



(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) 
1-0022040

(51)⁷ **A61K 47/48, 38/23, A61P 9/00, 29/00,** (13) **B**
11/00

-
- (21) 1-2014-01420 (22) 30.10.2012
(86) PCT/EP2012/071507 30.10.2012 (87) WO2013/064508 10.05.2013
(30) 11187735.3 03.11.2011 EP
(45) 25.10.2019 379 (43) 25.07.2014 316
(73) 1. BAYER PHARMA AKTIENGESELLSCHAFT (DE)
Mullerstrasse 178, 13353 Berlin, Germany
2. BAYER INTELLECTUAL PROPERTY GMBH (DE)
Alfred-Nobel-Strasse 10, 40789 Monheim, Germany
(72) FLAMME, Ingo (DE), KOBBERLING, Johannes (DE), LERCHEN, Hans-Georg
(DE), GRIEBENOW, Nils (DE), SCHOHE-LOOP, Rudolf (DE), WITTROCK, Sven
(DE), KOLLNBERGER, Maria (DE), WUNDER, Frank (DE), REDLICH, Gorden
(DE), KNORR, Andreas (DE), MARLEY, July (GB), PRITCHARD, Iain (GB)
(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)
-

(54) **TIỀN DƯỢC CHẤT ĐƯỢC TẠO THÀNH CHỦ YẾU TỪ POLYETYLEN
GLYCOL CHỨA ADRENOMEDULIN, QUY TRÌNH ĐIỀU CHẾ VÀ THUỐC
CHỨA TIỀN DƯỢC CHẤT NÀY**

(57) Sáng chế đề cập đến tiền dược chất được tạo thành chủ yếu từ polyetylen glycol (PEG) chứa adrenomedulin và quy trình bào chế chúng. Tiền dược chất này là hữu hiệu để điều trị và/hoặc ngăn ngừa các bệnh và để sản xuất thuốc để điều trị và/hoặc ngăn ngừa các bệnh, cụ thể là các bệnh tim mạch, các rối loạn do bị phù và/hoặc viêm.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến tiền dược chất được tạo thành chủ yếu từ polyetylen glycol (PEG) mới chứa adrenomedulin, quy trình bào chế tiền dược chất này, việc sử dụng tiền dược chất này để điều trị và/hoặc ngăn ngừa bệnh, và việc sử dụng tiền dược chất này để sản xuất thuốc để điều trị và/hoặc ngăn ngừa bệnh, cụ thể là bệnh tim mạch, các rối loạn do bị phù và/hoặc viêm.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Peptit hormon adrenomedulin gồm 52 axit amin (ADM) được tạo ra ở tuyến thượng thận, phổi, thận, cơ tim và các cơ quan khác. Hàm lượng của ADM trong huyết tương nằm trong khoảng thấp hơn picomol. ADM là thành phần của họ peptit liên quan đến gen canxitonin (CGRP) chứa peptit và gắn kết với thụ thể cặp đôi heterodime G-protein mà gồm có CRLR và RAMP 2 hoặc 3 (thụ thể tương tự thụ thể canxitonin (Calcitonin-receptor-like receptor) và protein 2 hoặc 3 cải biến hoạt tính thụ thể (receptor activity modifying protein 2 or 3). Sự hoạt hóa của thụ thể ADM dẫn đến sự tăng nội bào của adenosin 3', 5'-monophosphat vòng (cAMP) ở tế bào mang thụ thể. Các thụ thể ADM là có mặt trên các loại tế bào khác nhau ở hầu hết tất cả các cơ quan bao gồm tế bào nội mô. ADM được cho là được chuyển hóa bởi endopeptidaza trung tính và được thanh thải phần lớn ở phổi trong đó các thụ thể ADM được biểu hiện ở mức cao [xem ấn phẩm: Gibbons C., Dackor R., Dunworth W., Fritz-Six K., Caron K.M., *Mol Endocrinol* **21**(4),783-796 (2007)].

Các dữ liệu thử nghiệm từ các ấn phẩm này gợi ý rằng ADM có liên quan đến nhiều vai trò chức năng mà bao gồm, trong số các vai trò khác, điều hòa huyết áp, giãn phế quản, chức năng thận, tiết hormon, sinh trưởng tế bào, sự biệt hóa, sự dẫn truyền thần kinh và sự điều biến đáp ứng miễn dịch. Hơn nữa, ADM đóng vai trò cốt yếu như yếu tố tự tiết trong quá trình tăng sinh và tái sinh của tế bào nội mô [xem ấn phẩm: García M.A., Martín-Santamaría S., de Pascual-Teresa B., Ramos A., Julián M.,

Martínez A., *Expert Opin Ther Targets*, **10**(2), 303-317 (2006)].

Có rất nhiều bằng chứng từ các ấn phẩm này chỉ ra rằng ADM là tuyệt đối cần thiết đối với chức năng ngăn nội mô nguyên vẹn và việc dùng ADM ở mức trên sinh lý tạo ra chức năng chống phù và chống viêm mạnh ở nhiều tình trạng bệnh viêm trong các thử nghiệm trên động vật bao gồm sự nhiễm trùng, tổn thương phổi cấp tính và viêm ruột [xem ấn phẩm: Temmesfeld-Wollbrück B., Hocke A.C., Suttorp N., Hippenstiel S., *Thromb Haemost*; **98**, 944-951 (2007)].

Cho đến nay, thử nghiệm lâm sàng của ADM được thực hiện ở các chỉ định về bệnh tim mạch với điểm cuối huyết động đo được như bệnh cao huyết áp phổi, bệnh cao huyết áp, chứng suy tim và chứng nhồi máu cơ tim cấp tính. ADM thể hiện các tác dụng huyết động ở vài nghiên cứu ở người bệnh mắc các tình trạng bệnh được kể đến trên đây. Tuy nhiên, các tác dụng chỉ kéo dài trong thời gian ngắn và ngừng ngay sau khi kết thúc việc dùng. Các phát hiện này tương quan với khả năng được động học đã được biết đến của ADM. Các tác dụng được động học bao gồm, trong số các tác dụng khác, làm giảm huyết áp toàn thân và động mạch phổi và gia tăng chức năng tim mạch [Troughton R.W., Lewis L.K., Yandle T.G., Richards A.M., Nicholls M.G., *Hypertension*, **36**(4), 588-93 (2000); Nagaya N., Kangawa K., *Peptides*, **25**(11), 2013-8 (2004); Kataoka Y., Miyazaki S., Yasuda S., Nagaya N., Noguchi T., Yamada N., Morii I., Kawamura A., Doi K., Miyatake K., Tomoike H., Kangawa K., *J Cardiovasc Pharmacol*, **56**(4), 413-9 (2010)].

Tóm lại, dựa trên bằng chứng từ nhiều dữ liệu thử nghiệm trên động vật và các thử nghiệm lâm sàng thứ nhất ở người, sự tăng ADM đến các mức trên sinh lý có thể được xem như là cơ chế đích để điều trị nhiều tình trạng bệnh ở người và động vật. Tuy nhiên, các giới hạn chính của việc sử dụng ADM làm chất điều trị là khả năng áp dụng bất tiện của liệu pháp truyền liên tục mà ngăn cản việc sử dụng nó cho hầu hết các chỉ định tiềm năng và các biên an toàn giới hạn tiềm năng đối với chứng giảm huyết áp mà có thể thu được từ việc dùng ADM liều cao.

Mục đích của sáng chế là đề xuất các hợp chất mới mà có thể được dùng để điều

trị các bệnh, cụ thể là bệnh tim mạch, các rối loạn do chứng phù và viêm.

Nhiều peptit hoặc protein có hoạt tính điều trị có hệ số thanh thải cao in vivo. Hiện có một số phương pháp tạo ra vật chứa tiêm được chứa các dược chất như vậy mà bao gồm việc sử dụng các phân tử lớn.

Các chất nền polyme mà chứa phân tử dược chất ở trạng thái được gắn kết không cộng hóa trị là đã được biết đến. Các chất này cũng có thể tiêm được như hydro gel, vi hạt hoặc mixen. Động học giải phóng của các sản phẩm dược chất như vậy có thể không đáng tin cậy với tính biến thiên cao giữa các bệnh nhân. Việc tạo ra các polyme này có thể gây tổn hại cho dược chất dễ bị ảnh hưởng hoặc có thể trải qua các phản ứng phụ với polyme trong quá trình thoái hóa của nó (xem ấn phẩm: D.H. Lee et al., J. Contr. Rel., 2003, 92, 291-299).

Sự PEGyl hóa lâu dài của peptit hoặc protein làm tăng cường độ tan của chúng, làm giảm tính gây miễn dịch và làm gia tăng chu kỳ bán rã bằng cách làm giảm độ thanh thải ở thận là khái niệm đã được biết đến từ đầu những năm 1980 (Caliceti P., Veronese F.M., Adv. Drug Deliv. Rev. 2003, 55, 1261-1277). Đối với vài dược chất, quy trình này đã được sử dụng thành công, nhưng với nhiều ví dụ, sự PEGyl hóa làm giảm hiệu quả của dược chất đến mức mà khái niệm này là không hề thích hợp nữa (T. Peleg-Shulman et al., J. Med. Chem., 2004, 47, 4897-4904).

Các tiền dược chất được tạo thành chủ yếu từ polymer là phương án thay thế thích hợp. Các định nghĩa hiện nay đối với các tiền dược chất theo IUPAC đưa ra các thuật ngữ sau đây (International Union of Pure and Applied Chemistry and International Union of Biochemistry: GLOSSARY OF TERMS USED IN MEDICINAL CHEMISTRY (Recommendations 1998); in Pure & Appl. Chem. Vol 70, No. 5, 1998, p. 1129-1143):

Tiền dược chất: Tiền dược chất là hợp chất bất kỳ mà trải qua sự biến đổi sinh học trước khi thể hiện tác dụng dược lý của nó. Do đó, các tiền dược chất có thể được xem là dược chất chứa các nhóm bảo vệ không độc riêng biệt được sử dụng theo cách

tạm thời để thay đổi hoặc loại trừ các đặc tính không mong muốn trong phân tử gốc.

Tiền dược chất liên kết chất mang (Tiền dược chất chất mang): Tiền dược chất liên kết chất mang là tiền dược chất mà chứa liên kết tạm thời của hoạt chất đã nêu với nhóm chất mang tạm thời mà tạo ra các đặc tính hóa lý hoặc dược động học được cải thiện và mà có thể được loại bỏ một cách dễ dàng in vivo, thường bằng việc tách nhờ thủy phân.

Tiền dược chất theo tầng: Tiền dược chất theo tầng là tiền dược chất mà việc tách nhóm chất mang trở nên có hiệu quả chỉ ngay sau khi không che giấu nhóm hoạt hóa.

Đã có một số ví dụ về các tiền dược chất chất mang trên cơ sở PEG, hầu hết trong số chúng đều cần phải hoạt hóa cầu liên kết giữa dược chất và chất mang nhờ enzym, hầu hết được khơi mào bởi sự thủy phân nhờ enzym. Do các este được tách rất dễ dàng và không thể dự báo được in vivo, các cầu liên kết este trực tiếp đối với tiền dược chất chất mang bị hạn chế ở tính tiện lợi của chúng (J. Rautio et al., *Nature Reviews Drug discovery*, 2008, 7 255-270).

Các phương pháp thay thế thường được sử dụng là các cầu liên kết theo tầng được gắn vào một nhóm chức amin trong peptit hoặc protein. Trong các cầu liên kết theo tầng, nhóm che giấu cần phải được loại bỏ ở bước giới hạn tốc độ trong tầng thác. Việc này hoạt hóa cầu liên kết để phân hủy ở vị trí thứ hai nhằm giải phóng peptit hoặc protein. Thông thường, nhóm che giấu có thể được loại bỏ nhờ cơ chế enzym (R.B.Greenwald et al. trong WO2002/089789, Greenwald, et al., *J. Med. Chem.* 1999, 42, 3657-3667, F.M.H. DeGroot et al. trong WO2002/083180 và WO2004/043493, và D. Shabat et al. trong WO2004/019993).

Một phương pháp khác, không dựa trên sự hoạt hóa enzym là phương pháp được U. Hersel và đồng tác giả nêu trong WO2005/099768. Theo phương pháp này, nhóm che giấu đối với phenol được loại bỏ theo cách hoàn toàn phụ thuộc vào độ pH bằng cách tấn công vào nhóm ưa nhân bên trong. Điều này hoạt hóa cầu liên kết để

phân hủy tiếp.

Như được kể đến bởi U. Hersel et al. trong WO2005/099768, “Sự bất lợi trong các hệ tiền dược chất được kể đến trên đây được mô tả bởi Greenwald, DeGroot và Shabat là sự giải phóng của các sản phẩm phụ phân tử nhỏ thơm gây độc tiềm năng như quinon methit sau khi tách liên kết tạm thời. Các gốc gây độc tiềm năng được giải phóng theo hệ số tỷ lệ 1:1 với dược chất và có thể có nồng độ cao in vivo.” Vấn đề tương tự cũng đúng đối với các hệ tiền dược chất được nêu bởi Hersel et al.

Đối với các phân tử hữu cơ nhỏ, tồn tại nhiều cách tiếp cận tiền dược chất khác nhau (J. Rautio et al., *Nature Reviews Drug discovery*, 2008, 7 255-270). Phương pháp này được sử dụng bởi U. Hersel et al. như cơ chế giải phóng để che giấu nhóm của chúng được sử dụng như phương pháp tiền dược chất đối với các nhóm phenol của các phân tử nhỏ từ cuối những năm 1980. (W.S. Saari in EP 0296 811 và W.S. Saari et al., *J. Med. Chem.* 1990, Vol 33, No 1, p 97-101).

Hệ tiền dược chất được tạo thành chủ yếu từ amin thay thế dựa trên sự thủy phân chậm của bis-hydroxyetyl glyxin như tiền dược chất theo tầng. Các nhóm hydroxy của bis-hydroxyetyl glyxin được che giấu bởi este mà có thiên hướng thủy phân bởi esteraza (R. Greenwald et al., *J. Med. Chem.* 2004, 47, 726–734 và D. Vetter et al. trong WO 2006/136586).

Các dẫn xuất adrenomedulin được đánh dấu để sử dụng làm chất chẩn đoán hình ảnh và cả chất điều trị là đã được biết đến (J. Depuis et al. in CA 2567478 và WO 2008/138141). Trong các dẫn xuất ADM này, cấu trúc phân tử tương tự khung tạo phức có khả năng gắn kết các chất đồng vị phóng xạ được gắn vào đầu cuối N của ADM theo cách trực tiếp hoặc qua đơn vị khoảng trống cũng có khả năng bao gồm các khoảng trống ngắn PEG. Giá trị chẩn đoán hoặc điều trị của các dược chất này tăng lên từ sự phân phối hướng đích của phân tử phóng xạ.

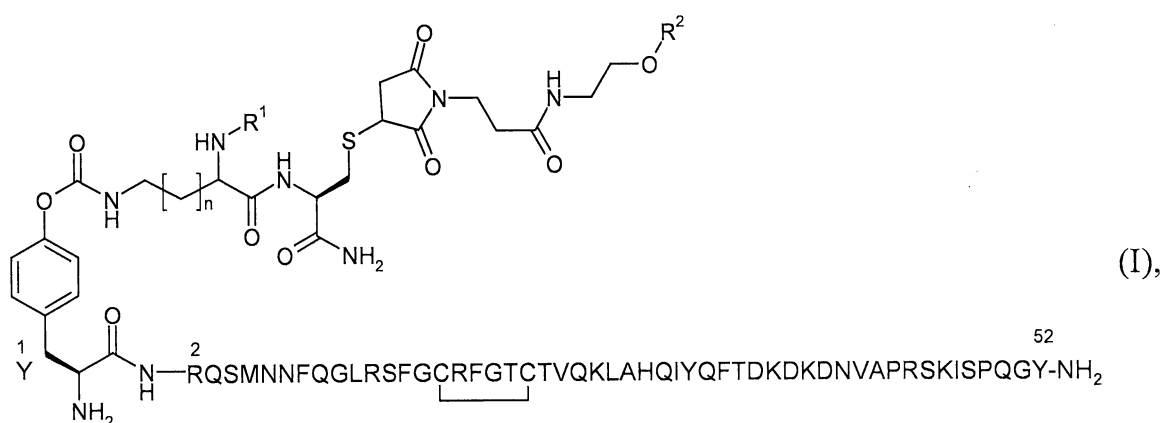
Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Trái với các cách tiếp cận tiền dược chất được liệt kê trên đây, mà đều dựa trên

việc che giấu các nhóm chức amin, sáng chế này dựa trên việc che giấu nhóm phenol của tyrosin trong ADM. Tiền dược chất được liên kết chất mang được sử dụng, dựa trên việc tách carbamat trên nhóm phenol nhờ các nhóm ái nhân bên trong. Lợi ích chính so với các nhóm tiền dược chất khác được kể đến trên đây là tính vô hại không độc của sản phẩm phân hủy cầu liên kết, ure vòng được gắn một cách cố định vào chất mang. Hơn nữa, sự phân hủy của tiền dược chất là không phụ thuộc vào các cơ chế enzym mà có thể gây ra sự biến đổi động học phân tách ở mức cao bên trong người bệnh. Cơ chế tách chỉ phụ thuộc độ pH do amin bên trong mà được proton hóa ở độ pH axit được hoạt hóa ở độ pH cao hơn (trung tính) để hoạt động như nhóm ái nhân tấn công phenol carbamat dựa trên tyrosin.

Theo sáng chế, các hợp chất hiện được mô tả có tác dụng như các tiền dược chất ADM giải phóng chậm với khoảng thời gian tác dụng dược lý kéo dài giống như ADM và dựa trên cơ chế tác dụng đặc hiệu này-sau khi dùng ngoài đường tiêu hóa-tạo ra các tác dụng chống viêm và huyết động học kéo dài *in vivo* chẳng hạn như làm ổn định chức năng của hàng rào nội mô và làm giảm huyết áp, một cách tương ứng.

Sáng chế đề xuất hợp chất có công thức



trong đó:

n bằng 0, 1, 2 hoặc 3,

R^1 là hydro, metyl, etyl, n-propyl hoặc isopropyl,

R² là PEG mạch thẳng hoặc mạch nhánh có từ 20kDa đến 80kDa được gắn mũ ở đầu cuối bằng nhóm metoxy,

và muối của nó, solvat của nó và solvat của muối của nó.

Các hợp chất theo sáng chế là các hợp chất có công thức (I) và muối của nó, solvat của nó và solvat của muối của nó, các hợp chất mà được bao gồm bởi công thức (I) và các hợp chất có các công thức được kể đến dưới đây và muối của nó, solvat của nó và solvat của muối của nó, và các hợp chất được bao gồm bởi công thức (I) và được kể đến dưới đây như ví dụ điều chế và muối của nó, solvat của nó và solvat của muối của nó, nếu các hợp chất mà được bao gồm bởi công thức (I) và được kể đến dưới đây không phải là muối, solvat và solvat của muối.

Phụ thuộc vào cấu trúc của chúng, các hợp chất theo sáng chế có thể tồn tại ở dạng chất đồng phân lập thể (chất đồng phân đối ảnh, chất đồng phân không đối quang). Do đó, sáng chế bao gồm các chất đồng phân đối ảnh hoặc chất đồng phân không đối quang và hỗn hợp cụ thể của chúng. Các cấu tử đồng nhất về mặt đồng phân lập thể có thể được tách từ hỗn hợp gồm chất đồng phân đối ảnh và/hoặc chất đồng phân không đối quang theo cách đã biết.

Khi các hợp chất theo sáng chế có thể xuất hiện ở dạng tautome, thì sáng chế bao gồm tất cả các dạng tautome.

Theo sáng chế, các muối được ưu tiên là các muối chấp nhận được về mặt sinh lý của các hợp chất theo sáng chế. Các muối mà không thích hợp đối với các ứng dụng dược phẩm, nhưng, ví dụ, có thể được sử dụng để tách hoặc tinh chế các hợp chất theo sáng chế cũng được kể đến.

Các muối chấp nhận được về mặt sinh lý của các hợp chất theo sáng chế bao gồm các muối cộng axit của các axit khoáng, axit carboxylic và axit sulfonic, ví dụ các muối của axit clohydric, axit hydrobromic, axit sulfuric, axit phosphoric, axit metan-sulfonic, axit etansulfonic, axit toluensulfonic, axit benzensulfonic, axit naphthalen-disulfonic, axit axetic, axit trifloaxetic, axit propionic, axit lactic, axit tartaric, axit

maleic, axit xitric, axit fumaric, axit maleic và axit benzoic.

Các muối chấp nhận được về mặt sinh lý của các hợp chất theo sáng chế cũng bao gồm các muối của các bazơ thông thường, ví dụ và với các muối kim loại kiềm ưu tiên (ví dụ các muối natri và kali), các muối kim loại kiềm thổ (ví dụ muối canxi và magie) và các muối amoni thu được từ amoniac hoặc amin hữu cơ có từ 1 đến 16 nguyên tử cacbon, ví dụ và với sự ưu tiên etylamin, dietylamin, trietylamin, etyldiisopropylamin, monoetanolamin, dietanolamin, trietanolamin, dicyclohexylamin, dimethylaminoethanol, procain, dibenzylamin, *N*-metylmorpholin, arginin, lysin, etylendiamin và *N*-metylpiperidin.

Theo sáng chế, solvat là để chỉ các dạng của các hợp chất theo sáng chế mà, ở trạng thái rắn hoặc lỏng, tạo ra phức hệ nhờ sự phối hợp với các phân tử dung môi. Hydrat là dạng đặc hiệu của solvat, trong đó sự phối hợp là với nước. Các solvat được ưu tiên theo sáng chế là hydrat.

Theo sáng chế được gắn mũ ở đầu cuối bằng nhóm metoxy được kể đến trong R^2 có nghĩa rằng polyetylen glycol (PEG) được thế bằng nhóm metoxy ở đầu cuối mà không được gắn kết với oxy, nghĩa là -PEG 40kDa-OMe.

Sự ưu tiên được đưa ra đối với hợp chất có công thức (I) trong đó:

n bằng 1 hoặc 2,

R^1 là hydro hoặc metyl,

R^2 là PEG mạch thẳng 40kDa được gắn mũ ở đầu cuối bằng nhóm metoxy.

Sự ưu tiên cũng được đưa ra đối với hợp chất có công thức (I) trong đó

n bằng 1 hoặc 2,

R^1 là hydro,

R^2 là PEG mạch thẳng 40kDa được gắn mũ ở đầu cuối bằng nhóm metoxy.

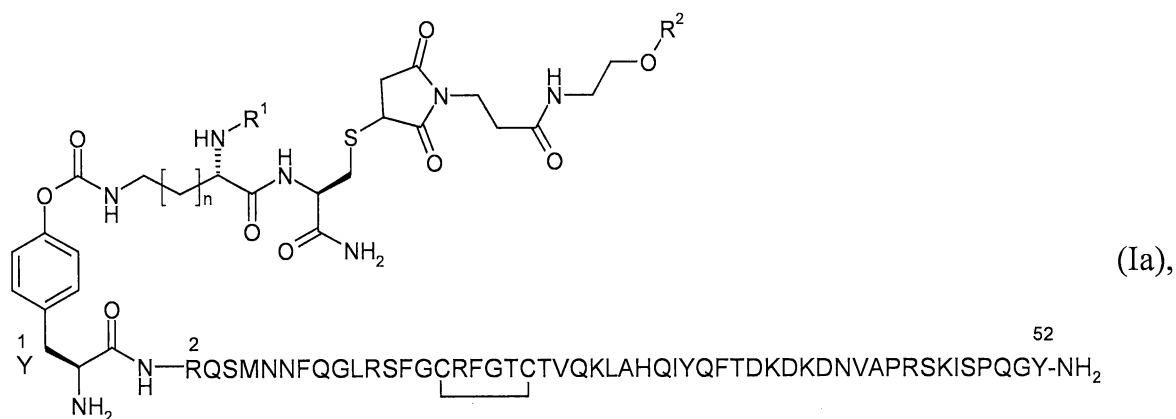
Sự ưu tiên cũng được đưa ra đối với hợp chất có công thức (I) trong đó n bằng 1.

Sự ưu tiên cũng được đưa ra đối với hợp chất có công thức (I) trong đó R¹ là hydro.

Sự ưu tiên cũng được đưa ra đối với hợp chất có công thức (I) trong đó nguyên tử cacbon mà phần tử thế -NHR¹ được gắn vào có cấu hình S.

Sự ưu tiên cũng được đưa ra đối với hợp chất có công thức (I) trong đó R² là PEG mạch thẳng 40kDa được gắn mũ ở đầu cuối bằng nhóm metoxy.

Sự ưu tiên cũng được đưa ra đối với hợp chất có công thức (I) mà có cấu trúc có công thức (Ia)



trong đó:

mỗi n, R¹ và R² là như được xác định trên đây,

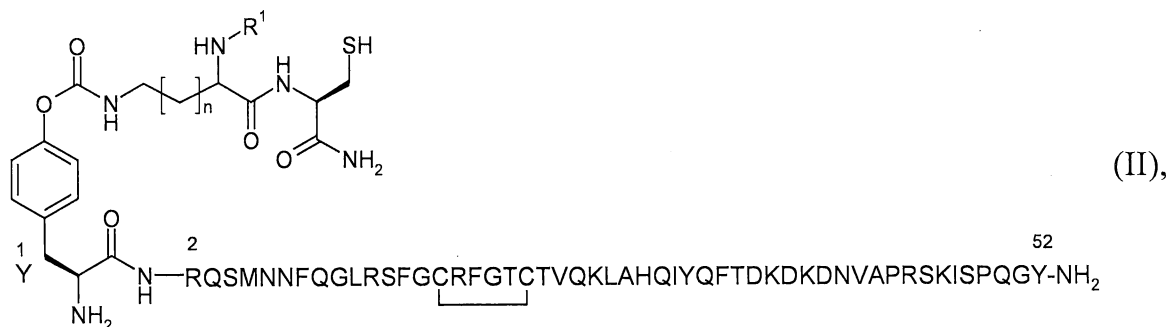
và muối của nó, solvat của nó và solvat của muối của nó.

Các định nghĩa về gốc cụ thể được đưa ra trong các tổ hợp cụ thể hoặc tổ hợp được ưu tiên của các gốc là, không kể tổ hợp cụ thể của gốc được kể đến, cũng được thay thế bằng các định nghĩa gốc bất kỳ của các tổ hợp khác.

Sự ưu tiên rất đặc biệt được đưa ra đối với các tổ hợp của hai hoặc nhiều khoảng

được ưu tiên được kể đến trên đây.

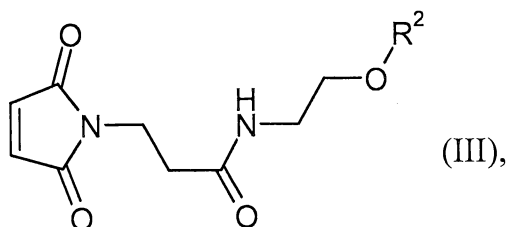
Sáng chế còn đề xuất quy trình điều chế các hợp chất có công thức (I), hoặc muối của nó, solvat của nó hoặc solvat của muối của nó, trong đó các hợp chất có công thức (II)



trong đó:

mỗi n và R^1 là như được xác định trên đây,

được cho phản ứng với các hợp chất có công thức (III)



trong đó:

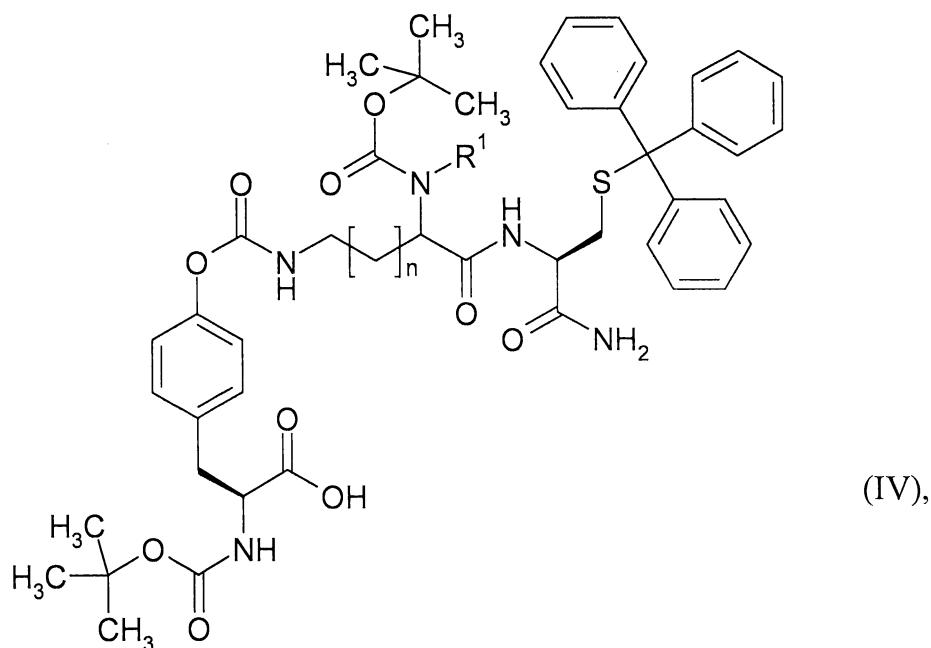
R^2 là như được xác định trên đây.

Thông thường, phản ứng được thực hiện trong các dung môi trơ, tốt hơn là ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 0°C đến 50°C ở áp suất tiêu chuẩn.

Các dung môi trơ là, ví dụ, các chất đệm xitrat, các chất đệm glyxin-hydroclorua, các chất đệm phthalat hoặc các chất đệm axetat có độ pH từ 3 đến 5, sự ưu tiên được đưa ra đối với chất đệm xitrat có độ pH=4.

Hợp chất có công thức (III) là đã được biết đến hoặc có thể được tổng hợp bằng các quy trình đã được biết đến từ các hợp chất khởi đầu thích hợp.

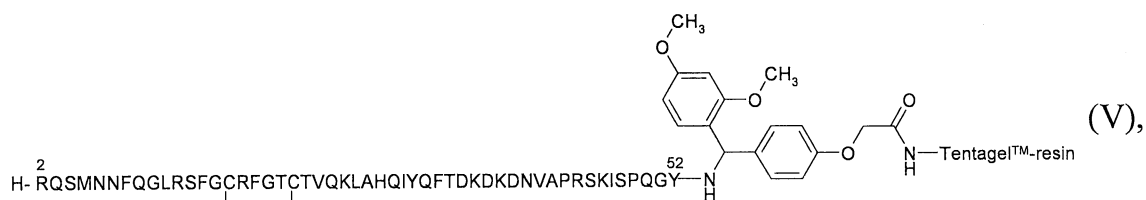
Các hợp chất có công thức (II) là đã được biết đến hoặc có thể được tạo ra bằng các cho hợp chất có công thức (IV)



trong đó:

n và R^1 là như được xác định trên đây,

ở giai đoạn thứ nhất, phản ứng với hợp chất có công thức (V)



và ở giai đoạn thứ hai, phản ứng với axit.

Thông thường, phản ứng ở giai đoạn thứ nhất được thực hiện trong các dung môi trơ, với sự có mặt của chất phản ứng khử nước, tùy ý với sự có mặt của bazơ, tốt hơn là ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ nhiệt độ trong phòng đến 70°C ở áp suất tiêu

chuẩn.

Các dung môi trơ là, ví dụ, các halohydrocacbon như diclometan, triclometan hoặc 1,2-dicloetan, các ete như dioxan, tetrahydrofuran hoặc 1,2-dimetoxyetan, hoặc các dung môi khác như axeton, dimetylformamit, dimetylaxetamit, 2-butanon hoặc axetonitril. Tương tự, có thể sử dụng hỗn hợp gồm các dung môi. Sự ưu tiên được đưa ra đối với dimetylformamit.

Các chất phản ứng khử nước thích hợp theo sáng chế là, ví dụ, carbodiimit, ví dụ *N,N'*-dietyl-, *N,N'*-dipropyl-, *N,N'*-diisopropyl-, *N,N'*-dixyclohexylcarbodiimit, *N*-(3-dimethylaminoisopropyl)-*N'*-etylcarbodiimit hydroclorua (EDC), *N*-xyclohexylcarbodiimit-*N'*-propyloxymetylpolystyren (PS-carbodiimit), hoặc các hợp chất cacbonyl như cacbonyldiimidazol hoặc các hợp chất 1,2-oxazol như 2-etyl-5-phenyl-1,2-oxazol 3-sulphat hoặc 2-tert-butyl-5-metylisoxazol perchlorat hoặc các hợp chất axylamino như 2-etoxy-1-etoxycacbonyl-1,2-dihydroquinolin, hoặc propanphosphonic anhydrua hoặc isobutyl cloformat, hoặc bis-(2-oxo-3-oxazolidinyl)phosphoryl clorua hoặc benzotriazolyloxytri(dimethylamino)phosphon hexaflophosphat hoặc *O*-(benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetrametyluron hexaflophosphat (HBTU), benzotriazol-1-yl-*N*-tetrametyluron tetraflorurat (TBTU), 2-(2-oxo-1-(2H)-pyridyl)-1,1,3,3-tetrametyluron tetraflorurat (TPTU) hoặc *O*-(7-azabenzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetrametyluron hexaflophosphat (HATU), hoặc 1-hydroxybenzotriazol (HOBt), hoặc benzotriazol-1-yloxytris(dimethylamino)phosphon hexaflophosphat (BOP), hoặc benzotriazol-1-yloxytris(pyrolidino)phosphon hexaflophosphat (PYBOP), hoặc *N*-hydroxysuxinimit, hoặc hỗn hợp gồm các dung môi này với bazơ.

Các bazơ là, ví dụ, cacbonat kim loại kiềm, ví dụ natri cacbonat hoặc kali cacbonat hoặc natri hydrocacbonat hoặc kali hydrocacbonat hoặc các bazơ hữu cơ như trialkylamin, ví dụ trietylamin, *N*-metylmorpholin, *N*-metylpiperidin, 4-dimethylaminopyridin hoặc *N,N*-diisopropyletylamin, sự ưu tiên được đưa ra đối với *N,N*-diisopropyletylamin.

Tốt hơn là, sự ngưng tụ được thực hiện với TBTU với sự có mặt của *N,N*-

diisopropyletylamin.

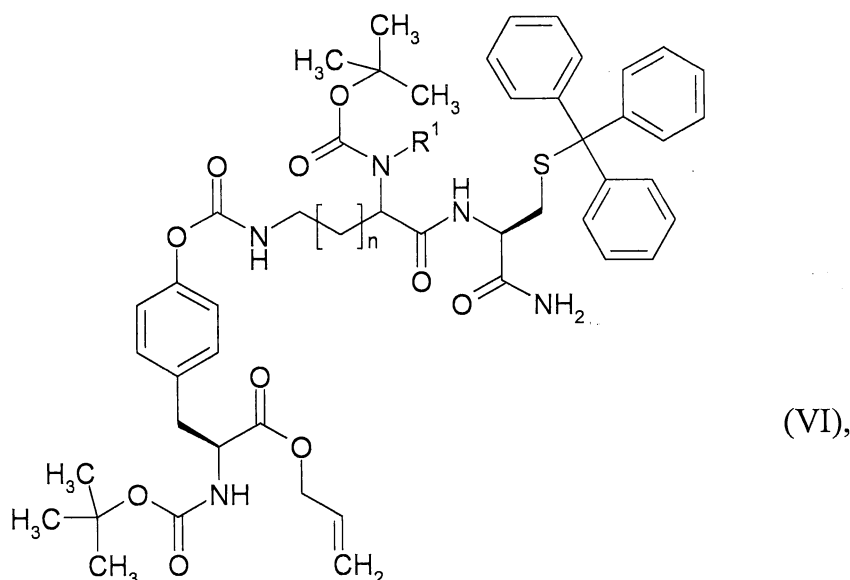
Tùy ý, phản ứng giai đoạn hai được thực hiện trong các dung môi trơ, tốt hơn là ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ nhiệt độ trong phòng đến 60°C ở áp suất tiêu chuẩn.

Các dung môi trơ là, ví dụ, halohydrocacbon như diclometan, triclometan, cacbon tetraclorea hoặc 1,2-dicloetan, hoặc các ete như tetrahydrofuran hoặc dioxan, sự ưu tiên được đưa ra đối với diclometan.

Các axit là, ví dụ, axit trifloaxetic hoặc hydro clorua trong dioxan, sự ưu tiên được đưa ra đối với axit trifloaxetic đậm đặc. Axit trifloaxetic đậm đặc có thể được sử dụng với việc bổ sung các chất tẩy tạp như nước, phenol, thioanisol và 1,2-etandiol. Sự ưu tiên được đưa ra đối với từ 1 đến 5% của mỗi trong số các chất tẩy tạp này.

Hợp chất có công thức (V) là đã được biết đến hoặc có thể được tổng hợp bằng các quy trình đã được biết đến từ các hợp chất khởi đầu thích hợp (ví dụ 14A).

Các hợp chất có công thức (IV) là đã được biết đến hoặc có thể được tạo ra bằng cách cho hợp chất có công thức (VI)



trong đó:

n và R^1 là như được xác định trên đây,

phản ứng với nguồn paladi(0) và các chất khử.

Thông thường, phản ứng được thực hiện trong các dung môi trơ, tùy ý với sự có mặt của bazơ yếu, tốt hơn là ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 0°C đến 50°C ở áp suất tiêu chuẩn.

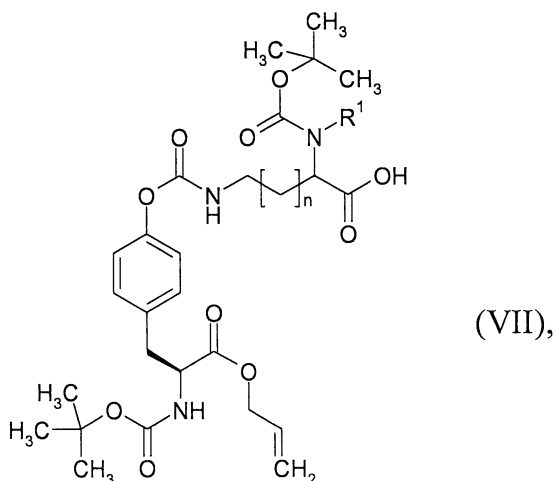
Các dung môi trơ là, ví dụ, các halohydrocacbon như diclometan, triclometan hoặc 1,2-dicloetan, các ete như dioxan, tetrahydrofuran hoặc 1,2-dimetoxyetan, hoặc các dung môi khác như axeton, dimetylformamit, dimetylaxetamit, 2-butanon hoặc axetonitril. Tương tự, có thể sử dụng hỗn hợp gồm các dung môi. Sự ưu tiên được đưa ra đối với tetrahydrofuran.

Các nguồn paladi(0) là, ví dụ, tetrakis(triphenylphosphin)paladi(0), tris(dibenzylidenaxeton)dipaladi(0) hoặc nguồn paladi(II) mà được giảm tại chỗ thành paladi(0) trong quá trình phản ứng, sự ưu tiên được đưa ra đối với tetrakis(triphenylphosphin)-paladi(0).

Các chất khử là, ví dụ, axit formic hoặc trietyl silan, sự ưu tiên được đưa ra đối với axit formic.

Các bazơ là, ví dụ, trietylamin, N,N-diisopropyletylamin hoặc dung dịch kali phosphat, sự ưu tiên được đưa ra đối với trietylamin.

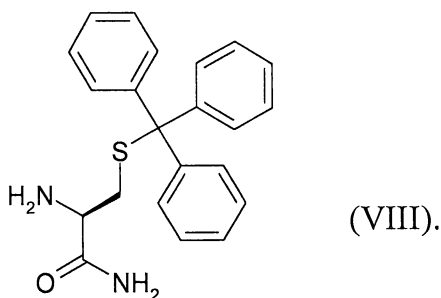
Các hợp chất có công thức (VI) là đã được biết đến hoặc có thể được tạo ra bằng cách cho hợp chất có công thức (VII)



trong đó:

n và R^1 là như được xác định trên đây,

phản ứng với hợp chất có công thức (VIII)



Thông thường, phản ứng được thực hiện trong các dung môi trơ, với sự có mặt của chất khử nước, tùy ý với sự có mặt của bazơ, tốt hơn là ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ nhiệt độ trong phòng đến 70°C ở áp suất tiêu chuẩn.

Các dung môi trơ là, ví dụ, các halohydrocacbon như diclometan, triclometan hoặc 1,2-dicloetan, các ete như dioxan, tetrahydrofuran hoặc 1,2-dimetoxyetan, hoặc các dung môi khác như axeton, dimetylformamit, dimetylaxetamit, 2-butanon hoặc axetonitril. Tương tự, có thể sử dụng hỗn hợp gồm các dung môi. Sự ưu tiên được đưa ra đối với diclometan.

Các chất khử nước thích hợp theo sáng chế là, ví dụ, carbodiimide, ví dụ N,N' -diethyl-, N,N' -dipropyl-, N,N' -diisopropyl-, N,N' -dicyclohexylcarbodiimide, N -(3-

dimethylaminoisopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimit hydroclorua (EDC), *N*-xyclohexylcarbodiimit-*N'*-propyloxymetylpolystyren (PS-carbodiimit) hoặc các hợp chất cacbonyl như cacbonyldiimidazol hoặc các hợp chất 1,2-oxazol như 2-etyl-5-phenyl-1,2-oxazol 3-sulphat hoặc 2-tert-butyl-5-metylisoxazol perchlorat hoặc các hợp chất axylamino như 2-etoxy-1-etoxycacbonyl-1,2-dihydroquinolin hoặc propanphosphonic anhydrua hoặc isobutyl cloformat, hoặc bis-(2-oxo-3-oxazolidinyl)phosphoryl clorua hoặc benzotriazoloxxytri(dimethylamino)phosphon hexaflophosphat hoặc *O*-(benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetrametyluron hexaflophosphat (HBTU), benzotriazol-1-yl-*N*-tetrametyluron tetrafloborat (TBTU), 2-(2-oxo-1-(2H)-pyridyl)-1,1,3,3-tetrametyluron tetrafloborat (TPTU) hoặc *O*-(7-azabenzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetrametyluron hexaflophosphat (HATU), hoặc 1-hydroxybenzotriazol (HOBt), hoặc benzotriazol-1-yloxytris(dimethylamino)phosphon hexaflophosphat (BOP), hoặc benzotriazol-1-yloxytris(pyrrolidino)phosphon hexaflophosphat (PYBOP), hoặc *N*-hydroxsuxinimit hoặc hỗn hợp gồm các dung môi này với các bazơ.

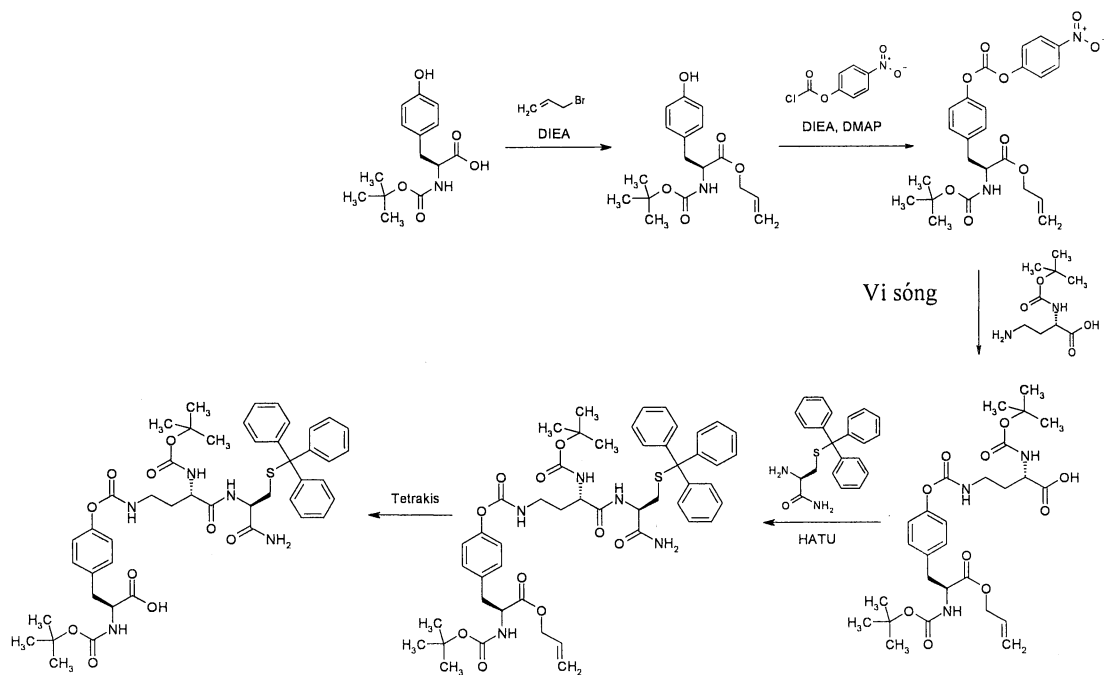
Các bazơ là, ví dụ, các cacbonat kim loại kiềm, ví dụ natri cacbonat hoặc kali cacbonat, hoặc natri hydrocacbonat hoặc kali hydrocacbonat hoặc các bazơ hữu cơ như trialkylamin, ví dụ trietylamin, *N*-metylmorpholin, *N*-metylpiperidin, 4-dimethylamino-pyridin hoặc *N,N*-diisopropyletylamin, sự ưu tiên được đưa ra đối với *N,N*-diisopropyletylamin.

Tốt hơn là, sự ngưng tụ được thực hiện với HATU với sự có mặt của *N,N*-diisopropyletylamin.

Các hợp chất có công thức (VII) và (VIII) là đã được biết đến và có thể được tổng hợp bằng các quy trình đã được biết đến từ các hợp chất khởi đầu thích hợp.

Việc điều chế các hợp chất theo sáng chế có thể được minh họa bằng sơ đồ tổng hợp sau đây:

Sơ đồ 1



Các hợp chất theo sáng chế thể hiện phổ hoạt tính dược lý hữu ích không thể đoán trước.

Do đó, chúng thích hợp để sử dụng làm thuốc để điều trị và/hoặc ngăn ngừa bệnh ở người và động vật.

Các hợp chất theo sáng chế được nhận biết như các tiền tiền dược chất giải phóng adrenomedulin (ADM).

Sáng chế còn đề xuất việc sử dụng các hợp chất theo sáng chế để điều trị và/hoặc ngăn ngừa các rối loạn, đặc biệt là bệnh tim mạch, các rối loạn do bị phù và/hoặc viêm.

Mô tả chi tiết sáng chế

Đối với sáng chế, thuật ngữ "sự điều trị" hoặc "việc điều trị" bao gồm việc ức chế, làm chậm, làm giảm, làm nhẹ, làm dịu, làm ngừng, làm giảm hoặc gây ra sự thoái triển của bệnh, rối loạn, tình trạng bệnh hoặc trạng thái bệnh. Sự phát triển và/hoặc sự tiến triển của nó và/hoặc các triệu chứng của nó. Thuật ngữ "sự ngăn ngừa" hoặc "việc

ngăn ngừa" bao gồm việc làm giảm nguy cơ có, sự mắc phải hoặc sự trải qua, bệnh, rối loạn, tình trạng bệnh hoặc trạng thái bệnh, sự phát triển và/hoặc sự tiến triển của nó và/hoặc các triệu chứng của nó. Thuật ngữ ngăn ngừa bao gồm sự phòng bệnh. Việc điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh, rối loạn, tình trạng bệnh hoặc trạng thái bệnh có thể là riêng phần hoặc hoàn toàn.

Dựa trên các đặc tính dược lý của chúng, các hợp chất theo sáng chế có thể được dùng để điều trị và/hoặc ngăn ngừa bệnh tim mạch, cụ thể là chứng suy tim, đặc biệt là chứng suy tim mạn tính và cấp tính, chứng suy tim tâm thu và tâm trương (xung huyết), chứng suy tim do mất bù cấp tính, thiếu năng tim, bệnh tim mạch vành, đau thắt do viêm họng, chứng nhồi máu cơ tim, thương tổn do ngập tràn lại thiếu máu cục bộ, đột quỵ do thiếu máu cục bộ và xung huyết, chứng xơ cứng động mạch, chứng xơ vữa động mạch, bệnh cao huyết áp, cụ thể là bệnh cao huyết áp bản chất, bệnh cao huyết áp bản chất ác tính, bệnh cao huyết áp thứ cấp, bệnh cao huyết áp mạch mới và bệnh cao huyết áp thứ cấp đối với các rối loạn thận và tuyến nội tiết, bệnh tim do chứng tăng huyết áp, bệnh thận do chứng tăng huyết áp, bệnh cao huyết áp phổi, cụ thể là bệnh cao huyết áp phổi thứ cấp, bệnh cao huyết áp phổi sau nghẽn phổi có và không có bệnh tim phổi cấp tính, bệnh cao huyết áp phổi sơ cấp và bệnh nghẽn động mạch ngoại vi.

Hơn nữa, các hợp chất theo sáng chế là thích hợp để điều trị và/hoặc ngăn ngừa chứng phù thời kỳ thai nghé [do sự mang thai gây ra] và protein niệu có kèm theo và không kèm theo bệnh cao huyết áp (tiền sản giật).

Hơn nữa, các hợp chất theo sáng chế là thích hợp để điều trị và/hoặc ngăn ngừa các rối loạn phổi, như bệnh nghẽn phổi mạn tính, bệnh hen, chứng phù phổi cấp tính và mạn tính, viêm phế nang dị ứng và bệnh sung phổi do bụi hữu cơ hít vào và hạt có nguồn gốc từ nấm, nấm sợi hoặc có nguồn gốc khác, viêm phế quản cấp tính do hóa chất, chứng phù phổi do hóa chất cấp tính và mạn tính (ví dụ sau khi hít phải phosgen, nitơ oxit), chứng phù phổi bệnh thần kinh, các biểu thị phổi cấp tính và mạn tính do bức xạ, các rối loạn khe phổi cấp tính và mạn tính (như, nhưng không chỉ giới hạn đến các rối loạn khe phổi do dược chất gây ra, ví dụ thứ cấp đối với việc điều trị

Bleomycin), hội chứng tổn thương phổi cấp tính/suy liệt hô hấp cấp (ALI/ARDS) ở người lớn hoặc trẻ nhỏ bao gồm trẻ sơ sinh, ALI/ARDS thứ cấp đối với chứng viêm phổi và nhiễm trùng, viêm phổi sắc và ALI/ARDS thứ cấp đối với sắc (như nhưng không chỉ giới hạn ở viêm phổi sắc do hàm lượng dạ dày ợ ra), ALI/ARDS thứ cấp đối với việc hít phải khí độc, tổn thương phổi cấp tính liên quan đến việc truyền máu (TRALI), ALI/ARDS hoặc thiếu năng phổi cấp tính sau phẫu thuật, chấn thương hoặc vết bỏng, tổn thương phổi do máy hô hấp nhân tạo gây ra (VILI), tổn thương phổi sau hít phân su, chứng xơ hóa phổi, và hội chứng độ cao.

Hơn nữa, các hợp chất theo sáng chế là thích hợp để điều trị và/hoặc ngăn ngừa bệnh thận mạn tính (các giai đoạn từ 1 đến 5), thiếu năng thận, bệnh thận do đái tháo đường, bệnh thận mạn tính do tăng huyết áp, bệnh viêm tiểu cầu thận, hội chứng thận tiến triển nhanh chóng và mạn tính, hội chứng thận không đặc hiệu, hội chứng thận, bệnh thận do di truyền, viêm thận kẽ ống cấp tính và mạn tính, tổn thương thận cấp tính, suy thận cấp tính, suy thận do chấn thương, tổn thương thận do chấn thương và sau phẫu thuật, hội chứng tim thận, và bảo vệ và cải thiện chức năng của các mô ghép thận.

Hơn nữa, các hợp chất là thích hợp để điều trị và/hoặc ngăn ngừa bệnh đái tháo đường và các triệu chứng tiếp theo của nó, như ví dụ bệnh đại và vi mạch máu do đái tháo đường, bệnh thận và bệnh thần kinh do đái tháo đường.

Hơn nữa, các hợp chất theo sáng chế có thể được sử dụng để điều trị và/hoặc ngăn ngừa các rối loạn của hệ thần kinh trung ương và ngoại vi như viêm màng não do virus và vi khuẩn và viêm não (ví dụ viêm não Zoster), tổn thương não, khối u ác tính sơ cấp và thứ cấp [di căn] của não và tủy sống, viêm dễ thành kinh và viêm đa dễ thần kinh, hội chứng Guillain-Barre [viêm đa dây thần kinh sau lây truyền cấp tính, hội chứng Miller Fisher], bệnh xơ cứng teo cơ một bên [sự teo cơ xương tiến triển], bệnh Parkinson, bệnh đa thần kinh cấp tính và mạn tính, chứng đau, phù não, bệnh Alzheimer, các bệnh thoái hóa hệ thần kinh và các bệnh hủy myelin của hệ thần kinh trung ương như nhưng không chỉ giới hạn ở đa xơ cứng.

Hơn nữa, các hợp chất theo sáng chế là thích hợp để điều trị và/hoặc ngăn ngừa công bệnh cao huyết áp và chứng xơ hóa gan [bệnh xơ gan] và di chứng của nó như chứng giãn tĩnh mạch thực quản và dịch cổ trướng, để điều trị và/hoặc ngăn ngừa sự tràn dịch phổi thứ cấp đối với các khối u ác tính hoặc viêm và để điều trị và/hoặc ngăn ngừa chứng phù bạch huyết và phù thứ cấp đối với chứng giãn tĩnh mạch.

Hơn nữa, các hợp chất theo sáng chế là thích hợp để điều trị và/hoặc ngăn ngừa các rối loạn viêm của đường dạ dày-ruột như bệnh viêm ruột, bệnh Crohn, viêm loét ruột kết và các rối loạn mạch và tính độc của ruột.

Hơn nữa, các hợp chất theo sáng chế là thích hợp để điều trị và/hoặc ngăn ngừa nhiễm trùng, sốc do nhiễm trùng, hội chứng đáp ứng viêm toàn thân (SIRS) không có nguồn gốc lây nhiễm, sốc do xuất huyết, sự nhiễm trùng hoặc SIRS với sự rối loạn chức năng cơ quan hoặc suy đa cơ quan (MOF), sốc do chấn thương, sốc do độc, sốc do quá mẫn, chứng mày đay, các dị ứng liên quan đến côn trùng đốt và cắn, chứng phù mạch [chứng mày đay dạng không, chứng phù Quincke], chứng viêm thanh quản và viêm khí quản cấp tính và chứng viêm thanh quản do nghẽn cấp tính [bệnh bạch hầu thanh quản] và viêm nắp thanh quản.

Hơn nữa, các hợp chất là thích hợp để điều trị và/hoặc ngăn ngừa các bệnh thuộc loại bệnh thấp khớp và các dạng bệnh khác được xét đến như các bệnh tự miễn dịch như nhưng không chỉ giới hạn ở chứng viêm đa khớp, luput ban đỏ hệ thống, xơ cứng bì, ban xuất huyết và viêm mạch.

Hơn nữa, các hợp chất theo sáng chế là thích hợp để điều trị bệnh cao huyết áp mắt (bệnh tăng nhãn áp), bệnh võng mạc do đái tháo đường và bệnh phù điểm vàng.

Hơn nữa, các hợp chất theo sáng chế có thể được sử dụng để điều trị và/hoặc ngăn ngừa các tình trạng thiếu máu cục bộ liên quan đến hoạt động và các triệu chứng tiếp theo của nó sau khi can thiệp phẫu thuật, cụ thể là các can thiệp đối với tim bằng cách sử dụng máy tim phổi (ví dụ phẫu thuật tim nhân tạo, ghép van tim), các can thiệp đối với động mạch cảnh, các can thiệp đối với động mạch chủ và các can thiệp với

dụng cụ mở hoặc sự thâm thấu của mũi chỏm.

Hơn nữa, các hợp chất là thích hợp đối với việc điều trị và/hoặc ngăn ngừa chung trong trường hợp can thiệp phẫu thuật với mục đích thúc đẩy việc làm lành vết thương và rút ngắn thời gian hồi phục. Hơn nữa, chúng cũng thích hợp để đẩy mạnh sự làm lành vết thương.

Hơn nữa, các hợp chất là thích hợp để điều trị và/hoặc ngăn ngừa các rối loạn về mật độ xương và cấu trúc xương như nhưng không chỉ giới hạn ở chứng loãng xương, chứng nhuyễn xương và các rối loạn xương liên quan đến chứng tăng năng tuyến giáp.

Hơn nữa, các hợp chất là thích hợp để điều trị và/hoặc ngăn ngừa các rối loạn chức năng giới tính, cụ thể là rối loạn chức năng cương cứng ở nam giới.

Tốt hơn là, các hợp chất là thích hợp để điều trị và/hoặc ngăn ngừa chứng suy tim, bệnh tim mạch vành, đột quỵ do thiếu máu cục bộ và/hoặc xung huyết, bệnh cao huyết áp, bệnh cao huyết áp phổi, bệnh nghẽn động mạch ngoại vi, tiền sản giật, bệnh nghẽn phổi mạn tính, bệnh hen, chứng phù phổi cấp tính và/hoặc mạn tính, chứng viêm phế nang và/hoặc viêm thành phế nang dị ứng do bụi hữu cơ hít vào và hạt có nguồn gốc từ nấm, nấm sợi hoặc có nguồn gốc khác, và/hoặc viêm phế quản cấp tính do hóa chất, chứng phù phổi cấp tính và/hoặc mạn tính do hóa chất, chứng phù phổi bệnh thần kinh, các biểu hiện phổi cấp tính và/hoặc mạn tính do bức xạ, các rối loạn kẽ phổi cấp tính và/hoặc mạn tính, hội chứng tổn thương phổi cấp tính/suy liệt hô hấp cấp (ALI/ARDS) ở người lớn hoặc trẻ nhỏ bao gồm trẻ sơ sinh, ALI/ARDS thứ cấp đối với chứng viêm phổi và nhiễm trùng, viêm phổi sắc và ALI/ARDS thứ cấp đối với sắc, ALI/ARDS thứ cấp đối với việc hít phải khí độc, tổn thương phổi cấp tính liên quan đến việc truyền máu (TRALI), ALI/ARDS và/hoặc thiếu năng phổi cấp tính sau phẫu thuật, chấn thương và/hoặc vết bỏng, và/hoặc tổn thương phổi do máy hô hấp nhân tạo gây ra (VILI), tổn thương phổi sau hít phân su, chứng xơ hóa phổi, hội chứng độ cao, bệnh thận mạn tính, bệnh viêm tiểu cầu thận, tổn thương thận cấp tính, hội chứng tim thận, phù bạch huyết, bệnh viêm ruột, nhiễm trùng, sốc do nhiễm trùng, hội chứng đáp

ứng viêm toàn thân (SIRS) không có nguồn gốc lây nhiễm, sốc do quá mẫn, bệnh viêm ruột và/hoặc chứng mày đay.

Tốt hơn nữa là, các hợp chất là thích hợp để điều trị và/hoặc ngăn ngừa chứng suy tim, bệnh cao huyết áp, bệnh cao huyết áp phổi, bệnh hen, chứng phù phổi cấp tính và/hoặc mạn tính do hóa chất, hội chứng tổn thương phổi cấp tính/suy liệt hô hấp cấp (ALI/ARDS) ở người lớn hoặc trẻ nhỏ bao gồm trẻ sơ sinh, ALI/ARDS thứ cấp đối với chứng viêm phổi và nhiễm trùng, viêm phổi sắc và ALI/ARDS thứ cấp đối với sắc, ALI/ARDS thứ cấp đối với việc hít phải khí độc, tổn thương phổi cấp tính liên quan đến việc truyền máu (TRALI), ALI/ARDS và/hoặc thiếu năng phổi cấp tính sau phẫu thuật, chấn thương và/hoặc vết bỏng, và/hoặc tổn thương phổi do máy hô hấp nhân tạo gây ra (VILI), tổn thương phổi sau hít phân su, nhiễm trùng, sốc do nhiễm trùng, hội chứng đáp ứng viêm toàn thân (SIRS) không có nguồn gốc lây nhiễm, sốc do quá mẫn, bệnh viêm ruột và/hoặc chứng mày đay.

Sáng chế còn đề xuất việc sử dụng các hợp chất theo sáng chế để điều trị và/hoặc ngăn ngừa các rối loạn, cụ thể là các rối loạn được kể đến trên đây.

Sáng chế còn đề xuất việc sử dụng các hợp chất theo sáng chế để sản xuất thuốc để điều trị và/hoặc ngăn ngừa các rối loạn, cụ thể là các rối loạn được kể đến trên đây.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp để điều trị và/hoặc ngăn ngừa các rối loạn, cụ thể là các rối loạn được kể đến trên đây, bằng cách sử dụng lượng có hoạt tính của các hợp chất theo sáng chế.

Sáng chế còn đề xuất Thuốc chứa hợp chất theo sáng chế và một hoặc nhiều hoạt chất khác, cụ thể là để điều trị và/hoặc ngăn ngừa các rối loạn được kể đến trên đây. Các tổ hợp chứa hoạt chất lấy làm ví dụ và được ưu tiên là:

Các chất ức chế ACE, chất đối kháng thụ thể angiotensin, chất chủ vận thụ thể beta-2, chất ức chế phosphodiesteraza, chất chủ vận thụ thể glucocorticoit, các thuốc lợi tiểu hoặc angiotensin tái tổ hợp chuyển hóa enzym-2 hoặc axit axetylsalixylic (aspirin).

Theo phương án được ưu tiên của sáng chế, các hợp chất theo sáng chế được dùng kết hợp với chất ức chế ACE như, bằng cách ví dụ và ưu tiên, enalapril, quinapril, captopril, lisinopril, ramipril, delapril, fosinopril, perindopril, cilazapril, imidapril, benazepril, moexipril, spirapril hoặctrandopril.

Theo phương án được ưu tiên của sáng chế, các hợp chất theo sáng chế được dùng kết hợp với chất đối kháng thụ thể angiotensin như, bằng cách ví dụ và ưu tiên, losartan, candesartan, valsartan, telmisartan hoặc embusartan.

Theo phương án được ưu tiên của sáng chế, các hợp chất theo sáng chế được dùng kết hợp với chất chủ vận thụ thể beta-2 như, bằng cách ví dụ và ưu tiên, salbutamol, pirbuterol, salmeterol, terbutalin, fenoterol, tulobuterol, clenbuterol, reproterol hoặc formoterol.

Theo phương án được ưu tiên của sáng chế, các hợp chất theo sáng chế được dùng kết hợp với chất ức chế phosphodiesteraza (PDE) như, bằng cách ví dụ và ưu tiên, milrinon, amrinon, pimobendan, cilostazol, sildenafil, vardenafil hoặc tadalafil.

Theo phương án được ưu tiên của sáng chế, các hợp chất theo sáng chế được dùng kết hợp với chất chủ vận thụ thể glucocorticoit như, bằng cách ví dụ và ưu tiên, cortisol, cortison, hydrocortison, prednison, metyl-prednisolon, prednyliden, deflazacort, fluocortolon, triamcinolon, dexamethason hoặc betamethason.

Theo phương án được ưu tiên của sáng chế, các hợp chất theo sáng chế được dùng kết hợp với thuốc lợi tiểu như, bằng cách ví dụ và ưu tiên, furosemit, torasemit và hydroclothiazit.

Sáng chế còn đề cập đến thuốc mà chứa ít nhất một hợp chất theo sáng chế,

thường cùng với một hoặc nhiều tá dược được dụng trợ không độc và đến việc sử dụng nó cho các mục đích được kể đến trên đây.

Các hợp chất theo sáng chế có thể có tác dụng toàn thân và/hoặc cục bộ. Đối với mục đích này, chúng có thể được dùng theo cách thích hợp, ví dụ qua đường ngoài đường tiêu hóa, phổi, mũi, dưới lưỡi, lưỡi, khoang miệng, da, qua da, màng kết qua đường thị giác hoặc như mô ghép hoặc stent.

Các hợp chất theo sáng chế có thể được dùng ở các dạng dùng thích hợp đối với các đường dùng này.

Việc dùng ngoài đường tiêu hóa có thể được thực hiện để tránh bước hấp thụ (ví dụ trong tĩnh mạch, trong động mạch, trong tim, trong xương sống hoặc trong thất lưng) hoặc bao gồm cả sự hấp thụ (ví dụ trong cơ, dưới da, trong da, qua da hoặc trong màng bụng). Các dạng dùng thích hợp để dùng ngoài đường tiêu hóa bao gồm các chế phẩm để tiêm và truyền ở dạng dung dịch, huyền phù, nhũ tương, đông khô hoặc bột vô trùng.

Thích hợp cho các đường dùng khác là, ví dụ, dạng dược phẩm để xông (bao gồm dụng cụ xông bột, dụng cụ khí dung), thuốc nhỏ mũi, thuốc nhỏ mắt, dung dịch hoặc phun xịt; màng mỏng/màng hoặc huyền phù trong nước (thuốc xức dùng ngoài da, hỗn hợp lắ), huyền phù ưa chất béo, thuốc mỡ, kem, các hệ điều trị qua da (ví dụ miếng đắp), sữa, bột nhão, bột, bột dạng bụi, mô ghép hoặc stent.

Việc dùng ngoài đường tiêu hóa là được ưu tiên, đặc biệt là dùng trong tĩnh mạch.

Các hợp chất theo sáng chế có thể được chuyển hóa thành các dạng dùng được chỉ ra. Việc này có thể được thực hiện theo cách đã được biết đến bằng cách trộn với các tá dược được dụng trợ không độc. Các tá dược này bao gồm các chất mang (ví dụ xenluloza dạng vi tinh thể, lactoza, manitol), các dung môi (ví dụ polyetylen glycol dạng lỏng), chất nhũ tương và chất gây phân tán hoặc chất làm ướt (ví dụ natri dodexylsulfat, polyoxysorbitan oleat), các chất kết dính (ví dụ polyvinylpyrrolidon), các

polyme tổng hợp và tự nhiên (ví dụ albumin), các chất làm ổn định (ví dụ các chất chống oxy hóa, ví dụ axit ascorbic), các chất tạo màu (ví dụ các sắc tố vô cơ, ví dụ sắt oxit) và các chất che giấu hương vị và/hoặc mùi.

Nói chung, đã phát hiện là trong trường hợp dùng ngoài đường tiêu hóa, có lợi nếu dùng các lượng nằm trong khoảng từ 0,001 đến 5mg/kg, tốt hơn là khoảng từ 0,01 đến 1mg/kg, thể trọng để đạt được các kết quả hữu hiệu.

Tuy nhiên, trong một số trường hợp có thể nằm ngoài khoảng lượng đã nêu, cụ thể là tùy thuộc vào thể trọng, đường dùng, sự đáp ứng của cá thể đối với hoạt chất, bản chất của chế phẩm và thời gian hoặc khoảng thời gian mà trong đó việc dùng được thực hiện. Ví dụ, nhỏ hơn lượng tối thiểu được kể đến có thể là đủ trong một số trường hợp, trong khi trong các trường hợp khác, giới hạn trên đã nêu phải được vượt quá. Trong trường hợp dùng lượng lớn hơn, có thể thích hợp để phân chia chúng thành nhiều liều riêng rẽ trong ngày.

Các ví dụ sau đây minh họa sáng chế. Sáng chế không bị giới hạn ở các ví dụ này.

Các tỷ lệ phần trăm trong các thử nghiệm và ví dụ sau đây, trừ khi được chỉ ra theo cách khác, là tỷ lệ phần trăm theo trọng lượng; các phần là các phần theo trọng lượng. Tỷ lệ dung môi, tỷ lệ pha loãng và dữ liệu nồng độ đối với chất lỏng/dung dịch dạng lỏng là được dựa trên thể tích.

A. Ví dụ thực hiện sáng chế

Các chữ viết tắt

AA	axit amin
Acm	axetamidometyl
ADM	adrenomedulin (của người)
ADM(2-52)	trình tự peptit của ADM AA 2 đến AA 52, bao gồm liên kết disulfua và amit đầu cuối C

approx.	khoảng
Boc	<i>tert</i> -butyloxycacbonyl
CDI	cacbonyldiimidazol
d	(các) ngày, bộ đôi (theo NMR)
TLC	sắc ký lớp mỏng
DCI	ion hóa hóa học trực tiếp (theo MS)
dd	vạch đôi của vạch đôi (theo NMR)
DIEA	N,N-diisopropyletylamin
DMAP	4-dimetylaminopyridin
DMF	<i>N,N</i> -dimetylformamit
DMSO	dimetyl sulfoxit
theo lý thuyết	theo lý thuyết (theo hiệu suất)
eq.	(các) đương lượng
ESI	ion hóa phun điện (theo MS)
Fmoc	(9H-fluoren-9-ylmetoxy)cacbonyl
h	(các) giờ
HATU	O-(7-azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetrametyluron hexaflophosphat
HPLC	sắc ký lỏng cao áp, hiệu năng cao
LC-MS	sắc ký lỏng-quang phổ khối cặp đôi
m	mức bội (theo NMR)
min	(các) phút
MS	phổ khối
NMR	phổ cộng hưởng từ hạt nhân
pbf	2,2,4,6,7-pentametyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl
PEG	polyetylen glycol
RP	pha đảo (theo HPLC)
RT	nhiệt độ trong phòng
R _t	thời gian lưu (theo HPLC)
s	bộ đơn (theo NMR)

TBTU	benzotriazol-1-yl-N-tetrametyl-uron tetrafloroborat
tBu	<i>tert</i> -butyl
TFA	axit trifloaxetic
THF	tetrahydrofuran
Trt	trityl

Danh pháp của các axit amin và trình tự peptit là theo:

International Union of Pure and Applied Chemistry and International Union of Biochemistry: Nomenclature and Symbolism for Amino Acids and Peptides (Recommendations 1983). In: Pure & Appl. Chem. 56, Vol. 5, 1984, p. 595-624

Tên thông thường	Ký hiệu	Ký hiệu chữ cái
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Axit aspartic	Asp	D
Xystein	Cys	C
Axit glutamic	Glu	E
Glutamin	Gln	Q
Glyxin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleuxin	Ile	I
Leuxin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y

Valin Val V

Các phương pháp LC-MS và MS

Phương pháp 1 (LC-MS): Loại thiết bị: Hệ Waters ACQUITY SQD UPLC; cột: Waters Acquity UPLC HSS T3 1,8 μ 50mm x 1mm; pha động A: 1 l nước + 0,25ml 99% nồng độ axit formic, pha động B: 1 l axetonitril + 0,25ml 99% nồng độ axit formic; gradient: 0,0 phút 90% A $\rightarrow$ 1,2 phút 5% A $\rightarrow$ 2,0 phút 5% A; lò: 50°C; dòng chảy: 0,40ml/phút; dò tia cực tím: từ 210 đến 400nm.

Phương pháp 2 (LC-MS): loại thiết bị MS: Waters (Micromass) Quattro Micro; HPLC loại thiết bị: các dây Agilent 1100; cột: Thermo Hypersil GOLD 3 μ 20mm x 4 mm; pha động A: 1 l nước + 0,5ml 50% nồng độ axit formic, pha động B: 1 l axetonitril + 0,5ml 50% nồng độ axit formic; gradient: 0,0 phút 100% A $\rightarrow$ 3,0 phút 10% A $\rightarrow$ 4,0 phút 10% A; lò: 50°C; dòng chảy: 2,0 ml/phút; dò tia cực tím: 210nm.

Phương pháp 3 (HPLC): Loại thiết bị: các dây HP 1200; UV DAD; cột: Phenomenex Luna 5 μ m C5 100Å, 150 mm x 4,6mm; pha động A: 1 l nước + 0,5ml 50% nồng độ axit formic, pha động B: 1 l axetonitril + 0,5ml 50% nồng độ axit formic; gradient: 0,0 phút 95%A $\rightarrow$ 5 phút 5% A; $\rightarrow$ 5,8 phút 95% A $\rightarrow$ 6,2 phút 95% A; tốc độ dòng chảy: 2,5 ml/phút; lò: RT; dò tia cực tím: 210 nm.

Phương pháp 4 (HPLC): Loại thiết bị: các dây HP 1200; UV DAD; cột: Merck Chromolith Fastgradient RP18 50mm x 2mm; pha động A: 1 l nước + 0,5ml 50% nồng độ axit formic, pha động B: 1 l axetonitril + 0,5ml 50% nồng độ axit formic; gradient: 0,0 phút 95%A $\rightarrow$ 2,9 phút 5% A $\rightarrow$ 3,2 phút 5% A; tốc độ dòng chảy: 3ml/phút; lò: RT; dò tia cực tím: 210nm.

Phương pháp 5 (DCI MS): Loại thiết bị: Thermo Fisher-Scientific DSQ; ion hóa hóa học; khí amoniac phản ứng; nhiệt độ nguồn: 200°C; năng lượng ion hóa 70eV.

Phương pháp 6 (MALDI MS): Loại thiết bị Kratos PC-Kompact SEQ V1.2.2 MALDI TOF MS, phương thức ion hóa tích cực, chiều cao tuyến tính, công suất: 75.

Bộ tổng hợp vi sóng: bộ tổng hợp Biotage Emrys Initiator II, với kích cỡ lọ thay đổi đến thể tích phản ứng 20ml và bộ xử lý mẫu “Robot 60”

Chất đệm xitrat độ pH=4: Fluka No 82566; chất đệm xitrat độ pH=4, được làm ổn định bằng chế phẩm natri azit: axit xitric, khoảng 0,056 M; natri azit, khoảng 0,05%; natri clorua, khoảng 0,044 M; natri hydroxit, khoảng 0,068M.

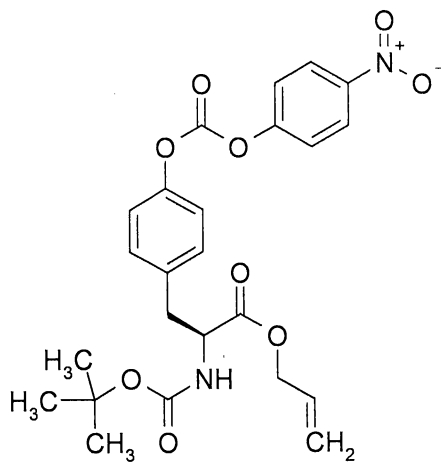
40kDa metoxy poly(etylen glycol) maleimido propionamit (40k mPEG maleimit mạch thẳng);

Số CAS 724722-89-8; Từ Dr. Reddys Inc., số Lot 233101301; phân tử lượng trung bình khối, Mw (GPC) 40500 Da; đa phân tán (GPC) 1,08.

Các hợp chất khởi đầu

Ví dụ 1A

Allyl-N-(tert-butoxycarbonyl)-O-[(4-nitrophenoxy)carbonyl]-L-tyrosinat



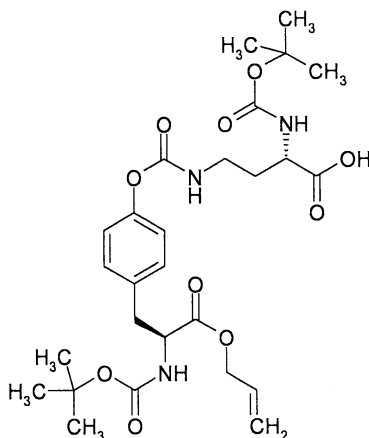
Gom 36,7g (114,3 mmol) N-Boc-L-tyrosin allyl este, 23,0g (114,3mmol) 4-nitrophenyl cloformat, 17,5ml (125,7mmol) trietylamin và 1,40g (11,4mmol) 4-dimetylamino pyridin vào 1000ml diclometan và khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ. Chiết hỗn hợp phản ứng bằng khoảng 500ml nước và bằng khoảng 250ml nước muối và làm khô qua khoảng 100g natri sulfat. Loại bỏ dung môi bằng thiết bị bay hơi kiểu quay (khoảng 40°C, khoảng 200mbar, khoảng 30 phút) và hòa tan sản phẩm trong

diethyl ete ấm và kết tinh qua đêm ở 4°C. Lọc bỏ chất kết tủa, rửa bằng diethyl ete lạnh và làm khô trong chân không ở mức cao (khoảng 0,1mbar, 18 giờ). Hiệu suất là 29,86g, (59,6mmol, 52% theo lý thuyết) sản phẩm mong muốn.

LC-MS (phương pháp 1): $R_t = 1,23$ phút, $m/z = 487$ ($M+H$)⁺

Ví dụ 2A

Axit (2S)-4-{[(4-{(2S)-3-(Allyloxy)-2-[(tert-butoxycarbonyl)amino]-3-oxopropyl}phenoxy)carbonyl]-amino}-2-[(tert-butoxycarbonyl)amino]butanoic

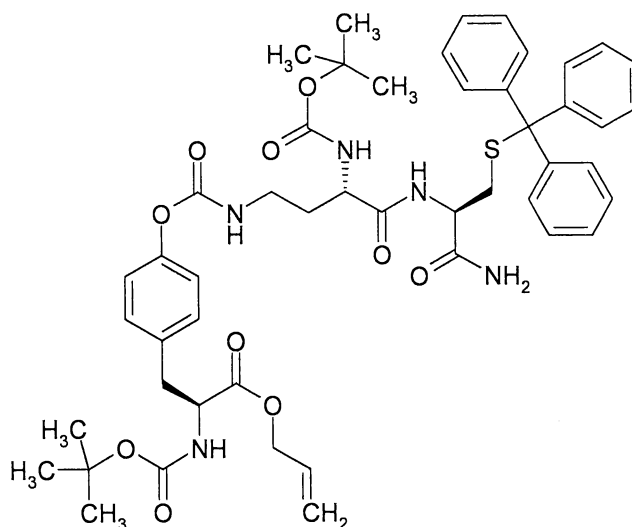


Hòa tan 4,0g (8,22mmol) hợp chất từ ví dụ 1A trong 60ml diclometan. Thêm 1,795 (8,22mmol) axit (2S)-4-Amino-2-[(tert-butoxycarbonyl)amino]butanoic và 1,43ml (8,22mmol) N,N-diisopropyletylamin vào. Tách hỗn hợp phản ứng thành 3 phần. Gia nhiệt các phần trong 30 phút trong ống bịt kín ở 75°C trong bộ tổng hợp vi sóng. Loại bỏ dung môi bằng thiết bị bay hơi kiểu quay ra khỏi hỗn hợp phản ứng gom lại (khoảng 40°C, khoảng 200mbar, khoảng 30 phút). Hòa tan sản phẩm thô trong diclometan và sắc ký qua khoảng 600ml silicagel. Dung môi được sử dụng là diclometan/etyl axetat 4/1, diclometan/etyl axetat 1/1, diclometan/metanol 4/1 và diclometan/ metanol 1/1. Gom các phân đoạn chứa sản phẩm và cô đặc đến khô dưới áp suất giảm. Việc này thu được 4,02g (6,54mmol, 80% theo lý thuyết) sản phẩm mong muốn.

LC-MS (phương pháp 1): $R_t = 1,07$ phút, $m/z = 564$ ($M-H$)⁻

Ví dụ 3A

Allyl O-((3S)-4-{[(2R)-1-amino-1-oxo-3-(tritylsulfanyl)propan-2-yl]amino}-3-[(tert-butoxycarbonyl)amino]-4-oxobutyl} carbamoyl)-N-(tert-butoxycarbonyl)-L-tyrosinat

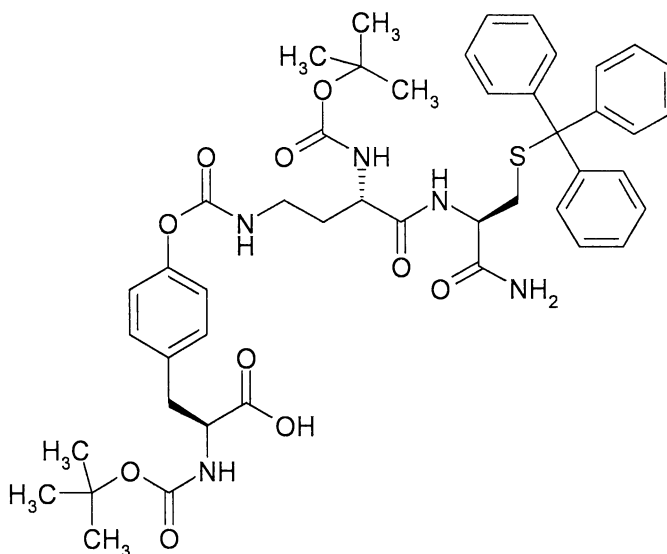


Hòa tan 2,50g (4,42mmol) hợp chất từ ví dụ 2A trong 100ml diclometan. Thêm 1,602g (4,42mmol) S-Trityl-L-xysteinamit, 0,77ml (4,42mmol) N,N-diisopropyletylamin và 1,68g (4,42mmol) HATU vào. Tách hỗn hợp phản ứng thành 5 phần. Gia nhiệt các phần trong 30 phút trong ống bịt kín ở 60°C trong bộ tổng hợp vi sóng. Loại bỏ dung môi bằng thiết bị bay hơi kiểu quay ra khỏi hỗn hợp phản ứng gom lại (khoảng 40°C, khoảng 200 mbar, khoảng 30 phút). Hòa tan sản phẩm thô trong diclometan và sắc ký qua khoảng 600ml silicagel. Dung môi được sử dụng là diclometan/etyl axetat 2/1, diclometan/etyl axetat 1/1, diclometan/metanol 20/1 và diclometan/metanol 10/1. Gom các phân đoạn chứa sản phẩm và cô đặc đến khô dưới áp suất giảm. Việc này thu được 4,12g (3,30mmol, 75% theo lý thuyết, độ tinh khiết 73%) sản phẩm mong muốn.

LC-MS (phương pháp 1): $R_t = 1,36$ phút, $m/z = 911$ ($M+H$)⁺

Ví dụ 4A

O-((3S)-4-{[(2R)-1-Amino-1-oxo-3-(tritylsulfanyl)propan-2-yl]amino}-3-[(tert-butoxycarbonyl)-amino]-4-oxobutyl} carbamoyl)-N-(tert-butoxycarbonyl)-L-tyrosin



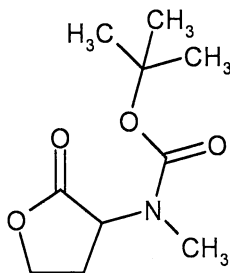
Hòa tan 4,14g (4,55mmol) hợp chất từ ví dụ 3A trong 90ml tetrahydrofuran. Thêm 3,17ml (22,8mmol) triethylamin, 0,86ml (22,8mmol) axit formic và 0,526g (0,455 mmol) tetrakis(triphenylphosphin)paladi(0) vào. Khuấy hỗn hợp phản ứng qua đêm ở nhiệt độ trong phòng. Pha loãng phản ứng bằng khoảng 100ml nước và chiết hai lần bằng khoảng 100ml diclometan. Chiết các pha hữu cơ gom lại bằng nước muối, làm khô qua natri sulfat và cô đặc đến khô dưới áp suất giảm. Hòa tan sản phẩm thô trong diclometan và sắc ký qua khoảng 500ml silicagel. Dung môi được sử dụng là diclometan, diclometan/metanol 20/1 và diclometan/metanol 1/1. Gom các phân đoạn chứa sản phẩm và cô đặc đến khô dưới áp suất giảm. Việc này thu được 2,62g sản phẩm thô có độ tinh khiết 94,5%. Tinh chế tiếp sản phẩm này bằng RP-HPLC điều chế trên C18 bằng nước/metanol gradient để thu được 2,35g (2,70mmol, 59% theo lý thuyết) sản phẩm tinh khiết.

LC-MS (phương pháp 1): $R_t = 1,22$ phút, $m/z = 871$ ($M+H$)⁺

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆, δ /ppm): $\delta = 7,92$ (d, 1H), 7,65 (t, 1H), 7,28-7,35 (m, 12H), 7,25-7,28 (t, 3H), 7,15-7,20 (m, 4H), 6,95 (d, 2H), 4,29 (q, 1H), 4,00 (m, 1H), 3,92 (m, 1H), 3,11 (m, 3H), 2,90 (m, 1H), 2,36 (m, 2H), 1,84 (m, 1H), 1,68 (m, 1H), 1,34 (d, 18H).

Ví dụ 5A

tert-Butyl-methyl(2-oxotetrahydrofuran-3-yl)carbamate



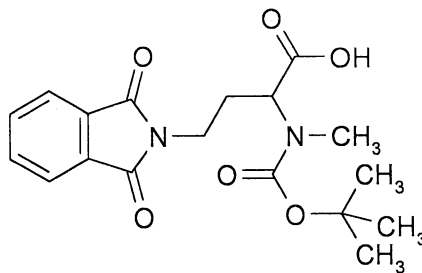
Hợp chất được tổng hợp theo Alberico, Dino; Paquin, Jean-Francois; Lautens, Mark; Tetrahedron, 2005, vol. 61, p. 6283 - 6297.

Hòa tan 5,18g (25,7mmol) tert-Butyl(tetrahydro-2-oxo-3-furanyl)carbamate, 4,81ml (77,2mmol) iodometan trong 100ml dimetyl fomamit khô. Làm lạnh dung dịch đến 0°C và thêm 1,34g (60% trong dầu khoáng, 33,5mmol) natri hydrua. Làm ấm phản ứng đến nhiệt độ trong phòng và khuấy qua đêm. Thêm hỗn hợp phản ứng vào khoảng 400ml nước và chiết hỗn hợp ba lần bằng khoảng 300 ml etyl axetat. Làm khô các pha hữu cơ gom lại qua natri sulfat và cô đặc đến khô dưới áp suất giảm. Việc này thu được 8,70g (25,7mmol, 100% theo lý thuyết, độ tinh khiết 63%) sản phẩm mong muốn.

Các dữ liệu phân tích theo tài liệu chuyên ngành. Sản phẩm được sử dụng trong bước tổng hợp tiếp theo mà không cần tinh chế thêm.

Ví dụ 6A

Axit 2-[(tert-Butoxycarbonyl)(methyl)amino]-4-(1,3-dioxo-1,3-dihydro-2H-isoindol-2-yl)butanoic



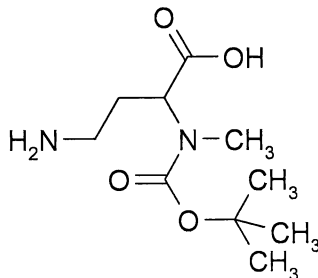
Hòa tan 8,70g (khoảng 25mmol, độ tinh khiết khoảng 63%) hợp chất từ ví dụ

5A trong 560ml dimetyl formamit. Thêm 8,23g (44,4mmol) kali ophtalimit vào và gia nhiệt hỗn hợp phản ứng đến 150°C trong 7 giờ. Loại bỏ khoảng 400ml dung môi bằng thiết bị bay hơi kiểu quay (khoảng 60°C, khoảng 10mbar, khoảng 30 phút). Rót hỗn hợp phản ứng vào hỗn hợp gồm khoảng 100ml nước, 200g nước đá và 15ml axit axetic. Sau khi làm nóng chảy nước đá còn lại, lọc hỗn hợp phản ứng và chiết phần lọc 3 lần bằng khoảng 100 ml diclometan. Làm khô các pha hữu cơ gom lại bằng natri sulfat và cô đặc đến khô dưới áp suất giảm. Hòa tan sản phẩm thô trong diclometan và sắc ký qua khoảng 70ml silicagel. Dung môi được sử dụng là diclometan/etyl axetat 9/1 to diclometan/etyl axetat 6/4. Gom các phân đoạn chứa sản phẩm và cô đặc đến khô dưới áp suất giảm. Việc này thu được 2,39g (6,04mmol, 24% theo lý thuyết) sản phẩm.

LC-MS (phương pháp 1): $R_t = 0,92$ phút, $m/z = 363$ ($M+H$)⁺

Ví dụ 7A

Axit 4-Amino-2-[(tert-butoxycarbonyl)(metyl)amino]butanoic



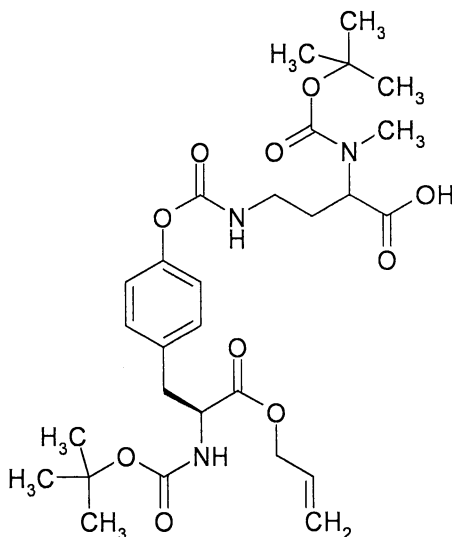
Hòa tan 11,8g (32,6mmol) hợp chất từ ví dụ 6A trong khoảng 640ml etanol và thêm 23,8ml (488mmol) hydrazin hydrat vào hỗn hợp phản ứng. Sau khi khuấy qua đêm, lọc hỗn hợp phản ứng và cô đặc phần lọc đến khô dưới áp suất giảm. Hòa tan sản phẩm thô trong etanol và thêm khoảng 50g silicagel vào, loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm. Thêm chất rắn thu được vào khoảng 500g cột silicagel và sắc ký. Dung môi được sử dụng là diclometan/metanol 9/1 đến diclometan/metanol 1/1. Gom các phân đoạn chứa sản phẩm và cô đặc đến khô dưới áp suất giảm. Việc này thu được 2,98g (12,8mmol, 39% theo lý thuyết) sản phẩm.

LC-MS (phương pháp 2): $R_t = 0,21$ phút, $m/z = 233$ ($M+H$)⁺

DCI MS (phương pháp 5): $m/z = 233$ ($M+H$)⁺

Ví dụ 8A

Axit 4-{[(4-{(2S)-3-(Allyloxy)-2-[(tert-butoxycarbonyl)amino]-3-oxopropyl}phenoxy)carbonyl]-amino}-2-[(tert-butoxycarbonyl)(metyl)amino]butanoic

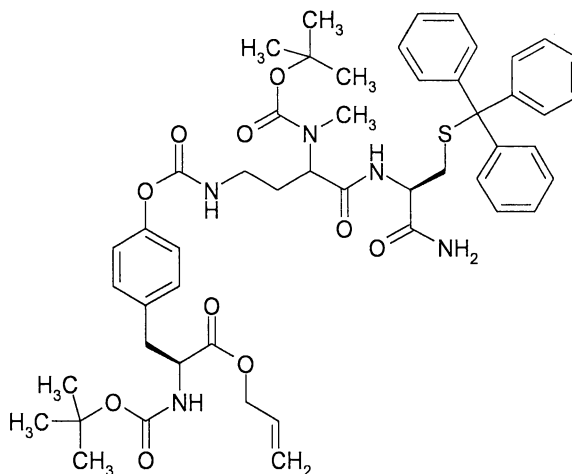


Hòa tan 0,931g (1,92mmol) hợp chất từ ví dụ 1A trong 30ml diclometan. Thêm 0,455g (1,92mmol) hợp chất từ ví dụ 7A vào. Tách hỗn hợp phản ứng thành 2 phần. Gia nhiệt các phần trong 30 phút trong ống bịt kín ở 80°C trong bộ tổng hợp vi sóng. Loại bỏ dung môi ra khỏi hỗn hợp phản ứng gom lại dưới áp suất giảm. Tinh chế sản phẩm thô bằng RP-HPLC điều chế trên cột C18 bằng nước metanol gradient từ 9/1 đến 1/9. Gom các phân đoạn chứa sản phẩm và cô đặc đến khô dưới áp suất giảm. Việc này thu được 0,523g (0,85mmol, 44% theo lý thuyết) sản phẩm mong muốn là hỗn hợp gồm 2 chất đồng phân không đối quang.

LC-MS (phương pháp 1): $R_t = 1,08$ và $1,11$ phút, $m/z = 578$ ($M-H$)⁻

Ví dụ 9A

Allyl O-[(4-{[(2R)-1-amino-1-oxo-3-(tritylsulfanyl)propan-2-yl]amino}-3-[(tert-butoxycarbonyl)-(metyl)amino]-4-oxobutyl)carbonyl]-N-(tert-butoxycarbonyl)-L-tyrosinat

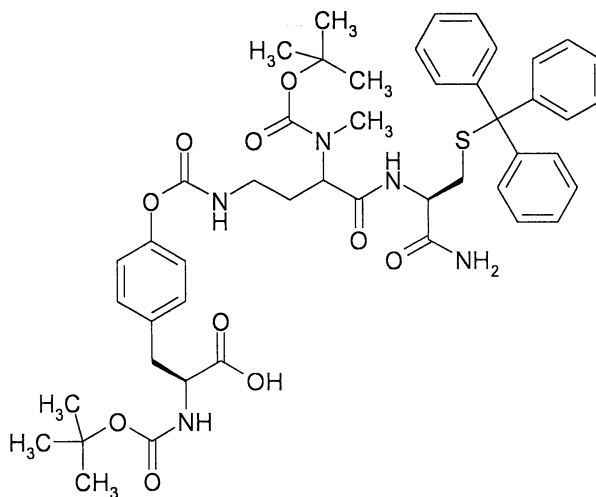


Hòa tan 2,24g (3,86mmol) hợp chất từ ví dụ 8A trong 100ml diclometan. Thêm 1,401g (3,86mmol) S-Trityl-L-xysteinamit, 0,67ml (3,86mmol) N,N-diisopropyletylamin và 1,47g (3,86mmol) HATU vào. Tách hỗn hợp phản ứng thành 5 phần. Gia nhiệt các phần trong 30 phút trong ống bịt kín ở 60°C trong bộ tổng hợp vi sóng. Loại bỏ dung môi bằng thiết bị bay hơi kiểu quay ra khỏi hỗn hợp phản ứng gom lại (khoảng 40°C, khoảng 200 mbar, khoảng 30 phút). Tinh chế sản phẩm thô bằng RP-HPLC điều chế trên cột C18 bằng nước metanol gradient từ 9/1 đến 1/9. Gom các phân đoạn chứa sản phẩm và cô đặc đến khô dưới áp suất giảm. Việc này thu được 3,26g (2,75mmol, 71% theo lý thuyết, độ tinh khiết 78%) sản phẩm mong muốn là hỗn hợp gồm chất đồng phân không đối quang.

LC-MS (phương pháp 1): $R_t = 1,41$ và $1,43$ phút, $m/z = 924$ ($M+H$)⁺

Ví dụ 10A

O-[(4-{[(2R)-1-Amino-1-oxo-3-(tritylsulfanyl)propan-2-yl]amino}-3-[(tert-butoxycarbonyl)-(metyl)amino]-4-oxobutyl)carbamoyl]-N-(tert-butoxycarbonyl)-L-tyrosin



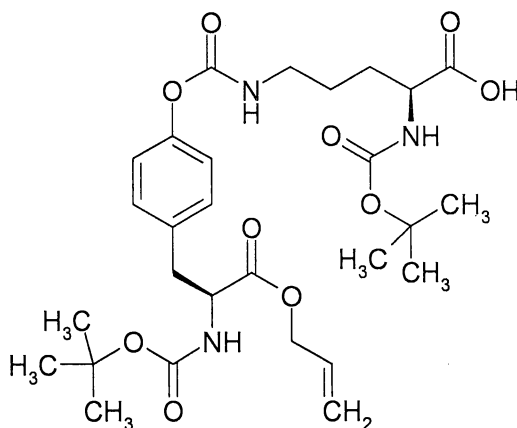
Hòa tan 2,2g (2,38mmol) hợp chất từ ví dụ 9A trong 48ml tetrahydrofuran. Thêm 1,66ml (11,9mmol) triethylamin, 0,45ml (11,9mmol) axit formic và 0,275g (0,238mmol) tetrakis(triphenylphosphin)paladi(0) vào. Khuấy hỗn hợp phản ứng qua đêm ở nhiệt độ trong phòng. Pha loãng phản ứng bằng khoảng 50ml nước và chiết hai lần bằng khoảng 50ml diclometan. Chiết các pha hữu cơ gom lại bằng nước muối, làm khô qua natri sulfat và cô đặc đến khô dưới áp suất giảm. Hòa tan sản phẩm thô trong diclometan và sắc ký qua khoảng 100g silicagel. Dung môi được sử dụng là diclometan, diclometan/metanol 50/1 và diclometan/metanol 4/1. Gom các phân đoạn chứa sản phẩm và cô đặc đến khô dưới áp suất giảm. Việc này thu được 1,44g (1,61mmol, 68% theo lý thuyết) sản phẩm là hỗn hợp gồm chất đồng phân không đối quang.

LC-MS (phương pháp 1): $R_t = 1,20$ và $1,24$ phút, $m/z = 884$ ($M+H$)⁺

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆, δ /ppm): $\delta = 8,00$ (m, 1H), 7,65-7,90 (m, 4H), 7,18-7,35 (m, 18H), 7,10 (m, 2H), 6,96 (m, 4H), 4,60 (m, 1H), 4,46 (m, 1H), 4,30 (m, 2H), 4,05 (m, 2H), 3,00 (m, 4H), 2,75 (m, 6H), 2,36 (m, 3H), 2,00 (m, 2H), 1,82 (m, 2H), 1,40 (m, 3H), 1,35 (s, 18H).

Ví dụ 11A

N⁵-[(4-{(2S)-3-(Allyloxy)-2-[(tert-butoxycarbonyl)amino]-3-oxopropyl}phenoxy)cacbonyl]-N²-(tert-butoxycarbonyl)-L-ornithin

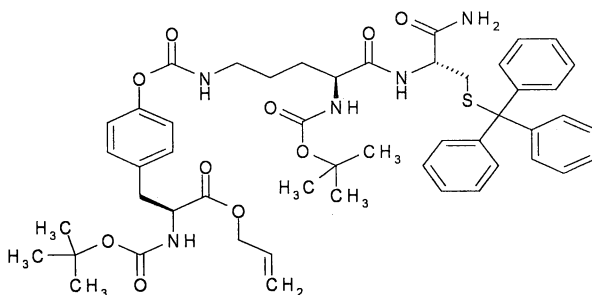


Hòa tan 6,00g (12,33mmol) hợp chất từ ví dụ 1A trong 120ml diclometan. Thêm 2,57g (12,33 mmol) N²-(tert-Butoxycarbonyl)-L-ornithin. Tách hỗn hợp phản ứng thành 6 phần. Gia nhiệt các phần trong 90 phút trong ống bịt kín ở 75°C trong bộ tổng hợp vi sóng. Chiết hỗn hợp phản ứng gom lại bằng khoảng 100ml dung dịch amoni clorua bão hòa. Chiết lại hai lần pha trong nước bằng khoảng 30ml diclometan. Chiết các pha hữu cơ gom lại bằng khoảng 50 ml nước muối và làm khô qua natri sulfat. Loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm. Hòa tan sản phẩm thô trong diclometan và sắc ký qua khoảng 600ml silicagel. Dung môi được sử dụng là diclometan, diclometan/metanol 40/1 đến diclometan/metanol 1/1. Gom các phân đoạn chứa sản phẩm và cô đặc đến khô dưới áp suất giảm. Việc này thu được 2,63g (4,06mmol, 33% theo lý thuyết, độ tinh khiết 89%) sản phẩm mong muốn.

LC-MS (phương pháp 1): R_t = 1,03 phút, m/z = 578 (M-H)⁻

Ví dụ 12A

N⁵-[(4-{(2S)-3-(Allyloxy)-2-[(tert-butoxycarbonyl)amino]-3-oxopropyl}phenoxy)carbonyl]-N²-(tert-butoxycarbonyl)-L-ornithyl-S-trityl-L-xysteinamit

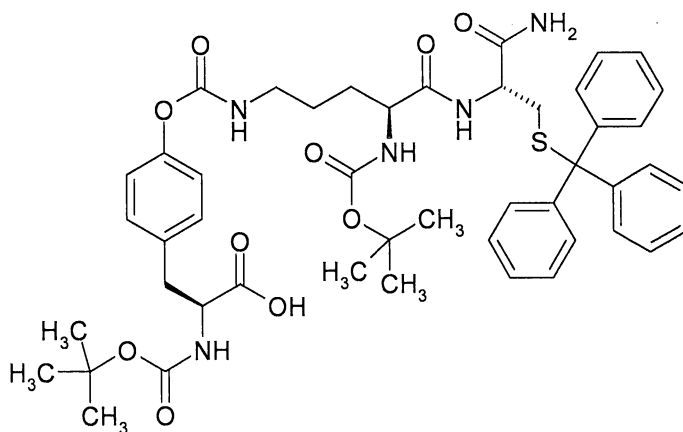


Hòa tan 1,20g (2,07mmol) hợp chất từ ví dụ 11A trong 48ml diclometan. Thêm 0,750g (2,07mmol) S-Trityl-L-xysteinamit, 0,36ml (2,07mmol) N,N-diisopropyletylamin và 0,787g (2,07mmol) HATU vào. Tách hỗn hợp phản ứng thành 3 phần. Gia nhiệt các phần trong 30 phút trong ống bịt kín ở 60°C trong bộ tổng hợp vi sóng. Loại bỏ dung môi bằng thiết bị bay hơi kiểu quay ra khỏi hỗn hợp phản ứng gom lại (khoảng 40°C, khoảng 200 mbar, khoảng 30 phút). Hòa tan sản phẩm thô trong diclometan và sắc ký qua khoảng 400ml silicagel. Dung môi được sử dụng là diclometan/etyl axetat 2/1, diclometan/etyl axetat 1/1. Gom các phân đoạn chứa sản phẩm và cô đặc đến khô dưới áp suất giảm. Việc này thu được 1,30g (1,5mmol, 56% theo lý thuyết, độ tinh khiết 82%) sản phẩm mong muốn.

LC-MS (phương pháp 1): $R_t = 1,35$ phút, $m/z = 924$ ($M+H$)⁺

Ví dụ 13A

N²-(tert-Butoxycarbonyl)-N⁵-[(4-{(2S)-2-[(tert-butoxycarbonyl)amino]-2-carboxyethyl}phenoxy)-carbonyl]-L-ornithyl-S-trityl-L-xysteinamit



Hòa tan 3,06g (2,33mmol) hợp chất từ ví dụ 12A trong 46ml tetrahydrofuran. Thêm 1,63ml (11,6mmol) trietylamin, 0,44ml (11,6mmol) axit formic và 0,265g (0,233mmol) tetrakis(triphenylphosphin)paladi(0) vào. Khuấy hỗn hợp phản ứng qua đêm ở nhiệt độ trong phòng. Pha loãng phản ứng bằng khoảng 50ml nước và chiết hai lần bằng khoảng 50ml diclometan. Chiết các pha hữu cơ gom lại bằng nước muối, làm khô qua natri sulfat và cô đặc đến khô dưới áp suất giảm. Hòa tan sản phẩm thô trong

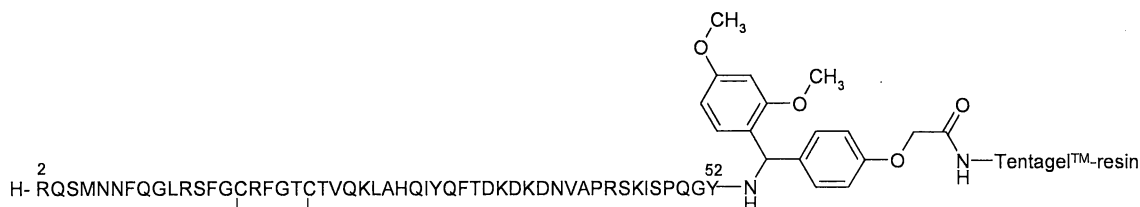
diclometan và sắc ký qua khoảng 500ml silicagel. Dung môi được sử dụng là diclometan, diclometan/metanol 40/1 và diclometan/metanol 1/1. Gom các phân đoạn chứa sản phẩm và cô đặc đến khô dưới áp suất giảm. Việc này thu được 1,40g sản phẩm thô có độ tinh khiết 86%. Tinh chế tiếp sản phẩm này bằng RP-HPLC điều chế trên cột C18 với nước/metanol gradient để thu được 2 phân đoạn: 0,93g sản phẩm (45% theo lý thuyết).

LC-MS (phương pháp 1): $R_t = 1,18$ phút, $m/z = 885$ ($M+H$)⁺

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆, δ /ppm): $\delta = 7,89$ (d, 1H), 7,65 (t, 1H), 7,25-7,35 (m, 12H), 7,20-7,25 (m, 6H), 7,10-7,20 (m, 3H), 6,95 (d, 2H), 4,29 (m, 1H), 4,05 (m, 1H), 3,88 (m, 1H), 3,11 (d, 1H), 3,00 (m, 4H), 2,75 (m, 2H), 2,36 (m, 3H), 1,64 (m, 1H), 1,51 (m, 3H), 1,36 (s, 9H), 1,32 (s, 9H).

Ví dụ 14A

Nhựa amit được tạo thành chủ yếu từ tentagel được gắn kết ADM (2-52)



Ghép theo bước peptit vào nhựa amit được tạo thành chủ yếu từ Tentagel trên bộ tổng hợp peptit tự động (Protein Technologies Inc. Symphony). Các bình phản ứng 8 poly-propylen được sử dụng song song thực hiện hóa học giống nhau. Nạp mỗi bình bằng 0,05mmol nhựa Rink được tạo thành chủ yếu từ Tentagel đối với tổng kích cỡ mẻ 0,4mmol.

Thêm mỗi axit amn vào với lượng dư mol gấp 8 lần đối với lượng nhựa. Axit amin là Fmoc được bảo vệ như nhóm bảo vệ đầu cuối N và nhóm bảo vệ được chỉ định dưới đây được sử dụng đối với các nhóm chức chuỗi phụ. Ngoài ra, thêm 188mg (0,59mmol, 7,8 đương lượng) TBTU và 0,21ml (1,2mmol, 16 đương lượng) DIEA vào.

Thực hiện phản ứng trong DMF làm dung môi, trong khi DMF được sử dụng với lượng đủ để làm nở nhựa và lắc mạnh một cách tự do. Thời gian phản ứng/axit amin là khoảng 1 giờ. Việc tách các nhóm bảo vệ Fmoc đạt được bằng cách sử dụng 20% piperidin/DMF, trong khi đó 20% piperidin/DMF được sử dụng với lượng đủ để làm nở nhựa và lắc một cách tự do.

Trình tự cặp đôi là như sau:

1. Tyr(tBu) (Tyr = Y = AA 52 của ADM của người)
2. Gly (Gly = G = AA 51 của ADM của người)
3. Gln(Trt) (Gln = Q = AA 50 của ADM của người)
4. Pro (Pro = P = AA 49 của ADM của người)
5. Ser(tBu) (Ser = S = AA 48 của ADM của người)
6. Ile (Ile = I = AA 47 của ADM của người)
7. Lys(Boc) (Lys = K = AA 46 của ADM của người)
8. Ser(tBu) (Ser = S = AA 45 của ADM của người)
9. Arg(pbf) (Arg = R = AA 44 của ADM của người)
10. Pro (Pro = P = AA 43 của ADM của người)
11. Ala (Ala = A = AA 42 của ADM của người)
12. Val (Val = V = AA 41 của ADM của người)
13. Asn(Trt) (Asn = N = AA 40 của ADM của người)
14. Asp(OtBu) (Asp = D = AA 39 của ADM của người)
15. Lys(Boc) (Lys = K = AA 38 của ADM của người)
16. Asp(OtBu) (Asp = D = AA 37 của ADM của người)
17. Lys(Boc) (Lys = K = AA 36 của ADM của người)
18. Asp(OtBu) (Asp = D = AA 35 của ADM của người)
19. Thr(tBu) (Thr = T = AA 34 của ADM của người)
20. Phe (Phe = F = AA 33 của ADM của người)
21. Gln(Trt) (Gln = Q = AA 32 của ADM của người)
22. Tyr(tBu) (Tyr = Y = AA 31 của ADM của người)
23. Ile (Ile = I = AA 30 của ADM của người)

24. Gln(Trt)	(Gln = Q = AA 29 của ADM của người)
25. His(Trt)	(His = H = AA 28 của ADM của người)
26. Ala	(Ala = A = AA 27 của ADM của người)
27. Leu	(Leu = L = AA 26 của ADM của người)
28. Lys(Boc)	(Lys = K = AA 25 của ADM của người)
29. Gln(Trt)	(Gln = Q = AA 24 của ADM của người)
30. Val	(Val = V = AA 23 của ADM của người)
31. Thr(tBu)	(Thr = T = AA 22 của ADM của người)
32. Cys(Trt)	(Cys = C = AA 21 của ADM của người)
33. Thr(tBu)	(Thr = T = AA 20 của ADM của người)
34. Gly	(Gly = G = AA 19 của ADM của người)
35. Phe	(Phe = F = AA 18 của ADM của người)
36. Arg(pbf)	(Arg = R = AA 17 của ADM của người)
37. Cys(Acm)	(Cys = C = AA 16 của ADM của người)
38. Gly	(Gly = G = AA 15 của ADM của người)
39. Phe	(Phe = F = AA 14 của ADM của người)
40. Ser(tBu)	(Ser = S = AA 13 của ADM của người)
41. Arg(pbf)	(Arg = R = AA 12 của ADM của người)
42. Leu	(Leu = L = AA 11 của ADM của người)
43. Gly	(Gly = G = AA 10 của ADM của người)
44. Gln(Trt)	(Gln = Q = AA 9 của ADM của người)
45. Phe	(Phe = F = AA 8 của ADM của người)
46. Asn(Trt)	(Asn = N = AA 7 của ADM của người)
47. Asn(Trt)	(Asn = N = AA 6 của ADM của người)
48. Met	(Met = M = AA 5 của ADM của người)
49. Ser(tBu)	(Ser = S = AA 4 của ADM của người)
50. Gln(Trt)	(Gln = Q = AA 3 của ADM của người)
51. Arg(pbf)	(Arg = R = AA 2 của ADM của người)

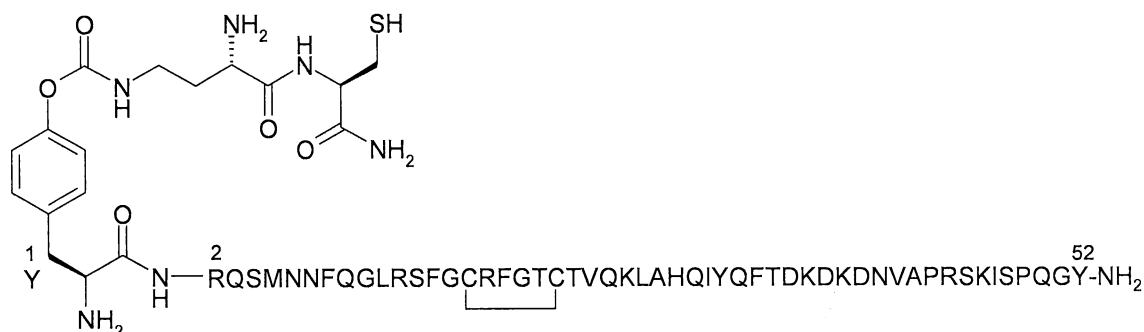
Việc oxy hóa trên nhựa đạt được bằng cách sử dụng sự bảo vệ Cys(Trt) và Cys(Acm) với việc tách kèm theo các nhóm bảo vệ và sự oxy hóa thành liên kết

disulfua bằng cách sử dụng Iot (8 đương lượng Iodine cộng với 8 đương lượng DIEA với thời gian phản ứng 30 phút). Sự oxy hóa được xác nhận bằng sự tách mẫu và sự phân tích bằng cách sử dụng HPLC và MALDI-MS.

Gom 8 mẽ để dùng cho việc sử dụng khác.

Ví dụ 15A

O-{[(3S)-3-Amino-4-{[(2R)-1-amino-1-oxo-3-sulfanylpropan-2-yl]amino}-4-oxobutyl]-carbamoyl}-L-tyrosyl-adrenomedulin(2-52)

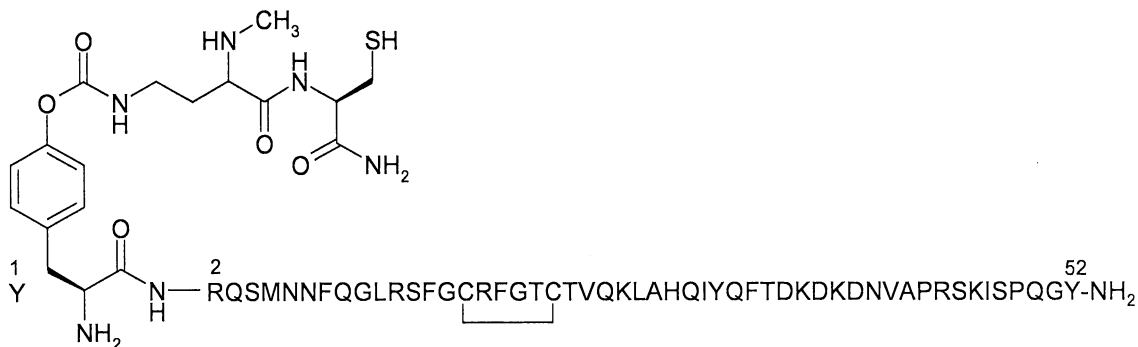


Thêm 520mg (0,6mmol, 8 đương lượng) hợp chất của ví dụ 4A vào 0,075mmol hợp chất của ví dụ 14A. Ngoài ra, thêm 188mg (0,59mmol, 7,8 đương lượng) TBTU và 0,21ml (1,2mmol, 16 đương lượng) DIEA vào. Phản ứng được thực hiện với DMF làm dung môi, trong khi đó DMF được sử dụng với lượng đủ để là nở nhựa và lắc một cách tự do. Thời gian phản ứng là khoảng 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Tách peptit ra khỏi nhựa bằng sự khử bảo vệ toàn thể đồng thời bằng cách sử dụng TFA đậm đặc với lượng đủ để làm nở nhựa và lắc một cách tự do, trong khi đó TFA chứa chất phân hủy (từ 1 đến 5% nước, phenol, thioanisol và 1,2-etandiol), với thời gian phản ứng 2 ½ giờ. Làm khô lạnh sản phẩm thô và tinh chế bằng sắc ký RP bằng cách sử dụng 0,1% TFA trong nước 0,1% TFA trong axetonitril làm pha động để bảo đảm rằng độ pH vẫn còn dưới 4 ở tất cả các thời gian trong quy trình tinh chế và quy trình làm khô lạnh. Gom tất cả các phân đoạn chứa ion chính xác bằng phân tích MALDI-MS. Hiệu suất là 44,0mg peptit được tinh chế riêng phần (khoảng 0,0035mmol, khoảng 4,7% theo lý thuyết; độ tinh khiết được ước lượng: khoảng 50%, tạp chất còn lại: ADM (2-52)).

MALDI MS (phương pháp 6): $m/z = 6275(M+H)^+$ và 5866 (tạp chất: $(ADM(2-52)+H)^+$)

Ví dụ 16A

O- $\{[4-\{[(2R)-1\text{-Amino-1-oxo-3-sulfanylpropan-2-yl]amino}\}-3\text{-(methylamino)-4-oxobutyl]-carbamoyl}\}$ -L-tyrosyl-adrenomedullin(2-52)

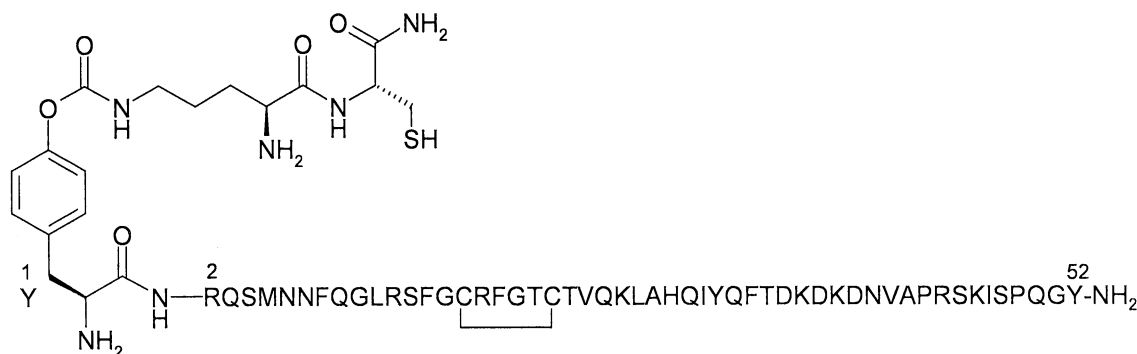


Thêm 530mg (0,6mmol, 8 đương lượng) hợp chất của ví dụ 10A vào 0,075mmol hợp chất của ví dụ 14A. Ngoài ra, thêm 188mg (0,59mmol, 7,8 đương lượng) TBTU và 0,21ml (1,2mmol, 16 đương lượng) DIEA. Phản ứng được thực hiện với DMF làm dung môi, trong khi DMF được sử dụng với lượng đủ để làm nở nhựa và lắc một cách tự do. Thời gian phản ứng là khoảng 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Tách peptit ra khỏi nhựa với việc khử bảo vệ tổng thể kèm theo bằng cách sử dụng TFA đậm đặc với lượng đủ để làm nở nhựa và lắc một cách tự do, trong khi TFA chứa chất phân hủy (từ 1 đến 5% nước, phenol, thioanisol và 1,2-ethandiol), với thời gian phản ứng 2 ½ giờ. Làm khô lạnh sản phẩm thô và tinh chế bằng sắc ký RP bằng cách sử dụng 0,1% TFA trong nước và 0,1% TFA trong axetonitril làm pha động để bảo đảm rằng độ pH vẫn dưới 4 ở tất cả các thời gian trong quy trình tinh chế và làm khô lạnh. Gom tất cả các phân đoạn chứa ion chính xác bằng phân tích MALDI-MS. Hiệu suất là 34,0mg peptit được tinh chế riêng phần (khoảng 0,0026mmol, khoảng 3,5% theo lý thuyết; độ tinh khiết được ước lượng: khoảng 50%, tạp chất còn lại: ADM (2-52)).

MALDI MS (phương pháp 6): $m/z = 6289(M+H)^+$ và 5866 (tạp chất: $(ADM(2-52)+H)^+$)

Ví dụ 17A

O-{[(4R)-4-Amino-5-{[(2R)-1-amino-1-oxo-3-sulfanylpropan-2-yl]amino}-5-oxopentyl]-carbamoyl}-L-tyrosyl-adrenomedullin(2-52)

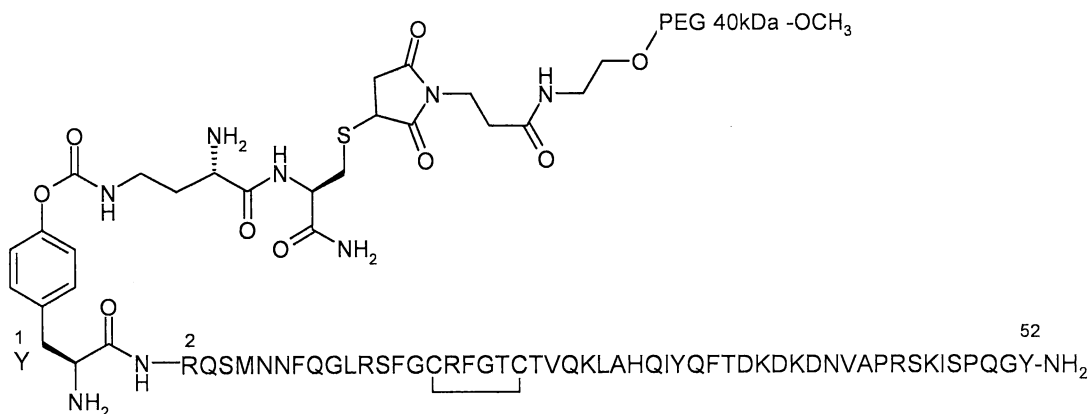


Thêm 530mg (0,6mmol, 8 đương lượng) hợp chất của ví dụ 13A vào 0,075mmol hợp chất của ví dụ 14A. Ngoài ra, thêm 188mg (0,59mmol, 7,8 đương lượng) TBTU và 0,21ml (1,2mmol, 16 đương lượng) DIEA. Phản ứng được thực hiện với DMF làm dung môi, trong khi DMF được sử dụng với lượng đủ để làm nở nhựa và lắc một cách tự do. Thời gian phản ứng là khoảng 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Tách peptit ra khỏi nhựa với việc khử bảo vệ tổng thể tiếp theo bằng cách sử dụng TFA được cô đặc với lượng đủ để làm nở nhựa và lắc một cách tự do, trong khi TFA chứa chất phân hủy (từ 1 đến 5% nước, phenol, thioanisol và 1,2-ethandiol), với thời gian phản ứng 2 ½ giờ. Làm khô lạnh sản phẩm thô và tinh chế bằng sắc ký RP bằng cách sử dụng 0,1% TFA trong nước và 0,1% TFA trong axetonitril làm pha động để bảo đảm rằng độ pH vẫn còn dưới 4 ở tất cả các thời gian trong quy trình tinh chế và làm khô lạnh. Gom tất cả các phân đoạn chứa ion chính xác bằng phân tích MALDI-MS. Hiệu suất là 47mg peptit được tinh chế riêng phần (khoảng 0,0037mmol, khoảng 5,0% theo lý thuyết; độ tinh khiết được ước lượng: khoảng 50%, tạp chất còn lại: ADM (2-52)).

MALDI MS (phương pháp 6): $m/z = 6289(M+H)^+$ và 5866 (tạp chất: $(ADM(2-52)+H)^+$)

Ví dụ điều chế**Ví dụ 1**

O-{[(3S)-3-Amino-4-({(2R)-1-amino-3-[(2,5-dioxo-1-{3-oxo-3-[(2-{ω-metoxypolyoxyetylen[40kDa]}ethyl)amino]propyl}pyrrolidin-3-yl)sulfanyl]-1-oxopropan-2-yl)amino)-4-oxobutyl]carbonyl}-L-tyrosyl-adrenomedullin(2-52)



Khuấy 44mg peptit thô của ví dụ 15A bằng 426mg (10,5μmol, 1,5 đương lượng, có nguồn gốc từ Dr. Reddys) 40kDa metoxy poly(etylen glycol) maleimido propionamit trong 9ml chất đệm xitrat có độ pH=4 qua đêm ở nhiệt độ trong phòng. Tiêm hỗn hợp phản ứng thô trong hai phần trên hệ HPLC điều chế bằng Phenomenex Luna 10μ Proteo C5 100A AXIA 250mm x 21,2mm cột và sắc ký với nước/axetonitril (cả hai với 0,1% TFA) gradient. Gom các phân đoạn trong các ống thử nghiệm 20ml trên bộ gom phân đoạn tự động. Để bảo đảm tính axit đủ, mỗi lọ được làm đầy bằng 0,5ml axit axetic trước khi gom.

ADM(2-52), mà là sản phẩm phụ của ví dụ 15A và mà không trải qua sự PEGyl hóa trong phản ứng này, cũng như PEG không được phản ứng là được loại bỏ một cách hoàn toàn.

Gom tất cả các phân đoạn chứa ví dụ 1. Loại bỏ riêng phần axetonitril trên thiết bị bay hơi quay ở nhiệt độ bể nước 30°C và khoảng 50mbar trong khoảng 30 phút.

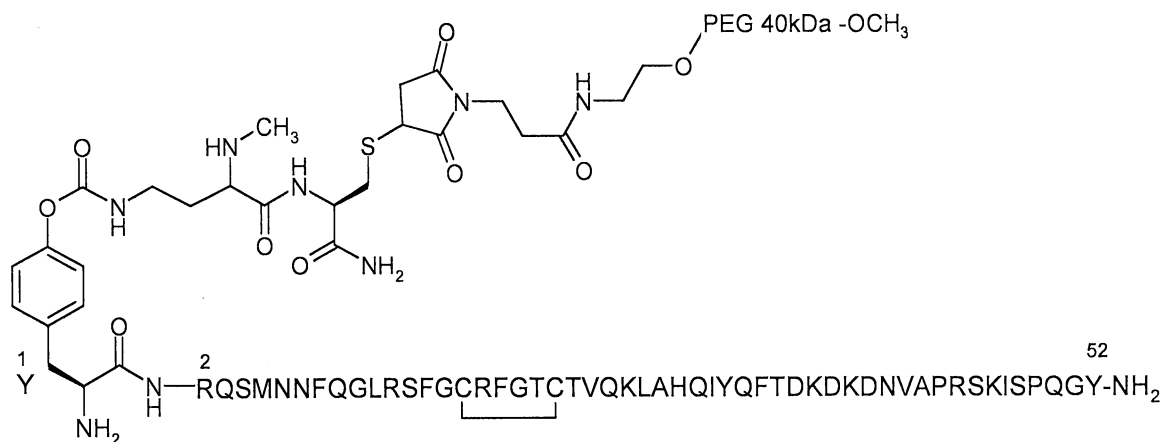
Sau khi việc bổ sung 0,5ml axit axetic, làm đông khô dung dịch còn lại. Tổng

hiệu suất của ví dụ 1 là 109mg (2,35 μ mol, 33% theo lý thuyết).

HPLC (phương pháp 3): R_t = từ 4,23 đến 4,30 phút

Ví dụ 2

O-{[(3-N-Metyl-amino-4-((2R)-1-amino-3-[(2,5-dioxo-1-{3-oxo-3-[(2-{ ω -metoxy-poly-oxyetylen[40kDa]}etyl)amino]propyl}pyrrolidin-3-yl)sulfanyl]-1-oxopropan-2-yl)amino)-4-oxobutyl]carbamoyl}-L-tyrosyl-adrenomedulin(2-52)



Khuấy 15mg peptit thô của ví dụ 16A với 145mg (3,58 μ mol, 1,5 đương, có nguồn gốc từ Dr. Reddys) 40kDa metoxy poly(etylen glycol) maleimido propionamit 5ml chất đệm xitrat có độ pH=4 qua đêm ở nhiệt độ trong phòng. Tiêm hỗn hợp phản ứng thô vào hệ HPLC điều chế với Phenomenex Jupiter 10 μ cột C18 300A 250mm x 21,2mm và sắc ký với nước/axetonitril (cả với 0,1% TFA) gradient. Gom các phân đoạn trong các ống thử nghiệm 20ml trên bộ gom phân đoạn tự động. Để bảo đảm tính axit đủ, mỗi lọ được làm đầy bằng 0,5ml axit axetic trước khi gom.

ADM(2-52), mà là sản phẩm phụ của ví dụ 16A và mà không trải qua sự PEGyl hóa trong phản ứng này, cũng như loại bỏ PEG không được phản ứng một cách hoàn toàn.

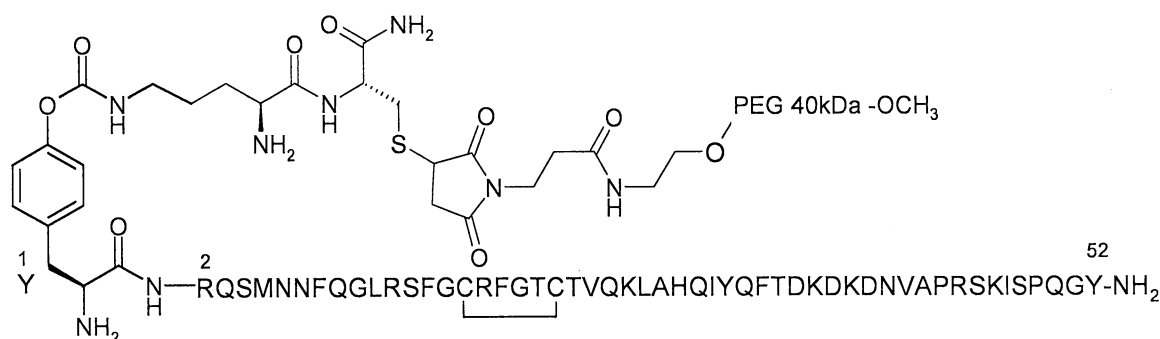
Gom tất cả các phân đoạn chứa ví dụ 2. Loại bỏ riêng phần axetonitril trên thiết bị bay hơi quay ở nhiệt độ bể nước 30°C và khoảng 50 mbar trong khoảng 30 phút.

Sau khi bổ sung 0,5ml axit axetic, làm khô lạnh dung dịch còn lại. Tổng hiệu suất của ví dụ 2 là 50mg (1,08 μ mol, 43% theo lý thuyết).

HPLC (phương pháp 4): R_t = từ 2,02 đến 2,08 phút

Ví dụ 3

O-{[(4S)-4-Amino-5-({(2R)-1-amino-3-[(2,5-dioxo-1-{3-oxo-3-[(2-{ ω -metoxy-polyoxyetylen[40kDa]}etyl)amino]propyl}pyrrolidin-3-yl)sulfanyl]-1-oxopropan-2-yl)amino)-5-oxopentyl]carbamoyl}-L-tyrosyl-adrenomedulin(2-52)



Khuấy 15mg peptit thô của ví dụ 17A với 145mg (3,58 μ mol, 1,5 đương lượng, có nguồn gốc từ Dr. Reddys) 40 kDa metoxy poly(etylen glycol) maleimido propionamit trong 5ml chất đệm xitrat có độ pH=4 qua đêm ở nhiệt độ trong phòng. Tiêm hỗn hợp phản ứng thô vào hệ HPLC điều chế với Phenomenex Jupiter 10 μ cột Proteo 90A AXIA 250mm x 21,2mm và sắc ký với nước/axetonitril (cả hai với 0,1% TFA) gradient. Gom các phân đoạn vào ống thử nghiệm 20ml trên bộ gom phân đoạn tự động. Để bảo đảm tính axit đủ, mỗi lọ được làm đầy bằng 0,5ml axit axetic trước khi gom.

ADM(2-52), mà là sản phẩm phụ của ví dụ 17A và mà không trải qua sự PEGyl hóa trong phản ứng này, cũng như PEG không phản ứng được loại bỏ một cách hoàn toàn.

Gom tất cả các phân đoạn chứa ví dụ 3. Loại bỏ riêng phần axetonitril trên thiết bị bay hơi quay ở nhiệt độ bể nước 30°C và khoảng 50mbar trong khoảng 30 phút.

Sau khi thêm 0,5ml axit axetic, làm đông kho dung dịch còn lại. Tổng hiệu suất của ví dụ 3 là 19,5mg (0,42 μ mol, 17% theo lý thuyết).

HPLC (phương pháp 4): R_t = từ 2,02 đến 2,08 phút

B. Đánh giá hoạt tính dược lý

Tính thích hợp của các hợp chất theo sáng chế để điều trị các bệnh có thể được xác định bằng cách sử dụng các hệ thử nghiệm sau đây:

1) Mô tả thử nghiệm (in vitro)

1a) Thử nghiệm đối với tế bào thông báo thụ thể adrenomedulin tái tổ hợp

Hoạt tính của các hợp chất theo sáng chế được định lượng với sự trợ giúp của dòng tế bào buồng trứng chuột túi trung quốc tái tổ hợp (CHO) mang thụ thể adrenomedulin của người. Sự hoạt hóa của thụ thể bằng các phối tử có thể được đo bằng sự thanh thải aequorin. Việc tạo cấu trúc của dòng tế bào và quy trình đo được mô tả chi tiết trong ấn phẩm: [Wunder F., Rebmann A., Geerts A, and Kalthof B., *Mol Pharmacol*, 73, 1235-1243 (2008)]. Tóm lại: Tế bào được tạo hạt trên các đĩa vi chuẩn 384 giếng mờ ở mật độ 4000 tế bào/giếng và được phát triển trong 24 giờ. Sau khi loại bỏ môi trường nuôi cấy, nạp tế bào trong 3 giờ với 0,6 μ g/ml coelenterazin trong dung dịch Tyrode không chứa Ca^{2+} (130mM natri clorua, 5mM kali clorua, 20mM HEPES (axit 4-(2-hydroxyetyl)-1-piperazinetsulfonic), 1mM magie clorua, và 4,8mM natri hydro cacbonat, độ pH=7,4) được bổ sung với 0,2mM 3-Isobutyl-1-metylaxanthin (IBMX) trong thiết bị ủ nuôi cấy tế bào. Bổ sung các hợp chất vào trong 6 phút trong dung dịch Tyrode không chứa Ca^{2+} chứa 0,1% albumin huyết thanh bò. Ngay trước khi bổ sung Ca^{2+} vào nồng độ cuối cùng 3mM đo sự thanh thải aequorin được bắt đầu bằng cách sử dụng huỳnh quang kế thích hợp. Sự thanh thải được đo trong 60 giây. Trong các thử nghiệm thông thường, hợp chất được thử nghiệm ở nồng độ nằm trong khoảng từ 1×10^{-13} đến 3×10^{-6} M.

Để xác định sự giải phóng của adrenomedulin có hoạt tính ra khỏi hợp chất theo

sáng chế, ủ các hợp chất ở các nồng độ khác nhau trong các khoảng thời gian khác nhau đến 24 giờ trong dung dịch Tyrode được bổ sung với huyết thanh bào thai bò, môi trường nuôi cấy hoặc huyết tương từ các loài khác nhau ở độ pH=7,4. Hàm lượng Canxi²⁺ của môi trường ủ tương ứng được tạo đệm bằng cách bổ sung 4mM EDTA (axit etylen diamin tetraaxetic) trước khi bổ sung các mẫu vào tế bào thông báo thụ thể adrenomedulin.

Sau khi ủ sơ bộ thích hợp, các ví dụ theo phương án hoạt hóa tế bào thông báo thụ thể adrenomedulin có hiệu lực cao hơn so với trước khi ủ sơ bộ. Việc này được chỉ định bởi thực tế rằng các giá trị EC₅₀ được xác định bởi yếu tố đến nhỏ hơn 10 sau khi ủ sơ bộ so với trước và được giải thích bởi sự giải phóng adrenomedulin hoạt tính ra khỏi các hợp chất.

Các giá trị EC₅₀ đại diện đối với các ví dụ theo phương án trước và sau khi ủ trong 24 giờ trong chất đệm được bổ sung với 2,5% huyết thanh bào thai bò được đưa ra trong Bảng 1 sau đây:

Bảng 1

Ví dụ số	EC ₅₀ T = 0 giờ [nM]	EC ₅₀ T = 24 giờ [nM]
ADM	0,5	2,5
1	110	8,4
2	> 1000	161
3	124	12,3

1b) Thử nghiệm kháng điện tích chuyển qua màng tế bào ở tế bào nội mô

Hoạt tính của các hợp chất theo sáng chế được đặc trưng trong các thử nghiệm thăm thấu *in vitro* ở tế bào tĩnh mạch rốn của người (HUVEC, Lonza). Bằng cách sử dụng thiết bị ECIS (ECIS: *Electric Cell-substrate Impedance Sensing*; Applied

Biophysics Inc; Troy, NY) các thay đổi của sức kháng điện tích chuyển màng trong (TEER) trong lớp đơn màng trong được đo một cách liên tục bằng cách sử dụng điện cực bằng vàng nhỏ mà ở đó tế bào được tạo hạt. HUVEC được phát triển trên đĩa điện cực cảm ứng 96 giếng (96W1E, Ibidi GmbH, Martinsried) để hợp dòng các lớp đơn và độ thấm quá mức có thể được cảm ứng bởi sự kích thích viêm như Thrombin, TNF- α , IL-1 β , VEGF, Histamin và hydro peroxit mà tất cả được chứng minh để gây ra sự phát vỡ các tiếp xúc tế bào nội mô và sự khử TEER. Thrombin được sử dụng ở nồng độ cuối cùng 0,5 U/ml. Bổ sung các hợp chất thử nghiệm trước và sau khi bổ sung thrombin. Trong thử nghiệm thông thường, các hợp chất được thử nghiệm ở nồng độ nằm trong khoảng từ 1×10^{-10} đến 1×10^{-6} M.

Các ví dụ theo phương án ức chế thrombin gây thấm quá mức trong thử nghiệm này ở nồng độ $\leq 10^{-6}$ M.

1c) Thử nghiệm độ thấm *In vitro* ở tế bào nội mô

Trong mô hình *in vitro* khác của độ thấm quá mức màng trong, hoạt tính của các hợp chất theo sáng chế được thử nghiệm đối với sự điều biến của độ thấm phân tử lớn. Tế bào nội mô của tĩnh mạch rốn của người (HUVECS) được phát triển để hợp dòng đối với các màng lọc Transwell® được phủ fibronectin (đĩa 24 giếng, vật lồng vào 6,5mm với 0,4 μ M màng polycarbonat; Costar #3413) mà tách phía trên ra khỏi khoang nuôi cấy mô thấp với tế bào nội mô đang phát triển ở đáy của khoang phía trên. Môi trường của khoang phía trên được bổ sung với 250 μ g/ml 40 kDa FITC-Dextran (Invitrogen, D1844). Độ thấm quá mức của lớp đơn được cảm ứng nhờ việc bổ sung thrombin vào nồng độ cuối cùng 0,5U/ml. Gôm các mẫu môi trường từ khoang phía dưới cứ hằng 30 phút và sự huỳnh quang tương đối như tham số đối với các thay đổi của độ thấm phân tử lớn theo thời gian được đo trong huỳnh quang kế thích hợp. Thử thách thrombin cảm ứng hầu hết việc nhân đôi của sự chuyển tiếp FITC-dextran ngang qua lớp đơn màng trong. Trong thử nghiệm thông thường, các hợp chất được thử nghiệm ở nồng độ nằm trong khoảng từ 1×10^{-10} đến 1×10^{-6} M.

Các ví dụ theo phương án thể hiện thrombin gây ra độ thấm quá mức trong thử

nghiệm này ở nồng độ $\leq 10^{-6}M$.

2. Mô tả thử nghiệm (*in vivo*)

2a) Đo huyết áp và nhịp tim ở chuột Wistar được đo xa, huyết áp bình thường

Các tác dụng bệnh tim mạch được cảm ứng bởi các hợp chất theo sáng chế được nghiên cứu ở chuột Wistar giống cái tỉnh táo vận động tự do (thể trọng > 200g) nhờ phép đo viễn trắc phóng xạ của huyết áp và nhịp tim. Tóm lại, hệ viễn trắc (DSI Data Science International, MN, USA) được bao gồm đối với 3 yếu tố cơ bản: vật truyền có thể ghép (TA11PA-C40), bộ thu (RA1010) và phần mềm đặt được dựa trên máy tính (Dataquest™ A.R.T. 4.1 đối với Windows). Chuột được trang bị với mô cấy áp suất đối với việc sử dụng mạn tính ít nhất 14 ngày trước các thử nghiệm. Ống thông bộ cảm biến được giữ chặt bằng 4-0 mũi khâu vài lần để tạo ra nắp 0,5cm từ đầu mít của ống thông. Trong khi cấy ống thông, gây mê chuột bằng pentobarbital (Nembutal, Sanofi: 50mg/kg i.p.). Sau khi cạo da bụng, vết rạch ở giữa bụng được tạo ra và ống thông cảm biến được làm đầy chất lỏng được xen ngược dòng vào động mạch chủ đi xuống được phơi trần giữa nhánh rẽ xương chậu và động mạch thận. Ống thông được giữ chặt vài lần ở nắp. Đầu mít của ống thông viễn trắc được định vị ngay ở đuôi đối với động mạch thận và được giữ chặt bởi chất dính bám mô. Các thể truyền được gắn vào vách màng bụng trong trước khi đóng kín bụng. Việc đóng kín hai lớp của vết rạch bụng được sử dụng, với đường nối riêng rẽ của màng bụng và vách cơ được tiếp theo bởi việc đóng kín da bên ngoài. Đối với sự bảo vệ sau phẫu thuật chống lại việc lây nhiễm và đau, liều đơn lẻ của thuốc kháng sinh (Oxytetracyclin 10% R, 5,0ml/kg s.c., beta-pharma GmbH&Co, Germany) và tiêm thuốc gây mê (Rimadyl R, 5,0ml/kg s.c., Pfizer, Germany). Cấu hình phần cứng được trang bị đối với 24 động vật. Tám lồng chuột được định vị ở phía trên của sàn nhận riêng rẽ. Sau khi hoạt hóa vật truyền được cấy, hệ đặt được dữ liệu trực tuyến, dữ liệu mẫu và chuyển hóa dữ liệu tín hiệu áp suất viễn trắc thành mm Hg. Sự tham chiếu khí áp cho phép đối với sự liên quan của áp suất tuyệt đối (so với chân không) với áp suất không khí môi trường. Phần mềm đặt được giữ liệu được xác định trước đến dữ liệu huyết động mẫu trong khoảng thời gian 10

giây cứ hằng 5 phút. Việc gom dữ liệu vào tài liệu được bắt đầu 2 giờ trước khi dùng hợp chất thử nghiệm và kết thúc sau khi kết thúc chu kỳ 24 giờ. Trong thử nghiệm thông thường, các hợp chất thử nghiệm được dùng như liều cao dưới da hoặc trong tĩnh mạch ở liều nằm trong khoảng từ 1 đến 1000 μ g/kg thể trọng (như được kể đến thành phần peptit).

Adrenomedulin kiểu hoang dại (Bachem, H-2932) gây ra sự giảm huyết áp trong thử nghiệm này với khoảng thời gian ≤ 4 giờ khi được thử nghiệm ở liều $\leq 300\mu$ g/kg thể trọng [Fig.1].

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1: khoảng thời gian 24 giờ của huyết áp động mạch trung bình (MABP) được ghi chép từ chuột Wistar giống cái huyết áp bình thường viễn trắc sau khi dùng dưới da ADM hoặc tá được dạng lỏng như được chỉ định (đường nét đứt). Các điểm dữ liệu được tạo biểu đồ như giá trị trung bình $\pm$ SEM trong khoảng thời gian trung bình 30 phút từ 4 động vật/nhóm. Một giờ sau khi dùng, các động vật được xử lý với ADM thể hiện sự giảm trung bình của MABP trong hầu hết 20% ở đỉnh (vòng tròn được làm đầy). Sau khoảng 3,5 giờ, MABP được trở lại mức đường ranh giới và nằm trong khoảng của mức của động vật được xử lý bằng tá được dạng lỏng (các vòng tròn mở).

Trong thử nghiệm này, các chất theo sáng chế gây ra sự giảm huyết áp đến 10 giờ ở liều $\leq 500\mu$ g/kg thể trọng (như được kể đến với thành phần peptit) [Fig.2].

Fig.2: khoảng thời gian 24 giờ của huyết áp động mạch trung bình (MABP) được ghi từ chuột Wistar giống cái viễn trắc sau khi dùng dưới da của ví dụ 1 hoặc tá được dạng lỏng như được chỉ định (đường nét đứt). Các điểm dữ liệu được tạo biểu đồ như giá trị trung bình $\pm$ SEM trong khoảng thời gian trung bình 30 phút từ 6 động vật/nhóm. Việc dùng của ví dụ 1 ở liều 150 μ g/kg (như được kể đến đối với thành phần peptit) làm giảm MABP bởi khoảng từ 15 đến 19% cho đến 6 giờ sau khi dùng (vòng tròn được làm đầy). Trong khoảng từ 6 giờ đến 14 giờ sau khi dùng, MABP từ từ trở lại các giá trị ranh giới và cuối cùng là nằm trong khoảng giá trị của động vật được xử lý bằng tá

được dạng lỏng.

2b) Thử nghiệm dò mạch da ở chuột Wistar

Thử nghiệm thử thách histamin trong da được dùng để đánh giá tác dụng của các hợp chất theo sáng chế đối với chức năng ngăn mạch ở động vật khỏe mạnh. Chuột Sprague Dawley giống đực (thể trọng >200g) được gây mê bằng isofluran (từ 2% đến 3% trong không khí môi trường) và cho vào vị trí nằm ngửa. Cạo lông bụng và xen ống thông vào thành mạch đùi. Chỉ có tá được dạng lỏng (0,5ml PBS + 0,1% albumin huyết thanh bò) hoặc các hợp chất thử nghiệm ở các liều thích hợp được dùng như tiêm liều cao trong tĩnh mạch. Sau 15 phút, lần tiêm thứ hai 100 μ l/kg 2% dung dịch xanh Evans (Sigma) được dùng và ngay sau đó, tiêm 100 μ l dung dịch histamin có nồng độ thích hợp (ví dụ từ 0 đến 2,5 đến 5 đến 10 đến 20 đến 40 μ g/ml) trong da vào da bụng. Màu xanh Evans là protein huyết tương ở mức cao được gắn thuốc nhuộm và do đó được sử dụng như chất chỉ thị đối với sự tràn dịch lỏng giàu protein và dò mạch. 30 phút sau quy trình này, giết chuột bằng quá liều isofluran và tiếp theo làm trật khớp cổ và cắt da bụng. Cắt nốt phỏng bằng cách sử dụng bấm sinh thiết 8mm, cân các mẫu mô và chuyển vào formamit trong 48 giờ để chiết chất màu xanh Evans. Đo các mẫu ở bước sóng 620 nM và 750 nM trên quang kế thích hợp và hàm lượng chất màu xanh Evans của mẫu được hiệu chỉnh đối với các sắc tố hem theo công thức A_{620} (được hiệu chỉnh) = $A_{620} - (1,426 \times A_{750} + 0,030)$ và được tính toán đối với đường cong tiêu chuẩn. [phương pháp được làm thích ứng từ Wang L.F., Patel M., Razavi H.M., Weicker S., Joseph M.G., McCormack D.G., Mehta S., *Am . Respir Crit Care Med*, **165**(12), 1634-9 (2002)].

Các chất theo sáng chế làm giảm sự tràn của chất lỏng huyết tương giàu protein được cảm ứng bởi thử thách histamin trong thử nghiệm này.

2c) Sự truyền dẫn trong khí quản của LPS ở chuột

Thử thách trong khí quản với lipopolysaccharit (LPS) được dùng để thử nghiệm tác dụng của hợp chất theo sáng chế đối với thương tổn phổi cấp tính. Chuột giống đực

BALB/c (trọng lượng động vật trung bình từ 20 đến 23g) được gây mê bằng isofluran (7%) và LPS từ *E. coli* (ví dụ kiểu huyết thanh 055:B5; Sigma) được dẫn truyền trong 100µl nước muối bằng cách sử dụng vi pipet. Liều thông thường của LPS được sử dụng đối với thử thách là nằm trong khoảng từ 1 đến 10mg/kg thể trọng. Ở các thời điểm khác nhau trước và sau khi truyền dẫn, các hợp chất thử nghiệm được dùng bằng đường dưới da. Liều thông thường là nằm trong khoảng từ 1 đến 300µg/kg thể trọng. Trong thử nghiệm này, các thời điểm dùng hợp chất thử nghiệm là 15 phút trước hoặc 1 giờ sau thử thách LPS. 48 giờ sau khi dẫn truyền LPS, chuột được gây mê sâu bằng isofluran và giết bằng cách làm trật khớp cổ. Sau khi đưa ống thông của dịch rửa phế quản của khoảng trống dịch rửa phế quản với 0,5ml nước muối đá lạnh được thực hiện. Phổi được tạo ra và cân trọng lượng. Tế bào trong dịch rửa phế quản (BALF) được đếm trên thiết bị đếm tế bào (Cell Dyn 3700, Abbott). Trong thử nghiệm này, trọng lượng phổi như việc đo đối với chúng phù phổi được tái tạo được tìm thấy là tăng khoảng 50% hoặc lớn hơn so với các đối chứng giả bộ 48 giờ sau thử thách LPS. Do trọng lượng phổi chỉ thể hiện độ biến thiên rất thấp trong các nhóm, trọng lượng phổi tuyệt đối được sử dụng làm tham số. Số lượng đối với tế bào máu trắng thường được tìm thấy là gia tăng một cách đáng kể so với đối chứng trong BALF sau thử thách LPS.

Việc dùng chất theo sáng chế dẫn đến trọng lượng phổi và số lượng tế bào máu trắng giảm một cách đáng kể trong BALF sau 48 giờ sau khi được dùng như liều cao đối với liều ≤ 300 µg/kg thể trọng (như được kể đến thành phần peptit).

2d) Sự gây ra tổn thương phổi cấp tính ở lợn nhỏ

Sự tổn thương phổi cấp tính được gây ra ở lợn nhỏ được gây mê bằng cách sử dụng lipopolysaccharit (LPS) hoặc axit oleic làm thử thách. Chi tiết là: lợn nhỏ giống cái Göttingen có thể trọng khoảng từ 3,5 đến 5,5 kg (Ellegaard, Denmark) được gây mê duy trì nhờ sự truyền trong tĩnh mạch liên tục Ketavet®, Dormicum® và Pancuron® sau khi dùng thuốc mê với việc tiêm trong cơ Ketavet® / Stresnil®. Sau khi lồng ống vào khí quản, các động vật được dùng oxy nhân tạo bằng cách sử dụng thiết bị hô hấp của trẻ nhỏ (Sulla 808V; Dräger, Germany) với hỗn hợp khí oxy ở thể tích thủy triều từ

30 đến 50ml và tần số cố định 25 phút⁻¹. PaCO₂ động mạch được điều chỉnh đến khoảng 40mmHg bằng cách điều hòa phân đoạn oxy được hít vào (FiO₂) qua tỷ lệ hỗn hợp khí oxy. Thông thường, các tham số bệnh tim mạch và hô hấp sau đây được đo sau khi đặt máy dò cần thiết và ống thông được khớp vào bộ chuyển đổi áp suất thích hợp và thiết bị ghi: áp suất tĩnh mạch trung tâm (qua tĩnh mạch cổ trái), huyết áp động mạch và nhịp tim (BP và HR; qua động mạch cảnh trái), áp suất tâm thất trái (LVP; bằng cách sử dụng ống thông Millar [FMI, Mod.:SPC-340S, REF: 800-2019-1, 4F] được đưa vào tâm thất trái qua động mạch cảnh phải), áp suất động mạch phổi (PAP; bằng cách sử dụng ống thông hình cầu tia X ARROW Berman [REF.: AI-07134 4 Fr. 50cm] được đặt vào động mạch phổi qua tĩnh mạch cổ trái), nhịp tim (CO) và chỉ số nước của phổi ngoài mạch (EVWLI) bằng cách sử dụng hệ PiCCO (Pulsion, Germany) được kết nối với ống thông Pulsion 4F Thermodilution (PV2014L08N) được đặt vào động mạch đùi phải. Các ống thông để đo CVP, BP, HR, LVP, và PAP được khớp vào hệ ghi chép Ponemah. Sự phân tích khí của máu động mạch được thực hiện để xác định PaO₂/FiO₂. Theo American-European Consensus Conference đối với ARDS PaO₂/FiO₂ < 300mmHg được xét đến như chỉ thị đối với sự có mặt của tổn thương phổi cấp tính. Phụ thuộc vào khoảng thời gian được áp dụng của các thử nghiệm thay đổi nằm trong khoảng từ 4 đến 5 giờ sau khi dùng thử thách gây tổn thương phổi. Ở lúc kết thúc thử nghiệm, các lợn bị giết bằng cách hút máu và gom dịch rửa phế quản (BALF) từ phổi. Hàm lượng BALF của tế bào được xác định bằng cách sử dụng thiết bị đếm tế bào máu (Cell DYN 3700).

Trong tổn thương phổi cấp tính thiết lập thông thường được cảm ứng bởi sự truyền dẫn trong khí quản của Lipopolysaccharide (LPS; *E.coli* 0111:B4; Sigma L2630) trong nước muối ở liều 5mg/kg thể trọng vào mỗi phổi qua ống khí quản. PAP và EVWLI gia tăng trong khi PaO₂/FiO₂ giảm dưới 300mmHg để đáp ứng với thử thách. Hàm lượng tế bào của BALF được gia tăng một cách đáng kể. Việc dùng hợp chất 1 của sáng chế như liều cao trong tĩnh mạch 15 phút trước thử thách LPS được cải thiện hoặc được ngăn ngừa khỏi các thay đổi do LPS gây ra.

Trong quy trình khác, axiti oleic (OA; Sigma-Aldrich, O1008) được pha loãng

bằng etanol (1:1) được truyền trong tĩnh mạch trong 15 phút ở liều cuối cùng 100mg/kg thể trọng. Thử thách với OA dẫn đến sự gia tăng của PAP và EVLWI và sự giảm $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ dưới 300mmHg. Các thay đổi được cải thiện hoặc được ngăn ngừa bằng cách dùng hợp chất 1 theo sáng chế 15 phút trước khi bắt đầu truyền OA.

Các liều của ví dụ 1 $\leq 30\mu\text{g/kg}$ thể trọng (như được kể đến là thành phần peptit) được cho là có hoạt tính trong các hệ thử nghiệm được mô tả.

C. Các phương án được đưa ra làm ví dụ của dược phẩm

Các hợp chất theo sáng chế có thể được chuyển hóa thành dược phẩm theo cách cách sau đây:

Dung dịch dùng trong tĩnh mạch:

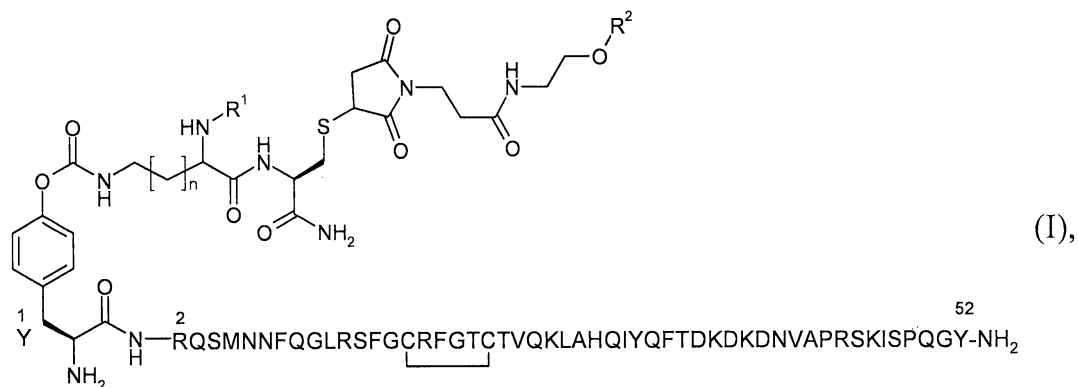
Hợp chất theo sáng chế được hòa tan ở nồng độ thấp hơn độ tan bão hòa trong dung môi chấp nhận được về mặt sinh lý (ví dụ chất đệm có độ pH từ 4 đến 7, dung dịch natri clorua đẳng trương, dung dịch glucoza 5% và/hoặc dung dịch PEG 400 30%). Dung dịch được vô trùng bằng cách lọc và nạp vào đồ chứa tiêm vô trùng và không chứa chất gây sốt.

Dung dịch dùng qua da:

Hợp chất theo sáng chế được hòa tan ở nồng độ thấp hơn độ tan bão hòa trong dung môi chấp nhận được về mặt sinh lý (ví dụ chất đệm có độ pH từ 4 đến 7, dung dịch natri clorua đẳng trương, dung dịch glucoza 5% và/hoặc dung dịch PEG 400 30%). Dung dịch được vô trùng bằng cách lọc và nạp vào đồ chứa tiêm vô trùng và không chứa chất gây sốt.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Hợp chất có công thức



trong đó:

n bằng 0, 1, 2 hoặc 3,

R¹ là hydro, metyl, etyl, n-propyl hoặc isopropyl,

R² là PEG mạch thẳng hoặc mạch nhánh từ 20kDa đến 80kDa được gắn mũ ở đầu cuối bằng nhóm metoxy,

hoặc một trong số các muối của nó, solvat của nó hoặc solvat của muối của nó.

2. Hợp chất theo điểm 1, trong đó hợp chất này được đặc trưng ở chỗ:

n bằng 1 hoặc 2,

R¹ là hydro hoặc metyl,

R² là PEG mạch thẳng 40kDa được gắn mũ ở đầu cuối bằng nhóm metoxy.

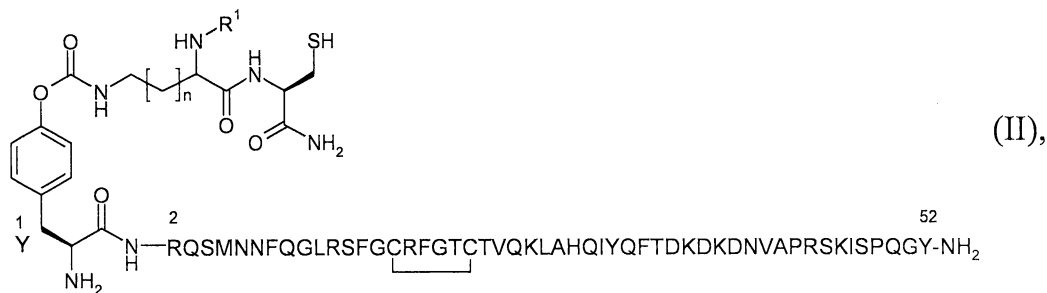
3. Hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1 và 2, trong đó hợp chất này được đặc trưng ở chỗ:

n bằng 1 hoặc 2,

R¹ là hydro,

R^2 là PEG mạch thẳng 40kDa được gắn mũ ở đầu cuối bằng nhóm metoxy.

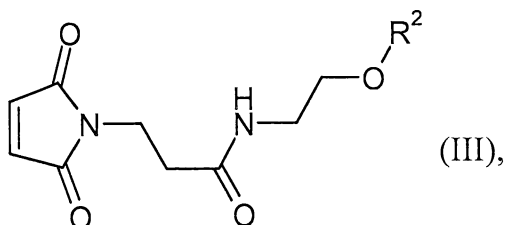
4. Quy trình điều chế hợp chất có công thức (I) hoặc một trong số các muối của chúng, solvat của chúng hoặc solvat của muối của chúng theo điểm 1, được đặc trưng ở chỗ, hợp chất có công thức (II)



trong đó:

mỗi n và R^1 là như được xác định theo điểm 1,

được cho phản ứng với hợp chất có công thức (III)



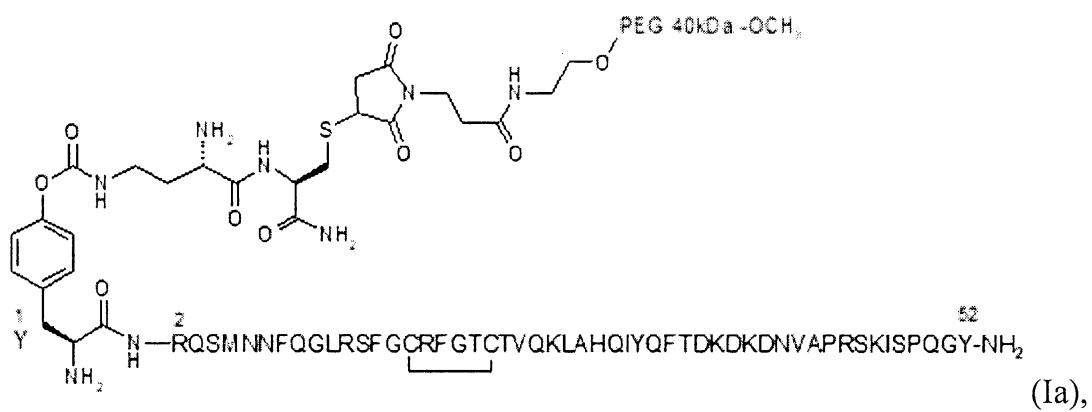
trong đó,

R^2 là như được xác định theo điểm 1.

5. Thuốc chứa hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3 kết hợp với tá dược được dụng không độc trơ.

6. Thuốc chứa hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3 kết hợp với hoạt chất khác.

7. Hợp chất có công thức (Ia):



hoặc một trong số các muối của chúng, solvat của chúng hoặc solvat của muối của chúng.

Fig.1

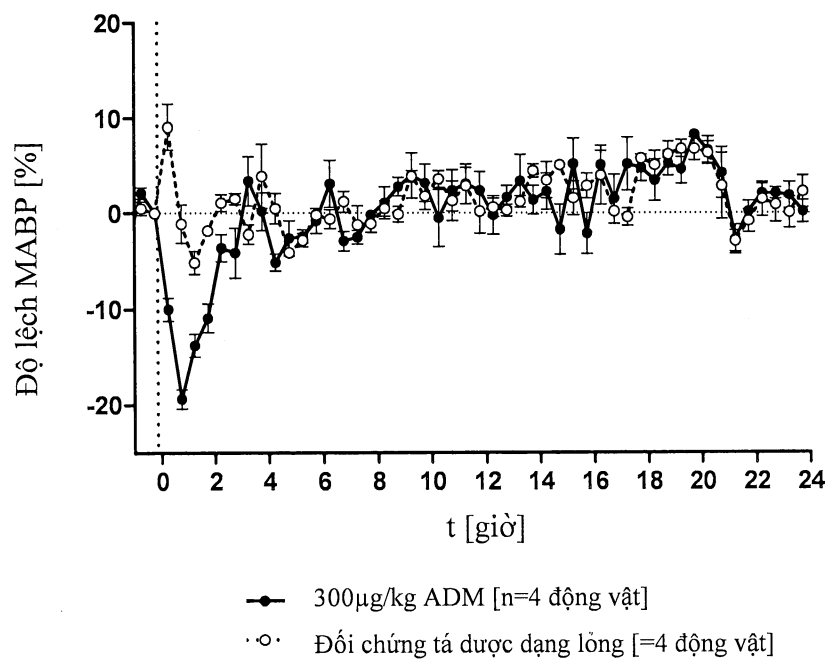


Fig.2

