



(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)



1-0029823

(51)⁷ C07D 453/00; A61P 35/00; A61K
31/439; A61P 3/00

(13) B

(21) 1-2015-03933

(22) 14/03/2014

(86) PCT/US2014/027081 14/03/2014

(87) WO 2014/152215 A1 25/09/2014

(30) 61/791,706 15/03/2013 US

(45) 25/10/2021 403

(43) 25/04/2016 337A

(73) GENZYME CORPORATION (US)

500 Kendall Street, Cambridge, Massachusetts 02142, United States of America

(72) SIEGEL, Craig (US); ZHAO, Jin (US).

(74) Công ty TNHH Trần Hữu Nam và Đồng sự (TRAN H.N & ASS.)

(54) MUỐI CỦA HỢP CHẤT S-QUINUCLIDIN-3-YL-(2-(2-(4-FLOPHENYL)THIAZOL-4-YL) PROPAN-2-YL)CARBAMAT Ở DẠNG TINH THỂ

(57) Sáng chế đề cập đến các muối của hợp chất (S)-quinuclidin-3-yl (2-(2-(4-flophenyl)thiazol-4-yl)propan-2-yl)carbamat ở dạng tinh thể để làm chất ức chế glucosylxeramit synthaza (GCS - glucosylceramide synthase), trong đó các muối này có thể được dùng độc lập hoặc kết hợp với liệu pháp thay thế enzym để điều trị các bệnh rối loạn về chuyển hóa, ví dụ bệnh tích trữ thể tiêu bào, và để điều trị bệnh ung thư.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế này đề cập đến các muối của hợp chất (S)-quinuclidin-3-yl (2-(2-(4-flophenyl)thiazol-4-yl)propan-2-yl)carbamate để làm chất ức chế glucosylxeramit synthaza (GCS), trong đó các muối này có thể được dùng độc lập hoặc kết hợp với liệu pháp thay thế enzym để điều trị bệnh do chuyển hóa, như bệnh tích trữ thể tiêu bào (lysosome), và dùng để điều trị bệnh ung thư.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Glucosylxeramit synthaza (GCS) là enzym nòng cốt làm xúc tác bước glycosyl hóa ban đầu trong việc sinh tổng hợp các glycosphingolipit gốc glucosylxeramit (GSL) cụ thể qua việc chuyển chủ yếu glucoza từ UDP-glucoza (UDP-Glc) thành xeramit để hình thành glucosylxeramit. GCS là một protein xuyên màng loại III, được xác định tại các miền cis và trung gian của thể Golgi. Glycosphingolipit (GSLs) được cho là tích hợp tạo động lực cho nhiều quá trình diễn ra qua màng tế bào, bao gồm tương tác tế bào, truyền tín hiệu và chuyển tải gen. Sự tổng hợp cấu trúc GSL đã được công bố (xem, Yamashita và các đồng tác giả, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1999, 96(16), 9142-9147) là cần thiết cho sự phát triển thời kì đầu phôi và biệt hóa một số mô. Xeramit đóng một vai trò quan trọng trong cơ chế trao đổi chất sphingolipit và sự điều chỉnh giảm hoạt động GCS đã cho thấy là tạo các hiệu ứng rõ nét trên biểu đồ sphingolipit với biểu hiện glycosphingolipit giảm đi. Các sphingolipit (SL) có một vai trò điều biến sinh học trong sinh lý học cũng như các tình trạng bệnh lý tim mạch. Đặc biệt là, sphingolipit và các enzym điều chỉnh của chúng thể hiện là đóng vai trò quan trọng trong các phản ứng có tính thích nghi với sự giảm oxy-huyết mãn tính trong tim chuột sơ sinh (xem, El Alwanit và các đồng tác giả, Prostaglandins & Other Lipid Mediators 2005, 78(1-4), 249-263).

Các chất ức chế GCS đã được đề xuất để điều trị nhiều loại bệnh (xem ví dụ, WO2005068426). Việc điều trị này bao gồm điều trị các bệnh liên quan đến tích đọng glycolipit (ví dụ, các bệnh Tay Sachs, Sandhoffs, Thiếu hụt hoạt chất GM2, gangliosidosis GM1 và Fabry), các bệnh liên quan đến sự tích tụ glycolipit (ví dụ, bệnh Gaucher; Miglustat (Zavesca), chất ức chế GCS, đã được phê duyệt để điều trị cho các bệnh nhân mắc bệnh Gaucher Loại 1, xem, Treiber và các đồng tác giả, *Xenobiotica* 2007, 37(3), 298-314), các bệnh gây ra chứng phình hoặc tăng sinh thận như là bệnh thận do đái tháo đường; bệnh gây tăng đường huyết hoặc tăng insulin máu; các bệnh ung thư mà trong đó tổng hợp glycolipit bất bình thường, các bệnh truyền nhiễm gây ra bởi sinh vật mà sử dụng glycolipit bề mặt tế bào làm thụ thể, các bệnh truyền nhiễm mà trong đó việc tổng hợp glucosylxeramit là cần thiết hoặc quan trọng, các bệnh mà trong đó việc tổng hợp glucosylxeramit là cần thiết hoặc quan trọng, các bệnh mà việc tổng hợp glycolipit quá mức xảy ra (ví dụ, xơ vữa động mạch, bệnh thận đa nang và phình thận), rối loạn chức năng neuron thần kinh, tổn thương neuron thần kinh, các bệnh viêm hoặc rối loạn liên quan đến việc bổ sung và hoạt hóa của đại thực bào (ví dụ, chứng viêm khớp, bệnh Crohn, hen suyễn và nhiễm khuẩn huyết) và đái tháo đường và béo phì (xem, WO 2006053043).

Đặc biệt là, đã được chỉ ra rằng tình trạng biểu hiện dư thừa GCS liên quan đến việc kháng nhiều loại thuốc và làm gián đoạn cơ chế gây chết tế bào theo chương trình (apoptosis) do xeramit gây ra. Ví dụ, Turzanski và các đồng tác giả, (*Experimental Hematology* 2005, 33 (1), 62-72 đã chứng minh rằng xeramit gây ra cơ chế gây chết tế bào theo chương trình trong tế bào bệnh bạch cầu dòng tủy cấp tính (AML) và rằng P-glycoprotein (p-gp) mang lại sức đề kháng chống lại cơ chế gây chết tế bào theo chương trình do xeramit kích ứng, với sự điều biến của quá trình xeramit- glucosylxeramit đóng góp đáng vào đề kháng này ở các tế bào TF-1. Như vậy, các chất ức chế GCS có thể có hiệu quả trong điều trị các bệnh rối loạn tăng sinh bằng việc gây ra cơ chế gây chết tế bào theo chương trình trong các tế bào bệnh.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất hợp chất (S)-Quinuclidin-3-yl (2-(2-(4-flophenyl)thiazol-4-yl)propan-2-yl)carbamate malat ở dạng tinh thể A, trong đó nhiễu xạ bột tia X này chứa đỉnh 2-theta kế tiếp được đo bằng cách sử dụng bức xạ CuK_{α} : 18,095.

Hơn nữa, sáng chế này đề cập đến hợp chất (S)-Quinuclidin-3-yl (2-(2-(4-flophenyl)thiazol-4-yl)propan-2-yl)carbamate malat ở dạng tinh thể A, trong đó nhiễu xạ bột tia X này chứa các đỉnh 2-theta kế tiếp được đo bằng cách sử dụng bức xạ CuK_{α} : 18,095 và 17,493.

Hơn nữa, sáng chế này đề cập đến hợp chất (S)-Quinuclidin-3-yl (2-(2-(4-flophenyl)thiazol-4-yl)propan-2-yl)carbamate malat ở dạng tinh thể A, trong đó nhiễu xạ bột tia X này chứa các đỉnh 2-theta kế tiếp được đo bằng cách sử dụng bức xạ CuK_{α} : 18,095 và 19,516.

Hơn nữa, sáng chế này đề cập đến hợp chất (S)-Quinuclidin-3-yl (2-(2-(4-flophenyl)thiazol-4-yl)propan-2-yl)carbamate malat ở dạng tinh thể A, trong đó nhiễu xạ bột tia X nói trên chứa các đỉnh 2-theta kế tiếp được đo bằng cách sử dụng bức xạ CuK_{α} : 18,095, 17,493 và 19,516.

Hơn nữa, sáng chế này còn đề cập đến hợp chất (S)-Quinuclidin-3-yl (2-(2-(4-flophenyl)thiazol-4-yl)propan-2-yl)carbamate malat ở dạng tinh thể A, trong đó nhiễu xạ bột tia X này chứa các đỉnh 2-theta kế tiếp được đo bằng cách sử dụng bức xạ CuK_{α} : 18,095, 17,493, 19,516 và 20,088.

Hơn nữa, sáng chế này cũng đề cập đến hợp chất (S)-Quinuclidin-3-yl (2-(2-(4-flophenyl)thiazol-4-yl)propan-2-yl)carbamate malat ở dạng tinh thể A, trong đó nhiễu xạ bột tia X này chứa các đỉnh 2-theta kế tiếp được đo bằng cách sử dụng bức xạ CuK_{α} : 18,095, 17,493, 19,516 và 20,088 và 17,125.

Hơn nữa, sáng chế này cũng còn đề cập đến hợp chất (S)-Quinuclidin-3-yl (2-(2-(4-flophenyl)thiazol-4-yl)propan-2-yl)carbamate malat ở dạng tinh thể B,

trong đó nhiễu xạ bột tia X này chứa đỉnh 2-theta kế tiếp được đo bằng cách sử dụng bức xạ CuK_α : 24,355.

Hơn nữa, sáng chế này đề cập đến hợp chất (S)-Quinuclidin-3-yl (2-(2-(4-flophenyl)thiazol-4-yl)propan-2-yl)carbamate malat ở dạng tinh thể B, trong đó nhiễu xạ bột tia X này chứa các đỉnh 2-theta kế tiếp được đo bằng cách sử dụng bức xạ CuK_α : 24,355 và 21,167.

Hơn nữa, sáng chế này còn đề cập quan đến hợp chất (S)-Quinuclidin-3-yl (2-(2-(4-flophenyl)thiazol-4-yl)propan-2-yl)carbamate malat ở dạng tinh thể B, trong đó nhiễu xạ bột tia X này chứa các đỉnh 2-theta kế tiếp được đo bằng cách sử dụng bức xạ CuK_α : 24,355, 21,167 và 27,343.

Hơn nữa, sáng chế này cũng đề cập đến hợp chất (S)-Quinuclidin-3-yl (2-(2-(4-flophenyl)thiazol-4-yl)propan-2-yl)carbamate malat ở dạng tinh thể B, trong đó nhiễu xạ bột tia X chứa các đỉnh 2-theta kế tiếp được đo bằng cách sử dụng bức xạ CuK_α : 24,355, 21,167, 27,343 và 16,111.

Hơn nữa, sáng chế này còn đề cập đến hợp chất (S)-Quinuclidin-3-yl (2-(2-(4-flophenyl)thiazol-4-yl)propan-2-yl)carbamate malat ở dạng tinh thể B, trong đó nhiễu xạ bột tia X này chứa các đỉnh 2-theta kế tiếp được đo bằng cách sử dụng bức xạ CuK_α : 24,355, 21,167, 27,343, 16,111 và 17,185.

Hơn nữa, sáng chế này đề cập đến hợp chất (S)-Quinuclidin-3-yl (2-(2-(4-flophenyl)thiazol-4-yl)propan-2-yl)carbamate malat ở dạng tinh thể B, trong đó nhiễu xạ bột tia X này chứa các đỉnh 2-theta kế tiếp được đo bằng cách sử dụng bức xạ CuK_α : 24,355, 21,167, 27,343, 16,111, 17,185 và 20,243.

Hơn nữa, sáng chế này đề cập đến muối (S)-2-hydroxysuccinat của hợp chất (S)-Quinuclidin-3-yl (2-(2-(4-flophenyl)thiazol-4-yl)propan-2-yl)carbamate ở dạng tinh thể, trong đó nhiễu xạ bột tia X này chứa đỉnh 2-theta kế tiếp được đo bằng cách sử dụng bức xạ CuK_α : 17,162.

Hơn nữa, sáng chế đề cập đến muối (S)-2-hydroxysuccinat của hợp chất (S)-Quinuclidin-3-yl (2-(2-(4-flophenyl)thiazol-4-yl)propan-2-yl)carbamate ở

dạng tinh thể A, trong đó nhiễu xạ bột tia X này chứa các đỉnh 2-theta kế tiếp được đo bằng cách sử dụng bức xạ CuK_{α} : 17,162 và 18,028.

Hơn nữa, sáng chế đề cập đến muối (S)-2-hydroxysuccinat của hợp chất (S)-Quinuclidin-3-yl (2-(2-(4-flophenyl)thiazol-4-yl)propan-2-yl)carbamate ở dạng tinh thể A, trong đó nhiễu xạ bột tia X này chứa các đỉnh 2-theta kế tiếp được đo bằng cách sử dụng bức xạ CuK_{α} : 17,162 và 14,280.

Hơn nữa, sáng chế đề cập đến muối (S)-2-hydroxysuccinat của hợp chất (S)-Quinuclidin-3-yl (2-(2-(4-flophenyl)thiazol-4-yl)propan-2-yl)carbamate ở dạng tinh thể A, trong đó nhiễu xạ bột tia X này chứa các đỉnh 2-theta kế tiếp được đo bằng cách sử dụng bức xạ CuK_{α} : 17,162; 18,028 và 14,280.

Hơn nữa, sáng chế đề cập đến muối (S)-2-hydroxysuccinat của hợp chất (S)-Quinuclidin-3-yl (2-(2-(4-flophenyl)thiazol-4-yl)propan-2-yl)carbamate ở dạng tinh thể A, trong đó nhiễu xạ bột tia X này chứa các đỉnh 2-theta kế tiếp được đo bằng cách sử dụng bức xạ CuK_{α} : 17,162, 18,028, 14,280 và 18,153.

Hơn nữa, sáng chế đề cập đến muối (S)-2-hydroxysuccinat của hợp chất (S)-Quinuclidin-3-yl (2-(2-(4-flophenyl)thiazol-4-yl)propan-2-yl)carbamate ở dạng tinh thể A, trong đó nhiễu xạ bột tia X này chứa các đỉnh 2-theta kế tiếp được đo bằng cách sử dụng bức xạ CuK_{α} : 17,162, 18,028, 14,280, 18,153 và 23,422.

Hơn nữa, sáng chế đề cập đến muối HCl của hợp chất (S)-Quinuclidin-3-yl (2-(2-(4-flophenyl)thiazol-4-yl)propan-2-yl)carbamate ở dạng tinh thể, trong đó nhiễu xạ bột tia X này chứa đỉnh 2-theta kế tiếp được đo bằng cách sử dụng bức xạ CuK_{α} : 18,087.

Hơn nữa, sáng chế đề cập đến muối HCl của hợp chất (S)-Quinuclidin-3-yl (2-(2-(4-flophenyl)thiazol-4-yl)propan-2-yl)carbamate ở dạng tinh thể A, trong đó nhiễu xạ bột tia X này chứa đỉnh 2-theta kế tiếp được đo bằng cách sử dụng bức xạ CuK_{α} : 12,818.

Hơn nữa, sáng chế đề cập đến muối HCl của hợp chất (S)-Quinuclidin-3-yl (2-(2-(4-flophenyl)thiazol-4-yl)propan-2-yl)carbamate ở dạng tinh thể A, trong

đó nhiều xạ bột tia X này chứa đỉnh 2-theta kế tiếp được đo bằng cách sử dụng bức xạ CuK_α : 25,722.

Hơn nữa, sáng chế đề cập đến muối HCl của hợp chất (S)-Quinuclidin-3-yl (2-(2-(4-flophenyl)thiazol-4-yl)propan-2-yl)carbammat ở dạng tinh thể A, trong đó nhiều xạ bột tia X này chứa các đỉnh 2-theta kế tiếp được đo bằng cách sử dụng bức xạ CuK_α : 12,818 và 25,722.

Hơn nữa, sáng chế đề cập đến muối HCl của hợp chất (S)-Quinuclidin-3-yl (2-(2-(4-flophenyl)thiazol-4-yl)propan-2-yl)carbammat ở dạng tinh thể A, trong đó nhiều xạ bột tia X này chứa các đỉnh 2-theta kế tiếp được đo bằng cách sử dụng bức xạ CuK_α : 12,818, 25,722 và 13,040.

Hơn nữa, sáng chế đề cập đến muối HCl của hợp chất (S)-Quinuclidin-3-yl (2-(2-(4-flophenyl)thiazol-4-yl)propan-2-yl)carbammat ở dạng tinh thể A, trong đó nhiều xạ bột tia X này chứa các đỉnh 2-theta kế tiếp được đo bằng cách sử dụng bức xạ CuK_α : 12,818, 25,722, 13,040 và 28,910.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

FIG. 1

Nhiều xạ ký của hợp chất (S)-Quinuclidin-3-yl (2-(2-(4-flophenyl)thiazol-4-yl)propan-2-yl)carbammat malat ở dạng tinh thể A được thực hiện trên nhiều xạ kế của hãng Bruker D8-Advance.

FIG. 2

Nhiều xạ ký của hợp chất (S)-Quinuclidin-3-yl (2-(2-(4-flophenyl)thiazol-4-yl)propan-2-yl)carbammat malat ở dạng tinh thể B được thực hiện trên nhiều xạ kế của hãng Bruker D8-Advance.

FIG. 3

Nhiều xạ ký của muối (S)-2-hydroxysuccinat của hợp chất (S)-Quinuclidin-3-yl (2-(2-(4-flophenyl)thiazol-4-yl)propan-2-yl)carbammat ở dạng tinh thể được thực hiện trên nhiều xạ kế của hãng Bruker D8-Advance.

FIG. 4

Nhiều xạ ký của muối HCl của hợp chất (S)-Quinuclidin-3-yl (2-(2-(4-flophenyl)thiazol-4-yl)propan-2-yl)carbamate ở dạng tinh thể được thực hiện trên nhiều xạ kế của hãng Bruker D8-Advance.

Mô tả chi tiết sáng chế

Theo khía cạnh đầu tiên của sáng chế hướng đến hợp chất (S)-Quinuclidin-3-yl (2-(2-(4-flophenyl)thiazol-4-yl)propan-2-yl)carbamate malat ở dạng tinh thể A đặc trưng bởi nhiễu xạ bột tia X được biểu hiện theo cường độ tương đối 2-theta và với một cường độ tương đối > 0,52% (Bảng 1). Các phép đo được tiến hành như sau: Thiết bị: nhiễu xạ kế của hãng Bruker D8-Advance, loại: Bragg-Brentano; Nguồn $\text{CuK}\alpha$ 1, bước sóng = 1,5406Å; Máy phát điện: 35kV - 40 mA; Máy tách sóng: PSD/Vantec; Buồng Anton Paar TTK450; Giá đỡ mẫu Si; Phạm vi góc: 2° đến 40° trong 2-theta Bragg; Phân kỳ biến số khe hở: 4mm (V4); Kích thước bước: 0,033°; Bước thời gian: 1 giây.

Bảng 1

Theo thứ tự vị trí 2theta và bước sóng d

Số.	Vị trí [°2Th.]	bước sóng d [Å]	Kết quả (%)
1	7,918	11,1570	9,55
2	10,255	8,6186	7,36
3	11,633	7,6007	14,27
4	14,049	6,2987	28,16
5	14,280	6,1973	45,27
6	15,868	5,5807	4,69
7	17,162	5,1627	100
8	18,028	4,9165	46,12
9	18,153	4,8829	43,86

10	19,688	4,5055	13,34
11	19,878	4,4630	24,63
12	20,308	4,3693	5,01
13	20,449	4,3395	13,21
14	20,617	4,3046	19,14
15	21,079	4,2112	14,8
16	21,691	4,0938	3,3
17	21,981	4,0404	6,56
18	22,203	4,0006	9,02
19	23,422	3,7951	42,99
20	23,794	3,7365	2,73
21	24,273	3,6639	7
22	24,740	3,5955	7,35
23	24,896	3,5736	7,91
24	25,016	3,5567	7,44
25	25,759	3,4558	8
26	25,998	3,4246	3,56
27	27,250	3,2700	22,05
28	27,799	3,2067	2,92
29	28,350	3,1455	5,19
30	28,815	3,0959	6,25
31	29,229	3,0530	2,5
32	29,602	3,0153	6,24
33	30,163	2,9605	5,52
34	30,729	2,9073	2,14
35	31,153	2,8686	4,18
36	31,380	2,8486	2,6
37	31,630	2,8266	1,92
38	31,916	2,8018	2,66

39	32,100	2,7861	1,4
40	32,767	2,7309	1,31
41	33,730	2,6548	1,18
42	34,333	2,6099	3,32
43	34,620	2,5889	2,46
44	34,880	2,5699	4,51
45	35,090	2,5553	4,58
46	35,437	2,5310	2,41
47	36,420	2,4649	0,78
48	36,800	2,4376	0,29
49	37,000	2,4364	0,87
50	38,330	2,3465	1,15
51	38,680	2,3262	0,97
52	38,990	2,3083	1,27
53	39,940	2,2553	1,26
54	40,385	2,2316	1,95
55	40,960	2,2016	1,41

Theo khía cạnh thứ hai của sáng chế hướng đến hợp chất (S)-Quinuclidin-3-yl (2-(2-(4-flophenyl)thiazol-4-yl)propan-2-yl)carbamal malat ở dạng tinh thể B đặc trưng bởi nhiễu xạ bột tia X dưới đây được biểu hiện theo cường độ tương đối 2-theta và với cường độ tương đối > 8% (Bảng 2). Các phép đo được tiến hành như sau: Thiết bị: nhiễu xạ kế của hãng Bruker D8-Advance, loại: Bragg-Brentano; Nguồn $\text{CuK}\alpha 1$, bước sóng = 1,5406Å; Máy phát điện: 35kV - 40 mA; Máy tách sóng: PSD/Vantec; Buồng phản ứng Anton Paar: TTK450; Giá đỡ mẫu Si; Phạm vi góc: 2° đến 40° trong 2-theta Bragg; Phân kỳ biến số khe hở: 4mm (V4); Kích thước bước: 0,033°; Bước thời gian: 1 giây.

Bảng 2

Góc-2 Theta°	Cường độ tương ứng %
3,957	15,7
7,981	32,0
10,508	10,5
12,768	17,7
14,195	23,3
14,570	28,5
16,111	53,7
16,982	13,5
17,185	46,0
17,691	11,6
18,744	10,6
19,055	22,9
19,315	10,0
19,454	12,8
20,243	41,3
20,722	13,7
21,167	86,1
21,516	11,4
21,610	11,3
22,466	20,3
23,626	16,6
23,765	21,5
24,097	20,2
24,255	100,0

24,823	10,0
25,243	13,4
25,377	13,9
25,637	18,2
25,809	12,2
26,681	15,7
26,801	18,9
27,343	57,6
27,765	12,3
28,670	12,1
28,861	17,6
29,516	34,8
30,745	12,8
31,285	14,3
31,470	15,5
31,803	18,1
32,023	15,2
32,151	14,7
32,491	15,7
32,609	15,9
33,303	15,3
33,520	14,1
33,791	16,9
34,101	15,7
34,219	17,4
34,380	18,7

34,460	18,9
34,942	24,6
35,566	13,9
35,730	14,0
35,965	14,7
36,913	16,2
37,712	14,0
38,120	15,5
38.268	17,7
38,731	18,7
39,042	16,5
39,257	16,4

Theo khía cạnh thứ ba của sáng chế hướng đến muối (S)-2-hydroxysuccinat của hợp chất (S)-Quinuclidin-3-yl (2-(2-(4-flophenyl)thiazol-4-yl)propan-2-yl)carbammat ở dạng tinh thể đặc trưng bởi các nhiễu xạ bột tia X sau đây biểu hiện theo cường độ tương đối 2-theta và với cường độ tương đối > 8% (Bảng 3). Các phép đo được tiến hành như sau: Thiết bị: nhiễu xạ kế của hãng Bruker D8-Advance, loại: Bragg-Brentano; Nguồn $\text{CuK}\alpha 1$, bước sóng = 1,5406Å; Máy phát điện: 35kV-40 mA; Máy tách sóng: PSD/Vantec; Buồng phản ứng Anton Paar TTK450; Giá đỡ mẫu Si; Phạm vi góc: 2° đến 40° trong 2-theta Bragg; Phân kỳ biến số khe hở: 4mm (V4); Kích thước bước: 0,033°; Bước thời gian: 1 giây.

Bảng 3

Theo thứ tự vị trí 2-theta và bước sóng d

Số thứ	Khoảng		Kết quả
tự	cách	bước sóng d	thu được
	[° 2Th.]	[Å]	(%).
1	7,918	11,1570	9,55
2	10,255	8,6186	7,36
3	11,633	7,6007	14,27
4	14,049	6,2987	28,16
5	14,280	6,1973	45,27
6	15,868	5,5807	4,69
7	17,162	5,1627	100
8	18,028	4,9165	46,12
9	18,153	4,8829	43,86
10	19,688	4,5055	13,34
11	19,878	4,4630	24,63
12	20,308	4,3693	5,01
13	20,449	4,3395	13,21
14	20,617	4,3046	19,14
15	21,079	4,2112	14,8
16	21,691	4,0938	3,3
17	21,981	4,0404	6,56
18	22,203	4,0006	9,02
19	23,422	3,7951	42,99
20	23,794	3,7365	2,73
21	24,273	3,6639	7
22	24,740	3,5955	7,35
23	24,896	3,5736	7,91
24	25,016	3,5567	7,44
25	25,759	3,4558	8
26	25,998	3,4246	3,56

27	27,250	3,2700	22,05
28	27,799	3,2067	2,92
29	28,350	3,1455	5,19
30	28,815	3,0959	6,25
31	29,229	3,0530	2,5
32	29,602	3,0153	6,24
33	30,163	2,9605	5,52
34	30,729	2,9073	2,14
35	31,153	2,8686	4,18
36	31,380	2,8486	2,6
37	31,630	2,8266	1,92
38	31,916	2,8018	2,66
39	32,100	2,7861	1,4
40	32,767	2,7309	,31
41	33,730	2,6548	1,18
42	34,333	2,6099	3,32
43	34,620	2,5889	2,46
44	34,880	2,5699	4,51
45	35,090	2,5553	4,58
46	35,437	2,5310	2,41
47	36,420	2,4649	0,78
48	36,800	2,4376	0,29
49	37,000	2,4364	0,87
50	38,330	2,3465	1,15
51	38,680	2,3262	0,97
52	38,990	2,3083	1,27
53	39,940	2,2553	1,26
54	40,385	2,2316	1,95
55	40,960	2,2016	1,41

Khía cạnh thứ tư của sáng chế hướng đến muối HCl của hợp chất (S)-Quinuclidin-3-yl (2-(2-(4-flophenyl)thiazol-4-yl)propan-2-yl)carbamate ở dạng tinh thể đặc trưng bởi các mẫu nhiễu xạ bột tia x biểu hiện theo cường độ tương đối 2-theta và với cường độ tương đối > 0,96% (Bảng 4). Các phép đo được tiến hành như sau: Thiết bị: nhiễu xạ kế của hãng Bruker D8-Advance, loại: Bragg-Brentano; Nguồn $\text{CuK}\alpha 1$, bước sóng = 1,5406 Å; Máy phát điện: 35kV - 40 mA; Máy tách sóng: PSD/Vantec; Buồng phản ứng Anton Paar: TTK450; Giá đỡ mẫu Si; Phạm vi góc: 2° đến 40° trong 2-theta Bragg; Phân kỳ biến số khe hở: 4mm (V4); Kích thước bước: 0,033°; Bước thời gian: 1 giây.

Bảng 4

Theo thứ tự vị trí 2theta và bước sóng d

Số thứ tự	Vị trí. [°2Th.]	bước sóng d [Å]	Kết quả thu được (%)
1	12,818	6,9008	50,54
2	13,040	6,7842	18,21
3	13,378	6,6147	3,89
4	13,829	6,3987	10,68
5	14,124	6,2658	7,61
6	14,384	6,1532	6,98
7	14,893	5,9441	2,95
8	15,060	5,8785	12,79
9	15,338	5,725	1,11
10	15,827	5,5952	5,17
11	16,069	5,5114	4,36

12	16,679	5,3113	10,92
13	17,577	5,0416	17,64
14	18,087	4,9007	100
15	18,474	4,8008	6,95
16	18,865	4,7002	2,58
17	19,321	4,5903	1,34
18	19,840	4,4715	2,00
19	20,441	4,3412	4,64
20	21,050	4,2170	2,59
21	21,720	4,0883	0,96
22	22,784	3,8999	2,32
23	23,415	3,7961	0,97
24	23,923	3,7166	3,31
25	24,214	3,6727	2,51
26	24,619	3,6132	3,23
27	25,106	3,5441	2,09
28	25,722	3,4607	31,45
29	26,064	3,4161	8,72
30	26,241	3,3933	3,55
31	26,978	3,3023	3,92
32	27,217	3,2739	2,61
33	27,895	3,1958	1,75
34	28,460	3,1337	2,86
35	28,910	3,0859	18,11
36	29,934	2,9826	4,41
37	30,374	2,9410	1,45
38	30,774	2,9030	1,03
39	31,245	2,8604	3,25
40	31,883	2,8046	1,24

41	32,484	2,7540	0,79
42	33,104	2,7042	0,86
43	33,810	2,6490	1,77
44	35,069	2,5568	0,61
45	35,526	2,5270	1,09
46	36,243	2,4766	0,52
47	36,721	2,4475	1,20
48	39,164	2,3003	0,83

Một số cách tiếp cận đang được sử dụng hoặc được tiếp tục để điều trị LSDs, hầu hết trong số đó tập trung vào sử dụng liệu pháp thay thế enzym được sử dụng riêng lẻ trong điều trị bệnh. Nhiều liệu pháp thay thế enzym có sẵn trên thị trường để điều trị LSDs (ví dụ, Myozyme® đối với bệnh Pompe, Aldurazyme® đối với Bệnh lý Mucopolysaccharidosis loại I, Xerezime® đối với bệnh Gaucher và Fabrazyme®, đối với bệnh Fabry). Ngoài ra, các tác giả sáng chế đã xác định được một số phân tử nhỏ được dùng độc lập trong việc điều trị bệnh LSDs. Các phương pháp trị liệu của sáng chế được mô tả trong tài liệu này được đề xuất các lựa chọn điều trị đối các bác sĩ phải đối mặt với việc điều trị bệnh tích trữ thể tiêu bào khác nhau, như được mô tả chi tiết dưới đây.

Trong một số khía cạnh nhất định của sáng chế, các hợp chất theo sáng chế có thể được sử dụng để điều trị bệnh rối loạn chuyển hóa, chẳng hạn bệnh tích trữ thể tiêu bào (LSD), hoặc dùng độc lập hoặc kết hợp với liệu pháp thay thế enzym. Trong khía cạnh khác của sáng chế, các hợp chất theo sáng chế có thể được sử dụng để ức chế hoặc giảm hoạt động của GCS ở người được chẩn đoán mắc bệnh rối loạn chuyển hóa, chẳng hạn như LSD, hoặc sử dụng mình hoặc kết hợp với liệu pháp thay thế enzym. Theo khía cạnh khác của sáng chế, các hợp chất theo sáng chế có thể được sử dụng để làm giảm và/hoặc ức chế sự tích tụ của chất lưu động (ví dụ, chất nền tiêu thể) ở đối tượng được chẩn đoán

mắc bệnh rối loạn chuyển hóa, chẳng hạn như LSD. Trong phương án nhất định của những khía cạnh đã nêu trước đó, LSD là Gaucher (loại 1, loại 2 hoặc loại 3), Fabry, bệnh G_{M1} - gangliosidosis hoặc bệnh G_{M2} - gangliosidoses (ví dụ, thiếu hụt hoạt chất GM2, Tay-Sachs và Sandhoff). Bảng 1 liệt kê nhiều LSDs và xác định các enzym thiếu hụt tương ứng có thể được sử dụng như ERT trong những khía cạnh trên của sáng chế.

Trong các trường hợp khác, hợp chất có thể cần thiết để cung cấp SMT đến bệnh nhân mà điều kiện áp dụng đối với họ là việc giảm cơ chất trong não và do đó không thể điều trị bằng cách dùng thuốc ERT. Trong khi não thất hoặc nội thủy mạc được thực hiện trực tiếp có thể làm giảm nồng độ chất nền trong não bộ, điều hành hệ thống ERT là không phù hợp cho LSD với hệ thần kinh trung ương (CNS) do không đủ khả năng vượt qua hàng rào máu não (BBB) và SMT có thể chứng minh có lợi cho bệnh nhân có các hoạt động enzym còn sót lại trong hệ thần kinh trung ương CNS.

Phù hợp với sáng chế này, SMT được đề xuất cho bệnh nhân để điều trị bệnh ung thư và/hoặc bệnh rối loạn chuyển hóa, chẳng hạn như bệnh tích trữ tế bào. SMT có thể bao gồm một hoặc nhiều phân tử nhỏ. SMT bao gồm áp dụng các hợp chất theo sáng chế cho bệnh nhân. Trong các phương án cụ thể, các hợp chất là hợp chất (S)-Quinuclidin-3-yl (2-(2-(4-flophenyl)thiazol-4-yl)propan-2-yl)carbamate hoặc hợp chất Quinuclidin-3-yl (2-(4'-flo-[1,1'-biphenyl]-3-yl)propan-2-yl)carbamate, hoặc hỗn hợp của chúng.

Trong các phương án nhất định, các hợp chất theo sáng chế, chẳng hạn như, ví dụ, hợp chất (S)-Quinuclidin-3-yl (2-(2-(4-flophenyl)thiazol-4-yl)propan-2-yl)carbamate và hợp chất Quinuclidin-3-yl (2-(4'-flo-[1,1'-biphenyl]-3-yl)propan-2-yl)carbamate có thể được sử dụng để điều trị hầu như bất kỳ bệnh tích đọng do thiếu sót trong quá trình glycosphingolipit (ví dụ như bệnh Gaucher (loại 1, loại 2, loại 3), Fabry, bệnh G_{M1} - gangliosidosis, bệnh G_{M2} - gangliosidoses (ví dụ, Thiếu hụt hoạt chất GM2, Tay-Sachs và Sandhoff)). Trong phương án được đặc biệt ưu tiên, hợp chất (S)-Quinuclidin-3-yl (2-(2-(4-

flophenyl)thiazol-4-yl)propan-2-yl)carbamate hoặc muối được dùng hoặc tiền chất của chúng được sử dụng để ức chế và/hoặc làm giảm sự tích tụ của Gb3 và/hoặc lyso-Gb3 ở bệnh nhân bị bệnh Fabry, hoặc độc lập hoặc như liệu pháp kết hợp với liệu pháp thay thế enzyme (xem ví dụ). Trong phương án được ưu tiên, các liệu pháp thay thế enzyme bao gồm việc thực hiện alpha -galactosidase A cho bệnh nhân mắc Fabry. Thật vậy, các ví dụ dưới đây chứng minh rằng chất ức chế GCS của sáng chế làm giảm hiệu quả tích đọng Gb3 và lyso-Gb3 của bệnh Fabry trong mô hình chuột, do đó hỗ trợ việc sử dụng nó như là giải pháp khả thi đối với việc điều trị bệnh Fabry. Hơn nữa dữ liệu liệu pháp kết hợp *in vivo* được cung cấp trong các ví dụ gợi ý mạnh mẽ rằng các phương pháp trị liệu kết hợp có thể là cả thêm vào và bổ sung.

Trong các phương án nhất định, các hợp chất theo sáng chế, chẳng hạn như, ví dụ, hợp chất (S)-Quinuclidin-3-yl (2-(2-(4-flophenyl)thiazol-4-yl)propan-2-yl)carbamate và hợp chất Quinuclidin-3-yl (2-(4'-flo-[1,1'-biphenyl]-3-yl)propan-2-yl)carbamate có thể được sử dụng để làm giảm mức độ của GluCer và GluSph trong não của đối tượng được chẩn đoán mắc bệnh Gaucher thần kinh, hoặc độc lập hoặc kết hợp với ERT (ví dụ, áp dụng glucocerebrosidase).

Chế độ liều lượng đối với thành phần liệu pháp phân tử nhỏ của liệu pháp kết hợp theo các sáng chế nói chung được xác định bởi các người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực và được dự kiến sẽ thay đổi đáng kể tùy thuộc vào bệnh tích liên quan đến tích đọng cụ thể đang được điều trị và tình trạng lâm sàng của bệnh nhân bị mắc bệnh cụ thể. Các nguyên tắc chung đối với việc xác định chế độ liều SMT được đưa ra trong sáng chế đối với việc điều trị bệnh liên quan đến tích đọng bất kỳ cũng được biết đến với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực. Hướng dẫn về chế độ liều lượng có thể thu được từ bất kỳ các tài liệu tham khảo được biết đến nhiều trong lĩnh vực kỹ thuật về vấn đề này. Hơn nữa, hướng dẫn có sẵn, không kể những cái khác, từ việc xem xét các tài liệu tham khảo cụ thể được trích dẫn trong tài liệu này. Trong các phương án nhất

định, liều lượng này có thể dao động nằm trong khoảng từ 0,5 mg/kg đến 300 mg/kg, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 5 mg/kg đến 60 mg/kg (ví dụ, 5 mg/kg, 10 mg/kg, 15 mg/kg, 20 mg/kg, 25 mg/kg, 30 mg/kg, 35 mg/kg, 40 mg/kg, 45 mg/kg, 50 mg/kg, 55 mg/kg và 60 mg/kg) bằng cách uống hoặc bằng cách thông qua đưa vào trong bụng, hoặc cách tương đương từ một đến năm lần mỗi ngày. Liều lượng này có thể dao động nằm trong khoảng từ 5 mg/kg đến khoảng 5 g/kg, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 10 mg/kg đến khoảng 1 g/kg bằng đường uống, trong màng bụng hoặc cách tương đương từ một đến năm lần mỗi ngày. Trong một phương án, liều lượng nằm trong khoảng từ 10 mg/ngày đến khoảng 500 mg/ngày (ví dụ, 10 mg/ngày, 20 mg/ngày, 30 mg/ngày, 40 mg/ngày, 50 mg/ngày, 60 mg/ngày, 70 mg/ngày, 80 mg/ngày, 90 mg/ngày, 100 mg/ngày, 110 mg/ngày, 120 mg/ngày, 130 mg/ngày, 140 mg/ngày, 150 mg/ngày, 160 mg/ngày, 170 mg/ngày, 180 mg/ngày, 190 mg/ngày, 200 mg/ngày, 210 mg/ngày, 220 mg/ngày, 230 mg/ngày, 240 mg/ngày, 250 mg/ngày, 260 mg/ngày, 270 mg/ngày, 280 mg/ngày, 290 mg/ngày, 300 mg/ngày). Liều uống đặc biệt ưu tiên là nằm trong khoảng từ 50 đến 100 mg, trong đó các liều được dùng hai lần mỗi ngày. Liều uống cụ thể của hợp chất theo sáng chế nằm trong khoảng từ 5mg/kg/ngày đến 600 mg/kg/ngày. Trong phạm vi liều uống cụ thể đối với hợp chất theo sáng chế này là nằm trong khoảng từ 1 đến khoảng 120 mg/kg/ngày, ví dụ, 1 mg/kg/ngày, 5 mg/kg/ngày, 10 mg/kg/ngày, 15 mg/kg/ngày, 20 mg/kg/ngày, 25 mg/kg/ngày, 30 mg/kg/ngày, 35 mg/kg/ngày, 40 mg/kg/ngày, 45 mg/kg/ngày, 50 mg/kg/ngày, 55 mg/kg/ngày hoặc 60 mg/kg/ngày, 65 mg/kg/ngày, 70 mg/kg/ngày, 75 mg/kg/ngày, 80 mg/kg/ngày, 85 mg/kg/ngày, 90 mg/kg/ngày, 95 mg/kg/ngày, 100 mg/kg/ngày, 105 mg/kg/ngày, 110 mg/kg/ngày, 115 mg/kg/ngày hoặc 120 mg/kg/ngày.

Trong phương án nhất định, sáng chế đề cập đến phương pháp điều trị kết hợp của SMT sử dụng các hợp chất theo sáng chế và liệu pháp ERT cho việc điều trị các bệnh tích trữ thể tiêu bào. Một phần danh sách các bệnh tích trữ thể tiêu bào được biết có thể được điều trị phù hợp với các sáng chế được đưa ra

trong bảng 5, bao gồm cả tên bệnh phổ biến, chất được tích đọng, và thiếu hụt enzym tương ứng (chuyển thể từ Bảng 38-4 của Kolodny các đồng giả., 1998, Id.).

Bảng 5

Các bệnh tích trữ thể tiêu bào

Bệnh	Chất được tích đọng	Thiếu hụt enzym
Sphingolipidoses		
Gaucher	Glucosylsphingosine	Glucosylsphingosidaza
Niemann-Pick	Sphingomyelin	Sphingomyelinaza
Niemann-Pick B	Sphingomyelin	Sphingomyelinaza
Farber	Xeramit	Xeramidaza
GM ₁ -gangliosidosis	GM ₁ -gangliosit, glycoprotein	GM ₁ -gangliosit- β -galactosidaza
GM ₂ -gangliosidosis (Sandhoff)	GM ₂ -gangliosit, globosit	Hexosaminidaza A và B
Tay-Sachs	GM ₂ -gangliosit	Hexosaminidaza A
Krabbe	Galactosylxeramit	β -Galactosylxeramidaza
Mucopolysaccharidoses		
Hurler-Scheie (MPS I)	Dermatan Sulfat, heparin Sulfat	α -L-iduronidaza
Hunter (MPS II)	Dermatan Sulfat, heparin Sulfat	Iduronat sufataza
Sanfilippo (MPS III)		
Loại A	Heparan Sulfat	Heparan-N-sufataza
Loại B	Heparan Sulfat	N-acetyl- α -glucosaminidaza
Loại C	Heparan Sulfat	Axetyl CoA: α -glucosaminidaza axetyl-transferaza
Loại D	Heparan Sulfat	N-acetyl- α -glucosamin-6-sufataza
Marquio (MPS IV)		
Loại A	Keratan Sulfat	Galactosamin-6-sufataza
Loại B	Keratan Sulfat	β -galactosidaza
Maroteaux-Lamy (MPS VI)	Dermatan Sulfat	Galactosamin-4-sufataza (arylsufataza B)

Sly (MPS VII)	Dermatan Sulfat, heparan Sulfat	β -glucuronidaza
Mucosulfatidosis	Sulfatit, mucopolysacarit	Arylsufataza A, B và C, sufataza khác
Mucolipidosis Sialidosis	Sialyloligosacarit, glycoprotein	α -neuraminidaza
Mucolipidosis II	Sialyloligosacarit, glycoprotein, glycolipit	Huyết thanh cao, nguyên bào sợi thấp enzym; N-axetyl-glucosamin-1-phosphat transferaza
Mucolipidosis III	Glycoproteins, glycolipit	Như ở trên
Mucolipidosis IV	Glycolipit, glycoproteins	Mcoln1 transm protein
Các bệnh khác liên quan đến chuyển hóa cacbonhydrat phức hợp		
Fabry	Globotriaosylxeramit(Gb3), lyso-Gb3	α -galactosidaza A
Schindler	O-được liên kết glycopeptit	α -N-axetyl galactosaminidaza
Pompe	Glycogen	α -glucosidaza
Bệnh tích trữ axit sialic	Axit sialic tự do	Không xác định
Fucosidosis	Fucoglycolipit, fucosyloligosacarit	α -fucosidaza
Mannosidosis	Mannosyloligosaccarit	α -mannosidaza
Aspartylglucosaminuria	Aspartylglucosamin	Aspartylglucosamin amidaza
Wolman	Cholesteryl este, Triglyxerit	Axit lipaza
Tế bào thần kinh (NCLs)*		
Infantile NCL	Granular osmophilic deposits, Saposins A và D thioesteraza	Palmitoyl-thioesteraza (PPT1)
Late Infantile	cấu hình cong, đơn vị nhỏ ATP synthaza c	Tripeptidyl proteaza 1 (TPP1)
Biến thể Finnish	Cấu hình Vân tay/thẳng, đơn vị nhỏ ATP synthaza c	CLN5
Biến thể	Cấu hình Vân tay/thẳng, đơn vị nhỏ ATP synthaza c	CLN6
Thanh thiếu niên	Cấu hình Vân tay	CLN3

	đơn vị nhỏ ATP synthaza c	
Người trưởng thành người Bắc Âu	Biến đổi Cấu hình thẳng, đơn vị nhỏ ATP synthaza c	không xác định CLN8
Biến thể Turkish	Cấu hình Vân tay/thẳng Cấu hình - thành phần không xác định	không xác định

Vận chuyển clolesterol và chuyển hóa bệnh tiêu thể.

Bệnh Niemann-Pick cholesterol được ete hóa NPC1 hoặc NPC2 loại C

* Davidson và các đồng giả, The Neuronal Ceroid Lipofuscinosis, Clinical Features and Molecular Basis of Disease. Trong Barranger JA and Cabrera-Salazar MA (Eds) Lysosomal Storage Disorders 2007. pp. 371-388. Springer, New York, Mỹ.

Bất kỳ phương pháp đã được biết đến với những người người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực có thể được sử dụng để theo dõi tình trạng bệnh lý và hiệu quả của liệu pháp kết hợp của sáng chế. Giám sát lâm sàng của tình trạng bệnh lý có thể bao gồm nhưng không giới hạn lượng cơ quan (ví dụ như gan, lá lách), huyết cầu tố, số lượng hồng cầu, tỷ lệ hồng cầu, giảm tiểu cầu, chứng suy giảm (suy mòn)), và mức độ huyết tương chitinaza (ví dụ như chitotriosidaza). Chitotriosidaza là enzym của họ chitinaza được biết đến do được sản xuất bởi đại thực bào ở mức độ cao trong ở bệnh nhân mắc bệnh tích trữ thể tiêu bào (xem) Guo và các đồng giả, 1995, J. Inherit. Metab. Dis. 18, 717-722; den Tandt và các đồng tác giả, 1996, J. Inherit. Metab. Dis. 19, 344-350; Dodelson de Kremer và các đồng tác giả, 1997, Medicina (Buenos Aires) 57, 677-684; Czartoryska và các đồng tác giả, 2000, Clin. Biochem. 33, 147-149; Czartoryska và các đồng tác giả, 1998, Clin. Biochem. 31, 417-420; Mistry và các đồng tác giả, 1997, Baillieres Clin. Haematol. 10, 817-838; Young và các đồng tác giả, 1997, J. Inherit. Metab. Dis. 20, 595-602; Hollak và các đồng tác giả, 1994, J. Clin. Invest. 93, 1288-1292). Tốt hơn là, chitotriosidaza được đo trong liên kết

nổi với men chuyển angiotensin và axit phosphat kháng không tartrat để theo dõi những phản ứng để điều trị bệnh nhân mắc bệnh Gaucher.

Các phương pháp và chế phẩm được điều chế theo công thức thực hiện các phương pháp điều trị kết hợp của sáng chế bao gồm tất cả các phương pháp và công thức điều chế được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật này (xem, ví dụ, Remington's Pharmaceutical Sciences, 1980 và những năm tiếp theo, xuất bản lần thứ 16. Và các phiên bản tiếp theo, biên tập A. Oslo, Easton Pa.; Controlled Drug Delivery, 1987, 2nd rev, Joseph R. Robinson & Vincent HL Lee, eds, Marcel Dekker, ISBN: 0824775880; Encyclopedia of Controlled Drug Delivery, năm 1999, Edith Mathiowitz, John Wiley & Sons, ISBN: 0471148288; Bằng sáng chế Hoa Kỳ số 6,066,626 và tài liệu tham khảo được trích dẫn trong đó, xem thêm, tài liệu tham khảo được trích dẫn trong phần dưới đây).

Theo sáng chế, các phương pháp tiếp cận thông thường tiếp theo được đề xuất cho liệu pháp kết hợp trong việc điều trị các bệnh tích trữ thể tiêu bào. Mỗi cách tiếp cận thông thường liên quan đến việc kết hợp các liệu pháp thay thế enzym với liệu pháp phân tử nhỏ một cách nhất quán với việc tối ưu hóa lợi ích lâm sàng trong khi giảm thiểu bất lợi liên quan đến việc sử dụng từng liệu pháp riêng lẻ.

Trong một phương án của sáng chế, liệu pháp thay thế enzym (độc lập hoặc kết hợp với liệu pháp phân tử nhỏ) được thực hiện để điều trị ban đầu (tức là, đối tượng loại bỏ tế bào ung thư), và liệu pháp phân tử nhỏ được sử dụng sau khi giai đoạn loại bỏ tế bào ung thư để đạt được và duy trì hiệu quả điều trị lâu dài ổn định mà không cần phải tiêm tĩnh mạch ERT thường xuyên. Ví dụ, liệu pháp thay thế enzym có thể được tiêm tĩnh mạch (ví dụ như trong khoảng thời gian từ 1 đến 2 giờ) cơ bản một tuần một lần, hai tuần một lần, hoặc hai tháng một lần, trong vài tuần hoặc vài tháng, hoặc dài hơn (ví dụ, cho đến khi cơ quan liên quan như lá lách hoặc gan cho thấy sự sụt giảm về kích thước). Hơn nữa, giai đoạn ban đầu để loại bỏ tế bào ung thư trong việc điều trị ERT có thể được thực hiện độc lập hoặc kết hợp với liệu pháp phân tử nhỏ. Thành phần liệu pháp

phân tử nhỏ được đặc biệt ưu tiên trong đó các phân tử nhỏ là tương thích với đường uống, do đó hơn nữa đề xuất giảm việc tiêm tĩnh mạch thường xuyên.

Ngoài ra, giữa các ERT và SMT, hoặc bổ sung SMT với ERT khi cần thiết, đề xuất chiến lược đồng thời tận dụng những thế mạnh và giải quyết các nhược điểm liên quan đến mỗi phương pháp trị liệu khi dùng độc lập. Thuận lợi của ERT, dù được sử dụng để loại bỏ tế bào ung thư và/hoặc điều trị lâu dài hơn, thì kinh nghiệm lâm sàng có sẵn sàng giúp bác sĩ đưa ra quyết định của chính mình. Hơn nữa, bệnh nhân có thể được đo độ chuẩn một cách hiệu quả với ERT trong giai đoạn loại bỏ bệnh ung thư bằng cách, ví dụ, theo dõi chất chuyển hóa sinh hóa trong nước tiểu hoặc mẫu khác của cơ thể, hoặc bằng cách kiểm tra lượng cơ quan bị ảnh hưởng. Tuy nhiên, bất lợi của ERT là tần số của thực hiện được đặt ra thường là tiêm tĩnh mạch trên một cơ sở hàng tuần hoặc mỗi tuần hai kỳ do sự liên tục tái tích tụ của các chất nền. Việc sử dụng các liệu pháp phân tử nhỏ để làm giảm lượng hoặc ức chế sự tích tụ chất nền ở một bệnh nhân có thể lần lượt làm giảm tần số thực hiện của ERT. Ví dụ, chế độ liều lượng của liệu pháp thay thế enzyme hai tuần một lần có thể được đề xuất "ERT khuyết" (ví dụ, bằng cách sử dụng SMT) để tiêm enzyme thường xuyên mà không cần điều trị. Hơn nữa, điều trị bệnh tích trữ thể tiêu bào với liệu pháp kết hợp có thể đề xuất phương pháp điều trị bổ sung. Thật vậy, như đã chứng minh trong các ví dụ dưới đây, một liệu pháp kết hợp của SMT và ERT có thể đề xuất những cải tiến đáng kể so với cả hai nền tảng điều trị riêng lẻ. Những dữ liệu này cho thấy rằng liệu pháp kết hợp sử dụng SMT và ERT có thể được thêm vào và bổ sung. Trong một phương án, ERT có thể được sử dụng như là một chiến lược loại bỏ tế bào ung thư (tức là, điều trị ban đầu), được theo dõi hoặc đồng thời bổ sung với SMT sử dụng một hợp chất của sáng chế. Trong phương án khác, một bệnh nhân đầu tiên được điều trị với SMT sử dụng hợp chất của sáng chế, tiếp theo hoặc đồng thời có bổ sung ERT. Trong các phương án khác, SMT được sử dụng để ức chế hoặc giảm thiểu sự tích tụ thêm các chất nền (hoặc tái tích tụ của chất nền nếu được sử dụng sau khi loại bỏ tế bào ung thư với ERT) ở bệnh nhân mắc

bệnh tích trữ thể tiêu bào, và tùy chọn được đề xuất ERT là cần thiết để giảm thiểu bất kỳ tích tụ thêm chất nền. Trong một phương án, sáng chế này đề xuất một phương pháp kết hợp liệu pháp điều trị của đối tượng được chuẩn đoán mắc bệnh tích trữ thể tiêu bào gồm xen kẽ giữa thực hiện của liệu pháp thay thế enzym và liệu pháp phân tử nhỏ. Trong phương án khác, sáng chế này đề xuất một phương pháp điều trị kết hợp liệu pháp của đối tượng được chuẩn đoán mắc bệnh tích trữ thể tiêu bào bao gồm đồng thời thực hiện liệu pháp thay thế enzym và liệu pháp phân tử nhỏ. Trong liệu pháp kết hợp khác nhau của sáng chế, nó sẽ được hiểu rằng thực hiện liệu pháp phân tử nhỏ có thể thực hiện trước, đồng thời với, hoặc sau đó, thực hiện liệu pháp thay thế enzym. Tương tự như vậy, việc thực hiện liệu pháp thay thế enzym có thể xảy ra trước, đồng thời với, hoặc sau điều trị bằng phân tử nhỏ.

Trong bất kỳ phương án nào trong các phương án của sáng chế, các bệnh tích trữ thể tiêu bào được chọn từ nhóm gồm các Gaucher (loại 1, 2 và 3), Niemann-Pick, Farber, G_{M1} -gangliosidosis, G_{M2} -gangliosidose (ví dụ, thiếu hụt hoạt chất $GM2$, Tay-Sachs và Sandhoff), Krabbe, Hurler-Scheie (MPS I), Hunter (MPS II), Sanfilippo (MPS III) Loại A, Sanfilippo (MPS III) Loại B, Sanfilippo (MPS III) Loại C, Sanfilippo (MPS III) Loại D, Marquio (MPS IV) Loại A, Marquio (MPS IV) Loại B, Maroteaux-Lamy (MPS VI), Sly (MPS VII), mucosulfatidosis, sialidoza, mucopolipitosis II, mucopolipitosis III, mucopolipitosis IV, bệnh Fabry, Schindler, bệnh Pompe, bệnh tích đọng axit sialic, fucosidosis, mannosidosis, aspartylglucosaminuria, Wolman, và bệnh lipofuscinosis dạng sáp của tế bào thần kinh.

Hơn nữa, ERT cung cấp lượng hiệu quả của ít nhất một trong những chất sau: enzym; glucocerebrosidaza, sphingomyelinaza, xeramidaza, G_{M1} -gangliosit-beta-galactosidaza, hgalactosidaza A, hgalactosidaza B, beta-galactocerebrosidaza, alpha-L-iduronidaza, sulfataza iduronat, heparan-N-sulfataza, N-acetyl-alpha-glucosaminidaza, acetyl CoA:alpha-glucosaminide acetyl-transferaza, N-acetyl-alpha-glucosamin-6-sulfataza, galactosamin-6-

sulfataza, beta-galactosidaza, galactosamin-4-sulfataza (arylsulfataza B), beta-glucuronidaza, arylsulfataza A, arylsulfataza C, alpha-neuraminidaza, N-axetylglucosamin-1-phosphat transferaza, alpha-galactosidaza A, alpha-N-axetylglactosaminidaza, alpha-glucosidaza, alpha-fucosidaza, alpha-mannosidaza, aspartylglucosamin amidaza, axit lipaza, palmitoyl-protein thioesteraza (CLN-1), PPT1, TPP1, CLN3, CLN5, CLN6, CLN8, NPC1 hoặc NPC2.

Phù hợp với các sáng chế, SMT và/hoặc ERT sản xuất lượng lượng giảm bớt ít nhất một trong những chất tích đọng sau đây; glucocerebrosit, sphingomyelin, Xeromit, G_{M1} -gangliosit, G_{M2} -gangliosit, globosit, galactosylxeromit, sulfat dermatan, sulfat heparan, sulfat keratan, sulfatit, mucopolisacarit, sialyloligolisacarit, glycoprotein, sialyloligolisacarit, glycolipit, globotriaosylxeromit, glycopeptit O-liên kết, glycogen, axit sialic tự do, fucoglycolipit, fucosyloligolisacarit, mannosyloligolisacarit, aspartylglucosamin, este cholesteryl, triglyxerides, granular osmophilic deposits – Saposins A và D, ATP synthaza tiểu đơn vị c, NPC1 hoặc NPC2.

Trong các phương án nhất định của sáng chế, các liệu pháp phân tử nhỏ bao gồm việc áp dụng lượng hiệu quả của hợp chất (S)-Quinuclidin-3-yl (2-(2-(4-flophenyl)thiazol-4-yl)propan-2-yl)carbammat cho đối tượng (xem Fig. 2A). Trong phương án khác, liệu pháp phân tử nhỏ bao gồm áp dụng lượng hiệu quả của hợp chất Quinuclidin-3-yl (2-(4'-flo-[1,1'-biphenyl]-3-yl)propan-2-yl)carbammat đến đối tượng điều trị (xem Fig. 2B). Liệu pháp phân tử nhỏ có thể bao gồm việc áp dụng một hoặc nhiều hợp chất cho đối tượng điều trị. Trong các phương án nhất định, ít nhất là một trong những hợp chất là một hợp chất của sáng chế, chẳng hạn như những hợp chất được thể hiện trong Fig. 2A và/hoặc 2B.

Liệu pháp thay thế enzyme có thể gây phản ứng miễn dịch không mong muốn. Theo đó, các tác nhân ức chế miễn dịch có thể được sử dụng cùng với thành phần liệu pháp thay thế enzyme của liệu pháp kết hợp của sáng chế. Các tác

nhân này cũng có thể được sử dụng với thành phần liệu pháp phân tử nhỏ, nhưng sự cần thiết đối với sáng chế này thường ít xảy ra. Bất kỳ tác nhân ức chế miễn dịch được biết đến với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực có thể được sử dụng cùng với một liệu pháp kết hợp của sáng chế. Tác nhân ức chế miễn dịch này bao gồm nhưng không giới hạn cyclosporin, FK506, rapamycin, CTLA4-Ig, và các tác nhân kháng -TNF như etanercept (xem ví dụ Moder, 2000, *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 84, 280-284; Nevins, 2000, *Curr. Opin. Pediatr.* 12, 146-150; Kurlberg và các đồng tác giả, 2000, *Scand. J. Immunol.* 51, 224-230; Ideguchi và các đồng tác giả, 2000, *Neuroscience* 95, 217-226; Potter và các đồng tác giả, 1999, *Ann. NY Acad. Sci.* 875, 159-174; Slavik và các đồng tác giả 1999, *Immunol. Res.* 19, 1-24; Gaziev và các đồng tác giả, 1999, *Bone Marrow Transplant.* 25, 689-696; Henry, 1999, *Clin. Transplant.* 13, 209-220; Gummert và các đồng tác giả, 1999, *J. Am. Soc. Nephrol.* 10, 1366-1380; Qi và các đồng tác giả, 2000, *Transplantation* 69, 1275-1283). Các thụ thể kháng IL2 (. alpha. tiểu đơn vị) kháng thể daclizumab (ví dụ như Zenapax.TM.), trong đó đã được chứng minh có hiệu quả ở bệnh nhân được cấy ghép, cũng có thể được sử dụng như một tác nhân ức chế miễn dịch (ví dụ xem Wiseman và các đồng tác giả, 1999, *Drugs* 58, 1029-1042; Beniaminovitz và các đồng tác giả, 2000, *N. Engl J. Med* 342, 613-619; Ponticelli và các đồng tác giả, 1999, *Drugs R. D.* 1, 55-60; Berard và các đồng tác giả, 1999, *Pharmacotherapy* 19, 1127-1137; Eckhoff và các đồng tác giả, 2000, *Transplantation* 69, 1867-1872; Ekberg và các đồng tác giả, 2000, *Transpl. Int.* 13, 151-159). Tác nhân ức chế miễn dịch bổ sung bao gồm nhưng không giới hạn để kháng CD2 (Branco và các đồng tác giả, 1999, *Transplantation* 68, 1588-1596; Przepiorka và các đồng tác giả 1998, *Blood* 92, 4066-4071), kháng CD4 (Marinova-Mutafchieva và các đồng tác giả, 2000, *Arthritis Rheum.* 43, 638-644; Fishwild và các đồng tác giả 1999, *Clin. Immunol.* 92, 138-152), và phối tử kháng CD40 (Hong và các đồng tác giả, 2000, *Semin. Nephrol.* 20, 108-125; Chirmule và các đồng tác giả, 2000,

J. Virol. 74, 3345-3352; Ito và các đồng tác giả, 2000, J. Immunol. 164, 1230-1235).

Bất kỳ sự kết hợp nào của các tác nhân ức chế miễn dịch được biết đến với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực có thể được sử dụng cùng với một liệu pháp kết hợp của sáng chế. Một sự kết hợp tác nhân ức chế miễn dịch của sự hữu ích đặc biệt là tacrolimus (thuốc bôi mới) (FK506) cùng với sirolimus (rapamycin) cùng với daclizumab (thụ thể kháng -IL2 thụ. alpha. - đơn vị nhỏ kháng thể). Sự kết hợp này được chứng minh có hiệu quả như là thay thế cho các xteoit và cyclosporin, và khi mục tiêu điều trị cụ thể là gan. Hơn nữa, sự kết hợp này gần đây đã được đưa ra để cho phép cấy tế bào đảo tụy thành công Xem Denise Grady, The New York Times, thứ bảy 27 tháng 5, 2000, trang A1 và A11. Xem A.M. Shapiro và các đồng tác giả, 27 Tháng Bảy năm 2000, "Islet Transplantation In Seven Patients With Type 1 Diabetes Mellitus Using A Glucocorticoid-Free Immunosuppressive Regimen", N. Engl. J. Med. 343, 230-238; Ryan và các đồng tác giả, 2001, Diabetes 50, 710-719. Liệu pháp trao đổi huyết tương (Plasmaphoresis) bằng phương pháp được biết đến trong kỹ thuật cũng có thể được sử dụng để loại bỏ hoặc làm cạn kiệt các kháng thể mà có thể chống lại các thành phần khác nhau của liệu pháp kết hợp.

Chỉ số trạng thái miễn dịch sử dụng ở sáng chế bao gồm nhưng không giới hạn cho các kháng thể và bất kỳ xytokin nào được biết đến bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật, ví dụ như, các interleukin, CSFs và chất do các tế bào bị nhiễm virus sản sinh ra có khả năng ức chế tăng trưởng virus (interferon) (xem thường, Leonard và các đồng tác giả, 2000, J. Allergy Clin Immunol. 105, 877-888; Oberholzer và các đồng tác giả, 2000, Crit. Care Med. 28 (4 Suppl.), N3-N12; Rubinstein và các đồng tác giả, 1998, Cytokine Growth Factor Rev. 9, 175-181). Ví dụ, các kháng thể phản ứng miễn dịch đặc hiệu với enzyme thay thế có thể được theo dõi để xác định tình trạng miễn dịch của đối tượng. Trong số hai chục interleukin đã biết, chỉ số trạng thái miễn dịch đặc biệt ưu tiên là IL-1.alpha., IL-2, IL-4, IL-8 và IL-10. Trong số nhân tố kích

thích khuẩn lạc (colony) (CSFs), chỉ số trạng thái miễn dịch được đặc biệt ưu tiên là G-CSF, GM-CSF và M-CSF. Trong số các chất do các tế bào bị nhiễm virus sản sinh ra có khả năng ức chế tăng trưởng virus, một hoặc nhiều alpha, beta hay gamma của chất do các tế bào bị nhiễm virus sản sinh ra có khả năng ức chế tăng trưởng virus được ưu tiên như các chỉ số tình trạng miễn dịch.

Trong các phần dưới đây, các thành phần khác nhau mà có thể được sử dụng cho tám bệnh tích trữ thể tiêu bào cụ thể được đề xuất (tức là, Gaucher (bao gồm các loại 1, 2 và 3), bệnh Fabry, Niemann-Pick B, Hunter, Morquio, Maroteaux-Lamy, Pompe, và Hurler-Scheie). Trong phần tiếp theo, liệu pháp thay thế enzyme được tiếp tục bộc lộ và các thành phần liệu pháp phân tử nhỏ của một liệu pháp kết hợp theo sáng chế được đề xuất.

Bệnh Gaucher

Như đã đề cập ở trên, bệnh Gaucher được gây ra bởi sự thiếu hụt của enzyme glucocerebrosidaza (beta-D-glucosyl-N-acylsphingosin glucosylhydrolaza, EC 3.2.1.45) và sự tích tụ glucocerebrosit (glucosylceramide). Đối với một thành phần liệu pháp thay thế enzyme của liệu pháp kết hợp theo sáng chế để điều trị bệnh Gaucher, một số tài liệu tham khảo có sẵn trong đó đặt ra chế độ liều lượng đạt yêu cầu và thông tin hữu ích khác liên quan đến việc điều trị (xem Morales, năm 1996, Gaucher's Disease: A Review, *The Annals of Pharmacotherapy* 30, 381-388; Rosenthal và các đồng tác giả, 1995, Enzyme Replacement Therapy for Gaucher Disease: Skeletal Responses to Macrophage-targeted Glucocerebrosidase, *Pediatrics* 96, 629-637; Barton và các đồng tác giả, 1991, Replacement Therapy for Inherited Enzyme Deficiency--Macrophage-targeted Glucocerebrosidase for Gaucher's Disease, *New England Journal of Medicine* 324, 1464-1470; Grabowski và các đồng tác giả, 1995, Enzyme Therapy in Type 1 Gaucher Disease: Comparative Efficacy of Mannose-terminated Glucocerebrosidase from Natural and Recombinant Sources, *Annals of Internal Medicine* 122, 33-39; Pastores và các đồng tác giả, 1993, Enzyme Therapy in

Gaucher Disease Type 1: Dosage Efficacy and Adverse Effects in 33 Patients treated for 6 to 24 Months, Blood 82, 408-416); và Weinreb và các đồng tác giả, Am. J. Med; 113 (2): 112-9 (2002).

Trong một phương án, chế độ liều lượng ERT từ 2,5 đơn vị trên mỗi kg (U/kg) với ba lần một tuần đến 60 U/kg mỗi hai tuần một lần được đề xuất, các enzym được truyền tĩnh mạch từ 1 đến 2 giờ. Đơn vị của glucocerebrosidaza được định nghĩa là lượng enzym xúc tác quá trình thủy phân một micromol của chất nền tổng hợp para-nitrophenyl-p-D-glucopyranosit mỗi phút ở 37 °C. Trong phương án khác, chế độ liều lượng từ 1 U/kg ba lần một tuần đến 120 U/kg mỗi hai tuần một lần được đề xuất. Trong một phương án khác, một chế độ liều lượng từ 0,25 U/kg mỗi ngày hoặc ba lần một tuần đến 600 U/kg mỗi 2 đến 6 tuần một lần được đề xuất.

Từ năm 1991, algluxeraza (Xeredaza®) đã có sẵn từ công ty Genzyme. Algluxeraza là một dạng glucocerebrosidaza được biến đổi có nguồn gốc từ nhau thai. Năm 1994, imigluxeraza (Xerzyme®) cũng trở thành có sẵn từ công ty Genzyme. Imigluxeraza là một dạng được biến đổi của glucocerebrosidaza bắt nguồn từ biểu hiện của ADN tái tổ hợp trong một hệ thống nuôi cấy tế bào ở động vật có vú (những protein được tạo ra từ tế bào trứng của chuột đồng Trung Quốc - Chinese hamster ovary cells). Imigluxeraza là glycoprotein đơn thể của 497 axit amin có chứa bốn vị trí glycosyl hóa được liên kết với N. Imigluxeraza có những lợi thế là nguồn cung cấp không giới hạn về mặt lý thuyết và cơ hội giảm các chất ô nhiễm sinh học so với algluxeraza có nguồn gốc từ nhau thai. Các enzym này được biến đổi tại các vị trí glycosyl hóa của chúng để đưa ra phần dư mannoza, sự vận động được cải thiện mục tiêu tiêu thể thông qua các thụ thể mannoza-6-phosphat. Imigluxeraza được phân biệt với glucocerebrosidaza nhau thai bởi một axit amin ở vị trí 495, nơi histidin được thay thế cho acginin. Một số chế độ liều lượng của các sản phẩm này được cho là có hiệu quả (xem Morales, 1996, Id.; Rosenthal và các đồng tác giả, 1995, Id.; Barton và các đồng tác giả, 1991, Id.; Grabowski và các đồng tác giả 1995, Id.;

Pastores và các đồng tác giả 1993, Id.). Ví dụ, chế độ liều lượng của 60 U/kg mỗi hai tuần một lần có lợi ích lâm sàng ở bệnh nhân có mức độ bệnh vừa đến nặng. Các tài liệu tham khảo được trích dẫn ở trên và sản phẩm này được đóng gói nên hỏi ý kiến của những bác sĩ có trình độ với việc thêm chế độ liều lượng và thông tin thực hiện. Xem thêm Bằng sáng chế Hoa Kỳ số 5,236,838 và 5,549,892 giao cho công ty Genzyme.

Như đã nói ở trên, bệnh Gaucher là kết quả từ sự thiếu hụt các enzym tiêu thể glucocerebrosidaza (GC). Trong các kiểu hình phổ biến nhất của bệnh Gaucher (loại 1), bệnh lý được giới hạn trong các hệ lưới nội mô và xương và không có triệu chứng thần kinh. Xem Barranger, Glucosylxeramitlipitosis: Gaucher disease. Trong: Scriver CR BA, Sly WS, Valle D, editor. The Metabolic Basis of Inherited Disease. New York: McGraw-Hill. pp. 3635-3668 (2001). Trong bệnh Gaucher thần kinh (nGD), chia thành bệnh Gaucher loại 2 và loại 3, sự thiếu hụt của glucocerebrosidaza (GC) gây nên glucosylxeramit (GluCer; GL-1) và glucosylsphingosin (GluSph) tích tụ trong não, dẫn đến suy giảm thần kinh. bệnh Gaucher loại 2 có đặc trưng bởi xuất hiện sớm, tiến triển nhanh, bệnh lý lan rộng ra các nội tạng và hệ thống thần kinh trung ương, và thường tử vong sau 2 năm mắc bệnh. Bệnh Gaucher loại 3, còn được gọi là nGD bán cấp, với một kiểu hình trung gian với tuổi phát bệnh khác nhau và mức độ nghiêm trọng và mức độ tiến triển khác nhau. Goker-Alpan và các đồng tác giả, Tạp chí The Journal of Pediatrics 143: 273-276 (2003). Một nghiên cứu phát triển gần đây đã sản xuất các mô hình chuột K14 Inl/Inl của bệnh Gaucher loại 2 (sau đây gọi là "chuột K14"); mô hình chuột này tóm lược rất giống với các bệnh ở người chỉ ra sự mất điều hòa, co giật, co cứng và giảm tuổi thọ trung bình chỉ có 14 ngày. Enquist và các đồng tác giả, PNAS 104: 17483-17488 (2007).

Như ở bệnh nhân mắc nGD, một số mô hình chuột bị bệnh có mức GluCer và GluSph được tăng lên trong não do sự thiếu hụt trong hoạt động GC. Liu và các đồng tác giả, PNAS 95: 2503-2508 (1998) và Nilsson, J. Neurochem

39: 709-718 (1982). Các chuột "K14" hiển thị một kiểu hình thần kinh mà đưa ra nhiều tính năng bệnh lý với bệnh Gaucher loại 2, chẳng hạn như thoái hóa thần kinh, mô tế bào hình sao, tiểu thần kinh đệm tăng sinh, và tăng nồng độ GluCer và GluSph trong vùng não đặc hiệu. Enquist và các đồng tác giả, (2007).

Hệ thống quản lý lâm sàng của bệnh nhân bị ảnh hưởng bởi nGD đặt ra một thách thức cho các bác sĩ điều trị vì mức độ nghiêm trọng của bệnh loại 2 và khả năng của các liệu pháp hiện tại để vượt qua hàng rào máu não (BBB). Việc điều trị hiện nay của không-nGD dựa trên việc phân phối tĩnh mạch tái tổ hợp glucocerebrosidaza ở người (Imiglucerase; Xerzyme™) để thay thế các enzym bị thiếu hoặc thực hiện của các chất ức chế glucosylceramid synthaza để làm suy giảm sự sản xuất chất nền (GL-1). Tuy nhiên, những loại thuốc này không qua được hàng rào máu não, và do đó không được dự kiến sẽ đề xuất lợi ích điều trị cho bệnh nhân mắc nGD. Các chất ức chế phân tử nhỏ glucosylceramid synthaza hiện nay ở lâm sàng học không có khả năng để giải quyết các kiểu hình thần kinh của nGD. Một đánh giá về hợp chất của sáng chế, hợp chất, Quinuclidin-3-yl (2-(4'-flo-[1,1'-biphenyl]-3-yl)propan-2-yl)carbamate (sau đây gọi là "Gz161"), trong mô hình chuột K14 mắc bệnh Gaucher loại 2 được chứng minh rằng nó thực sự có thể làm giảm GluCer và GluSph trong não (xem ví dụ 122-125). Nó cũng làm giảm bệnh chứng thần kinh não bộ và mở rộng khoảng thời gian sống của mô hình này. Hơn nữa, một cách tiếp cận kết hợp sử dụng cả việc thay thế enzym và giảm chất nền có phân tử nhỏ có thể tương ứng với một liệu pháp tốt cho bệnh Gaucher loại 2.

Fabry

Như đã nói trước đây, bệnh Fabry được gây ra bởi sự thiếu hụt của các enzym tiêu thể alpha-galactosidaza A. Việc thiếu hụt enzym dẫn đến tích tụ hệ thống glycosphingolipit có gốc đầu cuối alpha-galactosyl, chủ yếu là globotriaosylceramid (GL3 hoặc Gb3), và ở một mức độ thấp hơn, galabiosylceramid và glycosphingolipit nhóm máu B.

Một số xét nghiệm có sẵn để theo dõi tiến triển của bệnh và để xác định khi chuyển từ một phương thức điều trị sang phương thức khác. Trong một phương án, xét nghiệm để xác định các hoạt động cụ thể của alpha-galactosidaza A trong một mẫu mô có thể được sử dụng. Trong phương án khác, xét nghiệm để xác định sự tích tụ của Gb3 có thể được sử dụng. Trong phương án khác, bác sĩ có thể khảo nghiệm sự tích tụ của các chất nền glycosphingolipit trong chất lỏng ở cơ thể và trong tiêu thể của tế bào nội mô mạch máu, mô quanh mao mạch và tế bào cơ trơn của các mạch máu. Biểu hiện lâm sàng khác có thể là chỉ số hữu ích của thực hiện bệnh bao gồm protein niệu, hoặc những dấu hiệu khác của suy thận như các tế bào đỏ hoặc các hạt cầu lipid trong nước tiểu, và tốc độ lắng hồng cầu cao. Cũng có thể theo dõi tình trạng thiếu máu, giảm nồng độ sắt trong huyết thanh, nồng độ cao của beta-thromboglobulin, và số lượng hồng cầu lưới cao hoặc sự kết tụ tiểu cầu. Thật vậy, bất cứ cách tiếp cận để giám sát tiến triển của bệnh mà được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực biết đến có thể được sử dụng (Xem thường Desnick RJ và các đồng tác giả, 1995, alpha-Galactosidase A Deficiency: Fabry Disease, trong: *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, Scriver và các đồng tác giả., eds., McGraw-Hill, N.Y., 7. sup.th ed., trang 2741-2784). Dấu hiệu thay thế được ưu tiên là gây đau để theo dõi việc thực hiện bệnh Fabry. Phương pháp ưu tiên khác bao gồm việc đánh giá tổng sự thanh thải các enzym và/hoặc chất nền từ chất lỏng cơ thể hoặc mẫu sinh thiết. Chế độ liều lượng được ưu tiên cho liệu pháp thay thế enzym trong bệnh Fabry là 1-10 mg/kg iv mỗi ngày. Chế độ liều lượng nằm trong khoảng từ 0,1 đến 100 mg/kg iv với tần suất từ mỗi ngày một lần đến mỗi tuần hoặc mỗi hai tuần một lần có thể được sử dụng.

Niemann-Pick B

Như đã nói trước đây, bệnh Niemann-Pick B là do giảm hoạt động của các axit enzym tiêu thể sphingomyelinaza và tích tụ màng lipid, sphingomyelin sơ cấp. Liều lượng hiệu quả của axit thay thế sphingomyelinaza sẽ được chuyển giao có thể dao động từ khoảng 0,01 mg/kg đến khoảng 10 mg/kg trọng lượng

cơ thể với tần suất từ cách ngày hàng tuần, hai tuần một lần, hoặc hai tháng một lần. Trong các phương án khác, liều lượng hiệu quả có thể dao động từ khoảng 0,03 mg/kg đến khoảng 1 mg/kg; từ khoảng 0,03 mg/kg đến khoảng 0,1 mg/kg; và/hoặc từ khoảng 0,3 mg/kg đến khoảng 0,6 mg/kg. Trong phương án cụ thể, bệnh nhân được thực hiện axit sphingomyelinaza trong một chế độ liều tăng dần theo liều tuần tự sau đây: 0,1 mg/kg; 0,3 mg/kg; 0,6 mg/kg; và 1,0 mg/kg, trong đó mỗi liều axit sphingomyelinaza được dùng ít nhất hai lần, và mỗi liều được dùng cách nhau hai tuần, và trong đó bệnh nhân được theo dõi tác dụng phụ độc hại trước khi nâng liều lên mức tiếp theo (Xem công bố đơn sáng chế Hoa Kỳ số 2011/0052559).

Hurler-Scheie (MPS I)

Bệnh Hurler, Scheie, và Hurler-Scheie, còn được gọi là MPS I, được gây ra bởi sự bất hoạt của alpha-iduronidaza và tích tụ dermatan sulfat và heparan sulfat. Một số xét nghiệm có sẵn để theo dõi tiến triển của bệnh MPS I. Ví dụ, hoạt tính enzym alpha-iduronidaza có thể được theo dõi trong các mẫu sinh thiết mô hay tế bào nuôi cấy được từ máu ngoại vi. Ngoài ra, phương pháp có lợi của sự tiến triển bệnh trong MPS I và mucopolysaccharidoza khác bài tiết nước tiểu của các glycosaminoglycan dermatan sulfat và heparan sulfat (xem Neufeld và các đồng tác giả, 1995, Id.). Trong phương án cụ thể, enzym alpha-iduronidaza được dùng một lần mỗi tuần như truyền tĩnh mạch với liều 0,58 mg/kg ở trọng lượng cơ thể.

Hunter (MPS II)

Bệnh Hunter (a.k.a. MPS II) được gây ra bởi sự bất hoạt của iduronat sulfataza và tích tụ dermatan sulfat và heparan sulfat. Bệnh Hunter trình bày lâm sàng trong trường hợp bệnh nặng và nhẹ. Chế độ liều lượng enzym trị liệu từ 1,5 mg/kg hai tuần một lần đến 50 mg/kg mỗi tuần được ưu tiên.

Morquio (MPS IV)

Hội chứng Morquio (a.k.a. MPS IV) là kết quả của sự tích tụ của keratan sulfat do sự bất hoạt của một trong hai enzym. Trong MPS IVA, enzym bất hoạt là galactosamin-6-sulfataza và MPS IVB enzym bất hoạt là beta-galactosidaza. Chế độ liều lượng enzym điều trị từ 1,5 mg/kg hai tuần một lần đến 50 mg/kg mỗi tuần được ưu tiên.

Maroteaux-Lamy (MPS VI)

Hội chứng Maroteaux-Lamy (a.k.a. MPS VI) được gây ra bởi sự bất hoạt của alactosamin-4-sulfataza (arylsulfataza B) và tích tụ của dermatan sulfat. Chế độ liều lượng từ 1,5 mg/kg hai tuần một lần đến 50 mg/kg mỗi tuần là một phạm vi được ưu tiên của enzym điều trị hiệu quả được đề xuất bởi ERT. Tối ưu, các lượng được sử dụng nhỏ hơn hoặc bằng 10 mg/kg mỗi tuần. Một dấu hiệu thay thế ưu tiên dành cho sự tiến triển của bệnh MPS VI là mức roteoglycan.

Pompe

Bệnh Pompe được gây ra bởi sự bất hoạt của enzym của axit alpha-glucosidaza và tích tụ glycogen. Các gen axit alpha-glucosidaza nằm trên nhiễm sắc thể số 17 ở người và được chỉ định GAA. H.G. Hers lần đầu tiên đề xuất khái niệm của bệnh tích đọng các chất trong tiêu thể bẩm sinh dựa trên các nghiên cứu của ông về bệnh này, mà ông gọi là bệnh tích đọng glicogen loại II (GSD II) và bây giờ cũng gọi là thiếu hụt axit mantaza (AMD) (xem Hers, 1965, Gastroenterology 48, 625). Trong phương án cụ thể, GAA được dùng 2 tuần một lần như truyền tĩnh mạch với liều 20 mg/kg trọng lượng cơ thể.

Một số xét nghiệm có sẵn để theo dõi tiến triển của bệnh Pompe. Bất kỳ khảo nghiệm được biết đến với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật có thể được sử dụng. Ví dụ, người ta có thể khảo nghiệm để tích tụ nội tiêu

thể của hạt glycogen, cụ thể trong cơ tim, gan và các sợi cơ thu được từ sinh thiết. Hoạt động của enzym alpha-glucosidaza cũng có thể được theo dõi trong các mẫu sinh thiết hoặc các tế bào nuôi cấy được từ máu ngoại vi. Độ cao trong huyết thanh của creatin kinaza (CK) có thể được theo dõi như là một dấu hiệu của sự tiến triển bệnh. Huyết thanh CK có thể được nâng lên đến mười lần ở những bệnh nhân trẻ con khởi phát và thường được nâng lên một mức độ thấp hơn ở những bệnh nhân người lớn khởi phát. Xem Hirschhorn R, 1995, Glycogen Storage Disease Type II: Acid alpha-Glucosidase (Acid Maltase) Deficiency, Trong: The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, Scriver và các đồng tác giả, eds, McGraw-Hill, N.Y., 7sup.th ed., trang 2443-2464.

Liệu pháp thay thế enzym

Các phần sau đây được bộc lộ thông tin cụ thể và những phương án thay thế có sẵn cho các thành phần liệu pháp thay thế enzym của một liệu pháp kết hợp của sáng chế. Nói chung, chế độ liều lượng cho thành phần liệu pháp thay thế enzym của một liệu pháp kết hợp của sáng chế thường được xác định bởi các bác sĩ có trình độ kỹ thuật. Một vài ví dụ về các chế độ liều lượng cho việc điều trị các bệnh Gaucher với glucocerebrosidaza được đề xuất ở trên. Các nguyên tắc chung để xác định một liều lượng cho bất kỳ thành phần ERT nhất định của một liệu pháp kết hợp của sáng chế để điều trị bất kỳ LSD sẽ được rõ ràng để người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực từ các thông tin có sẵn, chẳng hạn như, ví dụ, xem xét lại các tài liệu tham khảo cụ thể được trích dẫn trong các phần cho mỗi LSD cụ thể. ERT có thể được dùng cho bệnh nhân bằng cách truyền tĩnh mạch. Tiêm trong não thất và/hoặc nội tủy mạc có thể được sử dụng (ví dụ, ngoài việc truyền tĩnh mạch) để thực hiện ERT đến một bệnh nhân được chẩn đoán mắc bệnh tích trữ thể tiêu bào có biểu hiện CNS.

Bất kỳ phương pháp được biết đến trong kỹ thuật có thể được sử dụng để sản xuất các enzym được sử dụng trong thành phần liệu pháp thay thế enzym

của liệu pháp kết hợp theo sáng chế. Nhiều phương pháp như vậy được biết đến và bao gồm nhưng không giới hạn ở các công nghệ kích hoạt gen được phát triển bởi Shire plc (xem Bằng sáng chế Hoa Kỳ số 5,968,502 và 5,272,071).

Liệu pháp phân tử nhỏ

Các phần sau đây cũng được bộc lộ cụ thể và những phương án thay thế có sẵn cho các thành phần trị liệu phân tử nhỏ của một liệu pháp kết hợp của sáng chế. Chế độ liều lượng cho thành phần của liệu pháp phân tử nhỏ của một liệu pháp kết hợp theo sáng chế nói chung được xác định bởi các người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật và được dự kiến sẽ thay đổi đáng kể tùy thuộc vào bệnh tích động cụ thể đang được điều trị và tình trạng lâm sàng của bệnh nhân mắc bệnh cụ thể. Các nguyên tắc chung để xác định liều lượng cho thành phần SMT được của bất kỳ liệu pháp kết hợp nào của sáng chế để điều trị bất kỳ bệnh tích động đều được biết đến với các người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật. Hướng dẫn chế độ liều lượng có thể thu được từ bất kỳ các tài liệu tham khảo nổi tiếng nhiều trong kỹ thuật về vấn đề này. Hướng dẫn thêm là có sẵn, ngoài những điều khác, từ việc xem xét các tài liệu tham khảo cụ thể được trích dẫn trong tài liệu này.

Nói chung, các hợp chất theo sáng chế, chẳng hạn như, ví dụ, (S)-Quinuclidin-3-yl (2-(2-(4-flophenyl)thiazol-4-yl)propan-2-yl)carbamate và Quinuclidin-3-yl (2-(4'-flo-[1,1'-biphenyl]-3-yl)propan-2-yl)carbamate có thể được sử dụng trong các phương pháp điều trị kết hợp của sáng chế để điều trị bất kỳ bệnh tích động nào do tổn thương trong quá trình của glycosphingolipit (ví dụ: Gaucher, Fabry, G_{M1}-gangliosidosis và G_{M2}-gangliosidosis (ví dụ, Tay Sachs, Sandhoffs, Thiếu hụt hoạt chất GM2)). Tương tự như vậy, aminoglycosits (ví dụ gentamicin, G418) có thể được sử dụng trong các phương pháp điều trị kết hợp của sáng chế cho bất kỳ cá nhân mắc bệnh tích động có đột biến codon kết thúc sớm (tức là, đột biến vô nghĩa). Các đột biến này là đặc biệt phổ biến trong hội chứng Hurler. Thành phần liệu pháp phân tử nhỏ của một liệu pháp kết hợp của

sáng chế được đặc biệt ưu tiên, nơi có biểu hiện của hệ thần kinh trung ương đến các bệnh tích đọng đang được điều trị (ví dụ, Sandhoff, Tay-Sachs, Niemann-Pick Loại A, và Gaucher loại 2 và 3), vì các phân tử nhỏ thường có thể vượt qua hàng rào máu-não một cách dễ dàng khi so sánh với các phương pháp khác.

Liều lượng được ưu tiên của các chất ức chế chất nền được sử dụng trong một liệu pháp kết hợp của sáng chế được xác định dễ dàng bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực. Trong các phương án nhất định, liều lượng như vậy có thể dao động từ khoảng 0,5 mg/kg đến khoảng 300 mg/kg, tốt hơn từ khoảng 5 mg/kg đến khoảng 60 mg/kg (ví dụ, 5 mg/kg, 10 mg/kg, 15 mg/kg, 20 mg/kg, 25 mg/kg, 30 mg/kg, 35 mg/kg, 40 mg/kg, 45 mg/kg, 50 mg/kg, 55 mg/kg và 60 mg/kg) dùng trong phúc mạc, qua đường uống hoặc tương đương từ một đến năm lần mỗi ngày. Liều lượng như vậy có thể dao động từ khoảng 5 mg/kg đến khoảng 5 g/kg, tốt hơn từ khoảng 10 mg/kg đến khoảng 1 g/kg bằng đường uống, qua phúc mạc hoặc qua cách dùng tương đương từ một đến năm lần mỗi ngày. Trong một phương án, liều lượng từ khoảng 10 mg/ngày đến khoảng 500 mg/ngày (ví dụ, 10 mg/ngày, 20 mg/ngày, 30 mg/ngày, 40 mg/ngày, 50 mg/ngày, 60 mg/ngày, 70 mg/ngày, 80 mg/ngày, 90 mg/ngày, 100 mg/ngày, 110 mg/ngày, 120 mg/ngày, 130 mg/ngày, 140 mg/ngày, 150 mg/ngày, 160 mg/ngày, 170 mg/ngày, 180 mg/ngày, 190 mg/ngày, 200 mg/ngày, 210 mg/ngày, 220 mg/ngày, 230 mg/ngày, 240 mg/ngày, 250 mg/ngày, 260 mg/ngày, 270 mg/ngày, 280 mg/ngày, 290 mg/ngày, 300 mg/ngày). Một loạt liều uống đặc biệt ưu tiên là từ khoảng 50 mg tới khoảng 100 mg, trong đó các liều được dùng hai lần mỗi ngày. Phạm vi liều uống đặc biệt đối với hợp chất của sáng chế hiện nay là từ khoảng 5 mg/kg/ngày đến khoảng 600 mg/kg/ngày. Phạm vi liều uống đặc biệt đối với hợp chất của sáng chế hiện nay là từ khoảng 1 mg/kg/ngày với khoảng 100 mg/kg/ngày, ví dụ, 1 mg/kg/ngày, 5 mg/kg/ngày, 10 mg/kg/ngày, 15 mg/kg/ngày, 20 mg/kg/ngày, 25 mg/kg/ngày, 30 mg/kg/ngày, 35 mg/kg/ngày, 40 mg/kg/ngày, 45 mg/kg/ngày, 50 mg/kg/ngày, 55 mg/kg/ngày hoặc 60 mg/kg/ngày, 65 mg/kg/ngày, 70 mg/kg/ngày, 75 mg/kg/ngày, 80

mg/kg/ngày, 85 mg/kg/ngày, 90 mg/kg/ngày, 95 mg/kg/ngày hoặc 100 mg/kg/ngày.

Việc kết hợp luân phiên của các nền tảng điều trị (tức là, liệu pháp thay thế enzym và liệu pháp phân tử nhỏ) được ưu tiên. Tuy nhiên, đối tượng này cũng có thể được điều trị bằng cách lồng ghép cả hai phương pháp khi cần thiết, như được xác định bởi các bác sĩ có trình độ kỹ thuật. Ví dụ về các lịch trình điều trị có thể bao gồm nhưng không giới hạn: (1) SMT tiếp theo ERT; (2) ERT sau SMT; và (3) ERT và SMT đề xuất tại cùng một thời điểm. Như đã nói trước đây, sự chồng chéo theo thời gian của các nền tảng điều trị tạm thời cũng có thể được thực hiện, khi cần thiết, tùy thuộc vào diễn biến lâm sàng của bệnh tích đọng được đưa ra ở bệnh nhân nhất định.

Khoảng thời gian điều trị cho các liệu pháp kết hợp khác nhau có thể rất khác nhau và thường có thể khác nhau giữa các bệnh tích đọng khác nhau, cá nhân khác nhau tùy thuộc vào cách các sản phẩm tích đọng được tích tụ. Ví dụ, sản phẩm tích đọng tích tụ Fabry có thể được làm chậm so với sản phẩm tích tụ tích đọng nhanh chóng trong Pompe. Chuẩn độ của một bệnh tích đọng cụ thể ở một cá nhân cụ thể được thực hiện bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực bằng cách giám sát các dấu hiệu lâm sàng của tiến triển bệnh và điều trị thành công.

Các đại phân tử khác nhau mà tích tụ trong các bệnh tích trữ thể tiêu bào phân bố không đồng đều, mà thay vào đó chúng được lắng đọng ở vị trí giải phẫu nhất định được ưu tiên cho từng bệnh. Tuy nhiên, enzym ngoại sinh được thường được đưa lên bởi các tế bào của hệ lưới nội mô và được sắp xếp để ngăn tiêu thể, nơi nó hoạt động để thủy phân chất nền được tích tụ. Hơn nữa, sự hấp thu của tế bào đối với enzym điều trị có thể được bổ sung bằng một số thao tác để tăng tiêu thể nhằm mục tiêu (xem ví dụ như bằng sáng chế Hoa Kỳ Số 5,549,892 của Friedman và các đồng tác giả, giao cho công ty Genzyme, trong đó mô tả glucocerebrosidaza tái tổ hợp có vật lý thuốc tới cơ thể được cải thiện

bởi tác dụng của chuỗi bên oligolisacarit được tổ chức lại bởi các thụ thể bề mặt tế bào mannoza được nhập bào và vận chuyển đến tiêu thể).

Một số phương pháp điều trị nhắm vào một số bộ phận cơ thể bị ảnh hưởng tốt hơn những bộ phận khác. Trong Fabry, ví dụ, nếu ERT không đến thận cũng đủ cho một kết quả lâm sàng thỏa đáng, SMT có thể được sử dụng để làm giảm nồng độ chất nền trong thận. Như thể hiện trong ví dụ 112 và Fig. 6B, SMT làm giảm hiệu quả mức Gb3 (tức là, các chất nền tích tụ trong bệnh nhân mắc Fabry) trong nước tiểu của một mô hình chuột Fabry ở mức độ lớn hơn ERT. Thận được cho là nguồn gốc chính của nước tiểu Gb3. Ngược lại, Fig. 6B cho thấy ERT có hiệu quả giảm mức Gb3 trong huyết tương ở mức độ lớn hơn so với SMT. Những kết quả này chứng minh rằng liệu pháp kết hợp của ERT và SMT đưa ra một chiến lược điều trị bổ sung để tận dụng những điểm mạnh và giải quyết những điểm yếu liên quan tới mỗi liệu pháp được thực hiện riêng lẻ. SMT là có thể vượt qua hàng rào máu não BBB, mang lại một cách tiếp cận mạnh mẽ, khi kết hợp với ERT, để điều trị LSD có biểu hiện thần kinh trung ương CNS, chẳng hạn như Niemann Pick Loại A và bệnh Gaucher do thần kinh (nGD). Hơn nữa, việc giảm chất nền của SMT kết hợp với thay thế enzym giải quyết vấn đề tích đọng tại các điểm can thiệp riêng biệt và khác biệt đó có thể nâng cao kết quả lâm sàng.

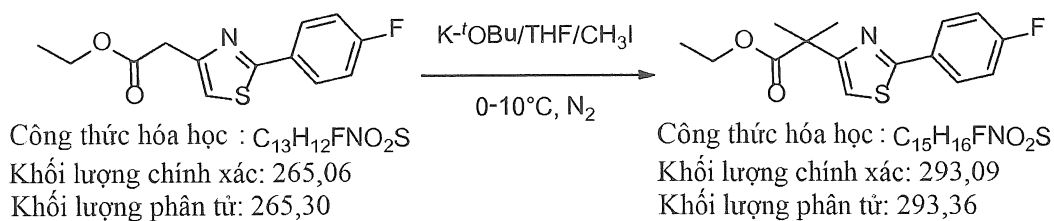
Nó sẽ được hiểu rằng tài liệu tham khảo để thực hiện đồng thời hoặc hai hay nhiều phương pháp điều trị không yêu cầu chúng phải được thực hiện đồng thời tại cùng một thời điểm, chỉ là chúng được diễn xuất trong bệnh nhân cùng một lúc.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1

(S)-Quinuclidin-3-yl (2-(2-(4-flophenyl)thiazol-4-yl)propan-2-yl)carbamate

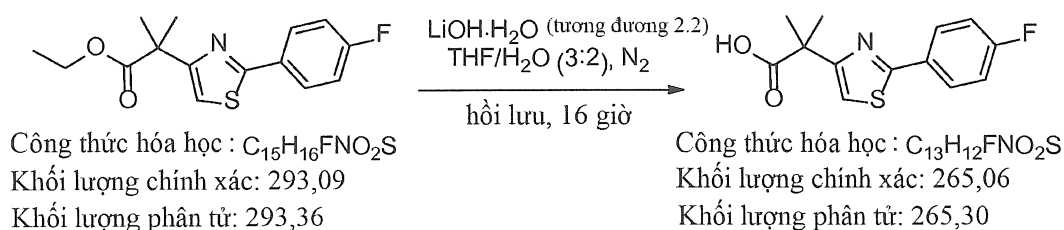
Bước 1: Dimethyl hóa với methyl Iodua



Phương pháp: bình RB 3N được trang bị một nhiệt kế, thêm vào đó là một cái phễu và một ống dẫn nitơ. Các bình được rửa bằng nitơ và kali tert-butoxit (MW 112,21, 75,4 mmol, 8,46 g, 4. 0 equiv, bột màu trắng) được cân ra và thêm vào bình qua bột phễu tiếp theo là việc bổ sung các THF (60 ml). Hầu hết các kali tert-butoxit tan thành dung dịch bị vẩn đục. Hỗn hợp này được làm lạnh trong một chậu nước đá từ 0 đến 2°C (nhiệt độ bên trong phòng). Trong bình tách riêng, đầu tiên cho vào các este (MW 265,3, 18,85 mmol, 5,0 g, 1,0 equiv.) được hòa tan trong THF (18 ml + 2 mL như rửa) và chuyển đến các phễu bổ sung. Dung dịch này đã được thêm từng giọt vào hỗn hợp đã làm lạnh trong khoảng thời gian từ 25 đến 30 phút, giữ nhiệt độ bên trong 5°C trong suốt lúc thêm vào. Hỗn hợp phản ứng được làm lạnh lại từ 0 đến 2°C. Trong bình riêng, dung dịch của metyl iodua (MW 141,94, 47,13 mmol, 6,7 g, 2,5 equiv.) trong THF (6 mL) đã được điều chế và chuyển đến các phễu bổ sung thêm. Bình chứa dung dịch metyl iodua sau đó được rửa sạch với THF (1,5 ml) mà sau đó đã được chuyển đến các phễu bổ sung có chứa sẵn các dung dịch không màu trong của metyl iodua trong THF. Dung dịch này đã được bổ sung cẩn thận từng giọt vào hỗn hợp phản ứng màu nâu tối trong khoảng thời gian từ 30 đến 40 phút, giữ nhiệt độ bên trong luôn dưới 10°C trong suốt thời gian thêm vào. Sau khi việc thêm vào đã hoàn tất, các hỗn hợp hơi đục được khuấy thêm trong vòng 1 giờ trong thời gian đó nhiệt độ bên trong giảm xuống từ 0 đến 5°C. Sau khi khuấy trong một giờ ở 0 đến 5°C, hỗn hợp phản ứng đã được tôi bằng cách thêm từ từ từng giọt dung dịch HCl 5,0M (8 mL) trong khoảng thời gian từ 5 đến 7 phút. Nhiệt độ bên trong nên được duy trì dưới 20°C trong quá trình thêm vào này. Sau khi thêm, nước (14 ml) và hỗn hợp được khuấy trong 2 đến 3 phút. Khi

việc khuấy dừng lại và 2 lớp được tách ra. 2 lớp này sau đó được chuyển đến bình 1N RB 250 mL và THF được bốc hơi *trong chân không* như thu được lớp hai pha của THF/sản phẩm và nước. 2 lớp được tách ra. Dung dịch THF của sản phẩm theo Bước 1 đã được sử dụng trong các phản ứng tiếp theo.

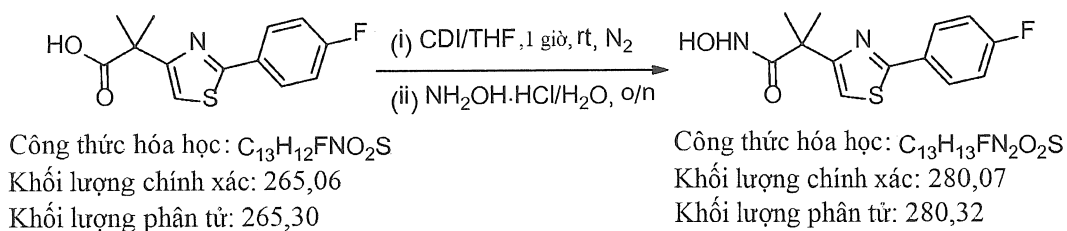
Bước 2: Thủy phân este etyl với LiOH monohydrat



Phương pháp: Các este thô trong THF đã được thêm vào bình phản ứng, Riêng biệt, LiOH.H₂O (MW 41,96, 75,0 mmol, 3,15 gram, 2,2 equiv.) được tách ra và cân trong cốc 100 mL mà một thanh khuấy đã được bổ sung. Nước (40 ml) và hỗn hợp được khuấy đến khi tất cả chất rắn tan ra và có được dung dịch trong không màu. Dung dịch này sau đó đã được thêm vào bình RB 250mL chứa các dung dịch của este trong tetrahydrofuran (THF). Một tụ điện được gắn vào cổ bình và một ống dẫn nitơ được gắn ở phía trên cùng của bình ngưng tụ. Hỗn hợp được gia nhiệt ở hồi lưu trong 16 giờ. Sau 16 giờ, việc gia nhiệt đã dừng lại và hỗn hợp được làm lạnh đến nhiệt độ phòng. THF được bốc hơi trong chân không để thu được dung dịch màu nâu. Phân ước của dung dịch nước màu nâu được phân tích bởi HPLC và LC/MS cho thủy phân hoàn toàn este etyl. Nước (15 ml) đã được bổ sung và dung dịch nước nền này được chiết xuất với TBME (2 x 40 ml) để loại bỏ các t-butyl este. Các lớp nước nền được làm lạnh trong nước đá từ 0 đến 10°C và axit hóa bằng cách thêm từng giọt HCl đặc đến độ pH ~ 1 và khuấy lên. Chất rắn dính trong dung dịch axit nước đã được bổ sung TBME (60 mL) và hỗn hợp được lắc và sau đó khuấy mạnh để hòa tan tất cả axit vào lớp TBME. 2 lớp này được chuyển đến phễu và lớp TBME đã được tách ra. Các dung dịch axit nước màu vàng nhạt được tái chiết với TBME (40

mL) và lớp TBME đã được tách ra và kết hợp với các lớp TBME trước. Lớp axit nước đã được loại bỏ. Các lớp TBME kết hợp được sấy khô bằng Na_2SO_4 khan, được lọc và bốc hơi trong chân không để loại bỏ TBME và có được các axit thô ở dạng dầu màu cam/vàng sẫm đặc lại dưới chân không cao trở thành một chất rắn màu vàng bị bắn. Các axit thô được cân ra và kết tinh bằng cách nung nóng nó trong heptan/TBME (3:1, 5 ml/g dầu thô) để có được các axit là chất rắn màu vàng.

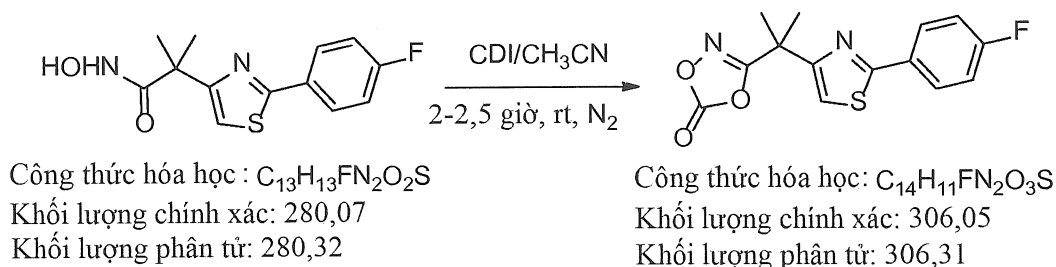
Bước 3: Hình thành các axit hydroxamic với $\text{NH}_2\text{OH}.\text{HCl}$



Phương pháp: Các axit carboxylic (MW 265,3, 18,85 mmol, 5,0 g, 1,0 equiv) được cân và chuyển vào bình RB 1N 25mL dưới nitơ. THF (5,0 ml) được cho vào và các axit dễ dàng hòa tan để dung dịch màu vàng đậm chuyển sang dung dịch màu nâu. Các dung dịch được làm lạnh đến 0 đến 2°C (nhiệt độ của chậu đá) trong chậu đá và N, N'- carbonyldiimidazol (CDI; MW 162,15, 20,74 mmol, 3,36 g, 1,1 equiv) đã được thêm vào từ từ trong các phần nhỏ hơn trong khoảng thời gian từ 10 đến 15 phút. Chậu đá được bỏ ra và dung dịch được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ. Sau một giờ khuấy, các dung dịch một lần nữa được làm lạnh trong một chậu từ 0 đến 2°C (nhiệt độ chậu). Hydroxylamin hydroclorua ($\text{NH}_2\text{OH}.\text{HCl}$; MW 69,49, 37,7 mmol, 2,62 g, 2,0 equiv) đã được thêm vào từ từ trong các phần nhỏ như một chất rắn trong khoảng từ 3 đến 5 phút như dung dịch tỏa nhiệt. Sau khi việc bổ sung đã được hoàn tất, nước (1,0 ml) được thêm từng giọt vào hỗn hợp không đồng nhất trong khoảng thời gian 2 phút và hỗn hợp phản ứng được khuấy ở 0 đến 10°C trong chậu nước đá trong 5 phút. Chậu đá được bỏ ra và hỗn hợp phản ứng được khuấy dưới nitơ ở nhiệt độ

phòng qua đêm từ 20 đến 22 giờ. Các dung dịch chuyển sang dạng trong như tất cả các $\text{NH}_2\text{OH}.\text{HCl}$ hòa tan. Sau 20 đến 22 giờ, phân ước của hỗn hợp phản ứng được phân tích bằng sắc ký lỏng cao áp (HPLC). THF sau đó được bốc hơi trong chân không và phần dư được đưa vào trong diclometan (120 mL) và nước (60 mL). Hỗn hợp này được chuyển đến một phễu, được lắc và 2 lớp được phép tách ra. Lớp nước đã được bỏ đi và lớp diclometan đã được rửa sạch bằng 1N hydroclorua (HCl; 60 mL). Lớp axit đã được bỏ đi. Lớp diclometan được sấy khô bằng Na_2SO_4 khan, được lọc và dung môi được bay hơi *trong chân không* để có được các axit hydroxamic thô như một chất rắn màu vàng nhạt được sấy khô trong chân không cao qua đêm.

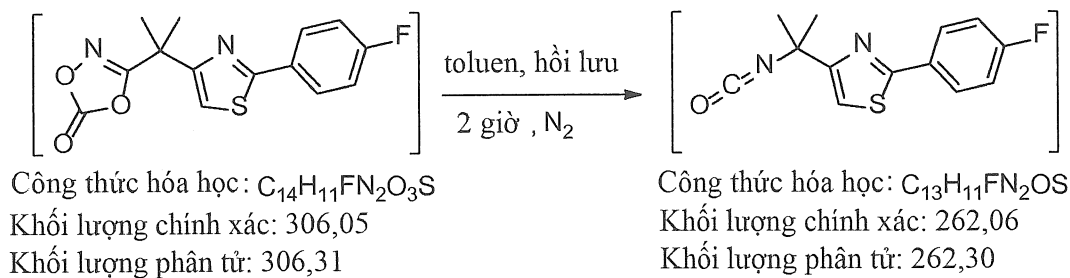
Bước 3 tiếp tục: Chuyển đổi các axit hydroxamic theo chu kỳ trung gian (không bị phân lập)



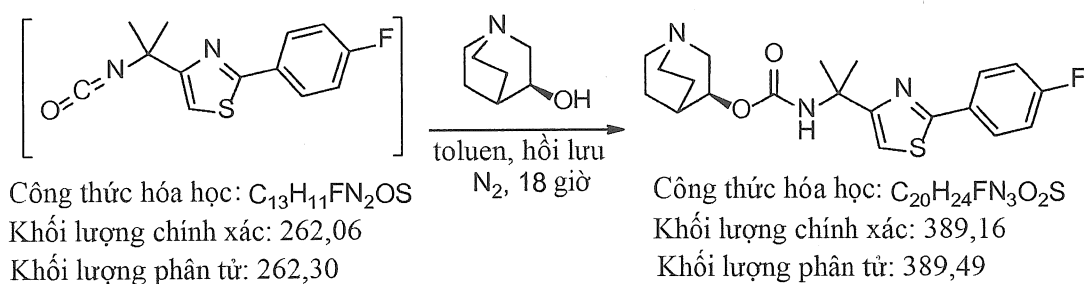
Phương pháp: Các axit hydroxamic thô (MW 280,32, 5,1 g) được chuyển đến một bình 1N RB 250 mL bằng một ống dẫn nitơ. Một thanh khuấy đã được thêm vào sau đó bằng cách bổ sung các axetonitril (50 mL). Chất rắn không hòa tan trong axetonitril. Các hỗn hợp không đồng nhất màu vàng đã được khuấy trong 2 đến 3 phút dưới khí nitơ và CDI (MW 162,15, 20,74 mmol, 3,36 g, 1,1 equiv.) đã được thêm vào trong một phần riêng ở nhiệt độ phòng. Không quan sát thấy phản ứng tỏa nhiệt. Chất rắn hòa tan ngay lập tức và các dung dịch trong màu vàng được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 2 đến 2,5 giờ. Sau 2 đến 2,5 giờ, phân ước đã được phân tích bởi HPLC và LC/MS trong đó cho thấy sự chuyển đổi của các axit hydroxamic thành chu kỳ trung gian như mong muốn.

Các axetonitril sau đó được bốc hơi trong chân không để tạo ra chu kỳ trung gian dạng thô như dầu đặc màu đỏ. Dầu đã được đưa vào trong toluen (60

mL) và hỗn hợp màu đỏ được đun nóng đến hồi lưu trong 2 giờ trong thời gian đó, chu kỳ trung gian thải ra CO₂ và sắp xếp lại các isoxianat (xem bên dưới).



Bước 3 tiếp tục: Chuyển đổi các isoxianat để tạo thành gốc tự do.



Hỗn hợp phản ứng được làm lạnh đến 50 đến 60°C và (*S*)-(+)-quinuclidinol (MW 127,18, 28. 28 mmol, 3,6 g, 1,5 equiv.) đã được thêm vào hỗn hợp như một chất rắn trong từng phần riêng. Hỗn hợp này được lại được đun nóng đến hồi lưu trong 18 giờ. Sau 18 giờ, phân ước đã được phân tích bởi HPLC và LC/MS trong đó cho thấy sự chuyển đổi hoàn toàn của isoxianat để có sản phẩm như mong muốn. Hỗn hợp phản ứng đã được đưa vào một phễu chiết tách và toluen (25 ml) được thêm vào. Hỗn hợp được rửa sạch bằng nước (2 x 40 ml) và các lớp nước được tách ra. Các lớp nước kết hợp được tái chiết với toluen (30 mL) và lớp nước đã được loại bỏ. Các lớp toluen kết hợp được chiết xuất với 1 N HCl (2 x 60 ml) và lớp toluen (có chứa các tạp chất O-acyl) đã được bỏ đi. Các lớp HCl được kết hợp được đưa vào bình Erlenmeyer 500 mL được trang bị với một thanh khuấy. Dung dịch khuấy màu vàng/đỏ cam trong suốt này được bazơ hóa đến độ pH từ 10 đến 12 bằng cách thêm từng giọt dung dịch NaOH 50%. Gốc tự do mong muốn kết tủa khỏi dung dịch dưới dạng chất

rắn màu vàng keo bị vẩn bẩn có thể làm kẹt thanh khuấy. Isopropyl axetat (100 mL) được thêm vào hỗn hợp này và hỗn hợp được khuấy mạnh trong vòng 5 phút cho đến khi chất rắn dẻo chuyển thành isopropyl axetat. Việc khuấy được dừng lại và 2 lớp được phép tách ra. Lớp isopropyl axetat vàng đã được tách ra và lớp nước cơ bản đã được tái chiết với isopropyl axetat (30 mL). Các lớp nước cơ bản đã được bỏ đi và các lớp isopropyl axetat kết hợp được sấy khô bằng Na_2SO_4 , khan được lọc vào bình RB đã được đo trước và các dung môi bay hơi *trong chân không* để có được gốc tự do như chất rắn từ màu be sang màu nâu vàng đỏ được sấy khô ở chân không cao qua đêm.

Bước 3 tiếp tục: Sự kết tinh của các gốc tự do dạng thô

Gốc tự do thô màu be chuyển sang màu nâu vàng và tái kết tinh từ heptan/isopropyl axetat (3:1, 9,0 ml dung môi/gốc tự do dạng thô). Lượng heptan/isopropyl axetat thích hợp được thêm vào gốc tự do dạng thô này cùng với một thanh khuấy và các hỗn hợp được nung nóng đến hồi lưu cho 10 phút (gốc tự do ban đầu chỉ hòa tan một phần, nhưng tan dần để tạo thành dung dịch màu đỏ cam trong khi đun nóng đến hồi lưu). Các nguồn nhiệt đã được tháo ra và hỗn hợp được cho phép làm lạnh đến nhiệt độ phòng và khuấy cho đến khi hình thành kết tủa trắng. Sau khi khuấy ở nhiệt độ phòng trong 3 đến 4 giờ, kết tủa được lọc dưới ống chân không bằng cách dùng phễu Buchner, rửa sạch với heptan (20 mL) và làm khô dưới ống chân không qua đêm trên phễu Buchner. Chất kết tủa được đưa vào đĩa kết tinh và sấy khô ở 55°C qua đêm trong lò chân không. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8,04-7,83 (m, 2H), 7,20-6,99 (m, 3H), 5,53 (s, 1H), 4,73-4,55 (m, 1H), 3,18 (dd, $J = 14,5, 8,4$ Hz, 1H), 3,05-2,19 (m, 5H), 2,0-1,76 (m, 11H). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 166,38, 165,02, 162,54, 162,8-155,0 (d, CF), 130,06, 128,43, 128,34, 116,01, 115,79, 112,46, 71,18, 55,70, 54,13, 47,42, 46,52, 27,94, 25,41, 24,67, 19,58.

Ví dụ 2

Hợp chất (S)-Quinuclidin-3-yl (2-(2-(4-flophenyl)thiazol-4-yl)propan-2-yl)carbammat malat ở dạng tinh thể A

Các gốc tự do của hợp chất (S)-Quinuclidin-3-yl (2-(2-(4-flophenyl)thiazol-4-yl)propan-2-yl)carbammat (20 g) được hòa tan trong IPA (140 ml) tại nhiệt độ phòng và được lọc. Chất lọc được thêm vào bình rb 1L được trang bị một máy khuấy trên không và nitơ ở đầu vào/đầu ra. Axit L-malic (6,89 g) được hòa tan trong IPA (100 + 30 ml) ở nhiệt độ phòng và được lọc. Phần lọc được thêm vào bình 1 lít trên. Các dung dịch kết quả được khuấy ở nhiệt độ phòng (có hoặc không có hạt giống) dưới nitơ trong 4 đến 24 giờ. Trong khoảng thời gian này tinh thể được cho vào. Sản phẩm đã được thu bằng cách lọc và rửa sạch với một lượng nhỏ IPA (30 ml). Chất rắn được làm khô trong lò chân không ở 55° C trong 72 giờ (sản lượng thu được là 23 g).

^1H NMR CDCl_3

δ (ppm)	Sự phân tách	Tích phân	Thiết lập
7.9	m	2	Ha
7.1	m	3	Hb, Hc
5.9	br s	1	NH
4.9	m	1	Hd
4.2	m	1	Ha'
3.1-3.6	m	6	He
2.7	m	2	Hb'
1.6-2.4	m	11	Hf, $(\text{CH}_3)_2$

Ví dụ 3

Muối HCl của hợp chất (S)-Quinuclidin-3-yl (2-(2-(4-flophenyl)thiazol-4-yl)propan-2-yl)carbammat

Hợp chất (S)-Quinuclidin-3-yl (2-(2-(4-flophenyl)thiazol-4-yl)propan-2-yl)carbammat (0,78 g, 2 mmmol) trong IPA (8 ml) được khuấy tại nhiệt độ phòng, HCl (2 M trong IPA, 1 ml) đã được thêm vào. Dung dịch đã được gieo và khuấy

ở nhiệt độ phòng trong 18 giờ. Sản phẩm thu được bằng cách lọc và sấy khô dưới chân không thành sản phẩm (0,7 g). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 12. (br, s, 1H), 7,9-8,0 (m, 2H), 7,1-7,2 (m, 3H), 5. 9 (br, s, 1H), 4,9-5,0 (m, 1H), 3. 2 - 3. 6 (m, 6H), 1,7-2,4 (m, 11H).

Ví dụ 3

Muối (S)-2-hydroxysuccinat của hợp chất (S)-Quinuclidin-3-yl (2-(2-(4-flophenyl)thiazol-4-yl)propan-2-yl)carbamát

Axit succinic (0,15 g) được hòa tan trong IPA (5 ml) và khuấy ở 50°C . Hợp chất (S)-Quinuclidin-3-yl (2-(2-(4-flophenyl)thiazol-4-yl)propan-2-yl)carbamát (0,5 g) trong IPA (8 ml) đã được thêm vào. Dung dịch được gieo và khuấy ở nhiệt độ phòng trong 20 giờ. Sản phẩm thu được bằng cách lọc và sấy khô dưới chân không để có sản phẩm (0,4 g). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7,9 (m, 2H), 7,1-7,2 (m, 3H), 5,8 (br, s, 1H), 4,9 (m, 1H), 3,1-3,5 (m, 6H) 2,6 (s, 4H), 1,7-2,4 (m, 11H).

Yêu cầu bảo hộ

1. Hợp chất (S)-quinuclidin-3-yl (2-(2-(4-flophenyl)thiazol-4-yl)propan-2-yl)carbamate malat ở dạng tinh thể A, trong đó nhiễu xạ bột tia X này chứa các đỉnh 2-theta kế tiếp được đo bằng cách sử dụng bức xạ CuK_α : 18,095.
2. Hợp chất (S)-quinuclidin-3-yl (2-(2-(4-flophenyl)thiazol-4-yl)propan-2-yl)carbamate malat ở dạng tinh thể A, trong đó nhiễu xạ bột tia X này chứa các đỉnh 2-theta kế tiếp đo bằng cách sử dụng bức xạ CuK_α : 18,095 và 17,493.
3. Hợp chất (S)-quinuclidin-3-yl (2-(2-(4-flophenyl)thiazol-4-yl)propan-2-yl)carbamate malat ở dạng tinh thể A, trong đó nhiễu xạ bột tia X này chứa các đỉnh 2-theta kế tiếp được đo bằng cách sử dụng bức xạ CuK_α : 18,095 và 19,516.
4. Hợp chất (S)-quinuclidin-3-yl (2-(2-(4-flophenyl)thiazol-4-yl)propan-2-yl)carbamate malat ở dạng tinh thể A, trong đó nhiễu xạ bột tia X nói trên chứa các đỉnh 2-theta kế tiếp được đo bằng cách sử dụng bức xạ CuK_α : 18,095, 17,493 và 19,516.
5. Hợp chất (S)-quinuclidin-3-yl (2-(2-(4-flophenyl)thiazol-4-yl)propan-2-yl)carbamate malat ở dạng tinh thể A, trong đó nhiễu xạ bột tia X này chứa các đỉnh 2-theta kế tiếp được đo bằng cách sử dụng bức xạ CuK_α : 18,095, 17,493, 19,516 và 20,088.
6. Hợp chất (S)-quinuclidin-3-yl (2-(2-(4-flophenyl)thiazol-4-yl)propan-2-yl)carbamate malat ở dạng tinh thể A, trong đó nhiễu xạ bột tia X này chứa các đỉnh 2-theta kế tiếp được đo bằng cách sử dụng bức xạ CuK_α : 18,095, 17,493, 19,516 và 20,088 và 17,125.

Fig 1

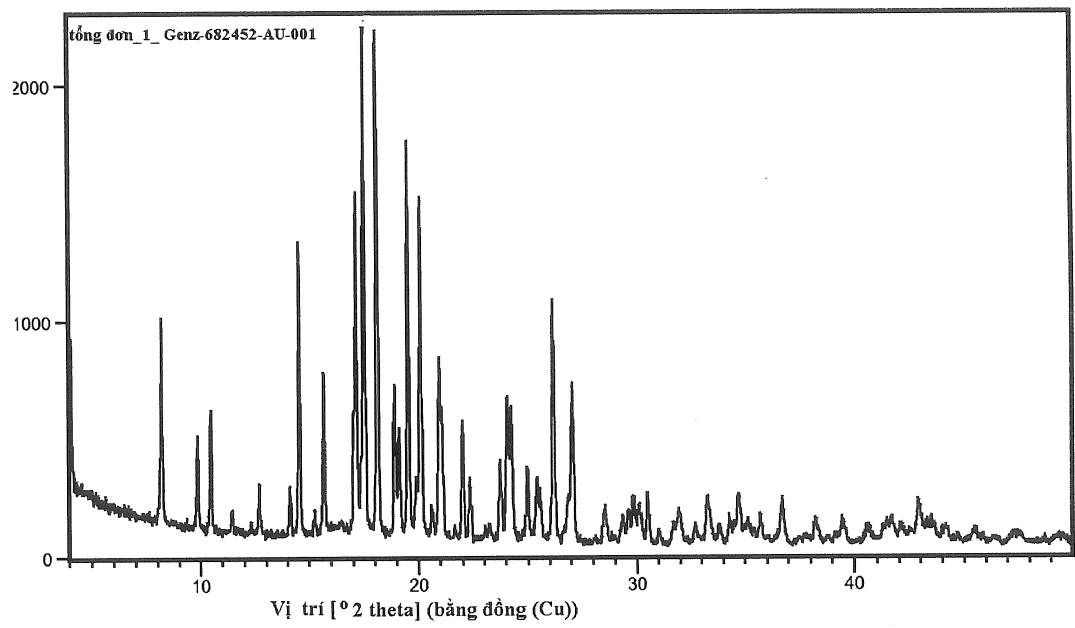


Fig 2

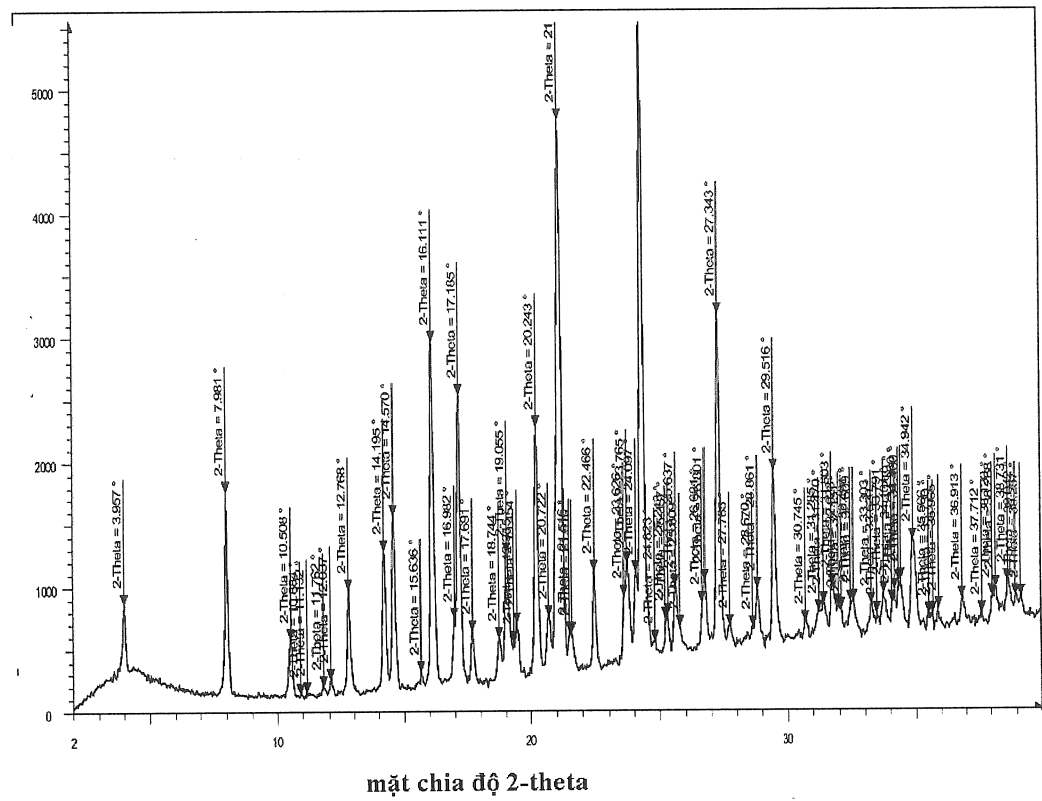


Fig 3

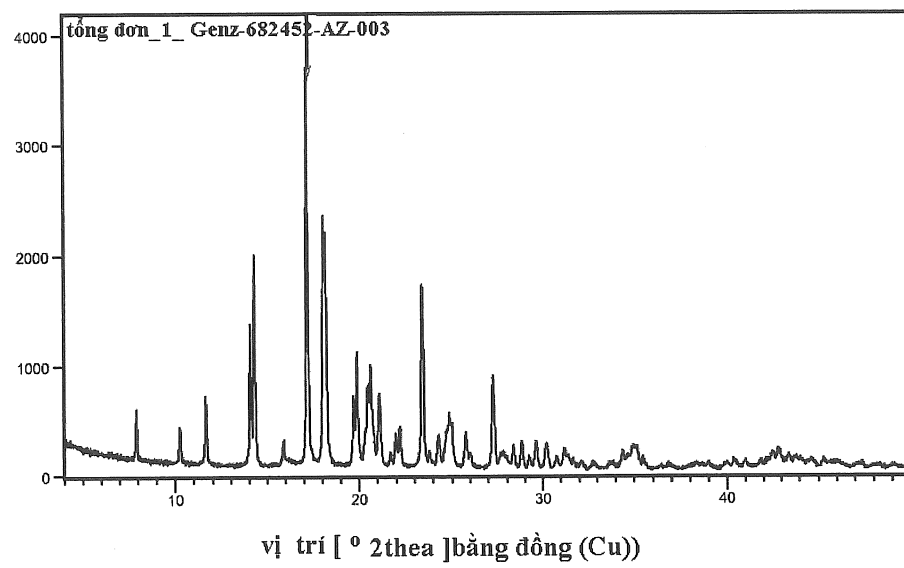


Fig 4

