



(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)

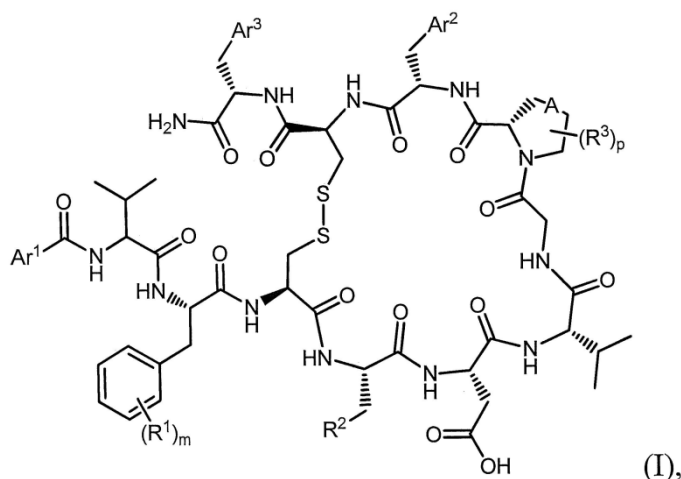


1-0031009

(51)⁸ C07D 513/04; C07K 7/64; A61K 38/12; (13) B
A61P 25/06

- (21) 1-2017-02561 (22) 06/01/2016
(86) PCT/EP2016/050110 06/01/2016 (87) WO2016/110499 14/07/2016
(30) 62/100,371 06/01/2015 US
(45) 25/02/2022 407 (43) 25/10/2017 355A
(73) FERRING B.V. (NL)
Polaris Avenue 144, 2132 JX Hoofddorp, The Netherlands
(72) WISNIEWSKI, Kazimierz (US); JIANG, Guangcheng (US); RABINOVICH,
Aleksandr, K (US); SUEIRAS-DIAZ, Javier, J (US).
(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

- (54) HỢP CHẤT PEPTIT ĐỐI KHÁNG PEPTIT LIÊN QUAN ĐẾN GEN
CANXITONIN (CGRP) VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA HỢP CHẤT NÀY
(57) Sáng chế đề cập đến các hợp chất có công thức (I) hoặc muối dược dụng của chúng:



trong đó m, p, A, Ar¹, Ar², Ar³, R¹, R², và R³ được xác định trong bản mô tả. Các hợp chất có công thức (I) có thể được dùng làm chất đối kháng CGRP và có thể dùng để điều trị chứng đau nửa đầu. Sáng chế cũng đề cập đến dược phẩm chứa các hợp chất này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến các peptit đối kháng CGRP, cũng như các chế phẩm và phương pháp liên quan.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Chứng đau nửa đầu là tình trạng suy nhược đặc trưng bởi sự tấn công lặp đi lặp lại của các cơn đau nhói đầu thường nghiêm trọng, thường kèm với buồn nôn và mẫn cảm với ánh sáng và âm thanh. Chứng đau nửa đầu thường được báo trước bởi triệu chứng thần kinh cục bộ gọi là tiền triệu. Chế độ chăm sóc chuẩn hiện có để điều trị chứng đau nửa đầu là sử dụng các thuốc thuộc nhóm triptan. Tuy nhiên, khoảng 30% số bệnh nhân không giảm đau khi dùng triptan. Ngoài ra, các triptan bị chống chỉ định ở các bệnh nhân đau nửa đầu có nguy cơ bệnh tim mạch cao (ví dụ, tiểu đường, béo phì, và tăng cholesterol huyết). Do đó, vẫn còn nhu cầu về mô hình điều trị mới để điều trị chứng đau nửa đầu.

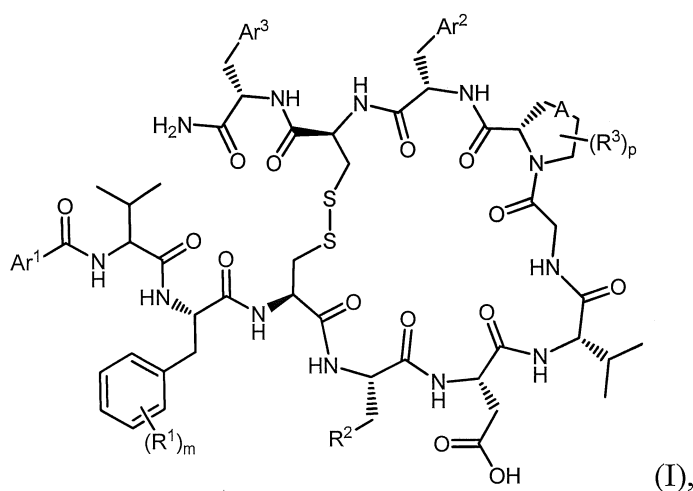
Peptit liên quan đến gen canxitonin (Calcitonin gene related peptit - CGRP) là một peptit gồm 37 axit amin, thu được từ việc cắt nối luân phiên gen canxitonin. CGRP có liên quan đến nhiều tình trạng sinh lý và bệnh lý. Đã phát hiện rằng các peptit cắt cụt (ví dụ, CGRP(8-37) hoặc CGRP(27-37)) có thể hoạt động làm chất đối kháng thụ thể CGRP. Các peptit này hữu dụng làm công cụ nghiên cứu, nhưng các peptit như vậy không được theo đuổi trong các thử nghiệm lâm sàng. Các nỗ lực khám phá thuốc mới tập trung vào các phân tử nhỏ không phải peptit tạo ra một số hợp chất mà có lợi trong phát triển lâm sàng, như olcegepant và telcagepant. Dù có tính hữu hiệu rõ ràng trong điều trị chứng đau nửa đầu, các chương trình này đều bị ngừng, chủ yếu là do các quan ngại về tính độc gan. Gần đây hơn, các nỗ lực khám phá thuốc mới hướng đến con đường CGRP cho chứng đau nửa đầu đã lại tập trung vào các kháng thể đơn dòng kháng CGRP hoặc thụ thể của nó.

Thụ thể CGRP là bảy vùng thụ thể giống canxitonin (CLR - calcitonin like receptor) trong phức hợp với peptit điều biến hoạt tính thụ thể 1 (RAMP1 - Receptor Activity Modulating Peptide 1). Ngoài thụ thể CGRP, CGRP cũng hoạt hóa các thụ thể

adrenomedullin (AM) AM1 và AM2 (lần lượt là CLR+RAMP2 và CLR+RAMP3) ở nồng độ cao hơn. Các thụ thể AM được cho là có ảnh hưởng đến chức năng sinh sản; tim mạch và thận; các tình trạng viêm và các tình trạng khác. Chất đối kháng CGRP-R chọn lọc với hoạt tính ở các thụ thể AM giảm có thể làm giảm nguy cơ biến cố bất lợi phá vỡ sự truyền tín hiệu AM.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Theo một khía cạnh, bản mô tả bộc lộ hợp chất có công thức (I) hoặc muối của nó:



trong đó m là 0, 1, 2, 3, 4, hoặc 5; p là 0, 1, 2, hoặc 3; A là liên kết cacbon-cacbon đơn hoặc đôi; Ar¹ là aryl hoặc heteroaryl 5 hoặc 6 cạnh, mỗi nhóm này tùy ý được thế bằng một hoặc nhiều phần tử thế, mỗi phần tử thế độc lập là halogen, nitro, C₁-C₄ alkyl, C₁-C₄ hydroxyalkyl, OR_a, hoặc N(R_aR_{a'}), trong đó mỗi R_a, độc lập, là H hoặc C₁-C₄ alkyl và mỗi R_{a'}, độc lập, là H hoặc C₁-C₄ alkyl; Ar² là aryl hoặc heteroaryl 5 hoặc 6 cạnh, mỗi nhóm này tùy ý được thế bằng một hoặc nhiều phần tử thế, mỗi phần tử thế độc lập là halogen, xyano, nitro, C₁-C₄ alkyl, C₁-C₄ aminoalkyl, C₁-C₄ hydroxyalkyl, OR_b, N(R_bR_{b'}), C(O)-N(R_bR_{b'}), hoặc NH-C(O)-N(R_bR_{b'}), trong đó mỗi R_b, độc lập, là H hoặc C₁-C₄ alkyl và mỗi R_{b'}, độc lập, là H hoặc C₁-C₄ alkyl; Ar³ là aryl hoặc heteroaryl 5 hoặc 6 cạnh, mỗi nhóm này tùy ý được thế bằng một hoặc nhiều phần tử thế, mỗi phần tử thế độc lập là halogen, C₁-C₄ alkyl, C₁-C₄ hydroxyalkyl, OR_c, hoặc N(R_cR_{c'}), trong đó mỗi R_c, độc lập, là H hoặc C₁-C₄ alkyl và mỗi R_{c'}, độc lập, là H hoặc C₁-C₄ alkyl; mỗi R¹ độc lập là C₁-C₄ alkyl, C₁-C₄ aminoalkyl, C₁-C₄ hydroxyalkyl, OR_d, hoặc C(O)-N(R_dR_{d'}), trong đó mỗi R_d độc lập là H hoặc C₁-C₄ alkyl và mỗi R_{d'}, độc lập, là

H hoặc C₁-C₄ alkyl; R² là -(CH₂)_n-R, trong đó n là 0, 1, 2, hoặc 3 và R là guanidino, aminoaxyl, C₁-C₄ alkylaminoaxyl, OR_e, N(R_eR_{e'}), NH-C(O)-CH(NH₂)-(CH₂)₄-N(R_eR_{e'}), NH-C(O)-CH₂-(OCH₂CH₂)₂-N(R_eR_{e'}) được thế hoặc không được thế, hoặc heteroxycloalkyl 5 cạnh tùy ý được thế bằng C₁-C₄ alkyl hoặc N(R_eR_{e'}), trong đó mỗi R_e, độc lập, là H hoặc C₁-C₄ alkyl và mỗi R_{e'}, độc lập, là H hoặc C₁-C₄ alkyl; và mỗi R³, độc lập, là halogen, C₁-C₄ alkyl, hoặc OR_f, trong đó mỗi R_f, độc lập, là H hoặc C₁-C₄ alkyl; với điều kiện là, nếu n là 0, R không phải là amino hoặc guanidino và nếu gốc axit amin liên kết với Ar¹C(O) là L-Val, Ar¹ không phải là phenyl không được thế.

Theo khía cạnh khác, bản mô tả bộc lộ được phẩm chất chứa hợp chất có công thức (I) được mô tả trong bản mô tả và chất mang được dụng.

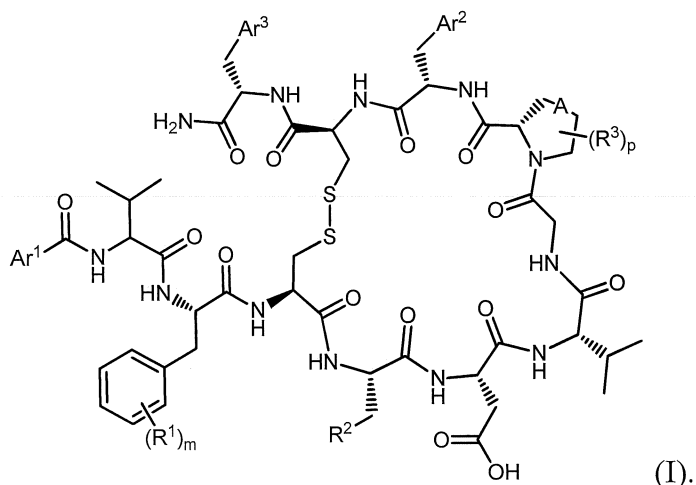
Theo một phương án khác nữa, bản mô tả bộc lộ phương pháp điều trị chứng đau nửa đầu bao gồm việc cho bệnh nhân cần điều trị sử dụng lượng hữu hiệu được phẩm được mô tả trong bản mô tả.

Các đặc điểm, đối tượng, và ưu điểm của sáng chế sẽ trở nên rõ ràng qua phần mô tả và các yêu cầu bảo hộ.

Mô tả chi tiết sáng chế

Bản mô tả bộc lộ chung đến các peptit đối kháng CGRP và việc sử dụng chúng để điều trị chứng đau nửa đầu. Cụ thể, bản mô tả dựa trên khám phá bất ngờ rằng các peptit nhất định là các chất đối kháng CGRP mà thể hiện hiệu lực cải thiện đối với thụ thể CGRP, và có thể được sử dụng hữu hiệu để điều trị chứng đau nửa đầu. Theo các phương án nhất định, các peptit đối kháng CGRP chọn lọc đối với thụ thể CGRP hơn so với thụ thể AM2. Theo các phương án nhất định, các peptit đối kháng CGRP có độ tan cải thiện. Theo các phương án nhất định, các peptit đối kháng CGRP có độ sinh khả dụng cải thiện.

Theo một số phương án, các peptit đối kháng CGRP được mô tả trong bản mô tả là các chất có công thức (I) hoặc muối được dụng của chúng:



Trong công thức (I), m là 0, 1, 2, 3, 4, hoặc 5; p là 0, 1, 2, hoặc 3; A là liên kết cacbon-cacbon đơn hoặc đôi; Ar¹ là aryl hoặc heteroaryl 5 hoặc 6 cạnh, mỗi nhóm này tùy ý được thế bằng một hoặc nhiều phần tử thế, mỗi phần tử thế độc lập là halogen (ví dụ, F, Cl, Br, hoặc I), nitro, C₁-C₄ alkyl, C₁-C₄ hydroxyalkyl (ví dụ, CH₂OH), OR_a, hoặc N(R_aR_{a'}), trong đó mỗi R_a, độc lập, là H hoặc C₁-C₄ alkyl và mỗi R_{a'}, độc lập, là H hoặc C₁-C₄ alkyl; Ar² là aryl hoặc heteroaryl 5 hoặc 6 cạnh, mỗi nhóm này tùy ý được thế bằng một hoặc nhiều phần tử thế, mỗi phần tử thế độc lập là halogen, xyano, nitro, C₁-C₄ alkyl, C₁-C₄ aminoalkyl (ví dụ, CH₂NH₂), C₁-C₄ hydroxyalkyl, OR_b, N(R_bR_{b'}), C(O)-N(R_bR_{b'}), hoặc NH-C(O)-N(R_bR_{b'}), trong đó mỗi R_b, độc lập, là H hoặc C₁-C₄ alkyl và mỗi R_{b'}, độc lập, là H hoặc C₁-C₄ alkyl; Ar³ là aryl hoặc heteroaryl 5 hoặc 6 cạnh, mỗi nhóm này tùy ý được thế bằng một hoặc nhiều phần tử thế, mỗi phần tử thế độc lập là halogen, C₁-C₄ alkyl, C₁-C₄ hydroxyalkyl, OR_c, hoặc N(R_cR_{c'}), trong đó mỗi R_c, độc lập, là H hoặc C₁-C₄ alkyl và mỗi R_{c'}, độc lập, là H hoặc C₁-C₄ alkyl; mỗi R¹, độc lập, là C₁-C₄ alkyl, C₁-C₄ aminoalkyl, C₁-C₄ hydroxyalkyl, OR_d, hoặc C(O)-N(R_dR_{d'}), trong đó mỗi R_d, độc lập, là H hoặc C₁-C₄ alkyl và mỗi R_{d'}, độc lập, là H hoặc C₁-C₄ alkyl; R² là -(CH₂)_n-R, trong đó n là 0, 1, 2, hoặc 3 và R là guanidino, aminoaxyl (tức là, C(O)NH₂), C₁-C₄ alkylaminoaxyl (ví dụ, C(O)NHCH₃), OR_e, N(R_eR_{e'}), NH-C(O)-CH(NH₂)-(CH₂)₄-N(R_eR_{e'}), NH-C(O)-CH₂-(OCH₂CH₂)₂-N(R_eR_{e'}) được thế hoặc không được thế, hoặc heteroxycloalkyl 5 cạnh tùy ý được thế bằng C₁-C₄ alkyl hoặc N(R_eR_{e'}), trong đó mỗi R_e, độc lập, là H hoặc C₁-C₄ alkyl và mỗi R_{e'}, độc lập, là H hoặc C₁-C₄ alkyl; và mỗi R³, độc lập, là halogen, C₁-C₄ alkyl, hoặc OR_f, trong đó mỗi R_f, độc lập, là H hoặc C₁-C₄ alkyl; với điều kiện là, nếu n là 0, R không

phải là amino hoặc guanidino và nếu gốc axit amin liên kết với $\text{Ar}^1\text{C}(\text{O})$ là L-Val, Ar^1 không phải là phenyl không được thế.

Thuật ngữ “alkyl” chỉ gốc hydrocarbon no, mạch thẳng hoặc mạch nhánh, như $-\text{CH}_3$ hoặc $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$. Thuật ngữ “xycloalkyl” chỉ gốc hydrocarbon no, mạch vòng, như xyclohexyl. Thuật ngữ “heteroxycloalkyl” chỉ gốc no, mạch vòng có ít nhất một nguyên tử khác loại trong vòng (ví dụ, N, O, hoặc S), như 4-tetrahydropyranyl. Thuật ngữ “aryl” chỉ gốc hydrocarbon có một hoặc nhiều vòng thơm. Ví dụ về các gốc aryl bao gồm phenyl (Ph), phenylen, naphtyl, naphtylen, pyrenyl, anthryl, và phenanthryl. Thuật ngữ “heteroaryl” chỉ gốc có một hoặc nhiều vòng thơm mà chứa ít nhất một nguyên tử khác loại (ví dụ, N, O, hoặc S). Ví dụ về các gốc heteroaryl bao gồm furyl, furylen, fluorenyl, pyrrolyl, thienyl, oxazolyl, imidazolyl, thiazolyl, pyridinyl, pyrimidinyl, quinazolinyl, quinolyl, isoquinolyl và indolyl.

Theo một số phương án, gốc axit amin liên kết với $\text{Ar}^1\text{C}(\text{O})$ có thể là D-Val.

Theo một số phương án, Ar^1 có thể là phenyl, pyridinyl, oxazolyl, thiazolyl, imidazolyl, pyrimidinyl, pyrrolyl, hoặc triazolyl, mỗi nhóm này tùy ý được thế bằng một hoặc nhiều phần tử thế, như F, Cl, NO_2 , CH_3 , CH_2OH , hoặc NH_2 .

Theo một số phương án, Ar^2 có thể là phenyl hoặc pyridinyl, mỗi nhóm này tùy ý được thế bằng một hoặc nhiều phần tử thế, như CH_2NH_2 , $\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$, OH, CN, CH_2OH , NH_2 , hoặc $\text{NH}-\text{C}(\text{O})-\text{NH}_2$.

Theo một số phương án, Ar^3 có thể là pyridinyl.

Theo một số phương án, R^1 có thể là OH, $\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$, hoặc CH_2NH_2 . Theo các phương án như vậy, m trong công thức (I) có thể là 1.

Theo một số phương án, n trong R^2 trong công thức (I) có thể là 0, 1, hoặc 2.

Theo một số phương án, R có thể là $\text{N}(\text{R}_e\text{R}_{e'})$, $\text{NH}-\text{C}(\text{O})-\text{CH}(\text{NH}_2)-(\text{CH}_2)_4-\text{N}(\text{R}_e\text{R}_{e'})$, $\text{NH}-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_2-\text{N}(\text{R}_e\text{R}_{e'})$, triazolyl tùy ý được thế bằng NH_2 , hoặc guanidino tùy ý được thế bằng CN hoặc CH_3 , trong đó mỗi R_e , độc lập, là H hoặc $\text{C}_1\text{-C}_3$ alkyl và mỗi $\text{R}_{e'}$, độc lập, là H hoặc $\text{C}_1\text{-C}_3$ alkyl. Chẳng hạn, R có thể là NH_2 , $\text{N}(\text{CH}_3)_2$, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$, $\text{NH}(\text{CH}(\text{CH}_3)_2)$, $\text{NH}-\text{C}(\text{O})-\text{CH}(\text{NH}_2)-(\text{CH}_2)_4-\text{N}(\text{CH}_3)_2$, $\text{NH}-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_2-\text{NH}_2$, $\text{NH}-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_2-\text{NH}(\text{CH}(\text{CH}_3)_2)$, 3-amino-1,2,4-triazol-5-yl, hoặc guanidino tùy ý được thế bằng CN hoặc CH_3 .

Theo một số phương án, p trong công thức (I) là 0.

Ví dụ về các hợp chất có công thức (I) (tức là, hợp chất 1-70) bao gồm các hợp chất được liệt kê trong Bảng 1 sau đây.

Bảng 1

Hợp chất #	Nhận dạng trình tự
1	Bz(4-F)-D-Val-Tyr-c(Cys-Arg-Asp-Val-Gly-Pro-Phe-Cys)-3Pal-NH ₂
2	Bz(4-F)-D-Val-Tyr-c(Cys-Arg-Asp-Val-Gly-Pro-3Pal-Cys)-3Pal-NH ₂
3	Picolinoyl-D-Val-Tyr-c(Cys-Arg-Asp-Val-Gly-Pro-3Pal-Cys)-3Pal-NH ₂
4	Bz(4-F)-D-Val-Tyr-c(Cys-Arg-Asp-Val-Gly-Dhp-Phe-Cys)-3Pal-NH ₂
5	Bz(4-F)-D-Val-Tyr-c(Cys-Arg-Asp-Val-Gly-Pro-Phe(3-CH ₂ NH ₂)-Cys)-3Pal-NH ₂
6	Bz(4-F)-D-Val-Tyr-c(Cys-Dpr-Asp-Val-Gly-Pro-Phe(3-Cbm)-Cys)-3Pal-NH ₂
7	Bz(4-F)-D-Val-Tyr-c(Cys-Dpr-Asp-Val-Gly-Pro-Tyr-Cys)-3Pal-NH ₂
8	Picolinoyl-D-Val-Tyr-c(Cys-Dab(Et ₂)-Asp-Val-Gly-Pro-Phe-Cys)-3Pal-NH ₂
9	Picolinoyl-D-Val-Tyr-c(Cys-Dab(iPr)-Asp-Val-Gly-Pro-Phe-Cys)-3Pal-NH ₂
10	Picolinoyl-D-Val-Tyr-c(Cys-Dpr(CO-CH ₂ -(O-(CH ₂) ₂) ₂ -NH ₂)-Asp-Val-Gly-Pro-Phe-Cys)-3Pal-NH ₂
11	Oxazol-2-carbonyl-D-Val-Tyr-c(Cys-Arg-Asp-Val-Gly-Pro-3Pal-Cys)-3Pal-NH ₂
12	Picolinoyl(5-F)-D-Val-Tyr-c(Cys-Orn-Asp-Val-Gly-Pro-Phe-Cys)-3Pal-NH ₂
13	Picolinoyl(5-F)-D-Val-Tyr-c(Cys-Orn(CO-CH ₂ -(O-(CH ₂) ₂) ₂ -NH-iPr)-Asp-Val-Gly-Pro-Phe-Cys)-3Pal-NH ₂
14	Picolinoyl(5-F)-D-Val-Tyr-c(Cys-Orn(iPr)-Asp-Val-Gly-Pro-Phe-Cys)-3Pal-NH ₂
15	Bz(4-F)-D-Val-Phe(2-Cbm)-c(Cys-Arg-Asp-Val-Gly-Pro-Phe-Cys)-3Pal-NH ₂
16	Pyrimidine-4-carbonyl-D-Val-Tyr-c(Cys-Arg-Asp-Val-Gly-Pro-Phe-Cys)-3Pal-NH ₂
17	Picolinoyl(3-F)-D-Val-Tyr-c(Cys-Arg-Asp-Val-Gly-Pro-Phe-Cys)-3Pal-NH ₂
18	Picolinoyl(4-F)-D-Val-Tyr-c(Cys-Arg-Asp-Val-Gly-Pro-Phe-Cys)-3Pal-NH ₂

19	Bz(4-F)-D-Val-Tyr-c(Cys-norArg(CN)-Asp-Val-Gly-Pro-Phe-Cys)-3Pal-NH ₂
20	Bz(4-F)-D-Val-Tyr-c(Cys-Arg-Asp-Val-Gly-Pro-Phe(4-CH ₂ NH ₂)-Cys)-3Pal-NH ₂
21	Bz(4-F)-D-Val-Tyr-c(Cys-Arg-Asp-Val-Gly-Pro-Phe(3-CN)-Cys)-3Pal-NH ₂
22	Bz(4-F)-D-Val-Phe(3-CH ₂ NH ₂)-c(Cys-Arg-Asp-Val-Gly-Dhp-Tyr-Cys)-3Pal-NH ₂
23	Oxazol-2-carbonyl-D-Val-Phe(3-CH ₂ NH ₂)-c(Cys-Arg-Asp-Val-Gly-Dhp-Phe(3-Cbm)-Cys)-3Pal-NH ₂
24	Picolinoyl-D-Val-Tyr-c(Cys-Orn(Et ₂)-Asp-Val-Gly-Pro-Phe-Cys)-3Pal-NH ₂
25	Picolinoyl-D-Val-Tyr-c(Cys-Orn-Asp-Val-Gly-Pro-Phe(4-CH ₂ OH)-Cys)-3Pal-NH ₂
26	Picolinoyl-D-Val-Tyr-c(Cys-Arg(CN)-Asp-Val-Gly-Pro-Phe-Cys)-3Pal-NH ₂
27	Picolinoyl-D-Val-Tyr-c(Cys-Orn(Atz)-Asp-Val-Gly-Pro-Phe-Cys)-3Pal-NH ₂
28	Picolinoyl-D-Val-Tyr-c(Cys-Arg(Me)-Asp-Val-Gly-Pro-Phe-Cys)-3Pal-NH ₂
29	Picolinoyl(3-F)-D-Val-Tyr-c(Cys-Orn-Asp-Val-Gly-Pro-Phe(4-CH ₂ OH)-Cys)-3Pal-NH ₂
30	Oxazol-2-carbonyl-D-Val-Phe(2-Cbm)-c(Cys-Orn(iPr)-Asp-Val-Gly-Pro-Phe-Cys)-3Pal-NH ₂
31	Pyrimidin-4-carbonyl-D-Val-Phe(2-Cbm)-c(Cys-Arg-Asp-Val-Gly-Dhp-Phe(3-CH ₂ NH ₂)-Cys)-3Pal-NH ₂
32	Picolinoyl(3-F)-D-Val-Phe(2-Cbm)-c(Cys-Arg-Asp-Val-Gly-Dhp-Phe(3-CH ₂ NH ₂)-Cys)-3Pal-NH ₂
33	Thiazol-2-carbonyl-D-Val-Tyr-c(Cys-Arg-Asp-Val-Gly-Pro-Phe-Cys)-3Pal-NH ₂
34	Picolinoyl(3-Me)-D-Val-Tyr-c(Cys-Arg-Asp-Val-Gly-Pro-Phe-Cys)-3Pal-NH ₂
35	Picolinoyl(3,5-F ₂)-D-Val-Tyr-c(Cys-Arg-Asp-Val-Gly-Pro-Phe-Cys)-3Pal-NH ₂
36	Picolinoyl(3-NH ₂)-D-Val-Tyr-c(Cys-Arg-Asp-Val-Gly-Pro-Phe-Cys)-3Pal-NH ₂
37	1H-imidazol-5-carbonyl-D-Val-Tyr-c(Cys-Arg-Asp-Val-Gly-Pro-Phe-Cys)-3Pal-NH ₂
38	Picolinoyl(5-F)-D-Val-Phe(2-Cbm)-c(Cys-Orn(iPr)-Asp-Val-Gly-Dhp-3Pal-Cys)-3Pal-NH ₂
39	Picolinoyl(5-F)-D-Val-Phe(2-Cbm)-c(Cys-Orn(iPr)-Asp-Val-Gly-Pro-3Pal-

	Cys)-3Pal-NH ₂
40	Oxazol-2-carbonyl-D-Val-Phe(2-Cbm)-c(Cys-Orn(iPr)-Asp-Val-Gly-Pro-3Pal-Cys)-3Pal-NH ₂
41	Oxazol-2-carbonyl-D-Val-Phe(2-Cbm)-c(Cys-Lys(iPr)-Asp-Val-Gly-Pro-3Pal-Cys)-3Pal-NH ₂
42	Oxazol-2-carbonyl-D-Val-Phe(2-Cbm)-c(Cys-Dab(Atz)-Asp-Val-Gly-Pro-3Pal-Cys)-3Pal-NH ₂
43	Oxazol-2-carbonyl-D-Val-Phe(2-Cbm)-c(Cys-Orn(iPr)-Asp-Val-Gly-Dhp-Phe(3-CH ₂ NH ₂)-Cys)-3Pal-NH ₂
44	Oxazol-2-carbonyl-D-Val-Tyr-c(Cys-Orn(Lys(Me ₂))-Asp-Val-Gly-Pro-Phe-Cys)-3Pal-NH ₂
45	Pyrimidin-4-carbonyl-D-Val-Tyr-c(Cys-Orn(Lys(Me ₂))-Asp-Val-Gly-Pro-Phe-Cys)-3Pal-NH ₂
46	Picolinoyl(3-F)-D-Val-Tyr-c(Cys-Orn(Me ₂))-Asp-Val-Gly-Pro-Phe-Cys)-3Pal-NH ₂
47	1H-imidazol-4-carbonyl-D-Val-Tyr-c(Cys-Arg-Asp-Val-Gly-Pro-Phe-Cys)-3Pal-NH ₂
48	1H-1,2,4-triazol-5-carbonyl(3-Me)-D-Val-Tyr-c(Cys-Arg-Asp-Val-Gly-Pro-Phe-Cys)-3Pal-NH ₂
49	1H-pyrol-2-carbonyl-D-Val-Tyr-c(Cys-Arg-Asp-Val-Gly-Pro-Phe-Cys)-3Pal-NH ₂
50	Picolinoyl(3-NO ₂)-D-Val-Tyr-c(Cys-Arg-Asp-Val-Gly-Pro-Phe-Cys)-3Pal-NH ₂
51	Picolinoyl(3-Cl)-D-Val-Tyr-c(Cys-Arg-Asp-Val-Gly-Pro-Phe-Cys)-3Pal-NH ₂
52	Oxazol-2-carbonyl-D-Val-Phe(2-Cbm)-c(Cys-Orn(Atz)-Asp-Val-Gly-Pro-3Pal-Cys)-3Pal-NH ₂
53	1H-1,2,4-triazol-5-carbonyl(3-Me)-D-Val-Tyr-c(Cys-Arg-Asp-Val-Gly-Pro-Phe(2-CH ₂ NH ₂)-Cys)-3Pal-NH ₂
54	Picolinoyl-D-Val-Phe(2-Cbm)-c(Cys-Orn(iPr)-Asp-Val-Gly-Dhp-Phe(3-CH ₂ NH ₂)-Cys)-3Pal-NH ₂
55	Picolinoyl-D-Val-Tyr-c(Cys-Orn(iPr)-Asp-Val-Gly-Pro-Phe(4-CH ₂ OH)-Cys)-3Pal-NH ₂
56	Picolinoyl(5-F)-D-Val-Tyr-c(Cys-Orn-Asp-Val-Gly-Pro-Phe(4-CH ₂ OH)-Cys)-3Pal-NH ₂
57	Oxazol-2-carbonyl-D-Val-Phe(2-Cbm)-c(Cys-Orn(iPr)-Asp-Val-Gly-Dhp-Tyr-Cys)-3Pal-NH ₂
58	Oxazol-2-carbonyl-D-Val-Phe(2-Cbm)-c(Cys-Orn(iPr)-Asp-Val-Gly-Dhp-3Pal-Cys)-3Pal-NH ₂

59	Oxazol-2-carbonyl-D-Val-Phe(2-Cbm)-c(Cys-Orn(iPr)-Asp-Val-Gly-Dhp-4Aph-Cys)-3Pal-NH ₂
60	Oxazol-2-carbonyl-D-Val-Phe(2-Cbm)-c(Cys-Orn(iPr)-Asp-Val-Gly-Dhp-4Uph-Cys)-3Pal-NH ₂
61	Picolinoyl(5-F)-D-Val-Tyr-c(Cys-Orn(iPr)-Asp-Val-Gly-Pro-Phe(4-CH ₂ OH)-Cys)-3Pal-NH ₂
62	Picolinoyl(3,5-F ₂)-D-Val-Tyr-c(Cys-Orn(iPr)-Asp-Val-Gly-Pro-Phe-Cys)-3Pal-NH ₂
63	Picolinoyl(5-F)-D-Val-Phe(2-Cbm)-c(Cys-Orn(iPr)-Asp-Val-Gly-Dhp-Phe(4-CH ₂ OH)-Cys)-3Pal-NH ₂
64	Oxazol-2-carbonyl-D-Val-Phe(2-Cbm)-c(Cys-Orn(iPr)-Asp-Val-Gly-Pro-Phe(4-CH ₂ OH)-Cys)-3Pal-NH ₂
65	Oxazol-2-carbonyl-D-Val-Phe(2-Cbm)-c(Cys-Orn(iPr)-Asp-Val-Gly-Dhp-Phe(3-Cbm)-Cys)-3Pal-NH ₂
66	Picolinoyl(5-F)-D-Val-Phe(2-Cbm)-c(Cys-Orn(iPr)-Asp-Val-Gly-Dhp-Phe(2-Cbm)-Cys)-3Pal-NH ₂
67	Oxazol-2-carbonyl-D-Val-Tyr-c(Cys-Orn(iPr)-Asp-Val-Gly-Dhp-Phe(3-Cbm)-Cys)-3Pal-NH ₂
68	Picolinoyl(5-F)-D-Val-Tyr-c(Cys-Orn(iPr)-Asp-Val-Gly-Dhp-Phe(3-Cbm)-Cys)-3Pal-NH ₂
69	Picolinoyl-D-Val-Tyr-c(Cys-Orn(iPr)-Asp-Val-Gly-Dhp-Phe(4-CH ₂ OH)-Cys)-3Pal-NH ₂
70	Oxazol-2-carbonyl-D-Val-Tyr-c(Cys-Orn(iPr)-Asp-Val-Gly-Dhp-Phe(4-CH ₂ OH)-Cys)-3Pal-NH ₂

Trừ khi được chỉ định khác, mã axit amin trong Bảng 1 chỉ đồng phân L của nó. Chẳng hạn, Orn chỉ L-ornithin, 3Pal chỉ 3-(3-Pyridyl)-L-alanin, Dhp chỉ 3,4-dehydro-L-prolin, và Phe(2-Cbm) chỉ 3-(2-carbamoyl)phenyl-L-alanin.

Các hợp chất ví dụ 1-70 là các hợp chất có công thức (I), trong đó m là 1, p là 0, Ar³ là 3-pyridinyl, và A, Ar¹, Ar², R¹, n, và R như được thể hiện trên Bảng 2 dưới đây.

Bảng 2

Hợp chất #	A	Ar ¹	Ar ²	R ¹	n	R
1	đơn	4-flophenyl	phenyl	4-OH	2	guanidino
2	đơn	4-flophenyl	3-pyridinyl	4-OH	2	guanidino
3	đơn	2-pyridinyl	3-pyridinyl	4-OH	2	guanidino
4	đôi	4-flophenyl	phenyl	4-OH	2	guanidino
5	đơn	4-flophenyl	3-aminometylphenyl	4-OH	2	guanidino
6	đơn	4-flophenyl	3-carbamoylphenyl	4-OH	0	NH ₂
7	đơn	4-flophenyl	4-hydroxyphenyl	4-OH	0	NH ₂
8	đơn	2-pyridinyl	phenyl	4-OH	1	N(Et ₂)
9	đơn	2-pyridinyl	phenyl	4-OH	1	NH-iPr
10	đơn	2-pyridinyl	phenyl	4-OH	0	NH-CO-CH ₂ - (O-(CH ₂) ₂) ₂ - NH ₂
11	đơn	1,3-oxazol-2-yl	3-pyridinyl	4-OH	2	guanidino
12	đơn	5-flopyridin-2-yl	phenyl	4-OH	2	NH ₂
13	đơn	5-flopyridin-2-yl	phenyl	4-OH	2	NH-CO-CH ₂ - (O-(CH ₂) ₂) ₂ - NH-iPr
14	đơn	5-flopyridin-2-yl	phenyl	4-OH	2	NH-iPr
15	đơn	4-flophenyl	phenyl	2-C(O)- NH ₂	2	guanidino
16	đơn	pyrimidinyl	phenyl	4-OH	2	guanidino
17	đơn	3-flopyridin-2-yl	phenyl	4-OH	2	guanidino
18	đơn	4-flopyridin-2-yl	phenyl	4-OH	2	guanidino
19	đơn	4-flophenyl	phenyl	4-OH	1	xyanoguanidino
20	đơn	4-flophenyl	4-aminometylphenyl	4-OH	2	guanidino
21	đơn	4-flophenyl	3-xyanophenyl	4-OH	2	guanidino
22	đôi	4-flophenyl	4-hydroxyphenyl	3-CH ₂ - NH ₂	2	guanidino

23	đôi	1,3-oxazol-2-yl	3-carbamoylphenyl	3-CH ₂ -NH ₂	2	guanidino
24	đơn	2-pyridinyl	phenyl	4-OH	2	N(Et ₂)
25	đơn	2-pyridinyl	4-hydroxymethylphenyl	4-OH	2	NH ₂
26	đơn	2-pyridinyl	phenyl	4-OH	2	xyanoguanidino
27	đơn	2-pyridinyl	phenyl	4-OH	2	3-amino-1,2,4-triazol-5-yl
28	đơn	2-pyridinyl	phenyl	4-OH	2	metylguanidino
29	đơn	3-flopyridin-2-yl	4-hydroxymethylphenyl	4-OH	2	NH ₂
30	đơn	1,3-oxazol-2-yl	phenyl	2-C(O)-NH ₂	2	NH-iPr
31	đôi	pyrimidinyl	3-aminomethylphenyl	2-C(O)-NH ₂	2	guanidino
32	đôi	3-flopyridin-2-yl	3-aminomethylphenyl	2-C(O)-NH ₂	2	guanidino
33	đơn	2-thiazolyl	phenyl	4-OH	2	guanidino
34	đơn	3-methylpyridin-2-yl	phenyl	4-OH	2	guanidino
35	đơn	3,5-diflopyridin-2-yl	phenyl	4-OH	2	guanidino
36	đơn	3-aminopyridin-2-yl	phenyl	4-OH	2	guanidino
37	đơn	5-imidazolyl	phenyl	4-OH	2	guanidino
38	đôi	5-flopyridin-2-yl	3-pyridinyl	2-C(O)-NH ₂	2	NH-iPr
39	đơn	5-flopyridin-2-yl	3-pyridinyl	2-C(O)-NH ₂	2	NH-iPr
40	đơn	1,3-oxazol-2-yl	3-pyridinyl	2-C(O)-NH ₂	2	NH-iPr
41	đơn	1,3-oxazol-2-yl	3-pyridinyl	2-C(O)-NH ₂	3	NH-iPr
42	đơn	1,3-oxazol-2-yl	3-pyridinyl	2-C(O)-NH ₂	2	3-amino-1,2,4-triazol-5-yl

43	đôi	1,3-oxazol-2-yl	3-aminomethylphenyl	2-C(O)-NH ₂	2	NH-iPr
44	đơn	1,3-oxazol-2-yl	phenyl	4-OH	2	NH-C(O)-CH(NH ₂)-(CH ₂) ₄ -N(CH ₃) ₂
45	đơn	pyrimidinyl	phenyl	4-OH	2	NH-C(O)-CH(NH ₂)-(CH ₂) ₄ -N(CH ₃) ₂
46	đơn	3-flopyridin-2-yl	phenyl	4-OH	2	NMe ₂
47	đơn	5-imidazolyl	phenyl	4-OH	2	guanidino
48	đơn	1,2,4-triazol-5-yl	phenyl	4-OH	2	guanidino
49	đơn	2-pyrollyl	phenyl	4-OH	2	guanidino
50	đơn	3-nitropyridin-2-yl	phenyl	4-OH	2	guanidino
51	đơn	3-clopyridin-2-yl	phenyl	4-OH	2	guanidino
52	đơn	1,3-oxazol-2-yl	3-pyridinyl	2-C(O)-NH ₂	2	3-amino-1,2,4-triazol-5-yl
53	đơn	1,2,4-triazol-5-yl	2-aminomethylphenyl	4-OH	2	guanidino
54	đôi	2-pyridinyl	3-aminomethylphenyl	2-C(O)-NH ₂	2	NH-iPr
55	đơn	2-pyridinyl	4-hydroxymethylphenyl	4-OH	2	NH-iPr
56	đơn	5-flopyridin-2-yl	4-hydroxymethylphenyl	4-OH	2	NH ₂
57	đôi	1,3-oxazol-2-yl	4-hydroxyphenyl	2-C(O)-NH ₂	2	NH-iPr
58	đôi	1,3-oxazol-2-yl	3-pyridinyl	2-C(O)-NH ₂	2	NH-iPr
59	đôi	1,3-oxazol-2-yl	4-aminophenyl	2-C(O)-NH ₂	2	NH-iPr
60	đôi	1,3-oxazol-2-yl	4-ureidophenyl	2-C(O)-NH ₂	2	NH-iPr
61	đơn	5-flopyridin-2-	4-	4-OH	2	NH-iPr

		yl	hydroxymethylphenyl			
62	đơn	3,5-diflopyridin-2-yl	3-pyridinyl	4-OH	2	NH-iPr
63	đôi	5-flopyridin-2-yl	3-pyridinyl	2-C(O)-NH ₂	2	NH-iPr
64	đơn	1,3-oxazol-2-yl	4-hydroxymethylphenyl	2-C(O)-NH ₂	2	NH-iPr
65	đôi	1,3-oxazol-2-yl	3-carbamoylphenyl	2-C(O)-NH ₂	2	NH-iPr
66	đôi	5-flopyridin-2-yl	2-carbamoylphenyl	2-C(O)-NH ₂	2	NH-iPr
67	đôi	1,3-oxazol-2-yl	3-carbamoylphenyl	4-OH	2	NH-iPr
68	đôi	5-flopyridin-2-yl	3-carbamoylphenyl	4-OH	2	NH-iPr
69	đôi	2-pyridinyl	4-hydroxymethylphenyl	4-OH	2	NH-iPr
70	đôi	1,3-oxazol-2-yl	4-hydroxymethylphenyl	4-OH	2	NH-iPr

Các hợp chất có công thức (I) có thể được điều chế bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này hoặc các phương pháp được mô tả trong bản mô tả. Ví dụ 1-5 sau đây mô tả chi tiết về việc điều chế các hợp chất 1-70 trên thực tế.

Bản mô tả cũng bộc lộ các dược phẩm chứa lượng hữu hiệu điều trị của ít nhất một (ví dụ, hai hoặc nhiều) peptit đối kháng CGRP được mô tả trong bản mô tả (tức là, các hợp chất có công thức (I)) hoặc muối dược dụng của chúng làm thành phần hoạt tính, cũng như ít nhất một chất mang (ví dụ, tá dược hoặc chất pha loãng) dược dụng. Ví dụ về các muối dược dụng bao gồm muối cộng axit, ví dụ, muối điều chế được bằng phản ứng với các axit hydrohalogen (như axit clohydric hoặc axit bromhydric), các axit vô cơ (như axit sulfuric, axit phosphoric và axit nitric), và các axit sulfonic hoặc carboxylic béo, vòng béo, thơm hoặc dị vòng (như axit formic, axit axetic, axit propionic, axit succinic, axit glycolic, axit lactic, axit malic, axit tartaric, axit xitric, axit benzoic, axit ascorbic, axit maleic, axit hydroxymaleic, axit pyruvic, axit p-hydroxybenzoic, axit embonic, axit metansulphonic, axit etansulphonic, axit

hydroxyetansulphonic, axit halobenzenesulphonic, axit trifloaxetic, axit triflometansulphonic, axit toluensulphonic, và axit naphtalensulphonic).

Chất mang trong dược phẩm phải “chấp nhận được” theo nghĩa là nó tương thích với thành phần hoạt tính trong dược phẩm (và tốt hơn là có khả năng ổn định thành phần hoạt tính) và không có hại cho đối tượng cần điều trị. Một hoặc nhiều tác nhân hòa tan có thể được sử dụng là chất mang dược để phân phối peptit đối kháng CGRP có hoạt tính. Ví dụ về các chất mang khác bao gồm silic oxit keo, magie stearat, xenluloza, natri lauryl sulfat, và D&C Yellow # 10.

Dược phẩm được mô tả trong bản mô tả có thể tùy ý chứa ít nhất một chất phụ trợ khác được chọn từ chất gây rã, chất kết dính, chất làm trơn, chất tạo hương vị, chất bảo quản, chất tạo màu và hỗn hợp bất kỳ của chúng. Ví dụ về các chất phụ trợ như vậy và các chất phụ trợ khác có thể xem trong “Handbook of Pharmaceutical Excipients”; Ed. A.H. Kibbe, 3rd Ed., American Pharmaceutical Association, USA and Pharmaceutical Press UK, 2000.

Dược phẩm được mô tả trong bản mô tả có thể được bào chế để dùng ngoài đường tiêu hóa, đường miệng, khu trú, đường mũi, đường trực tràng, trong má, hoặc dưới lưỡi hoặc để dùng qua đường hô hấp, ví dụ, ở dạng sol khí hoặc bột mịn treo trong không khí. Thuật ngữ “ngoài đường tiêu hóa” như được sử dụng trong bản mô tả chỉ việc tiêm dưới da, trong da, trong tĩnh mạch, trong cơ, trong khớp, trong động mạch, trong bao hoạt dịch, trong xương ức, trong vỏ, trong thương tổn, trong màng bụng, trong mắt, trong tai, hoặc trong sọ, cũng như kỹ thuật truyền bất kỳ thích hợp. Theo một số phương án, dược phẩm có thể ở dạng viên nén, viên nang, bột, vi hạt, bột mịn, xi rô, huyền phù, dung dịch, dạng phun mũi, miếng dán qua da hoặc viên đạn.

Theo một số phương án, dược phẩm được mô tả trong bản mô tả có thể chứa peptit đối kháng CGRP được mô tả trong bản mô tả mà được hòa tan trong dung dịch nước. Chẳng hạn, dược phẩm có thể chứa dung dịch nước natri clorua (ví dụ, chứa 0,9% trong lượng natri clorua) để làm chất pha loãng.

Ngoài ra, bản mô tả bộc lộ phương pháp sử dụng peptit đối kháng CGRP như mô tả trên đây để điều trị chứng đau nửa đầu hoặc để sản xuất thuốc cho việc điều trị này. Phương pháp có thể bao gồm việc cho bệnh nhân cần điều trị sử dụng lượng hữu hiệu dược phẩm được mô tả trong bản mô tả. “Lượng hữu hiệu” chỉ lượng dược phẩm

cần để tạo ra tác dụng điều trị trên đối tượng được điều trị. Liều hữu hiệu sẽ thay đổi, như người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực này đã biết, tùy thuộc vào loại bệnh được điều trị, đường dùng, việc sử dụng tá dược, và khả năng dùng đồng thời với các phép điều trị khác.

Như được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ “sự điều trị”, “điều trị”, và “việc điều trị” dùng để chỉ việc đảo ngược, làm thuyên giảm, làm chậm sự khởi phát của, hoặc việc ức chế sự tiến triển của chứng đau nửa đầu hoặc một hoặc nhiều triệu chứng của nó, như được mô tả ở đây. Theo một số phương án, việc điều trị có thể được thực hiện sau khi một hoặc nhiều triệu chứng đã phát triển. Theo các phương án khác, việc điều trị có thể được thực hiện khi không có triệu chứng. Ví dụ, việc điều trị có thể được thực hiện đối với các cá thể dễ bị mắc bệnh trước khi khởi phát các triệu chứng (chẳng hạn, dựa trên tiền sử của triệu chứng và/hoặc dựa trên các yếu tố di truyền hoặc các yếu tố miễn cảm khác). Việc điều trị cũng có thể được tiếp tục sau khi các triệu chứng được giải quyết, ví dụ để ngăn ngừa hoặc làm chậm sự tái phát của chúng.

Liều thông thường của peptit đối kháng CGRP được mô tả trong bản mô tả có thể thay đổi trong khoảng rộng và sẽ phụ thuộc vào các yếu tố khác nhau như nhu cầu riêng của mỗi bệnh nhân và đường dùng. Ví dụ về các liều hằng ngày (chẳng hạn, dùng dưới da) có thể là ít nhất khoảng 0,5 mg (ví dụ, ít nhất khoảng 1 mg, ít nhất khoảng 5 mg, ít nhất khoảng 10 mg, hoặc ít nhất khoảng 15 mg) và/hoặc nhiều nhất khoảng 100 mg (ví dụ, nhiều nhất khoảng 75 mg, nhiều nhất khoảng 50 mg, nhiều nhất khoảng 20 mg, hoặc nhiều nhất khoảng 15 mg) peptit đối kháng CGRP. Người có hiểu biết về lĩnh vực này hoặc bác sĩ điều trị có thể xem xét các thay đổi thích hợp đối với khoảng liều này và thực hiện điều chỉnh cho phù hợp với tình trạng thực tế.

Theo một số phương án, dược phẩm được mô tả trong bản mô tả có thể được dùng một lần một ngày. Theo một số phương án, dược phẩm có thể được dùng nhiều hơn một lần mỗi ngày (ví dụ, hai lần một ngày, ba lần một ngày, hoặc bốn lần một ngày).

Nội dung của tất cả các công bố được viện dẫn trong bản mô tả (ví dụ, bằng sáng chế, công bố đơn sáng chế, và bảo báo) được kết hợp ở đây bằng cách viện dẫn đến toàn bộ nội dung của chúng.

Các ví dụ sau đây nhằm mục đích minh họa và không dự định để giới hạn sáng chế.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các phương pháp tổng hợp chung

1. Các dẫn xuất axit amin

Các dẫn xuất axit amin được mua từ những nhà cung cấp thương mại (như Aapptec, Chem Impex International, EMD Millipore, PPL, PepTech và peptits International), trừ Fmoc-Orn(iPr,Boc)-OH. Fmoc-Orn(iPr,Boc)-OH được điều chế như sau:

50,0 g (105,8 mmol) Fmoc-Orn(Boc)-OH được hòa tan trong 100 mL diclometan (DCM). Sau đó 100 mL axit trifloaxetic (TFA) được bổ sung vào. Hỗn hợp phản ứng được khuấy từ trong 1 giờ và dung môi được làm bay hơi. Để loại bỏ TFA dư, phần cặn được hoàn nguyên trong DCM và làm bay hơi vài lần. Phần cặn dầu được hòa tan trong 400 mL MeOH và 100 mL axeton, tiếp theo là 30 mL axit axetic. Hỗn hợp phản ứng được khuấy mạnh liệt và 120,0 g (0,57 mol, 5,4 đương lượng) $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ rắn được bổ sung vào theo các phần 10 g đến khi Fmoc-Orn-OH được tiêu thụ (khoảng 2 giờ, kiểm tra bằng HPLC phân tích). Sau đó, dung môi được làm bay hơi và phần cặn rắn thu được được sử dụng ở bước tiếp theo mà không cần tinh chế.

Phần cặn thu được ở bước trước được hòa tan trong 100 mL nước và độ pH của dung dịch được điều chỉnh đến khoảng 9,5 bằng Na_2CO_3 rắn. Sau đó, 100 mL t-BuOH được bổ sung vào dung dịch phản ứng có khuấy từ. Boc_2O (60,0 g, 275 mmol, 2,6 đương lượng) trong 100 mL t-BuOH sau đó được bổ sung vào từng phần trong vòng 10 giờ. Độ pH của hỗn hợp phản ứng được duy trì ở khoảng 9,5 bằng cách bổ sung Na_2CO_3 (dung dịch nước) bão hòa. Sau khi phần Boc_2O cuối cùng được bổ sung, hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 9 giờ nữa. Hỗn hợp phản ứng được pha loãng bằng 1 L nước và chiết bằng 2 x 200 mL hexan. Pha nước được axit hóa bằng HCl 2M và sản phẩm được chiết bằng dietyl ete (3 x 300 mL). Các phần chiết hữu cơ kết hợp được rửa kỹ bằng HCl 2M (3 x 200 mL) và nước, và sau đó làm khô bằng MgSO_4 khan. Tác nhân làm khô được lọc ra và dung môi được làm bay hơi. Phần cặn rắn thu được được xử lý bằng ete dầu mỏ, gạn và làm khô trong chân không. Sản phẩm kết tinh được hòa tan trong 200 mL t-BuOH và đông khô. Thu được 41,8 g (84 mmol, hiệu suất 79,5%) dẫn xuất đông khô.

2. Tổng hợp peptit

Các nhựa được mua từ nhà cung cấp thương mại (ví dụ, PCAS BioMatrix Inc. và EMD Millipore). Các axit carboxylic để đưa nhóm axyl vào đầu tận cùng N mua được từ hãng AstaTech, ChemBridge Corp. Frontier Scientific, J&W Pharmalab, Oakwood Products and TCI America. Tất cả các chất phản ứng, hóa chất và dung môi khác được mua từ hãng Sigma-Aldrich và VWR.

Các hợp chất được mô tả trong bản mô tả được tổng hợp bằng các phương pháp chuẩn trong hóa học peptit pha rắn bằng cách sử dụng phương pháp Fmoc. Các peptit này được lắp ghép thủ công hoặc tự động bằng thiết bị tổng hợp peptit Tribute (Protein Technologies Inc., Tucson, Arizona) hoặc thiết bị tổng hợp peptit Applied Biosystems 433A, hoặc bằng cách kết hợp tổng hợp thủ công và tự động.

Phương pháp HPLC điều chế được thực hiện trên hệ Waters Prep LC System bằng cột PrepPack Delta-Pack C18, 300Å, 15 µm, 47 x 300 mm với tốc độ dòng 100 mL/phút và/hoặc trên cột Phenomenex Luna C18, 100Å, 5 µm, 30 x 100 mm với tốc độ dòng 40 mL/phút. Phương pháp HPLC phân tích đảo pha được thực hiện trên hệ thống sắc ký lỏng Agilent Technologies 1200rr Series bằng cột Agilent Zorbax C18, 1,8 µm, 4,6 x 110 mm với tốc độ 1,5 mL/phút. Các phép phân tích hợp chất cuối được thực hiện trên hệ thống sắc ký Agilent Technologies 1200 Series bằng phương pháp HPLC đảo pha trên cột Phenomenex Gemini 110Å C18, 3 µm, 2 x 150 mm với tốc độ dòng 0,3 mL/phút. Phổ khối được ghi trên máy phổ khối phụ điện tử MAT Finnigan LCQ. Trừ khi được khẳng định khác, tất cả các phản ứng được thực hiện ở nhiệt độ trong phòng. Các tài liệu tham khảo sau đây cung cấp tiếp các hướng dẫn về thiết lập thử nghiệm chung, cũng như về sự khả dụng của các nguyên liệu và chất phản ứng ban đầu: Kates, S.A., Albericio, F., Eds., *Solid Phase Synthesis: A Practical Guide*, Marcel Dekker, New York, Basel, 2000; Greene, T.W., Wuts, P.G.M., *Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley Sons Inc., 2nd Edition, 1991; Stewart, J.M., Young, J.D., *Solid Phase Synthesis*, Pierce Chemical Company, 1984; Bisello, et al., *J. Biol. Chem.* 1998, 273, 22498-22505; Merrifield, J. *Am. Chem. Soc.* 1963, 85, 2149-2154; và Chang and White P.D., *'Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: a Practical Approach'*, Oxford University Press, Oxford, 2000.

Các nhóm bảo vệ sau đây được sử dụng để bảo vệ các nhóm chức mạch bên axit amin: Pbf (2,2,4,6,7-pentametyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl) cho Arg; tBu (t-butyl) cho Tyr và Asp; Boc (t-butoxycarbonyl) cho Dab, Orn, Orn(iPr) và Lys; và Trt (trityl) cho Cys.

Việc kết hợp các axit amin được bảo vệ bằng Fmoc trên thiết bị tổng hợp Tribute được thực hiện bằng HBTU/NMM trong DMF trừ các dẫn xuất cystein được kết hợp với DIC/HOBt trong DMF. Các chu kỳ đơn 30-60 phút 5 lần dư các axit amin được bảo vệ bằng Fmoc đã hoạt hóa được sử dụng trong quá trình tổng hợp. Việc loại bỏ nhóm bảo vệ Fmoc được kiểm tra bằng UV. Tiền hành rửa nhựa peptit nhiều lần (lên đến 10 lần, nếu cần) mỗi lần 2 phút bằng 20% piperidin trong DMF.

Các quy trình chu kỳ do hãng Applied Biosystems đưa ra được sử dụng trên thiết bị tổng hợp 433A. Các phép kết hợp được thực hiện bằng HATU/DIPEA hoặc DIC/HOBt trong DMF/NMP. Các phép kết hợp đơn trong thời gian 35-50 với 4 lần dư các axit amin được bảo vệ bằng Fmoc đã hoạt hóa được sử dụng. Việc loại bỏ nhóm bảo vệ Fmoc được kiểm tra bằng UV và được thực hiện bằng một lần rửa trong 20 phút bằng 20% piperidin/NMP.

Việc kết hợp thông qua DIC/HOBt trong DMF được sử dụng đối với tất cả các axit amin theo cách thủ công. Các chu kỳ đơn dài ít nhất 2 giờ với 3 lần dư các axit amin được bảo vệ bằng Fmoc đã hoạt hóa được sử dụng trong quá trình tổng hợp. Sự hoàn thành phản ứng kết hợp được đánh giá bằng phép thử ninhydrin (Kaiser). Việc loại bỏ nhóm bảo vệ Fmoc được thực hiện bằng cách rửa nhựa peptit một lần trong 30 phút bằng 20% piperidin trong DMF.

Khi hoàn thành việc tổng hợp peptit, các nhựa peptit được rửa bằng DCM và làm khô trong chân không. Các nhựa này được xử lý bằng TFA chứa lượng H_2O thay đổi (không quá 10%) và diisopropylsilan (TIS; không quá 4%) trong 2 giờ để loại bỏ các nhóm bảo vệ mạch bên bằng cách phân cắt đồng thời peptit khỏi nhựa. Các peptit được lọc, kết tủa bằng diethyl ete và gạn. Để thu được các peptit với cầu disulfua, chất kết tủa được hòa tan trong TFA hoặc AcOH nguyên chất và dung dịch này sau đó được rót vào 10 % axetonitril trong nước. Trong một số trường hợp, bổ sung thêm một lượng axetonitril để hòa tan chất nền. Peptit thẳng được oxy hóa bằng I_2 0,1M trong MeOH hoặc AcOH. Dung dịch chất oxy hóa được bổ sung từng giọt đến khi có màu

vàng không đổi. Iot dư được khử bằng axit ascorbic. Sau đó, độ pH được điều chỉnh đến khoảng 4 bằng amoniac đặc. Dung dịch thu được được tải trực tiếp lên cột HPLC điều chế và giải hấp bằng gradien thành phần B được thể hiện trong bảng 3 sau đây.

Mỗi peptit thô được tinh chế bằng dung dịch đệm T được thể hiện trong bảng 3. Các phân đoạn có độ tinh khiết trên 90%, được xác định bằng phương pháp HPLC phân tích đảo pha, được gộp chung và tải lại lên cột và giải hấp bằng dung dịch đệm T để tạo ra muối trifloaxetat. Trong một số trường hợp, thực hiện tinh chế tiếp bằng dung dịch đệm C được thể hiện trong bảng 3. Để thu được muối hydroclorua, các phân đoạn từ những lần chạy bằng dung dịch đệm T hoặc C được tải lại lên cột và cột này được rửa bằng 3-5 thể tích natri clorua 0,1M trong HCl 1mM. Sản phẩm cuối được giải hấp bằng dung dịch đệm H được thể hiện trên bảng 3. Các phân đoạn được gộp chung và đông khô. Các hợp chất được điều chế như vậy thường được phát hiện là tinh khiết ít nhất khoảng 90%.

Bảng 3. Các chế phẩm đệm HPLC điều chế

Đệm	Thành phần A	Thành phần B
C	0,25 M Triethylamoni Perclorat, pH 2,3	60% axetonitril, 40% thành phần A
T	0,1% axit trifloaxetic (TFA)	60% axetonitril, 0,1% TFA
H	1 mM HCl	60% axetonitril, 1 mM HCl

Quy trình tổng hợp các hợp chất ví dụ có công thức (I) nhất định được mô tả trong bản mô tả được đưa ra sau đây.

Ví dụ 1: Tổng hợp hợp chất 30

Peptit được lắp ghép thủ công bắt đầu từ 3,0 g (1,95 mmol) nhựa MBHA amit Fmoc-Rink (EMD Millipore, số danh mục 855003, 0,65 mmol/g). Sử dụng các phản ứng kết hợp thông qua DIC/HOBt trong DMF. Các chu kỳ đơn dài ít nhất 2 giờ với 3 lần dư các axit amin được bảo vệ bằng Fmoc đã hoạt hóa được sử dụng trong quá trình tổng hợp. Sự hoàn thành phản ứng kết hợp được đánh giá bằng phép thử nihidrin. Việc loại bỏ nhóm bảo vệ Fmoc được thực hiện bằng cách rửa nhựa peptit một lần trong 30 phút bằng 20% piperidin trong DMF. Các dẫn xuất axit amin sau được dùng để lắp ghép peptit liên kết nhựa: Fmoc-3Pal-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Asp(tBu)-OH, Fmoc-Orn(iPr,Boc)-OH,

Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-Phe(2-Cbm)-OH và Fmoc-D-Val-OH. Sau khi mảnh peptit 1-11 được lắp ghép, nhựa được bịt đầu bằng axit oxazol-2-carboxylic/DIC/HOBt (4 đương lượng), rửa kỹ bằng DCM và làm khô trong chân không. Peptit thẳng thô được phân cắt khỏi nhựa bằng 50 mL TFA/H₂O/TIS 96:2:2 (thể tích/thể tích/thể tích) trong 2 giờ. Sau khi dung môi được làm bay hơi, peptit thô được kết tủa bằng diethyl ete và gạn. Chất kết tủa được hòa tan trong 1L dung dịch nước TFA 1% và oxy hóa bằng 0,1M I₂/MeOH. Dung dịch chất oxy hóa được bổ sung từng giọt đến khi có màu vàng không đổi. Iot dư được khử bằng axit ascorbic rắn. Sau đó, độ pH được điều chỉnh đến khoảng 4 bằng amoniac đặc. Dung dịch thu được được tải trực tiếp lên cột HPLC điều chế và tinh chế bằng đệm T. Các phân đoạn với độ tinh khiết >90%, được xác định bằng phương pháp HPLC phân tích đảo pha, được gộp chung và tải lại lên cột. Cột được cân bằng bằng HCl 1 mM, rửa bằng 3 thể tích NaCl 0,1 mM trong HCl 1 mM và hợp chất được giải hấp bằng đệm H để tạo ra muối hydroclorua. Các phân đoạn được gộp chung và đông khô. Thu được 1009,8 mg (0,63 mmol, tổng số 32,3% tính theo hàm lượng peptit 89,6%) bột peptit màu trắng (hợp chất 30).

Độ tinh khiết của sản phẩm được xác định bằng HPLC phân tích là 90,7%. Dữ liệu MS quan sát và tính toán được (tức là, M+H) được đưa ra trong bảng 4 sau đây.

Ví dụ 2: Tổng hợp hợp chất 40

Việc tổng hợp pha rắn peptit này được thực hiện trên thiết bị tổng hợp peptit Tribute bằng kế hoạch Fmoc. Nhựa ban đầu là 0,23 g (0,15 mmol) nhựa Rink Amide MBHA (EMD Millipore, số danh mục 855003, 100-200 mesh, 0,65 mmol/g). Sử dụng các phản ứng kết hợp thông qua DIC/HOBt trong DMF đối với tất cả các axit amin trừ axit oxazol-2-carboxylic ở đầu tận cùng N cần có phương pháp kết hợp HBTU/NMM. Các chu kỳ đơn 2 giờ với 3 lần dư các axit amin được bảo vệ bằng Fmoc đã hoạt hóa được sử dụng trong quá trình tổng hợp. Nhóm bảo vệ Fmoc được loại bỏ bằng cách xử lý bằng 20% piperidin trong DMF, 1 × 5 phút và 1 × 25 phút. Các dẫn xuất axit amin sau được dùng liên tiếp để lắp ghép peptit liên kết nhựa: Fmoc-3Pal-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-3Pal-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Asp(tBu)-OH, Fmoc-Orn(*i*Pr,Boc)-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-Phe(2-Cbm)-OH và Fmoc-D-Val-OH. Nhóm axyl đầu tận cùng N được đưa vào bằng cách xử lý mảnh peptit liên kết nhựa (1-11) bằng hỗn hợp đã hoạt hóa trước chứa axit oxazol-2-carboxylic (0,5 mmol), HBTU (0,5 mmol), và DIEA (1,0 mmol) trong 4

giờ. Nhựa peptit đã lắp ghép cuối được rửa bằng DCM và làm khô trong chân không. Peptit trắng thô được phân cắt khỏi nhựa bằng 25 mL TFA/H₂O/TIS (94:3:3, thể tích/thể tích/thể tích) trong 2,5 giờ. Dung môi được làm bay hơi trong chân không và peptit thô được kết tủa bằng dietyl ete. Chất kết tủa được thu gom bằng cách lọc và sau đó hòa tan trong 400 mL TFA 0,1% trong ACN 5% và oxy hóa bằng 0,1M I₂/AcOH. Dung dịch chất iot được bổ sung từng giọt đến khi có màu vàng không đổi. Iot dư được khử bằng dung dịch axit ascorbic bão hòa trong nước. Dung dịch thu được được tải trực tiếp lên cột HPLC điều chế và tinh chế bằng đệm T. Các phân đoạn với độ tinh khiết >90%, được xác định bằng phương pháp HPLC phân tích đảo pha, được gộp chung và đông khô bằng thiết bị đông khô. Thu được 80,2 mg (45,0 μ mol, hiệu suất tổng 30% tính theo hàm lượng peptit ước tính 80%) bột peptit màu trắng (hợp chất 40).

Độ tinh khiết của sản phẩm được xác định bằng HPLC phân tích là 96,8%. Dữ liệu MS quan sát và tính toán được (tức là, M+H) được đưa ra trong bảng 4 sau đây.

Ví dụ 3: Tổng hợp hợp chất 62

Peptit này được lắp ghép thủ công bắt đầu từ 3,0 g (1,77 mmol) nhựa amit MBHA Rink (Novabiochem, số danh mục 8.55003, 0,59 mmol/g), bằng SPPS nhiệt độ cao (75°C, bể nước Lauda E100, bình phản ứng SPPS 50 mL có bao ổn nhiệt). Các chu kỳ đơn dài ít nhất 15 phút với không quá 4 lần dư các axit amin được bảo vệ bằng Fmoc đã hoạt hóa (HOBt, DIC, không hoạt hóa trước Fmoc-Orn(iPr,Boc)-OH) được sử dụng trong quá trình tổng hợp. Nhóm bảo vệ Fmoc được loại bỏ bằng 2 lần rửa nhựa peptit mỗi lần 5 phút bằng 25% piperidin trong DMF. Các dẫn xuất axit amin sau được dùng để lắp ghép peptit liên kết nhựa: Fmoc-3Pal-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Asp(tBu)-OH, Fmoc-Orn(iPr,Boc)-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH, và Fmoc-D-Val-OH. Sau khi mảnh peptit 1-11 được lắp ghép, nhựa được bật đầu bằng axit 3,5-diflopicolinic/HATU/DIPEA (4 đương lượng), rửa kỹ bằng MeOH, và làm khô trong chân không. Peptit trắng thô được phân cắt khỏi nhựa bằng 75 mL TFA/H₂O/TIS 96:2:2 (thể tích/thể tích/thể tích) trong 2 giờ. Sau khi dung môi được làm bay hơi, peptit thô được kết tủa bằng dietyl ete và gạn. Chất kết tủa được hòa tan trong 1L MeCN 10% trong dung dịch nước TFA 0,5% và oxy hóa bằng 0,05M I₂/AcOH. Dung dịch chất oxy hóa được bổ sung từng giọt đến khi có màu vàng không đổi. Iot dư được khử bằng axit ascorbic 1M. Dung dịch thu được được tải trực tiếp lên cột HPLC điều chế và tinh chế bằng đệm T cải biến (thành phần

A: 0,01% TFA, thành phần B: 95% axetonitril trong 0,01% TFA). Các phân đoạn với độ tinh khiết >95%, xác định bằng phương pháp HPLC phân tích đảo pha, được gộp chung và tải lại lên cột. Cột được cân bằng bằng HCl 1 mM, rửa bằng 3 thể tích NaCl 0,1 mM trong HCl 1 mM và sau đó hợp chất được giải hấp bằng đệm H để tạo ra muối hydroclorua. Các phân đoạn được gộp chung và đông khô. Thu được 583 mg (0,63 mmol, tổng số 20% tính theo hàm lượng peptit 87,3% và độ tinh khiết 98,8%) bột peptit màu trắng (hợp chất 62).

Độ tinh khiết của sản phẩm được xác định bằng HPLC phân tích là 98,8%. Dữ liệu MS quan sát và tính toán được (tức là, M+H) được đưa ra trong bảng 4 sau đây.

Ví dụ 4: Tổng hợp hợp chất 65

Hợp chất này được lắp ghép trên pha rắn bằng cách kết hợp tổng hợp thủ công và tự động. Đầu tiên, tripeptit đầu tận cùng C được tổng hợp thủ công bắt đầu từ 7,3 g (3,5 mmol) nhựa Fmoc-Rink amide Chem Matrix (Biotage, số danh mục 7-600-1310-25, 0,48 mmol/g). Các phản ứng kết hợp qua HATU/DIPEA trong DMF được dùng cho 3Pal và Phe(3-Cbm), và phản ứng kết hợp qua DIC/HOBt trong DMF được dùng cho Cys. Các chu kỳ đơn dài ít nhất 2 giờ với 3 lần dư các axit amin được bảo vệ bằng Fmoc đã hoạt hóa được sử dụng trong quá trình tổng hợp. Sự hoàn thành phản ứng kết hợp được đánh giá bằng phép thử ninhydrin. Loại bỏ nhóm bảo vệ Fmoc bằng 30% piperidin trong DMF bằng hai lần rửa lần lượt trong 5 và 25 phút. Các dẫn xuất axit amin sau được dùng để lắp ghép peptit liên kết nhựa: Fmoc-3Pal-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH và Fmoc-Phe(3-Cbm)-OH. Việc tổng hợp được tiếp tục trên thiết bị tổng hợp 433A Synthesizer với một phần tám (0,44 mmol) lượng nhựa. Các phản ứng kết hợp qua HATU/DIPEA hoặc DIC/HOBt (cho Cys) trong NMP/DMF được sử dụng. Các chu kỳ đơn dài ít nhất 30 phút với 5 lần dư các axit amin được bảo vệ bằng Fmoc đã hoạt hóa được sử dụng trong quá trình tổng hợp. Việc loại bỏ nhóm bảo vệ Fmoc được thực hiện bằng cách rửa nhựa peptit một lần trong 30 phút bằng 20% piperidin trong NMP. Các dẫn xuất axit amin sau được dùng để hoàn thiện việc lắp ghép peptit liên kết nhựa: Fmoc-Dhp-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Asp(tBu)-OH, Fmoc-Orn(iPr,Boc)-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-Phe(2-Cbm)-OH và Fmoc-D-Val-OH. Sau khi mảnh peptit 1-11 được lắp ghép, nhựa được bịt đầu thủ công bằng axit oxazol-2-carboxylic/HATU/DIPEA (4 đương lượng), rửa kỹ bằng DCM và làm khô trong chân không. Peptit thẳng thô được phân cắt khỏi nhựa bằng 50 mL TFA/H₂O/TIS

90:8:2 (thể tích/thể tích/thể tích) trong 2 giờ. Dung môi được làm bay hơi và peptit thô được kết tủa bằng MTBA, ly tâm và gạn. Chất kết tủa được hòa tan trong 15 mL AcOH và rót vào 250 mL dung dịch nước axetonitril 10% (thể tích/thể tích) và oxy hóa bằng 0,1M I₂/MeOH. Dung dịch chất oxy hóa được bổ sung từng giọt đến khi có màu vàng không đổi. Iot dư được khử bằng axit ascorbic rắn. Sau đó, độ pH được điều chỉnh đến khoảng 4 bằng amoniac đặc. Dung dịch thu được được tải trực tiếp lên cột HPLC điều chế và tinh chế bằng đệm T (xem bảng sau). Các phân đoạn với độ tinh khiết >90%, xác định bằng phương pháp HPLC phân tích đảo pha, được gộp chung và đông khô. Thu được 116,2 mg (0,06 mmol, tổng số 14,1% tính theo hàm lượng peptit 78,5%) bột peptit màu trắng (hợp chất 65).

Độ tinh khiết của sản phẩm được xác định bằng phương pháp HPLC phân tích là 98,3%. Dữ liệu MS quan sát và tính toán được (tức là, M+H) được đưa ra trong bảng 4 sau đây.

Ví dụ 5: Tổng hợp các hợp chất 1-29, 31-39, 41-61, 63, 64, và 66-70

Các hợp chất 1-29, 31-39, 41-61, 63, 64, và 66-70 được tổng hợp bằng phương pháp được mô tả trong các ví dụ 1-4.

Dữ liệu MS quan sát và tính toán được (tức là, M+H) của các hợp chất 1-70 được tổng hợp trong bảng 4 sau đây.

Bảng 4

Hợp chất số	M+H theo tính toán	M+H quan sát được
1	1425,6	1425,6
2	1426,6	1426,6
3	1408,6	1408,6
4	1423,6	1423,5
5	1454,6	1454,6
6	1398,5	1398,5
7	1371,5	1371,5
8	1408,6	1408,8
9	1394,6	1394,7
10	1628,7	1628,9

11	1398,6	1398,8
12	1384,6	1384,7
13	1571,7	1571,8
14	1426,6	1426,7
15	1452,6	1452,7
16	1409,6	1409,7
17	1426,6	1426,7
18	1426,6	1426,7
19	1436,6	1436,7
20	1454,6	1454,6
21	1450,6	1450,6
22	1452,6	1452,7
23	1452,6	1452,7
24	1422,6	1422,7
25	1396,6	1396,7
26	1433,6	1433,7
27	1448,6	1488,7
28	1422,6	1422,8
29	1414,6	1414,7
30	1425,6	1425,7
31	1463,6	1463,8
32	1480,6	1480,7
33	1414,5	1414,7
34	1422,6	1422,7
35	1444,6	1444,7
36	1423,6	1423,6
37	1397,6	1397,7
38	1452,6	1452,6
39	1454,6	1454,6
40	1426,6	1426,5
41	1440,6	1440,6
42	1452,6	1452,5
43	1452,6	1452,6

44	1512,7	1512,7
45	1523,7	1523,8
46	1412,6	1412,7
47	1397,6	1397,6
48	1412,6	1412,7
49	1396,6	1396,6
50	1453,6	1453,6
51	1442,6	1442,6
52	1466,6	1466,6
53	1441,6	1441,8
54	1462,6	1462,7
55	1438,6	1438,8
56	1414,6	1414,9
57	1439,6	1439,8
58	1424,6	1424,7
59	1438,6	1438,9
60	1481,6	1481,7
61	1456,6	1456,7
62	1444,6	1444,7
63	1481,6	1481,6
64	1455,6	1455,6
65	1466,6	1466,7
66	1494,6	1494,7
67	1439,6	1439,6
68	1467,6	1467,7
69	1436,6	1436,7
70	1426,6	1426,5

Ví dụ 6: Hoạt tính đối kháng thụ thể CGRP đo được bằng phép thử cAMP

Các chất chủ vận thụ thể CGRP làm tăng lượng adenosin mono-phosphat vòng (cAMP) nội bào. Các chất đối kháng thụ thể CGRP có thể làm giảm tác dụng chủ vận. Hoạt tính đối kháng được đánh giá bằng cách xác định lượng adenosin mono-phosphat vòng (cAMP) bằng cách sử dụng dòng tế bào biểu hiện ổn định thụ thể hCGRP

(GeneBLazer® CALCRL:RAMP1-CRE-bla Freestyle™ 293F, Invitrogen). Các tế bào biểu hiện thụ thể hCGRP được giữ trong môi trường DMEM có nồng độ glucoza cao với GlutaMAX™ chứa 10% (thể tích/thể tích) FBS, 0,1 mM NEAA, 25 mM HEPES, 5 ug/ml Blastidin, 100 ug/ml Hygromycin, và 400 ug/ml Geneticin ở 37°C trong 5% CO₂ trong khí quyển đã làm ẩm. Để xác định cAMP, các tế bào được rửa một lần bằng 5 ml PBS 1X, môi trường giữ tế bào được thay bằng đệm hợp chất ((CB): DMEM chứa 0,1% BSA và 0,5 mM IBMX), và các bình được ủ trong 1 giờ ở 37°C trong 5% CO₂ trong khí quyển đã làm ẩm. Các tế bào được lấy ra khỏi bình nuôi cấy bằng đệm phân ly tế bào không chứa enzym và thu vào trong CB. Phản ứng được thực hiện trong các đĩa thể tích nhỏ màu trắng 384 giếng (Greiner) với mật độ 10000 tế bào/giếng. Các tế bào được cho tiếp xúc với nồng độ chất đối kháng thay đổi trong 30 phút với sự có mặt của chất chủ vận với nồng độ cố định (α CGRP người). Mức cAMP được xác định bằng cách sử dụng phép thử miễn dịch cAMP cạnh tranh dựa trên huỳnh quang phân giải thời gian đồng nhất (HTRF - homogeneous time resolved fluorescence) (cAMP Dynamic 2 Kit, Cisbio), theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Tỷ lệ giữa các số đo huỳnh quang phân giải thời gian (RFU) ở 665 nm và 615 nm được tính toán và vị trí liên kết đơn, mô hình đáp ứng nồng độ bốn thông số: $(MIN + ((MAX - MIN) / (1 + ((EC50/x)^{Hill}))))$, được sử dụng để thực hiện phân tích hồi quy phi tuyến tính, tạo ra đường cong đáp ứng nồng độ. Các thông số được báo cáo bao gồm hiệu lực đối kháng IC₅₀ (nồng độ gây ra sự ức chế bán tối đa đáp ứng chủ vận của các hợp chất đối kháng) và hiệu quả (%MPE: tỷ lệ phần trăm so với hiệu quả tối đa có thể có).

Các hợp chất 1-70 và ba hợp chất peptit tham chiếu được khảo sát trong phép thử trên đây. Ba hợp chất peptit tham chiếu là: (1) Bz(4-F)-D-Val-Tyr-c(Cys-Agp-Asp-Val-Gly-Pro-Phe-Cys)-3Pal-NH₂ (“hợp chất tham chiếu 1”, tức là hợp chất 36 theo Yan et al., *J. Pept. Sci.* 2011, 17, 383-386), (2) Bz-D-Val-Tyr-c(Cys-Dpr-Asp-Val-Gly-Pro-Phe-Cys)-3Pal-NH₂ (“hợp chất tham chiếu 2”, tức là hợp chất 33 theo Yan et al., *J. Pept. Sci.* 2011, 17, 383-386), và (3) H-Val-Thr-His-Arg-Leu-Ala-Gly-Leu-Leu-Ser-Arg-Ser-Gly-Gly-Val-Val-Lys-Asn-Asn-Phe-Val-Pro-Thr-Asn-Val-Gly-Ser-Lys-Ala-Phe-NH₂ (“hợp chất tham chiếu 3”, chất đối kháng α -CGRP(8-37)-NH₂ người). Kết quả được tổng hợp trên bảng 5 sau đây.

Như được thể hiện trên bảng 5, các hợp chất 1-70 nói chung thể hiện lực cải thiện so với các hợp chất tham chiếu 1-3.

Ví dụ 7: Hoạt tính đối kháng thụ thể AM2 đo được bằng phép thử cAMP

Hoạt tính đối kháng đối với thụ thể adrenomedullin AM2 được xác định bằng phương pháp được mô tả trong ví dụ 6 trên đây, với các thay đổi sau. Thay vì các tế bào GeneBLAzer® CALCRL:RAMP1-CRE-bla Freestyle™ 293F, các tế bào GeneBLAzer® CALCRL:RAMP3-CRE-bla Freestyle™ 293F được dùng để khảo sát hoạt tính ở các thụ thể hAM2. Chất chủ vận là adrenomedullin người, thay cho α -CGRP.

Các hợp chất 1-70 và ba hợp chất peptit tham chiếu được mô tả trong ví dụ 6 được khảo sát trong phép thử này. Kết quả được tổng hợp trên bảng 5 sau đây. Trong bảng 5, tỷ lệ chọn lọc của hCGRP so với hAM2 được tính dưới dạng IC_{50} của hAM2-R / IC_{50} của hCGRP-R.

Như được thể hiện trên bảng 5, phần lớn các hợp chất 1-thể hiện độ chọn lọc cải thiện với thụ thể hCGRP so với thụ thể hAM2 so với các hợp chất tham chiếu 1-3.

Bảng 5.

Hợp chất theo sáng chế số	IC ₅₀ trung bình (nM)	hCGRP-R		hAM2-R	
		Hiệu lực đối kháng (%) trung bình	IC ₅₀ trung bình (nM)	Hiệu lực đối kháng (%) trung bình	Tỷ lệ chọn lọc CGRP/AM2
1	0,14	100	52	101	362
2	0,08	100	45	100	555
3	0,12	100	35	101	285
4	0,17	100	29	113	172
5	0,13	100	26	99	192
6	0,17	100	101	113	612
7	0,13	100	43	100	334
8	0,09	100	30	100	347
9	0,15	100	51	106	351
10	0,19	100	114	107	589
11	0,13	100	25	108	198
12	0,11	100	18	100	172
13	0,10	100	26	100	249

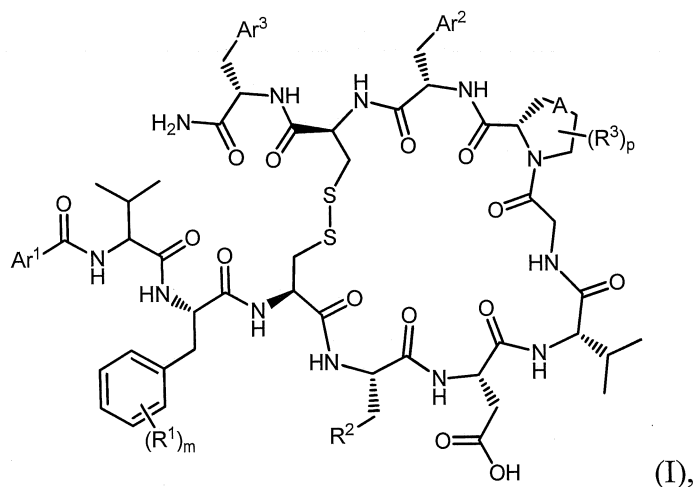
14	0,12	100	20	100	167
15	0,10	100	58	99	610
16	0,07	100	6,8	101	93
17	0,05	100	7,1	100	148
18	0,16	100	8,1	98	52
19	0,19	100	48	100	248
20	0,18	100	54	100	309
21	0,13	100	33	99	258
22	0,19	100	33	101	175
23	0,05	100	21	100	400
24	0,11	100	128	98	1213
25	0,07	100	78	100	1071
26	0,06	100	38	100	636
27	0,15	100	119	98	765
28	0,07	100	68	99	1031
29	0,09	100	148	98	1699
30	0,11	100	700	98	6628
31	0,12	100	46	100	390
32	0,12	100	61	99	498
33	0,10	100	11	100	117
34	0,14	100	7,9	100	58
35	0,06	100	33	101	580
36	0,17	100	16	101	93
37	0,17	100	379	100	2295
38	0,06	100	87	101	1478
39	0,13	100	275	101	2125
40	0,09	100	980	98	10884
41	0,13	100	1020	97	8075
42	0,14	100	1225	97	9068
43	0,04	100	180	101	4693
44	0,17	100	114	100	668
45	0,18	100	198	98	1082
46	0,15	100	184	99	1189

47	0,16	100	232	99	1460
48	0,07	100	402	96	5610
49	0,19	100	89	99	461
50	0,18	100	8,1	99	46
51	0,14	100	13	100	92
52	0,15	100	770	97	5203
53	0,11	100	901	98	8130
54	0,17	100	150	99	898
55	0,18	100	137	100	746
56	0,17	100	55	100	328
57	0,12	100	624	99	5225
58	0,18	100	476	99	2588
59	0,17	100	467	99	2770
60	0,12	100	444	100	3759
61	0,10	100	89	100	934
62	0,14	100	85	100	592
63	0,10	101	85	98	848
64	0,12	101	1246	99	10594
65	0,06	101	318	100	5492
66	0,08	101	84	100	1027
67	0,09	101	103	99	1094
68	0,06	101	18	100	300
69	0,13	100	64	100	497
70	0,15	100	107	100	727
Hợp chất tham chiếu 1	0,20	100	42	98	210
Hợp chất tham chiếu 2	0,52	100	200	100	387
Hợp chất tham chiếu 3	4,1	100	35	101	9

Các phương án khác nằm trong phạm vi của các điểm yêu cầu bảo hộ sau đây.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Hợp chất có công thức (I) hoặc muối được dụng của nó:



trong đó

m là 0, 1, 2, 3, 4, hoặc 5;

p là 0, 1, 2, hoặc 3;

A là liên kết cacbon-cacbon đơn hoặc đôi;

Ar^1 là aryl hoặc heteroaryl 5 hoặc 6 cạnh, mỗi nhóm này tùy ý được thế bằng một hoặc nhiều phân tử thế, mỗi phân tử thế độc lập là halogen, nitro, C_1 - C_4 alkyl, C_1 - C_4 hydroxyalkyl, OR_a , hoặc $N(R_aR_{a'})$, trong đó mỗi R_a độc lập là H hoặc C_1 - C_4 alkyl và mỗi $R_{a'}$ độc lập là H hoặc C_1 - C_4 alkyl;

Ar^2 là aryl hoặc heteroaryl 5 hoặc 6 cạnh, mỗi nhóm này tùy ý được thế bằng một hoặc nhiều phân tử thế, mỗi phân tử thế độc lập là halogen, xyano, nitro, C_1 - C_4 alkyl, C_1 - C_4 aminoalkyl, C_1 - C_4 hydroxyalkyl, OR_b , $N(R_bR_{b'})$, $C(O)-N(R_bR_{b'})$, hoặc $NH-C(O)-N(R_bR_{b'})$, trong đó mỗi R_b độc lập là H hoặc C_1 - C_4 alkyl và mỗi $R_{b'}$ độc lập là H hoặc C_1 - C_4 alkyl;

Ar^3 là aryl hoặc heteroaryl 5 hoặc 6 cạnh, mỗi nhóm này tùy ý được thế bằng một hoặc nhiều phân tử thế, mỗi phân tử thế độc lập là halogen, C_1 - C_4 alkyl, C_1 - C_4 hydroxyalkyl, OR_c , hoặc $N(R_cR_{c'})$, trong đó mỗi R_c độc lập là H hoặc C_1 - C_4 alkyl và mỗi $R_{c'}$ độc lập là H hoặc C_1 - C_4 alkyl;

mỗi R^1 độc lập là C_1 - C_4 alkyl, C_1 - C_4 aminoalkyl, C_1 - C_4 hydroxyalkyl, OR_d , hoặc $C(O)-N(R_dR_{d'})$, trong đó mỗi R_d độc lập là H hoặc C_1 - C_4 alkyl và mỗi $R_{d'}$ độc lập là H hoặc C_1 - C_4 alkyl;

R^2 là $-(CH_2)_n-R$, trong đó n là 0, 1, 2, hoặc 3 và R là guanidino, aminoaxyl, C_1 - C_4 alkylaminoaxyl, OR_e , $N(R_eR_{e'})$, $NH-C(O)-CH(NH_2)-(CH_2)_4-N(R_eR_{e'})$, $NH-C(O)-CH_2-(OCH_2CH_2)_2-N(R_eR_{e'})$ được thế hoặc không được thế, hoặc heteroxycloalkyl 5 cạnh tùy ý được thế bằng C_1 - C_4 alkyl hoặc $N(R_eR_{e'})$, trong đó mỗi R_e độc lập là H hoặc C_1 - C_4 alkyl và mỗi $R_{e'}$ độc lập là H hoặc C_1 - C_4 alkyl; và

mỗi R^3 độc lập là halogen, C_1 - C_4 alkyl, hoặc OR_f , trong đó mỗi R_f độc lập là H hoặc C_1 - C_4 alkyl;

với điều kiện là, nếu n là 0, R không phải là amino hoặc guanidino và nếu gốc axit amin liên kết với $Ar^1C(O)$ là L-Val, Ar^1 không phải là phenyl không được thế.

2. Hợp chất theo điểm 1, trong đó Ar^1 là phenyl, pyridinyl, oxazolyl, thiazolyl, imidazolyl, pyrimidinyl, pyrrolyl, hoặc triazolyl, mỗi nhóm này tùy ý được thế bằng một hoặc nhiều phần tử thế, mỗi phần tử thế độc lập là F, Cl, NO_2 , CH_3 , CH_2OH , hoặc NH_2 .
3. Hợp chất theo điểm 1, trong đó Ar^2 là phenyl hoặc pyridinyl, mỗi nhóm này tùy ý được thế bằng một hoặc nhiều phần tử thế, mỗi phần tử thế độc lập là CH_2NH_2 , $C(O)NH_2$, OH, CN, CH_2OH , NH_2 , hoặc $NH-C(O)-NH_2$.
4. Hợp chất theo điểm 1, trong đó Ar^3 là pyridinyl.
5. Hợp chất theo điểm 1, trong đó m là 1.
6. Hợp chất theo điểm 5, trong đó R^1 là OH, $C(O)NH_2$, hoặc CH_2NH_2 .
7. Hợp chất theo điểm 1, trong đó n là 0, 1, hoặc 2.
8. Hợp chất theo điểm 1, trong đó R là $N(R_eR_{e'})$, $NH-C(O)-CH(NH_2)-(CH_2)_4-N(R_eR_{e'})$, $NH-C(O)-CH_2-(OCH_2CH_2)_2-N(R_eR_{e'})$, triazolyl tùy ý được thế bằng NH_2 , hoặc guanidino tùy ý được thế bằng CN hoặc CH_3 , trong đó mỗi R_e độc lập là H hoặc C_1 - C_3 alkyl và mỗi $R_{e'}$ độc lập là H hoặc C_1 - C_3 alkyl.
9. Hợp chất theo điểm 1, trong đó R là NH_2 , $N(CH_3)_2$, $N(CH_2CH_3)_2$, $NH(CH(CH_3)_2)$, $NH-C(O)-CH(NH_2)-(CH_2)_4-N(CH_3)_2$, $NH-C(O)-CH_2-(OCH_2CH_2)_2-$

NH₂, NH-C(O)-CH₂-(OCH₂CH₂)₂-NH(CH(CH₃)₂), 3-amino-1,2,4-triazol-5-yl, hoặc guanidino tùy ý được thế bằng CN hoặc CH₃.

10. Hợp chất theo điểm 1, trong đó p là 0.

11. Hợp chất theo điểm 1, trong đó hợp chất này là oxazol-2-carbonyl-D-Val-Phe(2-Cbm)-c(Cys-Orn(iPr)-Asp-Val-Gly-Pro-Phe-Cys)-3Pal-NH₂.

12. Hợp chất theo điểm 1, trong đó hợp chất này là:

Picolinoyl-D-Val-Tyr-c(Cys-Dab(Et₂)-Asp-Val-Gly-Pro-Phe-Cys)-3Pal-NH₂;

Picolinoyl-D-Val-Tyr-c(Cys-Dab(iPr)-Asp-Val-Gly-Pro-Phe-Cys)-3Pal-NH₂;

Picolinoyl(5-F)-D-Val-Tyr-c(Cys-Orn(iPr)-Asp-Val-Gly-Pro-Phe-Cys)-3Pal-NH₂;

Picolinoyl-D-Val-Tyr-c(Cys-Orn(Et₂)-Asp-Val-Gly-Pro-Phe-Cys)-3Pal-NH₂;

Picolinoyl-D-Val-Tyr-c(Cys-Orn-Asp-Val-Gly-Pro-Phe(4-CH₂OH)-Cys)-3Pal-NH₂;

Picolinoyl(3,5-F₂)-D-Val-Tyr-c(Cys-Arg-Asp-Val-Gly-Pro-Phe-Cys)-3Pal-NH₂;

Picolinoyl(5-F)-D-Val-Phe(2-Cbm)-c(Cys-Orn(iPr)-Asp-Val-Gly-Dhp-3Pal-Cys)-3Pal-NH₂;

Picolinoyl(5-F)-D-Val-Phe(2-Cbm)-c(Cys-Orn(iPr)-Asp-Val-Gly-Pro-3Pal-Cys)-3Pal-NH₂;

Oxazol-2-carbonyl-D-Val-Phe(2-Cbm)-c(Cys-Orn(iPr)-Asp-Val-Gly-Pro-3Pal-Cys)-3Pal-NH₂;

Oxazol-2-carbonyl-D-Val-Phe(2-Cbm)-c(Cys-Orn(iPr)-Asp-Val-Gly-Dhp-Phe(3-CH₂NH₂)-Cys)-3Pal-NH₂;

1H-1,2,4-triazol-5-carbonyl(3-Me)-D-Val-Tyr-c(Cys-Arg-Asp-Val-Gly-Pro-Phe(2-CH₂NH₂)-Cys)-3Pal-NH₂;

Oxazol-2-carbonyl-D-Val-Phe(2-Cbm)-c(Cys-Orn(iPr)-Asp-Val-Gly-Dhp-4Aph-Cys)-3Pal-NH₂;

Oxazol-2-carbonyl-D-Val-Phe(2-Cbm)-c(Cys-Orn(iPr)-Asp-Val-Gly-Dhp-4Uph-Cys)-3Pal-NH₂;

Picolinoyl(5-F)-D-Val-Tyr-c(Cys-Orn(iPr)-Asp-Val-Gly-Pro-Phe(4-CH₂OH)-Cys)-3Pal-NH₂;

Picolinoyl(3,5-F₂)-D-Val-Tyr-c(Cys-Orn(iPr)-Asp-Val-Gly-Pro-Phe-Cys)-3Pal-NH₂;

Picolinoyl(5-F)-D-Val-Phe(2-Cbm)-c(Cys-Orn(iPr)-Asp-Val-Gly-Dhp-Phe(4-CH₂OH)-Cys)-3Pal-NH₂;

Oxazol-2-carbonyl-D-Val-Phe(2-Cbm)-c(Cys-Orn(iPr)-Asp-Val-Gly-Pro-Phe(4-CH₂OH)-Cys)-3Pal-NH₂;

Oxazol-2-carbonyl-D-Val-Phe(2-Cbm)-c(Cys-Orn(iPr)-Asp-Val-Gly-Dhp-Phe(3-Cbm)-Cys)-3Pal-NH₂;

Picolinoyl(5-F)-D-Val-Phe(2-Cbm)-c(Cys-Orn(iPr)-Asp-Val-Gly-Dhp-Phe(2-Cbm)-Cys)-3Pal-NH₂;

Oxazol-2-carbonyl-D-Val-Tyr-c(Cys-Orn(iPr)-Asp-Val-Gly-Dhp-Phe(3-Cbm)-Cys)-3Pal-NH₂;

Picolinoyl(5-F)-D-Val-Tyr-c(Cys-Orn(iPr)-Asp-Val-Gly-Dhp-Phe(3-Cbm)-Cys)-3Pal-NH₂; hoặc

Picolinoyl-D-Val-Tyr-c(Cys-Orn(iPr)-Asp-Val-Gly-Dhp-Phe(4-CH₂OH)-Cys)-3Pal-NH₂.

13. Dược phẩm chứa hợp chất theo điểm 1 và chất mang dược dụng.

14. Dược phẩm theo điểm 13, trong đó dược phẩm này chứa dung dịch nước.

15. Dược phẩm theo điểm 14, trong đó dược phẩm này chứa dung dịch nước natri clorua.

16. Dược phẩm theo điểm 15, trong đó dung dịch nước chứa khoảng 0,9% khối lượng natri clorua.