



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

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



1-0027474

(51)⁷ C07D 417/06; C07K 7/16; A61K 38/11 (13) B

(21) 1-2016-00187

(22) 25/07/2014

(86) PCT/US2014/048317 25/07/2014

(87) WO2015/013690 29/01/2015

(30) 61/859,024 26/07/2013 US; 61/952,073 12/03/2014 US

(45) 25/02/2021 395

(43) 25/05/2016 338A

(73) FERRING B.V. (NL)

Polaris Avenue 144, 2132 JX Hoofddorp, The Netherlands

(72) WISNIEWSKI, Kazimierz (US); SCHTEINGART, Claudio (US); RIVIERE, Pierre (US).

(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) HỢP CHẤT DÙNG LÀM CHẤT CHỦ VẬN THỤ THỂ VASOPRESSIN-2 VÀ
DƯỢC PHẨM CHỨA HỢP CHẤT NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến hợp chất dùng làm chất chủ vận thụ thể vasopressin-2 và dược phẩm chứa hợp chất này. Hợp chất này là hữu ích để điều trị bệnh đái tháo nhạt, đái dầm ban đêm nguyên phát, và chứng tiểu đêm.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến các hợp chất có hoạt tính chủ vận ở thụ thể vasopressin-2 (V_2) và dược phẩm chứa hợp chất này. Hợp chất này là hữu ích để sản xuất thuốc nhằm điều trị các bệnh.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Có ba typ phụ đã biết của thụ thể vasopressin, V_{1a} , V_{1b} và V_2 . Thụ thể V_{1b} cũng được biết đến là thụ thể V_3 và thụ thể V_{1a} cũng được biết đến là thụ thể V_1 . Mỗi typ phụ có mẫu vật biểu hiện khác biệt trong mô, với V_2 chủ yếu được tìm thấy trong thận, trong đó nó qua trung gian hoạt tính chống lợi tiểu của vasopressin phối tử nội sinh (Favory et al, 2009). V_{1b} được phân bố một cách rộng rãi trong não (Hernando et al., 2001). V_{1a} được tìm thấy trong nhiều mô, bao gồm cơ trơn, gan, thận, tiểu huyết cầu, lá lách và não (Zingg, 1996; Ostrowski et al., 1994).

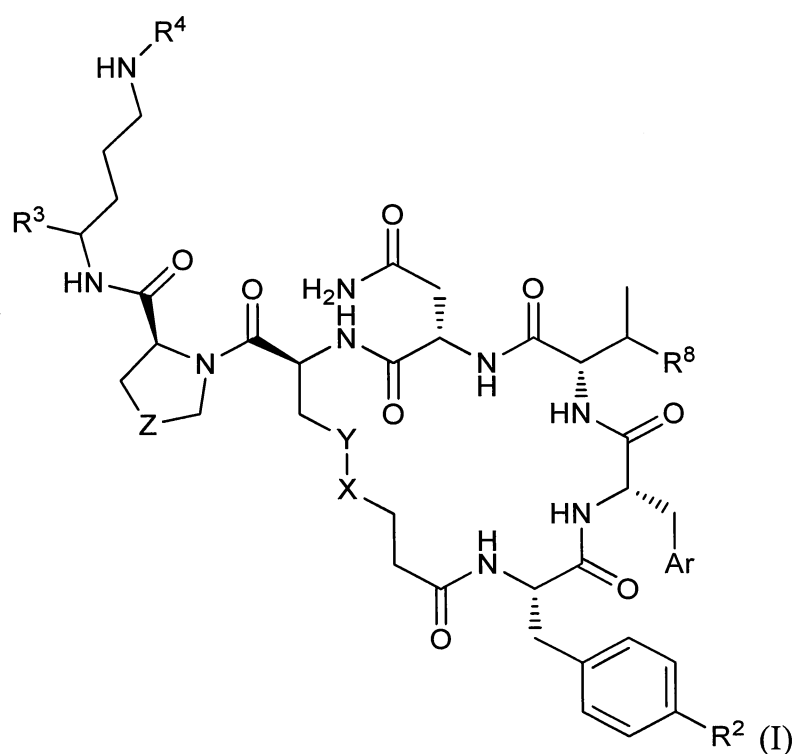
Các chất chủ vận của thụ thể V_2 là hữu ích về mặt lâm sàng. Desmopressin là chất chủ vận thụ thể V_2 mà được chấp thuận ở một số lãnh thổ để điều trị bệnh đái tháo nhạt, đái dầm ban đêm nguyên phát, chứng tiểu đêm, và các rối loạn đông tụ bao gồm chứng máu khó đông A và bệnh von Willebrand. Desmopressin gắn kết và hoạt hoá các thụ thể V_2 và V_{1b} , với hoạt tính yếu hơn đối với V_{1a} .

Desmopressin đã thể hiện được tiết một phân qua thận (ví dụ, Fjellestad-Paulsen et al., 1993), và chu kỳ nửa phân rã của desmopressin được gia tăng ở người bệnh bị suy thận (Ruzicka, et al. 2003; Agersoe et al. 2004). Agersoe et al. đề xuất rằng chu kỳ nửa phân rã gia tăng có thể dẫn đến tác dụng chống lợi tiểu kéo dài và làm tăng nguy cơ giảm natri huyết, giảm hàm lượng natri huyết thanh mà có thể dẫn đến làm nghịch đảo các sự kiện như tai biến ngập máu hoặc hôn mê. Các tác giả còn đề xuất rằng “mặc dù desmopressin xuất hiện là an toàn và được dung nạp tốt bởi người bệnh có chức năng thận bị suy yếu, nguyên nhân lớn nhất sẽ được thực hiện khi chuẩn độ đối với chế độ dùng liều hữu hiệu, nếu người bệnh có chức năng thận ở mức vừa phải hoặc trầm trọng sẽ được điều trị bằng desmopressin.”

Do đó, vẫn có nhu cầu đối với các chất chủ vận thụ thể V_2 bổ sung với hoạt tính giảm ở thụ thể V_{1b} . Ngoài ra, các chất chủ vận thụ thể V_2 mà không dựa quá nhiều vào thân để loại thải cũng có thể mong muốn.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Theo một phương án, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức I hoặc muối được
dùng của nó,



trong đó, R² là H, C₁-C₄ alkyl, halogen, -OH hoặc -O-C₁-C₄alkyl;

R^3 là H hoặc $-CH_2-OH$ hoặc $-C(O)-NR^5R^6$;

R⁴ là H hoặc -C(=NH)-NH₂;

R⁵ và R⁶ độc lập là H, C₁-C₆ alkyl, -CH₂-xyclopropyl, -xyclopropyl hoặc arylalkyl với điều kiện R⁵ và R⁶ không cùng là H;

X và Y độc lập là $-\text{CH}_2-$ hoặc $-\text{S}-$ với điều kiện nếu X là $-\text{CH}_2-$, Y không phải là $-\text{CH}_2-$;

Z là -CHR⁷- hoặc S và R⁷ là H hoặc C₁-C₄ alkyl, halogen, -OH hoặc -O-C₁-C₄ alkyl;

R⁸ là H hoặc -CH₃; và

Ar là heteroaryl hoặc phenyl tùy ý được thế bằng một C₁-C₄ alkyl, halogen, -OH hoặc -O-C₁-C₄ alkyl.

Theo một số phương án, R⁵ và R⁶ độc lập là H, C₁-C₆ alkyl, hoặc arylalkyl.

Theo một số phương án, R⁵ và R⁶ độc lập là H, C₁-C₆alkyl hoặc arylalkyl.

Theo một số phương án, R⁵ và R⁶ không cùng là H.

Theo một số phương án, chỉ một trong số X và Y là -S-. Theo một số phương án, X là -CH₂-. Theo một số phương án, X và Y cùng là -S-.

Theo một số phương án, Ar là thiophen.

Theo một số phương án, R⁸ là -CH₃.

Theo một số phương án, R³ là -C(O)-NR⁵R⁶. Theo một số trong số các phương án này, R⁵ là H và R⁶ là C₁-C₄ alkyl. Theo một số trong số các phương án này, R⁵ và R⁶ cùng là -CH₂CH₃.

Theo một số phương án, R² là halogen. Theo một số trong số các phương án này, R² là -Cl. Theo một số trong số các phương án này, R² là -F.

Cũng được bộc lộ trong bản mô tả này, theo một phương án, là phương pháp điều trị một trong số bệnh đái tháo nhạt, đái dầm ban đêm nguyên phát, và chứng tiểu đêm bao gồm việc cho người bệnh cần điều trị này dùng lượng hữu hiệu về mặt điều trị của hợp chất có công thức I. Phần mô tả cũng bộc lộ việc sử dụng hợp chất được mô tả trong bản mô tả này để điều trị các tình trạng bệnh được mô tả trong bản mô tả này, cùng với việc sử dụng các hợp chất được mô tả trong bản mô tả này để sản xuất thuốc nhằm điều trị các tình trạng bệnh được mô tả trong bản mô tả này.

Theo một phương án, hợp chất có công thức I được sử dụng để sản xuất thuốc nhằm điều trị bệnh đái tháo nhạt, đái dầm ban đêm nguyên phát, hoặc chứng tiểu đêm.

Mô tả chi tiết sáng chế

Trừ khi có quy định khác, các thuật ngữ sau đây được sử dụng trong bản mô tả này, bao gồm phần mô tả và các điểm yêu cầu bảo hộ, có các định nghĩa được đưa ra dưới đây. Phải được hiểu rằng, như được sử dụng trong phần mô tả và các điểm yêu cầu

bảo hộ kèm theo, các dạng số ít “một” bao gồm các tham khảo số nhiều trừ khi có quy định khác một cách rõ ràng trong bản mô tả này. Các định nghĩa về các thuật ngữ hoá học tiêu chuẩn có thể được tìm thấy trong tài liệu tham khảo, bao gồm ấn phẩm: Carey and Sundberg (2007) *Advanced Organic Chemistry 5th Ed.* Vols. A and B, Plenum Press, New York. Thực tiễn của sáng chế sẽ dùng, trừ khi có quy định khác, các phương pháp thông thường của ngành hoá học hữu cơ tổng hợp, phép đo phổ khối, phương pháp điều chế và phân tích của sắc ký, hoá học protein, hoá sinh học và dược lý, nằm trong kỹ năng của người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này.

“Alkyl” là alkyl mạch thẳng hoặc mạch nhánh có từ 1 đến 12 cacbon. Alkyl mạch nhánh bao gồm các cấu hình *iso*-, *sec*-, và *tert*-.

“Aryl” là hệ vòng vòng cacbon thơm một vòng hoặc hai vòng có từ 5 đến 12 cacbon tùy ý được thế bằng C₁-C₄alkyl, halogen, -OH hoặc -O-C₁-C₄alkyl. Các hệ vòng vòng cacbon thơm một vòng và hai vòng ví dụ bao gồm phenyl được thế tùy ý và naphthyl được thế tùy ý.

“Arylalkyl” là nhóm alkyl mà có nhóm phần tử thế aryl hoặc heteroaryl.

“Heteroaryl” là hệ vòng có năm hoặc sáu cạnh dị vòng thơm tùy ý được thế bằng C₁-C₄alkyl, halogen, -OH hoặc -O-C₁-C₄ alkyl. Hệ vòng dị thơm có năm cạnh là hệ vòng thơm một vòng có năm nguyên tử vòng, trong đó 1, 2, 3 hoặc 4 nguyên tử vòng độc lập được chọn từ N, O và S. Các hệ vòng dị thơm có năm cạnh ví dụ bao gồm imidazolyl được thế tùy ý, thiazolyl, thienyl, furyl, pyrazolyl, và triazolyl. Hệ vòng dị thơm có sáu cạnh là hệ vòng thơm một vòng có sáu nguyên tử vòng, trong đó 1, 2, 3 hoặc 4 nguyên tử vòng độc lập được chọn từ N, O và S. Các hệ vòng dị thơm có sáu cạnh ví dụ bao gồm pyridyl được thế tùy ý, pyrimidyl và pyrazinyl.

Một phương án của sáng chế đề xuất được phẩm chứa hợp chất của sáng chế. Theo phương án thứ nhất, được phẩm còn bao gồm một hoặc nhiều tá dược được dụng hoặc tá dược dạng lỏng và tùy ý các thành phần điều trị và/hoặc phòng bệnh tùy ý khác. Các tá dược này là đã được biết đến đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Các hợp chất của sáng chế bao gồm, mà không hạn chế, các hợp chất bazơ như bazơ tự do. Trong toàn bộ phần mô tả về tá dược được dụng và muối là sẵn có trong ấn

phẩm: Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition (Easton, Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1990).

Các ví dụ về muối được dụng bao gồm các muối cộng axit, ví dụ muối được tạo thành bằng phản ứng với axit hydrohalogen như axit clohydric và các axit khoáng, như axit sulphuric, axit phosphoric và axit nitric, cũng như axit béo, vòng béo, thơm hoặc axit sulphonic dị vòng hoặc axit carboxylic như axit formic, axit axetic, axit propionic, axit succinic, axit glycolic, axit lactic, axit malic, axit tartaric, axit citric, axit benzoic, axit ascorbic, axit maleic, axit hydroxymaleic, axit pyruvic, axit p-hydroxybenzoic, axit embonic, axit metansulphonic, axit etansulphonic, axit hydroxyetansulphonic, axit halobenzenesulphonic, axit trifloaxetic, axit triflometansulphonic, axit toluensulphonic và axit naphthalensulphonic. (xem ví dụ ấn phẩm: Berge et al., *J. Pharm. Sci.* 66:1 19, 1977 and Wermuth, C.G. and P.H. Stahl, eds. *Pharmaceutical Salts: Properties, Selection and Use*. Zürich: *Verlag Helvetica Chimica Acta*, 2002).

Phụ thuộc vào phương thức dùng được dự định, các dược phẩm có thể ở dạng liều rắn, bán rắn hoặc lỏng, như ví dụ, viên nén, viên thuốc đạn, viên tròn, viên nang, bột, dịch lỏng, huyền phù, kem, thuốc mỡ, thuốc xức ngoài da hoặc tương tự, tốt hơn là ở dạng liều đơn vị thích hợp để dùng đơn lẻ liều chính xác. Dược phẩm sẽ bao gồm lượng hữu hiệu của dược chất được chọn trong tổ hợp với chất mang được dụng và, ngoài ra, có thể bao gồm các chất dùng trong dược phẩm khác, chất bổ trợ, chất pha loãng, chất đệm, v.v.

Sáng chế bao gồm dược phẩm chứa hợp chất của sáng chế bao gồm các chất đồng phân, hỗn hợp racemic hoặc không racemic của chất đồng phân hoặc muối được dụng hoặc solvat của nó cùng với một hoặc nhiều chất mang được dụng và tùy ý các thành phần điều trị và/hoặc phòng bệnh tùy ý khác.

Đối với dược phẩm dạng rắn, chất mang dạng rắn không độc thông thường bao gồm, ví dụ, loại dùng trong dược phẩm của manitol, lactoza, tinh bột, magie stearat, natri sacarin, bột talc, xenluloza, glucoza, sucroza, magie carbonat và tương tự.

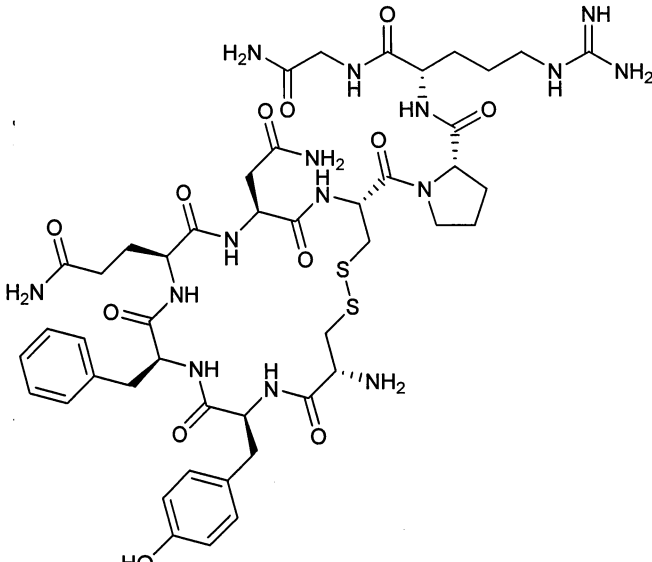
Để dùng qua đường miệng, dược phẩm thường thu được ở dạng viên nén, viên nang, dung dịch không chứa nước của viên nang gel mềm, huyền phù hoặc xi-rô. Viên

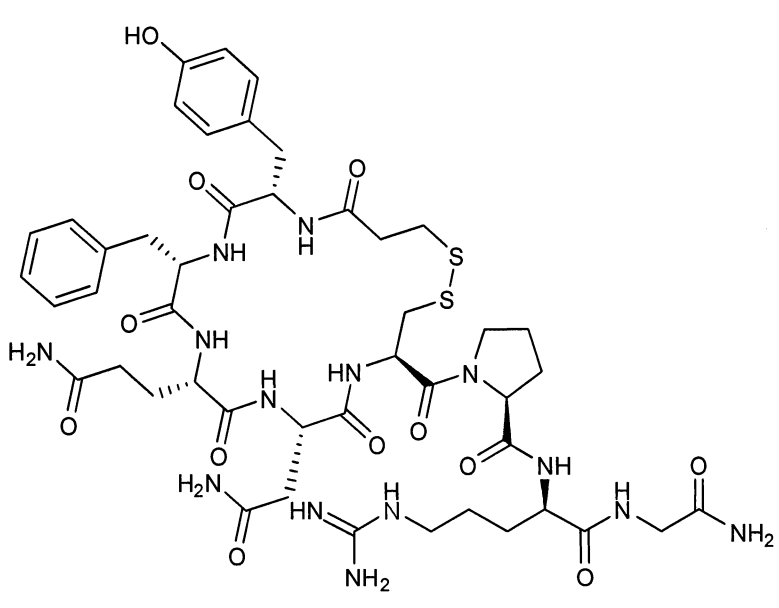
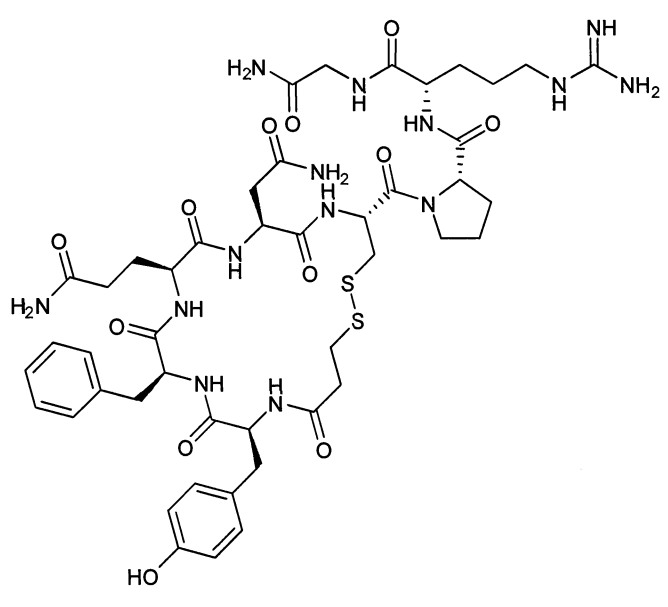
nén và viên nang là dạng dùng qua đường miệng được ưu tiên. Theo một số phương án, viên nén là lát mỏng, ví dụ lát mỏng nóng chảy nhanh. Theo một số phương án, lát mỏng được dùng qua đường dùng dưới lưỡi. Viên nén và viên nang để sử dụng qua đường miệng sẽ thường bao gồm một hoặc nhiều chất mang được sử dụng một cách thông thường như lactoza và tinh bột ngô. Chất làm trơn, như magie stearat, cũng thường được bổ sung vào. Khi huyền phù dạng lỏng được sử dụng, hoạt chất có thể được tổ hợp với chất nhũ tương và chất tạo huyền phù. Nếu muốn, chất tạo hương, chất tạo màu và/hoặc chất tạo ngọt có thể được bổ sung vào. Các thành phần tùy ý khác để hợp nhất vào trong được phẩm dùng qua đường miệng trong bản mô tả này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, chất bảo quản, chất tạo huyền phù, chất gây lắng và tương tự.

Các liều dùng cho liệu pháp điều trị sẽ phụ thuộc vào tốc độ hấp thụ, phân bố, chuyển hoá và bài tiết của các thành phần của liệu pháp điều trị tổ hợp cũng như các yếu tố khác đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Các trị số liều cũng sẽ thay đổi theo mức trầm trọng của tình trạng bệnh sẽ được làm nhẹ. Còn được hiểu rằng đối với đối tượng cụ thể bất kỳ, chế độ và chương trình liều cụ thể có thể được điều chỉnh trong khoảng thời gian theo nhu cầu của cá thể và sự phán xét của chuyên gia dùng hoặc kiểm soát việc dùng liệu pháp điều trị. Theo một số phương án, liều trong tĩnh mạch là khoảng 100ng. Theo một số phương án, liều dùng qua đường miệng nằm trong khoảng từ 1µg đến 1mg. Theo một số phương án, liều dùng qua mũi nằm trong khoảng từ 3mg đến 6mg.

Các chữ viết tắt được sử dụng là:

Chữ viết tắt	Định nghĩa
Ac	Axetyl
AcOH	Axit axetic

Chữ viết tắt	Định nghĩa
AVP	Arginin Vasopressin Cys-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys-Pro-Arg-Gly-NH₂ với cầu disulfua giữa Cys 
BTA	<i>N,O</i> -Bis(trimetylsilyl)axetamit
Bu	Các gốc butyl – alkyl còn có thể được ký hiệu là n (thông thường, nghĩa là không có mạch nhánh), i (iso), s (bậc hai) và t (bậc ba)
Bzl	Benzyl
CH ₃ CN	Axetonitril
DCE	1,2-dicloetan
DCM	Diclometan

Chữ viết tắt	Định nghĩa
dDAVP	Desmopressin, [1-deamino, 8-D-arginin]-vasopressin 
DIC	<i>N,N'</i> -Diisopropylcarbodiimit
DIPEA	<i>N,N</i> -diisopropyletylamin
DMF	<i>N,N</i> -dimetylformamit
dVP	1-deamino-vasopressin 
Et	Etyl
Fmoc	9-florenylmetoxycarbonyl

Chữ viết tắt	Định nghĩa
HBTU	O-Benzotriazol-N,N,N',N'-tetrametyl-uron, hexafluorophosphat
HFIP	1,1,1,3,3,3-hexafluor-2-propanol
HOBt	N-hydroxybenzotriazol
HPLC	sắc ký lỏng hiệu năng cao
<i>i</i> Bu	<i>iso</i> -butyl
<i>c</i> Pr	cyclopropyl
<i>i</i> Pr	<i>iso</i> -propyl
LC	sắc ký lỏng
Me	metyl
MeOH	metanol
MS	phép đo phổ khối
NMM	<i>N</i> -metylmorpholin
Pbf	2,2,4,6,7-pentametyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl
<i>t</i> Bu	<i>tert</i> -butyl
<i>t</i> BuOH	ruợu <i>tert</i> -butylic
TFA	axit trifluoroacetic
TIS	triisopropylsilan
TMOF	Trimetyl orthoformat, trimetoxymetan
Trt	trityl [triphenylmetyl, (C ₆ H ₅) ₃ C-]

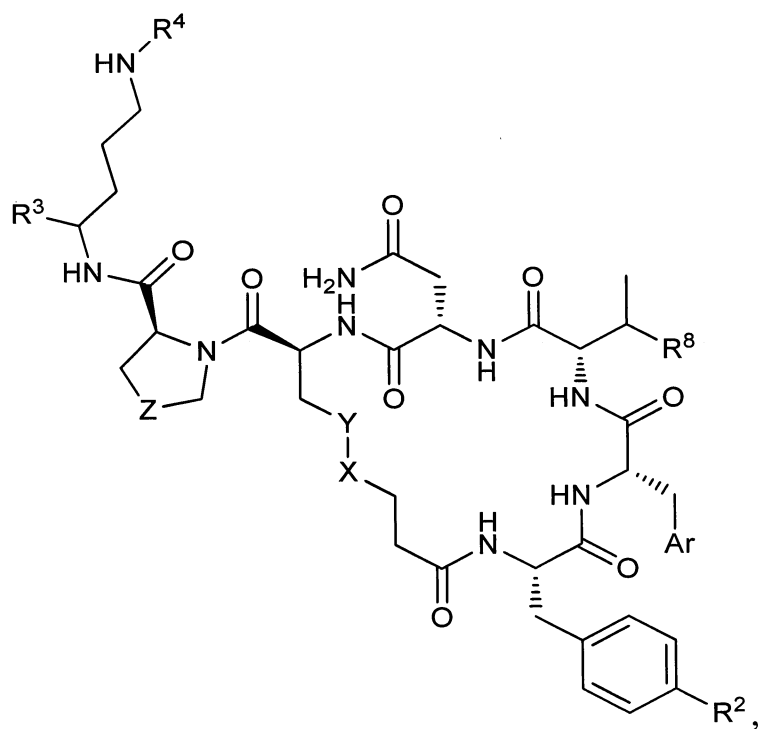
Trừ khi có quy định khác, axit L-amino được sử dụng và danh pháp axit amin thông thường là được sử dụng. Các ví dụ về axit amin mà không phải hai mươi axit amin thông thường bao gồm:

Chữ viết tắt	Tên thông thường
Thi	β -(2-thienyl)alanin
Cpa	β -(4-clophenyl)alanin
Fpa	β -(4-flophenyl)alanin
Hyp	4-Hydroxyprolin

Chữ viết tắt	Tên thông thường
Thz	Axit 1,3-thiazolidin-4-carboxylic, thioprolin
Abu	Axit 2-aminobutyric
Agm	Agmatin, (4-aminobutyl)guanidin
Phe(4-Me)	β -(4-metylphenyl)alanin
Phe(4-Et)	β -(4-etylphenyl)alanin

Các hợp chất

Hợp chất của sáng chế có công thức I:



và muối được dụng của nó, trong đó:

R^2 là H, C_1 - C_4 alkyl, halogen, $-OH$ hoặc $-O-C_1$ - C_4 alkyl;

R^3 là H hoặc $-CH_2-OH$ hoặc $-C(O)-NR^5R^6$;

R^4 là H hoặc $-C(=NH)-NH_2$;

R^5 và R^6 độc lập là H, C_1 - C_6 alkyl, $-CH_2$ -xyclopropyl, -xyclopropyl hoặc arylalkyl với điều kiện R^5 và R^6 không cùng là H;

X và Y độc lập là $-CH_2-$ hoặc S với điều kiện nếu X là $-CH_2-$, Y không phải là $-CH_2-$;

Z là $-\text{CHR}^7-$ hoặc S và R^7 là H hoặc $\text{C}_1\text{-C}_4$ alkyl, halogen, $-\text{OH}$ hoặc $-\text{O}-\text{C}_1\text{-C}_4$ alkyl;

R^8 là H hoặc $-\text{CH}_3$;

Ar là heteroaryl hoặc phenyl tùy ý được thế bằng một $\text{C}_1\text{-C}_4$ alkyl, halogen, $-\text{OH}$ hoặc $-\text{O}-\text{C}_1\text{-C}_4$ alkyl.

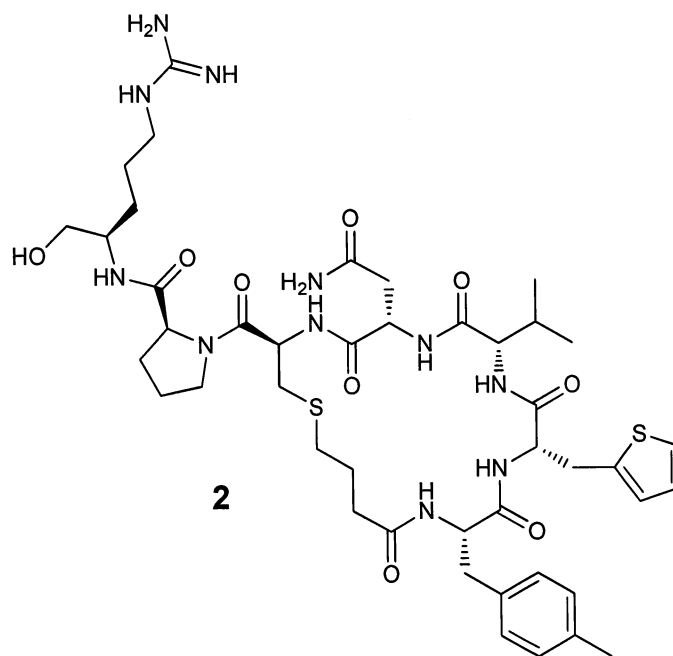
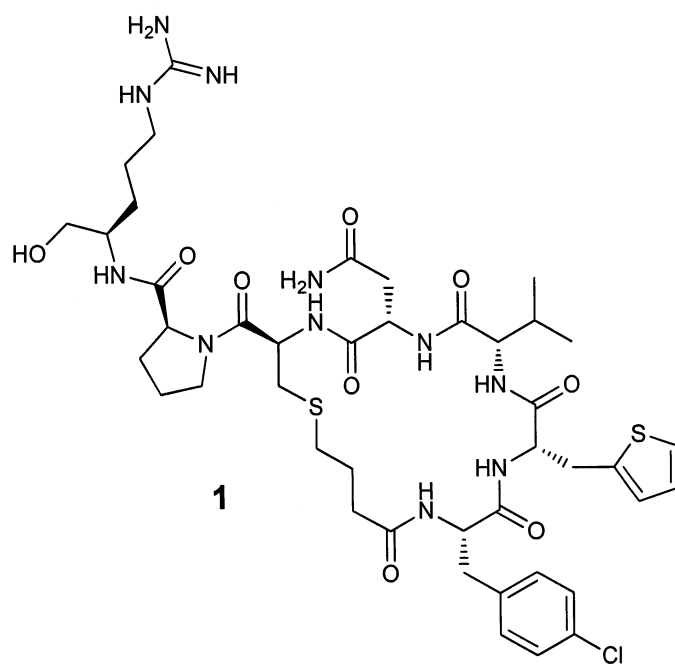
Bảng 1. Các hợp chất ví dụ của sáng chế

SEQ ID	R^2	R^3 và cấu hình	R^4	Ar	X	Y	Z
1	Cl	CH_2OH (R)	$\text{C}(=\text{NH})\text{-NH}_2$	2-thienyl	CH_2	S	CH_2
2	Me	CH_2OH (R)	$\text{C}(=\text{NH})\text{-NH}_2$	2-thienyl	CH_2	S	CH_2
3	Cl	$\text{C}(=\text{O})\text{-NHEt}$ (R)	$\text{C}(=\text{NH})\text{-NH}_2$	2-thienyl	CH_2	S	CH_2
4	Cl	$\text{C}(=\text{O})\text{-NHPr}$ (R)	$\text{C}(=\text{NH})\text{-NH}_2$	2-thienyl	CH_2	S	CH_2
5	Cl	$\text{C}(=\text{O})\text{-NH}i\text{Bu}$ (R)	$\text{C}(=\text{NH})\text{-NH}_2$	2-thienyl	CH_2	S	CH_2
6	OH	CH_2OH (R)	$\text{C}(=\text{NH})\text{-NH}_2$	2-thienyl	CH_2	S	CH_2
7	Cl	H	$\text{C}(=\text{NH})\text{-NH}_2$	4-flophenyl	CH_2	S	CH_2
8	OH	H	$\text{C}(=\text{NH})\text{-NH}_2$	4-flophenyl	CH_2	S	CH_2
9	OH	H	H	2-thienyl	CH_2	S	CH_2
10	Cl	H	$\text{C}(=\text{NH})\text{-NH}_2$	2-thienyl	CH_2	S	CH_2
11	Cl	$\text{C}(=\text{O})\text{-NH}c\text{Pr}$ (R)	$\text{C}(=\text{NH})\text{-NH}_2$	2-thienyl	CH_2	S	CH_2

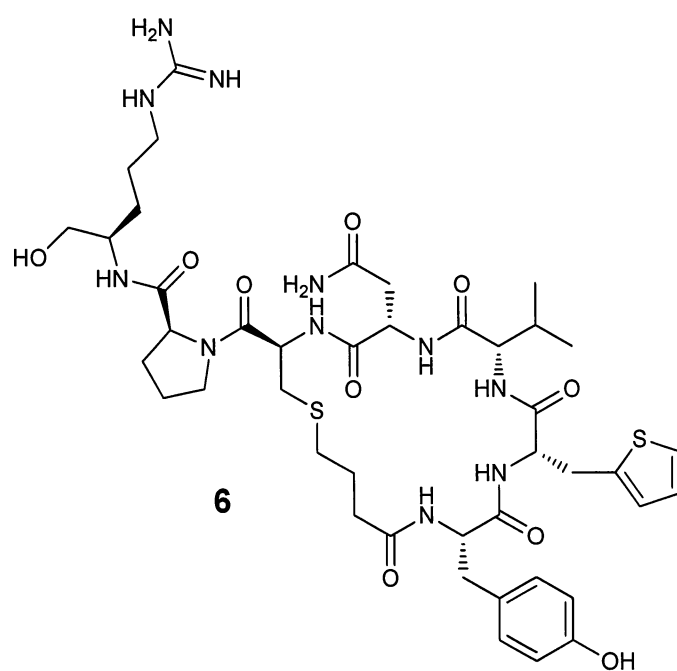
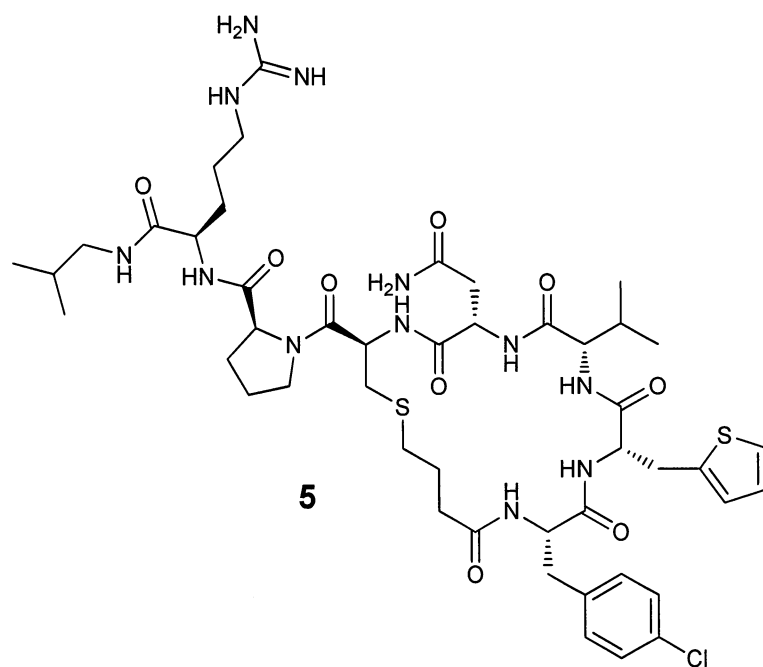
12	Cl	C(=O)-NH-CH ₂ - <i>c</i> Pr (R)	C(=NH)-NH ₂	2-thienyl	CH ₂	S	CH ₂
13	Cl	C(=O)-NHBzl (R)	C(=NH)-NH ₂	2-thienyl	CH ₂	S	CH ₂
14	Cl	C(=O)-NHBu (R)	C(=NH)-NH ₂	2-thienyl	CH ₂	S	CH ₂
15	Cl	C(=O)-NH <i>i</i> Pr (R)	C(=NH)-NH ₂	2-thienyl	CH ₂	S	CH ₂
16	Cl	C(=O)-NH <i>i</i> Bu (R)	C(=NH)-NH ₂	2-thienyl	CH ₂	S	CH(OH)
17	Et	CH ₂ OH (S)	C(=NH)-NH ₂	2-thienyl	CH ₂	S	CH ₂
18	Cl	C(=O)-NH <i>i</i> Bu (R)	C(=NH)-NH ₂	2-thienyl	S	CH ₂	CH ₂
19	Cl	C(=O)-NH <i>i</i> Bu (S)	C(=NH)-NH ₂	2-thienyl	CH ₂	S	CH ₂
20	Cl	C(=O)-NHMe (R)	C(=NH)-NH ₂	2-thienyl	CH ₂	S	CH ₂
21	Cl	C(=O)-NEt ₂ (R)	C(=NH)-NH ₂	2-thienyl	CH ₂	S	CH ₂
22	Cl	CH ₂ OH (S)	C(=NH)-NH ₂	2-thienyl	CH ₂	S	CH ₂
23	OH	CH ₂ OH (S)	C(=NH)-NH ₂	2-thienyl	CH ₂	S	CH ₂
24	Cl	CH ₂ OH (R)	C(=NH)-NH ₂	4-flophenyl	CH ₂	S	CH ₂
25	Cl	CH ₂ OH (R)	C(=NH)-NH ₂	2-thienyl	S	CH ₂	CH ₂
26	Cl	C(=O)-NH <i>i</i> Bu (R)	C(=NH)-NH ₂	phenyl	S	CH ₂	CH ₂

27	Cl	C(=O)-NH <i>i</i> Bu (R)	C(=NH)-NH ₂	2-thienyl	S	CH ₂	CH(OH)
28	Cl	C(=O)-NHEt (R)	C(=NH)-NH ₂	2-thienyl	S	S	CH ₂
29	Cl	C(=O)-NHEt (R)	C(=NH)-NH ₂	phenyl	S	S	CH ₂
30	Cl	C(=O)-NHEt (R)	C(=NH)-NH ₂	2-thienyl	S	CH ₂	CH ₂
31	Cl	C(=O)-NHEt (R)	C(=NH)-NH ₂	2-thienyl	S	CH ₂	CH(OH)
32	Cl	C(=O)-NHEt (R)	C(=NH)-NH ₂	phenyl	CH ₂	S	CH(OH)
33	Cl	C(=O)-NHEt (R)	C(=NH)-NH ₂	2-thienyl	CH ₂	S	S
34	Cl	C(=O)-NHEt (R)	C(=NH)-NH ₂	2-thienyl	S	CH ₂	S
35	Cl	C(=O)-NHPr (R)	C(=NH)-NH ₂	2-thienyl	CH ₂	S	S
36	Cl	C(=O)-NH-CH ₂ -2-thienyl (R)	C(=NH)-NH ₂	2-thienyl	CH ₂	S	S
37	Cl	C(=O)-NH-CH ₂ -2-thienyl (R)	C(=NH)-NH ₂	4-flophenyl	CH ₂	S	S
38	OH	C(=O)-NHBzl (R)	C(=NH)-NH ₂	2-thienyl	CH ₂	S	CH ₂
39	Cl	C(=O)-NHBzl (R)	C(=NH)-NH ₂	2-thienyl	CH ₂	S	S
40	Cl	H	C(=NH)-NH ₂	2-thienyl	CH ₂	S	S
41	Cl	H	C(=NH)-NH ₂	4-flophenyl	CH ₂	S	S

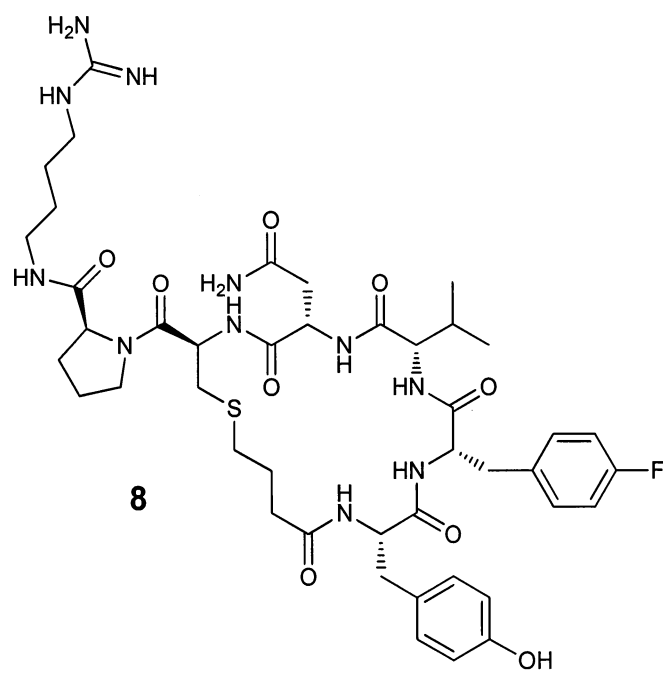
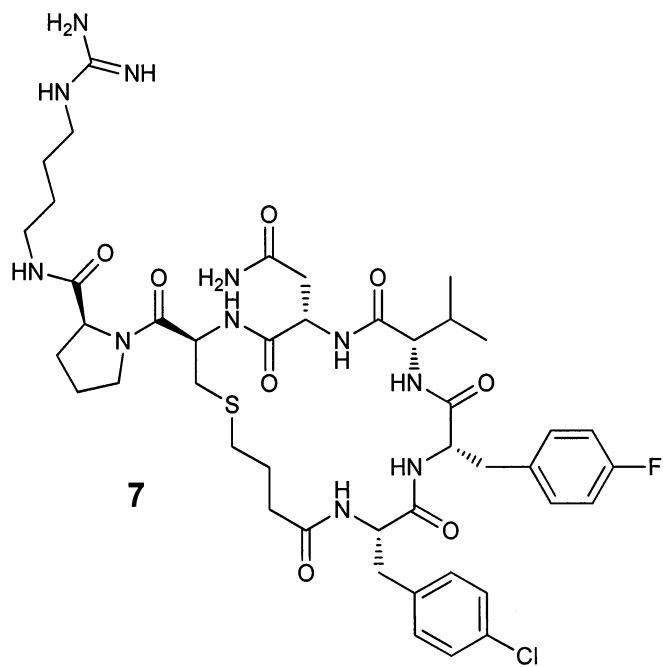
Cấu trúc của các hợp chất từ 1 đến 41 (SEQ ID 1-41):



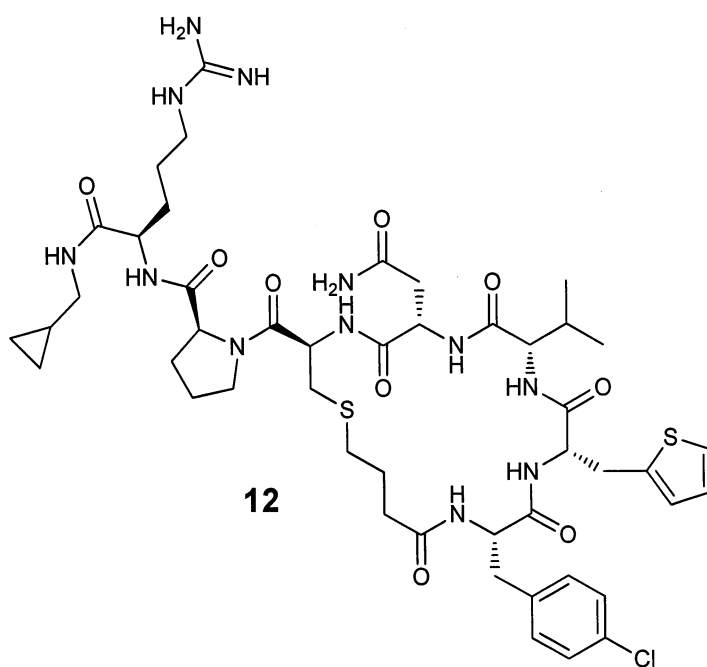
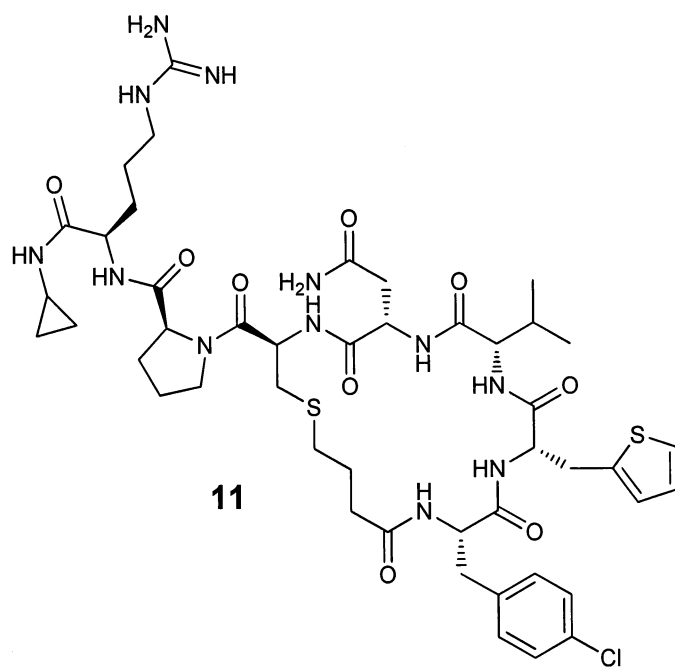


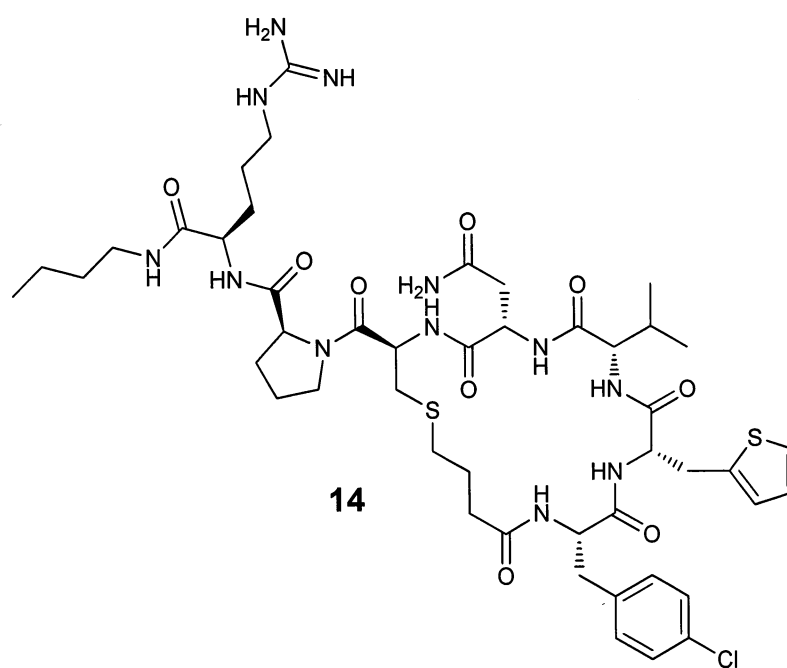
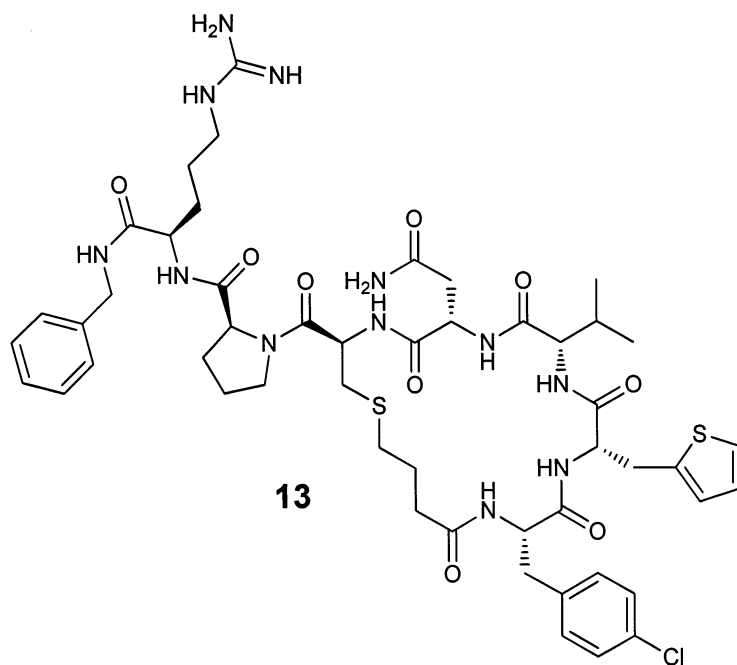


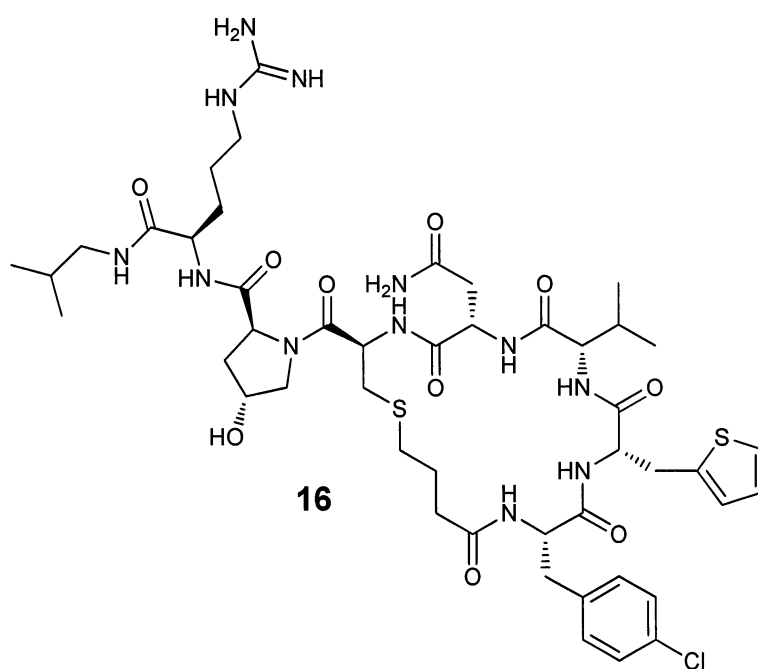
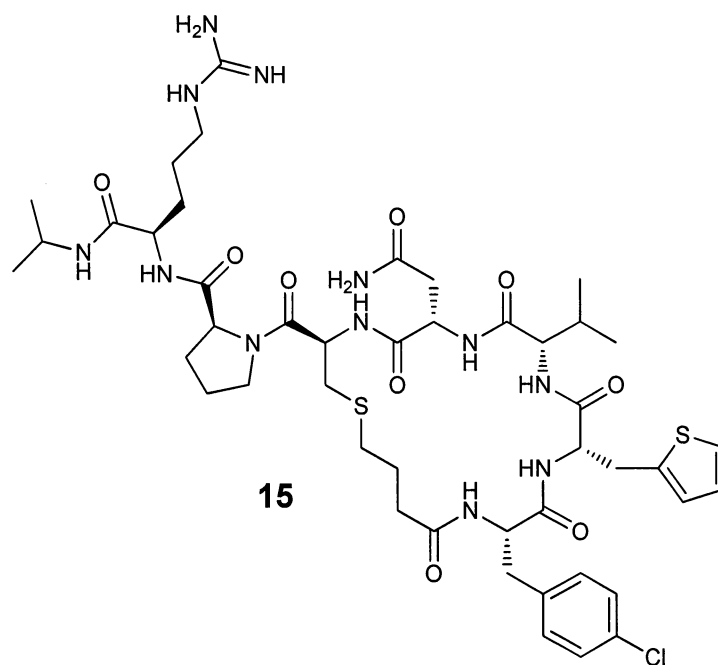
27474















27474

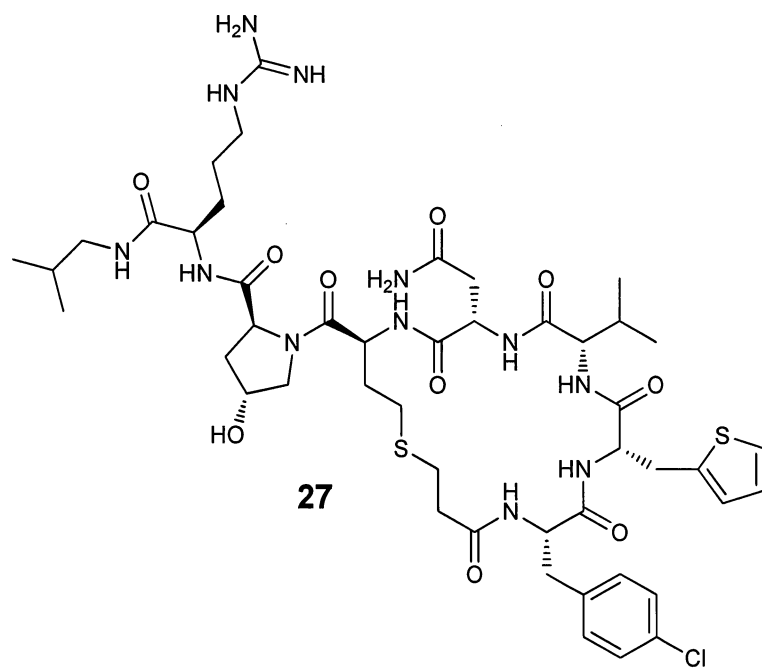


27474

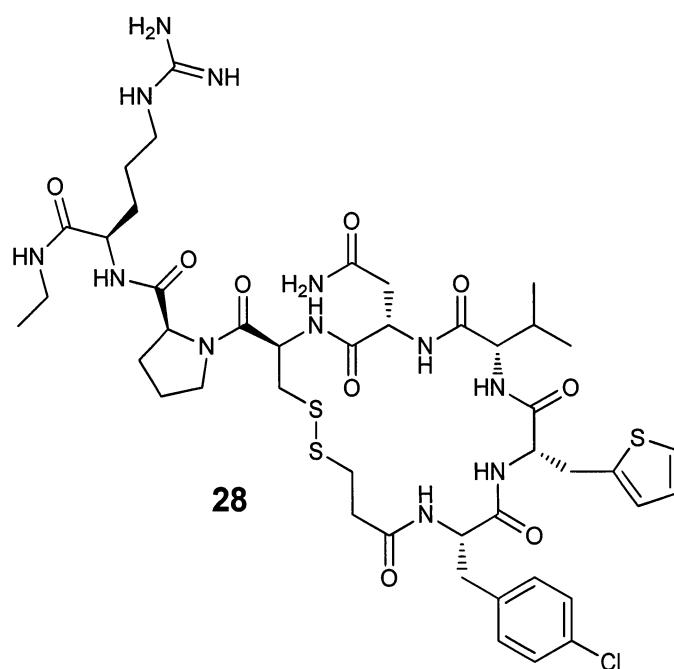


27474

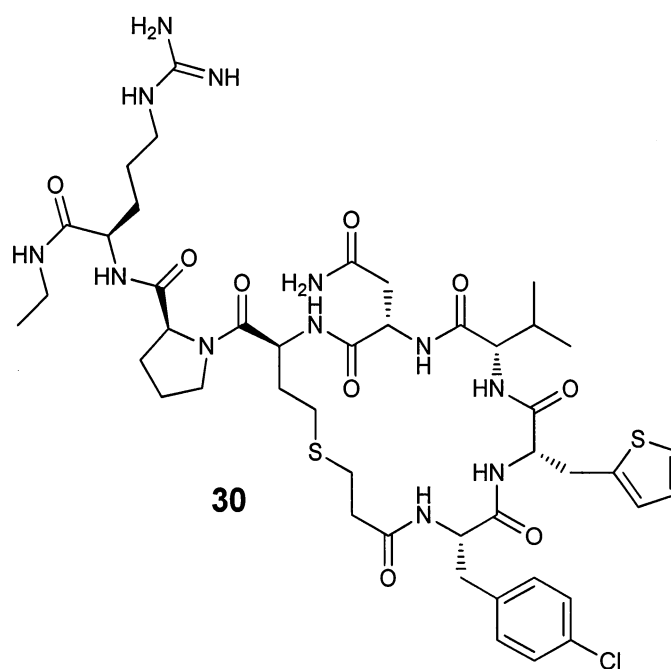
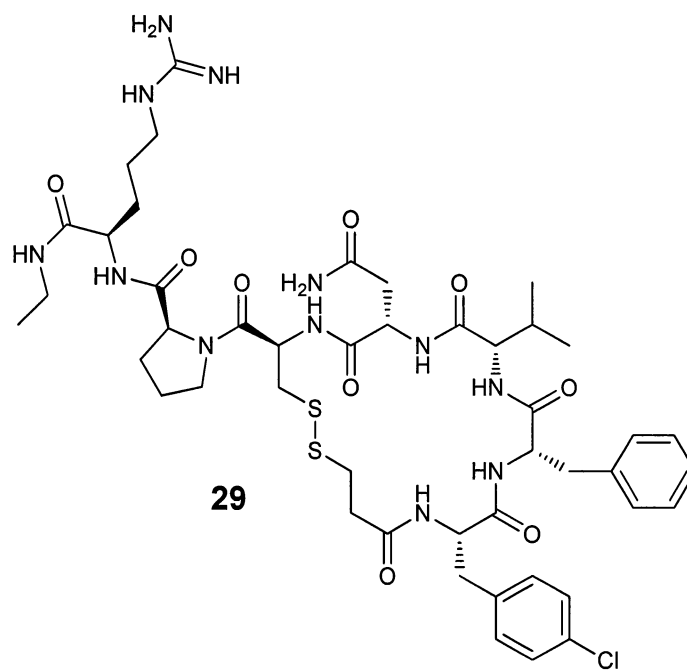


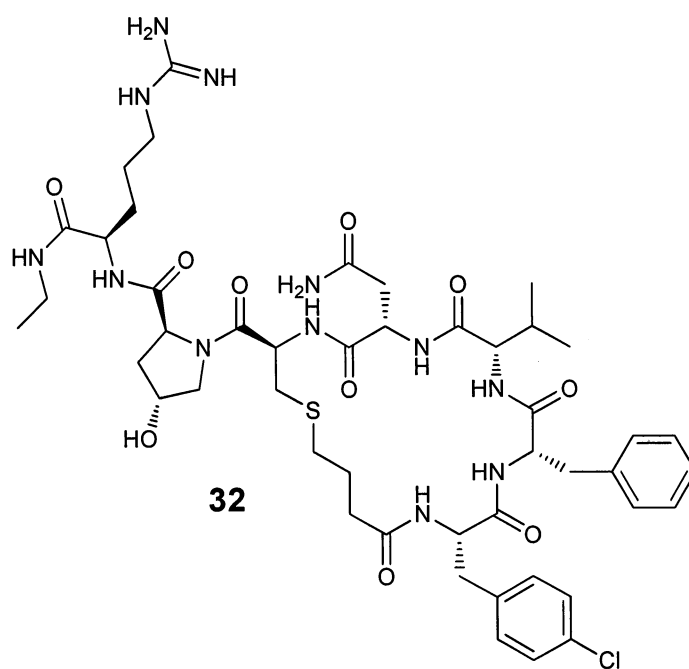
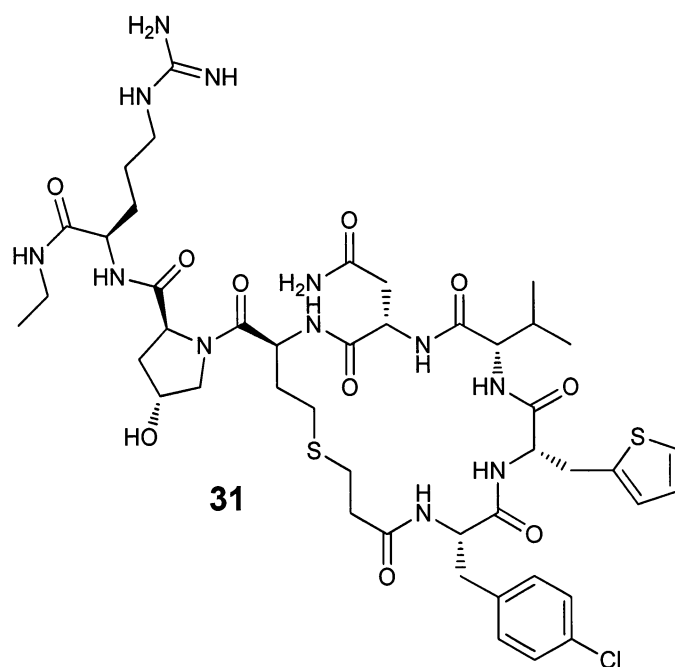


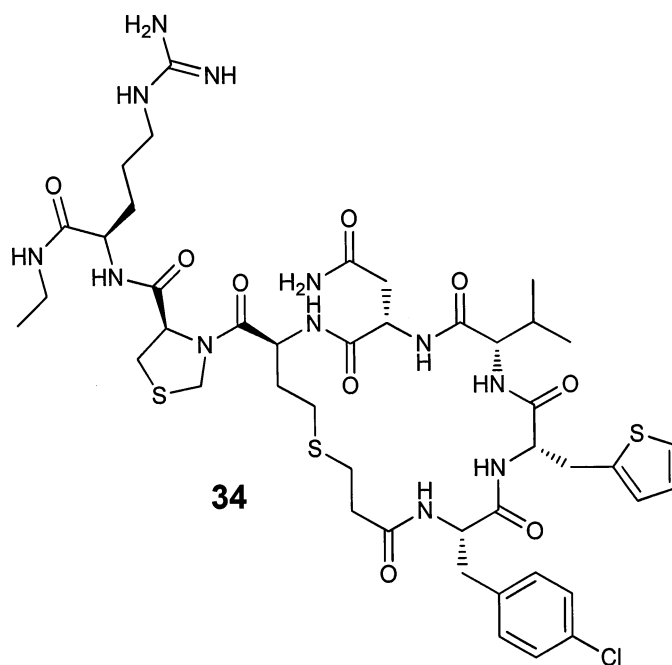
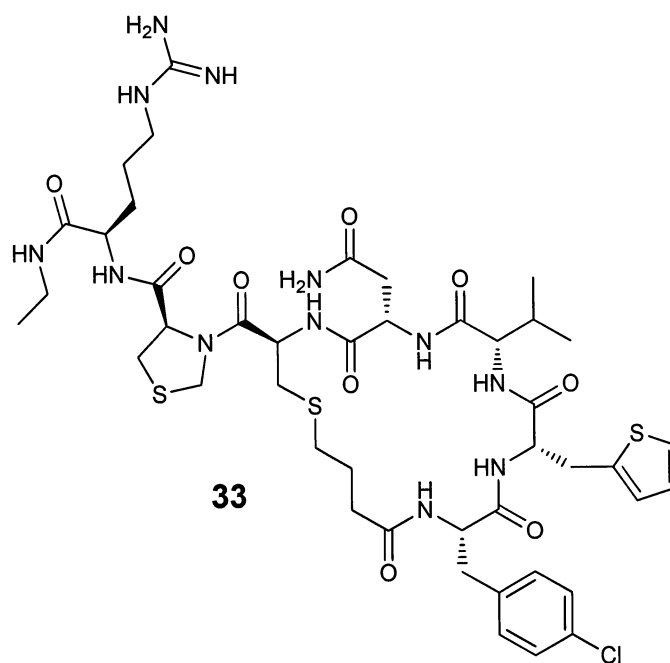
27



28

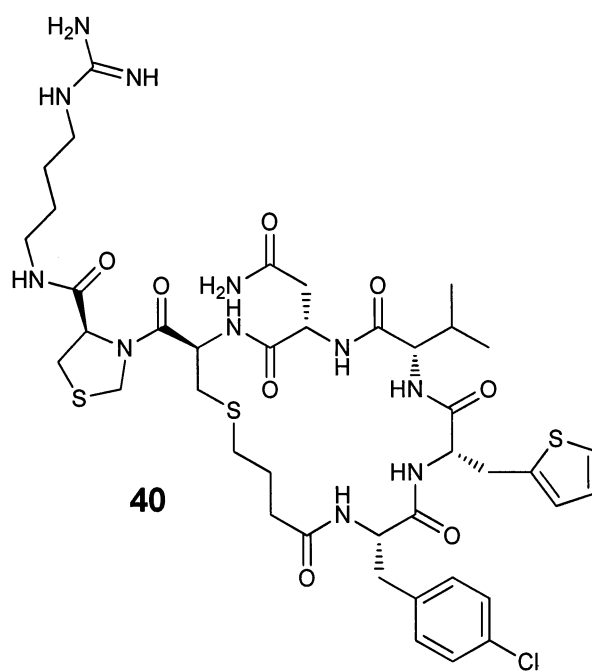
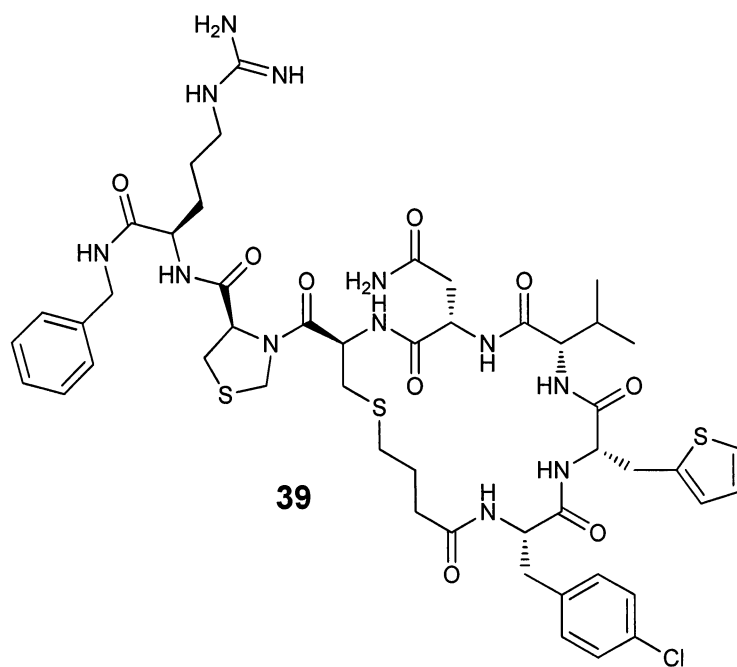


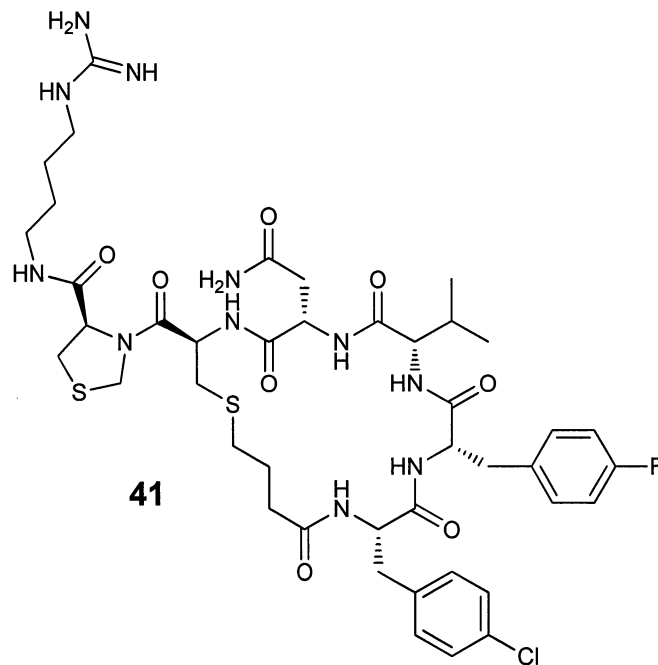












Bảng 2: Các đặc tính vật lý của các hợp chất từ 1 đến 41 (SEQ ID 1-41)

SEQ ID	M+H (tính toán)	M+H (quan sát)	Độ tinh khiết HPLC
1	976,4	976,4	99,3
2	956,5	956,4	98,3
3	1017,4	1017,4	100,0
4	1031,4	1031,5	100,0
5	1045,5	1045,5	100,0
6	958,4	958,5	100,0
7	958,4	958,5	95,8
8	940,5	940,5	99,6
9	886,4	886,4	99,6
10	946,4	946,7	99,1
11	1029,4	1029,4	100,0
12	1043,4	1043,4	100,0
13	1079,4	1079,5	100,0
14	1045,5	1045,8	97,3

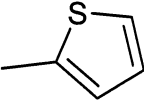
15	1031,4	1031,5	100,0
16	1061,5	1061,5	100,0
17	970,5	970,4	100,0
18	1045,5	1045,4	100,0
19	1045,5	1045,5	100,0
20	1003,5	1003,4	100,0
21	1045,5	1045,5	99,2
22	976,4	976,5	98,2
23	948,4	958,5	96,6
24	988,4	988,5	99,3
25	976,4	976,5	100,0
26	1039,5	1039,5	100,0
27	1061,5	1061,5	99,8
28	1035,4	1035,4	97,4
29	1029,4	1029,5	99,3
30	1017,4	107,5	99,5
31	1033,4	1033,5	99,2
32	1027,5	1027,5	99,2
33	1035,4	1035,5	100,0
34	1035,4	1035,5	100,0
35	1049,4	1049,7	99,3
36	1103,4	1103,7	100,0
37	1115,4	1115,7	99,2
38	1061,5	1061,7	98,3
39	1097,4	1097,7	96,8
40	964,3	964,6	99,6
41	976,4	976,7	100,0

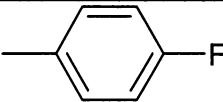
Bảng 3: Dữ liệu thử nghiệm In vitro đối với các hợp chất từ 1 đến 41

SEQ ID	EC50 hV2-R	%hiệu quả hV2-R	EC50 hV1b-R	% hiệu quả hV1b-R
1	0,10	102	140,91	42
2	0,39	104	806,52	27
3	0,29	92	171,74	62
4	0,33	92	249,07	49
5	0,22	100	213,51	50
6	0,08	93	57,58	56
7	0,31	89	142,28	39
8	0,10	91	175,57	62
9	0,19	94	>10000	60
10	0,07	104	104,64	42
11	0,23	86	480,08	36
12	0,21	90	321,63	43
13	0,19	100	149,75	37
14	0,26	98	187,54	36
15	0,45	81	576,96	33
16	0,23	87	480,92	26
17	0,35	110	>10000	34
18	0,22	103	>10000	29
19	0,29	98	>10000	19
20	0,27	106	351,12	37
21	0,25	102	535,72	21
22	0,14	96	382,84	44
23	0,10	92	518,47	53
24	0,35	102	223,19	45
25	0,08	115	64,30	38

26	0,27	101	45,79	33
27	0,20	100	132,93	24
28	0,32	103	>10000	20
29	0,38	103	>10000	16
30	0,19	114	123,00	33
31	0,10	92	258,02	25
32	0,29	98	150,43	21
33	0,10	103	159,76	32
34	0,11	93	40,21	34
35	0,21	111	122,05	43
36	0,17	108	95,56	53
37	0,30	102	100,61	46
38	0,26	111	150,12	48
39	0,31	111	328,73	72
40	0,12	106	140,67	50
41	0,22	108	114,44	42
42 (dDAVP)	0,22	100	6,59	100
43([Val4]dDAVP)	0,05	89	24,13	98
44 (AVP)	0,04		5,4	

Bảng 4: Danh pháp then chốt đối với axit amin

Axit amin	Vị trí	Tên danh pháp
Cpa	2	$R^2=Cl$
Fpa	2	$R^2=F$
Phe(4-Me)	2	$R^2= -CH_3$
Phe(4-Et)	2	$R^2= -CH_2-CH_3$
Thi	3	Ar = 

Axit amin	Vị trí	Tên danh pháp
Fpa	3	Ar = 
Val	4	R ⁸ = -CH ₃
Abu	4	R ⁸ = -H
Hyp	7	Z = -CH-OH
Thz	7	Z = S
Agm	8	R ³ = H và R ⁴ = -C(=NH)-NH ₂

Ví dụ thực hiện sáng chế

Quy trình tổng hợp chung

Các dẫn xuất axit amin mua được từ nhà cung cấp thương mại (Aapptec, EMD Millipore and Peptides International). Nhựa được mua từ nhà cung cấp thương mại (PCAS BioMatrix Inc. và EMD Millipore). Tất cả các thuốc thử bổ sung, chất hoá học và dung môi là được mua từ Sigma-Aldrich và VWR.

Các hợp chất được mô tả trong bản mô tả này được tổng hợp theo các phương pháp tiêu chuẩn trong ngành hoá học peptit pha rắn bằng cách sử dụng hệ phương pháp Fmoc. Các peptit được lắp ráp bằng thủ công, theo cách tự động bằng cách sử dụng Tribute Peptide Synthesizer (Protein Technologies Inc., Tucson, Arizona) hoặc bằng tổ hợp của quy trình tổng hợp thủ công và tự động.

HPLC điều chế được thực hiện trên hệ Waters Prep LC bằng cách sử dụng hộp PrepPack Delta-Pack C18, 300Å, 15µm, 47 x 300mm ở tốc độ dòng 100mL/phút và/hoặc trên cột Phenomenex Luna C18, 100Å, 5µm, 30 x 100mm ở tốc độ dòng 40mL/phút. HPLC pha ngược phân tích được thực hiện trên sắc ký lỏng Agilent Technologies 1200rr Series bằng cách sử dụng cột Agilent Zorbax C18, 1,8µm, 4,6 x 110mm ở tốc độ dòng 1,5mL/phút. Phép phân tích hợp chất cuối cùng được thực hiện trên sắc ký Agilent Technologies 1200 Series bằng HPLC pha ngược trên cột Phenomenex Gemini 110Å C18, 3µm, 2 x 150mm ở tốc độ dòng 0,3mL/phút. Quang

phổ khối được ghi chép trên quang phổ kế khối lượng tia điện MAT Finningan LCQ. Trừ khi có quy định khác, tất cả các phản ứng được thực hiện ở nhiệt độ trong phòng. Tài liệu chuyên ngành tham khảo tiêu chuẩn sau đây còn cung cấp chỉ dẫn đối với việc thiết lập thử nghiệm thông thường, cũng như đối với tính sẵn có của vật liệu khởi đầu và thuốc thử đòi hỏi: Kates, S.A., Albericio, F., Eds., *Solid Phase Synthesis: A Practical Guide*, Marcel Dekker, New York, Basel, 2000; Greene, T.W., Wuts, P.G.M., *Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley Sons Inc., 2nd Edition, 1991; Stewart, J.M., Young, J.D., *Solid Phase Synthesis*, Pierce Chemical Company, 1984; Bisello, et al., *J. Biol. Chem.* 1998, 273, 22498-22505; Merrifield, J. *Am. Chem. Soc.* 1963, 85, 2149-2154; và Chang and White P.D., *'Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: a Practical Approach'*, Oxford University Press, Oxford, 2000.

Các nhóm bảo vệ sau đây được sử dụng để bảo vệ nhóm chức chuỗi phụ axit amin đã nêu: Pbf (2,2,4,6,7-pentametyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl) đối với Arg; tBu (t-butyl) đối với Tyr và Trt (trityl) đối với Cys, Gln và Asn.

Việc ghép cặp các axit amin được bảo vệ Fmoc trên bộ tổng hợp Tribute được qua trung gian với HBTU/NMM trong DMF ngoại trừ đối với các dẫn xuất cystein mà được ghép cặp với DIC/HOBt trong DMF. Các chu kỳ đơn lẻ từ 30 đến 60 phút với lượng dư gấp 5 lần axit amin được bảo vệ Fmoc hoạt hoá được sử dụng trong quá trình tổng hợp. Việc loại bỏ nhóm bảo vệ Fmoc được kiểm tra bằng tia cực tím. Nhiều lần rửa hai phút (đến 10 lần, nếu cần) của nhựa peptit bằng 20% piperidin trong DMF là được thực hiện.

Việc ghép cặp qua trung gian DIC/HOBt trong DMF được dùng đối với tất cả các axit amin theo cách thủ công. Các chu kỳ đơn lẻ ít nhất 2 giờ với lượng dư gấp 3 lần của axit amin được bảo vệ Fmoc hoạt hoá được sử dụng trong quá trình tổng hợp. Việc hoàn thiện việc ghép cặp được đánh giá bằng thử nghiệm ninhydrin (Kaiser). Việc loại bỏ nhóm bảo vệ Fmoc đạt được bằng một lần rửa 30 phút của nhựa peptit bằng 20% piperidin trong DMF.

Khi hoàn thiện tổng hợp peptit, nhựa peptit được rửa bằng DCM và làm khô trong chân không. Nhựa được xử lý bằng TFA/H₂O/TIS 96:2:2 (thể tích) trong 2 giờ để loại

bỏ các nhóm bảo vệ chuỗi phụ với việc tách tiếp theo của peptit ra khỏi nhựa. Lọc peptit, tạo kết tủa bằng diethyl ete và gạn. Để thu được peptit với cầu disulfua, chất kết tủa được hoà tan trong TFA nguyên chất và tiếp theo rót dung dịch vào trong 10% axetonitril trong nước. Trong một số trường hợp, lượng bổ sung của axetonitril được bổ sung vào để làm hoà tan nền. Peptit mạch thẳng được oxy hoá bằng 0,1M $I_2/MeOH$. Dung dịch oxy hoá được thêm nhỏ giọt vào cho đến khi màu vàng không đổi. Lượng dư iodua được giảm bằng axit ascorbic dạng rắn. Sau đó, điều chỉnh độ pH đến khoảng 4 bằng amoniac đậm đặc. Nạp dung dịch thu được một cách trực tiếp vào cột HPLC prep và tách rửa bằng gradient thành phần B (xem bảng dưới đây).

Để đóng vòng peptit qua sự hình thành liên kết amit, peptit mạch thẳng thô được hoà tan trong DMF và dung dịch chứa HBTU trong DMF cũng được tạo ra. Dung dịch peptit và dung dịch chất hoạt hoá được bổ sung theo cách hoán đổi vào thể tích DIPEA chứa DMF khuấy mạnh. Độ pH được duy trì ở từ 9 đến 10 bằng việc thêm DIPEA nguyên chất. Kiểm tra phản ứng bằng HPLC và thường không có đỉnh nền nào được phát hiện sau khi các phản chất hoạt hoá cuối cùng và dung dịch peptit đã được bổ sung. Pha loãng hỗn hợp phản ứng bằng 0,1% AcOH và nạp dung dịch thu được một cách trực tiếp vào cột HPLC prep và tách rửa bằng gradient của thành phần B.

Mỗi peptit thô được tinh chế bằng hệ đệm T. Các phân đoạn có độ tinh khiết vượt quá 93%, được xác định bằng HPLC phân tích pha ngược, được nhóm và nạp lại vào cột và tách rửa bằng chất đệm T để thu được muối trifloaxetat. Trong một số trường hợp, việc tinh chế bổ sung với hệ đệm C là được thực hiện. Để thu được muối axetat, các phân đoạn từ các lần chạy với chất đệm T hoặc C được nạp lại vào cột và rửa cột bằng 5 thể tích 0,1M amoni axetat. Tách rửa sản phẩm cuối cùng bằng chất đệm A. Các phân đoạn được nhóm và làm đông khô.

Bảng. Chế phẩm chất đệm

Chất đệm	Thành phần A	Thành phần B
C	0,25M Triethylamoni Perchlorat, độ pH=2,3	60% axetonitril, 40% thành phần A
T	0,1% axit trifloaxetic (TFA)	60% axetonitril, 0,1% TFA

Chất đệm	Thành phần A	Thành phần B
A	2% axit axetic (AcOH)	60% axetonitril, 2% AcOH

Các hợp chất được tạo ra thường được tìm thấy có độ tinh khiết ít nhất khoảng 95%.

Ví dụ 1 – SEQ ID:21

Lắp ráp các mảnh từ 1 đến 7 theo cách thủ công bắt đầu từ 7,8g (6,9mmol) nhựa H-Pro-2-clotrityl AM (EMD Millipore, loại số 856057, 0,88mmol/g). Việc ghép cặp qua trung gian DIC/HOBt trong DMF là được dùng. Các chu kỳ đơn lẻ ít nhất 2 giờ với lượng dư gấp 3 lần axit amin được bảo vệ Fmoc hoạt hoá được sử dụng trong quá trình tổng hợp. Việc hoàn thiện ghép cặp được đánh giá bằng thử nghiệm ninhydrin. Việc loại bỏ nhóm bảo vệ Fmoc đạt được với một lần rửa 30 phút của nhựa peptit bằng 20% piperidin trong DMF. Các dẫn xuất axit amin sau đây được sử dụng để lắp ráp các gốc từ 1 đến 7 của peptit gắn kết nhựa: Fmoc-Cys((CH₂)₃C(O)OtBu)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Thi-OH và Boc-Cpa-OH. Sau khi mảnh peptit từ 1 đến 7 được lắp ráp, rửa kỹ nhựa bằng DCM và xử lý bằng cốc tai DCM/HFIP 7:3 (thể tích) (2 x 1 giờ, mỗi lần 30mL). Sau đó, làm bay hơi dung môi và kết tủa phần còn lại bằng ethyl ete, lọc và làm khô trong chân không. Thu được 5,79g (4,63mmol, 67%) peptit mạch thẳng được bảo vệ thô. (Phần còn lại của sản phẩm này được sử dụng trong quá trình tổng hợp các hợp chất khác như được mô tả trong bản mô tả này.)

H-D-Arg-NEt₂ x 2TFA. Hoà tan 2,81g (5,4mmol) Boc-D-Arg(Pbf)-OH (Chem Impex, loại số 05282), 1,95mL (11,2mmol) DIPEA và 2,13g (5,6mmol) HBTU trong 10mL DMF. Tiếp theo, thêm 0,62mL (6mmol) diethylamin vào dung dịch. Không có chất nền nào được phát hiện bằng HPLC phân tích sau 5 phút. Rót hỗn hợp phản ứng vào trong 500mL nước và tách chất kết tủa bằng việc ly tâm và làm khô trong chân không. Xử lý phần còn lại bằng 20mL TFA/TIS/H₂O (96/2/2, thể tích) trong 1 giờ và làm bay hơi dung môi. Xử lý phần còn lại bằng ethyl ete và gạn. Thu được 1,65g (3,6mmol, 67%) dẫn xuất bán rắn mà được sử dụng trong bước tiếp theo mà không cần phải tinh chế thêm.

Ghép cặp với H-D-Arg-NEt₂. Hoà tan 2,3g (khoảng 1,86mmol) peptit mạch thẳng được bảo vệ và 0,76g (2mmol) HBTU trong 10mL DMF chứa 0,73mL (4,2mmol) DIPEA. Tiếp theo, thêm 0,93g (2,05mmol) H-D-Arg(Pbf)-OH x 2TFA trong 1mL DMF vào hỗn hợp phản ứng. Không có chất nền nào được phát hiện sau 5 phút bởi HPLC. Làm kết tinh sản phẩm bằng 1L nước, lọc bỏ và làm khô trong chân không. Thu được 2,6g (1,78mmol, 96%) peptit mạch thẳng được bảo vệ thô. Xử lý peptit được bảo vệ một cách đầy đủ bằng 20mL TFA/TIS/H₂O (96/2/2, thể tích) trong 1 giờ và làm bay hơi dung môi. Peptit mạch thẳng không được bảo vệ được tạo kết tủa bằng etyl ete và làm khô lạnh. Hiệu suất 1,82g (1,55mmol, 83%).

Hoà tan toàn bộ lượng peptit mạch thẳng trong 50mL DMF. Dung dịch chứa 0,59g (khoảng 1,55mmol) HBTU trong 10mL DMF cũng được tạo ra. Thêm dung dịch peptit và dung dịch chất hoạt hoá theo cách thay thế cho nhau vào 50mL DMF được khuấy mạnh chứa 200μL DIPEA theo 10 phần lần lượt chứa 5mL và 1mL. Duy trì độ pH ở từ 9 đến 10 bằng việc thêm DIPEA nguyên chất. Không có đỉnh chất nền nào được phát hiện bởi HPLC sau khi các phần cuối cùng chứa chất hoạt hoá và dung dịch peptit được bổ sung vào. Pha loãng hỗn hợp phản ứng bằng 0,1% AcOH đến 1L. Nạp một cách trực tiếp dung dịch thu được vào cột HPLC prep và tinh chế bằng hệ chất đệm T tách rửa bằng gradient thành phần B (xem bảng trên đây). Các phân đoạn có độ tinh khiết vượt quá 93%, được xác định bằng HPLC phân tích pha ngược, nhóm và nạp lại vào cột. Rửa cột bằng 5 thể tích của 0,1M AcONH₄ và tiếp theo tách rửa hợp chất bằng chất đệm C để thu được muối axetat. Nhóm các phân đoạn và làm khô lạnh. Thu được 703,1mg (0,60mmol, 22% tổng thể dựa trên 89,6% hàm lượng peptit) của bột peptit màu trắng. Xác định độ tinh khiết của sản phẩm bằng HPLC phân tích là 99,7% và M+H được quan sát bằng 1045,6 (tính toán M+H = 1045,5).

Ví dụ 2 – SEQ ID NO:10

Hoà tan 2,32g (khoảng 1,8mmol) peptit mạch thẳng được bảo vệ được tạo ra khi tổng hợp SEQ ID NO: 21 trong 7mL DMF và thêm 0,63mL (3,6mmol, 2 đương lượng) NMM vào tiếp theo thêm 0,76g (2mmol, 1,1 đương lượng) HBTU vào. Trong bình nhỏ riêng biệt, tạo huyền phù 0,64g (2,8mmol, 1,5 đương lượng) agmatin sulfat trong 7mL DMF chứa 0,49mL (2,8mmol) DIPEA. Thêm N,O-Bis(trimetylsilyl)axetamit (BTA,

Sigma-Aldrich, cat # 128910) vào huyền phù được tạo lốc xoáy/nhấp nháy theo cách không thường xuyên. Thu được dung dịch sạch sau khi 4 đương lượng BTA được bổ sung vào huyền phù. Gom hai dung dịch và không có peptit nền nào được phát hiện bằng HPLC sau 5 phút. Tạo kết tủa sản phẩm bằng 1L nước, lọc và làm khô trong chân không. Xử lý bột thu được bằng 50mL cốc tai TFA/TIS/H₂O 96/2/2 (thể tích) trong 1,5 giờ. Làm bay hơi dung dịch và tạo kết tủa peptit mạch thẳng bằng etyl ete, hoàn nguyên trong nước/axetonitril và làm khô lạnh.

Hoà tan toàn bộ lượng peptit (2,13g, khoảng 2mmol) thu được ở bước trên đây trong 50mL DMF. Dung dịch chứa 0,76g (2mmol) HBTU trong 10mL DMF cũng được tạo ra. Thêm dung dịch peptit và dung dịch chất hoạt hoá theo cách thay thế cho nhau vào 50mL DMF được khuấy mạnh chứa 400 μ L DIPEA theo 10 phần lần lượt chứa 2,5mL và 0,5mL. Duy trì độ pH ở từ 9 đến 10 bằng việc thêm DIPEA nguyên chất. Không có đỉnh chất nền nào được phát hiện sau khi các phần cuối cùng chứa chất hoạt hoá hoặc dung dịch peptit được bổ sung vào. Pha loãng hỗn hợp phản ứng bằng 0,1% AcOH đến 1L và nạp một cách trực tiếp dung dịch thu được vào cột HPLC prep và tinh chế bằng hệ chất đệm T tách rửa bằng gradient thành phần B (xem bảng trên đây). Các phân đoạn có độ tinh khiết vượt quá 93%, được xác định bằng HPLC phân tích pha ngược, nhóm và nạp lại vào cột. Rửa cột bằng 5 thể tích của 0,1M AcONH₄ và tiếp theo tách rửa hợp chất bằng chất đệm C để thu được muối axetat. Nhóm các phân đoạn và làm khô lạnh. Thu được 656,7mg (0,62mmol, hiệu suất tổng thể 23% dựa trên 89,5% hàm lượng peptit) bột peptit màu trắng. Xác định độ tinh khiết của sản phẩm bằng HPLC phân tích như 100,0% và M+H được quan sát bằng 946,6 (M+H tính toán bằng 946,4).

Ví dụ 3 – SEQ ID NO:5

Làm phòng 1g (khoảng 1mmol) nhựa FMPB AM (EMD Millipore, cat # 855028) trong 15ml hỗn hợp DCE/TMOF 1:1. Thêm isobutyl amin (1,5mL, 15mmol) vào huyền phù nhựa tiếp theo thêm 3,2g natri triaxetoxymorhydrit dạng rắn vào. Lắc huyền phù qua đêm. Rửa nhựa bằng MeOH, DMF và DCM và tiếp theo axyl hoá bằng Fmoc-D-Arg(Pbf)-OH/DIC (4 đương lượng) trong DCM. Rửa nhựa bằng DMF và được thử nghiệm đối với sự hoàn thành axyl hoá bằng thử nghiệm chloranil (âm tính). Tách nhựa thành ba phần bằng nhau và tiếp tục tổng hợp ở thang 0,33mmol trên máy tổng hợp

Tribute. Việc ghép cặp đơn lẻ qua trung gian với HBTU/NMM trong DMF hoặc với DIC/HOBt (đối với Cys) với lượng dư gấp 5 lần của axit amin được bảo vệ Fmoc là được sử dụng. Loại bỏ nhóm bảo vệ Fmoc bằng vài lần rửa 2 phút liên tiếp bằng 20% piperidin trong DMF. Sử dụng các dẫn xuất axit amin sau đây trong khi tổng hợp tự động: Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Cys(((CH₂)₃C(O)OtBu)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Thi-OH và Boc-Cpa-OH. Sau khi toàn bộ trình tự peptit đã được lắp ráp, tách peptit ra khỏi nhựa bằng 20mL TFA/H₂O/TIS 96:2:2 (thể tích) trong 2 giờ. Hoà tan peptit mạch thẳng trong 40mL DMF chứa 200µL DIPEA. Dung dịch chứa 152mg (khoảng 0,4mmol) HBTU trong 5mL DMF cũng được tạo ra. Thêm dung dịch peptit và dung dịch chất hoạt hoá theo cách thay thế cho nhau vào 40mL DMF khuấy mạnh theo 10 phần lần lượt chứa 4mL và 0,5mL. Duy trì độ pH ở từ 9 đến 10 bằng việc thêm DIPEA nguyên chất. Không có đỉnh chất nền nào được phát hiện bằng HPLC sau khi phần cuối cùng của dung dịch chất hoạt hoá được bổ sung vào. Pha loãng hỗn hợp phản ứng bằng 0,1% AcOH đến 1L. Nạp một cách trực tiếp dung dịch thu được vào cột HPLC prep. Trình chế hợp chất bằng ba lần chạy liên tiếp trong chất đệm T.

Các phân đoạn có độ tinh khiết vượt quá 97% được nhóm và làm khô lạnh. Thu được 49,0mg (0,042mmol, toàn bộ 12%, giả định 90% hàm lượng peptit) của bột peptit màu trắng. Xác định độ tinh khiết của sản phẩm bằng HPLC phân tích như 99,5% và M+H được quan sát bằng 1045,6 (M+H tính toán = 1045,5).

Ví dụ 4 – SEQ ID NO:9

Làm phòng 0,37g (khoảng 0,3mmol) nhựa 1,4-diaminobutan-2-clotrityl (EMD Millipore, cat # 856085) trong 10mL DMF và nhựa được đặt vào bình phản ứng tổng hợp tự động. Việc lắp ráp peptit được thực hiện trên bộ tổng hợp Tribute. Các lần ghép cặp đơn lẻ được qua trung gian với HBTU/NMM trong DMF hoặc với DIC/HOBt (đối với Cys) với lượng dư gấp 5 lần của axit amin được bảo vệ Fmoc là được sử dụng. Nhóm bảo vệ Fmoc được loại bỏ bằng vài lần rửa 2 phút liên tiếp bằng 20% piperidin trong DMF. Các dẫn xuất axit amin sau đây được sử dụng trong khi tổng hợp tự động: Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Cys(((CH₂)₃C(O)OtBu)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Thi-OH và Boc-Tyr(tBu)-OH. Sau khi toàn bộ trình tự peptit được lắp ráp, tách peptit ra khỏi nhựa bằng 30mL HFIP/DCM3:7 (thể tích) trong 2 giờ. Lọc nhựa và làm bay hơi

dung môi. Tạo kết tủa peptit mạch thẳng được bảo vệ bằng etyl ete khan. Gạn chất kết tủa và tạo huyền phù trong 20mL axetonitril. Tiếp theo, thêm 111mg (0,4mmol) Z(2-Cl)-OSu và 0,136mL (0,8mmol) DIPEA vào huyền phù. Sau khi chất nền đã được hoà tan, làm bay hơi dung môi và xử lý phần còn lại bằng 20mL cốc tai TFA/TIS/H₂O 95/2,5/2,5 trong 1,5 giờ. Sau đó, làm bay hơi TFA và tạo kết tủa phần còn lại bằng diethyl ete. Hoà tan peptit mạch thẳng thô trong 100mL DMF chứa 200μL DIPEA. Tiếp theo, thêm dung dịch chứa 120mg (0,31mmol) HBTU trong 5mL DMF vào hỗn hợp phản ứng được khuấy mạnh. Sau 30 phút, pha loãng hỗn hợp phản ứng bằng 1L 0,1% AcOH và nạp dung dịch thu được vào cột prep HPLC. Tách rửa peptit mạch vòng bằng keo sơn (khoảng 3% MeCN/phút) trong hệ chất đệm T. Các phân đoạn có độ tinh khiết vượt quá 97% bằng HPLC phân tích được nhóm và làm khô lạnh. Xử lý phần khô lạnh bằng 5mL cốc tai TMSBr/thioanisol/TFA (1/1/6, thể tích) trong 1 giờ ở 0°C. Làm bay hơi TFA và tạo kết tủa peptit bằng etyl ete. Tinh chế sản phẩm cuối cùng bằng một lần chạy trong chất đệm T.

Các phân đoạn có độ tinh khiết vượt quá 97% được nhóm và làm khô lạnh. Thu được 77,5mg (0,079mmol, toàn bộ 26%, giả định 90% hàm lượng peptit) của bột peptit màu trắng. Xác định độ tinh khiết của sản phẩm bằng HPLC phân tích như 99,6% và M+H quan sát bằng 886,4 (M+H tính toán = 886,4).

Ví dụ 5 – SEQ ID NO:17

Làm phòng 0,43g (khoảng 0,3mmol) nhựa H-Arg(Pbf)-O-2-clotrityl (EMD Millipore, cat # 856067) trong 10mL DMF và nhựa được đặt vào trong bình phản ứng tổng hợp tự động. Việc lắp ráp peptit được thực hiện trên máy tổng hợp Tribute. Các lần ghép cặp đơn lẻ qua trung gian với HBTU/NMM trong DMF hoặc với DIC/HOBt (đối với Cys) với lượng dư gấp 5 lần axit amin được bảo vệ Fmoc là được sử dụng. Loại bỏ nhóm bảo vệ Fmoc bằng vài lần rửa 2 phút liên tiếp bằng 20% piperidin trong DMF. Các dẫn xuất axit amin sau đây được sử dụng trong khi tổng hợp tự động: Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Cys((CH₂)₃C(O)OtBu)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Val-OH và Fmoc-Thi-OH. Sau khi các trình tự có từ 3 đến 8 peptit được lắp ráp, ghép cặp theo cách thủ công Fmoc-Phe(4-Et)-OH bằng cách sử dụng phương pháp DIC/HOBt với lượng dư thuốc thử gấp 2 lần. Sau đó, thay thế nhóm Fmoc bằng nhóm Boc bằng cách xử lý nhựa

bằng 20% PIP/DMF trong 30 phút và axyl hoá nhóm chức amino đầu cuối N bằng Boc_2O trong DMF. Tách peptit mạch thẳng ra khỏi nhựa bằng 30mL HFIP/DCM 3:7 (thể tích) trong 2 giờ. Lọc nhựa và làm bay hơi dung môi. Tạo kết tủa peptit mạch thẳng được bảo vệ bằng etyl ete khan. Gạn chất kết tủa và làm khô trong chân không. Thu được 450mg peptit được bảo vệ thô. Hoà tan toàn bộ lượng peptit (khoảng 0,3mmol) trong 10mL 1,2-dicloetan chứa 0,5mL DMF và 61 μL (0,45mmol) NMM. Làm mát dung dịch đến 0°C trên bề nước đá và thêm 61 μL (0,45mmol) isobutyl cloformat vào. Khuấy theo cách từ tính hỗn hợp phản ứng trong 10 phút ở 0°C. Thêm dung dịch chứa 160mg (4,5mmol) natri bohydrua vào 5mL nước theo một phần. Pha loãng phản ứng bằng 200mL nước và tách sản phẩm bằng việc ly tâm và làm khô trong chân không. Sau đó, xử lý sản phẩm bằng 20mL cốc tai TFA/TIS/ H_2O 95/2,5/2,5 trong 1,5 giờ. Sau đó, làm bay hơi TFA và tạo kết tủa phần còn lại bằng dietyl ete. Hoà tan peptit mạch thẳng thô trong 80mL DMF chứa 200 μL DIPEA. Tiếp theo, thêm dung dịch chứa 61mg (0,15mmol) HBTU trong 5mL DMF vào hỗn hợp phản ứng được khuấy mạnh. Sau 30 phút, pha loãng hỗn hợp phản ứng bằng 1L 0,1% AcOH và nạp dung dịch thu được vào cột prep HPLC. Tinh chế peptit mạch vòng theo hai lần chạy liên tiếp trong chất đệm T.

Các phân đoạn có độ tinh khiết vượt quá 97% được nhóm và làm khô lạnh. Thu được 41,7mg (0,039mmol, toàn bộ 13%, giả định 90% hàm lượng peptit) của bột peptit màu trắng. Xác định độ tinh khiết của sản phẩm bằng HPLC phân tích như 95,1% và M+H quan sát bằng 970,6 (M+H tính toán = 970,5).

Thử nghiệm (thử nghiệm sinh học)

Thử nghiệm thụ thể In vitro

Hoạt tính thụ thể V_2

Hoạt tính chủ vận của các hợp chất đối với thụ thể V_2 của người (h $V_2\text{R}$) được xác định trong thử nghiệm gen thông báo phiên mã bằng cách truyền nhiễm theo cách tạm thời ADN biểu hiện thụ thể h V_2 vào trong tế bào HEK-293 (dòng tế bào thận của phôi người 293) phối hợp với ADN cổng chứa yếu tố thúc đẩy đáp ứng canxi nội bào điều hoà sự biểu hiện của luciferaza đom đóm. Xem ấn phẩm: Boss, V., Talpade, D.J., Murphy, T.J. *J. Biol. Chem.* 1996, May 3; 271(18), 10429-10432 để hướng dẫn hơn nữa

đối với thử nghiệm này. Tế bào được phơi trần với dịch pha loãng theo dãy chứa hợp chất được pha loãng gấp 10 lần mỗi liều trong 5 giờ, tiếp theo làm tan tế bào, xác định hoạt tính luciferaza và xác định hiệu quả của hợp chất và trị số EC_{50} qua sự hồi quy không tuyến tính. Desmopressin (dDAVP) được sử dụng làm đối chứng nội tại trong mỗi thử nghiệm. Các kết quả đối với các hợp chất được thử nghiệm được thể hiện trong bảng 3

Hoạt tính thụ thể V_{1b}

Để xác định tính lựa chọn, các hợp chất được thử nghiệm trong các thử nghiệm gen thông báo phiên mã dựa trên luciferaza biểu hiện thụ thể V_{1b} của người (h $V_{1b}R$). Hoạt tính chủ vận của các hợp chất đối với h $V_{1b}R$ được xác định trong thử nghiệm gen thông báo phiên mã trong dòng tế bào FLP-In™ 293 (HEK-flpin) được truyền nhiễm một cách ổn định để biểu hiện h $V_{1b}R$. Các tế bào này được truyền nhiễm một cách tạm thời với yếu tố đáp ứng NFAT-gen thông báo luciferaza (NFAT-Luc). Tế bào được phơi trần với dịch pha loãng theo dãy chứa hợp chất được pha loãng gấp 10 lần mỗi liều trong 5 giờ, tiếp theo làm tan tế bào, xác định hoạt tính luciferaza và xác định hiệu quả của hợp chất và các trị số EC_{50} qua sự hồi quy không tuyến tính. AVP được sử dụng làm đối chứng nội tại trong mỗi thử nghiệm. Các kết quả đối với các hợp chất thử nghiệm được thể hiện trong bảng 3.

Hệ số thanh thải thận

Desmopressin được thanh thải ra khỏi cơ thể chủ yếu bởi thận (“hệ số thanh thải thận”). Các hợp chất của sáng chế có phạm vi thanh thải ở mức cao qua các cơ chế không phải thận. Các thử nghiệm dược động học được thực hiện ở chuột bị cắt bỏ thận và hoạt động giả bộ. Hệ số thanh thải không phải thận (CL_{nr}) được xác định ở chuột bị cắt bỏ thận và tổng hệ số thanh thải được xác định ở chuột hoạt động giả bộ (CL_{sham}). % hệ số thanh thải không phải thận được tính toán bằng $(CL_{nr}/CL_{sham}) \times 100$.

Đối với các nghiên cứu dược động học, chuột Sprague Dawley giống đực trưởng thành được gây mê qua tĩnh mạch cổ (để dùng hợp chất) và động mạch cảnh (để gom máu). Dung dịch chứa nhiều hợp chất (cát xét dùng liều) được tiêm vào trong ống thông tĩnh mạch cổ (0,1mg FB/ml của mỗi hợp chất, 0,3ml/động vật; liều theo danh nghĩa

0,1mg FB/kg/hợp chất). Gom các mẫu máu ở 2, 6, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90, và 120 phút sau khi dùng bằng cách sử dụng hệ gom mẫu máu tự động, Instech Laboratories Automated Blood Sampling Unit tạo ra lần thứ 2 (ABS2). Huyết tương được tạo ra từ dòng máu chung bằng cách sử dụng K2EDTA làm chất chống đông. Phép phân tích tiếp theo của mẫu bao gồm phần chiết hợp chất và xác định nồng độ huyết tương bằng cách sử dụng các phương pháp LC/MS tiêu chuẩn. Nồng độ chất phân tích được tính toán dựa vào các diện tích đỉnh và đường cong định cỡ. Các tham số PK thu được bằng cách khớp tốt nhất profin nồng độ hợp chất-thời gian đối với mỗi động vật bằng phương pháp phân tích không ngăn bằng cách sử dụng phần mềm WINNONLIN™ v6.3 (Pharsight Corporation).

Thuốc chống lợi tiểu

Các hợp chất được thử nghiệm đối với hoạt tính chống lợi tiểu trong mô hình chuột. Tóm lại, chuột Sprague Dawley bình thường được thông dò được đặt vào lồng chuyển hoá. Mỗi lồng chuyển hoá được thiết lập cho phép đo liên tục lưu lượng nước tiểu tự phát qua bộ truyền ép được đặc lên lọ nhỏ gom nước tiểu để kiểm tra và ghi chép khoảng thời gian lưu lượng nước tiểu bằng cách sử dụng phần mềm NOTOCORD™. Chuột nhận việc truyền trong tĩnh mạch của hợp chất thử nghiệm hoặc tá được dạng lỏng trong ba giờ bằng cách sử dụng bơm ống tiêm và phương pháp khớp khuyên/buộc chặt. Các dữ liệu đối với lưu lượng nước tiểu được gom trong khi dùng hợp chất (từ 0 đến 3 giờ) và gom trong 5 giờ sau khi dùng. Trong một số trường hợp, nồng độ osmol/lit nước tiểu cũng được xác định. Các hợp chất của sáng chế thể hiện hoạt tính chống lợi tiểu.

Dược phẩm

Phần mô tả còn bộc lộ việc sử dụng hợp chất có công thức (I), như được xác định trong bản mô tả này, làm dược phẩm. Sáng chế còn đề xuất dược phẩm chứa hợp chất có công thức (I), như được xác định trong bản mô tả này, làm hoạt chất kết hợp với chất bổ trợ được dụng, chất pha loãng hoặc chất mang.

Dược phẩm có thể được làm thích ứng đối với các mô hình dùng khác nhau bao gồm ví dụ, qua đường miệng và qua mũi. Do đó, dược phẩm có thể, ví dụ, ở dạng viên nén, viên nang, bột, vi hạt, hạt, xi-rô, huyền phù và dung dịch.

Dược phẩm tùy ý có thể bao gồm ví dụ ít nhất một chất phụ gia khác được chọn từ chất gây phân tán, chất kết dính, chất bôi trơn, chất tạo hương, chất bảo quản, chất tạo màu và hỗn hợp bất kỳ của chúng. Các ví dụ về các chất phụ gia này và chất phụ gia khác được tìm thấy trong ấn phẩm: '*Handbook of Pharmaceutical Excipients*'; Ed. A.H. Kibbe, 3rd Ed., American Pharmaceutical Association, USA and Pharmaceutical Press UK, 2000.

Phương pháp điều trị

Theo khía cạnh khác, phần mô tả còn bộc lộ việc sử dụng hợp chất như được nêu trên đây để sản xuất thuốc nhằm điều trị bệnh đái tháo nhạt, đái dầm ban đêm nguyên phát, và chứng tiểu đêm. Hơn nữa, các phương pháp điều trị bệnh đái tháo nhạt, đái dầm ban đêm nguyên phát, và chứng tiểu đêm cũng được bộc lộ. Như được sử dụng trong bản mô tả này, 'điều trị' có nghĩa là việc làm giảm triệu chứng, trì hoãn sự khởi phát của bệnh và/hoặc chữa bệnh khi hợp chất của sáng chế được dùng trong liệu thích hợp.

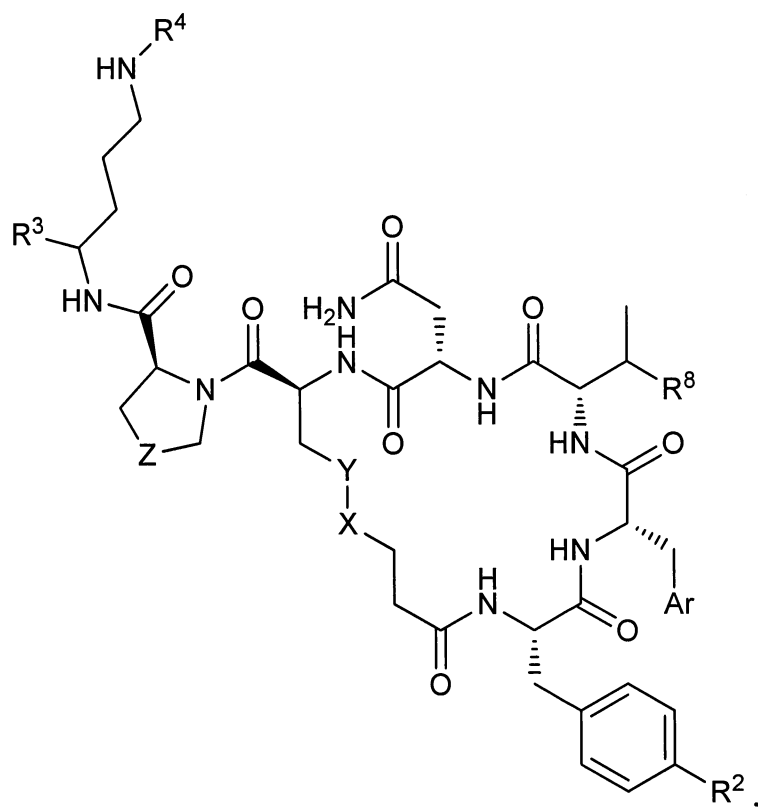
Liều thông thường của hợp chất theo sáng chế thay đổi nằm trong khoảng rộng và sẽ phụ thuộc vào các yếu tố khác nhau như các nhu cầu cá thể của mỗi người bệnh và đường dùng. Liều có thể được dùng một lần hàng ngày hoặc thường xuyên nhiều hơn một lần hàng ngày, ví dụ theo cách gián đoạn. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ có khả năng làm tối ưu liều đối với trường hợp xử lý.

Tất cả các tài liệu công bố và đơn yêu cầu cấp patent được trích dẫn trong bản mô tả này được đưa ra trong bản mô tả này để tham khảo nếu mỗi tài liệu công bố hoặc đơn yêu cầu cấp patent riêng rẽ được chỉ định một cách cụ thể và theo cách riêng rẽ được đưa ra trong bản mô tả này để tham khảo.

Mặc dù sáng chế đã được mô tả chi tiết hơn bằng cách minh họa và ví dụ nhằm mục đích hiểu rõ ràng, sẽ rõ ràng đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này dựa vào phần mô tả của sáng chế mà các thay đổi và cải biến nhất định có thể được tạo ra mà không tách rời tinh thần hoặc phạm vi của các điểm yêu cầu bảo hộ kèm theo.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Hợp chất có công thức I:



hoặc muối được dụng của nó, trong đó:

R^2 là H, C_1 - C_4 alkyl, halogen, -OH hoặc -O- C_1 - C_4 alkyl;

R^3 là H hoặc -CH₂-OH hoặc -C(O)-NR⁵R⁶;

R^4 là H hoặc -C(=NH)-NH₂;

R^5 và R^6 độc lập là H, C_1 - C_6 alkyl, -CH₂-xyclopropyl, -xyclopropyl, hoặc arylalkyl, với điều kiện R^5 và R^6 không cùng là H;

X và Y độc lập là -CH₂- hoặc -S- với điều kiện nếu X là -CH₂-, Y không phải là -CH₂-;

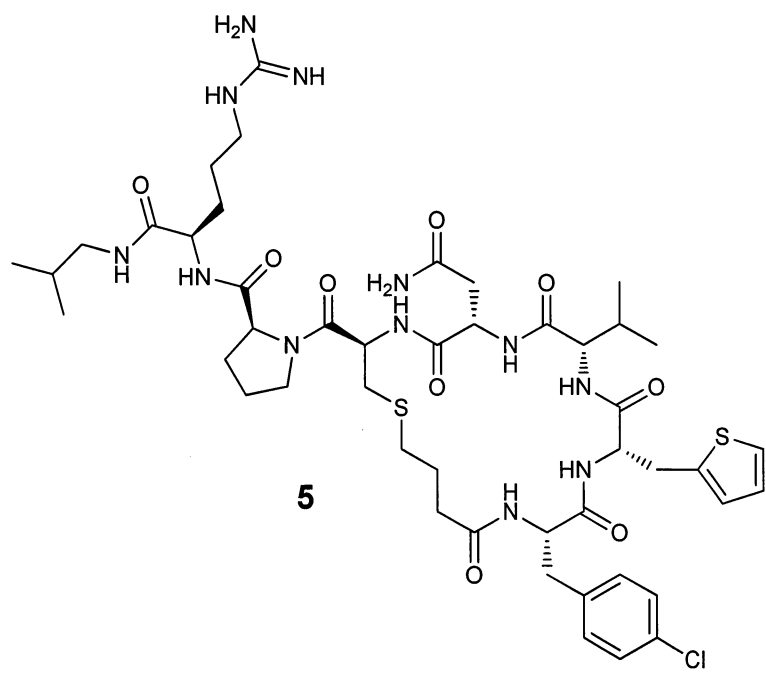
Z là -CHR⁷- hoặc S và R^7 là H hoặc C_1 - C_4 alkyl, halogen, -OH hoặc -O- C_1 - C_4 alkyl;

R^8 là H hoặc -CH₃;

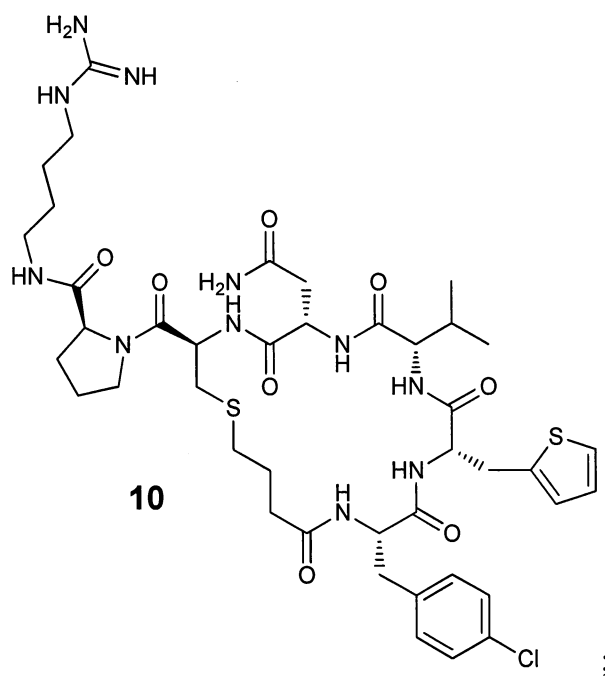
Ar là heteroaryl hoặc phenyl tùy ý được thế bằng một C₁-C₄alkyl, halogen, -OH hoặc -O-C₁-C₄alkyl.

2. Hợp chất theo điểm 1, trong đó R₅ và R₆ độc lập là H, C₁-C₆alkyl hoặc arylalkyl.
3. Hợp chất theo điểm 1, trong đó chỉ một trong số X và Y là -S-.
4. Hợp chất theo điểm 1, trong đó X là -CH₂-.
5. Hợp chất theo điểm 1, trong đó X và Y cùng là -S-.
6. Hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong đó Ar là thiophen.
7. Hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, trong đó R⁸ là -CH₃.
8. Hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7, trong đó R³ là -C(O)-NR⁵R⁶.
9. Hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8, trong đó R⁵ là H và R⁶ là C₁-C₄alkyl.
10. Hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8, trong đó R⁵ và R⁶ cùng là -CH₂CH₃.
11. Hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 10, trong đó R² là halogen.
12. Hợp chất theo điểm 11, trong đó R² là -Cl.
13. Hợp chất theo điểm 11, trong đó R² là -F.
14. Hợp chất theo điểm 1, trong đó hợp chất này là:

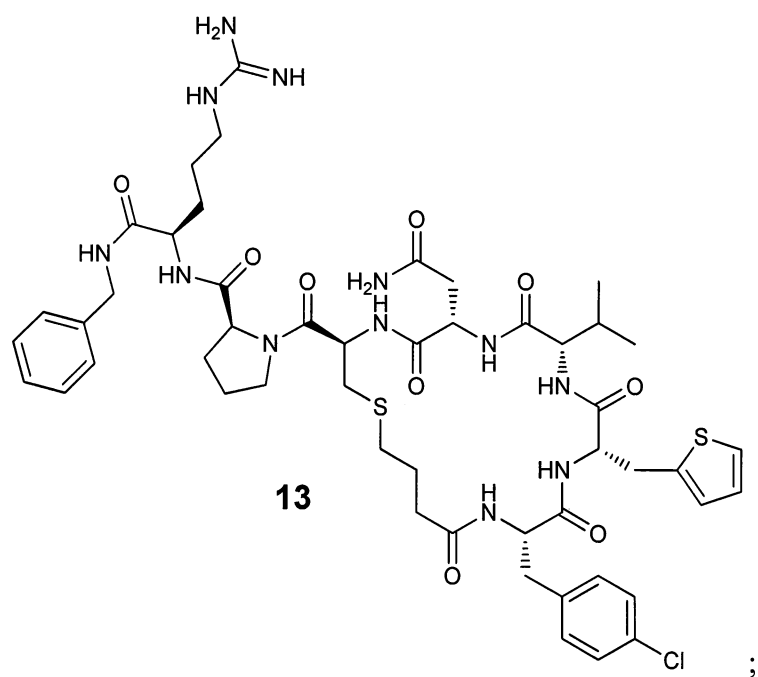
hợp chất 5



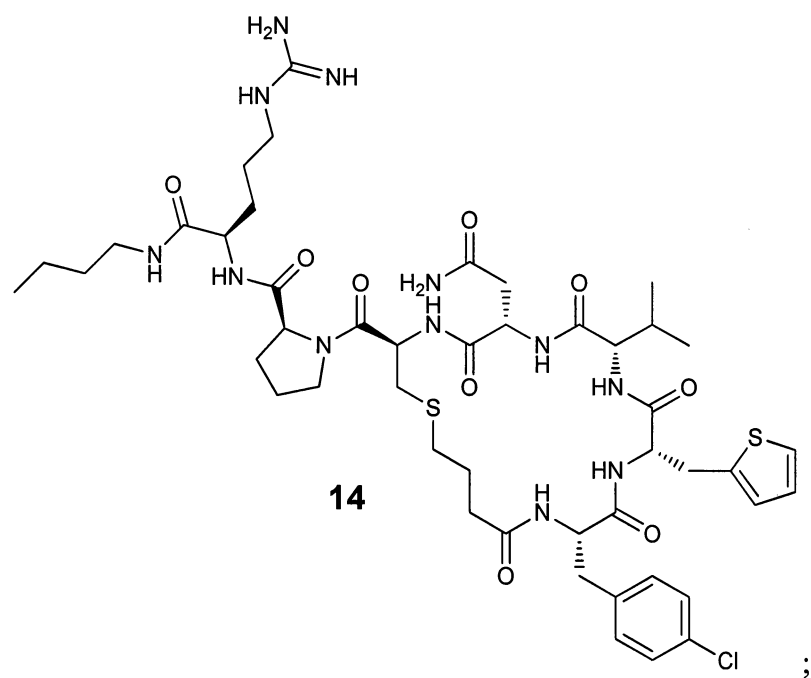
hợp chất 10



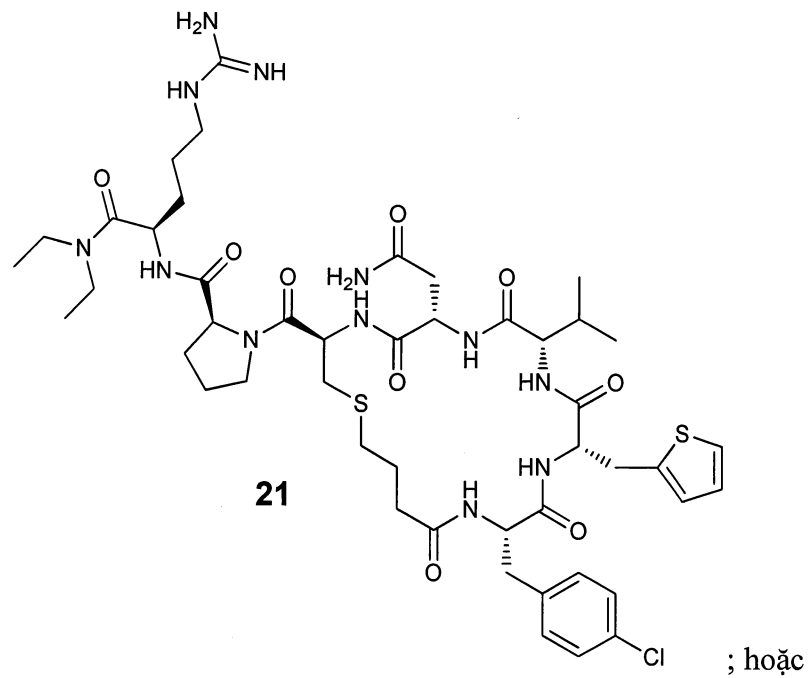
hợp chất 13



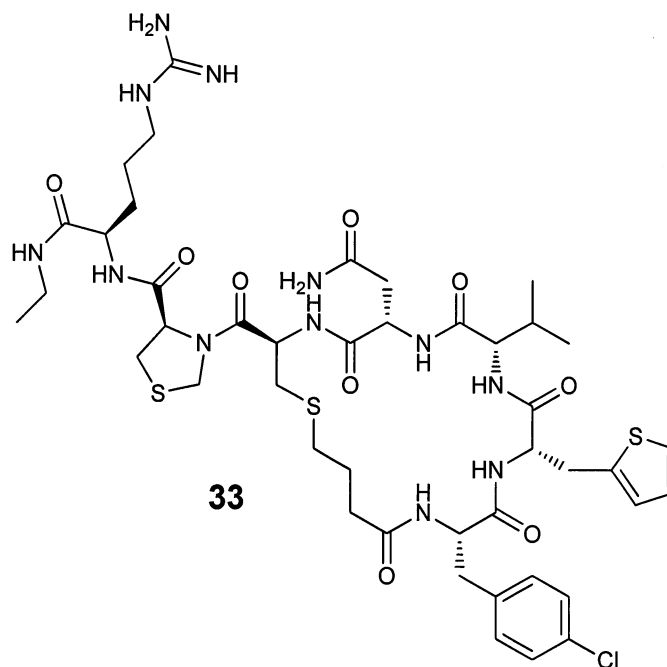
hợp chất 14



hợp chất 21



hợp chất 33



15. Dược phẩm chứa hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 13 để sử dụng trong điều trị bệnh đái tháo nhạt, đái dầm ban đêm nguyên phát, hoặc chứng tiểu đêm.