



(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)



1-0028213

(51)⁷ C07D 207/04; A61K 31/4025; C07D
403/06; C07D 207/10; A61K 31/40

(13) B

(21) 1-2017-03865

(22) 08/07/2016

(86) PCT/US2016/041563 08/07/2016

(87) WO2017/008033 12/01/2017

(30) 1020150097040 08/07/2015 KR

(45) 25/05/2021 398

(43) 25/06/2018 363A

(73) 1. Research & Business Foundation Sungkyunkwan University (KR)
Sungkyunkwan University, 2066, Seobu-ro Jangan-gu, Suwon Gyeonggi-do,
Republic of Korea

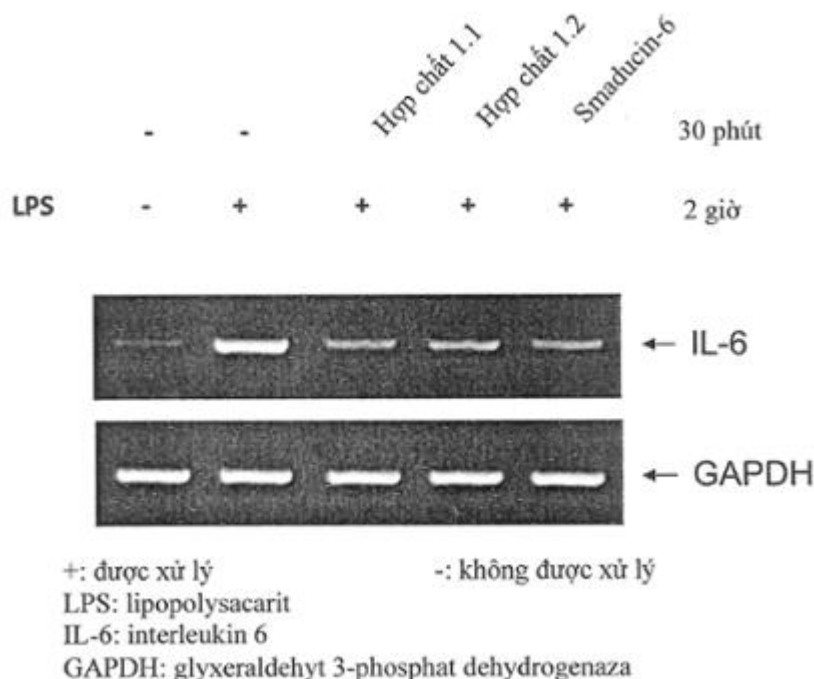
2. Korea Research Institute of Chemical Technology (KR)
141 Gajeong-ro, Yuseong-gu, Daejeon, 305-600, Republic of Korea

(72) CHOI, Gildon (KR); RHEE, Sang, Dal (KR); ALI, Imran (PK); CHAE, Chong, Hak
(KR); PARK, Seok Hee (KR); JEON, Moon, Kook (KR); LEE, Youn, Sook (KR);
LEE, Kwangho (US).

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

(54) HỢP CHẤT PYROLIDIN CARBOXAMIDO, PHƯƠNG PHÁP ĐIỀU CHẾ HỢP
CHẤT VÀ CHẾ PHẨM CHỨA HỢP CHẤT NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến hợp chất pyrolidin carboxamido, chất đồng phân quang học của
nó và muối của nó có khả năng ngăn ngừa, cải thiện và/hoặc điều trị các tình trạng bệnh
viêm, bao gồm bệnh viêm ruột, và cũng đề cập đến phương pháp điều chế hợp chất và chế
phẩm chứa hợp chất này.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến hợp chất pyrolidin carboxamido, chất đồng phân quang học của nó hoặc muối được dụng của nó, phương pháp điều chế hợp chất và chế phẩm chứa hợp chất này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các hợp chất/chế phẩm/phương pháp khác nhau bao gồm, nhưng không giới hạn ở, thuốc ức chế miễn dịch (ví dụ, infliximab), axit aminosalixylic (ví dụ, sulfasalazin) và steroid được đề xuất dùng để làm giảm xytokin và/hoặc chemokin để ngăn ngừa và/hoặc điều trị các bệnh khác nhau bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các dấu hiệu viêm, bệnh ung thư và các dấu hiệu viêm mắt (Expert opinion on emerging drugs (2015) 20(3):349-352; Cell. (2010) March 19; 140(6): 883–899; Progress in Retinal and Eye Research 37(2013) 68e89, tài liệu này được đưa vào phần mô tả bằng cách viện dẫn). Tuy nhiên, các hợp chất/chế phẩm/phương pháp này chưa đạt yêu cầu ít nhất vì chúng đắt, và/hoặc có tác dụng phụ, và/hoặc thể hiện hiệu quả điều trị thấp (P&T 41(2016), Jun no 6; Gut 56(2007):725–732; World J Gastroenterol (2005);11(16):2462-2466, tài liệu này được đưa vào phần mô tả bằng cách viện dẫn). Do đó, vẫn cần có hợp chất, chế phẩm và/hoặc phương pháp mới.

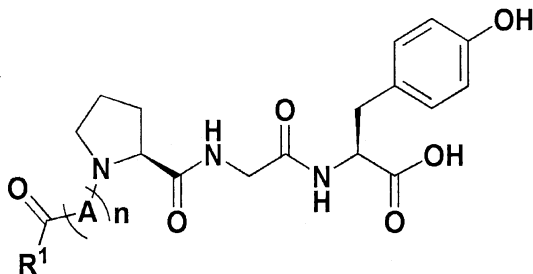
Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế dựa trên việc khám phá ra rằng các dẫn xuất pyrolidin carboxamido nhất định có khả năng ức chế sự biểu hiện và hoạt tính của xytokin viêm (ví dụ, IL-6) và/hoặc chemokin và có khả năng duy trì ở nồng độ đủ cao trong mô/tế bào đích trong khi ít xuất hiện trong máu. Sáng chế cũng dựa trên việc khám phá ra rằng các dẫn xuất pyrolidin carboxamido nhất định có khả năng ức chế hoạt tính của NF- κ B bằng cách làm ổn định I κ B. Sáng chế còn dựa trên việc khám phá ra rằng các dẫn xuất pyrolidin carboxamido nhất định có khả năng làm gián đoạn sự tạo thành của phức chất truyền tín hiệu viêm được trung gian bởi gen đáp ứng sơ cấp sự biệt hóa tủy 88 (myeloid differentiation primary response gene 88 - MyD88) và/hoặc protein tương tác thụ thể 1 (receptor-interacting protein 1 - RIP1) mà hoạt động theo hướng xuôi của con đường

truyền tín hiệu liên quan đến thụ thể giống Toll 2/4 và IL-1 β .

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất hợp chất được biểu diễn bằng công thức hóa học có công thức 1 dưới đây, chất đồng phân quang học của nó hoặc muối được dụng của nó.

Công thức 1:



trong đó: n là 0, 1 hoặc 2; A là -a¹-, là axit amin được chọn độc lập từ nhóm bao gồm alanin, (Ala, A), arginin (Arg, R), asparagin (Asn, N), axit aspartic (Asp, D), cystein (Cys, C), axit glutamic (Glu, E), glutamin (Gln, Q), glyxin (Gly, G), histidin (His, H), isoleuxin (Ile, I), leuxin (Leu, L), lysin (Lys, K), methionin (Met, M), phenylalanin (Phe, F), prolin (Pro, P), serin (Ser, S), threonin (Thr, T), tryptophan (Trp, W), tyrosin (Tyr, Y) và valin (Val, V), cả hai đầu tận cùng của axit amin này đều liên kết với nhóm cacbonyl hoặc nhóm amin bằng liên kết amit; và R¹ là C₁₋₃₆ alkyl mạch thẳng hoặc mạch nhánh, C₂₋₃₆ alkenyl mạch thẳng hoặc mạch nhánh chứa ít nhất một liên kết đôi hoặc C₂₋₃₆ alkynyl mạch thẳng hoặc mạch nhánh chứa ít nhất một liên kết ba.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp điều chế hợp chất, chất đồng phân quang học và muối.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất chế phẩm dùng để ngăn ngừa, cải thiện và điều trị các bệnh khác nhau (ví dụ, các dấu hiệu viêm, bệnh ung thư và các dấu hiệu viêm mắt). Mỗi chế phẩm chứa thành phần hoạt tính là ít nhất một hợp chất, ít nhất một chất đồng phân quang học hoặc ít nhất một muối.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế mô tả các phương pháp dùng để ngăn ngừa, cải thiện hoặc điều trị các bệnh khác nhau (ví dụ, các dấu hiệu viêm, bệnh ung thư và các dấu hiệu viêm mắt). Mỗi phương pháp bao gồm việc dùng cho đối tượng cần điều trị chế phẩm chứa thành phần hoạt tính là ít nhất một hợp chất, ít nhất một

chất đồng phân quang học hoặc ít nhất một muối.

Hợp chất theo các phương án nhất định của sáng chế có thể ức chế sự phân hủy I κ B trong con đường truyền tín hiệu viêm được trung gian bởi MyD88 (phức chất myddosome) và/hoặc RIP 1, nhờ đó ngăn NF- κ B chuyển vào nhân của tế bào, dẫn đến ức chế sự biểu hiện của xytokin và chemokin (ví dụ, G-CSF, IL-2, SCF, VEGF, CX3CL1, IGFBP5, IGFBP6, IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-9, MCP-1, MIP-3 α , IL12p40/70, MIG, TNF- α và VCAM-1) và ngăn ngừa phản ứng viêm mà nếu không thì có thể được gây ra bởi sự biểu hiện của chúng.

Các khía cạnh và ưu điểm khác của sáng chế sẽ trở nên rõ ràng đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật từ việc xem xét phần mô tả chi tiết và các hình vẽ.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1A là kết quả điện di thể hiện rằng các hợp chất theo các phương án của sáng chế ức chế sự biểu hiện của IL-6.

Fig.1B là biểu đồ thể hiện rằng các hợp chất theo các phương án của sáng chế ức chế sự biểu hiện của IL-6.

Fig.2 thể hiện rằng các hợp chất theo các phương án của sáng chế ức chế sự biểu hiện của xytokin và chemokin trong dòng tế bào RAW 264.7.

Fig.3 thể hiện rằng các hợp chất theo các phương án của sáng chế ức chế sự biểu hiện của IL-6 trong vật chủ trong dòng tế bào RAW 264.7.

Fig.4 thể hiện rằng các hợp chất theo các phương án của sáng chế ức chế hoạt tính của NF- κ B.

Fig.5 thể hiện rằng các hợp chất theo các phương án của sáng chế ức chế NF- κ B.

Fig.6 thể hiện rằng các hợp chất theo các phương án của sáng chế ức chế hoạt tính của NF- κ B trong khi không ảnh hưởng đến việc truyền tín hiệu của TGF- β và BMP.

Fig.7 là kết quả miễn dịch kết tủa thể hiện rằng các hợp chất theo các phương án của sáng chế ức chế sự tạo thành phức chất protein trong con đường truyền tín hiệu

viêm được trung gian bởi IRAK-1, MyD88 và/hoặc RIP1 và thể hiện rằng các hợp chất theo các phương án của sáng chế làm thay đổi nồng độ của I κ B.

Fig.8 là kết quả miễn dịch kết tủa thể hiện rằng các hợp chất theo các phương án của sáng chế có thể làm gián đoạn sự tạo thành phức chất protein trong con đường truyền tín hiệu viêm được trung gian bởi IRAK-1, MyD88 và/hoặc RIP1.

Fig.9 thể hiện sự thay đổi nồng độ của hợp chất trước khi điều trị theo các phương án của sáng chế làm thay đổi nồng độ của I κ B trong các tế bào đại thực bào RAW 264.7 và các tế bào BMDM.

Fig.10 là biểu đồ biểu thị điểm chỉ số hoạt động bệnh trong mô hình động vật mắc bệnh viêm ruột kết mạn tính gây ra bởi DSS theo liều hợp chất theo các phương án của sáng chế trong trường hợp dùng liều qua miệng.

Fig.11A thể hiện điểm chỉ số hoạt động bệnh thể hiện khả năng của hợp chất theo các phương án của sáng chế để ức chế bệnh viêm ruột kết cấp tính trong mô hình động vật mắc bệnh viêm ruột kết cấp tính gây ra bởi DSS.

Fig.11B thể hiện các hợp chất theo các phương án của sáng chế ảnh hưởng đến mức biểu hiện của chemokin (CCL2, CCL20 và CXCL1) trong mô hình chuột nhắt mắc bệnh viêm ruột kết mạn tính gây ra bởi DSS.

Các Fig.12-16 là các hình ảnh thể hiện hình dạng của lòng nhung ruột già từ nhóm không được điều trị, nhóm mô hình bệnh viêm ruột kết mạn tính gây ra bởi DSS, và nhóm được điều trị bằng hợp chất theo các phương án của sáng chế.

Fig.17 là biểu đồ thể hiện mức độ hồi phục của thành ruột già của nhóm không được điều trị, nhóm mô hình bệnh viêm ruột kết mạn tính gây ra bởi DSS, nhóm được điều trị bằng hợp chất theo các phương án của sáng chế và nhóm được điều trị bằng sulfasalazin.

Fig.18 là biểu đồ thể hiện sự thay đổi nồng độ hợp chất trong máu qua thời gian theo các phương án của sáng chế thông qua việc dùng trong tĩnh mạch.

Fig.19 là biểu đồ thể hiện sự thay đổi nồng độ hợp chất trong máu qua thời gian theo các phương án của sáng chế thông qua việc dùng qua miệng.

Fig.20A là hình ảnh thẩm tách Western dùng để xác định liệu hợp chất theo các phương án của sáng chế có ức chế con đường truyền tín hiệu MAPK/ERK hay không.

Fig.20B là sơ đồ mô tả con đường truyền tín hiệu của thụ thể giống Toll.

Fig.21 là hình ảnh thâm tách Western dùng để xác định liệu hợp chất theo các phương án của sáng chế có ức chế con đường truyền tín hiệu MAPK/ERK hay không.

Fig.22A và Fig.22B thể hiện mức độ ức chế sự hoạt hóa NF- κ B lần lượt bằng hợp chất theo các phương án của sáng chế và chất ức chế IRAK1/4.

Fig.23 là hình ảnh thâm miễn dịch dùng để xác định liệu hợp chất theo các phương án của sáng chế và chất ức chế IRK1/4 có làm thay đổi nồng độ của I κ B hay không.

Fig.24A và Fig.24B lần lượt là hình ảnh và biểu đồ, tương ứng, so sánh khả năng của hợp chất theo các phương án của sáng chế để ức chế con đường truyền tín hiệu MAPK/ERK và khả năng của chất ức chế IRAK1/4 để ức chế con đường truyền tín hiệu MAPK/ERK.

Fig.25A là hình ảnh thâm tách Western dùng để xác định liệu hợp chất theo các phương án của sáng chế có ức chế, trong ARPE-19, biểu hiện của Nox-4, VEGF, VEGFR1, VEGFR2, Ang-2, EPO và EPOR và có thể làm tăng biểu hiện của Ang-1 và Tie2 hay không.

Fig.25B là hình ảnh qRT-PCR dùng để xác định liệu hợp chất theo các phương án của sáng chế có ức chế sự biểu hiện của VEGF trong HRMEC hay không.

Fig.26 là hình ảnh thể hiện rằng các hợp chất theo các phương án của sáng chế ức chế sự tạo thành ống trong HRMEC.

Fig.27A và Fig.27B là các hình ảnh thể hiện rằng các hợp chất theo các phương án của sáng chế ức chế oxy đã hoạt hóa tăng trong mô hình chuột nhất mắc bệnh vông mạc do đái tháo đường typ 1 gây ra bởi STZ.

Fig.28A là biểu đồ thể hiện rằng các hợp chất theo các phương án của sáng chế có hiệu quả trị liệu ở chuột nhất EAE gây ra bởi MOG.

Fig.28B là biểu đồ thể hiện rằng các hợp chất theo các phương án của sáng chế làm thay đổi khối lượng của chuột nhất EAE gây ra bởi MOG.

Fig.29 là biểu đồ thể hiện rằng các hợp chất theo các phương án của sáng chế có hiệu quả trị liệu trong mô hình thắt manh tràng và chọc dò (cecal ligation and

puncture - CLP).

Mô tả chi tiết sáng chế

1. Định nghĩa

Trừ khi được định nghĩa khác, tất cả các thuật ngữ kỹ thuật và khoa học được sử dụng trong bản mô tả này có nghĩa thông dụng được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật của sáng chế. Các tài liệu tham khảo dưới đây, được đưa vào phần mô tả bằng cách viện dẫn, cung cấp hiểu biết với định nghĩa chung của nhiều thuật ngữ được sử dụng trong sáng chế này: The Cambridge Dictionary of Science and Technology (Walker ed., 1988); The Glossary of Genetics, 5th Ed., R. Rieger et. al. (eds.), Springer Verlag (1991); và Hale & Marham, The Harper Collins Dictionary of Biology (1991). Như được sử dụng trong bản mô tả này, các thuật ngữ dưới đây có nghĩa được sử dụng cho chúng như dưới đây, trừ các trường hợp cụ thể khác.

Trừ khi được nêu cụ thể hoặc rõ ràng theo ngữ cảnh, như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “hoặc” được hiểu là bao gồm.

Trừ khi được nêu cụ thể và rõ ràng theo ngữ cảnh, như được sử dụng trong bản mô tả này, các thuật ngữ chỉ “một” được hiểu là số ít hoặc số nhiều. Do đó, ví dụ, đề cập đến “hợp chất” là bao gồm hỗn hợp của các hợp chất; đề cập đến “chất mang” là bao gồm hỗn hợp của hai hoặc nhiều chất mang; và tương tự.

Trừ khi được nêu cụ thể hoặc rõ ràng theo ngữ cảnh, như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “khoảng” được hiểu là nằm trong giới hạn cho phép thông thường trong lĩnh vực kỹ thuật, ví dụ trong 2 độ lệch chuẩn của giá trị trung bình. Khoảng có thể được hiểu là nằm trong 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05% hoặc 0,01% giá trị được nêu. Trừ khi nêu rõ ràng theo ngữ cảnh, tất cả các giá trị số được nêu trong bản mô tả này được thay đổi bởi thuật ngữ khoảng.

Thuật ngữ “chất có hoạt tính”, “thuốc” và “dược chất” được sử dụng thay đổi với nhau trong bản mô tả để chỉ nguyên liệu hoặc hợp chất hóa học mà, khi được dùng cho đối tượng (ví dụ, động vật bất kỳ bao gồm người hoặc động vật không phải người) bằng cách và/hoặc đường bất kỳ tạo ra hiệu quả dược lý mong muốn (ví dụ, như giảm viêm).

Thuật ngữ “chất bổ trợ” như được sử dụng trong bản mô tả này có thể chỉ thành phần bổ sung bất kỳ mà có thể được bổ sung vào chế phẩm được mô tả trong bản mô tả này. Ví dụ, các chất bổ trợ có thể bao gồm tá dược (ví dụ, một hoặc nhiều tá dược), chất chống oxy hóa (ví dụ, một hoặc nhiều chất chống oxy hóa), chất làm ổn định (ví dụ, một hoặc nhiều chất làm ổn định), chất bảo quản (ví dụ, một hoặc nhiều chất bảo quản), chất điều chỉnh pH và/hoặc chất đệm (ví dụ, một hoặc nhiều chất điều chỉnh pH và/hoặc chất đệm), chất điều chỉnh trương lực (ví dụ, một hoặc nhiều chất điều chỉnh trương lực), chất làm đặc (ví dụ, một hoặc nhiều chất làm đặc), chất tạo huyền phù (ví dụ, một hoặc nhiều chất tạo huyền phù), chất kết dính (ví dụ, một hoặc nhiều chất kết dính), chất làm tăng độ nhớt (ví dụ, một hoặc nhiều chất làm tăng độ nhớt) và các chất tương tự, với điều kiện là các thành phần bổ sung là có thể chấp nhận về mặt dược dụng đối với các tình trạng bệnh cụ thể cần được điều trị. Các chất bổ trợ cũng có thể bao gồm chất xử lý và chất cải biến sự vận chuyển thuốc và chất làm tăng cường, như, ví dụ, canxi phosphat, magie stearat, talc, monosacarit, disacarit, tinh bột, gelatin, xenluloza, metyl xenluloza, natri carboxymetyl xenluloza, dextroza, hydroxypropyl-beta-xyclodextrin, polyvinylpyrrolidinon, sáp có nhiệt độ nóng chảy thấp, nhựa trao đổi ion và các chất tương tự, cũng như là hỗn hợp của hai hoặc nhiều chất bất kỳ. Các tá dược được dùng thích hợp khác được mô tả trong các tài liệu “Remington’s Pharmaceutical Sciences”, Mack Pub. Co., New Jersey (1991), và “Remington: The Science and Practice of Pharmacy”, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, tái bản lần thứ 20 (2003) và tái bản lần thứ 21 (2005), các tài liệu này được đưa vào phần mô tả bằng cách viện dẫn. Các chất bổ trợ được mô tả trong bản mô tả này có thể được sử dụng với lượng thích hợp bất kỳ.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “dùng” có nghĩa là dùng qua miệng, dùng dưới dạng thuốc đạn, tiếp xúc tại chỗ, trong tĩnh mạch, ngoài đường tiêu hóa, trong màng bụng, trong cơ, trong thương tổn, nội tủy mạc, trong mũi hoặc dưới da, hoặc cấy dụng cụ giải phóng chậm vào đối tượng, ví dụ, bơm thẩm thấu cỡ nhỏ. Việc dùng là dùng bằng bất kỳ đường nào, bao gồm ngoài đường tiêu hóa và qua niêm mạc (ví dụ, đường miệng, mũi, phổi, trực tràng, vào miệng, âm đạo, mắt và qua da).

Thuật ngữ “dẫn xuất” và ‘chất tương tự’ được sử dụng thay thế cho nhau trong bản mô tả này, và chỉ hợp chất mà có lõi tương tự như hợp chất ban đầu, nhưng khác hợp chất ban đầu ở thứ tự liên kết, không có hoặc có một hoặc nhiều nguyên tử

và/hoặc nhóm nguyên tử và kết hợp của chúng. Dẫn xuất có thể khác với hợp chất ban đầu, ví dụ, ở một hoặc nhiều phần tử thể có mặt trên lõi, mà có thể bao gồm một hoặc nhiều nguyên tử, nhóm chức hoặc cấu trúc phụ. Dẫn xuất cũng có thể khác với hợp chất ban đầu ở thứ tự liên kết giữa các nguyên tử trong lõi. Nói chung, có thể hình dung được dẫn xuất được tạo thành, ít nhất là theo lý thuyết, từ hợp chất ban đầu thông qua các quá trình hóa học và/hoặc vật lý.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, “chất chống oxy hóa” có thể chỉ các chất nhân tạo hoặc tự nhiên mà có thể ngăn ngừa hoặc làm chậm một số loại tổn thương tế bào và/hoặc quá trình oxy hóa. Chất chống oxy hóa được tìm thấy trong nhiều loại thực phẩm, bao gồm trái cây và rau. Chúng cũng là các chất có bán trên thị trường dưới dạng thực phẩm chức năng. Các chất chống oxy hóa làm ví dụ có thể bao gồm: beta-caroten, lutein, lycopene, selen, vitamin A, vitamin C và vitamin E. Các chất chống oxy hóa khác được biết bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật cũng có thể được sử dụng. Các chất chống oxy hóa được mô tả trong bản mô tả này có thể được sử dụng với lượng thích hợp bất kỳ.

Thuật ngữ “chất đồng sử dụng” có nghĩa là hợp chất hoặc chế phẩm được mô tả trong bản mô tả này được dùng ở cùng thời điểm, ngay trước khi, hoặc ngay sau khi dùng liệu pháp bổ sung hoặc chất có hoạt tính hoặc chất hỗ trợ được mô tả trong bản mô tả này. Hợp chất hoặc chế phẩm theo sáng chế có thể được dùng riêng rẽ hoặc có thể được dùng cùng lúc cho đối tượng cần nó. Việc đồng sử dụng có nghĩa là bao gồm việc dùng đồng thời hoặc tuần tự hợp chất riêng rẽ hoặc kết hợp (nhiều hơn một hợp chất hoặc chất). Dạng điều chế cũng có thể được kết hợp, khi mong muốn, với các chất có hoạt tính khác.

Trong bản mô tả này, “chứa”, “có chứa”, “gồm có” và “có” và các từ tương tự có thể có nghĩa như được quy định theo luật sáng chế của Hoa Kỳ và có thể có nghĩa là “gồm”, “bao gồm” và các từ tương tự; “bao gồm chủ yếu” hoặc “gồm chủ yếu” tương tự như vậy cũng có nghĩa như được quy định theo luật sáng chế của Hoa Kỳ và thuật ngữ này là dạng kết thúc mở, cho phép sự có mặt của nhiều phương án hơn so với phương án được nêu cụ thể, miễn là các đặc điểm cơ bản hoặc mới của phương án được nêu cụ thể không bị thay đổi bởi sự có mặt của nhiều phương án hơn so với phương án được nêu cụ thể, nhưng loại trừ các phương án đã có trong tình trạng kỹ thuật.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, “dùng đồng thời” bao gồm việc dùng trùng lặp thời gian ít nhất một phần. Ví dụ, khi hai chất (ví dụ, chất hoặc lớp chất bất kỳ được mô tả trong bản mô tả này mà có hoạt tính sinh học) được dùng đồng thời, việc dùng chúng xảy ra trong thời gian mong muốn nhất định. Việc dùng các chất có thể bắt đầu và kết thúc trong cùng ngày. Việc dùng một chất cũng có thể trước việc dùng chất thứ hai theo (các) ngày miễn là cả hai chất được dùng trong cùng ngày ít nhất một lần. Tương tự, việc dùng một chất có thể kéo dài trước khi dùng chất thứ hai miễn là cả hai chất được dùng trong cùng ngày ít nhất một lần. (Các) chất có hoạt tính không phải dùng cùng thời điểm mỗi ngày kể cả khi dùng đồng thời.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, “lượng hữu hiệu” hoặc “lượng cho hiệu quả điều trị” là lượng đủ để ảnh hưởng đến hiệu quả sinh học mong muốn, như các kết quả có lợi, bao gồm các kết quả lâm sàng. Như vậy, “lượng hữu hiệu” tùy thuộc vào ngữ cảnh mà nó được sử dụng. Lượng hữu hiệu có thể thay đổi theo các yếu tố được biết trong lĩnh vực kỹ thuật, như tình trạng bệnh, độ tuổi, giới tính và cân nặng của các cá nhân được điều trị. Nhiều liều được chia nhỏ có thể được dùng hàng ngày hoặc liều này có thể được làm giảm theo tỷ lệ như được chỉ định theo nhu cầu của tình trạng cần trị liệu. Ngoài ra, hợp chất, chế phẩm hoặc dạng bào chế theo sáng chế có thể cần thiết được dùng thường xuyên để đạt được lượng trị liệu.

Thuật ngữ “gel” như được sử dụng trong bản mô tả này có thể chỉ nguyên liệu không phải là chất lỏng dễ chảy và không phải là chất rắn, tức là, bán rắn. Gel có thể được tạo ra từ các nguyên liệu tồn tại trong tự nhiên hoặc nguyên liệu tổng hợp. Gel có thể không được xếp lớp đến được xếp lớp không đáng kể thể hiện đặc tính lưỡng chiết, tinh thể lỏng. Gel có thể được dùng tại chỗ.

Thuật ngữ “bệnh viêm ruột” như được sử dụng trong bản mô tả này có nghĩa y học thông thường của nó và chỉ nhóm các dấu hiệu/tình trạng viêm của ruột kết và ruột non. Các bệnh viêm ruột làm ví dụ có thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở, bệnh Crohn, bệnh viêm ruột kết gây loét, bệnh Johne, hội chứng Behçet, bệnh viêm ruột kết liên quan với sự biến đổi collagen, bệnh viêm ruột kết do phẫu thuật mở thông hồi tràng, bệnh viêm ruột kết không xác định, bệnh viêm ruột kết nhiễm khuẩn, bệnh viêm ruột kết thiếu máu cục bộ, bệnh viêm ruột kết do tế bào lympho và các bệnh và các rối loạn của đường dạ dày-ruột có liên quan chặt chẽ.

Thuật ngữ “ức chế” như được sử dụng trong bản mô tả này, nghĩa là ngăn ngừa, làm giảm, làm chậm hoặc làm ngừng. Theo một phương án, hợp chất, chế phẩm hoặc dạng bào chế có thể được coi là ức chế sự tồn tại của ít nhất một protein (ví dụ, G-CSF, IL-2, SCF, VEGF, CX3CL1, IGFBP5, IGFBP6, IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-9, MCP-1, MIP-3 α , IL12p40/70, MIG, TNF- α , VCAM-1 và NF- κ B) khi lượng hoặc tỷ lệ của quá trình hoặc phản ứng trong điều kiện có mặt hợp chất, chế phẩm hoặc dạng bào chế này giảm đi ít nhất là khoảng 10% so với lượng hoặc tỷ lệ trong điều kiện không có mặt hợp chất, chế phẩm hoặc dạng bào chế này. Theo một phương án khác, hợp chất, chế phẩm hoặc dạng bào chế có thể được coi là ức chế quá trình hoặc phản ứng khi lượng hoặc tỷ lệ của quá trình hoặc phản ứng trong điều kiện có mặt hợp chất, chế phẩm hoặc dạng bào chế này giảm đi ít nhất là khoảng 20% so với lượng hoặc tỷ lệ trong điều kiện không có mặt hợp chất, chế phẩm hoặc dạng bào chế này. Theo các phương án khác, hợp chất, chế phẩm hoặc dạng bào chế có thể được coi là ức chế sự tồn tại của một hoặc nhiều protein (ví dụ, G-CSF, IL-2, SCF, VEGF, CX3CL1, IGFBP5, IGFBP6, IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-9, MCP-1, MIP-3 α , IL12p40/70, MIG, TNF- α , VCAM-1 và NF- κ B) khi lượng hoặc tỷ lệ tồn tại trong điều kiện có mặt hợp chất, chế phẩm hoặc dạng bào chế này giảm đi ít nhất là khoảng 25%, khoảng 30%, khoảng 40%, khoảng 50%, khoảng 60%, khoảng 70%, khoảng 75% hoặc khoảng 80% so với lượng hoặc tỷ lệ trong điều kiện không có mặt hợp chất, chế phẩm hoặc dạng bào chế này. Theo các phương án khác nữa, hợp chất, chế phẩm hoặc dạng bào chế có thể được coi là ức chế sự tồn tại của một hoặc nhiều protein, tức là làm ngừng sự phát triển của nó.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, “việc dùng gián đoạn” bao gồm việc dùng chất có hoạt tính trong một khoảng thời gian (mà có thể được xem là “giai đoạn dùng lần đầu”), sau đó là thời gian mà chất này không được dùng hoặc được dùng với liều duy trì thấp hơn (có thể được xem là “giai đoạn nghỉ”) sau đó là thời gian mà chất này được dùng lần nữa (mà có thể được xem là “giai đoạn dùng lần hai”). Nói chung, trong suốt giai đoạn dùng lần hai, lượng liều của chất sẽ phù hợp với lượng liều được dùng trong suốt giai đoạn dùng lần đầu nhưng có thể tăng hoặc giảm khi cần thiết về mặt y tế.

“Keo” theo sáng chế này là lớp gel, là hệ bán rắn mà bao gồm huyền phù được tạo ra từ các hạt vô cơ nhỏ hoặc các phân tử hữu cơ lớn được xâm nhập qua lại nhờ

chất lỏng, trong đó chất nền gắn kết cấu trúc chứa tỷ lệ cao chất lỏng, thường là nước.

“Chất lỏng” như được sử dụng trong bản mô tả này là dạng liều chứa chế phẩm ở trạng thái lỏng của nó. Chất lỏng là chất có thể rót được; nó chảy và phù hợp với vật chứa nó ở nhiệt độ phòng. Chất lỏng thể hiện thuyết Newton hoặc tính chất dòng giả dẻo. Theo các phương án, thuật ngữ “bán lỏng” như được sử dụng trong bản mô tả này có thể có các đặc tính của cả chất lỏng và một dạng bào chế khác (tức là, huyền phù, nhũ tương, dung dịch, kem, gel, keo và các chất tương tự).

“Gen đáp ứng sơ cấp sự biệt hóa tủy 88” hoặc “MyD88” là protein ở người được mã hóa bởi gen MyD88. MyD88 giữ vai trò chủ yếu trong sự đáp ứng miễn dịch bẩm sinh và đáp ứng miễn dịch thích nghi. Protein này có chức năng làm chất truyền tín hiệu thiết yếu trong con đường truyền tín hiệu interleukin-1 và thụ thể giống Toll. Các con đường này điều chỉnh sự hoạt hóa lượng lớn gen gây viêm. Protein được mã hóa bao gồm miền chết đầu tận cùng N và miền thụ thể Toll-interleukin1 đầu tận cùng C.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “thuốc mỡ” có thể chỉ dạng bào chế lỏng hoặc bán lỏng có độ nhớt cao có thể được sử dụng để điều trị bệnh, hội chứng hoặc tình trạng bệnh bằng trị liệu (ví dụ, bệnh viêm ruột).

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “chất mang dược dụng” bao gồm bất kỳ và tất cả dung môi, môi trường phân tán, lớp phủ, chất chống vi khuẩn và chống nấm, các chất làm chậm đẳng trương và hấp thụ và các chất tương tự mà tương thích về mặt sinh lý học. Loại chất mang có thể được chọn dựa trên đường dùng được dự định. Chất mang dược dụng bao gồm dung dịch nước vô trùng hoặc chất phân tán và bột vô trùng để điều chế ngay lúc dùng dung dịch dùng tại chỗ hoặc chất phân tán vô trùng. Việc sử dụng môi trường và chất này cho chất có hoạt tính dược là được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật. Ngoại trừ đến mức mà môi trường hoặc chất thông thường bất kỳ không tương thích với chế phẩm (ví dụ, công thức I như được mô tả trong bản mô tả này, dẫn xuất/chất tương tự có công thức I hoặc muối, dung môi, hydrat hoặc đa hình dược dụng của nó), việc sử dụng nó trong chế phẩm dùng cho mắt trong bản mô tả này được đề cập.

“Chất mang dược” hoặc “chất mang” như được sử dụng trong bản mô tả này có thể còn bao gồm chất mang, tá dược hoặc chất làm ổn định dược dụng mà không độc

đối với tế bào hoặc động vật có vú được tiếp xúc với các chất này với liều lượng và nồng độ được sử dụng. Thường thì chất mang có thể chấp nhận được về mặt sinh lý là dung dịch đệm pH dạng nước. Các ví dụ về chất mang có thể chấp nhận được về mặt sinh lý bao gồm các chất đệm như phosphat, xitrat và axit hữu cơ khác; chất chống oxy hóa bao gồm axit ascorbic; polypeptit khối lượng phân tử thấp (nhỏ hơn khoảng 10 nhóm); protein, như albumin trong huyết thanh, gelatin hoặc albumin miễn dịch; polyme ưa nước như polyvinylpyrrolidon; axit amin như glyxin, glutamin, asparagin, arginin hoặc lysin; monosacarit, disacarit và hydrat cacbon khác bao gồm glucoza, manosa hoặc dextrin; chất tạo chelat như EDTA; rượu đường như manitol hoặc sorbitol; các ion trái dấu tạo thành muối như natri; và/hoặc chất hoạt động bề mặt không ion như TweenTM, polyetylen glycol (polyethylene glycol - PEG) và PluronicTM.

Ngoài ra, “dược dụng” nghĩa là được cấp phép hoặc có thể được cấp phép bởi cơ quan điều hành liên bang hoặc chính quyền bang hoặc cơ quan tương ứng ở các nước khác Hoa Kỳ, hoặc được liệt kê trong Dược điển Hoa Kỳ hoặc các dược điển được công nhận chung khác sử dụng cho động vật, và cụ thể hơn là ở người.

Thuật ngữ “chất pH” hoặc “chất đệm” như được sử dụng trong bản mô tả này có thể chỉ hợp chất hoặc chất đệm hữu dụng làm chất điều chỉnh pH. Các chất này bao gồm, nhưng không giới hạn ở, chất đệm glyxerol, chất đệm xitrat, chất đệm borat, chất đệm axetat, chất đệm gluconat, chất đệm phosphat hoặc chất đệm axit xitric-phosphat cũng có thể được bao gồm. Chất pH hoặc chất đệm có thể được sử dụng với lượng thích hợp bất kỳ.

Thuật ngữ “chất bảo quản” như được mô tả trong bản mô tả này có thể chỉ chất hoặc chất hóa học mà ngăn ngừa sự thay đổi hóa học không mong muốn của hợp chất hoặc chế phẩm hoặc công thức được mô tả trong bản mô tả này. Các chất bảo quản thích hợp có thể bao gồm, ví dụ, benzalkoni clorua, thimerosal, clobutanol, metyl paraben, propyl paraben, rượu phenyletyl, axit edetat dinatri sorbic, Onamer M Polyquat, xetyl bromua, xetyl pyridin clorua, benzyl bromua, EDTA, phenylmercury nitrat, phenylmercury axetat, thimerosal, merthiolat, axetat và phenylmercury borat, polymyxin B sulphat, metyl và propyl paraben, amoni clorua bậc bốn, natri benzoat, natri proprionat và natri perborat, và các chất khác được biết đến với những người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật hoặc các dạng kết hợp của chúng. Chất bảo

quản có thể được sử dụng với lượng thích hợp bất kỳ.

Thuật ngữ “ngăn ngừa”, “việc ngăn ngừa” hoặc “sự ngăn ngừa” và các thuật ngữ tương đương khác như được sử dụng trong bản mô tả này, bao gồm để duy trì sự phát triển, sự tồn tại, sự cản trở hoặc ngăn chặn các triệu chứng của bệnh hoặc tình trạng bệnh cũng như là để làm giảm sự xuất hiện của các triệu chứng. Có thể ngăn ngừa hoàn toàn (tức là, không phát hiện triệu chứng) hoặc một phần, sao cho quan sát thấy ít triệu chứng có thể xuất hiện hơn khi không điều trị. Các thuật ngữ này còn bao gồm lợi ích phòng bệnh. Đối với bệnh hoặc tình trạng bệnh cần được ngăn ngừa, chế phẩm có thể được dùng cho bệnh nhân có nguy cơ phát triển bệnh cụ thể, hoặc cho bệnh nhân mắc một hoặc nhiều triệu chứng sinh lý của bệnh, mặc dù có thể chưa thực hiện chẩn đoán bệnh này.

Khoảng được đề xuất trong bản mô tả này được hiểu là cách viết tắt cho tất cả các giá trị nằm trong khoảng đó. Ví dụ, khoảng từ 1 đến 50 được hiểu là bao gồm số bất kỳ, sự kết hợp của nhiều số hoặc khoảng con từ nhóm bao gồm 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 hoặc 50 cũng như là tất cả các giá trị thập phân liên quan nằm giữa các số nguyên nêu trên như, ví dụ, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8 và 1,9. Đối với các khoảng con, “khoảng con lồng nhau” mà mở rộng từ điểm gốc của khoảng được bao hàm một cách cụ thể. Ví dụ, khoảng con lồng nhau của khoảng làm ví dụ là từ 1 đến 50 có thể chứa từ 1 đến 10, từ 1 đến 20, từ 1 đến 30 và từ 1 đến 40 theo một chiều, hoặc từ 50 đến 40, từ 50 đến 30, từ 50 đến 20 và từ 50 đến 10 theo chiều còn lại. Các khoảng có thể được biểu diễn trong bản mô tả này là từ “khoảng” một giá trị cụ thể, và/hoặc đến “khoảng” một giá trị cụ thể khác. Khi khoảng này được biểu diễn, một khía cạnh khác bao gồm từ một giá trị cụ thể và/hoặc đến giá trị cụ thể còn lại. Tương tự, khi các giá trị này được biểu diễn là xấp xỉ, bằng cách sử dụng từ “khoảng” ở trước, cần hiểu rằng giá trị cụ thể này tạo ra một khía cạnh khác. Còn được hiểu rằng các điểm gốc của mỗi khoảng trong số các khoảng đều là đáng kể so với điểm gốc còn lại, và độc lập với điểm gốc còn lại. Cũng hiểu rằng có một số giá trị được bộc lộ trong bản mô tả này, và mỗi giá trị cũng được bộc lộ trong bản mô tả này là “khoảng” giá trị cụ thể ngoài chính giá trị đó. Cũng hiểu rằng xuyên suốt đơn này, dữ liệu được cung cấp ở một số định dạng khác nhau và dữ liệu này thể hiện các điểm gốc và các điểm ban đầu và các khoảng kết hợp bất kỳ của các

điểm dữ liệu. Ví dụ, nếu một điểm dữ liệu cụ thể là “10” và một điểm dữ liệu cụ thể là “15” được bộc lộ, thì cần hiểu rằng lớn hơn, lớn hơn hoặc bằng, nhỏ hơn, nhỏ hơn hoặc bằng và bằng 10 và 15 được xem là được bộc lộ cũng như các giá trị nằm trong khoảng từ 10 đến 15. Cũng hiểu rằng mỗi đơn vị nằm giữa hai đơn vị cụ thể cũng được bộc lộ. Ví dụ, nếu 10 và 15 được bộc lộ, thì sau đó 11, 12, 13 và 14 cũng được bộc lộ.

“Protein tương tác thụ thể” hoặc “RIP1” như được sử dụng trong bản mô tả này mô tả protein kinaza là chất điều hòa quyết định sự tồn tại hoặc sự chết tế bào. RIP1 và RIP2 cũng sinh ra miền đầu tận cùng C thuộc siêu họ miền chết, cho phép bổ sung các phức hợp protein lớn khởi đầu các con đường truyền tín hiệu khác nhau.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, “muối” hoặc “dạng muối” hoặc “muối được dụng” có thể bao gồm muối cộng bazơ (được tạo ra từ nhóm carboxyl tự do hoặc các nhóm anion khác) thu được từ các bazơ vô cơ như, ví dụ, natri, kali, amoni, canxi hoặc sắt (III) hydroxit, và các bazơ hữu cơ là isopropylamin, triethylamin, 2-ethylamino-ethanol, histidin, procain và các chất tương tự. Các muối được tạo ra này là các muối cộng axit có nhóm cation tự do bất kỳ và thường được tạo ra từ axit vô cơ như, ví dụ, axit clohydric, axit sulfuric hoặc axit phosphoric, hoặc axit hữu cơ như axit axetic, axit xitric, axit p-toluensulfonic, axit metansulfonic, axit oxalic, axit tartaric, axit mandelic và các axit tương tự. Muối theo sáng chế có thể bao gồm muối amin được tạo ra bởi sự proton hóa nhóm amino bằng axit vô cơ như axit clohydric, axit bromhydric, axit hydroiodic, axit sulfuric, axit phosphoric và các axit tương tự. Muối theo sáng chế cũng bao gồm muối amin được tạo ra bởi sự proton hóa nhóm amino bằng axit hữu cơ thích hợp, như axit p-toluensulfonic, axit axetic và các axit tương tự. Tá được bổ sung là tá được được dự định dùng trong thực hiện sáng chế là các chất đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật, ví dụ, các chất được tìm thấy trong United States Pharmacopoeia Vol. XXII và National Formulary Vol. XVII, U.S. Pharmacopoeia Convention, Inc., Rockville, Md. (1989), nội dung của các tài liệu này được đưa vào phần mô tả bằng cách viện dẫn.

“Gel bán rắn” theo sáng chế là bán rắn. Độ nhớt biểu kiến của dạng bào chế bán rắn có thể tăng cùng với nồng độ.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, “dùng tuần tự” bao gồm việc dùng hai chất (ví dụ, hợp chất hoặc chế phẩm được mô tả trong bản mô tả này) xảy ra riêng rẽ

trong cùng ngày hoặc không xảy ra trong cùng ngày (ví dụ, xảy ra ở các ngày liên tiếp).

“Dung dịch” theo sáng chế có thể là dạng liều lỏng đồng nhất, trong mà chứa một hoặc nhiều chất hóa học được hòa tan trong dung môi hoặc hỗn hợp của dung môi trộn lẫn một cách tương hỗ. Dung dịch là chất điều chế lỏng mà chứa một hoặc nhiều chất hóa học hòa tan trong dung môi hoặc hỗn hợp thích hợp của dung môi trộn lẫn một cách tương hỗ. Vì các phân tử của chất làm thuốc trong dung dịch được phân tán đồng đều, nên việc sử dụng dung dịch làm dạng liều thường tạo ra sự đảm bảo liều đồng dạng khi dùng và độ chính xác tốt khi dung dịch này được pha loãng hoặc nếu không thì được trộn.

Thuật ngữ “dung môi” như được sử dụng trong bản mô tả này, chỉ dung môi lỏng dạng nước hoặc không phải dạng nước. Việc lựa chọn dung môi phụ thuộc đáng kể vào độ hòa tan của chế phẩm trong dung môi này và cách thức dùng. Dung môi nước có thể chứa chỉ nước, hoặc có thể chứa nước cùng với một hoặc nhiều dung môi trộn lẫn, và có thể chứa chất hòa tan được hòa tan như đường, chất đệm, muối hoặc tá dược khác. Dung môi không phải dạng nước được sử dụng phổ biến hơn là rượu hữu cơ mạch ngắn, như, metanol, etanol, propanol, keton mạch ngắn, như axeton và rượu đa chức, như glyxerol. Dung môi có thể có mặt với lượng thích hợp bất kỳ.

“Đối tượng” hoặc “bệnh nhân” có nghĩa là người hoặc động vật không phải người, như động vật có vú. “Đối tượng” có thể bao gồm động vật bất kỳ, bao gồm ngựa, chó, mèo, lợn, dê, thỏ, chuột đồng, khỉ, chuột lang, chuột cống, chuột nhắt, thằn lằn, rắn, cừu, gia súc, cá và chim. Đối tượng là con người có thể được đề cập đến là bệnh nhân.

“Huyền phù” như được sử dụng trong bản mô tả này là dạng liều lỏng mà chứa các hạt rắn phân tán trong chất dẫn thuốc dạng lỏng.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “hội chứng” có thể chỉ nhóm các triệu chứng mà xảy ra nhất quán cùng với nhau hoặc tình trạng bệnh được đặc trưng bởi tập hợp các triệu chứng liên quan. Hội chứng (ví dụ, hội chứng viêm ruột) có thể là tập hợp các dấu hiệu và triệu chứng y tế mà có liên quan đến nhau và thường liên quan đến bệnh cụ thể. Nói cách khác, bệnh có thể là tình trạng sức khỏe mà có thể xác định nguyên nhân rõ ràng đằng sau nó. Tuy nhiên, hội chứng (từ Hy Lạp có nghĩa là ‘đi kèm cùng nhau’) có thể tạo ra một số triệu chứng mà không xác định được

nguyên nhân. Chúng có thể gợi ý ra khả năng mắc bệnh tiềm ẩn hoặc thậm chí cơ hội phát triển bệnh.

Thuật ngữ “điều trị”, “việc điều trị” hoặc “sự điều trị” và các thuật ngữ tương đương khác như được sử dụng trong bản mô tả này, bao gồm việc làm dịu, làm giảm, cải thiện hoặc ngăn ngừa bệnh, tình trạng bệnh (ví dụ, bệnh viêm ruột) hoặc triệu chứng, ngăn ngừa các triệu chứng bổ sung, cải thiện hoặc ngăn ngừa nguyên nhân chuyển hóa tiềm ẩn của các triệu chứng, ức chế bệnh hoặc tình trạng bệnh, ví dụ, làm ngừng sự phát triển của bệnh hoặc tình trạng bệnh, làm giảm đau bệnh hoặc tình trạng bệnh, gây ra sự thoái triển của bệnh hoặc tình trạng bệnh, làm giảm đau tình trạng gây ra bởi bệnh hoặc tình trạng bệnh, hoặc làm dừng triệu chứng của bệnh hoặc tình trạng bệnh, và được dự định bao gồm việc phòng bệnh. Các thuật ngữ này còn bao gồm việc đạt được lợi ích trị liệu và/hoặc lợi ích phòng bệnh. Lợi ích trị liệu có nghĩa là sự tiêu diệt hoặc sự cải thiện rối loạn tiềm ẩn cần được điều trị. Ngoài ra, lợi ích trị liệu đạt được cùng với sự tiêu diệt hoặc sự cải thiện một hoặc nhiều triệu chứng sinh lý liên quan đến rối loạn tiềm ẩn sao cho sự cải thiện được quan sát thấy ở bệnh nhân, mặc dù bệnh nhân có thể vẫn bị đau do rối loạn tiềm ẩn.

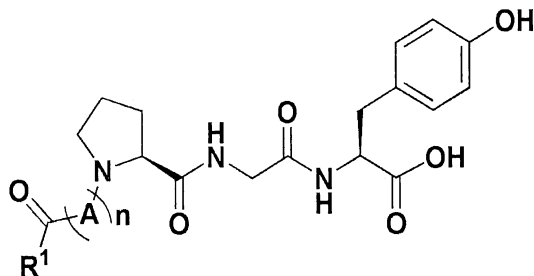
Như được sử dụng trong bản mô tả này, “độ nhớt” chỉ sự chống lại dòng chảy của chất lỏng. Chất nhớt có thể được sử dụng trong bản mô tả này và bao gồm, ví dụ, rượu polyvinyl, polyvinyl pyrrolidon, metyl xenluloza, hydroxy propyl metylxenluloza, hydroxyetyl xenluloza, carboxymetyl xenluloza, hydroxy propyl xenluloza, các chất khác đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật, hoặc hỗn hợp của chúng.

Thuật ngữ “phần trăm khối lượng” hoặc “% (khối lượng)” chỉ phần trăm của thành phần trong dung dịch mà được tính theo khối lượng thành phần và dung môi. Ví dụ, dung dịch 1% (khối lượng) của thành phần sẽ chứa 1 g thành phần được hòa tan trong 100 g dung môi. Thuật ngữ “phần trăm thể tích” hoặc “% (thể tích)” chỉ phần trăm của thành phần trong dung dịch mà được tính theo thể tích thành phần và dung môi. Ví dụ, dung dịch 1% (thể tích) của thành phần sẽ chứa 1 mL thành phần được hòa tan trong 100 mL dung môi. Thuật ngữ “phần trăm khối lượng/thể tích” hoặc “% (khối lượng/thể tích)” chỉ phần trăm của thành phần trong dung dịch mà được tính theo khối lượng thành phần và theo thể tích dung môi. Ví dụ, dung dịch 1,0% (khối lượng/thể tích) của thành phần sẽ chứa 1 g thành phần được hòa tan trong 100 mL dung môi.

2. Hợp chất:

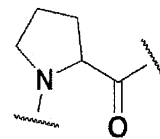
Như được thảo luận ở trên, một khía cạnh của sáng chế đề xuất hợp chất được biểu diễn bằng công thức 1 dưới đây, chất đồng phân quang học của nó hoặc muối được dụng của nó.

Công thức 1:



trong đó: n là 0, 1 hoặc 2; A là α , là axit amin độc lập được chọn từ nhóm bao gồm alanin, (Ala, A), arginin (Arg, R), asparagin (Asn, N), axit aspartic (Asp, D), cystein (Cys, C), axit glutamic (Glu, E), glutamin (Gln, Q), glyxin (Gly, G), histidin (His, H), isoleuxin (Ile, I), leuxin (Leu, L), lysin (Lys, K), methionin (Met, M), phenylalanin (Phe, F), prolin (Pro, P), serin (Ser, S), threonin (Thr, T), tryptophan (Trp, W), tyrosin (Tyr, Y) và valin (Val, V), cả hai đầu tận cùng của axit amin liên kết với nhóm cacbonyl hoặc nhóm amin bằng liên kết amit; và R^1 là C_{1-36} alkyl mạch thẳng hoặc mạch nhánh, C_{2-36} alkenyl mạch thẳng hoặc mạch nhánh chứa ít nhất một liên kết đôi hoặc C_{2-36} alkynyl mạch thẳng hoặc mạch nhánh chứa ít nhất một liên kết ba.

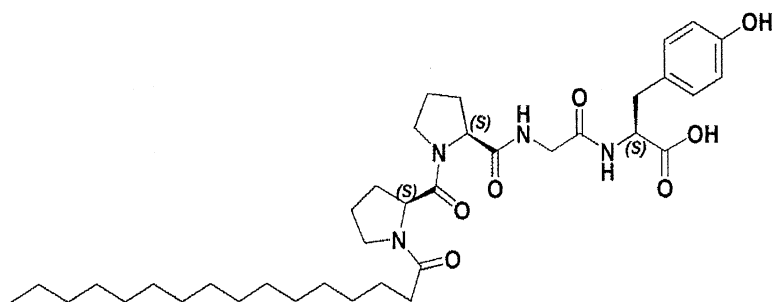
Thuật ngữ “hợp chất theo sáng chế” và các thuật ngữ tương đương, có nghĩa là bao gồm hợp chất có công thức như được mô tả ở trên, mà thuật ngữ này bao gồm muối được dụng và solvat, ví dụ, hydrat và solvat của muối được dụng mà ngữ cảnh cho phép.



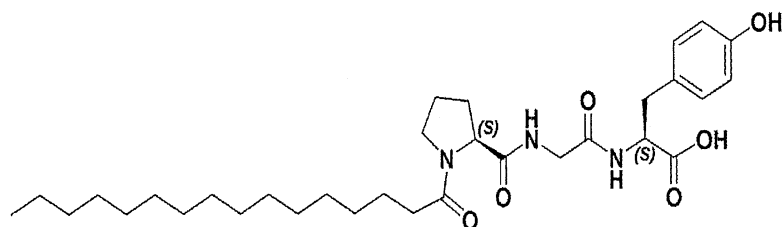
Theo một số phương án của sáng chế, α^1 có thể là C_{1-36} alkyl mạch thẳng hoặc mạch nhánh.

Các ví dụ không giới hạn về hợp chất bao gồm các hợp chất dưới đây:

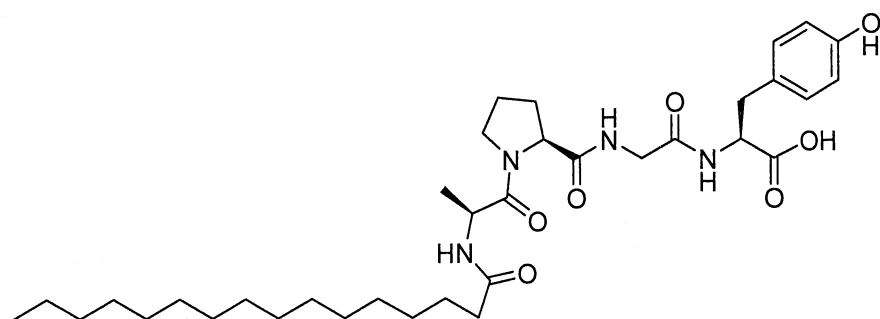
Công thức A:



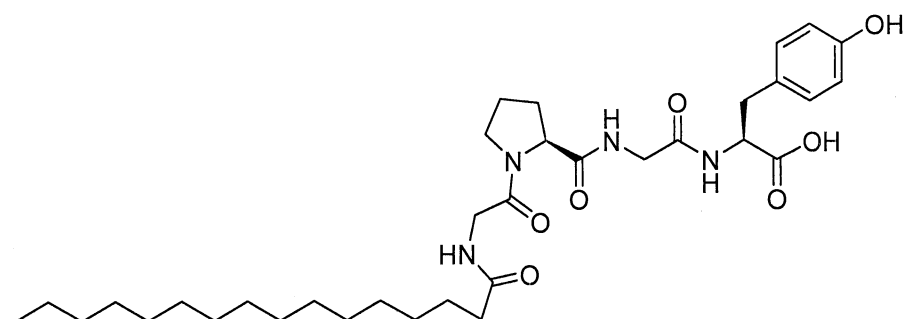
Công thức B:



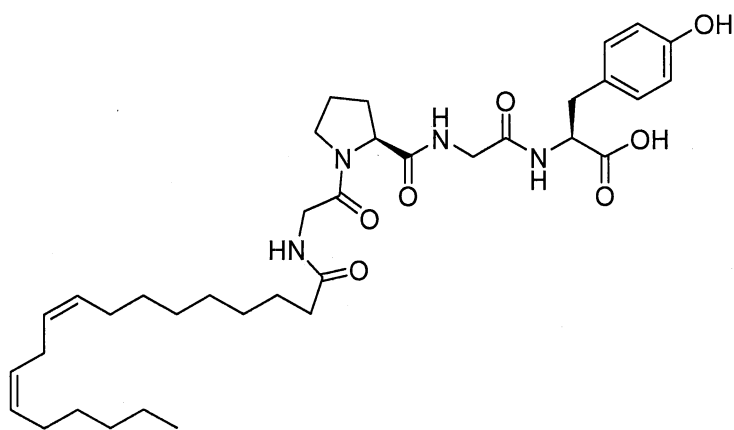
Công thức C:



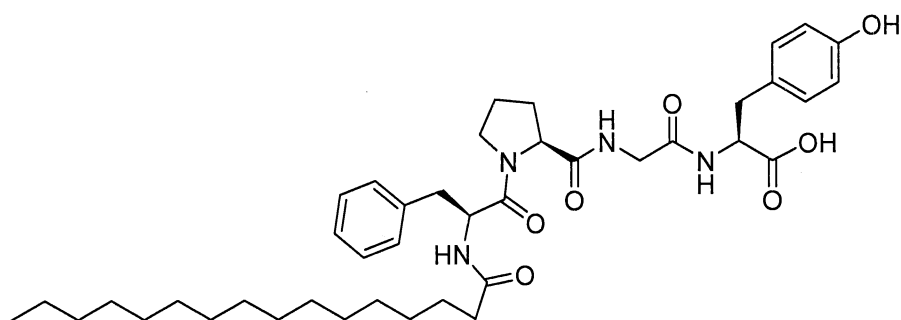
Công thức D:



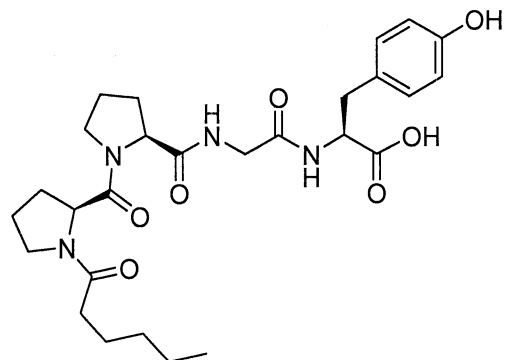
Công thức E:



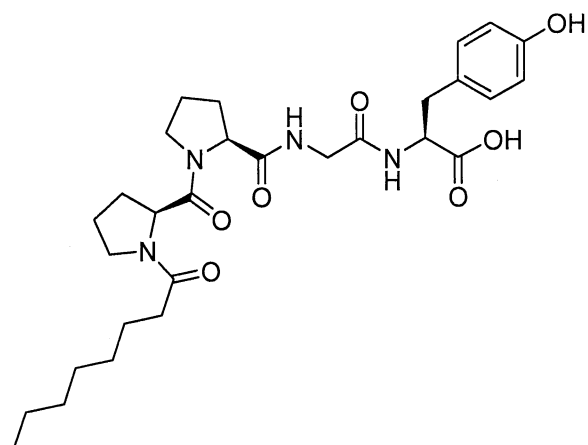
Công thức F:



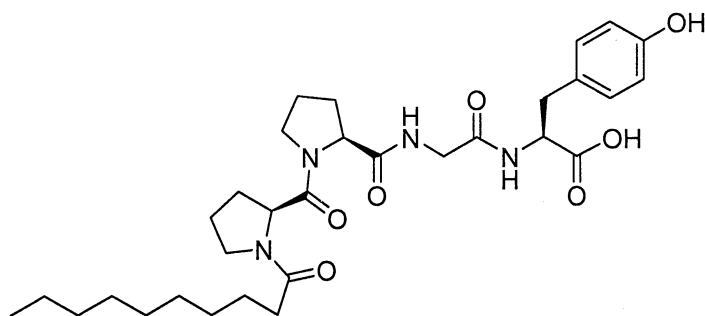
Công thức G:



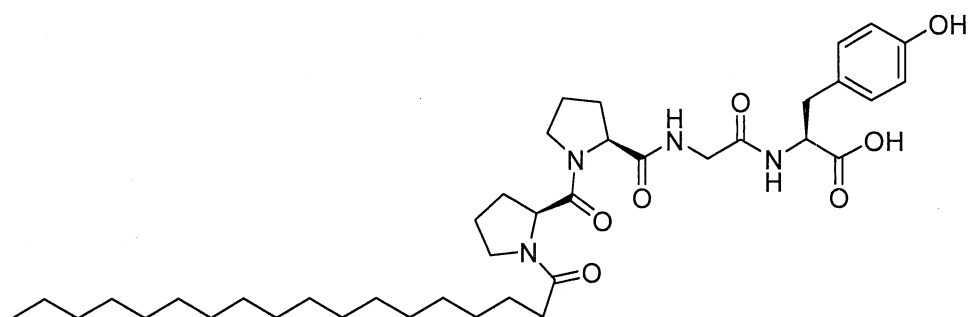
Công thức H:



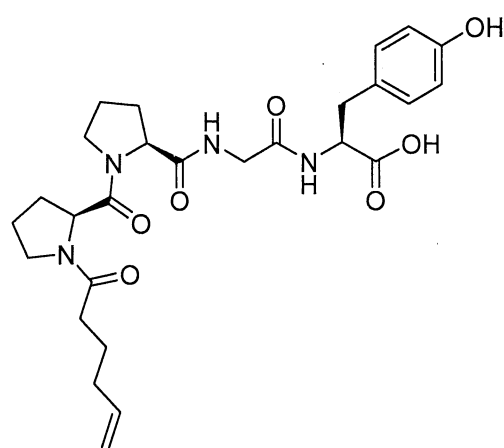
Công thức I:



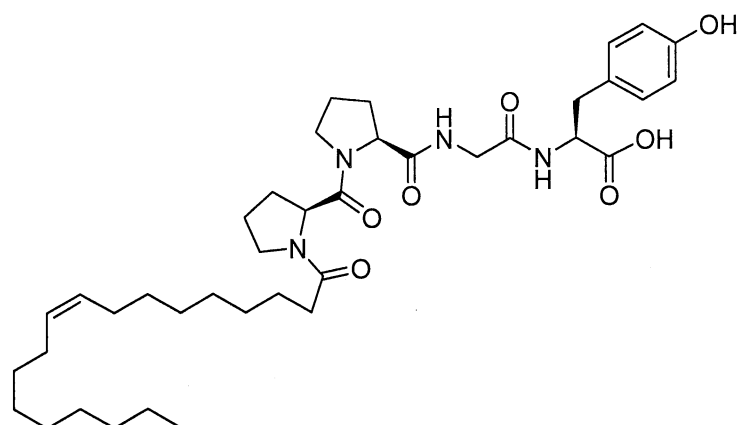
Công thức J:



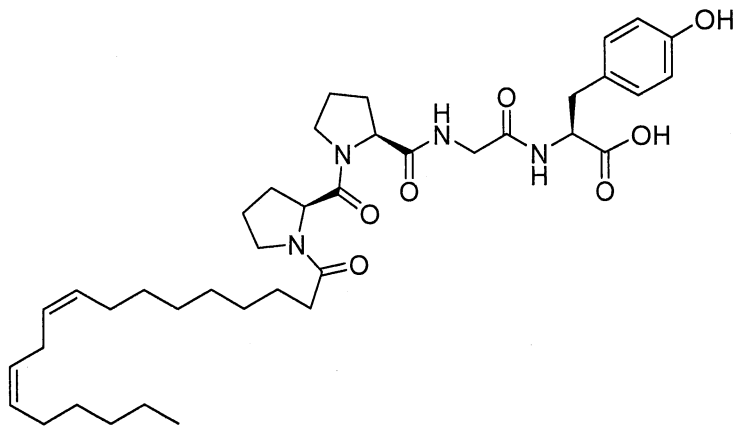
Công thức K:



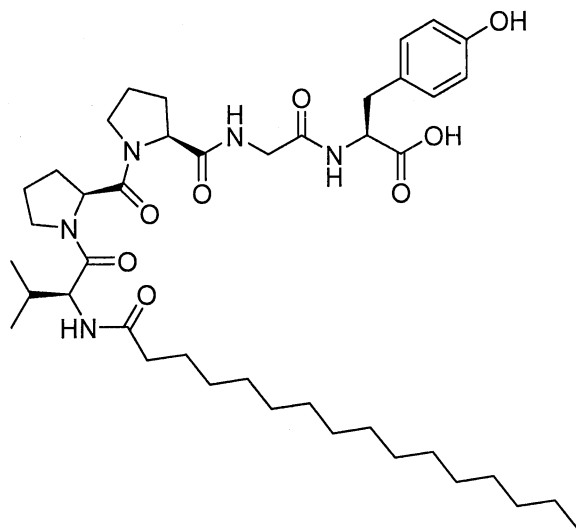
Công thức L:



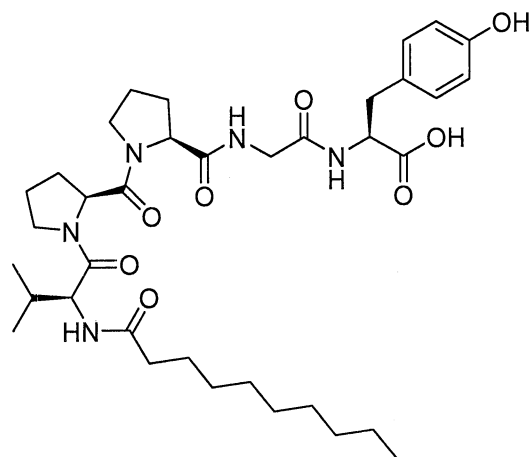
Công thức M:



Công thức N:



Công thức O:



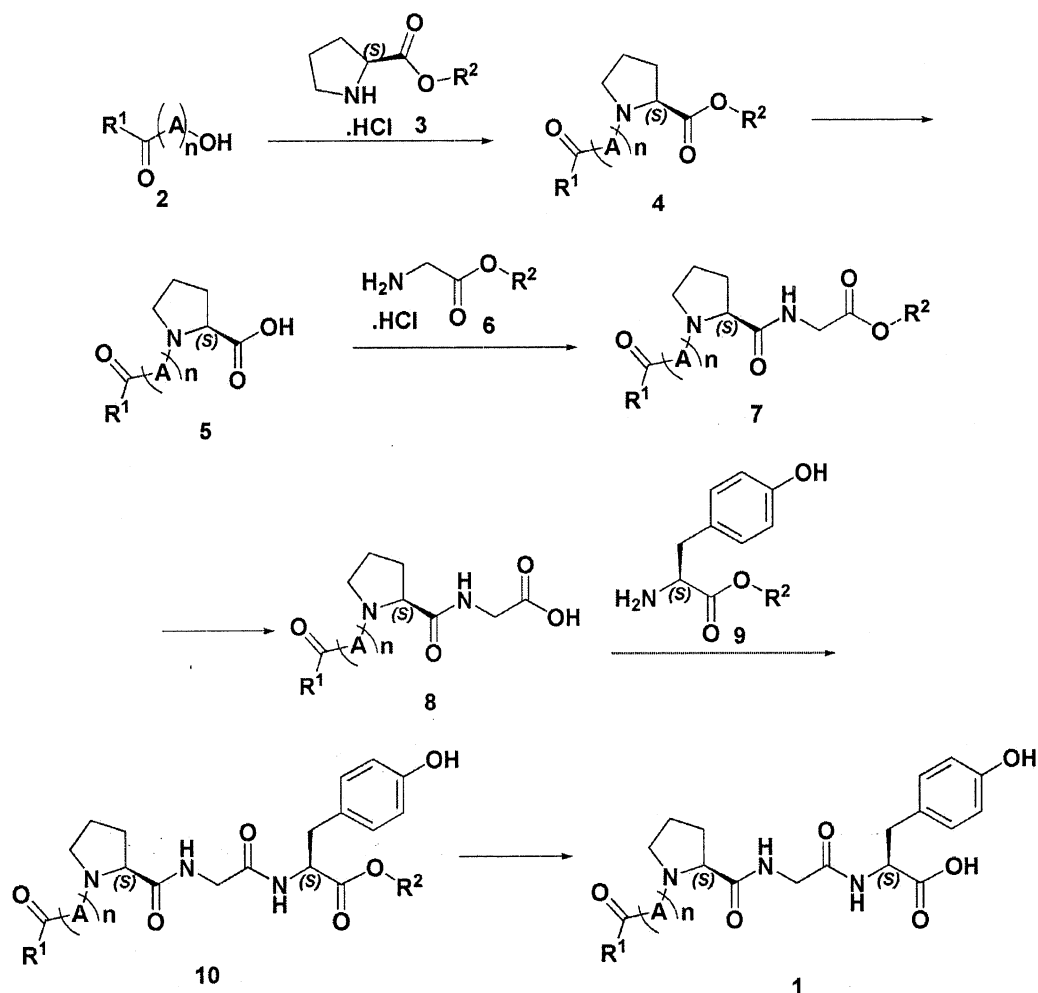
Hợp chất theo các phương án của sáng chế là hữu hiệu dùng để ngăn ngừa hoặc điều trị các bệnh khác nhau bao gồm các dấu hiệu viêm, bệnh ung thư và các dấu hiệu viêm mắt. Cụ thể hơn, các hợp chất này là hữu hiệu để ức chế sự biểu hiện của xytokin

và/hoặc chemokin (ví dụ, G-CSF, IL-2, SCF, VEGF, CX3CL1, IGFBP5, IGFBP6, IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-9, MCP-1, MIP-3 α , IL12p40/70, MIG, TNF- α và VCAM-1). Các hợp chất này cũng hữu hiệu để ức chế sự phân hủy của I κ B trong con đường truyền tín hiệu viêm được trung gian bởi MyD88 (phức chất myddosome) và/hoặc RIP 1, nhờ đó ngăn NF- κ B chuyển vào nhân của tế bào. Ngoài ra, nồng độ hữu hiệu của hợp chất trong tế bào/mô đích duy trì đủ thời gian.

3. Phương pháp điều chế:

Một khía cạnh khác theo sáng chế đề xuất phương pháp điều chế hợp chất được biểu diễn bằng công thức 1. Phương pháp này được minh họa bằng sơ đồ phản ứng 1 được thể hiện dưới đây, trong đó phương pháp này bao gồm các bước: cho hợp chất 2 phản ứng với hợp chất 3 để điều chế hợp chất 4 (bước 1); thủy phân hợp chất 4 với sự có mặt của bazơ để điều chế hợp chất 5 (bước 2); cho hợp chất 5 phản ứng với hợp chất 6 để điều chế hợp chất 7 (bước 3); thủy phân hợp chất 7 với sự có mặt của bazơ để điều chế hợp chất 8 (bước 4); cho hợp chất 8 phản ứng với hợp chất 9 để điều chế hợp chất 10 (bước 5); thủy phân hợp chất 10 với sự có mặt của bazơ để điều chế hợp chất có công thức I (bước 6).

Sơ đồ phản ứng 1:



trong đó A, R^1 và n là giống như được định nghĩa theo điểm 1 và R^2 là C_{1-5} alkyl mạch thẳng hoặc mạch nhánh.

Theo một số phương án, ở bước 1, hợp chất 2 có thể liên kết với hợp chất 3 khi có mặt 1-ety-3-(3-dimetylaminopropyl)carbodiimít (EDCI), hydroxybenzotriazol (HOBt) và bazơ. Bazơ này có thể là bazơ hữu cơ hoặc vô cơ. Các ví dụ không giới hạn về bazơ hữu cơ bao gồm pyridin, trietylamin (TEA), N,N-diisopropyletylamin (DIPEA), và 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU). Các ví dụ không giới hạn về bazơ vô cơ bao gồm natri hydroxit, natri cacbonat, kali cacbonat, xesi cacbonat và natri hydrua. Các chất này có thể được sử dụng theo hệ số tỷ lệ hoặc dư ra, riêng rẽ hoặc kết hợp. Các ví dụ không giới hạn về dung môi mà có thể được sử dụng để cho hợp chất 2 phản ứng với hợp chất 3 bao gồm ete (ví dụ, tetrahydrofuran (THF), dioxan, ete etyl và 1,2-dimetoxyetan), rượu (ví dụ, metanol, etanol, propanol, và butanol), dimetylformamit (DMF), dimetylsulfoxit (DMSO), diclometan (DCM), dicloetan, nước, axeton, benzensulfonat, toluensulfonat, clobenzensulfonat, xylensulfonat, etylaxetat, phenylaxetat, phenylpropionat, phenylbutyrat, xitrat, lactat, hydroxybutyrat,

glycolat, maleat, tartrat, metansulfonat, propansulfonat, naphtalen-1-sulfonat, naphtalen-2-sulfonat và mandelat. Dung môi có thể được sử dụng riêng rẽ hoặc kết hợp.

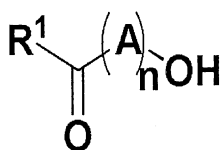
Bazơ ở bước 2 có thể là bazơ hữu cơ hoặc vô cơ. Tương tự, các ví dụ không giới hạn về bazơ hữu cơ mà có thể được sử dụng ở bước 2 bao gồm pyridin, triethylamin, N,N-diisopropyletylamin (DIPEA) và 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU). Các ví dụ không giới hạn về bazơ vô cơ bao gồm natri hydroxit, natri cacbonat, kali cacbonat, xesi cacbonat và natri hydrua. Các chất này có thể được sử dụng theo hệ số tỷ lệ hoặc dư ra, riêng rẽ hoặc kết hợp. Các ví dụ không giới hạn về dung môi mà có thể được sử dụng để cho hợp chất 4 phản ứng với hợp chất 5 bao gồm ete (ví dụ, tetrahydrofuran (THF), dioxan, ete etyl và 1,2-dimetoxyetan), rượu (ví dụ, metanol, etanol, propanol, và butanol), dimetylformamit (DMF), dimetylsulfoxit (DMSO), diclometan (DCM), dicloetan, nước, axeton, benzensulfonat, toluensulfonat, clobenzensulfonat, xylensulfonat, etylaxetat, phenylaxetat, phenylpropionat, phenylbutyrat, xitrat, lactat, hydroxybutyrat, glycolat, mandelat, tartrat, metansulfonat, propansulfonat, naphtalen-1-sulfonat, naphtalen-2-sulfonat và mandelat. Dung môi có thể được sử dụng riêng rẽ hoặc kết hợp.

Bước 3 và bước 5 có thể được thực hiện theo quy trình giống hoặc tương tự bước 1. Bước 4 và bước 6 có thể được thực hiện theo quy trình giống hoặc tương tự bước 2.

Điều chế hợp chất 2:

Các ví dụ về hợp chất 2 được biểu diễn bằng công thức 2 dưới đây, là nguyên liệu khởi đầu của sơ đồ phản ứng 1, có thể là được điều chế bằng, ví dụ, phương pháp điều chế A được mô tả dưới đây.

Công thức 2:



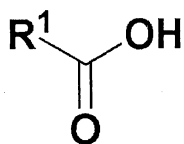
trong đó n là 0, 1 hoặc 2; A là -a¹-, là axit amin độc lập được chọn từ nhóm bao gồm alanin, (Ala, A), arginin (Arg, R), asparagin (Asn, N), axit aspartic (Asp, D),

xystein (Cys, C), axit glutamic (Glu, E), glutamin (Gln, Q), glyxin (Gly, G), histidin (His, H), isoleuxin (Ile, I), leuxin (Leu, L), lysin (Lys, K), methionin (Met, M), phenylalanin (Phe, F), prolin (Pro, P), serin (Ser, S), threonin (Thr, T), tryptophan (Trp, W), tyrosin (Tyr, Y) và valin (Val, V), cả hai đầu tận cùng của axit amin liên kết với nhóm cacbonyl hoặc nhóm amin bằng liên kết amit; và R^1 là C_{1-36} alkyl mạch thẳng hoặc mạch nhánh, C_{2-36} alkenyl mạch thẳng hoặc mạch nhánh chứa ít nhất một liên kết đôi hoặc C_{2-36} alkynyl mạch thẳng hoặc mạch nhánh chứa ít nhất một liên kết ba.

Phương pháp điều chế A:

Hợp chất được biểu diễn bằng công thức a thể hiện dưới đây được liên kết với axit amin được chọn từ nhóm bao gồm alanin, (Ala, A), arginin (Arg, R), asparagin (Asn, N), axit aspartic (Asp, D), xystein (Cys, C), axit glutamic (Glu, E), glutamin (Gln, Q), glyxin (Gly, G), histidin (His, H), isoleuxin (Ile, I), leuxin (Leu, L), lysin (Lys, K), methionin (Met, M), phenylalanin (Phe, F), prolin (Pro, P), serin (Ser, S), threonin (Thr, T), tryptophan (Trp, W), tyrosin (Tyr, Y) và valin (Val, V) khi có mặt 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimit, hydroxybenzotriazol và bazơ để tạo thành liên kết amit, nhờ đó điều chế hợp chất 2.

Công thức a:



(R^1 giống như được xác định ở công thức 2).

4. Chế phẩm/dạng bào chế:

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất chế phẩm dùng để ngăn ngừa, cải thiện và điều trị các bệnh khác nhau (ví dụ, các dấu hiệu viêm, bệnh ung thư và các dấu hiệu viêm mắt), trong đó chế phẩm này chứa thành phần hoạt tính là ít nhất một hợp chất, ít nhất một chất đồng phân quang học hoặc ít nhất một muối.

Chế phẩm theo một số phương án có thể ức chế sự biểu hiện của xytokin và/hoặc chemokin bao gồm G-CSF, IL-2, SCF, VEGF, CX3CL1, IGFBP5, IGFBP6, IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-9, MCP-1, MIP-3 α , IL12p40/70, MIG, TNF- α và VCAM-1. Chế phẩm theo các phương án khác có thể ức chế hoạt tính của NF- κ B. Chế phẩm theo

các phương án khác có thể ức chế sự tạo thành của phức chất truyền tín hiệu viêm được trung gian bởi MyD88. Chế phẩm theo các phương án khác có thể ức chế sự tạo thành của phức chất truyền tín hiệu viêm được trung gian bởi RIP1. Chế phẩm theo các phương án khác có thể ức chế sự tạo thành của phức chất truyền tín hiệu viêm được trung gian bởi Pellino-1.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất chế phẩm dùng để ngăn ngừa, cải thiện và điều trị bệnh viêm ruột (bao gồm các bệnh có liên quan chặt chẽ đến các rối loạn), chứa thành phần hoạt tính là ít nhất một hợp chất, ít nhất một chất đồng phân quang học hoặc ít nhất một muối. Bệnh viêm ruột có thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở, bệnh viêm ruột kết gây loét, bệnh Behcet và bệnh Crohn. Chế phẩm này có thể chứa thêm chất bổ trợ.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất chế phẩm dùng để ngăn ngừa, cải thiện hoặc điều trị bệnh xơ cứng rải rác, bệnh vẩy nến, chứng nhiễm khuẩn, bệnh teo địa lý, bệnh điểm vàng do lão hóa thể ướt, bệnh điểm vàng do lão hóa thể khô, bệnh võng mạc do đái tháo đường, bệnh phổi nhiễm khuẩn, bệnh viêm phổi do vi khuẩn, bệnh viêm phổi do virus, u lympho tế bào B lớn khuếch tán, nhiễm trùng do virus, bệnh tự miễn, bệnh ung thư máu bao gồm u lympho và các khối u trong các cơ quan bên trong, chứa thành phần hoạt tính là ít nhất một hợp chất, ít nhất một chất đồng phân quang học hoặc ít nhất một muối.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất chế phẩm dùng để ngăn ngừa, cải thiện hoặc điều trị bệnh rụng tóc, chứa thành phần hoạt tính là ít nhất một hợp chất, ít nhất một chất đồng phân quang học hoặc ít nhất một muối, trong đó thành phần hoạt tính này ức chế sự biểu hiện của IL-6 ở da đầu và nang tóc.

Sáng chế bao gồm các dạng bào chế phù hợp cho việc dùng hợp chất được mô tả trong bản mô tả này. Hợp chất được mô tả trong bản mô tả này có thể ở dạng bào chế (bao gồm dược phẩm) với chất bổ trợ như tá dược (ví dụ, một hoặc nhiều tá dược), chất chống oxy hóa (ví dụ, một hoặc nhiều chất chống oxy hóa), chất làm ổn định (ví dụ, một hoặc nhiều chất làm ổn định), chất bảo quản (ví dụ, một hoặc nhiều chất bảo quản), chất điều chỉnh pH và/hoặc chất đệm (ví dụ, một hoặc nhiều chất điều chỉnh pH và/hoặc chất đệm), chất điều chỉnh trương lực (ví dụ, một hoặc nhiều chất điều chỉnh trương lực), chất làm đặc (ví dụ, một hoặc nhiều chất làm đặc), chất tạo huyền phù (ví

dụ, một hoặc nhiều chất tạo huyền phù), chất kết dính (ví dụ, một hoặc nhiều chất kết dính), chất làm tăng độ nhót (ví dụ, một hoặc nhiều chất làm tăng độ nhót) và các chất tương tự, với điều kiện là các thành phần bổ sung là được dụng đối với các tình trạng bệnh cụ thể cần được điều trị. Theo một số phương án, dạng bào chế có thể bao gồm hỗn hợp của hai hoặc nhiều thành phần bổ sung như được mô tả trong bản mô tả này (ví dụ, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, hoặc nhiều thành phần bổ sung). Theo một số phương án, chất bổ trợ bao gồm chất xử lý và chất cải biến sự vận chuyển thuốc và các chất làm tăng cường, như, ví dụ, canxi phosphat, magie stearat, talc, monosacarit, disacarit, tinh bột, gelatin, xenluloza, metyl xenluloza, natri carboxymetyl xenluloza, dextroza, hydroxypropyl-beta-xyclodextrin, polyvinylpyrrolidinon, sáp có nhiệt độ nóng chảy thấp, nhựa trao đổi ion và các chất tương tự, cũng như là hỗn hợp của hai hoặc nhiều chất bất kỳ. Các tá dược được dụng thích hợp khác được mô tả trong các tài liệu “Remington’s Pharmaceutical Sciences,” Mack Pub. Co., New Jersey (1991), và “Remington: The Science and Practice of Pharmacy,” Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, tái bản lần thứ 20 (2003) và tái bản lần thứ 21 (2005), các tài liệu này được đưa vào phần mô tả bằng cách viện dẫn.

Các dạng bào chế của dược phẩm thích hợp cho việc dùng bằng cách bất kỳ có thể chấp nhận được về mặt y học được đề xuất trong sáng chế. Các dạng dược phẩm có thể chứa chất mang được dụng thích hợp với cách dùng và hợp chất được dụng (ché phẩm). Ví dụ, các dạng bào chế của chế phẩm được mô tả trong bản mô tả này có thể thích hợp cho việc dùng qua miệng. Chúng có thể được tạo ra ở các dạng khác nhau bao gồm dung dịch, nhũ tương, bán lỏng, bán rắn, gel, nhũ tương, thuốc mỡ, viên nén và kem. Dạng viên nén có thể chứa một hoặc nhiều trong số lactoza, sucroza, manitol, sorbitol, canxi phosphat, tinh bột ngô, tinh bột khoai tây, xenluloza vi tinh thể, gelatin, keo silicon dioxit, talc, magie stearat, axit stearic, và tá dược khác, chất tạo màu, chất độn, chất kết dính, chất pha loãng, chất đệm, chất làm ẩm, chất bảo quản, chất điều vị, thuốc nhuộm, chất phân hủy và chất mang tương thích được.

Chế phẩm (dạng bào chế) có thể được dùng qua nhiều đường bao gồm, không giới hạn ở, đường miệng, mũi, phổi, trực tràng, vào miệng, âm đạo, mắt và qua da. Cách thức, tần suất và lượng dùng chế phẩm (dạng bào chế) hữu hiệu có thể được quyết định theo phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật và/hoặc phương pháp được mô tả trong bản mô tả này (ví dụ, dùng qua miệng, 0,1-1.000 mg/ngày, một lần

một ngày). Ví dụ, chúng có thể được dùng riêng rẽ hoặc kết hợp. Ví dụ, chúng có thể được dùng đồng thời, được đồng sử dụng và/hoặc được dùng theo từng đợt.

5. Phương pháp sử dụng hợp chất, chế phẩm hoặc dạng bào chế:

Khía cạnh khác của sáng chế mô tả phương pháp dùng để ngăn ngừa, cải thiện hoặc điều trị các bệnh khác nhau (ví dụ, các dấu hiệu viêm, bệnh ung thư và các dấu hiệu viêm mắt), mà bao gồm việc dùng cho đối tượng cần điều trị chế phẩm (hoặc hợp chất hoặc dạng bào chế được mô tả trong bản mô tả này).

Theo một phương án, sáng chế mô tả phương pháp dùng để ngăn ngừa, cải thiện hoặc điều trị bệnh viêm ruột, mà bao gồm việc dùng chế phẩm (hoặc hợp chất hoặc dạng bào chế được mô tả trong bản mô tả này) cho đối tượng cần điều trị chế phẩm chứa thành phần hoạt tính là ít nhất một hợp chất, ít nhất một chất đồng phân quang học hoặc ít nhất một muối.

Theo một phương án khác, sáng chế mô tả phương pháp dùng để ngăn ngừa, cải thiện hoặc điều trị bệnh hoặc hội chứng, trong đó phương pháp này bao gồm việc dùng cho đối tượng cần điều trị chế phẩm chứa thành phần hoạt tính là ít nhất một hợp chất, ít nhất một chất đồng phân quang học hoặc ít nhất một muối. Bệnh hoặc hội chứng có thể liên quan đến sự tạo thành phức chất truyền tín hiệu viêm gây ra bởi Pellino-1 bao gồm MyD88, RIP1 hoặc cả hai. Bệnh hoặc hội chứng có thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở, bệnh xơ cứng rải rác, bệnh vẩy nến, chứng nhiễm khuẩn, bệnh teo địa lý, bệnh điểm vàng do lão hóa thể ướt, bệnh điểm vàng do lão hóa thể khô, bệnh vồng mạc do đái tháo đường, bệnh phổi nhiễm khuẩn, bệnh viêm phổi do vi khuẩn, bệnh viêm phổi do virus, u lympho tế bào B lớn khuếch tán, nhiễm trùng do virus, bệnh tự miễn, bệnh ung thư máu bao gồm u lympho và các khối u trong các cơ quan bên trong (ví dụ, gan, phổi, ruột, tuyến tiền liệt, tuyến tụy và các cơ quan tương tự).

Theo một phương án khác nữa, sáng chế mô tả phương pháp dùng để ngăn ngừa, cải thiện hoặc điều trị bệnh teo địa lý, bệnh điểm vàng do lão hóa thể ướt, bệnh điểm vàng do lão hóa thể khô hoặc bệnh vồng mạc do đái tháo đường, trong đó phương pháp này bao gồm việc dùng cho đối tượng cần điều trị chế phẩm chứa thành phần hoạt tính là ít nhất một hợp chất, ít nhất một chất đồng phân quang học hoặc ít nhất một muối. (Các) hợp chất, (các) chất đồng phân quang học và (các) muối có thể có tác dụng được trên tế bào biểu mô sắc tố võng mạc. Trong các tế bào biểu mô sắc tố võng

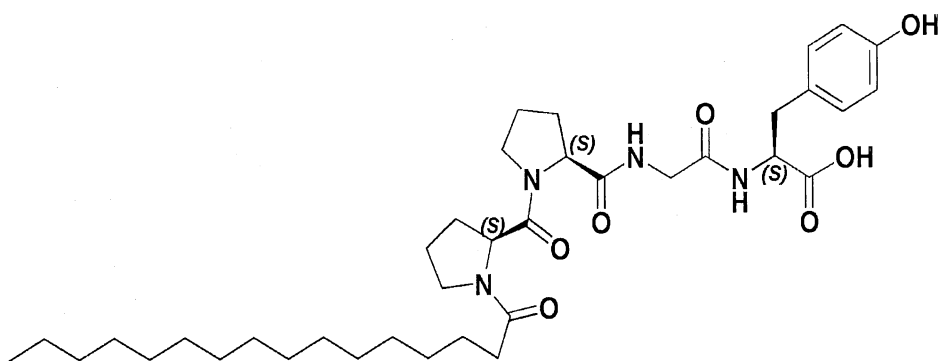
mạc, chúng có thể ức chế sự biểu hiện của ít nhất một protein được chọn từ nhóm bao gồm Nox-4, VEGF, VEGFR1, VEGFR2, Ang2, EPO và EPOR. Trong các tế bào biểu mô sắc tố võng mạc, chúng có thể làm tăng biểu hiện của Ang 1, Tie2 hoặc cả hai.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế sẽ được giải thích chi tiết hơn bằng các ví dụ dưới đây. Các ví dụ này được trình bày chỉ cho mục đích minh họa sáng chế và sáng chế không bị giới hạn bởi các ví dụ này.

Ví dụ 1: Điều chế hợp chất

Ví dụ 1.1: Axit (S)-3-(4-hydroxyphenyl)-2-(2-((S)-1-((S)-1-palmitoylpyrrolidin-2-cacbonyl)pyrrolidin-2-carboxamido)axetamido)propanoic (Pal-PPGY-OH)



Bước 1: Điều chế (S)-metyl 1-((S)-1-palmitoylpyrrolidin-2-cacbonyl)pyrrolidin-2-carboxylat

Dung dịch hỗn hợp được tạo ra bằng cách trộn axit (S)-1-palmitoylpyrrolidin-2-carboxylic (10,0 g, 28,3 mmol) được điều chế ở bước 2 theo ví dụ 1.2, EDCI (5,96 g, 31,1 mmol), HOBt (4,20 g, 31,1 mmol) và triethylamin (11,8 mL, 84,9 mmol) trong diclometan. Bổ sung prolin metyl este hydroclorua (5,15 g, 31,1 mmol) vào dung dịch hỗn hợp. Hỗn hợp tạo thành này được khuấy ở nhiệt độ phòng qua đêm, được cô dưới áp suất giảm, được pha loãng bằng dung dịch nước natri bicacbonat và được chiết bằng etyl axetat ba lần. Toàn bộ lớp hữu cơ được rửa bằng dung dịch nước muối và được rửa bằng HCl 1N ba lần. Sản phẩm được rửa bằng dung dịch nước muối, được làm khô bằng magie sulfat khan và được cô dưới áp suất giảm để thu được (S)-metyl 1-((S)-1-palmitoylpyrrolidin-2-cacbonyl)pyrrolidin-2-carboxylat (11,4 g, hiệu suất 87%).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 4,69-4,65 (m, 1 H), 4,54-4,58 (m, 1 H), 3,83-3,93 (m, 1 H), 3,58-3,72 (m, 5H), 3,45-3,53 (m, 1 H), 1,89-2,31 (m, 10 H), 1,60-1,64 (m, 2

H), 1,25 (m, 24 H), 0,88 (t, $J = 6,87\text{Hz}$, 3 H).

MS (ESI), được tính toán cho $\text{C}_{27}\text{H}_{48}\text{N}_2\text{O}_4$ 464,4, phát hiện m/z 465,2 ($\text{M} + \text{H}^+$).

Bước 2: Điều chế axit (S)-1-((S)-1-palmitoylpyrolidin-2-cacbonyl)pyrolidin-2-carboxylic

Trộn (S)-metyl 1-((S)-1-palmitoylpyrolidin-2-cacbonyl)pyrolidin-2-carboxylat (15,0 g, 32,3 mmol) được điều chế ở bước 1 với tetrahydrofuran. Bổ sung dung dịch nước natri hydroxit (2,58 g, 64,6 mmol) vào dung dịch hỗn hợp. Hỗn hợp tạo thành này được khuấy ở nhiệt độ phòng qua đêm và được cô. Bổ sung HCl 1N để điều chỉnh pH đến 1,0. Lớp nước của nó được chiết bằng etyl axetat ba lần. Toàn bộ lớp hữu cơ được làm khô bằng magie sulfat khan và được cô để thu được axit (S)-1-((S)-1-palmitoylpyrolidin-2-cacbonyl)pyrolidin-2-carboxylic (13,2 g, hiệu suất 91%) là chất rắn màu trắng.

MS (ESI), được tính toán cho $\text{C}_{26}\text{H}_{46}\text{N}_2\text{O}_4$ 450,3, phát hiện m/z 451,1 ($\text{M} + \text{H}^+$).

Bước 3: Điều chế etyl 2-((S)-1-((S)-1-palmitoylpyrolidin-2-cacbonyl)pyrolidin-2-carboxamido)axetat

Trộn axit (S)-1-((S)-1-palmitoylpyrolidin-2-cacbonyl)pyrolidin-2-carboxylic (12 g, 26,6 mmol) được điều chế ở bước 2 với diclometan. Bổ sung glyxin etyl este hydroclorua (4,09 g, 29,3 mmol), EDCI (5,62 g, 29,3 mmol), HOBt (3,96 g, 29,3 mmol) và trietyamin (11,1 mL, 79,8 mmol) vào dung dịch hỗn hợp. Hỗn hợp tạo thành này được khuấy ở nhiệt độ phòng qua đêm, được cô dưới áp suất giảm, được pha loãng bằng dung dịch nước natri cacbonat và được chiết bằng etyl axetat ba lần. Toàn bộ lớp hữu cơ được rửa bằng dung dịch nước muối và được rửa bằng HCl 1N ba lần. Lớp hữu cơ này được rửa bằng dung dịch nước muối, được làm khô bằng magie sulfat khan và được cô để thu được etyl 2-((S)-1-((S)-1-palmitoylpyrolidin-2-cacbonyl)pyrolidin-2-carboxamido)axetat (11,1 g, hiệu suất 78%).

MS (ESI), được tính toán cho $\text{C}_{30}\text{H}_{53}\text{N}_3\text{O}_5$ 535,4, phát hiện m/z 536,5 ($\text{M} + \text{H}^+$).

Bước 4: Điều chế axit 2-((S)-1-((S)-1-palmitoylpyrolidin-2-cacbonyl)pyrolidin-2-carboxamido)axetic

Trộn etyl 2-((S)-1-((S)-1-palmitoylpyrolidin-2-cacbonyl)pyrolidin-2-carboxamido)axetat (12 g, 22,4 mmol) được điều chế ở bước 3 với tetrahydrofuran.

Bổ sung dung dịch nước natri hydroxit (1,79 g, 44,8 mmol) vào dung dịch hỗn hợp. Hỗn hợp tạo thành này được khuấy ở nhiệt độ phòng qua đêm và được cô. Bổ sung HCl 1N để điều chỉnh pH đến 1,0. Lớp nước được chiết bằng etyl axetat ba lần. Toàn bộ lớp hữu cơ được làm khô bằng magie sulfat khan và được cô để thu được axit 2-((S)-1-((S)-1-palmitoylpyrolidin-2-cacbonyl)pyrolidin-2-carboxamido)axetic (9,5 g, hiệu suất 84%).

MS (ESI), được tính toán cho $C_{28}H_{49}N_3O_5$ 507,4, phát hiện m/z 508,2 ($M + H^+$).

Bước 5: Điều chế (S)-metyl 3-(4-hydroxyphenyl)-2-(2-((S)-1-((S)-1-palmitoylpyrolidin-2-cacbonyl)pyrolidin-2-carboxamido)axetamido)propanoat

Trộn axit 2-((S)-1-((S)-1-palmitoylpyrolidin-2-cacbonyl)pyrolidin-2-carboxamido)axetic (10 g, 19,7 mmol) được điều chế ở bước 4 với diclometan. Bổ sung tyrosin metyl este (4,23 g, 21,7 mmol), EDCI (4,16 g, 21,7 mmol), HOBt (21,7 g, 21,7 mmol) và triethylamin (8,19 mL, 59,1 mmol) vào dung dịch hỗn hợp. Hỗn hợp tạo thành này được khuấy ở nhiệt độ phòng qua đêm, được cô dưới áp suất giảm, được pha loãng bằng dung dịch nước natri bicacbonat và được chiết bằng etyl axetat ba lần. Toàn bộ lớp hữu cơ được rửa bằng dung dịch nước muối và được rửa bằng HCl 1N ba lần. Lớp hữu cơ này được rửa bằng dung dịch nước muối, được làm khô bằng magie sulfat khan, được cô và được tinh chế bằng MPLC để thu được (S)-metyl 3-(4-hydroxyphenyl)-2-(2-((S)-1-((S)-1-palmitoylpyrolidin-2-cacbonyl)pyrolidin-2-carboxamido)axetamido)propanoat (8,4 g, hiệu suất 62%).

MS (ESI), được tính toán cho $C_{37}H_{60}N_4O_7$ 684,4, phát hiện m/z 685,2 ($M + H^+$).

Bước 6: Điều chế axit (S)-3-(4-hydroxyphenyl)-2-(2-((S)-1-((S)-1-palmitoylpyrolidin-2-cacbonyl)pyrolidin-2-carboxamido)axetamido)propanoic

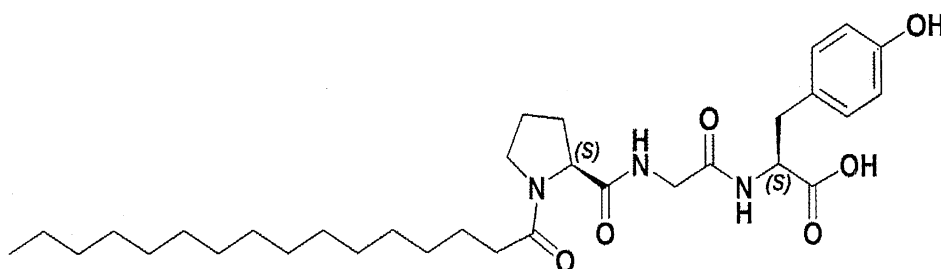
Trộn (S)-metyl 3-(4-hydroxyphenyl)-2-(2-((S)-1-((S)-1-palmitoylpyrolidin-2-cacbonyl)pyrolidin-2-carboxamido)axetamido)propanoat (4,9 g, 7,16 mmol) được điều chế ở bước 5 với tetrahydrofuran. Bổ sung dung dịch nước natri hydroxit (0,86 g, 21,5 mmol) vào dung dịch hỗn hợp. Hỗn hợp tạo thành này được khuấy ở nhiệt độ phòng qua đêm và được cô. Bổ sung HCl 1N để điều chỉnh pH đến 1,0. Lớp nước được chiết bằng etyl axetat ba lần. Toàn bộ lớp hữu cơ được làm khô bằng magie sulfat khan và được cô để thu được axit (S)-3-(4-hydroxyphenyl)-2-(2-((S)-1-((S)-1-palmitoylpyrolidin-2-cacbonyl)pyrolidin-2-carboxamido)axetamido)propanoic (4,5 g,

hiệu suất 93%).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, MeOD) δ 7,04 (d, $J = 8,31$ Hz, 2 H) 6,70 (d, $J = 8,37$ Hz, 2 H), 4,38-4,68 (m, 3 H), 3,44-4,04 (m, 6 H), 2,91-3,13 (m, 2 H), 1,81-2,38 (m, 10 H), 1,54-1,60 (m, 2 H), 1,30 (m, 24 H), 0,88 (t, $J = 6,63$ Hz, 3 H).

MS (ESI), được tính toán cho $\text{C}_{37}\text{H}_{58}\text{N}_4\text{O}_7$ 670,4, phát hiện m/z 671,3 ($\text{M} + \text{H}^+$).

Ví dụ 1.2: Axit (S)-3-(4-hydroxyphenyl)-2-(2-((S)-1-palmitoylpyrrolidin-2-carboxamido)axetamido)propanoic (Pal-PGY-OH)



Bước 1: (S)-metyl 1-palmitoylpyrrolidin-2-carboxylat

Trộn axit palmitic (7 g, 27,3 mmol), EDCI (5,78 g, 30,0 mmol), HOBt (4,05 g, 30,0 mmol) và triethylamin (11,4 mL, 81,9 mmol) với diclometan. Bổ sung prolin metyl este hydroclorua (4,97 g, 30,0 mmol) vào dung dịch hỗn hợp. Hỗn hợp tạo thành này được khuấy ở nhiệt độ phòng qua đêm, được cô dưới áp suất giảm, được pha loãng bằng dung dịch nước natri cacbonat và được chiết bằng etyl axetat ba lần. Toàn bộ lớp hữu cơ được rửa bằng dung dịch nước muối và được rửa bằng HCl 1N ba lần. Lớp hữu cơ này được rửa bằng dung dịch nước muối, được làm khô bằng magie sulfat khan và được cô dưới áp suất giảm để thu được (S)-metyl 1-palmitoylpyrrolidin-2-carboxylat (9,6 g, hiệu suất 96%) là chất lỏng nhớt.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 4,46-4,50 (m, 1 H), 3,47-3,75 (m, 5 H), 1,90-2,36 (m, 6 H), 1,59-1,69 (m, 2 H), 1,25 (m, 24 H), 0,88 (t, $J = 6,84$ Hz, 3H)

MS (ESI), được tính toán cho $\text{C}_{22}\text{H}_{41}\text{NO}_3$ 367,3, phát hiện m/z 368 ($\text{M} + \text{H}^+$).

Bước 2: Điều chế axit (S)-1-palmitoylpyrrolidin-2-carboxylic

Trộn (S)-metyl 1-palmitoylpyrrolidin-2-carboxylat (10,0 g, 27,2 mmol) được điều chế ở bước 1 với tetrahydrofuran. Bổ sung dung dịch nước natri hydroxit (3,26 g, 81,6 mmol) vào dung dịch hỗn hợp. Hỗn hợp tạo thành này được khuấy ở nhiệt độ phòng qua đêm và được cô. Bổ sung HCl 1N để điều chỉnh pH đến 1,0. Lớp nước

được chiết bằng etyl axetat ba lần. Toàn bộ lớp hữu cơ được làm khô bằng magie sulfat khan và được cô để thu được axit (S)-1-palmitoylpyrrolidin-2-carboxylic (8,6 g, hiệu suất 89%) là chất rắn màu trắng.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 4,59-62 (m, 1 H), 3,42-3,59 (m, 2H), 2,46-2,53 (m, 1 H), 2,33-2,38 (m, 2 H), 1,93-2,01 (m, 3 H), 1,62-1,69 (m, 2 H), 1,25 (m, 24 H), 0,88 (t, $J = 6,90$ Hz, 3 H)

MS (ESI), được tính toán cho $\text{C}_{21}\text{H}_{39}\text{NO}_3$ 353,3, phát hiện m/z 354,2 ($\text{M} + \text{H}^+$).

Bước 3: Điều chế (S)-etyl 2-(1- palmitoylpyrrolidin-2-carboxamido)axetat

Trộn axit (S)-1-palmitoylpyrrolidin-2-carboxylic (10 g, 28,3 mmol) được điều chế ở bước 2, glyxin etyl este hydroclorua (4,34 g, 31,1 mmol), EDCI (5,76 g, 31,1 mmol), HOBt (4,20 g, 31,1 mmol) và trietyamin (15,7 mL, 113 mmol) với diclometan. Hỗn hợp tạo thành này được khuấy ở nhiệt độ phòng qua đêm, được cô dưới áp suất giảm, được pha loãng bằng dung dịch nước natri cacbonat và được chiết bằng etyl axetat ba lần. Toàn bộ lớp hữu cơ được rửa bằng dung dịch nước muối và được rửa bằng HCl 1N ba lần. Lớp hữu cơ này được rửa bằng dung dịch nước muối, được làm khô bằng magie sulfat khan và được cô để thu được (S)-etyl 2-(1- palmitoylpyrrolidin-2-carboxamido)axetat (10,7 g, hiệu suất 86%).

MS (ESI), được tính toán cho $\text{C}_{25}\text{H}_{46}\text{N}_2\text{O}_4$ 438,3, phát hiện m/z 439,1 ($\text{M} + \text{H}^+$).

Bước 4: Điều chế axit (S)-2-(1-palmitoylpyrrolidin-2-carboxamido)axetic

Trộn (S)-etyl 2-(1- palmitoylpyrrolidin-2-carboxamido)axetat (12 g, 27,4 mmol) được điều chế ở bước 3 với tetrahydrofuran. Bổ sung dung dịch nước natri hydroxit (2,20 g, 54,7 mmol) vào dung dịch hỗn hợp. Hỗn hợp tạo thành này được khuấy ở nhiệt độ phòng qua đêm và được cô. Bổ sung HCl 1N để điều chỉnh pH đến 1,0. Lớp nước được chiết bằng etyl axetat ba lần. Toàn bộ lớp hữu cơ được làm khô bằng magie sulfat khan và được cô để thu được axit (S)-2-(1-palmitoylpyrrolidin-2-carboxamido)axetic (10,2 g, hiệu suất 91%) là chất rắn màu trắng.

MS (ESI), được tính toán cho $\text{C}_{23}\text{H}_{42}\text{N}_2\text{O}_4$ 410,3, phát hiện m/z 411,3 ($\text{M} + \text{H}^+$).

Bước 5: Điều chế (S)-metyl 3-(4-hydroxyphenyl)-2-(2-((S)-1-palmitoylpyrrolidin -2-carboxamido)axetamido)propanoat

Trộn axit (S)-2-(1-palmitoylpyrrolidin-2-carboxamido)axetic (7 g, 27,3 mmol)

được điều chế ở bước 4 với diclometan. Bổ sung tyrosin methyl este (5,86 g, 30,0 mmol), EDCI (5,78 g, 30,0 mmol), HOBt(4,05 g, 30,0 mmol) và triethylamin (11,4 mL, 81,9 mmol) vào dung dịch hỗn hợp. Hỗn hợp tạo thành này được khuấy ở nhiệt độ phòng qua đêm, được cô dưới áp suất giảm, được pha loãng bằng dung dịch nước natri bicacbonat và được chiết bằng etyl axetat ba lần. Toàn bộ lớp hữu cơ được rửa bằng dung dịch nước muối và được rửa bằng HCl 1N ba lần. Lớp hữu cơ này được rửa bằng dung dịch nước muối, được làm khô bằng magie sulfat khan, được cô và được tinh chế bằng MPLC để thu được (S)-methyl 3-(4-hydroxyphenyl)-2-(2-((S)-1-palmitoylpyrrolidin -2-carboxamido)axetamido)propanoat (9,8 g, hiệu suất 61%).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 7,25-7,50 (m, 3 H), 6,93 (d, $J = 8,34$ Hz, 2 H), 6,70 (d, $J = 8,34$ Hz, 2 H), 4,70-4,77 (m, 1 H), 4,39-4,43 (m, 1 H), 3,95-4,21 (m, 1 H), 3,41-3,72 (m, 5 H), 2,92-3,12 (m, 2 H), 1,91-2,35 (m, 7 H), 1,57-1,61 (m, 2 H), 1,25 (m, 24 H), 0,88 (t, $J = 6,87$ Hz, 3 H)

MS (ESI), được tính toán cho $\text{C}_{33}\text{H}_{53}\text{N}_3\text{O}_6$ 587,4, phát hiện m/z 588,1 ($\text{M} + \text{H}^+$).

Bước 6: Điều chế axit (S)-3-(4-hydroxyphenyl)-2-(2-((S)-1-palmitoylpyrrolidin -2-carboxamido)axetamido)propanoic

Trộn (S)-methyl 3-(4-hydroxyphenyl)-2-(2-((S)-1-palmitoylpyrrolidin -2-carboxamido)axetamido)propanoat (2,85 g, 4,85 mmol) được điều chế ở bước 5 với tetrahydrofuran. Bổ sung dung dịch nước natri hydroxit (0,58 g, 14,6 mmol) vào dung dịch hỗn hợp. Hỗn hợp tạo thành này được khuấy ở nhiệt độ phòng qua đêm và được cô. Bổ sung HCl 1N để điều chỉnh pH đến 1,0. Lớp nước được chiết bằng etyl axetat ba lần. Toàn bộ lớp hữu cơ được làm khô bằng magie sulfat khan và được cô để thu được axit (S)-3-(4-hydroxyphenyl)-2-(2-((S)-1-palmitoylpyrrolidin -2-carboxamido)axetamido)propanoic (2,2 g, hiệu suất 79%) là chất rắn màu trắng.

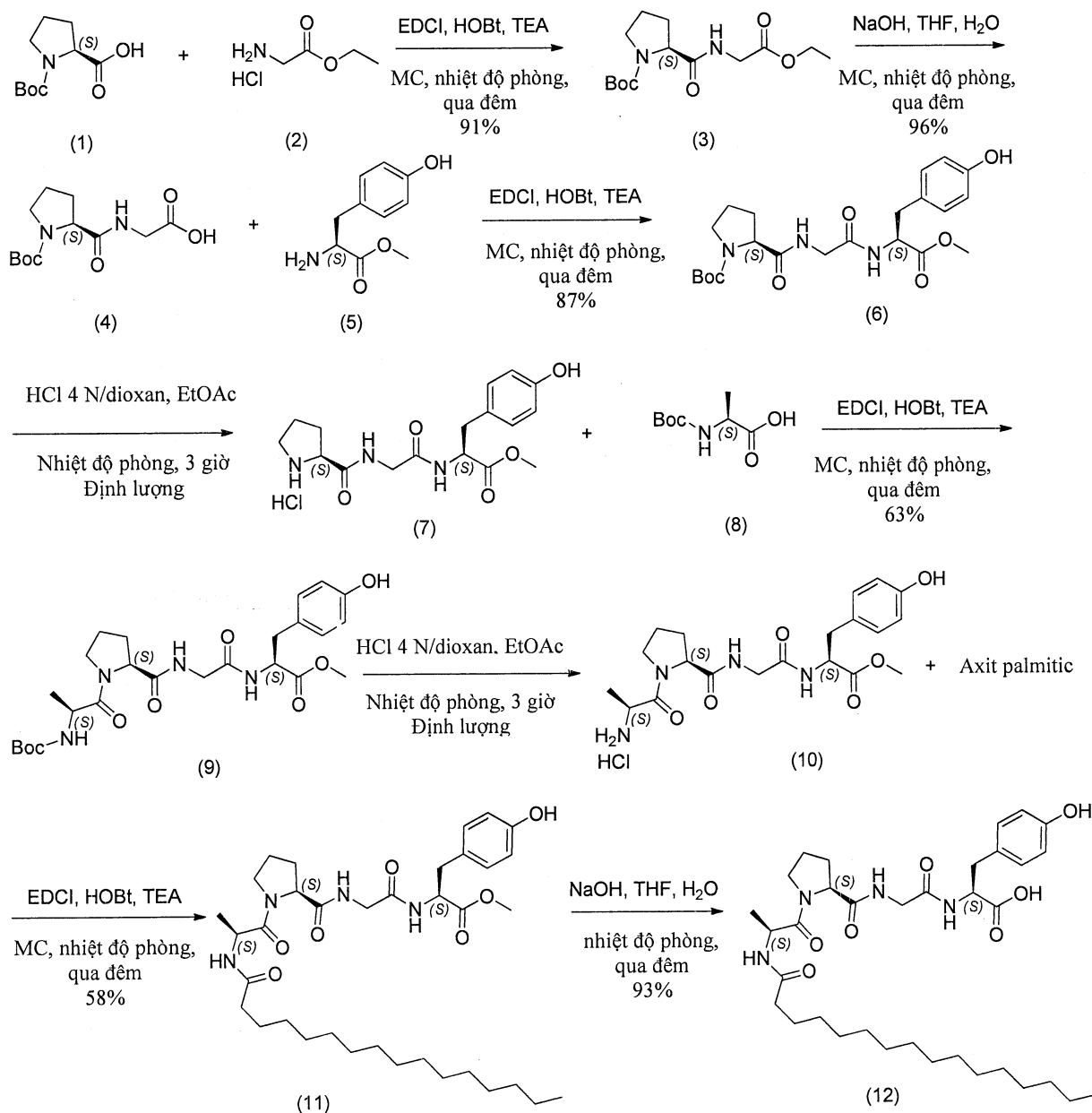
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, MeOD) δ 7,03 (d, $J = 8,40$ Hz, 2 H), 6,70 (d, $J = 8,40$ Hz, 2 H), 4,58-4,61 (m, 1 H), 4,33-4,56 (m, 1 H), 3,58-4,37 (m, 4 H), 2,96-3,15 (m, 2 H), 1,92-2,39 (m, 6 H), 1,55-1,62 (m, 2 H), 1,29 (m, 24 H), 0,91 (t, $J = 6,87$ Hz, 3 H)

MS (ESI), được tính toán cho $\text{C}_{32}\text{H}_{51}\text{N}_3\text{O}_6$ 573,4, phát hiện m/z 574,2 ($\text{M} + \text{H}^+$).

Ví dụ 1.3: Palmitoyl-L-alanyl-L-prolylglyxyl-L-tyrosin (pal-APGY-OH)

Hợp chất được điều chế theo sơ đồ phản ứng 2 dưới đây.

Sơ đồ phản ứng 2



Trộn hợp chất (1) (10 g, 46,5 mmol), hợp chất (2) (7,15 g, 51,2 mmol), EDCI·HCl (9,82 g, 51,2 mmol), HOBT (6,92 g, 51,2 mmol) và trietylamin (19,4 mL, 140 mmol) với diclometan. Hỗn hợp tạo thành này được khuấy ở nhiệt độ phòng qua đêm, được cô dưới áp suất giảm, được pha loãng bằng dung dịch nước natri cacbonat, và được chiết bằng etyl axetat ba lần. Toàn bộ lớp hữu cơ được rửa bằng dung dịch nước muối và được rửa bằng HCl 1N ba lần. Lớp hữu cơ này được rửa bằng dung dịch nước muối, được làm khô bằng magie sulfat khan và được cô dưới áp suất giảm để thu được hợp chất (3) (hiệu suất 91%) là chất lỏng nhớt.

LC-MS (ESI): được tính toán cho $C_{14}H_{24}N_2O_5$ 300,2, phát hiện m/z 301,2 ($M + H^+$).

Trộn hợp chất (3) (12 g, 40 mmol) với tetrahydrofuran. Bổ sung dung dịch nước natri hydroxit (6,40 g, 160 mmol) vào dung dịch hỗn hợp. Hỗn hợp tạo thành này được khuấy ở nhiệt độ phòng qua đêm và được cô. Bổ sung HCl 1N để điều chỉnh pH đến 1,0. Lớp nước được chiết bằng ethyl axetat ba lần. Toàn bộ lớp hữu cơ được làm khô bằng magie sulfat khan và được cô để thu được hợp chất (4) (hiệu suất 96%) là chất rắn màu trắng.

LC-MS (ESI): được tính toán cho $C_{12}H_{20}N_2O_5$ 272,1, phát hiện m/z 273,1 ($M + H^+$).

Trộn hợp chất (4) (6,25 g, 23 mmol), hợp chất (5) (4,85 g, 25,3 mmol), EDCI·HCl (4,85 g, 25,3 mmol), HOBt (43,42 g, 25,3 mmol) và triethylamin (TEA, 12,8 mL, 96 mmol) với diclometan. Hỗn hợp tạo thành này được khuấy ở nhiệt độ phòng qua đêm, được cô dưới áp suất giảm, được pha loãng bằng dung dịch nước natri cacbonat và được chiết bằng ethyl axetat ba lần. Toàn bộ lớp hữu cơ được rửa bằng dung dịch nước natribicacbonat hai lần, được rửa bằng dung dịch nước muối và được rửa bằng HCl 1N ba lần. Lớp hữu cơ này được rửa bằng dung dịch nước muối, được làm khô bằng magie sulfat khan và được cô để thu được hợp chất (6) (hiệu suất 87%) là chất rắn màu trắng.

LC-MS (ESI): được tính toán cho $C_{22}H_{31}N_3O_7$ 449,2, phát hiện m/z 450,2 ($M + H^+$).

Hòa tan hợp chất (6) (8 g, 17,8 mmol) trong ethyl axetat. Bổ sung lượng dư HCl 4 N trong dioxan ở nhiệt độ phòng. Hỗn hợp tạo thành này được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 4 giờ và được cô dưới áp suất giảm để thu được hợp chất (7) là chất rắn màu trắng.

LC-MS (ESI): được tính toán cho $C_{17}H_{23}N_3O_5$ 349,2, phát hiện m/z 350,2 ($M + H^+$).

Trộn hợp chất (7) (0,25 g, 0,65 mmol), hợp chất (8) (Boc-alanin, 0,12 g, 0,65 mmol), EDCI·HCl (0,25 g, 1,30 mmol), HOBt (0,18 g, 1,30 mmol), và triethylamin (0,36 mL, 2,60 mmol) với diclometan. Hỗn hợp tạo thành này được khuấy ở nhiệt độ

phòng qua đêm, được cô dưới áp suất giảm, được pha loãng bằng dung dịch nước natri cacbonat và được chiết bằng etyl axetat ba lần. Toàn bộ lớp hữu cơ được rửa bằng dung dịch nước natri bicacbonat hai lần, được rửa bằng dung dịch nước muối, và được rửa bằng HCl 1N ba lần. Lớp hữu cơ này được rửa bằng dung dịch nước muối, được làm khô bằng magie sulfat khan, được cô và được tinh chế bằng cách sử dụng MPLC (diclometan/2-propanol) để thu được hợp chất (9) (hiệu suất 3%).

LC-MS (ESI): được tính toán cho $C_{25}H_{36}N_4O_8$ 520,3, phát hiện m/z 520,7 ($M + H^+$).

Hòa tan hợp chất (9) (0,11 g, 0,21 mmol) trong etyl axetat. Bổ sung lượng dư HCl 4 N trong dioxan ở nhiệt độ phòng và khuấy ở nhiệt độ phòng trong 4 giờ. Hỗn hợp tạo thành này được cô dưới áp suất giảm để thu được hợp chất (10) là chất rắn màu trắng.

LC-MS (ESI): được tính toán cho $C_{20}H_{28}N_4O_6$ 420,2, phát hiện m/z 420,6 ($M + H^+$).

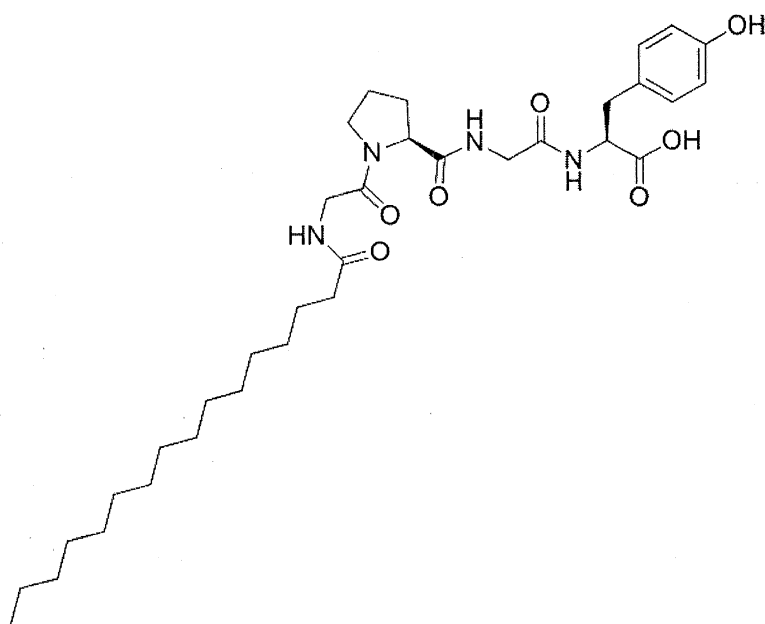
Bổ sung hợp chất (10) (0,04 g, 0,09 mmol), EDCI.HCl (0,03 g, 0,16 mmol), HOBT (0,02 g, 0,16 mmol) và triethylamin (0,04 mL, 0,32 mmol) vào dung dịch axit palmitic (0,02 g, 0,08 mmol) trong diclometan. Sản phẩm được khuấy ở nhiệt độ phòng qua đêm, được cô dưới áp suất giảm, được pha loãng bằng dung dịch nước natri cacbonat và được chiết bằng etyl axetat ba lần. Toàn bộ lớp hữu cơ được rửa bằng dung dịch nước muối và được rửa bằng HCl 1N ba lần. Lớp hữu cơ này được rửa bằng dung dịch nước muối, được làm khô bằng magie sulfat khan, được cô và được tinh chế bằng cách sử dụng MPLC (diclometan/2-propanol) để thu được hợp chất (11) (hiệu suất 58%).

LC-MS (ESI): được tính toán cho $C_{36}H_{58}N_4O_7$ 658,4, phát hiện m/z 659,1 ($M + H^+$).

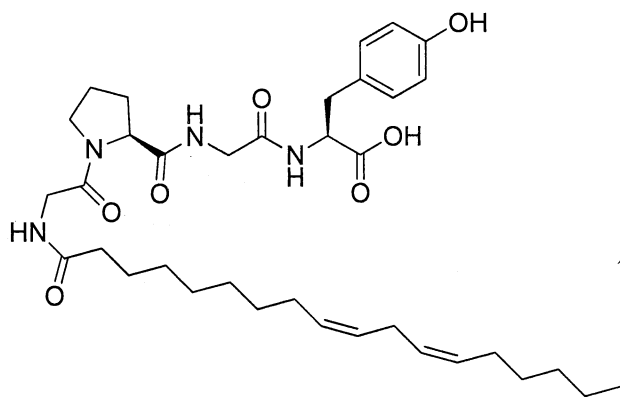
Trộn hợp chất (11) (0,03 g, 0,05 mmol) với tetrahydrofuran. Bổ sung dung dịch nước natri hydroxit (0,008 g, 0,20 mmol). Hỗn hợp tạo thành này được khuấy ở nhiệt độ phòng qua đêm và được cô. Bổ sung HCl 1N để điều chỉnh pH đến 1,0. Lớp nước được chiết bằng etyl axetat ba lần. Toàn bộ lớp hữu cơ được làm khô bằng magie sulfat khan và được cô để thu được hợp chất (12) (hiệu suất 93%) là chất rắn màu trắng.

^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ 7,05 (d, $J = 8,50$ Hz, 2 H), 6,70 (d, $J = 8,50$ Hz, 2 H), 4,59-4,65 (m, 2 H), 4,39-4,41 (m, 1 H), 3,96-3,99 (m, 1 H), 3,84-3,89 (m, 1 H), 3,65-3,76 (m, 2 H), 3,10-3,14 (m, 1 H), 2,97-3,01 (m, 1 H), 2,20-2,24 (m, 3 H), 2,09-2,14 (m, 1 H), 1,96-2,03 (m, 2 H), 1,58-1,60 (m, 3 H), 1,31-1,36 (m, 30 H), 0,92 (t, $J = 7,15$ Hz, 3 H). LC-MS (ESI): được tính toán cho $\text{C}_{35}\text{H}_{56}\text{N}_4\text{O}_7$ 644,4, phát hiện m/z 644,6 ($\text{M} + \text{H}^+$).

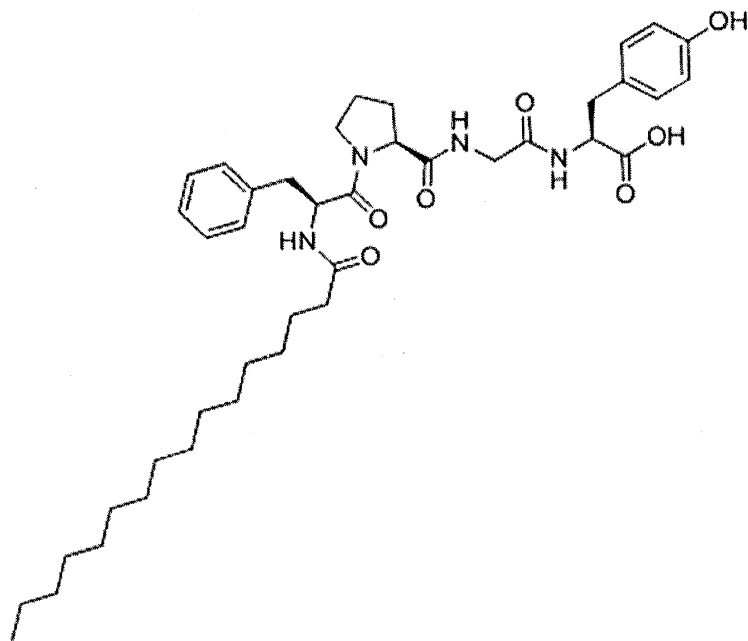
Hợp chất theo các ví dụ từ 1.4 đến 1.15 được điều chế theo cách tương tự như được mô tả trong ví dụ 1.3, bằng cách sử dụng hợp chất (7) làm nguyên liệu khởi đầu. Dữ liệu NMR của các hợp chất này được thể hiện dưới đây.



Ví dụ 1.4: Palmitoylglyxyl-L-prolylglyxyl-L-tyrosin (pal-GPGY-OH) ^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ 7,03 (d, $J = 8,50$ Hz, 2 H), 6,70 (d, $J = 8,50$ Hz, 2 H), 4,58-4,63 (m, 1 H), 4,39-4,42 (m, 1 H), 3,90-4,08 (m, 4 H), 3,59-3,74 (m, 3 H), 3,09-3,12 (m, 1 H), 2,96-3,00 (m, 1 H), 1,99-2,31 (m, 7 H), 1,56-1,66 (m, 3 H), 1,24-1,35 (m, 26 H), 0,92 (t, $J = 7,05$ Hz, 3 H). LC-MS (ESI): được tính toán cho $\text{C}_{34}\text{H}_{54}\text{N}_4\text{O}_7$ 630,4, phát hiện m/z 630,8 ($\text{M} + \text{H}^+$).

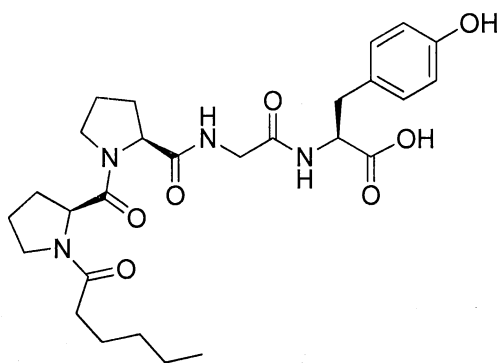


Ví dụ 1.5: ((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoyl)glyxyl-L-prolylglyxyl-L-tyrosin (linoleyl-GPGY-OH) ^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ 7,03 (d, $J = 8,50$ Hz, 2 H), 6,71 (d, $J = 8,50$ Hz, 2 H), 5,31-5,41 (m, 4 H), 4,58-4,62 (m, 1 H), 4,39-4,42 (m, 1 H), 3,99-4,08 (m, 2 H), 3,70-3,73 (m, 1 H), 3,59-3,67 (m, 1 H), 3,09-3,12 (m, 1 H), 2,96-3,00 (m, 1 H), 2,78-2,79 (m, 3 H), 2,25-2,31 (m, 1 H), 2,18-2,22 (m, 2 H), 1,99-2,13 (m, 7 H), 1,56-1,64 (m, 3 H), 1,31-1,42 (m, 18 H), 0,93 (t, $J = 7,10$ Hz, 3 H). LC-MS (ESI): được tính toán cho $\text{C}_{36}\text{H}_{54}\text{N}_4\text{O}_7$ 654,4, phát hiện m/z 655 ($\text{M} + \text{H}^+$).



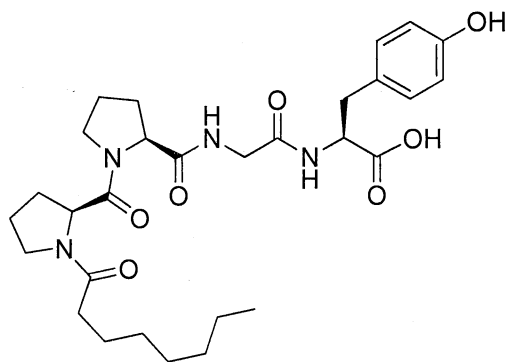
Ví dụ 1.6: Palmitoyl-L-phenylalanyl-L-prolylglyxyl-L-tyrosin (pal-FPGY-OH) ^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ 7,27-7,28 (m, 5 H), 7,07 (d, $J = 8,45$ Hz, 2 H), 6,71 (d, $J = 8,30$ Hz, 2 H), 4,59-4,63 (m, 1 H), 4,40-4,42 (m, 1 H), 3,99-4,02 (m, 1 H), 3,85-3,89 (m, 1 H), 3,73-3,78 (m, 1 H), 3,52-3,55 (m, 1 H), 3,09-3,16 (m, 2 H), 2,86-3,02 (m, 3 H), 1,95-2,22 (m, 8 H), 1,44-1,62 (m, 4 H), 1,31 (m, 25 H), 0,92 (t, $J = 7,10$ Hz, 3 H). LC-MS (ESI): được tính toán cho $\text{C}_{41}\text{H}_{60}\text{N}_4\text{O}_7$ 720,4, phát hiện m/z 721,1 ($\text{M} +$

H⁺).



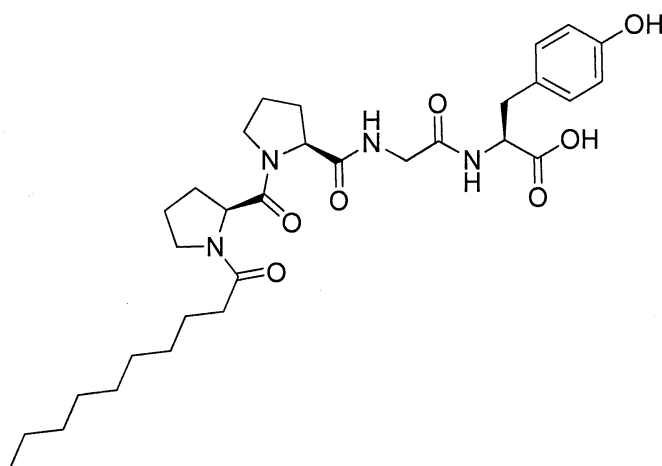
Ví dụ 1.7: Hexanoyl-L-prolyl-L-prolylglyxyl-L-tyrosin (hexanoyl-PPGY-OH)

¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ 7,05 (d, *J* = 8,50 Hz, 2 H), 6,70 (d, *J* = 8,50 Hz, 2 H), 4,66-4,68 (m, 1 H), 4,54-4,57 (m, 1 H), 4,40-4,44 (m, 1 H), 3,96-4,00 (m, 1 H), 3,85-3,89 (m, 1 H), 3,73-3,76 (m, 1 H), 3,51-3,68 (m, 3 H), 3,08-3,12 (m, 1 H), 2,97-3,02 (m, 1 H), 2,31-2,41 (m, 2 H), 2,20-2,29 (m, 2 H), 1,92-2,12 (m, 5 H), (m, 8 H), 1,57-1,66 (m, 3 H), 1,31-1,38 (m, 5 H), 0,93 (t, *J* = 7,00 Hz, 3 H). LC-MS (ESI): được tính toán cho C₂₇H₃₈N₄O₇ 530,3, phát hiện *m/z* 530,7 (M + H⁺).



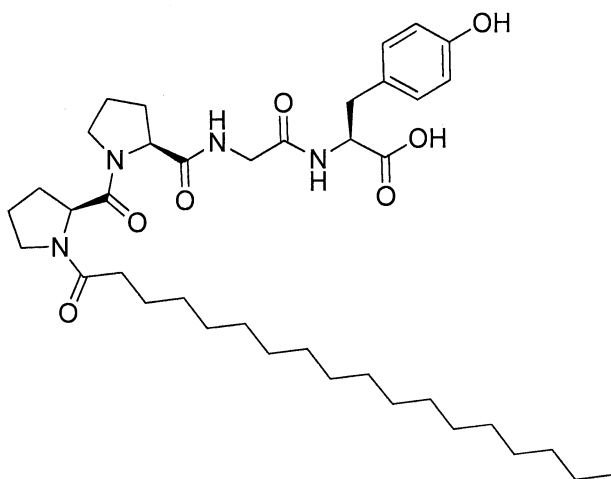
Ví dụ 1.8: Octanoyl-L-prolyl-L-prolylglyxyl-L-tyrosin (octanoyl-PPGY-OH)

¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ 7,05 (d, *J* = 8,50 Hz, 2 H), 6,71 (d, *J* = 8,50 Hz, 2 H), 4,66-4,68 (m, 1 H), 4,54-4,57 (m, 1 H), 4,40-4,42 (m, 1 H), 3,96-4,00 (m, 1 H), 3,85-3,89 (m, 1 H), 3,73-3,77 (m, 1 H), 3,51-3,68 (m, 3 H), 3,08-3,12 (m, 1 H), 2,97-3,02 (m, 1 H), 2,18-2,34 (m, 4 H), 1,92-2,12 (m, 5 H), 1,57-1,61 (m, 2 H), 1,32-1,35 (m, 10 H), 0,92 (t, *J* = 7,00 Hz, 3 H). LC-MS (ESI): được tính toán cho C₂₉H₄₂N₄O₇ 558,3, phát hiện *m/z* 558,5 (M + H⁺).



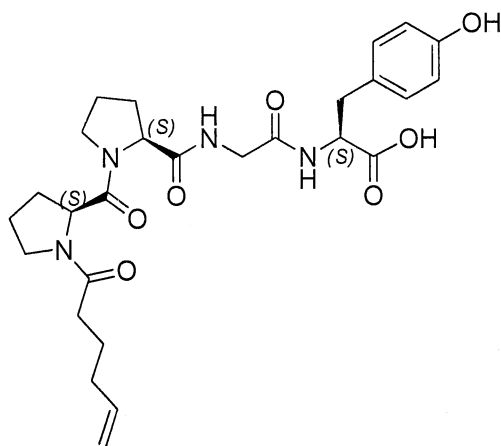
Ví dụ 1.9: Decanoyl-L-prolyl-L-prolylglyxyl-L-tyrosin (decanoyl-PPGY-OH)

^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ 7,03 (d, $J = 8,55$ Hz, 2 H), 6,71 (d, $J = 8,40$ Hz, 2 H), 4,66-4,68 (m, 1 H), 4,54-4,57 (m, 1 H), 4,40-4,42 (m, 1 H), 3,96-4,00 (m, 1 H), 3,85-3,89 (m, 1 H), 3,73-3,77 (m, 1 H), 3,51-3,68 (m, 3 H), 3,08-3,12 (m, 1 H), 2,97-3,02 (m, 1 H), 2,18-2,39 (m, 5 H), 1,92-2,14 (m, 6 H), 1,57-1,61 (m, 2 H), 1,32-1,36 (m, 14 H), 0,92 (t, $J = 7,15$ Hz, 3 H). LC-MS (ESI): được tính toán cho $\text{C}_{31}\text{H}_{46}\text{N}_4\text{O}_7$ 586,3, phát hiện m/z 586,8 ($\text{M} + \text{H}^+$).

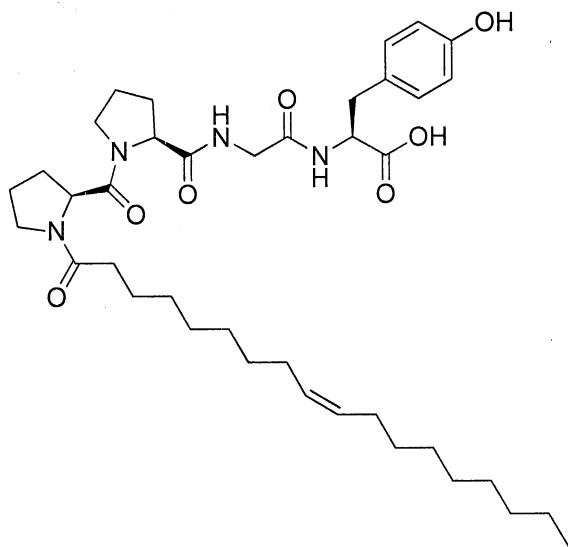


Ví dụ 1.10: Stearoyl-L-prolyl-L-prolylglyxyl-L-tyrosin (stearoyl-PPGY-OH)

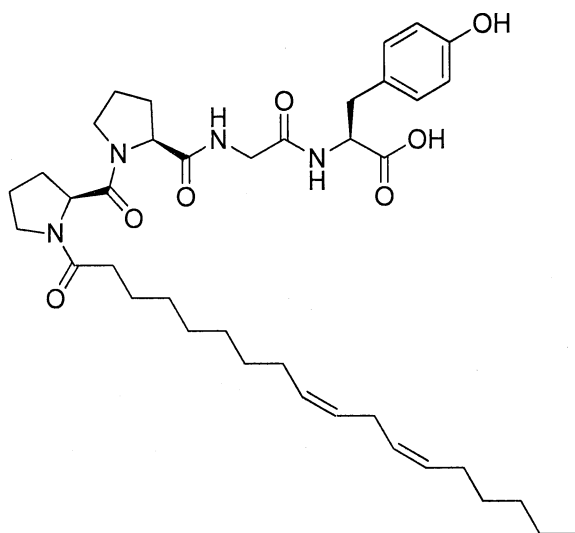
^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ 7,03 (d, $J = 8,55$ Hz, 2 H), 6,71 (d, $J = 8,25$ Hz, 2 H), 4,66-4,68 (m, 1 H), 4,55-4,57 (m, 1 H), 4,40-4,44 (m, 1 H), 3,96-4,02 (m, 1 H), 3,84-3,89 (m, 1 H), 3,71-3,76 (m, 1 H), 3,48-3,68 (m, 4 H), 3,08-3,12 (m, 1 H), 2,97-3,02 (m, 1 H), 2,14-2,42 (m, 5 H), 1,90-2,14 (m, 6 H), 1,57-1,61 (m, 2 H), 1,32-1,35 (m, 30 H), 0,92 (t, $J = 7,15$ Hz, 3 H). LC-MS (ESI): được tính toán cho $\text{C}_{39}\text{H}_{62}\text{N}_4\text{O}_7$ 698,5, phát hiện m/z 698,5 ($\text{M} + \text{H}^+$).



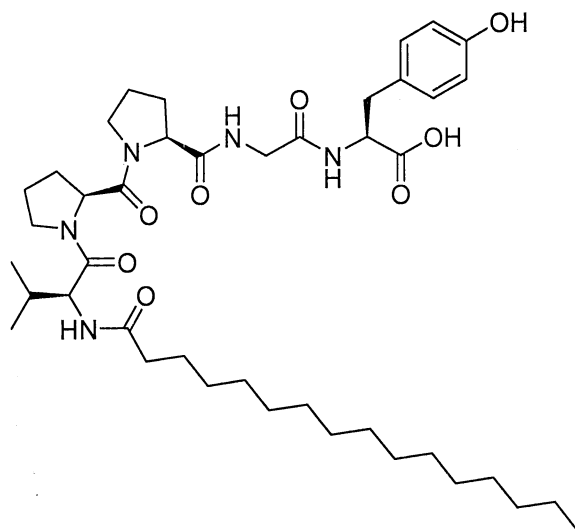
Ví dụ 1.11: Hex-5-enoyl-L-prolyl-L-prolylglyxyl-L-tyrosin (5-hexenoyl-PPGY-OH) ^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ 7,05 (d, $J = 8,55$ Hz, 2 H), 6,70 (d, $J = 8,25$ Hz, 2 H), 5,78-5,89 (m, 1 H), 4,98-5,08 (m, 3 H), 4,66-4,69 (m, 1 H), 4,54-4,57 (m, 1 H), 4,40-4,44 (m, 1 H), 3,97-4,01 (m, 1 H), 3,84-3,90 (m, 1 H), 3,73-3,76 (m, 1 H), 3,47-3,68 (m, 4 H), 3,08-3,12 (m, 1 H), 2,97-3,01 (m, 1 H), 2,33-2,42 (m, 2 H), 2,20-2,30 (m, 2 H), 2,06-2,15 (m, 4 H), 1,92-2,04 (m, 4 H), 1,67-1,76 (m, 3 H). LC-MS (ESI): được tính toán cho $\text{C}_{27}\text{H}_{36}\text{N}_4\text{O}_7$ 528,3, phát hiện m/z 529 ($\text{M} + \text{H}^+$).



Ví dụ 1.12: Oleoyl-L-prolyl-L-prolylglyxyl-L-tyrosin (oleyl-PPGY-OH) ^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ 7,03 (d, $J = 8,50$ Hz, 2 H), 6,71 (d, $J = 8,50$ Hz, 2 H), 5,34-5,38 (m, 2 H), 4,66-4,68 (m, 1 H), 4,55-4,57 (m, 1 H), 4,40-4,42 (m, 1 H), 3,96-4,01 (m, 1 H), 3,84-3,90 (m, 1 H), 3,73-3,77 (m, 1 H), 3,53-3,69 (m, 4 H), 3,08-3,12 (m, 1 H), 2,97-3,01 (m, 1 H), 2,18-2,39 (m, 5 H), 2,06-2,12 (m, 2 H), 1,92-2,05 (m, 3 H), 1,58-1,61 (m, 3 H), 1,31-1,35 (m, 25 H), 0,92 (t, $J = 7,0$ Hz, 3 H). LC-MS (ESI): được tính toán cho $\text{C}_{39}\text{H}_{60}\text{N}_4\text{O}_7$ 696,4, phát hiện m/z 697,3 ($\text{M} + \text{H}^+$).

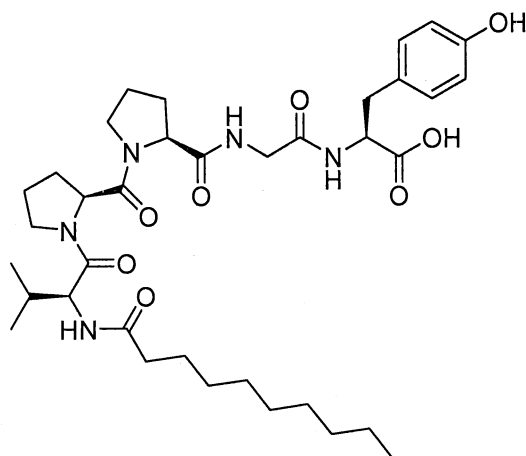


Ví dụ 1.13: ((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoyl)-L-prolyl-L-prolylglyxyl-L-tyrosin (linoleyl-PPGY-OH) ^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ 7,05 (d, $J = 8,45$ Hz, 2 H), 6,71 (d, $J = 8,45$ Hz, 2 H), 5,32-5,41 (m, 4 H), 4,66-4,68 (m, 1 H), 4,55-4,57 (m, 1 H), 4,40-4,43 (m, 1 H), 3,96-4,01 (m, 1 H), 3,84-3,89 (m, 1 H), 3,73-3,77 (m, 1 H), 3,53-3,68 (m, 4 H), 3,08-3,12 (m, 1 H), 2,97-3,01 (m, 1 H), 2,80 (t, $J = 6,40$ Hz, 2 H), 2,19-2,39 (m, 5 H), 1,93-2,13 (m, 10 H), 1,59-1,61 (m, 3 H), 1,31-1,40 (m, 15 H), 0,92 (t, $J = 6,59$ Hz, 3 H). LC-MS (ESI): được tính toán cho $\text{C}_{39}\text{H}_{58}\text{N}_4\text{O}_7$ 694,4, phát hiện m/z 695,2 ($\text{M} + \text{H}^+$).



Ví dụ 1.14: Palmitoyl-L-valyl-L-prolyl-L-prolylglyxyl-L-tyrosin (Pal-VPPGY-OH) ^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ 7,04 (d, $J = 8,35$ Hz, 2 H), 6,71 (d, $J = 8,35$ Hz, 2 H), 4,67-4,70 (m, 1 H), 4,52-4,58 (m, 1 H), 4,39-4,43 (m, 1 H), 3,77-4,05 (m, 4 H), 3,64-3,73 (m, 2 H), 3,49-3,60 (m, 1 H), 3,01-3,11 (m, 2 H), 1,87-2,31 (m, 15 H), 1,61-1,63 (m, 3 H), 1,31 (m, 24 H), 1,01 (d, $J = 6,58$ Hz, 3 H), 0,98 (d, $J = 6,58$ Hz, 3 H),

0,92 (t, $J = 6,96$ Hz, 3 H). LC-MS (ESI), được tính toán cho $C_{42}H_{67}N_5O_8$ 769,5, phát hiện m/z 770,7 ($M + H^+$).

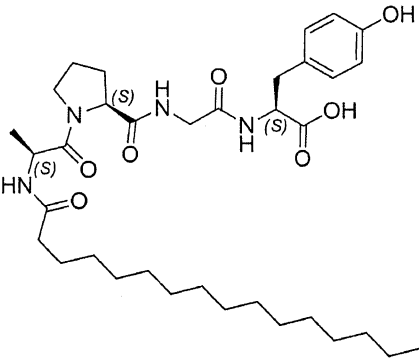
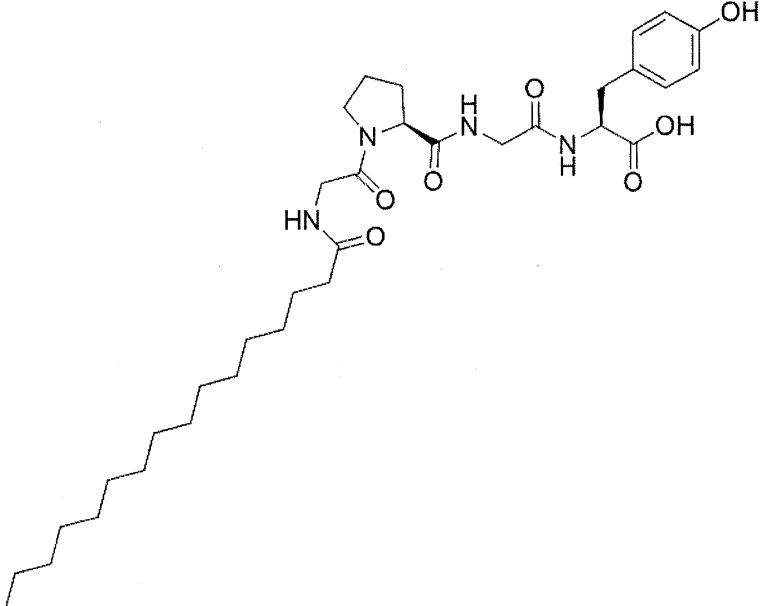
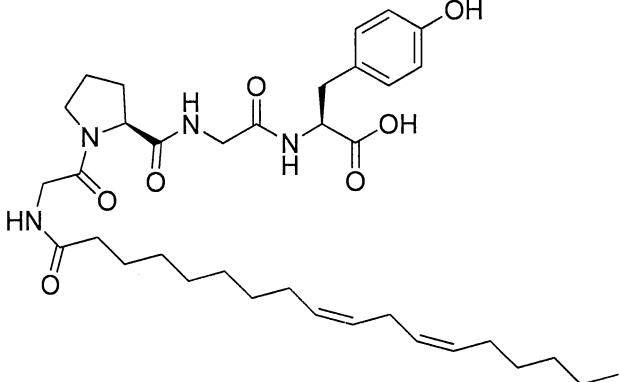


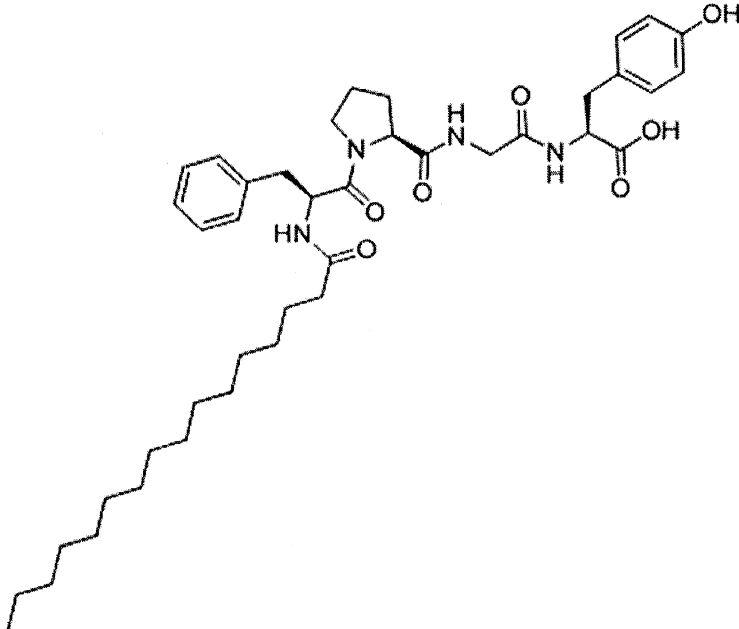
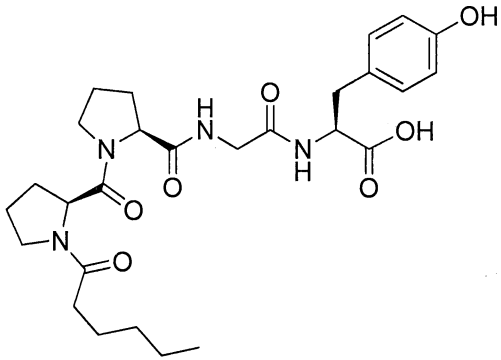
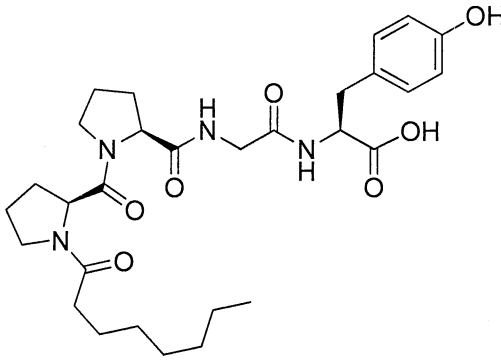
Ví dụ 1.15: Decanoyl-L-valyl-L-prolyl-L-prolylglyxyl-L-tyrosin (decanoyl-VPPGY-OH) 1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ 7,05 (d, $J = 8,45$ Hz, 2 H), 6,71 (d, $J = 8,45$ Hz, 2 H), 4,67-4,70 (m, 1 H), 4,50-4,57 (m, 1 H), 4,39-4,43 (m, 1 H), 3,95-4,05 (m, 2 H), 3,80-3,91 (m, 1 H), 3,65-3,70 (m, 2 H), 3,64-3,73 (m, 2 H), 3,53-3,57 (m, 1 H), 3,01-3,10 (m, 2 H), 1,89-2,31 (m, 12 H), 1,61-1,63 (m, 3 H), 1,31 (m, 24 H), 1,01 (d, $J = 6,68$ Hz, 3 H), 0,97 (d, $J = 6,55$ Hz, 3 H), 0,92 (t, $J = 7,05$ Hz, 3 H). LC-MS (ESI), được tính toán cho $C_{36}H_{55}N_5O_8$ 685,4, phát hiện m/z 686,6 ($M + H^+$).

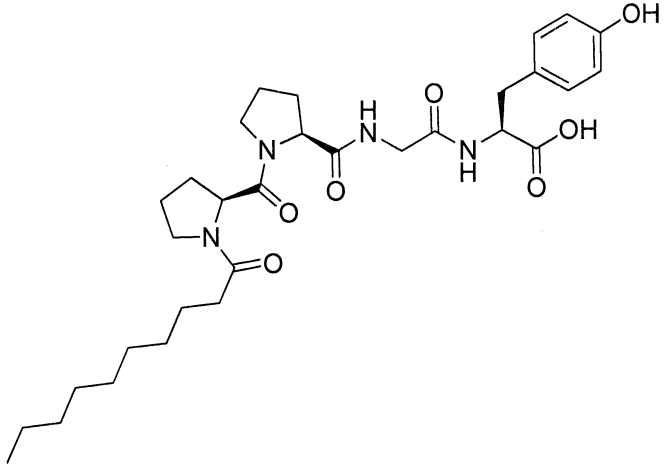
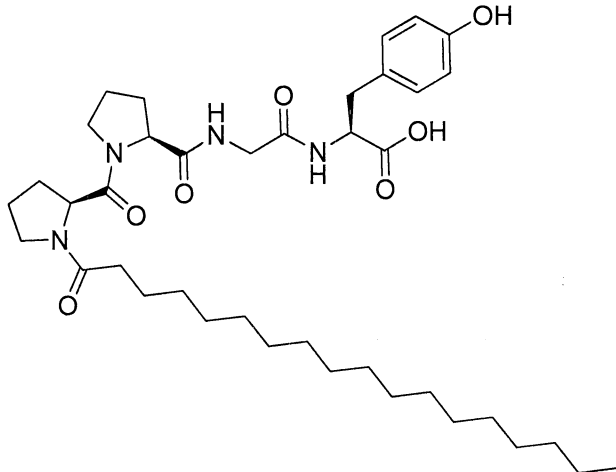
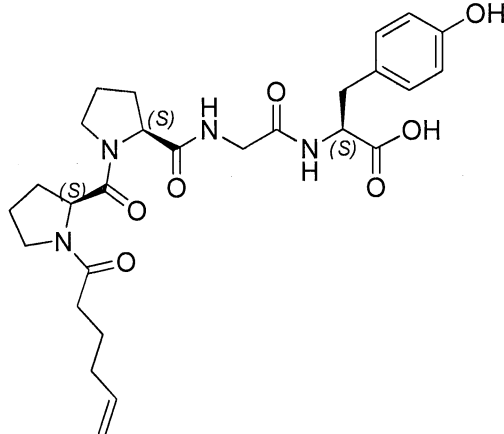
Bảng 1 mô tả các hợp chất theo các ví dụ từ 1.1 đến 1.15.

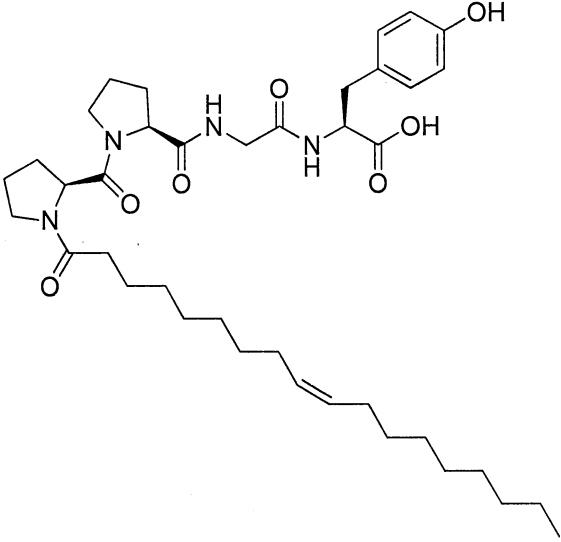
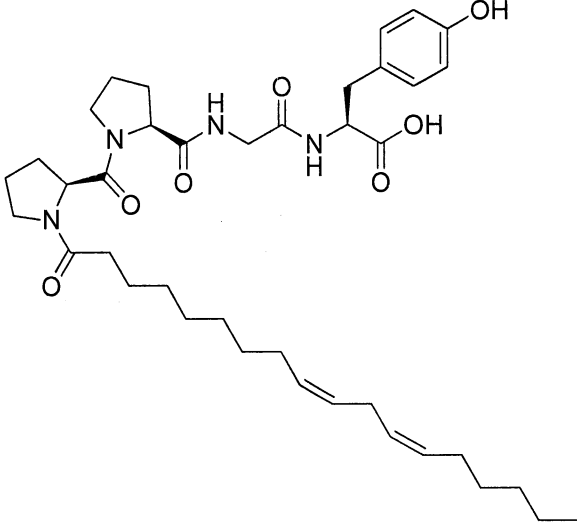
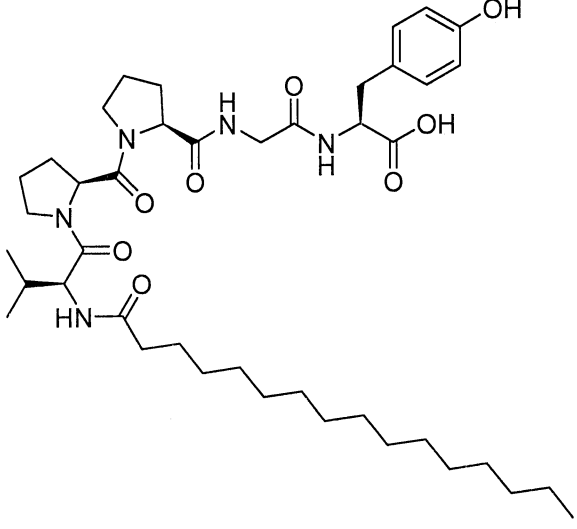
Bảng 1: Các hợp chất theo các ví dụ từ 1.1 đến 1.15

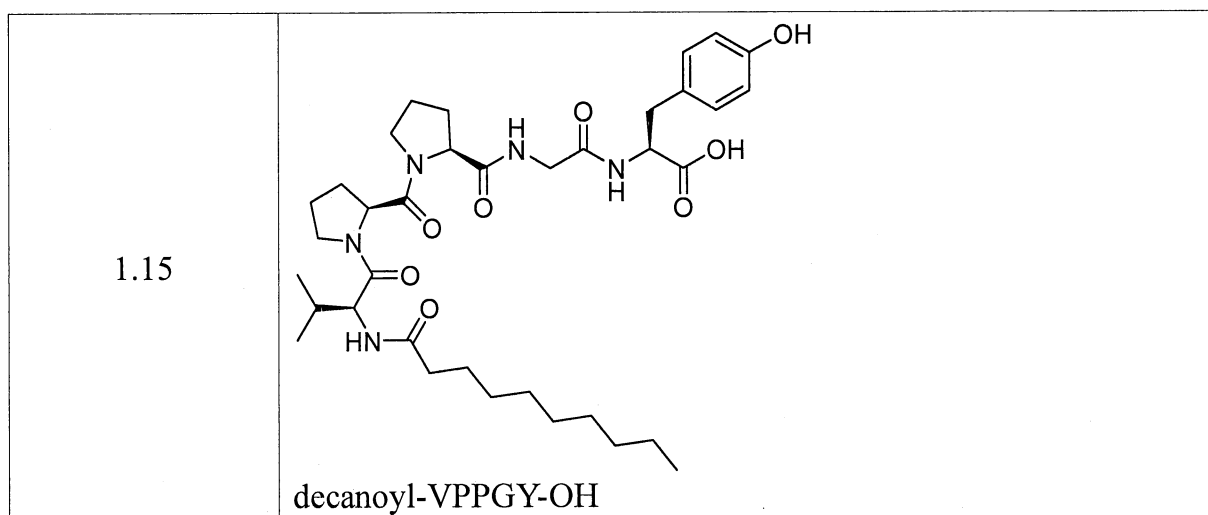
Ví dụ số (Hợp chất số)	Công thức hóa học
1.1	Pal-PPGY-OH
1.2	Pal-PGY-OH

1.3	 Chemical structure of Pal-APGY-OH. It features a long saturated palmitoyl chain (16 carbons) attached to a glycine residue (HN-C(=O)-CH2-). This is linked via an amide bond to a proline ring, which is further connected to a glycine residue (NH-CH2-C(=O)-). This glycine is linked to another amide bond, which connects to a chiral center (S) attached to a 4-hydroxyphenyl group and a carboxylic acid group (COOH). Stereochemistry is indicated with (S) labels. Pal-APGY-OH
1.4	 Chemical structure of pal-GPGY-OH. It features a long saturated palmitoyl chain (16 carbons) attached to a glycine residue (HN-C(=O)-CH2-). This is linked via an amide bond to a proline ring, which is further connected to a glycine residue (NH-CH2-C(=O)-). This glycine is linked to another amide bond, which connects to a chiral center (S) attached to a 4-hydroxyphenyl group and a carboxylic acid group (COOH). Stereochemistry is indicated with (S) labels. pal-GPGY-OH
1.5	 Chemical structure of linoleyl-GPGY-OH. It features a long unsaturated linoleoyl chain (18 carbons, two double bonds) attached to a glycine residue (HN-C(=O)-CH2-). This is linked via an amide bond to a proline ring, which is further connected to a glycine residue (NH-CH2-C(=O)-). This glycine is linked to another amide bond, which connects to a chiral center (S) attached to a 4-hydroxyphenyl group and a carboxylic acid group (COOH). Stereochemistry is indicated with (S) labels. linoleyl-GPGY-OH

1.6	 Chemical structure of pal-FPGY-OH. It features a long palmitoyl chain (16 carbons) attached to a proline ring. The proline is part of a peptide backbone that includes a phenyl group and a 4-hydroxyphenyl group. The structure is shown in a zig-zag conformation. pal-FPGY-OH
1.7	 Chemical structure of hexanoyl-PPGY-OH. It features a hexanoyl chain (6 carbons) attached to a proline ring. The proline is part of a peptide backbone that includes a 4-hydroxyphenyl group. The structure is shown in a zig-zag conformation. hexanoyl-PPGY-OH
1.8	 Chemical structure of octanoyl-PPGY-OH. It features an octanoyl chain (8 carbons) attached to a proline ring. The proline is part of a peptide backbone that includes a 4-hydroxyphenyl group. The structure is shown in a zig-zag conformation. octanoyl-PPGY-OH

1.9	 Chemical structure of decanoyl-PPGY-OH. It features a decanoyl chain (10 carbons) attached to the first pyrrolidine ring of a PPGY-OH molecule. The PPGY-OH moiety consists of two pyrrolidine rings connected by a carbonyl group, with a hydroxyl group on the second pyrrolidine ring. decanoyl-PPGY-OH
1.10	 Chemical structure of stearoyl-PPGY-OH. It features a stearoyl chain (18 carbons) attached to the first pyrrolidine ring of a PPGY-OH molecule. The PPGY-OH moiety consists of two pyrrolidine rings connected by a carbonyl group, with a hydroxyl group on the second pyrrolidine ring. stearoyl-PPGY-OH
1.11	 Chemical structure of 5-hexenoyl-PPGY-OH. It features a 5-hexenoyl chain (6 carbons with a terminal double bond) attached to the first pyrrolidine ring of a PPGY-OH molecule. The PPGY-OH moiety consists of two pyrrolidine rings connected by a carbonyl group, with a hydroxyl group on the second pyrrolidine ring. Stereochemistry is indicated with (S) labels on the chiral centers. 5-hexenoyl-PPGY-OH

1.12	 oleyl-PPGY-OH
1.13	 linoleyl-PPGY-OH
1.14	 Pal-VPPGY-OH



Ví dụ 2: Các thử nghiệm

Ví dụ 2.1: Ức chế biểu hiện của IL-6

Để đánh giá sự ức chế biểu hiện của IL-6 bằng hợp chất theo sáng chế, các thử nghiệm dưới đây được thực hiện.

Đầu tiên, các tế bào đại thực bào RAW 264.7 được mua từ Bộ sưu tập chủng giống Hoa Kỳ (ATCC; Manassas, VA) và được nuôi ở nhiệt độ 37°C, trong khí CO₂ 5%, sử dụng huyết thanh thai bò 10% (Fetal Bovine Serum - FBS) và môi trường Dulbecco cải tiến từ môi trường Eagle (DMEM) chứa penixilin/streptomycin 1%.

Các tế bào đại thực bào RAW 264.7 đã nuôi cấy được chia vào tấm nuôi cấy tế bào 6 lỗ. Sau 24 giờ, các tế bào này được xử lý trước lần lượt với hợp chất 1.1, hợp chất 1.2 và smaducin-6 ở nồng độ 100 nM trong 30 phút và được xử lý thêm bằng lipopolysaccharit (LPS) trong 2 giờ. Các tế bào này được thu bằng cách sử dụng TRIzol® và ARN được chiết. cADN (axit deoxyribonucleic bổ trợ) được tổng hợp từ 2 µg ARN được chiết và phản ứng chuỗi polymeraza phiên mã ngược (RT-PCR) và phản ứng chuỗi polymeraza thời gian thực (Real-Time PCR) được thực hiện. Các mẫu từ RT-PCR được xác định bằng điện di trên gel agarosa và được định lượng bằng cách sử dụng vi quang kế. Gen glyxeraldehyt 3-phosphat dehydrogenaza (GAPDH) được sử dụng làm đối chứng tải cho gen interleukin-6.

Fig.1A thể hiện hình ảnh mô tả sự ức chế biểu hiện của interleukin-6 bằng hợp chất 1.1 và hợp chất 1.2, và Fig.1B là biểu đồ thể hiện sự ức chế biểu hiện được định lượng của interleukin-6 bằng hợp chất 1.1 và hợp chất 1.2. So với mẫu không được xử lý, khi các tế bào được xử lý bằng hợp chất theo sáng chế, thì biểu hiện của

interleukin-6, gây ra bởi sự xử lý LPS, được ức chế.

Ngoài ra, các tế bào đại thực bào RAW 264.7 được nuôi cấy như được mô tả ở trên cũng được chia vào tám 6 lỗ, sau 24 giờ, được xử lý trước bằng 100 nM hợp chất 1.1 trong 30 phút, và được xử lý thêm bằng LPS trong 2 giờ. Tế bào nuôi cấy ở trên được thu và, sử dụng thử nghiệm xytokin (thử nghiệm xytokin ở chuột nhắt C3, RayBiotech), sự thay đổi lượng xytokin và chemokin được định lượng bằng vi quang kế. Xytokin và chemokin được phát hiện bằng hợp chất theo sáng chế bao gồm G-CSF, IL-2, SCF, VEGF, CX3CL1, IGFBP5, IGFBP6, IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-9, MCP-1, MIP-3 α , IL12p40/70, MIG, TNF- α và VCAM-1. So với các mẫu không được xử lý, khi các tế bào được xử lý bằng hợp chất theo sáng chế, biểu hiện của xytokin và chemokin ở trên, gây ra bởi sự xử lý LPS, được ức chế là có ý nghĩa thống kê (Fig.2).

Các tế bào đại thực bào RAW 264.7 được xử lý bằng các nồng độ khác nhau của hợp chất 1.1 trong khoảng từ 50 pM đến 500 nM trong 30 phút, và được xử lý bằng 100 ng/mL LPS trong 2 giờ. Sự biểu hiện cảm ứng của interleukin-6 được định lượng như được mô tả ở trên và các kết quả được thể hiện trên Fig.3. Trong các tế bào đại thực bào RAW 264.7, nồng độ của hợp chất 1.1 mà ở nồng độ này sự biểu hiện của interleukin-6 được ức chế đến 50% hoặc thấp hơn (tức là, IC₅₀) là khoảng 1,6 nM.

Ví dụ 2.2: Ức chế hoạt tính của NF- κ B

Để đánh giá liệu tín hiệu NF- κ B gây ra bởi LPS có được ức chế đặc hiệu bởi hợp chất theo sáng chế hay không, các thử nghiệm dưới đây được thực hiện.

Cụ thể là, plasmit chỉ thị 5x NF- κ B-Luc được chuyển nạp vào các tế bào RAW 264.7 bằng cách sử dụng Effectene (được sản xuất bởi Qiagen, USA). Các tế bào được chuyển nạp này được xử lý trước bằng hợp chất 1.1 100 nM trong 30 phút và được xử lý thêm bằng LPS (100 ng/mL) trong 2 giờ và hoạt tính luciferaza trong tế bào được xác định (Fig.4 mô tả biểu đồ thể hiện hoạt tính ức chế tương đối của hợp chất 1.1 và hợp chất 1.2 với sự hoạt hóa NF- κ B). Khi các tế bào được xử lý bằng hợp chất 1.1 và hợp chất 1.2 theo sáng chế, sự hoạt hóa của NF- κ B, gây ra bởi LPS, được ức chế (Fig.4).

Ngoài ra, plasmit chỉ thị 5x NF- κ B-Luc được chuyển nạp vào các tế bào đại thực bào RAW 264.7 và được xử lý bằng hợp chất theo sáng chế, như được mô tả ở

trên. Sau 24 giờ chuyển nạp, các tế bào này được xử lý trước với DMSO (đối chứng), hợp chất 1.1, hợp chất tham chiếu 1 (hợp chất mà axit palmitic được loại khỏi hợp chất 1.1) và smaducin-6 được xử lý ở các nồng độ khác nhau là 100 pM, 1nM, và 100nM trong 30 phút và sau đó các tế bào này được xử lý bằng 100 ng/mL LPS trong 2 giờ. Hoạt tính luciferaza trong tế bào được xác định và các kết quả được thể hiện trên Fig.5.

Như được thể hiện trên Fig.5, khi các tế bào này được xử lý trước bằng hợp chất 1.1 (tương tự với các tế bào được xử lý trước bằng smaducin-6), sự ức chế hoạt tính của NF- κ B, gây ra bởi sự xử lý LPS, tăng khi liều của hợp chất 1.1 tăng. Ngược lại, khi các tế bào này được xử lý trước bằng DMSO hoặc hợp chất tham chiếu 1, hoạt tính của NF- κ B không bị ức chế theo cách phụ thuộc liều.

Ví dụ 2.3: Chọn lọc con đường truyền tín hiệu

Để đánh giá sự chọn lọc con đường truyền tín hiệu của hợp chất 1.1 theo sáng chế, các thử nghiệm dưới đây được thực hiện. Các thử nghiệm dưới đây được thực hiện để kiểm tra liệu hợp chất 1.1 đã ức chế đặc hiệu con đường truyền tín hiệu gây ra bởi chất cảm ứng riêng rẽ hay chưa.

Cụ thể là, plasmit chỉ thị 5x NF- κ B-Luc, plasmit chỉ thị SBE-Luc, và plasmit chỉ thị BRE-Luc được chuyển nạp riêng lẻ vào các tế bào đại thực bào RAW 264.7. Sau 24 giờ, các tế bào được chuyển nạp với plasmit chỉ thị NF- κ B-Luc được xử lý bằng 100 ng/mL LPS, các tế bào được chuyển nạp với plasmit chỉ thị SBE-Luc được xử lý bằng 5 ng/mL TFG- β 1, và các tế bào được chuyển nạp với plasmit chỉ thị BRE-Luc được xử lý bằng 100 ng/mL BMP6 trong 2 giờ.

Fig.6 là biểu đồ thể hiện hoạt tính ức chế tương đối của hợp chất 1.1 với các con đường truyền tín hiệu khác nhau. Như được thể hiện trên Fig.6, khi các tế bào được xử lý bằng hợp chất 1.1 theo sáng chế, sự hoạt hóa của NF- κ B, gây ra bởi sự xử lý LPS, được ức chế. Tuy nhiên, sự hoạt hóa của BRE, gây ra bởi sự xử lý BMP6 hoặc sự hoạt hóa của SBE, mà gây ra bởi sự xử lý TFG- β , không bị ức chế bởi hợp chất 1.1. Theo đó, hợp chất 1.1 ức chế chọn lọc sự hoạt hóa con đường truyền tín hiệu NF- κ B.

Cụ thể là, các nghiên cứu gần đây báo cáo rằng, đối với việc điều trị bệnh viêm ruột, con đường truyền tín hiệu TFG- β và BMP có thể liên quan cụ thể đến việc chữa lành vết thương niêm mạc và các bệnh tương tự (Nature 449 (2007), 361–365, Am J

Path, 162(2), (2003), Nature Immunol. 6, (2005), 507–514, J Cell Physiol. 196(2): (2003); 258–64), và Nature Protocols, 8(3), (2013) 627–637, các tài liệu này được đưa vào phần mô tả bằng cách viện dẫn), và TFG- β có thể là yếu tố rất quan trọng kiểm soát tình trạng viêm (tình trạng bệnh tế bào đuôi gai) ở ruột (J. Clin. Invest., 111 (2003), 1297–1308, Immunity, 10 (1999), 39–49, Eur. J. Immunol., 36 (2006), 864–874, Immunity, 25 (2006), 319–329, Cell 118 (2004), 229–241 và J. Immunol. 179 (2007), 2690–2694, các tài liệu này được đưa vào phần mô tả bằng cách viện dẫn). Do đó, hợp chất theo sáng chế không ức chế sự hoạt hóa con đường truyền tín hiệu TFG- β và BMP đã chỉ ra rằng các hợp chất này đem lại hiệu quả rõ rệt đối với việc điều trị bệnh viêm ruột.

Ví dụ 2.4: Sự gián đoạn sự tạo thành phức chất truyền tín hiệu và sự phân hủy chất ức chế κB (I κB)

Để kiểm tra liệu hợp chất theo sáng chế có thể làm gián đoạn sự tạo thành phức chất protein trong con đường truyền tín hiệu viêm được trung gian bởi MyD88 và/hoặc RIP1 hay không, ví dụ phức chất protein trong con đường truyền tín hiệu thụ thể giống Toll (TLR), các thử nghiệm miễn dịch kết tủa được thực hiện. Tại cùng thời điểm, các thử nghiệm dưới đây được thực hiện để xác định sự phân hủy I κB bằng hợp chất theo sáng chế bằng việc xác định sự thay đổi nồng độ của I κB .

Cụ thể là, bằng cách sử dụng kháng thể tương ứng với protein mà liên quan đến sự tạo thành phức chất protein trong con đường truyền tín hiệu thụ thể giống Toll (TLR) (ví dụ, IRAK1, TRAF6, MyD88, RIP1 và Pellino-1), sự gián đoạn tạo thành phức chất protein trong con đường truyền tín hiệu viêm được xác nhận bằng miễn dịch kết tủa. Mức biểu hiện tương đối của β -actin từ dịch tan tế bào tổng làm đối chứng tham chiếu được so sánh và được thể hiện bằng cách sử dụng thẩm tách Western.

Các tế bào đại thực bào RAW264.7 được xử lý riêng rẽ lần nữa bằng hợp chất 1.1 và hợp chất 1.2 và smaducin-6, và được xử lý thêm bằng LPS. Các tế bào đại thực bào RAW264.7 này được thu, phân giải trong đệm phân giải (PBS chứa Triton X-100 0,5 %, HEPES 20 mM (pH 7,4), NaCl 150 mM, β -glycerol phosphat 12,5mM, MgCl₂ 1,5 mM, NaF 10 mM, DTT 2 mM, Na₃O₄V 1 mM, EGTA 2 mM và chất ức chế proteaza 1 mM (PMSF)) và được ly tâm 13000 vòng/phút trong 10 phút. Đối với các thử nghiệm miễn dịch kết tủa, dịch nổi được ủ ở nhiệt độ 4°C trong 12 giờ, với các hạt

agaroza protein A và kháng thể tương ứng với protein trên và các hạt này sau đó được rửa ba lần với đệm phân giải. Chất đã được miễn dịch kết tủa được phân ly khỏi các hạt này bằng cách bổ sung 2x đệm mẫu và được làm sôi. Các mẫu đã chuẩn bị được nạp lên gel SDS-polyacrylamit (Fig.7).

Để xác định sự thay đổi nồng độ của I κ B, các tế bào đại thực bào RAW264.7 được xử lý riêng lẻ trước bằng hợp chất 1.1, hợp chất 1.2 và smaducin-6 ở nồng độ là 100 nM, và sau đó được xử lý bằng LPS. Dịch tan tế bào đã chiết được sử dụng để thấm miễn dịch kháng thể I κ B α và β -actin được sử dụng để tham chiếu (Fig.7).

Fig.7 thể hiện các hình ảnh miễn dịch kết tủa chỉ ra rằng hợp chất 1.1 và hợp chất 1.2 đã làm gián đoạn phức chất protein trong con đường truyền tín hiệu viêm, mà được trung gian bởi MyD88 hoặc RIP1 và còn chỉ ra sự thay đổi nồng độ của I κ B bởi các hợp chất này. Khi các tế bào được xử lý bằng hợp chất theo sáng chế, được so với đối chứng dịch tan tế bào tổng, thì sự tạo thành phức chất protein trong con đường truyền tín hiệu viêm (được trung gian bởi MyD88 hoặc RIP1) bị gián đoạn (Fig.7). Các tế bào được xử lý bằng hợp chất theo sáng chế được làm ổn định bằng việc khử phosphoryl I κ B được so với sự biểu hiện của chất tham chiếu β -actin.

Khi các tế bào được xử lý bằng các hợp chất theo sáng chế, được so với đối chứng dịch tan tế bào tổng, thì sự tạo thành phức chất protein MyD88 và phức chất protein RIP1, và hoạt tính của nó bị gián đoạn và bị ức chế đáng kể (Fig.7). Các kết quả này chỉ ra rằng các hợp chất theo sáng chế có thể được sử dụng để điều trị các bệnh liên quan đến Pellino-1. Hơn thế nữa, ngoài bệnh viêm ruột được mô tả ở trên, hợp chất theo sáng chế có thể là hữu hiệu để ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh teo địa lý, bệnh điểm vàng do lão hóa thể ướt (AMD thể ướt), bệnh điểm vàng do lão hóa thể khô (AMD thể khô), bệnh vồng mạc do đái tháo đường, bệnh xơ cứng rải rác (MS), bệnh viêm phổi, bệnh viêm phổi do vi khuẩn, bệnh viêm phổi do virus, u lympho tế bào B lớn khuếch tán (DLBCL, loại GCB hoặc loại ABC) và bệnh rụng tóc (Journal of Clinical Investigation, 124(11), (2014), 4976-4988, J Virology, 86(12), (2012), 6595-6604, Nature Medicine, 19(5), (2013), 595-602, J. Immunol., 187 (2011), 1-14, J. Inv. Derm., 132 (2012), 43-49, Med. Inflamm., (2010), Article ID 928030, Hair The Transplant, 4 (2014), 4:1, Exp. Derm., 17 (2007), 12-19, và DDT Dis. Mech. 5 (2009), e163-171), các tài liệu này được đưa vào phần mô tả bằng cách viện dẫn).

Các tế bào đại thực bào thu được từ tủy xương (BMDM) được xử lý riêng rẽ trước bằng hợp chất 1.1, hợp chất tham chiếu 1 và smaducin-6 ở các nồng độ khác nhau là 100 pM, 1nM và 100nM và sau đó được xử lý thêm bằng 100 ng/mL LPS. Dịch tan tế bào đã chiết được sử dụng để thăm miễn dịch như được mô tả ở trên, và các kết quả được thể hiện trên Fig.8.

Trong trường hợp các tế bào được xử lý trước bằng hợp chất 1.1 được so với các tế bào được xử lý trước bằng smaducin-6, sự tạo thành phức chất trong con đường truyền tín hiệu viêm (ví dụ, thụ thể giống Toll (TLR)) được trung gian bởi MyD88 và RIP1, tiếp tục bị gián đoạn theo cách phụ thuộc liều tăng của hợp chất 1.1 (Fig.8). Trong khi đó, các tế bào được xử lý trước bằng DMSO hoặc hợp chất tham chiếu 1 đã tạo ra phức chất trong con đường truyền tín hiệu viêm được trung gian bởi MyD88 và RIP1 theo cách không phụ thuộc liều.

Tương tự, so với đối chứng của dịch tan tế bào tổng, khi các tế bào này được xử lý trước bằng hợp chất 1.1 theo sáng chế, sự tạo thành phức chất trong con đường truyền tín hiệu viêm được trung gian bởi MyD88 và RIP1 bị gián đoạn đáng kể. Thử nghiệm sử dụng các tế bào BMDM với hợp chất theo sáng chế chỉ ra rằng hợp chất theo sáng chế là hữu hiệu để ngăn ngừa và điều trị nhiều bệnh liên quan đến MyD88, ngăn ngừa và điều trị các bệnh liên quan đến sự biểu hiện của Pellino-1 như nhiễm trùng do virus (nhiễm trùng hô hấp do virus, bệnh viêm phổi do virus), bệnh viêm phổi do vi khuẩn, bệnh tự miễn, bệnh ung thư máu bao gồm u lympho, các khối u ở các cơ quan bên trong khác nhau (ví dụ, gan, phổi, ruột, tuyến tiền liệt, tuyến tụy và các cơ quan tương tự) và ngăn ngừa và điều trị bệnh xơ cứng rải rác (MS).

Như được mô tả trên Fig.9, các tế bào đại thực bào RAW 264.7 (ở trên) và các tế bào BMDM (ở dưới) được xử lý riêng rẽ trước bằng hợp chất 1.1, hợp chất tham chiếu 1 và smaducin-6 ở các nồng độ khác nhau là 100 pM, 1nM và 100nM và sau đó được xử lý thêm bằng 100 ng/mL LPS. Các kết quả được so sánh với sự biểu hiện của chất tham chiếu β -actin. Sự biểu hiện của I κ B tăng trong tế bào khi liều dùng hợp chất 1.1 và smaducin-6 được xử lý trước tăng. Trong khi đó, I κ B bị phân hủy trong các tế bào được xử lý trước bằng DMSO hoặc hợp chất tham chiếu 1 vì nó thể hiện là được phosphoryl hóa. Do đó, hợp chất 1.1 theo sáng chế đã ức chế sự phân hủy của I κ B.

Ví dụ 2.5: Đánh giá mối tương quan giữa liều và chỉ số hoạt động bệnh

Để đánh giá chỉ số hoạt động bệnh của hợp chất theo sáng chế trong mô hình động vật mắc bệnh viêm ruột kết mạn tính được gây ra bởi dextran sulfat natri (DSS), các thử nghiệm dưới đây được thực hiện.

Chuột nhắt (7-8 tuần, con cái, C57BL/6) được cấp polyme DSS 2% (khối lượng phân tử là khoảng 50000Da) trong nước uống trong 5-7 ngày và bệnh viêm ruột kết được gây ra từ 2 đến 15 ngày. Hợp chất 1.1 sau đó được dùng qua miệng cho chuột nhắt, mà gây ra bệnh viêm ruột kết mạn tính bằng DSS, với lượng lần lượt là 50 mg/kg, 100 mg/kg, 200 mg/kg và 400 mg/kg, tính từ ngày thứ ba sau khi cấp DSS, hàng ngày, trong 11 ngày. Khối lượng cơ thể, mức độ tiêu chảy và phân có máu của chuột nhắt được kiểm tra hàng ngày và chỉ số hoạt động bệnh được xác định (Fig.10).

Fig.10 là biểu đồ chỉ ra điểm chỉ số hoạt động bệnh trong mô hình động vật mắc bệnh viêm ruột kết mạn tính gây ra bởi DSS theo liều của hợp chất 1.1 và hợp chất 1.2 được dùng qua miệng. Như được thể hiện trên Fig.10, khi hợp chất 1.1 theo sáng chế được dùng với liều khác nhau nằm trong khoảng từ 50 mg/kg đến 400 mg/kg, thì hoạt động bệnh của nó tăng khi liều tăng và hoạt động bệnh bị bão hòa ở liều 200 mg/kg. Do đó, hợp chất theo sáng chế tăng hoạt tính theo tỷ lệ theo cách không phụ thuộc liều.

Ví dụ 2.6: Ưc chế hoạt động của bệnh ruột

Để đánh giá hoạt tính thay thế của hợp chất theo sáng chế trong mô hình động vật mắc bệnh viêm ruột kết cấp tính được gây ra (gây ra bởi DSS), các thử nghiệm dưới đây được thực hiện.

Chuột nhắt (7-8 tuần, con cái, C57BL/6) được cấp polyme DSS 2% (khối lượng phân tử là khoảng 50000Da) trong nước uống trong 7-8 ngày và bệnh viêm ruột kết được gây ra. Sau đó, mỗi con chuột nhắt mắc bệnh viêm ruột kết cấp tính được dùng sulfasalazin với lượng là 500 mg/kg và hợp chất 1.1 với lượng là 100 mg/kg hàng ngày trong 14 ngày. Khối lượng cơ thể, mức độ tiêu chảy và phân có máu của chuột nhắt được kiểm tra hàng ngày và chỉ số hoạt động bệnh (disease activity index - DAI) được xác định (Fig.11A).

DAI được xác định như sau đây:

1) giảm khối lượng (0 điểm: không giảm khối lượng; 1 điểm: khối lượng giảm 1-5%, 2 điểm: khối lượng giảm 6-10%, 3 điểm: khối lượng giảm 11-20%; 4 điểm: khối

lượng giảm lớn hơn hoặc bằng 20%);

2) tiêu chảy (0 điểm: các chất thải ra khỏi ruột bình thường; 2 điểm: các chất thải ra khỏi ruột lỏng; 4 điểm: tiêu chảy); và

3) phân có máu (0 điểm: phân bình thường; 2 điểm: ít máu trong phân; 4 điểm: nhiều máu trong phân).

Fig.11A là biểu đồ chỉ ra điểm chỉ số hoạt động bệnh thể hiện sự ức chế hoạt tính của hợp chất được dùng trong mô hình động vật mắc bệnh viêm ruột kết cấp tính gây ra bởi DSS. So với sulfasalazin chống viêm, hợp chất theo sáng chế có điểm chỉ số hoạt động bệnh đúng ở liều giảm và do đó, hợp chất theo sáng chế hữu hiệu hơn để điều trị bệnh viêm ruột kết (Fig.11A).

Trong khi đó, như được thể hiện trên Fig.11B, chuột nhất mắc bệnh viêm ruột kết mạn tính gây ra bởi DSS được dùng sulfasalazin qua miệng với lượng là 500 mg/kg và hợp chất 1.1 với lượng là 100 mg/kg hàng ngày trong 10 ngày. Sau 10 ngày dùng, mô ruột già được thu từ chuột nhất, và biểu hiện của chemokin (CCL20, CCL2 và CX3CL1) trong các mô được xác định bằng cách sử dụng phản ứng chuỗi polymeraza thời gian thực (Real-Time PCR) như được mô tả ở trên. Hợp chất 1.1 là chất phong bế chemokin hiệu quả bằng cách ức chế hóa ứng động của tế bào miễn dịch gây bệnh vào trong mô bị viêm.

Ví dụ 2.7: Phân tích mô học của lòng nhung ruột kết

Để xác định hiệu quả điều trị bệnh viêm ruột kết mạn tính gây ra bởi DSS bằng hợp chất 1.1 theo sáng chế, lòng nhung ruột già từ nhóm không được điều trị, nhóm mô hình bệnh viêm ruột kết mạn tính gây ra bởi DSS và nhóm được điều trị bằng hợp chất 1.1 được chụp ảnh (các Fig.12-16).

Các Fig.12-14 là các hình ảnh thể hiện hình dạng của lòng nhung ruột già từ nhóm không được điều trị, nhóm mô hình bệnh viêm ruột kết mạn tính gây ra bởi DSS và nhóm được điều trị bằng hợp chất 1.1. Như được thể hiện trên các Fig.12-14, khi so sánh với lòng nhung ruột già từ mô hình bệnh viêm ruột kết mạn tính gây ra bởi DSS, lòng nhung từ nhóm được điều trị bằng hợp chất 1.1 là tương tự lòng nhung của nhóm không được điều trị.

Fig.15 thể hiện hình ảnh được chụp của mô ruột già thu được từ nhóm không

được điều trị, nhóm mô hình bệnh viêm ruột kết mạn tính gây ra bởi DSS, nhóm được điều trị bằng hợp chất 1.1 (100 mpk) và nhóm được điều trị bằng sulfasalazin (500 mpk) là thuốc chống viêm để điều trị bệnh viêm ruột kết. Fig.16 thể hiện ảnh chụp hình thái học của màng nhầy ruột già thu được từ nhóm không được điều trị, nhóm mô hình bệnh viêm ruột kết mạn tính gây ra bởi DSS, nhóm được điều trị bằng hợp chất 1.1 (100 mpk) và nhóm được điều trị bằng sulfasalazin (500 mpk) là thuốc chống viêm để điều trị bệnh viêm ruột kết và màng nhầy được nhuộm với xanh Alcian. Như được thể hiện trên các Fig.15-16, khi mô hình bệnh viêm ruột kết mạn tính gây ra bởi DSS được điều trị bằng hợp chất 1.1, thì sự tổn thương mô học, mà có thể được thấy trong các mô bị viêm, được làm dịu. Ngoài ra, khi so sánh nhóm không được xử lý và nhóm được điều trị bằng sulfasalazin, nhóm được điều trị bằng hợp chất 1.1 có độ hồi phục màng nhầy cao hơn bằng cách phong bế các tế bào bị viêm vào mô.

Fig.17 là biểu đồ thể hiện mức độ hồi phục của thành ruột già trong nhóm không được điều trị, nhóm mô hình bệnh viêm ruột kết mạn tính gây ra bởi DSS, nhóm được điều trị bằng hợp chất 1.1 (100 mpk) và nhóm được điều trị bằng sulfasalazin (500 mpk).

Cụ thể là, như được mô tả trong tài liệu Nature Protocols, 8(3), (2013) 627-637, vào ngày thứ 8 điều trị mô hình bệnh viêm ruột kết mạn tính gây ra bởi DSS, FITC-Dextran được dùng qua miệng với liều 44 mg trên mỗi 100 g khối lượng cơ thể. Sau bốn giờ dùng, máu với lượng là 300-400 μ L được thu từ tim của chuột nhắt. FITC-Dextran đã giải phóng vào trong dòng máu được xác định bằng cách sử dụng quang phổ kế huỳnh quang.

Fig.17 thể hiện về mặt định lượng rằng bằng cách phân tích FITC-Dextran được giải phóng vào trong dòng máu, sự thất chặt mô biểu mô ruột già gây ra bởi sự nghiền màng nhầy ruột già, hoặc chức năng ở thành ruột già được phục hồi như khi điều trị bằng sulfasalazin hiện nay. Do đó, hợp chất theo sáng chế có hiệu quả đáng kể trong việc phục hồi hàng rào biểu bì ruột và chức năng thất chặt trong mô mắc bệnh viêm ruột kết mạn tính.

Ví dụ 2.8: Nồng độ trong huyết tương

Để đánh giá sự thay đổi nồng độ (dòng máu) của hợp chất 1.1 được dùng trong tĩnh mạch và dùng qua miệng trong máu theo sáng chế, các thử nghiệm dưới đây được

thực hiện.

Hợp chất 1.1 được dùng cho chuột cống trong tĩnh mạch (I.V., 5 mg/kg) hoặc qua miệng (50 mg/kg) và 24 giờ sau khi dùng, nồng độ của hợp chất 1.1 trong huyết tương được xác định (Fig.18 và Fig.19).

Sự thay đổi nồng độ của hợp chất 1.1 khi được dùng trong tĩnh mạch ở các khoảng thời gian khác nhau được xác định (Fig.18). Nồng độ này được làm giảm đến 1/100 nồng độ ban đầu của nó trong 1-2 giờ và trong 8 giờ từ khi dùng. Hợp chất 1.1 được phát hiện trong máu ở nồng độ rất thấp.

Sự thay đổi nồng độ của hợp chất 1.1 trong máu ở các thời điểm khác nhau khi được dùng qua miệng được xác định (Fig.19). Sau 30 phút từ khi dùng liều qua miệng, hợp chất 1.1 không được phát hiện trong máu.

Bảng 2 thể hiện các thông số dược động học của hợp chất 1.1.

Bảng 2: Các thông số dược động học của hợp chất 1.1

Profen		5 mg/kg (i.v.)	50 mg/kg (p.o.)
<i>In vivo</i> PK (chuột cống, liều đơn)	Động vật	Chuột cống SD đực	Chuột cống SD đực
	C _{max} (ng/mL)	6.017,3 ± 2.302,4	0
	T _{max} (giờ)	0,08	0
	AUC _{last} (ng·giờ/mL)	2.135,6 ± 848,1	0
	T _{1/2} (giờ)	-	0
	V _{ss} (L/kg)	5,4 ± 1,0	-
	CL (L/giờ/kg)	2,7 ± 1,3	-

Ví dụ 2.9: Sự phân phối trong mô

Để đánh giá sự phân phối trong mô của hợp chất 1.1 theo sáng chế, các thử nghiệm dưới đây được thực hiện.

Hợp chất 1.1 được dùng qua miệng cho chuột cống với liều 10 mg/kg và sau 2 giờ và 8 giờ, nồng độ của hợp chất 1.1 được xác định trong mô ruột non, mô ruột già, mô ruột thừa, bã thải trong ruột non và bã thải trong ruột già. Các kết quả được thể hiện trong bảng 3 dưới đây.

Bảng 3: Nồng độ của hợp chất 1.1 sau khi dùng liều qua miệng

Các loại mô	Nồng độ (ng/mL)	
	2 giờ	8 giờ

Mô ruột non	75±70,2	78,1±59,9
Mô ruột già	30±10	33,2±28,8
Mô ruột thừa	22,7±2,56	48,2±46
Bã thải trong ruột non	1118±217	876±900
Bã thải trong ruột già	ND	1278±52,7

ND: Không xác định

Giới hạn định lượng: ruột 8-2000 ng/kg, bã thải 30-1000 ng/mL

Như được thể hiện trong bảng 3, hợp chất 1.1 được phân phối trong mô ruột như mô ruột non, ruột già và ruột thừa tại thời điểm 2 giờ và 8 giờ từ khi dùng trong khoảng định lượng và hợp chất 1.1 được phân phối thêm trong mô ruột 8 giờ sau khi dùng.

Do đó, khi được dùng qua miệng, nồng độ hữu hiệu của hợp chất theo sáng chế được duy trì liên tục trong mô ruột, thậm chí sau 8 giờ. Vì hợp chất theo sáng chế là thuốc phân tử nhỏ, nên hợp chất này có thể dễ hấp thụ vào ruột sao cho nồng độ hiệu quả của nó có thể dễ dàng đạt được. Do đó, bằng cách dùng liều qua miệng, hợp chất được mô tả trong bản mô tả này có thể được sử dụng để điều trị hiệu quả bệnh viêm ruột.

Ví dụ 2.10: Ức chế hoạt động của con đường truyền tín hiệu MAPK

Để kiểm tra liệu hợp chất 1.1 và hợp chất 1.2 theo sáng chế có ức chế con đường truyền tín hiệu MAPK/ERK hay không, phân tích thẩm tách Western được thực hiện (Fig.20).

Các tế bào đại thực bào RAW 246.7 được xử lý trước bằng hợp chất 1.1, hợp chất 1.2 và hợp chất tham chiếu 1 ở nồng độ là 100 nM trong 30 phút và sau đó được xử lý thêm bằng LPS trong 0 giờ, 0,5 giờ, 1 giờ và 2 giờ. Sự phosphoryl hóa của protein trong con đường truyền tín hiệu MAPK (ERK1/2, JNK, p38) từ tế bào được xử lý bằng hợp chất 1.1 và hợp chất 1.2 được hoạt hóa ở 0,5 giờ với mẫu tương tự như trong trường hợp của hợp chất tham chiếu 1, và sau 1 giờ hoặc 2 giờ điều trị, sự phosphoryl hóa của các protein này được làm giảm dần dần bằng mẫu tương tự như trường hợp với hợp chất tham chiếu 1. β -actin được sử dụng làm đối chứng tham chiếu. Sự thay đổi nồng độ khi phosphoryl hóa mỗi protein được xác định bằng cách thẩm miễn dịch sử dụng kháng thể chống sự phosphoryl hóa. Hợp chất tham chiếu 1, hợp

chất 1.1 và hợp chất 1.2 không ức chế sự phosphoryl hóa của các protein trong con đường truyền tín hiệu MAPK.

Fig.21 thể hiện hình ảnh xác định sự ức chế sự phosphoryl hóa của các protein trong con đường truyền tín hiệu MAPK (ERK1/2, JNK, p38). Các tế bào BMDM được xử lý trước bằng DMSO, hợp chất tham chiếu 1, hợp chất 1.1 và smaducin-6 ở các nồng độ khác nhau là 100 pM, 1 nM và 100 nM và sau đó được xử lý thêm bằng LPS trong 2 giờ. Sau đó, phân tích thẩm tách Western được thực hiện. Hợp chất 1.1 theo sáng chế không liên quan đến việc ức chế sự phosphoryl hóa của các protein trong con đường truyền tín hiệu MAPK/ERK mặc dù tăng liều, kết quả này là tương tự DMSO và hợp chất tham chiếu 1.

Ví dụ 2.11: So sánh với chất ức chế IRAK1/4

Như được mô tả trong ví dụ 2.3, plasmit chỉ thị 5x NF- κ B-Luc được chuyển nạp vào các tế bào đại thực bào RAW 246.7. Sau 24 giờ, các tế bào này được chuyển nạp với plasmit chỉ thị NF- κ B-Luc được xử lý trước bằng hợp chất 1.1 (100 nM), chất ức chế kinaza-1/4 được liên kết thụ thể interleukin-1 (IRAK1/4 – interleukin-1-receptor-associated-kinase-1/4) (25 μ M, CAS 509093-47-4) và smaducin-6 (100 nM) trong 30 phút, và sau đó được xử lý thêm bằng LPS (100 ng/mL) trong 2 giờ. Sau đó, hoạt tính luxiferaza trong tế bào được xác định.

Fig.22 thể hiện sự ức chế sự hoạt hóa NF- κ B bằng hợp chất 1.1 và chất ức chế IRAK1/4 (Fig.22B) tương đối. Ở nồng độ chất ức chế IRAK1/4 cao (ví dụ, 25 μ M), sự hoạt hóa NF- κ B được ức chế, tương tự hợp chất 1.1.

Sự thay đổi nồng độ I κ B trong dịch tan tế bào của các tế bào đại thực bào RAW 246.7, mà được xử lý trước bằng hợp chất 1.1 (100 nM), chất ức chế IRAK1/4 (25 μ M) và smaducin-6 (100 nM) và sau đó được xử lý thêm bằng LPS (100 ng/mL), được xác định (Fig.23). Chất ức chế RAK1/4 cũng ức chế sự phân hủy của I κ B tương tự hợp chất 1.1 (Fig.23).

Fig.24 thể hiện biểu đồ và hình ảnh so sánh sự ức chế con đường truyền tín hiệu MAPK/ERK bằng hợp chất 1.1 và chất ức chế IRAK1/4. Cụ thể là, các tế bào đại thực bào RAW 246.7 được xử lý trước bằng DMSO, hợp chất 1.1 (100 nM), chất ức chế IRAK1/4 (25 μ M) và smaducin-6 (100 nM) trong 30 phút và sau đó được xử lý thêm

bằng LPS (100 ng/mL) trong 2 giờ. Fig.24A thể hiện cụ thể các kết quả thẩm miễn dịch để đánh giá liệu sự phosphoryl hóa của các protein trong con đường truyền tín hiệu MAPK như ERK, JNK và p38 được ức chế bằng việc xử lý ở trên hay không. β -actin được sử dụng làm tham chiếu. Hợp chất 1.1 và smaducin-6 không ức chế con đường truyền tín hiệu MAPK cũng không ức chế sự phosphoryl hóa của protein. Ngược lại, chất ức chế IRAK1/4 ức chế ít nhất một hoặc nhiều con đường truyền tín hiệu MAPK.

Ngoài ra, để kiểm tra tác dụng phụ không mong muốn (ví dụ, từ thực tế là chất ức chế IRAK1/4 ức chế tín hiệu phiên mã AP-1 trong con đường MAPK gây ra bởi LPS, là ngược lại với hợp chất 1.1), các thử nghiệm dưới đây được thực hiện.

Các tế bào đại thực bào RAW 246.7 được chuyển nạp với plasmit chỉ thị AP-1-Luc như được mô tả trong ví dụ 2.3. Sau 24 giờ, các tế bào đã chuyển nạp với plasmit chỉ thị AP-1-Luc được xử lý trước bằng hợp chất 1.1 (100 nM), chất ức chế IRAK1/4 (25 μ M) và smaducin-6 (100 nM) trong 30 phút và sau đó được xử lý thêm bằng LPS (100 ng/mL) trong 2 giờ. Hoạt tính luciferaza trong các tế bào được xác định và các kết quả được thể hiện trên Fig.24B. Hợp chất 1.1 theo sáng chế ức chế chọn lọc hoạt động của con đường truyền tín hiệu NF- κ B, nhưng không ức chế con đường truyền tín hiệu MAPK mà con đường này là quan trọng đối với hoạt tính sinh học của tế bào. Tuy nhiên, chất ức chế IRAK1/4 ức chế con đường truyền tín hiệu MAPK, mà có thể dẫn đến việc ức chế các yếu tố phiên mã AP-1, sao cho, khi áp dụng cho đối tượng sinh học, có thể gây ra các tác dụng phụ không mong muốn.

Các kết quả trong các ví dụ từ 2.1 đến 2.11 ở trên chỉ ra rằng các hợp chất theo sáng chế có thể (1) ức chế sự biểu hiện của interleukin-6 và hoạt tính của NF- κ B, mà gây ra bởi sự xử lý LPS; (2) làm gián đoạn con đường truyền tín hiệu viêm được trung gian bởi MyD88 và RIP1; và (3) tạo ra chỉ số hoạt động bệnh tương tự với liều nhỏ hơn liều sulfasalazin mà hiện nay chứa trong thuốc chống viêm cho bệnh viêm ruột kết. Ngoài ra, khi các hợp chất theo sáng chế được dùng qua miệng, nồng độ trong dòng máu thấp, trong khi nồng độ hữu hiệu được duy trì trong các tế bào và/hoặc mô. Cụ thể, trong mô ruột, nồng độ hiệu quả của nó có thể được duy trì thậm chí đến sau 8 giờ dùng. Do đó, các hợp chất theo sáng chế được sử dụng để điều trị bệnh viêm trong mô ruột, và cụ thể là, được sử dụng hiệu quả dùng để ngăn ngừa, làm dịu và điều trị bệnh

viêm ruột như bệnh viêm ruột kết gây loét, bệnh Behcet, bệnh Crohn và các bệnh tương tự.

Ví dụ 2.12: Tác dụng đối với tế bào biểu mô sắc tố võng mạc

Hợp chất 1.1 ảnh hưởng đến các yếu tố liên quan đến quá trình hình thành mạch hoặc các yếu tố ức chế.

Các tế bào ARPE-19 được xử lý bằng glucoza 5,5mM làm đối chứng tham chiếu. Đối với nhóm thử nghiệm, các tế bào ARPE-19 được xử lý bằng glucoza 30 mM trong 48 giờ để gây ra tình trạng glucoza trong máu cao, và đồng thời được xử lý bằng DMSO, hợp chất 1.1 (10 nM) và hợp chất 1.1 (50 nM). Sự thay đổi trong biểu hiện của Nox-4, VEGF, VEGFR1, VEGFR2, Ang1, Ang2, Tie-2, EPO và EPOR protein được xác định bằng phân tích thẩm tách Western.

Ang1 và Tie-2, là các yếu tố kiểm soát xuất huyết bằng cách tăng cường mạch máu, được làm tăng theo nồng độ tăng của hợp chất 1.1 (Fig.25A). Tuy nhiên, biểu hiện của Nox4 của yếu tố sản xuất ROS (dạng oxy phản ứng), VEGF của yếu tố cảm ứng mạch máu mới, VEGFR1,2, Ang2 của yếu tố đối kháng với Ang1 và EPO và EPOR của các yếu tố đối với bệnh võng mạc do đái tháo đường được làm giảm bằng cách xử lý bằng hợp chất 1.1.

Ngoài ra, các tế bào HRMEC được xử lý bằng glucoza 5,5mM đối với nhóm tham chiếu. Đối với nhóm thử nghiệm, các tế bào HRMEC được xử lý bằng glucoza 30 mM trong 48 giờ để cảm ứng tình trạng glucoza trong máu cao, và được xử lý đồng thời bằng DMSO, hợp chất 1.1 (10 nM), và hợp chất 1.1 (50 nM). Sự thay đổi biểu hiện của protein Nox-4, VEGF, VEGFR1, VEGFR2, Ang1, Ang2, Tie-2, EPO và EPOR được xác định về mặt định lượng bằng qRT-PCR (RT-PCR định lượng). Sự biểu hiện của tiền chất VEGF làm yếu tố kích thích mạch máu mới được làm giảm bằng cách xử lý bằng hợp chất 1.1 (Fig.25B).

Để đánh giá hiệu quả của hợp chất 1.1 đối với sự tạo thành ống trong suốt quá trình hình thành mạch, các tế bào HRMEC (8×10^3) được nuôi cấy trên phiên kính hiển vi phủ Matrigel và được xử lý bằng VEGF 20 ng/mL trong 4 giờ để cảm ứng sự tạo thành ống. Đồng thời, đối với nhóm tham chiếu, các tế bào này được xử lý bằng DMSO, và đối với nhóm thử nghiệm, các tế bào này được xử lý bằng hợp chất 1.1 50 nM và calcein-AM 1μM. Các tế bào này được quan sát bằng cách sử dụng kính hiển vi

huỳnh quang.

Fig.26 thể hiện hình ảnh tạo thành ống trong tế bào bằng cách sử dụng kính hiển vi huỳnh quang, mà có thể thể hiện rằng hợp chất 1.1 ức chế sự tạo thành ống. Thực tế là, trong các tế bào ARPE-19 của các tế bào biểu mô sắc tố võng mạc ở người, hợp chất 1.1 ức chế sự biểu hiện của protein Nox-4, VEGF, VEGFR1, VEGFR2, Ang2, EPO và EPOR theo nồng độ gradien của nó, và biểu hiện của Ang1 và Tie-2 tăng được quan sát. Như vậy, hợp chất 1.1 được sử dụng hiệu quả dùng để ngăn ngừa, làm dịu hoặc điều trị các dấu hiệu viêm mắt như bệnh võng mạc do đái tháo đường. Ngoài ra, bằng cách làm gián đoạn sự tạo thành phức chất của Myd88 trong con đường truyền tín hiệu, hợp chất 1.1 được sử dụng hiệu quả dùng để ngăn ngừa, làm dịu hoặc điều trị bệnh teo địa lý, bệnh điểm vàng do lão hóa thể ướt (AMD thể ướt), bệnh điểm vàng do lão hóa thể khô (AMD thể khô) và các bệnh tương tự (Cell. 149(4), (2012); 847–859).

Ví dụ 2.13: Tác dụng đối với bệnh võng mạc do đái tháo đường

Streptozotocin (STZ) được dùng với liều 50mg/kg cho chuột nhắt hàng ngày trong 5 ngày, và thu được mô hình chuột nhắt mắc bệnh võng mạc do đái tháo đường được gây ra. Nhóm mô hình chuột nhắt làm thử nghiệm được tiêm hợp chất 1.1, với lượng là 0,2 μ g vào một mắt của chuột nhắt, từ ngày thứ hai mươi đến ngày thứ hai mươi bốn từ khi dùng, ba lần với hai ngày dùng một lần. Sau 50 ngày dùng, mẫu DR không được xử lý bằng hợp chất 1.1 và mẫu DR được xử lý bằng hợp chất 1.1 được thu.

Mô võng mạc thu được từ mỗi nhóm chuột nhắt như được mô tả ở trên được nhuộm với dihydroethidi 5 μ M và tỷ lệ oxy hoạt động từ mỗi nhóm được xác định (Fig.27B). Mẫu DR được tiêm bằng hợp chất 1.1 thể hiện tỷ lệ oxy hoạt động giảm so với mẫu DR không được điều trị. Do đó, hợp chất 1.1 theo sáng chế được sử dụng hiệu quả dùng để ngăn ngừa, làm dịu hoặc điều trị các dấu hiệu viêm mắt như bệnh võng mạc do đái tháo đường từ thử nghiệm sinh học sử dụng chuột nhắt.

Ví dụ 2.14: Tác dụng đối với bệnh xơ cứng rải rác

Để xác định hiệu quả của hợp chất 1.1 đối với bệnh xơ cứng rải rác, chuột nhắt (10 tuần tuổi, con cái) được làm nhạy cảm bằng MOG35-55/CFU và PTX và thu được mô hình chuột nhắt viêm não tủy tự miễn làm thử nghiệm. Phương pháp thử nghiệm được mô tả trong Oncotarget, Vol. 7 (2016), No. 13, 15382-15393, tài liệu này được

đưa vào phần mô tả bằng cách viện dẫn.

Như được thể hiện trên Fig.28A, hợp chất 1.1 được tiêm dưới da với liều là 1 mg/kg và 40 mg/kg trong 25 ngày một lần vào mỗi ngày. Đối với nhóm tham chiếu, 10000 đơn vị Interferon-beta được tiêm dưới da trong 25 ngày, một lần mỗi ngày. Điểm lâm sàng được xác định và được thể hiện. Kết quả là, hợp chất 1.1 thể hiện hiệu quả trong việc điều trị bệnh xơ cứng rải rác với liều tối thiểu là 1 mg/kg so với interferon-beta làm thuốc thông thường hiện được sử dụng để điều trị bệnh xơ cứng rải rác.

Ngoài ra, khi sự thay đổi khối lượng cơ thể được đo từ mỗi nhóm thử nghiệm, nhóm được điều trị bằng hợp chất 1.1 không giảm khối lượng so với nhóm mô hình bệnh EAE (Fig.28B). Nói cách khác, hợp chất 1.1, so với dược chất sơ cấp hiện nay để điều trị bệnh xơ cứng rải rác, *ví dụ* interferon-beta, đã thể hiện hiệu quả điều trị và độ an toàn tương tự hoặc tốt hơn, và do đó, được sử dụng hiệu quả dùng để ngăn ngừa, làm dịu hoặc điều trị bệnh xơ cứng rải rác trong mô hình bệnh viêm não tủy tự miễn làm thử nghiệm.

Ví dụ 2.15: Tác dụng đối với bệnh nhiễm khuẩn huyết

Để xác định hiệu quả của hợp chất 1.1 đối với bệnh nhiễm khuẩn huyết, 10 con chuột nhắt ở mỗi nhóm (7 tuần tuổi, con đực) được gây mê, và sau đó, ruột thừa được làm lộ ra bằng đường rạch ở bụng. Phần dưới của van hồi manh tràng của ruột thừa đã lộ ra được thắt và một lỗ được tạo ra bằng cách sử dụng kim tiêm 22 gage. Ruột thừa được xử lý được đưa trở lại vào khoang bụng, và được khâu liền bằng cách sử dụng chỉ để thu được mô hình chuột nhắt được gây bệnh nhiễm khuẩn huyết (mô hình thắt manh tràng và chọc dò, mô hình CLP). Phương pháp thử nghiệm được mô tả trong EMBO Mol Med. (2015) Mar 12; 7(5):577-92, tài liệu này được đưa vào phần mô tả bằng cách viện dẫn.

Hợp chất 1.1 được tiêm dưới da cho các con chuột nhắt được điều trị với liều 1 mg/kg, 2 giờ sau quy trình CLP, 12 giờ giữa mỗi lần, ba lần. Đối với đối chứng tham chiếu, smaducin-6 được tiêm dưới da với liều 12 mg/kg như phương pháp tương tự được sử dụng đối với hợp chất 1.1. Tỷ lệ sống sót của chuột nhắt từ mỗi nhóm được xác định (Fig.29). Nhóm so sánh giả không được điều trị sau khi rạch ở bụng và khâu lại, nhóm so sánh CLP+PBS được điều trị bằng nước muối đệm phosphat (PBS) thay

vì hợp chất thuốc sau khi chuẩn bị mô hình thất manh tràng và chọc dò. Kết quả là, hợp chất 1.1 (1 mg/kg) là hữu hiệu để điều trị bệnh nhiễm khuẩn huyết, mà không được điều trị trước bằng thuốc thông thường với liều thấp so với smadudin-6 liều cao (ví dụ 12 mg/kg), với 60% tỷ lệ sống sót. Nói cách khác, hợp chất 1.1 là hữu hiệu đối với mô hình thất manh tràng và chọc dò (cecal ligation and puncture - CLP), chỉ ra rằng hợp chất 1.1 được sử dụng hiệu quả dùng để ngăn ngừa, làm dịu hoặc điều trị bệnh nhiễm khuẩn huyết.

<Dạng bào chế 1> Hạt

Hợp chất có công thức 1	2g
-------------------------	----

Lactoza	1g
---------	----

Hạt này được bào chế theo phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật.

<Dạng bào chế 2> Viên nén

Hợp chất có công thức 1	100 mg
-------------------------	--------

Tinh bột ngô	100 mg
--------------	--------

Lactoza	100 mg
---------	--------

Stearic magie	2 mg
---------------	------

Viên nén được bào chế theo phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật.

<Dạng bào chế 3> Viên nang

Hợp chất có công thức 1	100 mg
-------------------------	--------

Tinh bột ngô	100 mg
--------------	--------

Lactoza	100 mg
---------	--------

Stearic magie	2 mg
---------------	------

Viên nang được bào chế theo phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật.

<Dạng bào chế 4> Dạng tiêm

Hợp chất có công thức 1	100 mg
-------------------------	--------

Manitol	180 mg
---------	--------

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	26 mg
---	-------

Nước cất	2974 mg
----------	---------

Dạng tiêm được bào chế theo phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật.

Các tài liệu trích dẫn

1. Toxicology and Applied Pharmacology 279 (2014) 311-321
2. International Immunopharmacology 23 (2014) 294-303
3. Seminars in Immunology 26 (2014) 75-79
4. Neurobiology of Aging 22 (2001) 863-871
5. J. Immunology 175 (2005) 3463-3468
6. Prot Natl Acad Sci. 86 (1989) 6367-6371; J. Immunol. 143 (1989) 3949-3955; Nature 332 (1988) 83-85
7. FASEB J. 4 (1990) 2860-2867
8. J. Immunol. 147 (1991) 2777-2786
9. Cell 46(5) (1986) 705-16
10. Annu Rev Immunol. 16 (1998) 225
11. Nature 395 (1998) 297-300; Cell 93 (1998) 1231-1240
12. Nature 449 (2007), 361–365
13. American Journal of Pathology, 162(2), (2003)
14. Nature Immunol. 6, (2005), 507–514
15. J Cell Physiol. 196(2): (2003); 258-64)
16. Nature Protocols, 8(3), (2013) 627-637.
17. The Journal of Clinical Investigation, 124(11), (2014), 4976-4988.
18. J. Virology, 86(12), (2012), 6595-6604.
19. J. Clin. Invest., 111 (2003), 1297–1308.
20. Immunity, 10 (1999), 39–49.
21. Eur. J. Immunol., 36 (2006), 864–874.
22. Immunity, 25 (2006), 319–329.
23. Cell 118 (2004), 229–241.
24. J. Immunol. 179 (2007), 2690–2694.
25. Oncotich, Vol. 7 (2016), No. 13, 15382-15393.

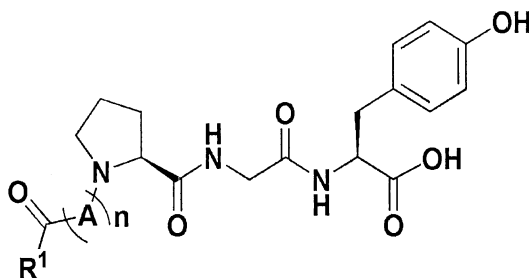
26. Cell. 149(4), (2012); 847–859.
27. Nature Medicine, 19(5), (2013), 595-602.
28. J. Immunol., 187 (2011), 1-14.
29. J. Inv. Derm., 132 (2012), 43-49.
30. Med. Inflamm., (2010), Article ID 928030
31. Hair The Transplant, 4 (2014), 4:1
32. Exp. Derm., 17 (2007), 12-19
33. DDT Dis. Mech. 5 (2009), e163-171
34. EMBO Mol Med. (2015) Mar 12; 7(5):577-92
35. Expert opinion on emerging drugs (2015) 20(3):349-352
36. Cell. (2010) March 19; 140(6): 883–899
37. Progress in Retinal and Eye Research 37(2013) 68e89
38. P&T 41(2016), Jun no 6
39. Gut 56(2007):725–732.
40. World J Gastroenterol (2005);11(16):2462-2466

Tất cả các tài liệu, bao gồm nhưng không giới hạn ở tài liệu sáng chế và các đơn sáng chế được trích dẫn trong phần mô tả này được đưa vào bằng cách viện dẫn khi nếu mỗi tài liệu riêng rẽ được chỉ ra cụ thể và riêng lẻ cần được đưa vào bằng cách viện dẫn trong bản mô tả như được nêu đầy đủ ở trên.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Hợp chất được biểu diễn bằng công thức 1 dưới đây, chất đồng phân quang học của nó hoặc muối được dụng của nó:

Công thức 1:



trong đó:

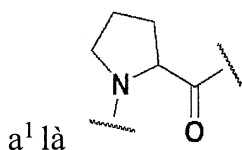
n là 0, 1 hoặc 2;

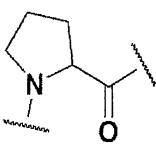
A là $-a^1-$, là axit amin độc lập được chọn từ nhóm bao gồm alanin, (Ala, A), arginin (Arg, R), asparagin (Asn, N), axit aspartic (Asp, D), cystein (Cys, C), axit glutamic (Glu, E), glutamin (Gln, Q), glyxin (Gly, G), histidin (His, H), isoleuxin (Ile, I), leuxin (Leu, L), lysin (Lys, K), methionin (Met, M), phenylalanin (Phe, F), prolin (Pro, P), serin (Ser, S), threonin (Thr, T), tryptophan (Trp, W), tyrosin (Tyr, Y) và valin (Val, V), cả hai đầu tận cùng của axit amin này đều liên kết với nhóm cacbonyl hoặc nhóm amin bằng liên kết amit; và

R^1 là C_{1-36} alkyl mạch thẳng hoặc mạch nhánh, C_{2-36} alkenyl mạch thẳng hoặc mạch nhánh chứa ít nhất một liên kết đôi hoặc C_{2-36} alkynyl mạch thẳng hoặc mạch nhánh chứa ít nhất một liên kết ba.

2. Hợp chất theo điểm 1, trong đó:

n là 0, 1 hoặc 2;

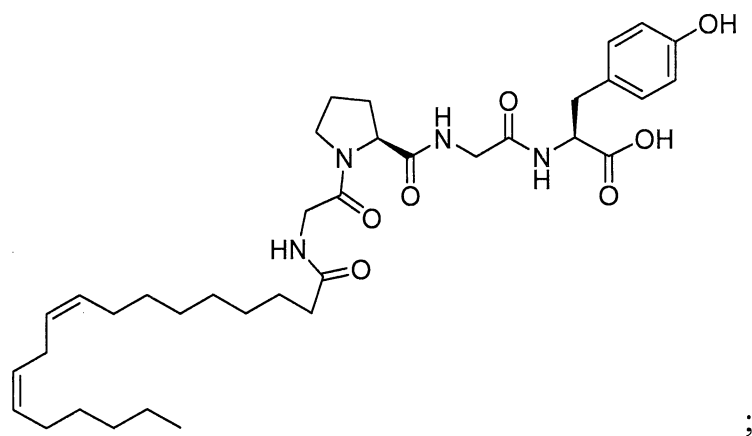
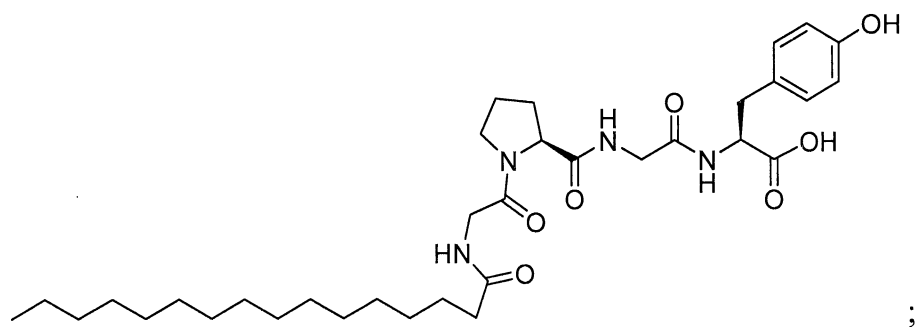
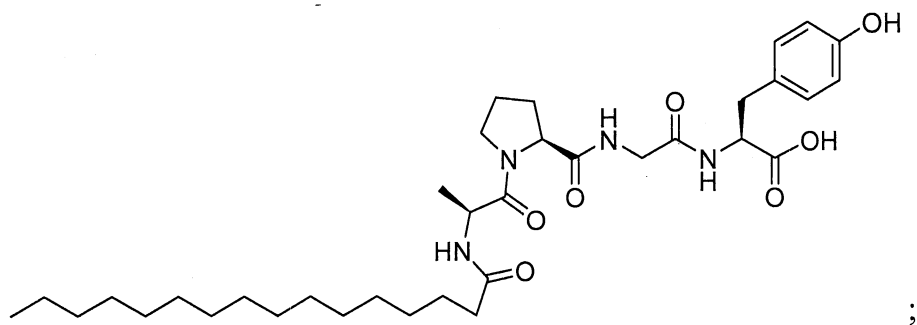
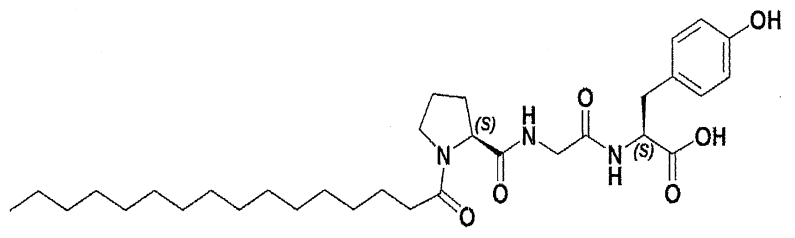
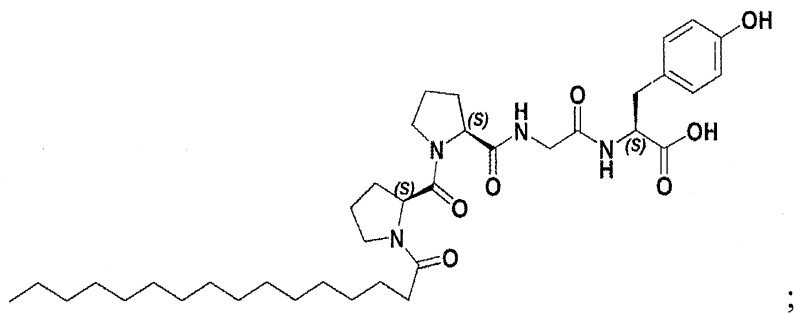


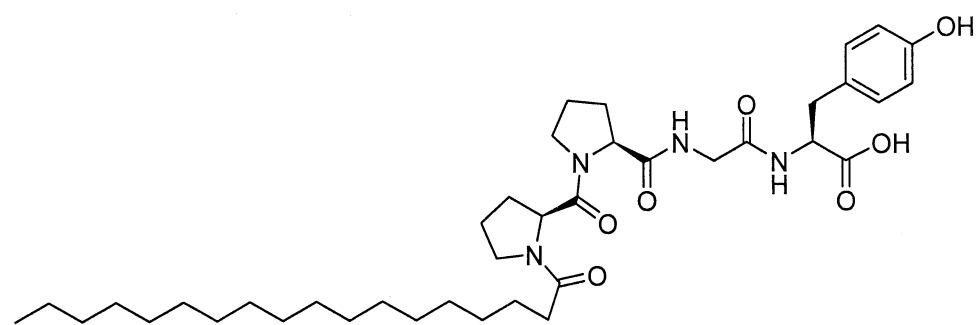
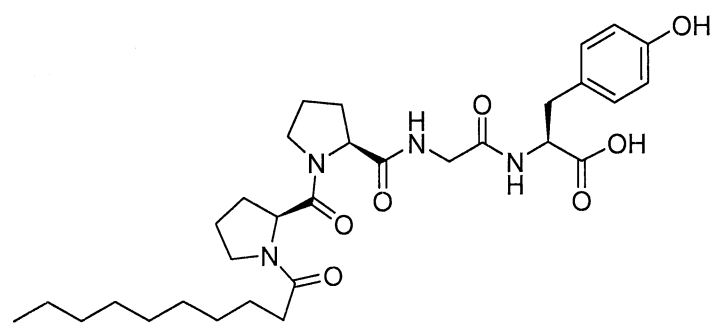
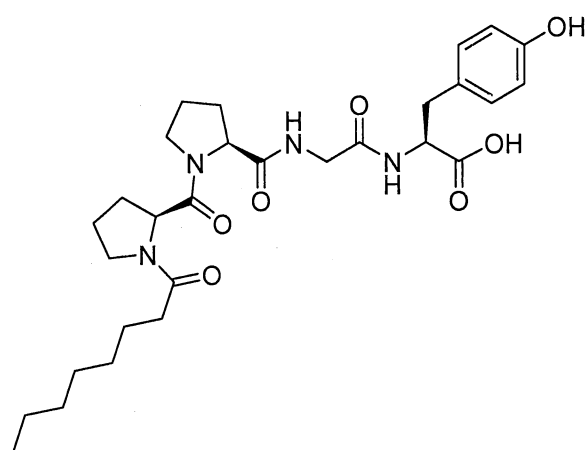
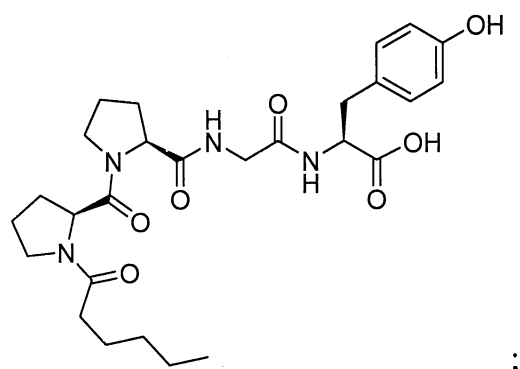
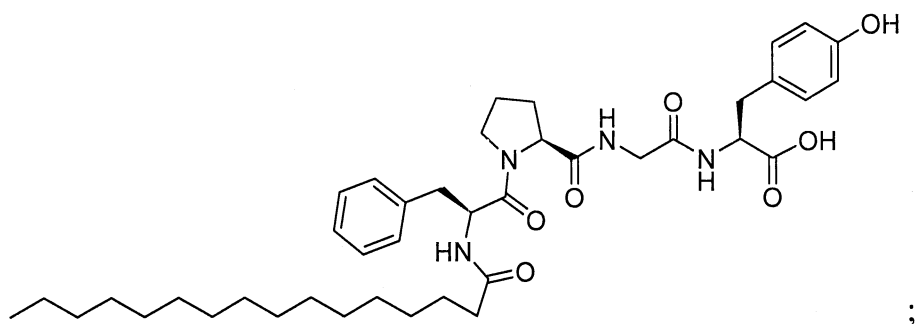
a^1 là , cả hai đầu tận cùng của hợp chất này đều liên kết với nhóm cacbonyl hoặc nhóm amit của nó bằng liên kết amit; và

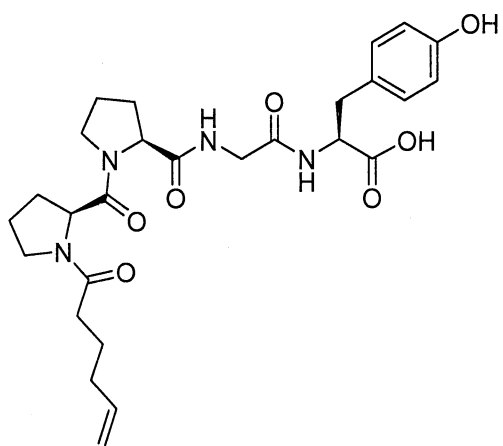
R^1 là C_{1-36} alkyl mạch thẳng hoặc mạch nhánh.

3. Hợp chất theo điểm 1, trong đó hợp chất này được chọn từ nhóm bao gồm các hợp

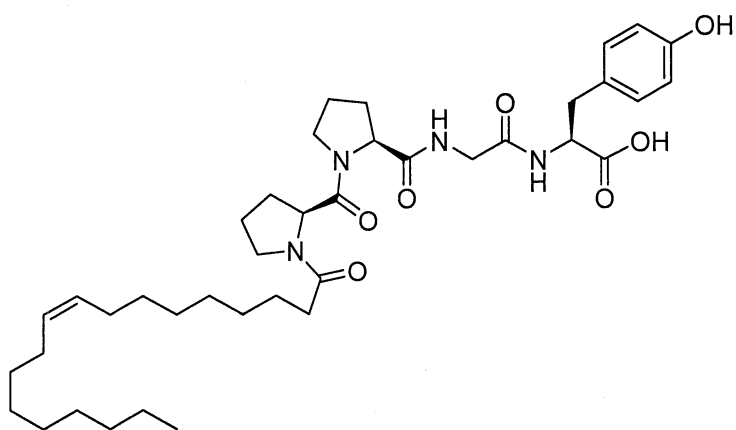
chất dưới đây:



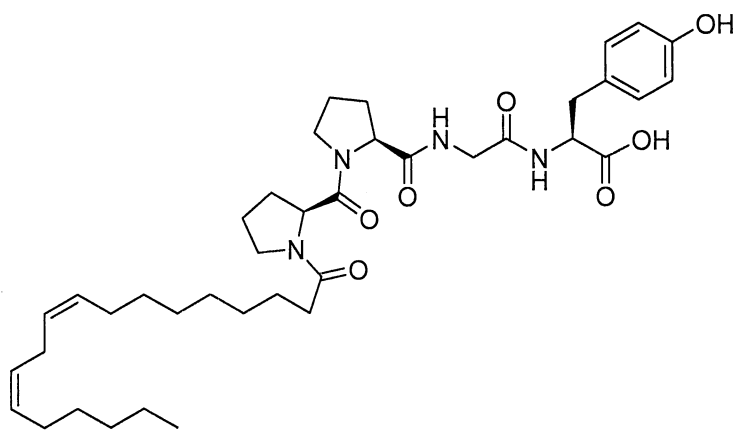




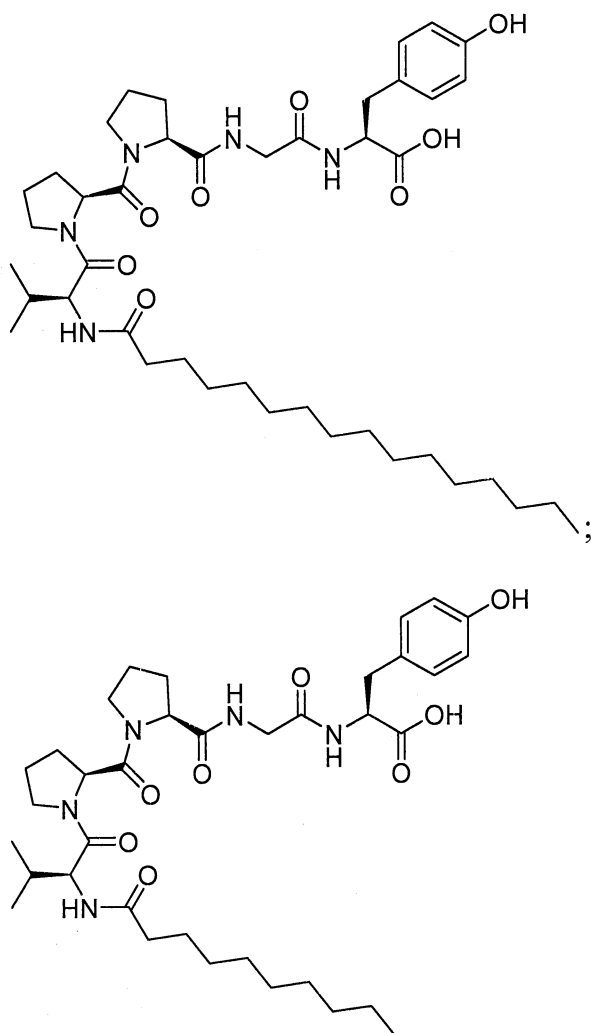
;



;



;



4. Phương pháp điều chế hợp chất theo điểm 1 được biểu diễn bằng công thức 1, trong đó phương pháp này bao gồm các bước như được thể hiện trong sơ đồ phản ứng 1 dưới đây:

cho hợp chất 2 phản ứng với hợp chất 3 để điều chế hợp chất 4;

thủy phân hợp chất 4 với sự có mặt của bazơ để điều chế hợp chất 5;

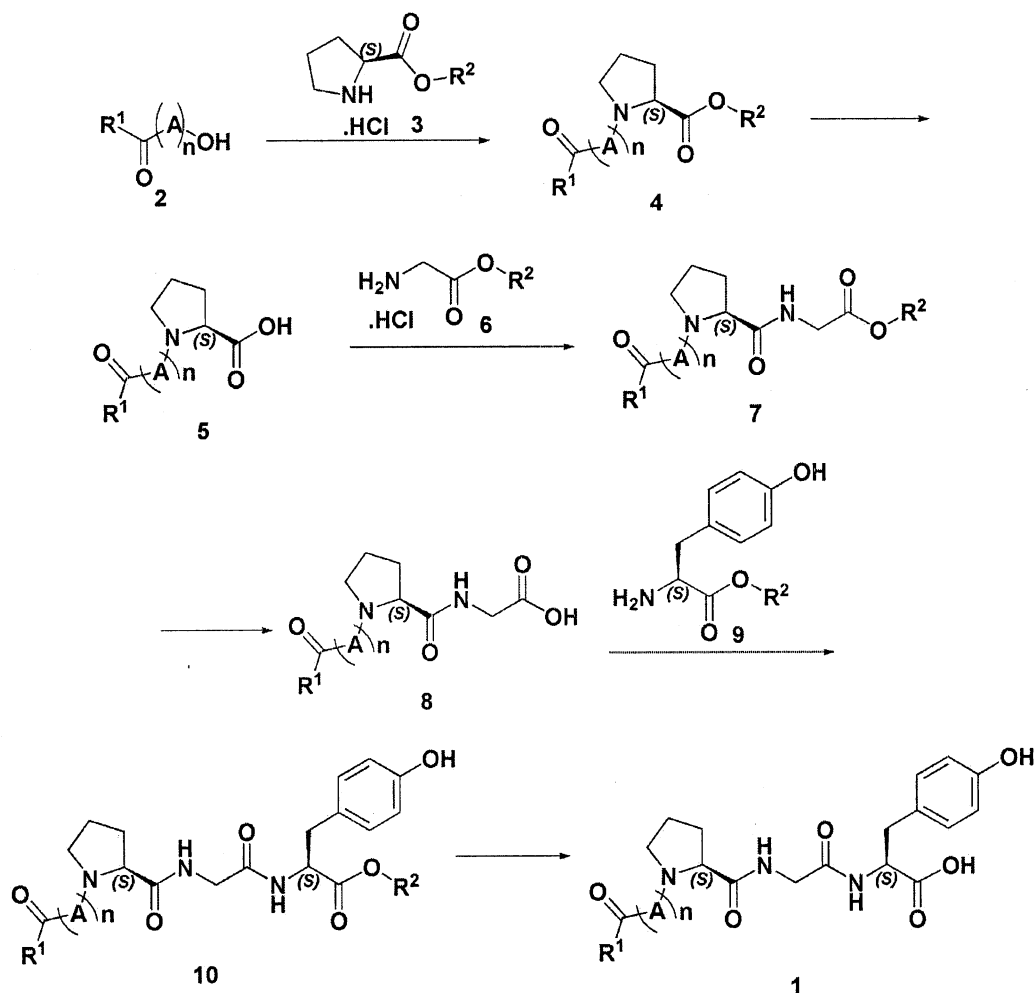
cho hợp chất 5 phản ứng với hợp chất 6 để điều chế hợp chất 7;

thủy phân hợp chất 7 với sự có mặt của bazơ để điều chế hợp chất 8;

cho hợp chất 8 phản ứng với hợp chất 9 để điều chế hợp chất 10;

thủy phân hợp chất 10 với sự có mặt của bazơ để điều chế hợp chất theo điểm 1;

Sơ đồ phản ứng 1:



trong đó A, R^1 và n là giống như được xác định trong điểm 1 và R^2 là C_{1-5} alkyl mạch thẳng hoặc mạch nhánh.

5. Chế phẩm dùng để ngăn ngừa, cải thiện hoặc điều trị bệnh viêm ruột, trong đó chế phẩm này chứa thành phần hoạt tính là hợp chất, chất đồng phân quang học hoặc muối theo điểm 1.

6. Chế phẩm dùng để ngăn ngừa, cải thiện hoặc điều trị bệnh hoặc hội chứng, trong đó chế phẩm này chứa thành phần hoạt tính là hợp chất, chất đồng phân quang học hoặc muối theo điểm 1, trong đó bệnh hoặc hội chứng này bao gồm bệnh teo địa lý, bệnh điểm vàng do lão hóa thể ướt, bệnh điểm vàng do lão hóa thể khô và bệnh vồng mạc do đái tháo đường.

7. Chế phẩm dùng để ngăn ngừa, cải thiện hoặc điều trị bệnh hoặc hội chứng, trong đó chế phẩm này chứa thành phần hoạt tính là hợp chất, chất đồng phân quang học hoặc muối theo điểm 1, trong đó bệnh hoặc hội chứng này bao gồm chứng nhiễm khuẩn và bệnh xơ cứng rải rác.

8. Chế phẩm dùng để ngăn ngừa, cải thiện hoặc điều trị bệnh rụng tóc, trong đó chế phẩm này chứa thành phần hoạt tính là hợp chất, chất đồng phân quang học hoặc muối theo điểm 1, trong đó thành phần hoạt tính này ức chế sự biểu hiện của IL-6 ở da đầu và nang tóc.

9. Chế phẩm dùng để ngăn ngừa, cải thiện hoặc điều trị bệnh hoặc hội chứng, trong đó chế phẩm này chứa thành phần hoạt tính là hợp chất, chất đồng phân quang học hoặc muối theo điểm 1, trong đó bệnh hoặc hội chứng này liên quan đến sự tạo thành phức chất truyền tín hiệu viêm gây ra bởi Pellino-1 chứa MyD88, RIP1 hoặc cả hai.

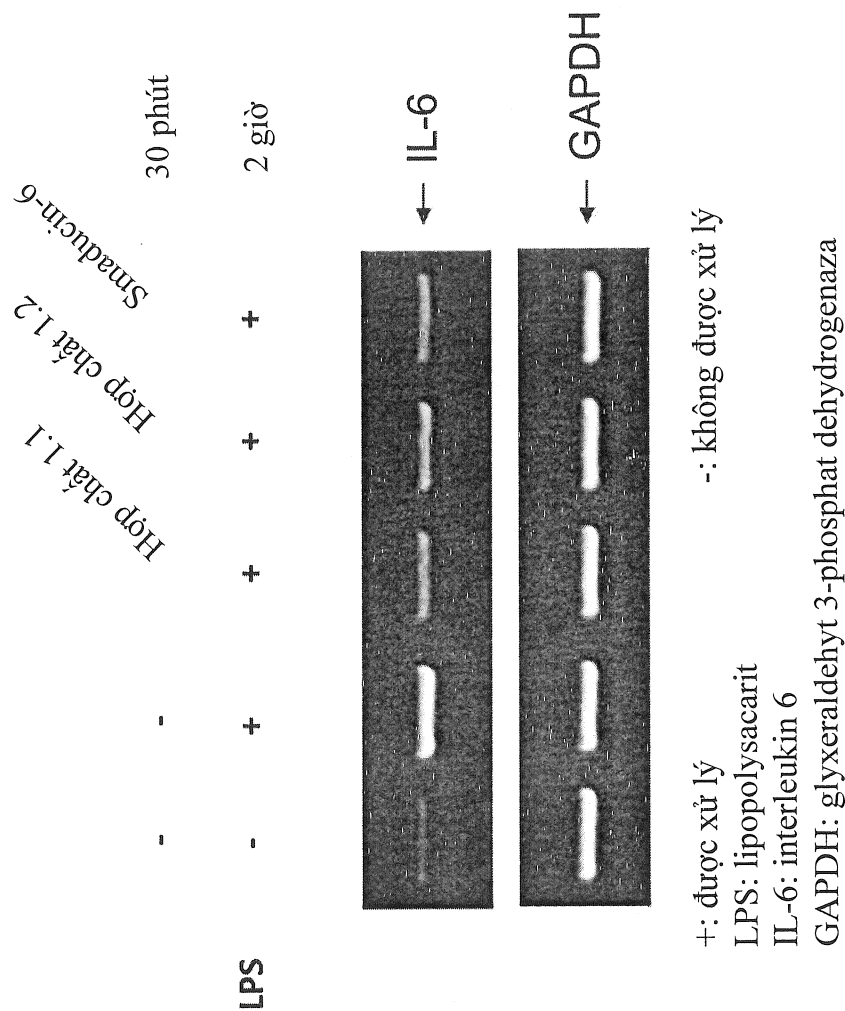


Fig.1A

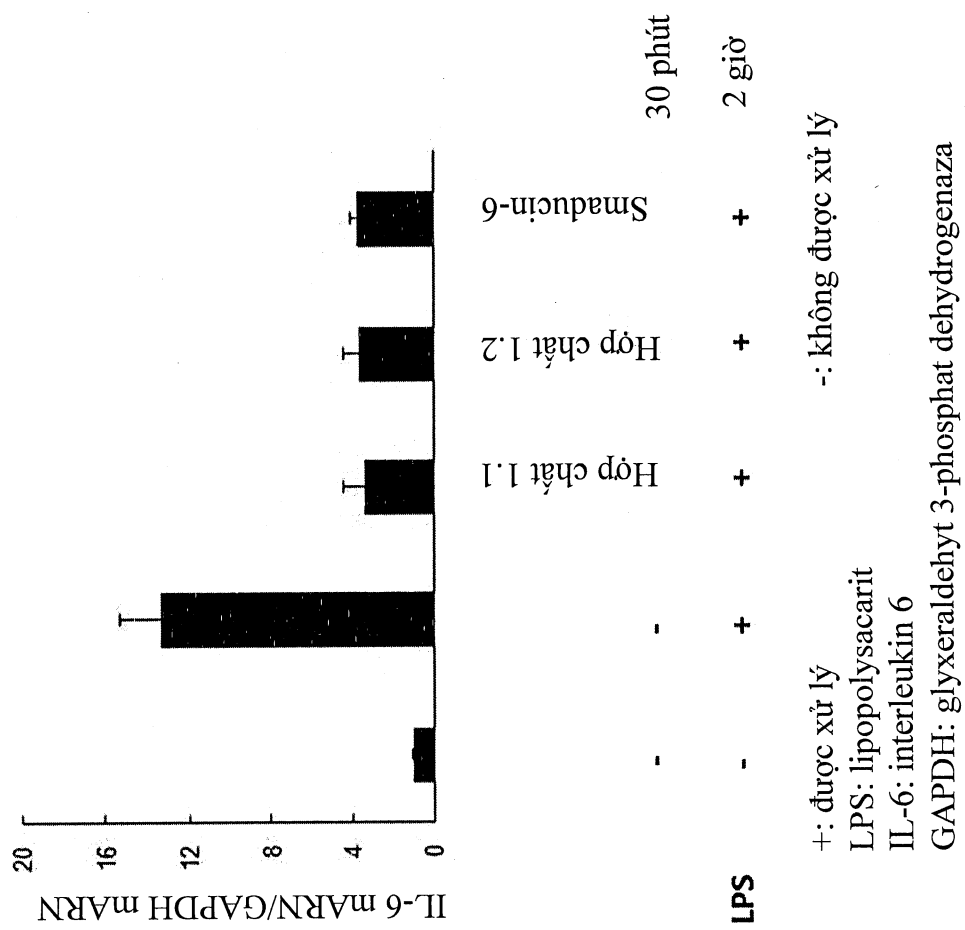


Fig.1B

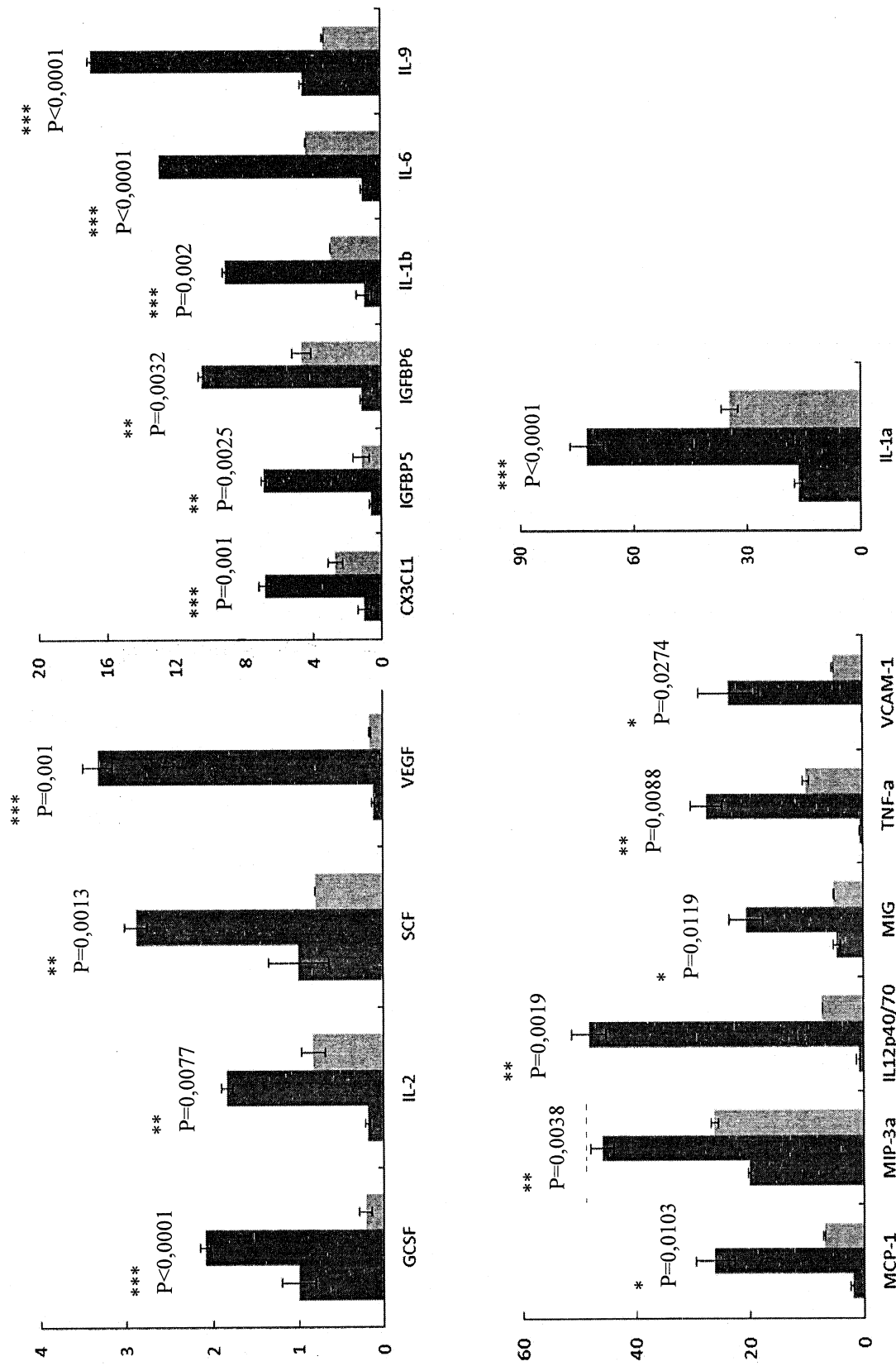


Fig.2

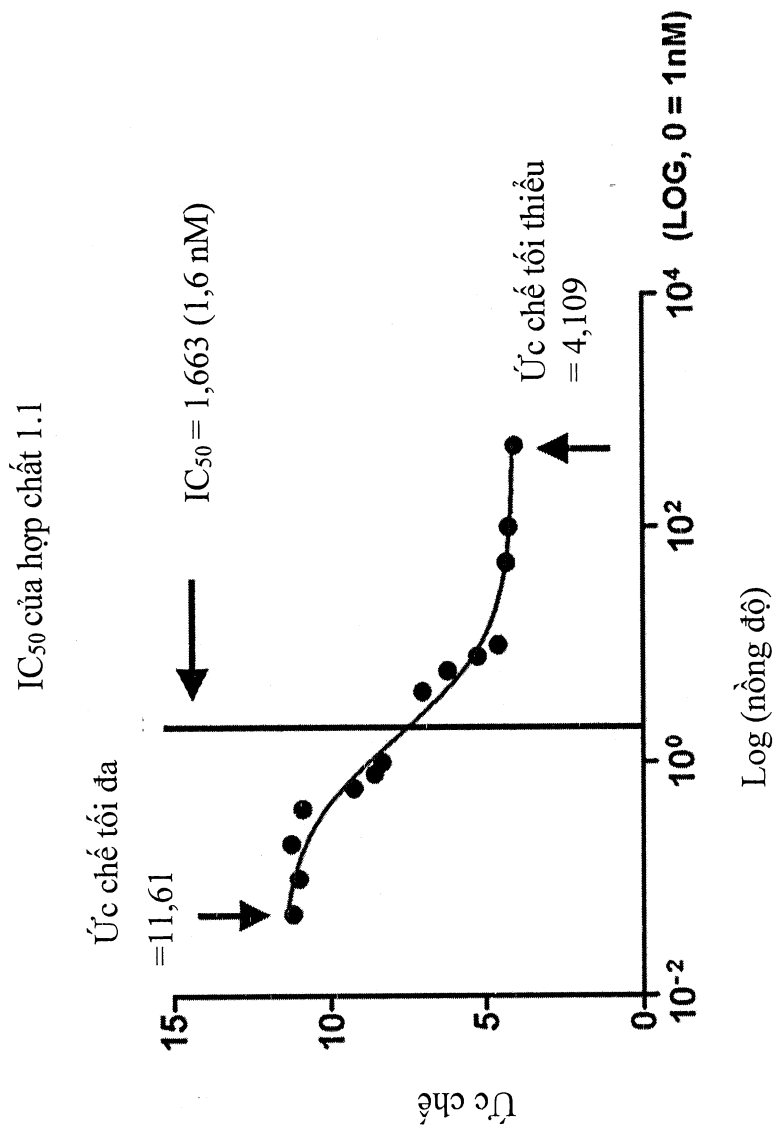


Fig.3

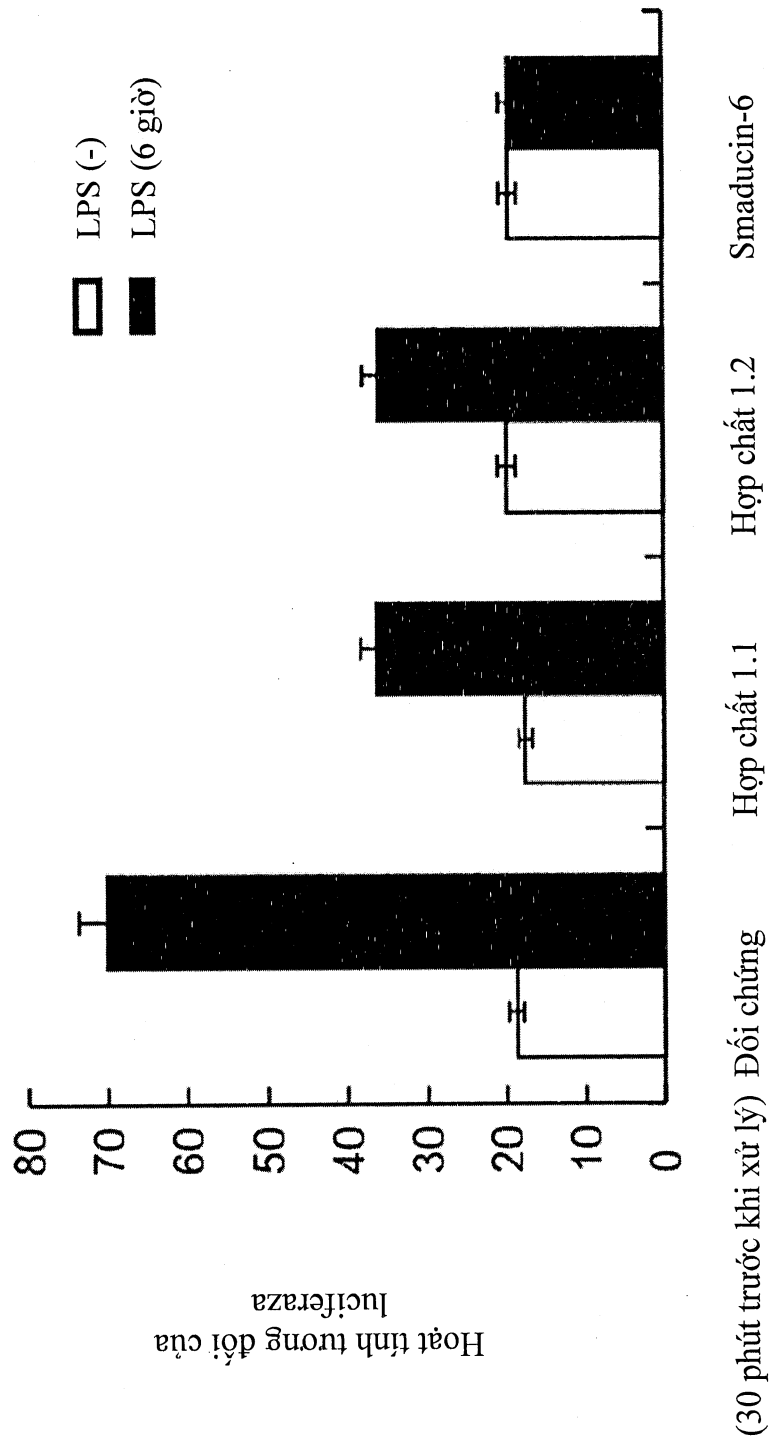


Fig.4

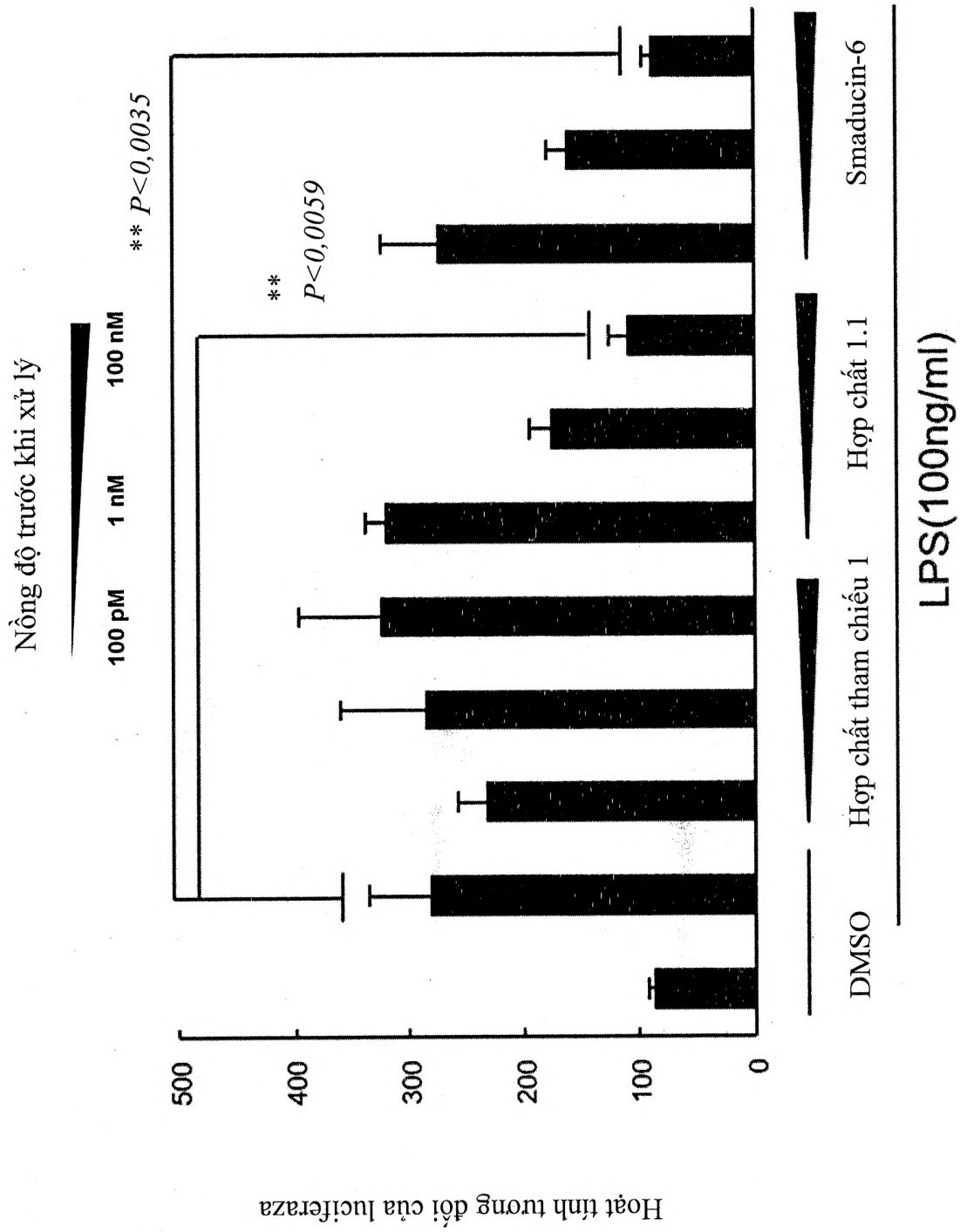


Fig.5

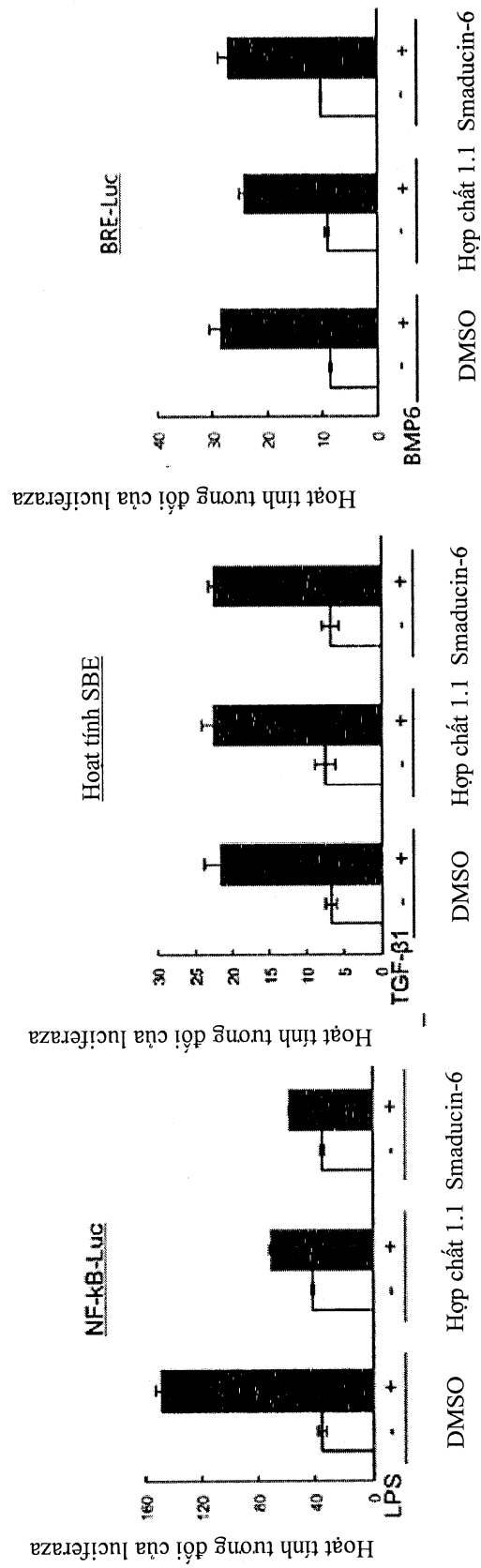


Fig.6

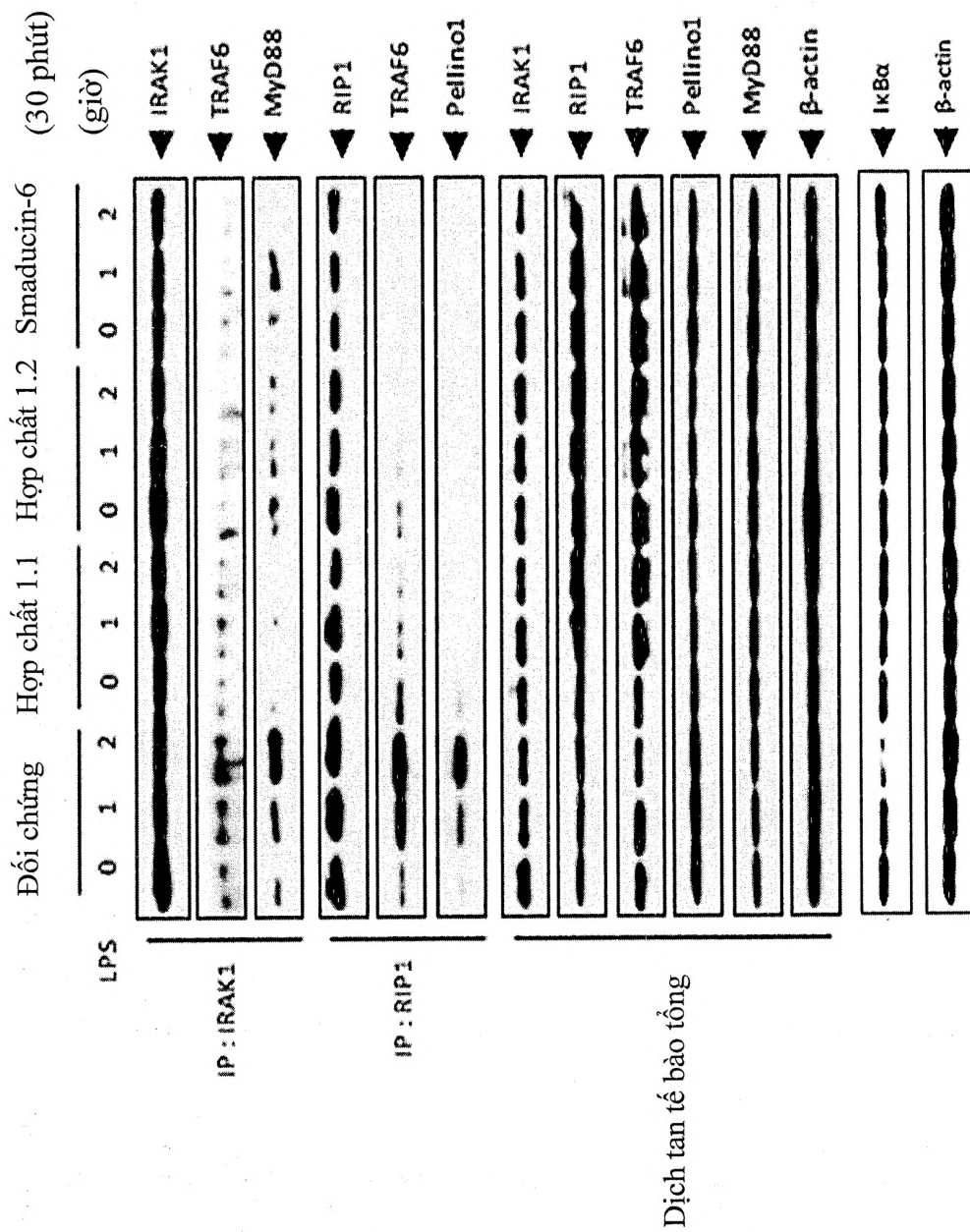


Fig.7

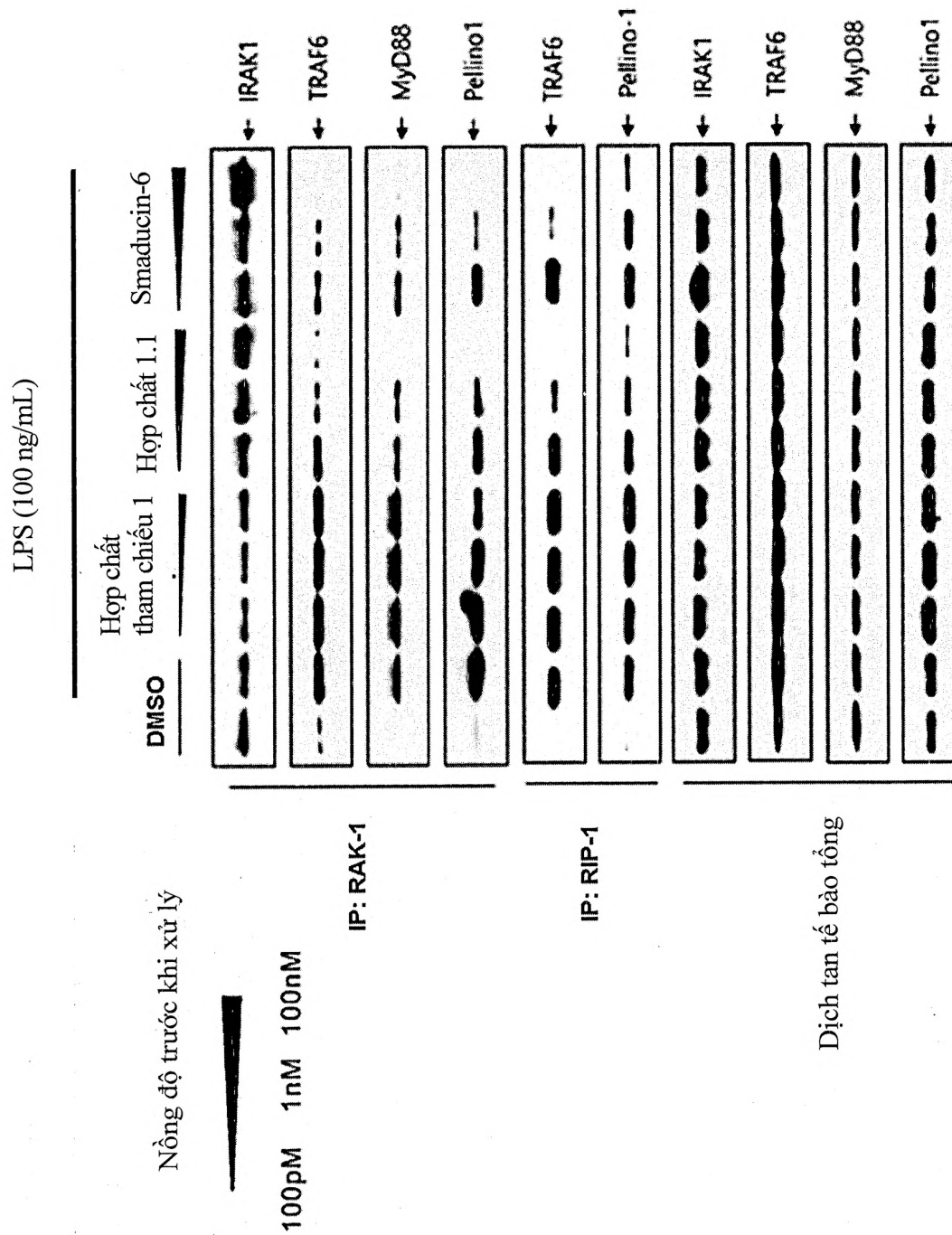


Fig.8

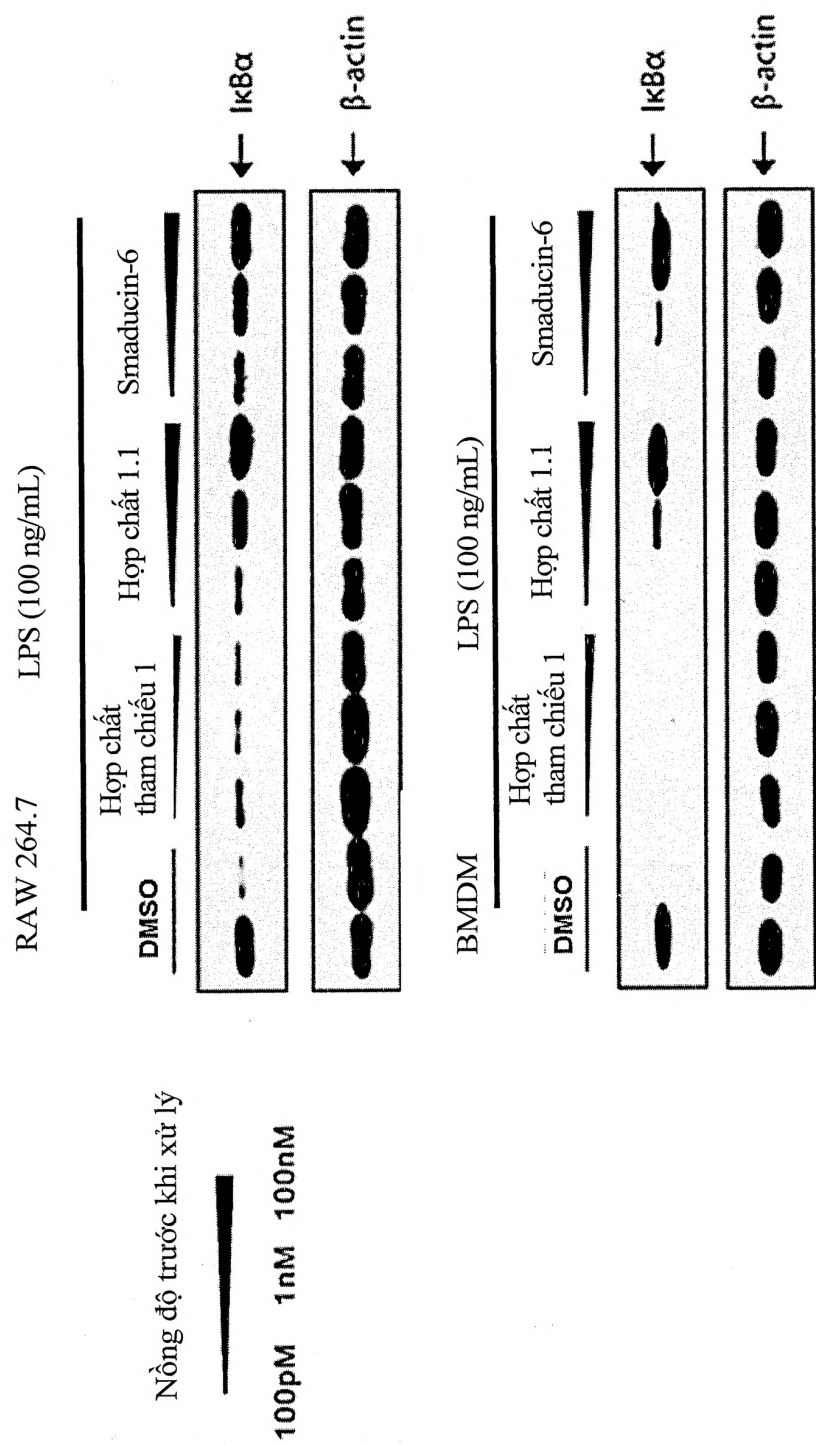


Fig.9

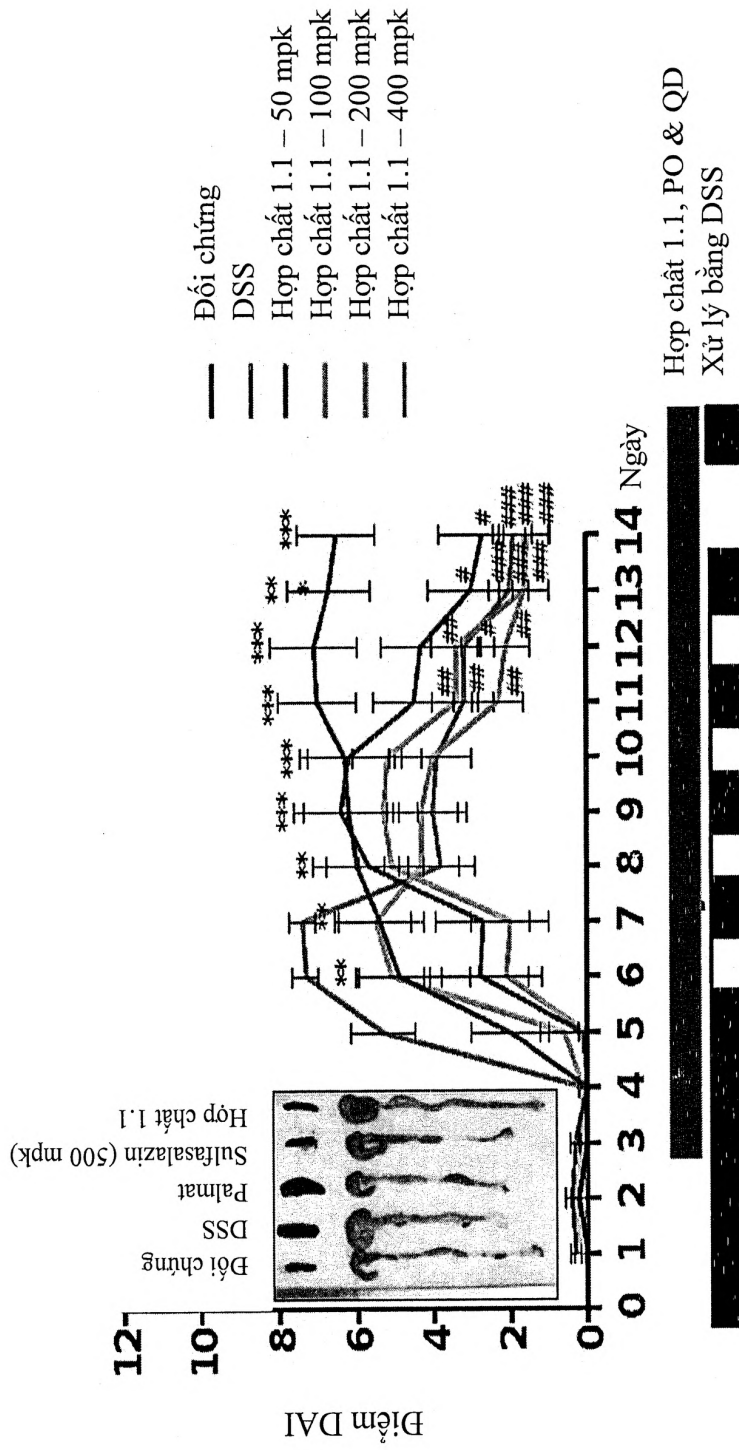


Fig.10

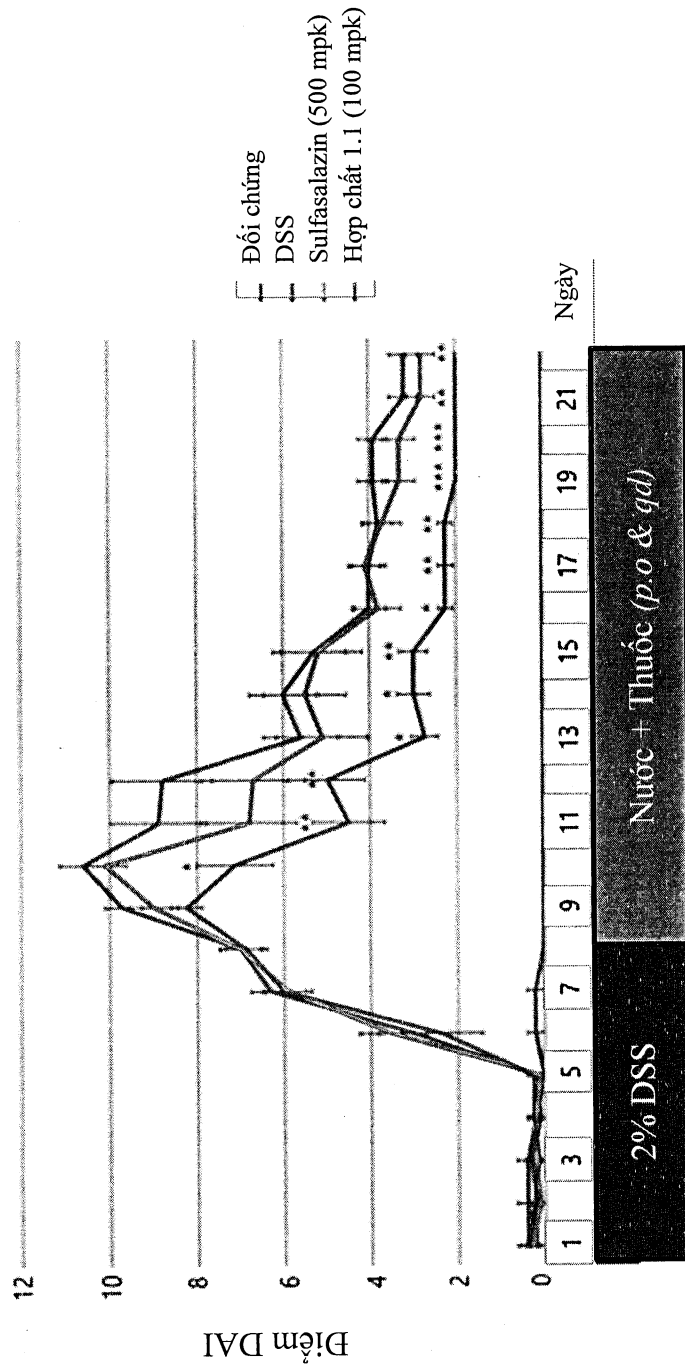


Fig.11A

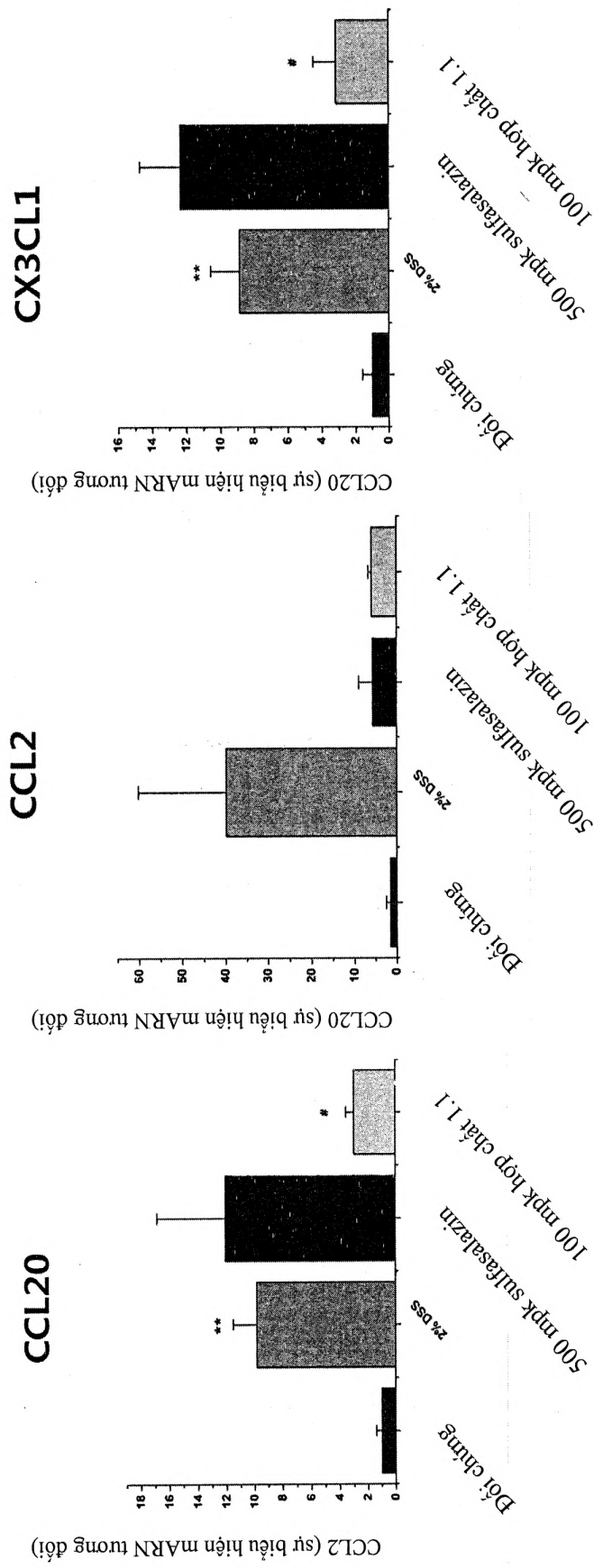
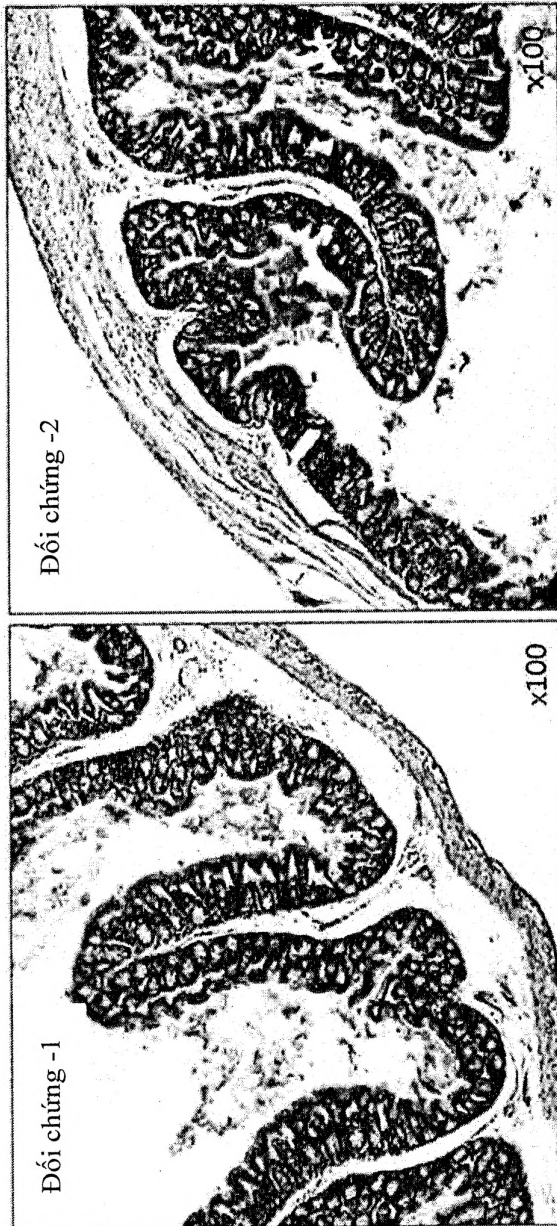
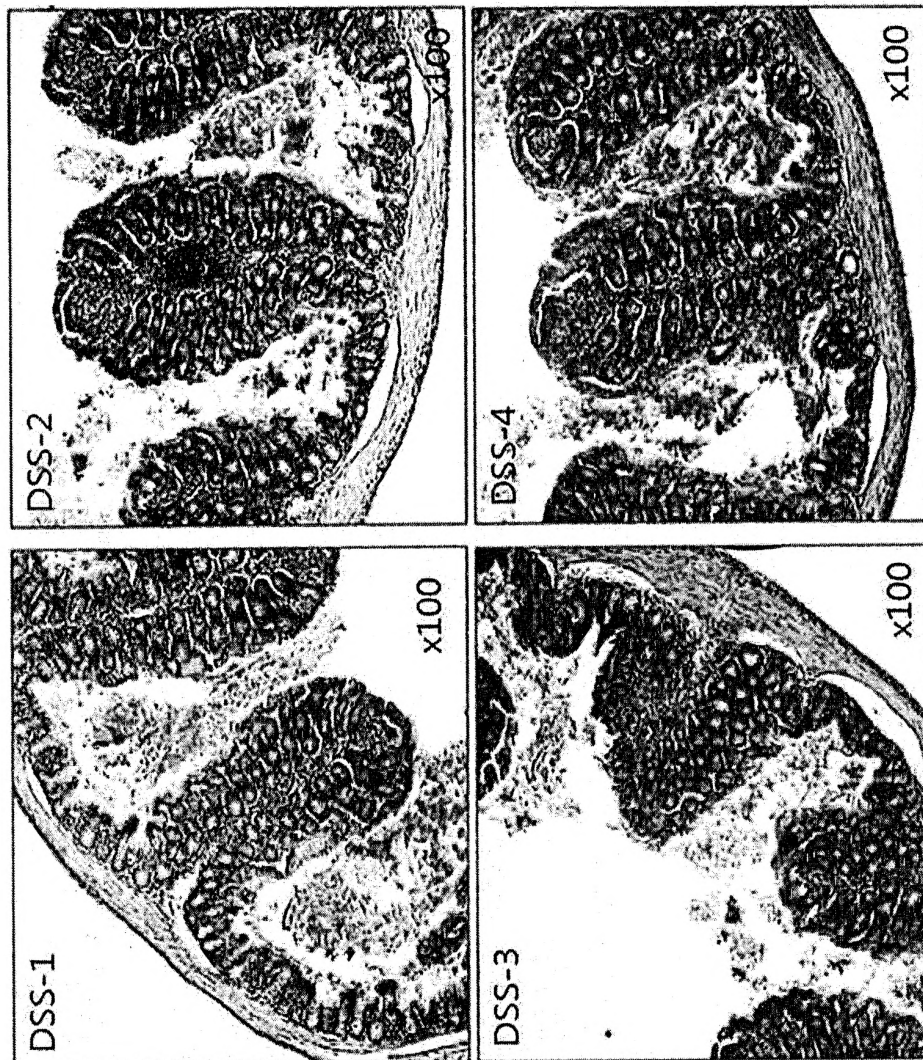


Fig.11B



Đối chứng: không được xử lý

Fig.12



DSS: được xử lý bằng dextran natri sulfat (DSS)

Fig.13

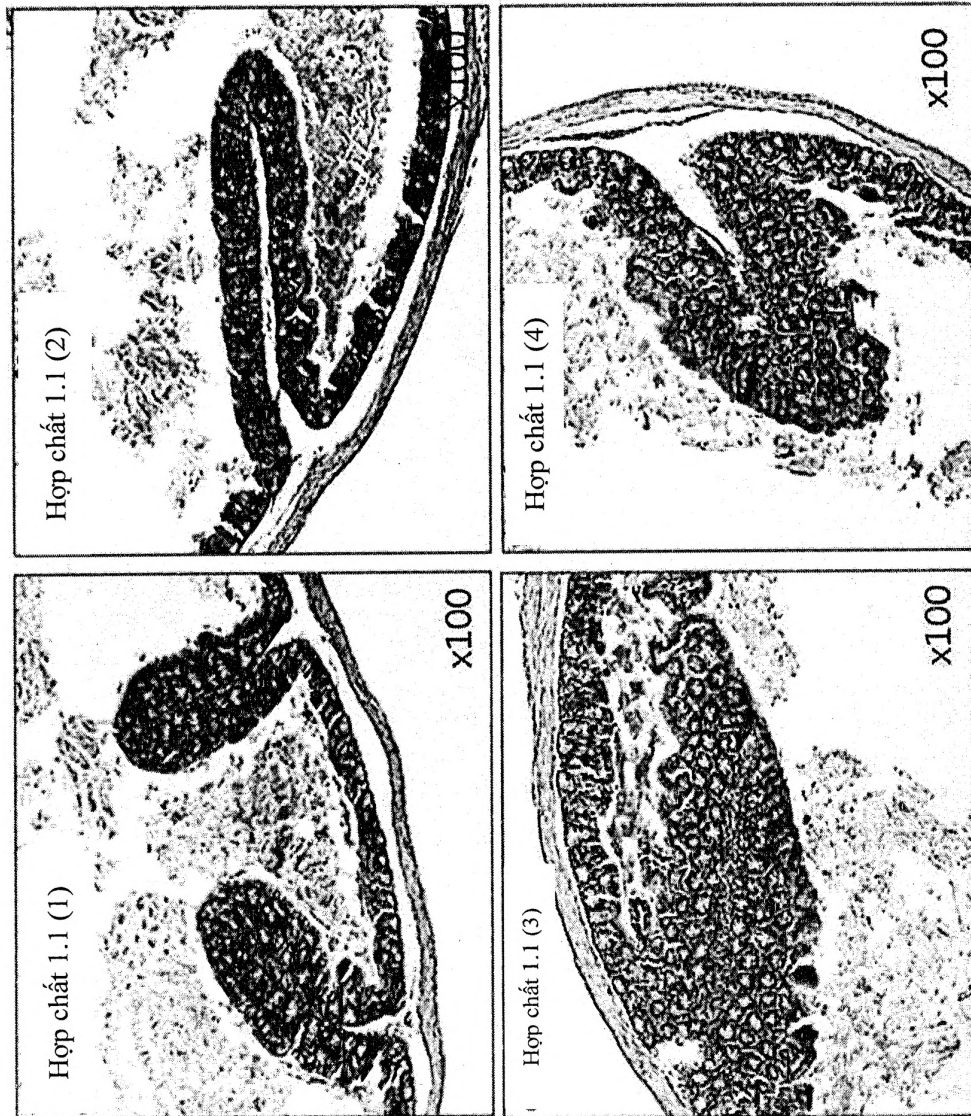


Fig.14

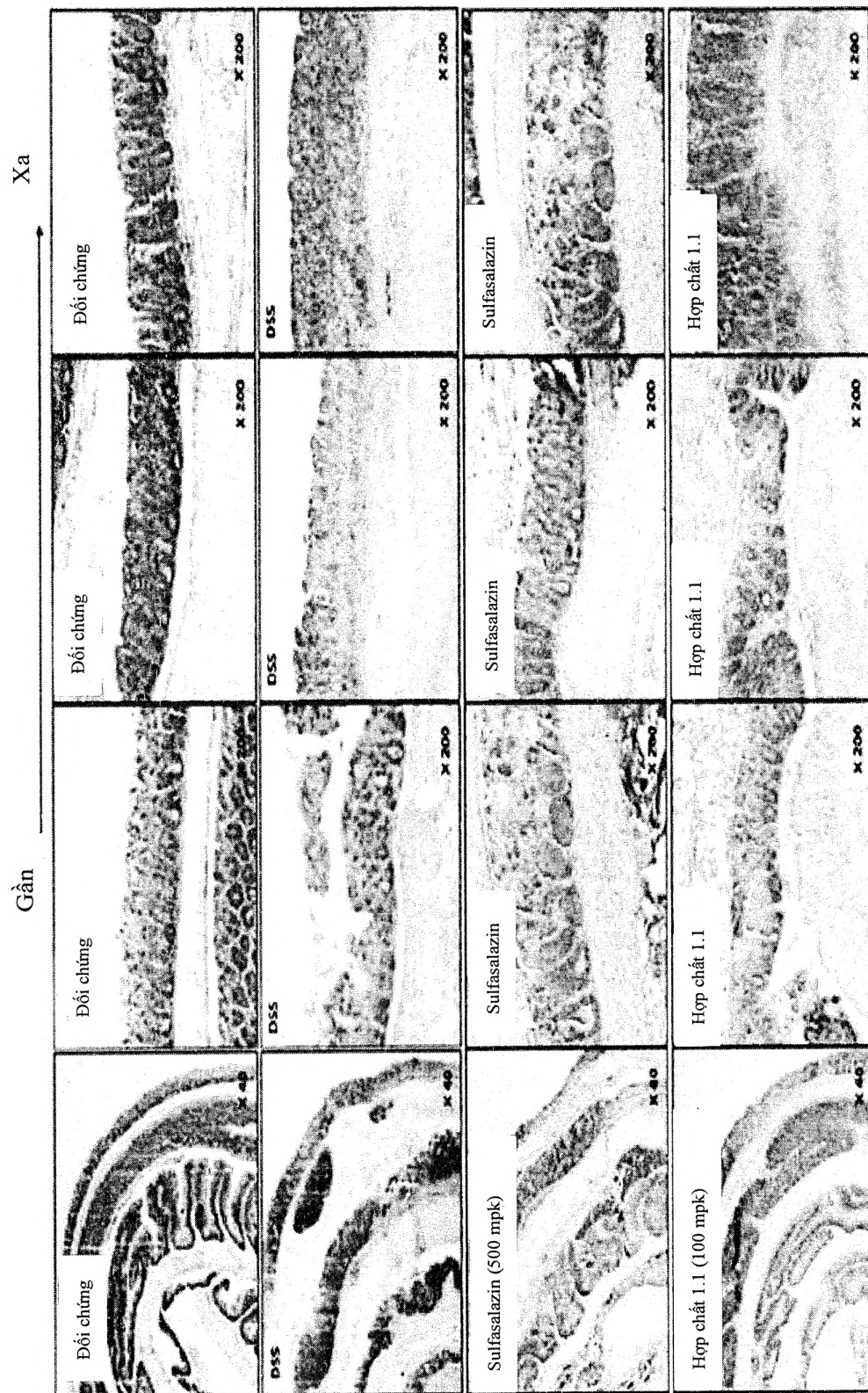


Fig.16

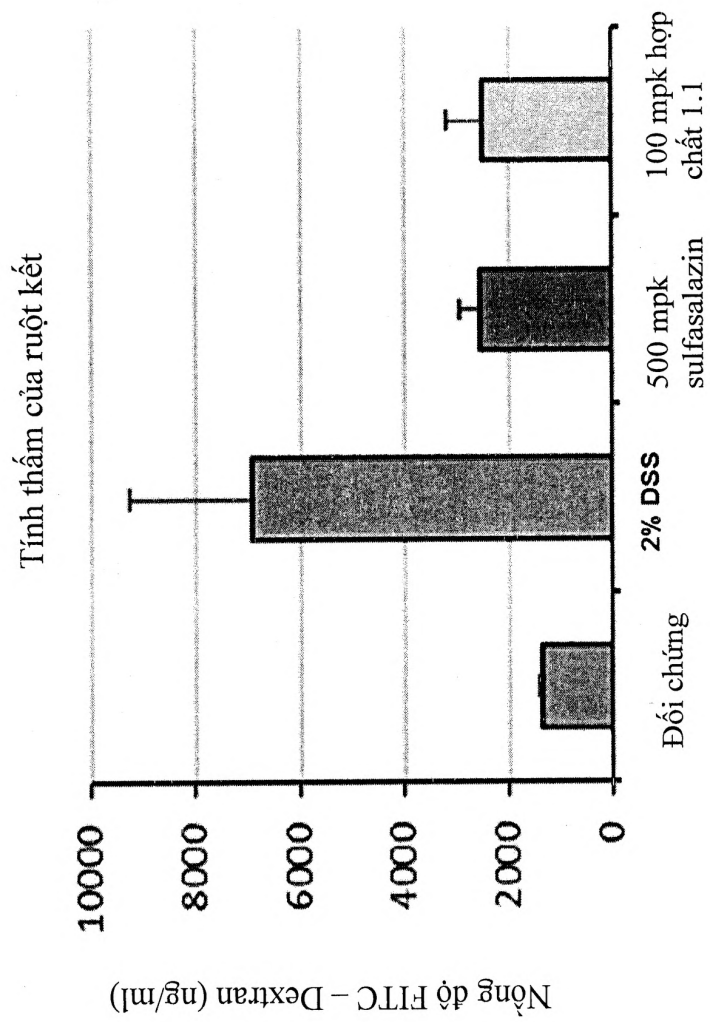


Fig.17

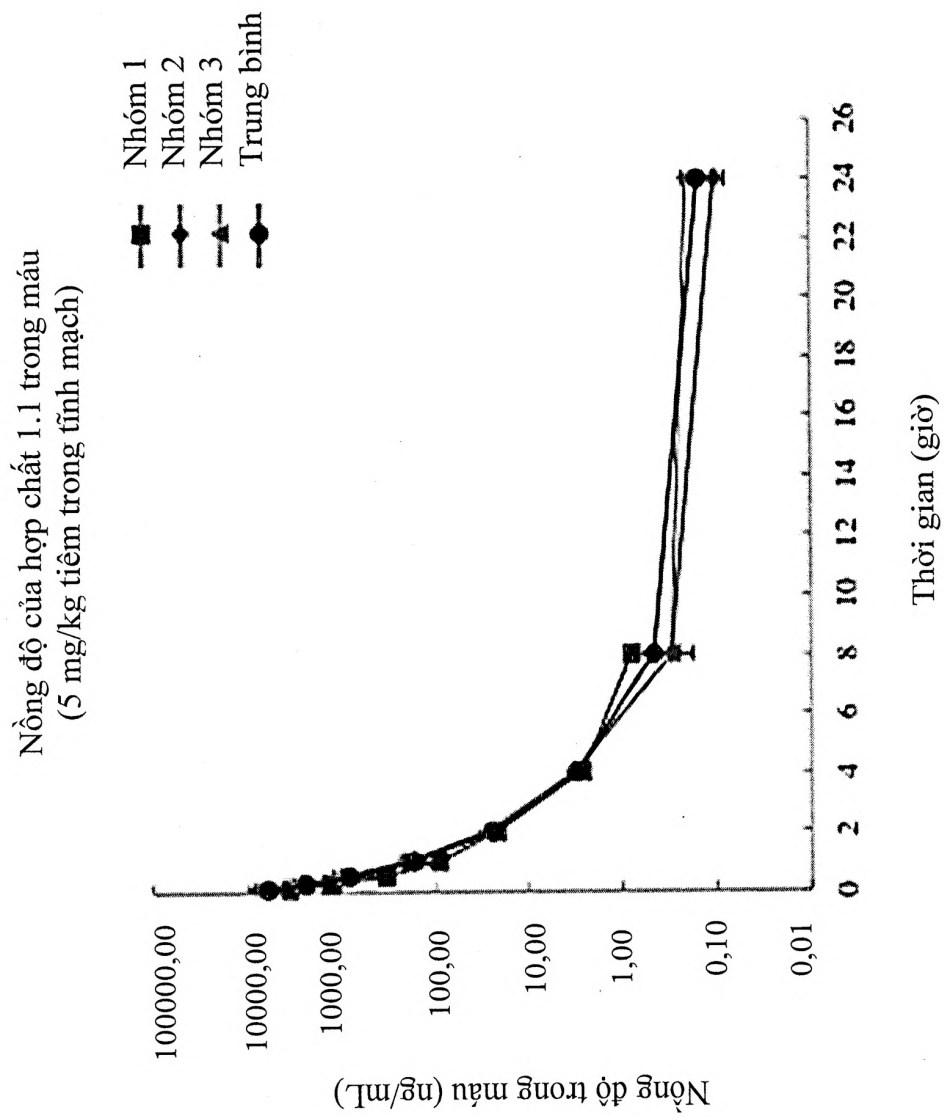


Fig.18

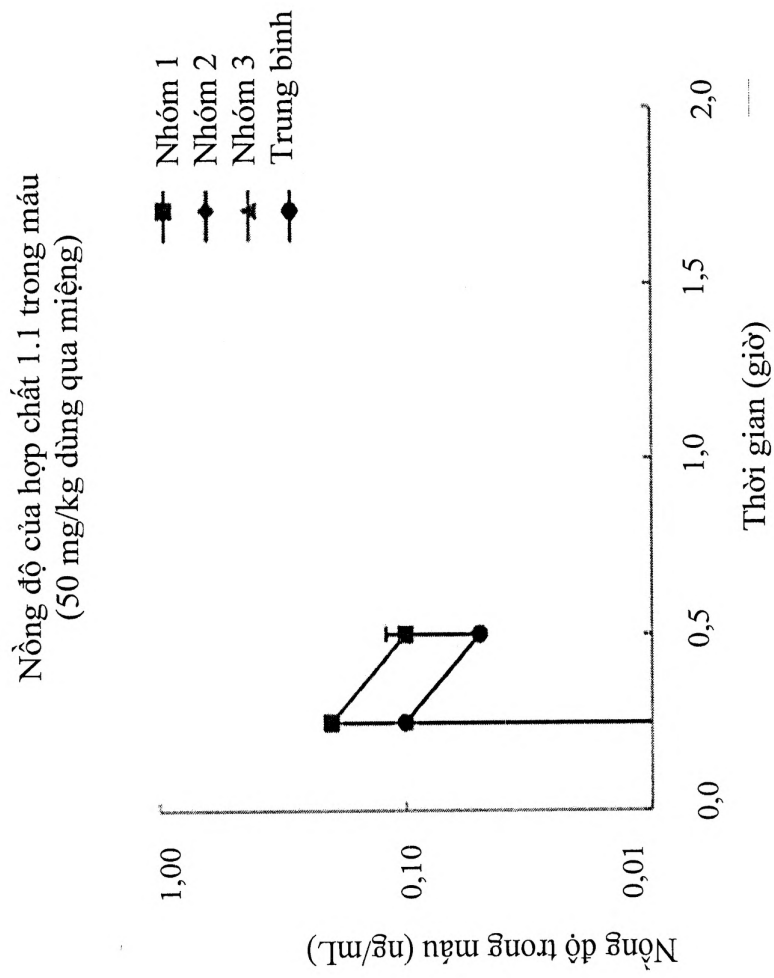


Fig.19

Con đường truyền tín hiệu của thụ thể giống Toll

Con đường MAPK (Thử nghiệm thấm tách Western)

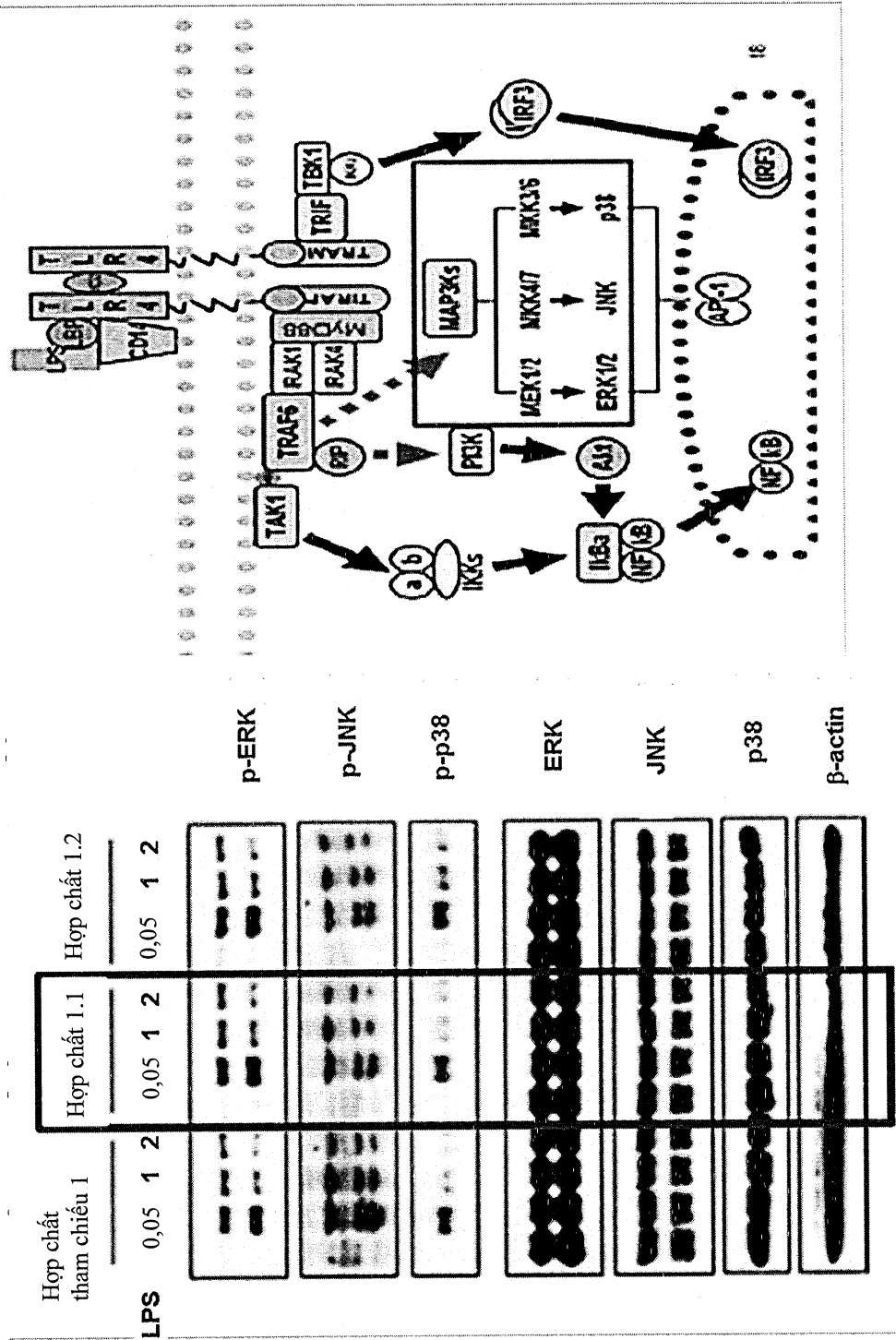
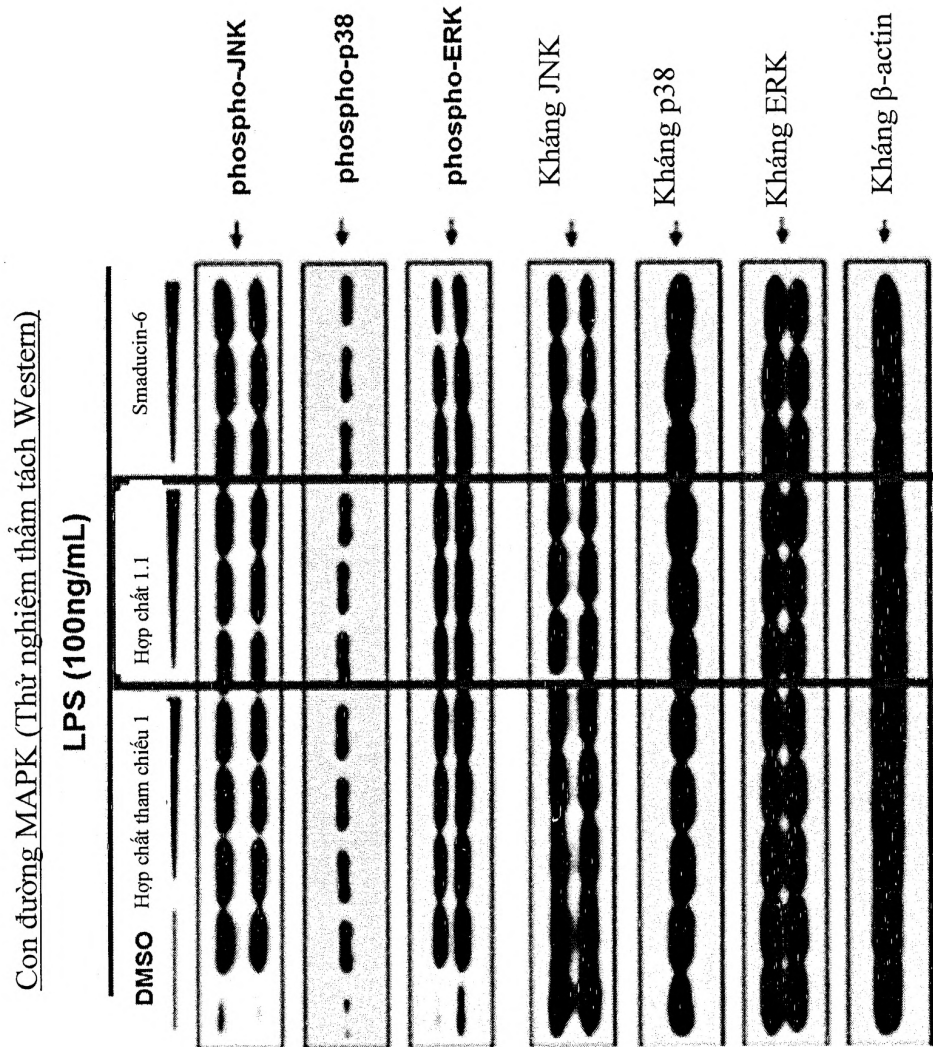


Fig.20B

Fig.20A



Nồng độ trước khi xử lý

100pM 1nM 100nM

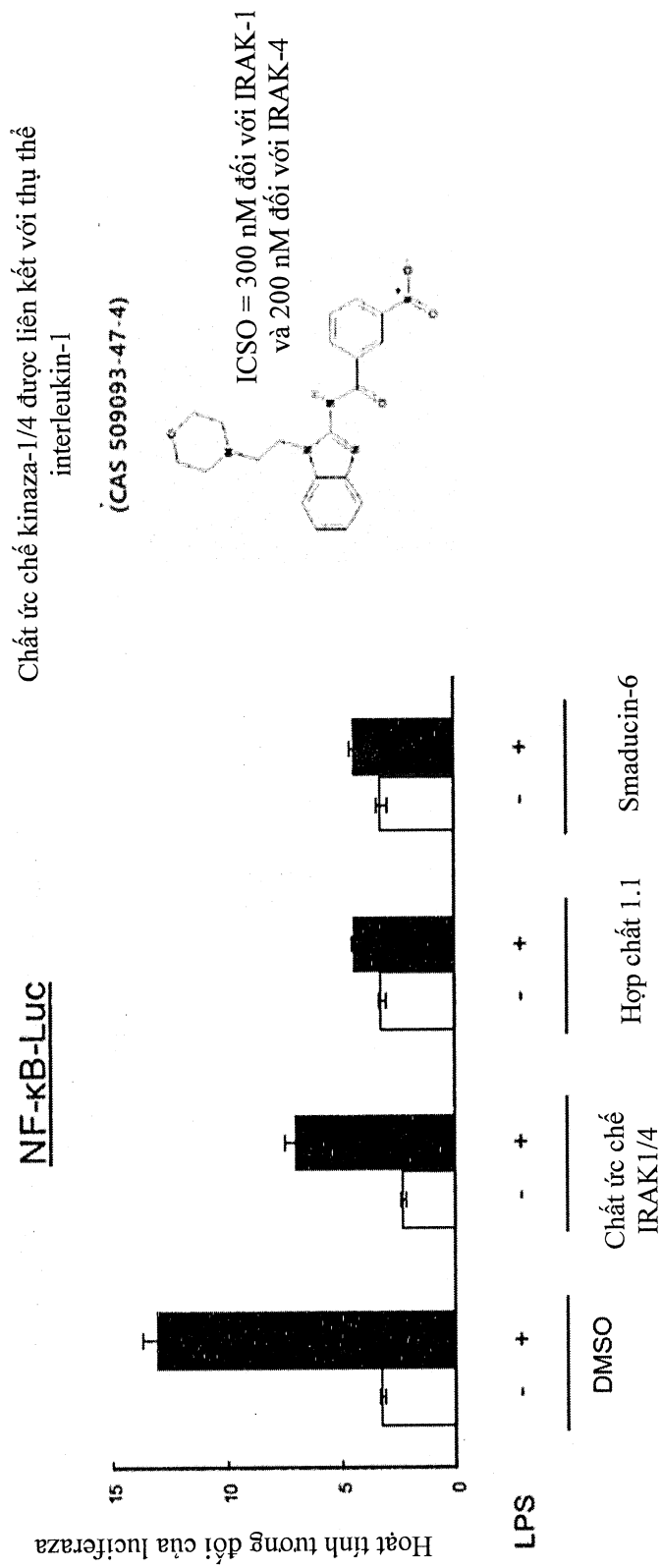


Fig.22B

Fig.22A

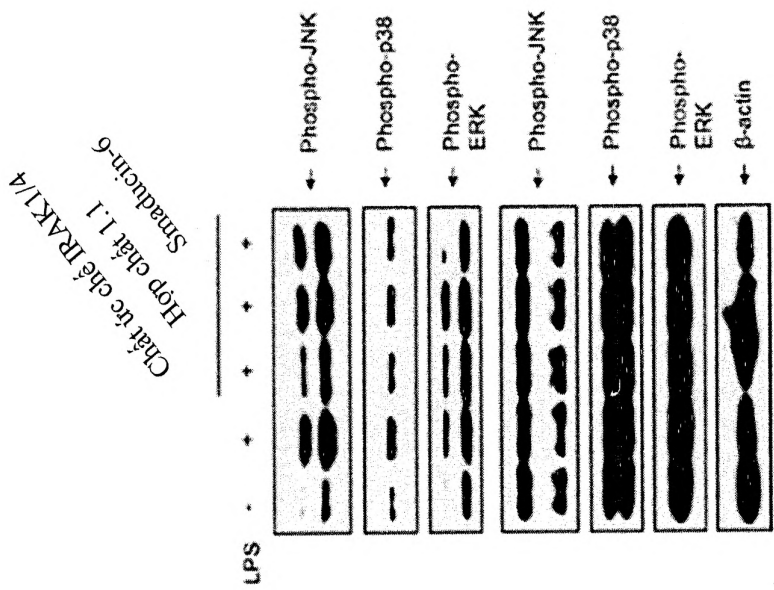


Fig.24A

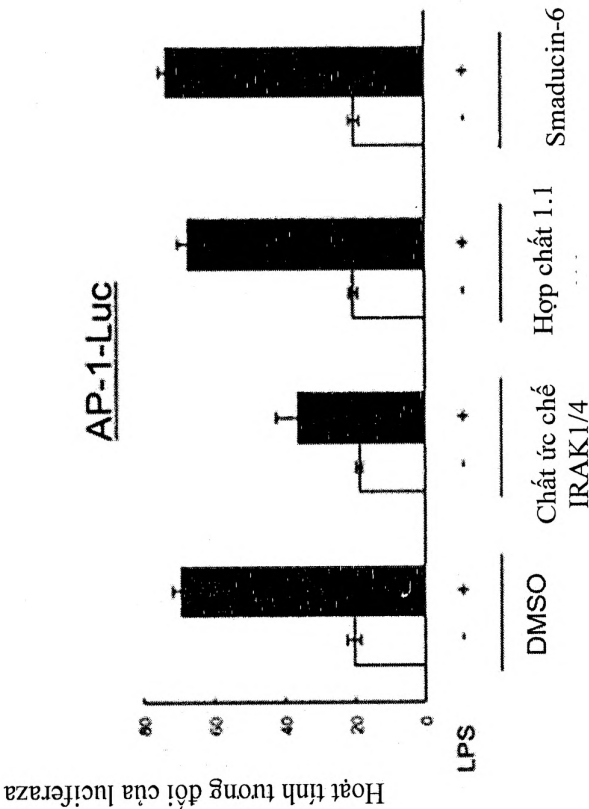


Fig.24B

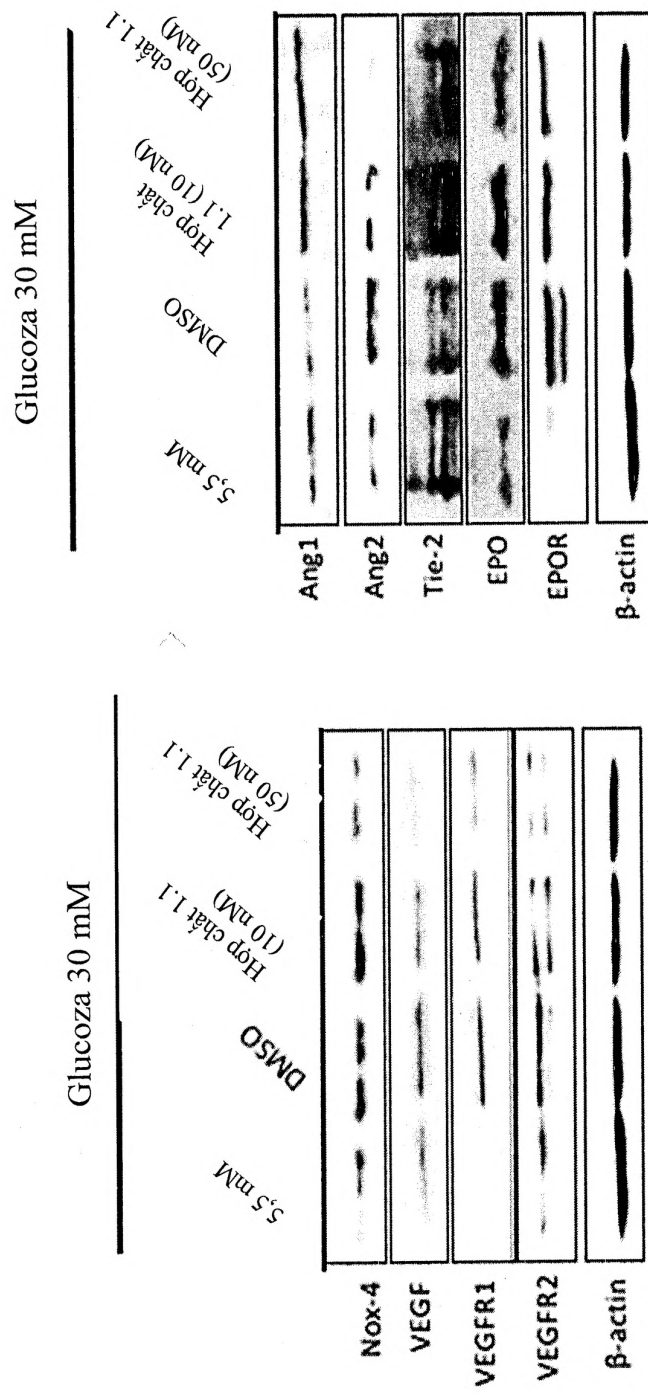


Fig.25A

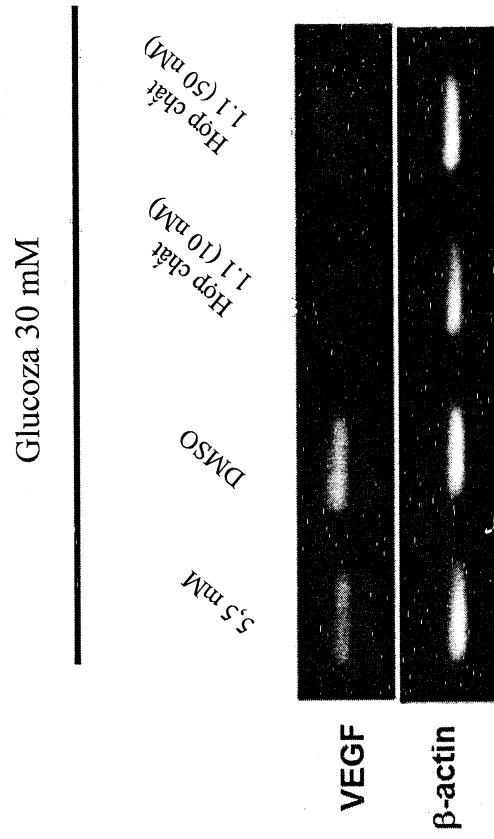


Fig.25B

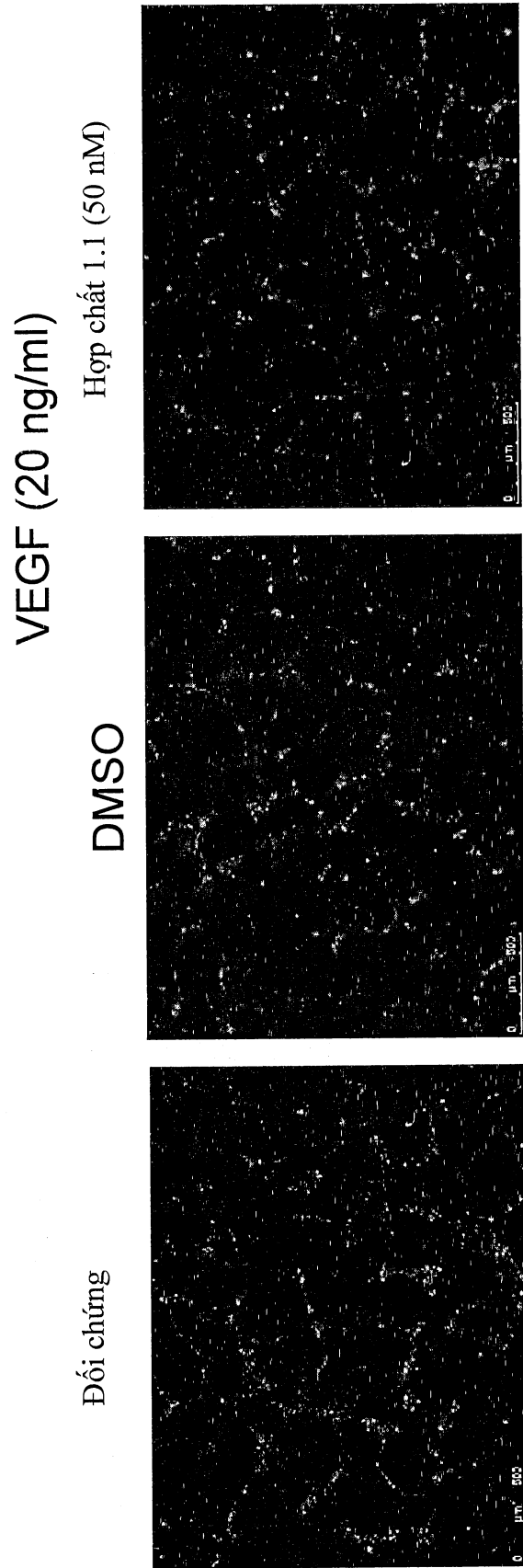


Fig.26

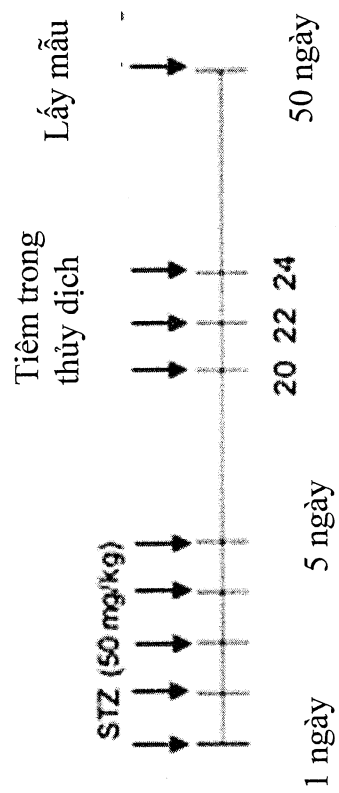


Fig.27A

Mẫu DR được xử lý bằng hợp chất 1.1

Mẫu DR

Đối chứng



5 μ m DHE

Fig.27B

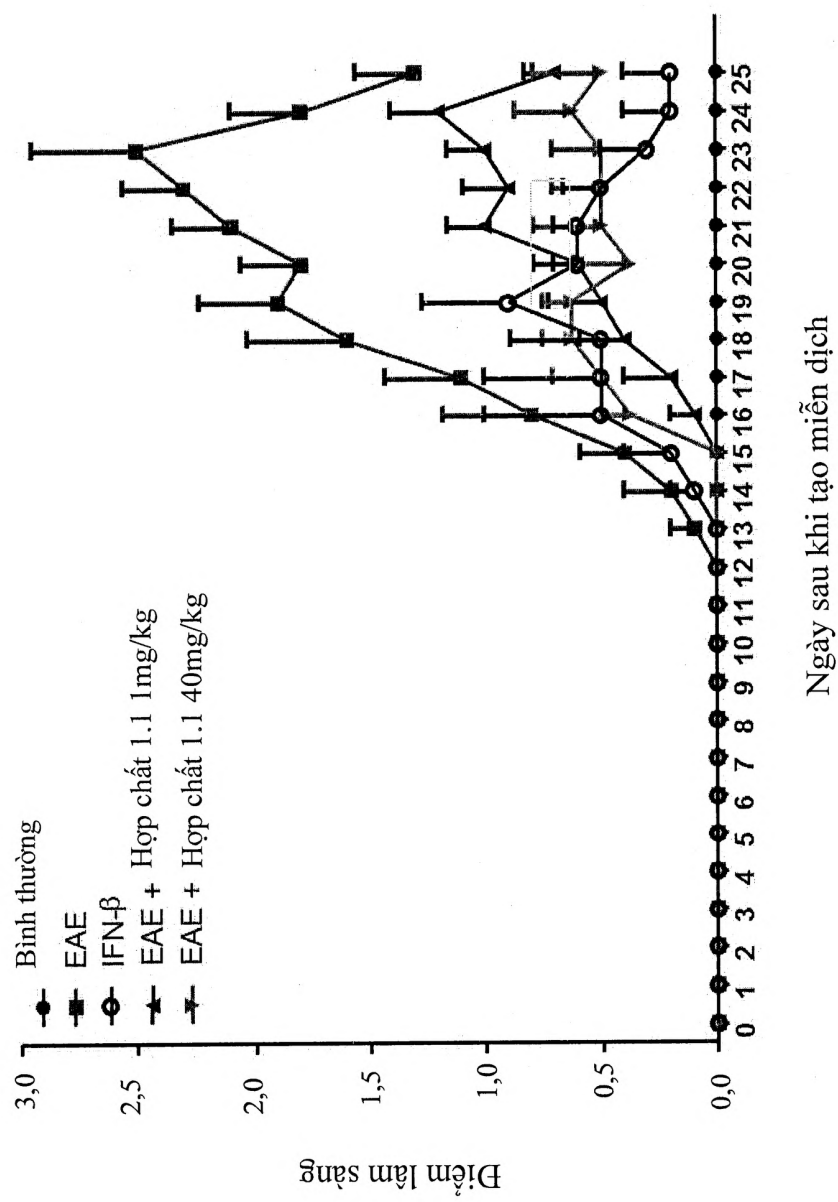
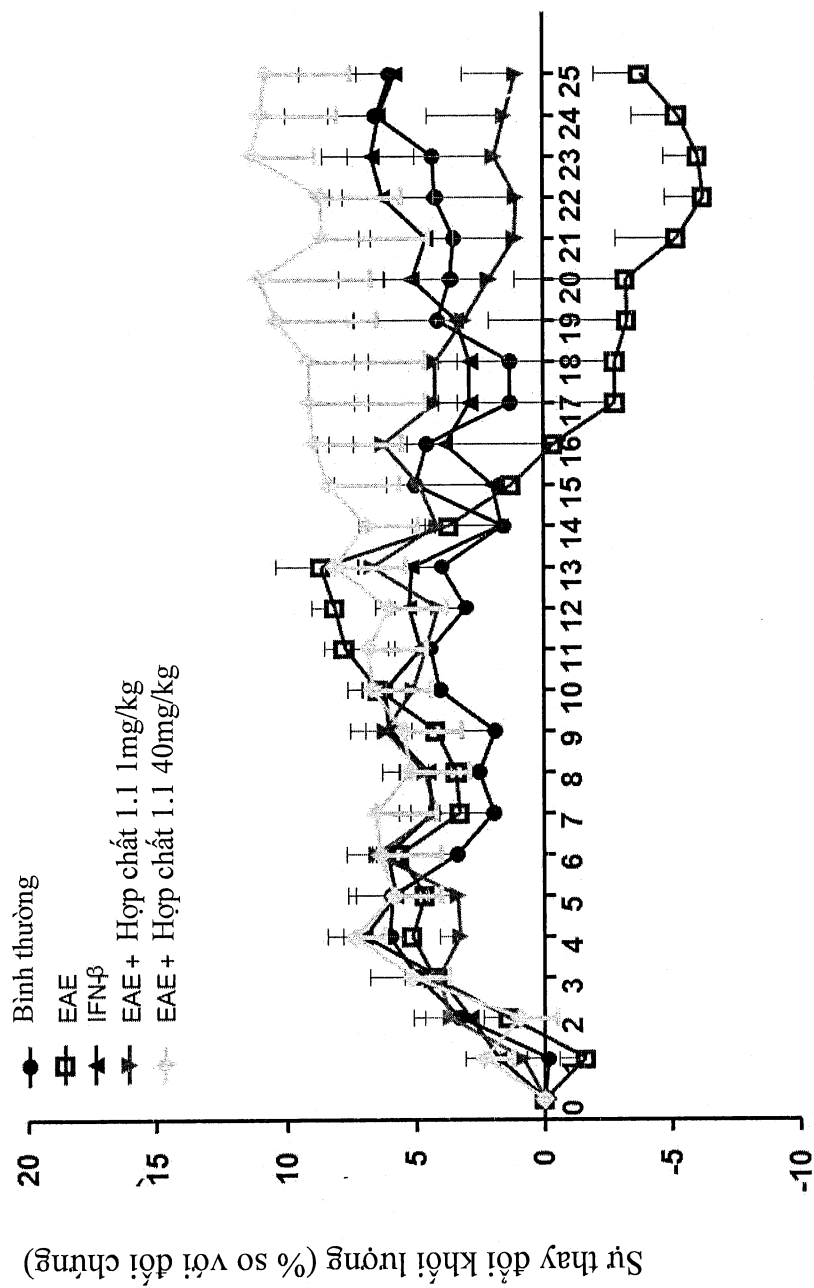


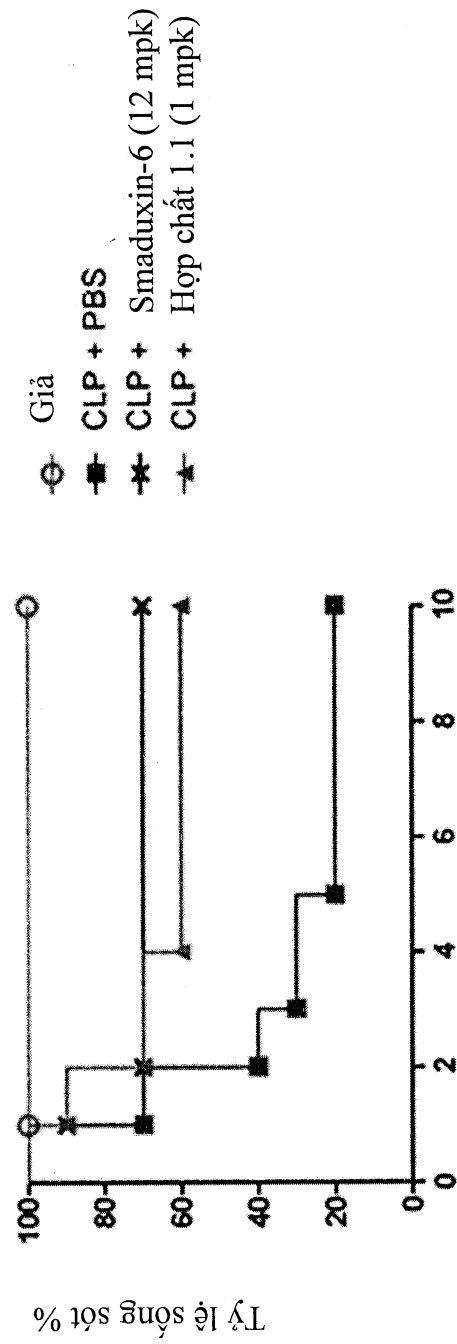
Fig.28A



Ngày sau khi tạo miễn dịch

Fig.28B

Mô hình động vật thất mạnh trắng và chọc dò
(CLP) *in vivo* của bệnh nhiễm khuẩn huyết



Các ngày sau khi điều trị

Fig.29