



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

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

(11) 
1-0019984

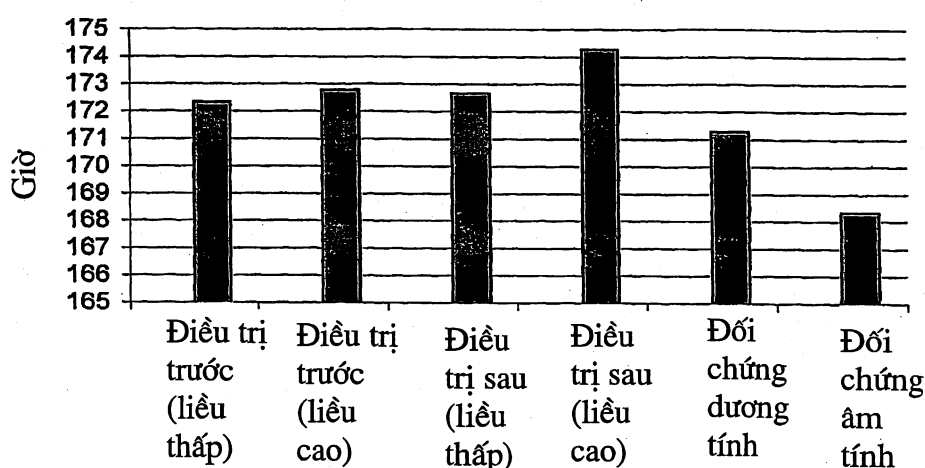
(51)⁷ **A61K 31/795, A61P 31/14, 31/16, C07K** (13) **B**
7/06, 7/08, A61K 47/54, 47/64, 47/69,
47/55, 47/68

(21)	1-2009-01319	(22)	22.01.2007		
(86)	PCT/US2007/001607	22.01.2007	(87)	WO2008/091246	31.07.2008
(45)	26.11.2018	368	(43)	25.09.2009	258
(73)	ALLEXCEL, INC. (US) 135 Wood Street, Suite 200, West Haven, CT 06516, United States of America				
(72)	ONTON Ann Louise (US), DIWAN Anil (US), TATAKE Jayant G. (US)				
(74)	Văn phòng luật sư Phạm và Liên danh (PHAM & ASSOCIATES)				

(54) **POLYME DẠNG RĂNG LƯỢC LÀM CHẤT KHÁNG VIRUT**

(57) Sáng chế đề cập đến polyme dạng răng lược, cụ thể là đề cập đến copolyme lưỡng tính dễ phân huỷ sinh học có mạch chính ưa nước và mạch bên là các nhóm béo kỵ nước. Các polyme này tạo ra các tổ hợp phân tử có kích thước nano trong môi trường nước, có phần bên trong kỵ nước có khả năng hòa tan các hợp chất hữu cơ không hòa tan và phá vỡ các protein vỏ virut. Các polyme này tùy ý chứa nhóm chức để phản ứng tạo ra các điểm gắn cho kháng thể, phối tử, và gốc hướng đích khác giúp cho tổ hợp này bám dính vào đích virut.

Thời gian sống sau khi nhiễm



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế liên quan đến lĩnh vực polyme lưỡng tính, và cụ thể là sáng chế đề cập đến polyme dạng răng lược tạo mixen tương hợp sinh học. Sáng chế còn liên quan đến lĩnh vực phân phối dược chất và các chất kháng virus hướng đích.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Copolymer khối lưỡng tính chứa khối kỵ nước và khối ưa nước đã được nghiên cứu nhiều trong những năm gần đây, vì chúng có khả năng tự lắp ráp thành nhiều dạng cấu trúc nano khi dung môi bao quanh thay đổi. Xem bài báo: Cameron và các đồng tác giả, Can. J. Chem./Rev. Can. Chim. 77:1311-1326 (1999). Trong dung dịch nước, vùng kỵ nước của polyme lưỡng tính có xu hướng tự lắp ráp để tránh tiếp xúc với nước và giảm đến mức tối thiểu năng lượng mặt phân cách tự do của hệ này. Đồng thời, khối ưa nước tạo ra “vành” được hydrat hóa trong môi trường nước, và vì thế tổ hợp này duy trì được cấu trúc ổn định về mặt nhiệt động học. Kết quả là tạo ra huyền phù dạng keo ổn định giống như latex chứa các hạt tổ hợp polyme với các lõi kỵ nước và vành ưa nước.

Copolymer lưỡng tính dạng răng lược khác với copolymer khối ở chỗ mạch chính chủ yếu có tính kỵ nước hoặc ưa nước, với nhánh bên gồm các mạch polyme có tính phân cực ngược với mạch chính chứ không kết hợp vào mạch chính. Đã điều chế được copolymer dạng răng lược với mạch chính kỵ nước và mạch nhánh ưa nước (xem Patent Mỹ số 6,399,700 cấp cho Mayes và các đồng tác giả), cũng như copolymer với mạch chính ưa nước và mạch nhánh kỵ nước (patent Mỹ số 6,521,736 cấp cho Watterson và các đồng tác giả). Copolymer dạng thứ nhất được dùng để thể hiện đa hóa trị của phối tử đối với thụ thể bề mặt tế bào, còn copolymer dạng thứ hai được dùng để hoà tan dược chất và phân phối chúng đến tế bào.

Đã có các nghiên cứu về việc dùng tổ hợp polyme lưỡng tính làm chất mang để hoà tan các dược chất không hoà tan, chất mang phân phối dược chất hướng đích, và làm hệ phân phối gen. Các tổ hợp này có cấu trúc ổn định hơn mixen có phân tử lượng thấp thông thường, do vùng kỵ nước nằm bên trong có cấu trúc hàng rào mạch và/hoặc cấu trúc tinh thể. Do chất mang có bản chất polyme nên tổ hợp này tương đối khó bị phân rã như xảy ra với các hệ liposom thông thường khi các hệ này bị pha loãng đến nồng độ thấp hơn nồng độ mixen tới hạn. Vì không có màng hai lớp nên tổ

hợp polyme này có thể dung hợp một cách dễ dàng với màng tế bào và phân phối các thành phần cần mang trực tiếp đến tế bào. Bản chất lưỡng tính của các tổ hợp này cũng làm cho hoạt tính giống chất tẩy rửa, và thích hợp là các tổ hợp đích có khả năng dung hợp và phá vỡ các protein vỏ virut.

Do poly(etylen glycol) (PEG) có tính tương hợp sinh học rất tốt và các hạt được phủ PEG “nhẹ” có khả năng thấy rõ là tránh được hệ lưới nội mô, nên mixen, liposom, và các polyme kết hợp PEG đã được xem xét rộng rãi làm nguyên liệu đối với các hệ phân phối dược chất. Đã có nhiều các bài báo về việc sử dụng poly(etylen glycol) (PEG) làm hợp phần ưa nước của PEG-lipit (tạo thành liposom và mixen); ví dụ, xem bài báo: Krishnadas và các đồng tác giả, *Pharm. Res.* 20:297-302 (2003). Copolyme khối lượng tính tự lắp ráp, mà có thể tự lắp ráp thành "polymersome" (dạng polyme tương tự liposom) bền hơn, cũng đã được nghiên cứu dùng làm chất mang để hoà tan và phân phối dược chất (Photos và các đồng tác giả, *J. Controlled Release*, 90:323-334 (2003)). Ngoài ra, xem trong tài liệu: Gref và các đồng tác giả, *Int. Symp. Controlled Release Mater.* 20:131 (1993); Kwon và các đồng tác giả, *Langmuir*, 9:945 (1993); Kabanov và các đồng tác giả, *J. Controlled Release*, 22:141 (1992); Allen và các đồng tác giả, *J. Controlled Release*, 63:275 (2000); Inoue và các đồng tác giả, *J. Controlled Release*, 51:221 (1998); Yu and Eisenberg, *Macromolecules*, 29:6359 (1996); Discher và các đồng tác giả, *Science*, 284:113 (1999); patent Mỹ số 6,322,805 cấp cho Kim và các đồng tác giả; patent Mỹ số 6,616,941 cấp cho Seo và các đồng tác giả và patent châu Âu số EP 0583955 của Seo và các đồng tác giả. Cũng đã có báo cáo về việc sử dụng poly(etylenimin) (PEI) theo cách này, chủ yếu tập trung vào việc phân phối oligonucleotit (patent Mỹ số 6,569,528 cấp cho Nam và các đồng tác giả; công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 20040248842 của Wagner và các đồng tác giả). Theo hướng tương tự, Luo và các đồng tác giả, trong bài báo: *Macromolecules* 35:3456 (2002), đã mô tả dendrime polyamidoamin liên hợp với PEG (“PAMAM”) thích hợp để phân phối polynucleotit.

Ngoài nhu cầu hoà tan, phân bố, và phân phối dược chất còn có nhu cầu tìm ra các hệ phân phối dược chất hướng đích mà chuyển đặc hiệu đến mô, khối u, hoặc cơ quan đích. Điều này thường được thực hiện bằng việc gắn kháng thể hoặc các phối tử khác vào thành tế bào ở vị trí đích nhờ ái lực đặc hiệu. Tuy nhiên, trừ các đầu cuối của mạch polyme, PEG chứa nhóm chức, và phần lớn các nhóm ở đầu tận cùng bị hấp thụ theo cách không thể tránh khỏi bởi môi liên kết với hợp phần copolyme khối

khác. Vì lý do này, việc gắn các gốc hướng đích như các kháng thể hoặc phân tử dính bám tế bào với copolyme khối PEG thường chỉ giới hạn ở khối không chứa PEG, mà điều đáng tiếc là đây lại không phải là phần copolyme thường tiếp xúc với vành của tổ hợp tự lắp ráp này.

Hiện tượng tách pha dẫn đến quá trình tự tập hợp của copolyme khối thành tổ hợp polyme lại dễ có tính thuận nghịch, và đã có nỗ lực nhằm gia tăng độ ổn định của tổ hợp này bằng cách tạo liên kết ngang phần lõi kỵ nước (xem tài liệu: Patent châu Âu số EP 0552802). Việc liên kết cộng hoá trị được chắt với hợp phần kỵ nước của copolyme khối cũng đã được dự định (patent Mỹ số 6,623,729 cấp cho Park and Yoo; patent châu Âu số EP 0397307).

Hiện tượng tách pha dẫn đến quá trình tự lắp ráp của copolyme khối thành các tổ hợp polyme lại dễ có tính thuận nghịch, và đã có nỗ lực tìm cách gia tăng độ ổn định của tổ hợp này bằng cách tạo liên kết ngang phần lõi kỵ nước (xem: patent châu Âu số EP 0552802). Việc gắn cộng hoá trị thuốc với hợp phần kỵ nước của copolyme khối cũng đã được dự định (patent Mỹ số 6,623,729 cấp cho Park và Yoo; patent châu Âu số EP 0397307).

Các polyme dạng nhánh cây được liên hợp một cách dễ dàng với gốc hướng đích, và cũng có tiềm năng đối với các tế bào đặc hiệu đích in vivo (Singh et al. (1994) Clin. Chem. 40:1845) và phong bế sự bám dính của các chất gây bệnh là virus và vi khuẩn với chất nền sinh học. Polyme mạch nhánh dạng răng lược và polyme ghép dạng nhánh cây được liên hợp với nhiều axit sialic đã được đánh giá là có khả năng ức chế quá trình ngưng kết hồng cầu virus và ngăn ngừa sự nhiễm khuẩn của các tế bào động vật có vú in vitro (Reuter et al. (1999) Bioconjugate Chem. 10:271). Các chất ức chế virus hiệu quả nhất là các phân tử lớn mạch nhánh dạng răng lược và các phân tử lớn ghép dạng nhánh cây có hoạt tính ức chế virus gấp 50.000 lần.

Gần đây, công ty dược phẩm Starpharma đã thông báo về sự phát triển thành công loại dược chất diệt sinh vật trên cơ sở polyme dạng nhánh cây (VivaGel™) ngăn ngừa được sự nhiễm HIV bằng cách gắn kết với thụ thể trên bề mặt virus (Halford (2005) Chem. & Eng. News 83 (24):30). Chen et al. (2000) (Biomacromolecules. 1:473) đã cho rằng polyme dạng nhánh cây poly(propylenimin) đã được tạo nhóm chức amoni bậc bốn là dược chất diệt sinh vật rất hiệu nghiệm.

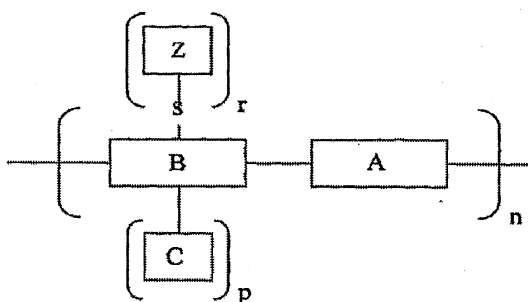
Tuy nhiên, vẫn có nhu cầu tìm ra hệ phân phối dược chất có đặc tính ổn định, tương hợp sinh học, dễ gắn các gốc hướng đích vào phần bên ngoài của tổ hợp, và

phân phối một cách có hiệu quả thuốc đến đích tế bào mong muốn. Ngoài ra, cũng có nhu cầu về chất kháng virus hướng đích có tính ổn định và độ tương hợp sinh học tương tự.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Nhằm đáp ứng nhu cầu nêu trên, mục đích của sáng chế là đề xuất phân tử polyme dạng rắn lược tương hợp sinh học chứa mạch chính ưa nước mang các gốc có điểm phân mạch nhánh và các mạch nhánh kỵ nước được gắn với các gốc có điểm phân mạch nhánh này. Sáng chế còn đề xuất huyền phù chứa tổ hợp polyme được tạo ra từ polyme này trong nước, và đề xuất phương pháp hoà tan các hợp chất hữu cơ không hòa tan hoặc ít tan, chẳng hạn như các dược chất, thuốc nhuộm, vitamin, và các chất tương tự, bằng cách kết hợp các hợp chất này vào phần lõi kỵ nước của tổ hợp polyme đó. Phương pháp hoà tan các chất hữu cơ không hòa tan trong nước vào trong dung môi nước chủ yếu bao gồm bước cho chất hữu cơ không hòa tan trong nước đó tiếp xúc với polyme theo sáng chế trong dung môi nước hoặc hỗn hợp dung môi nước.

Polyme dạng rắn lược này về cơ bản có cấu trúc sau:



1

Cấu trúc này có mạch chính chứa các gốc có điểm phân mạch nhánh B nằm xen kẽ với các khối polyme hòa tan trong nước, ưa nước A. Các mạch bên kỵ nước C và các phối tử Z được gắn vào các gốc có điểm phân mạch nhánh. Tốt hơn là, các mạch bên C là các hydrocarbon mạch thẳng hoặc mạch nhánh, tùy ý được thể bằng một hoặc nhiều phần tử thể ưa nước, hoặc các hydrocarbon vòng hoặc đa vòng có 6-30 nguyên tử C tùy ý được thể bằng một hoặc nhiều phần tử thể ưa nước. Các mạch bên C cũng có thể là các axit amin, peptit, hoặc polyme kỵ nước. Phần tử thể ưa nước thích hợp đối với các mạch bên C là nhóm hydroxyl, carboxy, và amino, cũng như

các nhóm amit, sulfonamit, sulfoxit và sulfon. Phân tử thể ưa nước được ưu tiên là các nhóm không proton phân cực như bậc ba amit, sulfoxit, và sulfon.

Các phối tử Z là các phối tử có ái lực gắn kết đặc hiệu với bề mặt của virus. Thuật ngữ “ái lực gắn kết đặc hiệu” được dùng để chỉ phối tử có khả năng gắn kết với bề mặt của virus in vivo với sự có mặt của nhiều bề mặt và phân tử lớn được tìm thấy trong cơ thể động vật có vú. Nhóm s là liên kết hoặc nhóm đệm, và khi s là nhóm đệm, mỗi s có thể mang từ 1 đến 4 nhóm Z. n có trị số nằm trong khoảng từ 3 đến 100; p có trị số trung bình nằm trong khoảng từ 1 đến 2, và r có trị số trung bình nằm trong khoảng từ 1 đến 4.

Gốc có điểm phân mạch nhánh B là gốc đa hoá trị có các liên kết với hai khối polyme A, liên kết với 1-2 mạch bên C (trung bình), và một hoặc nhiều liên kết với các nhóm đệm “s” và/hoặc phối tử Z. Theo các phương án cụ thể, các liên kết với B và s và/hoặc Z được thiết lập qua nhiều nhóm chức dễ phản ứng, chúng có khả năng dùng làm các điểm gắn kết. Theo phương án được đặc biệt ưu tiên, gốc hướng đích như phối tử hoặc kháng thể được liên kết cộng hoá trị với gốc có điểm phân mạch nhánh của polyme theo sáng chế, và được chất được kết hợp vào lõi của các tổ hợp, để tạo ra phức hợp được chất hướng đích.

Sáng chế cũng đề xuất phân tử polyme dạng răng lược tương hợp sinh học như được mô tả trên đây, thậm chí là khi không có mặt của chất điều trị phân tử nhỏ vốn có đặc tính kháng virus. Hoạt tính kháng virus này được cho là do khả năng giống chất tẩy rửa của polyme lưỡng tính làm phá vỡ lớp vỏ ngoài của các hạt virus. Theo các phương án được ưu tiên, hoạt tính kháng virus được tăng cường bằng cách gắn gốc hướng đích có ái lực gắn kết với bề mặt của virion cần hướng đích.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp điều chế polyme dạng răng lược, các tổ hợp, và các tổ hợp polyme và phức hợp được chất hướng đích được mô tả trong bản mô tả này. Polyme theo sáng chế tự tập hợp thành các tổ hợp polyme có tác dụng hoà tan, phân bố, và phân phối một cách có hiệu quả được chất in vivo; có hoạt tính kháng virus; không độc, tương hợp sinh học, và ổn định; và có khả năng mang gốc hướng đích là nhiều tế bào và virus trên các bề mặt bên ngoài của chúng.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 là thể hiện tác dụng của việc sử dụng chế phẩm theo sáng chế đến thời gian sống trung bình của chuột nhắt bị nhiễm virus cúm.

Fig.2 thể hiện mức tăng thời gian sống của chuột nhắt bị nhiễm virus cúm khi được điều trị bằng chế phẩm theo sáng chế.

Fig.3 thể hiện mức giảm trọng lượng trong khoảng thời gian 7 ngày của chuột bị nhiễm virus cúm khi được điều trị bằng chế phẩm theo sáng chế.

Mô tả chi tiết sáng chế

Polyme theo sáng chế, được gọi trong bản mô tả này là “ π -polyme”, có kiểu cấu trúc dạng răng lược, với mạch chính được tạo ra từ các gốc chứa điểm phân mạch nhánh B xen kẽ với khối polyme hòa tan trong nước, ưa nước A; và có nhiều mạch bên kỵ nước C được gắn với mỗi gốc có điểm phân mạch nhánh, như được thể hiện trong Công thức 1. Mạch bên C là các nhóm kỵ nước, tương đối ngắn mà có thể là các phân tử, mạch hoặc oligome béo. Lý tưởng, nếu trị số của p là số nguyên bằng 2, 3, hoặc 4. Trên thực tế, thông qua các phản ứng hoá học, phổ biến là tạo ra mạch bên với hiệu quả không được thật hoàn hảo, điều này dẫn đến trị số trung bình của p trong quá trình điều chế polyme xét về tổng thể không phải là số nguyên như dự tính. Ngoài ra, cũng có thể thu được các trị số trung bình không phải là số nguyên theo thiết kế, như được bàn luận sau đây. Do đó, trị số trung bình của p trong polyme theo sáng chế là lớn hơn một và có thể có thể lên đến bốn ($1 < p \leq 4$). Theo các phương án được ưu tiên, trị số p nằm trong khoảng từ 2 đến 4, và tốt nhất là $1,5 < p \leq 2$.

Khối polyme của mạch chính A được chọn từ các mạch polyme ưa nước và/hoặc hòa tan trong nước, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở poly(etylen glycol), poly(propylen glycol), poly(etylen imin), poly(rượu vinylic), poly(vinylpyrrolidon), polysacarit, và các chất tương tự. Tốt hơn nếu, các đơn vị polyme A là các mạch poly(etylen glycol) có công thức $-(CH_2CH_2O)_m-$ trong đó m nằm trong khoảng từ 1 đến 10000, tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 3 đến 3000.

Trong quá trình sản xuất poly(etylen glycol) với các loại khác nhau, trong công nghiệp đã biết các phương pháp liên hợp gốc liên kết hoá trị hai (ví dụ, bisphenol A diglycidyl ete) với hai mạch poly(etylen glycol), điều này giúp cho có thể gấp đôi một cách hữu hiệu trọng lượng phân tử của polyme đồng thời vẫn duy trì

khoảng trọng lượng phân tử tương đối thấp. Do vậy, các phân tử “poly(etylen glycol)” thu được này bị ngắt ở giữa mạch polyme bởi các gốc liên kết phi glycol (xem, ví dụ, sản phẩm cộng ete poly(etylen glycol)-bisphenol A diglycidyl, đăng ký CAS (Chemical Abstracts Services) số 37225-26-6). Ngoài ra, cũng đã biết các oligome cao, tức là các oligome có ba mạch PEG được phân cách dưới nhau bởi hai gốc ete bisphenol A diglycidyl, xem, ví dụ, công bố đơn quốc tế số WO 00/24008. Do đó, các thuật ngữ “poly(etylen glycol)” và “poly(propylen glycol)” bao gồm poly(etylen glycol) và các mạch polyme poly(propylen glycol) kết hợp các đơn vị liên kết phi glycol, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở ete bisphenol A diglycidyl, ete bisphenol B diglycidyl, ete bisphenol S diglycidyl, ete hydroquinon diglycidyl, và các ete tương tự. Đối với mục đích của bản mô tả này, không tính các gốc liên kết bất kỳ như vậy là “đơn vị monome”.

Tốt nhất là khối polyme A này có chiều dài trung bình nằm trong khoảng từ hai mươi đến năm mươi đơn vị monome. Các mạch polyetylen glycol có thể được thế ở đầu cuối bằng các nhóm chức thích hợp để dùng làm liên kết với các gốc khác, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở các nhóm amino, mercapto, acrylat, acrylamit, maleat, maleimit, và các gốc tương tự, ở một hoặc cả hai đầu cuối. Trị số của n nằm trong khoảng từ 1 đến 1000 và tốt hơn là nằm trong khoảng từ 3 đến 100. Trọng lượng phân tử trung bình của π -polyme có thể thay đổi trong khoảng từ 1000 đến 100000 dalton hoặc lớn hơn; tốt hơn là lớn hơn 2000 dalton, và tốt hơn nữa là lớn hơn 7000 dalton.

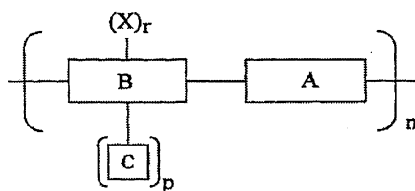
Các nhóm kỵ nước C có thể là giống nhau hoặc khác nhau, và có thể ví dụ là các hydrocacbon mạch thẳng (tùy ý được thế bằng một hoặc nhiều phân tử thế ưa nước), các hydrocacbon đa vòng (tùy ý được thế bằng một hoặc nhiều phân tử thế ưa nước), axit amin, peptit và polyme kỵ nước. Các phân tử thế ưa nước thích hợp bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở các nhóm chức hydroxyl, ete, xyano, và amit. Được đặc biệt ưu tiên là các gốc C_8 đến C_{20} alkyl mang các phân tử thế ω -hydroxy, ω -xyano, ω -amido, hoặc ω -alkoxy. Trong bản mô tả này, thuật ngữ “phân tử thế” bao gồm cả việc thế một nguyên tử khác loại, như nguyên tử O, N, hoặc S cho nguyên tử cacbon trên mạch hydrocacbon hoặc hệ nhân của gốc C. Do đó, các liên kết ete và amit, và các nhân dị vòng, có thể được đưa vào gốc C.

Tốt hơn, nếu các nhóm kỵ nước C là các mạch béo có từ 8 đến 20 nguyên tử cacbon tương đối ngắn, nhưng cũng có thể là oligome mạch ngắn. Oligome thích hợp

bao gồm các oligo axit hydroxy chẳng hạn như poly(axit glycolic), poly(axit DL-lactic), poly(axit L-lactic), và copolyme của poly(axit glycolic) và các axit poly(axit lactic)hydroxy, và poly(axit amin), poly(anhydrit), poly(orthoeste), và poly(phosphoeste), polylacton chẳng hạn như poly(epsilon-caprolacton) poly(delta-valerolacton) poly(gama-butyrolacton) và poly(beta-hydroxybutyrat). Các gốc C cũng có thể được chọn từ các phân tử kỵ nước, chẳng hạn như cholesterol, axit cholic, axit lithocholic, peptit kỵ nước, và các chất tương tự. Trọng lượng phân tử của mỗi gốc C là lớn hơn 40, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 50 đến 1000, và tốt nhất nếu nằm trong khoảng từ 100 đến 500. Trị số logP (octanol-nước) của phân tử C-H là lớn hơn khoảng 1,4, và tốt hơn là lớn hơn khoảng 2,0, và tốt hơn nữa là lớn hơn khoảng 2,5. Nói chung, gốc C bất kỳ được cho là thích hợp để sử dụng trong sáng chế nếu phân tử C-H hầu như không hòa tan trong nước. Thuật ngữ “hầu như không hòa tan” được dùng để chỉ phân tử C-H ở dạng lỏng tạo ra pha tách biệt khi trộn lẫn với nước.

Một đặc điểm đặc trưng của polyme dạng rắn lược theo sáng chế đó là mạch bên C không phân bố đều và đồng nhất dọc theo mạch polyme, mà đúng hơn là xuất hiện thành từng cụm $[C]_p$. Các cụm này cách nhau một cách đều đặn nhiều hoặc ít hơn dọc theo mạch polyme, tùy thuộc vào mức độ đồng nhất phân tử của đơn vị polyme A. Do đó, khoảng cách giữa hai mạch bên C gắn với gốc tạo mạch nhánh chung B là khác với khoảng cách giữa hai mạch bên gắn với các gốc tạo mạch nhánh khác.

Theo một phương án đặc biệt thích hợp của sáng chế, các gốc có điểm phân mạch nhánh B còn chứa một hoặc nhiều nhóm chức dễ phản ứng X, như được thể hiện trong Công thức 2.



Trong Công thức 2, từng nhóm dễ phản ứng X có thể là giống nhau hoặc có thể là khác nhau, và tùy ý có thể được phong bế hoặc được bảo vệ khi cần thiết trong quá trình lắp ráp polyme 2. Trị số trung bình của r sẽ thay đổi trong khoảng từ 0 (không có nhóm X) đến khoảng 4. Thông thường, các nhóm dễ phản ứng này sẽ được chọn từ các nhóm chức đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này hữu ích cho việc tạo thành

các mối liên kết cộng hoá trị giữa các loài phân tử. Các nhóm này X có tác dụng làm điểm gắn kết cho các phân tử thuốc, các gốc hướng đích mô hoặc tế bào, các gốc hướng đích virus, hoặc các gốc gắn với chất mang (chẳng hạn như cho mục đích bao phủ lên bề mặt của stent hoặc dụng cụ y tế khác). Theo một số phương án, có thể có một điểm đính X. Theo một phương án khác, có thể ba hoặc bốn dạng nhóm dễ phản ứng khác nhau. Gốc gắn với chất mang có thể gắn với chất mang thông qua các mối liên kết cộng hoá trị, các tương tác đặc hiệu không phải là cộng hoá trị (ví dụ, các tương tác kháng thể-kháng nguyên, hoặc không đặc hiệu (ví dụ, thông qua việc cặp đôi ion hoặc tương tác "kỵ nước"). Các nhóm dễ phản ứng thích hợp X bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở -OH, -NH₂, -SH, -CHO, -NHNH₂, -COOH, -CONHNH₂, haloaxyl, acetoaxetyl, -CN, -OCN, -SCN, -NCO, -NCS, và các nhóm tương tự; mỗi liên kết đôi dễ phản ứng chẳng hạn như vinylic, acrylic, allylic, maleic, ximamic, và các mối liên kết tương tự, và các nhóm có mỗi liên kết ba dễ phản ứng chẳng hạn như axetylenecarboxy và axetylenecarboxamido (thích hợp cho các phản ứng cộng Michael, phản ứng Diels-Alder, và các phản ứng cộng gốc tự do).

Các gốc hướng đích tế bào ví dụ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các phối tử đặc hiệu với thụ thể, kháng thể, và các gốc hướng đích khác, chẳng hạn như peptit có trình tự axit amin Arginin-Glyxin-axit Aspartic (RGD) hoặc motif Tyrosin - Isoloxin-Serin-Arginin-Glyxin (YISRG); các yếu tố sinh trưởng bao gồm yếu tố phát triển biểu bì, yếu tố phát triển mạch nội mô và yếu tố phát triển nguyên bào sợi; các phối tử bề mặt virus chẳng hạn như axit sialic và các dẫn xuất axit N-axetylneuraminic; các phối tử thụ thể tế bào chẳng hạn như folat, methotrexat, axit pteric, estradiol, estratriol, testosterone, và các hormon khác; manozơ-6-phosphat, các đường, các vitamin, tryptophan, và các chất tương tự. Tốt hơn nếu kháng thể là kháng thể đơn dòng hướng đến các kháng nguyên bề mặt đặc hiệu tế bào; các gốc hướng đích thích hợp bao gồm không chỉ kháng thể đầy đủ mà còn bao gồm mảnh kháng thể chứa trình tự gắn kết kháng nguyên hoạt tính, chẳng hạn như mảnh Fab'2, mảnh Fab', hoặc chất tương tự peptit mạch ngắn của trình tự gắn kết với kháng nguyên hoạt tính của các kháng thể như vậy.

Ví dụ về các gốc hướng đích virus bao gồm các phối tử phân tử nhỏ gắn kết với virus, chẳng hạn như aminoalkyladamantan, Fuzeon™, PRO-542, BMS-488043, axit sialic, axit 2-đeoxy-2,3-diđehydro-N-axetylneuraminic, 4-guanidino-Neu5Ac2en (zanamivir), oseltamivir, RWJ-270201, và các phối tử tương tự; oligopeptit, oligosacarit, và glycopeptit gắn kết với bề mặt virus, và kháng thể và mảnh kháng thể

hướng đến các kháng nguyên bề mặt đặc hiệu của virus. Theo các phương án được ưu tiên, sáng chế đề xuất π -polyme mang các phối tử cho neuraminidaza hoặc hemagglutinin (chất ngưng kết tổ hồng cầu) của virus. Đã biết rõ rằng bản thân các polyme như vậy có hoạt tính kháng virus; xem chẳng hạn T. Masuda và các đồng tác giả, *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 51:1386-98 (2003); M. Itoh và các đồng tác giả, *Virology* 212:340-7 (1995), và Reece và các đồng tác giả, patent Mỹ số 6,680,054 (2004). Phần lõi kỵ nước của polyme và tổ hợp polyme kháng virus theo sáng chế có thể tùy ý được nạp một hoặc nhiều thuốc kháng virus thông thường, mà tốt hơn nếu thuốc này được giải phóng ở vùng ngay cận hạt virus.

Các nhóm gắn khác có liên quan đến mục đích y học có thể là các hoá chất phân tử nhỏ, peptit, kháng thể hoặc mảnh kháng thể, enzym, hoặc các dược chất, các chất này có thể ảnh hưởng đến các quy trình sinh học chẳng hạn như hormon hoặc các chất chủ vận hoặc chất đối kháng hormon, các chất gây ảnh hưởng đến sự gắn kết của virus, các chất gây ảnh hưởng đến chu trình tế bào hoặc các quá trình trong tế bào sau khi thâm nhập vào nội bào, và các chất tương tự. Có thể nhằm đích đến các tế bào của sinh vật đơn bào và đa bào, bao gồm vi khuẩn, nấm, động vật bậc cao hơn, và thực vật. Biotin có thể gắn với π -polyme và được sử dụng làm điểm gắn kết cho các protein, peptit được liên hợp với avidin và streptavidin, và các chất đích hoặc dược chất khác chẳng hạn như kháng thể, hormon sinh trưởng, các thuốc thử hiện hình ảnh, và các chất tương tự.

“Chất mang” dùng để chỉ các chất liệu, bề mặt, chất kết động hữu cơ hoặc vô cơ chẳng hạn như thủy tinh, bề mặt của silic oxit hoặc kim loại, chất mang ngoại bào, chất kết động protein chẳng hạn như vùng hoại tử dạng tinh bột thuộc các dạng khác nhau, bề mặt tế bào, bề mặt virus, và các bề mặt đồng nhất hoặc không đồng nhất mà nói chung có thể hoặc không thể được đặc tả kỹ, bao gồm các prion.

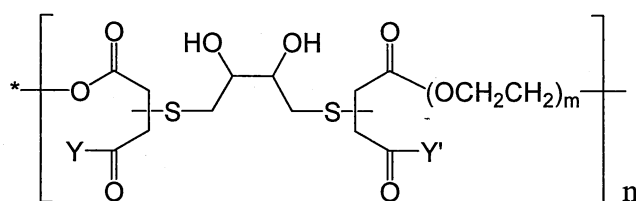
Ví dụ về các gốc gắn với chất mang thủy tinh hoặc silic đioxit bao gồm các halosilan, alkoxysilan, axylsilan khác nhau cũng như các hoá chất có các nhóm chức như vậy kể cả polyme. Các gốc gắn khác có thể được tạo ra tùy theo các đặc tính hóa lý cụ thể của chất mang. Các gốc gắn thích hợp, ví dụ như các nhóm được sử dụng trong lớp bao stent, là đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Theo khía cạnh thứ ba của sáng chế, các gốc có điểm phân mạch nhánh B được nối với các gốc khác có điểm gắn kết mạch nhánh ở đâu đó trong mạch polyme để tạo ra cấu trúc hydrogel được tạo liên kết ngang. Có thể tạo ra liên kết ngang như

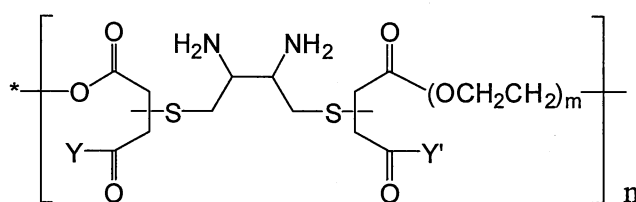
vậy bằng cách cho polyme phản ứng với các gốc đa chức mà chứa các nhóm chức đồng nhất hoặc các nhóm chức khác nhau, ít nhất một gốc trong đó phản ứng với X hoặc nhóm dễ phản ứng trên C nằm ở gốc có điểm phân mạch nhánh thứ nhất, và ít nhất một trong số gốc này phản ứng với X hoặc với nhóm chức dễ phản ứng có mặt trên C ở nhóm tạo điểm phân mạch nhánh thứ hai. Cũng có thể tạo ra liên kết ngang thông qua liên kết với các nhóm chức đầu tận của mạch polyme A. Polyme được tạo liên kết ngang như vậy tùy ý có thể chứa các nhóm chức dễ phản ứng thích hợp cho việc gắn các phân tử thuốc hoặc các gốc hướng đích.

Thông thường, gốc có điểm phân mạch nhánh B thu được từ phân tử đa chức có nhiều nhóm dễ phản ứng, hai trong số các nhóm này thích hợp để gắn với đơn vị polyme ưa nước A, và hai trong số các nhóm này thích hợp để gắn các nhóm kỵ nước C. Gốc B có thể tùy ý có các nhóm dễ phản ứng X bổ sung như đã nêu trên.

Các nhóm là điểm phân mạch nhánh được ưu tiên đặc biệt là các liên hợp của dithiothreitol (DTT), dithioerytritol (DTE), hoặc 2,3-điaminobutan-1,4-đithiol với hai phân tử axit maleic. Kết hợp của gốc có điểm phân mạch nhánh này với gốc A là polyetylen glycol tạo ra mạch chính polyme có công thức 3 và 3a:



3



3a

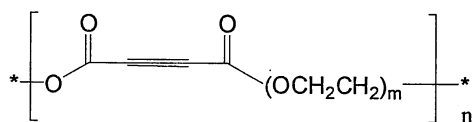
trong đó Y và Y' có thể là giống nhau hoặc khác nhau, và tốt hơn nếu được chọn từ OH, NH₂, ONH₂, NHOH, và NHNH₂. Theo một phương án được ưu tiên, các nhóm hydroxyl hoặc amino của dithiol này là các nhóm dễ phản ứng X, có tác dụng làm các điểm gắn kết cho các gốc hướng đích hoặc các gốc thuốc, trong khi đó các nhóm chức Y và Y' đóng vai trò như là các điểm gắn kết cho các gốc C. Theo cách khác,

các nhóm Y và Y' này có thể đóng vai trò như là các điểm gắn kết, còn các nhóm hydroxyl hoặc amino được sử dụng để gắn các gốc C.

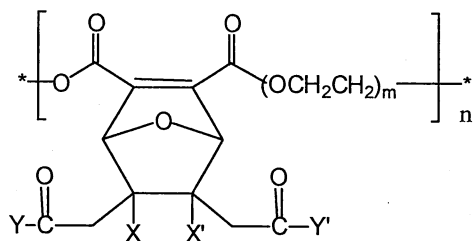
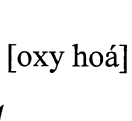
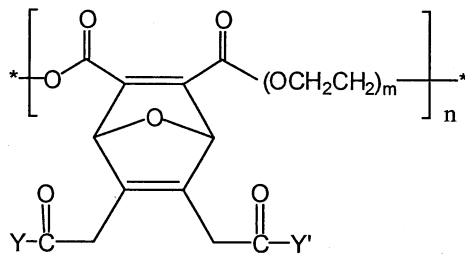
Các công thức 3 và 3a được dự định để nêu ra rằng mỗi nguyên tử lưu huỳnh có thể độc lập được gắn với nhóm carbonyl của este PEG ở vị trí alpha hoặc beta. Sáng chế bao gồm chế phẩm đồng phân đơn cũng như các hỗn hợp của các đồng phân vị trí ở một hoặc cả hai liên kết C-S. Ngoài ra, do có bốn nguyên tử cacbon bất đối trong Công thức 1, sáng chế bao gồm tất cả các đồng phân không đối xứng, chất đồng phân phân không quang hoạt (đồng phân meso), và chất đồng phân không đối quang và các hỗn hợp của chúng.

Sản phẩm cộng Diels-Alder của axit axetylen dicarboxylic và furan cũng có thể đóng vai trò như làm gốc có điểm phân mạch nhánh thích hợp. Ví dụ, đã biết rằng polyeste có công thức 4 thu được từ PEG và axit axetylen dicarboxylic có thể tham gia phản ứng Diels-Alder với furan (M. Delerba và các đồng tác giả, *Macromol. Rapid Commun.* 18(8):723-728 (1997)). Do đó, chất này có thể được xử lý bằng phản ứng Diels-Alder với furan được thể ở hai vị trí 3,4 để tạo ra chất chẳng hạn như chất có công thức 5, và polyme có công thức 5 có thể được cải biến bằng phản ứng hydroxyl hoá hoặc epoxy hoá để tạo ra các nhóm để phản ứng (ví dụ, X và X' trên Sơ đồ 1).

19984



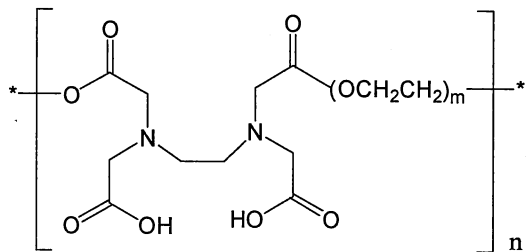
4



5

Sơ đồ 1

Tương tự, phản ứng của PEG với dianhydrit của axit etylenđiamin tetraaxetic sẽ tạo ra polyeste có công thức 6:

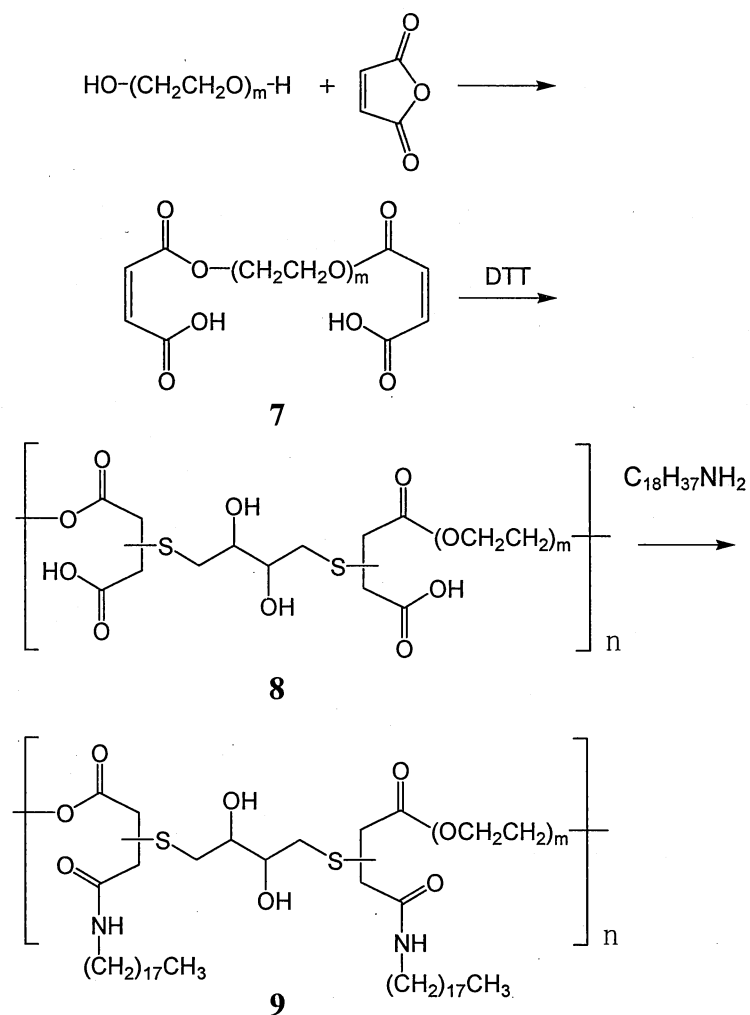


6

Các gốc có điểm gắn mạch nhánh thích hợp khác có thể thu được từ axit tartaric, axit etylenđicarboxylic, axit trilotriaxetic, dianhydrit của axit 3,4,3',4'-điphenyl sulfon tetracarboxylic, dianhydrit của axit 3,4,3',4'-điphenyl ete tetracarboxylic, dianhydrit pyromelitic, các alkandithiol chẳng hạn như 1,2-etandithiol và 1,4-butandithiol, bis(2-mercaptoetyl)ete, 2-mercaptoethylsulfua, đimercaptopropanol, đimercaptopurin, đimercaptothiadiazol, axit đimercaptosuccinic, benzendimetanthiol, benzendithiol, các benzendimetanthiol được dihalogen hoá, 4,4'-thiobisbenzenthiole được dihalogen hoá, và các chất tương tự.

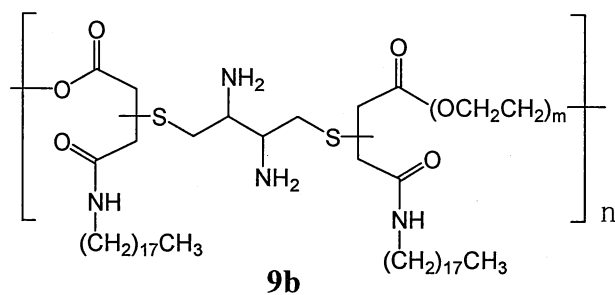
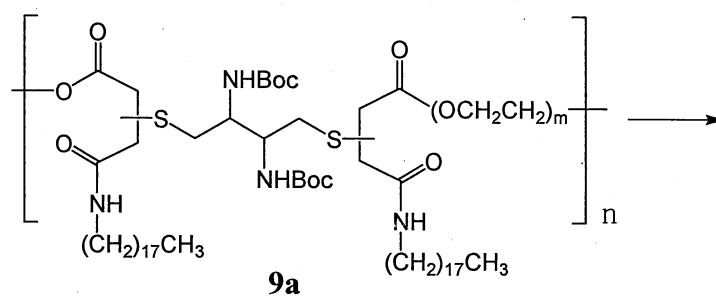
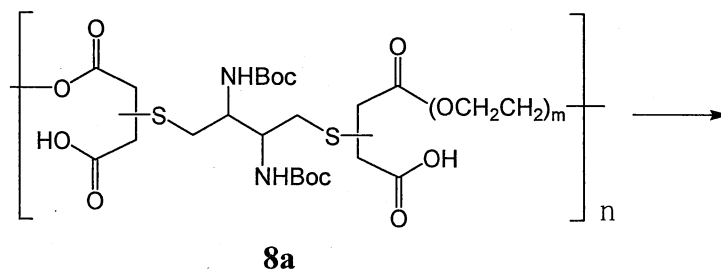
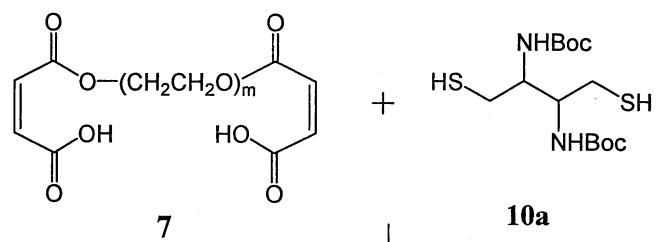
Khi Y và Y' là OH, các nhóm kỵ nước C có thể được liên kết với polyme bằng cách amit hoá hoặc este hoá các nhóm của axit carboxylic. Tốt hơn, nếu các nhóm kỵ nước C này chủ yếu là các nhóm hydrocacbon và có kích cỡ tương đối nhỏ (C_8-C_{20}), và có thể là mạch thẳng hoặc mạch nhánh hoặc chứa một hoặc nhiều nhân. Ví dụ bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở các nhóm thu được từ các phân tử C-H, n-octanol, n-decanol, n-dodecylamin, n-pentadecylamin, cholesterol, và axit cholic được liên kết cộng hoá trị. Mặc dù, để thuận tiện polyme theo sáng chế được thể hiện là có nhiều nhất hai mạch bên kỵ nước khác nhau, nhưng cần phải hiểu rằng các hỗn hợp của hai hoặc nhiều hợp chất kỵ nước có thể được sử dụng để tạo ra nhiều mạch bên kỵ nước gắn vào mỗi polyme cụ thể.

Như là một ví dụ cụ thể, polyme có công thức 2, trong đó $X = OH$ và $r = 2$, được điều chế bằng cách cho polyetylen glycol phản ứng với anhydrit maleic để tạo ra polyeste 7, sau đó phản ứng với dithiothreitol để tạo ra hợp chất có công thức 8. Sau đó, axit có công thức 7 này được amit hoá bằng n-octadecylamin để tạo ra polyme dạng rắn lược mong muốn 9 (Sơ đồ 2). Polyme dạng rắn lược amit được dẫn xuất từ DTT được thể hiện bằng công thức 9 được đề cập trong bản mô tả này là " π -Polyme A"; polyme có công thức 9 cụ thể Sơ đồ 2 sẽ được ký hiệu là " C_{18} - π -Polyme A".



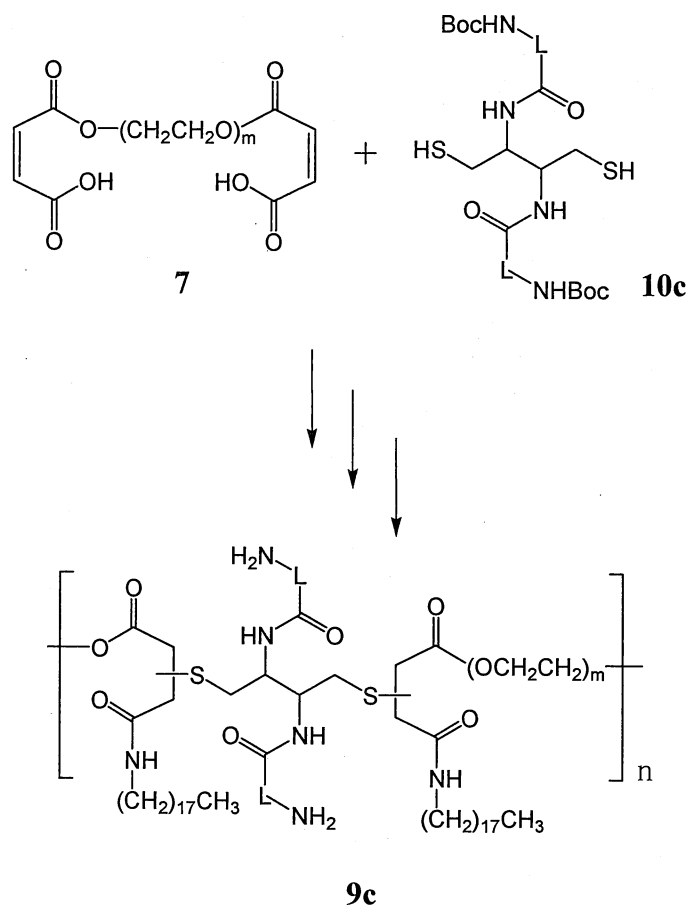
Sơ đồ 2

Việc thay thế 2,3-bis(t-butoxycarbonylamino)butan-1,4-đithiol (điều chế được bằng phương pháp của DuPriest và các đồng tác giả, trong patent Mỹ số 4,755,528) cho dithiothreitol, sau khi khử bảo vệ, dẫn đến tạo ra π -polyme được tạo nhóm chức amino tương ứng có công thức 9b (Sơ đồ 3).



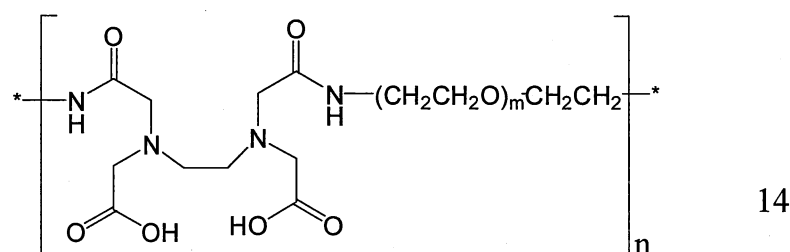
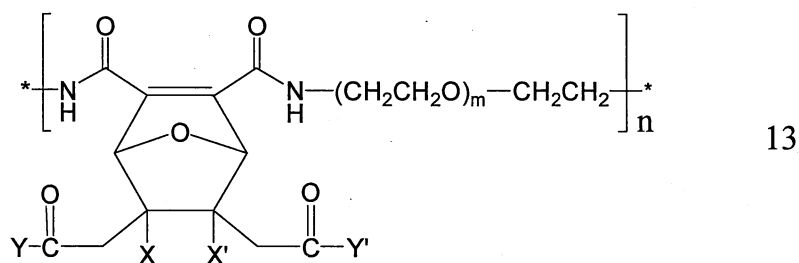
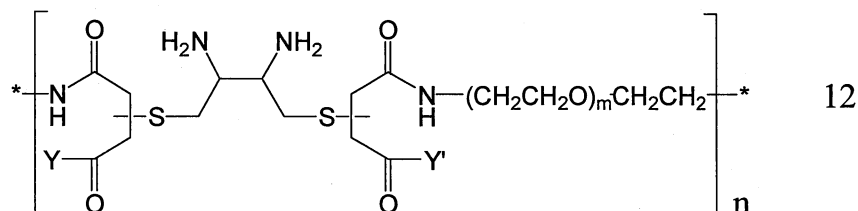
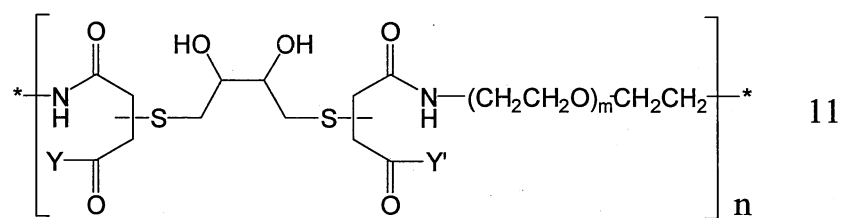
Sơ đồ 3

Tương tự, việc sử dụng butandithiol có công thức 10c tạo ra polyme có công thức cấu trúc tổng quát 9c, với nhóm đệm L thay cho việc gắn sau đó các gốc hướng đích (Sơ đồ 4). Các nhóm đệm L này có thể là nhóm đệm bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này sử dụng để gắn các phối tử hoặc các nhãn với các phân tử chất nền, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở nhóm đệm alkylene C₂ đến C₂₀ và oligo(etylen glycol) có từ 1 đến 10 đơn vị -CH₂CH₂O-.

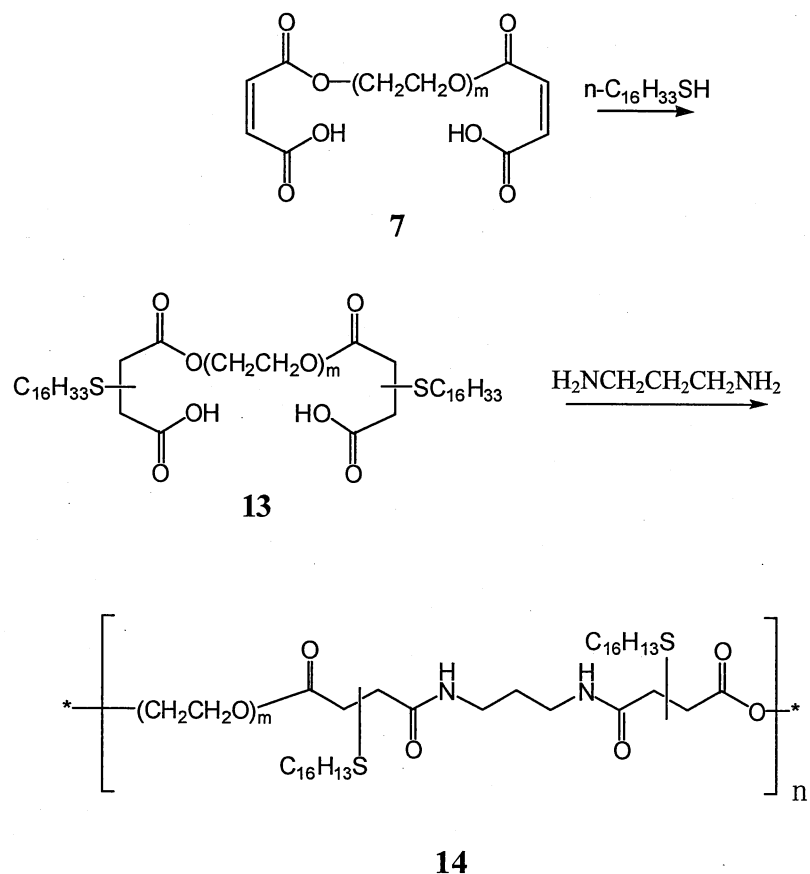


Sơ đồ 4

Theo các phương án khác, có thể sử dụng polyme PEG với các nhóm amino đầu tận để điều chế các ví dụ có các mối liên kết amit giữa các đơn vị A và B, như được thể hiện trong các cấu trúc 10-14 sau đây. Mỗi trong số các polyamit này có thể được tạo dẫn xuất thông qua phản ứng của PEG điamin $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}_2$ với anhydrit mạch vòng thích hợp:

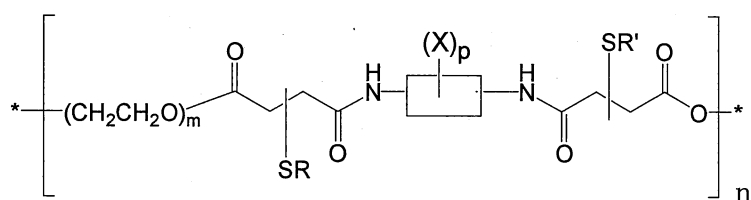
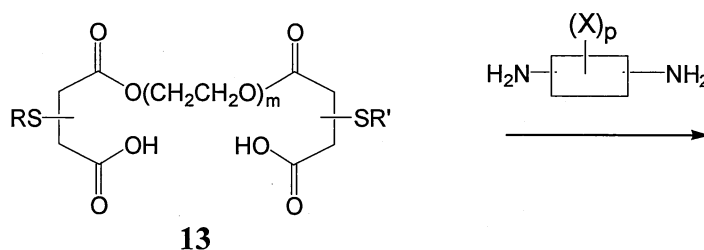
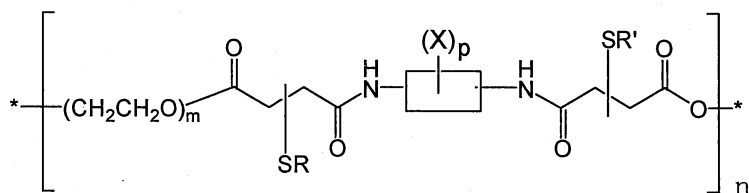
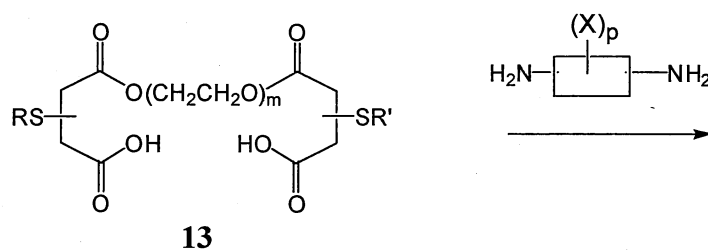


Ở các điều kiện phản ứng nhẹ nhàng, các axit amido nêu trên là các sản phẩm dự tính. Khi gia nhiệt, có thể mong đợi là tạo ra imit, dẫn đến việc tạo thành polyme với ít nhóm dễ phản ứng hơn nhưng vẫn thích hợp để gắn các gốc kỵ nước C. Theo cách khác, mạch bên nằm bên C có thể được cộng vào đầu cuối của khối polyme A, và các gốc có điểm phân mạch nhánh có thể được tạo ra ở thời điểm polyme hoá (Sơ đồ 5).



Sơ đồ 5

Ngoài các điamin đơn giản như 1,3-điaminopropan, như được thể hiện trong Sơ đồ 5, có thể sử dụng các điamin có các nhóm chức dễ phản ứng X (tùy ý được che dấu) để tạo ra polyme có công thức 15 thích hợp để gắn các gốc hướng đích (Sơ đồ 6). Trong công thức sau đây, p có thể thay đổi trong khoảng từ 0 đến 4, và mỗi X độc lập là giống nhau hoặc khác với nhóm X bất kỳ khác có thể có mặt. Nhóm dễ phản ứng X không nhất thiết là nhóm bên, nhưng có thể ví dụ là nhóm NH trong mạch các nguyên tử tạo thành điamin, như trong monome $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}_2$.



15

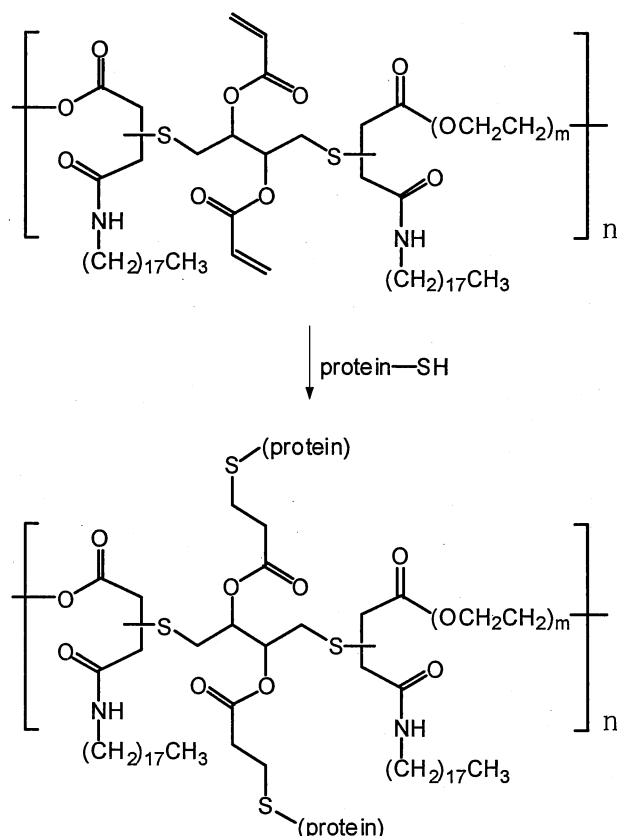
Sơ đồ 6

Một số π -polyme được điều chế như trên có các nhóm dễ phản ứng X thích hợp để tạo dẫn xuất tiếp để gắn các gốc hướng đích chẳng hạn như các phân tử nhỏ, peptit, nucleotit, đường, kháng thể, v.v., hoặc để tạo ra liên kết ngang giữa các mạch polyme thông qua các chất tạo liên kết ngang lưỡng chức hoặc đa chức. Theo các phương án đặc biệt, việc dẫn xuất hoá một phần các nhóm dễ phản ứng trên mạch

polyme được thực hiện để tạo ra π -polyme có nhiều nhóm dễ phản ứng khác nhau, cho phép gắn nhiều gốc hướng đích và các gốc thuốc vào một mạch polyme. Do đó, việc cộng hợp một lượng thấp hơn hệ số tỷ lệ của acryloyl clorua (hoặc anhydrit maleic) vào π -polyme của Ví dụ 1 sẽ tạo ra polyme có cả hai dạng nhóm acryloyl (hoặc maleyl) và các nhóm hydroxyl còn lại. Phản ứng cộng Michael tiếp theo với axit mercapto-carboxylic với một lượng thấp hơn hệ số tỷ lệ, ví dụ như HS-(CH₂)₃-COOH, sẽ tạo ra polyme với các nhóm hydroxyl, acryloyl, và carboxyl. Phản ứng cộng hợp với xystein đưa thêm các nhóm amino và carboxyl, ngoài các nhóm dễ phản ứng còn lại bất kỳ sau đó bằng cách dùng chất phản ứng với một lượng thấp hơn hệ số tỷ lệ.

Một phương pháp khác tạo ra π -polyme đa chức bao gồm việc loại bỏ có tính toán một phần của các mạch kỵ nước C. Ví dụ, π -polyme ở Ví dụ 1 có thể được điều chế với các nhóm axit carboxylic không phản ứng bằng phương cách đơn giản là loại bỏ lượng alkylamin tạo mạch bên trong bước amit hoá. Còn một phương pháp khác là amit hoá bằng hỗn hợp các amin, mà một phần của nó chứa nhóm dễ phản ứng X. Ngoài ra, ở điều kiện thích hợp (dư anhydrit maleic trong bước A và dư DTT trong bước B), có thể tạo ra chế phẩm polyme có vùng nhóm thiol tự do mong muốn.

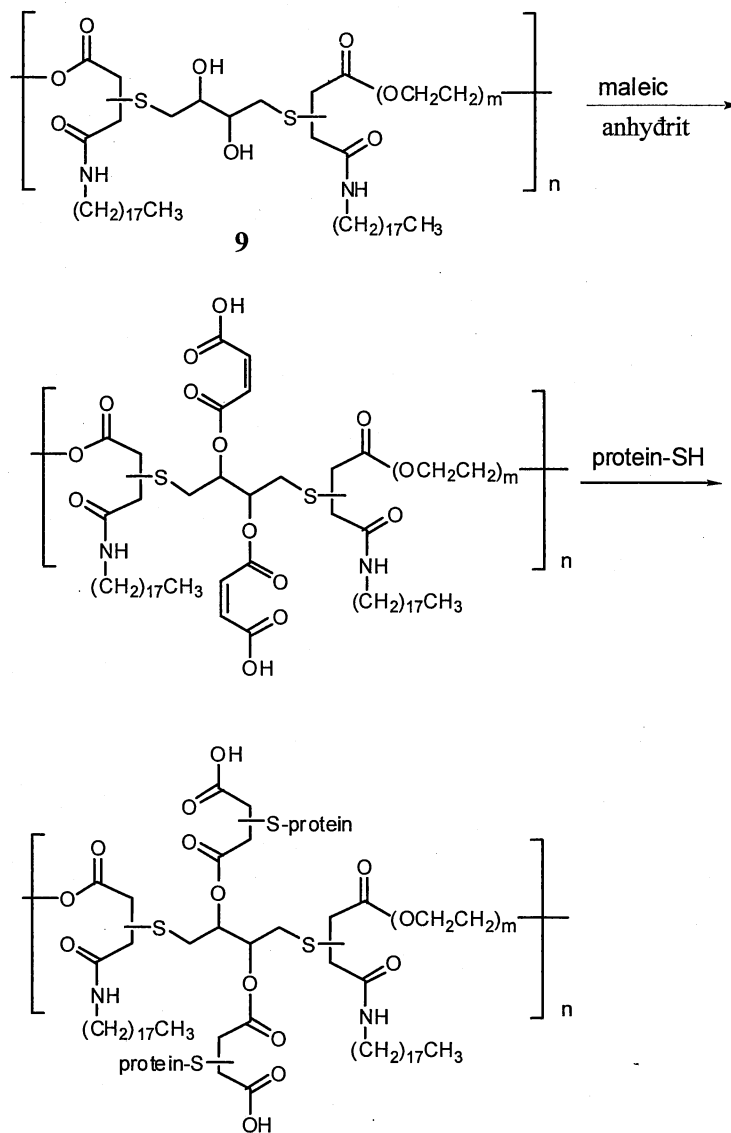
Bằng cách thiết kế, π -polyme của Ví dụ 1 chứa các nhóm hydroxyl thu được từ gốc DTT trong mạch chính, nhóm này đóng vai trò như là các nhóm dễ phản ứng X. Este hoá các nhóm này bằng acryloyl clorua hoặc metacryloyl clorua trong môi trường nước với sự có mặt của dung dịch đệm cacbonat/bicacbonat dẫn đến việc thay thế acryloyl trên các nhóm -OH. Polyme được acrylat hoá này có thể được xử lý trùng hợp gốc một cách dễ dàng (có hoặc không có monome gốc bổ sung như hợp chất acrylic hoặc mối liên kết ngang chẳng hạn như hợp chất bisacrylic) để thu được hydrogel thích hợp để phân phối được chất có kiểm soát (có vai trò như viên thuốc lớn polyme hoặc viên cấy dưới da) và dùng cho các ứng dụng khu trú (chẳng hạn như cao dán lên da hoặc thuốc mỡ). Ngoài ra, nhóm acryl cũng có thể được xử lý bằng phản ứng cộng Michael, đặc biệt là, với thiol, chẳng hạn như thiol trong gốc xystein ở protein, enzym, peptit, kháng thể, mảnh Fab'2 hoặc mảnh Fab', hoặc gốc hướng đích khác (Sơ đồ 7).



Sơ đồ 7

Sau khi làm khô, π -polyme có các nhóm hydroxyl dễ phản ứng cũng có thể được este hoá bằng anhydrit maleic để gắn nhóm maleat nhóm, chất nhận Michael, đồng thời tạo ra nhóm carboxylic tự do. Trong polyme thu được, đã sẵn có mối liên kết đôi maleic cho phản ứng cộng Michael, đặc biệt là, với thiol, chẳng hạn như liên kết đôi của gốc xystein trong protein, enzym, peptit, kháng thể, mảnh Fab'2 hoặc mảnh Fab', hoặc gốc hướng đích khác (Sơ đồ 8), và sẵn có nhóm carboxyl để thực hiện phản ứng liên hợp với các nhóm amino của các thuốc hoặc phối tử, hoặc gốc lysin trong các protein và peptit.

Có thể gắn tiếp nhóm khác với nhóm carboxylic mới được tạo ra (hoặc sẵn có từ trước) thông qua phản ứng amit hoá. Do đó, có thể gắn ít nhất hai gốc hướng đích khác nhau ngay cả ở các điều kiện phản ứng bão hoà (tức là các gốc sẽ được gắn có mặt với một lượng dư theo hệ số tỷ lượng).



Polyme mang các nhóm carboxylat mạch bên có thể được amit hoá bằng amin ở điều kiện phản ứng phản ứng liên hợp thông thường, và chúng cũng có thể được chuyển hoá thành các nhóm isoxyanat thông qua phương pháp tái bố trí Curtius và sau đó được liên hợp với amin hoặc rượu để lần lượt tạo thành ure và carbamat. Các phản ứng như vậy có thể được sử dụng để đưa các nhóm kỵ nước C vào, hoặc để gắn các gốc hướng đích.

Có thể đưa amin tự do vào polyme bằng cách ít nhất thực hiện phản ứng ít nhất một phần một trong số các nhóm để phản ứng với điamin. Điamin này phải được lựa chọn sao cho một trong số các nhóm amin hoặc là được bảo vệ hoặc không có tính phản ứng ở các điều kiện phản ứng. Phương pháp sau có thể thường được thực hiện bằng cách sử dụng etylendiamin ở độ pH vào khoảng 7,5, vì hệ số pKa của hai

nhóm amino này khác nhau một cách đáng kể. Tốt hơn nếu, quá trình amit hoá này được thực hiện như là một bước riêng rẽ sau khi đưa các nhóm bên kỵ nước vào. Sau đó, peptit hoặc phân tử khác có nhóm carboxylic có thể được gắn ở amin tự do này bằng cách amit hoá.

Do đó, ngay cả ở điều kiện bão hoà, có thể có đến ba peptit khác nhau hoặc gốc hướng đích khác được gắn với π -polyme này: một nhóm được gắn thông qua thiol, một nhóm được gắn thông qua amin hoặc hydroxyl, và một nhóm được gắn thông qua nhóm axit carboxylic.

Ngoài ra, các nhóm hydroxyl và thiol cũng có thể được chuyển hoá thành amin bậc một bằng phản ứng với aziridin hoặc haloalkyl amin (chẳng hạn như bromoethylamin hoặc cloethylamin). Việc amit hoá bằng cysteamine sẽ đưa nhóm disulfua vào, nhóm này có thể được cho phản ứng trực tiếp với cysteine của peptit hoặc kháng thể để gắn peptit hoặc kháng thể; hoặc có thể trước hết được khử, ví dụ bằng aminoethanethiol hoặc DTT, để phản ứng tiếp với peptit hoặc kháng thể.

Bằng cách thực hiện các phản ứng một phần, ta có thể đưa các nhóm chức dễ phản ứng bổ sung vào polyme theo sáng chế, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở (1) các nhóm dễ phản ứng với thiol chẳng hạn như các dẫn xuất của axit acrylic hoặc axit maleic, (2) các nhóm dễ phản ứng với axit carboxylic chẳng hạn như amino hoặc hydroxyl, (3) các nhóm dễ phản ứng với amin chẳng hạn như carboxyl, và (4) các nhóm dễ phản ứng với disulfua chẳng hạn như mercapto. Số lượng các nhóm chức được bổ sung như vậy cho mỗi phân tử polyme có thể thay đổi trong khoảng từ $1/r$ lên đến một số lần bội số của r , tùy thuộc vào chất phản ứng được sử dụng và lượng được sử dụng.

Theo cách khác, có thể gắn thêm hai hoặc nhiều phối tử đặc hiệu vào để cải thiện tính đặc hiệu gắn kết với, chẳng hạn bề mặt virus, hoặc tế bào. Cũng có thể sử dụng hai hoặc nhiều phối tử đặc hiệu để tạo ra tương tác giữa các đích tế bào khác nhau, ví dụ như, một phối tử có thể hướng đích tới hạt virus, và phối tử kia có thể tạo thuận lợi cho việc gắn kết với thể thực bào, nhờ đó đưa hạt virus đến gần hoặc tiếp xúc với thể thực bào và thúc đẩy quá trình thực bào.

Các quá trình tạo dẫn xuất như vậy cho phép gắn ba hoặc nhiều gốc hướng đích và/hoặc trị liệu khác nhau với polyme thông qua gắn kết với các nhóm chức khác nhau (chẳng hạn như amin, carboxylat, và thiol). Do đó, ta có thể gắn chất

hướng đích đặc hiệu mô, chất hiện hình ảnh, và chất trị liệu vào một mạch polyme, và sau đó quá trình tự lắp ráp của polyme sẽ tạo ra chất trị liệu đích mà có thể theo dõi được sự phân bố và hiệu quả hướng đích của nó.

Việc gắn của phối tử vào các đơn vị cơ sở (mắt xích) của polyme theo sáng chế tạo ra trình bày đa hoá trị của phối tử trên mạch polyme này và trên bề mặt các hạt nano. Việc trình bày đa hoá trị thường dẫn đến sự gia tăng đáng kể ái lực đối với đích. Ví dụ, kháng thể đa hoá trị có thể hữu hiệu hơn nhiều trong việc tiếp cận với và thanh thải đích so với kháng thể hoá trị hai thông thường. Các protein gắn kết với hydrat cacbon và hydrat cacbon, về mặt bản chất, đã được biết đến là đa hoá trị, và không có hiệu quả khi mang hoá trị một. Tương tự, các gốc hướng đích peptit và hydrat cacbon đa hoá trị sẽ hữu hiệu hơn nhiều monome đơn lẻ. Sự gia tăng trọng lượng phân tử do việc gắn với polyme làm giảm tốc độ thanh thải của peptit và phối tử khác ở thận. Ngoài ra, mạch chính PEG mang lại cho peptit lợi ích tương tự lợi ích của quá trình PEG hoá, bao gồm cả việc tránh được sự kiểm soát của hệ miễn dịch.

Ngoài ra, gốc hướng đích đa hoá trị sẽ gắn với đích đa hoá trị (như hạt virus) và làm trung hoà nó một cách hiệu quả hơn gốc hướng đích monome. Khả năng trình bày nhiều peptit (khác nhau) ở dạng đa hoá trị sẽ làm tăng tính đặc hiệu. Ví dụ, polyme thật sự đặc hiệu với HIV (gắn kết với virus HIV) có thể được tạo nên bằng cách gắn với một peptit tương ứng với vùng gắn kết CD4, và một peptit khác tương ứng với vùng gắn kết CCR-5 hoặc CXCR-4 của virus này, và có thể một peptit thứ ba tương ứng với thụ thể khác (lần lượt CXCR-4 hoặc CCR-5). Một polyme như vậy có thể che phủ hoàn toàn vùng gắn kết của virus và làm cho virus này không thể gắn với tế bào và do đó không thể gây nhiễm. Ngoài ra, các đặc tính hoạt động bề mặt của polyme có thể làm mất ổn định chính cấu trúc virus khi gắn kết với nó. Thay cho các peptit, có thể sử dụng phân tử nhỏ gây ảnh hưởng đến theo cùng một kiểu gắn kết (CD4, CCR-5, CXCR-4), hoặc hỗn hợp các peptit và các phân tử nhỏ, tốt hơn nếu có hoạt tính bổ trợ. Polyme thu được này sẽ làm cho virus tự do bất kỳ trở nên bất hoạt, và do đó có thể là chất lý tưởng dùng để ngừng sự truyền nhiễm, bằng cách sử dụng chúng làm hợp phần của các chất làm trơn bao cao su và các chất tương tự. Ngoài ra, có thể tiêm polyme như vậy vào bệnh nhân để làm giảm sự lan truyền HIV.

Thông thường, khi sử dụng chất phản ứng đa chức chẳng hạn như DTT, có thể có quá trình liên kết ngang một phần giữa các mạch polyme thông qua quá trình este hoá axit carboxylic với DTT hoặc các phản ứng phụ tương tự. Các nhóm hydroxyl

phụ ở vùng trung tâm của mạch PEG, ví dụ các nhóm liên kết với gốc ete bisphenol A diglycidyl cũng có thể đóng góp vào liên kết ngang nếu chúng có mặt trong nguyên liệu PEG này. Các cấu trúc hydrogel liên kết ngang thu được cũng là các chất liệu hữu ích. Ví dụ, bằng cách tăng lên một cách thích hợp quy mô của liên kết ngang này hoặc bằng cách tạo liên kết ngang nhờ sử dụng mỗi liên kết ngang thay thế (chẳng hạn như bisoxirane), có thể tạo ra các chất liệu là hydrogel mềm dẻo có thể đóng vai trò như là nơi lưu trữ thuốc. Bằng cách cải biến một cách thích hợp các chất liệu này (ví dụ làm giảm chiều dài mạch PEG, mở rộng hơn các nhóm carboxylic, và đưa thêm vào các nhóm acrylic thích hợp) có thể tạo ra chất liệu hydrogel mạch thẳng hoặc liên kết ngang mà có thể đóng vai trò như là nơi chứa thuốc mà có thể được mang trên dụng cụ cố định như stent hoặc được hấp thu vào dụng cụ như miếng dán của cao dán dính hoặc cao dán cài dưới da. Nhìn chung, các chất liệu liên kết ngang như vậy sẽ là thích hợp để giải phóng có kiểm soát hơn là giải phóng hướng đích tăng cường.

Polyme dạng rắn lược theo sáng chế là hữu ích để hoà tan trong hệ dung môi nước, các chất liệu ít hòa tan trong nước. Phương pháp hoà tan một chất trong dung môi nước bao gồm việc cho chất rất ít tan tiếp xúc với polyme dạng rắn lược theo sáng chế với sự có mặt của nước, để tạo ra phức hợp hoà tan trong nước của chất này và polyme. Theo cách khác, polyme và chất cần được hoà tan có thể được kết hợp vào thành hệ nhũ tương hai pha nước-chất hữu cơ, và dung môi hữu cơ được loại bỏ bằng cách làm bay hơi. Một quy trình đưa ra làm ví dụ được mô tả trong patent Mỹ số 6,838,089, tài liệu này được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn. Cho rằng trong phần lớn trường hợp, polyme này tự lắp ráp thành các hạt nano có chất rất ít tan được hoà tan trong các mạch kỵ nước C kết hợp lại thành một khối ở lõi của các hạt này, trong khi đó khối A tạo thành vành ưa nước làm giảm một cách thích hợp năng lượng bề mặt tự do giữ cho huyền phù nước của các hạt này được ổn định.

Trong một số trường hợp, chất rất ít tan có thể không hoà tan hoàn toàn ở phần lõi, nhưng có thể tồn tại dưới dạng các hạt nano rắn được bao quanh bởi và được tạo huyền phù trong các mạch C ở lõi của các hạt này. Cho mục đích của sáng chế, vì việc thực hiện sáng chế không phụ thuộc vào mức độ trộn cụ thể bất kỳ của mạch C với chất rất ít tan, nên có sự khác nhau về mức độ. Trong một số trường hợp, chất này có thể hoà tan ở mức độ phân tử trong các mạch C, nhưng trong các trường hợp khác nó có thể thể hiện mức độ tách pha nào đó ra khỏi môi trường mạch C.

Trong một số trường hợp, có thể dự đoán là hệ này sẽ chuyển đổi từ trạng thái này sang trạng thái khác tùy theo sự biến đổi của nhiệt độ.

Năng lượng solvat hoá của lõi kỵ nước của các hạt polyme có thể được biến đổi bằng cách thay đổi các nhóm kỵ nước C. Các biến đổi thích hợp bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở việc đưa thêm vào một hoặc nhiều phần tử thế ưa nước, chẳng hạn như các nhóm chức hydroxyl, ete, amit, và xyano, để gia tăng tính phân cực và/hoặc trạng thái phân cực của lõi kỵ nước.

Chất liệu rất ít hòa tan mà có thể được giữ ở trạng thái hoà tan nhờ các polyme này bao gồm các vitamin và chất dinh dưỡng hoà tan trong chất béo, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở các vitamin A, D, E và K, caroten, cholecalciferol, và coenzym Q; thuốc không tan chẳng hạn như docetaxel, amphotericin B, nystatin, paclitaxel, doxorubicin, epirubicin, rubitecan, teniposide, etoposide, daunomycin, methotrexate, mitomycin C, cyclosporine, chất chuyển hoá irinotecan (SN-38), statin, và steroid; các thuốc nhuộm, các chất quang động, và chất hiện hình ảnh, và các axit nucleic, axit nucleic chất tương tự, và phức hợp axit nucleic. Chất tương tự axit nucleic bao gồm các chất chẳng hạn như thiophosphat và các axit nucleic peptit; phức hợp axit nucleic là phức hợp ion của các axit oligonucleic với lượng về cơ bản trung hoà điện tích của các loài cation hoặc polycation.

Cho mục đích của bản mô tả này, thuốc mà là không tan ở độ pH trung tính được xem như là “ít hoà tan”, vì trong nhiều trường hợp cần dùng đến được phẩm ở điều kiện trung tính. Ví dụ, ciprofloxacin có hoà tan trong nước vừa phải độ pH thấp hơn 4,5, nhưng độ pH này có thể gây tấy rất đáng kể khi thuốc này được đưa vào mắt. Polyme theo sáng chế sẽ hoà tan ciprofloxacin ở nước muối sinh lý ở độ pH 7. Ngoài ra, cho mục đích của bản mô tả này, “ít hoà tan” cần được hiểu là dùng để chỉ chất bất kỳ mà sự tăng độ hòa tan trong tá dược lỏng nước sẽ tạo nên thành phần được cải thiện hoặc hữu ích hơn. Do đó, một thuốc có độ hoà tan vừa phải, ví dụ ở mức 2g/lít, là “ít hoà tan” nếu liều đơn vị để cấp trong tĩnh mạch việc cấp 5 g.

Vì polyme theo sáng chế có khả năng hoà tan các loài dược chất, sáng chế còn đề xuất dược phẩm chứa một hoặc nhiều π -polyme theo sáng chế kết hợp một hoặc nhiều dược chất với một lượng điều trị hữu hiệu. Polyme theo sáng chế có thể làm cho thuốc trở nên hữu hiệu mà theo cách khác có thể là lượng dược chất không hữu hiệu. Do đó, cho các mục đích của bản mô tả này, “một lượng điều trị hữu hiệu” là lượng chất mà làm cho toàn bộ dược phẩm nói chung hữu hiệu.

Tất cả patent, các công bố đơn patent, và các tài liệu công bố được đề cập trong bản mô tả này được đưa vào bản mô tả này theo cách việc dẫn toàn bộ.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Thử nghiệm

1. Quy trình chung

Sáng chế còn đề xuất các quy trình điều chế polyme dạng rắn lược theo sáng chế. Việc tổng hợp các polyme này được chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật tổng hợp hữu cơ thực hiện một cách dễ dàng theo các quy trình được mô tả sau đây. Nguyên liệu chính là polyetylen glycol, tốt hơn nếu chất này được làm khô trước khi sử dụng. Quá trình này được thực hiện thuận lợi bằng cách khuấy PEG nóng chảy trong điều kiện chân không ở nhiệt độ nâng cao, cho đến khi bọt khí làm ngừng quá trình tạo thành. Quá trình này có thể mất 8-12 giờ, tùy thuộc vào chất lượng của PEG. Khi được làm khô, có thể bảo quản PEG này dưới khí argon trong thời gian không giới hạn. Có thể sử dụng PEG có sẵn trên thị trường ở cấp độ tinh khiết công nghiệp và nghiên cứu để điều chế polyme theo sáng chế, ví dụ như “PEG 1500” đa phân tán trên thị trường có phân bố trọng lượng phân tử trong khoảng 1430 – 1570. Nguyên liệu như vậy có thể kết hợp bisphenol A diglycidyl ete đưa thêm vào nhóm hydroxyl thứ hai ở tâm mạch PEG này. Để đảm bảo rằng polyme theo sáng chế có thể sử dụng lại phần lớn và có các đặc tính phù hợp, tốt hơn nếu PEG này không có bisphenol A, và có độ phân tán thấp. Tốt nhất là polyme PEG có đơn phân tán >95%, chẳng hạn như polyme có sẵn trên thị trường từ Nektar Therapeutics (trước đây là Shearwater Polymers), Huntsville AL, và Polypure AS, Oslo, Norway. Ví dụ về PEG được ưu tiên đặc biệt là “PEG-28” của Polypure, chiếm >95% $\text{HO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{28}\text{H}$, trọng lượng phân tử 1252.

Tất cả các phản ứng được thực hiện trong điều kiện khí quyển trơ chẳng hạn như khí nitơ hoặc argon, với khuấy từ hoặc tốt hơn nếu là khuấy cơ học.

Trong bước A, PEG khô được làm nóng chảy, và anhydrit maleic (2 mol cho một mol PEG) được cho thêm vào đồng thời khuấy trộn. Lượng anhydrit maleic cần phải phù hợp với số lượng nhóm hydroxyl PEG cuối, gần nhất đến mức cho phép. Việc thiếu anhydrit maleic sẽ tạo ra các mạch polyme có đầu cuối hydroxyl, trong khi đó một lượng dư anhydrit maleic sẽ làm tiêu tốn các nhóm thiol trong bước tiếp theo, dẫn đến sự kết thúc mạch sớm và tạo các nhóm carboxyl. Nhiệt độ của phản ứng không phải là một yếu tố quyết định, và quá trình này có thể được thực hiện thuận lợi

ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 45°C đến 100°C. Nhiệt độ được ưu tiên cho phản ứng nằm trong khoảng từ 65°C đến 90°C. Nếu sử dụng nhiệt độ cao, anhydrit maleic có xu hướng thăng hoa, và cần tiến hành các bước để kiểm tra xem là anhydrit maleic vẫn còn trong dung dịch. Giảm thiểu khoảng cách và nhúng bình phản ứng trong bể dầu là các phương pháp hữu hiệu.

Tuỳ thuộc vào nhiệt độ lựa chọn, phản ứng này có thể được hoàn thành trong thời gian 2 giờ hoặc ít hơn hoặc có thể được thực hiện qua đêm. Phản ứng có thể được theo dõi bằng TLC trên các đĩa silicagel, và được tiếp tục cho đến khi sau hết anhydrit maleic. Tất cả các phương pháp đối chiếu bằng mắt, UV, và nhuộm màu iot có thể được áp dụng để kiểm tra các đĩa TLC.

Trong bước B, este PEG bis-maleat thô tạo ra trong bước A được cho kết hợp với dithiothreitol (DTT) và N,N,N',N'-tetrametyletylenđiamin (TEMED) (có bổ sung nước, nếu cần thiết để tạo độ lỏng), và hỗn hợp này được khuấy ở nhiệt độ 70°C. Phản ứng này diễn ra hoàn toàn trong thời gian 30 phút, như được chỉ ra bởi sự tăng nhanh độ nhớt. Trọng lượng phân tử của sản phẩm sẽ bị giảm đi nếu sử dụng một lượng DDT lớn hoặc ít hơn lượng tối ưu. Ngoài ra, cũng có thể giảm trọng lượng phân tử của sản phẩm này, nếu muốn, bằng cách thay thế TEMED bằng bazơ amin kém hiệu quả hơn chẳng hạn như TEA.

Trong bước C, cho thêm một lượng đủ nước vào hỗn hợp phản ứng này để làm giảm độ nhớt, và 0,1 mol N-hydroxysuccinimit (NHS) và 1,05 mol hexadexylamin cho một mol nhóm axit carboxylic trong polyme này. (Lượng NHS này dường như làm giảm thiểu một cách tối ưu mức độ của các phản ứng phụ.) Sau đó, cho một lượng dư N-(3-đimetylaminopropyl)-N'-etylcarbodiimmit (EDC) (1,4mol EDC cho một mol nhóm axit carboxylic) vào từng phần, đồng thời bổ sung nước khi cần thiết để duy trì việc khuấy trộn. Duy trì độ pH của hỗn hợp phản ứng này lớn hơn 7, và tốt hơn là nằm trong khoảng từ 9 đến 11, để tối ưu hoá khả năng phản ứng của alkylamin. Với dodecylamin, có thể thực hiện phản ứng này ở nhiệt độ vào khoảng 40~45°C, trong khi đó với octadexylamin, nhiệt độ là vào khoảng 55°C-57°C. Sau phản ứng này, thực hiện TLC cho đến khi nhận được lượng ổn định alkylamin để lại, thông thường sau khi để qua đêm.

Axit hoá hỗn hợp phản ứng này đến độ pH nằm trong khoảng từ 3,0 đến khoảng 4,5 và khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian khoảng 24 giờ để phân huỷ EDC không phản ứng, sau đó được chuẩn độ đến độ pH 7,0 bằng cách sử dụng 1N NaOH. Ly tâm hỗn hợp phản ứng cuối ở tốc độ vào khoảng 800 xg trong thời gian từ 1 đến 3 giờ, để tách loại tạp chất rắn và các sản phẩm phụ.

Sau ly tâm, dịch nổi trên bề mặt có thể được sắc ký trên cột GPC(Toyopearl™, Sephadex™, Sephacryl™, Biogel™, và v.v.). Polyme π này là hợp chất lưỡng cực, và sẽ có ái lực đối với phần lớn việc nạp lên cột GPC, do đó làm cho quá trình loại bỏ tạp chất trở nên phức tạp. Theo cách khác, polyme này có thể được cho sắc ký trên cột tương tác kỵ nước cỡ lớn (ví dụ, TOYOPEARL™ Phenyl 650C, Tosoh Biosciences, Montgomeryville, PA, U.S.A.), với rửa giải bằng gradient metanol trong nước. Tốt hơn nếu, hỗn hợp phản ứng này được thẩm tách bằng một số lần thay đổi nước được axit hoá và trung tính để tách loại các chất liệu phân tử lượng thấp và các sản phẩm phụ của phản ứng.

Hỗn hợp phản ứng này cũng có thể được chiết bằng butanon, isopropanol, butanol hoặc các dung môi hữu cơ có cực khác để tách loại các tạp chất hữu cơ, nhưng một lượng đáng kể polyme lưỡng vùng bị tổn thất trong dung môi chiết tách. Tốt hơn, nếu hỗn hợp phản ứng này được xử lý siêu lọc bằng cách sử dụng các màng thích hợp để tách phân đoạn sản phẩm này thành từng cấp độ trọng lượng phân tử, chẳng hạn từ 5kDa đến 10kDa; 10kDa đến 30kDa, 30kDa đến 50kDa, v.v. tùy thuộc vào ngưỡng tách kích thước phân tử của màng lọc được sử dụng. Dung dịch nước của polyme có thể được xử lý bước lọc cuối để tạo ra dung dịch vô trùng hoặc không chứa virus, tùy thuộc vào việc lựa chọn màng lọc hoặc môi trường.

2. Tổng hợp π -polyme

Ví dụ 1: Polyme với trọng lượng phân tử trung bình PEG-đi(alkylamidoxysuccinyl)dithioete (C16- π -polyme A)

Sấy khô polyetylen glycol (PEG-1500, Sigma Chemical Co.) trong chân không ở nhiệt độ 80°C cho đến khi dừng tạo bọt khí. (8-12 giờ, tùy thuộc vào chất lượng của PEG). PEG đã làm khô này có thể được bảo quản ở điều kiện được hút ẩm dưới khí argon trong thời gian không giới hạn.

Làm nóng chảy PEG đã làm khô này dưới khí argon trong bể dầu, và cho từ từ anhydrit maleic (2 mol cho một mol PEG, đã được hiệu chỉnh trừ tạp chất) vào đồng thời khuấy. Khuấy hỗn hợp này dưới khí argon ở nhiệt độ 90°C. Vì anhydrit maleic có xu hướng thăng hoa, khoảng trống phía trên được giảm thiểu và toàn bộ bình phản ứng được giữ ở nhiệt độ phản ứng. Toàn bộ anhydrit maleic ngưng tụ trên thành bình được cạo đưa trở lại hỗn hợp phản ứng. Tiến trình của phản ứng này được theo dõi bằng TLC trên các đĩa silicagel, bằng cách sử dụng etanol và hexan làm các dung môi riêng rẽ, cùng với việc làm hiện hình ảnh bằng UV và bằng nhuộm màu iot. Phản ứng này được tiếp tục trong thời gian một giờ sau khi hết anhydrit maleic.

PEG đimaleat thô này được pha loãng với hai lần thể tích nước. Sau đó, cho thêm dung dịch chứa dithiothreitol (DTT, 1,01 đương lượng cho một đương lượng PEG) và N,N,N',N'-tetramethyl-etylendiamin (TEMED, 1,02 đương lượng) trong nước (2 thể tích nước cho một thể tích TEMED) vào hỗn hợp phản ứng này đồng thời khuấy trộn. Khuấy hỗn hợp phản ứng này ở nhiệt độ 70°C dưới khí argon trong thời gian 2,5 giờ, để ở nhiệt độ trong phòng qua đêm, và sau đó khuấy tiếp ở nhiệt độ 70°C trong thời gian 2 giờ. Phản ứng này được theo dõi bằng TLC và được cho là hoàn toàn khi DTT biến mất hoàn toàn.

Cho nước vào hỗn hợp phản ứng nêu trên để làm giảm độ nhớt cho đến khi có thể khuấy được hỗn hợp này (ở nồng độ vào khoảng 25% chất rắn), khuấy hỗn hợp này ở nhiệt độ 65°C dưới khí argon, và cho N-hydroxysuccinimit (0,1 mol cho một mol nhóm axit carboxylic trong polyme PEG-đimaleat-DTT này) vào, sau đó là hexadexylamin (1,05 mol cho một mol nhóm axit carboxylic trong polyme này) và N-(3-đimetylaminopropyl)-N'-etylcarbodiimmit (EDC, 0,56 mol cho một mol nhóm axit carboxylic trong polyme này). Khuấy hỗn hợp này dưới khí argon trong thời gian 1 giờ và cho phần EDC thứ hai (0,56 mol cho một mol nhóm axit carboxylic trong polyme này) vào. Sau một giờ nữa, cho tiếp phần EDC thứ ba (0,28 mol cho một mol nhóm axit carboxylic trong polyme này, trong tổng số 1,4 mol EDC cho một mol axit carboxylic) vào để bù sự tổn thất của EDC trong quá trình thủy phân. Nước bổ sung được cho vào khi cần thiết để duy trì độ lỏng, khi chất rắn được bổ sung vào làm cho huyền phù khó khuấy, và độ pH được duy trì trong khoảng từ 8 đến 10 bằng cách bổ sung 1N NaOH khi cần. Khuấy hỗn hợp này ở nhiệt độ 65°C dưới khí argon qua đêm, theo dõi bằng TLC (silic đioxit với etanol) cho đến khi đường như alkylamin đã đạt đến nồng độ ổn định, và sau đó khuấy thêm 4 h. Sau đó, hỗn hợp phản ứng này được axit hoá hỗn hợp bằng 1N HCl đến độ pH vào khoảng 4,5, khuấy trong thời gian 24 h để phân huỷ EDC không phản ứng, và được điều chỉnh đến độ pH 7,0 bằng cách bổ sung từng giọt 1N NaOH. Với đodexylamin, phản ứng này được thực hiện ở nhiệt độ vào khoảng 40~45°C, trong khi đó với octadexylamin, tốt hơn nếu nhiệt độ là 55 – 57°C.

Hỗn hợp này được chuyển vào chai ly tâm và được quay trong thiết bị ly tâm để bàn với tốc độ vào khoảng 800xg trong thời gian 2 giờ để tách riêng chất rắn còn lại. Sau khi ly tâm, chiết hỗn hợp phản ứng này bằng isopropanol để tách loại các tạp chất hữu cơ. Phương pháp siêu lọc là được ưu tiên làm phương pháp thay cho phương pháp tách chiết bằng isopropanol.

Theo phương pháp này, các hợp chất amino sau đây được liên hợp với polyme này:

Ví dụ 1a: undexylamin

Ví dụ 1b: octadexylamin

Ví dụ 1c: 4-nonylbenzylamin

Ví dụ 1d: 3-[(4-phenoxy)phenyl]propylamin

Ví dụ 2: Polyme trọng lượng phân tử cao PEG-đi(alkylamidossuccinyl)đithioete

Tuân theo quy trình được nêu ở Ví dụ 1, chỉ khác là dùng 0,55 mol DTT và 0,55 mol TEMED cho một mol anhydrit maleic. Việc khuấy mạnh là cần thiết khi độ nhớt tăng nhanh. Nhận thấy là phần lớn phản ứng này là hoàn toàn trong thời gian 5-10 phút, sau đó từ từ được hoàn thành tiếp theo trong thời gian 4 giờ khi nhiệt độ được tăng lên từ 55°C đến 80°C.

Ví dụ 3: Polyme PEG-đi(alkylamidossuccinyl)đithioete

Tuân theo quy trình được phác thảo ở Ví dụ 1, chỉ khác là sử dụng 1,5 mol đodexylamin cho một mol nhóm axit carboxylic trong polyme này. Cho N-hydroxysuccinimit (NHS, 1,0 mol cho một mol nhóm axit carboxylic) và 1,1'-carbonyldiimidazol (CDI, 3,0 mol cho một mol nhóm axit carboxylic) vào, và khuấy hỗn hợp phản ứng này ở nhiệt độ 80°C trong thời gian 4 giờ và hoàn thiện như nêu trên.

Theo phương pháp này, các hợp chất amino sau đây được liên hợp với polyme này:

Ví dụ 3a: undexylamin

Ví dụ 3b: tetradexylamin

Ví dụ 3c: octadexylamin

Ví dụ 3d: dehydroabietylamin

Ví dụ 3e: ete cholesterol 2-aminoetyl

Ví dụ 3f: 10-phenoxydexylamin

Ví dụ 3g: hydrazit axit sebacic

Ví dụ 3h: hydrazit axit oleic

Ví dụ 3i: hydrazit axit dehydroabietic

Ví dụ 3j: hydrazit axit cholic

Ví dụ 3k: hydrazit axit palmitic

Ví dụ 4: Polyme PEG-co-(alkylamidossuccinat)

Dung dịch PEG (6,66mmol) và triethylamin (2,32ml, 16,65mmol) trong diethyl ete khô (10ml) được làm lạnh ở nhiệt độ 0°C dưới khí argon và được xử lý từng giọt bằng metansulfonyl clorua (1,03ml, 13,32mmol). Tiếp tục khuấy trong thời gian 1 h ở nhiệt độ 0°C và sau đó ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 2 h. Làm bay hơi ete này và cho thêm axeton khô (15ml) vào phần còn lại để kết tủa triethylamin hydroclorua, chất này được lọc ra khỏi dung dịch này. Dịch lọc được xử lý bằng lithi bromua (2,31g, 26,64mmol) và được gia nhiệt đến hồi lưu trong thời gian 20 h. Sau đó, hỗn hợp này được pha loãng bằng hexan và lọc qua cột silic đioxit ngắn (3 cm) đã được bao phủ bằng Celite™ (0,5cm), và rửa giải bằng hexan. Dịch lọc được làm khô, lọc và làm bay hơi để lại α,ω -đibromo-PEG trong dầu.

α,ω -đibromo-PEG được cho phản ứng với một đương lượng 2,2-đibutyl-4,5-bis(metoxycarbonyl)-1,3,2-đioxastannolan bằng phương pháp của Godjoian và các đồng tác giả, Tetrahedron Letters, 37:433-6 (1996). Polyete đimetyltartrat-PEG thu được được xà phòng hoá bằng KOH trong metanol, và sau đó được amin hoá bằng đodexylamin hoặc hexadexylamin như ở ví dụ 1 và 3 nêu trên, hoặc bằng các amin ở các Ví dụ 3a-3k.

Ví dụ 5: Đồng trùng hợp PEG với EDTA dianhydrit

PEG khô được cho phản ứng với dianhydrit của axit etylendiamintetraxetic bằng phương pháp như được mô tả trong Ví dụ 1, và sau đó được amit hoá bằng đodexylamin như ở ví dụ 1 hoặc hexadexylamin như ở ví dụ 3, hoặc bằng amin ở các Ví dụ 3a-3k.

Theo phương pháp tương tự, các dianhydrit sau đây được đồng trùng hợp với PEG và sau đó được amit hoá:

Ví dụ 5a: Naphtalentetracarboxylicdianhydrit

Ví dụ 5b: Perylentetracarboxylicdianhydrit

Ví dụ 5c: Benzophenontetracarboxylicdianhydrit

Ví dụ 5d: 4,4'-(Hexafloisopropyliđen)điphtalic anhydrit

Ví dụ 5e: Dianhydrit của axit butan tetracarboxylic

Ví dụ 5f: Bixyclo(2,2,2)oct-7-en-2,3,5,6-tetracarboxylic dianhydrit

Ví dụ 5g: Dianhydrit của axit diethylentetramin pentaaxetic

Ví dụ 5h: Dianhydrit của axit 3,4,3',4'-diphenylsulfon tetracarboxylic

Ví dụ 5i: 3,4,3',4'-diphenyl ete dianhydrit của axit tetracarboxylic

Ví dụ 5j: Dianhydrit pyromelitic

Ví dụ 6A: Copolyme PEG-điamin với mạch bên thioete

PEG đimaleat, được điều chế như ở ví dụ 1, được cho phản ứng với dodecanthiol (hai đương lượng cho một đương lượng PEG đimaleat) bằng cách sử dụng cùng một quy trình như được sử dụng cho DTT ở Ví dụ 1. Không cần phải pha loãng, vì không xảy ra quá trình polyme hoá, và phản ứng này được thực hiện trong PEG-đimaleat nóng chảy. Cho chất xúc tác TEMED vào và sau đó cho thêm thiol. Phản ứng này được theo dõi về nguyên liệu phản ứng hết, bằng cách sử dụng TLC. Có thể sử dụng nhiệt độ lên đến điểm mà tại đó tổn thất của alkylthiol do quá trình bay hơi trở thành đáng kể (lên đến vào khoảng 100°C). Có thể sử dụng một lượng dư nhỏ alkylthiol để làm bão hoà hoàn toàn các nhóm maleic. Alkylthiol dư được đuổi đi vào cuối thời điểm phản ứng bằng cách sục nitơ hoặc argon, và/hoặc gia nhiệt trong chân không, cho đến khi không phát hiện được lượng nào bằng cách phát hiện mùi hoặc bằng TLC.

Theo phương pháp này, các thiol sau đây có thể được liên hợp với PEG đimaleat:

Ví dụ 6Aa: este của axit đi-t-butyl mercaptosuccinic

Ví dụ 6Ab: tetradecanthiol

Ví dụ 6Ac: hexadecanthiol

Ví dụ 6Ad: axit 2-mercaptoetansulfonic

Ví dụ 6Ae: axit 3-mercaptopropansulfonic

Ví dụ 6Af: este của axit t-butyl 6-mercaptohexanoic

Ví dụ 6Ag: este của axit t-butyl 4-mercaptobenzoic

Ví dụ 6Ah: este của axit t-butyl mercaptoaxetic

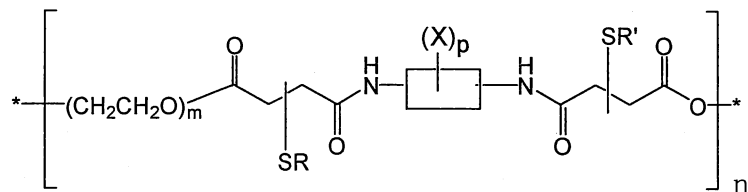
Ví dụ 6Ai: 4-(t-butoxycarbonylamino)butanthiol

Ví dụ 6Aj: 3-(t-butoxycarbonylamino)benzyl mercaptan

Ví dụ 6Ak: 4-đexylbenzyl mercaptan

Các thiol có các nhóm chức dễ phản ứng là thích hợp để gắn với các mạch C, và/hoặc các nhóm chức dễ phản ứng này có thể đóng vai trò như là các điểm gắn (X) cho các gốc hướng đích.

Ví dụ 6B: Copolyme PEG-điamin với mạch bên thioete



Sản phẩm cộng thiol thu được ở Ví dụ 6A được amit hoá bằng 1,4-điaminobutan (một đương lượng điamin cho hai nhóm COOH), bằng cách sử dụng cùng một quy trình được sử dụng cho dodecylamin ở Ví dụ 1, khi cần thiết thực hiện pha loãng với nước để duy trì độ lỏng của hỗn hợp phản ứng này. Bổ sung các phần phân ước EDC khi cần thiết để đảm bảo quá trình polyme hoá hoàn toàn. Theo phương pháp này, sản phẩm cộng thiol của Ví dụ 6A và 6Aa đến 6Ak được chuyển hoá thành PEG-điaminobutan polyamit.

Theo phương pháp này, có thể chuyển hoá các điamin sau thành PEG polyamit

(BOC = *t*-butoxycarbonyl):

Ví dụ 6Ba: 2-(*O*-BOC)-1,3-điamino-2-propanol

Ví dụ 6Bb: N',N''-đi(BOC) hexaetylen tetraamin

Ví dụ 6Bc: N',N''-đi(BOC) spermin

Ví dụ 6Bd: N'-BOC spermidin

Ví dụ 6Be: N',N'',N'''-tri(BOC) pentaetylen hexamin

Ví dụ 6Bf: agmatin

Ví dụ 6Bg: este lysin *t*-butyl

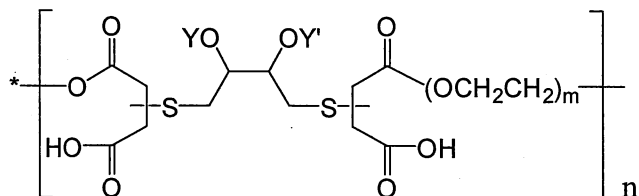
Ví dụ 6Bh: 1,6-điaminohexan

Ví dụ 6Bi: 1,4-phenylendiamin

Ví dụ 6Bj: 1,3-phenylendiamin

Ví dụ 6Bk: 1,4-điaminobutan-2,3-điol axetonit

Ví dụ 7: PEG-đi(alkylsuccinat)đithioete



Ete 2,3-bis-*O*-hexadexyl của DTT (*meso*-2,3-bis(hexadexyloxy)butan-1,4-đithiol) được điều chế bằng quy trình biến đổi của S. Sasaki và các đồng tác giả,

Chem.Pharm.Bull. 33(10):4247-4266 (1985). Chất này được cộng hợp với PEG-đimaleat bằng phương pháp của Ví dụ 1.

Theo phương pháp này, các ete dithiol sau đây được liên hợp với polyme PEG này:

Ví dụ 7a: meso-2,3-bis(n-butoxy)butan-1,4-dithiol

Ví dụ 7b: meso-2,3-bis(4-nonylphenylmetoxy)butan-1,4-dithiol

Ví dụ 7c: meso-2,3-bis(biphenyl-4-metoxy)butan-1,4-dithiol

Ví dụ 7d: 4,6-bis(đexyloxy)benzen-1,3-dimetanthiol

Ví dụ 7e: 4,5-bis(đexyloxy)benzen-1,2-dimetanthiol

Ví dụ 7f: 3,4-bis(đexyloxy)thiophen-2,5-dimetanthiol

Ví dụ 8A: PEG succinat được thể

Tuân theo phương pháp của Ví dụ 1, chỉ khác là 2-đodexen-1-yl succinic anhydrit được sử dụng thay cho anhydrit maleic. Phần tử thể đodexenyl này tạo ra các mạch bên C trong polyme cuối này.

Theo phương pháp này, các anhydrit succinic được thể sau được este hoá bằng PEG:

Ví dụ 8Aa: isobutenylsuccinic anhydrit

Ví dụ 8Ab: 2-octen-1-yl succinic anhydrit

Ví dụ 8Ac: octađecenyl succinic anhydrit

Ví dụ 8Ad: 3-oxabicyclo-hexan-2,4-dion

Ví dụ 8Ae: anhydrit xyclohexandicarboxylic

Ví dụ 8Af: anhydrit phtalic

Ví dụ 8Ag: anhydrit 4-đexyl phtalic

Ví dụ 8Ah: anhydrit hexahyđrometylphthalic

Ví dụ 8Ai: anhydrit tetrahyđrophthalic

Ví dụ 8Aj: anhydrit norbornenedicarboxylic

Ví dụ 8Ak: cantharidin

Ví dụ 8Al: anhydrit bixyclooctendicarboxylic

Ví dụ 8Am: anhydrit exo-3,6-epoxy-1,2,3,6-tetrahyđrophthalic

Ví dụ 8An: anhydrit S-axetyl mercaptosuccinic

Ví dụ 8B: PEG-đi(alkylamidossuccinyl)đithioete với các nhóm alkyl mạch bên

Bằng phương pháp của ví dụ 1, các PEG succinat được thể thu được như mô tả ở các Ví dụ 8A và 8Aa đến 8An được cho phản ứng với DTT.

Theo phương pháp này, cho các dithiol sau đây phản ứng với PEG succinat được thể bất kỳ thu được như mô tả ở các Ví dụ 8A và 8Aa đến 8An:

- Ví dụ 8Ba: etan-1,2-dithiol
- Ví dụ 8Bb: propan-1,3-dithiol
- Ví dụ 8Bc: butan-1,4-dithiol
- Ví dụ 8Bd: pentan-1,5-dithiol
- Ví dụ 8Be: hexan-1,6-dithiol
- Ví dụ 8Bf: 1,4-benzendithiol
- Ví dụ 8Bg: 1,3-benzendithiol
- Ví dụ 8Bh: 1,4-benzendimetanthiol
- Ví dụ 8Bi: 1,3-benzendimetanthiol
- Ví dụ 8Bj: 1,2-benzendimetanthiol

Ví dụ 8C: Copolyme PEG-điamin với các nhóm alkyl mạch bên

Bằng phương pháp của ví dụ 6B, PEG succinat được thể thu được như mô tả ở Ví dụ 8A được đồng trùng hợp với 1,4-điaminobutan.

Theo phương pháp này, các điamin sau đây được đồng trùng hợp với PEG succinat được thể bất kỳ của Ví dụ 8A và 8Aa đến 8An:

- Ví dụ 8Ca: 2O-BOC 1,3-điamino-2-propanol
- Ví dụ 8Cb: N', N''-đi(BOC) hexaetylen tetraamin
- Ví dụ 8Cc: N', N''-đi(BOC) spermin
- Ví dụ 8Cd: N'-BOC spermiđin
- Ví dụ 8Ce: N', N'', N'''-tri(BOC) pentaetylen hexamin
- Ví dụ 8Cf: agmatin
- Ví dụ 8Cg: este lysin t-butyl
- Ví dụ 8Ch: 1,6-điaminohexan
- Ví dụ 8Ci: 1,4-phenylendiamin
- Ví dụ 8Cj: 1,3-phenylendiamin
- Ví dụ 8Ck: 1,4-điaminobutan-2,3-điol axetonit

Ví dụ 9: Este hoá Trans PEG bằng cách sử dụng các axit được thể

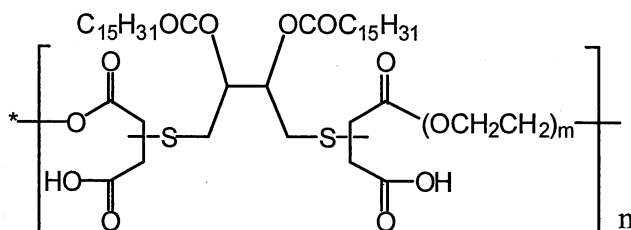
PEG đitosylat: Cho 2,1 mol tosyl clorua (dư 5% mol) vào 1 mol PEG (được hoà tan trong DMF hoặc được nóng chảy nguyên dạng) vào đồng thời khuấy dưới khí argon. Cho 2,2 mol tetrametyl etylen điamin (TEMED) vào hỗn hợp phản ứng này. Sau đó, hỗn hợp phản ứng này được ủ ở nhiệt độ 45°C trong thời gian 2h. Sản phẩm

này được dung giải bằng cách sử dụng TLC trong etylaxetat, toluen, hoặc etanol làm dung môi TLC. Có thể chiết PEG đitosylat từ hỗn hợp phản ứng này bằng toluen. Cũng có thể sử dụng các chất sulfonyl hoá chẳng hạn như mesyl clorua (xem Ví dụ 4), triflic anhydrit, hoặc tresyl clorua (tham khảo đơn yêu cầu cấp patent Mỹ 10/397332, số công bố 20040006051) thay cho tolunesulfonyl clorua.

Polyeste hoá PEG đitosylat: Cho 1 mol axit S,S'-didexyl-*meso*-2,3-dimercaptosuccinic và 2 mol TEMED vào 1 mol PEG-đitosylat nóng chảy, đồng thời khuấy dưới khí argon. Cho thêm DMF khi cần thiết để duy trì độ lỏng. Hỗn hợp phản ứng này được gia nhiệt đến nhiệt độ 80°C và khuấy trong thời gian 24 h hoặc cho đến khi phản ứng hoàn toàn, theo TLC.

Ví dụ 10: Polyme với trọng lượng phân tử trung bình (C16- π -polyme B)

PEG-đi(suxinyl)-đi-(O-được axyl hoá)thioete



Cho PEG-đimaleat (10,24g, 6,1mmol) được điều chế như ở ví dụ 1 vào bình thót cổ khô 125 ml và gia nhiệt đến nhiệt độ 70°C dưới khí argon để làm nóng chảy PEG-đimaleat. Cho nước (10ml) và dung dịch chứa DTT (0,961g, 6,168mmol) và TEMED (0,723g, 6,166mmol) trong nước (3ml) vào nguyên liệu được nóng chảy này, đồng thời khuấy. Khuấy dung dịch này ở nhiệt độ 70°C trong thời gian khoảng 4 giờ. Loại bỏ nước trong chân không tạo ra polyme rắn với hiệu suất khoảng 90%.

Polyme đã được làm khô này (5g, 2,7mmol) được gia nhiệt đến nhiệt độ 70-90°C dưới khí argon để làm nóng chảy nó, và cho TEMED (0,635g, 5,5mmol) vào. Cho palmitoyl clorua (1,689g, 5,5mmol) vào đồng thời khuấy, và khuấy hỗn hợp này dưới khí argon qua đêm. (Tỷ lệ polyme so với axyl clorua có thể thay đổi để thu được mức độ thế từ 0-100% hệ số tỷ lệ.) Cho nước vào hỗn hợp phản ứng này để tách “C16- π -polyme B”.

Theo phương pháp này, các axit sau đây được este hoá bằng các nhóm hydroxyl của copolyme đi(suxinyl)PEG-DTT:

Ví dụ 10a: Axit oleic

Ví dụ 10b: Cholesteryl succinat

Ví dụ 10c: Axit biphenyl-4-carboxylic

Ví dụ 10d: Axit 4-octylphenylaxetic

Ví dụ 10e: Axit hexadec-6-ynoic

Như là phương pháp thay thế cho việc sử dụng axit halogenua, các nhóm hydroxyl được dẫn xuất từ DTT của π -polyme cũng có thể được hoạt hoá bằng 1,3-bis (2,2-dimetyl-1,3-dioxolan-4-ylmetyl) carbodiimit (BDDC) và được liên hợp trực tiếp với các axit carboxylic; xem tài liệu: Handbook of Reagents for Organic Synthesis, Reagents for Glycoside, Nucleotide, and Peptide synthesis, Ed. David Crich, Wiley, 2005 trang 107-108 và các tài liệu tham khảo trong đó).

Ví dụ 11: Este của C16- π -polyme A được thế bằng nhóm cacboxyl

Các polyme được thế bằng axit carboxylic được sử dụng để gắn các phối tử có các nhóm dễ phản ứng amino, bằng cách sử dụng các phương pháp tạo liên kết peptit chuẩn (ví dụ thông qua các chất phản ứng carbodiimit) để liên kết các nhóm amino với nhóm chức axit cacboxylic của polyme. Các chất này thu được một cách dễ dàng bằng cách este hoá các nhóm hydroxyl của π -polyme với anhydrit mạch vòng. Ví dụ, C16- π -polyme A đimaleat được điều chế bằng cách cho anhydrit maleic phản ứng với các nhóm hydroxyl của C16- π -polyme A, như sau:

C16- π -polyme A (2 g) và anhydrit maleic (0,85 g) được nghiền trong máy nghiền khô và đưa vào bình đáy tròn dung tích 50 ml. Bình này được gia nhiệt ở nhiệt độ 90°C, trong môi trường khí argon, trong thời gian 2-3 giờ đồng thời khuấy trộn. Sau đó, hỗn hợp phản ứng rắn này được nghiền và được tạo huyền phù trong nước, và hỗn hợp này được chuyển đến túi thẩm tách (ngưỡng tách kích thước phân tử 3,5 kDa) (3,5 kDa ngưỡng). Hỗn hợp này được thẩm tách bằng nước để loại bỏ axit maleic dư và các sản phẩm phụ có trọng lượng phân tử thấp, và chất lưu giữ lại này được lấy ra khỏi túi và được làm khô ở nhiệt độ 60°C đến trọng lượng không đổi để thu được C16- π -polyme A đimaleat (1,79 g). Tỷ lệ Polyme A so với anhydrit maleic có thể được thay đổi để thu được mức thay thế thay đổi khoảng từ 0 đến 100% so với este hoá hoàn toàn theo hệ số tỷ lệ.

Ví dụ 11a: Diglycolat C16- π -polyme A

C16- π -polyme A (2 g) và anhydrit của axit diglycolic (1,0 g) được cho phản ứng bằng phương pháp như được nêu trong Ví dụ 11 trên đây, để tạo ra C16- π -polyme A diglycolat. Như với anhydrit maleic, tỷ lệ giữa Polyme A và anhydrit có thể được thay đổi để thu được mức thay thế thay đổi khoảng từ 0 đến 100% so với este hoá hoàn toàn theo hệ số tỷ lệ.

Ví dụ 11b: C16- A bis(aconitat)

C16- A (2 g) và anhydrit của axit aconitic (1,35 g) được cho phản ứng bằng phương pháp được nêu trong Ví dụ 11 trên đây, để tạo ra C16- A bis(aconitat).

Theo cách tương tự, các anhydrua sau được liên hợp với C16- π -polyme A. Khi sử dụng anhydrit có độ tan thấp, độ pH có thể được điều chỉnh để nằm trong khoảng từ 4,5 đến 6,5 trước khi thẩm tách để trợ giúp cho việc tinh chế. Việc thẩm tách lần thứ hai bằng dung dịch HCl 0,1N tạo ra dạng axit của polyme, nếu muốn.

Ví dụ 11c: anhydrit succinic

Ví dụ 11d: anhydrit glutaric

Example 11e: anhydrit phthalic

Liên kết đôi dễ phản ứng được đưa vào thông qua việc este hoá bằng anhydrua maleic hoặc *cis*-aconitic cũng có thể được sử dụng để bổ sung các phối tử chứa nhóm thiol cho polyme này, như được mô tả trong Ví dụ 12 dưới đây.

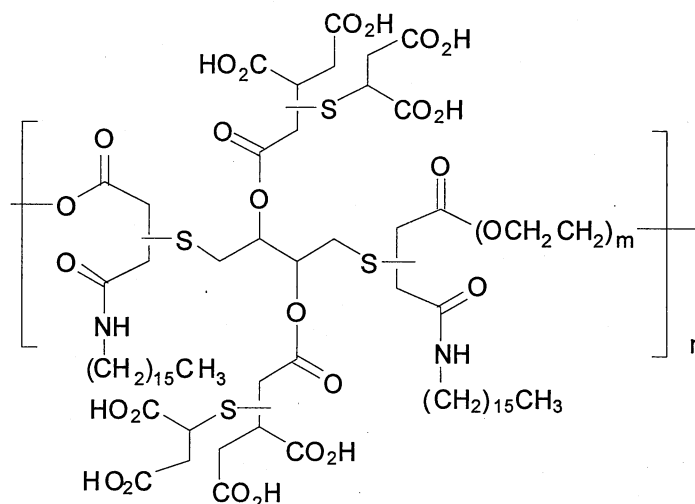
Ví dụ 12: Sản phẩm cộng xystein của C16- π -polyme A đimaleat

Cho bột C16- π -polyme A đimaleat (Ví dụ 11) (253 mg) vào nước (5ml) và khuấy mạnh hỗn hợp này. Cho xystein (24 mg) và TEMED (30,5 μ l) vào hỗn hợp phản ứng này, và khuấy hỗn hợp này ở nhiệt độ trong phòng dưới khí argon. Tiến trình phản ứng này được theo dõi bằng TLC (các đĩa silicagel, n-butanol-axit axetic-nước, 3:1:1) cùng với việc phát hiện bằng ninhydrin. Hỗn hợp phản ứng này cho thấy điểm đồng di chuyển đốm thẩm dương tính ninhydrin với polyme này. Xystein cũng cho điểm dương tính với ninhydrin, trong khi polyme nguyên liệu không cho màu bất kỳ với ninhydrin.

Phương pháp được mô tả trên đây được sử dụng để đưa các nhóm cacboxyl bổ sung để dùng làm các điểm gắn kết, bằng cách sử dụng các nhóm thiol có nhiều phần tử thế cacboxyl. Ví dụ, axit mercaptosuccinic được bổ sung vào C16- π -polyme A dieste sau:

Ví dụ 12a: C16- π -polyme A đimaleat

Ví dụ 12b: C16- π -polyme A dicrylat

Ví dụ 12c: C16- π -polyme A (bis)aconitat

Ví dụ 12c

Theo cách tương tự, axit 3-mercaptoglutaric được bổ sung vào các C16- π -polyme A dieste sau:

Ví dụ 12d: C16- π -polyme A đimaleat

Ví dụ 12e: C16- π -polyme A điacrylat

Ví dụ 12f: C16- π -polyme A (bis)aconitat

3. Sử dụng π polyme để hoà tan các chất không tan hoặc tan yếu

Ví dụ 1: Hoà tan các thuốc nhuộm

Cho một lượng dư các thuốc nhuộm Eosin Y, diclofluorescein, và Sudan IV vào 1,0 ml các phần phân ước của dung dịch nước polyme 50mg/ml PEG1500-co-suxinyl-DTT-bis-C16-amit (C16-Polyme A, Ví dụ 1), đã được ly tâm để tách loại chất liệu không tan nhưng không được tinh chế theo cách khác trong các đồ chứa riêng rẽ (thuyền cân polypropylen sạch FlexExcel™, cỡ WB2.5, sản phẩm của AllExcel, Inc., West Haven, CT), và các hợp phần này được khuấy cùng nhau để tạo ra bột nhão. Sau đó, đáy của đồ chứa này được gắn với đáy của bình hút bụi siêu âm bằng đồ kim hoàn nhỏ bằng cách sử dụng băng dính hai mặt chịu nước. Chỉ cho một lượng nước đủ vào vào bình để ngập thuyền cân đến khoảng 1/3 chiều cao của nó. Thực hiện việc bắn phá bằng siêu âm trong thời gian 15 phút theo các bước trong thời gian 5 phút. Các chất lỏng này được đưa vào ống ly tâm và được ly tâm hai lần trong thời gian 30 phút trong thiết bị ly tâm để bàn để bắn ra thành viên các thuốc nhuộm không tan. Phần dịch nổi được đưa vào các ống sạch và được ly tâm tiếp, để tách loại chất rắn bị giữ lại. Huyền phù của cùng một lượng các thuốc nhuộm trong

cùng một lượng nước cất như lượng dung dịch polyme được xử lý theo cùng cách như vậy dùng làm mẫu đối chứng. Dung dịch thu được này được thấm thành điểm (25 μ l) trên các đĩa TLC để tạo thành vòng tròn từ các giọt. Cường độ của các vết thấm được so với các vết thấm tạo ra từ các chuẩn là các dung dịch nhuộm màu tạo ra trong etanol hoặc etanol/nước để xác định nồng độ thích hợp; các vết thấm này được thể hiện ở Fig 1. Độ hoà tan của các thuốc nhuộm trong nước được xác định bằng cách hoà tan một lượng thích hợp thuốc nhuộm trong 1 l hoặc nhiều hơn nước khử ion (không được đệm) ở nhiệt độ trong phòng, và bổ sung (tức là chuẩn độ với) tiếp nước khi cần thiết để thu được dung dịch bão hoà.

Nồng độ của Sudan IV trong polyme 50mg/ml là vào khoảng 0,2mg/ml, so với nồng độ 0,000mg/ml trong H_2O (Sudan IV là không tan ở độ pH trung tính). Nồng độ của diclofluorescein là vào khoảng 5mg/ml trong polyme 50mg/ml, so với 0,010mg/ml trong H_2O . Nồng độ của Eosin Y trong polyme 50mg/ml là vào khoảng 5mg/ml, so với 0,007mg/ml trong H_2O . Tỷ lệ lượng nạp (lượng thuốc cho một lượng đơn vị polyme, g/g) được tính là vào khoảng 1:250 đối với Sudan IV, 1:10 đối với diclofluorescein và 1:10 đối với Eosin Y.

Tỷ lệ lượng nạp 1:10 đối với các hợp chất có cực mà giống các dược chất về các tính chất lý-hoá là lớn hơn tỷ lệ thường thu được với các liposom, cyclodextrin, Cremophor™, hoặc chất tẩy hoặc các hệ hoà tan khác. Eosin Y là chất tạo oxy vạch đơn có thể có hoạt tính quang hoạt có hiệu quả rất cao, và các dung dịch cô đặc như vậy của Eosin Y được tạo ra với polyme của Ví dụ 1 có thể được cho là có dược tính như là các chất gây độc tế bào có hoạt tính quang hoạt.

Sự thay đổi về phổ huỳnh quang của diclofluorescein trong dung dịch polyme này (màu vàng hơi đỏ/màu da cam) hơn so với dạng trong nước (màu vàng hơi lục) là có thể dễ nhận thấy bằng mắt thường và điều này cho thấy là thuốc nhuộm này không phải là trong môi trường nước, mà được tạo bao nang trong môi trường hữu cơ của lõi hạt polyme tự lắp ráp. Thật vậy, sự thay đổi về phổ huỳnh quang đã được dùng làm phương pháp xác định sự thay đổi tính phân cực của vi môi trường (ví dụ “các mẫu dò lipid”). Màu của dung dịch Sudan IV trong polyme này là màu nâu hơi đỏ, so với màu đỏ trong dung dịch etanol và bột màu nâu khi được tạo huyền phù trong nước. Eosin Y không thể hiện sự chuyển dịch màu quan sát bằng mắt thường đáng kể (màu hồng trong nước thành màu hồng hơi đỏ trong dung dịch polyme này).

Ví dụ 2: Hoà tan của các chất có liên quan đến y học

Purpurin, Amphotericin B, Camptothecin và Doxorubicin được lựa chọn là các hợp phần dược hoạt tính (API) ít hoà tan đại diện. Amphotericin B được sử dụng trong chế phẩm huyền phù mỡ làm chất chống nấm dùng để tiêm, còn Camptothecin và Doxorubicin là các chất chữa bệnh ung thư. Purpurin là thuốc nhuộm xen vào giữa ADN có tiềm năng sử dụng làm dược phẩm, và Eosin Y là chất phản ứng oxy vạch đơn cảm quang với tiềm năng sử dụng làm phép trị liệu quang động. Mỗi API được hoà tan trong nước bằng C16- π -polyme A, C18- π -polyme B, và/hoặc thể liên hợp C16- π -polyme A-axit folic (tham khảo phần sau đây). Sự hoà tan được thể hiện bằng việc thẩm điểm API đã hoà tan và các mẫu đối chứng không hoà tan trên các đĩa TLC, như đã nêu trên cho các thuốc nhuộm.

Polyme đã được làm khô được hoàn nguyên với nước bằng cách gia nhiệt, khuấy trộn, và bắn phá bằng siêu âm khi cần thiết. Khi dung dịch quá nhớt, thì nó được pha loãng. C16- π -polyme A được sử dụng ở nồng độ 10% trọng lượng/thể tích, C16- π -polyme A được folat hoá được sử dụng ở nồng độ 5% trọng lượng/thể tích, và C18- π -polyme B được sử dụng ở nồng độ 2% trọng lượng/thể tích.

Dược chất (20 mg) được cho trực tiếp vào 1ml dung dịch polyme, tạo ra tỷ lệ khối lượng polyme:API là 5:1 với C16- π -polyme A, 2,5:1 với C16- π -polyme A được folat hoá, và 1:1 với C18- π -polyme B, chỉ trừ doxorubicin (xem phần sau đây). Hỗn hợp này được bắn phá bằng siêu âm trong thời gian 1 giờ ở năng lượng thấp, và sau đó đã được ly tâm hai lần ở vận tốc 2000 xg để tách loại chất rắn không tan. Lượng chất rắn bị đóng thành viên là không đáng kể.

Doxorubicin hydroclorua được kết hợp với polyme như nêu trên ở tỷ lệ khối lượng 10:1 C16- π -polyme A so với doxorubicin hydroclorua, hoặc tỷ lệ khối lượng 5:1 C16- π -polyme A được folat hoá so với doxorubicin, sau đó bổ sung một lượng đủ 3M natri axetat để làm trung hoà doxorubicin hydroclorua. Hỗn hợp này được lắc mạnh trong thời gian 24 giờ và sau đó ly tâm hai lần ở tốc độ 2000 xg để tách loại chất rắn không tan. Lượng chất rắn bị đóng thành viên là không đáng kể.

Tỷ lệ khối lượng của các API được hoà tan so với polyme được trình bày ở Bảng 1. Không có cố gắng nào tối ưu hoá lượng nạp polyme, do đó các tỷ lệ này thể hiện giới hạn lượng API thấp hơn mà polyme có khả năng mang trên dung dịch.

Thấm 10 μ l mẫu của mỗi dung dịch trên đĩa TLC silicagel Bakerflex™ và được để lan. Dung dịch nước tạo thành đường bao bên ngoài của vòng tròn và vòng

tròn phía trong được tạo ra bởi sự dịch chuyển polyme mang nguyên liệu được tạo bao nang (Fig 2). Trong tất cả các trường hợp, có rất ít API ở rìa ngoại biên của vùng chỉ chứa nước, điều này cho thấy sự hoà tan thành công và sự thấm qua tối thiểu của nguyên liệu được tạo bao nang này.

Bảng 1: Hoà tan API

Polyme: tỷ lệ khối lượng chất nền (w/v: trọng lượng/thể tích)

	C16- π -polyme A	16- π -polyme A được folat hoá	C18- π -polyme B
	10% w/v	5% w/v	2% w/v
Purpurin	5:1	2,5:1	không thực hiện
Camptothecin	5:1	2,5:1	không thực hiện
Amphotericin B	5:1	2,5:1	không thực hiện
Doxorubicin	10:1	5:1	không thực hiện
Eosin Y	không thực hiện	không thực hiện	1:1

4. Tính tương hợp sinh học của π Polyme

Ví dụ 1: Thích hợp làm thuốc làm mềm, kem hoặc thuốc nhão dùng khu trú

Dạng sáp trong dầu cô đặc của polyme ở Ví dụ 1 được chà xát lên da cổ tay trong của tác giả sáng chế và quan sát sự hấp thu. Nguyên liệu này dường như được hấp thu tương tự với các kem sáp được lý, với tác dụng làm mềm nhẹ ở vùng này. Không phát hiện thấy các phản ứng dị ứng ngay lúc đó hoặc về sau như tấy đỏ, phát ban, hoặc ngứa khi dùng khu trú một lần.

Nhiều polyme này là các chất sáp hút ẩm ở nhiệt độ trong phòng, với nhiệt độ nóng chảy dự tính vào khoảng 45°C đến 60°C hoặc lớn hơn, tùy thuộc vào chế phẩm. Các polyme được tạo ra từ PEG có trọng lượng phân tử thấp hơn thậm chí có thể ở dạng lỏng ở nhiệt độ trong phòng. Một số polyme có thể là chất rắn ở nhiệt độ trong phòng, nóng chảy ở nhiệt độ cơ thể. Do đó, các đặc tính này của các π polyme này làm cho chúng trở thành các chất nền rất tốt để bào chế thuốc bôi xức, kem, thuốc mỡ, thuốc làm mềm, và các dạng phân phối khác, hoặc ở dạng hỗn hợp với các chất khác nhau, bao gồm các dược chất.

Ví dụ 2: Thích hợp để dùng ngoài đường tiêu hóa

Dung dịch nước chứa polyme thu được từ Ví dụ 1 được điều chế trong nước muối đệm phosphat và sau đó được lọc vào các ống vô trùng qua các bộ lọc có cỡ lỗ 0,22 μ m.

Sử dụng phương pháp liều dung nạp tối đa, trong đó chuột nhắt CD-1 được xử lý bằng liều trong tĩnh mạch đuôi 10ml cho một kg thể trọng tiêm với nồng độ lên đến 5% trọng lượng/thể tích dung dịch nước polyme. Theo dõi các con chuột nhắt này trong thời gian 12 giờ liên tục và cứ cách 2 giờ sau đó cho đến từ 48 đến 72 giờ, tùy thuộc vào từng nhóm. Các mẫu máu được thu lấy và phân tích. Một số chuột nhắt được giết chết và được xét nghiệm trước hết phân tích toàn bộ mô. Sau đó, thực hiện phân tích mô dưới kính hiển vi trên các lát cắt chọn lọc.

Không nhận thấy sự khác nhau ở mức phát hiện được khi phân tích máu giữa chuột nhắt đối chứng và chuột nhắt được xử lý. Nhận thấy không có sự khác nhau hoặc thương tổn ở mức phát hiện được so với các con chuột đối chứng trong phân tích toàn bộ mô ở các cơ quan khác nhau bao gồm tim, phổi, thận, lá lách, gan, ruột, dạ dày, bàng quang, da, các cơ, xương, não, và u bạch huyết. Nhận được các kết quả giống nhau với nhiều mẫu nghiên cứu từ các nhóm động vật khác nhau. Nhận thấy không có sự khác nhau ở mức phát hiện được về cấu trúc mô tế bào của các mô được xét nghiệm. Một số thận cho thấy là mức nhạt màu nào đó mà giảm đi theo thời gian tiếp xúc với polyme này. Điều này ám chỉ rằng sự nhạt màu chỉ là pha tạm thời và theo thời gian nó sẽ trở nên bình thường.

Kết luận là polyme này là an toàn cho ứng dụng y học làm chất được trong các thuốc tiêm và các chế phẩm ngoài đường tiêu hóa khác. Do đó, còn có thể dự đoán là polyme này là an toàn dùng cho các dung dịch, viên dạng caplet, và viên nén qua đường miệng, dịch phun xịt qua đường mũi, dạng phun mù qua đường miệng/ phổi, dạng đặt dưới lưỡi, kem/thuốc bôi xức/cao dán dùng ở da, thuốc nhỏ mắt, các đường khu trú khác, và các đường cấp khác.

5. Gắn các gốc hướng đích với π -polyme

Ví dụ 1: Gắn galactosamin với C-16 π -polyme B thông qua tạo thành liên kết amit

Galactosamin (GA) hướng đích thụ thể asialoglycoprotein của gan (ASGPR), và polyme mang galactosamin liên kết cộng hoá trị được phân phối đến gan; xem tài liệu: L. Seymour và các đồng tác giả, "Hepatic Drug Targeting: Phase I Evaluation of

Polymer-Bound Doxorubicin” J. Clin. Oncology, 20(6): 1668-1676 (2002) và các tài liệu tham khảo trong đó.

C16- π -polyme B (Ví dụ 10 trong phần phương pháp tổng hợp nêu trên) (461mg, 0,2mmol đương lượng COOH cho một đơn vị mắt xích cơ sở) được phân tán trong 14 ml nước, và cho EDC HCl (0,485mmol) và N-hydroxysuccinimit (0,464mmol) vào hệ phân tán này. Khuấy hỗn hợp này ở nhiệt độ môi trường trong thời gian 15 phút và cho dung dịch chứa galactosamin HCl (0,386mmol) và TEMED (0,387mmol) trong 1 ml nước vào. Khuấy dung dịch này và theo dõi phản ứng này bằng TLC trên silicagel và hiện hình trong 1-butanol-axit axetic-nước (3:1:1). Một lượng bổ sung TEMED (0,079mmol), NHS (0,078mmol) và EDC HCl (0,193mmol) được cho vào để thúc đẩy phản ứng này hoàn thành. Khi TLC cho thấy là mức ổn định về tiêu thụ GA, hỗn hợp phản ứng này được thẩm tách (ngưỡng tách kích thước phân tử của màng 3500 Da) trên 3 x 1000 ml nước khử ion để tách loại các chất phản ứng trọng lượng phân tử thấp và các sản phẩm phụ. Chất lưu giữ lại được loại ra và làm khô ở nhiệt độ 60°C đến trọng lượng ổn định (348 mg).

Phân tích TLC sản phẩm này cho thấy không có GA tự do (âm tính với ninhydrin). Mẫu sản phẩm này được thủy phân bằng 6 N HCl ở nhiệt độ 100°C để thủy phân liên kết GA. Phân tích sắc ký lớp mỏng cho thấy sự có mặt của GA (dương tính với ninhydrin) ở cùng Rf như là mẫu đối chiếu GA.

Ví dụ 2: Gắn axit folic với C18- π -polyme A

BDDC (2,44g, 8,56mmol) được cân bỏ vào bình thót cổ đáy tròn 125 ml được sục argon (BDDC là rất nhớt đặc như mật ong và khó phân phối). C18- π -polyme A (10g, 4,28mmol) được cho vào bình, hỗn hợp này được gia nhiệt đến nhiệt độ 70°C, và các chất phản ứng được khuấy cùng nhau trong thời gian khoảng 30 phút. Cho axit folic (3 g) vào, sau đó là một lượng đủ THF để đảm bảo có thể thực hiện quá trình khuấy. Các chất phản ứng này được khuấy ở nhiệt độ 40-70°C qua đêm, được bảo vệ không cho bị ẩm. Sau đó, cho THF bay hơi và cho nước (80ml) vào, và khuấy hỗn hợp này ở nhiệt độ 50°C trong thời gian thêm 2 h. Sau khi làm nguội xuống nhiệt độ trong phòng, hỗn hợp này được chuyển tới phần ống thẩm tách với ngưỡng thẩm tách phân tử 3500 Dalton, và thẩm tách bằng 0,1 N HCl (2 x 2000ml), nước (2000ml), 5% natri cacbonat (2 x 2000ml) và nước (4 x 2000ml), để tách loại các hoá chất chưa phản ứng và các sản phẩm phụ. Chất lưu giữ lại màu da cam-vàng sáng

được loại ra. Một phần được làm bay hơi đến trọng lượng ổn định để xác định nồng độ chất rắn, và được sử dụng cho thử nghiệm hoà tan như đã nêu trên.

Ví dụ 3: Gắn axit N-axetyl neuraminic (NANA) vào các chất tương tự với π -polyme

Các dẫn xuất của axit neuraminic là các gốc hướng đích virus cúm vì protein bao ngưng kết tổ hồng cầu và neuraminidaza, cả hai chất này đã được biết đến là gắn kết với axit sialic. Một số phương pháp để liên hợp NANA và các dẫn xuất của nó với π -polyme theo sáng chế đã được phát triển.

Ví dụ 3a: Gắn axit N-axetyl neuraminic (NANA) vào C16- π -polyme A bằng cách este hoá

BDDC (2,44g, 8,56mmol) và C18- π -polyme A (10g, 4,28mmol) được kết hợp với nhau và gia nhiệt đến nhiệt độ 70 °C, và được khuấy cùng nhau dưới khí argon trong thời gian khoảng 30 phút. Cho thêm axit N-axetyl neuraminic (3 g), sau đó là THF khi cần thiết để duy trì độ lỏng. Các chất phản ứng này được khuấy ở nhiệt độ 40-70°C qua đêm, được bảo vệ không cho bị ẩm. Cho thêm nước (80ml) vào, và hỗn hợp này được khuấy ở nhiệt độ 50°C thêm 2h nữa. Sau khi làm nguội xuống nhiệt độ trong phòng, hỗn hợp này được thẩm tách bằng dung dịch HCl 0,1N, dung dịch NaHCO₃ 5%, và nước (2 x 2000 ml mỗi lần) với ngưỡng kích thước phân tử màng là 3,5 kDa. Việc chấm điểm trên đĩa silicagel TLC, và hiển hình bằng 0,2% orcinol trong 70% axit sulfuric, ở nhiệt độ 130°C, đã cho thấy sự kết hợp axit neuraminic vào polyme.

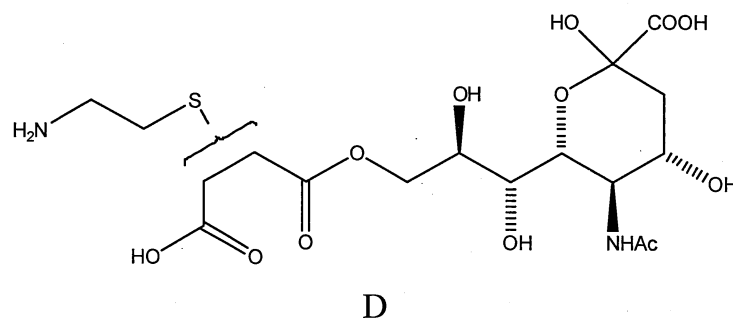
Ví dụ 3b: Gắn axit N-axetyl neuraminic (NANA) monomaleat vào C16- π -polyme A

Axit 5-N-Axetylneuraminic (NANA) (0,86mmol), anhydrit maleic (0,93mmol) và triethylamin (1,77mmol) được hòa tan trong 1,5 mL DMSO trong bình cầu đáy tròn khô. Bình cầu này được tiêm khí argon và được đặt trong bể dầu. Hỗn hợp này được khuấy ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 65°C đến 85°C và sự tiến triển của phản ứng được kiểm tra bằng TLC trên các đĩa silic oxit (i-PrOH-EtOAc-nước, 4:3:2) đến khi phản ứng diễn ra hoàn toàn (không có mặt của NANA, phát hiện bằng chất phản ứng orcinol /H₂SO₄ hoặc ure/HCl). Hỗn hợp phản ứng này được làm nguội đến nhiệt độ trong phòng, và nước được bổ sung để thủy phân anhydrit maleic dư. Dung dịch thu được chứa NANA monomaleat được sử dụng trực tiếp trong các phản ứng sau đó.

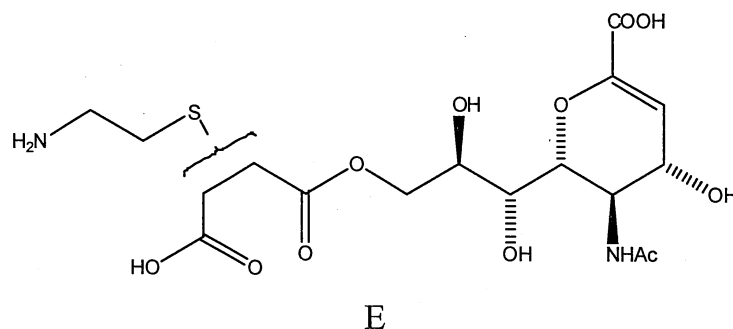
Dung dịch nước chứa C16- π -polyme A diglycolat (Xem phần “Tổng hợp π -polyme”, Ví dụ 11a) (1,23mmol đơn vị lặp lại, 2,46mmol -COOH) được điều chỉnh đến độ pH nằm trong khoảng 4,5-6,5. Carbodiimitt (EDC HCl, 3,86mmol) và N-hydroxysuccinimitt (2,6mmol) được bổ sung vào và hỗn hợp này được khuấy ở nhiệt độ môi trường trong thời gian khoảng 60 phút. Dung dịch chứa NANA monomaleat (2,49mmol), được điều chế như được mô tả trên đây, được bổ sung vào, và độ pH được điều chỉnh bằng TEMED đến độ pH = 6-7. Việc khuấy được tiếp tục ở nhiệt độ môi trường đến 26 giờ. Sản phẩm này được tinh chế bằng cách thẩm tách, trước tiên bằng 20mmol natri axetat, độ pH=4,5, sau đó bằng nước. Chất lưu giữ lại được loại bỏ và được cất giữ để sử dụng.

Ví dụ 3c: Gắn axit N-axetyl neuraminic (NANA) vào C16- π -polyme A, thông qua nhóm đệm

Xysteamin (2-aminoetanthiol) hydroclorua (0,93mmol trong nước) được bổ sung vào NANA monomaleat với lượng đẳng phân tử (dung dịch này được điều chế như được mô tả trên đây), tiếp đó là TEME với lượng đẳng phân tử D để tạo điều kiện thuận lợi cho việc bổ sung thiol vào liên kết đôi. Sau phản ứng là TLC trên silic oxit (i-PrOH-EtOAc-nước, 4:3:2) đến khi phản ứng diễn ra hoàn toàn (không có mặt của O-maleoyl-NANA, phát hiện bằng chất phản ứng orcinol /H₂SO₄ hoặc ure/HCl) để tạo ra gốc hướng đích D.



Bằng phương pháp giống hệt, axit 5-N-Axetyl-2,3-dehydro-2-deoxyneuraminic (DANA) được tạo dẫn xuất để tạo ra gốc hướng đích E.



Bằng phương pháp giống hệt, xystein và glutathion được bổ sung vào các monoeste của axit maleic NANA và DANA.

Bằng phương pháp được mô tả trong Ví dụ 3b trên đây, thể liên hợp mercaptosucxinat của C16- π -polyme A bis(aconitat) được amit hoá bằng gốc hướng đích D. Polyme này chứa đến 8 nhóm -COOH trên một đơn vị lặp lại (Xem phần “Tổng hợp π -polyme”, Ví dụ 12c).

Ví dụ 3d: Gắn axit N-axetyl neuraminic (NANA) vào C16- π -polyme A, thông qua nhóm đệm

Bằng phương pháp giống với phương pháp được mô tả trên đây, gốc hướng đích E được liên hợp với C16- π -polyme A diglycolat (Xem phần “Tổng hợp π -polyme”, Ví dụ 11a) polyme.

Ví dụ 3e: Gắn β -metylglycosit của axit neuraminic (MNA) vào C16- π -polyme

Polyme có trung bình một nhóm cacboxyl trong một đơn vị lặp lại (0,396mmol) được hòa tan trong nước và được cho phản ứng với NHS (0,4mmol) và EDC•HCl (0,64mmol). β -metylglycosit của axit neuraminic (MNA) (0,42mmol) được bổ sung vào. Hỗn hợp phản ứng này được khuấy ở nhiệt độ môi trường (25-30°C) trong thời gian 18-24 h, và sau đó được tinh chế bằng cách thẩm tách.

Ví dụ 3f: Mẫu C16- π -polyme A diglycolat thứ hai có hai nhóm cacboxyl trong một đơn vị lặp lại cũng được liên hợp với MNA theo cùng một kiểu.

Ví dụ 3g: Gắn axit β -O-metyl neuraminic (MNA) vào C16- π -polyme B

C16- π -polyme B, 43 micromol COOH, trong 1 ml nước, và β -metyl glycosit của axit neuraminic (Toronto Research Chemicals), 40 micromol, được trộn cùng với nhau, và 40 micromol NHS trong 0,1ml nước được bổ sung, tiếp đó là 40 micromol EDC hydroclorua trong 0,1 ml nước. Hỗn hợp phản ứng này được lắc ở nhiệt độ môi trường trong thời gian 48 giờ, và được phân tích bằng TLC trên silicagel với isopropanol-etylaxetat-nước (4:3:2). Phát hiện bằng 0,2% orcinol trong 70% axit sulfuric, ở nhiệt độ 130°C, không tạo ra màu khi phản ứng với polyme ban đầu, nhưng TLC hỗn hợp phản ứng đã cho các chấm màu tía cùng di chuyển với polyme này.

Tất cả thể liên hợp polyme trong các ví dụ trên (3a-3g) đã cho thấy phản ứng dương tính, sau khi thẩm tách, với sự có mặt của axit neuraminic khi hiển thị bằng chất phản ứng orcinol/axit sulfuric hoặc ure/HCL trên TLC.

Ví dụ 4: Gắn zanamivir vào C16- π -polyme B

Zanamivir (GG167) là chất ức chế tiềm năng neuraminidaza virut, và polyme mang phân tử này làm phối tử đa hoá trị là các chất ức chế sự sao chép của bệnh cúm.

Phân tán C16- π -polyme B (920 mg) trong 30 ml nước, và cho EDC HCl (1,2mmol) và N-hydroxysuccinimit (1,1mmol) vào chất này. Hỗn hợp này được khuấy ở nhiệt độ môi trường trong thời gian 20 phút, và cho dung dịch chứa muối axit trifloaxetic của axit 5-axetamido-7-(6'-aminohexyl)-carbamyloxy-4-guanidino-2,3,4,5-tetrađeoxy-D-glyxero-D-galacto-non-2-enopyranosonic (các patent Mỹ số 6,242,582 và 6,680,054) (0,39g, 0,67mmol) và TEMED (0,67mmol) trong 1 ml nước vào. Dung dịch này được khuấy ở nhiệt độ trong phòng, và phản ứng này được theo dõi bằng TLC. Hỗn hợp phản ứng này được thẩm tách (màng với ngưỡng kích thước phân tử 3500 kDa) với 3 x 1000 ml nước khử ion để tách loại các chất phản ứng có trọng lượng phân tử thấp và các sản phẩm phụ. Chất lưu giữ lại này được loại bỏ và làm khô ở nhiệt độ 60°C đến trọng lượng ổn định. Lượng đường kết hợp có thể được xác định bằng thử nghiệm so màu đối với nhóm guanidin (Can. J. Chem., 36:1541 (1958)). Có thể thực hiện thử nghiệm neuraminidaza theo quy trình của Potier et al, Anal. Biochem., 29 287 (1979).

Ví dụ 5: Gắn Mimosin

C16- π -polyme A diglycolat (Xem phần “Tổng hợp π -polyme”, Ví dụ 11a) với 4,5% khối lượng/thể tích dung dịch (1mmol đơn vị lặp lại, khoảng 2mmol trong các nhóm COOH) được cho phản ứng với NHS (2,27mmol) và EDC•HCl (2,23mmol), và bổ sung vào hỗn hợp thu được dung dịch chứa l-mimosin (2,14mmol, được điều chế trong 5 ml nước và pH được điều chỉnh bằng TEMED để làm tăng độ tan) và được khuấy ở nhiệt độ môi trường và độ pH nằm trong khoảng 6,8-7 trong thời gian khoảng 22-24 h. Độ pH này được điều chỉnh đến 3-4 bằng dung dịch HCl 6N, hỗn hợp này được khuấy trong thời gian 15-30 phút, và độ pH được tăng lên đến 6,1 bằng cách bổ sung TEMED vào. Sau đó, hỗn hợp này được thẩm tách (ngưỡng 3,5 kD) bằng nước để loại bỏ các tạp chất và các sản phẩm có trọng lượng phân tử thấp.

Ví dụ 6: Gắn peptit và protein vào π -polyme A đimaleat và diacrylat

Quy trình chung đối với mảnh Fab: Các liên kết disulfua trong mảnh kháng thể F(ab')₂ được khử bằng Gel khử disulfua TCEP cố định (Pierce, Sản phẩm # 0077712) bằng cách sử dụng quy trình của nhà sản xuất; hoặc theo cách khác bằng DTT hoặc TCEP trong dung dịch, các chất phản ứng đã qua sử dụng được loại bỏ

bằng cách siêu lọc bằng cách sử dụng các bộ lọc 30kD. Các mảnh F(ab')₂ đã được khử chứa các nhóm sulfhydryl tự do sau đó được cho phản ứng với π -polyme A đimaleat hoặc điacrylat với sự có mặt của TEMED.

Quy trình chung đối với xystein và peptit chứa xystein: este acrylat hoặc maleat của π -polyme A được cho phản ứng với các gốc xystein bằng cách sử dụng triethylamin làm chất xúc tác. Bổ sung xystein (0,66mmol) và triethylamin (1,32mmol) vào huyền phù polyme điacrylat (0,3mmol đơn vị lặp lại, 0,6mmol acrylat) trong nước. Bình cầu này được tiêm khí argon và được khuấy ở nhiệt độ môi trường qua đêm (khoảng 18 h). TLC hỗn hợp phản ứng trên silic oxit (i-PrOH-Etyl axetat-nước, 4:3:2) đã cho thấy không có mặt xystein và đốm tương tính với ninhydrin đối với polyme, chỉ ra rằng có sự bổ sung xystein vào liên kết đôi acrylat.

Ví dụ 6a: Gắn các mảnh kháng thể kháng bệnh dại vào C16- π -polyme A diglycolat

C16- π -polyme A đimaleat được điều chế, với nguyên liệu ban đầu là PEG trọng lượng phân tử 4500. Globulin miễn dịch kháng bệnh dại thu được từ người (hIgG) BayRab™ được xử lý bằng pepsin theo cách thường dùng trong dung dịch đệm có độ pH axit chất để tạo ra mảnh F(ab')₂, được tinh chế bằng phương pháp siêu lọc bằng cách sử dụng các bộ lọc 50kD. Đoạn F(ab')₂ này được liên hợp với PEG 4500 C-16- π -polyme A diglycolat bằng phương pháp EDC được mô tả trong Ví dụ 5 trên đây.

Ví dụ 6b: Gắn mảnh kháng thể kháng bệnh dại vào C16- π -polyme A đimaleat

Đoạn F(ab')₂ của BayRab™ hIgG (xem ví dụ 6a) được khử bằng DTT (hoặc theo cách khác bằng TCEP), và chất phản ứng đã qua sử dụng được loại bỏ bằng cách siêu lọc bằng cách sử dụng các bộ lọc 30kD. Các mảnh Fab'-SH được liên hợp với PEG 4500 C-16- π -polyme A đimaleat bằng cách bổ sung theo kiểu Michael thiol tự do vào liên kết đôi axit maleic ở độ pH 7-8,3 (TEMED). Thử liên hợp này được tinh chế bằng siêu lọc bằng cách sử dụng các bộ lọc 100kD để loại bỏ các tạp chất có trọng lượng phân tử thấp.

Ví dụ 6c: PEG 8500 C-16- π -polyme A đimaleat được liên hợp với mảnh F(ab')₂ đã được khử của BayRab™ hIgG như được mô tả trên đây.

Ví dụ 6d: Gắn peptit vào C16- π -polyme A đimaleat

Peptit KDYRGWKHWVYYTC ("Rab 1") đã được báo cáo là có khả năng gắn kết với virus bệnh dại (T.L. Lentz, 1990, J. Mol. Recognition, 3(2):82-88). Cys ở

đầu tận của peptit này được sử dụng để tổng hợp thể liên hợp peptit- π -polyme A kháng bệnh dại. C16- π -polyme A đimalcat (hai gốc axit maleic trong một đơn vị lặp lại) thu được từ PEG 1500 (0,157mmol) được hòa tan trong nước (6 mL) và độ pH của dung dịch này được điều chỉnh đến 8 bằng TEMED. Peptit (0,157mmol) được hòa tan trong DMF (3,1 ml) được bổ sung, và hỗn hợp phản ứng này được khuấy ở nhiệt độ môi trường trong môi trường argon trong khi độ pH của hỗn hợp phản ứng được duy trì trong khoảng 8-8,3. Sự tiến triển của phản ứng được kiểm tra bằng cách thử nghiệm hỗn hợp phản ứng này với chất phản ứng Ellman. Sau khoảng 45 giờ, thử nghiệm Ellman hầu như âm tính. Nước được bổ sung vào để làm giảm nồng độ DMF và hỗn hợp phản ứng này được ly tâm để loại bỏ lượng nhỏ chất kết tủa. Dịch trong nổi trên bề mặt được siêu lọc qua thiết bị lọc ly tâm 10 kD (Amicon Ultra 10 kD, cat# UFC901024) và chất lưu giữ lại được rửa bằng nước nhiều lần để loại bỏ các tạp chất có trọng lượng phân tử thấp.

Ba peptit sau (O = ornithin; NH₂ biểu thị amit có đầu tận C) được điều chế bằng cách tổng hợp pha rắn tự động, và được liên hợp với PEG1500 π -polyme A đimalcat theo cùng cách như peptit Rab1:

Ví dụ 6d: KDYRGWKOWVYYTC ("Rab2")

Ví dụ 6e: KGWKHWVYC(NH₂) ("Rab3")

Ví dụ 6f: KGWKOWVYC(NH₂) ("Rab4")

6. Hoạt tính kháng virus của π -polyme

Ví dụ 1: Hiệu quả phòng chống bệnh cúm

Virus cúm ở người ATCC VR-1520 (H2N1) được sử dụng trong thử nghiệm bảo vệ chuột. Tiêm vào tĩnh mạch đuôi một lần duy nhất với liều 200ul/20g BW dẫn đến việc 99,5% virus gây nhiễm bị chết so với ở các con đối chứng (7 ngày sống sót không được tiêm).

Mười con chuột ở mỗi nhóm. Chuột được tiêm tĩnh mạch đuôi với liều 200ul/20g thể trọng dung dịch liều thấp (0,0375%) và liều cao (0,15%) chứa thể liên hợp π -polyme B-MNA của Ví dụ 3 trên đây. Các con vật sau khi điều trị được cho dùng liều 24 giờ sau khi bị nhiễm virus, trong khi các con vật đã được điều trị trước được cho dùng liều 6 giờ trước khi nhiễm virus. Các con đối chứng dương tính được tiêm phối tử tự do với lượng tương đương, trong khi con đối chứng âm tính được tiêm dung dịch đệm nước muối.

Thời gian sống được sử dụng làm điểm cuối hiệu quả chỉ số. Thể trọng được sử dụng làm thông số nghiên cứu. Nghiên cứu mô các cơ quan bên trong được tiến hành trong cả việc xét nghiệm vĩ mô và xét nghiệm vi mô. Các kết quả được thể hiện trên Fig.2.

Mức tăng thời gian sống là 5,93 giờ ($\pm 0,48$ h SD) đối với nhóm điều trị liều cao, so với chỉ 2,94 giờ ($\pm 0,75$ h SD) đối với nhóm đối chứng dương tính (Fig.1 và Fig.2). Dựa trên cơ sở khối lượng phổi tử, việc điều trị liều cao tương ứng với, tối đa, 0,03% phổi tử, giả sử tỷ lệ thay thế polyme-thể liên hợp tối đa là 0,2 trọng lượng/trọng lượng. Do vậy, thể liên hợp polyme này thể hiện hiệu quả tương đối cao so với phổi tử không được liên hợp đối chứng.

Nghiên cứu mô ở tầm vĩ mô cũng như xét nghiệm vi mô của một số chuột trong nhóm điều trị bằng thể liên hợp polyme B-MNA liều cao đã cho thấy các mẫu hình bình thường, chỉ khác là trong phần tuỷ xương, chuột đã được điều trị thể hiện sự giảm không đáng kể các tế bào bạch cầu, điều này có thể quy cho các tác động của sự nhiễm virus cúm. Sự giảm thể trọng ở các nhóm bảo vệ (liều cao - 8,9%, liều thấp - 6,2%) cũng như các nhóm điều trị (liều cao - 9,0%, liều thấp - 9,4%) là nhỏ hơn ở nhóm đối chứng dương tính (- 9,8%), gợi ý rằng sự kết hợp với chính phổi tử chứ không phải là với polyme (Fig.3). Sự tăng nhỏ về trọng lượng 0,7% xảy ra ở chuột không được điều trị.

Ví dụ 2: Hiệu quả phòng chống bệnh dại

Các nhóm gồm mười con chuột Thụy Sĩ trắng, khoảng 20g mỗi con, cả cái lẫn đực, được sử dụng trong thử nghiệm bảo vệ in vivo. Các con chuột này được thử cho tiêm 3 lần LD₅₀ virus bệnh dại. Mỗi lần tiêm với 0,03 ml chủng gây bệnh dại CVS (virus chuẩn thử), ở mức pha loãng 10^{-6} (100 LD₅₀/ml). Sự sống sót, sự liệt và thể trọng hằng ngày được kiểm tra. Việc cho dùng được chất trong màng bụng vào thời điểm 25, 48, và 72 giờ, và việc cho dùng được chất trong não vào thời điểm 25 và 48 giờ được nghiên cứu. Các kết quả được thể hiện trong bảng 1 và 2.

Bảng 1
Thử nghiệm bệnh dại ở chuột
Tiêm trong màng bụng; số con sống sót

Ví dụ số (liều/tiêm mg)	Ngày sau khi nhiễm bệnh										
	1*	2*	3*	4	5	6	7	8	9	10	11
6a (0,4)	10	10	10	10	10	10	4	1	1	1	0
6b (2,0)	10	10	10	10	10	10	5	3	0		0
6c (2,0)	10	10	10	10	10	10	7	1	0		0
6d (2,1)	10	10	10	10	10	10	5	1	1	1	0
6e (2,4)	10	10	10	10	10	10	5	0			0
6f (3,0)	10	10	10	10	10	10	5	1	1	1	0
6g (2,6)	10	10	10	10	10	10	4	0			0
Peptit Rab1 (0,5)	10	10	10	10	10	10	7	2	0		0
Peptit Rab2 (0,5)	10	10	10	10	10	10	5	3	1	1	0
Peptit Rab3 (0,5)	10	10	10	10	10	10	5	1	0		0
Peptit Rab4 (0,5)	10	10	10	10	10	10	3	0			0
6d (1,0)	10	10	10	10	10	10	5	1	1	1	0
6e (1,2)	10	10	10	10	10	10	4	1	1	0	0
6f (1,5)	10	10	10	10	10	10	5	0			0
6g (1,3)	10	10	10	10	10	9	4	1	0		0
BayRab™ (0,4)	10	10	10	10	10	10	5	0			0
BayRab™ (2,0)	10	10	10	10	10	10	6	1	0		0
6b (0,4)	10	10	10	10	10	9	3	0			0
6c (0,4)	10	10	10	10	10	10	4	0			0
Nước muối	10	10	10	10	10	10	6	2	0		0
Không	10	10	10	10	9	9	5	1	1	1	0

* Các liều được tiêm vào ngày 1-3

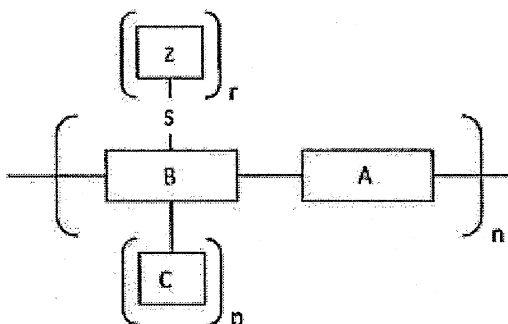
Bảng 2
Tiêm trong não; số con sống sót

Ví dụ số (liều/tiêm mg)	Ngày sau khi nhiễm bệnh										
	1*	2*	3	4	5	6	7	8	9	10	11
BayRab™ (0,4)	9	9	9	9	9	9	9	7	1	0	0
6g (0,4)	10	10	10	10	10	10	7	3	2	2	0
Nước muối	10	10	10	10	10	10	7	1	1	1	0

* Các liều được tiêm vào ngày 1 và 2

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Polyme dạng rắn lược có cấu trúc sau:



chứa mạch chính được tạo ra từ các gốc có điểm phân mạch nhánh B nằm xen kẽ với các khối polyme hòa tan trong nước, ưa nước A; và có các mạch bên kỵ nước C và các phối tử Z tùy ý được gắn vào các gốc có điểm phân mạch nhánh, trong đó:

khối polyme hòa tan trong nước A được chọn từ nhóm bao gồm poly(etylen glycol), poly(propylen glycol), poly(etylenimin), poly(rượu vinylic), và poly(vinylpyrrolidon), và các copolyme của chúng;

gốc có điểm phân mạch nhánh B là thể liên hợp của dithiotreitol, dithioerythritol, hoặc 2,3-điaminobutan-1,4-đithiol với hai phân tử axit maleic;

mỗi mạch bên kỵ nước C có trị số logP lớn hơn 1,4, và độc lập được chọn từ nhóm bao gồm hydrocarbon mạch thẳng hoặc mạch nhánh có 6-30 nguyên tử C tùy ý được thế bằng một hoặc nhiều phân tử thế ưa nước; hydrocarbon vòng hoặc đa vòng có 6-30 nguyên tử C tùy ý được thế bằng một hoặc nhiều phân tử thế ưa nước; và axit amin, peptit và polyme kỵ nước;

mỗi phối tử Z độc lập là phối tử có ái lực gắn kết đặc hiệu với bề mặt của virus;

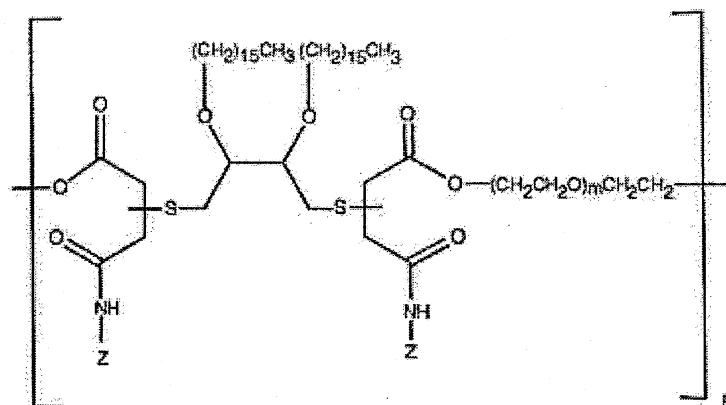
s là liên kết hoặc nhóm đệm;

n có trị số nằm trong khoảng từ 3 đến 100;

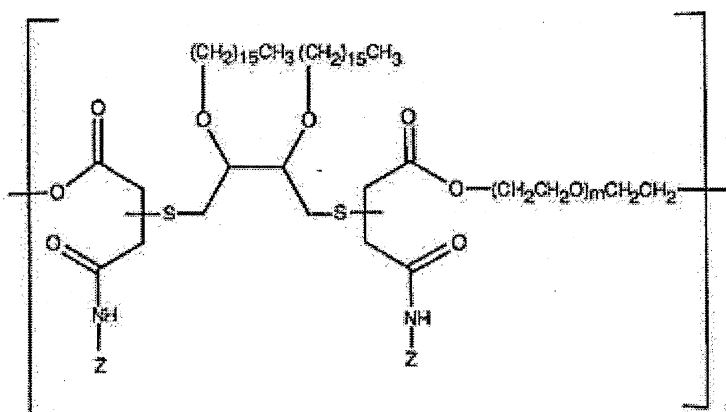
p có trị số trung bình nằm trong khoảng từ lớn hơn 1 đến 4; và

r có trị số trung bình nằm trong khoảng từ 1 đến 4;

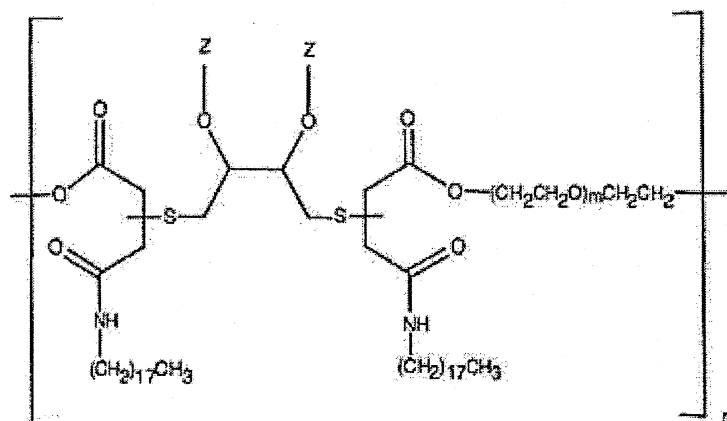
với điều kiện là polyme dạng rắn lược này không phải là:



trong đó -NH-Z là axit 5-axetamido-7-(6'-aminohexyl)-carbamyloxy-4-guanidino-2,3,4,5-tetradecoxy-D-glyxero-D-galacto-non-2-enopyranosonic được liên kết với N ở vị trí 6' (zanamivir);



trong đó -NH-Z là axit β -O-metyl neuraminic được liên kết với N (MNA); hoặc



trong đó Z là neuraminyl (NANA).

2. Polyme dạng rắn lược theo điểm 1, trong đó ít nhất một phối tử là axit N-axetyl neuraminic, β -metyl glycosit của axit neuraminic, hoặc axit 4-guanidino-2,4-đideoxy-2,3-đehydro-N-axetylneuraminic.

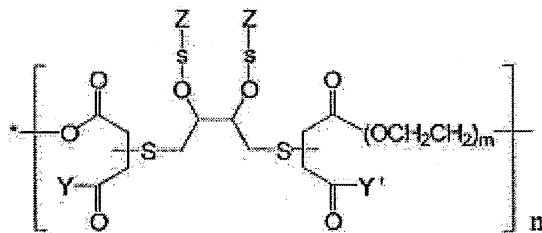
3. Polyme dạng rắn lược theo điểm 1, trong đó ít nhất một phối tử Z là peptit, kháng thể hoặc mảnh kháng thể có ái lực gắn kết đặc hiệu đối với bề mặt của virus nêu trên, trong đó tốt hơn nếu phối tử là các mảnh Fab hoặc $F(ab')_2$ thu được từ globulin miễn dịch (IgG) phòng đại ở người.

4. Polyme dạng rắn lược theo điểm 1, trong đó ít nhất một phối tử Z là peptit được chọn từ nhóm bao gồm KDYRGWKHWVYYTC, KDYRGWKOWVYYTC, KGWKHWVYC(NH₂), và KGWKOWVYC(NH₂).

5. Polyme dạng rắn lược theo điểm 1, trong đó khối polyme A được chọn từ nhóm bao gồm poly(etylen glycol), poly(propylen glycol), và các copolyme của chúng.

6. Polyme dạng rắn lược theo điểm 5, trong đó khối polyme A là poly(etylen glycol), trong đó khối polyme A có độ dài trung bình nằm trong khoảng từ 3 đến 3.000 đơn vị monome.

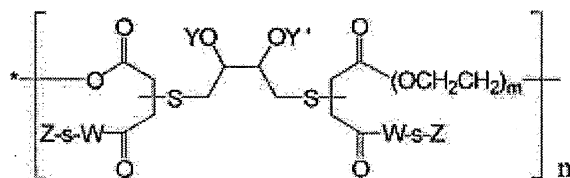
7. Polyme dạng rắn lược theo điểm 1, trong đó polyme này có cấu trúc:



trong đó m nằm trong khoảng từ 3 đến 3.000, và Y và Y' độc lập được chọn từ nhóm bao gồm R, OR, COOR, SR, NHR, NRR', ONHR, NHOR, NRNH₂, NHNHR, NRNHR', và NHNRR', trong đó R và R' độc lập được chọn từ nhóm bao gồm các hydrocarbon mạch nhánh hoặc mạch thẳng có 6-30 nguyên tử C tùy ý được thế bằng một hoặc nhiều phần tử thế ưa nước, các hydrocarbon vòng hoặc đa vòng có 6-30 nguyên tử C tùy ý được thế bằng một hoặc nhiều phần tử thế ưa nước, và các axit amin, peptit và polyme kỵ nước.

hoặc

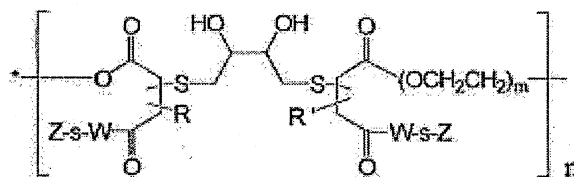
trong đó polyme này có cấu trúc:



trong đó m nằm trong khoảng từ 3 đến 3.000, W là O hoặc NH, và Y và Y' độc lập được chọn từ nhóm bao gồm R, COR, COOR, CONHR, CONRR', CONHOR, CONRNH₂, CONHNHR, CONRNHR', và CONHNRR', trong đó R và R' độc lập được chọn từ nhóm bao gồm các hydrocarbon mạch nhánh hoặc mạch thẳng có 6-30 nguyên tử C tùy ý được thế bằng một hoặc nhiều phần tử thế ưa nước, các hydrocarbon vòng hoặc đa vòng có 6-30 nguyên tử C tùy ý được thế bằng một hoặc nhiều phần tử thế ưa nước, và các axit amin, peptit và polyme kỵ nước;

hoặc

trong đó polyme này có cấu trúc:



trong đó m nằm trong khoảng từ 3 đến 3.000, W là O hoặc NH, và R và R' độc lập được chọn từ nhóm bao gồm các hydrocacbon mạch nhánh hoặc mạch thẳng có 6-30 nguyên tử C tùy ý được thế bằng một hoặc nhiều phân tử thế ưa nước, các hydrocacbon vòng hoặc đa vòng có 6-30 nguyên tử C tùy ý được thế bằng một hoặc nhiều phân tử thế ưa nước, và các axit amin, peptit và polyme kỵ nước.

8. Peptit được chọn từ nhóm bao gồm KGWKHWVYC(NH₂), và KGWKOWVYC(NH₂).

1/2

Thời gian sống sau khi nhiễm

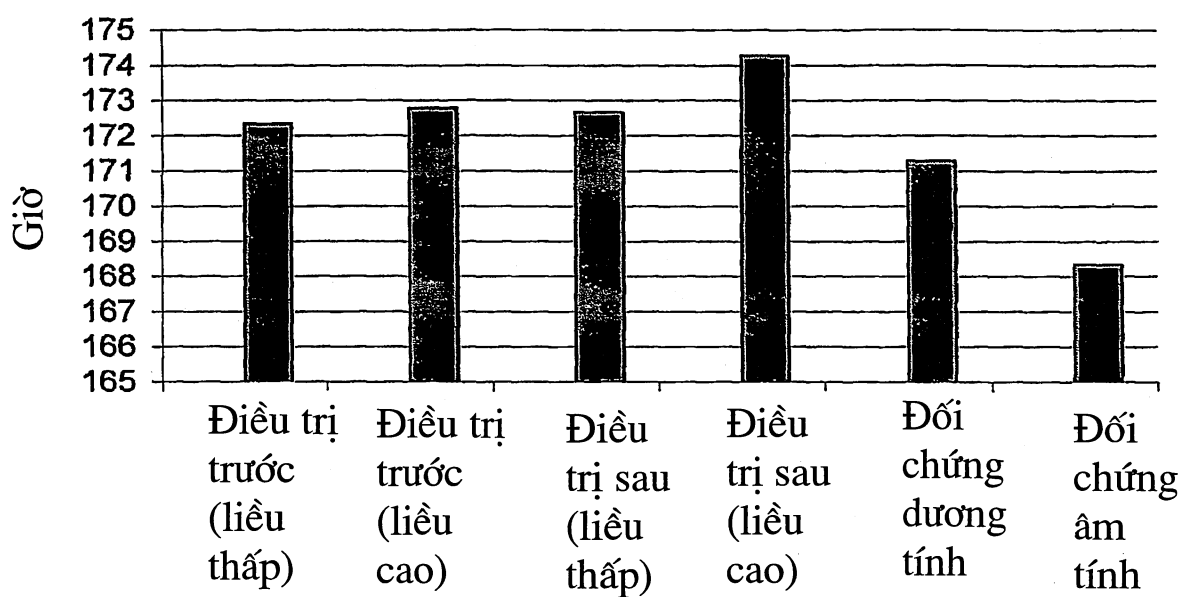


Fig.1

Mức tăng thời gian sống

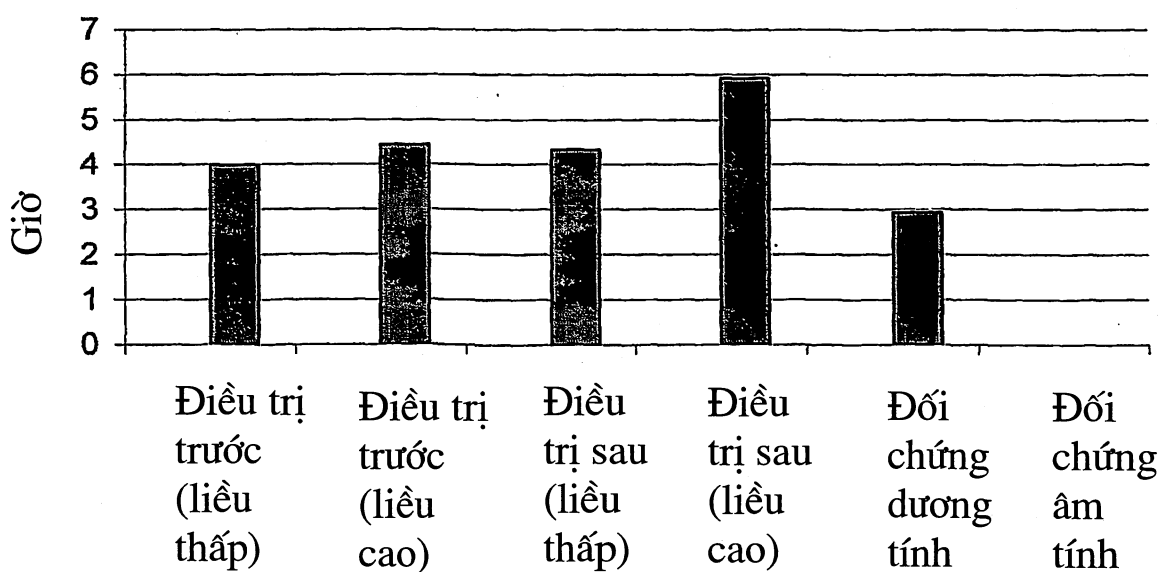


Fig.2

2/2

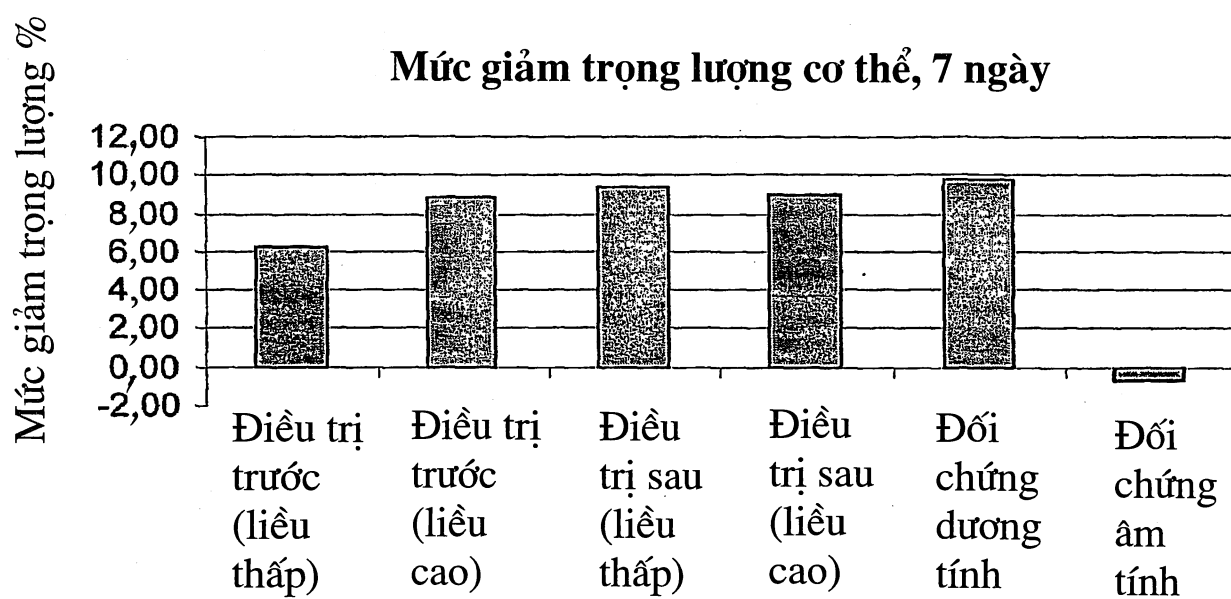


Fig.3