuranyl, isochromanyl, isoindazolyl, isoindoliny, isoindolyl, isoquinoliny, isothiazolyl, isoxazolyl, metylendioxyphenyl, morpholiny, naphthyridinyl, octahydroisoquinoliny, oxadiazolyl, 1,2,3-oxadiazolyl, 1,2,4-oxadiazolyl, 1,2,5-oxadiazolyl, 1,3,4-oxadiazolyl, oxazolidinyl, oxazolyl, oxindolyl, pyrimidinyl, phenanthridinyl, phenanthroliny, phenaziny, phenothiazinyl, phenoxathinyl, phenoxaziny, phtalaziny, piperaziny, piperidinyl, piperidonyl, 4-piperidonyl, piperonyl, pteridinyl, puriny, pyranyl, pyraziny, pyrazolidinyl, pyrazolinyl, pyrazolyl, pyridaziny, pyridooxazol, pyridoimidazol, pyridothiazol, pyridinyl, pyridyl, pyrimidinyl, pyrolidinyl, pyroliny, 2H-pyrolyl, pyrolyl, quinazolinyl, quinoliny, 4H-quinoliziny, quinoxaliny, quinuclidinyl, tetrahydrofuranyl, tetrahydroisoquinoliny, tetrahydroquinoliny, tetrazolyl, 6H-1,2,5-thiadiazinyl, 1,2,3-thiadiazolyl, 1,2,4-thiadiazolyl, 1,2,5-thiadiazolyl, 1,3,4-thiadiazolyl,

thianthrenyl, thiazolyl, thienyl, thienothiazolyl, thienooxazolyl, thienoimidazolyl, thiophenyl và xantenyl.

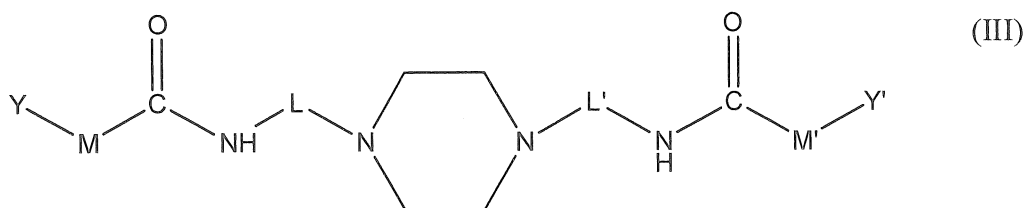
Các thuật ngữ “dị vòng” hoặc “vòng khác loại” được dùng trong bản mô tả này để chỉ gốc vòng gắn thông qua nguyên tử cacbon hoặc nguyên tử nito của nhân một vòng hoặc nhân hai vòng chứa 3 đến 10 nguyên tử trên nhân, và tốt hơn là chứa từ 5 đến 6 nguyên tử trên nhân, bao gồm nguyên tử cacbon và một đến bốn nguyên tử khác loại mỗi nguyên tử được chọn từ nhóm bao gồm oxy không peroxit, lưu huỳnh, và N(R), trong đó R không có mặt hoặc là H, O, (C₁₋₄)alkyl, phenyl hoặc benzyl, và tùy ý chứa 1 đến 3 liên kết đôi và tùy ý được thế bằng một hoặc nhiều phần tử thế. Các ví dụ về nhân dị vòng bao gồm, nhưng không giới hạn ở, benzimidazolyl, benzofuranyl, benzothiofuranyl, benzothiophenyl, benzoxazolyl, benzoxazoliny, benzthiazolyl, benztriazolyl, benztetrazolyl, benzisoxazolyl, benzisothiazolyl, benzimidazoliny, carbazolyl, 4*aH*-carbazolyl, carboliny, chromanyl, chromenyl, xinnoliny, decahydroquinoliny, 2*H*,6*H*-1,5,2-dithiaziny, dihydrofuro[2,3-*b*]tetrahydrofuran, furanyl, furazanyl, imidazolidiny, imidazoliny, imidazolyl, 1*H*-indazolyl, indolnyl, indoliny, indoliziny, indolyl, 3*H*-indolyl, isatinoyl, isobenzofuranyl, isochromanyl, isoindazolyl, isoindoliny, isoindolyl, isoquinoliny, isothiazolyl, isoxazolyl, metylendioxyphenyl, morpholiny, naphthyridiny, octahydroisoquinoliny, oxadiazolyl, 1,2,3-oxadiazolyl, 1,2,4-oxadiazolyl, 1,2,5-oxadiazolyl, 1,3,4-oxadiazolyl, oxazolidiny, oxazolyl, oxindolyl, pyrimidiny, phenanthridiny, phenanthroliny, phenaziny, phenothiaziny, phenoxathiny, phenoxaziny, phtalaziny, piperaziny, piperidiny, piperidonyl, 4-piperidonyl, piperonyl, pteridiny, puriny, pyranly, pyraziny, pyrazolidiny, pyrazoliny, pyrazolyl, pyridaziny, pyridoaxazol, pyridoimidazol, pyridothiazol, pyridiny, pyridyl, pyrimidiny, pyrolidiny, pyroliny, 2*H*-pyrolyl, pyrolyl, quinazoliny, quinoliny, 4*H*-quinoliziny, quinoxaliny, quinuclidiny, tetrahydrofuranyl, tetrahydroisoquinoliny, tetrahydroquinoliny, tetrazolyl, 6*H*-1,2,5-thiadiaziny, 1,2,3-thiadiazolyl, 1,2,4-thiadiazolyl, 1,2,5-thiadiazolyl, 1,3,4-thiadiazolyl, thianthrenyl, thiazolyl, thienyl, thienothiazolyl, thienooxazolyl, thienoimidazolyl, thiophenyl và xantenyl.

Theo phương án khác của sáng chế, chất ức chế là hợp chất có công thức II hoặc muối được dụng của nó:



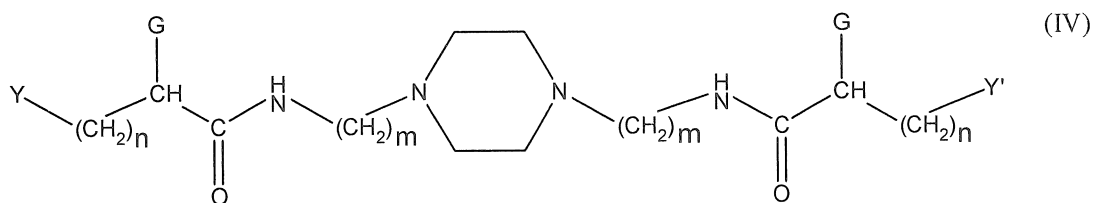
trong đó mỗi L, L', M, M', Y và Y' là như nêu trên.

Theo phương án khác của sáng chế, chất ức chế là hợp chất có công thức III hoặc muối được dụng của nó:



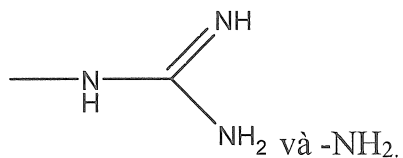
trong đó L, L', M, M', Y và Y' là như nêu trên.

Theo phương án khác nữa của sáng chế, chất ức chế là hợp chất có công thức (IV) hoặc muối được dụng của nó:

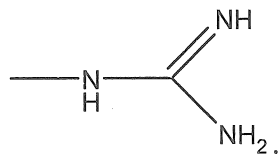


trong đó Y và Y' là như nêu trên và n bằng 3 đến 5, m bằng 3 đến 6 và G được chọn từ -NH₂ và OH. Tốt nhất, nếu G là amino.

Theo phương án khác nữa của sáng chế, chất ức chế là hợp chất có công thức bất kỳ trong số các công thức II, III hoặc IV và Y và Y' độc lập được chọn từ nhóm bao gồm các nhóm có công thức:

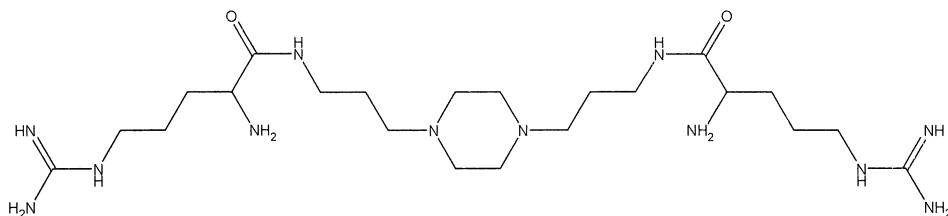


Tốt nhất, nếu G là -NH₂ và Y và Y' là nhóm có công thức:



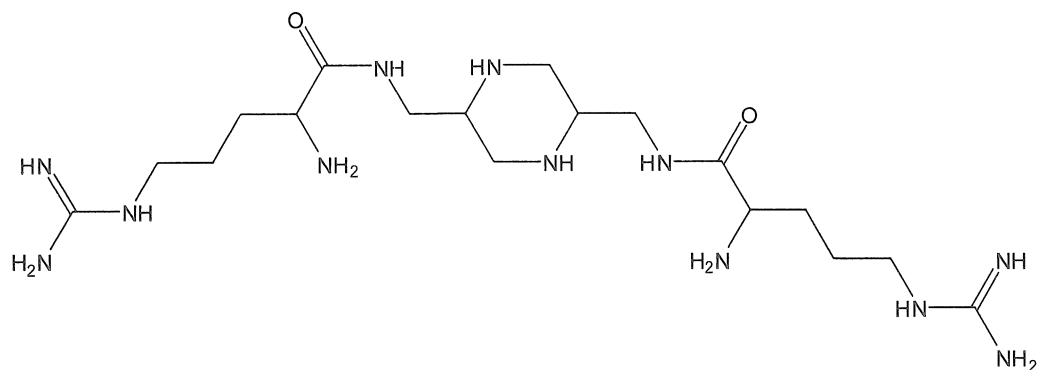
Do đó, theo một phương án, hợp chất theo sáng chế là đi-arginin piperazin (“DAP”), như hợp chất có công thức V, hoặc hợp chất có liên quan có công thức VI, hoặc các muối được dụng của hợp chất bất kỳ trong số hai hợp chất này:

(V)



(3-{4-[3-(2-amino-5-guanidino-pentanoylamino)-propyl]-piperazin-1-yl}-propyl)-amit của axit 2-amino-5-guanidino-pentanoic; hoặc

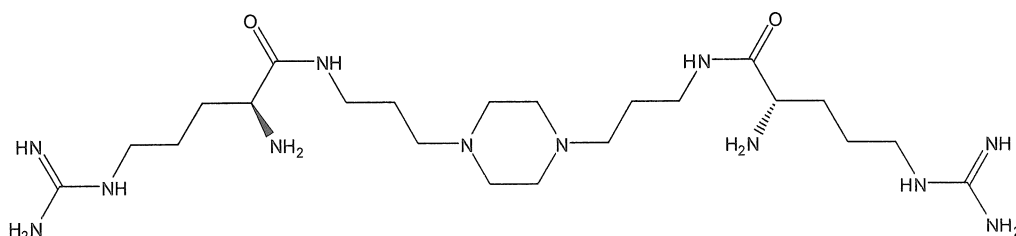
(VI)



{5-[(2-amino-5-guanidino-pentanoylamino)-metyl]-piperazin-2-ylmetyl}-amit của axit 2-amino-5-guanidino-pentanoic.

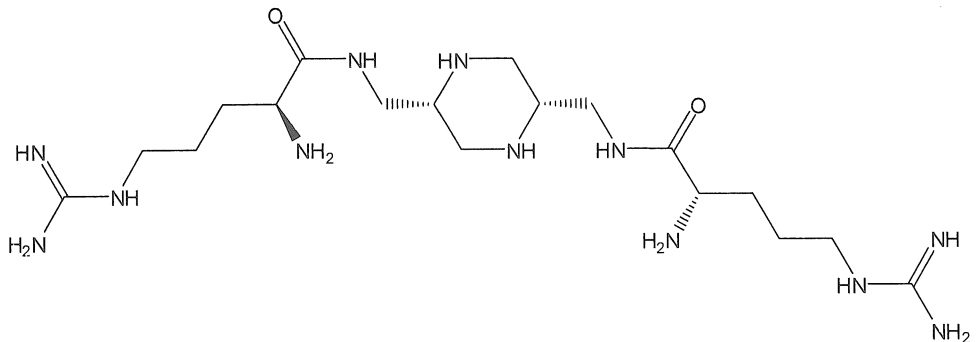
Theo khía cạnh cụ thể, hợp chất có công thức V là chất đồng phân lập thể có công thức VII:

(VII)



Theo phương án cụ thể khác, hợp chất có công thức VI là chất đồng phân lập thể có công thức VIII:

(VIII)



Thuật ngữ “muối được dụng” của hợp chất như được dùng trong bản mô tả này có nghĩa là muối mà là được dụng và có được tính mong muốn của hợp chất gốc. Các muối được dụng bao gồm các muối chứa nhóm axit hoặc nhóm bazơ có mặt trong các hợp chất theo sáng chế. Các muối cộng axit được dụng bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các muối hydroclorua, hydrobromua, hydroiodua, nitrat, sulfat, bisulfat, phosphat, axit phosphat, isonicotinat, axetat, lactat, salixylat, xitrat, tartrat, pantothenat, bitartrat, ascorbat, succinat, maleat, gentisinat, fumarat, gluconat, glucaronat, sacarat, format, benzoat, glutamat, metansulfonat, etansulfonat, benzensulfonat, p-

toluensulfonat và pamoat (tức là 1,1'-metylen-bis-(2-hydroxy-3-naphtoat)). Các muối bazơ thích hợp bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các muối của nhôm, canxi, lithi, magie, kali, natri, kẽm, và dietanolamin.

Hợp chất theo sáng chế ức chế hoạt tính của các chất ức chế đông máu. Một cơ chế được đề xuất về hoạt động của hợp chất theo sáng chế là thông qua việc liên kết các phân tử có điện tích âm (ví dụ, fondaparinux, heparin không phân đoạn, LMWH, đã được bộc lộ trong bản mô tả này). Các chất ức chế đông máu khác (ví dụ, các chất ức chế yếu tố IIa và yếu tố Xa như dabigatran, apixaban, edoxaban, và rivaroxaban, đã được bộc lộ trong bản mô tả này) cũng có điện tích âm; do đó, hợp chất theo sáng chế có thể ức chế các chất ức chế đông máu này thông qua việc trung hòa các gốc có điện tích âm của chúng.

Cơ chế được đề xuất khác về hoạt động của hợp chất theo sáng chế là thông qua các tương tác vật lý yếu như liên kết hydro và các tương tác kỵ nước với các chất ức chế đông máu. Các chất ức chế yếu tố IIa và yếu tố Xa dùng qua đường miệng có các phân kỵ nước, mà có thể gây ra sự kết hợp kỵ nước với hợp chất theo sáng chế, ví dụ, DAP.

Do đó, theo một số phương án, các hợp chất theo sáng chế chứa ít nhất một gốc vòng kỵ nước, ví dụ, một hoặc hỗn hợp gồm các nhân béo hoặc thơm kể cả các nhân ngưng tụ. Theo các phương án khác, các hợp chất theo sáng chế chứa ít nhất một gốc vòng kỵ nước và ít nhất hai gốc có điện tích dương hoặc gốc có một phần điện tích ở độ pH sinh lý.

Theo một số phương án của sáng chế, một hoặc cả hai arginin của hợp chất có công thức V và hợp chất có công thức VI (hoặc hợp chất có công thức VII và hợp chất có công thức VIII) được thế bằng một hoặc nhiều axit amin có điện tích dương, các chất dẫn xuất của chúng, hoặc các hợp chất có điện tích tương tự, ví dụ, lysin, histidin, ornithin. Các arginin trong hợp chất có công thức V và hợp chất có công thức VI hoặc các axit amin có điện tích dương được thế cho arginin đó có thể là các axit amin có trong tự nhiên (tức là axit amin L), các chất đồng phân đối ảnh của chúng (tức là axit amin D), hoặc hỗn hợp triệt quang hoặc hỗn hợp khác của chúng. Thuật ngữ “các chất đồng phân

đối ảnh” có nghĩa là hai chất đồng phân lập thể của hợp chất là ảnh không chồng chập của nhau qua gương.

Các định nghĩa hóa học lập thể và các quy ước hóa học lập thể được dùng trong bản mô tả này thường tuân theo: S. P. Parker, Ed., McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (1984) McGraw-Hill Book Company, New York; và Eliel, E. and Wilen, S., Stereochemistry of Organic Compounds (1994) John Wiley & Sons, Inc., New York. Nhiều hợp chất hữu cơ tồn tại ở dạng quay quang, tức là chúng có khả năng quay mặt phẳng của ánh sáng phân cực phẳng. Khi mô tả hợp chất quay quang, các tiền tố D và L hoặc R và S được dùng để biểu thị cấu hình tuyệt đối của phân tử về (các) tâm không đối xứng của nó. Các tiền tố D và L hoặc (+) và (-) được dùng để chỉ dấu chiều quay của ánh sáng phân cực phẳng bởi hợp chất này, trong đó (-) hay L có nghĩa rằng hợp chất này quay trái. Hợp chất có tiền tố (+) hoặc D có nghĩa là quay phải. Đối với một cấu trúc hóa học nhất định, các chất đồng phân lập thể này là giống hệt nhau chỉ trừ một điều chúng là ảnh qua gương của nhau. Chất đồng phân lập thể cụ thể còn có thể được gọi chất đồng phân đối ảnh, và hỗn hợp gồm các chất đồng phân này thường được gọi là hỗn hợp đồng phân đối ảnh. Hỗn hợp gồm các chất đồng phân đối ảnh theo tỷ lệ 50:50 được gọi là hỗn hợp triệt quang hoặc chất triệt quang, mà có thể xuất hiện khi không có chọn lọc về mặt lập thể hoặc đặc thù lập thể trong phản ứng hóa học hoặc quy trình hóa học. Các thuật ngữ “hỗn hợp triệt quang” và “chất triệt quang” có nghĩa là hỗn hợp đẳng mol gồm hai loại chất đồng phân đối ảnh, không có hoạt tính quay quang.

Theo các phương án khác của sáng chế, hợp chất theo sáng chế chứa ít nhất một gốc vòng kỵ nước, ví dụ, một hoặc hỗn hợp gồm các nhân béo và thơm, kể cả các nhân ngưng tụ. Các hợp chất đáng quan tâm chứa ít nhất một gốc vòng kỵ nước và ít nhất hai gốc có điện tích dương hoặc gốc có một phần điện tích ở độ pH sinh lý.

Sự quan tâm đặc biệt nên được dành cho việc thiết kế các tác nhân điều trị bệnh trên cơ sở peptit, vì nhiều tác nhân này có thể gây ra các phản ứng

miễn dịch không mong muốn và thường nghiêm trọng một khi được cho đối tượng dùng. Hợp chất theo sáng chế được thiết kế để có phân tử lượng đủ thấp để làm giảm đến mức tối thiểu các vấn đề về tính sinh miễn dịch. Theo một phương án, để tránh kích hoạt đáp ứng miễn dịch, hợp chất này được thiết kế sao cho phân tử lượng của nó nhỏ hơn khoảng 5000 dalton, như nhỏ hơn hoặc khoảng 1000 dalton, ví dụ, khoảng 500 dalton. Theo một phương án, phân tử lượng của hợp chất này là khoảng 512 dalton.

Tốt hơn là, các hợp chất theo sáng chế không liên kết, hoặc theo cách khác cản trở chức năng của ERG, một kênh ion kali mà góp phần vào tính dẫn điện của tim. Việc ức chế kênh kali này có thể dẫn đến hội chứng QT kéo dài có tiềm năng gây tử vong, và một vài dược chất ứng viên thành công theo cách khác đã thể hiện sự liên kết với ERG của người.

Ngoài ra, tốt hơn là hợp chất theo sáng chế không ức chế hoặc có tác dụng làm cơ chất đối với các enzym sắc tố tế bào liên kết với màng (membrane-bound cytochrome - CYP) p450. CYP là enzym chính tham gia vào quá trình chuyển hóa dược chất, và việc điều biến hoạt tính của CYP có thể cản trở quá trình thanh thải và chuyển hóa của các dược chất khác được cho đối tượng dùng, gây ra các tương tác dược chất không mong muốn.

Tốt hơn nữa, nếu các hợp chất theo sáng chế không thể hiện liên kết đáng kể với protein trong huyết tương *in vitro* (ví dụ, liên kết albumin). Vì các hợp chất theo sáng chế phần lớn không liên kết với các protein trong huyết tương, nên chúng thể hiện thời gian bán tồn hoạt tính ngắn, làm giảm đến mức tối thiểu nguy cơ dùng quá liều do sự tích tụ.

II. Tổng hợp các chất đảo ngược tác dụng chống đông

Các hợp chất và các muối dược dụng của chúng được bộc lộ trong bản mô tả này được điều chế bằng cách áp dụng nhiều phương pháp bắt đầu từ các hợp chất có bán trên thị trường, các hợp chất đã biết, hoặc các hợp chất điều chế được theo các phương pháp đã biết. Các quy trình tổng hợp làm ví dụ đối với một trong số các hợp chất theo sáng chế (hợp chất có công thức V, di-arginin piperazin, “DAP”) được bao gồm trong các sơ đồ dưới đây. Các sơ đồ

dưới đây cũng áp dụng được đối với chất đồng phân lập thể ADP có công thức VII bằng cách chọn lọc các hợp chất đồng phân lập thể ban đầu thích hợp. Các hợp chất khác theo sáng chế có thể được tổng hợp theo sơ đồ tổng hợp tương tự. Người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này cần phải hiểu rằng thứ tự của các bước được thể hiện trong bản mô tả này có thể được thay đổi để làm thích ứng với chức năng ở phân tử đích. Người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này cũng cần phải hiểu rằng có thể cần đến các bước bảo vệ và các bước khử bảo vệ cho quy trình tổng hợp. Nhu cầu bảo vệ và khử bảo vệ, và chọn lọc các nhóm bảo vệ thích hợp được tìm thấy, ví dụ, trong tài liệu: Greene and Wuts, *Protecting Groups in Organic Synthesis*, Second Edition, John Wiley & Sons (1991), tài liệu này được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn.

Theo một số phương án của sáng chế, nhóm bảo vệ là nhóm butyloxy-cacbonyl (Boc) bậc ba. Theo các phương án khác của sáng chế, nhóm bảo vệ là nhóm 2,2,4,6,7-pentametyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl (Pbf). Theo phương án khác, nhóm bảo vệ axit amin có thể là, nhưng không giới hạn ở, 2,2,5,7,8-pentametyl-chroman-6-sulphonyl (PMC).

Các nhóm bảo vệ có thể được loại bỏ qua nhiều đường khác nhau. Việc loại bỏ nhóm bảo vệ bao gồm, ví dụ, bước xử lý hợp chất đã được bảo vệ bằng axit trifloaxetic (TFA), dung dịch nước HCl, hoặc làm nóng trong axit axetic. Vì việc loại bỏ các nhóm bảo vệ, ví dụ, việc loại bỏ các nhóm bảo vệ trong các điều kiện axit, có thể khiến tạo ra các loại cation mà có thể alkyl hóa các nhóm chức trên mạch peptit, nên các chất tẩy tạp có thể được bổ sung vào ở bước khử bảo vệ để phản ứng với chất bất kỳ trong số các chất có hoạt tính phản ứng. Các ví dụ về chất tẩy tạp bao gồm, nhưng không giới hạn ở, nước, các chất dẫn xuất anisol và các chất dẫn xuất thiol. Do đó, theo một phương án, việc loại bỏ các nhóm bảo vệ bao gồm bước xử lý hợp chất đã được bảo vệ bằng TFA và chất tẩy tạp (ví dụ, TFA và nước).

Các dung môi khác nhau, ví dụ, các dung môi hữu cơ, có thể được sử dụng ở các bước của quy trình tổng hợp. Các dung môi thích hợp bao gồm,

nhưng không giới hạn ở, dimetyl sulfoxit, dimetylformamit (DMF), tetrahydrofuran, metanol, etanol, metylen clorua, toluen, và axeton. Theo một số phương án, dung môi là DMF.

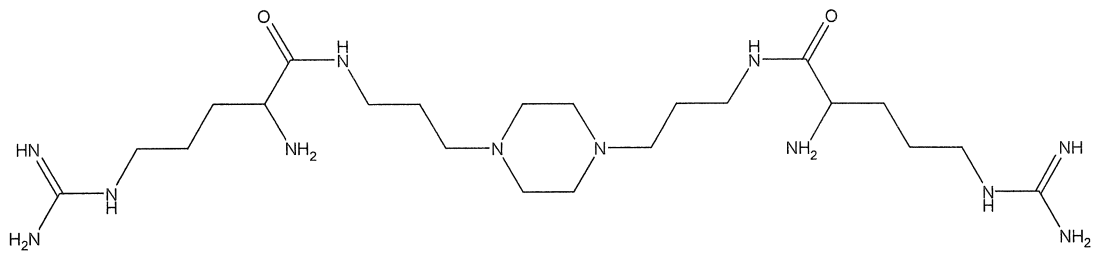
Các tác nhân liên kết axit thích hợp có thể được sử dụng ở các bước của quy trình tổng hợp. Các chất này bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các bazơ hữu cơ, ví dụ, pyridin, trietylamin, trietanolamin, 1,8-điazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU), và diisopropyletylamin (DIEA); và bazơ vô cơ, ví dụ, natri hydrua, kali cacbonat, và natri cacbonat. Theo một số phương án, chất liên kết axit là DIEA.

Quy trình tổng hợp có thể bao gồm việc sử dụng các chất phản ứng liên hợp peptit. Các chất phản ứng liên hợp peptit có thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở, 1-etyl-3-(3-dimetylaminopropyl) carbodiimít (EDC), N-hydroxybenzotriazol (HOBt), carbonyldiimidazol (CDI), dicyclohexylcarbodiimít (DCC), este N-hydroxysuccinamit (OSu) có hoạt tính, O-Benzotriazol-N,N,N',N'-tetrametyl-uron-hexafluorophosphat (HBTU), và hỗn hợp của chúng. Theo một phương án, tác nhân liên hợp peptit là HBTU. Theo phương án khác, tác nhân liên hợp peptit là EDC/HOBt. Theo phương án khác nữa, tác nhân liên hợp peptit là este OSu hoạt tính.

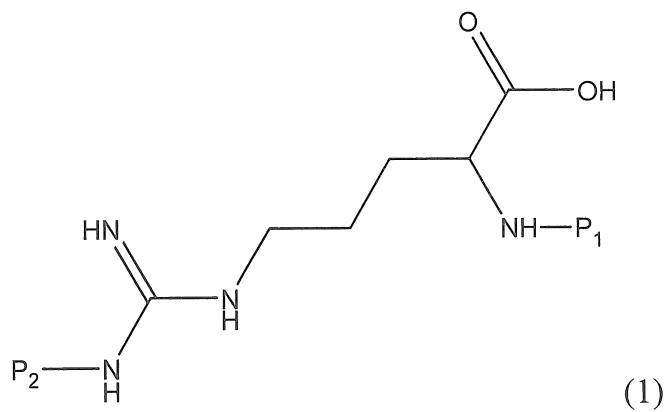
Ngoài ra, quy trình tổng hợp có thể bao gồm bước tinh chế sản phẩm thô, ví dụ, theo phương pháp sắc ký cột. Các sản phẩm mong muốn của từng bước hoặc một nhóm các bước có thể được tách và/hoặc được tinh chế đến mức độ đồng nhất mong muốn theo các kỹ thuật chung trong lĩnh vực kỹ thuật này. Thông thường, các bước tách này bao gồm việc chiết đa pha, kết tinh ra khỏi dung môi hoặc hỗn hợp dung môi, chưng cất, làm thăng hoa, hoặc sắc ký. Sắc ký có thể bao gồm phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp bao gồm, ví dụ, các phương pháp và thiết bị đảo pha và pha thuận; loại trừ theo kích thước; trao đổi ion; sắc ký lỏng cao áp, trung áp và thấp áp; sắc ký phân tích ở quy mô nhỏ; sắc ký tầng di chuyển mô phỏng (simulated moving bed - SMB) và sắc ký lớp mỏng hoặc sắc ký lớp dày, cũng như kỹ thuật sắc ký lớp mỏng ở quy mô nhỏ và kỹ thuật sắc ký cực nhanh.

Theo một sơ đồ, hợp chất có công thức V (DAP):

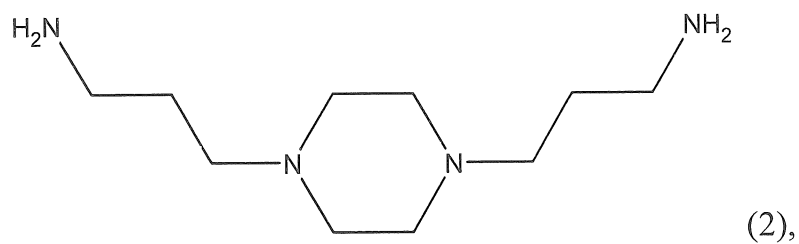
(V)



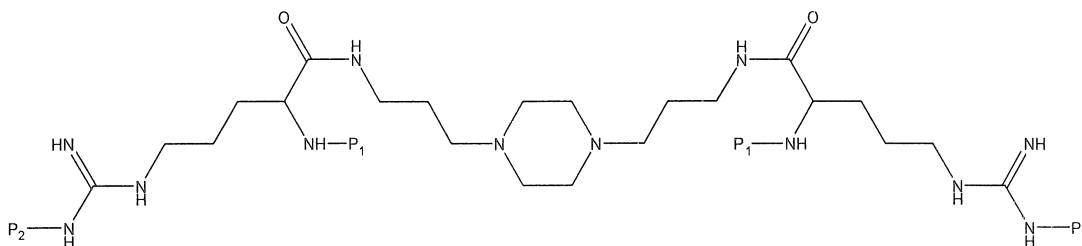
được tổng hợp bằng cách cho hợp chất có công thức 1 với đương lượng dư (ví dụ, ít nhất khoảng hai đương lượng)



phản ứng với một đương lượng của hợp chất có công thức 2:



với sự có mặt của tác nhân ngẫu hợp peptit, để thu được hợp chất có công thức 3:



(3),

trong đó P1 là nhóm bảo vệ và P2 là nhóm bảo vệ hoặc là hydro.

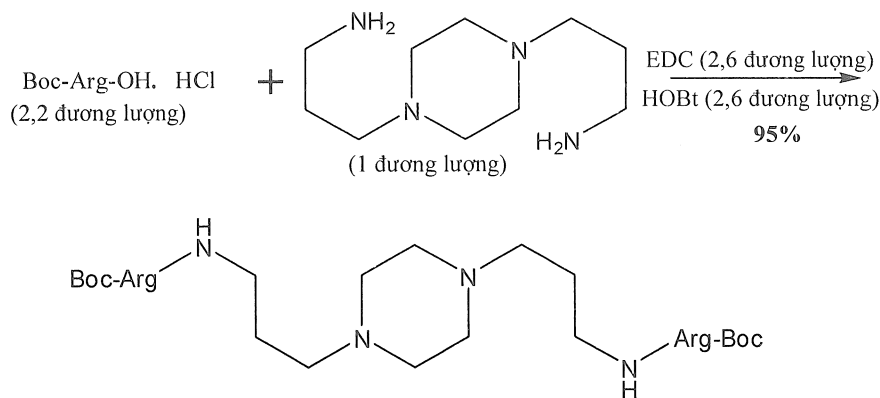
Theo một phương án, tác nhân liên hợp peptit là HBTU, EDC/HOBt, hoặc este OSu hoạt tính Theo một phương án, nhóm bảo vệ P1 là Boc. Theo phương án khác, nhóm bảo vệ P2 là Pbf. Theo một phương án khác, nhóm bảo vệ P1 là Boc và P2 là hydro.

Tiếp đó, hợp chất có công thức 3 có thể được tinh chế. Việc tinh chế này có thể bao gồm các phương pháp sắc ký cột khác nhau đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Các nhóm bảo vệ của hợp chất có công thức 3 có thể được loại bỏ theo nhiều phương pháp khác nhau đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này để thu được hợp chất có công thức V. Việc khử bảo vệ có thể đạt được, ví dụ, bằng cách loại bỏ các nhóm bảo vệ bằng cách sử dụng axit trifloaxetic (TFA) và nước, TFA và nước hoặc chất tẩy tạt khác bao gồm, nhưng không giới hạn ở, dung dịch nước HCl, hoặc làm nóng trong axit axetic.

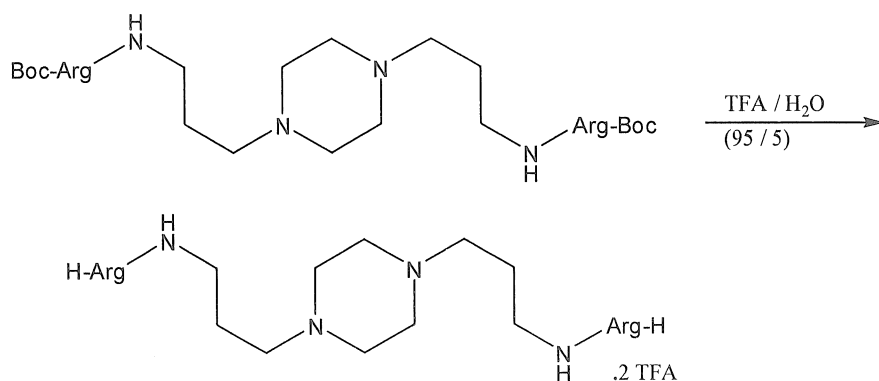
Hợp chất có thể được tinh chế tiếp bằng cách áp dụng phương pháp sắc ký cột, như trao đổi sắc ký ion với các dung dịch muối đậm hoặc sắc ký lỏng cao áp (HPLC) điều chế với axit trifloaxetic hoặc axit axetic làm dung dịch đậm.

Theo sơ đồ cụ thể hơn, việc liên hợp bao gồm bước cho hợp chất có công thức 1, trong đó P1 là Boc và P2 là nguyên tử hydro (được thể hiện là Boc-Arg-OH·HCl dưới đây), phản ứng với hợp chất có công thức 2 như được thể hiện dưới đây:



Sản phẩm thô thu được có độ tinh khiết cao hơn 95% theo phương pháp sắc ký lớp mỏng (TLC).

Tiếp theo, bước khử bảo vệ được thực hiện như được thể hiện dưới đây:



Sản phẩm khử bảo vệ được tinh chế theo phương pháp sắc ký lỏng cao áp (HPLC) điều chế bằng cách sử dụng dung dịch đệm axit axetic 1%. Quan sát thấy độ tinh khiết của sản phẩm $\geq 98\%$. Phần TFA còn lại được loại bỏ bằng nhựa DOWEX với lượng nhỏ. Phân tử lượng của DAP (hợp chất có công thức V) là 512,4, và hợp chất này được tổng hợp theo Sơ đồ nêu trên thể hiện pic chính dưới đây theo phổ khối: $[\text{M}+\text{H}]^+=513,4$.

III. Dược phẩm

Các dược phẩm chứa các hợp chất theo sáng chế được đề xuất. Dược phẩm này có thể chứa, ngoài hợp chất theo sáng chế, chất mang dược dụng hoặc tá dược. Thuật ngữ “dược dụng” có nghĩa là chất không độc mà tương thích với tính chất vật lý và tính chất hóa học của hoạt chất và không ảnh hưởng đến hiệu quả của hoạt tính sinh học của thành phần hoạt tính. Các dược phẩm này có thể chứa các chất pha loãng, các chất đệm, các muối, các dung

dịch đệm, các chất làm ổn định, các chất hòa tan, và các chất khác nhau khác đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các đặc tính của chất mang sẽ phụ thuộc vào đường dùng, và thường là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Dược phẩm theo sáng chế có thể được làm thích ứng để dùng trong ruột – cách dùng dược phẩm, trong đó dược phẩm này được hấp thụ thông qua đường tiêu hóa, ví dụ, ăn vào qua đường miệng, dùng qua đường trực tràng. Theo các phương án khác, dược phẩm theo sáng chế có thể được làm thích ứng để dùng ngoài đường tiêu hóa – cách dùng dược phẩm, trong đó dược phẩm này được đưa vào qua đường không phải là đường tiêu hóa, ví dụ, qua đường tĩnh mạch, dưới da, đường da, đường mũi, phổi, âm đạo, đặt trong má.

Các dược phẩm thích hợp, ví dụ, các dược phẩm để dùng qua đường miệng, có thể được bào chế như đã được bộc lộ trong các tài liệu tham khảo như “Pharmaceutical dosage form tablets”, eds. Liberman et. al. (New York, Marcel Dekker, Inc., 1989), “Remington – The science and practice of pharmacy”, 20th ed., Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 2000, và “Pharmaceutical dosage forms and drug delivery systems”, 6th Edition, Ansel et.al., (Media, PA: Williams and Wilkins, 1995), các tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn, mà cung cấp thông tin về các chất mang, các chất liệu (ví dụ, các chất bao), thiết bị và quy trình bào chế viên nén và viên nang và các dạng liều viên nén, viên nang, và hạt giải phóng giải phóng chậm.

Các ví dụ về các chất bao thích hợp bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các polyme xenluloza như xenluloza axetat phtalat, hydroxypropyl xenluloza, hydroxypropyl metylxenluloza, hydroxypropyl metylxenluloza phtalat và hydroxypropyl metylxenluloza axetat succinat; polyvinyl axetat phtalat, các polyme và các copolyme của axit acrylic, và nhựa metacrylic mà có thể mua được trên thị trường với nhãn hiệu Eudragit® (Roth Pharma, Westerstadt, Germany), Zein, senlac, và các polysacarit. Ngoài ra, chất bao có thể là các chất mang thông thường như chất làm mềm, chất tạo màu, chất màu, chất gây trượt, tác nhân làm ổn định, chất tạo lỗ và chất hoạt động bề mặt.

Các tá dược được dùng tùy ý có mặt trong các viên nén, hạt, hoặc các phần tử chứa thuốc bao gồm, nhưng không giới hạn ở, chất pha loãng, chất kết dính, chất làm trơn, chất gây rã, chất tạo màu, chất làm ổn định, và chất hoạt động bề mặt.

Các chất pha loãng, còn được gọi là "chất độn", thường là cần thiết để tăng kích thước của dạng liều rắn sao cho tạo ra kích thước thích hợp để nén viên nén hoặc tạo hạt và hạt. Các chất pha loãng thích hợp bao gồm, nhưng không giới hạn ở, đicacxi phosphat dihydrat, cacxi sulfat, lactoza, sucroza, manitol, sorbitol, xenluloza, xenluloza vi tinh thể, cao lanh, natri clorua, tinh bột khô, tinh bột đã được thủy phân, tinh bột đã được gelatin sơ bộ, silicon đioxit, titan oxit, magie nhôm silicat và bột đường.

Các chất kết dính được sử dụng để mang lại các đặc tính kết dính cho chế phẩm dạng liều rắn, và bằng cách đó đảm bảo rằng viên nén hoặc hạt hoặc hạt vẫn còn nguyên sau khi tạo ra dạng liều. Các chất kết dính thích hợp bao gồm, nhưng không giới hạn ở, tinh bột, tinh bột đã được gelatin sơ bộ, gelatin, đường (kể cả sucroza, glucoza, đextroza, lactoza và sorbitol), polyetylen glycol, sáp, gôm tự nhiên và gôm tổng hợp như acacia, tragacan, natri alginat, xenluloza, bao gồm hydroxypropylmetylxenluloza, hydroxypropylxenluloza, etylxenluloza, và veegum (magie nhôm silicat), và các polyme tổng hợp như copolyme của axit acrylic và axit metacrylic, copolyme của axit metacrylic, copolyme của metyl metacrylat, copolyme của aminoalkyl metacrylat, axit polyacrylic/axit polymetacrylic và polyvinylpyrrolidon.

Các chất làm trơn được dùng để tạo điều kiện thuận lợi cho việc bào chế viên nén. Các ví dụ về chất làm trơn thích hợp bao gồm, nhưng không giới hạn ở, magie stearat, cacxi stearat, axit stearic, glyxerol behenat, polyetylen glycol, talc, và dầu khoáng.

Các chất gây rã được dùng để tạo điều kiện thuận lợi cho dạng liều phân rã hoặc "tan rã" sau khi dùng, và thường bao gồm, nhưng không giới hạn ở, tinh bột, natri tinh bột glycolat, natri carboxymetyl tinh bột, natri carboxymetyl xenluloza, hydroxypropyl xenluloza, tinh bột đã được gelatin sơ bộ, đất sét,

xenluloza, alginin, gôm hoặc các polyme liên kết ngang, như PVP liên kết ngang (do Polyplasdone XL từ GAF Chemical Corp cung cấp).

Các chất làm ổn định được dùng để ức chế hoặc làm chậm lại các phản ứng phân hủy thuốc, bao gồm, ví dụ, các phản ứng oxy hóa.

Các chất hoạt động bề mặt có thể là các chất hoạt động bề mặt anion, cation, lưỡng tính hoặc không ion. Các chất hoạt động bề mặt anion thích hợp bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các chất chứa ion carboxylat, ion sulfonat và ion sulfat. Các ví dụ về các chất hoạt động bề mặt anion bao gồm natri, kali, amoni của alkyl sulfonat và alkyl aryl sulfonat mạch dài như natri dodecylbenzen sulfonat; dialkyl natri sulfosuccinat, như natri dodecylbenzen sulfonat; dialkyl natri sulfosuccinat, như natri bis-(2-ethylthioxyl)-sulfosuccinat; và alkyl sulfat như natri lauryl sulfat. Các chất hoạt động bề mặt cation bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các hợp chất amoni bậc bốn như benzalkoni clorua, benzethoni clorua, xetrimoni bromua, stearyl dimethylbenzyl amoni clorua, polyoxyetylen và amin dừa. Các ví dụ về chất hoạt động bề mặt không ion bao gồm etylen glycol monostearat, propylen glycol myristat, glyxeryl monostearat, glyxeryl stearat, polyglyxeryl-4-oleat, sorbitan axylat, sucroza axylat, PEG-150 laurat, PEG-400 monolaurat, polyoxyetylen monolaurat, polysorbat, polyoxyetylen octylphenylete, PEG-1000 xetyl ete, polyoxyetylen tridexyl ete, polypropylen glycol butyl ete, Poloxame® 401, stearyl monoisopropanolamit, và polyoxyetylen amit của mỡ bò được hydro hóa. Các ví dụ về chất hoạt động bề mặt lưỡng tính bao gồm natri N-dodecyl-.beta.-alanin, natri N-lauryl-.beta.-iminodipropionat, myristoamphoaxetat, lauryl betain và lauryl sulfobetain.

Các dược phẩm theo sáng chế có thể được thiết kế để giải phóng trễ, chậm, theo nhịp hoặc giải phóng theo cách cải biến khác.

Nếu muốn, viên nén, hạt, hạt hoặc các phần tử này còn có thể chứa lượng nhỏ các chất phụ trợ không độc như chất thấm ướt hoặc tác nhân nhũ hóa, chất màu, chất đệm độ pH, và chất bảo quản.

Các chế phẩm kết dính sinh học còn có thể được dùng để làm gia tăng mức độ hấp thu hoặc thay đổi mức độ giải phóng. Các chế phẩm này là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, xem đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 20060045865 của Jacob, được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

Các dược phẩm đã được làm thích ứng để phân phối qua đường mũi hoặc dùng qua đường phổi cũng có thể là hữu dụng. Sol khí để phân phối các tác nhân điều trị bệnh vào đường hô hấp đã được bộc lộ, ví dụ, xem: Adjei, A. and Garren, J. Pharm. Res., 7: 565-569 (1990); và Zanen, P. and Lamm, J.-W.J. Int. J. Pharm., 114: 111-115 (1995). Đường hô hấp bao gồm đường hô hấp trên, gồm miệng hầu và thanh quản, tiếp theo là đường hô hấp dưới, gồm khí quản, tiếp theo là nhánh rẽ vào phế quản và tiểu phế quản. Đường hô hấp trên và đường hô hấp dưới được gọi là đường dẫn hô hấp. Tiếp đó, tiểu phế quản đầu tận cùng chia vào tiểu phế quản hô hấp mà sau đó dẫn đến vùng hô hấp cuối cùng, phế nang, hoặc vùng phổi sâu. Gonda, I. "Aerosols for delivery of therapeutic and diagnostic agents to respiratory tract" trong Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 6:273-313 (1990). Vùng phổi sâu, hoặc phế nang, là đích chính của sol khí hít vào nhằm mục đích điều trị bệnh để phân phối thuốc qua đường nội hấp.

Các thuốc được dùng bằng cách xông có thể ở dạng chế phẩm sol khí lỏng.

Đối với các dược phẩm dùng để tiêm truyền (ví dụ, các dược phẩm qua đường tĩnh mạch), chất mang là nước cất vô trùng, nước muối, nước muối được đệm, hoặc tá dược được dụng khác dùng để tiêm. Các chất phụ gia có thể bao gồm chất bảo quản và axit hoặc bazơ để điều chỉnh độ pH, để làm thay đổi độ hòa tan hoặc mức độ hấp thụ.

Theo một phương án, theo đó dược phẩm này chứa hợp chất DAP có công thức V (hoặc chất đồng phân lập thể của nó có công thức VII) và dược phẩm này được làm thích ứng để dùng ngoài đường tiêu hóa trong thuốc tiêm, hợp chất này được hòa tan trong nước với chất cải biến trương lực và chất cải biến nồng độ phân tử gam thích hợp (như nước muối được đệm phosphat).

DAP hòa tan trong nước ở nồng độ cao hơn 100mg/ml. Theo một phương án, DAP được làm thích ứng ở dạng dung dịch vô trùng để dùng qua đường tĩnh mạch (IV). Theo một khía cạnh, nồng độ phân tử gam của dược phẩm, trong đó DAP đã được làm thích ứng để dùng qua đường tĩnh mạch (IV) được điều chỉnh đến 290mOsm/l bằng natri clorua, và độ pH được điều chỉnh đến 7,4 bằng natri hydroxit. Tốt hơn, nếu dược phẩm này được dùng để truyền liều cao qua đường tĩnh mạch bằng cách đẩy chậm.

IV. Phương pháp sử dụng

Sáng chế đề xuất hợp chất theo sáng chế (ví dụ, hợp chất có công thức I, II, III, IV, V, VI, VII, hoặc VIII) hoặc muối được dùng của nó để sử dụng trong sản xuất thuốc để làm đảo ngược hoàn toàn hoặc đảo ngược một phần tác dụng chống đông máu của chất ức chế đông máu ở đối tượng có nhu cầu điều trị bệnh. Sáng chế còn đề xuất hợp chất theo sáng chế hoặc muối được dùng của nó để sử dụng trong phương pháp thúc đẩy sự đông máu ở đối tượng có nhu cầu điều trị bệnh, trong đó đối tượng này nhận chất ức chế đông máu. Ngoài ra, sáng chế đề xuất hợp chất theo sáng chế hoặc muối được dùng của nó để sử dụng trong phương pháp làm trung hòa hoặc ức chế chất ức chế đông máu.

Theo sáng chế, chất ức chế đông máu (trong bản mô tả này còn được gọi là chất chống đông máu) là phân tử mà ức chế quá trình đông máu. Các chất ức chế đông máu làm ví dụ bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các chất hoạt hóa kháng thrombin (ví dụ, heparin không phân đoạn và LMWH), các chất ức chế yếu tố IIa, và các chất ức chế yếu tố Xa.

Heparin: Heparin là mucopolysacarit có trong tự nhiên mà hoạt động trong cơ thể như đồng tác nhân kháng thrombin để ngăn ngừa máu đông cục trong mạch. Hợp chất này được tạo ra bởi bạch cầu ưa kiềm và các tế bào nuôi, mà được tìm thấy trong nhiều trong mô liên kết xung quanh mao mạch, đặc biệt là ở phổi và gan. Ở dạng muối natri, heparin được dùng làm chất chống đông máu nhằm mục đích điều trị bệnh.

Heparin phân tử lượng thấp: heparin phân tử lượng thấp (LMWH) được tạo ra từ heparin bằng cách áp dụng các phương pháp khử polyme khác nhau,

bao gồm việc khử polyme oxy hóa bằng hydro peroxit, được dùng trong việc sản xuất arđeparin (NORMIFLO®); phân cắt loại amin bằng isoamyl nitrit, dùng trong việc sản xuất certoparin (SANDOPARIN®); phân cắt trong điều kiện kiềm mang tính loại bỏ beta benzyl este của heparin, dùng trong việc sản xuất enoxaparin (LOVENOX® và CLEXANE®); khử polyme oxy hóa bằng Cu^{2+} và hydro peroxit, dùng trong việc sản xuất parnaparin (FLUXUM®); phân cắt mang tính loại bỏ beta bằng enzym heparinaza, dùng trong việc sản xuất tinzaparin (INNOHEP® và LOGIPARIN®); phân cắt loại amin bằng axit nitơ, dùng trong việc sản xuất dalteparin (FRAGMIN®), reviparin (CLIVARIN®) và nadroparin (FRAXIPARIN®), mà khiến tạo ra gốc anhyđromanoza không tự nhiên ở đầu tận cùng có tính khử của các oligosacarit thu được. Sau đó, hợp chất này có thể được chuyển hóa thành anhyđromanitol bằng cách sử dụng chất khử thích hợp. Cả cách loại bỏ beta hóa học và enzym đều tạo ra gốc uronat không no không có trong tự nhiên (UA) ở đầu tận cùng không có tính khử.

Tóm tắt về hoạt tính chất chống đông máu của vài LMWH được thể hiện trong Bảng 1.

Bảng 1: Dữ liệu phân tử lượng (molecular weight - MW) và hoạt tính chất chống đông máu của các sản phẩm LMWH hiện có.

LMWH	Phân tử lượng trung bình	Tỷ lệ giữa hoạt tính kháng Xa/hoạt tính kháng IIa
BEMIPARIN	3600	9,7
CERTOPARIN	5400	2,4
DALTEPARIN	6000	2,5
ENOXAPARIN	4500	3,9
NADROPARIN	4300	3,3
PARNAPARIN	5000	2,3
REVIPARIN	4400	4,2
TINZAPARIN	6500	1,6

Trích từ: Gray E. et al., Thromb Haemost, 99: 807–818 (2008).

Về mặt lâm sàng, LMWH (phân tử lượng trung bình khoảng 4,5kDa) khác với heparin (tức là "heparin không phân đoạn"; phân tử lượng trung bình khoảng 15kDa) theo nhiều khía cạnh: (a) LMWH cần đến liều dùng dưới da thưa hơn để phòng bệnh huyết khối tắc tĩnh mạch sau phẫu thuật; (2) LMWH cần đến việc tiêm dưới da một lần hoặc hai lần mỗi ngày ở các bệnh nhân được điều trị bệnh huyết khối tắc tĩnh mạch và đau thắt không ổn định thay cho truyền qua đường tĩnh mạch cần thiết đối với heparin; (3) LMWH không cần đến việc theo dõi thông số đông tụ aPTT; (4) LMWH có nguy cơ chảy máu thấp hơn; (5) việc sử dụng LMWH kéo dài có nguy cơ loãng xương thấp hơn; và (6) LMWH có nguy cơ thấp hơn đối với chứng giảm tiểu cầu do heparin gây ra (tác dụng phụ tiềm năng của việc dùng heparin). Tuy nhiên, các tác dụng chống đông máu của heparin thường là thuận nghịch với protamin sulfat, trong khi tác động của protamin đối với LMWH bị hạn chế. Ngoài ra, LMWH có ít tác động hơn đến hoạt tính của thrombin (Yếu tố IIa) so với heparin, trong khi cả LMWH và heparin đều có tác động tương tự nhau đến hoạt tính của Yếu tố Xa.

Thrombin và chất ức chế yếu tố IIa hoặc chất ức chế yếu tố Xa khác: Các ví dụ về các chất ức chế thrombin (Yếu tố IIa) và yếu tố Xa bao gồm các chất chống đông máu như dabigatran (PRADAXA®), rivaroxaban

(XARELTO®), apixaban (ELIQUIS®), edoxaban (LIXIANA®), fondaparinux (ARIXTRA®), và argatroban (ARGATROBAN®).

Tên hóa học của chất chống đông máu PRADAXA® dùng qua đường miệng, dabigatran etexilat mesylat, một chất ức chế trực tiếp thrombin, là β -Alanin, N-[[2-[[[4-[[[(hexyloxy)cacbonyl]amino]iminometyl]phenyl]amino]metyl]-1-metyl-1H-benzimidazol-5-yl]cacbonyl]-N-2-pyridinyl-,etyl este, metansulfonat. Dabigatran và axyl glucuronit của nó là các chất ức chế trực tiếp thrombin cạnh tranh. Vì thrombin (Yếu tố IIa, serin proteaza) cho phép chuyển hóa fibrinogen thành fibrin trong chu trình đông máu, nên việc ức chế nó ngăn cản sự phát triển của cục huyết khối.

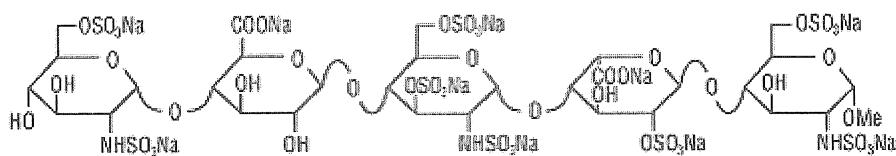
Rivaroxaban, chất ức chế yếu tố Xa, là hoạt chất trong XARELTO®, và có tên hóa học 5-clo-N-((5S)-2-oxo-3-[4-(3-oxo-4-morpholinyl)phenyl]-1,3-oxazolidin-5-yl)metyl)-2-thiophencarboxamit. Rivaroxaban là chất đồng phân đối ảnh (S) tinh khiết. XARELTO® là chất ức chế yếu tố Xa sinh khả dụng qua đường miệng mà phong bế một cách chọn lọc vị trí hoạt tính của yếu tố Xa và không cần đến đồng yếu tố (như kháng thrombin III) để có hoạt tính.

Apixaban hay ELIQUIS® là 1-(4-metoxyphenyl)-7-oxo-6-[4-(2-oxopiperidin-1-yl)phenyl]-4,5-dihydropyrazolo[5,4-c]pyridin-3-carboxamit. Đây là chất ức chế yếu tố Xa trực tiếp được dùng qua đường miệng đã được cấp phép ở châu Âu và hiện đang trải qua các thử nghiệm giai đoạn III ở Mỹ để dùng nhằm ngăn ngừa bệnh huyết khối tắc tĩnh mạch.

Edoxaban hay LIXIANA® là N'-(5-clopyridin-2-yl)-N-[(1S,2R,4S)-4-(-dimethylcarbamoyl)-2-[(5-metyl-6,7-dihydro-4H-[1,3]thiazolo[5,4-c]pyridin-2-cacbonyl)amino]xyclohexyl]oxamit. Edoxaban là chất ức chế trực tiếp yếu tố Xa, và nó đã được cấp phép ở Nhật để dùng trong việc phòng bệnh huyết khối tắc tĩnh mạch.

ARIXTRA® là fondaparinux natri. Nó là chất ức chế Yếu tố X (Xa) đã được hoạt hóa tổng hợp và đặc hiệu. Fondaparinux natri là metyl O-2-đeoxy-6-O-sulfo-2-(sulfoamino)- α -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-O- β -D-glucopyra-

nuronosyl-(1 → 4)-O-2-đeoxy-3,6-đi-O-sulfo-2-(sulfoamino)-α-D-glucopyranosyl-(1 → 4)-O-2-O-sulfo-α-L-idopyranuronosyl-(1 → 4)-2-đeoxy-6-O-sulfo-2-(sulfoamino)-α-D-glucopyranosit, muối đecanatri. Công thức phân tử của fondaparinux natri là $C_{31}H_{43}N_3Na_{10}O_{49}S_8$ và phân tử lượng của nó bằng 1728. Công thức cấu trúc là như sau:



Hoạt tính chống huyết khối của fondaparinux natri là kết quả của việc ức chế chọn lọc Yếu tố Xa do kháng thrombin III (ATIII) gây ra. Bằng cách liên kết một cách chọn lọc với ATIII, fondaparinux natri khiến cho có khả năng trung hòa một cách tự nhiên Yếu tố Xa bằng ATIII (khoảng 300 lần). Việc trung hòa Yếu tố Xa ngắt chu trình đông máu và do đó ức chế sự hình thành thrombin và phát triển khối máu đông. Fondaparinux natri không làm bất hoạt thrombin (Yếu tố II đã được kích hoạt) và không có tác dụng nào đối với chức năng tiểu cầu. Với liều được khuyến cáo, fondaparinux natri không tác động đến hoạt tính phân giải fibrin hoặc thời gian chảy máu. Dược lực học/dược động học của fondaparinux natri thu được từ nồng độ của fondaparinux trong huyết tương được định lượng thông qua hoạt tính kháng yếu tố Xa. Chỉ fondaparinux có thể được dùng để chuẩn hóa thử nghiệm kháng Xa. (Chuẩn quốc tế của heparin hoặc LMWH là không thích hợp đối với ứng dụng này). Kết quả là, hoạt tính của fondaparinux natri được biểu thị theo milligram (mg) chất chuẩn hóa fondaparinux. Hoạt tính kháng Xa của dược chất tăng theo nồng độ dược chất tăng dần, đạt được trị số tối đa trong thời gian khoảng ba giờ. Fondaparinux natri được dùng bằng cách tiêm dưới da được hấp thụ nhanh và hoàn toàn (độ sinh khả dụng tuyệt đối là 100%). Ở các bệnh nhân trải qua việc điều trị bệnh bằng cách tiêm dung dịch chứa 2,5mg fondaparinux natri, một lần hằng ngày, nồng độ pic trong huyết tương ở trạng thái ổn định trung bình nằm trong khoảng từ 0,39mg/l đến 0,50mg/l và đạt được khoảng 3 giờ sau khi dùng liều này. Ở các bệnh nhân này, nồng độ tối thiểu trong huyết tương ở trạng thái

ổn định nằm trong khoảng từ 0,14mg/l đến 0,19mg/l. Ở các bệnh nhân mắc chứng huyết khối tĩnh mạch sâu mang tính triệu chứng và nghẽn mạch phổi trải qua điều trị bệnh bằng cách tiêm dung dịch chứa 5mg (thể trọng <50kg), 7,5mg (thể trọng nằm trong khoảng từ 50kg đến 100kg), và 10mg (thể trọng >100kg) fondaparinux natri một lần hằng ngày, các liều lượng đã được điều chỉnh theo thể trọng tạo ra các pic trung bình ở trạng thái ổn định và nồng độ tối thiểu trong huyết tương tương tự ở tất cả các hạng mức thể trọng. Nồng độ pic trung bình trong huyết tương ở trạng thái ổn định nằm trong khoảng từ 1,20mg/l đến 1,26mg/l. Ở các bệnh nhân này, nồng độ tối thiểu trung bình trong huyết tương ở trạng thái ổn định nằm trong khoảng từ 0,46mg/l đến 0,62mg/l.

ARGATROBAN® là chất ức chế trực tiếp thrombin (Yếu tố IIa) tổng hợp, thu được từ L-arginin. Tên hóa học của ARGATROBAN® là axit 1-[5-[(aminoiminometyl) amino]-1-oxo-2-[(1,2,3,4-tetrahydro-3-metyl-8-quinoliny)-sulfonyl]amino]pentyl]-4-metyl-2-piperidincarboxylic, monohydrat. Công thức phân tử của ARGATROBAN® là $C_{23}H_{36}N_6O_5S \cdot H_2O$. Phân tử lượng của nó bằng 526,66. ARGATROBAN® là chất ức chế trực tiếp thrombin mà liên kết thuận nghịch với vị trí hoạt tính của thrombin. ARGATROBAN® không cần đến đồng yếu tố kháng thrombin III để có hoạt tính chống huyết khối. ARGATROBAN® được dùng bằng cách tiêm, và nó thể hiện các tác dụng chống đông máu bằng cách ức chế phản ứng xúc tác bởi thrombin hoặc phản ứng do thrombin gây ra, kể cả việc hình thành fibrin; hoạt hóa các yếu tố đông máu V, VIII, và XIII; hoạt hóa protein C; và kết tụ tiểu cầu.

Tác dụng chống đông máu là tác động bất kỳ của chất ức chế đông máu (ví dụ, heparin, LMWH, chất ức chế Yếu tố Xa, chất ức chế Yếu tố IIa) mà tạo ra từ việc nó phong bế việc nhân rộng chu trình đông máu. Các ví dụ không giới hạn phạm vi của sáng chế về các tác dụng chống đông máu bao gồm việc điều biến tăng hoạt tính kháng thrombin, làm giảm hoạt tính của Yếu tố Xa, làm giảm hoạt tính của Yếu tố IIa, tăng mất máu, và tình trạng bất kỳ khác, trong đó hoạt tính hoặc nồng độ của các yếu tố đông máu bị thay đổi theo cách ức chế sự tạo cục máu.

Hoạt tính của chất ức chế đông máu (tức là các tác dụng chống đông máu của nó) có thể được đo theo nhiều phương pháp khác nhau bao gồm, nhưng không giới hạn ở, thử nghiệm hoạt tính kháng yếu tố Xa sinh màu, thử nghiệm thời gian thromboplastin bán phần được hoạt hóa, thời gian prothrombin, thử nghiệm chảy máu (ví dụ, thử nghiệm chảy máu đuôi chuột), đàn hồi đồ cục máu, thử nghiệm về sự tạo thrombin, thời gian tồn tại của nọc độc rắn viper của Russel mức loãng trong máu, thời gian đông máu do ecarin gây ra, thời gian đông máu do kaolin gây ra, tỷ lệ đã được chuẩn hóa quốc tế (International Normalized Ratio - INR), thử nghiệm về fibrinogen (Clauss), thời gian thrombin (TCT), thời gian trộn, và thời gian phân giải euglobulin. Các phương pháp này trợ giúp việc xác định các thông số chống đông máu khác nhau, và đã biết đối với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này. Do đó, theo một số phương án, việc chống đông máu có thể được theo dõi theo một thử nghiệm hoặc kết hợp các thử nghiệm liệt kê trên đây.

Thử nghiệm về kháng yếu tố Xa đo một cách trực tiếp hoạt tính kháng yếu tố Xa. Phương pháp học đẳng sau thử nghiệm kháng yếu tố Xa là ở chỗ huyết tương của bệnh nhân được bổ sung vào yếu tố Xa với lượng dư đã biết và kháng thrombin với lượng dư đã biết. Nếu chất ức chế yếu tố Xa có mặt trong huyết tương của bệnh nhân, nó sẽ làm giảm hoạt tính enzym của yếu tố Xa. Lượng yếu tố Xa còn sót lại tỷ lệ nghịch với lượng chất kháng Xa trong huyết tương. Lượng yếu tố Xa còn sót lại được phát hiện bằng cách bổ sung cơ chất nhuộm sắc mà bất chước cơ chất tự nhiên của yếu tố Xa, khiến cho yếu tố Xa còn sót lại phân cắt nó, giải phóng hợp chất có màu mà có thể được phát hiện bằng quang phổ kế. Sự thiếu hụt kháng thrombin ở bệnh nhân không ảnh hưởng đến thử nghiệm này, vì lượng dư kháng thrombin được cung cấp trong phản ứng. Các kết quả được đưa ra là nồng độ chất chống đông máu theo đơn vị kháng yếu tố Xa/ml, sao cho các trị số cao biểu thị mức độ chống đông máu cao và các trị số thấp biểu thị mức độ chống đông máu thấp.

Thử nghiệm về thời gian thromboplastin bán phần được hoạt hóa (aPTT) là thử nghiệm đo xem mất bao nhiêu thời gian để máu đông. Các mẫu máu

được gom để đo trực tiếp hoặc trong các ống nghiệm với oxalat và xitrat để ngăn chặn sự đông máu bằng canxi cho đến khi thử nghiệm này có thể được thực hiện. Trong thử nghiệm này, phospholipit, chất hoạt hóa (silic đioxit, xelit, cao lanh, axit elagic, v.v.), và canxi được trộn vào huyết tương để máu đông. Thử nghiệm này đo thời gian cho đến khi hình thành cục huyết khối (cục máu).

Thử nghiệm làm chảy máu đuôi chuột hoặc thử nghiệm cắt ngang đuôi chuột là thử nghiệm mà đo lượng máu mất, ví dụ, mất máu sau khi dùng thuốc. Theo một phương án, khi tác động của hợp chất theo sáng chế (ví dụ, DAP) được thử nghiệm, ở Tmax của chất chống đông máu, DAP được dùng qua đường tĩnh mạch. Sau 20 phút, đuôi chuột được cắt ngang cách đầu mút khoảng 1mm, đặt trong nước muối ở nhiệt độ trong phòng, và máu được gom trong thời gian 30 phút và được cân.

Các thử nghiệm dùng để đo hoạt tính của chất ức chế đông máu có thể được dùng trong phòng thí nghiệm hoặc trong bệnh viện để đo mức đảo ngược tác dụng chống đông máu của chất ức chế đông máu, ví dụ, đảo ngược tác dụng chống đông máu của chất ức chế đông máu nhờ dùng được phẩm chứa hợp chất theo sáng chế. Do đó, theo một phương án, các thử nghiệm này được áp dụng để đo sự đảo ngược hoàn toàn hoặc đảo ngược một phần tác dụng chống đông máu của chất ức chế đông máu (như heparin, LMWH, chất ức chế Yếu tố IIa, và chất ức chế Yếu tố Xa).

Việc đảo ngược hoàn toàn tác dụng chống đông máu của chất ức chế đông máu xảy ra khi trung hòa hoạt tính chống đông máu. Theo một phương án, việc đảo ngược hoàn toàn tác dụng chống đông máu của chất ức chế đông máu, như đo được theo thử nghiệm về hoạt tính kháng Xa, xảy ra khi nồng độ chất chống đông máu được đưa đến thấp hơn nồng độ tối thiểu hữu hiệu (minimum effective concentration - MEC) để chống đông máu. MEC, như được dùng trong bản mô tả này, là nồng độ được chất thấp nhất (ví dụ, chất ức chế đông máu) cần thiết để có hiệu quả điều trị bệnh. Theo phương án khác, sự đảo ngược hoàn toàn tác dụng chống đông máu của chất ức chế đông máu, như đo được theo thử nghiệm aPTT, xảy ra khi aPTT hoàn lại khoảng 10% trị số

gốc. Trị số gốc được dùng trong bản mô tả này để chỉ aPTT không có mặt các chất ức chế đông máu.

Trong nhiều trường hợp, vẫn mong muốn chống đông máu, nhưng ở mức độ thấp hơn. Do đó, việc đảo ngược một phần tác dụng chống đông máu của chất ức chế đông máu sẽ được chỉ báo. Việc đảo ngược một phần tác dụng chống đông máu của chất ức chế đông máu, như đo được theo thử nghiệm về hoạt tính kháng Xa, xảy ra khi nồng độ chất chống đông máu được đưa đến thấp hơn nồng độ chất chống đông máu không có mặt chất đảo ngược tác dụng chống đông máu (ví dụ, hợp chất theo sáng chế), nhưng vẫn cao hơn MEC để chống đông máu. Do đó, theo một số phương án, việc đảo ngược một phần tác dụng chống đông máu của các chất ức chế đông máu xảy ra khi nồng độ của chất chống đông máu là thấp hơn khoảng bốn lần MEC, tốt hơn là khoảng hai lần MEC, tốt hơn nữa thấp hơn khoảng hai lần MEC (ví dụ, khoảng MEC). Việc đảo ngược một phần tác dụng chống đông máu của chất ức chế đông máu, như đo được theo thử nghiệm aPTT, xảy ra khi aPPT được giảm thấp hơn số đo không có mặt chất đảo ngược tác dụng chống đông máu (ví dụ, hợp chất theo sáng chế) nhưng cao hơn số đo gốc. Do đó, theo các phương án khác, việc đảo ngược một phần tác dụng chống đông máu của các chất ức chế đông máu xảy ra khi số đo aPTT được giảm xuống thấp hơn khoảng bốn lần số đo gốc, tốt hơn là khoảng hai lần số đo gốc, tốt hơn nữa thấp hơn khoảng hai lần số đo gốc. Nói chung, mức độ và khoảng thời gian kéo dài việc làm đảo ngược tác dụng chống đông máu được xác định theo bác sỹ hoặc bác sỹ thú y.

Thuật ngữ “đối tượng có nhu cầu điều trị bệnh” được dùng trong bản mô tả này có nghĩa là đối tượng có nhu cầu làm đảo ngược cấp hoặc làm đảo ngược có kế hoạch việc chống đông máu, ví dụ, đối tượng bị quá liều chất chống đông máu, đối tượng mắc chứng xuất huyết (ví dụ, chứng xuất huyết do chấn thương gây ra hoặc chứng xuất huyết tự phát trong dải dạ dày ruột (GI) hoặc nơi nào đó khác), đối tượng cần can thiệp phẫu thuật có kế hoạch, đối tượng trải qua quy trình xâm lấn hoặc quy trình không xâm lấn cần đến sinh thiết, đối tượng trải qua quy trình, trong đó lỗi về mặt thủ tục có thể dẫn đến rủi ro xuất huyết

nếu đối tượng vẫn còn bị chống đông máu, đối tượng cần gây tê tủy sống hoặc gây tê ngoài màng cứng. Thuật ngữ “đối tượng có nhu cầu điều trị bệnh” có thể là bệnh nhân trong đó sự có mặt của chất ức chế yếu tố trực tiếp (Yếu tố Xa, Yếu tố IIa và/hoặc kháng thrombin) gây ra hoặc có thể gây ra tác dụng làm chảy máu. Do đó, “đối tượng có nhu cầu điều trị bệnh” có thể là đối tượng nhận điều trị chống đông máu (ví dụ, đối tượng nhận heparin, LMWH, chất ức chế Yếu tố IIa, hoặc chất ức chế Yếu tố Xa) để, ví dụ, ngăn ngừa đột quỵ, các quy trình phẫu thuật tim và chẩn đoán tim, chứng loạn nhịp tim, phòng ngừa chứng huyết khối tĩnh mạch sâu (DVT), nghẽn mạch phổi, ngăn ngừa chung đối với sự hình thành cục máu vón bệnh lý.

“Đối tượng có nhu cầu điều trị bệnh” được dùng trong bản mô tả này là động vật. “Đối tượng có nhu cầu điều trị bệnh” bao gồm, nhưng không giới hạn ở, người, chuột nhắt, chuột to, chuột lang, chó, mèo, ngựa, bò, lợn, khỉ, tinh tinh, khỉ đầu chó, hoặc khỉ nâu. Theo một phương án, “đối tượng có nhu cầu điều trị bệnh” là động vật có vú. Theo phương án khác, “đối tượng có nhu cầu điều trị bệnh” là người.

Thuật ngữ “lượng hữu hiệu để điều trị bệnh” được dùng trong bản mô tả này để chỉ lượng chất đảo ngược tác dụng chống đông máu (ví dụ, hợp chất theo sáng chế được bộc lộ trong bản mô tả này), mà có tác dụng, sau khi dùng một hoặc nhiều liều (ví dụ, liều nhanh và/hoặc liều duy trì) cho đối tượng, trong việc trung hòa hoặc ức chế (đảo ngược hoàn toàn hoặc đảo ngược một phần) tác dụng chống đông máu của chất ức chế đông máu hoặc trong việc thúc đẩy sự đông máu.

Theo một khía cạnh, lượng hữu hiệu để điều trị bệnh là liều chất đảo ngược tác dụng chống đông máu nằm trong khoảng từ 0,01 đến 10.000 lần liều chất chống đông máu theo khối lượng. Theo khía cạnh khác, chất đảo ngược tác dụng chống đông máu được dùng theo tỷ lệ khối lượng liều trong khoảng từ 1:1 đến 1000:1 chất đảo ngược tác dụng chống đông máu so với chất chống đông máu, ví dụ, 100:1 chất đảo ngược tác dụng chống đông máu so với chất chống đông máu, như 10:1 chất đảo ngược tác dụng chống đông máu so với

chất chống đông máu. Theo một phương án của phương pháp theo sáng chế, lượng hữu hiệu để điều trị bệnh của chất đảo ngược tác dụng chống đông máu có thể được dùng dưới da, tiêm bắp, hoặc qua đường tĩnh mạch. Ví dụ, nó có thể được dùng qua đường tĩnh mạch ở dạng dung dịch vô trùng. Theo phương án khác, lượng hữu hiệu để điều trị bệnh của chất đảo ngược tác dụng chống đông máu được dùng qua đường miệng, đường mũi hoặc đường phổi, hoặc dùng vào vùng màng nhầy (miệng, trực tràng, hoặc âm đạo).

Lượng hữu hiệu điều trị bệnh của chất đảo ngược tác dụng chống đông máu (tức là hợp chất theo sáng chế) thường nằm trong khoảng từ 0,001mg/kg đến 1g/kg thể trọng hằng ngày; theo phương án khác, nằm trong khoảng từ 0,01mg/kg đến 600mg/kg thể trọng hằng ngày; theo phương án khác, nằm trong khoảng từ 0,01mg/kg đến 250mg/kg thể trọng hằng ngày; theo phương án khác, nằm trong khoảng từ 0,01mg/kg đến 400mg/kg thể trọng hằng ngày; theo phương án khác, nằm trong khoảng từ 0,01mg/kg đến 200mg/kg thể trọng hằng ngày; theo phương án khác, nằm trong khoảng từ 0,01mg/kg đến 100mg/kg thể trọng hằng ngày; theo một phương án, nằm trong khoảng từ 0,01mg/kg đến 25mg/kg thể trọng hằng ngày; theo phương án khác, nằm trong khoảng từ 0,1mg/kg đến 10mg/kg thể trọng hằng ngày; theo phương án khác, nằm trong khoảng từ 0,001mg/kg đến 100mg/kg thể trọng hằng ngày; theo phương án khác, nằm trong khoảng từ 0,001mg/kg đến 10mg/kg thể trọng hằng ngày; và theo phương án khác, nằm trong khoảng từ 0,001mg/kg đến 1mg/kg thể trọng hằng ngày. Các thử nghiệm về sự đông máu chuẩn (như được bộc lộ trong bản mô tả này) và các thử nghiệm *in vitro* khác có thể được áp dụng để xác định lượng hữu hiệu để điều trị bệnh.

Theo một số khía cạnh của sáng chế, hợp chất theo sáng chế có thể được dùng cùng với ít nhất một tác nhân điều trị bệnh bổ sung. Theo một phương án, ít nhất một tác nhân điều trị bệnh bổ sung có thể là vitamin K, mà thường được dùng để hiệu chỉnh thiếu hụt vón cục gây ra bởi các hợp chất varfarin.

Sáng chế còn đề xuất thử nghiệm chẩn đoán để xác định nồng độ chất chống đông máu trong máu. Như được thể hiện trong Ví dụ 13 dưới đây, DAP

thể hiện xu hướng đáp ứng liều lượng trong việc đảo ngược rivaroxaban *ex vivo* trong huyết tương của người bằng cách áp dụng thử nghiệm về sự hình thành sắc tố chống yếu tố Xa sạch hết 510k. Do đó, hợp chất theo sáng chế, ví dụ, DAP, có thể được dùng trong thử nghiệm chẩn đoán để xác định nồng độ của chất chống đông máu, ví dụ, chất ức chế yếu tố Xa, trong máu. Trong thử nghiệm đó, hợp chất theo sáng chế, ví dụ, DAP, có thể được sử dụng cùng với kit các chất phản ứng hiện có hoặc làm cơ chất liên kết trực tiếp thay thế các yếu tố tổng hợp có mặt trong các kit hiện có. Theo một phương án, thử nghiệm chẩn đoán có thể bao gồm việc sử dụng hợp chất theo sáng chế (ví dụ, DAP) làm cơ chất liên kết, trong đó hợp chất theo sáng chế liên kết chất chống đông máu trong mẫu máu, và hoạt tính còn sót lại của yếu tố vón cục (ví dụ, Yếu tố Xa) được định lượng để xác định nồng độ của chất chống đông máu trong mẫu này. Theo phương án khác, thử nghiệm chẩn đoán có thể bao gồm việc sử dụng hợp chất theo sáng chế (ví dụ, DAP) đã liên hợp với vi hạt từ tính, trong đó hợp chất theo sáng chế có thể liên kết với chất chống đông máu trong mẫu máu để loại bỏ chất chống đông ra khỏi mẫu hoặc để cô nó. Thử nghiệm về sự hình thành sắc tố trên cơ sở DAP hoặc thử nghiệm tại chỗ theo sáng chế có thể trợ giúp việc xác định nồng độ chất chống đông ở đối tượng, mà hiện là nhu cầu chưa được đáp ứng đáng kể về mặt lâm sàng vì các chẩn đoán hiện có không thể xác định nồng độ của các chất ức chế trực tiếp trong máu với độ chính xác cao.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất thử nghiệm, ví dụ, thử nghiệm về sự hình thành sắc tố, để xác định nồng độ của hợp chất theo sáng chế, ví dụ, DAP, cần thiết để đảo ngược chất chống đông máu có trong máu. Theo một phương án, thử nghiệm này sử dụng DAP làm chất liên kết trực tiếp đối với các chất chống đông máu khác.

Sáng chế còn đề xuất thử nghiệm, ví dụ, thử nghiệm về sự hình thành sắc tố, để xác định lượng hợp chất theo sáng chế, ví dụ, DAP, trong máu. Thử nghiệm này có thể sử dụng chất chống đông máu với nồng độ định trước.

Sáng chế còn đề xuất kit chẩn đoán mà kết hợp thử nghiệm chẩn đoán được bộc lộ trên đây trong bản mô tả này. Do đó, theo một phương án, kit này được dùng để xác định nồng độ chất chống đông máu trong máu. Kit này có thể chứa các thành phần khác, đóng gói, hướng dẫn, các chất phản ứng, và/hoặc nguyên liệu khác để trợ giúp việc xác định chất chống đông (ví dụ, chất ức chế Yếu tố Xa) hoặc nồng độ DAP và để hỗ trợ việc sử dụng kit này. Ngoài ra, kit này có thể được dùng để xác định liệu việc kết hợp varfarin và chất chống đông máu khác như varfarin sẽ không bị ảnh hưởng bởi hợp chất theo sáng chế, trong khi các chất chống đông máu khác sẽ được làm đảo ngược.

Như được thể hiện trong các ví dụ sau, hợp chất theo sáng chế (ví dụ, DAP) có khả năng liên kết heparin, làm bất hoạt nó *in vivo*. Do đó, ngoài các tác dụng của chúng đối với sự đông máu, hợp chất theo sáng chế còn có thể được sử dụng để lấy đi các mô có hoạt tính sinh hóa của heparin. Ví dụ, các phân tử khác liên kết heparin đã thể hiện khả năng khử yếu tố sinh trưởng nguyên bào sợi (fibroblast growth factor - FGF), yếu tố sinh trưởng biểu bì (epidermal growth factor - EGF), yếu tố sinh trưởng nội mô mạch (vascular endothelial growth factor - VEGF), và các yếu tố sinh trưởng khác liên kết heparin. Đã thấy rằng việc lấy đi VEGF và FGF là hữu dụng trong việc điều trị bệnh ung thư, khiến các hợp chất theo sáng chế trở thành các ứng viên có khả năng để điều trị bệnh ung thư. Do đó, theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất hợp chất theo sáng chế hoặc muối được dụng của nó để sử dụng trong phương pháp điều trị bệnh, phòng bệnh, hoặc làm thuyên giảm bệnh ung thư ở đối tượng.

Như được thể hiện trong các ví dụ, một hợp chất theo sáng chế, DAP, liên kết XARELTO®, ELIQUIS®, ARIXTRA® và LMWH *in vitro* như xác định được nhờ sự phân tán ánh sáng động học (DLS). DAP đảo ngược ARIXTRA® và LMWH được dùng dưới da *in vivo*. DAP đảo ngược XARELTO®, ELIQUIS®, PRADAXA®, LIXIANA®, heparin không phân đoạn và bemiparin *in vivo*. DAP được dùng qua đường tĩnh mạch với liều lượng 100mg/kg, 250mg/kg và 400mg/kg ở chuột to không thể hiện tác dụng phụ. DAP là sinh khả dụng qua đường miệng ở chuột to. DAP không thể hiện

liên kết với ERG của người, không ức chế hoặc làm cơ chất của các enzym CYP, và không liên kết một cách đáng kể protein nào của huyết tương (dữ liệu không được thể hiện). Ngoài ra, dường như DAP có thời gian bán thải ngắn, vì việc chống đông máu gây ra bởi PRADAXA® trở lại trong thời gian từ 20 phút đến 30 phút sau khi dùng liều cao DAP qua đường tĩnh mạch ở chuột to. Hơn thế nữa, DAP là ổn định trong quá trình tiệt trùng (chịu được việc làm nóng đến 200°C) và ổn định trong quá trình bảo quản ở dạng bột đã được sấy khô ở nhiệt độ thấp, ở 4°C, trong thời gian dài hơn một năm. Tóm tắt về việc làm đảo ngược chất chống đông máu bởi DAP được thể hiện trong Bảng 2.

Bảng 2: Đảo ngược chất chống đông máu

Tên thương mại	Tên thuốc gốc	Công ty	Yếu tố máu bị ức chế	Đường dùng	Liên kết DAP	Tác nhân đảo ngược
Lovenox® Hibor®	Enoxaparin Bemiparin	Sanofi, Sandoz/ Momenta, Rovi	Xa, ~80% đến 90% IIa, ~10% đến 20%	tiêm dưới da	X	Protamin* & DAP
Arixtra®	Fondaparinux	GSK	Xa	tiêm dưới da	X	DAP
Eliquis®	Apixaban	Pfizer, BMS	Xa	qua đường miệng	X	DAP
Xarelto®	Rivaroxaban	Bayer, Janssen, J&J	Xa	qua đường miệng	X	DAP
Argatroban®	Argatroban	GSK	IIa	tiêm dưới da	--	không
Pradaxa®	Dabigatran etexilate	Boehringer Ingelheim	IIa	qua đường miệng	X	DAP

*Protamin đảo ngược một phần các heparin phân tử lượng thấp.

Bảng 3: Tương tác *in vitro in vivo*

Tên thuốc gốc	Tỷ lệ mol liên kết DLS [DAP/thuốc]	Tỷ lệ mol đảo ngược [DAP/thuốc]	Phép xác định <i>in vivo</i>	Yếu tố máu bị ức chế	Đường dùng
Rivaroxaban	9	3*	Thử nghiệm về việc làm chảy máu	Xa	Qua đường miệng
Apixaban	10	8*	Thử nghiệm về việc làm chảy máu	Xa	Qua đường miệng
Fondaparinux	3	130	Kit Xa	Xa	Tiêm dưới da
Bemiparin	7	140	aPTT	Xa, ~80% đến 90% Ila, ~10% đến 20%	Tiêm dưới da
Argatroban	Không áp dụng	Không áp dụng	aPTT	Ila	Tiêm dưới da

Giả định rằng mức sinh khả dụng qua đường miệng là 60% đối với rivaroxaban, 50% đối với apixaban, và 5% đối với dabigatran; Giả định rằng mức sinh khả dụng là 100% đối với các chất chống đông máu dùng để tiêm.

Tóm tắt về mối tương tác *in vitro-in vivo* của việc xử lý bằng DAP được thể hiện trong Bảng 3. Tỷ lệ mol liên kết DLS được tính bằng cách chia tỷ lệ khối lượng thấp nhất của DAP với chất chống đông máu mà thể hiện liên kết đáng kể, được xác định theo mức kết hợp trong nước muối đệm phosphat với đường kính biểu kiến hơn 50nm, cho tỷ lệ phân tử lượng DAP và chất chống đông máu. Phân tử lượng được dùng trong các tính toán này là 512Da (DAP), 436Da (rivaroxaban), 460Da (apixaban), 1,7kDa (fondaparinux), 3,6kDa (bemiparin), 628Da (dabigatran), và 509Da (ARGATROBAN®). Tỷ lệ mol đảo ngược được tính theo cách tương tự bằng cách sử dụng liều đảo ngược *in*

vivo tối thiểu của DAP cần thiết để đạt được mức đảo ngược như đo được theo thử nghiệm về việc làm chảy máu cắt ngang đuôi chuột, kit nhiễm sắc kháng Xa, hoặc theo thời gian thromboplastin bán phần được hoạt hóa (aPTT). Đối với thử nghiệm về việc làm chảy máu, chất chống đông máu được xem là đã đảo ngược nếu mức mất máu trong thời gian 30 phút sau khi cắt ngang đuôi, trong đó đuôi đã cắt được nhúng vào nước muối ở nhiệt độ trong phòng, là khoảng 25% đối chứng (không dùng chất chống đông máu). Như đo được nhờ kit Xa, sự đảo ngược đạt được khi nồng độ chống đông máu hữu hiệu được đưa đến thấp hơn nồng độ tối thiểu hữu hiệu (MEC) để chống đông máu. Như đo được nhờ aPTT, sự đảo ngược được xem là đạt được khi aPTT của chuột đã bị chống đông trở lại khoảng 10% gốc. Trong trường hợp fondaparinux, mặc dù 200mg/kg DAP là liều thấp nhất được dùng *in vivo*, dữ liệu *in vitro* cho thấy rằng có thể có các liều làm đảo ngược thấp hơn một cách đáng kể.

Toàn bộ nội dung của tất cả các tài liệu tham khảo, các đơn yêu cầu cấp patent, và các patent đã được trích dẫn trong bản mô tả này đều được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế sẽ được minh họa thêm dưới đây trong phần ví dụ không nhằm mục đích giới hạn phạm vi của nó. Các ví dụ nêu dưới đây để giúp hiểu sáng chế nhưng không nhằm để, và không nên được hiểu là, giới hạn phạm vi của sáng chế theo cách bất kỳ. Các ví dụ này không bao gồm phần mô tả chi tiết sáng chế về các phương pháp thông thường mà người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này đã biết.

Ví dụ 1: Thử nghiệm về tính ổn định *in vitro* của diarginin piperazin (“DAP”)

Nguyên liệu và phương pháp

Muối axetat của DAP được điều chế như được bộc lộ trong bản mô tả này. Như được bộc lộ trong các ví dụ này, DAP rắn hoặc bột được dùng để chỉ muối axetat, trong khi DAP trong dung dịch được dùng để chỉ bazơ tự do khi

muối này ion hóa trong dung dịch nước. Như được bộc lộ trong các ví dụ này, hợp chất DAP được dùng là hợp chất có công thức VII.

Bột DAP được thử nghiệm về tính ổn định nhiệt theo hai cách. DAP được bảo quản ở 4°C trong 7 tháng trước khi sử dụng. Ngoài ra, DAP rắn được thử nghiệm theo phân tích đo nhiệt lượng quét vi phân (DSC) bằng cách làm nóng từ -20°C đến 200°C, trở lại -20°C và lại đến 200°C.

Kết quả

Bột DAP là ổn định ở 4°C trong khoảng thời gian dài hơn 12 tháng. Kết quả của DSC được thể hiện trên Hình 1. Nhiệt thứ hai (“2”) thể hiện tập tính nhiệt tương tự với nhiệt thứ nhất (“1”), cho thấy rằng DAP đã vượt qua được việc làm nóng lặp lại đến 200°C. Việc phát hiện này cho thấy rằng DAP có khả năng vượt qua được việc làm nóng đến nhiệt độ cao hơn nhiệt độ cần thiết để tiệt trùng.

Ví dụ 2: Liên kết của DAP với Heparin và LMWH

Nguyên liệu và phương pháp

Phân tán ánh sáng động lực học (dynamic light scattering - DLS) được áp dụng để đánh giá việc kết hợp 1mg/ml heparin không phân đoạn và 1mg/ml bemiparin (LMWH; HIBOR®), riêng rẽ hoặc kết hợp với 100mg/ml DAP trong nước (tỷ lệ khối lượng 100:1 DAP so với heparin hoặc LMWH).

Kết quả

DAP kết hợp về mặt vật lý trong nước với cả heparin không phân đoạn (Hình 2) và LMWH (không được thể hiện) để tạo ra liên kết về mặt vật lý mà làm tăng đường kính biểu kiến. Nếu dung dịch chứa DAP được trộn với dung dịch chứa LMWH hoặc heparin không phân đoạn, thì chúng tạo ra các hạt do các tương tác vật lý của chúng, mà xác nhận lý thuyết rằng DAP có thể đảo ngược việc chống đông máu bởi heparin và LMWH nhờ liên kết theo cách vật lý với các phân tử này.

Ví dụ 3: Liên kết DAP với các chất chống đông máu như đo được nhờ DLS.

Nguyên liệu và phương pháp

Chỉ riêng rivaroxaban (XARELTO®), chỉ riêng DAP, và hỗn hợp DAP:rivaroxaban theo tỷ lệ khối lượng 1:1 và 10:1 được bổ sung vào dung dịch nước và phân tích theo phân tán ánh sáng động học (DLS) để đánh giá sự kết hợp DAP và rivaroxaban. Thử nghiệm tương tự được thực hiện trên riêng apixaban (ELIQUIS®), riêng DAP, và hỗn hợp DAP:apixaban theo tỷ lệ khối lượng 1:1, 10:1 và 100:1. Chỉ riêng fondaparinux (ARIXTRA®), riêng DAP, và hỗn hợp fondaparinux:DAP theo tỷ lệ khối lượng 1:1, 10:1 và 100:1 được thử nghiệm theo cách tương tự. Riêng LMWH (bemiparin; HIBOR®), riêng DAP, và hỗn hợp LMWH:DAP theo tỷ lệ khối lượng 1:1, 10:1, và 100:1 cũng được thử nghiệm. Nồng độ của LMWH được thử nghiệm là 0,1mg/ml. Do đó, theo tỷ lệ 1:1, 0,1mg/ml DAP được thử nghiệm, theo tỷ lệ 10:1, 1mg/ml được thử nghiệm, và theo tỷ lệ 100:1, 10mg/ml DAP được thử nghiệm.

Ngoài ra, riêng dabigatran, riêng DAP, và hỗn hợp dabigatran:DAP theo tỷ lệ khối lượng 1:1, 10:1, 100:1, 1.000:1, và 10.000:1 DAP được thử nghiệm. Cuối cùng, riêng ARGATROBAN®, riêng DAP, hoặc hỗn hợp argatroban:DAP theo tỷ lệ khối lượng 1:1, 10:1, 100:1, và 1.000:1 được thử nghiệm.

Kết quả

Các kết quả được thể hiện trên Hình 3 đối với rivaroxaban; Hình 4 đối với apixaban; Hình 5 đối với fondaparinux (ARIXTRA®), Hình 6 đối với LMWH; và Hình 7 đối với argatroban. Mỗi hình thể hiện từng pic thể hiện DAP và riêng chất chống đông máu trong dung dịch nước. Khi chất chống đông máu được trộn với DAP theo tỷ lệ khối lượng đủ cao, thì quan sát thấy sự thay đổi về kích thước. Trong thử nghiệm này, thậm chí hiện tượng tăng nhẹ kích thước biểu thị tương tác vật lý giữa hai phân tử này; tuy nhiên, chỉ dịch chuyển đáng kể về đường kính biểu kiến được dùng trong việc đánh giá tương quan *in vitro in vivo*. Đường kính biểu kiến là số đo về mức độ tương tác.

Ví dụ 4: DAP làm đảo ngược tác dụng chống đông máu bằng LMWH *in vivo*

Nguyên liệu và phương pháp

Một con chuột đực bạch tạng, nặng 470g, được cho dùng 10mg bemiparin (dùng LMWH quá liều) bằng cách tiêm dưới da. Thời gian aPTT được đo trong khoảng thời gian năm giờ. Bốn giờ sau khi dùng LMWH, con chuột này nhận liều DAP 200mg/kg (100mg DAP) qua đường tĩnh mạch.

Kết quả

Sau khi dùng LMWH, aPTT tăng từ 53 giây đến 246 giây trong thời gian bốn giờ. Việc dùng qua đường tĩnh mạch 200mg/kg DAP (100mg DAP) đưa thời gian aPTT xuống gần hơn gốc trong vòng 60 phút (Hình 8).

Ví dụ 5: DAP đảo ngược tác dụng chống đông máu bằng Dabigatran (PRADAXA®) *in vivo*; thử nghiệm về việc dùng quá liều

Nguyên liệu và phương pháp

Một chuột đực bạch tạng, nặng 430g, được cho dùng 40mg/kg PRADAXA® (20mg PRADAXA®; dùng PRADAXA® quá liều) bằng cách đưa bằng ống vào miệng.

Khoảng 2 giờ trong thử nghiệm PRADAXA®, 200mg/kg DAP (100mg DAP) được dùng để truyền liều cao qua đường tĩnh mạch. Khoảng 2 giờ sau, chuột này được cho dùng 100mg/kg DAP (50mg DAP). Trong một giờ sau đó, chuột này được cho dùng một liều DAP 100mg/kg nữa (50mg DAP). aPTT được đo trong suốt toàn bộ tiến trình điều trị.

Kết quả

Các kết quả được thể hiện trên Hình 9 và Hình 13. 2 giờ sau khi dùng PRADAXA®, aPTT tăng từ 43 giây đến 81 giây, thể hiện tác dụng chống đông máu đáng kể. 100mg DAP được dùng để tiêm liều cao qua đường tĩnh mạch, mà đưa aPTT xuống thấp hơn gốc trong thời gian 25 phút. 2 giờ sau đó, aPTT tăng ngược trở lại đến 79 giây và chuột này được cho dùng liều 50mg DAP.

Trong thời gian 30 phút, aPTT được đưa xuống thấp hơn gốc. Cả hai lần, trong thời gian 60 phút sau khi dùng DAP, mức aPTT trở lại cao hơn gốc. Sau liều DAP thứ hai, aPTT tăng đến 53 giây. Liều DAP thứ ba, 100mg/kg DAP (50mg DAP), được dùng qua đường tĩnh mạch và aPTT giảm xuống gốc trong thời gian 20 phút. Hình 13 thể hiện thử nghiệm tương tự, trong đó sau khi dùng 15,5mg/kg PRADAXA®, aPTT trở lại bình thường trong thời gian khoảng 30 phút bắt đầu bằng việc điều trị bằng 100mg/kg DAP.

Ví dụ 6: DAP đảo ngược tác dụng chống đông máu *in vivo* bằng heparin không phân đoạn (“UHF”).

Nguyên liệu và phương pháp

Con chuột đực bạch tạng, nặng 515g, được cho dùng 10mg/kg heparin không phân đoạn (5mg UFH) bằng cách tiêm dưới da.

200mg/kg DAP (100mg DAP) được dùng thành hai lần tiêm liều cao qua đường tĩnh mạch sau khi dùng UFH. Sau đó, con chuột này được dùng liều 400mg/kg DAP (200mg DAP). aPTT được đo trong suốt toàn bộ tiến trình điều trị.

Kết quả

Như được thể hiện trên Hình 10, thời gian aPTT tăng một cách đáng kể từ 28 giây đến 102 giây trong khoảng thời gian một giờ sau khi dùng heparin. 100mg DAP được dùng qua đường tĩnh mạch và nó đưa thời gian aPTT đến 48 giây trong thời gian 20 phút. Trong thời gian 1 giờ, aPTT tăng đến 120 giây, sau đó liều 100mg DAP khác được dùng qua đường tĩnh mạch. Trong thời gian 15 phút, aPTT được giảm đến 47 giây. Trong thời gian 1 giờ, aPTT tăng đến 96 giây, sau đó liều 200mg DAP được dùng qua đường tĩnh mạch. 10 phút sau, aPTT giảm đến 33 giây.

Ví dụ 7: DAP đảo ngược tác dụng chống đông máu *in vivo* bằng rivaroxaban (XARELTO®)

Nguyên liệu và phương pháp

5mg/kg rivaroxaban (XARELTO®) được dùng qua đường miệng cho con chuột to. Sau bốn giờ, 5mg/kg DAP (2mg DAP) được dùng qua đường tĩnh mạch. aPTT được đo tại các thời điểm không phút, 15 phút, 30 phút, 45 phút, 60 phút và 240 phút, trước khi dùng DAP. aPTT cũng đo được tại các thời điểm khoảng 5 phút, 10 phút, 25 phút, 35 phút, 45 phút, 60 phút, 120 phút, và 240 phút sau khi dùng DAP.

Kết quả

Các kết quả được thể hiện trên Hình 11. DAP đảo ngược một cách có hiệu quả tác dụng chống đông máu bằng rivaroxaban (XARELTO®) *in vivo* ở chuột to.

Ví dụ 8: DAP đảo ngược tác dụng chống đông máu bằng fondaparinux (ARIXTRA®) *in vivo*.

Nguyên liệu và phương pháp

5mg/kg fondaparinux được dùng qua đường dưới da cho chuột to. 200mg/kg DAP được dùng qua đường tĩnh mạch sau 2 giờ. Hoạt tính được đo bằng thử nghiệm về sự hình thành sắc tố yếu tố Xa làm sạch 510k (Biophen) tại các thời điểm 10 phút, 20 phút, 30 phút và 60 phút sau khi dùng DAP.

Kết quả

Hình 12 thể hiện DAP đảo ngược tác dụng chống đông máu bằng fondaparinux trong thời gian 10 phút kể từ khi dùng.

Ví dụ 9: DAP dùng qua đường tĩnh mạch không ảnh hưởng đến aPTT

Nguyên liệu và phương pháp

Các liều 0mg, 2mg, 10mg, 25mg, 50mg hoặc 100mg DAP được dùng qua đường tĩnh mạch cho con chuột đực to CD, phù hợp với trọng lượng và aPTT được đo.

Kết quả

Các kết quả được thể hiện trên Hình 16 cho thấy rằng DAP dùng qua đường tĩnh mạch không ảnh hưởng đến aPTT theo kiểu phụ thuộc liều lượng khi không có mặt các chất chống đông máu. Cột sai số là sai số chuẩn từ bảy phép đo aPTT lấy trung bình trong thời gian 90 phút.

Ví dụ 10: DAP đảo ngược tác dụng chống đông máu ở mẫu cắt ngang đuôi chuột

Nguyên liệu và phương pháp

Mỗi con chuột trong số ba con chuột to được cho dùng 2mg rivaroxaban. Một con chuột nhận chất làm đảo ngược giả vờ không chứa DAP, con chuột thứ hai nhận 2,5mg DAP, và con chuột thứ ba nhận 12,5mg DAP. Con chuột thứ tư nhận liều chống đông máu và liều chất đảo ngược giả vờ (“giả vờ”). 20 phút sau liều chất làm đảo ngược, các đuôi bị cắt ngang cách đầu mút của đuôi 1mm, đặt trong nước muối ở nhiệt độ trong phòng, và lượng mất máu được gom trong thời gian 30 phút và sau đó được cân.

Quy trình giống như vậy được áp dụng với 1,25mg apixaban (ELIQUIS®) riêng rẽ hoặc kết hợp với 5mg DAP hoặc 12,5mg DAP; với 15,5mg dabigatran etexilat (PRADAXA®) riêng rẽ hoặc kết hợp với 5mg DAP hoặc 12,5mg DAP; và với 5mg edoxaban (LIXIANA®) riêng rẽ hoặc kết hợp với 12,5mg DAP.

Kết quả

Các kết quả được thể hiện trên Hình 15 đối với rivaroxaban, trên Hình 16 đối với apixaban, trên Hình 17 đối với edoxaban, và trên Hình 18 đối với dabigatran etexilat. Thử nghiệm về việc làm chảy máu cắt ngang đuôi chuột là tương tự tình huống lâm sàng, trong đó cần đảo ngược tác dụng chống đông máu cấp. Các kết quả này cho thấy rằng DAP làm đảo ngược một cách có hiệu quả hoạt tính chống đông máu dẫn đến hiện tượng giảm có ý nghĩa về mặt thống kê lượng máu mất so với chuột to chỉ nhận chất chống đông máu.

Ví dụ 11: DAP đảo ngược việc chống đông máu bằng rivaroxaban (XARELTO®) ở máu người vừa lấy *ex vivo*.

Nguyên liệu và phương pháp

Máu của người được lấy từ người tình nguyện. Rivaroxaban với liều 0,25µg/ml được bổ sung vào riêng rẽ hoặc kết hợp với 50µg/ml DAP. Các đối chứng chứa 50µg/ml DAP hoặc nước muối. aPTT được đo trong thời gian 2 phút kể từ khi gom máu.

Kết quả

Hình 19 cho thấy rằng việc dùng DAP làm đảo ngược tác dụng chống đông máu do rivaroxaban gây ra trong máu người mới lấy, như đo được nhờ aPTT. Các cột sai số là sai số chuẩn từ ba thử nghiệm độc lập.

Ví dụ 12: DAP đảo ngược tác dụng chống đông máu bằng rivaroxaban và apixaban trong huyết tương của người *ex vivo*

Nguyên liệu và phương pháp

218µg/l hoặc 459µg/l rivaroxaban được bổ sung vào huyết tương của người, lần lượt có hoặc không có 1,250µg/l DAP hoặc 6,250µg/l DAP. Tương tự, 156µg/l hoặc 313µg/l apixaban được bổ sung vào huyết tương của người lần lượt có hoặc không có 1,156µg/l hoặc 3,125µg/l DAP. Tác động của DAP đến mức độ chống đông máu được đo theo thử nghiệm về sự hình thành sắc tố kháng yếu tố Xa của Biophen làm sạch 510k. Nồng độ rivaroxaban được xác định bằng cách so sánh với chuẩn định cỡ huyết tương, trong khi nồng độ apixaban được suy ra từ các dung dịch pha loãng dung dịch gốc vì các chuẩn định cỡ vẫn chưa có.

Kết quả

Đối với cả nồng độ của rivaroxaban và apixaban, DAP hoàn lại nồng độ chống đông máu hữu hiệu đến thấp hơn nồng độ tối thiểu hữu hiệu. Hình 20 thể hiện các kết quả đối với rivaroxaban và Hình 21 thể hiện các kết quả đối với apixaban.

Ví dụ 13: Làm đảo ngược tác dụng chống đông máu nhờ rivaroxaban trong huyết tương của người *ex vivo* phụ thuộc liều lượng DAP

Nguyên liệu và phương pháp

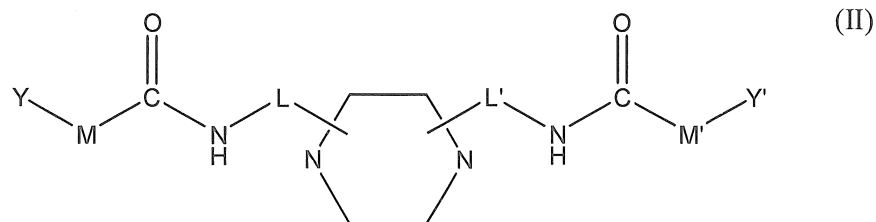
218µg/l rivaroxaban được bổ sung vào huyết tương của người riêng rẽ hoặc kết hợp với DAP với liều 1,25µg/l, 12,5µg/l, 125µg/l, hoặc 1,250µg/l. Hoạt tính của Yếu tố Xa được đo bằng kit thử nghiệm về sự hình thành sắc tố kháng Xa của Biophen đã được làm sạch 510k. Nồng độ rivaroxaban được xác định bằng cách so sánh với chuẩn định cỡ huyết tương.

Kết quả

Hình 22 cho thấy rằng DAP có tác dụng đảo ngược phụ thuộc liều lượng đối với việc chống đông máu bằng rivaroxaban trong huyết tương của người, như được thể hiện bởi tác động của nó đến nồng độ của rivaroxaban (đo được theo thử nghiệm về hoạt tính của Yếu tố Xa).

YÊU CẦU BẢO HỘ

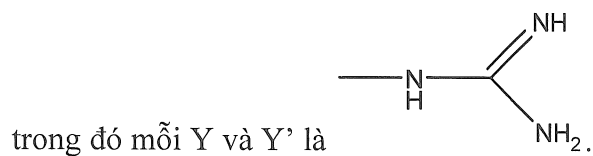
1. Hợp chất có công thức II:



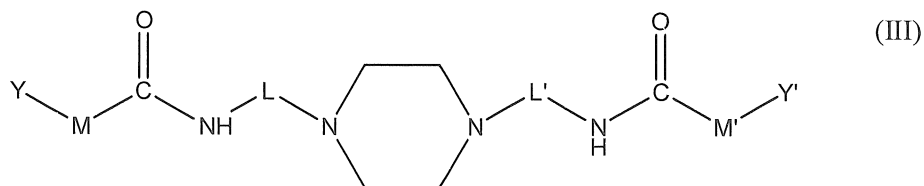
hoặc muối được dụng của nó;

trong đó mỗi L và L' là mạch alkylen được thể hoặc không được thể có 1 đến 10 nguyên tử cacbon,

trong đó mỗi M và M' là mạch alkylen được thể có 1 đến 10 nguyên tử cacbon và

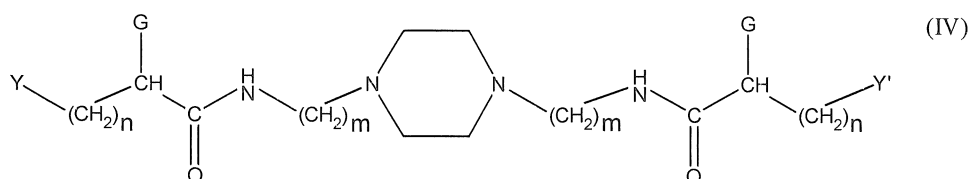


2. Hợp chất theo điểm 1, trong đó hợp chất này có công thức III:



hoặc muối được dụng của nó.

3. Hợp chất theo điểm 2, trong đó hợp chất này có công thức IV:

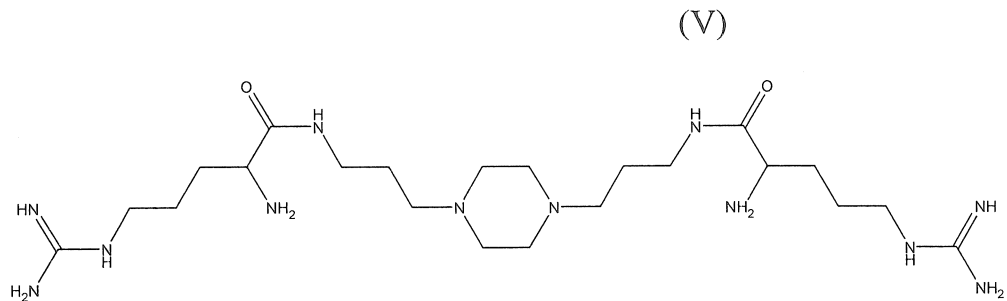


hoặc muối được dụng của nó,

trong đó n bằng 3 đến 5, m bằng 3 đến 6 và G được chọn từ $-\text{NH}_2$ và OH.

4. Hợp chất theo điểm 3, trong đó G là amino.

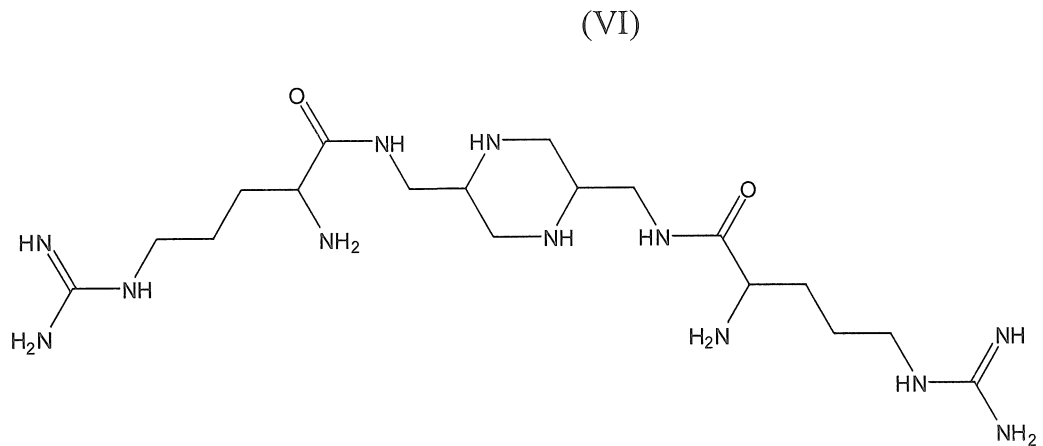
5. Hợp chất theo điểm 1, trong đó hợp chất này có công thức V:



,

hoặc muối được dụng của nó.

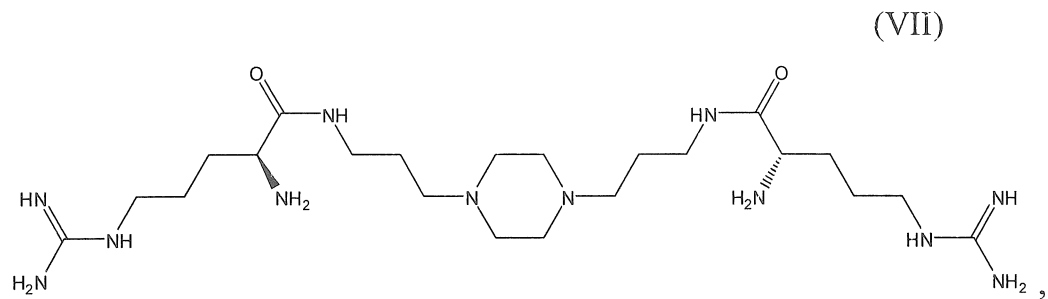
6. Hợp chất theo điểm 1, trong đó hợp chất này có công thức VI:



,

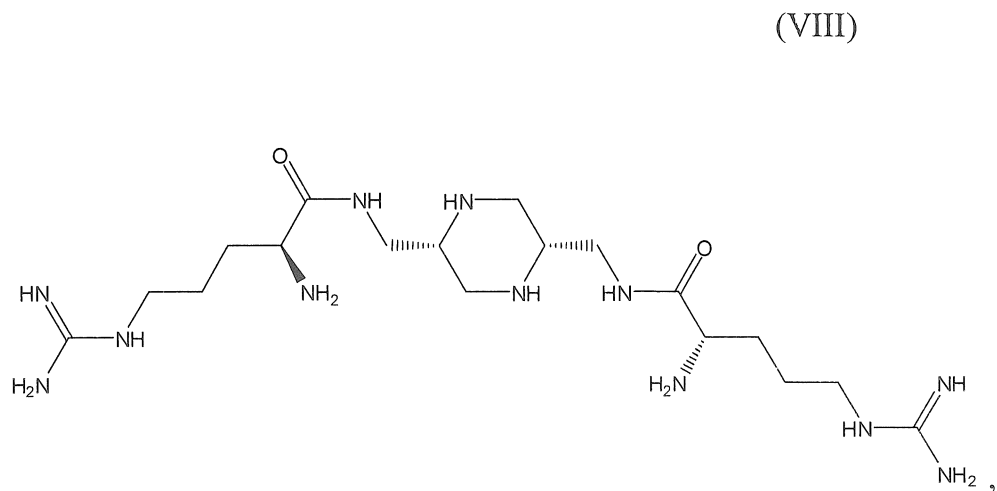
hoặc muối được dụng của nó.

7. Hợp chất theo điểm 1, trong đó hợp chất này có công thức VII:



hoặc muối được dụng của nó.

8. Hợp chất theo điểm 1, trong đó hợp chất này có công thức VIII:



hoặc muối được dụng của nó.

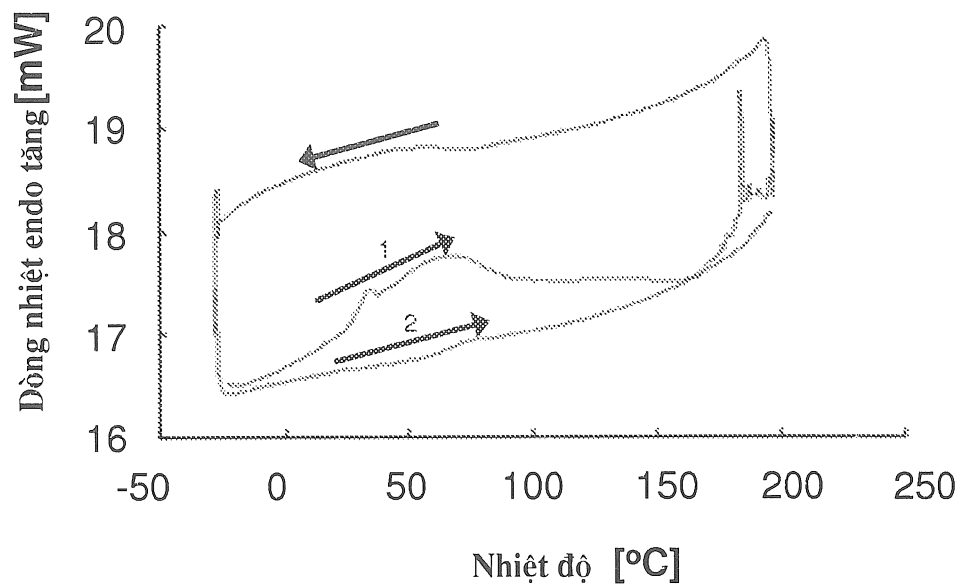
9. Dược phẩm chứa hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8 và chất mang được dụng.

10. Dược phẩm theo điểm 9, trong đó dược phẩm này được làm thích ứng:

- (a) để dùng trong ruột;
- (b) để dùng qua đường miệng;
- (c) để dùng ngoài đường tiêu hóa; hoặc
- (d) để dùng trong tĩnh mạch hoặc dưới da.

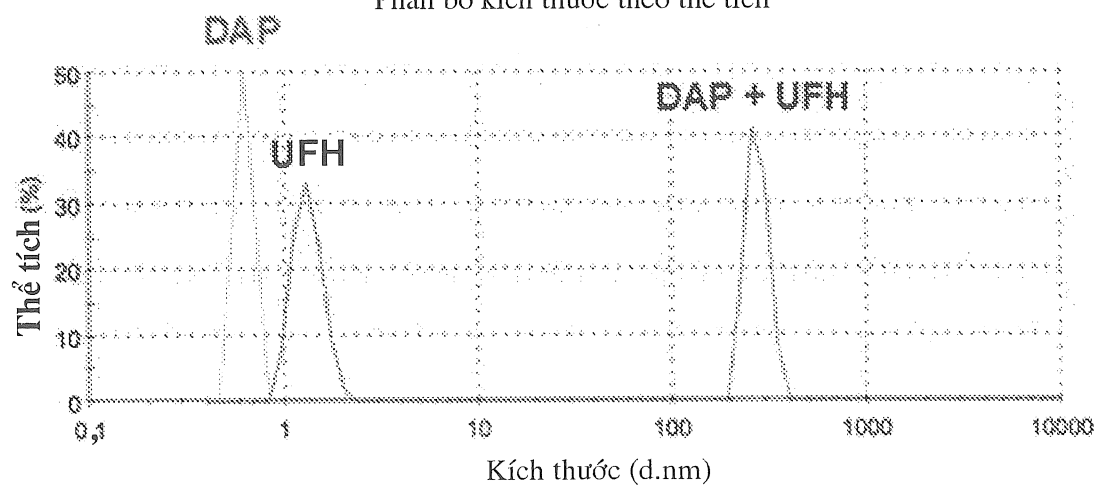
11. Kit chẩn đoán chứa hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8.

Hình 1

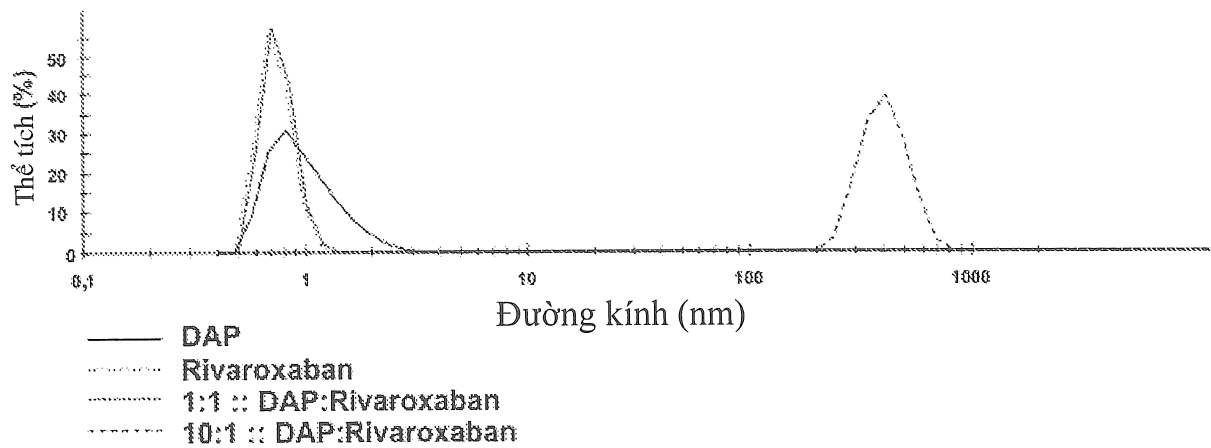


Hình 2

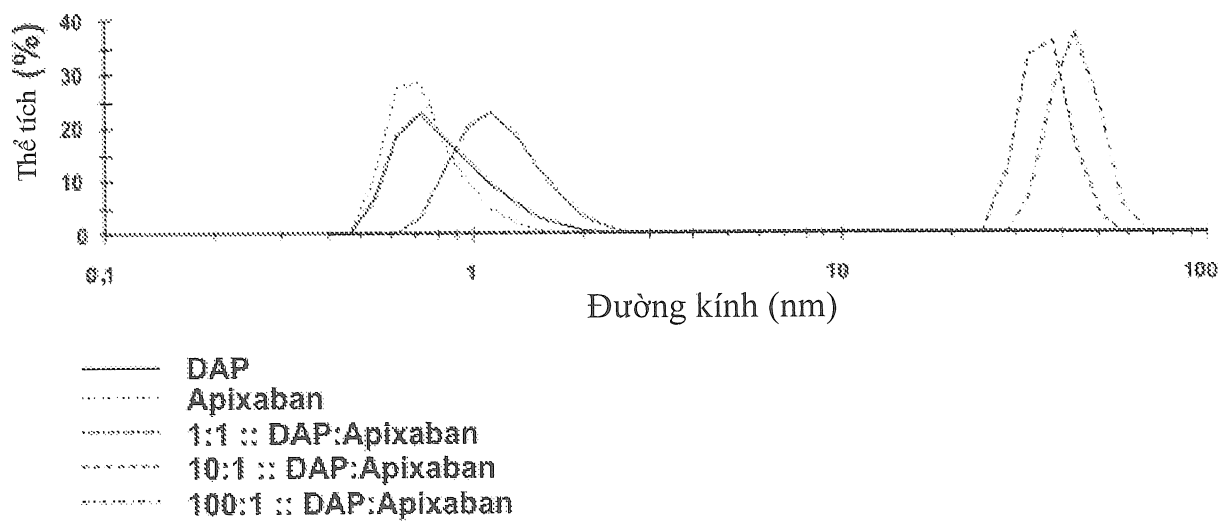
Phân bố kích thước theo thể tích



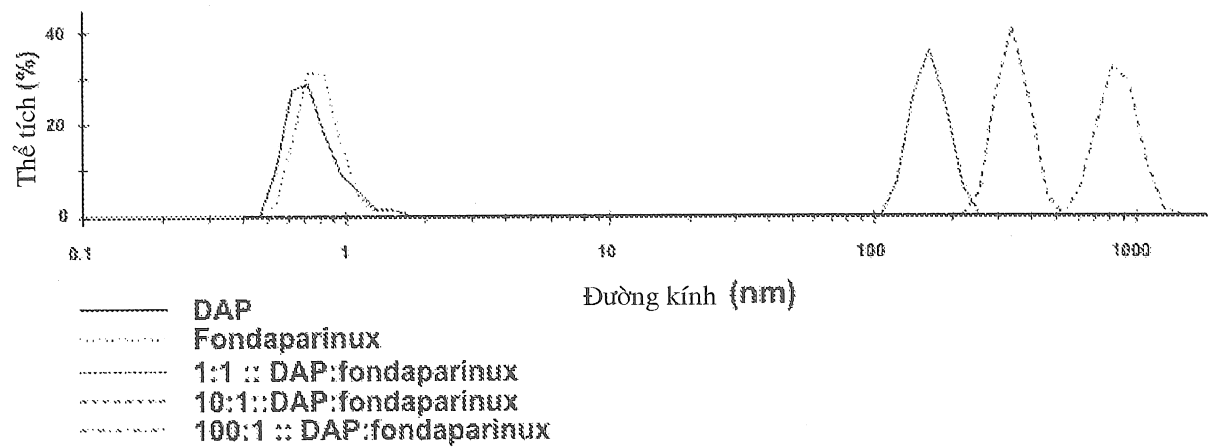
Hình 3



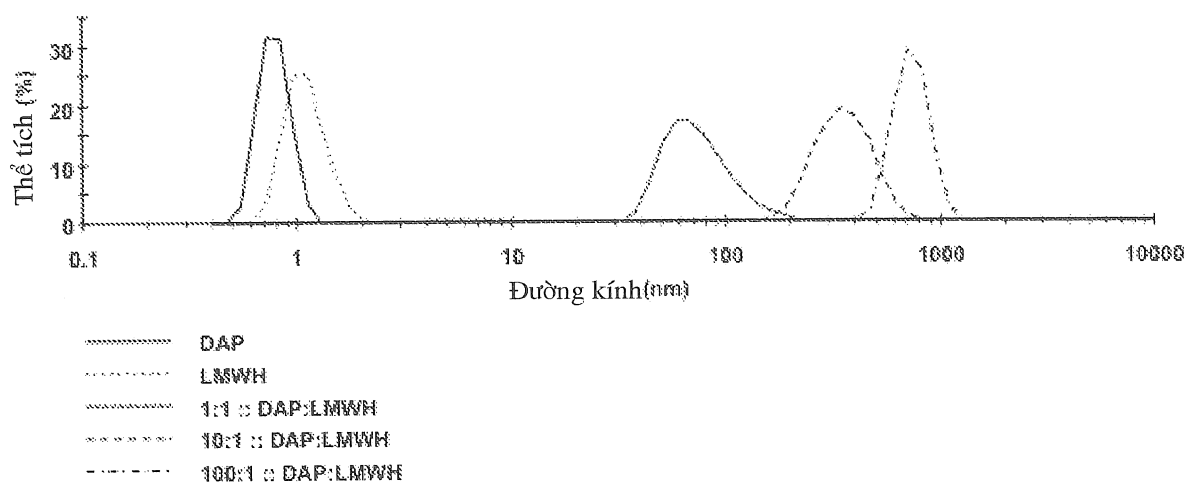
Hình 4



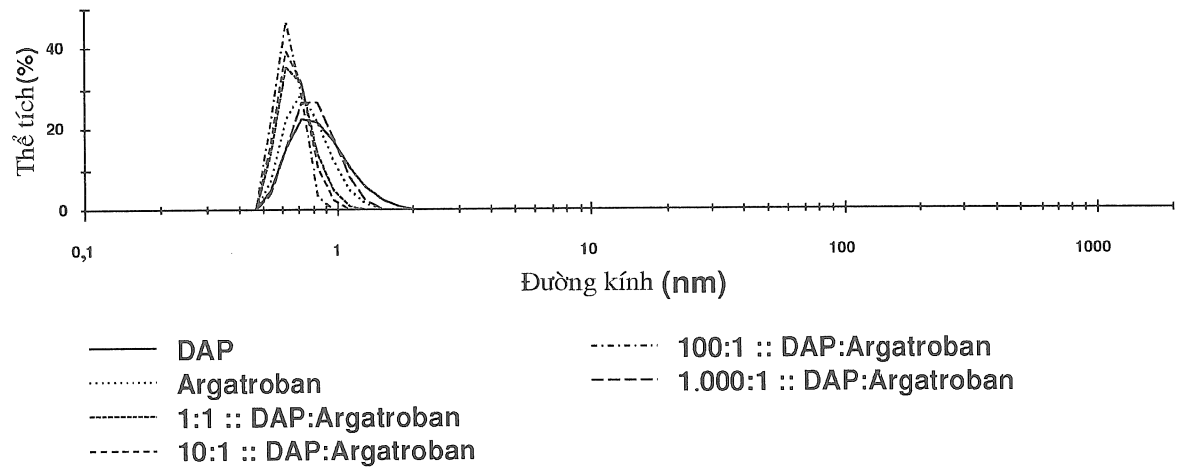
Hình 5

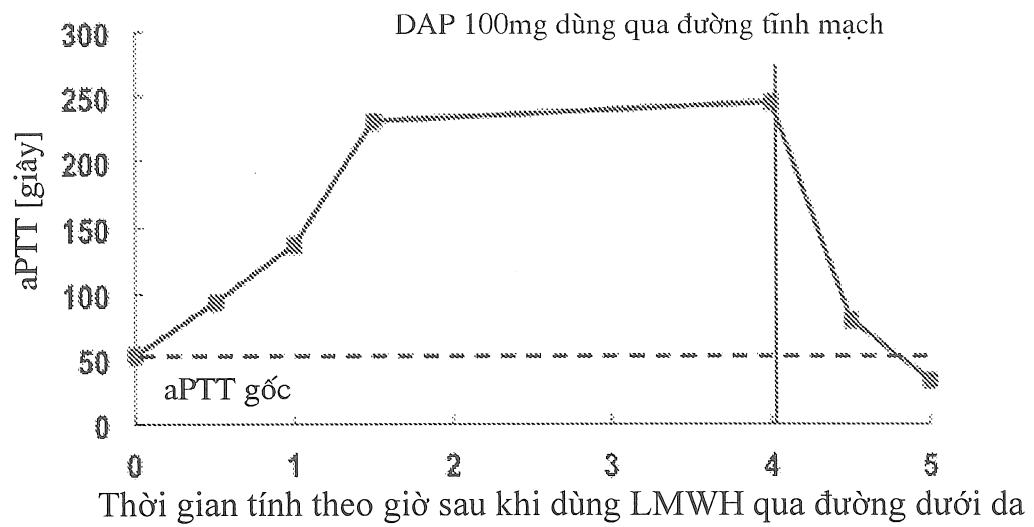
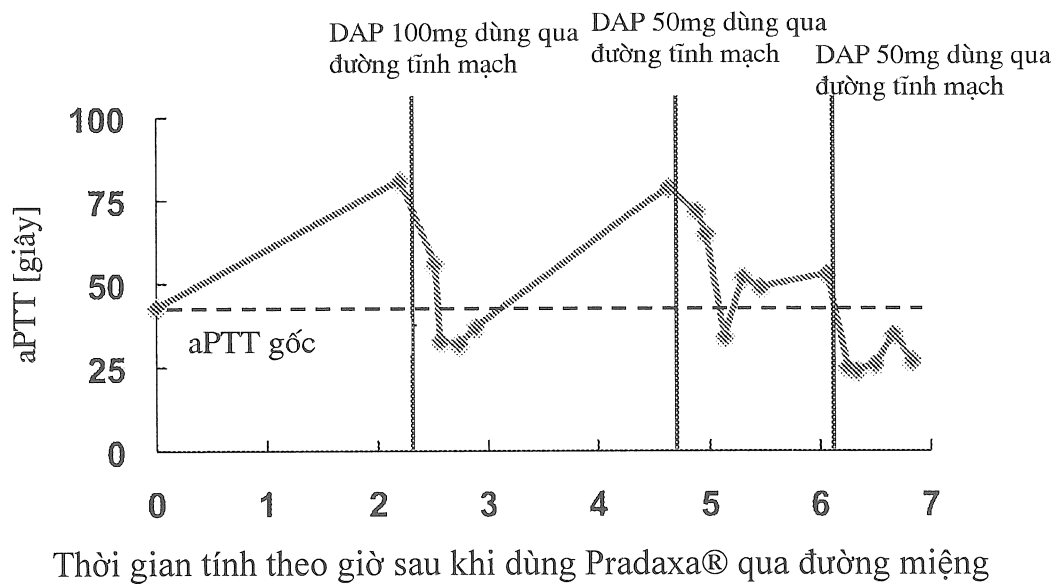


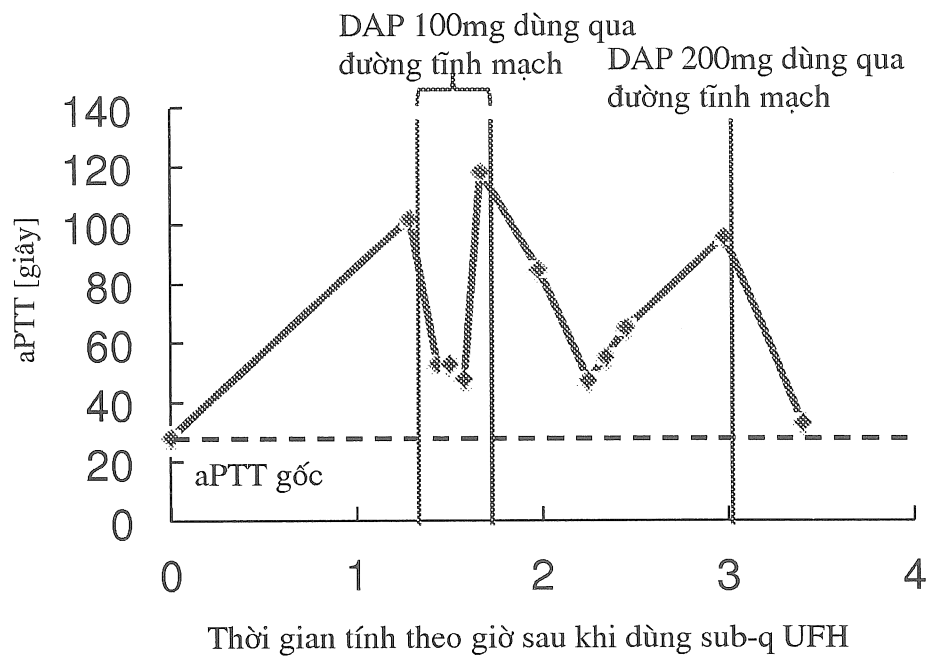
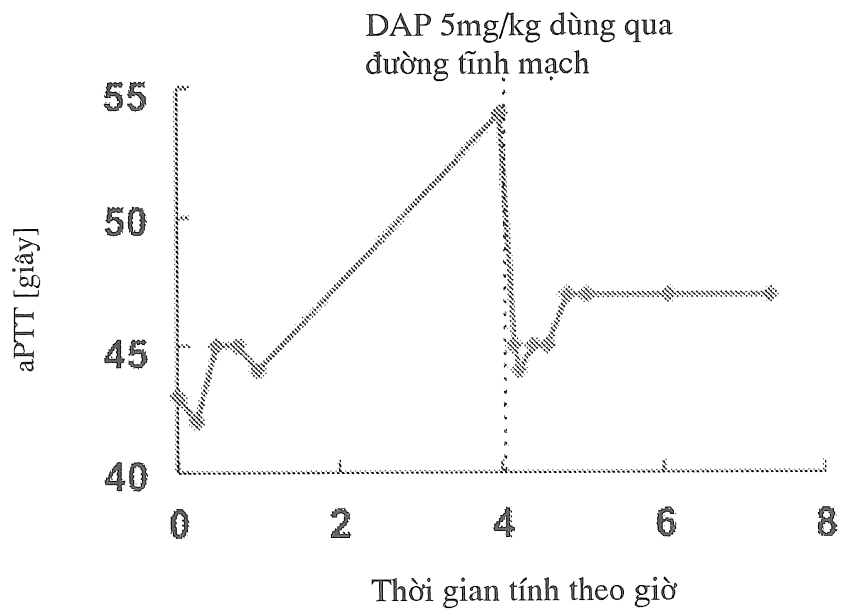
Hình 6



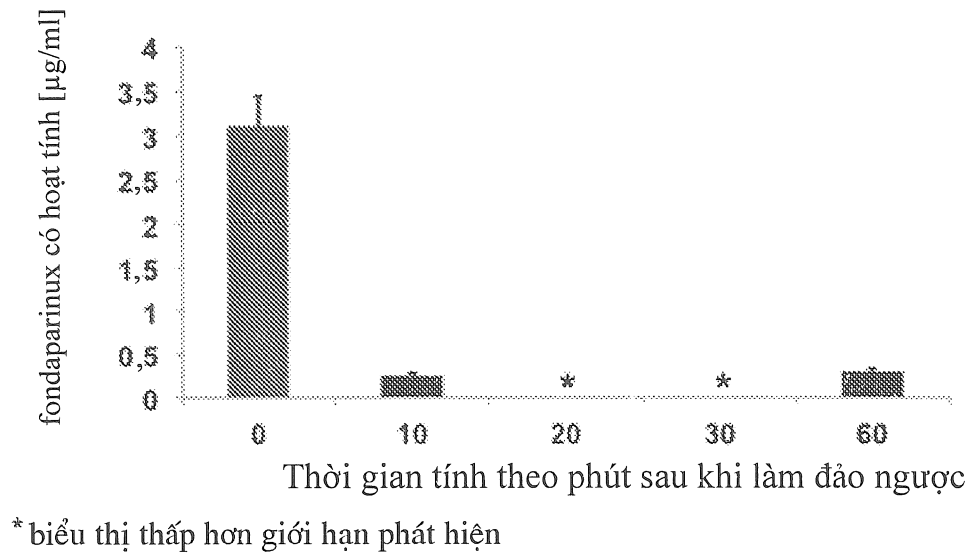
Hình 7



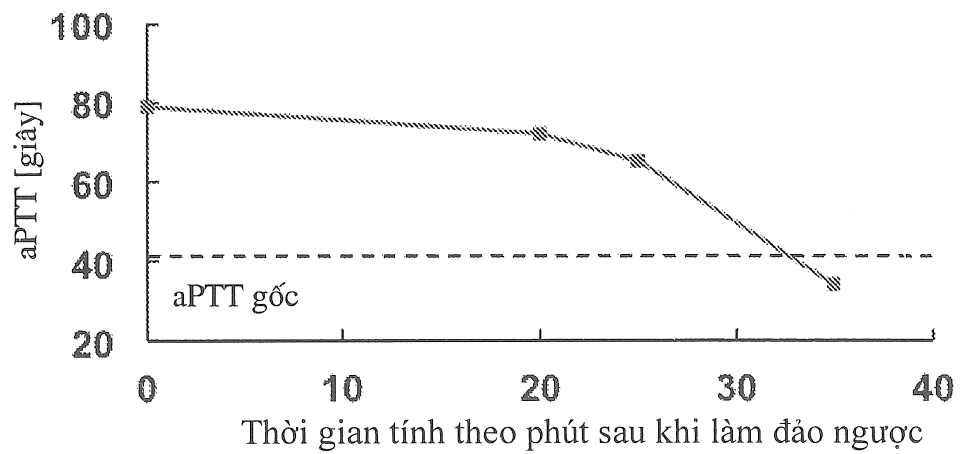
Hình 8**Hình 9**

Hình 10**Hình 11**

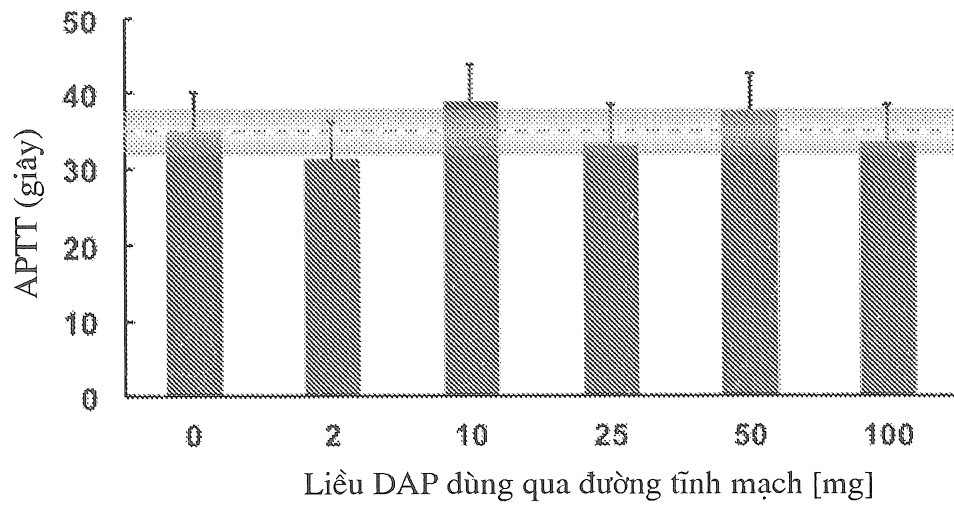
Hình 12



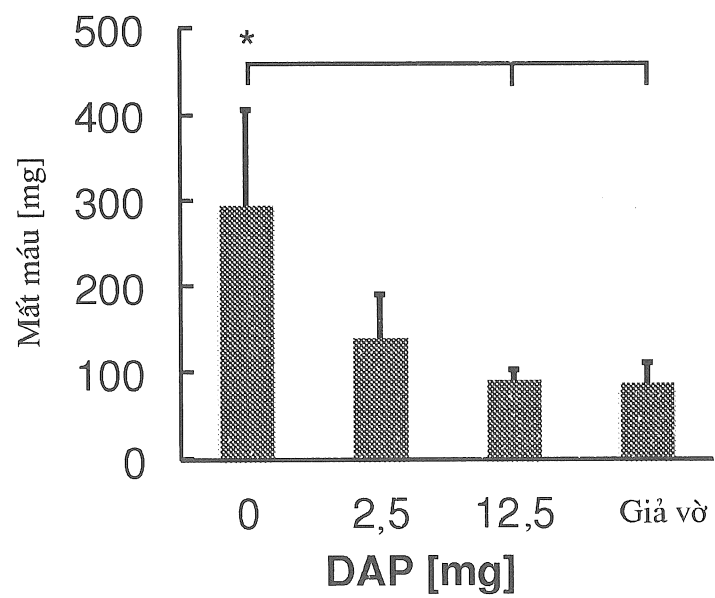
Hình 13



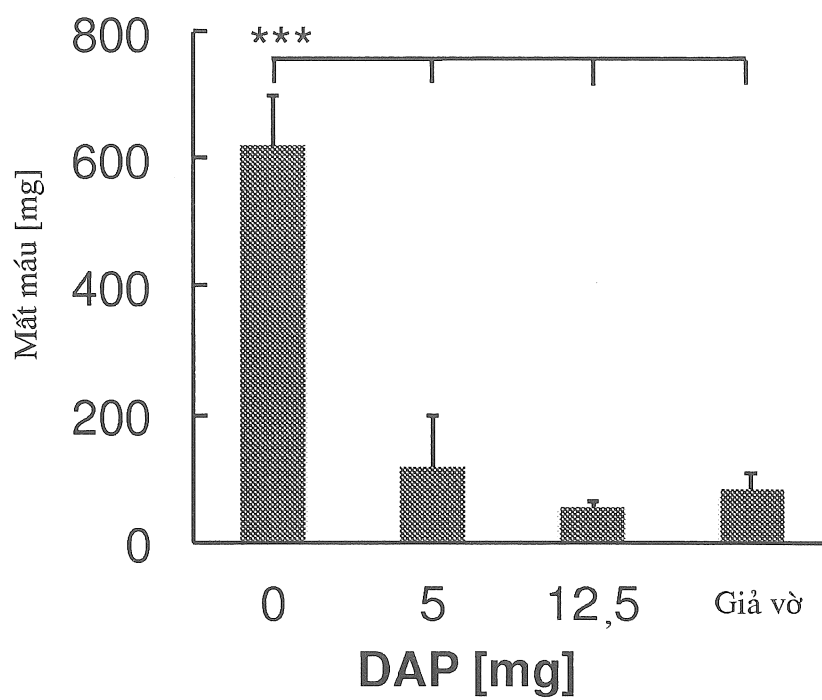
Hình 14



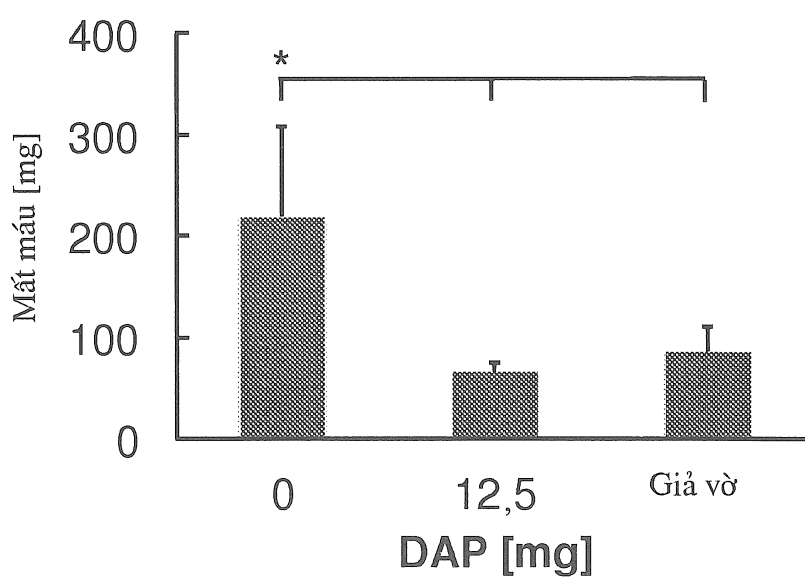
Hình 15



Hình 16

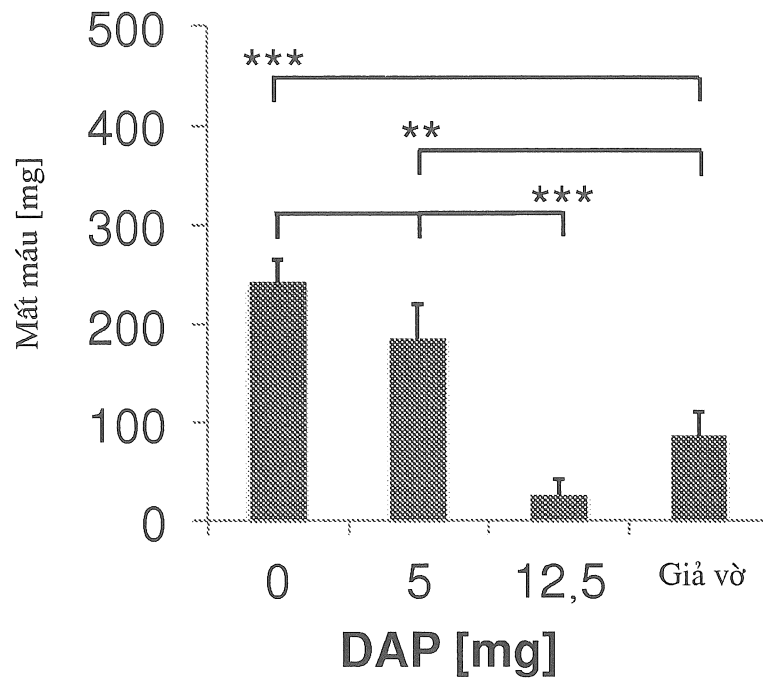


Hình 17

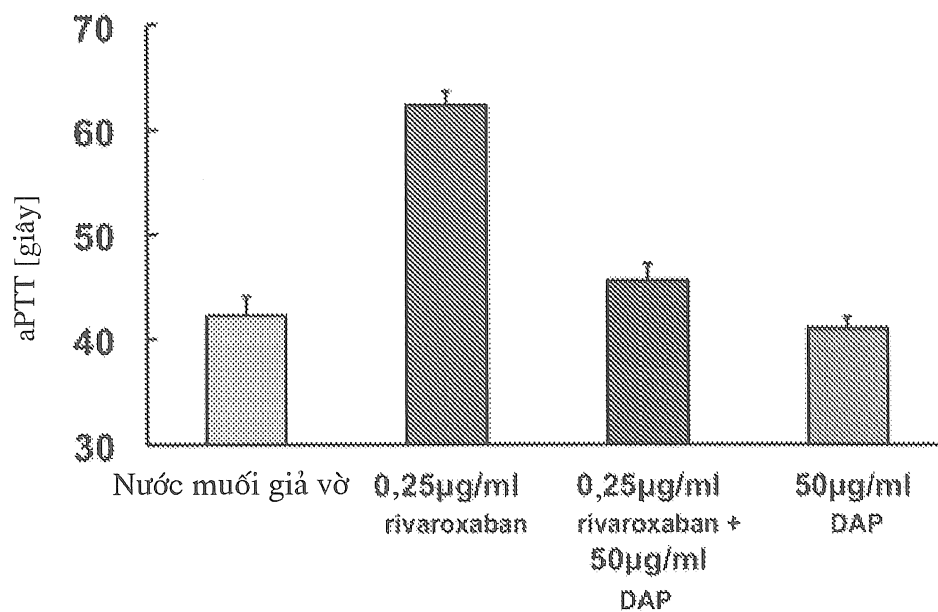


Hình 18

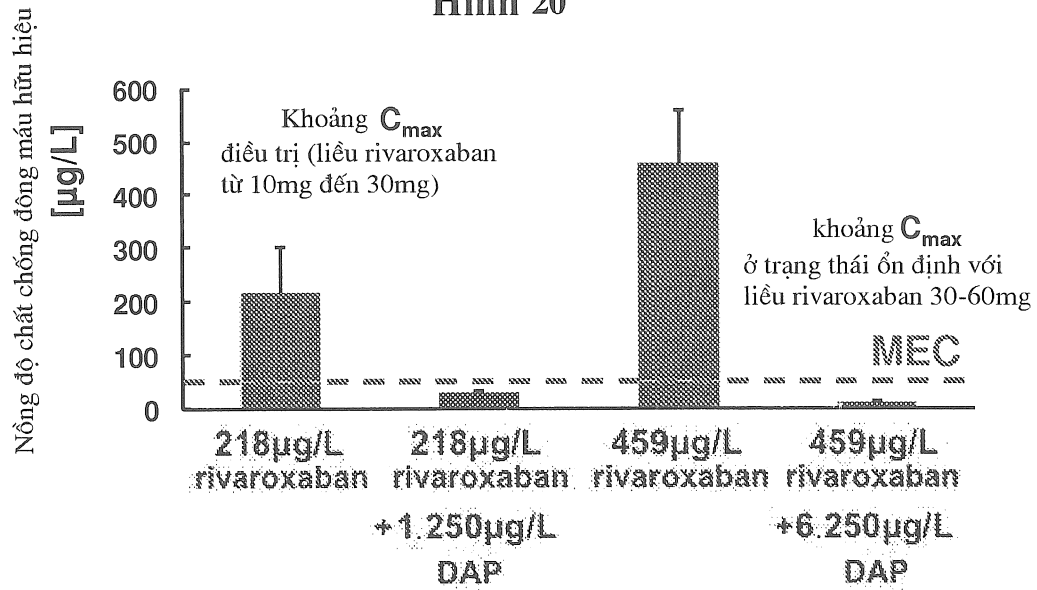
Dabigatran



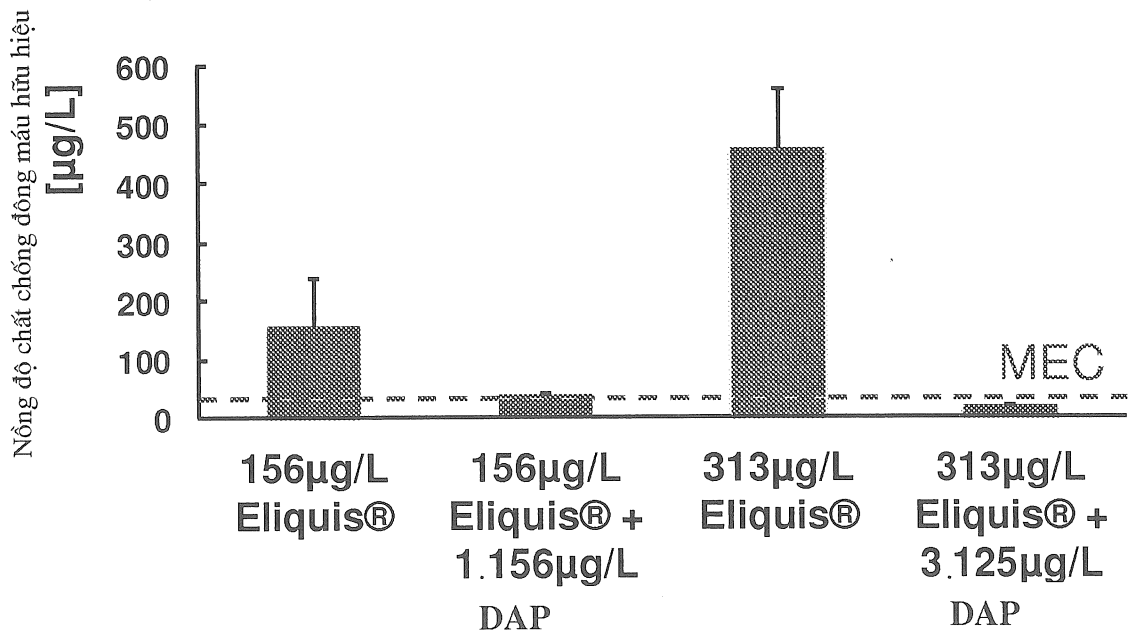
Hình 19



Hình 20



Hình 21



Hình 22

