



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

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



1-0035704

(51)⁸ C07D 407/12; A61P 31/16; C09K 9/00; (13) B
C07D 407/14; A61K 31/351

-
- (21) 1-2018-02664 (22) 16/11/2016
(86) PCT/AU2016/051100 16/11/2016 (87) WO 2017/083914 26/05/2017
(30) 2015904895 20/11/2015 AU
(45) 25/05/2023 422 (43) 26/11/2018 368A
(73) AusVir Therapeutics Pty Ltd (AU)
c/o Shinewing Australia, Level 10, 530 Collins Street, Melbourne, VIC 3000,
Australia
(72) Betty JIN (AU); Ee-Ling SEAH (AU); Paul Arthur JONES (AU); Peter James
JENKINS (AU); Henry Kenneth WINDLE (AU); Wen Yang WU (AU).
(74) Công ty cổ phần tư vấn Trung Thực (TRUNG THUC.,JSC)
-

(54) HỢP CHẤT DÙNG ĐỂ CHỮA BỆNH VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA NÓ

(57) Sáng chế đề xuất các hợp chất để dùng trong việc điều trị và/hoặc phòng bệnh cúm. Hợp chất này chứa miền thứ nhất và miền thứ hai, trong đó miền thứ nhất chứa ít nhất là một nhóm neo mà liên kết với bề mặt của các virus cúm và miền thứ hai chứa ít nhất là một nhóm anion. Miền thứ nhất và miền thứ hai được liên kết cộng hóa trị. Sáng chế còn đề xuất các muối dược dụng, các solvat, các tiền dược chất hoặc các chất đồng phân lập thể của các hợp chất này cũng như dược phẩm chứa chúng.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến các hợp chất dùng để chữa bệnh, cụ thể là để điều trị hoặc phòng ngừa bệnh do nhiễm các virus. Sáng chế còn đề cập đến các phương pháp điều chế các hợp chất.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Bệnh cúm là căn bệnh lây truyền qua đường hô hấp mà có từ 5% đến 25% dân số Mỹ mắc phải mỗi năm, khoảng 200.000 trong số họ phải nhập viện và 25.000 người chết. Lây cúm còn là nguy cơ thường trực đối với sức khỏe của con người và là gánh nặng đối với dịch vụ y tế. Rất gần đây, sự xuất hiện của các virus H5N1 và H7N9 có khả năng gây bệnh cao từ các nguồn gia cầm, và tiềm năng của chúng trong sự lây nhiễm ở người làm tăng nguy cơ liên quan đến việc lây cúm. Mặc dù vaccin vẫn là nền tảng cho việc phòng ngừa, cần thời gian đáng kể để phát triển vaccin hữu hiệu kháng lại các đột biến thông thường của chủng virus mới bất kỳ. Các thuốc chống cúm như các chất ức chế neuraminidaza của virus (các chất ức chế NA), bao gồm Zanamivir (Relenza) và Oseltamivir (Tamiflu) và chất ức chế kênh ion M2 thu được từ các adamantan, kể cả amantadin và rimantadin, là sẵn có và đã được đưa ra thị trường trong 20 năm, nhưng hiệu quả của chúng bị hạn chế bởi cơ chế hoạt động. Hiệu quả của chúng còn chịu tác động của đột biến của virus và sự hình thành của tính kháng thuốc tiếp.

Ví dụ, các chất ức chế kênh ion M2 hiện nay không được đề xuất sử dụng vì hầu hết các A virus A theo mùa trong tuần hoàn (kể cả H1N1pcim09), mang đột biến điểm S31N ở gen M2 mà truyền tính kháng cả amantadin và rimantadin. Điều này dẫn đến sự phụ thuộc đáng kể vào các chất ức chế NA thay thế như Zanamivir, Oseltamivir và Peramivir.

Các chất ức chế NA tác động đến sự tập hợp và nảy nở của virus cúm A trong chu kỳ sống của virus. Đối với các virion thế hệ con cần được giải phóng ra từ tế bào, neuraminidaza (NA) phải phân cắt nhóm axit sialic từ glycoprotein của vật chủ, mà là thiết yếu đối với sự lan truyền và nhiễm lại virus. Do đó, việc phong bế chức năng của neuraminidaza bằng các chất ức chế đặc hiệu (các chất ức chế NA) là một cách điều trị

bệnh cúm. Tuy nhiên, vì sự ức chế này xảy ra ở giai đoạn muộn của chu kỳ sống của virus (tức là, sau khi virus thâm nhập vào, sao chép, tập hợp, và nảy nở trên bề mặt tế bào), nhiều tổn thương đã kịp xảy ra đối với tế bào. Hơn thế nữa, chỉ virus nảy nở trên bề mặt tế bào chịu tác động. Hệ thống virus còn không bị ức chế có thể làm nhiễm tế bào mới. Điều này dẫn đến sự tiến triển nặng của bệnh. Để làm giảm mức độ nghiêm trọng của bệnh, cửa sổ điều trị tối ưu để điều trị bệnh bằng các thuốc ức chế NA là ở giai đoạn sớm trong tiến triển của bệnh này. Tuy nhiên, vì hiệu quả điều trị bệnh của hoạt chất nhất định thường được xác định theo cơ chế hoạt động, nên các thuốc ức chế NA được xem là tương đối nhẹ và có lợi ích hạn chế về mặt lâm sàng.

Cần có các cách thức mới để điều trị cúm.

Chu kỳ sống của cúm A bao gồm vài bước:

(a) virus cúm A có màng bao hai lớp lipid, trong đó có tám đoạn hệ gen ARN, mà mỗi đoạn liên quan đến polymeraza ARN của virus ở dạng trime (PB1, PB2, PA) và phủ nhiều nucleoprotein (NP) để tạo ra vRNP. Lớp ngoài của màng bao lipid được ghim bằng nhiều bản sao của HA, NA và số lượng ít M2, trong khi các phân tử M1 giữ vRNP gắn vào lớp trong.

(b) Glycoprotein bề mặt của virus HA liên kết với các thụ thể axit sialic bề mặt tế bào chủ, và virus được vận chuyển vào tế bào trong nang vùi vào trong tế bào. Độ pH thấp ở thể nhân gây ra thay đổi cấu hình ở protein HA mà dẫn đến sự dung hợp của màng của virus và màng thể trong nhân đơn bào. Độ pH thấp còn gây ra dòng proton vào virus thông qua kênh ion M2, nhờ đó phân ly vRNP ra khỏi các protein nền M1. Khi các phân tử M1 bị phân ly, thì vRNP mà được giải phóng vào tế bào chất được vận chuyển vào nhân nhờ nhận diện các trình tự định vị của nhân (NLS) trên các nucleoprotein.

(c) Trong nhân, polymeraza của virus khởi đầu quá trình tổng hợp ARN thông tin của virus nhờ các đoạn ARN 5' có chóp được phân cắt từ tiền-ARN thông tin của vật chủ. Cấu trúc siêu phân tử PB2 liên kết chóp ở đầu tận cùng 5' của tiền-ARN thông tin của vật chủ, và miền endonucleaza ở cấu trúc siêu phân tử PA phân cắt tiền-ARN thông tin 10 đến 13 nucleotit sau chóp này. Tiếp đó, sự phiên mã ARN thông tin của virus được khởi đầu từ đầu tận cùng 3' đã được phân cắt của đoạn ARN có chóp. Việc “chộp lấy chóp” này xảy ra trên các tiền-ARN thông tin mới sản sinh.

(d) các ARN thông tin của virus được vận chuyển đến tế bào chất để dịch mã thành các protein của virus. Các protein bề mặt HA, M2 và NA được xử lý ở lưới nội chất (ER), được glycosyl hóa ở thiết bị Golgi và được vận chuyển đến màng tế bào.

(e) Protein NS1 của virus cúm A đóng vai trò quan trọng trong việc kìm hãm quá trình sản xuất ARN thông tin của vật chủ bằng cách ức chế việc xử lý đầu tận cùng 3' của tiền-ARN thông tin của vật chủ, tiếp đó phong bế quá trình sản xuất ARN thông tin của vật chủ, kể cả các ARN thông tin interferon- β . Không giống như tiền-ARN thông tin của vật chủ, các ARN thông tin của virus không cần xử lý đầu tận cùng 3' bởi cơ cấu của tế bào chủ. Do đó, các ARN thông tin của virus được vận chuyển đến tế bào chất, trong khi quá trình tổng hợp ARN thông tin của vật chủ bị phong bế phần lớn.

(f) polymeraza của virus chịu trách nhiệm về không chỉ về quá trình tổng hợp ARN thông tin được môi bằng ARN có chóp mà còn quá trình sao chép không được môi của các ARN của virus như sau:

(-) ARN của virus $\rightarrow$ (+) ARN hỗ trợ $\rightarrow$ (-) ARN của virus.

Các phân tử nucleoprotein là cần thiết cho hai bước này của quá trình sao chép và được đặt trên ARN hỗ trợ và ARN của virus trong quá trình tổng hợp ARN. Tiếp đó, các vRNP thu được được vận chuyển đến tế bào chất, gián tiếp nhờ phức M1-NS2 mà liên kết với các vRNP; NS2 tương tác với protein CRM1 của người mà xuất vRNP ra khỏi nhân.

(g) Các vRNP đến được màng tế bào để được kết hợp vào các virus mới mà được nảy ra. Các protein HA và NA ở các virus mới chứa các axit sialic đầu tận cùng mà sẽ khiến các virus kết với nhau thành khối và bám dính vào bề mặt tế bào. NA của các virus mới tạo ra phân cắt các gốc axit sialic này, nhờ đó giải phóng virus ra khỏi tế bào chủ.

Ở các bước (a) và (b) của chu kỳ sống của virus cúm, glycoprotein bề mặt của virus chất gây nên sự đóng cục của tế bào máu (haemagglutinin - HA) liên kết với các thụ thể axit sialic trên tế bào chủ, tiếp theo là quá trình tiêu hóa vật lạ của tế bào gián tiếp nhờ thụ thể của virus này vào trong tế bào. Độ pH thấp ở thể nhân khởi đầu sự thay đổi cấu hình ở protein HA, mà dẫn đến việc dung hợp màng của virus và màng của thể vùi trong nhân đơn bào. Trong quá trình đó, độ pH thấp còn khởi đầu dòng proton vào virus thông qua kênh ion M2, nhờ đó giải phóng nguyên liệu di truyền của virus đến nhân để bắt đầu quá trình nhiễm virus trong tế bào.

Nhận thấy rằng việc phơi nhiễm virus với độ pH thấp ở môi trường bên ngoài tế bào làm bất hoạt virus. Đã thấy rằng thuốc xịt gel vào mũi có độ pH thấp ngăn chặn các virus cúm *in vitro* và bảo vệ chồn khỏi bị lây cúm. Tuy nhiên, trong các thử nghiệm này nồng độ hữu hiệu các axit là khoảng 0,15M (độ pH khoảng 3,5). Hơn nữa, cần có tiếp xúc với virus để có tác dụng diệt virus. Ngoài ra, thuốc xịt chỉ có hiệu quả trong khi các giai đoạn sớm của hiện tượng nhiễm virus. Mặc dù trị số độ pH gần bằng 3,5 có thể đạt được bằng cách dùng thuốc xịt mũi có đệm pH 3,5, cách phân phối đến mũi này có hạn chế, mà liên quan đến thời gian lưu sản phẩm tương đối ngắn ở mũi do cơ chế làm sạch mao biểu mô bề mặt khí quản. Thời gian lưu trú thông thường của dung dịch được dùng qua đường mũi ở người nằm trong khoảng từ 12 phút đến 15 phút.

Hơn nữa, trong trường hợp điều trị nhiễm virus, dung dịch đệm axit cần phải được phân phối sâu vào đường hô hấp. Có thể là tính axit của dung dịch đệm này sẽ gây kích ứng và hiện tượng không dung nạp ở người. Do đó, thuốc xịt mũi có tính axit sẽ là không thích hợp để làm các tác nhân dùng để điều trị bệnh nhiễm virus cúm vì chúng cơ bản bị giới hạn và không đặc hiệu.

Các hợp chất polyanionic có các đặc tính hấp dẫn làm các tác nhân kháng HIV. Phổ hoạt tính kháng virus của các polyanion mở rộng đến nhiều loại virus được bao màng, kể cả ortho-myxo virus và para-myxo virus (các virus cúm). Đã thấy rằng các polyanion này ức chế quá trình sao chép virus ở giống cây tế bào ở nồng độ nằm trong khoảng từ 0,1 μ g/ml đến 1 μ g/ml. Một cách có lợi, các hợp chất này là không độc đối với tế bào ở nồng độ thậm chí cao hơn đến 10.000 lần. Tuy nhiên, các chất này có nhiều hạn chế về dược động học và độc tính mà có vẻ ảnh hưởng đến ứng dụng lâm sàng của chúng, ví dụ, trong dòng máu chúng có thể bị giữ lại bởi các protein khác nhau của huyết tương trước khi đến được vị trí hoạt động của chúng. Ngoài ra, một số các polysaccharit đã được sulphat hóa đã được biết đến vì hoạt tính chống đông không mong muốn.

Có nhu cầu về các tác nhân kháng virus mới mà có tác dụng đối với bệnh cúm. Cụ thể, cần đến các tác nhân kháng virus mới mà thể hiện một hoặc nhiều trong số các đặc tính dưới đây: i) mức độ hiệu nghiệm cao đối với các virus cúm, ii) tác động nhanh để kiểm soát nhiễm khuẩn, iii) hoạt tính kháng virus phổ rộng (kể cả cúm A, B, cúm gia cầm), iv) hiệu quả đối với các chủng kháng thuốc, v) xu hướng chậm kháng thuốc, vi) khoảng thời gian hiệu nghiệm kéo dài, vii) mức độ chọn lọc cao, viii) cửa sổ điều trị tốt

hơn; ix) độc tính thấp, x) ít tác dụng phụ hơn và/hoặc xi) thích hợp cho ứng dụng điều trị và ứng dụng phòng ngừa.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất các hợp chất và các phương pháp điều trị và/hoặc ngăn ngừa lây nhiễm cúm.

Các hợp chất theo sáng chế, còn được gọi là “các hợp chất xử lý bề mặt”, được xem là làm thay đổi bề mặt của virus, chuyển hóa bề mặt này thành môi trường vi axit/anion để cản trở một cách chọn lọc chu kỳ sống của virus, bao gồm các bước (a) và (b) nêu trên.

Mục đích này được tin là đạt được nhờ các hợp chất theo sáng chế mà tổ hợp nhóm mà liên kết với virus cúm và với (các) nhóm axit hoặc nhóm anion mà hoạt động để cản trở liên kết của chất gây nên sự đóng cục của tế bào máu với tế bào. Đây là ưu điểm khi các hợp chất theo sáng chế hoạt động để phòng ngừa nhiễm tế bào và thể hiện tác dụng của nó ngoài tế bào. Việc này không cần phân tử xâm lấn tế bào mà sẽ khiến độc tính thấp hơn và/hoặc ít tác dụng phụ hơn.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất hợp chất chứa miền thứ nhất và miền thứ hai,

miền thứ nhất chứa ít nhất một nhóm neo mà liên kết với bề mặt của các virus cúm; và

miền thứ hai chứa ít nhất một nhóm anion;

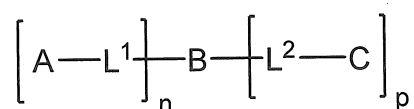
hoặc muối được dụng, solvat, tiền được chất hoặc chất đồng phân lập thể của chúng,

trong đó miền thứ nhất và miền thứ hai được liên kết cộng hóa trị.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất các hợp chất, trong đó miền thứ nhất và miền thứ hai được liên kết cộng hóa trị qua ít nhất một nhóm liên kết hóa trị hai.

Theo các khía cạnh khác nữa, các hợp chất theo sáng chế có thể còn bao gồm nhóm khung đa hóa trị.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất các hợp chất có công thức (I):



Công thức (I)

hoặc muối được dụng, solvat, tiền được chất hoặc chất đồng phân lập thể của chúng, trong đó:

mỗi A là một nhóm neo;

B là nhóm khung đa hóa trị;

mỗi C là một nhóm anion;

mỗi L^1 và L^2 là các nhóm liên kết hóa trị hai;

n là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 4; và

p là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 3.

Theo các khía cạnh khác, sang chế đề xuất các được phẩm chứa hợp chất theo sáng chế hoặc muối được dụng, solvat, tiền được chất hoặc chất đồng phân lập thể của nó. Theo các khía cạnh khác, sáng chế đề xuất việc sử dụng hợp chất theo sáng chế trong muối được dụng, solvat, tiền được chất hoặc chất đồng phân lập thể của nó trong việc bào chế thuốc dùng để điều trị hoặc phòng ngừa nhiễm virus cúm.

Theo các khía cạnh khác, sang chế đề xuất các phương pháp điều trị hoặc phòng ngừa nhiễm virus cúm, bao gồm việc dùng cho người có nhu cầu điều trị lượng hữu hiệu để điều trị bệnh của hợp chất theo sáng chế hoặc muối được dụng, solvat, tiền được chất hoặc chất đồng phân lập thể của nó.

Theo một số khía cạnh, nhiễm virus cúm là cúm A, cúm B, cúm gia cầm hoặc chủng cúm kháng thuốc.

Trừ khi có quy định rõ ràng khác, tất cả các thuật ngữ kỹ thuật và thuật ngữ khoa học được dùng trong bản mô tả này có cùng nghĩa như thường được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật của sáng chế.

Các giải pháp kỹ thuật đã biết nêu trong bản mô tả này không là, và không nên được hiểu là, sự xác nhận hoặc hình thức ám chỉ bất kỳ rằng các giải pháp đã biết đó tạo ra một phần của kiến thức chung thông thường.

Tất cả các tài liệu viện dẫn đều được đưa hoàn toàn vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1: Tóm tắt các điều kiện thay đổi để xử lý sơ bộ virus (A/Sydney/250/99 hoặc A/Sydney/5/97) bằng các hợp chất thử nghiệm trước khi nhiễm tế bào MDCK.

Hình 2: Xử lý sơ bộ virus (A/Sydney/250/99) bằng các hợp chất thử nghiệm trước khi nhiễm tế bào MDCK, A) MD348, B) MD345, và C) Zanamivir (đối chứng).

Hình 3: Xử lý sơ bộ virus (A/Sydney/5/97) bằng các hợp chất thử nghiệm trước khi nhiễm tế bào MDCK, A) MD348, B) MD345, và C) Zanamivir (đối chứng).

Hình 4: Xử lý sơ bộ virus (A/Sydney/250/99) bằng MD345 (hợp chất thử nghiệm) và Zanamivir (đối chứng) trong các khoảng thời gian khác nhau và các điều kiện khác nhau trước khi nhiễm tế bào MDCK.

Hình 5: so sánh hoạt tính kháng virus của MD314-1 và MD021-7 đối với A/Sydney/5/97 (H3N2).

Hình 6: so sánh hoạt tính kháng virus của MD314-1 và MD021-7 đối với A/Mississippi/03/01 (H1N1) loại thường.

Hình 7: so sánh hoạt tính kháng virus của MD021-7 và MD051-3 đối với A/Mississippi/03/01 (H1N1) loại thường.

Hình 8: so sánh hoạt tính kháng virus của MD021-7 và MD051-3 đối với A/Mississippi/03/01 (H1N1) H274Y (kháng Oseltamivir).

Hình 9: so sánh hoạt tính kháng virus của MD314-1 và MD021-7 đối với A/Mississippi/03/01 (H1N1) H274Y (kháng Oseltamivir).

Hình 10: Tóm tắt diễn tiến theo thời gian của việc điều trị, nhiễm và thu nhận cơ quan để đánh giá về tỷ lệ thanh thải virus ở phổi và cuốn mũi ở chuột nhắt.

Hình 11: So sánh chuẩn độ virus ở phổi ở chuột nhắt để đánh giá về tỷ lệ thanh thải virus bằng MD021, Zanamivir và PBS.

Hình 12: So sánh chuẩn độ virus ở phổi ở chuột nhắt để đánh giá về tỷ lệ thanh thải virus bằng MD021, Zanamivir và PBS vào ngày thứ 1, 3, 5 và 7 sau khi nhiễm.

Hình 13: So sánh chuẩn độ virus được biểu diễn theo tỷ lệ phần trăm so với trung bình của nhóm đối chứng PBS.

Hình 14: So sánh mức giảm cân ở chuột nhắt để đánh giá về tỷ lệ thanh thải virus bằng MD021, Zanamivir và PBS.

Hình 15: Trung hòa A/California/7/09 (pan H1N1) *in vitro*.

Mô tả chi tiết sáng chế

Như đã nêu trên, các hợp chất theo sáng chế được xem là làm thay đổi bề mặt của virus, chuyển hóa bề mặt thành môi trường vi axit/anion để cản trở một cách chọn lọc các bước trong chu kỳ sống của virus.

Tin tưởng rằng các nhóm axit/anion của các hợp chất theo sáng chế chuyển hóa bề mặt của virus thành môi trường vi axit/anion mà làm giảm hoặc làm bất hoạt hoạt tính của virus. Hơn thế nữa, tin rằng các hợp chất này hoạt động ngoài tế bào và do đó có thể liên quan đến tỷ lệ mắc tác dụng phụ giảm, độc tính giảm và/hoặc xu hướng kháng giảm. Cụ thể hơn, tin rằng các hợp chất theo sáng chế hoạt động ngoài tế bào tại nhiều thời điểm đích trong chu kỳ sống của virus bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở:

- Các nhóm axit/anion tạo ra độ pH thấp tại bề mặt của virus, mà khởi đầu thay đổi sớm về cấu hình ở protein là chất gây nên sự đóng cục của tế bào máu (haemagglutinin - HA), mà tiếp đó có thể làm giảm hoặc trì hoãn bước dung hợp virus và các tế bào. Điều này là đặc hiệu đối với chu kỳ sống của virus bước (b) nêu trên.
- Ngoài ra, tin rằng sự tạo ra môi trường có độ pH thấp trên bề mặt của virus phát ra dòng proton vào virus thông qua kênh ion M2, mà có thể khiến giải phóng nguyên liệu di truyền ra ngoài tế bào. Điều này là đặc hiệu đối với bước (b) của chu kỳ sống của virus nêu trên.
- Tin tưởng rằng các nhóm neo của các hợp chất theo sáng chế có thể liên kết chéo NA/HA và tập hợp các phần tử của virus để làm giảm độ linh động và khả năng lây nhiễm của virus. Điều này là đặc hiệu đối với các bước (a) & (b) của chu kỳ sống của virus nêu trên.
- Tin tưởng rằng các nhóm neo ức chế chức năng của neuraminidase (NA) để làm giảm hoặc phòng tránh sự giải phóng các virus mới ra khỏi màng tế bào. Điều này là đặc hiệu đối với bước (g) của chu kỳ sống của virus nêu trên.

Tin tưởng rằng sự phá vỡ các bước (a) và (b) của chu kỳ sống của virus có thể làm giảm mức độ nghiêm trọng tiềm năng của hiện tượng nhiễm bằng cách làm giảm khả năng lây nhiễm của virus bao gồm sự xâm nhập của virus vào tế bào, sự phá vỡ chức năng thông thường của nhân tế bào bởi virus, và/hoặc sao chép virus. Do đó, cho rằng việc dùng các hợp chất theo sáng chế có thể là cách điều trị hiệu quả hơn đối với hiện tượng nhiễm virus và/hoặc khiến bệnh nhân hồi phục nhanh hơn các thuốc ức chế NA hiện có.

Còn tin rằng các hợp chất theo sáng chế có thể được dùng nhằm mục đích phòng ngừa lây nhiễm cúm.

Do đó, theo một khía cạnh, sáng chế hợp chất chứa miền thứ nhất và miền thứ hai, miền thứ nhất chứa ít nhất một nhóm neo mà liên kết với bề mặt của các virus cúm; và

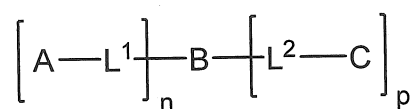
miền thứ hai chứa ít nhất một nhóm anion;

hoặc muối được dụng, solvat, tiền được chất hoặc chất đồng phân lập thể của chúng,

trong đó miền thứ nhất và miền thứ hai được liên kết cộng hóa trị.

Theo một số khía cạnh, miền thứ nhất và miền thứ hai có thể được liên kết cộng hóa trị qua ít nhất một nhóm liên kết hóa trị hai. Theo các khía cạnh khác, các hợp chất theo sáng chế có thể còn bao gồm nhóm khung đa hóa trị.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất các hợp chất có công thức (I):



Công thức (I)

hoặc muối được dụng, solvat, tiền được chất, este hoặc chất đồng phân lập thể của chúng, trong đó:

mỗi A là một nhóm neo;

B là nhóm khung đa hóa trị;

mỗi C là một nhóm anion;

mỗi L^1 và L^2 là các nhóm liên kết hóa trị hai;

n là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 4; và

p là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 4.

Các thuật ngữ "hợp chất theo sáng chế" hoặc "hợp chất có công thức (I)" được dùng trong bản mô tả này có nghĩa là hợp chất hoặc muối được dụng, solvat, tiền được chất, este hoặc chất đồng phân lập thể của nó, hoặc dẫn xuất có chức năng về mặt sinh lý học của nó.

Thuật ngữ "nhóm neo" được dùng trong bản mô tả này để chỉ nhóm thích hợp bất kỳ mà liên kết với bề mặt của các virus cúm. Theo một số phương án, nhóm neo là nhóm mà liên kết với neuraminidaza, như chất ức chế neuraminidaza hoặc chất dẫn xuất của

nó. Các ví dụ về nhóm thích hợp bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, axit sialic hoặc chất dẫn xuất của nó, kể cả các chất dẫn xuất được thế *N*- hoặc *O*- của axit neuraminic như zanamivir hoặc laninamivir, oseltamivir, peramivir, các axit 2,3-điflo sialic (DFSA) và các chất dẫn xuất của chúng. Theo các phương án khác, nhóm neo chứa miền liên kết kháng thể mà liên kết một cách đặc hiệu với neuraminidaza. Các ví dụ về nhóm neo thích hợp chứa miền liên kết kháng thể mà liên kết một cách đặc hiệu với neuraminidaza bao gồm kháng thể (Ab) hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của kháng thể, chuỗi đơn đoạn kháng thể (scFV) hoặc kháng thể đơn miền (dAb).

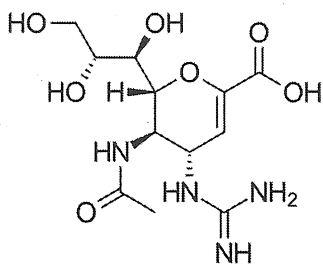
Thuật ngữ “nhóm khung” được dùng trong bản mô tả này để chỉ nhóm đa hóa trị thích hợp bất kỳ mà một hoặc nhiều nhóm neo và một hoặc nhiều nhóm axit hoặc nhóm anion được gắn vào. Theo một số khía cạnh, nhóm khung có thể là nhóm có ba hóa trị. Theo các khía cạnh khác, nhóm khung có thể là nhóm có bốn hóa trị. Các ví dụ về các nhóm khung thích hợp bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, propan-1,2,3-tricarboxylat tùy ý được thế, xyclohexan-1,3,5-tricarboxylat tùy ý được thế, và benzen-1,2,4,5-tetracarboxylat tùy ý được thế.

Các thuật ngữ “nhóm axit hoặc nhóm anion” và “nhóm axit/anion” được dùng để chỉ nhóm chức thích hợp bất kỳ có đặc tính axit và/hoặc đặc tính anion mà tác động để cản trở liên kết của chất gây nên sự đóng cục của tế bào máu với tế bào. Đặc biệt, thuật ngữ “anion” mô tả điện tích thực âm của nhóm chức hoặc nguyên liệu. Cần phải hiểu rằng nguyên liệu nhất định tích điện âm có thể có một hoặc nhiều ion trái dấu tích điện dương liên kết với nó, hoặc ngược lại. Trong dung dịch, nguyên liệu tích điện âm có thể phân ly khỏi một hoặc nhiều ion trái dấu tích điện dương mà nó kết hợp với. Thuật ngữ “anion” được dùng trong bản mô tả này được sử dụng để mô tả tính chất của nguyên liệu hoặc nhóm chức đó và không phải của toàn bộ phức với một hoặc nhiều ion trái dấu mà sẽ thường khiến phức này trung hòa về điện. Cần phải hiểu rằng một số nhóm chức tích điện âm, trung hòa về điện hoặc tích điện dương ở các điều kiện pH khác nhau. Liệu một nguyên liệu là anion hay không sẽ được xác định trên cơ sở tổng các điện tích này. Ví dụ, trong phạm vi của sáng chế, nhóm axit hoặc nhóm anion có thể bao gồm một hoặc nhiều nhóm chức trong số các nhóm chức dưới đây các axit carboxylic, sulfonic, phosphoric, và phosphinic và các chất đẳng vị hoặc chất đẳng cấu sinh học của chúng. Các ví dụ về nhóm axit hoặc nhóm anion thích hợp bao gồm axit carboxylic, axit amin, các dipeptit, các tripeptit hoặc các polypeptit hoặc chất dẫn xuất của chúng có đặc tính

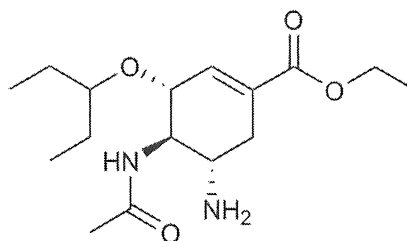
axit và/hoặc đặc tính anion, như axit aspartic, axit xysteic, axit glutamic hoặc các peptit thu được từ axit aspartic, axit xysteic và/hoặc axit glutamic.

Thuật ngữ “axit sialic” được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này và liên quan đến 9-cacbon monosacarit, đặc biệt là các hợp chất thu được từ axit neuraminic. Các ví dụ về các nhóm thích hợp bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các monosacarit được thể tùy ý thu được từ việc thế N và/hoặc thế O đối với axit *N*-axetylneuraminic (Neu5Ac) và axit *N*-glycolylneuraminic (Neu5Gc).

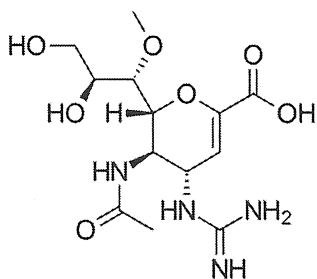
Thuật ngữ “chất ức chế neuraminidaza” được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này và được dùng để chỉ nhóm bao gồm các hợp chất mà phong bế enzym neuraminidaza. Theo một số phương án, nhóm neo có thể là chất ức chế neuraminidaza hoặc chất dẫn xuất của nó. Các ví dụ về các chất ức chế neuraminidaza thích hợp bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, axit sialic hoặc chất dẫn xuất của axit sialic, như axit 2,3-điflo sialic. Các chất ức chế neuraminidaza thích hợp khác bao gồm:



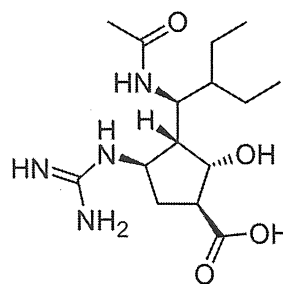
Zanamivir



Oseltamivir



Laninamivir



Peramivir

và các chất dẫn xuất của chúng.

Các thuật ngữ "liên kết đặc hiệu" hoặc "liên kết đặc hiệu", như được dùng trong bản mô tả này, liên quan đến tương tác của kháng thể với loại chất hóa học thứ hai, có nghĩa là tương tác phụ thuộc vào sự có mặt của một cấu trúc cụ thể (ví dụ, thể xác định kháng nguyên hoặc biểu vị) trên loại hóa chất này; ví dụ, kháng thể nhận biết và liên kết với một cấu trúc protein cụ thể hơn là các protein nói chung.

Thuật ngữ "kháng thể" được dùng trong bản mô tả này nói chung để chỉ phân tử globulin miễn dịch (Ig) bất kỳ bao gồm bốn chuỗi polypeptit, hai chuỗi nặng (H) và hai chuỗi nhẹ (L), hoặc đoạn chức năng, đột biến, biến dị, hoặc dẫn xuất bất kỳ của chúng, mà giữ được các dấu hiệu liên kết biểu vị thiết yếu của phân tử Ig. Các định dạng kháng thể đột biến, biến dị hoặc dẫn xuất này là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các phương án không giới hạn về chúng được bàn luận dưới đây.

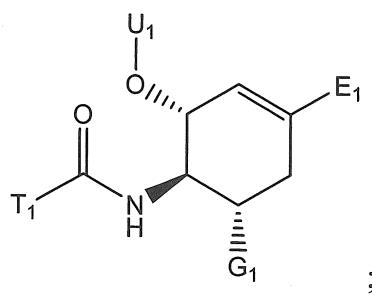
Trong kháng thể có chiều dài đầy đủ, mỗi chuỗi nặng chứa vùng thay đổi của chuỗi nặng (trong bản mô tả này được gọi tắt là HCVR hoặc VH) và vùng ổn định của chuỗi nặng. Vùng ổn định của chuỗi nặng bao gồm ba miền, CH1, CH₂ và CH3. Mỗi chuỗi nhẹ chứa vùng thay đổi của chuỗi nhẹ (trong bản mô tả này được gọi tắt là LCVR hoặc VL) và vùng ổn định của chuỗi nhẹ. Vùng ổn định của chuỗi nhẹ bao gồm một miền, CL. Các vùng VH và VL còn có thể chia tiếp thành các vùng có tính siêu biến, được gọi là các vùng xác định tính hỗ trợ (CDR), nằm rải rác với các vùng mà được bảo toàn hơn, được gọi là các vùng khung (FR). Mỗi VH và VL bao gồm ba CDR và bốn FR, nằm từ đầu tận cùng amino đến đầu tận cùng carboxy theo trình tự sau: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Các phân tử globulin miễn dịch có thể thuộc loại bất kỳ (ví dụ, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA và IgY), nhóm bất kỳ (ví dụ, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 và IgA2) hoặc phân nhóm bất kỳ.

Thuật ngữ "miền liên kết kháng nguyên" hoặc "đoạn liên kết kháng nguyên" của kháng thể được dùng trong bản mô tả này để chỉ một hoặc nhiều đoạn chứa kháng thể hoặc protein mà giữ lại được khả năng liên kết đặc hiệu với kháng nguyên (ví dụ, IL-12). Đã thấy rằng chức năng liên kết kháng nguyên của kháng thể có thể được thực hiện nhờ các đoạn chứa kháng thể có chiều dài đầy đủ. Các phương án về kháng thể này còn có thể có định dạng đặc hiệu kép, định dạng có hai tính đặc hiệu, hoặc định dạng đa đặc hiệu; liên kết đặc hiệu với hai hoặc nhiều kháng nguyên khác nhau. Các ví dụ về đoạn liên kết được bao hàm trong thuật ngữ "phần liên kết kháng nguyên" của kháng thể bao gồm (i) đoạn Fab, đoạn hóa trị một bao gồm các miền VL, VH, CL và CH1; (ii) đoạn F(ab')₂, đoạn hóa trị hai chứa hai đoạn Fab được liên kết bằng cầu disulfua trên vùng bản lề; (iii) đoạn Fd bao gồm miền VH và miền CH1; (iv) đoạn Fv chứa miền VL và miền VH của một nhánh của kháng thể, (v) đoạn dAb (xem tài liệu: Ward *et al.* 1989 *Nature* 341 544-6, Winter *et al.*, công bố đơn PCT số WO 90/05144 A1 được đưa vào đây bằng cách viện dẫn), mà chứa một miền thay đổi duy nhất; và (vi) vùng xác định tính hỗ trợ

đã được phân lập (CDR). Hơn thế nữa, mặc dù hai miền của đoạn Fv, VL và VH, mã hóa bởi gen riêng, chúng có thể được kết hợp, bằng cách áp dụng các phương pháp tái tổ hợp, nhờ nhóm liên kết tổng hợp mà cho phép chúng tạo ra dạng protein mạch đơn, trong đó vùng VL và vùng VH ghép cặp để tạo ra các phân tử hóa trị một (còn được gọi là Fv chuỗi đơn (scFv)); (ví dụ, xem các tài liệu: Bird *et al.* 1988 *Science* 242 423-6; Huston *et al.* 1988 *Proc Natl Acad Sci U S A* 85 5879-83). Các kháng thể chuỗi đơn này cũng dự tính được bao hàm trong thuật ngữ "phần liên kết với kháng nguyên" của kháng thể. Các dạng khác của các kháng thể chuỗi đơn, như các lưỡng thể cũng được bao hàm. Các lưỡng thể có hóa trị hai, các kháng thể đặc hiệu kép, trong đó miền VH và miền VL được biểu hiện trên một chuỗi polypeptit, nhưng bằng cách sử dụng nhóm liên kết mà là quá ngắn để cho phép ghép cặp giữa hai miền trên cùng một chuỗi, nhờ đó buộc các miền này ghép cặp với các vùng bổ trợ của chuỗi khác và tạo ra hai vị trí liên kết với kháng nguyên (ví dụ, xem tài liệu: Holliger, P., *et al.*, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448; Poljak, R. J., *et al.*, 1994, *Structure* 2:1121-1123). Các phần liên kết kháng thể này là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này (xem tài liệu: Kontermann and Dubel eds., *Antibody Engineering* 2001 Springer-Verlag. New York. 790 pp., ISBN 3-540-41354-5).

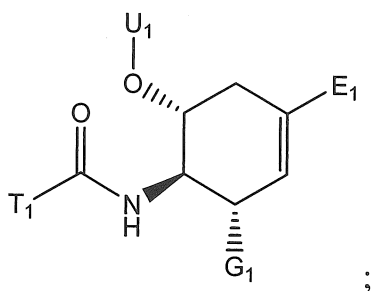
Theo một phương án, mỗi nhóm neo là nhóm neo thích hợp mà liên kết với bề mặt của các virus cúm. Theo một số phương án, mỗi nhóm neo là nhóm mà liên kết với neuraminidaza, kể cả chất ức chế neuraminidaza hoặc chất dẫn xuất của nó. Theo các phương án nhất định, nhóm neo là chất ức chế neuraminidaza hoặc chất dẫn xuất của nó được chọn từ axit sialic, như zanamivir hoặc laninamivir, axit 2,3-điflo sialic, oseltamivir, peramivir, và các chất dẫn xuất của chúng. Theo các phương án khác, mỗi nhóm neo chứa miền liên kết kháng thể mà liên kết một cách đặc hiệu với neuraminidaza. Theo các phương án nhất định, khi nhóm neo là miền liên kết kháng thể mà liên kết một cách đặc hiệu neuraminidaza, thì nhóm neo được chọn từ nhóm bao gồm kháng thể (Ab), đoạn liên kết với kháng nguyên của kháng thể, chuỗi đơn đoạn kháng thể (scFV) và kháng thể đơn miền (dAb). Các hợp chất theo sáng chế có thể bao gồm tổng cộng 1 đến 6 nhóm neo, tốt hơn là 2 đến 4 nhóm neo, tốt hơn nữa là 2 nhóm neo.

Theo phương án khác, nhóm neo là gốc hóa trị một thu được từ nhóm có công thức II



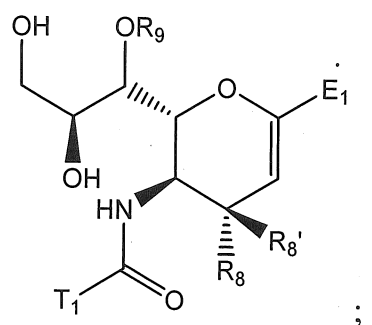
(Công thức II)

nhóm có công thức III



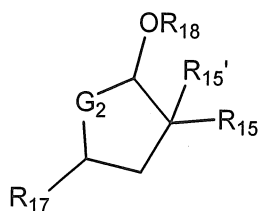
(Công thức III)

nhóm có công thức IV



(Công thức IV)

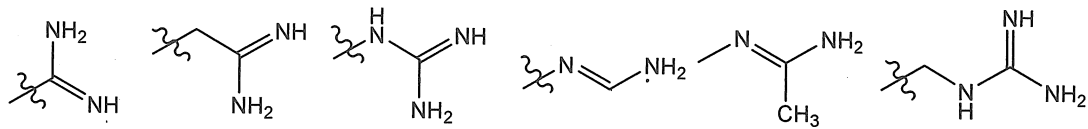
và nhóm có công thức V



(Công thức V)

trong đó E₁ được chọn từ nhóm bao gồm -COOH, COOHR₆, -SO₃H, -PO₃H₂, PO(OR₆)₂

G₁ được chọn từ -NH₂, -CH₂NH₂, -(CH₂)₂NH₂,



T₁ được chọn từ nhóm bao gồm C₁-C₆ alkyl tùy ý được thế, C₂-C₆ alkenyl tùy ý được thế hoặc C₂-C₆ alkynyl tùy ý được thế

U₁ được chọn từ nhóm bao gồm -CH₂R₇, -(CH₂)₂R₇, -CH₂CHR₇CH₂R₇

R₇ được chọn từ nhóm bao gồm H, -OH, -OCH₃, -OAc, -NH₂, hoặc -SH.

R₈ và R₈' độc lập được chọn từ nhóm bao gồm hydro -N₃, -CN, -CH₂NH₂, guanadino, hoặc -NR₁₀R₁₁;

R₉ được chọn từ hydro, C₁-C₆ alkyl tùy ý được thế, C₂-C₆ alkenyl tùy ý được thế, hoặc C₂-C₆ alkynyl tùy ý được thế;

R₁₀ và R₁₁ độc lập được chọn từ nhóm bao gồm hydro, nhóm C₁-C₆ alkyl tùy ý được thế, C₁-C₆ axyl tùy ý được thế, -C(NH)NH₂, -CH₂COOH, CH₂CH₂OH hoặc -CH₂CH(R₁₂)(R₁₃),

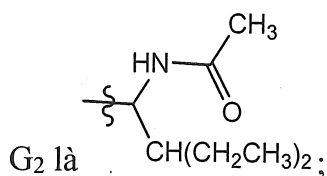
R₁₂ và R₁₃ độc lập được chọn từ O và R₁₄N=, và

R₁₄ được chọn từ nhóm bao gồm hydro, -OH, -OCH₃, -NH₂, và -N(CH₃)₂,

mỗi gốc R₁₅ và R₁₅' độc lập được chọn từ hydro và CO₂R₁₆,

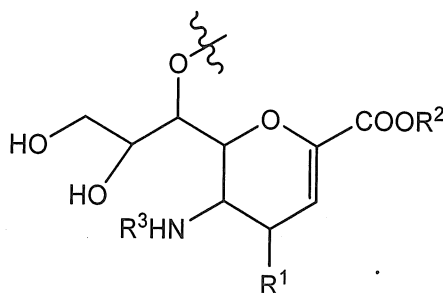
R₁₆ là H hoặc C₁-C₆ alkyl tùy ý được thế;

R₁₇ được chọn từ NH₂ và -NHC(=NH)NH₂;

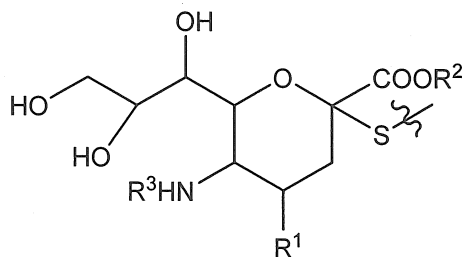


R₁₈ được chọn từ nhóm bao gồm hydro, C₁-C₆ alkyl tùy ý được thế, C₂-C₆ alkenyl tùy ý được thế, và C₂-C₆ alkynyl tùy ý được thế.

Theo các phương án khác nữa, mỗi nhóm neo được chọn từ nhóm bao gồm nhóm có công thức VI và nhóm có công thức VII:



(Công thức VI)



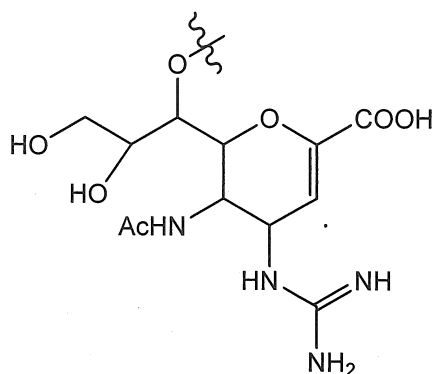
(Công thức VII)

trong đó R^1 được chọn từ nhóm bao gồm $-NR_2$, guanđino, $-ONR_2$, trong đó R là H hoặc C_1 - C_6 alkyl tùy ý được thế,

R^2 được chọn từ nhóm bao gồm H, C_1 - C_6 alkyl tùy ý được thế, và aryl được thế tùy ý, và

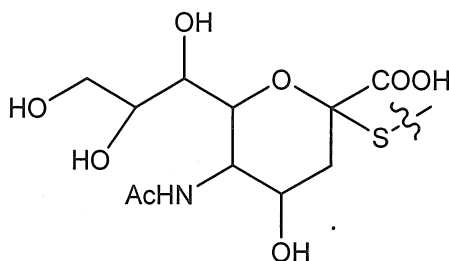
R^3 được chọn từ nhóm bao gồm H, C_1 - C_6 alkyl tùy ý được thế, aryl được thế tùy ý, và tùy ý C_1 - C_6 axyl.

Theo phương án khác, nhóm neo là nhóm có công thức (VIa):



Công thức (VIa).

Theo phương án khác nữa, nhóm neo là nhóm có công thức (VIIa):



Công thức (VIIa).

Theo một phương án, nhóm liên kết (như L^1 và/hoặc L^2 có công thức I) trong mỗi lần xuất hiện là nhóm liên kết hóa trị hai thích hợp bất kỳ. Theo một phương án, nhóm liên kết mỗi nhóm độc lập được chọn từ liên kết, alkylen C_1 - C_{12} được thế tùy ý, $-C(O)-$, $-NR-$, $-O-C(O)O-NR-$, $-C=N-O-$, $-C=N-NR-$, $-SO_2-NR-$, đisulfua, $-C(O)-NR-(CH_2)_x-NR-$

, $-(\text{CH}_2)_x\text{-NR-}$, $-(\text{CH}_2)_x\text{-(O-(CH}_2)_y\text{)}_z\text{-}$, -C=N-O- tùy ý được thế, alkylen -C=N-NR tùy ý được thế, alkylen sulfonamit tùy ý được thế, alkylen disulfua tùy ý được thế, trong đó R độc lập là H hoặc alkyl $\text{C}_1\text{-C}_6$ và trong đó mỗi x , y và z là số nguyên độc lập được chọn từ 0, 1, 2, 3 và 4.

Theo một phương án, trong đó nhóm neo là nhóm có công thức (VI) hoặc công thức (VIa), nhóm liên kết L^1 có công thức (I) được chọn từ $\text{-C(O)-NR-(CH}_2)_x\text{-NR-}$, $-(\text{CH}_2)_x\text{-NH-}$ và $-(\text{CH}_2)_x\text{-(O-(CH}_2)_y\text{)}_z\text{-}$, trong đó mỗi x , y và z là số nguyên độc lập được chọn từ 0, 1, 2, 3 và 4. Theo một phương án khác trong đó nhóm neo là nhóm có công thức (VII) hoặc công thức (VIIa), nhóm liên kết L^1 có công thức (I) là $-(\text{CH}_2)_x\text{-NH-}$, trong đó x là số nguyên được chọn từ 0, 1, 2, 3 và 4.

Theo một phương án, nhóm liên kết L^2 có công thức (I) là liên kết.

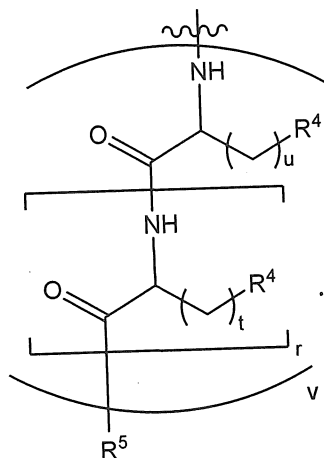
Theo một phương án, nhóm khung là nhóm đa trị thích hợp bất kỳ. Theo một phương án, nhóm khung là nhóm khung hóa trị ba. Theo phương án khác, nhóm khung là nhóm khung hóa trị bốn. Theo một phương án, nhóm khung được chọn từ nhóm tricarboxylat tùy ý được thế, nhóm tetracarboxylat tùy ý được thế hoặc peptit đa hóa trị. Theo các phương án khác, nhóm khung được chọn từ propan-1,2,3-tricarboxylat tùy ý được thế, prop-1-en-1,2,3-tricarboxylat tùy ý được thế, xyclopropan-1,2,3-tricarboxylat tùy ý được thế, xyclohexan-1,3,5-tricarboxylat tùy ý được thế, benzen-1,3,5-tricarboxylat tùy ý được thế, metan tetracarboxylat tùy ý được thế, 1,2,3,4-butan tetracarboxylat tùy ý được thế, etylen-1,1,2,2-tetracarboxylat tùy ý được thế, như axit etylendi-amintetraaxetic (EDTA), xyclohexan-1,2,4,5-tetracarboxylat tùy ý được thế, và benzen-1,2,4,5-tetracarboxylat tùy ý được thế. Theo các phương án khác nữa, nhóm khung được chọn từ propan-1,2,3-tricarboxylat tùy ý được thế, xyclohexan-1,3,5-tricarboxylat tùy ý được thế, benzen-1,2,4,5-tetracarboxylat tùy ý được thế, axit pyromellitic được thế tùy ý và axit di-pyromellitic tùy ý được thế tạo được bởi -C(O)-NH-NH-C(O)- liên kết (5,5'-(hydrazin-1,2-đicarbonyl)bis(axit benzen-1,2,4-tricarboxylic)). Theo các phương án khác nữa, nhóm khung là peptit đa hóa trị.

Theo một phương án, nhóm axit hoặc nhóm anion là nhóm chức thích hợp bất kỳ có đặc tính axit và/hoặc đặc tính anion mà tác động để cản trở liên kết của chất gây nên sự đóng cục của tế bào máu với tế bào. Theo một số phương án, nhóm axit hoặc nhóm anion là nhóm thích hợp bất kỳ chứa một hoặc nhiều nhóm chức được chọn từ axit carboxylic, các axit sulfonic, các axit phosphoric, và các axit phosphinic và các chất

đẳng vị hoặc chất đẳng cấu sinh học của chúng. Theo một số phương án, nhóm axit hoặc nhóm anion là axit amin thích hợp bất kỳ, dipeptit, tripeptit, polypeptit hoặc các chất dẫn xuất của chúng chứa một hoặc nhiều nhóm chức axit. Theo một phương án, nhóm axit hoặc nhóm anion là axit aspartic, axit xysteic, axit glutamic hoặc các peptit thu được từ axit aspartic, axit xysteic và/hoặc axit glutamic.

Theo một phương án, các hợp chất theo sáng chế bao gồm tổng cộng 2 đến 26 gốc axit/anion, tốt hơn là 4 đến 10 gốc axit/anion. Ví dụ, khi nhóm axit hoặc nhóm anion chứa axit dicarboxylic, cần phải hiểu rằng gốc này chứa hai gốc axit/anion riêng biệt. Bằng cách làm ví dụ có dựa vào các ví dụ đại diện về các hợp chất theo sáng chế, cần phải lưu ý rằng MD349 chứa tổng cộng chín gốc axit hoặc gốc anion (năm gốc axit carboxylic và bốn gốc axit sulfonic), MD348 chứa tổng cộng bảy gốc axit hoặc gốc anion (bốn gốc axit carboxylic và ba gốc axit sulfonic), MD345 chứa tổng cộng tám gốc axit hoặc gốc anion (một gốc axit carboxylic và bảy gốc axit sulfonic), MD352 chứa tổng cộng chín gốc axit hoặc gốc anion (hai gốc axit carboxylic và bảy gốc axit sulfonic), MD356 chứa tổng cộng sáu gốc axit hoặc gốc anion (hai gốc axit carboxylic và bốn gốc axit sulfonic), MD357 chứa tổng cộng sáu gốc axit hoặc gốc anion (hai gốc axit carboxylic và bốn gốc axit sulfonic), MD358 chứa tổng cộng tám gốc axit hoặc gốc anion (tám gốc axit carboxylic), MD359 chứa tổng cộng tám gốc axit hoặc gốc anion (hai gốc axit carboxylic và sáu gốc axit sulfonic), MD373 chứa tổng cộng tám gốc axit hoặc gốc anion (tám gốc axit carboxylic), và MD376 chứa tổng cộng mười gốc axit hoặc gốc anion (mười gốc axit carboxylic).

Theo phương án khác, nhóm axit hoặc nhóm anion là nhóm có công thức VIII:



(Công thức VIII)

trong đó

mỗi R^4 độc lập được chọn từ nhóm bao gồm $-\text{COOH}$, $-\text{SO}_3\text{H}$, $-\text{NHCH}_2\text{SO}_3\text{H}$, $-\text{CONH-Cya}$, $-\text{CONH-Asp}$, $-\text{CONH-Asp}(-\text{NHCH}_2\text{SO}_3\text{H})_w$, và $-\text{CONH-Asp}(-\text{NHCH}_2\text{PO}_3\text{H})_w$, trong đó w là số nguyên bằng 1 hoặc 2;

R^5 được chọn từ nhóm bao gồm $-\text{OH}$ và $-\text{NHCH}_2\text{SO}_3\text{H}$

u là số nguyên từ 0 đến 3;

t là số nguyên từ 0 đến 3;

r là số nguyên từ 0 đến 6;

v là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 12.

Theo một phương án, n là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 4. Theo một phương án khác, n là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 3. Theo các phương án nhất định, n bằng 1. Theo các phương án khác, n bằng 2. Theo các phương án khác nữa, n bằng 3. Theo một phương án khác nữa, n bằng 4.

Theo một phương án, p là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 4. Theo một phương án khác, p là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 2. Theo các phương án nhất định, p bằng 1. Theo các phương án khác, p bằng 2. Theo các phương án khác nữa, p bằng 3. Theo một phương án khác nữa, p bằng 4.

Ngoài ra, hoặc theo cách khác, theo một số phương án các hợp chất có công thức (I) có thể được cải biến, hoặc trước khi, trong khi, hoặc sau khi tập hợp, để nâng cao hoặc thay đổi hoạt tính sinh học và/hoặc ái lực liên kết với bề mặt của virus cúm. Theo một phương án, khi nhóm axit hoặc nhóm anion bao gồm một hoặc axit carboxylic, kể cả axit amin, thì axit carboxylic có thể được cải biến bằng cách sulfat hóa, phosphoryl hóa, chuyển đổi nhóm chức lẫn nhau, và/hoặc gắn mạch bên. Ví dụ, khi nhóm axit hoặc nhóm anion chứa axit carboxylic, thì axit carboxylic này có thể được cải biến thành amit hoặc amit đã được sulphat hóa, kể cả $-\text{C}(=\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_n\text{SO}_3\text{H}$. Theo cách khác, hoặc bổ sung cho cách nêu trên, khi nhóm axit hoặc nhóm anion bao gồm axit amin hoặc peptit, thì đầu tận cùng C có thể được cải biến để bao gồm các nhóm chức khác, như chuyển đổi của axit đầu tận cùng thành amit hoặc amit đã được sulphat hóa, kể cả $-\text{C}(=\text{O})\text{NH}(-\text{CH}_2)_n\text{SO}_3\text{H}$.

Đối với các hợp chất có công thức (I) được bộc lộ trong bản mô tả này sự kết hợp dưới đây của mục bất kỳ hoặc nhiều mục trong số từ (i) đến (vii) được dự tính:

(i) A là Công thức (IIa); hoặc

A là Công thức (IIIa);

- (ii) B là axit propan-1,2,3-tricarboxylic; hoặc
 B là xyclohexan-1,3,5-tricarboxylat, hoặc
 B là benzen-1,2,4,5-tetracarboxylat;
- (iii) L^1 là $-C(O)-NH-$; hoặc
 L^1 là $-C(O)-(NH)-(CH_2)_2-NH-$; hoặc
 L^1 là $-C(O)-(NH)-(CH_2)_3-NH-$; hoặc
 L^1 là $-C(O)-(NH)-(CH_2)_4-NH-$; hoặc
 L^1 là $-C(O)-(NH)-(CH_2)_5-NH-$; hoặc
 L^1 là $-C(O)-(NH)-(CH_2)_6-NH-$; hoặc
 L^1 là $-C(O)-(NH)-(CH_2)_7-NH-$; hoặc
 L^1 là $-C(O)-(NH)-(CH_2)_8-NH-$; hoặc
 L^1 là $-C(O)-(NH)-(CH_2)_9-NH-$; hoặc
 L^1 là $-C(O)-(NH)-(CH_2)_{10}-NH-$; hoặc
 L^1 là $-C(O)-(NH)-(CH_2)_{12}-NH-$; hoặc
- (iv) L^2 là liên kết;
- (v) C là axit L-aspartic; hoặc
 C là axit D-aspartic; hoặc
 C là axit L-xysteic; hoặc
 C là axit D-xysteic; hoặc
 C là $-(L-Asp)_2-OH$; hoặc
 C là $-(D-Asp)_2-OH$; hoặc
 C là $-(L-Cya)_2-OH$; hoặc
 C là $-(D-Cya)_2-OH$; hoặc
 C là $-(L-Asp)_3-OH$; hoặc
 C là $-(D-Asp)_3-OH$; hoặc
 C là $-(L-Cya)_3-OH$; hoặc
 C là $-(D-Cya)_3-OH$; hoặc
 C là $-(L-Cya)_7-OH$; hoặc
 C là $-(D-Cya)_7-OH$; hoặc
 C là $-(L-Asp-L-Cya)_4-OH$; hoặc
 C là $-(L-Asp-L-Cya)_4-OH$; hoặc

C là $-\text{[L-Asp(L-Cya)]}_3\text{-OH}$; hoặc
 C là $-\text{[D-Asp(D-Cya)]}_3\text{-OH}$; hoặc
 C là $-\text{[L-Asp(L-Cya)]}_4\text{-OH}$; hoặc
 C là $-\text{[(L-Asp)}_4\text{-(L-Cya)}_3\text{]-OH}$; hoặc
 C là $-\text{[(D-Asp)}_4\text{-(D-Cya)}_3\text{]-OH}$; hoặc
 C là $-\text{[L-Asp(L-Cya)]}_3\text{-OH}$; hoặc
 C là $-\text{[D-Asp(D-Cya)]}_3\text{-OH}$; hoặc
 C là $-\text{[L-Asp(L-Cya)]}_4\text{-OH}$; hoặc
 C là $-\text{[D-Asp(D-Cya)]}_4\text{-OH}$; hoặc
 C là $\text{L-Asp(NHCH}_2\text{SO}_3\text{H)}_2$; hoặc
 C là $\text{D-Asp(NHCH}_2\text{SO}_3\text{H)}_2$; hoặc
 C là $-\text{[L-Asp(NHCH}_2\text{SO}_3\text{)]}_3\text{-NHCH}_2\text{SO}_3\text{H}$; hoặc
 C là $-\text{[D-Asp(NHCH}_2\text{SO}_3\text{)]}_3\text{-NHCH}_2\text{SO}_3\text{H}$;

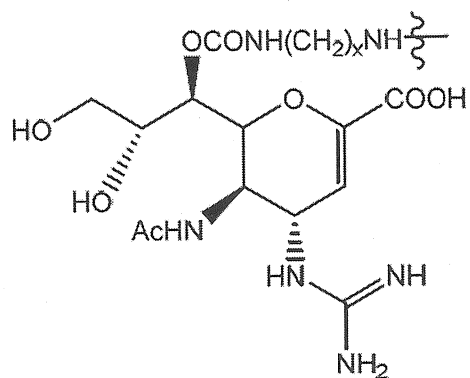
(vi) n bằng 2; hoặc

n bằng 3

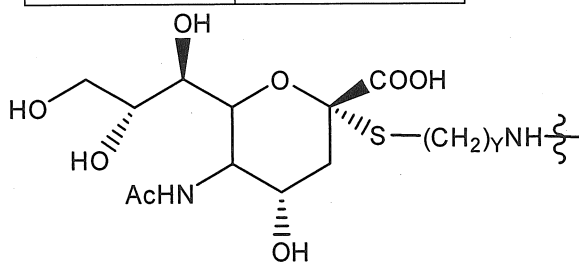
(vii) p bằng 1; hoặc

p bằng 2.

Để tiện hoặc để tham khảo, các ví dụ đại diện về các hợp chất theo sáng chế có thể được viết tắt. Ví dụ, trong phạm vi của các ví dụ đại diện, để tiện tham khảo, nhóm neo (kể cả A có công thức (I)) và nhóm liên kết (kể cả mỗi L_1 của công thức (I)) có thể được thể hiện như một nhóm, gọi là Z_x hoặc S_y . Đặc biệt, khi các hợp chất theo sáng chế chứa nhóm có công thức Z_x , các nhóm này là các chất dẫn xuất của axit sialic, trong đó nhóm chức (amino hoặc guanidino) thay thế nhóm hydroxyl ở vị trí 4 của nhân axit sialic. Cải biến như vậy cho phép các nhóm có công thức Z_x tương tác với neuraminidaza của virus cúm, nhưng không tương tác với neuraminidaza của động vật có vú. Điều này liên quan đến khía cạnh an toàn khi các hợp chất theo sáng chế được dùng cho các động vật có vú kể cả người. Các nhóm có công thức S_y được liên kết qua nhóm 2-hydroxy của axit sialic. Cụ thể, nhóm liên kết thio-glycosit được sử dụng cùng với nhóm neo trong công thức S_y , như $2\text{-S-(CH}_2\text{)}_m\text{NHR}$, mà chống lại sự thủy phân bằng enzym khi so với các nhóm liên kết ete tương đương, như $2\text{-O-(CH}_2\text{)}_m\text{NHR}$. Để dễ tham chiếu, các cấu trúc của Z_x hoặc S_y được nêu dưới đây:

Công thức Z_x

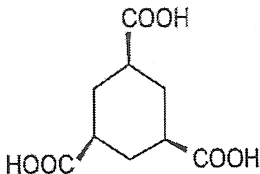
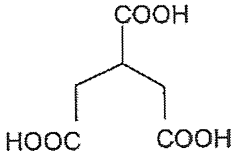
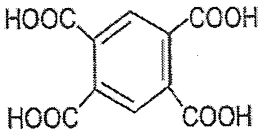
Cấu trúc Z_x	Chữ viết tắt
X bằng 0	Z_1
X bằng 2	Z_3
X bằng 3	Z_{2b}
X bằng 4	Z_b
X bằng 5	Z_p
X bằng 6	Z
X bằng 7	Z_h
X bằng 8	Z_0
X bằng 9	Z_n
X bằng 10	Z_{10}
X bằng 12	Z_{12}

Công thức S_y

Cấu trúc S_y	Chữ viết tắt
Y bằng 6	S_6
Y bằng 8	S_8
Y bằng 9	S_9
Y bằng 10	S_{10}

Y bảng 12	S ₁₂
-----------	-----------------

Để tiện hoặc để tham khảo, trong phạm vi của các ví dụ đại diện, các hợp chất mà nhóm khung B có công thức (I) có thể nguồn gốc từ đó được thể hiện vắn tắt như dưới đây

Chữ viết tắt	Cấu trúc	Tên
CHTCA		axit cis-1,3,5-xyclohexanetricarboxylic
TCA		Axit tricarboxylic
PYR		Axit pyromellitic
PYR-NH-NH-PYR		Axit đi-pyromellitic với liên kết C(O)-NH-NH-C(O) 5,5'-(hydrazin-1,2-đicarbonyl)bis(axit benzen-1,2,4-tricarboxylic)

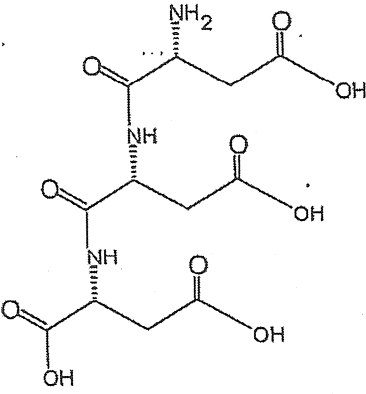
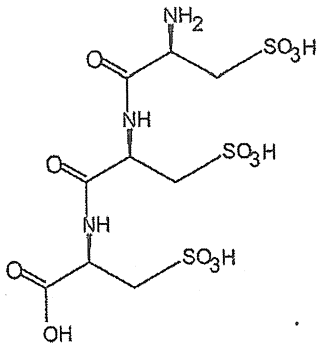
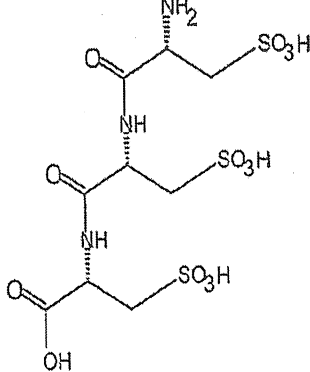
Để tiện hoặc để tham khảo, trong phạm vi của các ví dụ đại diện, nhóm neo A, nhóm liên kết L¹ và nhóm khung B có công thức (I), có thể được thể hiện vắn tắt như sau:

Chữ viết tắt	Cấu trúc	Chữ viết tắt	Cấu trúc
--------------	----------	--------------	----------

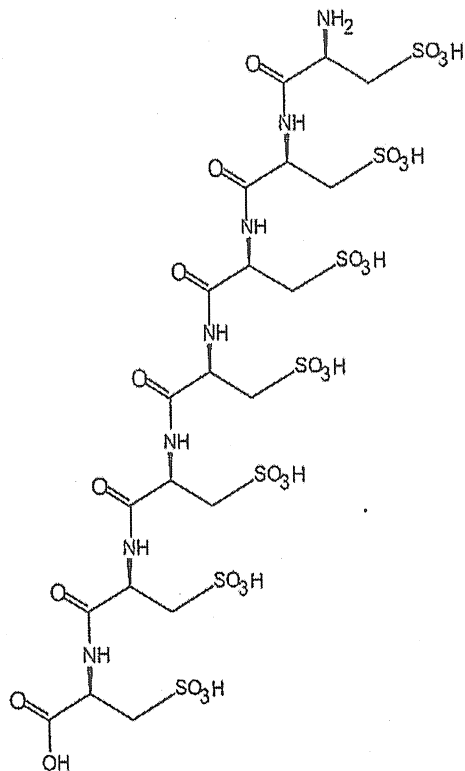
PK2 TCA(Z_x) ₂		PK1 TCA(Z_x) ₂	
PK1 PYR(Z_x) ₂		PK2 PYR(Z_x) ₂	
CHTCA(Z_x) ₂		CHTCA(S_y) ₂	
PK2 TCA(S_y) ₂		PK1 TCA(S_y) ₂	
PK1 PYR(S_y) ₂		PK2 PYR(S_y) ₂	
CHTCA(Z_x)(S_y)		CHTCA(Z_x) ₂ (S_y)	)
PK1 PYR(Z_x) ₂ (S_y)		PK2 PYR(Z_x) ₂ (S_y)	
PK2PYR(Z_x) ₂ (NHCH ₂ SO ₃ H) ₂			

Để tiện hoặc để tham khảo, trong phạm vi của các ví dụ đại diện, các hợp chất mà có thể nhóm axit hoặc nhóm anion có công thức (I) có nguồn gốc từ đó, được thể hiện vắn tắt như sau:

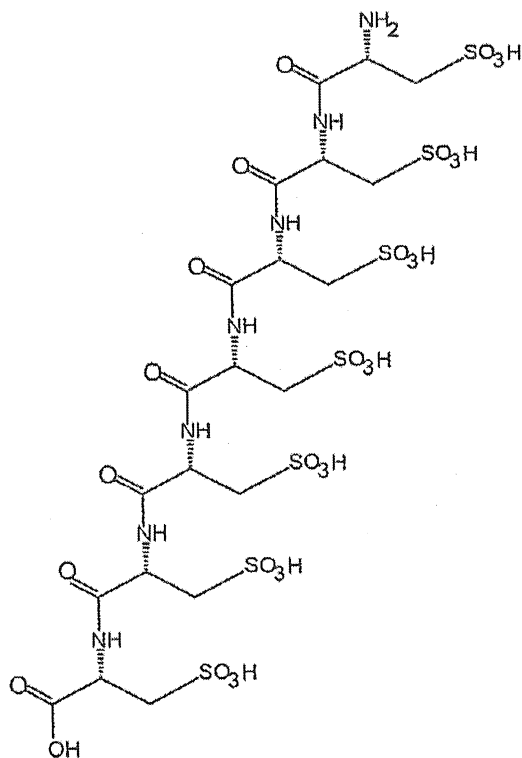
Chữ viết tắt	Cấu trúc	Tên
Cya Cya-SO ₃ H		Axit xysteic
L-Cya L-Cya-SO ₃ H		L-Axit xysteic
D-Cya D-Cya-SO ₃ H		D-Axit xysteic
Asp		Axit aspartic
L-Asp		L-Axit aspartic
D-Asp		D-Axit aspartic
(L-Asp) ₃ hoặc L-Asp-L-Asp-L-Asp		

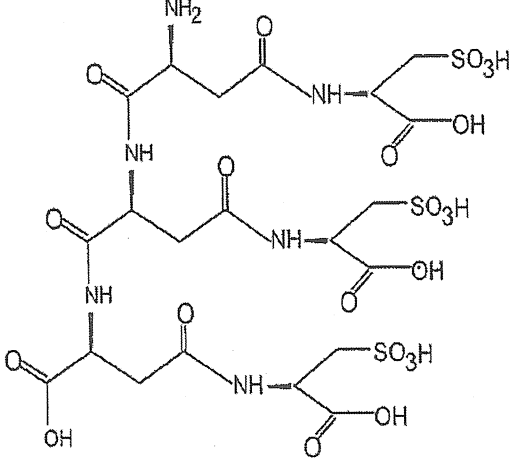
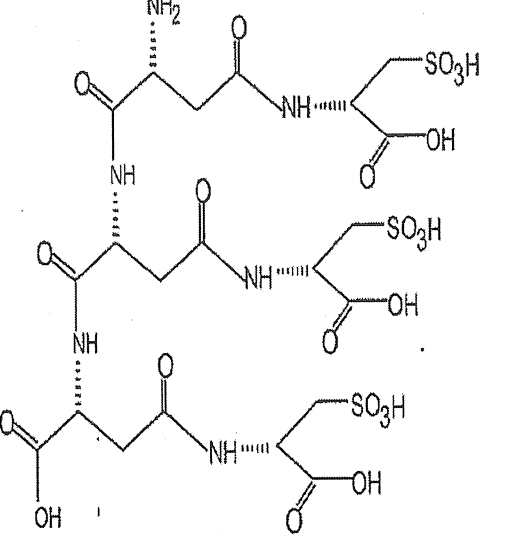
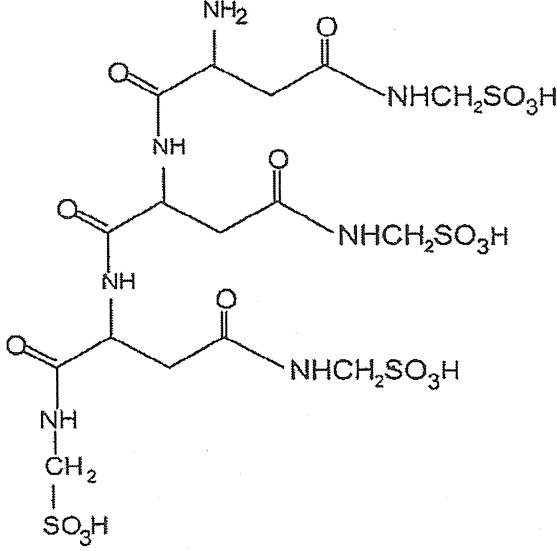
(D-Asp)₃ hoặc D-Asp-D-Asp-D- Asp		
(L-Cya)₃ hoặc L-Cya-L-Cya-L- Cya		
(D-Cya)₃ hoặc D-Cya-D-Cya-D- Cya		

(L-Cya)₇-OH hoặc
(L-Cya)₇



(D-Cya)₇-OH
(D-Cya)₇

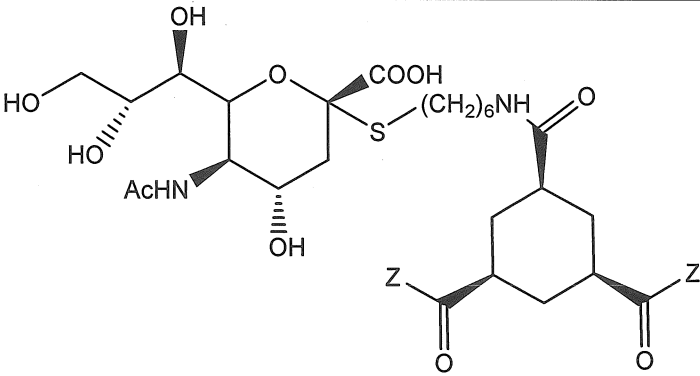
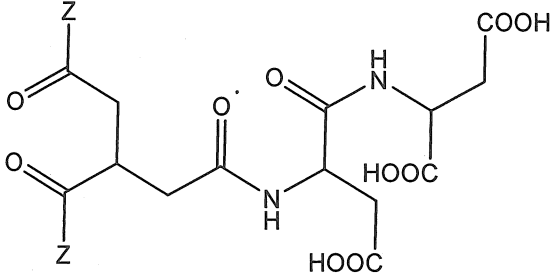
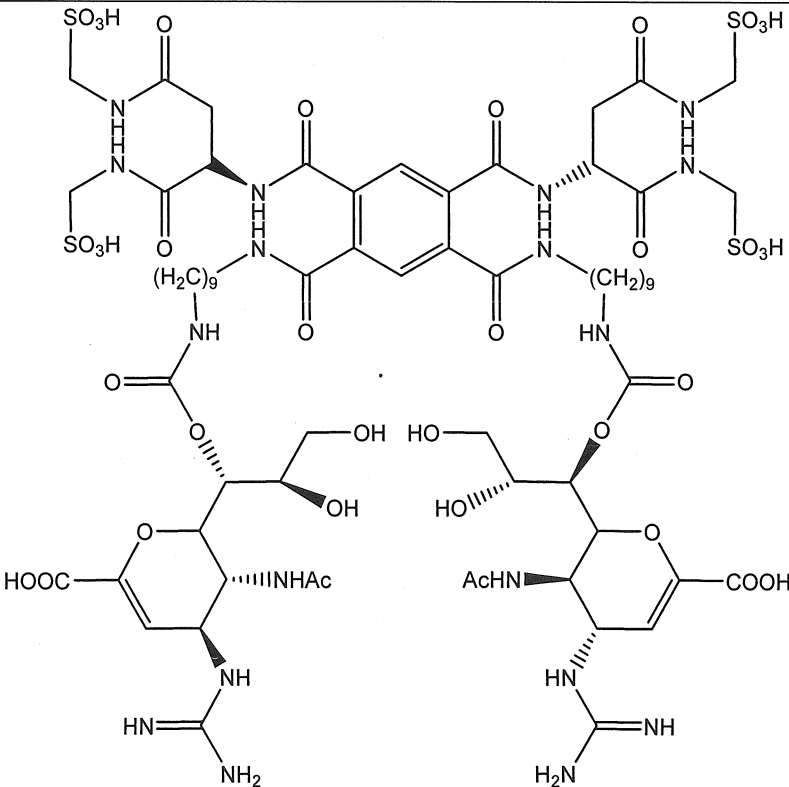


L-Asp(L-Cya)-L-Asp(L-Cya)-L-Asp(L-Cya)-OH hoặc [L-Asp(L-Cya)]₃		
D-Asp(D-Cya)-D-Asp(D-Cya)-D-Asp(D-Cya)-OH hoặc [D-Asp(D-Cya)]₃		
Asp(NHCH₂SO₃H)-Asp(NHCH₂SO₃H)-Asp(NHCH₂SO₃H)₂		

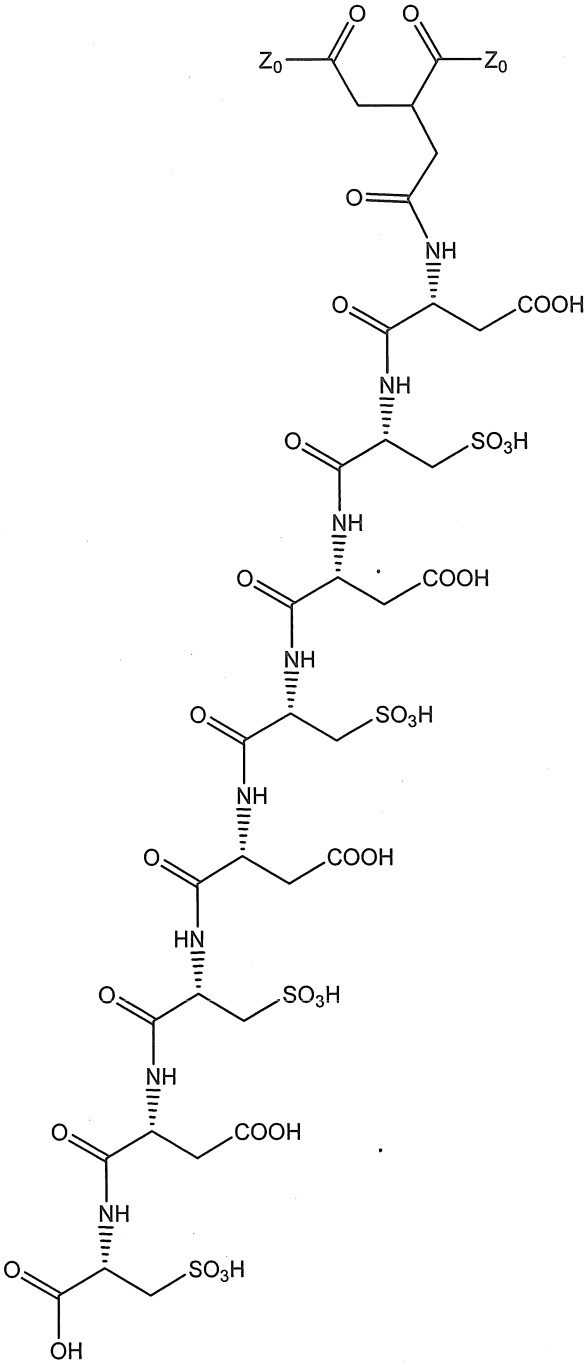
L-(Asp)(β)-L-(Asp)(β)-L-(Asp)	The structure shows a linear tripeptide of aspartic acid. The first and third residues are in the L-configuration, while the middle residue is in the β-configuration. The side chains are represented by carboxylic acid groups.	
D-(Asp)(β)-D-(Asp)(β)-D-(Asp)	The structure shows a linear tripeptide of aspartic acid. The first and third residues are in the D-configuration, while the middle residue is in the β-configuration. The side chains are represented by carboxylic acid groups.	
L-(Asp)(β)-D-(Asp)(β)-L-(Asp)	The structure shows a linear tripeptide of aspartic acid. The first and third residues are in the L-configuration, while the middle residue is in the β-configuration. The side chains are represented by carboxylic acid groups.	
D-Asp(L-Asp)-D-Asp(L-Asp)-D-Asp(L-Asp)	The structure shows a linear tetrapeptide of aspartic acid. The first, second, and fourth residues are in the D-configuration, while the third residue is in the L-configuration. The side chains are represented by carboxylic acid groups.	

Các ví dụ đại diện về các hợp chất theo sáng chế được phác thảo dưới đây.

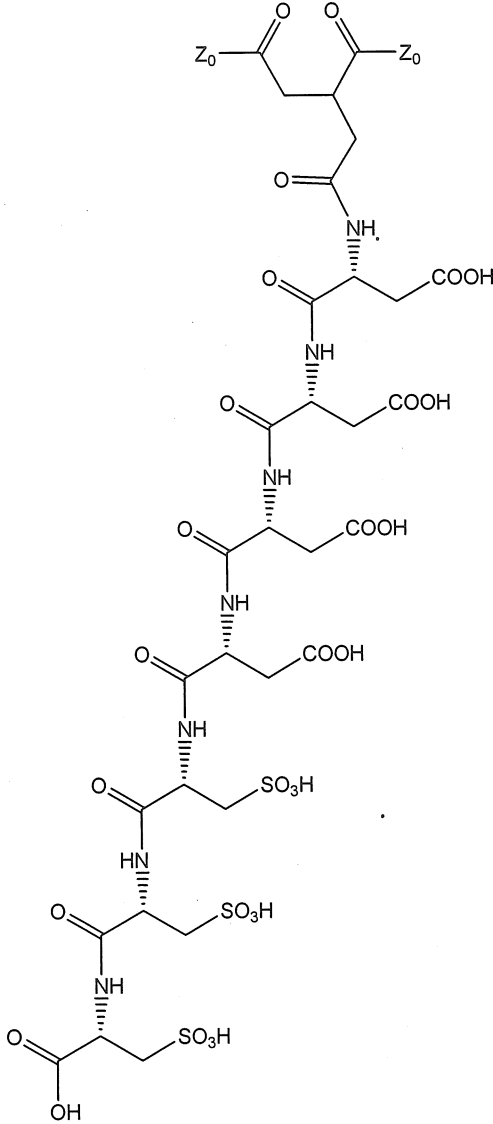
Số tham chiếu	Tham chiếu viết tắt	Cấu trúc
MD021 Phân tử lượng 1243	CHTCA(Z) ₂ -L-Asp	
MD154 Phân tử lượng 1485	CHTCA(Z ₀) ₂ -L-Asp(NHCH ₂ SO ₃ H) ₂	
MD155 Phân tử lượng 1485	CHTCA(Z ₀) ₂ -D-Asp(NHCH ₂ SO ₃ H) ₂	

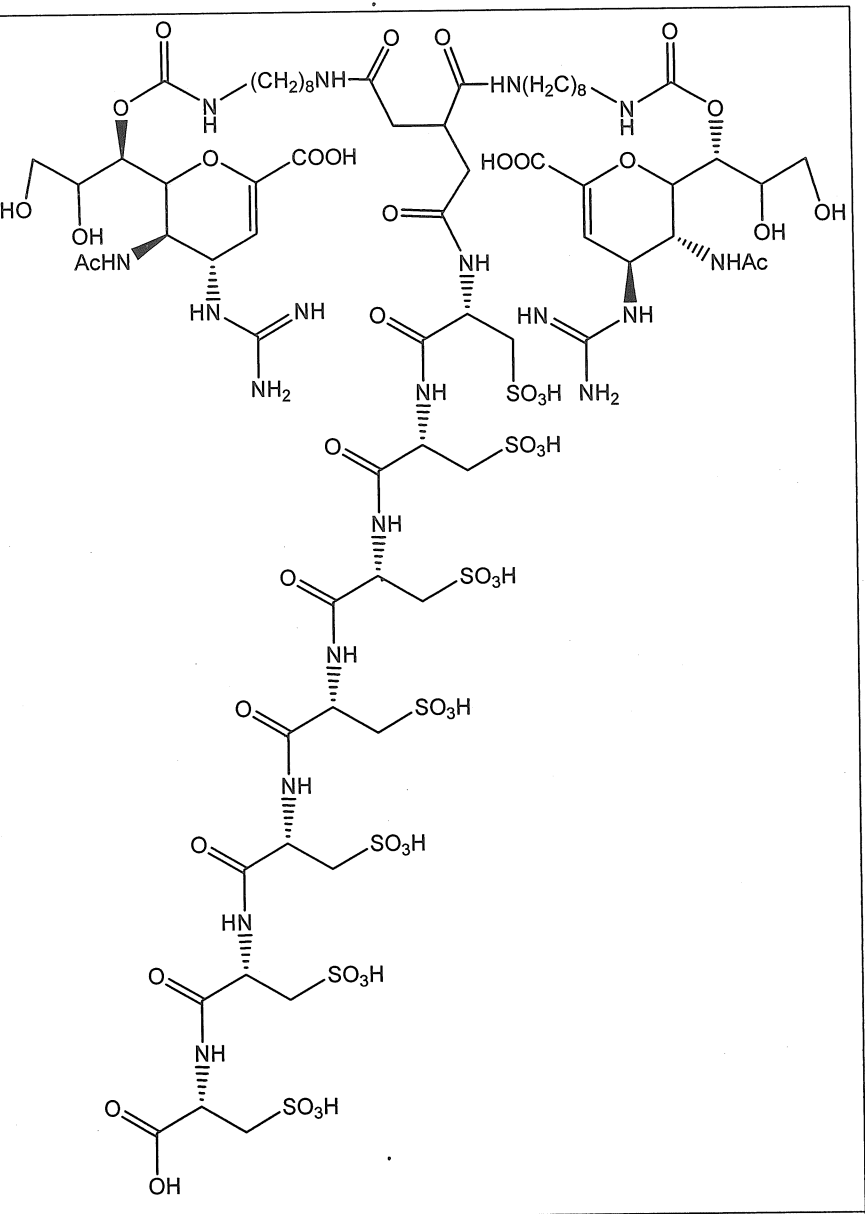
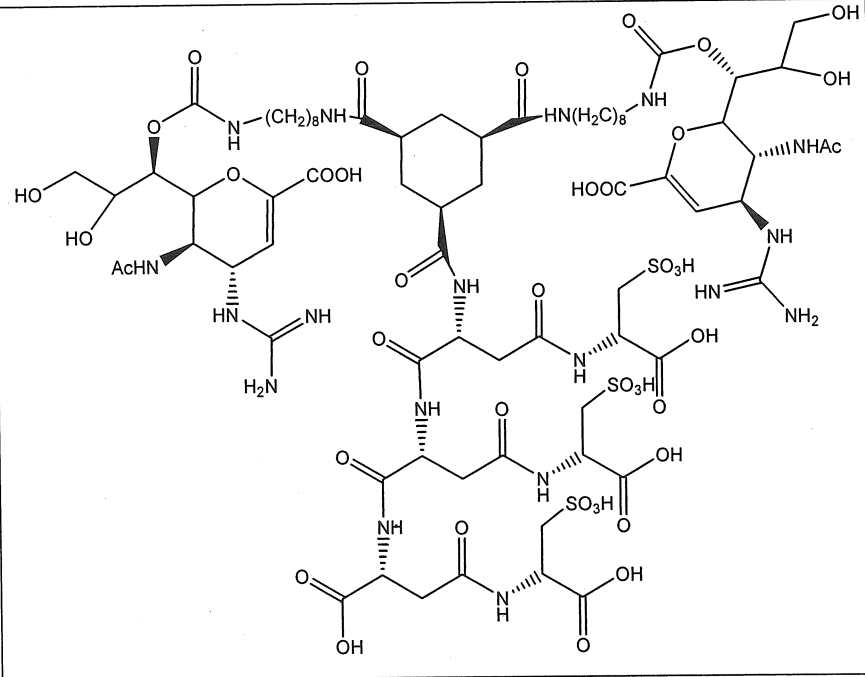
Số tham chiếu	Tham chiếu viết tắt	Cấu trúc
MD012 Phân tử lượng 1534	CHTCA(Z) ₂ (S ₆)	
MD051 Phân tử lượng 1318	PK2 TCA(Z) ₂ -[L- Asp-L-Asp]	
MD185 Phân tử lượng 1852	PK2PYR(Z _n) 2[(D- Asp)(NHCH 2SO ₃) ₂] ₂	

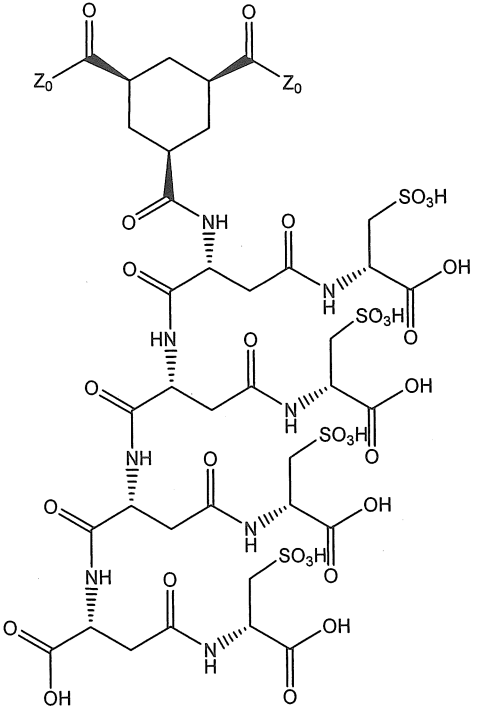
Số tham chiếu	Tham chiếu viết tắt	Cấu trúc
MD314 Phân tử lượng 1982	CHTCA(Z ₀)- L-Asp(L- Cya)-L-Asp- (L-Cya)-L- Asp(L- Cya)	
MD317 Phân tử lượng 1318	PK2 TCA(Z) ₂ -[D- Asp-D-Asp]	

Số tham chiếu	Tham chiếu viết tắt	Cấu trúc
MD342 Phân tử lượng 2208	PK2 TCA(Z ₀) ₂ - [D-Asp-D- Cya] ₄ -OH	

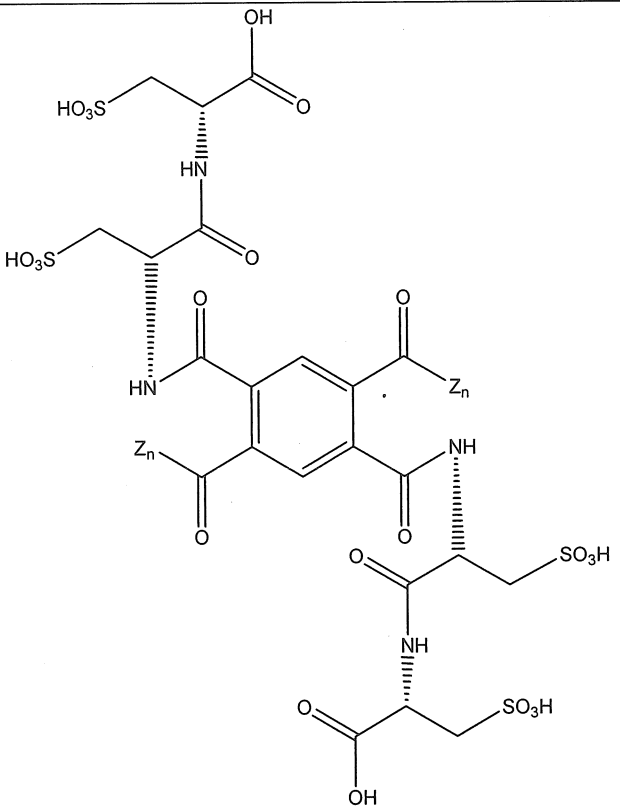
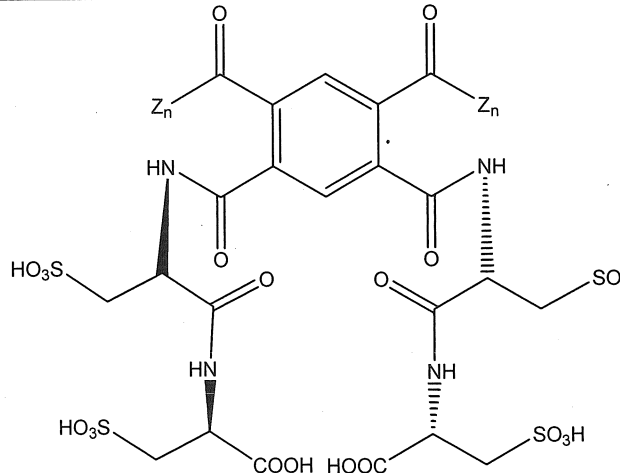
Số tham chiếu	Tham chiếu viết tắt	Cấu trúc
MD343 Phân tử lượng 1597	PK2 TCA(Z ₀) ₂ - [D- Cya] ₃ - OH	

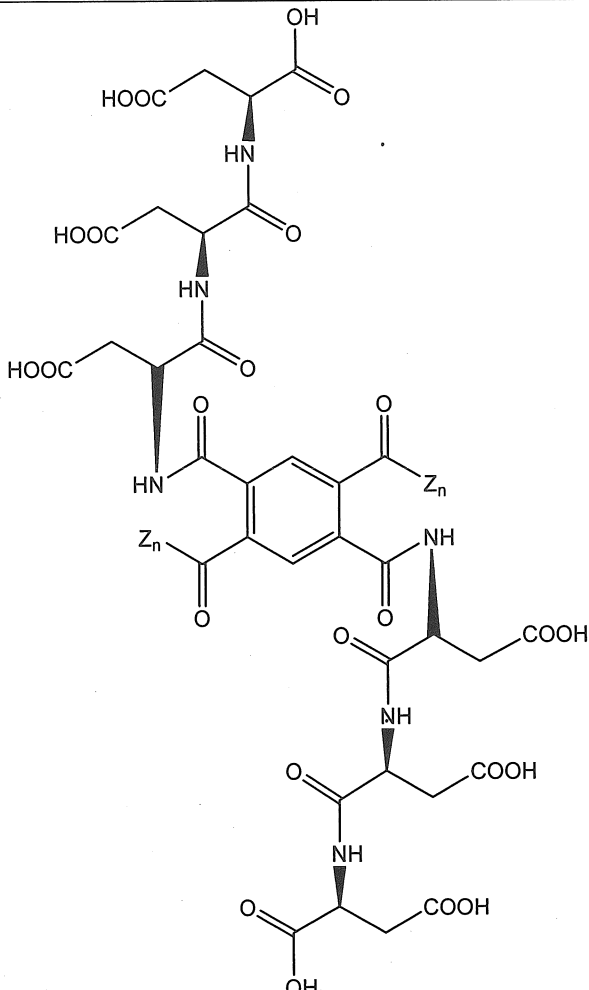
MD344 Phân tử lượng 2058	PK2 TCA(Z₀)₂[(D -Asp)₄D- Cya)₃]-OH	
--	---	---

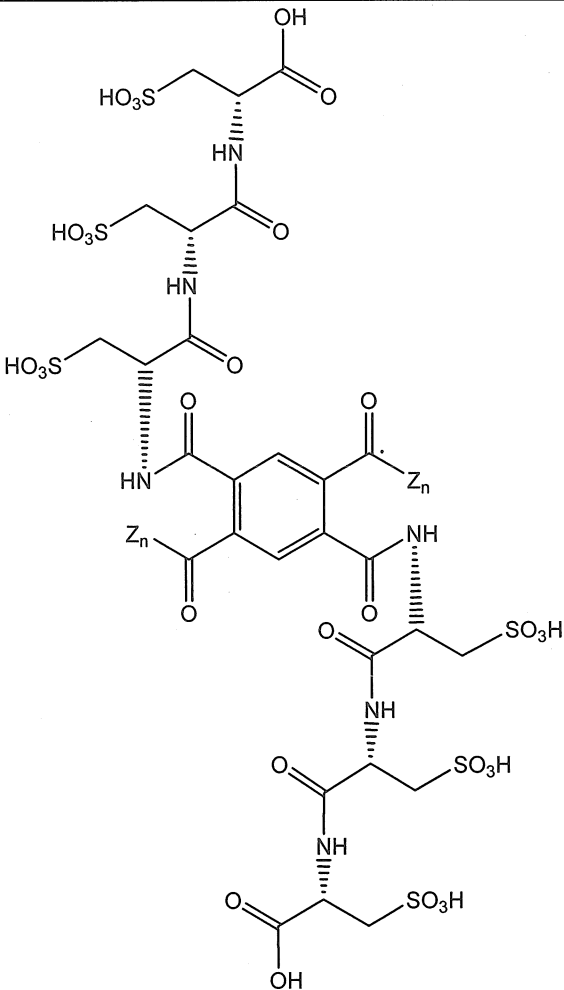
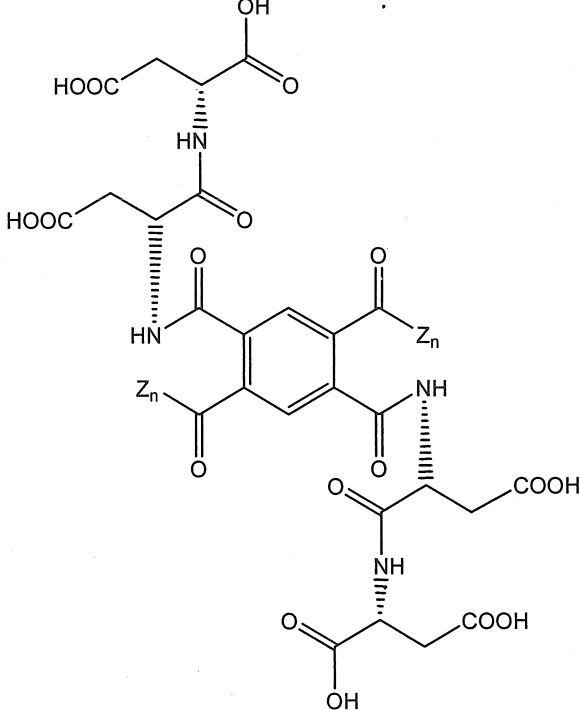
MD345 Phân tử lượng 2201	PK2TCA(Z₀) 2-[D-Cya (SO₃H)]₇- OH	
MD348 Phân tử lượng 1982	CHTCA(Z₀)₂ -[D-Asp(D-Cya)-D- Asp(D-Cya)- D-Asp(D-Cya)]-OH	

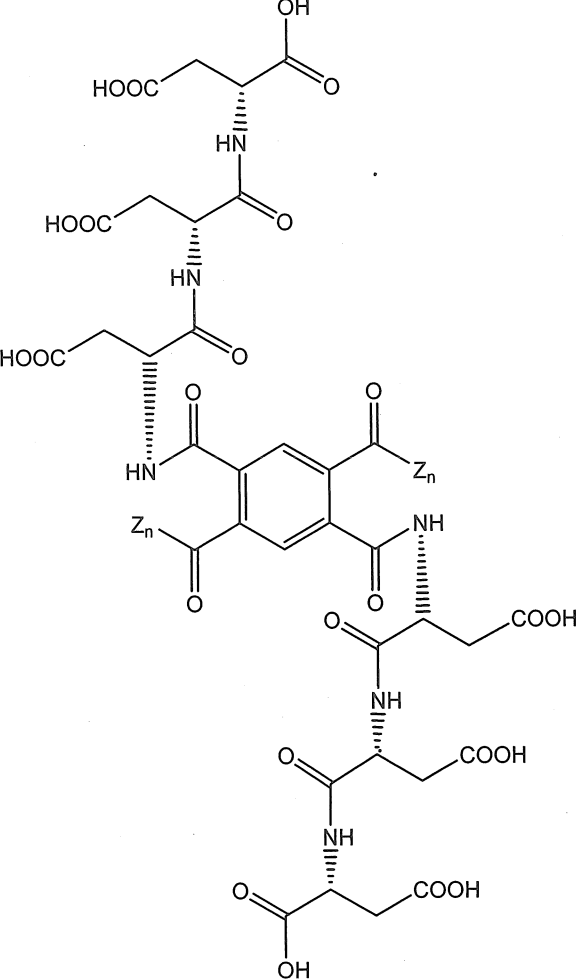
MD349 Phân tử lượng 2248	CHTCA(Z₀)[D-Asp(D- Cya)-D- Asp(D- Cya)-D- Asp(D- Cya)]-OH	
--	--	--

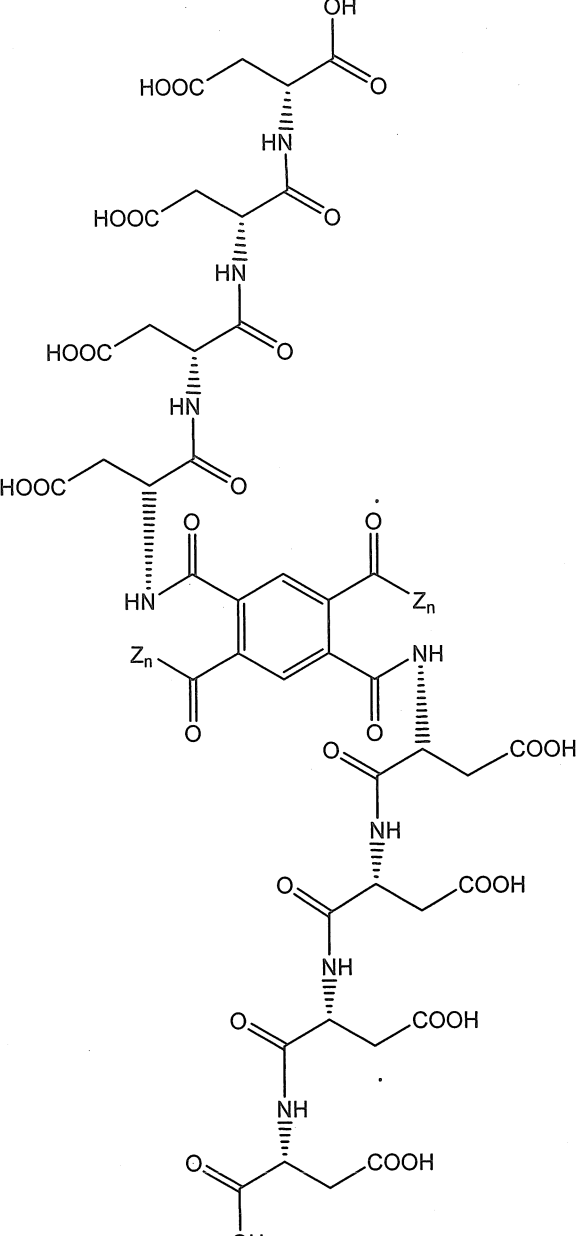
MD352 Phân tử lượng 1994	PK2 $\text{PYR}(\text{Zn})_2[\text{D-Cya}]_7\text{COOH}$	
--	---	--

MD356 Phân tử lượng 1940	PK1 PYR(Z_n)₂- [D-Cya-D- Cya]₂	
MD357 Phân tử lượng 1854	PK2 PYR(Z_n)₂-D- Cya-D- Cya]₂	

MD358	PK1 PYR(Z_n) ₂ [L-Asp-L-Asp-L-Asp] ₂	
-------	---	---

MD359 Phân tử lượng 2158	PK1 PYR(Z_n)₂[(D -Cya)₃-OH]₂	
MD371 Phân tử lượng 1710	PK1 PYR(Z_n)₂- [D-Asp-D- Asp]₂	

MD373 Phân tử lượng 1940	PK1 PYR(Z_n)₂- [D-Asp-D- Asp-D-Asp]₂	
--	--	---

MD376 Phân tử lượng 2170	PK1 PYR(Z_n)₂- [D-Asp-D- Asp-D-Asp- D-Asp]₂	
--	---	---

Thuật ngữ "alkyl" được sử dụng riêng rẽ hoặc kết hợp trong bản mô tả này để chỉ nhóm hydrocacbon no mạch thẳng hoặc mạch nhánh. Thuật ngữ "C₁₋₁₂ alkyl" được dùng để chỉ nhóm như vậy chứa từ một đến mười hai nguyên tử cacbon và "alkyl thấp" được dùng để chỉ nhóm C₁₋₆ alkyl chứa từ một đến sáu nguyên tử cacbon, như metyl ("Me"), etyl ("Et"), n-propyl, isopropyl, n-butyl, isobutyl, sec-butyl, tert-butyl và các nhóm tương tự.

Thuật ngữ "xycloalkyl" được dùng để chỉ vòng cacbon không thơm, vòng cacbon no không thơm. Thuật ngữ "C₄₋₉ xycloalkyl", chẳng hạn, được dùng để chỉ nhóm như vậy có từ 4 đến 9 nguyên tử cacbon. Các ví dụ bao gồm xyclobutyl, xyclopentyl và xyclohexyl.

Thuật ngữ "alkenyl" được dùng để chỉ hydrocacbon mạch thẳng hoặc mạch nhánh chứa một hoặc nhiều liên kết đôi, tốt hơn là một hoặc hai liên kết đôi. Thuật ngữ "C2-12 alkenyl", ví dụ, được dùng để chỉ nhóm như vậy chứa từ hai đến mười hai nguyên tử cacbon. Các ví dụ về alkenyl bao gồm alyl, 1-metylvinyl, butenyl, iso-butenyl, 1,3-butadienyl, 3-metyl-2-butenyl, 1,3-butadienyl, 1,4-pentadienyl, 1-pentenyl, 1-hexenyl, 3-hexenyl, 1,3-hexadienyl, 1,4-hexadienyl và 1,3,5-hexatrienyl.

Thuật ngữ "alkynyl" được dùng để chỉ hydrocacbon mạch thẳng hoặc mạch nhánh chứa một hoặc nhiều liên kết ba, tốt hơn là một hoặc hai liên kết ba. Thuật ngữ "C2-12 alkynyl", ví dụ, được dùng để chỉ nhóm như vậy chứa từ hai đến mười hai nguyên tử cacbon. Các ví dụ bao gồm 2-propynyl và 2- hoặc 3-butynyl.

Thuật ngữ "alkoxy" như được sử dụng riêng rẽ hoặc kết hợp để chỉ nhóm alkyl mạch thẳng hoặc mạch nhánh liên kết cộng hóa trị thông qua liên kết oxy (-O-) và các thuật ngữ "C₁₋₆ alkoxy" và "alkoxy thấp" chỉ các nhóm chứa từ một đến sáu nguyên tử cacbon, như metoxy, etoxy, propoxy, isopropoxy, butoxy, t-butoxy và các nhóm tương tự.

Thuật ngữ "xycloalkenyl" được dùng để chỉ các nhóm alkenyl vòng có một nhân vòng hoặc nhiều nhân ngưng tụ, và ít nhất một điểm không no bên trong, tốt hơn là kết hợp 4 đến 11 nguyên tử cacbon. Các ví dụ về các nhóm thích hợp xycloalkenyl bao gồm, ví dụ, xyclobut-2-enyl, xyclopent-3-enyl, xyclohex-4-enyl, xyclooct-3-enyl, indenyl và các nhóm tương tự.

Thuật ngữ "axyl" được dùng để chỉ các nhóm H-C(O)-, alkyl-C(O)-, xycloalkyl-C(O)-, aryl-C(O)-, heteroaryl-C(O)- và heteroxyclyl-C(O)-, khi alkyl, xycloalkyl, aryl, heteroaryl và heteroxyclyl được bộc lộ trong bản mô tả này.

Thuật ngữ "aryl" được dùng để chỉ các nhân hoặc các hệ nhân thơm (không dị vòng) vòng cacbon. Các nhân thơm có thể là các hệ nhân một vòng hoặc hai vòng. Các nhân thơm hoặc các hệ nhân thơm thường được cấu thành bởi 5 đến 10 nguyên tử cacbon. Các ví dụ về các nhóm thích hợp aryl bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, phenyl, biphenyl, naphtyl, tetrahydronaphtyl, và các nhóm tương tự.

Thuật ngữ "alkylen" được dùng để chỉ gốc hydrocacbon no mạch nhánh hoặc mạch thẳng hoặc mạch vòng có hai tâm gốc hóa trị một thu được bằng cách loại bỏ hai nguyên tử hydro ra khỏi cùng một nguyên tử cacbon hoặc hai nguyên tử cacbon khác nhau của alkan gốc. Ví dụ, nhóm alkylen có thể có 1 đến 20 nguyên tử cacbon, 1 đến 10 nguyên tử

cacbon, hoặc 1 đến 6 nguyên tử cacbon. Các gốc alkylen thường bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, metylen ($-\text{CH}_2-$), 1,1-etyl ($-\text{CH}(\text{CH}_3)-$), 1,2-etyl ($-\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 1,1-propyl ($-\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)-$), 1,2-propyl ($-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)-$), 1,3-propyl ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 1,4-butyl ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$), và các nhóm tương tự.

Thuật ngữ “alkenylen” được dùng để chỉ gốc hydrocacbon không no, mạch nhánh hoặc mạch thẳng hoặc mạch vòng có hai tâm gốc hóa trị một thu được bằng cách loại bỏ hai nguyên tử hydro ra khỏi cùng một nguyên tử cacbon hoặc hai nguyên tử cacbon khác nhau của alken gốc. Ví dụ, và nhóm alkenylen có thể có 1 đến 20 nguyên tử cacbon, 1 đến 10 nguyên tử cacbon, hoặc 1 đến 6 nguyên tử cacbon. Các gốc alkenylen thường bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, 1,2-etylen ($-\text{CH}=\text{CH}-$).

Thuật ngữ “alkynylen” được dùng để chỉ gốc hydrocacbon không no, mạch nhánh hoặc mạch thẳng hoặc mạch vòng có hai tâm gốc hóa trị một thu được bằng cách loại bỏ hai nguyên tử hydro ra khỏi cùng một nguyên tử cacbon hoặc hai nguyên tử cacbon khác nhau alkyn gốc. Ví dụ, nhóm alkynylen có thể có 1 đến 20 nguyên tử cacbon, 1 đến 10 nguyên tử cacbon, hoặc 1 đến 6 nguyên tử cacbon. Các gốc alkynylen thường bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, axetylen ($-\text{C}\equiv\text{C}-$), propargyl ($-\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{C}-$), và 4-pentynyl ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}-$).

Thuật ngữ “arylen” để chỉ gốc aryl có hai tâm gốc hóa trị một thu được từ việc loại bỏ hai nguyên tử hydro ra khỏi cùng một nguyên tử cacbon hoặc hai nguyên tử cacbon khác nhau hoặc các nguyên tử khác loại của nhóm aryl gốc.

Các thuật ngữ "halo" và "halogen" được dùng để chỉ các nhóm flo, clo, bromo và iodo.

Thuật ngữ nhóm "halo alkyl" có một hoặc nhiều nguyên tử hydro trên nhóm alkyl được thế bằng halogen.

Thuật ngữ "heteroaryl" được dùng để chỉ nhóm vòng cacbon thơm hóa trị một, tốt hơn là có từ 2 đến 10 nguyên tử cacbon và 1 đến 4 nguyên tử khác loại được chọn từ các nguyên tử oxy, nitơ và lưu huỳnh trong nhân. Tốt hơn, nếu nguyên tử khác loại là nitơ. Các nhóm heteroaryl này có thể có một nhân đơn nhất (ví dụ, pyridyl, pyrrolyl hoặc furyl) hoặc nhiều nhân ngưng tụ (ví dụ, indolizinyl, benzothienyl, hoặc benzofuranyl).

Thuật ngữ "heterocyclyl" được dùng để chỉ nhóm no hoặc không no hóa trị một có một nhân hoặc nhiều nhân ngưng tụ, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 1 đến 8 nguyên

từ cacbon và từ 1 đến 4 nguyên tử khác loại được chọn từ nitơ, lưu huỳnh, oxy, selen hoặc phospho trong nhân.

Thuật ngữ "được thế tùy ý" có nghĩa là một nhóm có thể bao gồm một hoặc nhiều phần tử thế. Một hoặc nhiều nguyên tử hydro trên nhóm này có thể được thế bằng các phần tử thế độc lập được chọn từ các halo (ví dụ halo alkyl như $-\text{CF}_3$ hoặc $-\text{CF}_2\text{H}$), C_{1-6} alkyl, C_{2-6} alkenyl, C_{2-6} alkynyl, $-(\text{CH}_2)_v\text{C}_{3-7}$ xycloalkyl, $-(\text{CH}_2)_v\text{C}_{4-7}$ xycloalkenyl, $-(\text{C}-\text{H}_2)_v$ aryl, $-(\text{CH}_2)_v$ heteroxyclyl, $-(\text{CH}_2)_v$ heteroaryl, $-\text{C}_6\text{H}_4\text{S}(\text{O})_q\text{C}_{1-6}$ alkyl, $-\text{C}(\text{Ph})_3$, $-\text{CN}$, $-\text{OR}$, $-\text{O}-(\text{CH}_2)_{1-6}-\text{R}$, $-\text{O}-(\text{CH}_2)_{1-6}-\text{OR}$, $-\text{OC}(\text{O})\text{R}$, $-\text{C}(\text{O})\text{R}$, $-\text{C}(\text{O})\text{OR}$, $-\text{OC}(\text{O})\text{NR}'\text{R}''$, $-\text{NR}'\text{R}''$, $-\text{NO}_2$, $-\text{NRC}(\text{O})\text{R}'$, $-\text{NRC}(\text{O})\text{NR}'\text{R}''$, $-\text{NRC}(\text{S})\text{NR}'\text{R}''$, $-\text{NRS}(\text{O})_2\text{R}'$, $-\text{NRC}(\text{O})\text{OR}'$, $-\text{C}(\text{NR})\text{NR}'\text{R}''$, $-\text{C}(=\text{NOR}')\text{R}$, $-\text{C}(=\text{NOH})\text{NR}'\text{R}''$, $-\text{C}(\text{O})\text{NR}'\text{R}''$, $-\text{C}(=\text{NCN})-\text{NR}'\text{R}''$, $-\text{C}(=\text{NR})\text{NR}'\text{R}''$, $-\text{C}(=\text{NR}')\text{SR}''$, $-\text{NR}'\text{C}(=\text{NCN})\text{SR}''$, $-\text{CONRSO}_2\text{R}'$, $-\text{C}(\text{S})\text{NR}'\text{R}''$, $-\text{S}(\text{O})_q\text{R}$, $-\text{SO}_2\text{NR}'\text{R}''$, $-\text{SO}_2\text{NRC}(\text{O})\text{R}'$, $-\text{OS}(\text{O})_2\text{R}$, $-\text{PO}(\text{OR})_2$ và $-\text{NO}_2$; trong đó v bằng 0 đến 6, q bằng 0 đến 2 và mỗi nhóm R , R' và R'' độc lập được chọn từ H , C_{1-6} alkyl, C_{2-6} alkenyl, C_{2-6} alkynyl, C_{3-7} xycloalkyl, C_{4-7} xycloalkenyl, aryl, heteroxyclyl, heteroaryl, C_{1-6} alkyl-aryl, C_{1-6} alkylheteroaryl, và C_{1-6} alkylheteroxyclyl, trong đó alkyl, alkenyl, alkynyl, xycloalkyl, xycloalkenyl, aryl, heteroxyclyl, heteroaryl, C_{1-6} alkylaryl, C_{1-6} alkylheteroaryl, hoặc C_{1-6} alkylheteroxyclyl, có thể được thế tùy ý bằng một đến sáu nhóm giống nhau hoặc khác nhau được chọn từ halogen, hydroxy, alkyl thấp, alkoxy thấp, $-\text{CO}_2\text{H}$, CF_3 , CN , phenyl, NH_2 và $-\text{NO}_2$; hoặc trong đó R' và R'' được gắn vào cùng một nguyên tử nitơ, chúng có thể, cùng với nguyên tử này mà chúng gắn vào, tạo ra nitơ chứa nhân dị vòng chứa nitơ có 5 đến 7 thành phần.

Trong danh mục các nhóm chức có khả năng đã được bộc lộ trong bản mô tả này, khi một nhóm nhất định chứa hai hoặc nhiều nhóm phụ, ví dụ, các phân nhóm có thể được liệt kê ở định dạng [phân nhóm A][phân nhóm B] như ở alkylaryl, hoặc [phân nhóm A][phân nhóm B][phân nhóm C] như ở aryloxyalkyl, thứ tự của các phân nhóm khi chúng được liệt kê trên đây không chỉ giới hạn ở thứ tự mà chúng được thể hiện. Do đó, nhóm có hai phân nhóm được xác định là [phân nhóm A][phân nhóm B], như alkylaryl, được dự định chỉ nhóm có hai phân nhóm được xác định là [phân nhóm B][phân nhóm A], như arylalkyl.

Thuật ngữ "không đối xứng" được dùng để chỉ các phân tử mà có tính chất không chồng lán với ảnh qua gương của chúng, trong khi thuật ngữ "phi bất đối xứng" được dùng để chỉ các phân tử mà có thể chồng lán với ảnh qua gương của chúng.

Thuật ngữ “các chất đồng phân lập thể” được dùng để chỉ các hợp chất mà có cấu tạo hóa học giống hệt nhau, nhưng khác nhau về sự bố trí của các nguyên tử hoặc các nhóm trong không gian.

Thuật ngữ “chất đồng phân không đối quang” được dùng để chỉ chất đồng phân lập thể có hai hoặc nhiều tâm không đối xứng và các phân tử của chúng không là ảnh qua gương của nhau. Các chất đồng phân không đối quang có các tính chất vật lý khác nhau, ví dụ, nhiệt độ nóng chảy, nhiệt độ sôi, các tính chất phổ, và hoạt tính phản ứng. Các hỗn hợp gồm các chất đồng phân không đối quang có thể tách theo các quy trình phân tích phân giải cao như điện di và sắc ký.

Thuật ngữ “chất đồng phân đối ảnh” được dùng để chỉ hai chất đồng phân lập thể của hợp chất mà không là ảnh chồng chập qua gương của nhau.

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

Thuật ngữ các axit amin và các chất dẫn xuất của chúng được dùng trong bản mô tả này có thể được thể hiện vắn tắt theo mã ba chữ cái hoặc mã một chữ cái tương ứng

của chúng khi thích hợp. Ví dụ, axit xysteic trong bản mô tả này có thể được gọi là Cya, Cyst hoặc Cyst-SO₃H, axit aspartic có thể được gọi là Asp.

Tốt hơn, nếu các muối của các hợp chất theo sáng chế là được dụng, nhưng có thể thấy rằng các muối không được dụng cũng nằm trong phạm vi của sáng chế, vì chúng có thể dùng làm các chất trung gian trong quá trình điều chế các muối được dụng.

Có thể thấy rằng các hợp chất theo sáng chế, và các muối này của chúng, có thể được trình bày ở dạng các chất dẫn xuất được dụng. Thuật ngữ "chất dẫn xuất được dụng" bao gồm các este, các tiền được chất, các solvat và các hydrat được dụng của các hợp chất có công thức (I), hoặc các muối của chúng. Các chất dẫn xuất được dụng có thể bao gồm hydrat hoặc hợp chất hoặc tiền được chất được dụng bất kỳ khác mà, sau khi dùng cho đối tượng, có khả năng tạo ra (trực tiếp hoặc gián tiếp) hợp chất theo sáng chế, hoặc chất chuyển hóa có hoạt tính hoặc gốc của chúng.

Các muối được dụng bao gồm các muối cộng axit, các muối cộng bazơ, và các muối của amin bậc bốn và pyridini. Các muối cộng axit được tạo ra từ hợp chất theo sáng chế và axit vô cơ hoặc hữu cơ được dụng bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các axit clohydric, bromhydric, sulfuric, phosphoric, metansulfonic, toluensulphonic, benzensulphonic, axetic, propionic, ascorbic, xitric, malonic, fumaric, maleic, lactic, salixylic, sulfamic, tarttric hoặc các axit amin. Ion trái dấu của amin bậc bốn và các pyridini bao gồm clorua, bromua, iodua, sulfat, phosphat, metansulfonat, xitrat, axetat, malonat, fumarat, sulfamat, và tartrat. bazơ các muối cộng bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các muối như natri, kali, canxi, lithi, magie, amoni và alkylamoni. Ngoài ra, các nhóm chứa nitơ kiềm tính có thể được tạo bậc bốn bởi các tác nhân như halogenua của alkyl thấp, như metyl, etyl, propyl, và butyl clorua, bromua và iodua; dialkyl sulfat như dimetyl và dietyl sulfat; và các chất khác. Các muối này có thể được tạo ra theo cách đã biết, ví dụ, bằng cách xử lý hợp chất này bằng axit hoặc bazơ thích hợp với sự có mặt của dung môi thích hợp.

Các hợp chất theo sáng chế có thể ở dạng tinh thể và/hoặc solvat (ví dụ, các hydrat) và dự định rằng cả hai dạng này nằm trong phạm vi của sáng chế. Thuật ngữ "solvat" là phức gồm tỷ lệ biến đổi tạo được bởi chất tan (theo sáng chế là hợp chất theo sáng chế) và dung môi. Các dung môi này không nên cản trở hoạt tính sinh học của chất tan. Các dung môi có thể được, bằng cách làm ví dụ, nước, etanol hoặc axit axetic. Các phương pháp solvat hóa thường đã được biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Thuật ngữ "tiền dược chất" được dùng với nghĩa rộng nhất của nó và bao hàm các chất dẫn xuất mà được chuyển hóa *in vivo* thành các hợp chất theo sáng chế. Các chất dẫn xuất này dễ dàng được tạo ra đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, và bao gồm, ví dụ, các hợp chất trong đó nhóm hydroxy tự do được chuyển hóa thành chất dẫn xuất este hoặc nhân nguyên tử nitơ được chuyển hóa thành N-oxit. Các ví dụ về este các chất dẫn xuất bao gồm alkyl este, phosphat este và các chất được tạo ra từ axit amin, tốt hơn là valin. Hợp chất bất kỳ mà là tiền dược chất của hợp chất theo sáng chế nằm trong phạm vi và ý tưởng của sáng chế.

Thuật ngữ "este dược dụng" bao gồm các este chấp nhận được về mặt sinh học của hợp chất theo sáng chế như các chất dẫn xuất axit sulphonic, phosphonic và carboxylic.

Do đó, theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất tiền dược chất hoặc este dược dụng của hợp chất theo sáng chế hoặc hoặc muối của nó.

Có thể thấy rằng các hợp chất theo sáng chế có ít nhất một tâm bất đối xứng, và do đó có khả năng tồn tại ở nhiều hơn một dạng đồng phân lập thể. Sáng chế mở rộng đến mọi dạng riêng lẻ và đến hỗn hợp của chúng, kể cả các chất triệt quang. Các chất đồng phân có thể được tách một cách thuận tiện theo phương pháp sắc ký hoặc bằng cách sử dụng tác nhân phân giải. Theo cách khác, từng chất đồng phân có thể được điều chế theo tổng hợp bất đối xứng bằng cách sử dụng các chất trung gian không đối xứng. Nếu hợp chất này có ít nhất là một liên kết đôi cacbon-cacbon, thì có thể xảy ra ở dạng Z- và dạng E với tất cả các dạng đồng phân của các hợp chất được bao hàm trong sáng chế.

Sáng chế còn bao gồm muối hoặc chất dẫn xuất dược dụng este, solvat và/hoặc tiền dược chất như dược dụng ở phương pháp nêu trên theo sáng chế.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất dược phẩm mà chứa lượng hữu hiệu để điều trị bệnh của một hoặc nhiều các hợp chất nêu trên hoặc muối dược dụng của nó, bao gồm các chất dẫn xuất dược dụng của chúng, và tùy ý chất mang dược dụng hoặc chất pha loãng.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất các dược phẩm để dùng trong việc điều trị hoặc phòng ngừa nhiễm virus cúm, dược phẩm này chứa lượng hữu hiệu của hợp chất theo sáng chế, hoặc muối dược dụng của chúng, bao gồm chất dẫn xuất dược dụng của chúng, và tùy ý chất mang dược dụng hoặc chất pha loãng.

Thuật ngữ "dược phẩm" nhằm bao gồm chế phẩm chứa hoạt chất với nguyên liệu bao nang ở dạng chất mang, để tạo ra viên nang trong đó hoạt chất (có hoặc không có chất mang khác) được bao quanh bởi các chất mang.

Các dược phẩm hoặc các chế phẩm bao gồm các dạng thích hợp để dùng qua đường miệng, đường trực tràng, đường mũi, khu trú (kể cả dạng đặt trong má và dưới lưỡi), qua đường âm đạo hoặc ngoài đường tiêu hóa (kể cả tiêm bắp, dưới da và qua đường tĩnh mạch) hoặc ở dạng thích hợp để dùng bằng cách khí dung hoặc bơm. Theo một phương án, các hợp chất theo sáng chế được bào chế để khí dung/khí dung, dùng qua đường miệng, dùng trong mũi, dùng trong khoang màng bụng, dùng qua đường tĩnh mạch hoặc tiêm bắp.

Các xem xét chung về việc bào chế và/hoặc sản xuất các tác nhân của các dược phẩm có thể được thấy, ví dụ, trong tài liệu: *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Sixteenth Edition, E. W. Martin (Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1980), và *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 21st Edition (Lippincott Williams & Wilkins, 2005).

Theo một phương án, các dược phẩm và các chế phẩm theo sáng chế có thể được dùng cho người có nhu cầu điều trị theo phương pháp phân phối bất kỳ thích hợp như khí dung, bơm hoặc phân phối trong mũi. Các phương pháp thích hợp để khí dung, bơm hoặc dùng trong mũi là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Theo một phương án, các dược phẩm hoặc các chế phẩm chứa các hợp chất theo sáng chế có thể ở dạng thích hợp để dùng bằng cách khí dung hoặc bơm. Ví dụ, các dược phẩm hoặc các chế phẩm chứa các hợp chất theo sáng chế có thể được bào chế ở dạng bột khô, dung dịch, huyền phù hoặc sol khí để khí dung hoặc bơm qua miệng hoặc mũi. Các chế phẩm thích hợp để dùng sol khí hoặc bột khô có thể được bào chế theo các phương pháp thông thường và có thể được phân phối cùng với các dược chất khác như các hợp chất nêu trên được dùng trong việc điều trị hoặc phòng ngừa các dạng nhiễm như được bộc lộ trong bản mô tả này.

Theo một phương án, các dược phẩm hoặc công thức chứa các hợp chất theo sáng chế có thể được dùng nhờ máy khí dung bột khô. Các loại máy khí dung bột khô đã được bộc lộ trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể được sử dụng, cũng như dạng bào có kích thước micro của các viên nén đã được nén đẳng tĩnh hoặc các片片 thuốc có hoặc không có

các chất kết dính trơ như lactoza có thể được sử dụng. Phương pháp dùng này là cách phân phối đặc biệt nhanh đến phổi. Khi hợp chất theo sáng chế được cung cấp ở dạng bột khô, nó có thể có mặt riêng lẻ hoặc trong hỗn hợp với chất pha loãng được dùng thích hợp như tinh bột, các chất dẫn xuất của tinh bột như hydroxypropylmetyl xenluloza hoặc polyvinylpyrrolidin (PVP), các chất dẫn xuất của đường như manitol hoặc lactoza. Chế phẩm bột có thể được trình bày ở dạng liều lượng đơn vị, ví dụ, trong các viên nang hoặc khay ví dụ gelatin hoặc tạo dạng gói dẻo mềm hoặc gói vỉ thuốc mà bột có thể được dùng từ đó nhờ dụng cụ khí dung, hoặc ở dạng nhiều liều từ, ví dụ, dụng cụ chứa bột.

Để khí dung các giọt nhỏ, sương và sol khí các thiết bị khác nhau như máy khí dung hoặc má tạo sol khí nén áp lực là dễ mua được. Ngoài ra, các thiết bị này có thể có đồng hồ đo để cấp liều đều.

Tất cả các máy khí dung có thể được thiết kế và cấu tạo để phân phối các phần tử lỏng hoặc rắn đến niêm mạc của mũi cũng như đường hô hấp trên và/hoặc đường hô hấp dưới.

Theo phương án khác, các dược phẩm hoặc chế phẩm chứa các hợp chất theo sáng chế có thể được dùng bằng cách khí dung hoặc bơm theo cách khí dung sol khí ướt. Ví dụ, các dược phẩm hoặc chế phẩm chứa các hợp chất theo sáng chế có thể được bào chế để dùng theo cách khí dung sol khí ướt trong máy khí dung đo trước.

Theo phương án khác nữa, các dược phẩm hoặc các chế phẩm chứa các hợp chất theo sáng chế là ở dạng thích hợp để dùng trong mũi. Các dược phẩm dùng trong mũi được bộc lộ trong bản mô tả này có thể được dùng ở dạng xịt hoặc giọt. Do đó, các bao gói thương mại thích hợp chứa chế phẩm dùng trong mũi có thể ở dạng vật chứa xịt bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Theo một hoặc nhiều phương án, các chế phẩm theo sáng chế có thể được dùng nhờ thiết bị xịt hoặc vật chứa. Các thiết bị xịt theo sáng chế có thể là hệ thống một liều đơn vị hoặc hệ thống nhiều liều, ví dụ, chứa bình, bơm và/hoặc cụm. Các thiết bị xịt này là sẵn có trên thị trường. Các thiết bị xịt thương mại thích hợp bao gồm các thiết bị sẵn có từ Nemera, Aptar, Bepak và Becton-Dickinson. Các cách thức thích hợp khác để dùng các dược phẩm hoặc các chế phẩm trong mũi theo sáng chế bao gồm dùng qua thiết bị nhỏ giọt, bơm tiêm, bình bóp, và các cách bất kỳ khác đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này để dùng chất lỏng vào niêm mạc của mũi theo cách chính xác và lặp lại.

Các hợp chất theo sáng chế cũng có thể được dùng ở nhiều dạng liều dùng qua đường miệng và ngoài đường tiêu hóa. Các dạng liều dưới đây có thể bao gồm hoạt chất là hợp chất theo sáng chế hoặc muối được dụng của hợp chất theo sáng chế là điều hiển nhiên đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Các dược phẩm hoặc các chế phẩm chứa các hợp chất theo sáng chế có thể ở dạng chế phẩm vô trùng để tiêm, như nước vô trùng để tiêm hoặc huyền phù nhón. Huyền phù này có thể được bào chế theo cách đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này bằng cách sử dụng chất phân tán hoặc chất thấm ướt hoặc chất tạo huyền phù thích hợp đã được nêu trong bản mô tả này. Dược phẩm vô trùng để tiêm còn có thể là dung dịch hoặc huyền phù vô trùng để tiêm trong chất pha loãng hoặc dung môi không độc được chấp nhận để dùng ngoài đường tiêu hóa, như dung dịch trong 1,3-butan-di-ol hoặc được bào chế ở dạng bột đã được đông khô nhanh. Trong số các chất dẫn và các dung môi chấp nhận được mà có thể sử dụng được có nước, dung dịch Ringer và dung dịch natri clorua đẳng trương. Ngoài ra, dầu không bay hơi vô trùng có thể được dùng một cách thuận tiện làm dung môi hoặc môi trường tạo huyền phù. Nhằm mục đích này, dầu nhẹ không bay hơi bất kỳ có thể được sử dụng bao gồm monoglyxerit hoặc diglyxerit tổng hợp. Ngoài ra, các axit béo như axit oleic có thể được dùng theo cách khác để bào chế thuốc tiêm. Hơn thế nữa, các chế phẩm thích hợp để dùng ngoài đường tiêu hóa bao gồm dung dịch tiêm vô trùng trong nước hoặc không chứa nước mà có thể chứa các chất chống oxy hóa, các dung dịch đệm, các chất kháng khuẩn và các chất tan mà khiến cho chế phẩm đẳng trương với máu của người nhận dự kiến; và các loại huyền phù vô trùng trong nước hoặc không chứa nước mà có thể bao gồm các tác nhân tạo huyền phù và các tác nhân làm đặc.

Các dược phẩm hoặc các chế phẩm chứa các hợp chất theo sáng chế còn có thể được dùng qua đường miệng, ví dụ, các viên nén, các viên dẹt, các viên ngậm, các huyền phù trong nước hoặc trong dầu, bột hoặc hạt có thể phân tán được, các loại nhũ tương, viên nang cứng hoặc viên nang mềm, siro hoặc cồn ngọt có thể được điều chế. Các dược phẩm nhằm để dùng qua đường miệng có thể được bào chế theo phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực bào chế dược phẩm và các dược phẩm này có thể chứa một hoặc nhiều tác nhân bao gồm các chất tạo ngọt, các tác nhân tạo vị, các tác nhân tạo màu và các chất bảo quản, để tạo ra chế phẩm dễ dùng.

Các hợp chất theo sáng chế, cùng với tá dược, chất mang, hoặc chất pha loãng thông thường, có thể được đưa vào dạng dược phẩm và liều lượng đơn vị của chúng, và

ở dạng đó có thể được dùng ở dạng rắn, như các viên nén hoặc nhồi các viên nang, hoặc chất lỏng như dung dịch, các loại huyền phù, các loại nhũ tương, các loại cồn ngọt, hoặc các viên nang được nhồi chúng, tất cả để dùng qua đường miệng, ở dạng viên đặt hậu môn để dùng qua đường trực tràng; hoặc ở dạng dung dịch vô trùng để tiêm truyền để dùng ngoài đường tiêu hóa (kể cả dưới da).

Các dược phẩm này và các dạng liều đơn vị của chúng có thể bao gồm các thành phần thông thường theo các tỷ lệ thông thường, có hoặc không có các hoạt chất bổ sung hoặc các thành phần cơ bản, và các dạng liều đơn vị này có thể chứa lượng hữu hiệu thích hợp bất kỳ của hoạt chất phù hợp với khoảng liều lượng dự tính dùng hằng ngày. Các chế phẩm chứa mười (10) miligam hoạt chất hoặc, hoặc rộng hơn, 0,1 miligam đến một trăm (100) milligam, cho mỗi viên nén, là các dạng liều đơn vị đại diện thích hợp.

Để bào chế các dược phẩm từ các hợp chất theo sáng chế, các chất mang được dùng có thể là rắn hoặc lỏng. Các chế phẩm dạng rắn bao gồm bột, viên nén, viên tròn, viên nang, viên con nhộng, viên đặt hậu môn, và hạt phân tán được. Chất mang rắn có thể là một hoặc nhiều chất mà còn có thể hoạt động như chất pha loãng, tác nhân tạo vị, chất hòa tan, chất làm trơn, tác nhân tạo huyền phù, chất kết dính, chất bảo quản, chất gây vỡ viên nén, hoặc nguyên liệu bao nang.

Ở bột, chất mang là chất rắn được nghiền mịn mà được kết hợp với thành phần hoạt tính đã được nghiền mịn.

Ở các viên nén, hoạt chất được trộn với chất mang có khả năng liên kết cần thiết theo tỷ lệ thích hợp và được kết đặc thành hình và kích thước mong muốn.

Tốt hơn, nếu bột và viên nén chứa từ năm hoặc mười đến bảy mươi phần trăm hoạt chất. Chất mang thích hợp là magie cacbonat, magie stearat, talc, đường, lactoza, pectin, dextrin, tinh bột, gelatin, tragacan, metylxenluloza, natri carboxymetylxenluloza, sáp nóng chảy ở nhiệt độ thấp, bơ cacao, và các chất tương tự. Thuật ngữ "chế phẩm" nhằm bao gồm dạng bào chế chứa hoạt chất và nguyên liệu bao nang làm chất mang tạo ra viên nang, trong đó hoạt chất, có hoặc không có các chất mang, được bao quanh bởi chất mang, mà nhờ đó kết hợp với nó. Tương tự, viên con nhộng và viên ngậm được bao gồm. Viên nén, bột, viên nang, viên tròn, viên con nhộng, và viên ngậm có thể được dùng ở dạng rắn thích hợp để dùng qua đường miệng.

Để bào chế viên đặt hậu môn, trước hết sáp nóng chảy ở nhiệt độ thấp, như hỗn hợp gồm các glyxerit của axit béo hoặc bơ cacao, được làm nóng chảy và hoạt chất được

phân tán đồng nhất trong đó bằng cách khuấy. Tiếp đó, hỗn hợp đồng nhất được rót vào khuôn có kích thước phù hợp, để nguội, và nhờ đó hóa rắn.

Các chế phẩm thích hợp để dùng qua đường âm đạo có thể được trình bày ở dạng viên đặt âm đạo, nút gạc, kem bôi, gel, bột nhào, xà phòng hoặc thuốc xịt mà ngoài hoạt chất còn chứa chất mang đã biết rằng là thích hợp trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Các chế phẩm dạng lỏng bao gồm dung dịch, huyền phù, và nhũ tương, ví dụ, dung dịch nước hoặc nước-propylen glycol. Ví dụ, các chế phẩm lỏng dùng để tiêm ngoài đường tiêu hóa có thể được bào chế ở dạng dung dịch trong dung dịch nước polyetylen glycol.

Các chế phẩm dạng lỏng vô trùng bao gồm các loại dung dịch, các loại huyền phù, các loại nhũ tương, các loại siro và các loại cồn ngọt vô trùng. Hoạt chất có thể được hòa tan hoặc được tạo huyền phù trong chất mang được dụng, như nước vô trùng, dung môi hữu cơ vô trùng hoặc hỗn hợp gồm cả hai.

Do đó, các hợp chất theo sáng chế có thể được bào chế để dùng ngoài đường tiêu hóa (ví dụ, bằng cách tiêm, ví dụ, tiêm nhanh một liều hoặc truyền liên tục) và có thể được trình bày ở dạng liều lượng đơn vị trong ống thuốc tiêm, bơm tiêm đã nạp, vật chứa thể tích truyền ít hoặc trong vật chứa đa liều có bổ sung chất bảo quản. Các dược phẩm có thể ở dạng như huyền phù, dung dịch, hoặc nhũ tương trong chất dẫn dầu hoặc chất dẫn nước, và có thể chứa các tác nhân bào chế như tác nhân tạo huyền phù, tác nhân làm ổn định và/hoặc tác nhân phân tán. Theo cách khác, hoạt chất có thể ở dạng bột, thu được bằng cách phân tách vô trùng chất rắn vô trùng hoặc bằng cách làm đông khô nhanh ra khỏi dung dịch, bằng cách tạo kết cấu với chất dẫn thích hợp, ví dụ nước vô trùng không có chất gây sốt, trước khi dùng.

Dung dịch nước thích hợp để dùng qua đường miệng có thể được điều chế bằng cách hòa tan hoạt chất trong nước và bổ sung các chất tạo màu, các chất tạo vị, các chất làm ổn định và các tác nhân làm đặc thích hợp, nếu muốn, vào.

Các loại huyền phù trong nước thích hợp để dùng qua đường miệng có thể được tạo thành bằng cách phân tán hoạt chất đã được nghiền mịn trong nước với nguyên liệu nhót, như gôm tự nhiên hoặc gôm tổng hợp, nhựa, metylxenluloza, natri carboxymetylxenluloza, hoặc các tác nhân tạo huyền phù đã biết khác.

Cũng được bao gồm là các chế phẩm dạng rắn mà dự định được chuyển hóa, ngay trước khi dùng, thành chế phẩm dạng lỏng để dùng qua đường miệng. Các dạng lỏng này

bao gồm các loại dung dịch, các loại huyền phù, và các loại nhũ tương. Ngoài hoạt chất, các chế phẩm này có thể chứa các chất tạo màu, các chất tạo vị, các chất làm ổn định, các dung dịch đậm, các chất làm ngọt nhân tạo và tự nhiên, các chất phân tán, các chất làm đặc, các chất hòa tan, và các chất tương tự.

Để dùng tại chỗ vào biểu bì, các hợp chất theo sáng chế có thể được điều chế ở dạng dầu bôi, kem bôi hoặc nước xúc, hoặc ở dạng miếng dán da. Các loại dầu bôi và kem bôi có thể, ví dụ, được bào chế với nền nước hoặc nền dầu có bổ sung chất làm đặc và/hoặc chất tạo gel thích hợp. Các loại nước xúc có thể được bào chế với nền nước hoặc nền dầu và thường còn chứa một hoặc nhiều tác nhân nhũ hóa, tác nhân làm ổn định, tác nhân phân tán, tác nhân tạo huyền phù, tác nhân làm đặc, hoặc tác nhân tạo màu.

Các chế phẩm thích hợp để dùng khu trú trong miệng bao gồm viên ngậm chứa hoạt chất trong nền đã được tạo vị, thường là sucroza và acaxia hoặc tragacan; viên kẹo mềm nhỏ chứa hoạt chất trong nền tơ như gelatin và glyxerin hoặc sucroza và acaxia; và nước súc miệng chứa hoạt chất trong chất mang lỏng thích hợp.

Dung dịch hoặc huyền phù được dùng một cách trực tiếp vào khoang mũi theo cách thông thường, ví dụ, nhờ thiết bị nhỏ giọt, pipet hoặc xịt. Các chế phẩm có thể được tạo ra ở dạng một liều hoặc dạng nhiều liều. Trong trường hợp thiết bị nhỏ giọt hoặc pipet, mục đích này có thể đạt được nhờ bệnh nhân dùng thể tích thích hợp định trước của dung dịch hoặc huyền phù. Trong trường hợp xịt, mục đích này có thể đạt được, ví dụ, theo cách bơm xịt phun sương đo. Để nâng cao hiệu suất phân phối và lưu giữ đến mũi, các hợp chất theo sáng chế có thể được bao nang bằng xyclodextrin, hoặc được bào chế với các tác nhân khác được mong đợi là sẽ nâng cao mức phân phối và lưu giữ ở niêm mạc của mũi.

Mục đích dùng cho đường hô hấp còn có thể đạt được với chế phẩm sol khí, trong đó hoạt chất được cung cấp trong gói nén áp với chất đẩy thích hợp như hydrofloalkan (HFA) hoặc cloflocacbon (CFC), ví dụ, diclođiflometan, tricloflometan, hoặc điclotetrafloetan, cacbon đioxit, hoặc khí thích hợp khác. Một cách thuận tiện, sol khí có thể còn chứa chất hoạt động bề mặt như lexitin. Liều thuốc có thể được kiểm soát bằng van đo.

Theo cách khác, các hoạt chất có thể được cung cấp ở dạng bột khô, ví dụ, hỗn hợp bột chứa hợp chất này trong nền bột thích hợp như lactoza, tinh bột, các chất dẫn xuất của tinh bột như hydroxypropylmetyl xenluloza và polyvinylpyrrolidon (PVP). Một

cách thuận tiện, chất mang bột sẽ tạo ra gel trong khoang mũi. Chế phẩm bột có thể được trình bày ở dạng liều lượng đơn vị, ví dụ, trong viên nang hoặc khay, ví dụ, gelatin, hoặc gói vỉ thuốc mà bột có thể được dùng từ đó nhờ máy khí dung.

Trong các chế phẩm dự định để dùng vào đường hô hấp, kể cả các chế phẩm dùng trong mũi, hợp chất này sẽ thường có cỡ hạt nhỏ, ví dụ nằm trong khoảng từ 5 đến 10 micron hoặc bé hơn. Cỡ hạt này có thể thu được theo cách đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ, bằng cách micron hóa.

Nếu muốn, các chế phẩm được làm thích nghi để giải phóng chậm hoạt chất có thể được sử dụng.

Tốt hơn, nếu được phẩm ở dạng liều đơn vị. Ở dạng này, chế phẩm được chia nhỏ thành các liều lượng đơn vị chứa hoạt chất với lượng thích hợp. Dạng liều đơn vị có thể là chế phẩm đóng gói, bao gói chứa lượng chế phẩm riêng rẽ, như viên nén hoặc viên nang đóng gói, và bột trong lọ hoặc ống thuốc tiêm. Ngoài ra, dạng liều đơn vị có thể chính là viên nang, viên nén, viên con nhộng, hoặc viên ngậm, hoặc nó có thể là số lượng thích hợp trong số này ở dạng đã được đóng gói.

Sáng chế còn bao gồm các hợp chất khi không có chất mang, trong đó các hợp chất này ở dạng liều đơn vị.

Lượng hợp chất theo sáng chế sẽ được dùng có thể nằm trong khoảng từ 0,01mg đến 2000mg hằng ngày, tùy theo hoạt tính của hợp chất này và bệnh này cần được điều trị.

Lượng hợp chất này cần thiết để dùng trong việc điều trị bệnh sẽ thay đổi tùy theo đường dùng, bản chất của tình trạng bệnh lý được điều trị và lứa tuổi và tình trạng của động vật (kể cả bệnh nhân), và về cơ bản sẽ tùy theo ý kiến của bác sỹ thú ý và bác sỹ trực tiếp điều trị.

Ví dụ, liều lượng thích hợp sẽ nằm trong khoảng từ 0,1mg đến 100mg/kg thể trọng hằng ngày, tốt hơn là nằm trong khoảng 0,1mg đến 50mg/kg/ngày.

Theo một số phương án, liều lượng để dùng qua đường miệng sẽ nằm trong khoảng từ 1mg/kg/ngày đến 100mg/kg/ngày. Liều để tiêm sẽ nằm trong khoảng từ 1mg/kg/ngày đến 100mg/kg/ngày. Liều để khí dung sẽ nằm trong khoảng từ 0,01mg/kg/ngày đến 1mg/kg/ngày. Theo một số phương án được ưu tiên, liều sẽ nằm trong khoảng từ 5mg đến 50mg/kg để dùng qua đường miệng hoặc tiêm hai lần đến ba lần ngày trong thời gian từ 1 ngày đến 15 ngày, tốt hơn là từ 3 ngày đến 12 ngày, tốt hơn

nữa là từ 5 ngày đến 10 ngày. Theo các phương án được ưu tiên khác, liều sẽ nằm trong khoảng từ 0,1mg/kg đến 0,5mg/kg để khí dung một lần đến năm lần mỗi ngày trong giai đoạn từ 1 ngày đến 15 ngày, tốt hơn là từ 3 ngày đến 12 ngày, tốt hơn nữa trong khoảng thời gian từ 5 ngày đến 10 ngày. Theo cách khác, theo phương án được ưu tiên hơn, liều sẽ nằm trong khoảng từ 0,2mg/kg đến 0,4mg/kg để khí dung như là một liều dùng hằng ngày trong khoảng thời gian điều trị. Cần phải hiểu rằng liều dùng mong muốn có thể được dùng thành một liều hoặc các liều chia nhỏ được dùng cách nhau các khoảng thời gian thích hợp, ví dụ, hai, ba, bốn hoặc nhiều liều phụ hằng ngày.

Các hợp chất theo sáng chế được dùng một cách thuận tiện ở dạng liều đơn vị, ví dụ, chứa 0,1mg đến 10mg hoạt chất trong mỗi dạng liều đơn vị.

Để dùng nhằm điều trị bệnh, trong khi có thể là các hợp chất có thể được dùng ở dạng hóa chất thô, ưu tiên trình bày hoạt chất ở dạng dược phẩm. Do đó, sáng chế còn đề xuất được phẩm bao gồm các hợp chất cùng với một hoặc nhiều chất mang được dùng của chúng và, tùy ý, các thành phần điều trị và/hoặc phòng bệnh khác. (Các) chất mang phải là 'chấp nhận được' theo nghĩa là tương thích với các thành phần khác của chế phẩm và không có hại đối với người tiếp nhận chúng.

Các dược phẩm bao gồm các dạng thích hợp để dùng qua đường miệng, qua đường trực tràng, mũi, hoặc ngoài đường tiêu hóa (kể cả tiêm bắp, trong da, dưới da và qua đường tĩnh mạch) hoặc ở dạng thích hợp để dùng cho dải dạ dày-ruột non, hoặc ở dạng thích hợp cho đường hô hấp (kể cả qua mũi), ví dụ, bằng cách khí dung hoặc bơm hoặc dùng để cấy trong da hoặc dưới da hoặc ở dạng miếng dán da. Nếu thích hợp, các chế phẩm này có thể được trình bày ở dạng các liều lượng đơn vị riêng rẽ và có thể được bào chế theo phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Tất cả các phương pháp bao gồm bước cho hoạt chất kết hợp với chất mang, như chất mang lỏng hoặc chất mang rắn đã được nghiền mịn hoặc hỗn hợp của chúng, và sau đó, nếu cần, tạo hình sản phẩm thành chế phẩm mong muốn.

Chất lỏng hoặc bột để dùng trong mũi, các viên nén hoặc các viên nang để dùng qua đường miệng và chất lỏng để dùng qua đường tĩnh mạch là các dược phẩm được ưu tiên.

Các dược phẩm chứa các hợp chất theo sáng chế có thể được dùng cùng với một hoặc nhiều hoạt chất khác trong phép điều trị kết hợp. Ví dụ, dược phẩm chứa hoạt chất

thể được dùng cùng (ví dụ, một cách riêng rẽ, đồng thời hoặc liên tục), với một hoặc nhiều tác nhân kháng virus, thuốc kháng sinh, và thuốc kháng viêm khác.

Thuật ngữ "lượng hữu hiệu để điều trị bệnh" để chỉ lượng mà là đủ để điều trị một cách hữu hiệu, như được định nghĩa trên đây, khi được dùng cho đối tượng, như động vật có vú, kể cả người có nhu cầu điều trị. Lượng hữu hiệu để điều trị bệnh thay đổi tùy theo đối tượng và trạng thái bệnh được điều trị, mức độ nặng của tình trạng và cách dùng thuốc, và có thể được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này xác định theo cách thông thường.

Thuật ngữ "điều trị bệnh" được dùng trong bản mô tả này bao trùm cách bất kỳ điều trị bệnh hoặc trạng thái đau ốm ở động vật, tốt hơn là động vật có vú, tốt hơn nữa người, và bao gồm: (i) phòng ngừa xảy ra bệnh hoặc tình trạng ở đối tượng; (ii) ức chế bệnh hoặc tình trạng bệnh lý này, (iii) làm thuyên giảm bệnh hoặc tình trạng bệnh lý này, hoặc (iv) làm dịu đi tình trạng/các triệu chứng do bệnh gây ra.

Các thuật ngữ "tránh" và "phòng bệnh" được dùng trong bản mô tả này để chỉ dùng thuốc sớm để ngăn ngừa hoặc chặn trước biểu hiện bên ngoài của một hoặc nhiều triệu chứng của bệnh hoặc rối loạn. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực y học nhận biết rằng thuật ngữ "phòng ngừa" không phải là thuật ngữ tuyệt đối. Trong lĩnh vực y học, thuật ngữ này được hiểu là việc dùng thuốc nhằm mục đích phòng ngừa để về cơ bản làm giảm khả năng hoặc mức độ nghiêm trọng của tình trạng, hoặc triệu chứng của tình trạng và đây chính là nghĩa được dự tính đến trong bản mô tả này. Như được dùng trong sách giáo khoa chuẩn trong lĩnh vực kỹ thuật này, *Physician's Desk Reference*, các thuật ngữ "phòng ngừa", "tránh" và "ngăn ngừa" liên quan đến rối loạn hoặc bệnh, được dùng chỉ việc ngăn chặn nguyên nhân, tác động, triệu chứng hoặc tiến triển của bệnh hoặc rối loạn trước khi chính bệnh hoặc rối loạn này biểu thị hoàn toàn.

Các thuật ngữ "cho dùng", "dùng" hoặc "cách dùng" liên quan đến hợp chất, được phẩm hoặc chế phẩm theo sáng chế có nghĩa là đưa hợp chất này vào cơ thể động vật có nhu cầu điều trị bệnh. Khi hợp chất theo sáng chế được cung cấp kết hợp với một hoặc nhiều hoạt chất khác, thuật ngữ "dùng" và mọi biến thể của nó được hiểu là bao gồm đưa đồng thời và/hoặc liên tục hợp chất này và hoạt chất khác vào.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các khía cạnh được bộc lộ trong bản mô tả này được mô tả một cách chi tiết hơn bằng các ví dụ không mang tính giới hạn dưới đây.

Các phương pháp chung và các lưu ý

Trừ khi được nêu rõ theo cách khác, phổ cộng hưởng từ hạt nhân được ghi nhận trên Bruker Avance 300, Xwin-NMR phiên bản 3.5 trên DPX 300A.

Trừ khi được nêu rõ theo cách khác, phổ khối được ghi nhận trên quang phổ kế khối lượng Waters Micromass ZMD bằng cách sử dụng ESI (mẫu ion hóa phun điện tử), bằng cách áp dụng phần mềm Water Mass Lynx NT.

Trừ khi được nêu rõ theo cách khác, sắc ký cột cực nhanh được thực hiện trên silicagel 60 F245 (E. Merck).

Sắc ký lớp mỏng (TLC) được thực hiện trên các đĩa đã phủ sơ bộ silicagel (E. Merck).

Trừ khi được nêu rõ theo cách khác, sắc ký lỏng hiệu suất cao (HPLC) được thực hiện trên môđun tách Waters Alliance 2690, bằng cách sử dụng thiết bị dò 2487 UV bước sóng kép của Waters và phần mềm của Millennium 32 Waters.

Quy trình chung để điều chỉnh các động vật phòng thí nghiệm

Việc điều chỉnh về mặt đạo đức các thử nghiệm có liên quan sử dụng các động vật phòng thí nghiệm được thực hiện theo cấp phép lưu hành của Ủy ban Chăm sóc và Sử dụng Động vật Từ thiện (Institutional Animal Care and Use Committee) của Viện/Trường tương ứng.

Quy trình chung cho thử nghiệm giảm mảng

Các tế bào MDCK được cấy vào đĩa nuôi cấy mô loại sáu lỗ và được cho sinh trưởng để hợp dòng theo các phương pháp chuẩn. Các virus cúm được pha loãng trong thể tích tối thiểu của nước muối đệm phosphat (PBS) có bổ sung 0,2% BSA để tạo ra chuẩn độ dự đoán nằm trong khoảng từ 50 đến 100 PFU mỗi lỗ. Sau khi hấp thụ trên các tế bào MDCK trong thời gian 1 giờ ở nhiệt độ 37°C trong khí quyển 5% CO₂, chất cấy truyền virus được hút và thay thế bằng môi trường nuôi cấy virus (môi trường Eagle tối thiểu có bổ sung BSA, trypsin, và insulin-transferrin-selen) chứa aga hoặc agaroza ở lượng (thường nằm trong khoảng từ 1% đến 2%) đủ để khiến môi trường thành gel ở

nhệt độ trong phòng. Các đĩa này được ủ ở nhiệt độ 37°C trong khí quyển CO₂ cho đến khi các mảng phát triển (thường nằm trong khoảng từ 2 ngày đến 4 ngày). Các mảng được quan sát bằng mắt thường với chất nhuộm màu thích hợp (ví dụ, 0,4% tím tinh thể trong nước muối chuẩn) trước khi chúng được đếm. Hiệu lực kháng virus (EC₅₀) được xác định theo nồng độ của hợp chất này trong môi trường mà làm giảm số mảng đến 50% trị số ở đối chứng không được xử lý.

Nguyên liệu và quy trình chung cho thử nghiệm CPE

Các hợp chất thử nghiệm được hòa tan trong nước vô trùng và bảo quản ở nhiệt độ -20°C. Tiếp đó, các hợp chất được pha loãng trong môi trường thử nghiệm (MEM + trypsin) đến nồng độ mong muốn.

Môi trường thử nghiệm chứa Gibco 1 MEM (500ml) có bổ sung 1mM axit amin không thiết yếu MEM, 50U-penicillin 50µg/ml streptomycin, 1mM natri pyruvat. Trypsin (TPCK- đã được xử lý) được bổ sung vào môi trường này đến nồng độ cuối cùng 1µg/ml, trước khi thực hiện thử nghiệm này.

Các tế bào MDCK (ATCC) sinh trưởng trong môi trường sinh trưởng -Gibco 1 x MEM (500ml) có bổ sung 1mM axit amin không thiết yếu MEM, 50U-penicillin-50µg/ml streptomycin, 1mM natri pyruvat, và 10%FBS.

Virus gốc được pha loãng trong PBS.

Thử nghiệm này được thực hiện bằng cách áp dụng thử nghiệm tăng sinh tế bào dung dịch một trong nước CellTitre 96 (do Promega cung cấp).

Trừ khi được nêu rõ theo cách khác, phương pháp chung dưới đây được áp dụng cho thử nghiệm CPE:

- i) Các tế bào MDCK được cho sinh trưởng để nhập dòng trong các khay loại 96 lỗ trong môi trường sinh trưởng;
- ii) Môi trường được loại bỏ;
- iii) 46µl virus đã pha loãng được bổ sung mỗi lỗ, bao gồm để giả các lỗ đã nhiễm;
- iv) Các đĩa được ủ ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 1,5 giờ. Trong khoảng thời gian này, các hợp chất thử nghiệm được điều chế.
- v) Sau thời gian 1,5 giờ, giống cây virus được loại bỏ.

- vi) Các hợp chất sẽ thử nghiệm được chuẩn bị, bằng cách pha loãng các dịch chứa các hợp chất theo tỷ lệ 1:3 trên các đĩa nêu trên:
 - a) 100µl môi trường thử nghiệm được bổ sung vào các hàng 3 đến 11;
 - b) 150µl hợp chất được bổ sung vào hàng 2;
 - c) Chuẩn độ 50µl các hàng từ 2 đến 10, sau đó 50µl được loại bỏ ra khỏi hàng 10.
 - d) hàng 11 dùng làm đối chứng dương tính và đối chứng âm tính.
- vii) Các tế bào được ủ ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 48 giờ đến 96 giờ.
- viii) 48 giờ đến 96 giờ sau khi làm nhiễm, môi trường này được loại bỏ.
- ix) Môi trường được thế bằng 100µl môi trường thử nghiệm không chứa trypsin.
- x) 20µl dung dịch dò được bổ sung vào mỗi lỗ.
- xi) Các đĩa được ủ ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 1 giờ nữa.
- xii) Mức hấp thụ của các đĩa này được đo tại bước sóng 490nm.

Ví dụ 1: Xử lý sơ bộ virus bằng các hợp chất thử nghiệm trước khi nhiễm tế bào MDCK

Các hợp chất đại diện có công thức (I) được sử dụng để đánh giá hoạt tính kháng virus trước khi nhiễm tế bào MDCK. MD345 [(PK2 TCA(Z₀)₂-[D-Cya-SO₃H]₇-OH], MD345 [(PK2 TCA(Z₀)₂-[Cya]₇-OH], MD348 [(CHTCA(Z₀)₂-D-Asp-(D-Cya)-D-Asp-(D-Cya)-D-Asp-(D-Cya)-OH] và MD348 [(CHTCA(Z₀)₂-D-Asp-(D-Cya-SO₃H)-D-Asp-(D-Cya-SO₃H)-D-Asp-(D-Cya-SO₃H)-OH] được thử như các hợp chất đại diện có công thức (I). Hoạt tính đối với hai chủng virus được thử nghiệm, A/Sydney/250/99 (H1N1), và A/Sydney/5/97 (H3N2). Zanamivir được sử dụng làm đối chứng.

Các điều kiện được bộc lộ chi tiết trong Bảng 1 và tóm tắt trên hình 1.

Bảng 1: Tóm tắt các điều kiện để xử lý sơ bộ virus trước khi nhiễm tế bào MDCK

<i>Điều kiện 1</i>	Virus trong PBS đã được hấp thụ sơ bộ trên các tế bào MDCK ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 1 giờ, huyền phù virus được loại bỏ, sau đó các tế bào được rửa bằng PBS (x 1), được bổ sung môi trường thử nghiệm, và ủ ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 72 giờ, thử bằng hệ thử nghiệm đo màu MTT.
<i>Điều kiện 2</i>	Virus được xử lý bằng PBS ở nhiệt độ trong phòng trong khoảng thời gian 60 phút, sau đó được hấp thụ trên các tế bào MDCK ở nhiệt độ

	37°C trong thời gian 1 giờ. Huyền phù virus được loại bỏ. Tế bào được rửa bằng PBS (x 1), môi trường thử nghiệm được bổ sung vào, và ủ ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 72 giờ, thử bằng hệ thử nghiệm đo màu MTT.
<i>Điều kiện 3</i>	Virus được xử lý bằng Trypsin (11tg/ml) ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 60 phút, sau đó được hấp thụ trên các tế bào MDCK ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 1 giờ, huyền phù virus được loại bỏ, tiếp đó các tế bào được rửa bằng PBS (x 1), môi trường thử nghiệm được bổ sung vào, và ủ ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 72 giờ, thử bằng hệ thử nghiệm đo màu MTT.
<i>Điều kiện 4</i>	Virus được xử lý bằng Trypsin (1µg/ml) ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 30 phút, sau đó được trộn với hợp chất ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 30 phút, tiếp đó được hấp thụ sơ bộ trên các tế bào MDCK ở 37°C trong thời gian 1 giờ. Huyền phù virus được loại bỏ. Tế bào được rửa bằng PBS (x1), môi trường thử nghiệm được bổ sung vào, và ủ ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 72 giờ, thử bằng hệ thử nghiệm đo màu MTT.
<i>Điều kiện 5</i>	Virus được xử lý bằng hợp chất ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 30 phút, sau đó được trộn với Trypsin (1µg/ml) ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 30 phút, tiếp đó được hấp thụ trên các tế bào MDCK ở 37°C trong thời gian 1 giờ. Huyền phù virus được loại bỏ. Tế bào được rửa bằng PBS (x1), môi trường thử nghiệm được bổ sung vào, và ủ ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 72 giờ, thử bằng hệ thử nghiệm đo màu MTT.
<i>Điều kiện 6</i>	Virus, hợp chất và Trypsin (1µg/ml) được trộn ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 1 giờ, sau đó được hấp thụ trên các tế bào MDCK ở 37°C trong thời gian 1 giờ. Huyền phù virus được loại bỏ. Tế bào được rửa bằng PBS (x 1), môi trường thử nghiệm được bổ sung vào, và ủ ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 72 giờ, thử bằng hệ thử nghiệm đo màu MTT.

<i>Điều kiện 7</i>	Virus đã được trộn với hợp chất ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 1 giờ, sau đó được hấp thụ sơ bộ trên các tế bào MDCK ở 37°C trong thời gian 1 giờ, huyền phù virus được loại bỏ. Tế bào được rửa bằng PBS (x1), môi trường thử nghiệm được bổ sung vào, và ủ ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 72 giờ, thử bằng hệ thử nghiệm đo màu MTT.
--------------------	---

Các kết quả đối với A/Sydney/250/99 được tóm tắt trong Bảng 2 và các Hình 2A, 2B và 2C. Các kết quả đối với A/Sydney/5/97 được tóm tắt trong Bảng 3 và các Hình 3A, 3B và 3C.

Kết quả biểu thị rằng các hợp chất có công thức (I), MD345, và MD348, trung hòa các virus A/Sydney/25/99 (H1N1) và A/Sydney/5/97 (H3N2) ngoài tế bào. Việc xử lý sơ bộ virus bằng Zanamivir không tác động đến khả năng lây nhiễm virus.

Việc so sánh tiếp theo theo tiến trình thời gian MD345-2 và Zanamivir đối với A/Sydney/250/99 biểu thị MD345-2 trung hòa cả hai virus trong thời gian chưa đến 1 phút. Các kết quả đối với A/Sydney/250/99 được tóm tắt trong Bảng 2 và các hình 2A, 2B và 2C. Các kết quả đối với A/Sydney/5/97 được tóm tắt trong Bảng 4 và Hình 4.

Bảng 2: Xử lý sơ bộ virus trước khi nhiễm tế bào MDCK

Các hợp chất thử nghiệm: MD348-2, MD345-2 và Zanamivir (đối chứng)

Chuẩn độ virus: A/Sydney/25/99

<i>MD348-2</i>				
Điều kiện				Trung bình
1	0,368	0,404	0,332	0,368
2	0,386	0,307	0,372	0,355
3	0,361	0,347	0,326	0,345
4	1,963	2,507	2,44	2,303
5		2,501	2,386	2,444
6	2,301	2,26	2,29	2,284
7	2,083	2,407	2,413	2,301
Không nhiễm	2,236	2,268	2,285	2,263

<i>MD348-2</i>	
% so với đối chứng (không nhiễm)	
1	16%
2	16%
3	15%
4	102%
5	108%
6	101%
7	102%
Không nhiễm	100%

<i>MD345-2</i>				
Điều kiện				Trung bình
1	0,368	0,404	0,332	0,368
2	0,386	0,307	0,372	0,355
3	0,361	0,347	0,326	0,345
4	2,384	2,468	2,219	2,357
5	2,37	2,109	2,277	2,252
6	2,305	2,303	2,206	2,271
7	2,203	2,14	2,168	2,170
Không nhiễm	2,236	2,268	2,285	2,263

<i>MD345-2</i>	
% so với đối chứng (không nhiễm)	
1	16%
2	16%
3	15%
4	104%
5	100%
6	100%
7	96%
Không nhiễm	100%

<i>Zanamivir</i>				
Điều kiện				Trung bình
1	0,368	0,404	0,332	0,368
2	0,386	0,307	0,372	0,355
3	0,361	0,347	0,326	0,345
4	0,466	0,461	0,967	0,631
5	0,419	0,409	0,625	0,484
6	0,446	0,512	0,443	0,467
7	0,663	0,791		0,727
Không nhiễm	2,236	2,268	2,285	2,263

<i>Zanamivir</i>	
% so với đối chứng (không nhiễm)	
1	16%
2	16%
3	15%
4	28%
5	21%
6	21%
7	32%
Không nhiễm	100%

Lưu ý: Các hợp chất được hòa tan trong H₂O đến nồng độ 50µg/ml. Tiếp tục pha loãng trong 1 x PBS đến nồng độ 5µg/ml. Tế bào được duy trì trong môi trường chứa 1µg/ml trypsin. Thử nghiệm tại thời điểm 72 giờ sau khi nhiễm. (1000 140711) $0,5 \times 10^{-4}$ virut đã được hấp thụ sơ bộ trong thời gian 1 giờ, virut được loại bỏ, tế bào được rửa một lần và môi trường mới được bổ sung vào, ủ trong thời gian 72 giờ.

Bảng 3: Xử lý sơ bộ virus trước khi nhiễm tế bào MDCK

Các hợp chất thử nghiệm: MD348-2, MD345-2 và Zanarnivir (đối chứng)

Chuẩn độ virus: A/Sydney/5/97

<i>MD348-2</i>				
Điều kiện				Trung bình
1	0,296	0,308	0,299	0,301
2	0,283	0,298	0,291	0,291
3	0,269	0,277	0,262	0,269
4	1,82	2,526	2,682	2,343
5	2,6	2,488	2,625	2,571
6	2,69	2,48	2,658	2,609
7	2,597	2,46	2,69	2,582
Không nhiễm	2,581	2,501	2,581	2,554

<i>MD348-2</i>	
% so với đối chứng (không nhiễm)	
1	12%
2	11%
3	11%
4	92%
5	101%
6	102%
7	101%
Không nhiễm	100%

<i>MD345-2</i>				
Điều kiện				Trung bình
1	0,296	0,308	0,299	0,301
2	0,283	0,298	0,291	0,291
3	0,269	0,277	0,262	0,269
4	2,547	2,621	2,451	2,540
5	2,444	2,473	2,486	2,468
6	2,568	2,523	2,456	2,516
7	2,491	2,437	2,437	2,455
Không nhiễm	2,581	2,501	2,581	2,554

<i>MD345-2</i>	
% so với đối chứng (không nhiễm)	
1	12%

2	11%
3	11%
4	99%
5	97%
6	98%
7	96%
Không nhiễm	100%

<i>Zanamivir</i>				
Điều kiện				Trung bình
1	0,296	0,308	0,299	0,301
2	0,283	0,298	0,291	0,291
3	0,269	0,277	0,262	0,269
4	0,329	0,322	0,322	0,324
5	0,329	0,325	0,303	0,319
6	0,32	0,336	0,324	0,327
7	0,322	0,298	0,293	0,304
Không nhiễm	2,581	2,501	2,581	2,554

<i>Zanamivir</i>	
% so với đối chứng (không nhiễm)	
1	12%
2	11%
3	11%
4	13%
5	12%
6	13%
7	12%
Không nhiễm	100%

Lưu ý: Các hợp chất được hòa tan trong H₂O đến nồng độ 50µg/ml. Tiếp tục pha loãng trong 1 x PBS đến nồng độ 5µg/ml. các tế bào được duy trì trong môi trường chứa trypsin ở nồng độ 1µg/ml. Thử nghiệm tại thời điểm 72 giờ sau khi nhiễm. (2000271011) 1 x 10⁴ virut đã được hấp thụ sơ bộ trong thời gian 1 giờ, virut được loại bỏ, các tế bào được rửa một lần và môi trường mới được bổ sung vào, ủ trong thời gian 72 giờ.

Bảng 4: So sánh theo tiến trình thời gian đối với việc xử lý sơ bộ virut trước khi nhiễm tế bào MDCK

Các hợp chất thử nghiệm: MD345-2 và Zanamivir (đối chứng)

Chuẩn độ virut: A/Sydney/250/99

<i>MD345-2</i>								
Thời gian (phút)	Điều kiện 3			Trung bình	Điều kiện 6			Trung bình
1	0,335	0,354	0,395	0,361	1,752	1,664	1,759	1,725
5	0,337	0,366	0,367	0,357	1,856	1,723	1,727	1,769
10	0,354	0,363	0,337	0,351	1,764	1,724	1,717	1,735
20	0,354	0,373	0,359	0,362	1,705	1,645	1,626	1,659
25	0,311	0,437	0,346	0,365	1,588	1,539	1,693	1,607
30	0,314	0,347		0,331	1,762	1,756	1,746	1,755
Đối chứng	1,829	1,71	1,625	1,721	1,829	1,71	1,625	1,721

<i>Zanamivir</i>						
Thời gian (phút)	Điều kiện 3		Trung bình	Điều kiện 6		Trung bình
1	0,356	0,318	0,337	0,338	0,798	0,568
5	0,347	0,355	0,351	0,394	0,609	0,502
10	0,323	0,37	0,347	0,326	0,487	0,407
20	0,347	0,358	0,353	0,461	0,728	0,595
25	0,411	0,339	0,375	0,375	0,322	0,349
30	0,383	0,373	0,378	0,357	0,353	0,355
Control			1,721			1,721

Thời gian (phút)	<i>MD345-2</i>		<i>Zanamivir</i>	
	Điều kiện 3	Điều kiện 6	Điều kiện 3	Điều kiện 6
1	21%	100%	20%	33%
5	21%	103%	20%	29%
10	20%	101%	20%	24%
20	21%	96%	20%	35%
25	21%	93%	22%	20%
30	19%	102%	22%	21%

Lưu ý: Các hợp chất được hòa tan trong H₂O đến nồng độ 50 µg/ml. Tiếp tục pha loãng trong 1 x PBS đến nồng độ 0,5µg/ml. Tế bào được duy trì trong môi trường chứa 1µg/ml trypsin. Thử nghiệm được thực hiện tại thời điểm 72 giờ sau khi nhiễm (1000 140711) 1 x 10⁻⁴ virut đã được hấp thụ sơ bộ trong thời gian 1 giờ, virut được loại bỏ, tế bào được rửa một lần và môi trường mới được bổ sung vào, ủ trong thời gian 72 giờ.

Ví dụ 2: So sánh các nhóm axit/anion biến đổi trên hoạt tính kháng virut của các hợp chất thử nghiệm

Các hợp chất đại diện có công thức (I) được sử dụng để so sánh tác động của các nhóm axit/anion đối với hoạt tính kháng virus. Các hợp chất sau được thử như các hợp chất đại diện có công thức (I):

- MD314-1: (CHTCA(Z)₀)₂-L-Asp-(L-Cyst-SO₃H)-Asp-(L-Cyst-SO₃H)-L-Asp-(L-Cyst-SO₃H)-OH, chứa ba axit sulfonic và bốn axit carboxylic;
- MD021-7: CHTGA(Z)₂-L-Asp, chứa 2 axit carboxylic; và
- MD051-3: PK2 TCA(Z)₂-L-Asp-L-Asp, chứa 3 axit carboxylic.

Hoạt tính đối với ba chủng virus được thử nghiệm, A/Sydney/250/99 (H1N1), A/Mississippi/03/01 (H1N1) loại thường, và A/Mississippi/03/01 (H1N1) H274Y (kháng Oseltamivir).

Các kết quả đối với A/Sydney/5/97 (H3N2) được tóm tắt trong Bảng 5 và Hình 5. Các kết quả đối với A/Mississippi/03/01 (H1N1) loại thường được tóm tắt trong Bảng 5 và các hình 6 và 7. Các kết quả đối với A/Mississippi/03/01 (H1N1) H274Y (kháng Oseltamivir) được tóm tắt trong Bảng 5 và các hình 8 và 9.

Bảng 5: So sánh các nhóm axit/anion trên hoạt tính kháng virus

Hợp chất thử nghiệm	A/Sydney/5/97(H3 N2)	A/Mississippi/03/01(H1N1) loại thường	A/Mississippi/03/01 (H1N1) H274Y (kháng Oseltamivir)
MD314-1	0,535ng/ml (0,27nM)	0,18ng/ml (0,09nM)	0,18ng/ml (0,09nM)
MD021-7	1,65ng/ml (1,32nM)	0,535ng/ml (0,43 nM)	0,535ng/ml (0,43nM)
MD051-3	0,156ng/ml (0,45nM)	0,535ng/ml (0,406nM)	0,535ng/ml (0,406nM)

Kết quả biểu thị rằng hoạt tính kháng virus của các hợp chất tỷ lệ với số lượng của nhóm axit/anion.

Ví dụ 3: Cải biến tốc độ thanh thải virus ở phổi và cuốn mũi

Tác động của các hợp chất đại diện có công thức (I) đến tỷ lệ thanh thải virus ở phổi và cuốn mũi của chuột nhắt được đánh giá. MD021 (CHTCA(Z)₂-L-Asp) được thử như hợp chất có công thức (I) đại diện. Zanamivir và PBS được sử dụng làm đối chứng.

20 con chuột nhất mỗi nhóm được điều trị trong mũi khi được gây mê bằng 2 μ g MD021, 2 μ g Zanamivir hoặc PBS vào ngày thứ -1, +1, +2, +3, +4 và +5 và được chuyển nhiễm với liều cận gây chết bằng 50pfu virut cúm PR8 vào ngày 0. Con chuột nhất được cân hằng ngày. Năm chuột nhất trong mỗi nhóm điều trị bị giết vào ngày thứ 1, 3, 5 và 7 sau khi nhiễm và phổi và cuốn mũi của chúng được gom. Phổi được thử nghiệm về số lượng virut. Cuốn mũi được bảo quản ở nhiệt độ -80°C cho đến khi phân tích.

Tất cả các thử nghiệm, gây nhiễm và giết chuột nhất xảy ra trong cửa sổ hai giờ 24 giờ sau khi can thiệp ngày hôm trước. Con chuột nhất không nhận điều trị vào cùng ngày chúng bị giết chết. Lịch trình thời gian xử lý nhiễm và thu hoạch cơ quan được tóm tắt trên Hình 10.

Kết quả được bộc lộ chi tiết trong Bảng 6 và các hình 11 đến 14. Tại mọi thời điểm, số lượng virut của phổi (được biểu diễn ở dạng $\log_{10}$) ở chuột nhất đã được điều trị bằng MD021 là thấp hơn đáng kể so với chuột nhất đã được xử lý bằng PBS. Vào ngày thứ 3 và 7 sau khi nhiễm, số lượng virut của phổi chuột nhất đã được điều trị bằng MD021 cũng ở mức độ đáng kể thấp hơn số lượng ở chuột nhất đã được điều trị bằng Zanamivir. Kết quả được đánh giá bằng cách áp dụng ANOVA một chiều với Tukey sau thử nghiệm đối với dữ liệu vào ngày thứ 1, 3 và 5 và thử nghiệm t theo Mann Witney đối với dữ liệu vào ngày thứ 7. Ngưỡng của thử nghiệm này là $10^{1,07}$. Các mẫu âm tính được quy trị số 10^1 . Chuột nhất chưa được điều trị (điều trị đối chứng PBS) không sống sót đến ngày 7 dù dùng liều virut thấp.

Mức giảm trọng lượng được đánh giá đối với các nhóm chuột nhất mà không bị giết đến tận ngày 7 sau khi nhiễm. Các kết quả biểu thị mức giảm trọng lượng tối thiểu sau khi điều trị bằng MD021, thấp hơn đáng kể so với mức giảm trọng lượng quan sát được khi dùng Zanamivir tại các thời điểm sau.

Bảng 6: Cải biến tốc độ thanh thải virus ở phổi và cuốn mũi

	Chuẩn độ cá thể		
	MD021	Zanamivir	PBS
Ngày 1	1,00	2,73	2,56
	2,52	3,07	1,82
	2,08	2,66	3,71
	1,00	2,96	3,01
	1,00	1,57	3,79
Ngày 3	1,82	4,44	6,12
	2,33	4,66	5,68
	2,51	4,97	5,90
	4,31	4,19	6,12
	2,63	3,16	5,94
Ngày 5	2,85	4,84	5,75
	3,77	3,00	5,84
	3,59	4,97	5,99
	3,82	5,77	6,00
	4,30	5,66	5,34
Ngày 7	3,41	4,70	
	3,18	5,14	
	3,22	3,90	
	3,16	4,64	
	1,00	5,24	

	Chuẩn độ trung bình nhóm		
	MD021	Zanamivir	PBS
Ngày 1	1,52	2,60	2,98
Ngày 3	2,72	4,28	5,95
Ngày 5	3,67	4,85	5,98
Ngày 7	2,79	4,72	

Phân tích thống kê đường cong giảm trọng lượng theo ANOVA đo lặp lại 2 chiều thể hiện khác biệt rất đáng kể trong đường cong xử lý ($p < 0,0001$). Lưu ý, ANOVA đo lặp lại 2 chiều chỉ hoàn thành đối với dữ liệu đạt được cho đến tận ngày 5 sau khi nhiễm vì nhóm PBS không có dữ liệu trọn vẹn vào các ngày thứ 6 và 7 do chết vì sinh non.

Đánh giá theo Bonferroni cho thấy rằng cả Zanamivir và MD021 ở mức độ đáng kể khác PBS vào ngày thứ 3, 4 và 5 ($p < 0,001$). Cùng phân tích này được thực hiện trên đường cong giảm trọng lượng tròn vện đối với MD021 và Zanamivir chỉ cho thấy khác biệt đáng kể về mặt thống kê ở hai đường cong giảm trọng lượng chung ($p = 0,0443$) trong đó đánh giá Bonferroni cho thấy rằng các khác biệt đáng kể xuất hiện vào ngày thứ 6 ($p < 0,01$) và ngày 7 ($p < 0,001$).

Kết quả biểu thị rằng nhiều điều trị hằng ngày bằng $2\mu\text{g}$ hợp chất MD021 có thể làm giảm số lượng virus của phổi ở mức độ đáng kể so với chuột nhắt đã được điều trị theo cách tương tự bằng PBS vào ngày thứ 1, 3 và 5 sau khi nhiễm và bằng cả $2\mu\text{g}$ Zanamivir vào ngày thứ 3 và 7 sau khi nhiễm. Hiện tượng giảm đáng kể về số lượng virus kèm theo giảm thể trọng ít hơn ở con chuột nhắt và kỳ vọng ngang bằng mức giảm đáng kể về mức độ nặng của bệnh. Mức giảm trọng lượng tối thiểu với MD021 trong toàn bộ tiến trình bệnh là nổi bật và ở mức độ đáng kể tốt hơn Zanamivir tại các thời điểm sau.

Mặc dù chuột nhắt được cung cấp liều virus PR8 mà, trong các tình huống bình thường, là liều cận gây chết, tất cả các con chuột nhắt nhận điều trị bằng đối chứng PBS giảm trọng lượng và bị giết chết trước ngày 7 sau khi nhiễm. Các ca bất ngờ chết do sinh non có thể liên quan đến tác động có hại của việc dùng gây tên trong mũi hằng ngày $50\mu\text{l}$ chất lỏng. Tuy nhiên, các nhóm MD021 và Zanamivir, việc điều trị có tác dụng nhiều hơn tác dụng bất lợi bất kỳ.

Ví dụ 4: Sàng lọc thử nghiệm CPE

Các sàng lọc thử nghiệm CPE được thực hiện đối với các hợp chất đại diện có công thức (I) theo quy trình chung for thử nghiệm CPE nêu trên. Các kết quả được nêu chi tiết trong các Bảng 7 và 8. Sàng lọc kháng virus *in vitro* cụ thể cũng được thực hiện đối với vài chủng virus, bao gồm cúm A H7N9 A/Anhui/1/2003 (Bảng 9), cúm A H5N1 Hong Kong/213/2003 (Bảng 10), cúm A H3N2 Perth/16/2009 (Bảng 11), cúm A H7N9 A/Anhui/1/2003 (Bảng 12), cúm A H1N1 California 07/2009 (Bảng 13), cúm A H5N1 Việt/MN/1525/81 (Bảng 14), cúm A H5N1 Thailand/16/2004 (Bảng 15), virus cúm A H1N1, A/Mississippi/3/2001 H275Y, kháng Oseltamivir (Bảng 16), virus cúm A H5N1 Việt/MN/1525/81 (Bảng 17), cúm B virus, B/Brisbane/60/2008 (Bảng 18), virus cúm B, B/Florida/4/2006 (Bảng 19) và A/Sydney/250/99 (H1N1) (Bảng 20).

Dữ liệu hoạt tính chống cúm cho thấy rằng càng nhiều nhóm axit trong các hợp chất có công thức (I) thì hoạt tính kháng virus càng cao.

Hoạt tính chống bệnh cúm của các hợp chất đại diện có công thức (I) được đánh giá tiếp trong các thử nghiệm CPE tiếp theo (Bảng 38) và ở các chuẩn độ virus khác nhau (Bảng 39).

Ví dụ 5: Hoạt tính chống virus cúm đối với các chủng kháng Oseltamivir

Hoạt tính chống virus cúm đối với các chủng kháng Oseltamivir được đánh giá đối với các hợp chất đại diện có công thức (I). Việc ức chế kích thước mảng và số lượng mảng được ghi nhận. Oseltamivir được sử dụng làm đối chứng. Kết quả được bộc lộ chi tiết trong Bảng 21.

Ví dụ 6: Thử nghiệm làm giảm mảng virus

Các hợp chất đại diện có công thức (I) được đánh giá trong làm giảm mảng virus đối với mỗi virus trong số virus H1N1 CA/07/2009 và virus H1N1 A/PR/8. Zanamivir được sử dụng làm đối chứng. Kết quả được bộc lộ chi tiết lần lượt trong Bảng 22 và 23.

Ví dụ 7: Dữ liệu hiệu quả in vivo ở chuột đối với các hợp chất đại diện có công thức (I)

Hiệu quả *in vivo* của các hợp chất đại diện có công thức (I) được đánh giá ở chuột nhắt đối với một khoảng nhiễm virus.

Bảng 24 thể hiện chi tiết sống sót của chuột sau khi nhiễm virus với một trong số A/California/04/2009 (H1N1) A/Victoria/3/75 (H3N2), A/Mississippi/3/01 H275Y, virus kháng Oseltamivir (H1N1), A/Viet/MN/1525/81 (H5N1), hoặc B/Sichuan/379/99 (FluB) và việc điều trị bệnh bằng một hợp chất với các hợp chất đại diện có công thức (I) ở các liều lượng khác nhau.

Bảng 25 thể hiện chi tiết mức sống sót ở chuột sau khi nhiễm virus trong mũi virus A/PR/8 (500 pfu/con chuột) và việc điều trị bệnh bằng một hợp chất bằng các hợp chất đại diện có công thức (I) ở các liều lượng và thời điểm khác nhau.

Bảng 26 thể hiện chi tiết tác động của một lần điều trị bệnh trong mũi bằng các hợp chất đại diện có công thức (I) khi được dùng ở các liều lượng khác nhau sau khi nhiễm đến mức sống sót từ nhiễm virus cúm A/California/04/2009 (H1N1pdm) ở chuột nhắt. Zanamivir được dùng làm đối chứng và nước muối được dùng làm thuốc vờ.

Bảng 27 thể hiện chi tiết các tác động của một lần điều trị bệnh trong mũi bằng các hợp chất đại diện có công thức (I) khi được dùng ở các liều lượng khác nhau 48 giờ sau khi nhiễm đến mức sống sót sau khi nhiễm virus cúm A/PR/8 (H1N1) ở chuột nhắt. Zanamivir được dùng làm đối chứng và nước muối được dùng làm thuốc vờ.

Bảng 28 thể hiện chi tiết các tác động của một lần điều trị bệnh trong mũi bằng các hợp chất đại diện có công thức (I) khi được dùng tại thời điểm 48 giờ sau khi nhiễm đến mức sống sót sau khi nhiễm virus cúm A/PR/8 (H1N1) ở chuột nhắt. Zanamivir được dùng làm đối chứng và nước muối được dùng làm thuốc vờ.

Bảng 29 thể hiện chi tiết các tác động của một lần điều trị bệnh trong mũi bằng các hợp chất đại diện có công thức (I) khi được dùng ở các liều lượng khác nhau ở 48 giờ sau khi nhiễm đến mức sống sót sau khi nhiễm virus cúm A/PR/8 (H1N1) (500pfu/con chuột) ở chuột nhắt. Zanamivir được dùng làm đối chứng và nước muối được dùng làm thuốc vờ.

Bảng 30 thể hiện chi tiết các tác động của một lần điều trị bệnh trong mũi bằng các hợp chất đại diện có công thức (I) khi được dùng ở các liều lượng khác nhau 60 giờ sau khi nhiễm đến mức sống sót sau khi nhiễm virus cúm A/PR/8 (H1N1) (500pfu/con chuột) ở chuột nhắt. Zanamivir được dùng làm đối chứng và nước muối được dùng làm thuốc vờ. Zanamivir được dùng làm đối chứng và nước muối được dùng làm thuốc vờ.

Bảng 31 thể hiện chi tiết các tác động của một lần điều trị bệnh trong mũi bằng các hợp chất đại diện có công thức (I) khi được dùng tại thời điểm 60 giờ sau khi nhiễm đến mức sống sót sau khi nhiễm virus cúm A/PR/8 (H1N1) (500pfu/con chuột) ở chuột nhắt. Zanamivir được dùng làm đối chứng và nước muối được dùng làm thuốc vờ.

Bảng 32 thể hiện chi tiết các tác động của một lần điều trị bệnh trong mũi bằng các hợp chất đại diện có công thức (I) khi được dùng tại thời điểm 72 giờ sau khi nhiễm đến mức sống sót sau khi nhiễm virus cúm A/PR/8 (H1N1) (500pfu/con chuột) ở chuột nhắt.

Bảng 33 thể hiện chi tiết các tác động của một lần điều trị bệnh trong mũi bằng các hợp chất đại diện có công thức (I) khi được dùng tại thời điểm 72 giờ sau khi nhiễm đến mức sống sót sau khi nhiễm virus cúm A/PR/8 (H1N1) (500pfu/con chuột) ở chuột nhắt.

Bảng 34 thể hiện chi tiết các tác động của một lần điều trị bệnh bằng các hợp chất đại diện có công thức (I) khi được dùng trong khoang màng bụng tại thời điểm 1 giờ trước liều gây chết của virus cúm A/PR/8 (H1N1) (500pfu/con chuột) đến chuột nhắt.

Bảng 35 thể hiện chi tiết các tác động của việc điều trị bệnh bằng các hợp chất đại diện có công thức (I) khi được dùng trong khoang màng bụng tại thời điểm 4 giờ sau khi nhiễm (20µg/con chuột/ngày x 5 ngày) đến mức sống sót sau khi nhiễm virus cúm A/PR/8 (H1N1) (500pfu/con chuột) ở chuột nhắt.

Các kết quả được thể hiện trong các bảng 34 và 35 cho thấy rằng các hợp chất có công thức (I) có thể được dùng trong việc điều trị nhiễm toàn thân.

Bảng 36 thể hiện chi tiết các tác động của việc điều trị bệnh bằng các hợp chất đại diện có công thức (I) khi được dùng trong mũi tại thời điểm 60 giờ sau khi nhiễm đến mức sống sót sau khi nhiễm virus cúm A/PR/8 (H1N1) (500pfu/con chuột) ở chuột nhắt.

Bảng 37 thể hiện chi tiết các tác động của việc điều trị bệnh bằng các hợp chất đại diện có công thức (I) khi được dùng trong mũi tại thời điểm 60 giờ sau khi nhiễm đến mức sống sót sau khi nhiễm virus cúm A/PR/8 (H1N1) (500pfu/con chuột) ở chuột nhắt.

Bảng 38 thể hiện chi tiết các tác động của việc điều trị bệnh bằng các hợp chất đại diện có công thức (I) khi được dùng trong khoang màng bụng tại thời điểm 1 giờ trước khi gây chết bằng virus cúm A/PR/8 (H1N1) (500pfu/con chuột) đến chuột nhắt.

Các kết quả của các thử nghiệm *in vitro* và *in vivo* cho thấy rằng các hợp chất có công thức (I) có hiệu lực đối với nhiều chủng cúm kể cả cúm A, B, cúm gia cầm và các chủng kháng thuốc. Hơn thế nữa, các kết quả thể hiện rằng các hợp chất có công thức (I) không thể hiện độc tính đối với tế bào.

Liên quan đến các nghiên cứu ở chuột nhắt, đã phát hiện ra rằng các con chuột nhắt đã bị nhiễm thường bị giảm cân ít hơn và/hoặc phục hồi nhanh hơn khi được điều trị bằng các hợp chất có công thức (I) nếu so với thuốc vờ là nước muối và/hoặc đối chứng (tức là Zanamivir). Hơn nữa, đã phát hiện ra rằng các hợp chất có công thức (I) có hiệu quả sau khi dùng vào khoang mũi ở chuột nhắt trong một khoảng thời gian hoặc lâu hơn 11 ngày.

Dữ liệu về hiệu quả *in vivo* cho thấy rằng các hợp chất có công thức (I) có hoạt tính gấp ít nhất là 75 lần (theo liều lượng theo thể trọng) hoặc > 400 lần (theo liều lượng phân tử gam) hơn đối chứng Zanamivir.

Liên quan đến dữ liệu về hiệu quả *in vivo* đối với chuột nhắt đã nhiễm virus cúm A/PR/8 (500pfu/con chuột) việc dùng trong mũi các hợp chất đại diện theo sáng chế trên cơ sở thời gian so sánh tại thời điểm 48 giờ, 60 giờ, hoặc 72 giờ sau khi nhiễm đem lại sự sống sót ở đại đa số chuột nhắt, và mức giảm cân tối đa < 15% (chỉ ba con chuột nhắt giảm cân trong khoảng từ 20% đến 25%).

Liên quan đến dữ liệu về hiệu quả *in vivo* đối với chuột nhắt đã nhiễm virus cúm A/PR/8 (500pfu/con chuột), việc dùng trong khoang màng bụng các hợp chất đại diện theo sáng chế đem lại sự sống sót ở tất cả chuột nhắt, và cho thấy rằng các hợp chất theo sáng chế có thể được dùng để điều trị nhiễm toàn thân.

Hai hợp chất đại diện có công thức (I), MD185 và MD317 được thử theo thử nghiệm hERG IC₅₀ (hERG-CHO, dán-kẹp tự động). Cả hai kết quả đều cho thấy rằng hai hợp chất này là an toàn liên quan đến độc tính đối với tim. Hơn thế nữa, MD185 và MD317 được thử trong thử nghiệm quét Kinome, không có tương tác đáng kể giữa các hợp chất và các kinaza ở mức 100nM.

Bảng 7: Sàng lọc thử nghiệm CPE

Hợp chất số	Phân tử lượng	EC ₅₀ CA/07/2009 ng/ml	EC ₅₀ Vit/MN/1525/81 ng/ml	EC ₅₀ Perth/16/2009 ng/ml	EC ₅₀ Florida/4/2006 ng/ml
MD015	1166	7	0,4	7,8	2,5
MD016	1166	9	0,6	3,3	8,2
MD021	1243	24	0,3	4,6	0,38
MD051	1318	10	0,7	26	1,5
MD206	1187	2	0,7	7,3	>10000
MD082	1110	7	0,4	8,4	15
MD102	1274	10	>10000	>10000	>10000
MD112	1246	>2 000	0,7	>10000	6,5
MD123	974	8	0,7	>10000	0,96
MD214	1340	7	0,2	>10000	2,5
MD154	1485	9	<0,13	<0,13	<0,13
MD219	1712	5	0,5	>10000	1,7
MD242	1215	8	0,84	4,2	0,71
MD185	1852	6	<0,13	<0,13	<0,13
MD191	1457	9	<0,13	<0,13	0,32

*CC₅₀> 10.000ng/ml
dòng tế bào MDCK

Mã hợp chất	Mô tả cấu trúc	Phân tử lượng
MD015	PK1 PYR(Z) ₂	1166
MD016	PK2 PYR(Z) ₂	1166

MD021	CHTCA(Z) ₂ -L-Asp	1243
MD051	PK2 TCA(Z) ₂ -L-Asp-L-Asp	1318
MD206	CHTCA(Z _b) ₂ -L-Asp	1187
MD082	PK1 Succinyl-SO ₃ H-(Z) ₂	1110
MD102	CHTCA(Z _{2b}) ₂ (L-Asp) ₂	1274
MD112	CHTCA(Z ₃) ₂ (L-Asp) ₂	1246
MD123	Axit suberic C ₈ (Z ₃) ₂	974
MD214	PK1 PYR(Z _b) ₂ (D-Asp) ₂	1340
MD154	CHTCA(Z ₀) ₂ -L-Asp(NHCH ₂ SO ₃ H) ₂	1485
MD219	PK2 PYR(Z _b) ₂ [(D-Asp)(NHCH ₂ SO ₃ H) ₂] ₂	1712
MD242	CHTCA(Z _p) ₂ -L-Asp	1215
MD185	PK2 PYR(Z _n) ₂ [D-Asp(NHCH ₂ SO ₃ H) ₂] ₂	1852
MD191	CHTCA(Z _b) ₂ -D-Asp(NHCH ₂ SO ₃ H) ₂	1457

Bảng 8: Hoạt tính chống virus cúm thu được từ thử nghiệm CPE* (EC₅₀mM)

Virut cúm	MD185 (MW1852)	MD314 (MW1982)	MD345 (MW2201)	MD348 (MW1982)	MD021 (MW1243)	Zanamivir (MW332)
A/Sydney/250/99	0,29	0,077	0,052	0,058	0,186	>198
A/Solomon Island/3/06	0,29	0,03	0,043	0,016	0,144	>44
A/Townsville/74/2011	0,74	0,09	0,041	0,06	0,40	>15
A/Mississippi/03/01 WT	0,89	0,09	0,24	0,27	0,43	>66
A/Mississippi/03/01H274Y	0,89	0,09	0,24	0,27	0,43	>66
A/Perth/261/2009	0,49	0,36	0,32	0,35	0,57	6,6
A/Victoria/170/2012	2,7	1,0	0,53	0,83	2,0	>596
A/Sydney/5/97	2,7	0,41	0,83	1,26	2,0	>>24
A/Victoria/503/06	6,5	4,4	2,2	4,5	4,0	>198
B/Townsville/2/2011	1,7	0,38	0,24	0,28	0,95	>1789

*CC₅₀> 600ng/ml dòng tế bàoMDCK

** các trị số là trung bình của ít nhất là ba lần xác định

Bảng 9: Sàng lọc kháng virus *in vitro* (virus cúm A H7N9, A/Anhui/1/2003)

Hợp chất số	Tên thử nghiệm thuốc	EC ₅₀ (µg/ml)	EC ₉₀ (µg/ml)	CC ₅₀ (µg/ml)	*SI ₅₀	**SI ₉₀
MD051	Giảm sản lượng virus/đỏ trung tính (độc tính)		0,0031	> 1,0		> 312
MD051	Đỏ trung tính (tác dụng gây bệnh tế bào/độc tính)	< 0,00032		> 1,0	> 3100	
MD154	Giảm sản lượng virus/đỏ trung tính (độc tính)		0,01	> 1,0		> 100
MD154	Đỏ trung tính (tác dụng gây bệnh tế bào/độc tính)	< 0,00032		> 1,0	> 3100	
MD185	Giảm sản lượng virus/đỏ trung tính (độc tính)		0,00185	> 1,0		> 540
MD185	Đỏ trung tính (tác dụng gây bệnh tế bào/độc tính)	< 0,00032		> 1,0	> 3100	
Ribavirin	Giảm sản lượng virus/đỏ trung tính (độc tính)		8,25	> 1000		> 121
Ribavirin	Đỏ trung tính (tác dụng gây bệnh tế bào/độc tính)	24		> 1000	> 42	

*SI₅₀ = CC₅₀/EC₅₀

**SI₉₀ = CC₅₀/EC₉₀

Bảng 10: Sàng lọc kháng virus *in vitro* (virus cúm A H5N1, Hong Kong/213/2003)

Hợp chất số	Tên thử nghiệm thuốc	EC ₅₀ (µg/ml)	EC ₉₀ (µg/ml)	CC ₅₀ (µg/ml)	*SI ₅₀	**SI ₉₀
MD051	Giảm sản lượng virus/đỏ trung tính (độc tính)		< 0,00032	> 1,0		> 3100
MD051	Đỏ trung tính (tác dụng gây bệnh tế bào/độc tính)	< 0,00032		> 1,0	> 3100	
MD154	Giảm sản lượng virus/đỏ trung tính (độc tính)		< 0,00032	> 1,0		> 3100
MD154	Đỏ trung tính (tác dụng gây bệnh tế bào/độc tính)	< 0,00032		> 1,0	> 3100	
MD185	Giảm sản lượng virus/đỏ trung tính (độc tính)		< 0,00032	> 1,0		> 3100
MD185	Đỏ trung tính (tác dụng gây bệnh tế bào/độc tính)	< 0,00032		> 1,0	> 3100	
Ribavirin	Giảm sản lượng virus/đỏ trung tính (độc tính)		14,68	> 1000		> 68
Ribavirin	Đỏ trung tính (tác dụng gây bệnh tế bào/độc tính)	17		> 1000	> 59	

*SI₅₀ = CC₅₀/EC₅₀

**SI₉₀ = CC₅₀/EC₉₀

Bảng 11: Sàng lọc kháng virus *in vitro* (virus cúm A H3N2, Perth/16/2009)

Hợp chất số	Tên thử nghiệm thuốc	EC ₅₀ (µg/ml)	EC ₉₀ (µg/ml)	CC ₅₀ (µg/ml)	*SI ₅₀	**SI ₉₀
MD185	Quan sát bằng mắt (giảm sản lượng virus / đỏ trung tính)		0,00086	>0,32		>370
MD185	Đỏ trung tính (tác dụng gây bệnh tế bào/độc tính)	0,0001		>0,32	>3200	
MD317	Quan sát bằng mắt (Giảm sản lượng virus/đỏ trung tính)		0,00173	>0,32		>180
MD317	Đỏ trung tính (tác dụng độc gây bệnh tế bào/độc tính)	0,00032		>0,32	>1000	
MD345	Quan sát bằng mắt (Giảm sản lượng virus/đỏ trung tính)		0,00485	>0,32		>66
MD345	Đỏ trung tính (tác dụng gây bệnh tế bào/độc tính)	0,00054		>0,32	>590	
MD349	Quan sát bằng mắt (Giảm sản lượng virus/đỏ trung tính)		0,00115	>0,32		>280
MD349	Đỏ trung tính (tác dụng gây bệnh tế bào/độc tính)	0,0006		>0,32	>530	
MD352	Quan sát bằng mắt (Giảm sản lượng virus/đỏ trung tính)		0,00208	>0,32		>150
MD352	Đỏ trung tính (tác dụng gây bệnh tế bào/độc tính)	0,00038		>0,32	>840	
Ribavirin	Quan sát bằng mắt (Giảm sản lượng virus/đỏ trung tính)		4,4	>320		>73
Ribavirin	Đỏ trung tính (tác dụng gây bệnh tế bào/độc tính)	5		>320	>64	

*SI₅₀ = CC₅₀/EC₅₀**SI₉₀ = CC₅₀/EC₉₀

Bảng 12: Sàng lọc kháng virus *in vitro* (virus cúm A H7N9, A/Anhui/1/2003)

Hợp chất số	Tên thử nghiệm thuốc	EC ₅₀ (µg/ml)	EC ₉₀ (µg/ml)	CC ₅₀ (µg/ml)	*SI ₅₀	**SI ₉₀
MD185	Quan sát bằng mắt (Giảm sản lượng virus/đỏ trung tính)		<0,0006	>2,0		>3333
MD185	Đỏ trung tính (tác dụng gây bệnh tế bào/độc tính)	0,001		>2,0	>2000	
MD317	Quan sát bằng mắt (Giảm sản lượng virus/đỏ trung tính)		0,01	>2,0		>200
MD317	Đỏ trung tính (tác dụng gây bệnh tế bào/độc tính)	0,015		>2,0	>130	
MD345	Quan sát bằng mắt (Giảm sản lượng virus/đỏ trung tính)		0,01	>2,0		>200
MD345	Đỏ trung tính (tác dụng gây bệnh tế bào/độc tính)	0,025		>2,0	>80	
MD349	Quan sát bằng mắt (Giảm sản lượng virus/đỏ trung tính)		<0,0006	>2,0		>3333
MD349	Đỏ trung tính (tác dụng gây bệnh tế bào/độc tính)	0,0042		>2,0	>480	
MD352	Quan sát bằng mắt (Giảm sản lượng virus/đỏ trung tính)		<0,0006	>2,0		>3333
MD352	Đỏ trung tính (tác dụng gây bệnh tế bào/độc tính)	0,00063		>2,0	>3200	
Ribavirin	Quan sát bằng mắt (Giảm sản lượng virus/đỏ trung tính)		2,20	>320		>267
Ribavirin	Đỏ trung tính (tác dụng gây bệnh tế bào/độc tính)	6,4		>320	>50	

*SI₅₀ = CC₅₀/EC₅₀**SI₉₀ = CC₅₀/EC₉₀

Bảng 13: Sàng lọc kháng virus *in vitro* (virus cúm A H1N1, California/07/2009)

Hợp chất số	Tên thử nghiệm thuốc	EC ₅₀ (µg/ml)	EC ₉₀ (µg/ml)	CC ₅₀ (µg/ml)	*SI ₅₀	**SI ₉₀
MD185	Quan sát bằng mắt (Giảm sản lượng virus/đỏ trung tính)		0,00026	>0,32		>1230
MD185	Đỏ trung tính (tác dụng gây bệnh tế bào/độc tính)	0,00015		>0,32	>2100	
MD317	Quan sát bằng mắt (Giảm sản lượng virus/đỏ trung tính)		0,0017	>0,32		>190
MD317	Đỏ trung tính (tác dụng gây bệnh tế bào/độc tính)	0,0009		>0,32	>360	
MD345	Quan sát bằng mắt (Giảm sản lượng virus/đỏ trung tính)		0,0047	>0,32		>68
MD345	Đỏ trung tính (tác dụng gây bệnh tế bào/độc tính)	0,00077		>0,32	>420	
MD349	Quan sát bằng mắt (Giảm sản lượng virus/đỏ trung tính)		0,0046	>0,32		>70
MD349	Đỏ trung tính (tác dụng gây bệnh tế bào/độc tính)	0,0007		>0,32	>460	
MD352	Quan sát bằng mắt (Giảm sản lượng virus/đỏ trung tính)		0,0041	>0,32		>78
MD352	Đỏ trung tính (tác dụng gây bệnh tế bào/độc tính)	0,00025		>0,32	>1300	
Ribavirin	Quan sát bằng mắt (Giảm sản lượng virus/đỏ trung tính)		2,3	>320		>140
Ribavirin	Đỏ trung tính (tác dụng gây bệnh tế bào/độc tính)	2,5		>320	>130	

*SI₅₀ = CC₅₀/EC₅₀**SI₉₀ = CC₅₀/EC₉₀

Bảng 14: Sàng lọc kháng virus *in vitro* (virus cúm A H5N1, Việt/MN/1525/81)

Hợp chất	Tên thử nghiệm thuốc	EC ₅₀ (µg/ml)	EC ₉₀ (µg/ml)	CC ₅₀ (µg/ml)	*SI ₅₀	**SI ₉₀
MD185	Quan sát bằng mắt (Giảm sản lượng virus/đỏ trung tính)	0,00153		>0,32		>210
MD185	Đỏ trung tính (tác dụng gây bệnh tế bào/độc tính)	0,00033		>0,32	>970	
MD317	Quan sát bằng mắt (Giảm sản lượng virus/đỏ trung tính)	0,00096		>0,32		>330
MD317	Đỏ trung tính (tác dụng gây bệnh tế bào/độc tính)	0,00099		>0,32	>320	
MD345	Quan sát bằng mắt (Giảm sản lượng virus/đỏ trung tính)	0,0065		>0,32		>49
MD345	Đỏ trung tính (tác dụng gây bệnh tế bào/độc tính)	0,0018		>0,32	>180	
MD349	Quan sát bằng mắt (Giảm sản lượng virus/đỏ trung tính)	0,00835		>0,32		>38
MD349	Đỏ trung tính (tác dụng gây bệnh tế bào/độc tính)	0,00085		>0,32	>380	
MD352	Quan sát bằng mắt (Giảm sản lượng virus/đỏ trung tính)	0,0077		>0,32		>42
MD352	Đỏ trung tính (tác dụng gây bệnh tế bào/độc tính)	0,00094		>0,32	>340	
Ribavirin	Quan sát bằng mắt (Giảm sản lượng virus/đỏ trung tính)	2,3		>320		>140
Ribavirin	Đỏ trung tính (tác dụng gây bệnh tế bào/độc tính)	6,5		>320	>49	

*SI₅₀ = CC₅₀/EC₅₀**SI₉₀ = CC₅₀/EC₉₀

Bảng 15: Sàng lọc kháng virus *in vitro* (virus cúm A H5N1, Thailand/16/2004)

Hợp chất số	Tên thử nghiệm thuốc	EC ₅₀ (µg/ml)	EC ₉₀ (µg/ml)	CC ₅₀ (µg/ml)	*SI ₅₀	**SI ₉₀
MD185	Quan sát bằng mắt (Giảm sản lượng virus/đỏ trung tính)		0,012	>2,0		>170
MD185	Đỏ trung tính (tác dụng gây bệnh tế bào/độc tính)	0,0045		>2,0	>440	
MD317	Quan sát bằng mắt (Giảm sản lượng virus/đỏ trung tính)		0,010	>2,0		>200
MD317	Đỏ trung tính (tác dụng gây bệnh tế bào/độc tính)	0,0076		>2,0	>260	
MD345	Quan sát bằng mắt (Giảm sản lượng virus/đỏ trung tính)		0,005	>2,0		>400
MD345	Đỏ trung tính (tác dụng gây bệnh tế bào/độc tính)	0,0069		>2,0	>290	
MD349	Quan sát bằng mắt (Giảm sản lượng virus/đỏ trung tính)		0,010	>2,0		>200
MD349	Đỏ trung tính (tác dụng gây bệnh tế bào/độc tính)	0,0055		>2,0	>360	
MD352	Quan sát bằng mắt (Giảm sản lượng virus/đỏ trung tính)		0,002	>2,0		>1000
MD352	Đỏ trung tính (tác dụng gây bệnh tế bào/độc tính)	0,0037		>2,0	>540	
Ribavirin	Quan sát bằng mắt (Giảm sản lượng virus/đỏ trung tính)		2,79	>320		>120
Ribavirin	Đỏ trung tính (tác dụng gây bệnh tế bào/độc tính)	3,7		>320	>86	

*SI₅₀ = CC₅₀/EC₅₀**SI₉₀ = CC₅₀/EC₉₀

Bảng 16: Sàng lọc kháng virus *in vitro* (virus cúm A H1N1, A/Mississippi/3/2001 H275Y, kháng Oseltamivir)

Hợp chất số	Tên thử nghiệm thuốc	EC ₅₀ (µg/ml)	EC ₉₀ (µg/ml)	CC ₅₀ (µg/ml)	*SI ₅₀	**SI ₉₀
MD185	Quan sát bằng mắt (Giảm sản lượng virus/đỏ trung tính)	0,006		>2,0	>330	
MD185	Đỏ trung tính (tác dụng gây bệnh tế bào/độc tính)	0,0062		>2,0	>320	
MD317	Quan sát bằng mắt (Giảm sản lượng virus/đỏ trung tính)	<0,002		>2,0	>1000	
MD317	Đỏ trung tính (tác dụng gây bệnh tế bào/độc tính)	<0,002		>2,0	>1000	
MD345	Quan sát bằng mắt (Giảm sản lượng virus/đỏ trung tính)	0,0036		>2,0	>560	
MD345	Đỏ trung tính (tác dụng gây bệnh tế bào/độc tính)	0,0036		>2,0	>560	
MD349	Quan sát bằng mắt (Giảm sản lượng virus/đỏ trung tính)	0,0089		>2,0	>220	
MD349	Đỏ trung tính (tác dụng gây bệnh tế bào/độc tính)	0,0067		>2,0	>300	
MD352	Quan sát bằng mắt (Giảm sản lượng virus/đỏ trung tính)	0,008		>2,0	>250	
MD352	Đỏ trung tính (tác dụng gây bệnh tế bào/độc tính)	0,0081		>2,0	>250	
Ribavirin	Quan sát bằng mắt (Giảm sản lượng virus/đỏ trung tính)	10		>320	>32	
Ribavirin	Đỏ trung tính (tác dụng gây bệnh tế bào/độc tính)	9,5		>320	>34	

*SI₅₀ = CC₅₀/EC₅₀

**SI₉₀ = CC₅₀ /EC₉₀

Bảng 17: Sàng lọc kháng virus *in vitro* (virus cúm A H5N1, Việt/MN/1525/81)

Hợp chất số	Tên thử nghiệm thuốc	EC ₅₀ (µg/ml)	EC ₉₀ (µg/ml)	CC ₅₀ (µg/ml)	*SI ₅₀	**SI ₉₀
MD185	Quan sát bằng mắt (Giảm sản lượng virus/đỏ trung tính)	<0,002		>2,0	>1000	
MD185	Đỏ trung tính (tác dụng gây bệnh tế bào/độc tính)	<0,002		>2,0	>1000	
MD317	Quan sát bằng mắt (Giảm sản lượng virus/đỏ trung tính)	<0,002		>2,0	>1000	
MD317	Đỏ trung tính (tác dụng gây bệnh tế bào/độc tính)	<0,002		>2,0	>1000	
MD345	Quan sát bằng mắt (Giảm sản lượng virus/đỏ trung tính)	0,0042		>2,0	>480	
MD345	Đỏ trung tính (tác dụng gây bệnh tế bào/độc tính)	0,0035		>2,0	>570	
MD349	Quan sát bằng mắt (Giảm sản lượng virus/đỏ trung tính)	<0,002		>2,0	>1000	
MD349	Đỏ trung tính (tác dụng gây bệnh tế bào/độc tính)	<0,002		>2,0	>1000	
MD352	Quan sát bằng mắt (Giảm sản lượng virus/đỏ trung tính)	0,0023		>2,0	>870	
MD352	Đỏ trung tính (tác dụng gây bệnh tế bào/độc tính)	0,0026		>2,0	>770	
Ribavirin	Quan sát bằng mắt (Giảm sản lượng virus/đỏ trung tính)	10		>320	>32	
Ribavirin	Đỏ trung tính (tác dụng gây bệnh tế bào/độc tính)	10		>320	>32	

*SI₅₀ = CC₅₀/EC₅₀**SI₉₀ = CC₅₀/EC₉₀

Bảng 18: *Sàng lọc kháng virus in vitro* (virus cúm B, B/Brisbane/60/2008)

Hợp chất số	Tên thử nghiệm thuốc	EC ₅₀ (µg/ml)	EC ₉₀ (µg/ml)	CC ₅₀ (µg/ml)	*SI ₅₀	**SI ₉₀
MD185	Quan sát bằng mắt (Giảm sản lượng virus/đỏ trung tính)	0,006		>2,0	>330	
MD185	Đỏ trung tính (tác dụng gây bệnh tế bào/độc tính)	0,0062		>2,0	>320	
MD317	Quan sát bằng mắt (Giảm sản lượng virus/đỏ trung tính)	<0,002		>2,0	>1000	
MD317	Đỏ trung tính (tác dụng gây bệnh tế bào/độc tính)	<0,002		>2,0	>1000	
MD345	Quan sát bằng mắt (Giảm sản lượng virus/đỏ trung tính)	0,0036		>2,0	>560	
MD345	Đỏ trung tính (tác dụng gây bệnh tế bào/độc tính)	0,0036		>2,0	>560	
MD349	Quan sát bằng mắt (Giảm sản lượng virus/đỏ trung tính)	0,0089		>2,0	>220	
MD349	Đỏ trung tính (tác dụng gây bệnh tế bào/độc tính)	0,0067		>2,0	>300	
MD352	Quan sát bằng mắt (Giảm sản lượng virus/đỏ trung tính)	0,008		>2,0	>250	
MD352	Đỏ trung tính (tác dụng gây bệnh tế bào/độc tính)	0,0081		>2,0	>250	
Ribavirin	Quan sát bằng mắt (Giảm sản lượng virus/đỏ trung tính)	10		>320	>32	
Ribavirin	Đỏ trung tính (tác dụng gây bệnh tế bào/độc tính)	9,5		>320	>34	

*SI₅₀ = CC₅₀/EC₅₀**SI₉₀ = CC₅₀/EC₉₀

Bảng 19: Sàng lọc kháng virus *in vitro* (virus cúm B, B/Florida/4/2006)

Hợp chất số	Tên thử nghiệm thuốc	EC ₅₀ (µg/ml)	EC ₉₀ (µg/ml)	CC ₅₀ (µg/ml)	*SI ₅₀	**SI ₉₀
MD185	Quan sát bằng mắt (Giảm sản lượng virus/đỏ trung tính)	0,006		>2,0	>330	
MD185	Đỏ trung tính (tác dụng gây bệnh tế bào/độc tính)	0,0062		>2,0	>320	
MD317	Quan sát bằng mắt (Giảm sản lượng virus/đỏ trung tính)	<0,002		>2,0	>1000	
MD317	Đỏ trung tính (tác dụng gây bệnh tế bào/độc tính)	<0,002		>2,0	>1000	
MD345	Quan sát bằng mắt (Giảm sản lượng virus/đỏ trung tính)	0,0036		>2,0	>560	
MD345	Đỏ trung tính (tác dụng gây bệnh tế bào/độc tính)	0,0036		>2,0	>560	
MD349	Quan sát bằng mắt (Giảm sản lượng virus/đỏ trung tính)	0,0089		>2,0	>220	
MD349	Đỏ trung tính (tác dụng gây bệnh tế bào/độc tính)	0,0067		>2,0	>300	
MD352	Quan sát bằng mắt (Giảm sản lượng virus/đỏ trung tính)	0,008		>2,0	>250	
MD352	Đỏ trung tính (tác dụng gây bệnh tế bào/độc tính)	0,008		>2,0	>250	
Ribavirin	Quan sát bằng mắt (Giảm sản lượng virus/đỏ trung tính)	10		>320	>32	
Ribavirin	Đỏ trung tính (tác dụng gây bệnh tế bào/độc tính)	9,5		>320	>34	

*SI₅₀ = CC₅₀/EC₅₀**SI₉₀ = CC₅₀/EC₉₀

Bảng 20: Sàng lọc kháng virus *in vitro* (A/Sydney/250/99)

Hợp chất	EC ₅₀ (ng/ml)	EC ₅₀ (nM)
MD012		
CHTCA(Z) ₂ (S ₆) (MW 1534)	0,06	0,039
MD021		
CHTCA(Z) ₂ -L-Asp (MW 1243)	0,03	0,024
Zanamivir (MW 332)	7,38	22,228

Bảng 21: Hoạt tính chống virus cúm đối với các chủng kháng Oseltamivir

Ước chế kích thước màng và số lượng màng nhờ các hợp chất đại diện có công thức (I)

Virus	Kiểu phụ	MD021 ng/ml		MD051 ng/ml		MD155 ng/ml		MD185 ng/ml		Oseltamivir nM	
		Kích thước	Số lượng	Kích thước	Số lượng	Kích thước	Số lượng	Kích thước	Số lượng	Kích thước	Số lượng
A/Fukui	H3N2	0,1-1,0 ^a	1-10	0,1-10	0,1-1	0,1-1,0	0,1-10 ^b	0,1-1,0	1	10-100	≥1000
A/Fukui	H3N2	0,1	0,1-1	0,1	0,1-1	0,1	0,1-1	0,1	0,1-1	100	≥10,000
A/Perth	pH1N1	1	10-100	0,1-1,0	1-10	0,1-1,0	1-10	1	1-10	10	100
A/Perth	pH1N1	0,1-1,0	10-100	0,1-1,0	1-10	0,1-1,0	1-10	0,1-1,0	1-100 ^b	100-1000	≥10,000
B/Perth	B	1	1-10	1	1-10	0,1-1,0	1-10	1,0-10	1-10	100-1000	1,000
B/Perth	B	1	1-100	0,1-1,0	1-10 ^b	1,0-10	1-10	0,1-10	1-100	1000	≥10,000

^a Khoảng được đưa ra khi IC₅₀ nằm trong khoảng giữa hai nồng độ thuốc.

^b Khoảng được thấy với khi lặp lại có thể trải qua nhiều hơn một log₁₀.

Bảng 22: thử nghiệm làm giảm mảng virus (virus H1N1 CA/07/2009)

Hợp chất	Phân tử lượng	EC ₅₀ ng/ml	nM
MD185	1852	0,095	0,05140
MD317	1318	0,068	0,05168
MD343	1597	0,012	0,00749
MD344	2057	0,021	0,01038
MD345	2201	0,017	0,00797
Zanamivir	332	1,969	5,933

Bảng 23: thử nghiệm làm giảm mảng virus (virus H1N1 A/PR/8)

Hợp chất	Phân tử lượng	EC ₅₀ nM
MD185	1852	4,256
MD344	2057	1,471
MD342	2208	1,276
MD345	2201	1,719
MD348	1982	1,919
MD051	1318	1,744
MD343	1597	1,273
MD317	1318	3,303
Zanamivir	332	10150

Bảng 24: Dữ liệu về hiệu quả *in vivo* ở chuột đối với các hợp chất đại diện có công thức (I).

Số con chuột sống sót/tổng số sau khi nhiễm virus và điều trị bằng hợp chất một lần với các liều lượng khác nhau.

Nhiễm virus ở chuột nhất	MD021 µg/con chuột			MD154 µg/con chuột			MD185 µg/con chuột			Zanamivir µg/con chuột		Thuốc vờ
	50	10	2	50	10	2	50	10	2	150	50	
A/California/04/2009 (H1N1)	8/10	3/10	5/10	10/10	10/10	4/10	10/10	9/10	4/10	2/10		0/20
A/Victoria/3/75 (H3N2)	10/10	5/10	6/10							8/10	3/10	0/20
A/Mississippi/3/01 H275Y				10/10	4/10	1/10	10/10	8/10	3/10	1/10		0/20
Virus kháng Oseltamivir (H1N1)	10/10	10/10	7/10	10/10	10/10	9/9	10/10	10/10	9/10	8/10		0/20
A/vit/MN/1525/81 (H5N1)	7/10	8/10	2/10	10/10	9/10	6/10	10/10	8/10	7/10	7/10		3/20
B/Sichuan/379/99 (FluB)	8/10	8/10	7/10	10/10	10/10	9/10	9/10	9/10	8/10	9/10		1/20

Lưu ý: Các hợp chất được dùng một lần trong mũi 24 giờ trước khi nhiễm; chuột nhất bị nhiễm trong mũi và khoảng thời gian quan sát là 21 ngày.

Bảng 25: Dữ liệu về hiệu quả *in vivo* ở chuột đối với các hợp chất đại diện có công thức (I)

Số con chuột sống sót/tổng số sau khi nhiễm virus và điều trị bằng hợp chất một lần với các liều lượng và tại các thời điểm khác nhau. Con chuột nhất bị nhiễm virus A/PR/8 (500pfu/con chuột) qua đường mũi và được điều trị trong mũi bằng các hợp chất đại diện có công thức (I).

	MD185		MD342	MD343	MD344	MD345	MD348	Zanamivir	Thuốc vờ
	4/5	5/5	5/5	4/5	4/5	5/5	4/5	0/5	0/5
0,25µg/con chuột 24 giờ trước khi nhiễm									
0,5µg/con chuột 24 giờ trước khi nhiễm	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	0/5	0/5
2µg/con chuột 5 ngày trước khi nhiễm	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5		0/5	0/5
5µg/con chuột 7 ngày trước khi nhiễm	5/5		5/5	5/5	5/5	5/5		0/5	0/5
5µg/con chuột 9 ngày trước khi nhiễm	4/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	0/5	0/5
5µg/con chuột 11 ngày trước khi nhiễm	4/5	5/5	5/5	4/5	2/5	5/5	5/5	0/5	0/5

Bảng 26: Dữ liệu về hiệu quả *in vivo* ở chuột đối với các hợp chất đại diện có công thức (I)

Các tác dụng của việc điều trị trong mũi một lần bằng MD 185 và Zanamivir khi được dùng sau khi nhiễm để mức sống sót sau khi nhiễm virus cúm A/California/04/2009 (H1N1pdm) ở chuột nhất.

Hợp chất	µg/con chuột	Thời gian điều trị (giờ) ^a	Số sống sót/tổng số	Số ngày chết trung bình ^b ±SD
MD185	250	24	4/10	8,2 ± 1,2***
MD185	50	24	1/10	7,3 ± 0,5***
MD185	10	24	0/10	6,3 ± 0,9
Zanamivir	250	24	0/9 ^c	6,7 ± 0,7
Thuốc vờ		24	1/13 ^c	5,6±0,9
MD185	250	48	5/9 ^{c**}	6,5 ± 1,0
MD185	50	48	3/10	7,7 ± 1,0
MD185	10	48	1/10	7,6±0,9*
Zanamivir	250	48	0/10	6,6±0,8
Thuốc vờ		48	0/15	6,6±0,6

^a So với tiếp cận với virus.

^b Ở con chuột nhất mà chết trong khoảng thời gian quan sát 21 ngày.

^c Kích thước nhóm ban đầu là 10 con chuột nhất được điều trị bằng thuốc và 15 con chuột nhất được điều trị bằng thuốc vờ. Bốn con chuột bị loại bỏ vì chúng không thể hiện bằng chứng nhiễm (không giảm cân).

* P<0,05, ** P<0,01, *** P<0,001, so với thuốc vờ.

Bảng 27: Dữ liệu về hiệu quả *in vivo* ở chuột đối với các hợp chất đại diện có công thức (I)

Tác dụng của việc điều trị trong mũi một lần bằng MD185, MD317, Zanamivir, hoặc nước muối khi được dùng tại thời điểm 48 giờ sau khi nhiễm sau khi nhiễm đến mức sống sót sau khi nhiễm virus cúm A/PR/8 (H1N1) ở chuột nhất.

Hợp chất	µg/con chuột	Thời gian điều trị (giờ) ^a	Số sống sót/tổng số	Mức giảm trọng lượng tối đa ở chuột nhất ^b
MD185	40	48	5/5	< 10% 4/5; 12% 1/5
MD317	40	48	4/5	< 10% 2/5; 20% 2/5
Zanamivir	40	48	0/5	
Thuốc vờ	Nước muối	48	0/5	
MD185	100	48	5/5	< 10% 4/5; 17% 1/5
MD317	100	48	5/5	< 10% 3/5; 15% 1/5; 20% 1/5
Zanamivir	100	48	0/5	
Thuốc vờ	Nước muối	48	0/5	

^a So với mức tiếp cận virus.

^b trong khoảng thời gian quan sát 21 ngày.

Bảng 28: Dữ liệu về hiệu quả *in vivo* ở chuột đối với các hợp chất đại diện có công thức (I)

Tác dụng của việc điều trị trong mũi một lần bằng MD185, MD345, MD348, Zanamivir, hoặc nước muối khi được dùng tại thời điểm 48 giờ sau khi nhiễm đến mức sống sót sau khi nhiễm virus cúm A/PR/8 (H1N1) ở chuột nhắt.

Hợp chất	µg/con chuột	Thời gian điều trị (giờ) ^a	Số sống sót/tổng số	Mức giảm trọng lượng tối đa ở chuột nhắt ^b
MD185	40	48	5/5	≤5% 1/5; ≤10% 1/5; ≤15% 3/5
MD345	40	48	5/5	≤10% 4/5; ≤15% 1/5
MD348	40	48	5/5	≤5% 1/5; ≤15% 3/5; <25% 1/5
Zanamivir	40	48	0/5 ^c	
Thuốc vờ	Nước muối	48	0/5 ^d	

^a So với tiếp cận virus; ^b trong khoảng thời gian quan sát 21 ngày; ^c Số ngày chết trung bình: 6,9 ngày; ^d Số ngày chết trung bình: 6,6 ngày

Bảng 29: Dữ liệu về hiệu quả *in vivo* ở chuột đối với các hợp chất đại diện có công thức (I)

Tác dụng của việc điều trị trong mũi một lần bằng MD185, MD348, Zanamivir, hoặc nước muối khi được dùng tại thời điểm 48 giờ sau khi nhiễm sau khi nhiễm virus cúm A/PR/8 (H1N1) (500pfu/con chuột) ở chuột nhắt.

Hợp chất	µg/con chuột	Thời gian điều trị (giờ) ^a	Số sống sót/tổng số	Mức giảm trọng lượng tối đa ở chuột nhắt ^b
MD185	40	48	4/5	10% 1/5; <15% 1/5; 15% 2/5
MD348	40	48	5/5	≤10% 3/5; 15% 1/5; 25% 1/5
Zanamivir	40	48	0/5	
Thuốc vờ	Nước muối	48	0/5	

^a So với tiếp cận virus; ^b trong khoảng thời gian quan sát 21 ngày.

Bảng 30: Dữ liệu về hiệu quả *in vivo* ở chuột đối với các hợp chất đại diện có công thức (I)

Tác dụng của việc điều trị trong mũi một lần bằng MD185, Zanamivir, hoặc nước muối khi được dùng tại thời điểm 60 giờ sau khi nhiễm đến mức sống sót sau khi nhiễm virus cúm A/PR/8 (H1N1) (500pfu/con chuột) ở chuột nhắt.

Hợp chất	µg/con chuột	Thời gian điều trị (giờ) ^a	Số sống sót/tổng số	Mức giảm trọng lượng tối đa ở chuột nhắt ^b
MD185	40	60	5/5	≤10% 3/5; 12% 1/5; 15% 1/5
MD185	200	60	5/5	<10% 2/5; 12% 2/5; 15% 1/5
Zanamivir	200	60	4/5 ^c	10% 1/5; 15% 1/5; ≥20% 2/5
Thuốc vờ	Nước muối	60	0/5 ^d	

^a So với tiếp cận virus; ^b trong khoảng thời gian quan sát 21 ngày; ^c Số ngày chết trung bình: 8 ngày; ^d Số ngày chết trung bình: 6,6 ngày

Bảng 31: Dữ liệu về hiệu quả *in vivo* ở chuột đối với các hợp chất đại diện có công thức (I)

Tác dụng của việc điều trị trong mũi một lần bằng MD185, MD317, MD345, Zanamivir, hoặc nước muối khi được dùng tại thời điểm 60 giờ sau khi nhiễm đến mức sống sót sau khi nhiễm virus cúm A/PR/8 (H1N1) (500pfu/con chuột) ở chuột nhắt.

Hợp chất	µg/con chuột	Thời gian điều trị (giờ) ^a	Số sống sót/tổng số	Mức giảm trọng lượng tối đa ở chuột nhắt ^b	Số ngày chết trung bình
MD185	40	60	2/5	20% 1/5; 24% 1/5	7,3 ngày
MD317	40	60	2/5	20% 1/5; 24% 1/5	7,0 ngày
MD345	40	60	5/5	18% 4/5; 20% 1/5	
Zanamivir	2000	60	0/5		6,6 ngày
Zanamivir	40	60	0/5		5,2 ngày
Thuốc vờ	Nước muối	60	0/5		5,2 ngày

^a So với tiếp cận virus; ^b trong khoảng thời gian quan sát 21 ngày.

Bảng 32: Dữ liệu về hiệu quả *in vivo* ở chuột đối với các hợp chất đại diện có công thức (I)

Tác dụng của việc điều trị trong mũi một lần bằng MD185, Zanamivir, hoặc nước muối khi được dùng tại thời điểm 72 giờ sau khi nhiễm đến mức sống sót sau khi nhiễm virus cúm A/PR/8 (H1N1) (500pfu/con chuột) ở chuột nhất.

Hợp chất	µg/con chuột	Thời gian điều trị (giờ) ^a	Số sống sót/tổng số	Mức giảm trọng lượng tối đa ở chuột nhất ^b	Số ngày chết trung bình
MD185	40	72	3/5	≤5% 1/5; <15% 1/5; <20% 1/5	7,25 ngày
MD185	200	72	4/5	<10% 1/5; <15% 2/5; 20% 1/5	7,5 ngày
Zanamivir	40	72	0/5		5,8 ngày
Zanamivir	200	72	0/5		6,2 ngày
Thuốc vờ	Nước muối	72	0/5		5 ngày

^a So với tiếp cận virus; ^b trong khoảng thời gian quan sát 21 ngày.

Bảng 33: Dữ liệu về hiệu quả *in vivo* ở chuột đối với các hợp chất đại diện có công thức (I)

Các tác dụng của việc điều trị trong mũi một lần bằng MD185, MD345, Zanamivir, hoặc nước muối khi được dùng ở nhiệt độ 72 giờ sau khi nhiễm đến mức sống sót sau khi nhiễm virus cúm A/PR/8 (H1N1) (500pfu/con chuột) ở chuột nhất.

Hợp chất	µg/con chuột	Thời gian điều trị (giờ) ^a	Số sống sót/tổng số	Mức giảm trọng lượng tối đa ở chuột nhất ^b	Số ngày chết trung bình
MD185	40	72	6/10	20% 2/10; 15% 1/10;	7,25 ngày
				12% 2/10; 10% 1/10	
MD345	40	72	7/10	25% 1/10; 18% 1/10;	7,0 ngày
				15% 3/10; 12% 2/10	
Zanamivir	40	72	0/5		6,6 ngày
Thuốc vờ	Nước muối	72	0/5		6,6 ngày

^a So với tiếp cận virus; ^b trong khoảng thời gian quan sát 21 ngày.

Bảng 34: Dữ liệu về hiệu quả *in vivo* ở chuột đối với các hợp chất đại diện có công thức (I)

Tác dụng của dùng trong khoang màng bụng một lần với MD185, MD317, Zanamivir, hoặc nước muối, 1 giờ trước khi thử thách bằng liều gây chết của virus cúm A/PR/8 (H1N1) (500pfu/con chuột) đến chuột nhất.

Hợp chất	µg/con chuột	Thời gian điều trị (giờ) ^a	Số sống sót/tổng số	Mức giảm trọng lượng tối đa ở chuột nhất ^b
MD185	20	-1	5/5	15% 3/5; 18% 1/5; 20% 1/5
MD317	20	-1	4/5	15% 3/5; 24% 1/5
Zanamivir	20	-1	0/5 ^c	
Thuốc vờ	Nước muối	-1	0/5 ^d	

^a So với tiếp cận virus; ^b trong khoảng thời gian quan sát 21 ngày; ^c Số ngày chết trung bình : 7 ngày; ^d Số ngày chết trung bình : 7 ngày

Bảng 35: Dữ liệu về hiệu quả *in vivo* ở chuột đối với các hợp chất đại diện có công thức (I)

Tác dụng của việc dùng trong khoang màng bụng 20µg/con chuột/ngày x 5 ngày MD185, MD317, Zanamivir, hoặc nước muối tại thời điểm 4 giờ sau khi nhiễm đến mức sống sót sau khi nhiễm virus cúm A/PR/8 (H1N1) (500pfu/con chuột) ở chuột nhất.

Hợp chất	µg/con chuột/ngày x 5	Thời gian điều trị (giờ) ^a	Số sống sót/tổng số	Mức giảm trọng lượng tối đa ở chuột nhất ^b
MD185	20 x 5	4	5/5	≤10
Zanamivir	20 x 5	4	0/5 ^c	
Thuốc vờ	Nước muối x 5	4	0/5 ^d	

^a So với tiếp cận virus; ^b trong khoảng thời gian quan sát 21 ngày; ^c Số ngày chết trung bình: 7,5 ngày; ^d Số ngày chết trung bình: 7,5 ngày.

Bảng 36: Dữ liệu về hiệu quả *in vivo* ở chuột đối với các hợp chất đại diện có công thức (I)

Tác dụng của việc điều trị trong mũi một lần bằng MD185, MD317, Zanamivir, hoặc nước muối khi được dùng tại thời điểm 60 giờ sau khi nhiễm đến mức sống sót sau khi nhiễm virus cúm A/PR/8 (H1N1) (500pfu/con chuột) ở chuột nhắt.

Hợp chất	µg/con chuột	Thời gian điều trị (giờ)	Số sống sót/tổng số	Mức giảm trọng lượng tối đa ở chuột nhắt ^b	Số ngày chết trung bình
MD185	40	60	5/5	10% 4/5;	20% 1/5
MD317	40	60	5/5	10% 3/5;	24% 2/5
Zanamivir	2000	60	3/5	15% 1/5	24% 2/5
Zanamivir	40	60	0/5		8,5 ngày
Nước muối	N/A	60	0/5		7 ngày

^a So với tiếp cận virus, ^b trong khoảng thời gian quan sát 21 ngày

Bảng 37: Dữ liệu về hiệu quả *in vivo* ở chuột đối với các hợp chất đại diện có công thức (I)

Tác dụng của việc điều trị trong mũi một lần bằng MD345, MD356, MD357, MD358, MD359, Zanamivir, hoặc nước muối khi được dùng tại thời điểm 60 giờ sau khi nhiễm đến mức sống sót sau khi nhiễm virus cúm A/PR/8 (H1N1) (500pfu/con chuột) ở chuột nhất

Hợp chất	µg/con chuột	Thời gian điều trị (giờ) ^a	Số sống sót/tổng số	Mức giảm thể trọng tối đa ở chuột nhất ^b	Số ngày chết trung bình
MD345	40	60	1/5	5% 1/5	7 ngày
MD356	40	60	5/5	<10% 1/5	
MD357	40	60	4/5	<15% 3/5	7 ngày
MD358	40	60	5/5	<10% 2/5	
MD359	40	60	4/5	<10% 1/5	7 ngày
Zanamivir	40	60	0/5		6 ngày
Nước muối	N/A	60	0/5		6 ngày

^a So với tiếp cận virus, ^b trong khoảng thời gian quan sát 21 ngày.

Bảng 38: Dữ liệu về hiệu quả *in vivo* ở chuột đối với các hợp chất đại diện có công thức (I)

Tác dụng của dùng trong khoang màng bụng một lần với MD345, MD373, Zanamivir hoặc nước muối, 1 giờ trước khi gây chết bằng virus cúm A/PR/8 (H1N1)

Hợp chất	Thời gian điều trị (giờ) ^a	Số sống sót/tổng số	Maximum chuột nhất giảm cân ^b		
MD345	-1	5/5	10% 1/5	12% 1/5	18% 1/5
MD372	-1	5/5	10% 1/5	12% 1/5	20% 1/5
Zanamivir	-1	0/5 ^c			
Nước muối	-1	0/5 ^d			

^a So với tiếp cận virus, ^b trong khoảng thời gian quan sát 14 ngày, ^c Số ngày chết trung bình 7 ngày, ^d Số ngày chết trung bình 5 ngày

Bảng 39: Hoạt tính chống virus cúm trong thử nghiệm CPE đối với các hợp chất đại diện có công thức (I) (EC₅₀ ng/ml/nM)

Virus cúm	MD185	MD356	MD357	MD358	MD359	MD371	MD021
A/Sydney/250/99	0,18/0,097	0,01/0,0054	0,02/0,0108	0,27/0,139	0,16/0,074	n/a	0,27/0,217
A/Soloman Island/3/06	0,06/0,032	0,03/0,016	0,04/0,021	0,09/0,046	0,05/0,023	n/a	0,06/0,048
A/Townsville/74/2011	<0,03/<0,016	0,03/0,016	0,03/0,016	0,03/0,0154	0,01/0,0046	n/a	0,03/0,024
A/Mississippi/03/01/WT	0,08/0,043	0,06/0,032	0,06/0,032	0,185/0,095	0,06/0,0278	0,06/0,035	0,06/0,048
A/Mississippi/03/01/H274Y	0,18/0,097	0,06/0,032	0,133/0,086	0,03/0,0154	0,06/0,0278	0,02/0,0116	0,06/0,048
A/Perth/261/2009	0,09/0,048	n/a	n/a	0,0065/0,0033	0,03/0,0139	0,009/0,0052	0,03/0,024
A/Victoria/170/2012	0,27/0,145	0,27/0,145	1,20/0,647	n/a	n/a	0,27/0,157	0,27/0,217
A/Sydney/5/97	0,13/0,070	0,06/0,032	0,18/0,097	0,09/0,046	0,16/0,074	n/a	0,27/0,217
B/Townsville/2/2011	5,07/2,73	0,28/0,151	2,5/1,348	2,5/1,28	2,5/1,158	n/a	2,5/2,01

Bảng 40: Hoạt tính chống virus cúm trong thử nghiệm CPE đối với các hợp chất đại diện có công thức (I) ở các chuẩn độ virus khác nhau (EC₅₀ ng/ml/nM)

Virus cúm	MD185	MD356	MD358	MD359 · MD371	MD345	MD021
A/Townsville/74/2011 (1 x 10 ⁻⁵ /ml)	<0,03/<0,0160	0,03/0,016	0,03/0,01540	0,01/0,0046	n/a	0,03/0,024
A/Townsville/74/2011 (5 x 10 ⁻⁵ /ml)	66/35,6	0,8/0,43	48/24,7	66/30,5	66/38,6	158/71,7 Không ức chế ở 197

Ví dụ 8: Nghiên cứu về độc tính ADME đối với các hợp chất đại diện có công thức (I)

Hai hợp chất có công thức (I), MD185 và MD317, được thử theo thử nghiệm hERG IC₅₀ (hERG-CHO, dán-kẹp tự động). Trị số IC₅₀ của MD 185 không thể tính được. Đường cong nồng độ-đáp ứng đối với MD317 thể hiện tác động thấp hơn 25% ở nồng độ thử nghiệm cao nhất đã được xác nhận, tức là IC₅₀ > 100nM.

Kết quả chỉ ra rằng MD185 và MD317 là an toàn về mặt độc tính đối với tim.

Ví dụ 9: Chép hình quét KINOME đối với các hợp chất đại diện có công thức (I)

Hai hợp chất có công thức (I), MD185 và MD317, được thử theo quy trình thử nghiệm kinaza dưới đây.

Đối với hầu hết các thử nghiệm, các chủng thể thực khuẩn T7 đánh dấu bằng kinaza được cho sinh trưởng song song trong khối loại 24 lỗ trong vật chủ *E. coli* thu được từ chủng BL21. *E. coli* được cho sinh trưởng đến pha log và được chuyển nhiễm với pha T7 từ giống gốc đã được đông lạnh (bội số nhiễm = 0,4) và ủ và lắc ở nhiệt độ 32°C cho đến khi phân giải (90 phút đến 150 phút). Các dịch phân giải được ly tâm (6.000 x g) và lọc (0,2µm) để loại bỏ mảnh vụn tế bào. Các kinaza còn lại được tạo ra trong tế bào HEK-293 và tiếp đó được gắn thẻ ADN để dò qPCR. Hạt từ tính phủ streptavidin được xử lý bằng các phối tử phân tử nhỏ đã được gắn biotin trong thời gian 30 phút ở nhiệt độ trong phòng để tạo ra nhựa ái lực cho thử nghiệm kinaza. Hạt đã có phối tử được phong bế bằng lượng dư biotin và rửa bằng dung dịch đệm phong bế (SeaBlock(pierce), 1% BSA, 0,05% Tween20, 1mMDTT) để loại bỏ phối tử không liên kết và để làm giảm liên kết thực khuẩn không đặc hiệu. Các phản ứng liên kết được tập hợp bằng cách kết hợp các kinaza, hạt ái lực có phối tử, và các hợp chất thử nghiệm trong 1 x dung dịch đệm liên kết (20% SeaBlock, 0,17 x PBS, 0,05% Tween20, 6mMDTT). Các hợp chất thử nghiệm được điều chế ở dạng gốc 40x trong 100% DMSO và được pha loãng một cách trực tiếp vào thử nghiệm. Tất cả các phản ứng được thực hiện trong các đĩa polypropylen loại 384 lỗ trong thể tích cuối cùng 0,04 ml. Các đĩa thử nghiệm được ủ ở nhiệt độ trong phòng và lắc trong thời gian 1 giờ và hạt ái lực được rửa bằng dung dịch đệm (1xPBS, 0,05% Tween 20). Tiếp đó, hạt được tạo huyền phù lại trong dung dịch đệm rửa giải (1xPBS, 0,05% Tween 20, 0,5µM phối tử ái lực chưa được biotinyl

hóa) và ủ ở nhiệt độ trong phòng và lắc trong thời gian 30 phút. Nồng độ kinaza trong các nước giải hấp đo được theo qPCR.

Không có tương tác đáng kể giữa các hợp chất và các kinaza ở nồng độ 100nM. Kết quả được tổng kết trong Bảng 41.

Bảng 41: Bảng điểm về mức chọn lọc

Tên hợp chất	Loại điểm về tính chọn lọc	Số lượng hit	Số lượng kinaza không đột biến	Nồng độ sàng lọc (nM)	Điểm về mức chọn lọc
MD185	S(35)	0	395	100	0
MD185	S(10)	0	395	100	0
MD185	S(1)	0	395	100	0
MD317	S(35)	0	395	100	0
MD317	S(10)	0	395	100	0
MD317	S(1)	0	395	100	0

Điều chế các hợp chất đại diện theo sáng chế

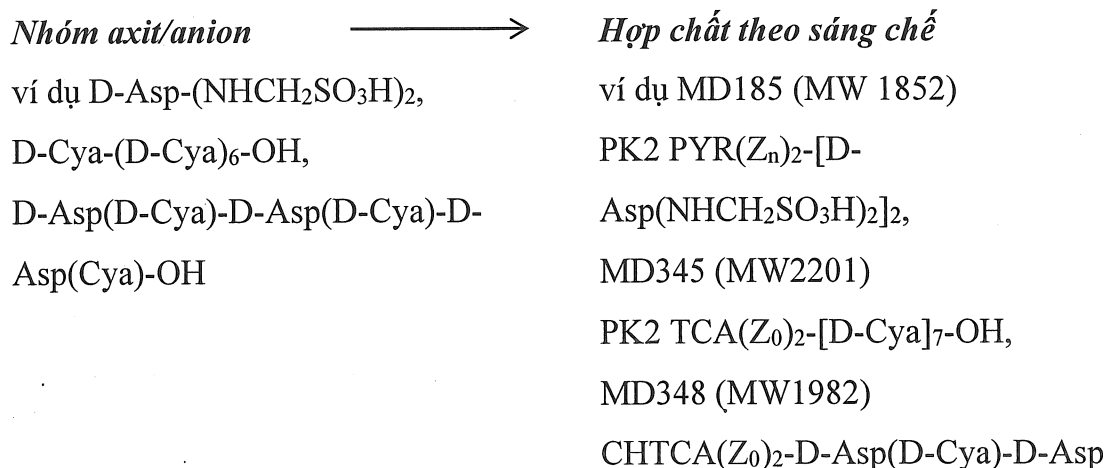
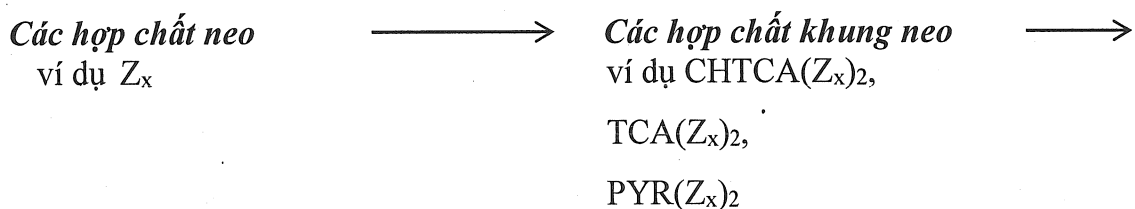
Để thuận tiện, nhiều gốc hóa học được thể hiện bằng cách sử dụng các chữ viết tắt bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, methyl (Me), ethyl (Et), n-propyl (nPr), isopropyl (iPr), n-butyl (nBu), tert-butyl (tBu), n-hexyl (nHex), cyclohexyl (cHex), phenyl (Ph), methoxy (MeO), ethoxy (EtO), trimethylsilyl (TMS), tert-butyloxycarbonyl (Boc), và acetyl (Ac).

Để thuận tiện, nhiều hợp chất hóa học được thể hiện bằng cách sử dụng các chữ viết tắt bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, methanol (MeOH), ethanol (EtOH), diethyl ether (Et₂O), ethyl acetate (EtOAc), triethylamine (TEA), dichloromethane (metylen clorua, DCM, CH₂Cl₂), axit trifluoroacetic (TFA), trifluoroethanol (TFE), dimethylformamide (DMF), natri sulphat (Na₂SO₄), tetrahydrofuran (THF), axit meta-chloroperoxybenzoic (*m*CPBA), hexamethyldisilazane muối natri (NaHMDS), O-(7-azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluron hexafluorophosphat (HATU), O-(benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-bis(tetrametylen)uron hexafluorophosphat (HBTU), dimethylsulfoxide (DMSO), magie

sulphat (MgSO_4), natri hydro cacbonat (NaHCO_3), tert-butanol ($t\text{-BuOH}$), muối hydroclorua của 1-etyl-3-(3-đimetylaminopropyl) carbodiimit (EDCl.HCl), tetra-*n*-butylamoni florua (TBAF), N,N-điisopropyletylamin (DIPEA), tert-butylđimetylsilyl (TBDMS), 1-hydroxybenzotriazol (HOBt), trans-điclobis(triphenylphosphin)paladi(II) ($\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$), tetrakis(triphenylphosphin)paladi(0) ($\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$) tris(đibenzylidenaxeton) đipaladi(0) ($\text{Pd}_2(\text{dba})_3$), tri-*t*-butyl phosphoni tetrafloborat ($t\text{-Bu}_3\text{PH.BF}_4$), 4,5-bis(điphenylphosphino)-9,9-đimetylanten (Xantphos), triphenylphosphin (PPh_3), đisopropyl azodicarboxylat (DIAD), pyridini clocromat (PCC), boran đimetylsulfua (BMS), titan isopropoxit (TiOiPr_4), natri triaxetoxibohyđrua ($\text{NaBH}(\text{OAc})_3$), natri xyanobohyđrua ($\text{NaBH}_3(\text{CN})$), natri bohyđrua (NaBH_4), amoni clorua (NH_4Cl), clorofom (CHCl_3), Mangan đioxit (MnO_2), kali cacbonat (K_2CO_3), 1,2-đicloetan (DCE), natri azit (NaN_3), natri nitrit (NaNO_2) đi-tert-butyl đicacbonat (Boc_2O), và S-axetamidometyl (Acm).

Quy trình chung tổng hợp các hợp chất có công thức (I) là tóm tắt trên Sơ đồ 1 dưới đây:

Sơ đồ 1: Quy trình chung tổng hợp các hợp chất có công thức (I)



(D-Cya)-D-Asp(D-Cya)-OH

Ví dụ 10: Điều chế N-Boc-1,9-điaminononan

1,9-điaminononan (1g, 6,329mmol) được hòa tan trong hỗn hợp gồm 50ml etanol và 50ml nước, sau đó được bổ sung đi-*t*-butylđicacbonat (1,38g, 6,329mmol) ở nhiệt độ trong phòng. Toàn bộ hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 16 giờ để tạo ra huyền phù trắng. Huyền phù này được lọc bỏ. Chất rắn là đi-Boc-1,9-điaminononan 488mg (1,36mmol, hiệu suất 21,53%) sau khi được sấy khô trong không khí. Dịch lọc được chiết bằng điclometan (150ml, 100ml). Lớp nước chứa 1,9-điaminononan chưa phản ứng (289mg, 1,83mmol) có thể được quay vòng vào mẻ điều chế tiếp theo. Các chiết phẩm hữu cơ được kết hợp và rửa bằng 50ml nước, rồi lại được khuấy với 10g Na₂SO₄ khan ở nhiệt độ trong phòng qua đêm. Huyền phù hữu cơ này được lọc. Dịch lọc được làm bay hơi trong chân không đến khô để tạo ra N-Boc-1,9-điaminononan 809mg (hiệu suất 49,5%) ở dạng chất rắn không màu. MS 295(M+1).

Ví dụ 11: Điều chế hợp chất neo Zn'

Quy trình tổng hợp được thể hiện chi tiết trên Sơ đồ 2 dưới đây. Các số tham chiếu hợp chất dưới đây và tham chiếu bước tổng hợp liên quan đến Sơ đồ 2.

Bước A) axit sialic (1) (5g, 16,18mmol) và nhựa Dowex 50 x 8(H⁺) (10g) được khuấy trong metanol khan (400ml) ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 60°C đến 62°C trong thời gian 48 giờ. Hỗn hợp này được lọc ra. Dịch lọc được làm bay hơi trong chân không đến khô để tạo ra Hợp chất (2) ở dạng rắn màu trắng 4,5g (13,25mmol, hiệu suất 82,5%). MS 338(M+1).

Bước B) Hợp chất (2) (4g, 11,87mmol) được khuấy với axetic anhydrit (40ml, d 1,08, phân tử lượng 102,29, 423mmol) và axit sulphuric (2ml). Sau đó, hỗn hợp này được khuấy ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 32°C đến 35°C trong thời gian 72 giờ trong bể dầu. Hỗn hợp phản ứng này được bổ sung nhỏ giọt vào hỗn hợp được khuấy gồm Na₂CO₃ (51g) trong nước (280ml) và etyl axetat (14ml) ở bể nước đá. Sau đó, hỗn hợp này được khuấy trong thời gian 1,5 giờ nữa trong bể nước đá, tiếp theo được chiết bằng etyl axetat (400ml, 270ml). Các dịch chiết etyl axetat được kết hợp và rửa bằng dung

dịch NaHCO_3 10% (270ml x 2), dung dịch NaCl bão hòa (270ml x 2), làm khô trên Na_2SO_4 khan qua đêm. Sau khi được lọc ra, dịch lọc được làm bay hơi trong chân không đến khô để tạo ra hợp chất có công thức (3) 4,78g (11,57mmol, hiệu suất 97,5%). MS 414(M+1). Cặn dầu chuyển thành chất rắn màu trắng đục sau khi bảo quản trong tủ sấy trên P_2O_5 trong thời gian 3 ngày.

Bước C) Hợp chất có công thức (3) (3,47g, 8,4mmol) được hòa tan trong *tert*-BuOH (25ml). Azidotrimetylsilan (1,81ml, 13,63mmol) được bổ sung vào dung dịch này. Toàn bộ hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 80°C đến 82°C trong khí quyển argon trong thời gian 24 giờ. Hỗn hợp phản ứng này được pha loãng bằng ethyl axetat (100ml), rồi lại được khuấy với 0,9g NaNO_2 trong 25ml nước, và được điều chỉnh đến độ pH=2 bằng dung dịch HCl 5N trong thời gian 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp hai pha này được tách, lớp nước được chiết bằng ethyl axetat (50ml). Các chiết phẩm hữu cơ được kết hợp và tiếp đó được rửa bằng nước (25ml x 2), dung dịch NaHCO_3 6% (25ml), nước (25ml x 3), sau đó được làm khô trên Na_2SO_4 . Dịch lọc được làm bay hơi trong chân không đến khô để tạo ra Hợp chất có công thức (4) 3,17g (6,95mmol, hiệu suất 82,7%) ở dạng chất dầu. MS 457 (M+1), 479 (M+Na), 925 (2M+Na).

Bước D) Hợp chất có công thức (4) (3,15g, 6,91mmol) được hòa tan trong metanol (100ml) và toluen (70ml). Dung dịch được đặt trong chân không để loại bỏ khí (oxy), tiếp đó nạp đầy lại bằng argon. Pd/C (10%) (616mg) được bổ sung vào hỗn hợp này, sau đó được đặt trong chân không để tháo argon ra mà tiếp theo được thế bằng hydro (H_2). Bước hydro hóa được thực hiện ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 2 giờ và tiếp đó chất xúc tác được lọc bỏ. Dịch lọc được làm bay hơi trong chân không đến khô để tạo ra hợp chất có công thức (5) 2,82g (6,55mmol, hiệu suất 94,7%) ở dạng rắn màu trắng đục. MS 431(M+1).

Bước E) Hợp chất có công thức (5) (2,80g, 6,51mmol) được hòa tan trong khan axetonitril (15ml). N,N'-đi-Boc-1H-pyrazol-1-carboxamidin [Bis(Boc)PCH] (3,03g, 9,76mmol) được bổ sung vào dung dịch này. Toàn bộ hỗn hợp được khuấy trong khí quyển argon ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 40 giờ. Hỗn hợp phản ứng được làm bay hơi trong chân không đến khô. Cặn được hòa tan trong ethyl axetat (4ml), sau đó

được pha loãng bằng hexan (4ml), đưa lên cột sắc ký cực nhanh, rửa bằng hexan (150ml), tiếp đó bằng dung môi (etyl axetat:hexan theo tỷ lệ 1:1) (150ml), cuối cùng được rửa giải bằng dung môi (etyl axetat:hexan theo tỷ lệ 1:1). Bước làm bay hơi trong chân không đối với các phân đoạn gom được tạo ra sản phẩm Hợp chất có công thức (6), 3,23g (4,8mmol, hiệu suất 73,7%) ở dạng rắn màu trắng. MS 673(M+1).

Bước F) Hợp chất có công thức (6) (2,8715g, 4,273mmol) được hòa tan trong metanol khan (22ml). NaOCH₃ (4,9134mg, 0,2136mmol) được bổ sung vào dung dịch này trong khí quyển argon. Toàn bộ hỗn hợp được khuấy trong khí quyển argon ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 2,5 giờ, sau đó được điều chỉnh đến độ pH=6,5 bằng nhựa Dowex50 x 8(H⁺), mà tiếp đó được lọc ra. Dịch lọc được làm bay hơi trong chân không đến khô để tạo ra hợp chất có công thức (7) 2,2024g (4,0337mmol, hiệu suất 94,4%) ở dạng rắn màu trắng. MS 547(M+1).

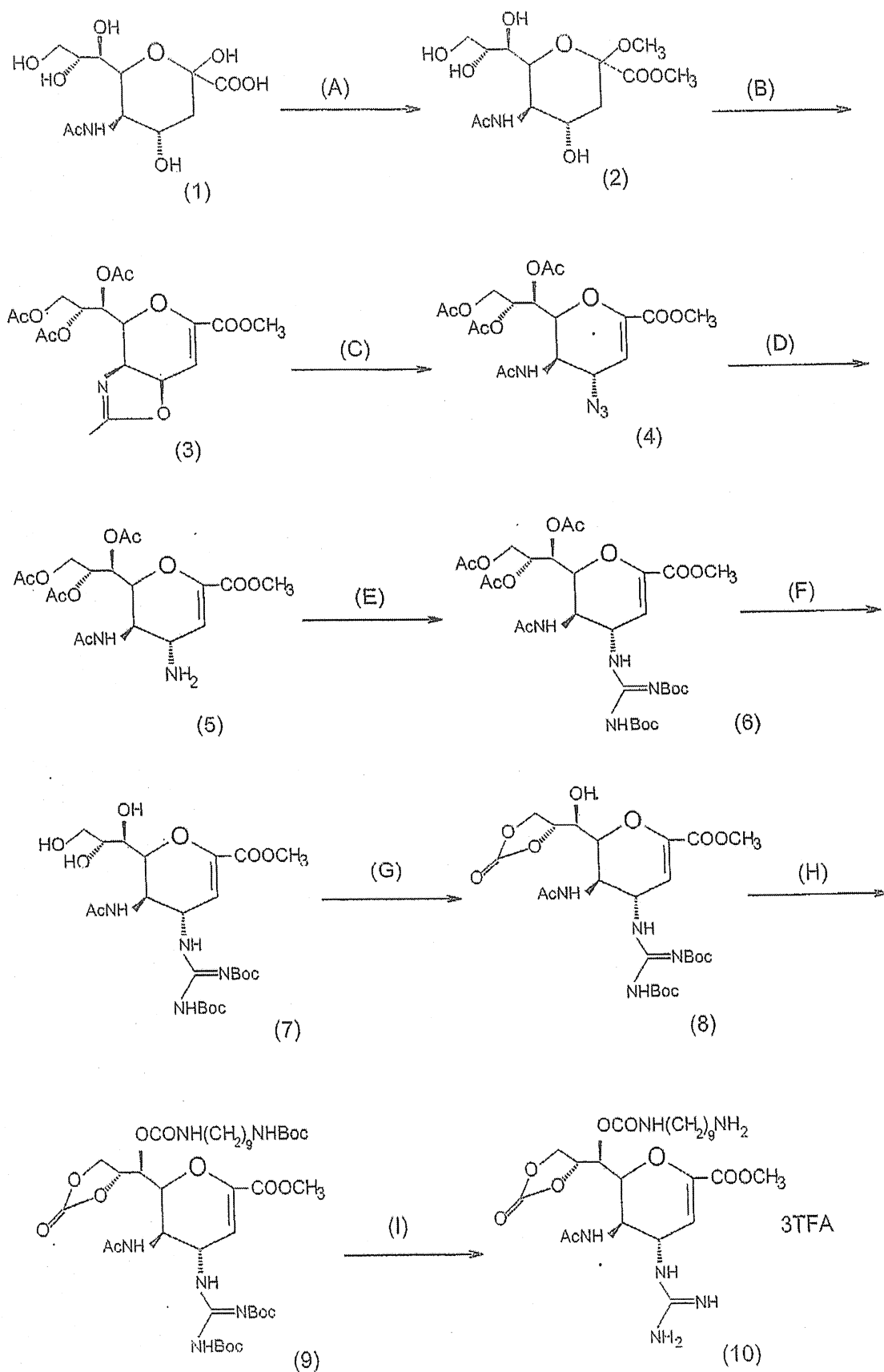
Bước G) Hợp chất có công thức (7) (2g, 3,66mmol) được hòa tan trong khan axetonitril. 1,1'-cacbonyldiimidazol (714mg, 4,403mmol) được bổ sung vào dung dịch này. Toàn bộ hỗn hợp được khuấy trong khí quyển argon ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 20°C đến 30°C trong thời gian 18 giờ. Nó được làm bay hơi trong chân không đến khô, sau đó cần được đưa vào cột cực nhanh sắc ký, trước hết được rửa bằng hexan (150ml), sau đó được hiện hình bằng dung môi (etyl axetat:hexan theo tỷ lệ 2:1). Các phân đoạn có trị số R_f 0,5 (etyl axetat:hexan theo tỷ lệ 2:1) được kết hợp và được làm bay hơi trong chân không đến khô để tạo ra Hợp chất có công thức (8) 1,35g (2,36mmol, hiệu suất 64,5%) ở dạng rắn màu trắng. MS 573(M+1).

Bước H) Hợp chất có công thức (8) (1,3g, 2,27mmol) được hòa tan trong khan pyridin (12,5ml). *p*-nitrophenyl clorofomat (503,3mg, 2,497mmol), 4-đimetylaminopyridin (808,5mg, 6,62mmol) được bổ sung vào dung dịch này. Toàn bộ hỗn hợp được khuấy ở 30°C trong khí quyển argon trong thời gian 7 giờ. Dung dịch chứa *N*-Boc-1,9-diaminononan (690mg, 2,67mmol) và 4-đimetylaminopyridin (166mg, 1,36mmol) trong pyridin khan (4ml) được bổ sung vào hỗn hợp phản ứng này. Hỗn hợp phản ứng này được khuấy trong khí quyển argon ở nhiệt độ 30°C trong thời gian 16 giờ, sau đó được làm bay hơi trong chân không để loại bỏ pyridin. Cần được phân bố giữa etyl axetat (300ml) và nước (50ml) chứa 2,45ml dung dịch HCl 5N, sau đó được rửa bằng nước

(50ml x 2), dung dịch NaHCO_3 2% (50ml x 6), nước (50ml x 2), làm khô trên Na_2SO_4 khan, và lọc. Dịch lọc được làm bay hơi trong chân không đến khô để tạo ra 2,25g chất dạng dầu. Nó được đưa đến bước sắc ký cột cực nhanh (etyl axetat:hexan theo tỷ lệ 1,5:1 làm chất rửa giải). Các phân đoạn (có trị số R_f bằng 0,27 TLC, etyl axetat:hexan theo tỷ lệ 1,5:1 làm dung môi hiện hình) được kết hợp và được làm bay hơi trong chân không đến khô để tạo ra hợp chất có công thức (9) 1,057g (1,234mmol, hiệu suất 54,4%) ở dạng rắn màu trắng. MS 857(M+1), 879(M+Na), $^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6) δ (ppm) 11,42 (1H, s, guanidin NHBoc), 8,25 (1H, d, NH-4), 7,95 (1H, d, AcNH), 7,16 (1H, t, OCONH), 6,75 (1H, t, nonyl NHBoc), 5,80 (1H, s, H-3), 4,92 (2H, m, H-7, H-8), 4,75 (1H, m, H-4), 4,31-4,62 (4H, m, H-5, H-6, H-9, H-9'), 3,74 (3H, s, COOCH_3), 2,90 (4H, m, $\text{NHCH}_2(\text{CH}_2)_7\text{CH}_2\text{NH}$), 1,86 (3H, s, NHCOCH_3), 1,49 (9H, s, Boc), 1,38 (18H, s, Boc), 1,2-1,6 (14H, m, $\text{NHCH}_2(\text{CH}_2)_7\text{CH}_2\text{NH}$).

Bước I) Hợp chất có công thức (9) (1g, 1,168mmol) được hòa tan trong hỗn hợp gồm axit trifloaxetic (TFA) (36ml) và metyl phenyl ete (Anisol) (3,9ml) trong điclorometan (CH_2Cl_2) (36ml). Toàn bộ hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ 25°C trong thời gian 2 giờ và 40 phút, sau đó nó được làm bay hơi trong chân không ở nhiệt độ 35°C trong thời gian 2 giờ. Cặn được khuấy trong hexan (100ml) ở nhiệt độ trong phòng qua đêm, hexan được gạn và hexan mới (60ml) được bổ sung vào, và tiếp tục khuấy trong thời gian 4 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Tiếp đó, hexan được loại bỏ. Cặn được hòa tan trong CH_2Cl_2 (10ml) và làm bay hơi đến khô ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 35°C đến 40°C . Cặn được hòa tan trong nước (25ml). Dung dịch nước được sấy khô ở nhiệt độ thấp để tạo ra hợp chất có công thức (10) 1,026g (1,143mmol, hiệu suất 97,8%) ở dạng bột màu trắng của muối $\text{TFA}_3\text{Zn}'$. MS 557 (M+1) [phân tử lượng của $\text{Zn}' = 556$, $\text{TFA}_3\text{Zn}' = 898$].

Sơ đồ 2: Điều chế hợp chất neo Zn'



Ví dụ 12: Điều chế các hợp chất khung neo $\text{PYR}(\text{Zn}')_2$

Quy trình tổng hợp được thể hiện chi tiết trên Sơ đồ 3 dưới đây. Các số tham chiếu hợp chất dưới đây liên quan đến Sơ đồ 3.

Zn' (10) (224,5mg, 0,25mmol) và diisopropyletylamin (DIPEA) (130,64 μ l, 0,75mmol) được bổ sung vào dung dịch chứa dianhydrit pyromelitic (11) (27,25mg, 0,125mmol) trong DMF khan (2ml) ở nhiệt độ trong phòng. Toàn bộ hỗn hợp phản ứng được để khuấy trong khí quyển argon ở nhiệt độ 25°C trong thời gian 36 giờ, sau đó được xử lý bằng ete: ete dầu mỏ theo tỷ lệ 1:1 (100ml). Chất kết tủa được lọc, rửa bằng ete, và làm khô trong không khí để tạo ra chất rắn màu trắng đục (197mg), mà sau đó được đưa đến bước tách theo phương pháp sắc ký lỏng cao áp và tinh chế.

HPLC phân tích: gradien pepl

Cột: cột C18 Gemini 100A 5 μ m 150 x 3,00mm. Bước sóng: 220/280nm. Lưu tốc: 0,7ml/phút. Dung môi A = 0,1% axit trifloaxetic. Dung môi B = 100% Axetonitril. Nhiệt độ: 30°C. Gradien: 0% đến 50% B, 15 phút. Thời gian lưu: PK1PYR(Zn')₂ (12) tại thời điểm 14,35 phút, PK2PYR(Zn')₂ (13) tại thời điểm 14,53 phút.

HPLC điều chế:

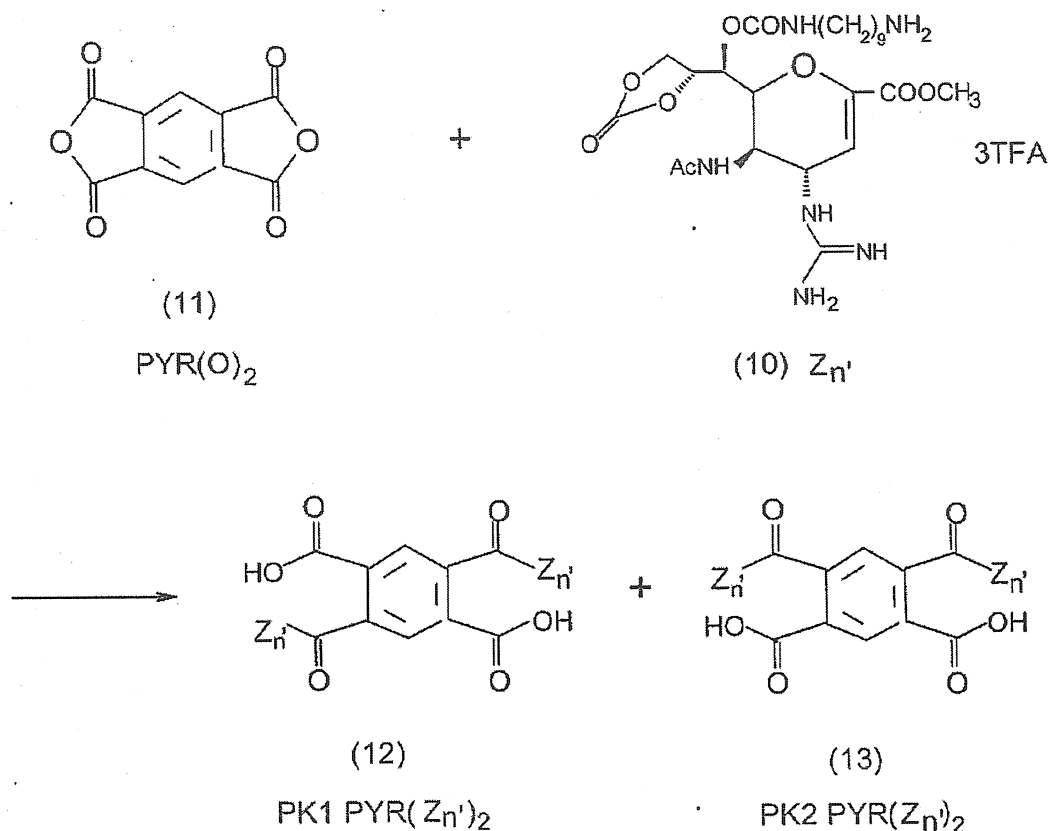
Cột: cột MS prep C18 Water Xterra 19 x 50mm, 5 μ m. Bước sóng: 220/280nm. Lưu tốc: 8ml/phút. Dung môi A = 0,1% axit trifloaxetic. Dung môi B = 100% Axetonitril. Nhiệt độ: 30°C. Gradien: 10% đến 100% B, 80 phút. Các phân đoạn tinh khiết chứa PK1PYR(Zn')₂ và PK2PYR(Zn')₂ (13) được gom và sấy khô ở nhiệt độ thấp riêng rẽ để lần lượt tạo ra PK1PYR(Zn')₂ (12) 49mg, và PK2PYR(Zn')₂ (13) 42mg.

PK1PYR(Zn')₂ (12) MS biểu thị ESI +ve 10V 1331,5 ion. ¹H-NMR (D₂O) δ (ppm): 8,00 (2H, s, para thơm H x 2), 6,00 (2H, d, H-3 x 2), 5,20-5,50 (4H, m, H-7 x 2, H-8 x 2), 4,35-4,90 (8H, m, H-4 x 2, H-5 x 2, H-6 x 2, H-9 x 2), 4,15 (2H, dd, H-9' x 2), 3,80 (6H, s, COOCH₃ x 2), 3,25-3,45 (4H, m, OCONHCH₂ x 2), 2,90-3,20 (4H, m, NHCH₂ x 2), 1,95 (6H, s, CH₃CO x 2), 1,20-1,70 (28H, m, (CH₂)₇ x 2).

PK2PYR(Zn')₂(13) MS biểu thị ESI +ve 10V 1331,5 ion. ¹H-NMR (D₂O) δ (ppm) 8,35 (1H, s, thơm H x 1), 7,50 (1H, s, thơm H x 1), 6,00 (2H, d, H-3 x 2), 5,20-

5,50 (4H, m, H-7 x 2, H-8 x 2), 4,35-4,90 (8H, m, H-4 x 2, H-5 x 2, H-6 x 2, H-9 x 2), 4,15 (2H, dd, H-9' x 2), 3,80 (6H, s, COOCH₃ x 2), 3,25-3,45 (4H, m, OCONHCH₂ x 2), 2,90-3,20 (4H, m, NHCH₂ x 2), 1,95 (6H, CH₃CO x 2), 1,20-1,70 (28H, m, (CH₂)₇ x 2).

Sơ đồ 3: Điều chế các hợp chất khung neo PYR(Z_{n'})₂



Ví dụ 13: Điều chế nhóm axit/anion D-Asp(NHCH₂SO₃H)₂

Quy trình tổng hợp được thể hiện chi tiết trên Sơ đồ 4 dưới đây. Các số tham chiếu hợp chất dưới đây liên quan đến Sơ đồ 4.

Axit Boc-D-aspartic (14) (233mg, 1mmol) và HBTU [O-(benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-bis(tetrametylen)uroni hexaflophosphat] (758mg, 2mmol) được hòa tan trong DMF (10ml). DIPEA (diisopropyletylamin) (349μl, 2mmol) được bổ sung vào dung dịch này. Dung dịch này được khuấy ở nhiệt độ phòng trong thời gian 10 phút, sau đó kết hợp với dung dịch chứa natri aminomêtansulfonat (332mg, 2,5mmol) trong DMF (3ml). Dung dịch thu được được để khuấy ở nhiệt độ phòng qua đêm.

Hỗn hợp phản ứng được làm bay hơi trong chân không để tạo ra chất rắn màu cam nhạt. Nó được hòa tan trong nước (20ml), rửa bằng etyl axetat (20ml x 3), pha nước được làm bay hơi trong chân không để loại bỏ dung môi hữu cơ, sau đó được sấy khô ở nhiệt độ thấp để tạo ra sản phẩm thô (15) 310mg ở dạng rắn màu trắng mà được đưa đến bước tách theo phương pháp sắc ký lỏng cao áp và tinh chế.

HPLC phân tích: gradien pep1

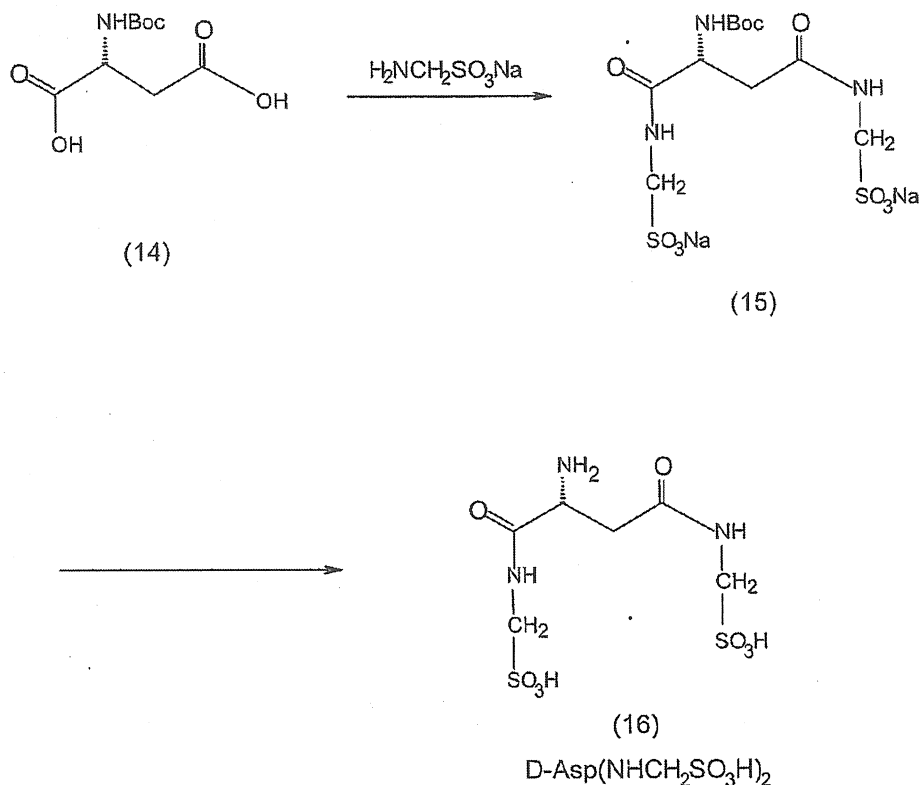
Cột: cột Gemini C18 100A 5 μ m 150 x 30 phút. Bước sóng: 220nm. Lưu tốc: 0,7ml/phút. Dung môi A = 0,1% axit trifloaxetic. Dung môi B = 100% Axetonitril. Nhiệt độ: 30°C. Gradien: 0% đến 50% B, 15 phút. Thời gian lưu: Hợp chất có công thức (15) ở dạng axit tự do tại thời điểm 4,669 phút MS ESI -ve 418(M-1), dung môi pic tại thời điểm 1,658 phút, axit aminometansulfonic tại thời điểm 2,722 phút, chất HBTU tại thời điểm 5,520 phút, mono Boc-D-Asp-NHCH₂SO₃H tại thời điểm 5,802 phút.

HPLC điều chế

Cột: cột Germini AXIA C18, 5 μ m 50 x 21,2mm, bước sóng: 220 phút. Lưu tốc: 8ml/phút; Dung môi A = 0,1% axit trifloaxetic; Dung môi B = 100% Axetonitril; Nhiệt độ: 30°C. Gradien : 0% đến 100% B, 100 phút.

Phân đoạn chứa hợp chất có công thức (15) được gom và gộp vốn lại, sau đó được sấy khô ở nhiệt độ thấp để tạo ra sản phẩm tinh khiết (15) ở dạng axit tự do. MS ESI -ve 418(M-1). Hợp chất có công thức (15) ở dạng axit tự do (200mg, 0,477mmol) được hòa tan trong axit trifloaxetic (10ml) chứa Anisol (1ml). Dung dịch này được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian một giờ, sau đó được làm bay hơi trong chân không đến khô. Cặn được nghiền trong ete (20ml x 2), lọc bỏ. Chất rắn được làm khô trong không khí, sau đó hoà tan lại trong nước, sấy khô ở nhiệt độ thấp để tạo ra sản phẩm (16) 106mg chất rắn màu trắng. MS ESI -ve 318(M-1). Sản phẩm được hòa tan trong nước (10ml), sau đó được trung hòa bằng hai đương lượng natri hydroxit, sấy khô ở nhiệt độ thấp để tạo ra đinatri muối của hợp chất có công thức (16) ở dạng rắn màu trắng.

Sơ đồ 4: Điều chế nhóm axit/anion D-Asp(NHCH₂SO₃H)₂



Ví dụ 14: Điều chế hợp chất MD185, $\text{PK2PYR}(\text{Zn})_2[(\text{D-Asp})(\text{NHCH}_2\text{SO}_3)_2]_2$

Quy trình tổng hợp được thể hiện chi tiết trên Sơ đồ 5 dưới đây. Các số tham chiếu hợp chất dưới đây liên quan đến Sơ đồ 5.

HATU [O-(7-Aza benzotriazol-1-yl)- N,N,N',N' -bis(tetrametylen)uroni hexaflophosphat] (17,14mg, 45,11 μmol) và DIPEA (7,9 μl , 45,31 μmol) được bổ sung vào dung dịch chứa $\text{PK2PYR}(\text{Zn})_2$ (13) (30mg, 22,56 μmol) trong DMF khô (5ml). Dung dịch thu được được khuấy ở nhiệt độ phòng trong thời gian 10 phút, sau đó muối dinatri của hợp chất có công thức (16) [$\text{D-Asp}(\text{NHCH}_2\text{SO}_3\text{Na})_2$] (33mg, 91,16 μmol) trong DMF (5ml) được bổ sung vào. Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ phòng trong thời gian 18 giờ, sau đó nó được đưa đến bước tách theo phương pháp sắc ký lỏng cao áp và tinh chế.

HPLC phân tích: gradien pep 1

Cột: cột Gemini C18 100A 5 μm 150 x 3,00mm; bước sóng: 220/280nm; Lưu tốc: 0,7ml/phút; Dung môi A = 0,1% axit trifloaxetic; Dung môi B = 100% Axetonitril; Nhiệt độ: 30°C; Gradien: 0% đến 50% B, 15phút; Thời gian lưu: sản phẩm (17) ở dạng axit tự

do tại thời điểm 14,270 phút. MS ESI +ve +30V 967,5, MS ESI -ve, -25v 965,4. Các pic khác là như sau: Nguyên liệu ban đầu PK2PYR(Z_n) (13) tại thời điểm 11,7 phút, PK2PYR(Z_n)₂-D-Asp(NHCH₂SO₃H)₂ tại thời điểm 13,6 phút.

HPLC điều chế

Cột: cột Water Xterra điều chế MS C18 19 x 50mm 5 μ m; bước sóng: 220/280nm; Lưu tốc: 8ml/phút; Dung môi A = 0,1% axit trifloaxetic; Dung môi B = 100% Axetonitril; Nhiệt độ: 30°C; Gradient: 0% đến 100% B 100 phút

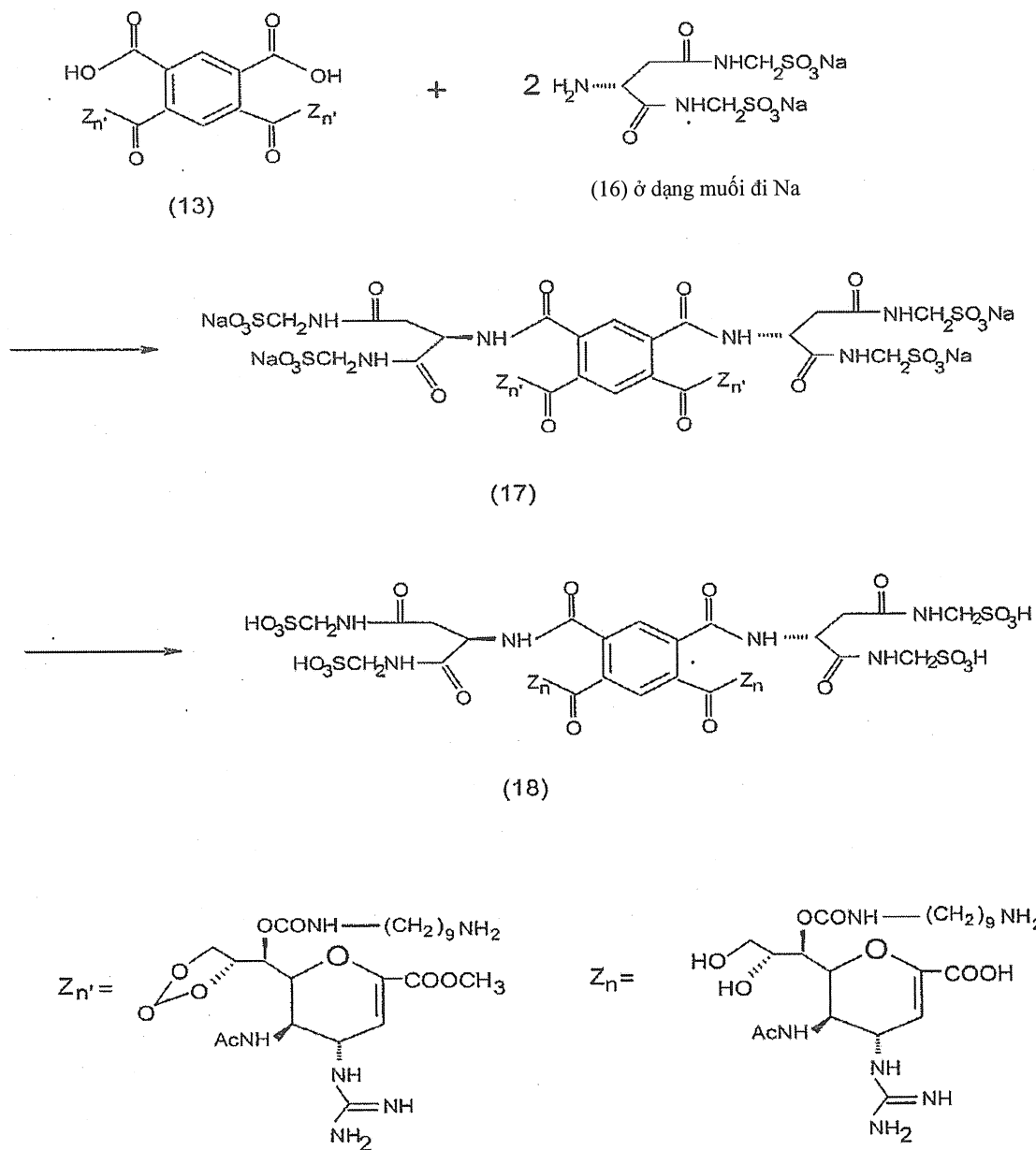
Sản phẩm rửa giải ra theo biên dạng ngược với Gemini phân tích. Biên dạng rửa giải giữa 25% và 35% axetonitril. Các phân đoạn được lấy mẫu và các ống nghiệm với độ tinh khiết cao hơn 90% được gom và nguyên liệu khác được tách trên cột Gemini AXIA.

Sản phẩm có công thức (17) được sấy khô ở nhiệt độ thấp để tạo ra bột trắng mịn. MS ESI -ve -25v 965,4, biểu thị phân tử lượng bằng 1932. Hợp chất có công thức (17) PK2 PYR(Z_n)₂[D-Asp(NHCH₂SO₃H)₂]₂ (8mg, 4,14 μ mol) được hòa tan trong dung dịch nước.metanol 50% (2ml), sau đó triethylamin (40 μ l, 287,5 μ mol) được bổ sung vào. Dung dịch thu được được khuấy ở nhiệt độ trong phòng. Phản ứng được theo dõi theo phương pháp phân tích sắc ký lỏng cao áp đối với pic tại thời điểm 10,848 phút. Sau thời gian 2 giờ, hỗn hợp phản ứng này được axit hóa bằng axit axetic (60 μ l, 1049 μ mol) và được pha loãng đến 10ml bằng nước. Dung dịch này được tinh chế trên cột Kinetex. Các phân đoạn tinh khiết được kết hợp và sấy khô ở nhiệt độ thấp để tạo ra 6mg sản phẩm (18) PK2 PYR(Z_n)₂[D-Asp(NHCH₂SO₃H)₂]₂ ở dạng bột màu trắng.

HPLC thời gian lưu 10,695 phút. MS ESI -ve -30V 925,6.

Để loại bỏ cặn TFA trong hợp chất, nguyên liệu tinh khiết được hòa tan trong 60ml HCl 4mM và sấy khô ở nhiệt độ thấp, sau đó được hòa tan trong 60ml HCl 1mM và sấy khô ở nhiệt độ thấp, cuối cùng được sấy khô ở nhiệt độ thấp ra khỏi 60ml nước. Hiệu suất 5,6mg hợp chất có công thức (18) MD185 MW1852.

Sơ đồ 5: Điều chế hợp chất MD185, PK2PYR(Z_n)₂[(D-Asp)(NHCH₂SO₃)₂]₂



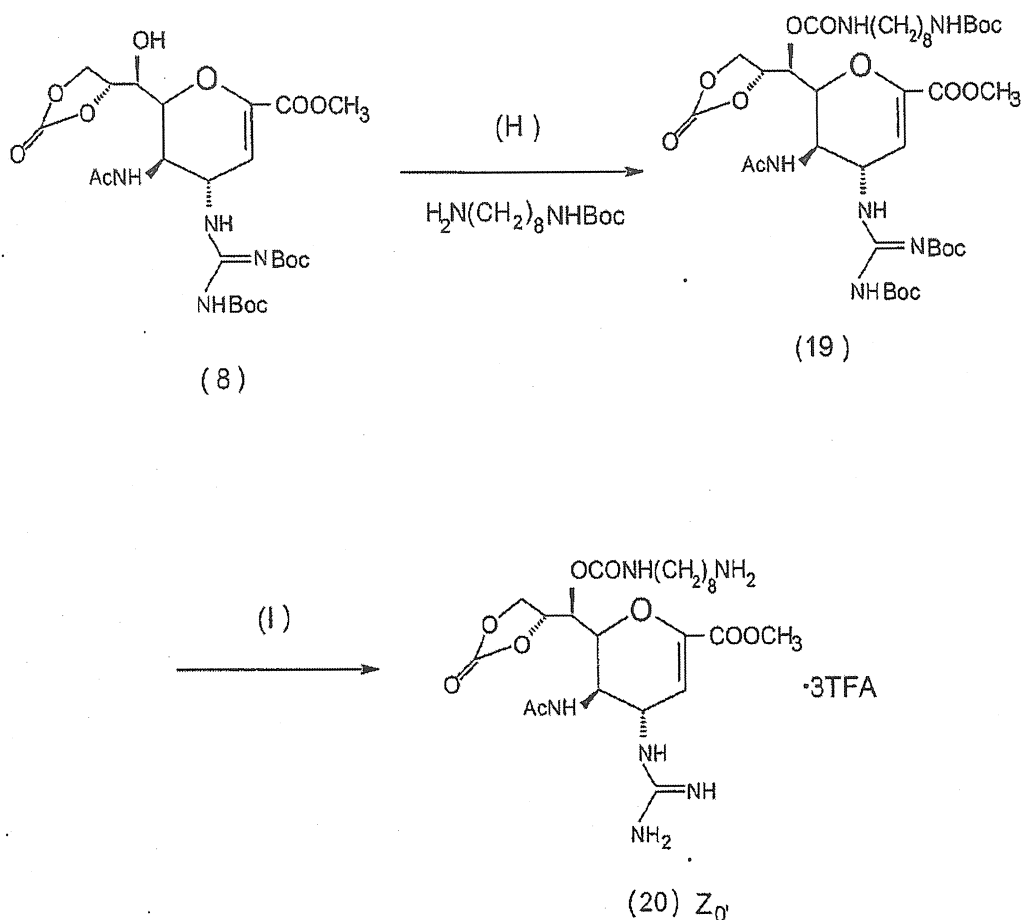
Ví dụ 15: Điều chế các hợp chất neo Z₀

Quy trình tổng hợp được thể hiện chi tiết trên Sơ đồ 6 dưới đây. Các chỉ số tham chiếu hợp chất và các tham chiếu bước tổng hợp liên quan đến Sơ đồ 6.

Theo quy trình (H) và (I) đã được bộc lộ trong Ví dụ 11, phản ứng của hợp chất có công thức (8) với p-nitrophenyl clorofomat, tiếp đó là N-Boc-1,8-điaminooctan, sau khi sắc ký, tạo ra hợp chất có công thức (19) ở dạng rắn màu trắng. MS 843 (M+1) Hợp chất có công thức (19) được xử lý bằng axit trifloaxetic (TFA), sau khi xử lý để tạo ra hợp chất (20) Z₀ ở dạng bột màu trắng của muối TFA₃Z₀ MS 543 (M+1) [phân tử lượng

của $Z_0' = 542$, $TFA_3Z_0' = 884$].

Sơ đồ 6: Điều chế các hợp chất neo Z_0'



Ví dụ 16: Điều chế các hợp chất khung neo PK1 TCA(Z_0')₂ và PK2 TCA(Z_0')₂

Quy trình tổng hợp được thể hiện chi tiết trên Sơ đồ 7 dưới đây. Các số tham chiếu hợp chất dưới đây liên quan đến Sơ đồ 7.

HATU (13,32mg, 35,03 μ mol) và DIPEA (6,5 μ l, 37,32 μ mol) được bổ sung vào dung dịch chứa TCA (21) (3,085mg, 17,52 μ mol) trong DMF (309 μ l). Toàn bộ hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 10 phút, sau đó được bổ sung nhỏ giọt dung dịch chứa Z_0' , hợp chất có công thức (20) (30,97mg, 35,03 μ mol) và DIPEA (18,44 μ l, 105,9 μ mol) trong DMF (600 μ l). Hỗn hợp phản ứng này được để khuấy qua đêm ở nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp thu được được đưa đến bước tách theo phương pháp sắc ký lỏng cao áp và tinh chế.

HPLC phân tích : pepl gradien

Cột: Phenomenex C18 5 μ l 110A 150 x 3mm bước sóng: 220/280nm; Lưu tốc: 0,7ml/phút; Dung môi A = 0,1% axit trifloaxetic; Dung môi B = 100% Axetonitril; Nhiệt độ: 30°C; Gradient: 100% đến 50% B 15 phút Thời gian.lưu: PK1 TCA(Zo')₂ (22) 11,100 phút và PK2 TCA(Zo')₂ (23) 11,156 phút.

PK1 TCA(Zo')₂ (22) ¹H-NMR (D₂O) δ ppm ở 2,5ppm (AB đối xứng dd, 4H, C_aH₂=C_bH₂) biểu thị cấu trúc đối xứng của nó. MS 1225,4 (phân tử lượng 1224).

PK2 TCA(Zo')₂ (23) ¹H-NMR (D₂O) δ ppm ở 2,35ppm đến 2,75ppm (không đối xứng, dd, 4H, (C_aH₂≠C_bH₂)) biểu thị cấu trúc bất đối xứng của nó. MS 1225,4 (phân tử lượng 1224).

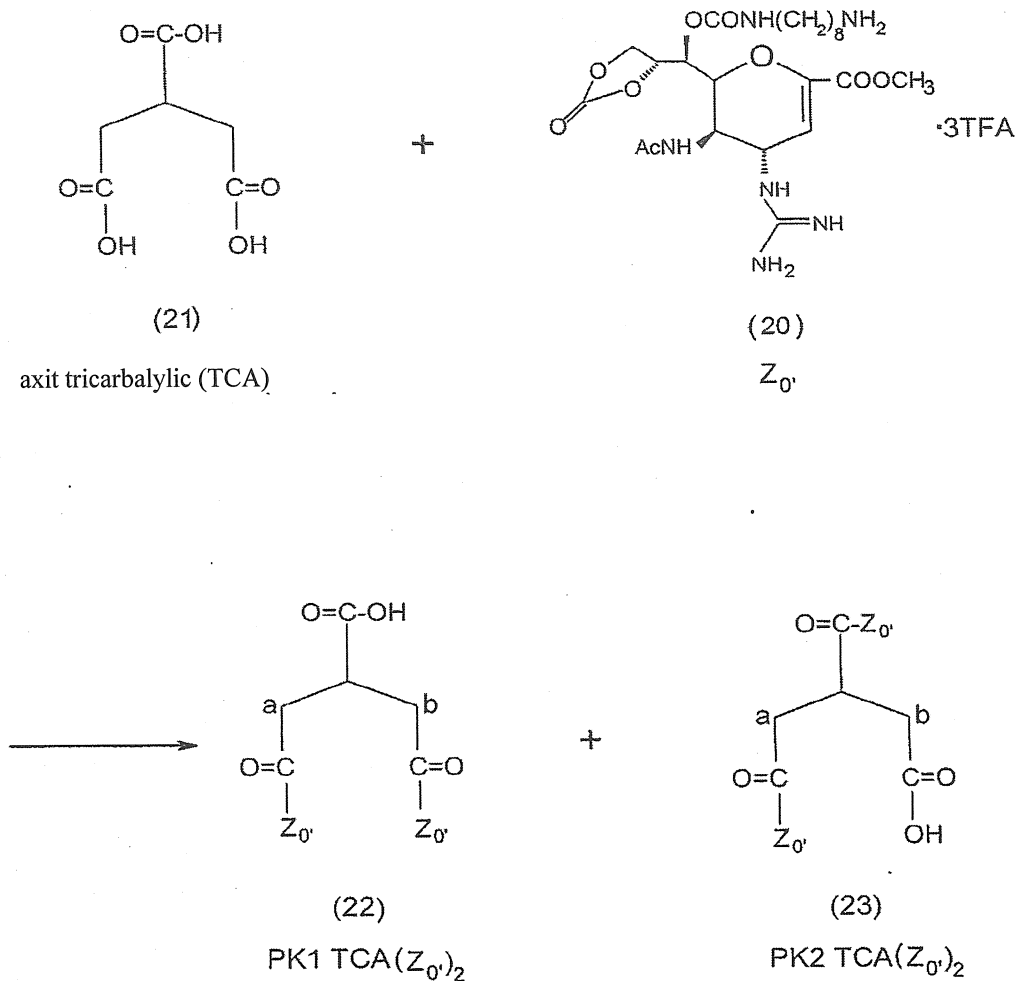
Sắc ký lỏng cao áp điều chế

Dung dịch này được axit hóa bằng lượng nhỏ axit axetic 1M và được pha loãng đến 25ml trong nước. Nó được lọc qua bộ lọc phun cỡ 0,45 μ m và được bơm vào cột Water Xterra điều chế MS C18 19 x 50mm ở nồng độ 20% đến 80% dung dịch đậm A. Lưu tốc 8ml/phút gradient 0% đến 100% B 100 phút, bước sóng 210/280nm. Biên dạng rửa giải trông DMF/DIPEA/HATU

PK1 TCA(Zo')₂ và PK2 TCA(Zo')₂ được tinh chế tiếp và tách trên cột Phenomenex Gemini 5 μ m C18 110A Axia 50 x 21,2mm trong dung dịch đậm TFA 0,1%.

Tỷ lệ PK1/PK2 là khoảng 1:2, cả hai MS ESI +30V 1225,4.

Sơ đồ 7: Điều chế các hợp chất khung neo PK1 TCA(Zo')₂ và PK2 TCA(Zo')₂



Ví dụ 17: Điều chế nhóm axit/anion [D-Cya-SO₃H]₇OH

Quy trình tổng hợp được thể hiện chi tiết trên Sơ đồ 8 dưới đây. Các số tham chiếu hợp chất dưới đây liên quan đến Sơ đồ 8.

Như được thể hiện chi tiết trên Sơ đồ 8, quy trình tổng hợp pha rắn được áp dụng để điều chế [D-Cys-SH]₇-OH (33), sau đó oxy hóa polyxystein (33) tạo ra [D-CyaSO₃H]₇-OH (34).

Fmoc-D-Cys(Trt)-OH (24) (2,93g, 5mmol) được hòa tan trong diclometan khan (DCM) (35ml) trong ống nghiệm Falcon loại dung tích 50ml, sau đó nhựa 2-clotrityl clorua (25) (5g) được bổ sung vào, lắc mạnh, diisopropyletylamin (DIPEA) (3,5ml, 20mmol) được bổ sung vào. Sau thời gian 5 phút, phần khác DIPEA (1,3ml, 7,5mmol) được bổ sung vào. Toàn bộ hỗn hợp được lắc trong thời gian 4 giờ nữa. Để nút 2-clotrityl clorua có hoạt tính phản ứng bất kỳ còn lại, metanol được bổ sung (4ml). Hỗn

hợp này được lắc trong thời gian 30 phút nữa. Nhựa được rửa lần lượt bằng DMF (20ml x 3), DCM (20ml x 3), metanol (20ml x 3), sau đó được sấy khô trong chân không qua đêm. Hiệu suất biểu thị lượng 0,57mM/g hợp chất có công thức (26).

Để loại bỏ nhóm Fmoc khỏi nhựa, nhựa (26) được làm trương sơ bộ trong DCM (35ml), sau đó được bổ sung 50% piperidin trong DMF (30ml). Toàn bộ hỗn hợp được đặt trên thiết bị quay trong thời gian 30 phút. Bước này được lặp lại với dung dịch mới chứa 50% piperidin trong DMF (30ml) trong thời gian 60 phút. Tiếp đó, nhựa được rửa bằng DMF (20ml x 2), DCM (20ml x 2), DMF (20ml x 3). Thử nghiệm ninhydrin dương tính được thể hiện. Nhựa (27) đã sẵn sàng để liên hợp.

HBTU [O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-bis(tetrametylen)uroni hexaflorophosphat] (1140mg, 3mmol) và DIPEA (523 μ l, 3mmol) được bổ sung vào dung dịch chứa Fmoc-D-Cys(Trt)-OH (24) (1758mg, 3mmol) trong DMF (6ml). Hỗn hợp này được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 10 phút, sau đó nhựa (27) (2,5g, 0,57mM/g, 1,5mmol) được bổ sung vào. Hỗn hợp phản ứng được để khuấy trong thời gian 24 giờ. Thử nghiệm ninhydrin âm tính, nhựa được rửa bằng DMF (20ml x 3), sau đó được xử lý bằng axetic anhydrit 5%, DIPEA 1% trong DMF (20ml) trong thời gian 30 phút. Tiếp đó, nhựa (28) được rửa bằng DMF (20ml x 3), DCM (20ml x 3), metanol (20ml x 3). Nhựa (28) được làm trương sơ bộ trong DCM, và bổ sung piperidin/N-methylpyrrolidon 30% trong DMF (20ml) vào. Toàn bộ hỗn hợp được đặt trên thiết bị khuấy trong thời gian 30 phút, sau đó bằng dung dịch mới chứa 30% piperidin và N-methylpyrrolidon trong thời gian 60 phút nữa, sau khi rửa bằng DMF (20ml x 2), DCM (20ml x 2), DMF (20ml x 2) để tạo ra nhựa (29).

Nhựa (29) được liên hợp tiếp trong thời gian 24 giờ với hợp chất có công thức (24) (1758mg, 3mmol) trong DMF (6ml) đã được hoạt hóa sơ bộ trong thời gian 10 phút bằng HBTU (1140mg, 3mmol) và DIPEA (523 μ l, 3mmol), sau khi xử lý để tạo ra nhựa (30). Tiếp đó, một nửa của nó được xử lý theo quy trình: được khử bảo vệ bằng piperidin/methylpyrrolidon, ngẫu hợp lại với hợp chất có công thức (24) đã được hoạt hóa sơ bộ bằng HBTU/DIPEA, to repeat quy trình này trong 4 lần để tạo ra nhựa (31).

Nhựa (31) được rửa bằng DCM (20ml x 5), sau đó được đặt trong ống nghiệm Falcon loại 50ml, được bổ sung 40% axit axetic trong DCM (35ml), trên thiết bị khuấy

ở nhiệt độ trong phòng được lắc trong thời gian 6 giờ. Huyền phù nhựa được lọc, dịch lọc được làm bay hơi trong chân không thành bột màu vàng nhạt. Cặn được rửa bằng nước (100ml x 3), sau khi được sấy khô để tạo ra chất rắn màu trắng (32) [D-Cys(Trt)]₇-OH.

Hợp chất có công thức (32) được khuấy trong dung dịch chứa TFA (20ml), Triisopropylsilan (1ml) và nước (0,5ml) trong thời gian 3 giờ. Huyền phù thu được được lọc. Dịch lọc được làm bay hơi thành chất dạng dầu mà sau đó được nghiền cùng với ete (20ml x 4) để tạo ra chất rắn màu trắng. Nó được khuấy trong dung dịch nước axetonitril 50% (100ml). Nguyên liệu này được xử lý bằng năng lượng âm thanh để tạo ra huyền phù trắng, mà được sấy khô ở nhiệt độ thấp để tạo ra sản phẩm thô có công thức (33) [D-Cys-SH]₇-OH (380mg).

HPLC phân tích

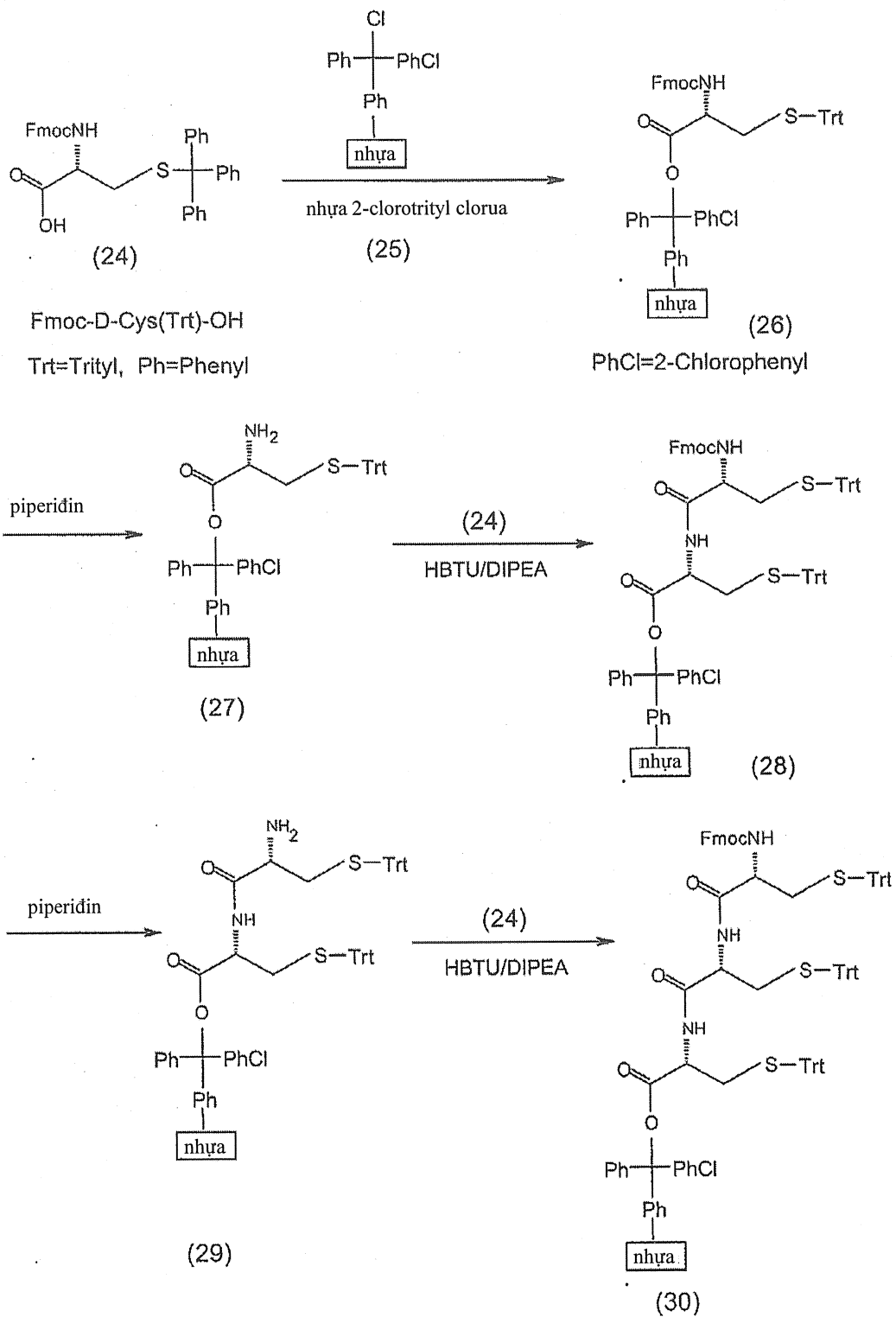
Cột: Phenomenex Gemini 5μm C18 110A 150 x 3,00mm Dung môi A= 0,1% axit trifloaxetic, Dung môi B= 100% Axetonitril, Lưu tốc: 0,7ml/phút, bước sóng: 210/280nm, Nhiệt độ: 30°C, Gradien: 0% đến 50% B 15 phút, Thời gian lưu: 9,356 phút.

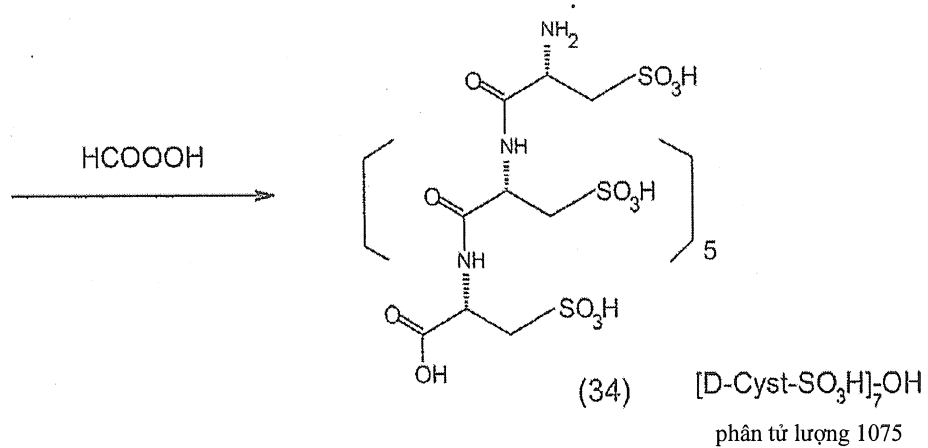
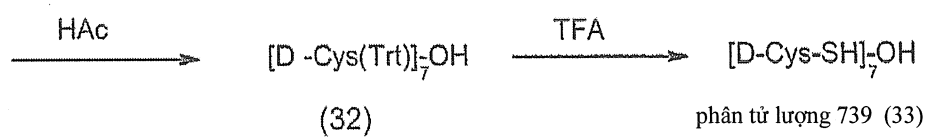
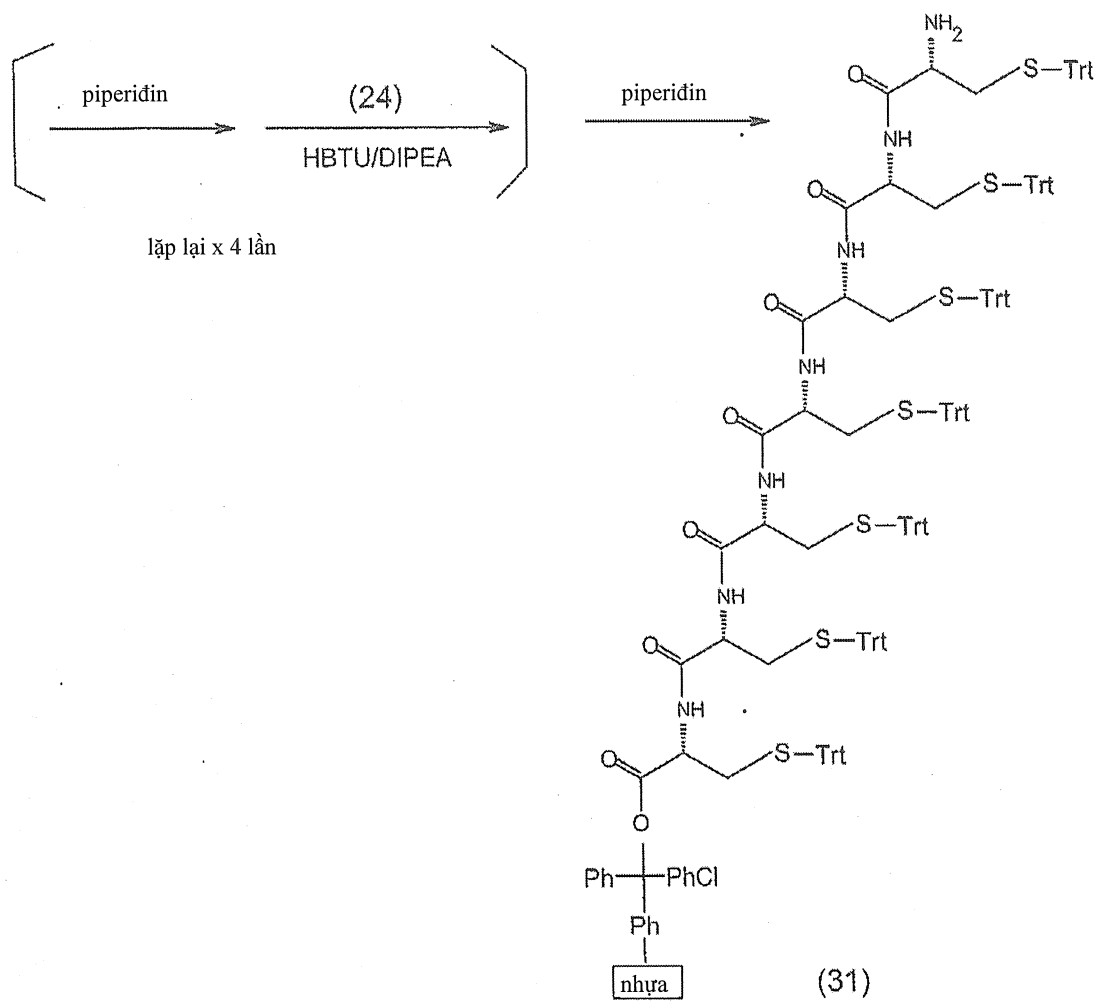
MS Cone +25V pic chính 740 Cone -25V pic chính 738 biểu thị phân tử lượng của hợp chất có công thức (33) là 739 [D-Cys-SH]₇-OH

Hợp chất có công thức (33) (10mg, 13,53μmol) được bổ sung vào dung dịch axit performic (1ml) đã được ướp lạnh sơ bộ trong bể nước đá-muối. Toàn bộ hỗn hợp được khuấy trong bể nước đá trong thời gian 1 giờ, sau đó được pha loãng bằng 100ml nước lạnh, sấy khô ở nhiệt độ thấp để tạo ra dạng màu vàng nhạt có công thức (34). Nguyên liệu này được tinh chế trên cột Phenomenex Kinetex 5μm XB-C18 100A bằng cách sử dụng đẳng dung môi 0,1% TFA làm chất rửa giải để tạo ra hợp chất có công thức (34) [D-Cyst-SO₃H]₇-OH phân tử lượng 1075, MS Cone +50V 1076 (M+1) ở dạng bột không màu.

Axit performic được điều chế bằng cách trộn axit formic (8,74ml), nước (0,96ml) và 30% hydro peroxit (1ml), và để yên hỗn hợp này ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 30 phút trong bình có chặn. Peroxit nên được làm mới trước khi dùng.

Sơ đồ 8: Điều chế nhóm axit/anion [D-Cyst-SO₃H]₇OH





Ví dụ 18: Điều chế hợp chất MD345, PK2 TCA(ZO')₂-[D-Cyst-SO₃H]₇-OH

Quy trình tổng hợp được thể hiện chi tiết trên Sơ đồ 9 dưới đây. Các số tham chiếu hợp chất dưới đây liên quan đến Sơ đồ 9.

HATU (1,242mg, 3,268 μ mol) và DIPEA 2% trong DMF (30 μ l, 3,44 μ mol) được bổ sung vào dung dịch chứa PK2 TCA(ZO')₂ (23) (4mg, 3,268 μ mol) trong DMF khan (2ml). Hỗn hợp này được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 10 phút, sau đó kết hợp với dung dịch chứa hợp chất có công thức (34), [D-Cyst-SO₃H]₇-OH (7,03mg, 6,54 μ mol) và DIPEA (9,11 μ l, 52,32 μ mol), trong DMF (3ml). Toàn bộ hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ trong phòng qua đêm. Hỗn hợp này được pha loãng đến 15ml bằng nước/metanol 1/1, sau đó được đưa đến bước tách theo phương pháp sắc ký lỏng cao áp và tinh chế.

HPLC điều chế:

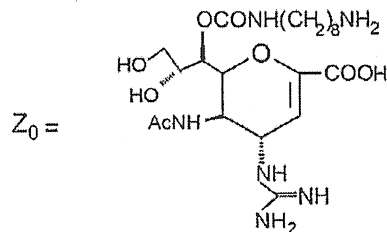
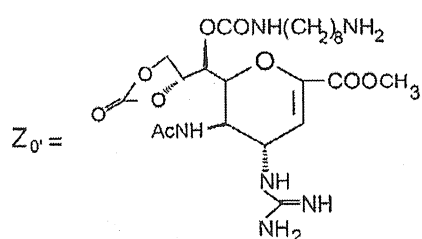
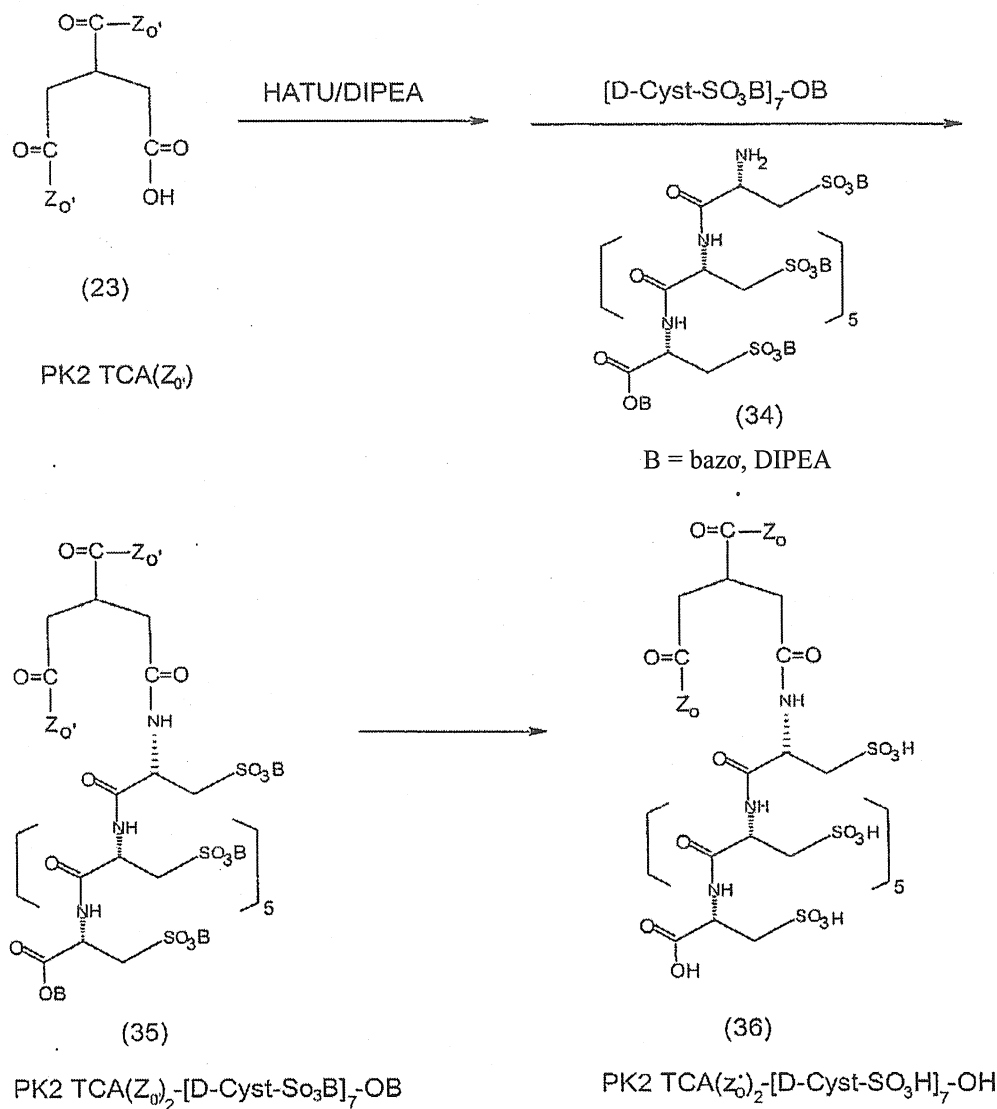
Cột: Phenomenex Kinetex 5 μ m XB-C18 50 x 21,2mm; bước sóng: 220/280nm; Lưu tốc: 8ml/phút; Dung môi A = 0,1% axit trifloaxetic (TFA); Dung môi B = 100% Axetonitril; Nhiệt độ: 30°C; Gradient: 0% đến 100% B, 80 phút. Các phân đoạn chứa hợp chất có công thức (35) axit tự do (B=H) được kết hợp và sấy khô ở nhiệt độ thấp để tạo ra hợp chất có công thức (35) axit tự do (B=H) 4mg ở dạng bột màu trắng. MS ESI +ve Cone 35V 1142,1 2 + ion.

Hợp chất có công thức (35) axit tự do (B=H), PK2 TCA(ZO')₂-[D-Cyst-SO₃H]₇-OH (4mg, 1,754 μ moles) được hòa tan trong dung dịch nước metanol 50% (800 μ l) chứa triethylamin (TEA) (20 μ l, 146 μ mol). Hỗn hợp này được khuấy ở nhiệt độ trong phòng, được theo dõi theo phương pháp sắc ký lỏng cao áp (HPLC). Nó được xử lý sau thời gian 3 giờ. Dung dịch này được tinh chế trên cột Kinetex. Các phân đoạn tinh khiết tại thời gian lưu 11,254 phút được kết hợp và sấy khô ở nhiệt độ thấp để tạo ra hợp chất có công thức (36) 2mg ở dạng bột màu trắng. MS ESI +ve Cone 40V 1102,2 2 + ion.

Để loại bỏ cặn TFA trong hợp chất này, hợp chất có công thức (36) được hòa tan trong dung dịch HCl 4mM (30ml) và sấy khô ở nhiệt độ thấp. Sau đó, nó được hòa tan trong dung dịch HCl 1mM (30ml) và sấy khô ở nhiệt độ thấp. Cuối cùng, nó được sấy

khô ở nhiệt độ thấp ra khỏi nước (30ml) để tạo ra sản phẩm có công thức (36) 1,1mg, MD345 PK2 TCA(Z₀)₂[D-Cyst-SO₃H]₇-OH phân tử lượng 2201 [MS 2202 (M+1)].

Sơ đồ 9: Điều chế hợp chất MD345, PK2 TCA(Z₀)₂-[D-Cyst-SO₃H]₇-OH phân tử lượng 2201

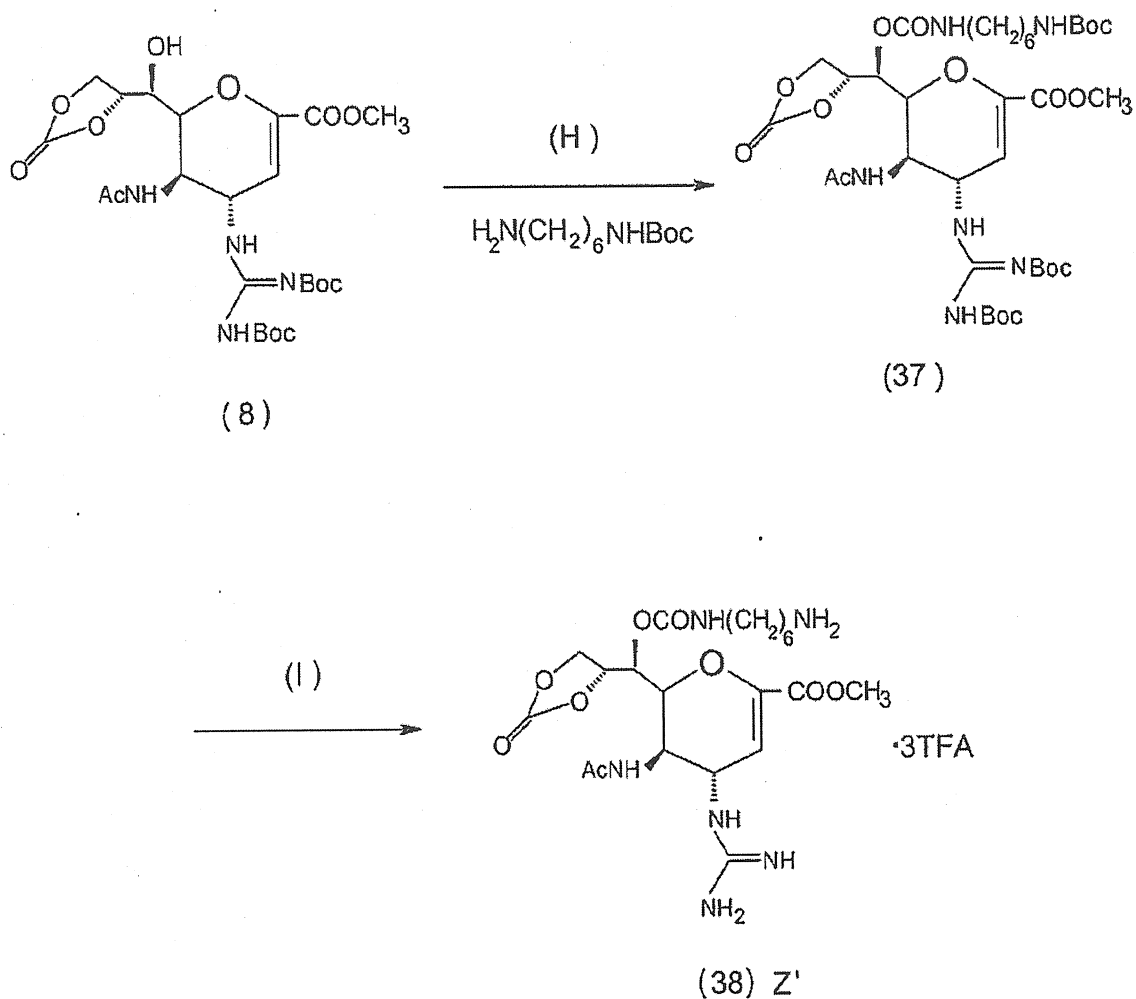


Ví dụ 19: Điều chế hợp chất neo Z'

Quy trình tổng hợp được thể hiện chi tiết trên Sơ đồ 10 dưới đây. Chỉ số tham chiếu hợp chất và tham chiếu bước tổng hợp dưới đây liên quan đến Sơ đồ 10.

Theo quy trình (H) và (I) được bộc lộ trong Ví dụ 11, phản ứng của hợp chất có công thức (8) với p-nitrophenyl clorofomat, tiếp đó là N-Boc-1,6-điaminohexan, sau khi sắc ký, để tạo ra hợp chất có công thức (37) ở dạng rắn màu trắng, MS 815 (M+1). Hợp chất có công thức (37) được xử lý bằng axit trifloaxetic (TFA) và anisol, sau khi xử lý để tạo ra hợp chất có công thức (38) Z' ở dạng trắng của muối TFA. MS 515 (M+1). [phân tử lượng của Z' = 514, TFA₃Z' = 856].

Sơ đồ 10: Điều chế hợp chất neo Z'



Ví dụ 20: Điều chế hợp chất khung neo CHTCA(Z')₂

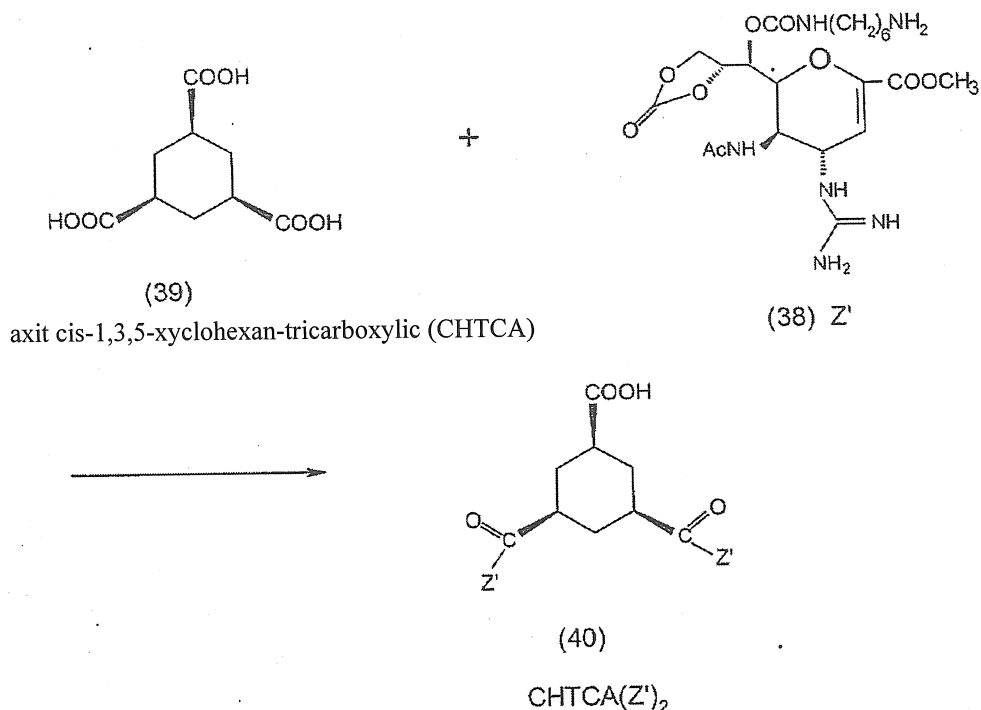
Quy trình tổng hợp được thể hiện chi tiết trên Sơ đồ 11 dưới đây. Các chỉ số tham chiếu hợp chất dưới đây liên quan đến Sơ đồ 11.

HATU (15,2mg, 40 μ mol) và DIPEA (7,4 μ l, 42,4 μ mol) được bổ sung vào dung dịch chứa CHTCA (39) (4,4mg, 20 μ mol) trong DMF (300 μ l). Toàn bộ hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 10 phút, sau đó được bổ sung nhỏ giọt dung dịch chứa Z' có công thức (38) (34,24mg, 40 μ mol) và DIPEA (21,06 μ l, 120,9 μ mol) trong DMF (700 μ l). Hỗn hợp phản ứng này được để khuấy qua đêm ở nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp thu được pha loãng bằng HAc 1M (50 μ l) và nước (25ml). Nó được lọc qua bộ lọc xi lanh cỡ 0,45 μ m. Dịch lọc được đưa đến bước tách theo phương pháp sắc ký lỏng cao áp và tinh chế.

Cột: cột Water Xterra điều chế MS C18 19 x 50mm; bước sóng: 210/280nm; Lưu tốc: 8ml/phút; Dung môi A = 0,1% TFA Dung môi B = 100% Axetonitril; Nhiệt độ: 30°C; Gradient: 0% đến 100% B 100phút; Biên dạng giải hấp trống DMF/DIPEA/HATU.

Các phân đoạn chứa hợp chất có công thức (40) được tinh chế tiếp trên cột Phenomenex Gemini 5 μ m C18 110A AXIA 50 x 21,2mm trong dung dịch đệm TFA 0,1%. Phân đoạn được sấy khô ở nhiệt độ thấp để tạo ra hợp chất có công thức (40) CHTCA(Z')₂, 15mg ở dạng bột màu trắng. MS ESI +ve, +30v, 1209 biểu thị phân tử lượng 1208.

Sơ đồ 11: Điều chế hợp chất khung neo CHTCA(Z')₂



Ví dụ 20: Điều chế hợp chất neo S₆

Quy trình tổng hợp được thể hiện chi tiết trên Sơ đồ 12 dưới đây. Các số tham chiếu hợp chất và tham chiếu các bước tổng hợp dưới đây liên quan đến Sơ đồ 12.

Bước A) Hợp chất có công thức (1) được khuấy trong metanol khan (100ml) ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 48 giờ, hỗn hợp này được lọc bỏ. Dịch lọc được làm bay hơi trong chân không đến khô để tạo ra hợp chất có công thức (41), 1,25g (6,037mmol, hiệu suất 93%) ở dạng rắn màu trắng. MS 324 (M+1).

Bước B) Hợp chất có công thức (41) (1,95g, 6,037mmol) được khuấy trong axetyl clorua (20ml, 281mmol) ở nhiệt độ trong phòng trong 3 ngày, sau đó được làm bay hơi trong chân không đến khô để tạo ra hợp chất có công thức (42) 3,06g (6,01mmol, hiệu suất 99%). MS 510,5 (M+1).

Bước C) Cặn (42) (3,06g, 6,01mmol) được khuấy trong điclometan (DCM) (35ml), sau đó KSAc (3,57g, 31,26mmol) được bổ sung vào. Hỗn hợp phản ứng này được khuấy trong khí quyển argon ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 40 giờ, pha loãng bằng điclometan (50ml), sau đó được phân bố giữa điclometan và nước (50ml). Lớp hữu cơ được rửa bằng dung dịch NaCl 5% (22ml x 2), và làm khô trên Na₂SO₄ khan qua đêm, lọc bỏ. Dịch lọc được làm bay hơi đến khô để tạo ra hợp chất (43) 2,93g (5,34mmol, hiệu

suất 88,8%) ở dạng bột màu trắng đục. MS 550 (M+1).

Bước D) Hợp chất có công thức (43) (200mg, 0,364mmol), và Boc-aminohexan bromua (107,4mg, 0,385mmol) được khuấy trong DMF (2ml), mà diethylamin (0,81ml, 7,83mmol) được bổ sung vào đó. Toàn bộ hỗn hợp được khuấy trong khí quyển argon ở nhiệt độ 25°C trong thời gian 2,5 giờ. Hỗn hợp phản ứng này được phân bố giữa etyl axetat (EA) (80ml) và dung dịch NaCl bão hòa. Lớp hữu cơ được rửa bằng dung dịch NaCl bão hòa (15ml x 3), nước (10ml x 3). Lớp hữu cơ được làm khô trên Na₂SO₄, lọc, dịch lọc được làm bay hơi trong chân không đến khô. Cặn được đưa đến bước sắc ký cột silicagel (Toluen:Axeton = 2:1). Các phân đoạn chứa hợp chất có công thức (44) được kết hợp và được làm bay hơi trong chân không đến khô để tạo ra hợp chất có công thức (44) 98mg (0,139mmol, hiệu suất 38%) ở dạng bột màu trắng. MS 706 (M+1).

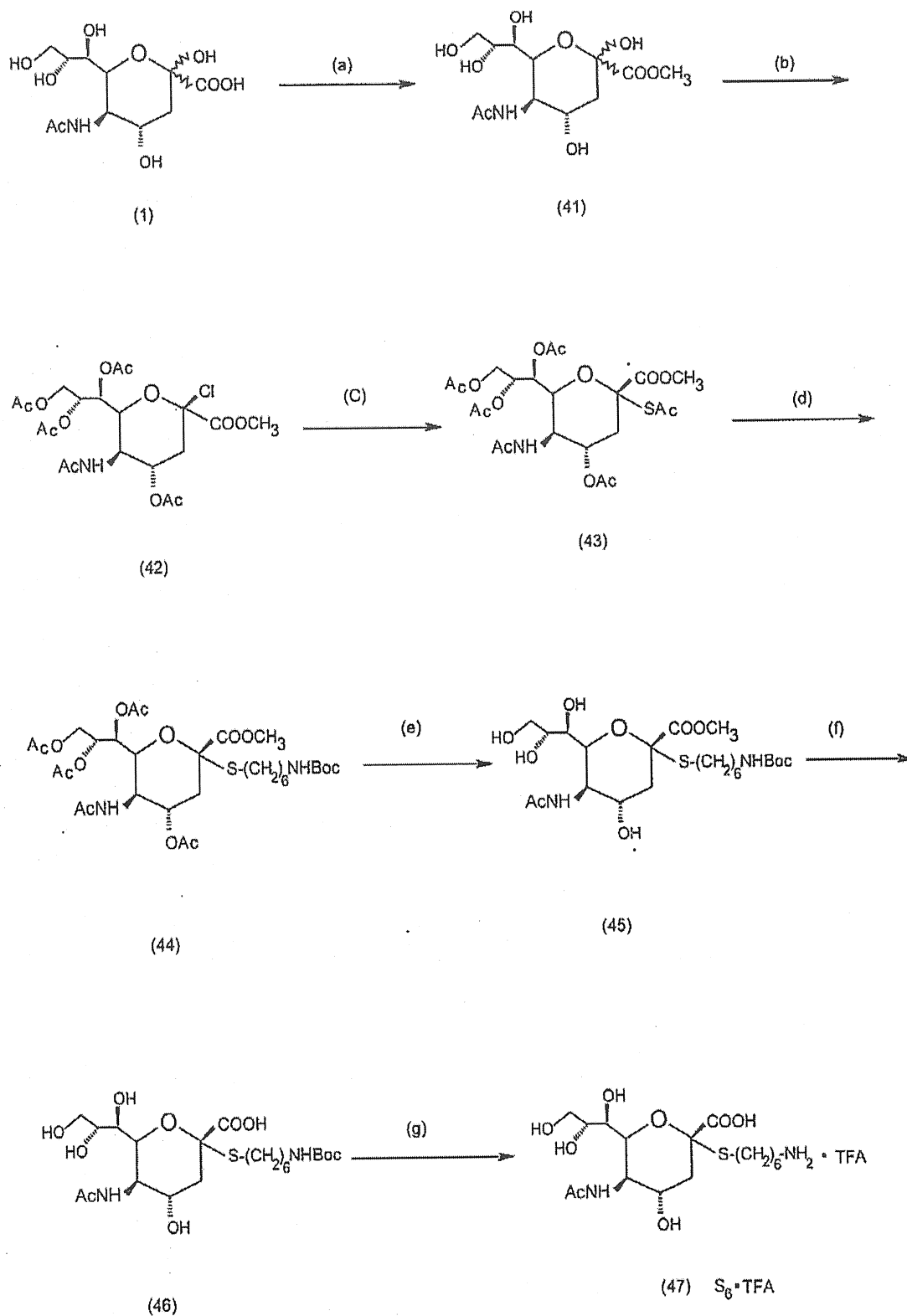
Bước E) Hợp chất có công thức (44) (95mg, 0,135mmol) được hòa tan trong metanol khan (1ml). Natri metoxit (0,16mg, 6,94μmol) trong khí quyển Argon được bổ sung vào dung dịch này, hỗn hợp phản ứng này được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 2,5 giờ, tiếp đó được điều chỉnh bằng nhựa Dowex50 x 8(H⁺) đến độ pH bằng 6,0 đến 6,5, lọc bỏ. Dịch lọc được làm bay hơi trong chân không đến khô để tạo ra hợp chất có công thức (45) 71mg (0,132mmol, hiệu suất 97,9%) ở dạng bột màu trắng. MS 538(M+1)

Bước F) Hợp chất có công thức (45) (60mg, 0,109mmol) được khuấy trong khí quyển argon trong NaOH 0,2N (2ml, 0,4mmol) ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 2,5 giờ. Dung dịch này được điều chỉnh đến độ pH nằm trong khoảng từ 3 đến 4 bằng nhựa Dowex50 x 8(H⁺) và lọc bỏ. Dịch lọc được sấy khô ở nhiệt độ thấp để tạo ra hợp chất có công thức (46) 56mg (0,107mmol, hiệu suất 98%) ở dạng bột màu trắng. MS 524 (M+1).

Bước G) Hợp chất có công thức (46) (50mg, 0,0956mmol) được hòa tan trong hỗn hợp gồm axit trifloaxetic (TFA) (2ml, 25,96mmol) và metylphenylete (anisol) (0,2ml, 1,84mmol) trong điclotetan (2ml). Toàn bộ hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ 25°C trong thời gian 2,5 giờ, sau đó nó được làm bay hơi trong chân không ở nhiệt độ 35°C trong thời gian 2 giờ. Cặn được rửa trong hexan (10ml x 2) ở nhiệt độ trong phòng

qua đêm, hexan được gạn. Cặn được khuấy trong ete (10ml x 2) ở nhiệt độ trong phòng, sau đó ete được loại bỏ. Cặn được hòa tan trong nước (1ml), và sấy khô ở nhiệt độ thấp để tạo ra hợp chất có công thức (47), ở dạng bột màu trắng của muối $S_6 \cdot TFA$, 51mg (0,0949mmol, hiệu suất 99%). MS 424(M+I) [Phân tử lượng của $S_6 = 423$, muối $S_6 \cdot TFA = 537$].

Sơ đồ 12: Điều chế hợp chất neo S₆



Ví dụ 21: Điều chế hợp chất MD012, CHTCA(Z)₂(S₆)

Quy trình tổng hợp được thể hiện chi tiết trên Sơ đồ 13 dưới đây. Các số tham

chiều hợp chất dưới đây và tổng hợp bước các tài liệu viện dẫn liên quan đến Sơ đồ 13.

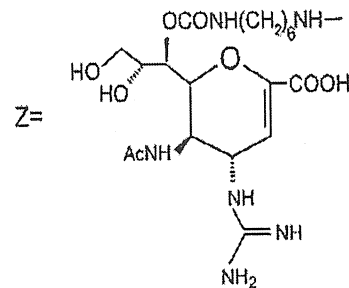
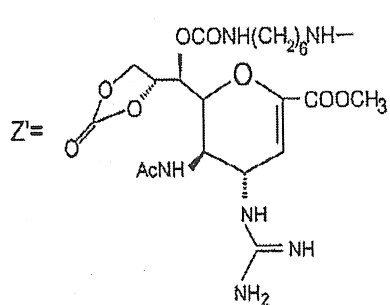
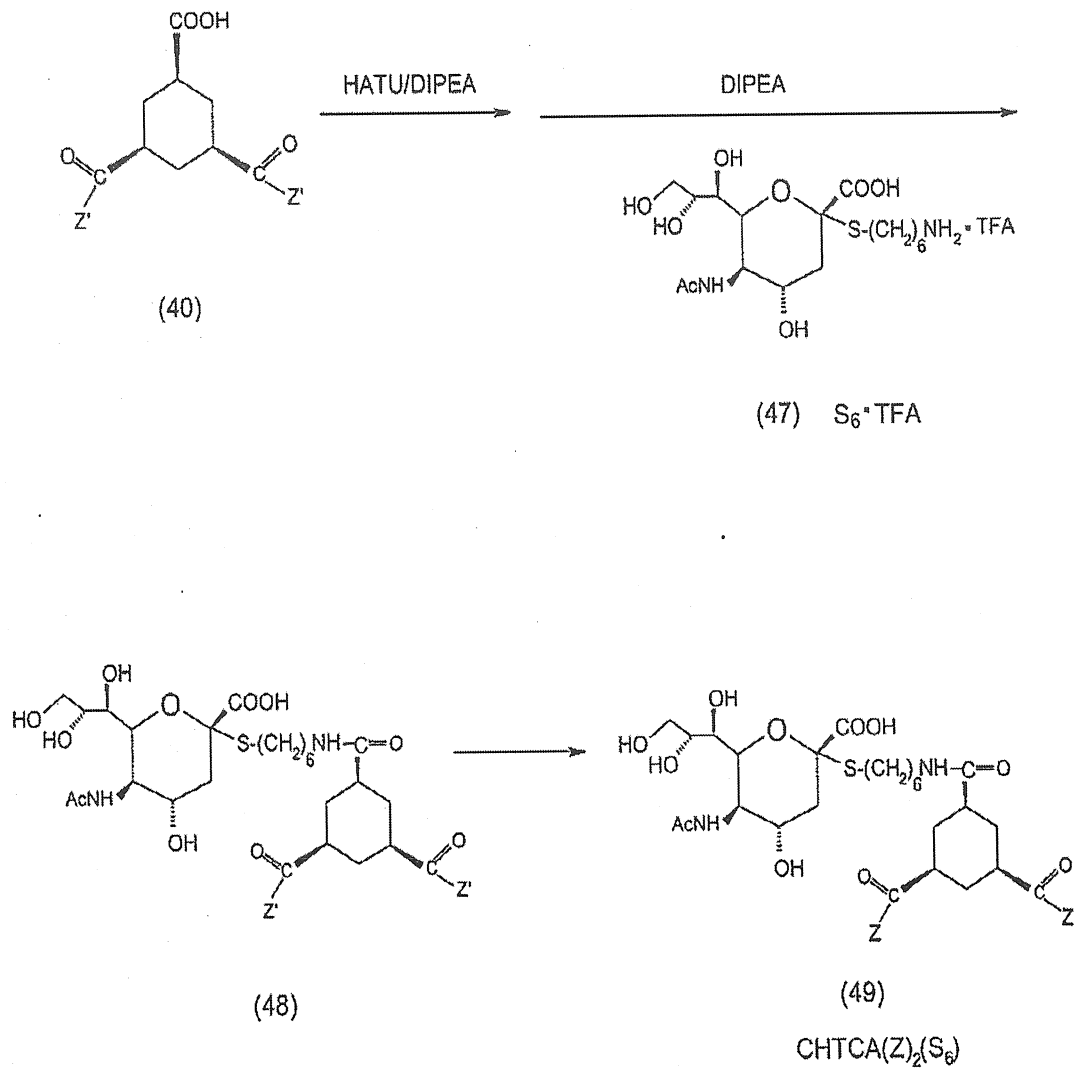
HATU (1,254mg, 3,3 μ mol) và DIPEA (0,6 μ l, 3,44 μ mol) được bổ sung vào dung dịch chứa CHTCA(Z')₂ có công thức (40) (4mg, 3,3 μ mol) trong DMF (100 μ l). Hỗn hợp này được khuấy ở nhiệt độ phòng trong thời gian 10 phút, sau đó dung dịch chứa muối S₆•TFA (47) (1,8mg, 3,35 μ mol) và DIPEA (1,20 μ l, 6,89 μ mol) trong DMF (100 μ l) được bổ sung vào. Hỗn hợp phản ứng này được khuấy ở nhiệt độ phòng qua đêm. Hỗn hợp thu được pha loãng bằng HAc 1M (5 μ l) và nước (2ml), sau đó nó được lọc qua bộ lọc xi lanh 0,45 μ m. Dịch lọc được đưa đến bước tách theo phương pháp sắc ký lỏng cao áp và tinh chế.

Cột: Phenomenex Gemini AXIA 5 μ m, C18 110A 50 x 21,2mm; bước sóng: 210/280nm; Lưu tốc: 8ml/phút; Dung môi A = 0,1% axit trifloacetic trong nước Milliq; Dung môi B = 100% Axetonitril; Gradient: 0% đến 100% B, 100 phút, tuyến tính; Nhiệt độ: 30°C.

Các phân đoạn chứa hợp chất có công thức (48) được gom và sấy khô ở nhiệt độ thấp để tạo ra hợp chất có công thức (48) CHTCA(Z')₂(S₆) 2,4mg, ở dạng bột màu trắng. MS ESI +30v 1615 biểu thị phân tử lượng bằng 1614.

Hợp chất có công thức (48) (2,4mg, 1,486 μ mol) được khuấy trong dung dịch nước metanol 50% (90 μ l) chứa triethylamin (6,6 μ l) ở nhiệt độ phòng trong 5 giờ, sau đó được làm bay hơi trong chân không đến khô. Cặn được hòa tan lại trong nước (100 μ l), sấy khô ở nhiệt độ thấp để tạo ra sản phẩm có công thức (49) CHTCA(Z)₂(S₆), 2mg (1,303mmol 87,7% hiệu suất) ở dạng bột màu trắng. MS ESI +30v 1535,7, biểu thị phân tử lượng bằng 1534,7

Sơ đồ 13: Điều chế hợp chất MD012, CHTCA(Z)₂(S₆)



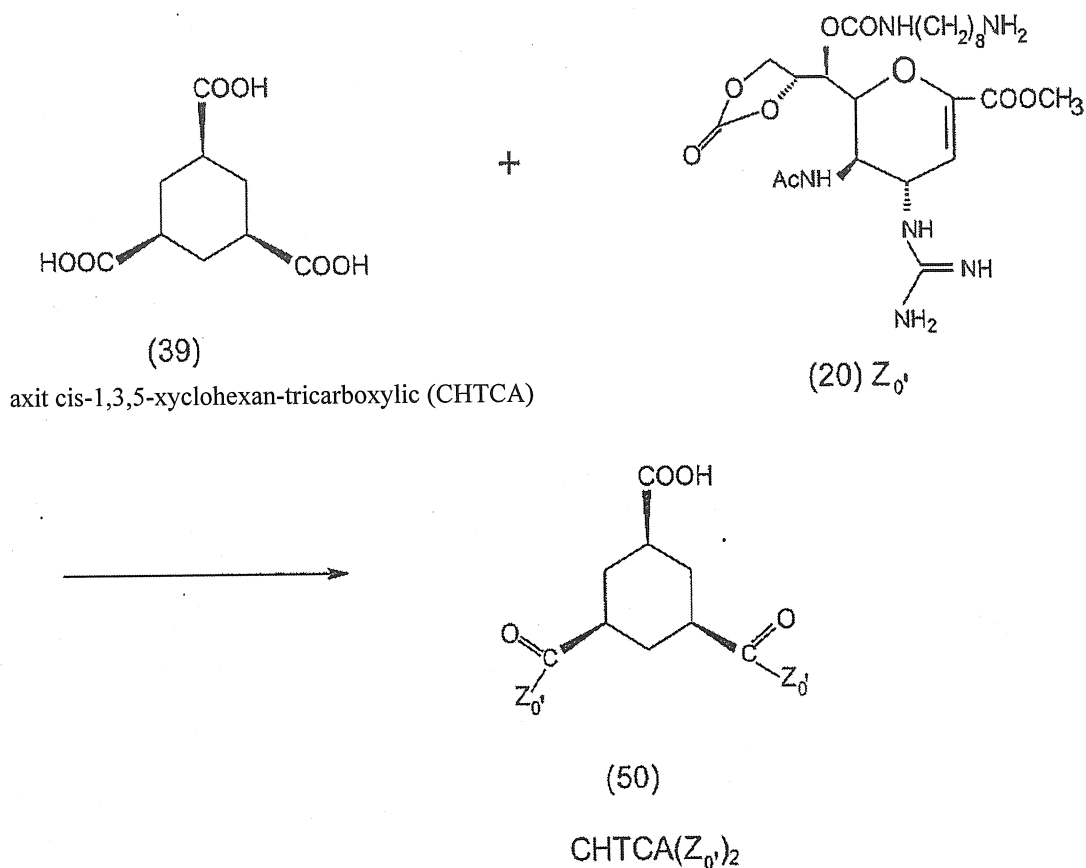
Ví dụ 22: Điều chế hợp chất khung neo CHTCA(Z₀)₂

Quy trình tổng hợp được thể hiện chi tiết trên Sơ đồ 14 dưới đây. Các số tham

chiều hợp chất dưới đây liên quan đến Sơ đồ 14.

Quy trình điều chế hợp chất neo (20) $Z_{0'}$ được bộc lộ chi tiết ở Ví dụ 15. Hợp chất khung neo có công thức (50) $CHTCA(Z_{0'})_2$ được điều chế theo quy trình bộc lộ chi tiết trong Ví dụ 20. Hợp chất khung neo có công thức (50) $CHTCA(Z_{0'})_2$ thu được ở dạng rắn màu trắng. MS ESI +ve, +30v 1265 biểu thị phân tử lượng bằng 1264.

Sơ đồ 14: Điều chế hợp chất khung neo $CHTCA(Z_{0'})_2$



Ví dụ 23: Điều chế nhóm axit/anion $D\text{-}Asp(D\text{-}Cys)\text{-}D\text{-}Asp(D\text{-}Cys)\text{-}D\text{-}Asp(D\text{-}Cys)\text{-}OH$

Quy trình tổng hợp được thể hiện chi tiết trên Sơ đồ 15 dưới đây. Các số tham chiếu hợp chất (A) đến (I) dưới đây và tham chiếu bước tổng hợp liên quan đến Sơ đồ 15.

Este Boc-D-xystein(Acm)metyl, [Boc-D-Cys(Acm)-OMe] (1,532g, 5mmol) được hòa tan trong axit trifloaxetic (TFA) (10ml) chứa anisol (1ml), và khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 30 phút. Sau đó, hỗn hợp phản ứng này được làm bay hơi trong chân không để loại bỏ TFA để tạo ra chất dạng dầu, mà được nghiền trong ete

(100ml x 2), sau đó hoà tan lại trong dung dịch nước axetonitril 20% (100ml), và sấy khô ở nhiệt độ thấp trong thời gian 72 giờ để tạo ra hợp chất TFA•D-Cys(Acm)-OMe, 1,60g. Sắc ký lỏng cao áp/MS biểu thị phân tử lượng bằng 206,35 (ở dạng bazơ tự do).

Este Fmoc-D-aspartic- α -axit- β -O-t-butyl, [Fmoc-D-Asp-Obut], (1,646g, 4mmol) được hoạt hóa bằng HBTU (phân tử lượng 379,25) (1,517g, 4mmol) và DIPEA (phân tử lượng 129,25) (0,517g, 4mmol) trong DMF (20ml) ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 10 phút, sau đó kết hợp với dung dịch chứa TFA•D-Cys(Acm)-OMe (1,47g, 4,2mmol) và DIPEA (0,542g, 4,2mmol) trong DMF (10ml). Toàn bộ hỗn hợp phản ứng được để khuấy trong thời gian 16 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Phản ứng này được theo dõi theo phương pháp sắc ký lỏng cao áp (HPLC). Hỗn hợp này được làm bay hơi trong chân không để loại bỏ DMF. Sau đó, nước (5 x 70ml) được bổ sung vào cặn để rửa đi cặn DMF và D-Cys(Acm)OMe để tạo ra chất rắn màu trắng đục, mà sau đó được sấy khô trong chân không để tạo ra hợp chất (A), Fmoc-D-Asp[D-Cys(Acm)-OMe]-O-But ở dạng rắn màu trắng. Sắc ký lỏng cao áp/MS biểu thị phân tử lượng bằng 599,7.

Hợp chất (A) (1,2g, 2mmol) được xử lý bằng 20% piperidin trong axetonitril (20ml) trong thời gian 30 phút ở nhiệt độ trong phòng, sau đó được lọc đi. Dịch lọc được làm bay hơi trong chân không để tạo ra hợp chất có công thức (B), D-Asp[D-Cys(Acm)-OMe]-OBut. Sắc ký lỏng cao áp/MS biểu thị phân tử lượng bằng 377,4.

Hợp chất (A) (599,7mg, 1mmol) được xử lý bằng TFA (6ml) trong thời gian 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Tiếp đó, nó được làm bay hơi trong chân không đến khô. Cặn được nghiền trong ete (50ml x 3), sau đó được hòa tan trong dung dịch nước axetonitril 30% (100ml), và sấy khô ở nhiệt độ thấp để tạo ra hợp chất có công thức (C), Fmoc-D-Asp[D-Cys(Acm)-OMe]-OH ở dạng rắn màu trắng. Sắc ký lỏng cao áp/MS biểu thị phân tử lượng bằng 542,7.

Hợp chất có công thức (C), Fmoc-D-Asp[D-Cys(Acm)-OMe]-OH (434mg, 0,8mmol) được hoạt hóa bằng HBTU (303,4mg, 0,8mmol) và DIPEA (103,4mg, 0,8mmol) trong DMF (8ml) ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 10 phút, sau đó nó được bổ sung hợp chất có công thức (B), D-Asp[D-Cys(Acm)-OMe]-OBut (9332mg, 0,88mmol). Hỗn hợp phản ứng này được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian

16 giờ. DMF được làm bay hơi trong chân không và cặn DMF được loại bỏ bằng cách rửa nguyên liệu rắn màu trắng một cách cẩn thận bằng nước. Tiếp đó, chất rắn màu trắng được làm khô trong chân không trong 24 giờ để tạo ra hợp chất (D), Fmoc-D-Asp[D-Cys(Acm)-OMe]-D-Asp[D-Cys(Acm)-OMe]-OBut, ở dạng rắn màu trắng. Sắc ký lỏng cao áp/MS biểu thị phân tử lượng bằng 902,19. Hợp chất (D) được xử lý bằng TFA (16ml) ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 1 giờ để loại bỏ t-butyl este. TFA được làm bay hơi trong chân không đến khô. Cặn được rửa bằng nước để loại bỏ cặn TFA và chất rắn được sấy khô trong chân không trong thời gian 72 giờ để tạo ra Fmoc-D-Asp[D-Cys(Acm)-OMe]-D-Asp[D-Cys(Acm)-OMe]-OH. Sắc ký lỏng cao áp/MS biểu thị phân tử lượng bằng 846.

Fmoc-D-Asp[D-Cys(Acm)-OMe]-D-Asp[D-Cys(Acm)-OMe]-OH (423mg, 0,5mmol) được hoạt hóa bằng HBTU (189,5mg, 0,5mmol) và DIPEA (64,63mg, 0,5mmol) trong DMF (5ml) ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 10 phút, sau đó được bổ sung hợp chất có công thức (B), D-Asp[D-Cys(Acm)-OMe]-OBut (317mg, 0,84mmol). Toàn bộ hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 16 giờ. Phản ứng được kiểm tra theo phương pháp sắc ký lỏng cao áp (HPLC) về mức độ hoàn thành, và DMF được loại bỏ trong chân không. Chất rắn màu trắng thu được được rửa một cách cẩn thận bằng nước lạnh, tiếp đó được sấy khô trong chân không trong thời gian 48 giờ để tạo ra Hợp chất (E), Fmoc-D-Asp[D-Cys(Acm)-OMe]-D-Asp[D-Cys(Acm)-OMe]-D-Asp[D-Cys(Acm)-OMe]-OBut, phân tử lượng 1206, mà được tinh chế tiếp theo phương pháp sắc ký lỏng cao áp (HPLC).

Sắc ký lỏng cao áp phân tích nguyên liệu này biểu thị độ tinh khiết 70%. Nguyên liệu này được hòa tan trong 50% metanol/nước và lọc qua bộ lọc 0,2µm để sắc ký lỏng cao áp điều chế.

Sắc ký lỏng cao áp điều chế

Cột: cột Waters Xterra C18 5µm 19 x 50mm theo mẻ 40mg; bước sóng: 220/280nm; Lưu tốc: 8ml/phút; Dung môi A = 0,1% axit trifloaxetic; Dung môi B = 100% Axetonitril; Gradient: 10% đến 100% B, 100 phút; Nhiệt độ: 30°C.

Sau đó, hợp chất (E), Fmoc-D-Asp[D-Cys(Acm)-OMe]-D-Asp[D-Cys(Acm)-

OMe]-D-Asp[D-Cys(Acm)-OMe]-OBut được xử lý bằng TFA (10ml) trong thời gian 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng và được làm bay hơi trong chân không đến khô. Cặn được hòa tan trong dung dịch nước axetonitril 40% (100ml), và sấy khô ở nhiệt độ thấp để tạo ra hợp chất (F), Fmoc-D-Asp[D-Cys(Acm)-OMe]-D-Asp[D-Cys(Acm)-OMe]-D-Asp[D-Cys(Acm)-OMe]-OH, ở dạng rắn màu trắng. Sắc ký lỏng cao áp/MS biểu thị phân tử lượng bằng 1150,27.

Hợp chất (F), Fmoc-D-Asp[D-Cys(Acm)-OMe]-D-Asp[D-Cys(Acm)-OMe]-D-Asp[D-Cys(Acm)-OMe]-OH (200mg, 0,1738mmol) được xử lý bằng 20% piperidin trong axetonitril (10ml) trong thời gian 30 phút và được khuấy ở nhiệt độ trong phòng và sau đó được lọc bỏ. Dịch lọc được làm bay hơi trong chân không. Cặn được khuấy trong 50% nước/metanol (20ml) chứa triethylamin (500 μ l) ở nhiệt độ trong phòng trong 6 giờ, được theo dõi theo phương pháp sắc ký lỏng cao áp (HPLC) để biểu thị phản ứng này hoàn thành. Hỗn hợp này được làm bay hơi trong chân không đến khô để tạo ra hợp chất (G), D-Asp[D-Cys(Acm)-OH]-D-Asp[D-Cys(Acm)-OH]-D-Asp[D-Cys(Acm)-OH]-OH. Sắc ký lỏng cao áp/MS biểu thị phân tử lượng bằng 885,9.

Sắc ký lỏng cao áp phân tích biểu thị độ tinh khiết 50%.

Hợp chất (G) được tinh chế tiếp theo phương pháp sắc ký lỏng cao áp (HPLC) điều chế.

Cột: cột sắc ký lỏng cao áp Phenomenex Gemini Axia 110A 5 μ m 50 x 21,2mm C18 bước sóng: 210/280nm; Lưu tốc: 8ml/phút; Dung môi A = 0,1% TFA; Dung môi B = 100% Axetonitril; Gradient: 0% đến 100% B, 100 phút; Nhiệt độ: 30°C

Mẫu (100mg) được hòa tan trong dung dịch nước metanol 10%, xử lý bằng năng lượng âm thanh, và lọc qua bộ lọc 0,2 μ m. Các mẻ 20mg được bơm vào cột theo gradient. Các phân đoạn được theo dõi theo phương pháp RF-HPLC phân tích bằng cách sử dụng cột Phenomenex Gemini C18 5 μ m. Lưu tốc 0,7ml/phút; bước sóng 210/280nm; Gradient 0% đến 50% B 15 phút; Dung môi A = 0,1% TFA; Dung môi B = 100% Axetonitril.

Các phân đoạn với độ tinh khiết theo MS chính xác hơn 90% được gom và sấy khô ở nhiệt độ thấp để tạo ra hợp chất đã được tinh chế (G).

Hợp chất (G), D-Asp [D-Cys(Acm)-OH]-D-Asp-[D-Cys(Acm)-OH]-D-Asp[D-Cys(Acm)-OH]-OH, (21,8mg, 0,0246mmol) được hòa tan trong TFA (10ml) chứa

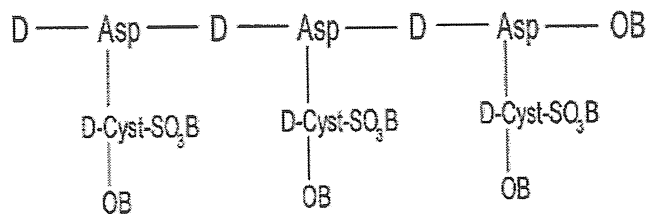
anisol (200 μ l), sau đó bạc triflometansulfonat (504mg, 1,96mmol) được bổ sung vào. Hỗn hợp phản ứng này được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 1 giờ. Tiếp đó, nó được làm bay hơi trong chân không đến khô. Cặn được nghiền trong ete (40ml x 2), ete rửa được gạn. Cặn được khuấy trong axit axetic 1M (20ml) chứa dithiothreitol (403mg, 2,62mmol) ở nhiệt độ 25°C trong thời gian 3 giờ. Huyền phù này được ly tâm trong các ống nghiệm falcon loại dung tích 50ml trong thời gian 10 phút với tốc độ 4000 vòng/phút. Dịch nổi được gom một cách cẩn thận, sau đó được tinh chế theo phương pháp sắc ký lỏng cao áp (HPLC) và sấy khô ở nhiệt độ thấp để tạo ra hợp chất (H), D-Asp(D-Cys-SH,-OH)-D-Asp(D-Cys-SH,-OH)-D-Asp(D-Cys-SH,-OH)-OH, sắc ký lỏng cao áp/MS biểu thị phân tử lượng bằng 672,3.

Hỗn hợp gồm 95% axit formic (7,36ml), 30% H₂O₂ (0,8ml) và H₂O (0,368ml) được để ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 30 phút, sau đó được khuấy trong bể nước đá ở nhiệt độ -5°C, mà hợp chất (H) (8mg, 0,0119mmol) được bổ sung vào đó và khuấy trong thời gian 1 giờ, sau đó trong chân không trong thời gian 10 phút. Tiếp đó, dung dịch còn lại được pha loãng bằng nước đến 200ml và sấy khô ở nhiệt độ thấp để tạo ra hợp chất có công thức (I) 9,5mg, D-Asp[D-Cya-SO₃H,-OH]-D-Asp[D-Cya-SO₃H,-OH]-D-Asp[D-Cya-SO₃H,-OH]-OH ở dạng rắn màu trắng, sắc ký lỏng cao áp/MS biểu thị phân tử lượng bằng 816,78.

Hợp chất này được tinh chế bằng cách loại muối trong các điều kiện sau.

Cột: cột sắc ký lỏng cao áp Phenomenex Gemini Axia 110A 5 μ m 50 x 21,2mm C18; bước sóng: 210/280nm; Lưu tốc: 8ml/phút; Dung môi A = 0,1% TFA; Dung môi B = 100% Axetonitril; Gradient: 0% đến 100% B, 100 phút Nhiệt độ: 30°C. Hợp chất (I) này rửa giải ra gần như rỗng.

Tiếp đó, nguyên liệu này được sấy khô ở nhiệt độ thấp để tạo ra bột màu trắng ở dạng hợp chất có công thức (I) tinh khiết. Hợp chất có công thức (I) được trung hòa bằng triethylamin (TEA) để tạo ra muối TEA (51) như sau:



B = bazơ như TEA

(51)

* HBTU: O-(1H-Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetrametyl-urani hexaflophosphat phân tử lượng 379,24

TFA: axit trifloaxetic phân tử lượng 114,02

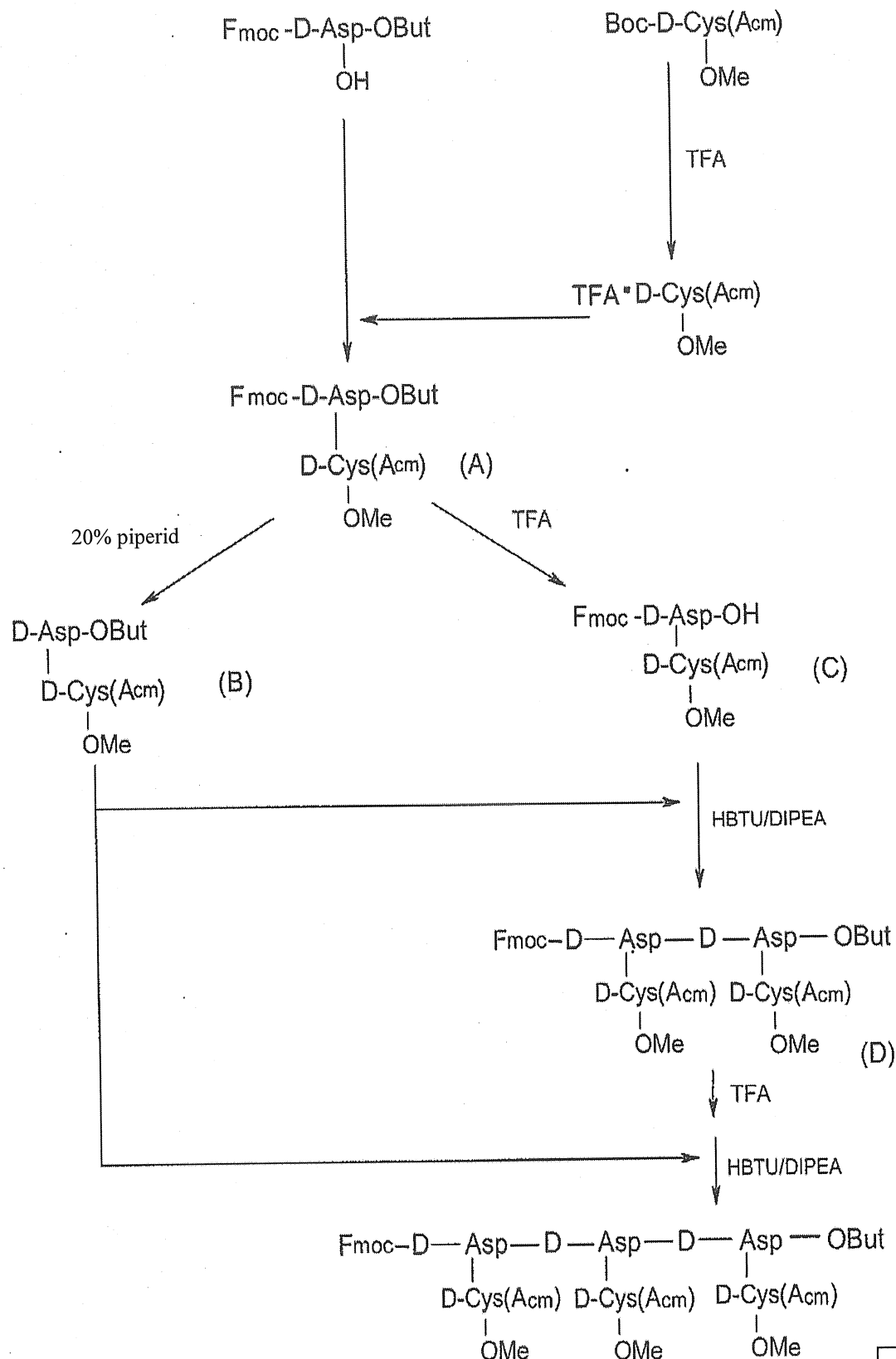
DIPEA: Diisopropyletylamin phân tử lượng 129,25

TEA; Trietylamin phân tử lượng 101,19

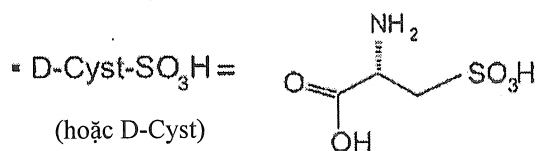
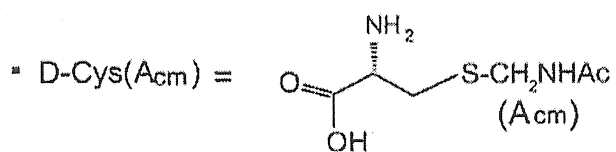
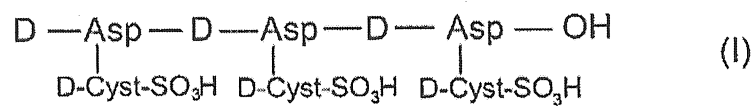
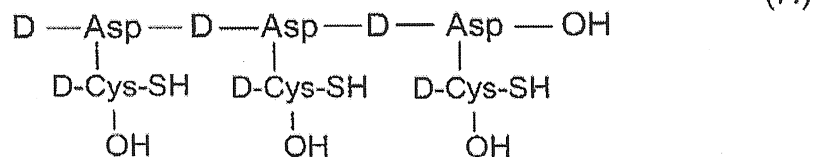
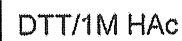
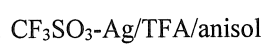
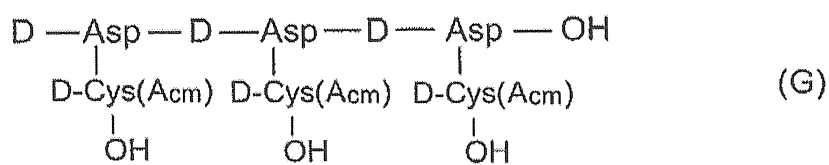
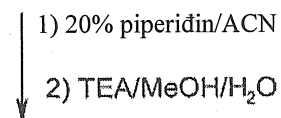
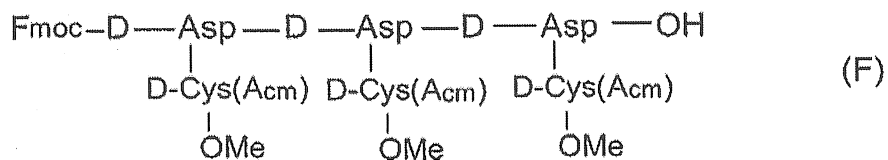
Acm: S-Axetamidometyl làm nhóm bảo vệ thio

OBUT: t-butyl este

Sơ đồ 15: Điều chế nhóm axit/anion D-Asp(D-Cys)-D-Asp(D-Cys)-D-Asp(D-Cys)-OH



Hợp chất (E)



Ví dụ 24: Điều chế hợp chất MD348, CHTCA(Zn)₂-[D-Asp(D-Cyst)-D-Asp(D-Cyst)-D-Asp(D-Cyst)]-OH

Quy trình tổng hợp được thể hiện chi tiết trên Sơ đồ 16 dưới đây. Các số tham chiếu hợp chất dưới đây liên quan đến Sơ đồ 16.

Hợp chất có công thức (50), CHTCA(Zn)₂ từ Ví dụ 22 (10,744mg, 8,5μmol) được khuấy với HATU (3,23mg, 8,5μmol) và DIPEA (1,496μl, 8,56μmol) trong DMF (5ml) ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 10 phút, sau đó nó được kết hợp với hợp chất có công thức (51), D-Asp(D-Cya-SO₃B,-OB)-D-Asp-(D-Cya-SO₃B,-OB)-D-Asp(D-Cya-SO₃B,-OB)-OB, từ Ví dụ 23 (13,2mg, 8,67μmol) trong DMF (5ml). Toàn bộ hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 16 giờ. Hỗn hợp thu được được theo dõi theo phương pháp sắc ký phân tích lỏng cao áp/MS ở thời gian lưu Pic 1, 12,903 phút. 44% MS ESI +ve, +20v 1032,3 2+ion, ESI -ve, -40v 1030,7 2+ion, biểu thị phân tử lượng bằng 2062 như hợp chất có công thức (52) không có bazơ, tức là CHTCA(Zn)₂[D-Asp(D-Cya-SO₃H,-OH)-D-Asp(D-Cya-SO₃H,-OH)-D-Asp-(D-Cyst-SO₃H,-OH)]-OH.

Sắc ký lỏng cao áp phân tích:

Cột: Phenomenex Kinetex EVO 5μm C18 100A 150 x 4,6mm; bước sóng: 210/280nm; Lưu tốc: 0,7ml/phút; Dung môi A = 0,1% TFA; Dung môi B = 100% Axetonitril; Gradient: 0% đến 50% B, 15 phút, tuyến tính; Nhiệt độ: 30°C.

Hỗn hợp thu được được axit hóa bằng axit xitric, được pha loãng đến 20ml bằng nước, và lọc qua bộ lọc 0,2μm, sau đó được đưa đến bước sắc ký lỏng cao áp điều chế để tách và tinh chế.

Sắc ký lỏng cao áp điều chế

Cột: Phenomenex Gemini AXIA 5μm C18 110A 50 x 21,2mm; bước sóng: 210/280nm; Lưu tốc: 8ml/phút; Dung môi A = 0,1TFA; Dung môi B = 100% Axetonitril; Gradient: 0% đến 100% B, 100 phút, tuyến tính; Nhiệt độ: 30°C.

Pic chính có khoảng thời gian lưu 31,087 phút là sản phẩm có công thức (52). Các phân đoạn chứa sản phẩm được gom và tinh chế lại bằng cách sắc ký lỏng cao áp

tiếp như sau.

Cột: Phenomenex Kinetex x B 5 μ m C18 100A 50 x 21,2mm; bước sóng: 210/280nm; Lưu tốc: 8ml/phút; Dung môi A = 0,1TFA; Dung môi B = 100% Axetonitril; Gradient: 5% đến 100% B, 80 phút, tuyến tính; Nhiệt độ 30°C.

Hợp chất đã được tinh chế có công thức (52) tại thời gian lưu 19,597 phút được tách hoàn toàn ra khỏi nguyên liệu ban đầu tại thời gian lưu 21,714 phút.

Hợp chất có công thức (52) (3,5mg, 1,697 μ mol) được hòa tan trong 50% metanol/nước (5ml) chứa triethylamin (TEA) (18 μ l, 129 μ mol). Nó được khuấy ở nhiệt độ phòng trong thời gian 3 giờ. Sắc ký lỏng cao áp biểu thị phản ứng không hoàn thành, do đó, thêm 11 μ l TEA được bổ sung vào. Hỗn hợp này được khuấy trong thời gian 60 phút nữa, tiếp đó sắc ký lỏng cao áp biểu thị phản ứng này hoàn thành. Sau đó, dung dịch phản ứng được trung hòa đến độ pH = 6 bằng axit axetic 1M. Tiếp đó, dung dịch được pha loãng đến 20ml bằng nước. Hỗn hợp này được đưa đến bước sắc ký lỏng cao áp.

Sắc ký lỏng cao áp phân tích

Cột: Phenomenex Kinetex Evo 5 μ m C18 100A 150 x 3mm; bước sóng: 210/280nm Lưu tốc: 0,7ml/phút; Dung môi A = dung dịch đệm NaHPO₄ 20mM có độ pH 7,0; Dung môi B = dung dịch đệm NaHPO₄ 10mM có độ pH 7,0 + 50% Axetonitril; Gradient: 0% đến 100% B, 30 phút, tuyến tính; Nhiệt độ: 30°C

Sắc ký lỏng cao áp điều chế

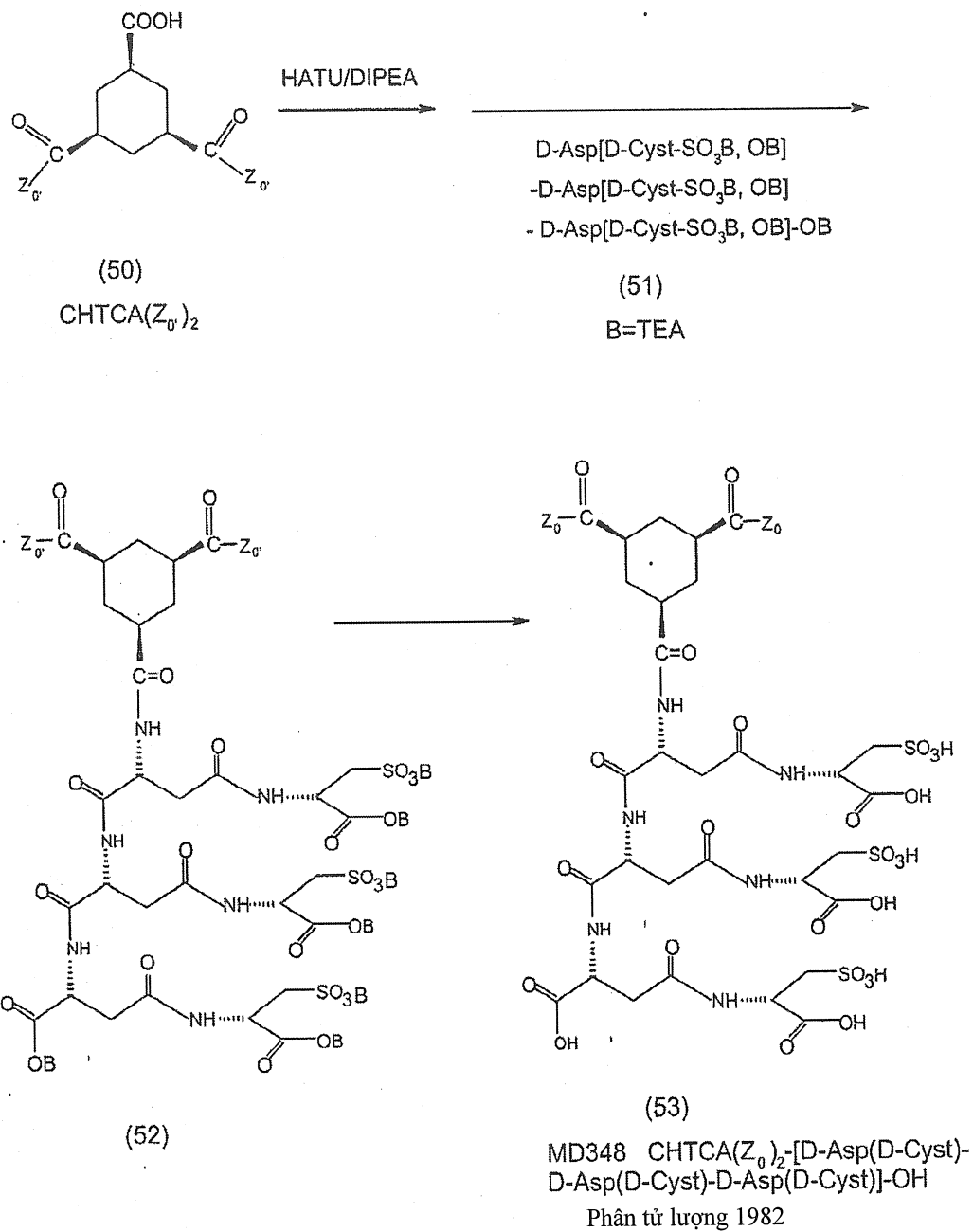
Cột: Phenomenex Kinetex XB 5 μ m C18 100A 50 x 21,2mm; bước sóng: 210/280nm Lưu tốc: 8ml/phút; Dung môi A = 0,1% TFA Dung môi B = 100% Axetonitril Gradient: 0% đến 100% B, 80 phút, tuyến tính; Nhiệt độ: 30°C.

Sản phẩm có công thức (53) được rửa giải ra tại thời điểm thời gian lưu 16,431 phút.

Các phân đoạn tinh khiết được kết hợp và sấy khô ở nhiệt độ thấp, sau đó áp dụng trao đổi HCl để loại bỏ cặn TFA. Bước sấy khô ở nhiệt độ thấp tạo ra sản phẩm có công thức (53) CHTCA(Zn)₂[D-Asp(D-Cya)-D-Asp(D-Cya)-D-Asp(D-Cya)-OH với độ tinh

khuyết > 99% ở dạng rắn màu trắng. MS ESI cone -20v, 990,5 2+ion biểu thị phân tử lượng bằng 1982.

Sơ đồ 16: Điều chế hợp chất MD348, CHTCA(Z₀)₂-[D-Asp(D-Cyst)-D-Asp(D-Cyst)-D-Asp(D-Cyst)]-OH



Các tài liệu viện dẫn

- 1) WHO: influenza (seasonal). 2009, truy cập tại: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/en>.
- 2) Metersky ML, Masterton RG, Lode H, File TM Jr, Babinchak T: Epidemiology, microbiology, and treatment considerations for bacterial pneumonia complicating influenza. *Int J Infect Dis.*, 2012 16:e 321-331.
- 3) Hale BG, Albrecht RA, Garcia-Sastre A: Innate immune evasion strategies of influenza viruses. *Future Microbiol.* 2010, 5:23-41.
- 4) Palese P, Shaw ML: orthomyxoviridae: the viruses and their replication, *In Fields Virology*, 5 edition. Edited by: Knipe DM, Howley PM, Philadelphia, PA: Lippincott Williams 2007:1647- '689.
- 5) Salomon R. *et al.*: The influenza virus enigma. *Cell.* 136 (3), 402-410 (2009).
- 6) Gao R. *et al.*: Human infection with a novel avian-origin influenza A (H7N9) virus. *N. Engl. J. Med.* 368 (2Q): 1888-1897 (2013).
- 7) Imal M. *et al.* Experimental adaptation of an influenza H5 HA confers respiratory droplet transmission to reassortant H5 HA/H1N1 virus in ferrets. *Nature*, 486 (7403): 420-428 (2012).
- 8) Herfst S. *et al.*: Airborne transmission of influenza A/H5N1 virus between ferrets. *Science*, 336 (6088):1534-1541 (2012).
- 9) Russell C A, *et al.*: The potential for respiratory droplet-transmissible A/H5N1 influenza virus to evolve in a mammalian host. *Science*, 336 (6088): 1541-1547 (2012).
- 10) Hu Y, *et al.*: Association between adverse clinical outcome in human diseases caused by novel virus influenza A H7N9 and sustained viral shedding and emergences of antiviral resistance. *Lancet*, 381 (9885): 2273-2279 (2013).
- 11) Baz M, *et al.*: Emergence of Oseltainivir-resistant pandemic H1N1 virus during prophylaxis. *N. Engl. J Med.*, 361 (23): 2296-2297 (2009).
- 12) Hayden F.: Developing new antiviral agents for influenza treatment: what does the future hold? *Clinical Infectious diseases*, 48: S3-13 (2009).
- 13) Das K, *et al.*: Structures of influenza A protein and insights into antiviral drug

- targets. *Nature Structural & Molecular Biology*, Vol.17, No.5, 530-538 (2010).
- 14) Hayden F.: Newer influenza antivirals, biotherapeutics and combinations. *Influenza and Other Respiratory viruses* 7 (Suppl. 1), 63-75 (2012).
 - 15) Wathen M W, *et al.*: Antivirals in seasonal and pandemic influenza-future perspectives. *Influenza and Other Respiratory Virus*, 7 (Suppl. 1), 76-80 (2012).
 - 16) Novel antiviral therapies for influenza and other respiratory viruses: Bench to Bedside. The 4th ISIRV-AVG Conference, 2-4 June 2015, University of Texas at Austin USA.
 - 17) Chen, W. *et al.* A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death. *Nat. Med.* 7, 1306-1312 (2001).
 - 18) Rebel, J.J. & Wiley, D.C. Receptor binding and membrane fusion in virus entry; the influenza hemagglutinin. *Annu. Rev. Biochem.* 69, 531-569 (2000).
 - 19) Wu. W.W. & Pante, N. The directionality of the nuclear transport of the influenza A genome is driven by selective exposure of nuclear localization sequences on nucleoprotein. *Viol. J.*, 6, 68 (2009).
 - 20) Ulmanen I., Broni, B.A. & Krug, R.M. The role of two of the influenza virus core P proteins in recognizing cap 1 structures (m⁷GpppNm) on RNAs and in initiating RNA transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 7355-7359 (1981).
 - 21) Plotch, S.J., Bouloy. M., Uhranen, I. & Krug, R.M. A unique cap(m⁷GpppXm)-dependent influenza virion endonuclease cleaves capped RNAs to generate the primers that initiate viral RNA transcription. *Cell*, 23, 847-858 (1981).
 - 22) Hagen, M., Chung, T.D.Y., Butcher, A. & Krystal, M. Recombinant influenza virus polymerase: requirement of both 5' and 3' viral ends for endonuclease activity. *J. Virol.*, 68, 1509-1515 (1994).
 - 23) Shimizu, K., Iguchi, A., Gornyou, R. & Ono, Y. Influenza virus inhibits cleavage of the HSP70 pre-mRNAs at the polyadenylation site. *Virology*, 254, 213-219 (1999).
 - 24) Nemeroff, M.E., Barabino, S.M., Li, Y., Keller, W. & Krug, R.M. Influenza virus NS1 protein interacts with cellular 30kDa subunit of CPSF and inhibits 3'end formation of cellular premRNAs. *Mol. Cell* 1, 991-1000 (1998).

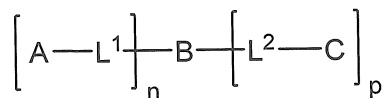
- 25) Newcomb, L.L. *et al.* Interaction of the influenza A virus nucleocapsid protein with the viral RNA polymerase potentiates unprimed viral RNA replication. *J. Virol.*, 83, 29-36 (2009).
- 26) Neumann, G., Hughes, M.T. & Kawaoka, Y. Influenza A virus NS2 protein mediates vRNP nuclear export through NES-independent interaction with hCRM1. *EMBO J.*, 19, 6751-6758 (2000).
- 27) Nayak, D.P., Hui, E.K. & Barman, S. Assembly and budding of influenza virus. *Virus Res*, 106, 147-165 (2004).
- 28) Rennie P., Powell P. *et al.*: Low pH intranasal spray inactivate influenza viruses *in vitro* and protect ferrets against influenza infection. *Respiratory Research*, 8, 37 (2007).
- 29) Anderson I, Proctor DF: Measurement nasal mucociliary clearance. *Eur. J. Respir. Dis.*, 64, 37-40 (1983).
- 30) Lande E.A. *et al.*: A comparative study of the effect of Citric acid, Capsaicin and, Resiniferatoxin on the cough challenge in Guinea-pig and man. *Pulmonary Pharmacology*, 6, 171-175 (1993).
- 31) Tanaka, M. *et al.*: Mechanisms of Capsaicin—and Citric-acid-induced cough reflexes in GuineaPig. *J. Pharmacol. Sci.*, 99, 77-82 (2005).
- 32) Erik De Clercq, Toward improved anti-HIV chemotherapy, therapeutic strategies for intervention with HIV infections. *Med. Chem.*, vol. 38, No.14, P.2491 (1995).
- 33) Abed Y *et al.*: Generation and Characterization of recombinant influenza A (H1N1) virus harboring amantadine resistance mutation. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49: 556-559 (2005).
- 34) Bright R. *et al.*: Adamantane resistance around influenza A viruses isolated early during the 2005-2006 influenza season in the United States. *JAMA*, 8: 891-894 (2006).
- 35) Bright R. *et al.*: Incidence of adamantane resistance among influenza A (H3N2) viruses isolated worldwide 1994-2005: a cause for concern. *Lancet*, 9492: 1175-1181 (2005).
- 36) Nelson M. *et al.*: The origin and global emergence of adamantane resistant A

- (H3N2) influenza virus. *Virology*, 388: 270-278 (2009).
- 37) Von Itzstein *et al.*: Rational Design of Potent Sialidase-based Inhibitors of Influenza virus Replication. *Nature*, 363, 418-423 (1993).
 - 38) Klumpp, K.: Recent Advances in the Discovery and Development of Anti-influenza Drugs. *Expert Opin. Ther. Pat.*, 14, 1153-1168 (2004).
 - 39) Wang, G.: Recent Advances in the Discovery and Development of Anti- influenza Drugs. *Expert Opin. Ther. Pat.*, 12, 845-861 (2002).
 - 40) Abdel-Magid, A. F. *et al.*: Synthesis of Influenza Neuraminidase Inhibitors. *Curr. Opin. Drug Discuss. Dev.*, 4, 776-791 (2001).
 - 41) Wang, G. T. *et al.*: Design, Synthesis, and Structure Analysis of Influenza Neuraminidase Inhibitors Containing Pyrrolidine Cores. *J. Med. Chem.*, 44, 1192-1201 (2001)
 - 42) Babu, Y.S. *et al.*: Discovery of a Novel, High Potent, Orally Active, and Selective Influenza Neuraminidase Inhibitor through Structure-based Drug Design. *J. Med. Chem.*, 43, 3482-3486 (2000).
 - 43) Chand, P. *et al.*: Syntheses and Neuraminidase Inhibitory Activity of Multisubstituted Cyclopentane Amide Derivatives. *J. Med. Chem.*, 47, 1919-1929 (2004).
 - 44) Honda, T. *et al.*: Synthesis and Anti-influenza Evaluation of Polyvalent Sialidase Inhibitors bearing 4-Guandino-Neu5Ac2en derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 12, 1929-1932 (2002).
 - 45) Honda, T. *et al.*: Synthesis and Anti-influenza Virus Activity of 7-O-Alkylated derivatives Related to Zanamivir. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 12, 1925-1928 (2002).
 - 46) Del Mar C. *et al.*: Neuraminidase inhibitors for influenza complications. *Lancet* 384, 1260 (2014).
 - 47) Jefferson T. *et al.*: Neuraminidase inhibitors for preventing and treating influenza in healthy adults and children. *Cochrane Database Syst. Rev.*, 4:CD008965 (2014).
 - 48) Nguyen-Van-Tam J S. *et al.*: Antivirals for influenza where now for clinical practice and pandemic preparedness? *Lancet*, 384: 386-387 (2014).

- 49) Reece, P.A. *et al.*: *PCT Int Appl.* WO98/21243 (1998). CA1998, 12928172.
- 50) Watson, K.G.; *et al.*: Highly potent and long-acting trimeric and tetrameric inhibitors of influenza virus neuraminidase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 14, 1589 (2004).
- 51) Demaine, D.A. *et al.*: Dimeric compounds and their use as anti-viral agents. WO03/040138. *Chem. Abstr.*, 138:354175 (2003).
- 52) Macdonald, S.J.F. *et al.*: Potent and long-acting dimeric inhibitors of influenza virus neuraminidase are effective at a one-weekly dosing regimen. *Antimicrob. Agents and Chemoth.*, 48, 4542 (2004).
- 53) Macdonald, S.J.F.; *et al.*: Dimer zanamivir conjugates with various linking group are potent, long-lasting inhibitors of influenza neuraminidase including H5N1 Avian influenza. *J. Med. Chem.*, 48, 2964 (2005).
- 54) Fraser B.H. *et al.*: Synthesis of 1,4-triazole linked zanamivir dimers as highly potent inhibitors of influenza A and B. *Med. Chem. Commun.*, 4, 383 (2013).
- 55) Watanabe W. *et al.* *J. of Virological Methods*, 48, 257 (1994).

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Hợp chất có công thức (I):



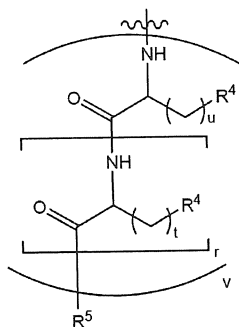
Công thức (I)

hoặc muối được dụng, solvat, este hoặc chất đồng phân lập thể của chúng, trong đó:

mỗi A là một nhóm neo, được chọn từ nhóm gồm zanamivir, laninamivir, oseltamivir, peramivir, và axit 2,3-diflo sialic hoặc miền liên kết kháng thể mà đặc biệt liên kết neuraminidaza;

B là nhóm khung đa hóa trị được chọn từ nhóm gồm propan-1,2,3-tricarboxylat, prop-1-en-1,2,3-tricarboxylat, xyclopropan-1,2,3-tricarboxylat, xyclohexan-1,3,5-tricarboxylat, benzen-1,3,5-tricarboxylat, metan tetracarboxylat, 1,2,3,4-butan tetracarboxylat, etylen-1,1,2,2-tetracarboxylat, xyclohexan-1,2,4,5-tetracarboxylat, và benzen-1,2,4,5-tetracarboxylat đã tùy ý được thể;

mỗi C là một nhóm anion có công thức VIII :



(Công thức VIII)

trong đó:

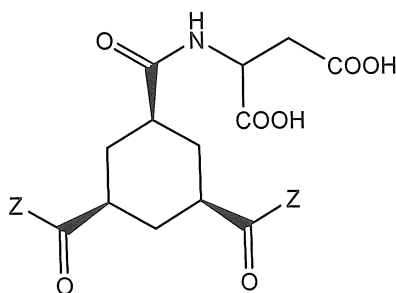
mỗi R⁴ được chọn độc lập từ nhóm bao gồm -COOH, -SO₃H, -NHCH₂SO₃H, -CONH-Cya, -CONH-Asp, -CONH-Asp(-NHCH₂SO₃H)_w, và -CONH-Asp(-NHCH₂PO₃H)_w, trong đó w là một số nguyên 1 hoặc 2;

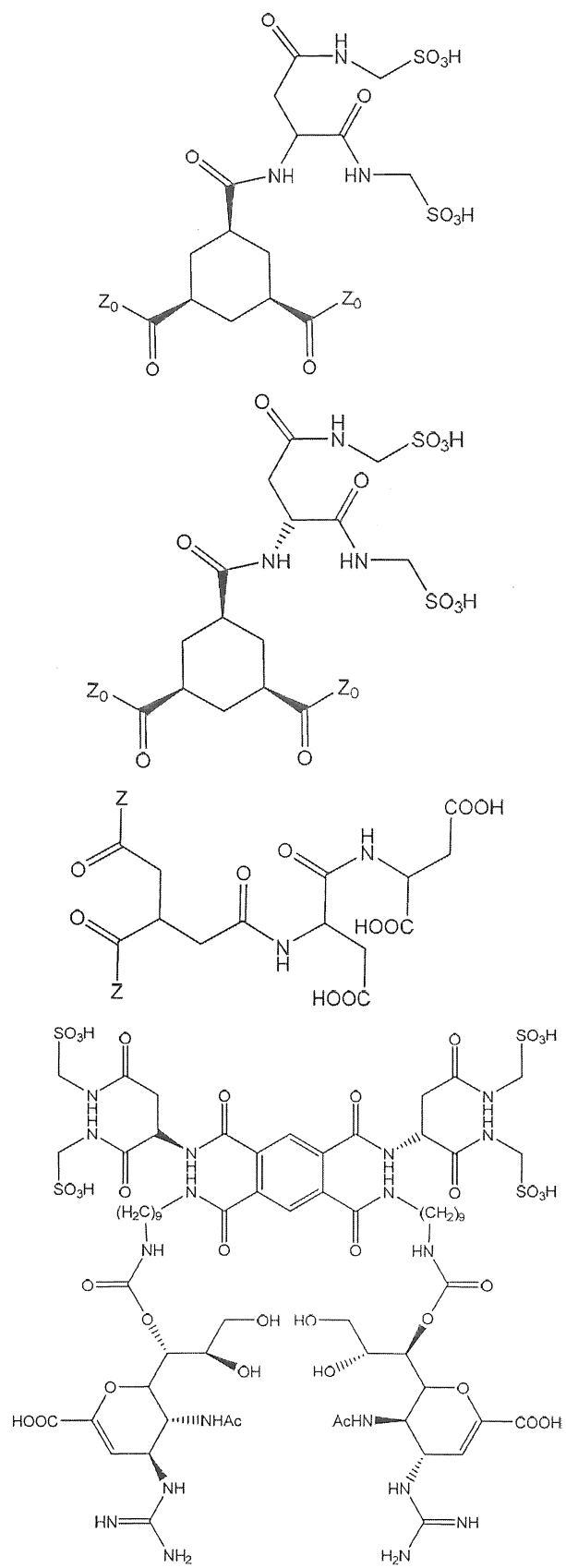
R⁵ được chọn từ nhóm bao gồm -OH và -NHCH₂SO₃H;

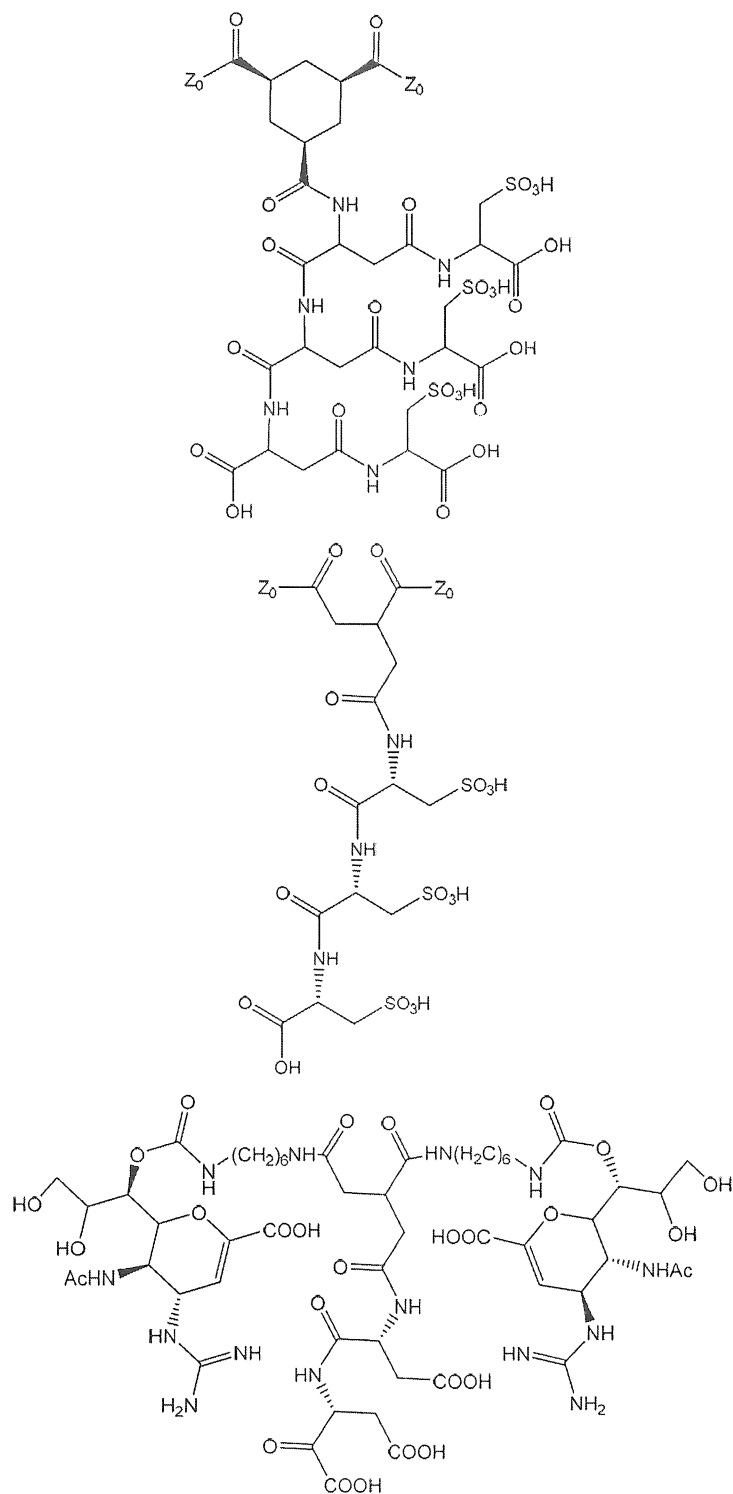
u là số nguyên nằm trong khoảng từ 0 đến 3;

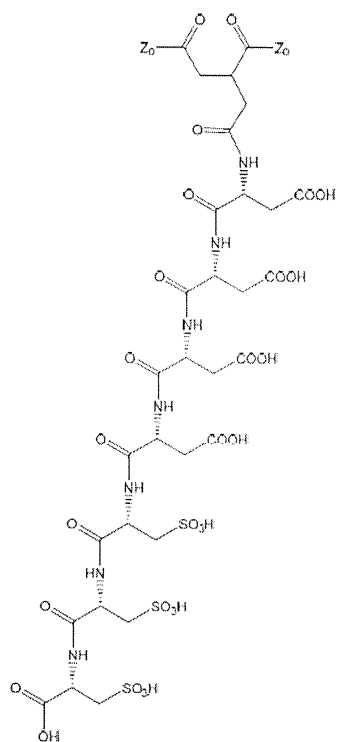
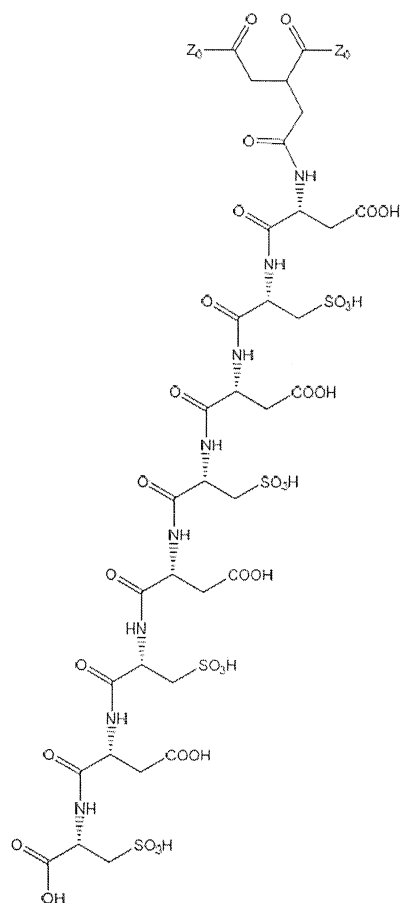
t là số nguyên nằm trong khoảng từ 0 đến 3;
 r là số nguyên nằm trong khoảng từ 0 đến 6; và
 v là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 12;
 mỗi L^1 và L^2 là các nhóm liên kết hóa trị hai;
 n là bằng 2 hoặc 3; và
 p là bằng 1 hoặc 2.

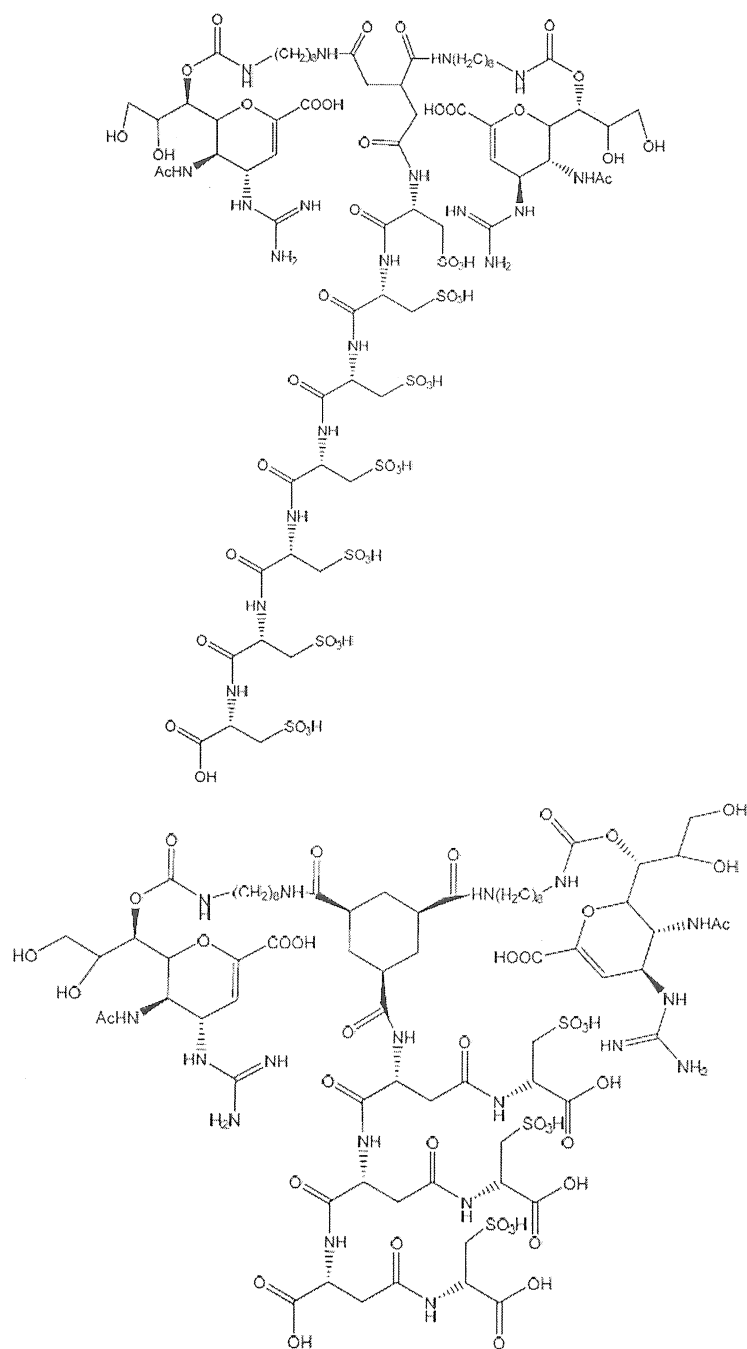
2. Hợp chất theo điểm 1, trong đó nhóm neo được chọn từ nhóm bao gồm kháng thể (Ab) hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của kháng thể, đoạn kháng thể chuỗi đơn (scFV) và kháng thể đơn miền (dAb).
3. Hợp chất theo điểm 1 hoặc điểm 2, trong đó mỗi L^1 và L^2 được chọn từ nhóm bao gồm liên kết, C_1 - C_{12} alkylen tùy ý được thế, $-C(O)-NR-$, $-O-C(O)O-NR-$, $-C=N-O-$, $-C=N-NR-$, $-SO_2-NR-$, đisulfua, $-C(O)-NR-(CH_2)_x-NR-$, $-(CH_2)_x-NR-$, $-(CH_2)_x-(O-(CH_2)_y)_z-$, $-C=N-O-$ tùy ý được thế, alkylen $-C=N-NR$ tùy ý được thế, alkylen sulfonamit tùy ý được thế, alkylen đisulfua tùy ý được thế, trong đó R độc lập là H hoặc C_1 - C_6 alkyl và trong đó mỗi x, y và z là số nguyên độc lập được chọn từ 0, 1, 2, 3 và 4.
4. Hợp chất theo điểm bất kỳ từ 1 đến 3, trong đó B được chọn từ nhóm bao gồm propan-1,2,3-tricarboxylat tùy ý được thế, xyclohexan-1,3,5-tricarboxylat tùy ý được thế, và benzen-1,2,4,5-tetracarboxylat tùy ý được thế.
5. Hợp chất theo điểm 1, trong đó hợp chất này được chọn từ các hợp chất có công thức:

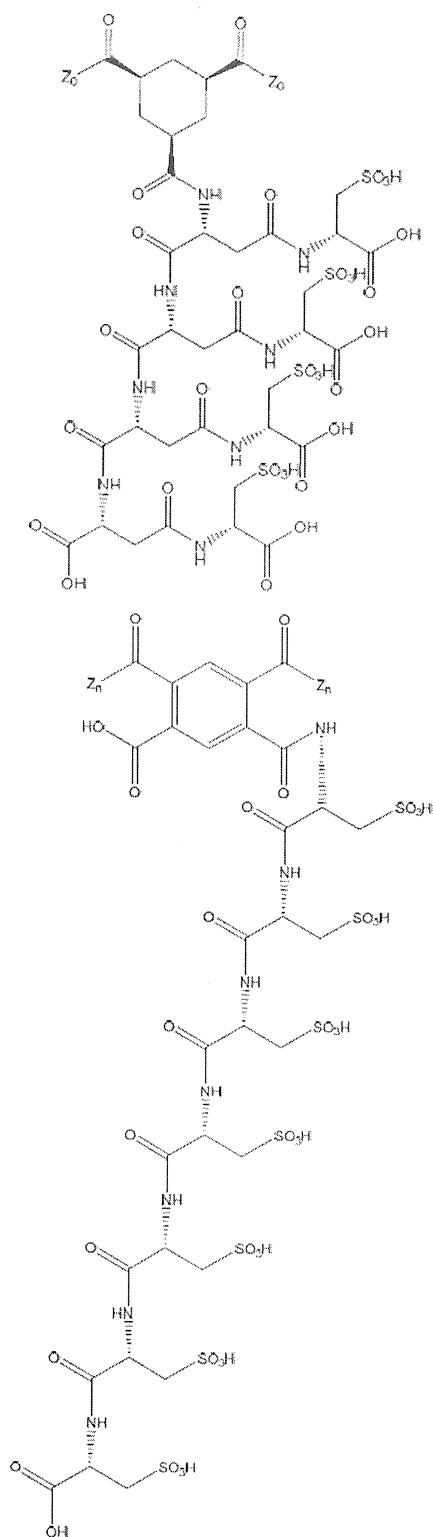


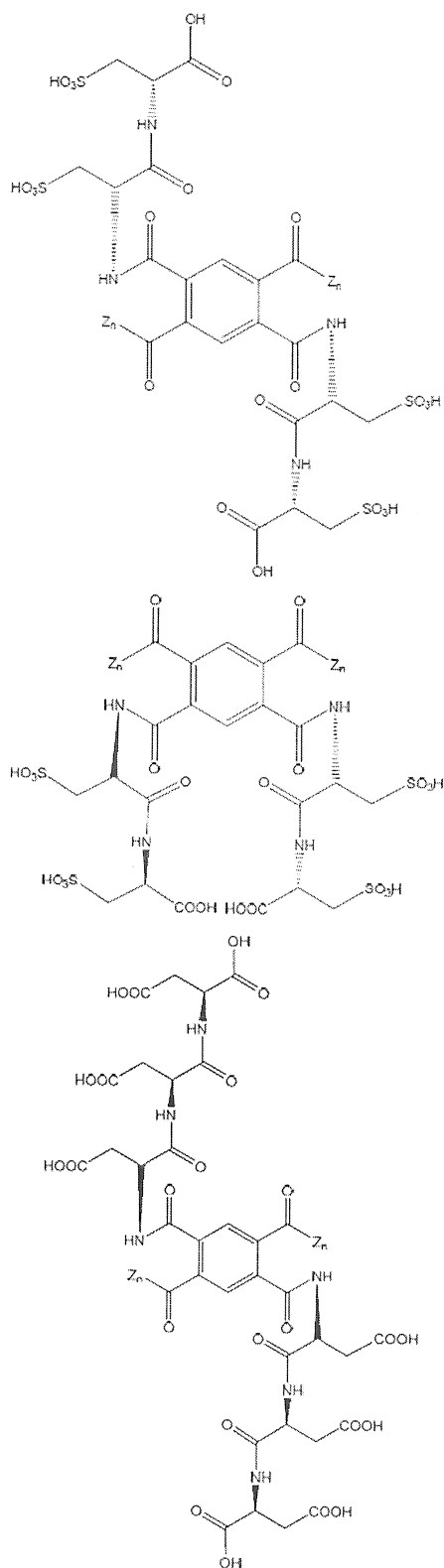


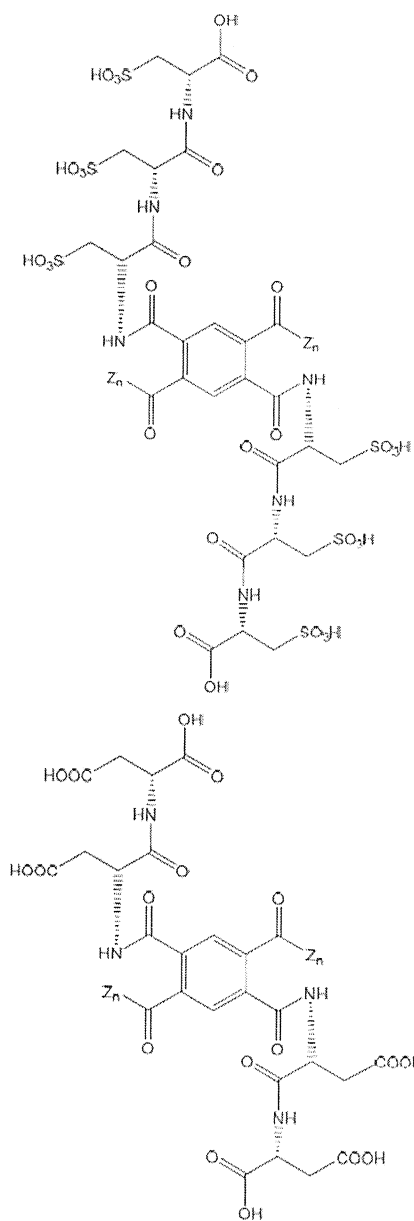


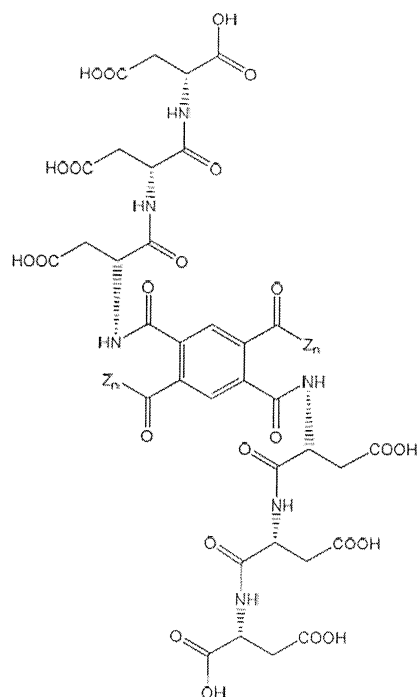






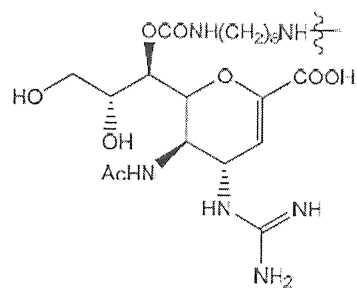




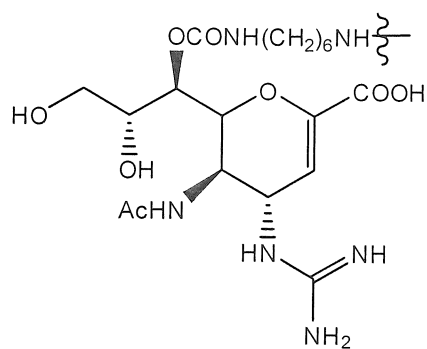


trong đó

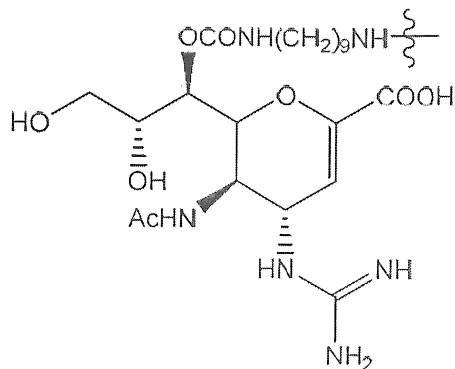
Z_0 là



Z là

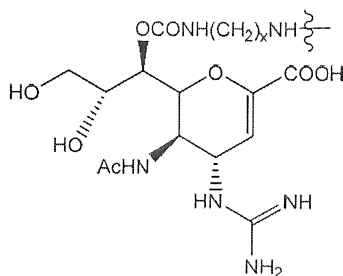


và Z_n là



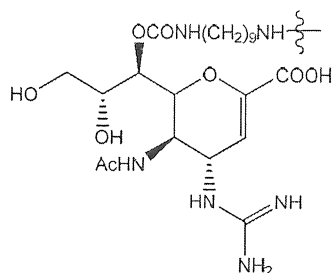
hoặc muối được dung, solvat, este hoặc chất đồng phân lập thể của chúng.

6. Hợp chất theo điểm 1, trong đó A là zanamivir.
7. Hợp chất theo điểm 1, trong đó B là benzen-1,2,4,5-tetracarboxylat.
8. Hợp chất theo điểm 1, trong đó mỗi R^4 là COOH .
9. Hợp chất theo điểm 1, trong đó R^5 là $-\text{OH}$.
10. Hợp chất theo điểm 1, trong đó mỗi L^2 là liên kết.
11. Hợp chất theo điểm 1, trong đó mỗi $[\text{A}-L^1]$ được thể hiện bởi nhóm có công thức Z_x với cấu trúc

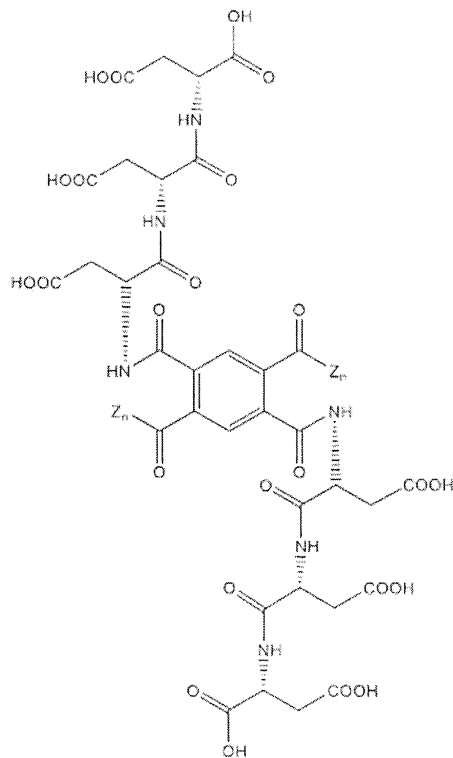


trong đó x là số nguyên nằm trong khoảng từ 0 đến 12.

12. Hợp chất theo điểm 11, trong đó Z_x là nhóm có công thức Z_n .

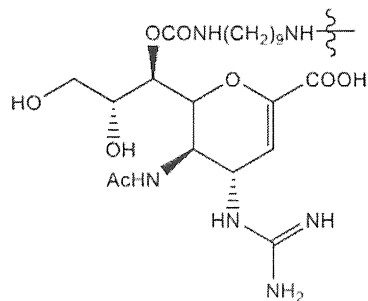


13. Hợp chất theo điểm 1, trong đó hợp chất này có công thức:



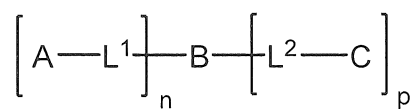
trong đó

Zn là



hoặc muối được dùng, solvat, este hoặc chất đồng phân lập thể của nó.

14. Hợp chất theo điểm 13, trong đó hợp chất này là este được dùng thu được từ axit carboxylic.
15. Dược phẩm chứa hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 14.
16. Hợp chất có công thức (I):



Công thức (I)

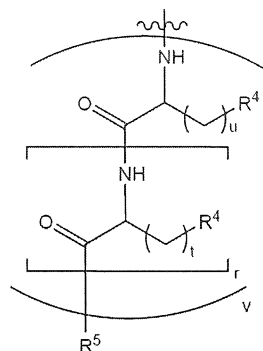
hoặc muối được dùng, solvat, este hoặc chất đồng phân lập thể của chúng dùng

để điều trị hoặc phòng ngừa nhiễm virus cúm A, cúm B, cúm gia cầm hoặc chủng virus cúm kháng thuốc, trong đó:

mỗi A là một nhóm neo, được chọn từ nhóm gồm zanamivir, laninamivir, oseltamivir, peramivir, và axit 2,3-difluo sialic hoặc miền liên kết kháng thể mà đặc biệt liên kết neuraminidaza;

B là nhóm khung đa hóa trị được chọn từ nhóm gồm propan-1,2,3-tricarboxylat, prop-1-en-1,2,3-tricarboxylat, xyclopropan-1,2,3-tricarboxylat, xyclohexan-1,3,5-tricarboxylat, benzen-1,3,5-tricarboxylat, metan tetracarboxylat, 1,2,3,4-butan tetracarboxylat, etylen-1,1,2,2-tetracarboxylat, xyclohexan-1,2,4,5-tetracarboxylat, và benzen-1,2,4,5-tetracarboxylat đã tùy ý được thế;

mỗi C là một nhóm anion có công thức VIII



(Công thức VIII)

trong đó

mỗi R^4 được chọn độc lập từ nhóm bao gồm $-\text{COOH}$, $-\text{SO}_3\text{H}$, $-\text{NHCH}_2\text{SO}_3\text{H}$, $-\text{CONH-Cya}$, $-\text{CONH-Asp}$, $-\text{CONH-Asp}(-\text{NHCH}_2\text{SO}_3\text{H})_w$, và $-\text{CONH-Asp}(-\text{NHCH}_2\text{PO}_3\text{H})_w$, trong đó w là một số nguyên 1 hoặc 2;

R^5 được chọn từ nhóm bao gồm $-\text{OH}$ và $-\text{NHCH}_2\text{SO}_3\text{H}$;

u là số nguyên nằm trong khoảng từ 0 đến 3;

t là số nguyên nằm trong khoảng từ 0 đến 3;

r là số nguyên nằm trong khoảng từ 0 đến 6; và

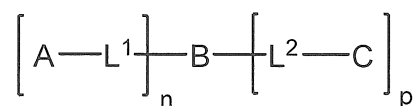
v là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 12;

mỗi L^1 và L^2 là các nhóm liên kết hóa trị hai;

n là bằng 2 hoặc 3; và

p là bằng 1 hoặc 2.

17. Hợp chất có công thức (I):



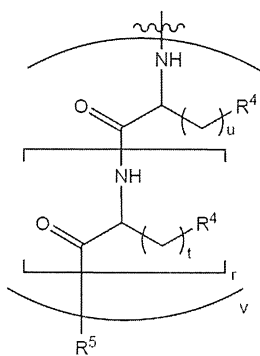
Công thức (I)

hoặc muối được dung, solvat, este hoặc chất đồng phân lập thể của chúng dùng để điều trị hoặc phòng ngừa nhiễm virus gây cúm A, cúm B, cúm gia cầm hoặc chủng gây cúm kháng thuốc, ở đường hô hấp hoặc toàn thân, trong đó:

mỗi A là một nhóm neo, được chọn từ nhóm gồm zanamivir, laninamivir, oseltamivir, peramivir, và axit 2,3-diflo sialic hoặc miên liên kết kháng thể mà đặc biệt liên kết neuraminidaza;

B là nhóm khung đa hóa trị được chọn từ nhóm gồm propan-1,2,3-tricarboxylat, prop-1-en-1,2,3-tricarboxylat, xyclopropan-1,2,3-tricarboxylat, xyclohexan-1,3,5-tricarboxylat, benzen-1,3,5-tricarboxylat, metan tetracarboxylat, 1,2,3,4-butan tetracarboxylat, etylen-1,1,2,2-tetracarboxylat, xyclohexan-1,2,4,5-tetracarboxylat, và benzen-1,2,4,5-tetracarboxylat đã tùy ý được thế;

mỗi C là một nhóm anion có công thức VIII



(Công thức VIII)

trong đó

mỗi R⁴ được chọn độc lập từ nhóm bao gồm -COOH, -SO₃H, -NHCH₂SO₃H, -CONH-Cya, -CONH-Asp, -CONH-Asp(-NHCH₂SO₃H)_w, và -CONH-Asp(-NHCH₂PO₃H)_w, trong đó w là một số nguyên 1 hoặc 2;

R⁵ được chọn từ nhóm bao gồm -OH và -NHCH₂SO₃H;

u là số nguyên nằm trong khoảng từ 0 đến 3;

t là số nguyên nằm trong khoảng từ 0 đến 3;

r là số nguyên nằm trong khoảng từ 0 đến 6; và

v là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 12;
mỗi L^1 và L^2 là các nhóm liên kết hóa trị hai;
 n là bằng 2 hoặc 3; và
 p là bằng 1 hoặc 2.