



(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)



1-0025648

(51)⁷ C07K 5/117; A61P 7/02; A61K 38/07; (13) B
A61P 39/06

(21) 1-2015-03670

(22) 03/06/2014

(86) PCT/CN2014/079098 03/06/2014

(87) WO/2014/194809 A1 11/12/2014

(30) 201310225330.6 05/06/2013 CN

(45) 26/10/2020 391

(43) 25/03/2016 336A

(73) SHANGHAI LUMOSA THERAPEUTICS CO., LTD. (CN)

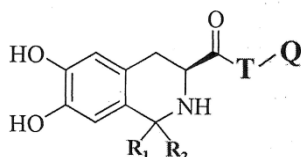
Room 3026, 3rd Floor, Building 1, No.146, 1st East Fute Road, Shanghai Pilot Free Trade Zone, Shanghai 200131, PR of China

(72) PENG, Shiqi (CN); ZHAO, Ming (CN); WU, Jianhui (CN); WANG, Yuji (CN); FENG, Qiqi (CN).

(74) Công ty TNHH Sở hữu trí tuệ VIPATCO (VIPATCO CO., LTD.)

(54) HỢP CHẤT LÀM TAN HUYẾT KHỐI, CHỐNG TẠO HUYẾT KHỐI VÀ LOẠI BỎ GỐC TỰ DO, PHƯƠNG PHÁP ĐIỀU CHẾ VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA HỢP CHẤT NÀY

(57) Sáng chế đề xuất hợp chất đồng thời có ba hoạt tính là làm tan huyết khối, tấn công huyết khối/chống huyết khối và loại bỏ gốc tự do cũng như phương pháp điều chế, dược phẩm có chứa hợp chất này và cấu trúc siêu hình cầu của hợp chất này. Hợp chất có công thức hóa học như sau:



trong đó T, Q, R₁ và R₂ được định nghĩa trong bản mô tả.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến hợp chất đồng thời làm tan huyết khối, loại bỏ gốc tự do và tấn công vào huyết khối/chống tạo huyết khối, cũng như phương pháp điều chế và mô tả việc sử dụng hợp chất này. Sáng chế còn đề xuất hợp chất hai thành phần được tạo thành bằng cách kết hợp oligopeptit làm tan huyết khối với hợp chất tetrahydroisoquinolin có hai nhóm alkyl C_{1-4} thông qua nhánh liên kết. Sáng chế cũng đề cập đến dược phẩm có chứa hợp chất này, phương pháp điều chế và cấu trúc nano của hợp chất này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Tỷ lệ mắc bệnh huyết khối như bị đột quy, nhồi máu đứng hàng đầu trong các loại bệnh. Hàng năm xu hướng ngày càng tăng lên đối với tỷ lệ mắc bệnh và bệnh này trở nên nghiêm trọng đối với sức khỏe con người. Việc điều trị bằng thuốc đối với bệnh huyết khối hiện đang là trọng tâm và là vấn đề nóng đối với việc điều trị bệnh. Hiện nay, đang có nhiều giới hạn về mặt lâm sàng trong việc sử dụng thuốc chống huyết khối, việc nghiên cứu loại thuốc mới có khả năng chống huyết khối và an toàn hơn đang được tập trung nghiên cứu.

Theo hướng nghiên cứu hiện nay, việc bổ sung các hoạt tính chống tụ tiểu huyết cầu và chống huyết khối, axit 3S-1,1-đimetyl-6,7-đihydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-3-carboxylic cũng có hoạt tính loại bỏ gốc tự do. Hơn nữa, trong sáng chế được công bố ở Trung Quốc số CN101497651B nộp ngày 30/01/2008, 10 hợp chất tetrahydroisoquinolin có hoạt tính chống huyết khối đã được bộc lộ. Các hợp chất tetrahydroisoquinolin bao gồm 3S-6,7-1,2,3,4-tetrahydro-6,7-đihydroxy-isoquinolin-3-axyl-Pro-Ala-Lys, 3S-6,7-1,2,3,4-tetrahydro-6,7-đihydroxy-isoquinolin-3-axyl-Arg-Pro-Ala-Lys, 3S-6,7-1,2,3,4-tetrahydro-6,7-đihydroxy-isoquinolin-3-axyl-Ala-Arg-Pro-Ala-Lys, 3S-6,7-1,2,3,4-tetrahydro-6,7-đihydroxy-isoquinolin-3-axyl-Gly-Arg-Pro-Ala-Lys, 3S-6,7-1,2,3,4-tetrahydro-6,7-đihydroxy-isoquinolin-3-axyl-Gln-Arg-Pro-Ala-Lys, axit 3S-2-[Pro-Ala-Lys]-1,2,3,4-tetrahydro-6,7-đihydroxy-isoquinolin-3-carboxylic, axit 3S-2-[Ala-Arg-pro-Ala-Lys]-1,2,3,4-tetrahydro-6,7-đihydroxy-isoquinolin-3-carboxylic, axit 3S-2-[Gly-Arg-Pro-Ala-Lys]-1,2,3,4-tetrahydro-6,7-đihydroxy-isoquinolin-3-carboxylic, và axit 3S-2-[Gln-Arg-Pro-Ala-Lys]-tetrahydro-6,7-đihydroxy-isoquinolin-3-carboxylic. Các hợp chất nói trên được viết tắt là "6,7-đihydroxy-isoquinolin có hoạt tính chống huyết khối". Tuy nhiên liều lượng hiệu quả của "6,7-đihydroxy-isoquinolin

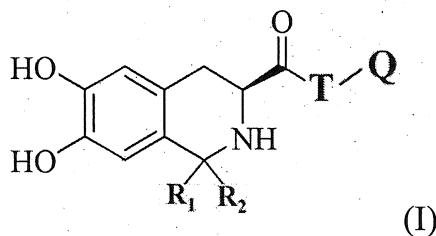
có hoạt tính làm tan huyết khối" là cao hơn, hoạt tính chống huyết khối và loại bỏ gốc tự do không được bộc lộ và kiểm chứng. Hơn nữa, tính hiệu quả trong việc điều trị bệnh đột quy đã được kiểm chứng là chỉ có hiệu quả tại thời điểm bị đột quy. Đối với việc điều trị đột quy sau 30 phút kể từ khi phát bệnh thì hiệu quả chưa được đề cập và xác nhận.

Bởi vậy, để tăng tính hiệu quả và an toàn trong việc điều trị bệnh huyết khối đối với thực tế lâm sàng, thì cần phải có một hợp chất mới đồng thời có khả năng điều trị huyết khối, chống tạo huyết khối và loại bỏ gốc tự do mà có khả năng vượt qua được hàng rào máu-não (BBB) và sử dụng với liều lượng thấp.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế đề xuất hợp chất có ba khả năng là làm tan huyết khối, chống tạo huyết khối và loại bỏ gốc tự do để khắc phục những nhược điểm của các loại thuốc điều trị huyết khối đã biết, phương pháp điều chế và dược phẩm chứa hợp chất này.

Để đạt được mục đích trên đây, theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (I):



trong đó T là nhánh liên kết có ít nhất hai nhóm liên kết, Q là peptit có hoạt tính làm tan huyết khối, R_1 và R_2 là các nhóm alkyl C_{1-4} , trong đó R_1 và R_2 có thể giống hoặc khác nhau.

Theo phương án khác của sáng chế, ít nhất một trong các nhóm để liên kết với nhánh liên kết T là nhóm amino và các nhóm còn lại để liên kết là nhóm carboxy hoặc nhóm amino.

Theo phương án ưu tiên của sáng chế, nhánh liên kết T có thể là amino axit tự nhiên như L-Lys, L-Asp hoặc L-Glu.

Theo phương án ưu tiên khác của sáng chế, peptit có hoạt tính làm tan huyết khối được sử dụng trong sáng chế này được chọn từ nhóm bao gồm oligopeptit có chuỗi PA (Pro-Ala), chuỗi PAK (Pro-Ala-Lys), chuỗi AKP (Ala-Lys-Pro) hoặc chuỗi KAP (Lys-Ala-Pro), hoặc peptit bao gồm các đơn vị lặp lại của chuỗi PAK, chuỗi AKP hoặc chuỗi KAP.

Theo phương án của sáng chế, oligopeptit có hoạt động làm tan huyết khối có thể là tripeptit (ba peptit) tới octapeptit (tám peptit) có chứa chuỗi PA (Pro-Ala), chuỗi

PAK, chuỗi AKP hoặc chuỗi KAP, tốt hơn là tripeptit có chứa chuỗi PA. Theo phương án ưu tiên hơn, tripeptit có công thức hóa học theo (Q1) hoặc (Q2) như dưới đây:

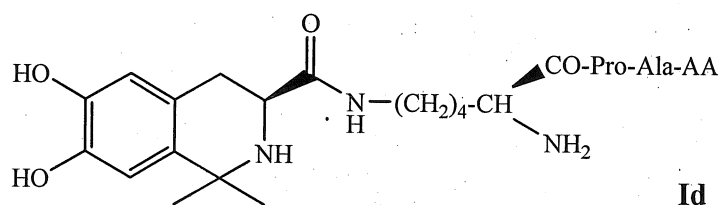
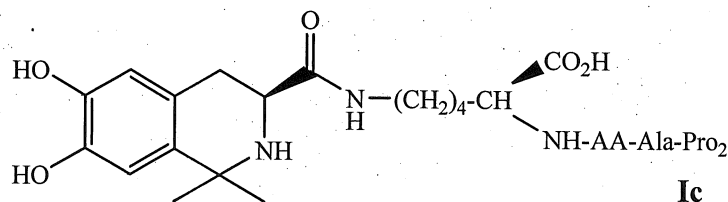
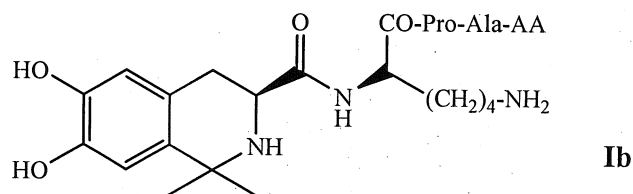
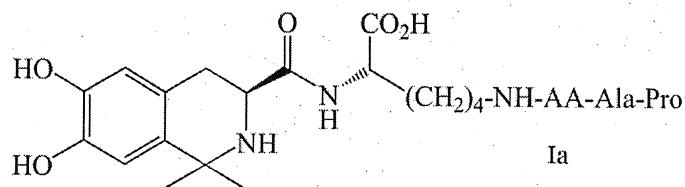
Pro-Ala-AA (Q1)

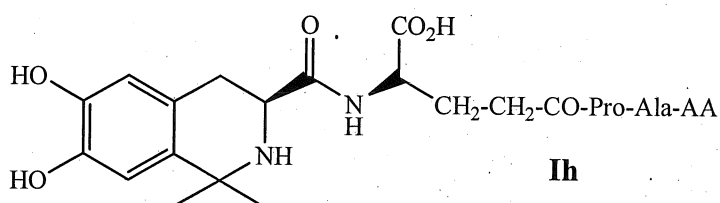
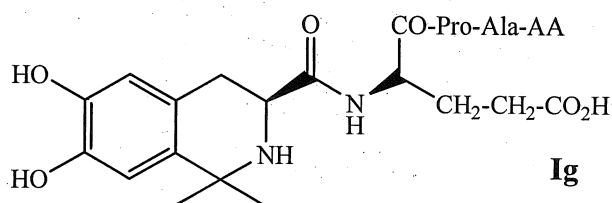
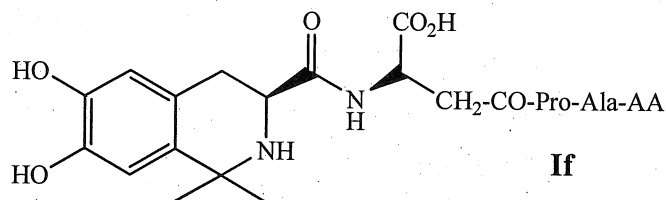
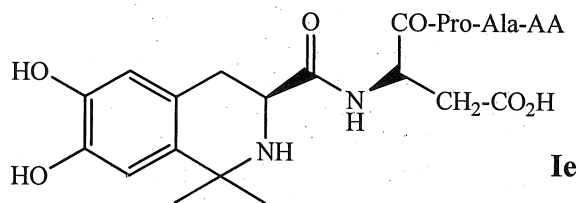
AA-Ala-Pro (Q2)

trong đó AA được chọn từ nhóm có chứa L-Ala, L-Val, L-Trp, L-Tyr, L-Pro, L-Phe, Gly, L-Ser, L-Ile, L-Thr, L-Lys, L-Leu, L-Gln, L-Asn, L-Asp và L-Glu.

Theo phương án ưu tiên của sáng chế, R_1 và R_2 đều là nhóm methyl.

Theo phương án ưu tiên, R_1 và R_2 của công thức (I) là các nhóm methyl, nhánh liên kết là L-Lys, L-Asp hoặc L-Glu, và peptit có hoạt tính làm tan huyết khối là tripeptit có chứa chuỗi PA (Pro-Ala). Ví dụ, hợp chất có công thức (Ia) giống như hợp chất 5Aa-p ở Hình 1, (Ib) giống như hợp chất 5Ba-p ở Hình 2, (Ic) giống như hợp chất 5Ca-p ở Hình 3, (Id) giống như hợp chất 5Da-p ở Hình 4, (Ie) giống như hợp chất 5Ea-p ở Hình 5, (If) giống như hợp chất 5Fa-p ở Hình 6, (Ig) giống như hợp chất 5Ga-p ở Hình 7 hoặc (Ih) giống như hợp chất 5Ha-p ở Hình 8.





trong đó AA được chọn từ nhóm có chứa L-Ala, L-Val, L-Trp, L-Tyr, L-Pro, L-Phe, Gly, L-Ser, L-Ile, L-Thr, L-Lys, L-Leu, L-Gln, L-Asn, L-Asp, và L-Glu.

Theo khía cạnh thứ hai, sáng chế đề xuất được phẩm có chứa thành phần hợp chất được mô tả trên đây và chất mang dược.

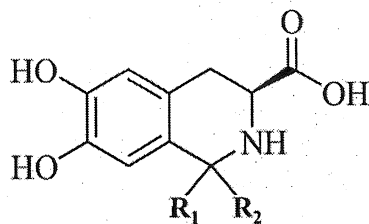
Theo phương án ưu tiên của sáng chế, các hợp chất ở dạng cấu trúc siêu hình cầu (nanospherical).

Theo phương án ưu tiên của sáng chế, dược phẩm có thể được sử dụng làm thuốc làm tan huyết khối, thuốc loại bỏ gốc tự do NO hoặc thuốc chống huyết khối/tán công huyết khối.

Theo phương án ưu tiên khác của sáng chế, dược phẩm có thể được sử dụng làm thuốc trong điều trị đột quỵ hoặc nhồi máu não, tốt hơn là sử dụng trong điều trị đột quỵ hoặc nhồi máu não trên 4 giờ, 6 giờ và 24 giờ kể từ khi khởi phát hội chứng và điều trị thông qua việc giám sát tiếp theo.

Theo khía cạnh thứ ba, sáng chế đề xuất phương pháp điều chế hợp chất có công thức (I). Phương pháp này bao gồm các bước sau:

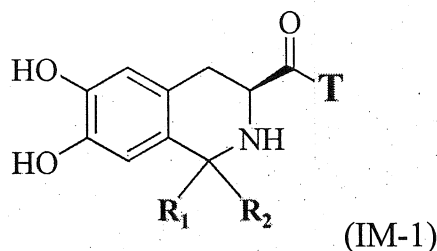
(1) tạo ra hợp chất có công thức (II):



trong đó R_1 và R_2 là các nhóm alkyl C_{1-4} , R_1 và R_2 có thể giống hoặc khác nhau.

(2) tạo ra nhánh liên kết T có ít nhất hai nhóm để liên kết và peptit Q có hoạt tính làm tan huyết khối, trong đó nhánh liên kết có nhóm thứ nhất để liên kết và nhóm thứ hai để liên kết.

(3) ghép nối nhóm carboxy của hợp chất có công thức (II) với nhóm thứ nhất để liên kết với nhánh liên kết T tạo ra hợp chất có công thức (IM-1):



ở điều kiện phản ứng thích hợp; và

(4) ghép peptit Q có hoạt tính làm tan huyết khối với hợp chất có công thức (IM-1) ở điều kiện phản ứng thích hợp, trong đó một đầu của peptit Q có hoạt tính làm tan huyết khối được ghép vào nhóm thứ hai để liên kết với nhánh liên kết T tạo thành hợp chất có công thức (I).

Theo một phương án của sáng chế, nhóm thứ nhất để liên kết với nhánh liên kết T là nhóm amino đang được sử dụng để ghép với nhóm carboxy của hợp chất trong công thức (II) ở phản ứng ngưng kết. Hơn nữa, nhóm thứ hai để liên kết là nhóm carboxy hoặc nhóm amino đang được dùng để ghép với đầu N hoặc đầu C của peptit Q có hoạt tính làm tan huyết khối. Định nghĩa về nhánh liên kết T và peptit Q có hoạt tính làm tan huyết khối được sử dụng trong phương pháp điều chế của sáng chế giống với định nghĩa về hợp chất có công thức (I) nói trên.

Trong phương án ưu tiên của sáng chế, nhánh liên kết trong phương pháp điều chế này có thể là L-Lys, L-Asp hoặc L-Glu và tốt nhất là L-Lys. Peptit có hoạt tính làm tan huyết khối có thể là tripeptit có chứa chuỗi PA (Pro-Ala), một oligopeptit có chứa chuỗi PAK (Pro-Ala-Lys), chuỗi AKP (Ala-Lys-Pro) hoặc chuỗi KAP (Lys-Ala-Pro), hoặc peptit có chuỗi lặp lại có chứa chuỗi PAK, chuỗi AKP hoặc chuỗi KAP, và tốt nhất là tripeptit có công thức (Q1) hoặc (Q2) như dưới đây:

Pro-Ala-AA (Q1)

AA-Ala-Pro (Q2)

trong đó AA được chọn từ nhóm bao gồm chứa L-Ala, L-Val, L-Trp, L-Tyr, L-Pro, L-Phe, Gly, L-Ser, L-Ile, L-Thr, L-Lys, L-Leu, L-Gln, L-Asn, L-Asp và L-Glu.

Theo một phương án khác của sáng chế, R₁ và R₂ của hợp chất có công thức (II) đều là các nhóm methyl, nhánh liên kết là L-Lys, L-Asp hoặc L-Glu, và peptit có hoạt tính làm tan huyết khối là tripeptit có chứa chuỗi PA (Pro-Ala). Trong phương án ưu tiên, phương pháp điều chế trong sáng chế được sử dụng để tạo ra các hợp chất có các công thức từ (Ia) đến (Ih) nói trên.

Trong các thử nghiệm trên chuột trong phòng thí nghiệm cho thấy rằng các hợp chất của sáng chế hoặc được phẩm có chứa hợp chất này có các hoạt tính vượt trội trong việc làm tan huyết khối và chống huyết khối ở liều lượng thấp và có hiệu quả bảo vệ chức năng thần kinh của những con chuột bị đột quỵ, điều này cho thấy tính hiệu quả và an toàn cho điều trị bệnh huyết khối trong thử nghiệm lâm sàng.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 là sơ đồ tổng hợp hợp chất (Ia) theo một phương án của sáng chế.

Hình 2 là sơ đồ tổng hợp hợp chất (Ib) theo một phương án của sáng chế.

Hình 3 là sơ đồ tổng hợp hợp chất (Ic) theo một phương án của sáng chế.

Hình 4 là sơ đồ tổng hợp hợp chất (Id) theo một phương án của sáng chế.

Hình 5 là sơ đồ tổng hợp hợp chất (Ie) theo một phương án của sáng chế.

Hình 6 là sơ đồ tổng hợp hợp chất (If) theo một phương án của sáng chế.

Hình 7 là sơ đồ tổng hợp hợp chất (Ig) theo một phương án của sáng chế.

Hình 8 là sơ đồ tổng hợp hợp chất (Ih) theo một phương án của sáng chế.

Hình 9 thể hiện hình ảnh TEM cấu trúc nano của hợp chất 5Aa-p theo một phương án của sáng chế.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế được mô tả chi tiết cùng với hình vẽ và phương án được sử dụng để minh họa giải pháp kỹ thuật. Tuy nhiên phạm vi của sáng chế không bị hạn chế bởi các phương án này.

Trong sáng chế, các hợp chất tetrahydroisoquinolin có hai nhóm alkyl C₁₋₄ (thực tế là hợp chất có công thức II) và peptit có hoạt tính làm tan huyết khối được ghép với một nhánh liên kết để tạo ra liên hợp có hai thành phần đồng thời có ba chức năng làm tan huyết khối, loại bỏ gốc tự do và chống huyết khối/tán công huyết khối. Liên hợp nói trên được gọi tắt là "liên hợp hai thành phần trong sáng chế".

Do các nhóm alkyl C_{1-4} được dẫn vào vị trí 1 và một nhánh liên kết được dẫn vào vị trí 3 của hợp chất có công thức (II), "liên hợp hai thành phần của sáng chế" có bốn ưu điểm như sau, so với "6,7-dihydroxyisoquinolin có hoạt tính làm tan huyết khối".

1) Hiệu quả ngăn cản bố trí trong không gian của hai nhóm alkyl C_{1-4} được dẫn vào vị trí 1 của hợp chất có công thức (II) có thể ngăn chặn việc tiếp cận carboxypeptidaza và aminopeptidaza, do đó oligopeptit làm tan huyết khối của "liên hợp hai thành phần của sáng chế" không dễ để thủy phân.

2) Khả năng kỵ nước của hai nhóm alkyl C_{1-4} được dẫn vào vị trí 1 của hợp chất có công thức (II) cho phép "liên hợp hai thành phần của sáng chế" vượt qua hàng rào máu-não với hiệu quả cao hơn.

3) Hiệu ứng nhường điện tử của hai nhóm alkyl C_{1-4} được dẫn vào vị trí 1 của hợp chất có công thức (II) cho phép làm giảm khả năng của "liên hợp hai thành phần của sáng chế" để đáp ứng nhu cầu loại bỏ gốc tự do.

4) Nhánh liên kết được dẫn vào vị trí 3 của hợp chất có công thức (II) cho phép "liên hợp hai thành phần của sáng chế" tổng hợp hiệu quả với nhau nhằm tạo thành các cấu trúc siêu hình cầu có đường kính từ 20-210 nm, tốt nhất là nằm trong khoảng 20-100 nm. Cấu trúc siêu hình cầu này ổn định sẽ hỗ trợ "liên hợp hai thành phần của sáng chế" không bị nhấn chìm bởi đại thực bào trong vòng tuần hoàn máu, do vậy được vận chuyển an toàn tới thẳng vị trí hình thành huyết khối và cuối cùng vượt qua hàng rào máu-não. Nói chung là "liên hợp hai thành phần của sáng chế" tạo thành cấu trúc siêu hình cầu có được chức năng vượt qua hàng rào máu-não. Hơn nữa ngoài chức năng làm tan huyết khối và chống tạo huyết khối, thì "liên hợp hai thành phần của sáng chế" cũng có hiệu quả trong việc loại bỏ gốc tự do OH, NO và các anion peroxit, và đạt được hiệu quả làm tan huyết khối ở liều lượng thấp, do đó cho hiệu quả tốt trong ứng dụng lâm sàng.

Ở đây khi sử dụng cụm từ "nhóm để liên kết" có nghĩa là nhóm chức năng như nhóm carboxy hoặc nhóm amino có khả năng thực hiện phản ứng ngưng kết.

Cụm từ "nhánh liên kết" có nghĩa là phân tử có các nhóm để liên kết, có khả năng ghép hợp chất có công thức (II) với oligopeptit Q có hoạt tính làm tan huyết khối. Ít nhất nhóm để liên kết thuộc nhánh liên kết là nhóm amino và các nhóm còn lại để liên kết là các nhóm carboxy hoặc nhóm amino. Theo sáng chế này, nhánh liên kết có thể là amino axit tự nhiên như L-Lys, L-Asp hoặc L-Glu.

Nhánh liên kết được dẫn vào cho phép "liên hợp hai thành phần của sáng chế" tạo thành cấu trúc siêu hình cầu ổn định mà không bị nhấn chìm bởi các đại thực bào. Cấu trúc siêu hình cầu được vận chuyển an toàn thẳng tới vị trí hình thành huyết khối và cuối cùng vượt qua được hàng rào máu-não. Cụ thể khi nhánh liên kết là L-Lys, thì "liên

hợp hai thành phần của sáng chế" được tổng hợp hiệu quả với nhau để tạo thành các cấu trúc siêu hình cầu có đường kính từ 20-210 nm, tốt nhất là nằm trong khoảng 20-100 nm. Cấu trúc siêu hình cầu ổn định hỗ trợ "liên hợp hai thành phần của sáng chế" không bị nhân chìm bởi các đại thực bào trong vòng tuần hoàn máu, do đó cho phép nó được vận chuyển an toàn thẳng tới vị trí hình thành huyết khối và cuối cùng vượt qua được hàng rào máu-não.

Ở đây có sử dụng "oligopeptit" nghĩa là phân tử peptit nhỏ có phân tử lượng dưới 1.000 Dalton (D) và thường bao gồm từ 3 đến 8 amino axit.

Cụm từ "peptit có hoạt tính làm tan huyết khối" nghĩa là tác nhân làm tan huyết khối oligopeptit có chức năng làm tăng khả năng thâm qua thành mạch máu và làm tan huyết khối, bao gồm P6A (ARPAK), chất chuyển hóa của P6A và các dẫn xuất liên quan. Một nghiên cứu trước đây đã cho biết rằng Pro-Ala-Lys là chuỗi ngắn có hoạt tính tốt và là chuỗi ổn định nhất trong một số các oligopeptit làm tan huyết khối, bao gồm Ala-Arg-Pro-Ala-Lys, Gly-Arg-Pro-Ala-Lys, Gln-Arg-Arg-Pro-Ala-Lys và Pro-Ala-Lys. Dẫn một tripeptit có chuỗi Pro-Ala-AA vào vị trí 3 của hợp chất có công thức (II) thông qua nhánh liên kết cho phép "liên hợp hai thành phần của sáng chế" có khả năng ổn định tốt hơn và hoạt tính làm tan huyết khối mạnh nhất.

Ví dụ, một oligopeptit có chứa chuỗi PAK, AKP hoặc KAP được sử dụng trong sáng chế này có thể là PAK, RPAK(Arg-Pro-Ala-Lys), ARPAK(Ala-Arg-Pro-Ala-Lys), GRPAK (Gly-Arg-Pro-Ala-Lys), QRPAK (Gln-Arg-Pro-Ala-Lys), AKP, KAP, KPAK (Lys-Pro-Ala-Lys), PAKP (Pro-Ala-Lys-Pro), AKPAK (Ala-Lys-Pro-Ala-Lys) hoặc PAKPA (Pro-Ala-Lys-Pro-Ala).

Ví dụ, peptit có các đơn vị lặp lại của chuỗi PAK, chuỗi AKP hoặc chuỗi KAP được sử dụng trong sáng chế có thể là bất kỳ peptit nào được mô tả trong sáng chế Trung Quốc số CN101190941 làm peptit có hoạt tính làm tan huyết khối, bao gồm peptit có các đơn vị lặp lại của chuỗi PAK như là (PAK)₂, (PAK)₃, (PAK)₄, (PAK)₅ và (PAK)₆; peptit có các đơn vị lặp lại của chuỗi AKP như là (AKP)₂, (AKP)₃, (AKP)₄, (AKP)₅ and (AKP)₆ và peptit có các đơn vị lặp lại của chuỗi KPA như là (KPA)₂, (KPA)₃, (KPA)₄, (KPA)₅ và (KPA)₆.

Ở đây sử dụng cụm từ "nhóm alkyl C₁₋₄" nghĩa là nhóm alkyl có từ 1-4 nguyên tử cacbon, như là metyl, etyl, n-propyl, isopropyl, butyl, isobutyl hoặc sec-butyl, tert-butyl. Trong đó R₁ và R₂ của hợp chất có công thức (I) cùng là các nhóm metyl, hợp chất có công thức (II), được sử dụng như là nguyên liệu ban đầu, có thể thu được bằng phương pháp Pictet-Spengler ngưng kết 3,4-đihydroxy-L-phenylalanin và axeton với sự hiện diện của trifloroaxetat (TFA) và magie sunphat khan. Ưu điểm là dễ dàng điều chế hơn.

Trong phương án của sáng chế, dược phẩm có thể là bất cứ dạng ổn định và chấp nhận được về mặt lâm sàng. Tốt nhất là ở dạng tiêm được (dạng bột dùng để tiêm, dạng bột đông khô dùng để tiêm, dạng dung dịch dùng để tiêm, dạng thuốc tiêm, v.v.). Chất mang được có thể là manitol, nước, dung dịch các muối hòa tan hoặc dung dịch natri clorua đẳng trương, v.v.

Cấu trúc siêu hình cầu của hợp chất theo sáng chế này có đường kính trong khoảng 20-210 nm, tốt hơn là trong khoảng 20-100 nm, qua đó hợp chất này có thể đi qua hàng rào máu-não một cách hiệu quả.

Cấu trúc siêu hình cầu sẽ hỗ trợ hợp chất của sáng chế không bị nhấn chìm bởi các đại thực bào, qua đó hợp chất được vận chuyển an toàn thẳng tới vị trí hình thành huyết khối và đi qua được hàng rào máu-não. Dược phẩm theo sáng chế này có thể được sử dụng làm thuốc làm tan huyết khối trong việc điều trị nhồi máu cơ tim, đột quỵ thiếu máu, huyết khối tĩnh mạch sâu, nghẽn mạch phổi, tắc động mạch ngoại biên, tắc thiết bị truy cập tĩnh mạch trung ương, vón cục tại điểm nối động mạch-tĩnh mạch với nhánh rẽ, hẹp động mạch cảnh, v.v. Dược phẩm theo sáng chế này cũng được sử dụng làm thuốc loại bỏ gốc tự do NO trong điều trị các bệnh thoái hóa thần kinh, các bệnh về tim mạch, bệnh tâm thần, say độ cao, bệnh tiểu đường, viêm khớp dạng thấp, chấn thương sọ não, ung thư, hội chứng X mong manh, bệnh tế bào hình liềm, liken phẳng, bạch biến, hội chứng mệt mỏi mãn tính, v.v. Dược phẩm theo sáng chế cũng được dùng làm thuốc tấn công huyết khối/chống huyết khối trong điều trị tăng tiểu cầu, bệnh tăng sinh tủy xương, vera đa hồng cầu, hội chứng Budd-Chiari, v.v.

Dược phẩm/hợp chất theo sáng chế này đồng thời có OH, NO và chức năng loại bỏ gốc tự do anion superoxit, làm tan huyết khối cũng như tấn công huyết khối/chống huyết khối. Do vậy có hiệu quả điều trị cho những bệnh nhân sau 4 giờ kể từ khi khởi phát đột quỵ, thực chất là được sử dụng không giới hạn bởi thời gian cửa sổ 3 giờ của tPA. Hơn nữa, việc sử dụng dược phẩm/hợp chất theo sáng chế này sẽ không gây hiện tượng chảy máu toàn thân như tPA và các anion superoxit trong quá trình thiếu máu cục bộ-tái tưới máu để ngăn chặn phá hủy mô não đối với những bệnh nhân được điều trị. Do các hai nhóm alkyl C₁₋₄ và nhánh liên kết được dẫn vào tương ứng ở vị trí 1 và vị trí 3 của hợp chất có công thức (II), so sánh với "6,7-đihydroxyisoquinolin có hoạt tính làm tan huyết khối", thì "liên hợp hai thành phần của sáng chế" cho thấy hoạt tính làm tan huyết khối tốt hơn, có hoạt tính loại bỏ gốc tự do và làm tan huyết khối duy nhất ở liều lượng thấp, cũng như có hiệu quả điều trị vượt trội trong việc điều trị đột quỵ sau 4 giờ kể từ khi khởi phát đột quỵ với liều lượng cao hơn.

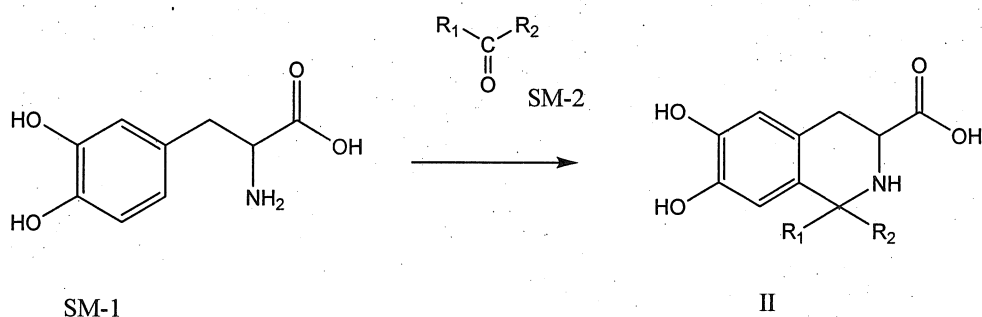
Trong sáng chế được công bố ở Trung Quốc số CN101497651B "6,7-đihydroxyisoquinolin có hoạt tính làm tan huyết khối" đã cho thấy có hoạt tính làm tan

huyết khối ở liều 10 nmol/kg. Tuy nhiên hợp chất của sáng chế có hoạt tính làm tan huyết khối và chống huyết khối tốt ở liều lượng 0,1 nmol/kg. Hơn nữa, hợp chất theo sáng chế có hiệu quả điều trị quan trọng trong điều trị sau 4, 6 và 24 giờ kể từ khi khởi phát đột quy ở liều 1 $\mu\text{mol/kg}$, 2,5 $\mu\text{mol/kg}$ và 5 $\mu\text{mol/kg}$ tương ứng.

Trong phương pháp điều chế hợp chất của sáng chế, peptit Q có hoạt tính làm tan huyết khối được điều chế trước và sau đó ghép với nhóm thứ hai để liên kết với nhánh liên kết T, hay bằng cách khác, một hoặc nhiều amino axit của peptit Q có hoạt tính làm tan huyết khối được ghép trình tự với nhánh liên kết T theo một thứ tự xác định trước. Ví dụ, amino axit thứ nhất tại một đầu của peptit làm tan huyết khối Q được ghép với nhóm thứ hai để liên kết với nhánh liên kết T, và một hoặc nhiều amino axit còn lại sau đó được ghép lần lượt với nó.

Phương pháp điều chế hợp chất theo sáng chế này được mô tả chi tiết như dưới đây.

Hợp chất có công thức (II) được điều chế bằng quy trình tổng hợp:



trong đó R_1 và R_2 là nhóm alkyl C_{1-4} và có thể cùng giống nhau hoặc khác nhau. Ví dụ như 3,4 đihydroxy-L-phenylalamin (SM-1) và hợp chất SM-2 được hòa tan trong TFA, và 3,4 đihydroxy-L-phenylalamin và SM-2 trải qua quá trình ngưng kết Pictet-Spengler để có được hợp chất với công thức (II) với sự hiện diện của magiê sunphat khan.

Trong phương án ưu tiên, nhánh liên kết trong phương pháp điều chế của sáng chế là L-Lys và peptit có hoạt tính làm tan huyết khối là tripeptit có chuỗi PA (Pro-Ala). Ví dụ, nhóm carboxy của hợp chất có công thức (II) được ghép với đầu N của L-Lys, sau đó tripeptit có chứa chuỗi PA được ghép với đầu N còn lại hoặc đầu C của nhánh liên kết L-Lys. Trong một số phương án, khi R_1 và R_2 cùng là nhóm methyl (thực tế là axit 3S-6,7-đihydroxy-1,1-đimetyl-1,2,3,4-tetrahydro-isoquinolin-3-axyl-carboxylic), thì nhánh liên kết là L-Lys, và peptit có hoạt tính làm tan huyết khối là tripeptit có chứa chuỗi PA (Pro-Ala), hợp chất Ia, Ib, Ic hoặc Id có thể thu được theo phương pháp điều chế của sáng chế này.

Khi điều chế hợp chất Ia theo phương pháp điều chế của sáng chế, thì quy trình tổng hợp được thể hiện trên Hình 1.

Trong phương án ở Hình 1, tripeptit có chứa chuỗi PA được tổng hợp trước và sau đó được ghép với nhánh liên kết L-Lys, trong đó AA được chọn từ L-Ala, L-Val, L-Trp, L-Tyr, L-Pro, L-Phe, Gly, L-Ser, L-Ile, L-Thr, L-Lys, L-Leu, L-Gln, L-Asn, L-Asp, và L-Glu còn lại (lần lượt tương ứng với các hợp chất 5Aa-p). Các điều kiện phản ứng được liệt kê theo đây: i) Axeton, TFA, MgSO₄; ii) HCl, Lys(Boc)-OBzl, DCC, HOBt, NMM; iii) 4M HCl/EA, bồn đá; iv) DCC, HOBt, NMM, v) EtOH, Pd/C; 4M HCl/EA, bồn đá; vi) EtOH, Pd/C; vii) 2M NaOH. Trong phương án khác, một amino axit của peptit có chứa chuỗi PA (như là AA) được ghép với nhánh liên kết L-Lys và hai amino axit còn lại (như là Pro-Ala) của tripeptit có chứa chuỗi PA sau đó được ghép với AA.

Ví dụ, trong phương án điều chế hợp chất Ia, phương pháp điều chế theo sáng chế bao gồm các bước sau:

1) Ngưng kết 3,4 dihydroxy-L-phenylalamin và axeton bằng phương pháp Pictet-Spengler với TFA và magiê sunphat khan để thu được axit 3S-6,7-dihydroxy-1,1-dimetyl-1,2,3,4-tetrahydro-isoquinolin-3-axyl-carboxylic.

2) Cho dicyclohexyl cacbodimin (DCC) và N-hydroxybenzotriazol triazol (HOBt), axit 3S-6,7-dihydroxy-1,1-dimetyl-1,2,3,4-tetrahydro-isoquinolin-3-axyl-carboxylic và HCl•Lys(Boc)-OBzl đã ngưng kết, phản ứng với N,N-dimethylfocmamin (DMF), để tạo ra 3S-6,7-dihydroxy-1,1-dimetyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-3-axyl-Lys(Boc)-Obzl. Ở phản ứng ngưng kết, N-metylmocpholin (NMM) được sử dụng để điều chỉnh ổn định hỗn hợp có pH=9.

3) Loại bỏ Boc từ 3S-6,7-dihydroxy-1,1-dimetyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-3-axyl-Lys(Boc)-Obzl trong dung dịch etyl axetat của HCL để thu được 3S-6,7-dihydroxy-1,1-dimetyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-3-axyl-Lys-Obzl.

4) Cho DCC và HOBt, Boc-Pro được ngưng kết với Tos•Ala-Obzl phản ứng với THF khan để tạo thành Boc-Pro-Ala-OBzl.

5) Trong EtOH, Boc-Pro-Ala-OBzl đã được thủy phân để tạo thành Boc-Pro-Ala.

6) Cho DCC và HOBt, Boc-Pro-Ala đã ngưng kết với AA-Obzl, phản ứng với THF khan, để tạo thành Boc-Pro-Ala-AA-OBzl (AA được chọn từ L-Ala, Gly, L-Phe, L-Val, L-Leu, L-Ile, L-Trp, L-Ser, L-Thr, L-Tyr, L-Lys(Z), L-Pro, L-Asn và L-Gln còn lại).

7) Thủy phân Boc-Pro-Ala-AA-OBzl thu được ở bước 6 trong EtOH, để tạo thành Boc-Pro-Ala-AA.

8) Cho DCC và HOBt, 3S-6,7-dihydroxy-1,1-dimetyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-3-axyl-Lys-Obzl đã được ngưng kết với Boc-Pro-Ala-AA ở bước 6, phản ứng với DFM khan, để tạo thành 3S-6,7-dihydroxy-1,1-dimetyl-1,2,3,4-

tetrahydroisoquinolin-3-axyl-Lys(Boc-Pro-Ala-AA)-Obzl (AA được định nghĩa giống ở bước 6).

9) Cho DCC và HOBt, 3S-6,7-dihydroxy-1,1-dimetyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-3-axyl-Lys-Obzl đã ngưng kết với Boc-AA(Obzl), phản ứng với DFM khan, để tạo thành 3S-6,7-dihydroxy-1,1-dimetyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-3-axyl-Lys[Boc-AA(Obzl)]-Obzl (AA được chọn từ L-Asp, L-Glu còn lại).

10) Loại bỏ Boc khỏi 3S-6,7-dihydroxy-1,1-dimetyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-3-axyl-Lys[Boc-AA(Obzl)]-Obzl trong dung dịch etyl axeton của HCL, để tạo thành 3S-6,7-dihydroxy-1,1-dimetyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-3-axyl-Lys[AA(Obzl)]-Obzl (AA được định nghĩa giống ở bước 9).

11) Cho DCC và HOBt, 3S-6,7-dihydroxy-1,1-dimetyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-3-axyl-Lys[AA(Obzl)]-Obzl đã ngưng kết với Boc-Pro-Ala, phản ứng với DFM khan, để tạo thành 3S-6,7-dihydroxy-1,1-dimetyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-3-axyl-Lys[Boc-Pro-Ala-AA(Obzl)]-Obzl (AA được định nghĩa như ở bước 9).

12) Sau khi thủy phân và loại bỏ Boc, cả 3S-6,7-dihydroxy-1,1-dimetyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-3-axyl-Lys(Boc-Pro-Ala-AA)-Obzl (AA được định nghĩa giống ở bước 6) và 3S-6,7-dihydroxy-1,1-dimetyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-3-axyl-Lys[Boc-Pro-Ala-AA(Obzl)]-Obzl (AA được định nghĩa giống ở bước 9) không còn được bảo vệ để thu được 3S-6,7-dihydroxy-1,1-dimetyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-3-axyl-Lys(pro-Ala-AA).

Khi điều chế hợp chất Ib theo phương pháp điều chế của sáng chế, thì quy trình tổng hợp thể hiện trên Hình 2, trong đó AA được chọn từ L-Ala, L-Val, L-Trp, L-Tyr, L-Pro, L-Phe, Gly, L-Ser, L-Ile, L-Thr, L-Lys, L-Leu, L-Gln, L-Asn, L-Asp và L-Glu còn lại (lần lượt tương ứng với các hợp chất 5Ba-p). Điều kiện phản ứng được liệt kê như sau: i) Axeton, TFA, MgSO₄; ii) HCl, Lys(Boc)-OBzl, DCC, HOBt, NMM; iii) EtOH, Pd/C; iv) DCC, HOBt, NMM, v) EtOH, Pd/C; 4M HCl/EA, bồn đá; vi) EtOH, Pd/C; vii) 4M HCl/EA, bồn đá.

Khi điều chế hợp chất Ic theo phương pháp điều chế của sáng chế, thì quy trình tổng hợp thể hiện trên Hình 3, trong đó AA được chọn từ L-Ala, L-Val, L-Trp, L-Tyr, L-Pro, L-Phe, Gly, L-Ser, L-Ile, L-Thr, L-Lys, L-Leu, L-Gln, L-Asn, L-Asp và L-Glu còn lại (lần lượt tương ứng với 5Ca-p). Các điều kiện phản ứng được liệt kê như sau: i) Axeton, TFA, MgSO₄; ii) HCl, Boc-Lys-OBzl, DCC, HOBt, NMM; iii) 4M HCl/EA, bồn đá; iv) DCC, HOBt, NMM, v) EtOH, Pd/C; 4M HCl/EA, bồn đá; vi) EtOH, Pd/C; vii) EtOH, Pd/C.

Khi điều chế hợp chất Id theo phương pháp điều chế của sáng chế, quy trình tổng hợp thể hiện trên Hình 4, trong đó AA được chọn từ L-Ala, L-Val, L-Trp, L-Tyr, L-Pro, L-Phe, Gly, L-Ser, L-Ile, L-Thr, L-Lys, L-Leu, L-Gln, L-Asn, L-Asp và L-Glu còn lại (lần lượt tương ứng với 5Da-p). Điều kiện phản ứng được liệt kê như sau: i) Axeton, TFA, MgSO₄; ii) HCl, Boc-Lys-OBzl, DCC, HOBt, NMM; iii) EtOH, Pd/C; iv) DCC, HOBt, NMM, v) EtOH, Pd/C; 4M HCl/EA, bồn đá; vi) EtOH, Pd/C; vii) EtOH, Pd/C.

Trong phương án ưu tiên khác, nhánh liên kết là L-Asp và peptit có hoạt tính làm tan huyết khối là tripeptit có chuỗi PA (Pro-Ala). Ví dụ, nhóm carboxy của hợp chất có công thức (II) được ghép với đầu N của L-Asp, sau đó tripeptit có chứa chuỗi PA được ghép với một đầu C còn lại của nhánh liên kết L-Asp. Trong một số phương án, khi R₁ và R₂ của hợp chất có công thức (II) cả hai đều là nhóm methyl (thực chất là axit 3S-6,7-đihydroxy-1,1-dimethyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-3-axyl-carboxylic), thì nhánh liên kết là L-Asp và peptit có hoạt tính làm tan huyết khối là tripeptit có chứa chuỗi PA (Pro-Ala), phương pháp điều chế trong sáng chế tổng hợp được hợp chất Ie và If nói trên.

Khi điều chế hợp chất Ie theo phương pháp điều chế của sáng chế, thì quy trình tổng hợp thể hiện trên Hình 5, trong đó AA được chọn từ L-Ala, L-Val, L-Trp, L-Tyr, L-Pro, L-Phe, Gly, L-Ser, L-Ile, L-Thr, L-Lys, L-Leu, L-Gln, L-Asn, L-Asp và L-Glu còn lại (lần lượt tương ứng với các hợp chất 5Ea-p). Điều kiện phản ứng được liệt kê như sau: i) Axeton, TFA, MgSO₄; ii) HCl, Asp(OCH₃)-OBzl, DCC, HOBt, NMM; iii) EtOH, Pd/C; iv) DCC, HOBt, NMM, v) EtOH, Pd/C; 2M NaOH, bồn đá; vi) EtOH, Pd/C; vii) 4M HCl/EA, bồn đá.

Khi điều chế hợp chất If theo phương pháp điều chế của sáng chế, thì quy trình tổng hợp thể hiện trên Hình 6, trong đó AA được chọn từ L-Ala, L-Val, L-Trp, L-Tyr, L-Pro, L-Phe, Gly, L-Ser, L-Ile, L-Thr, L-Lys, L-Leu, L-Gln, L-Asn, L-Asp và L-Glu còn lại (lần lượt tương ứng với các hợp chất 5Fa-p). Điều kiện phản ứng được liệt kê như sau: i) Axeton, TFA, MgSO₄; ii) HCl, Asp(OBzl)-OCH₃, DCC, HOBt, NMM; iii) 2M NaOH, iv) DCC, HOBt, NMM, v) EtOH, Pd/C; 2M NaOH, bồn đá; vi) EtOH, Pd/C; vii) 4M HCl/EA, bồn đá.

Trong phương án khác của sáng chế, nhánh liên kết là L-Glu và peptit có hoạt tính làm tan huyết khối là tripeptit có chứa chuỗi PA (Pro-Ala). Ví dụ, nhóm carboxy của hợp chất có công thức (II) được ghép với đầu N của L-Glu, sau đó tripeptit có chứa chuỗi PA được ghép với một trong các đầu còn lại C của nhánh liên kết L-Glu. Trong một số phương án, khi R₁ và R₂ của hợp chất có công thức (II) đều là nhóm methyl (thực chất là axit 3S-6,7-đihydroxy-1,1-dimethyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-3-axyl-carboxylic), nhánh liên kết là L-Glu và peptit có hoạt tính làm tan huyết khối là tripeptit

có chuỗi PA (Pro-Ala), thì phương pháp điều chế của sáng chế có thể tổng hợp được hợp chất Ig và Ih ở trên.

Khi điều chế hợp chất Ig theo phương pháp điều chế của sáng chế, thì quy trình tổng hợp thể hiện trên Hình 7, trong đó AA được chọn từ L-Ala, L-Val, L-Trp, L-Tyr, L-Pro, L-Phe, Gly, L-Ser, L-Ile, L-Thr, L-Lys, L-Leu, L-Gln, L-Asn, L-Asp và L-Glu còn lại (lần lượt tương ứng với các hợp chất 5Ga-P). Điều kiện phản ứng được liệt kê như sau: i) Axeton, TFA, MgSO₄; ii) HCl, Glu(O CH₃)-OBzl, DCC, HOBt, NMM; iii) EtOH, Pd/C; iv) DCC, HOBt, NMM; v) EtOH, Pd/C; 2M NaOH, bồn đá; vi) EtOH, Pd/C; vii) 4M HCl/EA, bồn đá.

Khi điều chế hợp chất Ih theo phương pháp điều chế của sáng chế, thì quy trình tổng hợp thể hiện trên Hình 8, trong đó AA được chọn từ L-Ala, L-Val, L-Trp, L-Tyr, L-Pro, L-Phe, Gly, L-Ser, L-Ile, L-Thr, L-Lys, L-Leu, L-Gln, L-Asn, L-Asp và L-Glu còn lại (lần lượt tương ứng với các hợp chất 5Ha-p). Điều kiện phản ứng được liệt kê như sau: i) Acetone, TFA, MgSO₄; ii) HCl, Glu(O Bzl)-OCH₃, DCC, HOBt, NMM; iii) EtOH, Pd/C; iv) DCC, HOBt, NMM; v) EtOH, Pd/C; 2M NaOH, bồn đá; vi) EtOH, Pd/C; vii) 4M HCl/EA, bồn đá.

Việc thử nghiệm trong phòng thí nghiệm trên các con chuột đối với hợp chất và được phẩm của sáng chế cho thấy các hợp chất và được phẩm này có hoạt tính làm tan huyết khối và chống huyết khối vượt trội ở liều lượng thấp và có hiệu quả trong việc bảo vệ các chức năng thần kinh của những con chuột bị đột quy. Do đó các hợp chất và được phẩm của sáng chế có hiệu quả và an toàn trong điều trị làm tan huyết khối đối với thử nghiệm lâm sàng.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế còn mô tả các ví dụ cụ thể như dưới đây và những ưu điểm cùng với tính năng được trở nên rõ ràng trong phần mô tả. Các ví dụ này chỉ là để minh họa cho sáng chế, không làm hạn chế phạm vi của sáng chế. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực có thể hiểu rằng việc thay đổi hoặc thay thế được thực hiện theo giải pháp kỹ thuật của sáng chế mà không nằm ngoài bản chất và phạm vi của sáng chế, những thay đổi và thay thế đó vẫn được coi là nằm trong phạm vi bảo hộ của sáng chế này.

Các ví dụ từ 1-68 minh họa phương pháp điều chế trên Hình 1 để điều chế các hợp chất 5Aa-p theo sáng chế này.

Ví dụ 1: Phương pháp tổng quát để tổng hợp peptit ở pha (dạng) lỏng.

Một amino axit có một đầu N bảo vệ được hòa tan trong tetrahydrofuran (THF) khan, dung dịch thu được được bổ sung N-hydroxybenzotrianol (HOBt). Dung dịch làm lạnh N,N-đicyclohexyl cacbodimin (DCC) được hòa tan trong THF khan được bổ sung

vào một cách từ từ, và sau đó khuấy ở nhiệt độ 0°C trong 15 phút để thu được dung dịch phản ứng (I). Một amino axit có đầu C bảo vệ cũng được hòa tan trong THF khan trong khi điều chỉnh pH=9 bằng N-metylmocpholin (NMM), sau đó được trộn với dung dịch phản ứng (I) trong khi duy trì pH=9 bởi N-metylmocpholin (NMM). Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 10 giờ và quá trình phản ứng được giám sát bởi TLC. Cho đến khi bắt đầu có đốm vật liệu biến mất trên TLC, thì hỗn hợp phản ứng được lọc và hỗn hợp sạch được cô đặc ở điều kiện áp suất thấp. Phần cô đặc sền sệt được hòa tan bằng etyl axetat (EA) hoặc bằng điclorometan, dung dịch thu được được làm sạch tuần tự bằng dung dịch nước NaHCO_3 5%, KHSO_4 5% và dung dịch nước NaCl bão hòa. Pha EA hoặc điclorometan được sấy khô bằng magiê sunphat khan, được lọc và phần đã lọc được cô đặc ở điều kiện áp suất thấp để thu được hợp chất mục tiêu.

Ví dụ 2: Phương pháp tổng quát để loại bỏ Boc.

Peptit được bảo vệ Boc được hòa tan bằng một lượng nhỏ etyl axetat khan, dung dịch etyl axetat của HCL (4 M) được bổ sung vào và khuấy trong bồn đá cho đến khi bắt đầu đốm vật liệu biến mất trên TLC. Dung dịch phản ứng được sấy khô lặp đi lặp lại bằng bơm nước, và khí HCL cũng được loại bỏ hoàn toàn. Phần còn lại được nghiền nhỏ cùng với ete dầu hỏa hoặc ete khan lặp đi lặp lại để thu được các hợp chất mục tiêu.

Ví dụ 3: Phương pháp tổng quát để loại bỏ nhóm benzyl este

Peptit có nhóm bảo vệ benzyl este được hòa tan bằng dung dịch CH_3OH , NaOH (2M) được bổ sung nhỏ giọt vào và được khuấy trong bồn đá, dung dịch phản ứng được duy trì ở 0°C cho đến khi bắt đầu đốm vật liệu biến mất trên TLC. Dung dịch phản ứng được điều chỉnh tự nhiên bằng 1 M HCL, và loại bỏ Me OH ở áp suất thấp. Dung dịch phản ứng được axit hóa đến pH=2 bằng 1 M HCL và sau đó được trích ly bằng EA. Pha EA kết hợp được rửa sạch bằng dung dịch nước muối (NaCl) bão hòa để làm trung tính, được làm khô bằng Na_2SO_4 khan và được lọc. Phần sau lọc được cô đặc ở điều kiện áp suất thấp để thu được các hợp chất mục tiêu.

Ví dụ 4: Phương pháp tổng quát để loại bỏ nhóm cacbobenzoxyl hoặc nhóm benzyl este.

Peptit được bảo vệ nhóm cacbobenzoxyl hoặc nhóm benzyl este được hòa tan trong một lượng thích hợp EtOH, Pd/C (10% của chất phản ứng) được bổ sung vào, và hydro được dẫn vào để thực hiện phản ứng thủy phân ở nhiệt độ phòng. Sau khi phản ứng, thì hỗn hợp phản ứng được lọc và sau đó được cô đặc ở áp suất thấp để thu được hợp chất mục tiêu.

Ví dụ 5: Điều chế Boc-Pro

5,75 g (50 mmol) L-Pro được hòa tan trong 1 mL nước. 25 mL dung dịch nước NaOH (2M) được nhỏ giọt vào và được khuấy chậm trong bồn đá để thu được dung

dịch (I). 13,08 g (60 mmol) (Boc)₂O được hòa tan trong 25 mL đioxan để thu được dung dịch (II). Dung dịch (II) được nhỏ giọt vào dung dịch (I) và được khuấy trong bồn đá, sau đó dung dịch NaOH (2M) được nhỏ giọt vào để điều chỉnh pH=9, hỗn hợp được khuấy trong bồn đá. Sau 30 phút, giá trị pH của hỗn hợp được đo và dung dịch NaOH (2M) được sử dụng để duy trì độ pH=9. Bơm nước được dùng để trích ly khí sinh ra. Sau khi khuấy trong 48 giờ, theo dõi TLC (CH₂Cl₂:MeOH 20:1) cho biết rằng phản ứng đã hoàn thành. Hỗn hợp được cô đặc ở áp suất thấp để loại bỏ đioxan. Phần còn lại được hòa tan bằng 5 mL nước, sau đó điều chỉnh pH=2 bằng dung dịch KHSO₄ bão hòa. Dung dịch nước được trích ly bằng EA ba lần. Pha EA kết hợp được rửa sạch bằng 5% KHSO₄ ba lần, sau đó được rửa bằng dung dịch nước muối NaCl bão hòa để làm trung tính. Lớp EA đã tách được làm khô bằng natri sunphat khan và sau đó đem đi lọc. Phần lọc được cô đặc ở áp suất thấp. Phần còn lại được kết tinh bằng EA-ete dầu hỏa để thu được 10,2 g (95%) hợp chất nói trên ở dạng tinh thể không màu. ESI-MS (m/e): 214 [M-H].

Ví dụ 6: Điều chế Boc-Pro-Ala-OBzl

Thực hiện theo phương pháp trong Ví dụ 1, 5,19 g (68%) hợp chất theo tiêu đề ở dạng bột không màu được điều chế từ 4,3 g (20,0 mmol) Boc-Pro và 8,45 g (24,0 mmol) Tos•Ala-OBzl. ESI-MS (m/e): 377 [M + H]⁺.

Ví dụ 7: Điều chế Boc-pro-Ala

Thực hiện theo phương pháp của Ví dụ 4, thu được 3,59 g (91%) của hợp chất theo tiêu đề ở dạng bột không màu được điều chế từ 5,19 g (13,8 mmol) Boc-Pro-Ala-OBzl. ESI-MS (m/e): 285 [M-H]⁻.

Ví dụ 8: Điều chế Boc-Pro-Ala-Ala-OBzl

Bằng cách thực hiện theo phương pháp ở Ví dụ 1, 3,04 g (68%) của hợp chất theo tiêu đề ở dạng bột không màu được điều chế từ 3,00 g (10,49 mmol) Boc-Pro-Ala-OBzl và 3,26 g (12,03 mmol) Tos•Ala-OBzl. ESI-MS (m/e): 448 [M + H]⁺.

Ví dụ 9: Điều chế Boc-Pro-Ala-Ala

Bằng cách thực hiện theo phương pháp ở Ví dụ 3, 3,21 g (90%) của hợp chất nói trên được điều chế từ 4,47 g (10 mmol) Boc-Pro-Ala-Ala-OBzl. ESI-MS (m/e): 356 [M-H]⁻.

Ví dụ 10: Điều chế Boc-Pro-Ala-Val-OBzl

Bằng cách thực hiện theo phương pháp ở Ví dụ 1, 3,28 g (69%) của hợp chất theo tiêu đề ở dạng bột không màu được điều chế từ 3,00 g (10,49 mmol) Boc-Pro-Ala và 3,58 g (12,01 mmol) Tos•Val-OBzl. ESI-MS (m/e): 476 [M + H]⁺.

Ví dụ 11: Điều chế Boc-Pro-Ala-Val

Bằng cách thực hiện theo phương pháp ở Ví dụ 3, 3,54 g (92%) của hợp chất theo tiêu đề được điều chế từ 4,75 g (10 mmol) Boc-Pro-Ala-Val-OBzl. ESI-MS (m/e): 384 [M-H]⁻.

Ví dụ 12: Điều chế Boc-Pro-Ala-Trp-OBzl

Bằng cách thực hiện theo phương pháp ở Ví dụ 1, 3,65 g (65%) của hợp chất theo tiêu đề ở dạng bột không màu được điều chế từ 3,00 g (10,49 mmol) Boc-Pro-Ala và 3,97 g (12,01 mmol) HCl•Trp-OBzl. ESI-MS (m/e): 563 [M + H]⁺.

Ví dụ 13: Điều chế Boc-Pro-Ala-Trp

Bằng cách thực hiện theo phương pháp ở Ví dụ 3, 4,21 g (89%) của hợp chất theo tiêu đề được điều chế từ 5,62 g (10 mmol) Boc-Pro-Ala-Trp-OBzl. ESI-MS (m/e): 471 [M-H]⁻.

Ví dụ 14: Điều chế Boc-Pro-Ala-Tyr-OBzl

Bằng cách thực hiện theo phương pháp ở Ví dụ 1, 3,73 g (69%) của hợp chất theo tiêu đề ở dạng bột không màu được điều chế từ 3,15 g (11 mmol) Boc-Pro-Ala và 4,43 g (10 mmol) Tos•Tyr-OBzl. ESI-MS (m/e): 540 [M + H]⁺.

Ví dụ 15: Điều chế Boc-Pro-Ala-Tyr

Bằng cách thực hiện theo phương pháp ở Ví dụ 3, 4,13 g (92%) của hợp chất theo tiêu đề được điều chế từ 5,39 g (10 mmol) Boc-Pro-Ala-Tyr-OBzl. ESI-MS (m/e): 448 [M-H]⁻.

Ví dụ 16: Điều chế Boc-Pro-Ala-Phe-OBzl

Bằng cách thực hiện theo phương pháp ở Ví dụ 1, 3,82 g (66%) của hợp chất theo tiêu đề ở dạng bột không màu được điều chế từ 3,00 g (10,0 mmol) Boc-Pro-Ala và 2,92 g (11,0 mmol) Tos•Phe-OBzl. ESI-MS (m/e): 524 [M + H]⁺.

Ví dụ 17: Điều chế Boc-Pro-Ala-Phe

Bằng cách thực hiện theo phương pháp ở Ví dụ 3, 3,94 g (91%) của hợp chất theo tiêu đề được điều chế từ 5,23 g (10 mmol) Boc-Pro-Ala-Phe-OBzl. ESI-MS (m/e): 432 [M-H]⁻.

Ví dụ 18: Điều chế Boc-Pro-Ala-Gly-OBzl

Bằng cách thực hiện theo phương pháp ở Ví dụ 1, 2,90 g (67%) của hợp chất theo tiêu đề ở dạng bột không màu được điều chế từ 3,15 g (11 mmol) Boc-Pro-Ala và 3,37 g (10 mmol) Tos•Gly-OBzl. ESI-MS (m/e): 434 [M + H]⁺.

Ví dụ 19: Điều chế Boc-Pro-Ala-Gly

Bằng cách thực hiện theo phương pháp ở Ví dụ 3, 2,98 g (87%) của hợp chất theo tiêu đề được điều chế từ 4,33 g (10 mmol) Boc-Pro-Ala-Gly-OBzl. ESI-MS (m/e): 342 [M-H]⁻.

Ví dụ 20: Điều chế Boc-Pro-Ala-Ser-OBzl

Bằng cách thực hiện theo phương pháp ở Ví dụ 1, 2,92 g (63%) của hợp chất theo tiêu đề ở dạng bột không màu được điều chế từ 3,15 g (11 mmol) Boc-Pro-Ala và 3,67 g (10 mmol) Tos•Ser-OBzl. ESI-MS (m/e): 464 [M + H]⁺.

Ví dụ 21: Điều chế Boc-Pro-Ala-Ser

Bằng cách thực hiện theo phương pháp ở Ví dụ 3, 3,28 g (88%) của hợp chất theo tiêu đề được điều chế từ 4,63 g (10 mmol) Boc-Pro-Ala-Ser-OBzl. ESI-MS (m/e): 372 [M-H]⁻.

Ví dụ 22: Điều chế Boc-Pro-Ala-Ile-OBzl

Bằng cách thực hiện theo phương pháp ở Ví dụ 1, 3,33 g (65%) của hợp chất theo tiêu đề ở dạng bột không màu được điều chế từ 3,15 g (11 mmol) Boc-Pro-Ala và 3,93 g (10 mmol) Tos•Ile-OBzl. ESI-MS (m/e): 490 [M + H]⁺.

Ví dụ 23: Điều chế Boc-Pro-Ala-Ile

Bằng cách thực hiện theo phương pháp ở Ví dụ 3, 3,67 g (91%) của hợp chất theo tiêu đề được điều chế từ 4,89 g (10 mmol) Boc-Pro-Ala-Ile-OBzl. ESI-MS (m/e): 398 [M-H]⁻.

Ví dụ 24: Điều chế Boc-Pro-Ala-Thr-OBzl

Bằng cách thực hiện theo phương pháp ở Ví dụ 1, 3,39 g (71%) của hợp chất theo tiêu đề ở dạng bột không màu được điều chế từ 3,15 g (11 mmol) Boc-Pro-Ala và 3,81 g (10 mmol) Tos•Thr-OBzl. ESI-MS (m/e): 478 [M + H]⁺.

Ví dụ 25: Điều chế Boc-Pro-Ala-Thr

Bằng cách thực hiện theo phương pháp ở Ví dụ 3, 3,56 g (91%) của hợp chất theo tiêu đề được điều chế từ 4,77 g (10 mmol) Boc-Pro-Ala-Thr-OBzl. ESI-MS (m/e): 386 [M-H]⁻.

Ví dụ 26: Điều chế Boc-Pro-Ala-Lys(Z)-OBzl

Bằng cách thực hiện theo phương pháp ở Ví dụ 1, 4,15 g (65%) của hợp chất theo tiêu đề ở dạng bột không màu được điều chế từ 3,15 g (11 mmol) Boc-Pro-Ala và 4,06 g (10 mmol) HCl•Lys(Z)-OBzl. ESI-MS (m/e): 639 [M + H]⁺.

Ví dụ 27: Điều chế Boc-Pro-Ala-Lys(Z)

Bằng cách thực hiện theo phương pháp ở Ví dụ 3, 4,71 g (86%) của hợp chất theo tiêu đề được điều chế từ 6,39 g (10 mmol) Boc-Pro-Ala-Lys(Z)-OBzl. ESI-MS (m/e): 547 [M-H]⁻.

Ví dụ 28: Điều chế Boc-Pro-Ala-Leu-OBzl

Bằng cách thực hiện theo phương pháp ở Ví dụ 1, 3,37 g (69%) của hợp chất theo tiêu đề ở dạng bột không màu được điều chế từ 3,15 g (11 mmol) Boc-Pro-Ala và 3,93 g (10 mmol) Tos•Leu-OBzl. ESI-MS (m/e): 490 [M + H]⁺.

Ví dụ 29: Điều chế Boc-Pro-Ala-Leu

Bằng cách thực hiện theo phương pháp ở Ví dụ 3, 3,67 g (91%) của hợp chất theo tiêu đề được điều chế từ 4,89 g (10 mmol) Boc-Pro-Ala-Leu-OBzl. ESI-MS (m/e): 398 [M-H]⁻.

Ví dụ 30: Điều chế Boc-Pro-Ala-Gln-OBzl

Bằng cách thực hiện theo phương pháp ở Ví dụ 1, 3,23 g (63%) của hợp chất theo tiêu đề ở dạng bột không màu được điều chế từ 3,15 g (11 mmol) Boc-Pro-Ala và 2,73 g (10 mmol) HCl•Gln-OBzl. ESI-MS (m/e): 505 [M + H]⁺.

Ví dụ 31: Điều chế Boc-Pro-Ala-Gln

Bằng cách thực hiện theo phương pháp ở Ví dụ 3, 3,73 g (90%) của hợp chất theo tiêu đề được điều chế từ 5,04 g (10 mmol) Boc-Pro-Ala-Gln-OBzl. ESI-MS (m/e): 413 [M-H]⁻.

Ví dụ 32: Điều chế Boc-Pro-Ala-Asn-OBzl

Bằng cách thực hiện theo phương pháp ở Ví dụ 1, 3,04 g (61%) của hợp chất theo tiêu đề ở dạng bột không màu được điều chế từ 3,15 g (11 mmol) Boc-Pro-Ala và 2,59 g (10 mmol) HCl•Asn-OBzl. ESI-MS (m/e): 491 [M + H]⁺.

Ví dụ 33: Điều chế Boc-Pro-Ala-Asn

Bằng cách thực hiện theo phương pháp ở Ví dụ 3, 3,67 g (92%) của hợp chất theo tiêu đề được điều chế từ 4,90 g (10 mmol) Boc-Pro-Ala-Asn-OBzl. ESI-MS (m/e): 399 [M-H]⁻.

Ví dụ 34: Điều chế 3S-6,7-đihydroxy-1,1-đimetyl-1,2,3,4-tetrahydro-isoquinolin-3-axyl-carboxylic axit (1).

5,0 g (25 mmol) 3,4-đihydroxy-L-phenylalanin được hòa tan trong 250 mL axeton, sau đó 6,0 g (30 mmol) magiê sunphat khan được thêm vào dung dịch thu được. Sau 30 phút, 25 mL TFA được bổ sung vào đó trên bồn đá. Hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 96 giờ cho đến khi đám vật liệu bắt đầu biến mất như được thể hiện bằng TLC (CH₂Cl₂:MeOH 1:1). Dung dịch phản ứng được đem đi lọc. Phần lọc được cô đặc ở áp suất thấp và phần còn lại được hòa tan trong axeton và tiếp tục được cô đặc ở áp suất thấp ba lần. 200 mL ete khan được bổ sung vào phần còn lại để kết tủa một lượng lớn chất rắn không màu. Sau khi lọc chân không, 5,8 g (95%) của hợp chất nói trên thu được ở dạng chất rắn không màu. ESI-MS (m/e): 238 [M + H]⁺; ¹HNMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ/ppm = 6.61 (s, 1H), 6.45 (s, 1H), 3.70 (dd, J = 3.9, 11.4 Hz, 1H), 2.76 (dd, J = 11.7, 15.3 Hz, 1H), 2.62 (m, 1H), 1.41 (s, 3H), 1.32 (s, 3H).

Ví dụ 35: Điều chế 3S-6,7-đihydroxy-1,1-đimetyl-1,2,3,4-tetrahydro-isoquinolin-3-axyl-Lys (Boc)-OBzl (2).

Bằng cách thực hiện theo phương pháp của Ví dụ 1, 1,19 g (5,01 mmol) axit 3S-6,7-đihydroxy-1,1-đimetyl-1,2,3,4-tetrahydro-isoquinolin-3-axyl-carboxylic được hòa tan trong 10 mL DMF khan. 675 mg (5,00 mmol) N-hydroxybenzotriazol (HOBt) được bổ sung vào dung dịch thu được. Sau 10 phút, dung dịch 1,20 g (5,83 mmol) dicyclohexyl cacbođiimit (DCC) và 5 mL DMF khan được thêm vào đó trên bồn đá để thu được dung dịch phản ứng (I). 2,83 g (5,53 mmol) HCl•Lys(Boc)-OBzl được hòa tan trong 15 mL DMF khan và sau đó được khuấy trong 30 phút để thu được dung dịch phản ứng (II). Dung dịch phản ứng (II) được bổ sung vào dung dịch phản ứng (I) trong khi khuấy trên bồn đá. Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 12 giờ, và được điều chỉnh pH=9 sử dụng MMM khi cần thiết cho đến khi axit 3S-6,7-đihydroxy-1,1-đimetyl-1,2,3,4-tetrahydro-isoquinolin-3-axyl-carboxylic biến mất như được thấy trên TLC (CH₂Cl₂:MeOH 10:1). Hỗn hợp phản ứng được đem đi lọc để loại bỏ Dicyclohexylurea (DCU). Phần lọc được cô đặc ở áp suất thấp để loại bỏ DMF. Phần còn lại được hòa tan trong 150 mL EA. Dung dịch thu được lần lượt được rửa bằng dung dịch NaHCO₃ bão hòa trong ba lần, sau đó rửa bằng dung dịch nước muối NaCl bão hòa trong ba lần. Dung dịch EA được làm khô bằng Na₂SO₄ khan và được đem đi lọc. Phần lọc được cô đặc để làm khô ở áp suất thấp. Phần còn lại được tinh chế bằng sắc ký cột (CH₂Cl₂: MeOH, 50:1) để thu được 327 mg (59%) hợp chất trên tiêu đề ở dạng bột màu hồng nhạt. ESI-MS (m/e): 556 [M + H]⁺; ¹HNMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ/ppm = 8,64 (s, 1H), 8,52 (s, 1H), 8,14 (d, J = 7,5 Hz, 1H), 7,36 (m, 5H), 6,74 (m, 1H), 6,57 (s, 1H), 6,37 (s, 1H), 5,14 (m, 2H), 4,30 (m, 1H), 3,55 (m, 2H), 3,32 (m, 2H), 2,88(m, 2H), 2,57 (d, J = 3,9 Hz, 1H), 2,27 (m, 1H), 2,15 (s, 1H), 1,69 (m, 4H), 1,36(s, 9H), 1,33 (s, 3H), 1,25 (s, 3H).

Ví dụ 36: Điều chế 3S-6,7-đihydroxy-1,1-đimetyl-1,2,3,4-tetrahydro-isoquinolin-3-axyl-Lys-OBzl (3A)

Thực hiện theo phương pháp trong Ví dụ 2, 1,01 g (82%) hợp chất theo tiêu đề ở dạng chất rắn màu hồng nhạt được điều chế từ 1,50 g (2,73 mmol) 3S-6,7-đihydroxy-1,1-đimetyl-1,2,3,4-tetrahydro-isoquinolin-3-axyl-Lys(Boc)-OBzl, mà được sử dụng trực tiếp trong phản ứng tiếp theo. ESI-MS(m/e): 456[M+H]⁺.

Ví dụ 37: Điều chế 3S-6,7-đihydroxy-1,1-đimetyl-1,2,3,4-tetrahydro-isoquinolin-3-axyl-Lys (Boc-Pro-Ala-Ala)-OBzl (4Aa)

Thực hiện theo phương pháp trong Ví dụ 1, 302 mg (38%) của hợp chất theo tiêu đề ở dạng bột màu vàng nhạt được điều chế từ 482 mg (1,01 mmol) 3S-6,7-đihydroxy-1,1-đimetyl-1,2,3,4-tetrahydro-isoquinolin-3-axyl-Lys-OBzl và 424 mg (1,20 mmol) Boc-Pro-Ala-Ala. ESI-MS (m/e): 795 [M + H]⁺; ¹HNMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ/ppm = 9,15 (s, 1H), 8,89 (s, 2H), 8,11 (m, 1H), 7,94 (m,1H), 7,85 (m, 1H), 7,76 (m,1H),

7,44-7,31 (m, 5H), 6,66 (s, 1H), 6,47 (s, 1H), 5,14 (m, 2H), 4,25 (m, 1H), 4,23 (m, 3H), 4,12 (m, 1H), 3,66 (m, 1H), 3,12 (m, 2H), 2,96 (m, 2H), 2,89-2,91 (m, 2H), 2,11-2,08 (m, 1H), 1,77 (m, 5H), 1,59 (s, 3H), 1,47-1,27 (m, 17H), 1,27-1,08 (m, 7H).

Ví dụ 38: Điều chế 3S-6,7-đihydroxy-1,1-đimetyl-1,2,3,4-tetrahydro-isoquinolin-3-axyl-Lys (Boc-Pro-Ala-Val)-OBzl (4Ab)

Thực hiện theo phương pháp trong Ví dụ 1, 604 mg (37%) của hợp chất theo tiêu đề ở dạng bột màu vàng nhạt được điều chế từ 964 mg (2,01 mmol) 3S-6,7-đihydroxy-1,1-đimetyl-1,2,3,4-tetrahydro-isoquinolin-3-axyl-Lys-OBzl và 924 mg (2,40 mmol) Boc-Pro-Ala-Val. ESI-MS (m/e): 823 [M + H]⁺; ¹HNMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ/ppm = 9,18 (s, 1H), 8,93 (m, 2H), 8,05 (m, 2H), 7,42 (m, 5H), 6,66 (s, 1H), 6,47 (s, 1H), 5,16 (s, 1H), 4,37-4,28 (m, 3H), 4,11 (m, 3H), 3,06-2,89 (m, 5H), 2,75 (m, 6H), 2,04 (s, 1H), 1,91 (m, 1H), 1,79 (m, 5H), 1,62 (s, 3H), 1,49 (s, 3H), 1,39 (m, 7H), 1,32 (m, 3H), 1,21 (m, 4H), 0,82 (m, 6H).

Ví dụ 39: Điều chế 3S-6,7-đihydroxy-1,1-đimetyl-1,2,3,4-tetrahydro-isoquinolin-3-axyl-Lys (Boc-Pro-Ala-Trp)-OBzl (4Ac)

Thực hiện theo phương pháp trong Ví dụ 1, 318 mg (35%) của hợp chất theo tiêu đề ở dạng bột màu vàng nhạt được điều chế từ 482 mg (1,01 mmol) 3S-6,7-đihydroxy-1,1-đimetyl-1,2,3,4-tetrahydro-isoquinolin-3-axyl-Lys-OBzl và 567 mg (1,20 mmol) Boc-Pro-Ala-Trp. ESI-MS (m/e): 910 [M + H]⁺; ¹HNMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ/ppm = 9,51 (s, 1H), 9,26 (m, 2H), 8,98 (m, 2H), 8,05 (d, 1H, J=7.2Hz), 7,94 (m, 1H), 7,78 (d, 1H, J=7.2Hz), 7,54 (m, 1H), 7,38 (m, 5H), 7,31 (d, 1H, J=4.5Hz), 7,24 (m, 1H), 7,11 (t, 1H, J=4.5Hz), 7,05 (t, 1H, J=4.5Hz), 6,67 (s, 1H), 6,52 (s, 1H), 5,15 (s, 2H), 4,44 (m, 1H), 4,35 (m, 2H), 4,07 (m, 2H), 3,23 (m, 1H), 3,17 (m, 5H), 2,86 (m, 1H), 1,97 (m, 2H), 1,76-1,70 (m, 8H), 1,31 (s, 3H), 1,24 (s, 3H), 1,93-1,79 (m, 9H), 1,16 (m, 4H).

Ví dụ 40: Điều chế 3S-6,7-đihydroxy-1,1-đimetyl-1,2,3,4-tetrahydro-isoquinolin-3-axyl-Lys (Boc-Pro-Ala-Tyr)-OBzl (4Ad)

Thực hiện theo phương pháp trong Ví dụ 1, 549 mg (31%) của hợp chất theo tiêu đề ở dạng bột màu vàng nhạt được điều chế từ 964 mg (2,01 mmol) 3S-6,7-đihydroxy-1,1-đimetyl-1,2,3,4-tetrahydro-isoquinolin-3-axyl-Lys-OBzl và 1077 mg (2,40 mmol) Boc-Pro-Ala-Tyr. ESI-MS (m/e): 887 [M + H]⁺; ¹HNMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ/ppm = 9,17 (m, 1H), 9,02 (m, 1H), 8,73 (m, 1H), 8,51 (m, 1H), 8,09 (m, 1H), 7,97 (m, 1H), 7,73 (m, 1H), 7,40 (m, 5H), 6,96 (m, 2H), 6,61 (m, 3H), 6,48 (s, 1H), 5,16 (s, 2H), 4,23 (m, 2H), 4,07 (m, 2H), 3,88 (m, 1H), 3,01 (m, 3H), 2,74 (m, 3H), 2,02 (m, 2H), 1,74 (m, 5H), 1,46 (s, 3H), 1,36-1,24 (m, 16H), 1,16 (m, 3H), 0,87 (m, 1H).

Ví dụ 41: Điều chế 3S-6,7-đihydroxy-1,1-đimetyl-1,2,3,4-tetrahydro-isoquinolin-3-axyl-Lys (Boc-Pro-Ala-Pro)-OBzl (4Ae)

Thực hiện theo phương pháp trong Ví dụ 1, 607 mg (37%) của hợp chất theo tiêu đề ở dạng bột màu vàng nhạt được điều chế từ 964 mg (2,01 mmol) 3S-6,7-đihydroxy-1,1-đimetyl-1,2,3,4-tetrahydro-isoquinolin-3-axyl-Lys-OBzl và 957 mg (2,40 mmol) Boc-Pro-Ala-Pro. ESI-MS (m/e): 821 [M + H]⁺; ¹HNMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ/ppm = 9,54 (m, 1H), 9,23 (s, 1H), 9,11 (m, 1H), 8,96 (s, 1H), 8,05 (m, 1H), 7,85 (m, 1H), 7,40 (m, 5H), 6,67 (s, 1H), 6,48 (s, 1H), 5,16 (m, 2H), 4,54 (m, 1H), 4,38 (m, 2H), 4,24 (m, 1H), 4,10 (m, 2H), 3,55 (m, 1H), 3,17 (m, 3H), 3,05 (m, 3H), 2,94 (m, 1H), 1,96 (m, 2H), 1,79 (m, 7H), 1,64 (s, 3H), 1,51 (s, 3H), 1,38-1,32 (m, 13H), 1,20 (m, 4H).

Ví dụ 42: Điều chế 3S-6,7-đihydroxy-1,1-đimetyl-1,2,3,4-tetrahydro-isoquinolin-3-axyl-Lys (Boc-Pro-Ala-Phe)-OBzl (4Af)

Thực hiện theo phương pháp trong Ví dụ 1, 626 mg (36%) của hợp chất theo tiêu đề ở dạng bột màu vàng nhạt được điều chế từ 964 mg (2,01 mmol) 3S-6,7-đihydroxy-1,1-đimetyl-1,2,3,4-tetrahydro-isoquinolin-3-axyl-Lys-OBzl và 1039 mg (2,40 mmol) Boc-Pro-Ala-Phe. ESI-MS (m/e): 871 [M + H]⁺; ¹HNMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ/ppm = 9,24 (s, 1H), 9,09 (m, 2H), 8,96 (s, 1H), 8,01-7,93 (m, 3H), 7,38 (m, 5H), 7,21 (m, 5H), 6,67 (s, 1H), 6,49 (s, 1H), 5,17 (s, 2H), 4,38 (m, 3H), 4,09 (m, 2H), 3,28 (m, 4H), 2,88 (m, 2H), 2,79 (m, 5H), 1,99 (m, 2H), 1,74 (m, 8H), 1,50 (m, 3H), 1,32 (m, 14H), 1,16 (m, 4H).

Ví dụ 43: Điều chế 3S-6,7-đihydroxy-1,1-đimetyl-1,2,3,4-tetrahydro-isoquinolin-3-axyl-Lys (Boc-Pro-Ala-Gly)-OBzl (4Ag)

Thực hiện theo phương pháp trong Ví dụ 1, 304 mg (39%) của hợp chất theo tiêu đề ở dạng bột màu vàng nhạt được điều chế từ 482 mg (1,01 mmol) 3S-6,7-đihydroxy-1,1-đimetyl-1,2,3,4-tetrahydro-isoquinolin-3-axyl-Lys-OBzl và 412 mg (1,20 mmol) Boc-Pro-Ala-Gly. ESI-MS (m/e): 781 [M + H]⁺; ¹HNMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ/ppm = 9,39 (s, 1H), 8,97 (m, 2H), 8,24-8,14 (m, 2H), 7,79 (m, 1H), 7,41 (m, 5H), 6,66 (s, 1H), 6,47 (s, 1H), 5,16 (s, 2H), 4,35 (m, 2H), 4,21 (m, 2H), 3,71-3,66 (m, 2H), 3,03 (m, 3H), 2,89-2,76 (m, 1H), 2,07 (m, 1H), 1,81-1,77 (m, 6H), 1,62 (s, 3H), 1,50 (s, 3H), 1,38 (m, 7H), 1,32 (m, 8H), 1,23 (m, 4H).

Ví dụ 44: Điều chế 3S-6,7-đihydroxy-1,1-đimetyl-1,2,3,4-tetrahydro-isoquinolin-3-axyl-Lys(Boc-Pro-Ala-Ser)-OBzl (4Ah)

Thực hiện theo phương pháp trong Ví dụ 1, 454 mg (29%) của hợp chất theo tiêu đề ở dạng bột màu vàng nhạt được điều chế từ 965 mg (2,01 mmol) 3S-6,7-đihydroxy-1,1-đimetyl-1,2,3,4-tetrahydro-isoquinolin-3-axyl-Lys-OBzl và 896 mg (2,40 mmol) Boc-Pro-Ala-Ser. ESI-MS (m/e): 811 [M + H]⁺; ¹HNMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ/ppm = 9,48 (m, 1H), 9,23 (s, 2H), 8,96 (m, 1H), 8,19 (m, 1H), 7,40 (m, 5H), 6,67 (s, 1H), 6,48 (s, 1H), 5,16 (m, 2H), 4,92 (m, 1H), 4,31 (m, 3H), 4,13 (m, 3H), 3,53 (m, 2H), 3,16

(m, 3H), 3,04-2,81 (m, 4H), 2,08 (m, 1H), 1,78 (m, 5H), 1,63 (s, 3H), 1,51 (s, 3H), 1,39-1,32 (m, 14H), 1,22 (m, 3H).

Ví dụ 45: Điều chế 3S-6,7-đihydroxy-1,1-đimetyl-1,2,3,4-tetrahydro-isoquinolin-3-axyl-Lys(Boc-Pro-Ala-Ile)-OBzl (4Ai)

Thực hiện theo phương pháp trong Ví dụ 1, 310 mg (37%) của hợp chất theo tiêu đề ở dạng bột màu vàng nhạt được điều chế từ 482 mg (1,01 mmol) 3S-6,7-đihydroxy-1,1-đimetyl-1,2,3,4-tetrahydro-isoquinolin-3-axyl-Lys-OBzl và 479 mg (1,20 mmol) Boc-Pro-Ala-Ile. ESI-MS (m/e): 837 [M + H]⁺; ¹HNMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ/ppm = 8,84-8,68 (m, 2H), 8,37 (s, 1H), 7,99-7,87 (m, 3H), 7,39 (m, 4H), 6,60 (s, 1H), 6,39 (s, 1H), 5,14 (m, 2H), 4,32 (m, 2H), 4,17 (m, 2H), 3,65 (m, 1H), 3,54 (m, 1H), 3,17 (m, 1H), 2,96 (m, 2H), 2,68 (m, 3H), 2,11 (m, 1H), 1,74-1,68 (m, 7H), 1,31-1,21 (m, 11H), 1,17 (m, 5H), 1,08 (m, 1H), 0,82 (m, 8H).

Ví dụ 46: Điều chế 3S-6,7-đihydroxy-1,1-đimetyl-1,2,3,4-tetrahydro-isoquinolin-3-axyl-Lys(Boc-Pro-Ala-Thr)-OBzl (4Aj)

Thực hiện theo phương pháp trong Ví dụ 1, 495 mg (30%) của hợp chất theo tiêu đề ở dạng bột màu vàng nhạt được điều chế từ 964 mg (2,01 mmol) 3S-6,7-đihydroxy-1,1-đimetyl-1,2,3,4-tetrahydro-isoquinolin-3-axyl-Lys-OBzl và 929 mg (2,40 mmol) Boc-Pro-Ala-Thr. ESI-MS (m/e): 825 [M + H]⁺; ¹HNMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ/ppm = 9,18 (s, 1H), 8,91 (s, 2H), 8,27 (m, 1H), 7,64 (m, 1H), 7,41 (m, 6H), 6,65 (s, 1H), 6,48 (s, 1H), 5,16 (s, 2H), 4,35 (m, 3H), 4,23 (m, 3H), 3,07 (m, 3H), 2,72 (m, 1H), 1,83-1,76 (m, 5H), 1,61 (s, 3H), 1,48 (s, 3H), 1,38-1,32 (m, 14H), 1,23 (m, 3H), 1,11 (m, 3H).

Ví dụ 47: Điều chế 3S-6,7-đihydroxy-1,1-đimetyl-1,2,3,4-tetrahydro-isoquinolin-3-axyl-Lys[Boc-Pro-Ala-Lys(Z)]-OBzl (4Ak)

Thực hiện theo phương pháp trong Ví dụ 1, 750 mg (30%) của hợp chất theo tiêu đề ở dạng bột màu vàng nhạt được điều chế từ 964 mg (2,01 mmol) 3S-6,7-đihydroxy-1,1-đimetyl-1,2,3,4-tetrahydro-isoquinolin-3-axyl-Lys-OBzl và 1209 mg (2,40 mmol) Boc-Pro-Ala-Lys(Z). ESI-MS (m/e): 987 [M + H]⁺; ¹HNMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ/ppm = 8,68 (s, 1H), 8,56 (s, 1H), 8,16 (m, 1H), 8,04 (m, 1H), 7,78 (m, 1H), 7,68 (m, 1H), 7,34 (m, 10H), 6,58 (s, 1H), 6,37 (s, 1H), 5,14 (s, 2H), 4,98 (s, 2H), 4,29 (m, 2H), 4,09 (m, 3H), 3,56 (m, 3H), 3,01 (m, 4H), 2,62 (m, 1H), 2,40 (m, 1H), 2,27 (m, 1H), 2,15 (s, 1H), 2,06 (m, 1H), 2,01 (s, 1H), 1,78 (m, 6H), 1,38-1,31 (m, 18H), 1,17 (m, 10H).

Ví dụ 48: Điều chế 3S-6,7-đihydroxy-1,1-đimetyl-1,2,3,4-tetrahydro-isoquinolin-3-axyl-Lys(Boc-Pro-Ala-Leu)-OBzl (4Al)

Thực hiện theo phương pháp trong Ví dụ 1, 301 mg (36%) của hợp chất theo tiêu đề ở dạng bột màu vàng nhạt được điều chế từ 482 mg (1,01 mmol) 3S-6,7-đihydroxy-

1,1-đimetyl-1,2,3,4-tetrahydro-isoquinolin-3-axyl-Lys-OBzl và 479 mg (1,20 mmol) Boc-Pro-Ala-Leu. ESI-MS (m/e): 837 [M + H]⁺; ¹HNMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ/ppm = 8,69-8,57 (m, 2H), 8,18-8,06 (m, 2H), 7,85 (m, 1H), 7,69 (m, 5H), 6,58 (s, 1H), 6,37 (s, 1H), 5,14 (m, 2H), 4,25-4,11 (m, 5H), 3,63-3,55 (m, 1H), 3,17 (s, 2H), 3,04-2,98 (m, 2H), 2,64-2,59 (m, 1H), 2,15-2,07 (m, 1H), 1,78-1,67 (m, 5H), 1,36 (m, 14H), 1,28 (m, 4H), 1,19 (m, 6H).

Ví dụ 49: Điều chế 3S-6,7-đihydroxy-1,1-đimetyl-1,2,3,4-tetrahydro-isoquinolin-3-axyl-Lys(Boc-Pro-Ala-Gln)-OBzl (4Am)

Thực hiện theo phương pháp trong Ví dụ 1, 665 mg (39%) của hợp chất theo tiêu đề ở dạng bột màu vàng nhạt được điều chế từ 965 mg (2,01 mmol) 3S-6,7-đihydroxy-1,1-đimetyl-1,2,3,4-tetrahydro-isoquinolin-3-axyl-Lys-OBzl và 994 mg (2,40 mmol) Boc-Pro-Ala-Gln. ESI-MS (m/e): 852 [M + H]⁺; ¹HNMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ/ppm = 9,3-9,1 (m, 4H), 8,16 (m, 1H), 7,96 (m, 2H), 7,83 (m, 1H), 7,44-7,38 (m, 7H), 6,89 (s, 1H), 6,86 (s, 1H), 6,56 (s, 1H), 5,17 (s, 2H), 4,4-4,1 (m, 6H), 3,17 (m, 4H), 2,98-2,83 (m, 2H), 2,08 (m, 4H), 1,91 (m, 1H), 1,64 (s, 3H), 1,51 (s, 3H), 1,38-1,31 (m, 17H), 1,22-1,20 (m, 4H).

Ví dụ 50: Điều chế 3S-6,7-đihydroxy-1,1-đimetyl-1,2,3,4-tetrahydro-isoquinolin-3-axyl-Lys(Boc-Pro-Ala-Asn)-OBzl (4An)

Thực hiện theo phương pháp trong Ví dụ 1, 636 mg (38%) của hợp chất theo tiêu đề ở dạng bột màu vàng nhạt được điều chế từ 965 mg (2,01 mmol) 3S-6,7-đihydroxy-1,1-đimetyl-1,2,3,4-tetrahydro-isoquinolin-3-axyl-Lys-OBzl và 960 mg (2,40 mmol) Boc-Pro-Ala-Asn. ESI-MS (m/e): 838 [M + H]⁺; ¹HNMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ/ppm = 9,26 (s, 1H), 9,04 (m, 2H), 8,31 (m, 1H), 8,03 (m, 1H), 7,57 (m, 1H), 7,44 (m, 6H), 6,90 (m, 1H), 6,68 (s, 1H), 6,49 (s, 1H), 5,16 (s, 2H), 4,45-4,40 (m, 3H), 4,14 (m, 2H), 3,42 (m, 5H), 3,17 (m, 3H), 2,89-2,82 (m, 1H), 2,09 (m, 1H), 1,90 (m, 1H), 1,79-1,74 (m, 6H), 1,64 (s, 3H), 1,52 (s, 3H), 1,39-1,32 (m, 15H), 1,22 (m, 3H).

Ví dụ 51: Điều chế 3S-6,7-đihydroxy-1,1-đimetyl-1,2,3,4-tetrahydro-isoquinolin-3-axyl-Lys[Boc-Pro-Ala-Asp(OBzl)]-OBzl (4Ao)

Thực hiện theo phương pháp trong Ví dụ 1, 403 mg (35%) của hợp chất theo tiêu đề ở dạng bột màu vàng nhạt được điều chế từ 870 mg (1,24 mmol) 3S-6,7-đihydroxy-1,1-đimetyl-1,2,3,4-tetrahydro-isoquinolin-3-axyl-Lys[Asp(OBzl)]-OBzl và 429 mg (2,48 mmol) Boc-Pro-Ala. ESI-MS (m/e): 929 [M + H]⁺; ¹HNMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ/ppm = 8,32 (m, 1H), 8,10 (m, 1H), 7,96 (m, 1H), 7,36 (m, 10H), 6,60 (s, 1H), 6,39 (s, 1H), 5,14 (s, 2H), 5,06 (s, 2H), 4,57 (m, 1H), 4,32 (m, 1H), 4,23 (m, 1H), 4,11 (m, 2H), 3,74 (m, 1H), 3,55 (m, 1H), 3,34-3,28 (m, 2H), 3,00 (m, 2H), 2,89 (s, 1H), 2,81

(m, 1H), 2,73 (m, 2H), 2,58 (m, 1H), 2,16-2,06 (m, 1H), 1,91 (s, 2H), 1,75 (m, 5H), 1,40-1,32 (m, 22H), 1,17 (m, 3H).

Ví dụ 52: Điều chế 3S-6,7-đihydroxy-1,1-đimetyl-1,2,3,4-tetrahydro-isoquinolin-3-axyl-Lys[Boc-Pro-Ala-Glu(OBzl)]-OBzl (4Ap)

Thực hiện theo phương pháp trong Ví dụ 1, 269 mg (38%) của hợp chất theo tiêu đề ở dạng bột màu vàng nhạt được điều chế từ 530 mg (0,75 mmol) 3S-6,7-đihydroxy-1,1-đimetyl-1,2,3,4-tetrahydro-isoquinolin-3-axyl-Lys[Glu(OBzl)]-OBzl và 256 mg (0,90 mmol) Boc-Pro-Ala. ESI-MS (m/e): 943 [M + H]⁺; ¹HNMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ/ppm = 9,26 (s, 1H), 9,10 (m, 1H), 8,97 (s, 1H), 8,79-7,88 (m, 3H), 7,36 (m, 10H), 6,67 (s, 1H), 6,48 (s, 1H), 5,14 (s, 2H), 5,06 (s, 2H), 4,35 (m, 1H), 4,23 (m, 2H), 4,10 (m, 1H), 3,83 (s, 1H), 3,34 (m, 5H), 2,83 (m, 1H), 2,72 (m, 1H), 2,34 (m, 2H), 1,78 (m, 10H), 1,51 (s, 3H), 1,36-1,31 (m, 14H), 1,21 (m, 3H).

Ví dụ 53: Điều chế 3S-6,7-đihydroxy-1,1-đimetyl-1,2,3,4-tetrahydro-isoquinolin-3-axyl-Lys(Pro-Ala-Ala) (5Aa)

Trước tiên, nhóm benzyl este được loại bỏ khỏi 300 mg (0,38 mmol) của 3S-6,7-đihydroxy-1,1-đimetyl-1,2,3,4-tetrahydro-isoquinolin-3-axyl-Lys(Boc-Pro-Ala-Ala)-OBzl theo phương pháp ở Ví dụ 4. Tiếp đến, Boc được loại bỏ theo phương pháp trong Ví dụ 2 để có 266 mg (78%) hợp chất theo tiêu đề ở dạng bột không màu. p 207,2-209,4 °C; [α]_D²⁵ = -4,5 (c = 0,25, CH₃OH); ESI-MS (m/e): 630 [M-H]⁻; IR(KBr): 3221,1, 3057,2, 2983,8, 2943,3, 2362,8, 1660,7, 1546,9, 1533,4, 1448,5, 1379,1, 1240,2, 1049,3, 867,9, 659,7; ¹HNMR (300 MHz, D₂O) δ/ppm = 6,79 (s, 1H), 6,68 (s, 1H), 4,36-4,29 (m, 5H), 3,32-3,12 (m, 6H), 1,89 (m, 4H), 1,70 (s, 3H), 1,57 (s, 3H), 1,48 (m, 2H), 1,33 (m, 9H).

Ví dụ 54: Điều chế 3S-6,7-đihydroxy-1,1-đimetyl-1,2,3,4-tetrahydro-isoquinolin-3-axyl-Lys(Pro-Ala-Val) (5Ab)

Thực hiện theo phương pháp trong Ví dụ 53, 187 mg (81%) hợp chất theo tiêu đề ở dạng bột không màu được điều chế từ 300 mg (0,36 mmol) 3S-6,7-đihydroxy-1,1-đimetyl-1,2,3,4-tetrahydro-isoquinolin-3-axyl-Lys(Boc-Pro-Ala-Val)-OBzl. Mp 195,8-197,9 °C; [α]_D²⁵ = -3,5 (c = 0,25, CH₃OH); ESI-MS (m/e): 630 [M-H]⁻; IR(KBr): 3221,1, 3062,9, 2970,4, 1658,8, 1546,9, 1533,4, 1450,5, 1384,9, 1240,2, 1047,4, 991,41, 866,04, 671,2; ¹HNMR (300 MHz, D₂O) δ/ppm = 8,13 (m, 1H), 6,79 (s, 1H), 6,68 (s, 1H), 4,36-4,29 (m, 4H), 3,89 (m, 1H), 3,36 (m, 2H), 3,23 (m, 2H), 3,08 (m, 2H), 1,89 (m, 4H), 1,70 (s, 3H), 1,57 (s, 3H), 1,48 (m, 1H), 1,37 (m, 6H), 1,32 (m, 2H), 0,89 (m, 6H).

Ví dụ 55: Điều chế 3S-6,7-đihydroxy-1,1-đimetyl-1,2,3,4-tetrahydro-isoquinolin-3-axyl-Lys(Pro-Ala-Trp) (5Ac)

Thực hiện theo phương pháp trong Ví dụ 53, 180 mg (76%) hợp chất theo tiêu đề ở dạng bột màu hồng nhạt được điều chế từ 300 mg (0.33 mmol) 3S-6,7-đihydroxy-1,1-đimetyl-1,2,3,4-tetrahydro-isoquinolin-3-axyl-Lys(Boc-Pro-Ala-Trp)-OBzl. Mp 205,1-207,9 °C; $[\alpha]_D^{25} = -1,3$ ($c = 0,25$, CH₃OH); ESI-MS (m/e): 718 [M-H]⁻; IR(KBr): 3221,2, 3059,1, 2981,9, 2941,4, 1660,7, 1533,4, 1448,5, 1388,7, 1240,2, 867,9, 748,4, 630,7; ¹HNMR (300 MHz, D₂O) $\delta/ppm = 7,50$ (d, $J=7,8Hz$, 1H), 7,39 (d, $J=7,8Hz$, 1H), 7,12 (t, $J=7,2Hz$, 1H), 7,05 (t, $J=7,2Hz$, 1H), 6,74 (s, 1H), 6,62 (s, 1H), 4,38 (m, 1H), 4,35 (m, 1H), 4,27 (m, 1H), 4,18 (m, 2H), 3,24 (m, 2H), 3,16 (m, 3H), 3,06 (m, 3H), 1,83 (m, 1H), 1,68 (m, 4H), 1,47 (m, 3H), 1,37 (m, 2H), 1,25 (m, 3H), 1,21 (m, 3H).

Ví dụ 56: Điều chế 3S-6,7-đihydroxy-1,1-đimetyl-1,2,3,4-tetrahydro-isoquinolin-3-axyl-Lys(Pro-Ala-Tyr) (5Ad)

Thực hiện theo phương pháp trong Ví dụ 53, 174 mg (74%) hợp chất theo tiêu đề ở dạng bột màu vàng nhạt được điều chế từ 303 mg (0.34 mmol) 3S-6,7-đihydroxy-1,1-đimetyl-1,2,3,4-tetrahydro-isoquinolin-3-axyl-Lys(Boc-Pro-Ala-Tyr)-OBzl. Mp 200,5-202,8 °C; $[\alpha]_D^{25} = -2,3$ ($c = 0,25$, CH₃OH); ESI-MS (m/e): 695 [M-H]⁻; IR(KBr): 3215,3, 3055,2, 2983,8, 2947,2, 1658,8, 1548,8, 1523,8, 1448,5, 1384,9, 1238,3, 1163,1, 657,7; ¹HNMR (300 MHz, D₂O) $\delta/ppm = 6,98$ (m, 2H), 6,92 (m, 3H), 6,65(s, 1H), 4,34-4,26 (m, 6H), 3,27 (m, 2H), 3,15 (m, 1H), 3,08 (m, 1H), 2,96 (m, 2H), 2,85 (m, 12H), 1,89 (m, 5H), 1,70 (s, 3H), 1,51 (m, 3H), 1,33 (m, 3H), 1,25 (m, 4H).

Ví dụ 57: Điều chế 3S-6,7-đihydroxy-1,1-đimetyl-1,2,3,4-tetrahydro-isoquinolin-3-axyl-Lys(Pro-Ala-Pro) (5Ae)

Thực hiện theo phương pháp trong Ví dụ 53, 179 mg (78%) hợp chất theo tiêu đề ở dạng bột màu vàng nhạt được điều chế từ 301 mg (0.36 mmol) 3S-6,7-đihydroxy-1,1-đimetyl-1,2,3,4-tetrahydro-isoquinolin-3-axyl-Lys(Boc-Pro-Ala-Pro)-OBzl. Mp 204,8-205,4 °C; $[\alpha]_D^{25} = -5,0$ ($c = 0,25$, CH₃OH); ESI-MS (m/e): 629 [M-H]⁻; IR(KBr): 3244,3, 3070,7, 2980,1, 2947,2, 1662,6, 1639,5, 1554,6, 1450,5, 1379,1, 1246,1, 1201,6, 1047,3, 995,3, 871,8, 657,7; ¹HNMR (300 MHz, D₂O) $\delta/ppm = 6,78$ (s, 1H), 6,68 (s, 1H), 4,57 (m, 1H), 4,39-4,33 (m, 5H), 3,74 (m, 1H), 3,60 (m, 1H), 3,26 (m, 2H), 3,17 (m, 1H), 3,04 (m, 2H), 2,19 (m, 3H), 1,85 (m, 5H), 1,69 (m, 4H), 1,54 (m, 6H), 1,36 (m, 6H).

Ví dụ 58: Điều chế 3S-6,7-đihydroxy-1,1-đimetyl-1,2,3,4-tetrahydro-isoquinolin-3-axyl-Lys(Pro-Ala-Phe) (5Af)

Thực hiện theo phương pháp trong Ví dụ 53, 183 mg (78%) hợp chất theo tiêu đề ở dạng bột màu vàng nhạt được điều chế từ 300 mg (0.34 mmol) 3S-6,7-đihydroxy-1,1-đimetyl-1,2,3,4-tetrahydro-isoquinolin-3-axyl-Lys(Boc-Pro-Ala-Phe)-OBzl. Mp 175,8-

178,2 °C; $[\alpha]_D^{25} = -3,3$ ($c = 0,25$, CH₃OH); ESI-MS (m/e): 679 [M-H]⁻; IR(KBr): 3215,3, 3049,5, 2949,2, 1662,6, 1539,2, 1454,3, 1394,5; ¹HNMR (300 MHz, D₂O) $\delta/ppm = 7,26$ (m, 3H), 7,14 (m, 2H), 6,77 (s, 1H), 6,65 (s, 1H), 4,39-4,33 (m, 3H), 4,03 (m, 3H), 3,42 (m, 1H), 3,37 (m, 1H), 3,29 (m, 2H), 3,17 (m, 1H), 3,09 (m, 4H), 2,95 (m, 3H), 1,91 (m, 5H), 1,74 (s, 3H), 1,53 (s, 3H), 1,33 (m, 6H).

Ví dụ 59: Điều chế 3S-6,7-đihydroxy-1,1-đimetyl-1,2,3,4-tetrahydro-isoquinolin-3-axyl-Lys(Pro-Ala-Gly) (5Ag)

Thực hiện theo phương pháp trong Ví dụ 53, 193 mg (85%) hợp chất theo tiêu đề ở dạng bột không màu được điều chế từ 300 mg (0.38 mmol) 3S-6,7-đihydroxy-1,1-đimetyl-1,2,3,4-tetrahydro-isoquinolin-3-axyl-Lys(Boc-Pro-Ala-Gly)-OBzl. Mp 196,4-199,5 °C; $[\alpha]_D^{25} = -3,0$ ($c = 0,25$, CH₃OH); ESI-MS (m/e): 588 [M-H]⁻; IR(KBr): 3223,1, 3062,9, 2983,8, 1630,2, 1552,7, 1537,3, 1448,5, 1382,9, 1244,1, 1049,3, 1006,8, 869,9, 661,6; ¹HNMR (300 MHz, D₂O) $\delta/ppm = 6,77$ (s, 1H), 6,67 (s, 1H), 4,34-4,28 (m, 4H), 3,78 (s, 2H), 3,30 (m, 2H), 3,15 (m, 3H), 1,92 (m, 3H), 1,70 (s, 3H), 1,55 (s, 3H), 1,33 (m, 6H).

Ví dụ 60: Điều chế 3S-6,7-đihydroxy-1,1-đimetyl-1,2,3,4-tetrahydro-isoquinolin-3-axyl-Lys(Pro-Ala-Ser) (5Ah)

Thực hiện theo phương pháp trong Ví dụ 53, 181 mg (79%) hợp chất theo tiêu đề ở dạng bột màu vàng nhạt được điều chế từ 300 mg (0.37 mmol) 3S-6,7-đihydroxy-1,1-đimetyl-1,2,3,4-tetrahydro-isoquinolin-3-axyl-Lys(Boc-Pro-Ala-Ser)-OBzl. Mp 195,6-197,4 °C; $[\alpha]_D^{25} = -3,8$ ($c = 0,25$, CH₃OH); ESI-MS (m/e): 619 [M-H]⁻; IR(KBr): 3228,8, 3061,0, 2981,9, 2943,4, 1732,1, 1662,6, 1550,7 1533,3, 1448,5, 1384,9, 1244,1, 1159,2, 1049,3, 869,9, 657,7, 518,8; ¹HNMR (300 MHz, D₂O) $\delta/ppm = 6,78$ (s, 1H), 6,67 (s, 1H), 4,41-4,26 (m, 5H), 3,74 (m, 2H), 3,25-3,13 (m, 6H), 1,91 (m, 3H), 1,69 (s, 3H), 1,55 (m, 3H), 1,46 (m, 2H), 1,37 (m, 6H).

Ví dụ 61: Điều chế 3S-6,7-đihydroxy-1,1-đimetyl-1,2,3,4-tetrahydro-isoquinolin-3-axyl-Lys(Pro-Ala-Ile) (5Ai)

Thực hiện theo phương pháp trong Ví dụ 53, 181 mg (78%) hợp chất theo tiêu đề ở dạng bột không màu được điều chế từ 302 mg (0.36 mmol) 3S-6,7-đihydroxy-1,1-đimetyl-1,2,3,4-tetrahydro-isoquinolin-3-axyl-Lys(Boc-Pro-Ala-Ile)-OBzl. Mp 175,6-178,4 °C; $[\alpha]_D^{25} = -3,3$ ($c = 0,25$, CH₃OH); ESI-MS (m/e): 645 [M-H]⁻; IR(KBr): 3224,9, 3057,2, 2970,4, 2758,2, 2497,8, 2360,87, 1656,9, 1535,3, 1454,3, 1388,7, 1244,1, 1159,1, 1037,7, 871,8, 659,6; ¹HNMR (300 MHz, D₂O) $\delta/ppm = 6,79$ (s, 1H), 6,68 (s, 1H), 4,42 (m, 1H), 4,35 (m, 1H), 4,29 (m, 1H), 4,18 (m, 1H), 3,92 (d, J=1,2Hz, 1H),

3,31 (m, 2H), 3,19 (m, 2H), 3,10 (m, 3H), 2,34 (m, 1H), 2,12 (m, 1H), 1,74 (m, 4H), 1,57 (m, 3H), 1,36 (m, 6H), 1,21 (m, 2H), 0,84 (m, 9H).

Ví dụ 62: Điều chế 3S-6,7-đihydroxy-1,1-đimetyl-1,2,3,4-tetrahydro-isoquinolin-3-axyl-Lys(Pro-Ala-Thr) (5Aj)

Thực hiện theo phương pháp trong Ví dụ 53, 175 mg (76%) hợp chất theo tiêu đề ở dạng bột màu vàng nhạt được điều chế từ 300 mg (0.36 mmol) 3S-6,7-đihydroxy-1,1-đimetyl-1,2,3,4-tetrahydro-isoquinolin-3-axyl-Lys(Boc-Pro-Ala-Thr)-OBzl. Mp 194,8-197,5 °C; $[\alpha]_D^{25} = -2,8$ (c = 0,25, CH₃OH); ESI-MS (m/e): 633 [M-H]⁻; IR(KBr): 3236,5, 3066,8, 2933,7, 1660,7, 1548,8, 1533,4, 1450,8, 1381,0, 1240,2, 1157,3, 1049,3, 869,9, 669,3; ¹HNMR (300 MHz, D₂O) δ/ppm = 6,81 (s, 1H), 6,71 (s, 1H), 4,43-4,31 (m, 4H), 4,11 (m, 2H), 3,33 (m, 2H), 3,24 (m, 1H), 3,24 (m, 2H), 3,21 (m, 1H), 3,18 (m, 1H), 3,09 (m, 1H), 1,94 (m, 3H), 1,74 (s, 3H), 1,58 (s, 3H), 1,51 (m, 2H), 1,23 (m, 1H), 1,19 (m, 1H), 1,14 (m, 3H).

Ví dụ 63: Điều chế 3S-6,7-đihydroxy-1,1-đimetyl-1,2,3,4-tetrahydro-isoquinolin-3-axyl-Lys(Pro-Ala-Lys) (5Ak)

Thực hiện theo phương pháp trong Ví dụ 53, 152 mg (75%) hợp chất theo tiêu đề ở dạng bột màu vàng xám được điều chế từ 305 mg (0.31 mmol) 3S-6,7-đihydroxy-1,1-đimetyl-1,2,3,4-tetrahydro-isoquinolin-3-axyl-Lys[Boc-Pro-Ala-Lys(Z)]-OBzl. Mp 185,6-188,1 °C; $[\alpha]_D^{25} = -1,8$ (c = 0,25, CH₃OH); ESI-MS (m/e): 660 [M-H]⁻; IR(KBr): 3853,7, 3738,1, 2956,8, 2349,3, 2017,5, 1668,4, 1537,3, 1400,3, 1257,6, 1043,5, 871,8, 671,2; ¹HNMR (300 MHz, D₂O) δ/ppm = 6,80 (s, 1H), 6,69 (s, 1H), 4,45 (m, 1H), 4,35 (m, 1H), 4,29 (m, 1H), 4,18 (m, 2H), 3,73 (m, 2H), 3,22-3,13 (m, 8H), 3,09 (m, 4H), 2,95 (m, 1H), 1,93 (m, 6H), 1,74 (m, 9H), 1,58 (m, 6H), 1,47 (m, 2H), 1,32-1,27 (m, 16H), 1,18 (m, 2H).

Ví dụ 64: Điều chế 3S-6,7-đihydroxy-1,1-đimetyl-1,2,3,4-tetrahydro-isoquinolin-3-axyl-Lys(Pro-Ala-Leu) (5Al)

Thực hiện theo phương pháp trong Ví dụ 53, 178 mg (77%) hợp chất theo tiêu đề ở dạng bột không màu được điều chế từ 300 mg (0.36 mmol) 3S-6,7-đihydroxy-1,1-đimetyl-1,2,3,4-tetrahydro-isoquinolin-3-axyl-Lys(Boc-Pro-Ala-Leu)-OBzl. Mp 189,7-192,7 °C; $[\alpha]_D^{25} = -3,5$ (c = 0,25, CH₃OH); ESI-MS (m/e): 645 [M-H]⁻; IR(KBr): 3224,9, 3064,9, 2956,8, 1660,7, 1548,8, 1535,3, 1448,5, 1381,0, 1242,2, 1049,3, 997,2, 869,9, 669,3; ¹HNMR (300 MHz, D₂O) δ/ppm = 6,78 (s, 1H), 6,68 (s, 1H), 4,38-4,29 (m, 3H), 4,13 (m, 2H), 3,31 (m, 3H), 3,21 (m, 1H), 3,08 (m, 2H), 1,89 (m, 4H), 1,70 (s, 3H), 1,57 (m, 4H), 1,46 (m, 5H), 1,32 (m, 6H), 1,32 (m, 1H), 1,16 (m, 6H).

Ví dụ 65: Điều chế 3S-6,7-đihydroxy-1,1-đimetyl-1,2,3,4-tetrahydro-isoquinolin-3-axyl-Lys(Pro-Ala-Gln) (5Am)

Thực hiện theo phương pháp trong Ví dụ 53, 184 mg (79%) hợp chất theo tiêu đề ở dạng bột không màu được điều chế từ 300 mg (0,35 mmol) 3S-6,7-đihydroxy-1,1-đimetyl-1,2,3,4-tetrahydro-isoquinolin-3-axyl-Lys(Boc-Pro-Ala-Gln)-OBzl. Mp 181,3-183,3 °C; $[\alpha]_D^{25} = -3,0$ ($c = 0,25$, CH₃OH); ESI-MS (m/e): 660 [M-H]⁻; IR(KBr): 3213,4, 3059,1, 2981,9, 2943,4, 2362,8, 1739,8, 1662,6, 1548,8, 1537,3, 1450,5, 1375,3, 1244,1, 1047,2, 871,8, 659,7; ¹HNMR (300 MHz, D₂O) $\delta/ppm = 6,80$ (s, 1H), 6,69 (s, 1H), 4,40-4,29 (m, 5H), 3,33 (m, 3H), 3,17 (m, 3H), 1,90 (m, 2H), 1,69 (s, 3H), 1,55 (s, 3H), 1,43 (m, 2H), 1,31 (m, 8H).

Ví dụ 66: Điều chế 3S-6,7-đihydroxy-1,1-đimetyl-1,2,3,4-tetrahydro-isoquinolin-3-axyl-Lys(Pro-Ala-Asn) (5An)

Thực hiện theo phương pháp trong Ví dụ 53, 174 mg (78%) hợp chất theo tiêu đề ở dạng bột không màu được điều chế từ 302 mg (0,36 mmol) 3S-6,7-đihydroxy-1,1-đimetyl-1,2,3,4-tetrahydro-isoquinolin-3-axyl-Lys(Boc-Pro-Ala-Asn)-OBzl. Mp 202,5-204,7 °C; $[\alpha]_D^{25} = -2,3$ ($c = 0,25$, CH₃OH); ESI-MS (m/e): 646 [M-H]⁻; IR(KBr): 3207,6, 3059,1, 2943,3, 1674,2, 1537,3, 1448,5, 1381,0, 1247,9, 642,3; ¹HNMR (300 MHz, D₂O) $\delta/ppm = 6,78$ (s, 1H), 6,67 (s, 1H), 4,48 (m, 1H), 4,42-4,29 (m, 4H), 3,29 (m, 2H), 3,16 (m, 4H), 2,65 (m, 2H), 1,90 (m, 2H), 1,69 (s, 3H), 1,55 (s, 3H), 1,31 (m, 6H).

Ví dụ 67: Điều chế 3S-6,7-đihydroxy-1,1-đimetyl-1,2,3,4-tetrahydro-isoquinolin-3-axyl-Lys(Pro-Ala-Asp) (5Ao)

Thực hiện theo phương pháp trong Ví dụ 53, 174 mg (83%) hợp chất theo tiêu đề ở dạng bột không màu được điều chế từ 300 mg (0,32 mmol) 3S-6,7-đihydroxy-1,1-đimetyl-1,2,3,4-tetrahydro-isoquinolin-3-axyl-Lys[Boc-Pro-Ala-Asp(OBzl)]-OBzl. Mp 207,1-209,7 °C; $[\alpha]_D^{25} = -3,5$ ($c = 0,25$, CH₃OH); ESI-MS (m/e): 647 [M-H]⁻; IR(KBr): 3383,3, 3061,0, 2360,9, 1670,3, 1550,8, 1448,5, 1400,3, 1246,3, 873,8, 611,4; ¹HNMR (300 MHz, D₂O) $\delta/ppm = 6,76$ (s, 1H), 6,66 (s, 1H), 4,52 (m, 1H), 4,37-4,281 (m, 4H), 3,27 (m, 4H), 3,13 (m, 1H), 3,05 (m, 1H), 2,76 (m, 2H), 1,97 (m, 1H), 1,90 (m, 1H), 1,71 (s, 3H), 1,55 (s, 3H), 1,43 (m, 2H), 1,31 (m, 6H).

Ví dụ 68: Điều chế 3S-6,7-đihydroxy-1,1-đimetyl-1,2,3,4-tetrahydro-isoquinolin-3-axyl-Lys(Pro-Ala-Glu) (5Ap)

Thực hiện theo phương pháp trong Ví dụ 53, 173 mg (82%) hợp chất theo tiêu đề ở dạng bột không màu được điều chế từ 301 mg (0,32 mmol) 3S-6,7-đihydroxy-1,1-đimetyl-1,2,3,4-tetrahydro-isoquinolin-3-axyl-Lys[Boc-Pro-Ala-Glu(OBzl)]-OBzl. Mp 194,7-196,1 °C; $[\alpha]_D^{25} = -2,3$ ($c = 0,25$, CH₃OH); ESI-MS (m/e): 661 [M-H]⁻; IR(KBr): 3053,3, 2945,3, 2370,5, 2320,4, 1651,1, 1546,9, 1533,4, 1448,5, 1388,8, 1240,2, 1165,0, 1045,4, 644,2; ¹HNMR (300 MHz, D₂O) $\delta/ppm = 6,78$ (s, 1H), 6,67 (s, 1H),

4,42-4,28 (m, 5H), 3,29 (m, 2H), 3,13 (m, 3H), 2,99 (m, 1H), 2,38 (m, 2H), 2,29 (m, 1H), 1,90 (m, 5H), 1,69 (s, 3H), 1,55 (s, 3H), 1,31 (m, 6H).

Ví dụ so sánh 1: Điều chế 3S-6,7-đihydroxy-1,1-dimetyl-1,2,3,4-tetrahydro-isoquinolin-3-acyl-Lys (6)

Thực hiện các bước theo phương pháp trong Ví dụ 4, 620 mg (85%) hợp chất theo tiêu đề ở dạng rắn màu hồng nhạt được điều chế từ 1,0 g (2,03 mmol) 3S-6,7-đihydroxy-1,1-dimetyl-1,2,3,4-tetrahydro-isoquinolin-3-acyl-Lys-OBzl. Hợp chất 6 này được sử dụng làm nhóm điều khiển trong các ví dụ thử nghiệm dưới đây. ESI-MS(m/e): 363[M-H]⁻.

Ví dụ thử nghiệm 1: Đánh giá hoạt tính làm tan huyết khối của các hợp chất 5Aa-p trong sáng chế thông qua điều trị tĩnh mạch.

1) Phương pháp đánh giá

Các con chuột đực SD nặng 200-220 g được gây tê bằng 20% dung dịch uretan (6 mL/kg, ip). Các con chuột đã gây tê được cố định nằm ngửa và động mạch cảnh chung bên phải được tách ra, được kẹp ở đầu gần bằng kẹp động mạch, và được xuyên qua bởi kim tại hai đầu tương ứng. Kim ở đầu xa được kẹp chặt bằng kẹp động mạch tại phần da/lông. Việc đưa ống thông vào được thực hiện ở đầu xa, kẹp động mạch được nới lỏng ra và khoảng 1 mL máu động mạch được chảy vào lọ thủy tinh EP 1 mL. 0,1 mL máu động mạch của chuột được bơm vào ống thủy tinh để đứng cố định (dài 15 mm, với đường kính trong là 2,5 mm và đường kính ngoài 0,5 mm, được làm kín bằng nắp cao su ở dưới đáy), ống đó được đưa ngay lập tức vào vít xoắn cố định huyết khối làm bằng thép không gỉ. Vít cố định huyết khối được làm bằng cuộn dây thép không gỉ có đường kính 0,2 mm, có một phần xoắn ốc dài 12 mm, gồm có 15 cuộn dây mỗi cái có đường kính 1,0 mm và phần thân dài 7,0 mm được nối với phần xoắn ốc và có hình dạng giống hình dấu hỏi. 40 phút sau khi máu đông lại, nắp cao su dưới đáy của ống thủy tinh được tháo ra, phần thân của vít cố định huyết khối được cố định bằng cái kẹp, và vít cố định huyết khối bọc lấy huyết khối được cẩn thận lấy ra khỏi ống thủy tinh và đem đi cân một cách chính xác.

Một ống nối tắt gồm có 3 đoạn. Đoạn giữa là ống polyetylen có độ dài 60 mm và đường kính trong là 3,5 mm. Hai đoạn ở hai đầu là ống polyetylen có độ dài 100 mm, đường kính trong là 1 mm và đường kính ngoài là 2 mm, một đầu được kéo dài để tạo thành chóp nhọn, với đường kính ngoài là 1,0 mm (được sử dụng để đưa vào trong động mạch cảnh của chuột hoặc ống thủy tinh), đầu còn lại được bọc bằng ống polyetylen có chiều dài 7 mm và đường kính ngoài là 3,5 mm (dày, được sử dụng để lồng vào ống polyetylen của đoạn giữa). Thành bên trong của ống ba đoạn được silyl hoàn toàn. Vít cố định huyết khối bọc lấy huyết khối được đặt vào trong ống polyetylen ở đoạn giữa,

và cả hai đầu của ống được bọc bằng đầu ống polyetylen dày. Ống được đổ đầy dung dịch heparin trong nước muối thường (50 IU/kg) thông qua đầu nhọn bằng cách sử dụng một bơm tiêm và sẵn sàng cho sử dụng.

Tĩnh mạch cảnh ngoài bên trái của chuột được tách ra và được xuyên bằng kim ở hai đầu tương ứng, và đầu xa được buộc thắt lại. Thực hiện cẩn thận một vết rạch hở trên tĩnh mạch cảnh ngoài bên trái, đầu nhọn của ống như đã chuẩn bị ở phần trước được lồng vào đầu gần của vết rạch trên tĩnh mạch cảnh ngoài bên trái, cách xa phần đầu của vít cố định huyết khối trong đoạn giữa của ống đi tắt (mà bao gồm cả trọng lượng chính xác của vít cố định huyết khối). Một lượng chính xác heparin trong nước muối (50 IU/kg) được bơm vào thông qua đầu nhọn bằng cách sử dụng một bơm tiêm. Lúc này, không cần rút bơm tiêm ra khỏi ống polyetylen, ống giữa bơm tiêm và ống polyetylen được kẹp bằng một cái kẹp cầm máu. Dòng máu được chặn lại bằng việc kẹp vào đầu gần của tĩnh mạch cảnh chung bên phải bằng kẹp tĩnh mạch và vết rạch được cắt cẩn thận ngang qua tĩnh mạch cảnh chung gần cái kẹp. Bơm tiêm được rút ra khỏi ống polyetylen thông qua đầu nhọn, và đầu nhọn của ống polyetylen sau đó được lồng vào đầu gần của vết rạch động mạch. Cả hai đầu của ống đi tắt được cố định với động mạch hoặc tĩnh mạch bằng các kim #4.

Một kim da đầu được dùng để đưa dung dịch nước muối, urokinase trong dung dịch nước muối hoặc nồng độ khác nhau của các hợp chất trong dung dịch nước muối thông qua phần giữa của ống đi tắt (mà bao gồm cả trọng lượng chính xác của vít cố định huyết khối) tới vị trí ở tĩnh mạch đầu gần và cách xa vít cố định huyết khối. Kẹp động mạch sau đó được tháo ra để cho máu chảy từ động mạch vào tĩnh mạch thông qua ống đi tắt. Chế độ làm tan huyết khối đi tắt từ động mạch sang tĩnh mạch của chuột được thiết lập. Dung dịch trong bơm tiêm được bơm từ từ vào máu (khoảng 6 mm), cho phép nước muối thông thường, urokinase (kiểm soát tích cực), hoặc các hợp chất của sáng chế phát huy tác dụng trên huyết khối trong vòng tuần hoàn máu theo thứ tự từ tĩnh mạch về tim và tới động mạch. Quá trình này được tính giờ từ lúc bắt đầu bơm vào và vít cố định huyết khối được bỏ ra khỏi ống đi tắt sau 1 giờ và được cân chính xác. Sự khác nhau về khối lượng của vít cố định huyết khối trong ống đi tắt trước và sau khi điều trị được xác định để đánh giá hoạt tính làm tan huyết khối trong ống nghiệm của các hợp chất. Trọng lượng giảm đi của huyết khối được thể hiện bằng giá trị trung bình và sai lệch chuẩn ($\bar{x} \pm SD$).

2) Phương pháp điều trị và liều lượng

Phương pháp điều trị là tiêm tĩnh mạch. Đối chứng tinh khiết là dung dịch nước muối thông thường, với liều 3 mL/kg. Đối chứng dương tính là urokinase và liều là

20.000 U/kg, bằng 1,68 mg/kg. Liều lượng của hợp chất 5Aa-p theo sáng chế này là 0,1 nmol/kg.

Kết quả đánh giá.

Hoạt tính làm tan huyết khối được thể hiện bằng sự suy giảm khối lượng của huyết khối ($\bar{x} \pm SD$ mg), và kết quả được liệt kê trong Bảng 1. Dữ liệu cho thấy rằng các hợp chất 5Aa-p ở liều 0,1 nmol/kg thông qua điều trị tiêm tĩnh mạch có thể dung giải hiệu quả huyết khối. ($p < 0,01$ so với dung dịch nước muối thông thường). Hoạt tính làm tan huyết khối của các hợp chất 5Aa, 5Af, 5Ag, 5Ak và 5Ao có khả năng so sánh được với urokinase ở liều 20.000 U/kg. Trong số các hợp chất có hoạt tính làm tan huyết khối cao hơn, 5Aa, 5Ad, 5Af, 5Ag và 5Ak, hợp chất 5Ak cho thấy có hoạt tính làm tan huyết khối là cao nhất, do vậy mối quan hệ liều lượng của nó cần được đánh giá thêm.

Bảng 1: Hoạt tính làm tan huyết khối của hợp chất 5Aa-P thông qua tiêm tĩnh mạch.

Hợp chất	Suy giảm khối lượng trong huyết khối	Hợp chất	Suy giảm khối lượng trong huyết khối
Dung dịch nước muối thường	$9,25 \pm 1,59$	urokinase	$18,95 \pm 2,73^a$
5Aa	$19,35 \pm 2,76^b$	Ai	$16,00 \pm 2,03^a$
5Ab	$17,12 \pm 1,64^a$	Aj	$15,23 \pm 2,45^a$
5Ac	$16,23 \pm 2,81^a$	Ak	$19,38 \pm 2,81^b$
5Ad	$18,11 \pm 2,48^b$	5Al	$14,65 \pm 2,86^a$
5Ae	$13,63 \pm 1,92^a$	5Am	$16,65 \pm 2,52^a$
5Af	$17,92 \pm 1,69^b$	5An	$16,44 \pm 2,32^a$
5Ag	$18,98 \pm 2,14^b$	5Ao	$15,86 \pm 2,21^a$
5Ah	$17,10 \pm 1,79^a$	5Ap	$16,03 \pm 2,14^a$
6	$13,87 \pm 3,07^a$	PAK	$14,17 \pm 1,84^a$
6 + PAK	$15,37 \pm 3,00^a$		

n=10;

a) $p < 0,01$ so với dung dịch nước muối thường;

b) $p < 0,01$ so với dung dịch nước muối thường; $p < 0,05$ so với hợp chất 6, PAK và hợp chất 6+PAK; $p > 0,05$ so với urokinase.

Ví dụ thử nghiệm 2: Đánh giá mối liên hệ liều lượng - hiệu quả đối với hoạt tính làm tan huyết khối của hợp chất 5Ak-p theo sáng chế thông qua điều trị tĩnh mạch.

Điều trị tiêm tĩnh mạch được thực hiện theo phương pháp trong ví dụ thử nghiệm 1. Đối chứng tinh khiết là dung dịch nước muối thường và liều là 3 mL/kg. Đối chứng dương tính là urokinase và liều là 20.000 U/kg, bằng 1,68 mg/kg. Các liều lượng cao,

trung bình và thấp của hợp chất 5Ak là 0,1 nmol/kg, 0,01 nmol/kg và 0,001 nmol/kg. Kết quả được thể hiện trong Bảng 2, dữ liệu cho thấy mối liên hệ rõ ràng giữa liều lượng - hiệu quả của hợp chất 5Ak.

Bảng 2: Mối liên hệ giữa liều lượng - hiệu quả về hoạt tính làm tan huyết khối của hợp chất 5Ak trong sáng chế.

Hợp chất	Suy giảm khối lượng trong huyết khối ($\bar{x} \pm SD$ mg)
Dung dịch nước muối thường, 3 mL/kg	$10,55 \pm 2,52$
Urokinase, 20.000 U/kg	$25,61 \pm 3,87$
5Ak, 0,1 nmol/kg	$21,61 \pm 4,62^a$
5Ak, 0,01 nmol/kg	$14,62 \pm 2,46^b$
5Ak, 0,001 nmol/kg	$11,73 \pm 2,15^c$

n=10;

a) $p < 0,01$ so với dung dịch nước muối thường và 0,01 nmol/kg 5Ak;

b) $p < 0,01$ so với dung dịch nước muối thường và 0,001 nmol/kg 5Ak;

c) $p > 0,05$ so với dung dịch nước muối thường.

Ví dụ thử nghiệm 3: Đánh giá hoạt tính làm tan huyết khối của các hợp chất 5Aa-p trong sáng chế này thông qua điều trị tĩnh mạch.

1) Phương pháp đánh giá.

Một ống gồm có ba đoạn. Đoạn giữa có độ dài 80 mm và đường kính trong là 3,5 mm. Hai đoạn ở hai đầu là cùng loại ống polyetylen có độ dài 100 mm, đường kính trong là 1 mm và đường kính ngoài là 2 mm, một đầu được kéo dài tạo thành mũi nhọn (sử dụng để đưa vào trong động mạch cảnh hoặc tĩnh mạch). Thành bên trong của cả ba đoạn được silyl hoàn toàn. Đoạn ren dài 60 mm cân trọng lượng trước được đặt vào đoạn giữa của ống polyetylen. Cả hai đầu ống rộng hơn được tạo ren ở đầu không bị thu hẹp thuộc hai ống polyetylen tương ứng (0,5 mm ren được giữ lại bởi một đầu của đoạn ống để cố định ren). Ống được đổ dung dịch heparin trong nước muối thường (50 IU/kg) thông qua đầu nhọn sử dụng bơm tiêm và sẵn sàng cho sử dụng.

Các con chuột đực SD nặng 200-220 g được gây tê bằng 20% dung dịch uretan (6 mL/kg; ip). Các con chuột đã gây tê được cố định nằm ngửa và tĩnh mạch cảnh ngoại biên bên trái được tách ra và được xuyên qua bằng một cái kim ở đầu gần và đầu xa tương ứng, đầu xa được buộc thắt lại. Thực hiện cẩn thận một vết rạch trên tĩnh mạch cảnh ngoại biên bên trái và đầu ống nhọn mà không giữ ren của ống đi tắt được chuẩn bị như mô tả ở phần trên được luồn vào đầu gần của vết rạch trên tĩnh mạch cảnh ngoại biên bên trái. Một lượng chính xác heparin trong nước muối thường (50 IU/kg) được tiêm vào thông qua đầu ống nhọn ở đầu kia bằng một bơm tiêm. Sau đó bơm tiêm được

thay thế và một lượng chính xác thuốc được bơm vào theo cách như vậy. Lúc này, không rút bơm tiêm ra khỏi ống etylen, động mạch cảnh chung bên phải được tách ra và đầu gần được kẹp bằng một cái kẹp động mạch. Động mạch cảnh chung bên phải được xuyên qua bằng một cái kim ở đầu gần và đầu xa tương ứng và đầu xa được thắt nút lại. Một vết rạch được thực hiện cẩn thận ngang qua động mạch cảnh chung bên phải gần với kẹp động mạch. Bơm tiêm rút ra sau đó được luồn vào đầu gần của vết rạch động mạch. Cả hai đầu của ống đi tắt được cố định với động mạch hoặc tĩnh mạch bằng các kim #4. Kẹp động mạch sau đó được tháo ra để máu chảy từ động mạch sang tĩnh mạch thông qua ống đi tắt. Chế độ đi tắt làm tan huyết khối đi từ động mạch sang tĩnh mạch của chuột được thiết lập. Quá trình được tính thời gian từ khi bắt đầu vòng tuần hoàn, phần ren có dính huyết khối được lấy ra khỏi ống đi tắt sau 15 phút và được cân chính xác. Sự khác nhau về trọng lượng của phần ren lúc trước và sau được xác định là trọng lượng ứ đọng của huyết khối, nó được phân tích có tính thống kê và được sử dụng để đánh giá hoạt tính chống huyết khối trong ống nghiệm. Khối lượng ứ đọng của huyết khối được thể hiện là giá trị trung bình và sai lệch chuẩn ($\bar{x} \pm SD$ mg).

2) Phương pháp điều trị và liều lượng.

Phương pháp điều trị là tiêm tĩnh mạch. Đối chứng tinh khiết là dung dịch nước muối thường và liều là 1 mL/kg. Đối chứng dương tính là atpirin và liều là 9 mg/kg. Liều lượng của hợp chất 5Aa-p theo sáng chế này là 0,1 nmol/kg.

3) Kết quả.

Hoạt tính chống huyết khối được thể hiện là khối lượng ứ đọng của huyết khối ($\bar{x} \pm SD$ mg), và kết quả được liệt kê trong Bảng 3. Dữ liệu ở đây cho biết rằng liều lượng của hợp chất 5Ak ở 0,1 nmol/kg thông qua điều trị tiêm tĩnh mạch có hiệu quả trong việc ngăn chặn hình thành huyết khối ($p < 0,001$, so với dung dịch nước muối thường), và mối liên hệ phụ thuộc vào liều lượng của 5Ak với hoạt tính cao hơn do đó được đánh giá thêm.

Bảng 3. Thử nghiệm chống huyết khối trong ống nghiệm của hợp chất 5Aa-p trong sáng chế này thông qua điều trị tĩnh mạch.

Hợp chất	Khối lượng ứ đọng của huyết khối ($\bar{x} \pm SD$ mg)	Hợp chất	Khối lượng ứ đọng của huyết khối ($\bar{x} \pm SD$ mg)
NS	65,40 $\pm$ 2,3	Atpirin	46,95 $\pm$ 5,21 ^a
5Aa	54,04 $\pm$ 6,43 ^a	5Ai	56,12 $\pm$ 5,55 ^a
5Ab	54,17 $\pm$ 6,61 ^a	5Aj	50,56 $\pm$ 3,96 ^a
5Ac	52,93 $\pm$ 3,96 ^a	5Ak	51,93 $\pm$ 2,74 ^a
5Ad	51,91 $\pm$ 4,97 ^a	5Al	54,20 $\pm$ 3,93 ^a
5Ae	57,20 $\pm$ 6,43 ^a	5Am	58,14 $\pm$ 2,30 ^a

5Af	54,01 ± 4,25 ^a	5An	55,11 ± 4,76 ^a
5Ag	54,28 ± 3,57 ^a	5Ao	48,34 ± 3,29 ^a
5Ah	50,67 ± 3,71 ^a	5Ap	49,97 ± 6,32 ^a

n=10; 5Aa-p (i.v.): 0,1 nmol/kg; Atpirin: 9 mg/kg;

a) p<0,001 so với NS.

Ví dụ thử nghiệm 4: Đánh giá mối liên hệ giữa liều lượng - hiệu quả về hoạt tính làm tan huyết khối của các hợp chất 5Ak trong sáng chế này thông qua điều trị tĩnh mạch.

1) Phương pháp đánh giá.

Phương pháp giống như trong Ví dụ thử nghiệm 3.

2) Phương pháp điều trị bằng thuốc và liều lượng.

Phương pháp điều trị bằng thuốc là hình thức tiêm tĩnh mạch. Đối chứng tính khiết là dung dịch nước muối thông thường với liều lượng là 3 mL/kg. Đối chứng dương tính là atpirin và liều lượng là 9 mg/kg. Liều cao, trung bình và thấp của hợp chất 5Ak lần lượt là 0,1 nmol/kg, 0,01 nmol/kg và 0,001 nmol/kg.

3) Kết quả.

Kết quả được liệt kê trong Bảng 4 và hợp chất 5Ak cho biết rất rõ mối liên hệ giữa liều lượng - hiệu quả.

Bảng 4: Mối liên hệ giữa liều lượng - hiệu quả trong ống nghiệm về hoạt tính chống huyết khối của hợp chất 5Ak trong sáng chế này.

Hợp chất	Khối lượng ứ đọng của huyết khối ($\bar{x} \pm SD$ mg)
NS	63,46 ± 3,67
Atpirin	45,62 ± 2,60
5Ak, 0,1 nmol/kg	52,16 ± 2,02 ^a
5Ak, 0,01 nmol/kg	57,34 ± 3,73 ^b
5Ak, 0,001 nmol/kg	61,91 ± 3,27 ^c

n= 10;

a) p<0,01 so với dung dịch nước muối thường và 0,01 nmol/kg 5Ak;

b) p<0,01 so với dung dịch nước muối thường và 0,001 nmol/kg;

c) p>0,05 so với dung dịch nước muối thường.

Ví dụ thử nghiệm 5: Đánh giá khả năng điều trị của hợp chất 5Ak trong sáng chế trên chuột đột quy.

Để đánh giá hiệu quả điều trị của hợp chất 5Aa-p ở chuột bị đột quy, hợp chất 5Ak được chọn làm đại diện và hiệu quả điều trị của nó đối với chuột bị đột quy được đánh giá bằng phương pháp dưới đây.

1) Phương pháp đánh giá.

Những con chuột đực SD (nặng 280-300 g) được chia ngẫu nhiên thành nhóm đối chứng dương UK ở liều 20.000 IU/kg, đối chứng tinh khiết cùng với dung dịch nước muối thường, nhóm đối chứng hợp chất với PAK ở liều 5 $\mu\text{mol/kg}$, và nhóm hợp chất 5Ak ở liều 1 $\mu\text{mol/kg}$ (liều cao), 0,1 $\mu\text{mol/kg}$ (liều trung bình) và 0,01 $\mu\text{mol/kg}$ (liều thấp). 10% dung dịch cloral hydrat (400 mg/kg) được tiêm vào màng bụng chuột để gây mê. Một vết rạch dọc khoảng 2 cm theo chiều dài được thực hiện ở bên phải gần giữa cổ và động mạch cảnh chung bên phải (CCA), động mạch cảnh kéo dài (ECA) và động mạch cảnh trong (ICA) được tách dọc mép phía bên trong của cơ ức đòn-chũm. Vết rạch ở động mạch cảnh trong và đầu gần của động mạch cảnh chung được kẹp lại tương ứng bằng kẹp động mạch không xâm lấn. Một vết rạch nhỏ được thực hiện trên động mạch cảnh ngoài và đầu xa của động mạch cảnh ngoài được thắt nút lại. Kẹp động mạch ở đầu gần của động mạch cảnh chung được nhả ra, để cho 10 μl máu chảy xuống. Sau khi máu đã chảy xuống, thì đầu gần của động mạch cảnh chung được kẹp lại bằng kẹp động mạch không xâm lấn. 10 μl máu chảy xuống được đặt vào trong lọ EP 1 mL và giữ ở RT trong 30 phút để máu được đông lại sau đó chuyển sang tủ đông -20°C trong 1 giờ để tạo thành dạng đông đặc. 1 giờ sau đó, các cục máu được lấy ra, 1 mL nước muối thường được bổ sung vào, tiếp theo các cục máu được làm vỡ ra thành các cục máu siêu nhỏ bởi que trộn bằng thép. Huyền phù huyết khối nhỏ sau đó được chuyển vào bơm tiêm 1 mL để sử dụng. Khi kẹp trên động mạch cảnh trong của chuột được nhả ra, thì huyền phù huyết khối nhỏ trong bơm tiêm 1 mL được bơm từ từ qua động mạch cảnh ngoài của chuột tới đầu gần của động mạch cảnh ngoài, sau đó được bơm vào não của chuột thông qua động mạch cảnh trong. Tiếp theo, đầu gần của động mạch cảnh ngoài được thắt nút lại, các kẹp động mạch trên động mạch cảnh trong và động mạch cảnh chung được nhả ra và máu được chảy trở lại. Các tĩnh mạch cổ được tách ra sau đó được tiêm vào UK với liều 20.000 IU/kg, dung dịch nước muối thường hoặc hợp chất 5Ak với liều 1 $\mu\text{mol/kg}$. Tĩnh mạch được thắt nút lại, 3 giọt penexillin được nhỏ vào vết rạch. Vết rạch sau đó được khâu lại và con chuột được chờ cho đến khi tỉnh lại.

24 giờ sau khi chuột tỉnh lại, mức độ phá hủy về chức năng thần kinh được đánh giá bằng phương pháp Zealanga. Điểm 0 thể hiện là không có dấu hiệu suy giảm về chức năng thần kinh, điểm 1 thể hiện là chân trước ở bên không bị tổn thương không thể duỗi ra được, điểm 2 thể hiện là đi về phía không bị tổn thương, điểm 3 thể hiện là đuôi theo đuôi vòng tròn về phía bên không bị tổn thương, điểm 4 thể hiện là không tự đi với sự không tự chủ và điểm 5 thể hiện là chết. Kết quả đánh giá được thống kê phân tích và theo phép kiểm tra T (t-test).

Sau khi chuột đã tỉnh 24 giờ và được đánh giá mức độ phá hủy chức năng thần kinh bằng phương pháp Zealanga, chuột được gây mê bằng uretan sau đó được cắt đầu ngay lập tức và lấy não. Các mô não được giữ ở trong tủ đông - 20°C trong vòng 2 giờ và vành đầu khoảng 2 mm được cắt ra thành công từ phần trán tổng cộng là 5 phần và sau đó được đặt vào trong dung dịch TTC 2% để ủ không có ánh sáng ở nhiệt độ 37°C trong 30 phút. Sự thay đổi màu sắc trong các phần não được quan sát: các mô não bình thường có màu đỏ do TTC, trong khi các mô não bị thiếu máu xuất hiện màu trắng. Hình ảnh được chụp bằng máy ảnh kỹ thuật số và được xử lý bằng phần mềm thống kê hình ảnh, khối lượng nhồi máu trong các mô não và khu vực các mô não bình thường ở phần vành đầu được tính toán. Tỷ lệ khối lượng nhồi máu não của từng nhóm được tính toán thống kê và theo phép thử T (t-test).

2) Kết quả đánh giá.

Dữ liệu đánh giá theo phương pháp Zealanga sau khi các con chuột tỉnh lại được liệt kê trong Bảng 5. Phần trăm của khối lượng nhồi máu não được liệt kê trong Bảng 6.

Bảng 5: Đánh giá theo phương pháp Zealanga sau khi chuột tỉnh lại 24 giờ.

Hợp chất	Điểm số chức năng thần kinh ($\bar{x} \pm SD$)
Dung dịch nước muối thường	2,90 $\pm$ 0,99
Urokinase, 20000 IU/kg	1,30 $\pm$ 0,95 ^a
5Ak, 1 μ mol/kg	1,10 $\pm$ 0,74 ^a
5Ak, 0,1 μ mol/kg	1,40 $\pm$ 1,07 ^b
5Ak, 0,01 μ mol/kg	2,30 $\pm$ 0,95 ^c
PAK, 5 μ mol/kg	2,20 $\pm$ 1,60

n = 9;

a) $p < 0,05$ so với dung dịch nước muối thường và 0,1 μ mol/kg 5Ak;

b) $p < 0,05$ so với dung dịch nước muối thường và 0,01 μ mol/kg 5Ak;

c) $p > 0,05$ so với dung dịch nước muối thường và 5 μ mol/kg PAK.

Bảng 6: Phần trăm khối lượng nhồi máu não ở chuột.

Hợp chất	Phần trăm khối lượng nhồi máu ($\bar{x} \pm SD\%$)
Dung dịch nước muối thường	22,99 $\pm$ 5,08
Urokinase, 20000 IU/kg	4,60 $\pm$ 2,09
5Ak, 1 μ mol/kg	3,44 $\pm$ 1,99 ^a
5Ak, 0,1 μ mol/kg	9,88 $\pm$ 2,52 ^b
5Ak, 0,01 μ mol/kg	18,05 $\pm$ 5,77 ^c

n=7;

a) $p < 0,01$ so với dung dịch nước muối thường, $p < 0,05$ so với 0,1 $\mu\text{mol/kg}$ 5Ak, $p > 0,05$ so với urokinase;

b) $p < 0,05$ so với dung dịch nước muối thường và 0,1 $\mu\text{mol/kg}$ 5Ak;

c) $p > 0,05$ so với dung dịch nước muối thường.

Dữ liệu trên Bảng 5 và Bảng 6 cho biết rằng hợp chất 5Ak có hiệu quả trong việc ngăn chặn thiếu máu cục bộ ở chuột từ khi xảy ra rối loạn vận động và nhồi máu não. Chức năng này của 5Ak là phụ thuộc vào liều lượng.

Ví dụ thử nghiệm 6: Đánh giá khả năng loại bỏ gốc tự do của hợp chất 5Aa-p trong sáng chế.

1) Hoạt tính loại bỏ gốc tự do hydroxyl.

11,316 mg DMPO (đi metylpyridin-N-oxit, Sigma) được hòa tan trong 1 mL nước nguyên chất để có được dung dịch 0,1 M DMPO. 2,78 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ được hòa tan trong 1 mL nước nguyên chất để có được dung dịch 10 mM. 30% H_2O_2 y tế được pha loãng thành 0,2%.

Chiều cao đỉnh thứ nhất của tín hiệu OH của dung dịch 2,5 μL $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ + 2,5 μL dung dịch DMPO + 5 μL nước được đo và lặp lại 6 lần. Chiều cao đỉnh này được xác định là chiều cao đỉnh của tín hiệu OH. Chiều cao đỉnh thứ nhất của tín hiệu OH của dung dịch 2,5 μL $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ + 2,5 μL dung dịch DMPO + 5 μL dung dịch H_2O_2 + 5 μL dung dịch của một trong các hợp chất 5Aa-p được đo và lặp lại 6 lần. Chiều cao đỉnh này được xác định là chiều cao đỉnh của tín hiệu OH được làm sạch bởi một trong các hợp chất 5Aa-p.

Tỷ lệ làm sạch = (chiều cao đỉnh của tín hiệu OH đã biết - chiều cao đỉnh của tín hiệu OH còn lại của các hợp chất 5Aa-p) / chiều cao đỉnh của tín hiệu OH đã biết.

2) Hoạt tính loại bỏ gốc tự do NO.

7,325 mg MGD (N-metyl-glucamin đitiocacbammat, Sigma) được hòa tan trong 1 mL nước nguyên chất để có được dung dịch 25 mM MGD. 3,475 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ được hòa tan trong 1 mL nước nguyên chất để có 12,5 mM dung dịch. 25 mg SNAP (S-Nitroso-axetyl penicilamin) được hòa tan trong 1 mL nước nguyên chất để có được 110 μM nước cái màu xanh, mà được pha loãng 100 lần để có được 1 μM dung dịch SNAP.

Chiều cao đỉnh thứ nhất của tín hiệu NO của 5 μL dung dịch MGD + 5 μL dung dịch $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ + 5 μL dung dịch SNAP + 5 μL nước được đo và lặp lại 6 lần. Chiều cao đỉnh này được xác định là chiều cao đỉnh đã biết của tín hiệu NO. Chiều cao đỉnh thứ nhất của tín hiệu NO của 5 μL dung dịch MGD + 5 μL dung dịch $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ + 5 μL dung dịch SNAP + 5 μL dung dịch của một trong các hợp chất 5Aa-p được đo và lặp

lại 6 lần. Chiều cao đỉnh này được xác định là chiều cao đỉnh còn lại của tín hiệu NO được làm sạch bởi một trong các hợp chất 5Aa-p.

Tỷ lệ làm sạch = (chiều cao đỉnh của tín hiệu NO đã biết - chiều cao đỉnh còn lại của tín hiệu NO thuộc các hợp chất 5Aa-p) / chiều cao đỉnh của tín hiệu NO đã biết.

3) Hoạt tính loại bỏ gốc tự do superoxit anionic.

0,3 g xantin được pha loãng trong 1 mL nước nguyên chất để có được 0,5 M dung dịch xantin (màu trắng sữa, phần lớn không tan). Dung dịch thương mại có sẵn của xantin oxidaza được pha loãng 10 lần để có được dung dịch xantin oxidaza. Dung dịch DETAPAC bão hòa được pha loãng 20 lần để có được dung dịch 0,9 mM. 11,316 mg DMPO được pha loãng trong 1 mL nước nguyên chất để có được 0,1 M dung dịch DMPO.

5 μ L dung dịch DMPO + 5 μ L dung dịch DETAPAC + 5 μ L dung dịch xantin + 5 μ L dung dịch xantin oxidaza + 5 μ L dung dịch các hợp chất 5Aa-p.

Chiều cao đỉnh thứ nhất của tín hiệu anion superoxit của 5 μ L dung dịch DMPO + 5 μ L dung dịch DETAPAC + 5 μ L dung dịch xantin + 5 μ L dung dịch xantin oxidaza + 5 μ L nước được đo và lặp lại 6 lần. Chiều cao đỉnh này được xác định là chiều cao đỉnh đã biết của tín hiệu anion superoxit: Chiều cao đỉnh thứ nhất của tín hiệu anion superoxit của 5 μ L dung dịch DMPO + 5 μ L dung dịch DETAPAC + 5 μ L dung dịch xantin + 5 μ L dung dịch xantin oxidaza + 5 μ L dung dịch thuộc một trong các hợp chất 5Aa-p được đo và lặp lại 6 lần. Chiều cao đỉnh này được xác định là chiều cao đỉnh còn lại của tín hiệu anion superoxit được làm sạch bởi một trong các hợp chất 5Aa-p.

Tỷ lệ làm sạch = (chiều cao đỉnh của tín hiệu anion superoxit đã biết - chiều cao đỉnh còn lại của tín hiệu anion superoxit của các hợp chất 5Aa-p) / chiều cao đỉnh của tín hiệu anion superoxit đã biết.

Kết quả được liệt kê trong Bảng 7. Dữ liệu này cho biết rằng EC₅₀ của các hợp chất 5Aa-p đối với ba hoạt tính loại bỏ gốc tự do là 0,4 - 0,7 mM. Các hợp chất 5Aa-p rõ ràng là có hoạt tính loại bỏ gốc tự do.

Bảng 7: EC₅₀ của các hợp chất 5Aa-p đối với hoạt tính loại bỏ gốc tự do.

Hợp chất	EC ₅₀ của việc làm sạch gốc tự do dưới đây ($\bar{x} \pm SD \times 10^{-4}$ M)		
	NO	OH	Gốc superoxit anionic
5Aa	5,99 $\pm$ 0,38	4,59 $\pm$ 0,66	4,77 $\pm$ 0,56
5Ab	5,32 $\pm$ 0,73	4,71 $\pm$ 0,71	4,71 $\pm$ 0,34
5Ac	4,63 $\pm$ 0,92	3,78 $\pm$ 0,85	3,66 $\pm$ 0,71
5Ad	4,53 $\pm$ 0,41	3,69 $\pm$ 0,32	3,54 $\pm$ 0,71

5Ae	$6,17 \pm 0,88$	$4,66 \pm 0,47$	$4,81 \pm 0,45$
5Af	$5,68 \pm 0,95$	$5,44 \pm 0,43$	$4,85 \pm 0,31$
5Ag	$6,09 \pm 0,95$	$4,22 \pm 0,61$	$4,67 \pm 0,94$
5Ah	$5,23 \pm 0,85$	$4,13 \pm 0,73$	$4,01 \pm 0,72$
5Ai	$5,27 \pm 0,90$	$4,95 \pm 0,61$	$4,52 \pm 0,64$
5Aj	$5,10 \pm 0,75$	$4,16 \pm 0,28$	$4,17 \pm 0,95$
5Ak	$4,99 \pm 0,89$	$4,22 \pm 0,82$	$3,63 \pm 0,94$
5Al	$5,03 \pm 0,41$	$4,89 \pm 0,32$	$4,14 \pm 0,97$
5Am	$6,47 \pm 0,88$	$4,66 \pm 0,77$	$3,71 \pm 0,45$
5An	$6,59 \pm 0,89$	$5,72 \pm 0,72$	$3,83 \pm 0,94$
5Ao	$4,73 \pm 0,99$	$3,96 \pm 0,48$	$4,35 \pm 0,65$
5Ap	$4,77 \pm 0,91$	$4,0 \pm 0,51$	$4,20 \pm 0,73$

$n = 6$, $EC_{50} = X \pm SD$; nồng độ hợp chất là $X \times 10^{-4} M$

Ví dụ thử nghiệm 7: Quan sát TEM của hợp chất 5Aa-p theo sáng chế.

Các mẫu được chuẩn bị là dung dịch $1 \times 10^{-7} M$, $1 \times 10^{-9} M$, $1 \times 10^{-11} M$ bằng nước cất một cách tương ứng. Một lượng nhỏ (khoảng 10 μl) dung dịch được lấy và nhỏ giọt lên bề mặt lưới đồng có giấy lọc được đặt bên dưới, cho không khí khô. Hình thái học và kích cỡ hạt sau đó được quan sát bằng kính hiển vi phóng đại điện tử (JEOL, JEM- 1230) và được ghi lại bằng ảnh.

Ở dung dịch nước, các hợp chất 5Aa-p có thể tự lắp ráp để tạo thành cấu trúc siêu hình cầu có đường kính nằm trong khoảng 20 - 210 nm, trong đó đường kính tốt nhất nằm trong khoảng 20 - 100 nm. Các siêu hình cầu này được kết hợp để tạo thành các hình dạng lưới nano hoặc vòng nano khác nhau, v.v. Ví dụ, khi nồng độ trong ống nghiệm là $1 \times 10^{-9} M$ (nồng độ thuốc theo lý thuyết trong máu), ảnh chụp TEM được thể hiện tương ứng (Hình 9). Trong Hình 9, các hợp chất 5Aa-p lần lượt tương ứng với các số 5a, 5b, 5c, 5d, 5e, 5f, 5g, 5h, 5i, 5j, 5k, 5l, 5m, 5n, 5o và 5p.

Ví dụ thử nghiệm 8: Thử nghiệm điều trị liên tục với 1 $\mu mol/kg$ 5Ak trong 6 lần đối với chuột bị đột quỵ sau 4 giờ kể từ khi xuất hiện đột quỵ.

Hiệu quả điều trị được đánh giá bằng điểm số chức năng thần kinh. Điểm càng thấp thì hiệu quả điều trị càng cao. 10% dung dịch clora hydrat được tiêm vào màng bụng của chuột đực SD với liều 400 mg/kg tính theo trọng lượng cơ thể để gây mê. Một vết rạch theo chiều dọc được thực hiện ở giữa cổ và thân động mạch cảnh chung bên phải được tách ra (dài khoảng 3 cm). Các nhánh động mạch cảnh bên ngoài được tách từng cái ra và được thắt nút tại xương chữ Y và động mạch cảnh trong được tách ra từ

phần sung ở cổ. Vết rạch ở động mạch cảnh trong và đầu gần của động mạch cảnh chung được kẹp tương ứng bằng các cái kẹp động mạch không xâm lấn, và đầu xa của động mạch cảnh ngoài được thắt nút lại. Một ống thông chứa 0,5 mL huyền phù huyết khối trong nước muối thường được chèn vào thân động mạch cảnh ngoài. Khi kẹp trên động mạch cảnh trong được nhả ra, thì 0,5 mL huyền phù huyết khối trong nước muối thường ở trong ống thông sẽ từ từ chảy từ động mạch cảnh ngoài tới đầu gần của nó, sau đó chạy vào các động mạch trong não thông qua động mạch cảnh trong. Tiếp theo, đầu gần của động mạch cảnh trong được thắt nút lại, các kẹp động mạch trên động mạch cảnh trong và động mạch cảnh chung được nhả ra và máu tiếp tục di chuyển. Sau khi vết rạch được khâu lại, 20.000 IU penicilin được tiêm vào bắp để hạn chế nhiễm trùng. 4 giờ sau, hợp chất 5Ak trong nước muối thường (ở liều $1\mu\text{mol/kg}$, $n = 10$) được truyền liên tục trong 6 ngày và được quan sát trong 7 ngày. Việc tự so sánh được thực hiện từng ngày, và mức độ mất thần kinh được đánh giá bằng phương pháp Zealanga. Điểm 0 cho biết là không có sự suy giảm chức năng thần kinh, điểm 1 cho biết là các chi trước ở phía không bị ảnh hưởng thì không duỗi ra được, điểm 2 cho biết là đi về phía không bị ảnh hưởng, điểm 3 cho biết là đuối đuôi vòng tròn về phía không bị ảnh hưởng, điểm 4 cho biết là không tự đi cùng với sự xáo trộn ý thức và điểm 5 cho biết là đã chết. Các kết quả đánh giá được liệt kê trong Bảng 8. Dữ liệu này cho biết là những con chuột nhận được điều trị liên tục trong 6 ngày với $1\mu\text{mol/kg}$ 5Ak mỗi ngày sau 4 giờ kể từ khi khởi phát đột quy, thì không con nào chết. Tám trong số mười con cho thấy không bị mất ý thức. Chỉ có hai con có dấu hiệu hơi mất ý thức. Do đó, liều $1\mu\text{mol/kg}$ 5Ak xác định hiệu quả điều trị sau 4 giờ kể từ khi khởi phát đột quy.

Bảng 8: Hiệu quả điều trị đối với chuột được tiếp nhận điều trị $1\mu\text{mol/kg}$ 5Ak sau 4 giờ kể từ khi khởi phát đột quy.

Thời gian đánh giá	Điểm số chức năng thần kinh hàng ngày (Trung bình $\pm$ SD) và số lượng chuột cho từng điểm số					
	Điểm 0	Điểm 1	Điểm 2	Điểm 3	Điểm 4	Điểm 5
Ngày 1	3	5	1	1	0	0
Ngày 2	5	4	1	0	0	0
Ngày 3	3	6	1	0	0	0
Ngày 4	8	1	1	0	0	0
Ngày 5	6	4	0	0	0	0
Ngày 6	8	2	0	0	0	0

Ví dụ thử nghiệm 9: Thử nghiệm điều trị liên tục với 1 $\mu\text{mol/kg}$ 5Ak trong 6 lần đối với chuột bị đột quy sau 6 giờ kể từ khi xuất hiện đột quy.

Hiệu quả điều trị được đánh giá bằng điểm số chức năng thần kinh. Điểm càng thấp thì hiệu quả điều trị càng cao. 10% dung dịch clora hydrat được tiêm vào màng bụng của chuột đực SD với liều 400 mg/kg tính theo trọng lượng cơ thể để gây mê. Một vết rạch theo chiều dọc được thực hiện ở giữa cổ và thân động mạch cảnh chung bên phải được tách ra (dài khoảng 3 cm). Các nhánh động mạch cảnh bên ngoài được tách từng cái ra và được thắt nút tại xương chữ Y và động mạch cảnh trong được tách ra từ phần sung ở cổ. Vết rạch ở động mạch cảnh trong và đầu gần của động mạch cảnh chung được kẹp tương ứng bằng các cái kẹp động mạch không xâm lấn và đầu xa của động mạch cảnh ngoài được thắt nút lại. Một ống thông chứa 0,5 mL huyền phù huyết khối trong nước muối thường được chèn vào thân động mạch cảnh ngoài. Khi kẹp trên động mạch cảnh trong được nhả ra, thì 0,5 mL huyền phù huyết khối trong nước muối thường ở trong ống thông sẽ từ từ chảy từ động mạch cảnh ngoài tới đầu gần của nó, sau đó chạy vào các động mạch trong não thông qua động mạch cảnh trong. Tiếp theo, đầu gần của động mạch cảnh trong được thắt nút lại, các kẹp động mạch trên động mạch cảnh trong và động mạch cảnh chung được nhả ra và máu tiếp tục di chuyển. Sau khi vết rạch được khâu lại, 20.000 IU penicilin được tiêm vào bắp để hạn chế nhiễm trùng. 6 giờ sau, hợp chất 5Ak trong nước muối thường (ở liều 1 $\mu\text{mol/kg}$, $n = 10$) được truyền liên tục trong 6 ngày và được quan sát trong 7 ngày. Việc tự so sánh được thực hiện từng ngày, và mức độ mất thần kinh được đánh giá bằng phương pháp Zealanga. Điểm 0 cho biết là không có sự suy giảm chức năng thần kinh, điểm 1 cho biết là các chi trước ở phía không bị ảnh hưởng thì không duỗi ra được, điểm 2 cho biết là đi về phía không bị ảnh hưởng, điểm 3 cho biết là đuối đuôi vòng tròn về phía không bị ảnh hưởng, điểm 4 cho biết là không tự đi cùng với sự xáo trộn ý thức và điểm 5 cho biết là đã chết. Các kết quả đánh giá được liệt kê trong Bảng 9. Dữ liệu cho biết rằng những con chuột nhận được điều trị 6 ngày liên tục với 1 $\mu\text{mol/kg}$ 5Ak mỗi ngày sau 6 giờ kể từ khi khởi phát đột quy, chỉ có 1 con chuột bị chết tình cờ. 6 trong 9 con hồi phục mà không có suy giảm ý thức. Chỉ có 3 con có hiện tượng suy giảm thần kinh nhẹ. Do vậy, liều 1 $\mu\text{mol/kg}$ 5Ak được xác định có hiệu quả điều trị sau 6 giờ kể từ khi khởi phát đột quy.

Bảng 9: Hiệu quả điều trị đối với chuột nhận được điều trị 1 $\mu\text{mol/kg}$ 5Ak sau 6 giờ kể từ khi khởi phát đột quy.

Thời gian đánh giá	Điểm số chức năng thần kinh hàng ngày (Trung bình $\pm$ SD) và số lượng chuột cho từng điểm số					
	Điểm 0	Điểm 1	Điểm 2	Điểm 3	Điểm 4	Điểm 5
Ngày 1	0	4	4	2	0	0
Ngày 2	0	7	2	1	0	0
Ngày 3	1	6	2	1	0	0
Ngày 4	4	4	1	0	0	1
Ngày 5	7	2	0	0	0	0
Ngày 6	6	3	0	0	0	0

Ví dụ thử nghiệm 10: Thử nghiệm điều trị liên tục với 1 $\mu\text{mol/kg}$ 5Ak trong 6 lần đối với chuột bị đột quy sau 24 giờ kể từ khi xuất hiện đột quy.

Hiệu quả điều trị được đánh giá bằng điểm số chức năng thần kinh. Điểm càng thấp thì hiệu quả điều trị càng cao. 10% dung dịch clora hydrat được tiêm vào màng bụng của chuột đực SD với liều 400 mg/kg tính theo trọng lượng cơ thể để gây mê. Một vết rạch theo chiều dọc được thực hiện ở giữa cổ và thân động mạch cảnh chung bên phải được tách ra (dài khoảng 3 cm). Các nhánh động mạch cảnh bên ngoài được tách từng cái ra và được thắt nút tại xương chữ Y và động mạch cảnh trong được tách ra từ phần sung ở cổ. Vết rạch ở động mạch cảnh trong và đầu gần của động mạch cảnh chung được kẹp tương ứng bằng các cái kẹp động mạch không xâm lấn và đầu xa của động mạch cảnh ngoài được thắt nút lại. Một ống thông chứa 0,5 mL huyền phù huyết khối trong nước muối thường được chèn vào thân động mạch cảnh ngoài. Khi kẹp trên động mạch cảnh trong được nhả ra, lúc này 0,5 mL huyền phù huyết khối trong nước muối thường ở trong ống thông sẽ từ từ chảy từ động mạch cảnh ngoài tới đầu gần của nó, sau đó chảy vào các động mạch trong não thông qua động mạch cảnh trong. Tiếp theo, đầu gần của động mạch cảnh trong được thắt nút lại, các kẹp động mạch trên động mạch cảnh trong và động mạch cảnh chung được nhả ra và máu tiếp tục di chuyển. Sau khi vết rạch được khâu lại, 20.000 IU penicilin được tiêm vào bắp để hạn chế nhiễm trùng. Sau 24 giờ, hợp chất 5Ak trong nước muối thường (ở liều 1 $\mu\text{mol/kg}$, $n = 10$) được truyền liên tục trong 6 ngày và được quan sát trong 7 ngày. Việc tự so sánh được thực hiện từng ngày và mức độ suy giảm thần kinh được đánh giá bằng phương pháp Zealona. Điểm 0 cho biết là không có dấu hiệu suy giảm chức năng thần kinh, điểm 1 cho biết là các chi trước ở phía không bị ảnh hưởng thì không duỗi ra được, điểm 2 cho biết là đi về phía không bị ảnh hưởng, điểm 3 cho biết là đuôi đuôi vòng tròn về

phía không bị ảnh hưởng, điểm 4 cho biết là không tự đi cùng với sự xáo trộn ý thức và điểm 5 cho biết là đã chết. Các kết quả đánh giá được liệt kê trong Bảng 10. Dữ liệu cho biết rằng hai con chuột bị chết sau 24 giờ kể từ khi khởi phát đột quy. Trong tám con còn lại nhận được điều trị 6 ngày liên tục với $1\mu\text{mol/kg}$ 5Ak mỗi ngày, không có con nào bị chết. Ba trong tám con hồi phục mà không có suy giảm thần kinh. Bốn con có hiện tượng suy giảm thần kinh nhẹ và một con bị suy giảm thần kinh một cách rõ ràng. Do vậy, liều $1\mu\text{mol/kg}$ 5Ak được xác định có hiệu quả điều trị sau 24 giờ kể từ khi khởi phát đột quy.

Bảng 10: Hiệu quả điều trị đối với chuột nhận được liều điều trị $1\mu\text{mol/kg}$ 5Ak sau 24 giờ kể từ khi khởi phát đột quy.

Thời gian đánh giá	Điểm số chức năng thần kinh hàng ngày (Trung bình $\pm$ SD) và số lượng chuột cho từng điểm số					
	Điểm 0	Điểm 1	Điểm 2	Điểm 3	Điểm 4	Điểm 5
Ngày 1	1	4	0	2	1	0
Ngày 2	2	3	3	1	0	0
Ngày 3	3	2	3	0	0	0
Ngày 4	2	3	3	0	0	0
Ngày 5	4	3	1	0	0	0
Ngày 6	3	4	1	0	0	0

Ví dụ thử nghiệm 11: Thử nghiệm điều trị liên tục với $2,5\mu\text{mol/kg}$ 5Ak trong 6 lần đối với chuột bị đột quy sau 6 giờ kể từ khi xuất hiện đột quy.

Hiệu quả điều trị được đánh giá bằng điểm số chức năng thần kinh. Điểm càng thấp thì hiệu quả điều trị càng cao. 10% dung dịch clora hydrat được tiêm vào màng bụng của chuột đực SD với liều 400 mg/kg tính theo trọng lượng cơ thể để gây mê. Một vết rạch theo chiều dọc được thực hiện ở giữa cổ và thân động mạch cảnh chung bên phải được tách ra (dài khoảng 3 cm). Các nhánh động mạch cảnh bên ngoài được tách từng cái ra và được thắt nút tại xương chữ Y và động mạch cảnh trong được tách ra từ phần sung ở cổ. Vết rạch ở động mạch cảnh trong và đầu gần của động mạch cảnh chung được kẹp tương ứng bằng các cái kẹp động mạch không xâm lấn và đầu xa của động mạch cảnh ngoài được thắt nút lại. Một ống thông chứa $0,5\text{ mL}$ huyền phù huyết khối trong nước muối thường được chèn vào thân động mạch cảnh ngoài. Cùng lúc khi kẹp trên động mạch cảnh trong được nhả ra, thì $0,5\text{ mL}$ huyền phù huyết khối trong nước muối thường ở trong ống thông sẽ từ từ chảy từ động mạch cảnh ngoài tới đầu gần

của nó, sau đó chạy vào các động mạch trong não thông qua động mạch cảnh trong. Tiếp theo, đầu gần của động mạch cảnh trong được thắt nút lại, các kẹp động mạch trên động mạch cảnh trong và động mạch cảnh chung được nhả ra và máu tiếp tục di chuyển. Sau khi vết rạch được khâu lại, 20.000 IU penicilin được tiêm vào bắp để hạn chế nhiễm trùng. Sau 6 giờ, hợp chất 5Ak trong nước muối thường (ở liều 2,5 $\mu\text{mol/kg}$, $n = 10$) được truyền liên tục trong 6 ngày và được quan sát trong 7 ngày. Việc tự so sánh được thực hiện từng ngày và mức độ suy giảm thần kinh được đánh giá bằng phương pháp Zealanga. Điểm 0 cho biết là không có dấu hiệu suy giảm chức năng thần kinh, điểm 1 cho biết là các chi trước ở phía không bị ảnh hưởng thì không duỗi ra được, điểm 2 cho biết là đi về phía không bị ảnh hưởng, điểm 3 cho biết là đuôi đuôi vòng tròn về phía không bị ảnh hưởng, điểm 4 cho biết là không tự đi cùng với sự xáo trộn ý thức và điểm 5 cho biết là đã chết. Các kết quả đánh giá được liệt kê trong Bảng 11. Dữ liệu cho biết rằng chín con chuột nhận được điều trị liên tục 6 ngày với liều 2,5 $\mu\text{mol/kg}$ 5Ak mỗi ngày sau 6 giờ kể từ khi khởi phát đột quy, không có con nào bị chết. Bảy trong chín con hồi phục mà không có suy giảm thần kinh. Một con có hiện tượng suy giảm thần kinh nhẹ. Do vậy, liều 2,5 $\mu\text{mol/kg}$ 5Ak được xác định có hiệu quả điều trị rõ ràng sau 6 giờ kể từ khi khởi phát đột quy tốt hơn so với liều 1 $\mu\text{mol/kg}$ 5Ak.

Bảng 11: Hiệu quả điều trị đối với chuột nhận được liều điều trị 2,5 $\mu\text{mol/kg}$ 5Ak sau 6 giờ kể từ khi khởi phát đột quy.

Thời gian đánh giá	Điểm số chức năng thần kinh hàng ngày (Trung bình $\pm$ SD) và số lượng chuột cho từng điểm số					
	Điểm 0	Điểm 1	Điểm 2	Điểm 3	Điểm 4	Điểm 5
Ngày 1	1	7	0	1	0	0
Ngày 2	3	4	2	0	0	0
Ngày 3	6	2	1	0	0	0
Ngày 4	6	3	0	0	0	0
Ngày 5	5	4	0	0	0	0
Ngày 6	7	2	0	0	0	0

Ví dụ thử nghiệm 12: Thử nghiệm điều trị liên tục với 2,5 $\mu\text{mol/kg}$ 5Ak trong 6 lần đối với chuột bị đột quy sau 24 giờ kể từ khi xuất hiện đột quy.

Hiệu quả điều trị được đánh giá bằng điểm số chức năng thần kinh. Điểm càng thấp thì hiệu quả điều trị càng cao. 10% dung dịch clora hydrat được tiêm vào màng

bụng của chuột đực SD với liều 400 mg/kg tính theo trọng lượng cơ thể để gây mê. Một vết rạch theo chiều dọc được thực hiện ở giữa cổ và thân động mạch cảnh chung bên phải được tách ra (dài khoảng 3 cm). Các nhánh động mạch cảnh bên ngoài được tách từng cái ra và được thắt nút tại xương chữ Y và động mạch cảnh trong được tách ra từ phần sung ở cổ. Vết rạch ở động mạch cảnh trong và đầu gần của động mạch cảnh chung được kẹp tương ứng bằng các cái kẹp động mạch không xâm lấn và đầu xa của động mạch cảnh ngoài được thắt nút lại. Một ống thông chứa 0,5 mL huyền phù huyết khối trong nước muối thường được chèn vào thân động mạch cảnh ngoài. Cùng lúc khi kẹp trên động mạch cảnh trong được nhả ra, thì 0,5 mL huyền phù huyết khối trong nước muối thường ở trong ống thông sẽ từ từ chảy từ động mạch cảnh ngoài tới đầu gần của nó, sau đó chạy vào các động mạch trong não thông qua động mạch cảnh trong. Tiếp theo, đầu gần của động mạch cảnh trong được thắt nút lại, các kẹp động mạch trên động mạch cảnh trong và động mạch cảnh chung được nhả ra và máu tiếp tục di chuyển. Sau khi vết rạch được khâu lại, 20.000 IU penicilin được tiêm vào bắp để hạn chế nhiễm trùng. Sau 24 giờ, hợp chất 5Ak trong nước muối thường (ở liều 2,5 $\mu\text{mol/kg}$, $n = 10$) được truyền liên tục trong 6 ngày và được quan sát trong 7 ngày. Việc tự so sánh được thực hiện từng ngày, và mức độ suy giảm thần kinh được đánh giá bằng phương pháp Zealanga. Điểm 0 cho biết là không có dấu hiệu sự suy giảm chức năng thần kinh, điểm 1 cho biết là các chi trước ở phía không bị ảnh hưởng thì không duỗi ra được, điểm 2 cho biết là đi về phía không bị ảnh hưởng, điểm 3 cho biết là đuối đuôi vòng tròn về phía không bị ảnh hưởng, điểm 4 cho biết là không tự đi cùng với sự xáo trộn ý thức và điểm 5 cho biết là đã chết. Các kết quả đánh giá được liệt kê trong Bảng 12. Dữ liệu cho biết rằng ba con chuột bị chết sau 24 giờ khởi phát đột quy. Bảy con còn lại nhận được điều trị liên tục 6 ngày với liều 2,5 $\mu\text{mol/kg}$ 5Ak mỗi ngày, thì hai con bị chết, ba con hồi phục mà không có suy giảm thần kinh. Một con có hiện tượng suy giảm thần kinh nhẹ và một con bị suy giảm thần kinh rõ ràng. Do vậy, liều 2,5 $\mu\text{mol/kg}$ 5Ak vẫn có hiệu quả điều trị rõ ràng sau 24 giờ kể từ khi khởi phát đột quy.

Bảng 12: Hiệu quả điều trị đối với chuột nhận được liều điều trị 2,5 $\mu\text{mol/kg}$ 5Ak sau 24 giờ kể từ khi khởi phát đột quy.

Thời gian đánh giá	Điểm số chức năng thần kinh hàng ngày (Trung bình $\pm$ SD) và số lượng chuột cho từng điểm số					
	Điểm 0	Điểm 1	Điểm 2	Điểm 3	Điểm 4	Điểm 5
Ngày 1	1	4	1	0	1	0
Ngày 2	3	2	1	1	0	0

Ngày 3	3	2	1	0	0	1
Ngày 4	2	2	1	1	0	0
Ngày 5	4	0	1	0	0	1
Ngày 6	3	1	1	0	0	0

Ví dụ thử nghiệm 13: Thử nghiệm điều trị liên tục với 5 $\mu\text{mol/kg}$ 5Ak trong 6 lần đối với chuột bị đột quy sau 24 giờ kể từ khi xuất hiện đột quy.

Hiệu quả điều trị được đánh giá bằng điểm số chức năng thần kinh. Điểm càng thấp thì hiệu quả điều trị càng cao. 10% dung dịch clora hydrat được tiêm vào màng bụng của chuột đực SD với liều 400 mg/kg tính theo trọng lượng cơ thể để gây mê. Một vết rạch theo chiều dọc được thực hiện ở giữa cổ và thân động mạch cảnh chung bên phải được tách ra (dài khoảng 3 cm). Các nhánh động mạch cảnh bên ngoài được tách từng cái ra và được thắt nút tại xương chữ Y và động mạch cảnh trong được tách ra từ phần sung ở cổ. Vết rạch ở động mạch cảnh trong và đầu gần của động mạch cảnh chung được kẹp tương ứng bằng các cái kẹp động mạch không xâm lấn và đầu xa của động mạch cảnh ngoài được thắt nút lại. Một ống thông chứa 0,5 mL huyền phù huyết khối trong nước muối thường được chèn vào thân động mạch cảnh ngoài. Khi kẹp trên động mạch cảnh trong được nhả ra, thì 0,5 mL huyền phù huyết khối trong nước muối thường ở trong ống thông sẽ từ từ chảy từ động mạch cảnh ngoài tới đầu gần của nó, sau đó chảy vào các động mạch trong não thông qua động mạch cảnh trong. Tiếp theo, đầu gần của động mạch cảnh trong được thắt nút lại, các kẹp động mạch trên động mạch cảnh trong và động mạch cảnh chung được nhả ra và máu tiếp tục di chuyển. Sau khi vết rạch được khâu lại, 20.000 IU penicilin được tiêm vào bắp để hạn chế nhiễm trùng. Sau 24 giờ, hợp chất 5Ak trong nước muối thường (ở liều 5 $\mu\text{mol/kg}$, $n = 10$) được truyền liên tục trong 6 ngày và được quan sát trong 7 ngày. Việc tự so sánh được thực hiện từng ngày, và mức độ suy giảm thần kinh được đánh giá bằng phương pháp Zealona. Điểm 0 cho biết là không có dấu hiệu sự suy giảm chức năng thần kinh, điểm 1 cho biết là các chi trước ở phía không bị ảnh hưởng thì không duỗi ra được, điểm 2 cho biết là đi về phía không bị ảnh hưởng, điểm 3 cho biết là đuôi đuôi vòng tròn về phía không bị ảnh hưởng, điểm 4 cho biết là không tự đi cùng với sự xáo trộn ý thức và điểm 5 cho biết là đã chết. Các kết quả đánh giá được liệt kê trong Bảng 13. Dữ liệu cho biết rằng một con chuột bị chết sau 24 giờ khởi phát đột quy. Mười con còn lại nhận được điều trị liên tục 6 ngày với liều 5 $\mu\text{mol/kg}$ 5Ak mỗi ngày, không có con nào bị chết. Bảy con hồi phục không có dấu hiệu suy giảm thần kinh. Ba con có hiện tượng suy giảm thần kinh nhẹ. Do vậy, liều 5 $\mu\text{mol/kg}$ 5Ak được xác định là có hiệu sau 24 giờ kể từ khi khởi phát đột quy và rõ ràng là tốt hơn liều 2,5 $\mu\text{mol/kg}$.

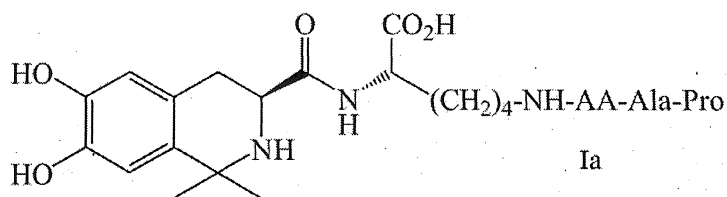
Bảng 13: Hiệu quả điều trị đối với chuột nhận được liều điều trị 5 $\mu\text{mol/kg}$ 5Ak sau 24 giờ kể từ khi khởi phát đột quy.

Thời gian đánh giá	Điểm số chức năng thần kinh hàng ngày (Trung bình $\pm$ SD) và số lượng chuột cho từng điểm số					
	Điểm 0	Điểm 1	Điểm 2	Điểm 3	Điểm 4	Điểm 5
Ngày 1	0	5	4	0	1	0
Ngày 2	2	6	2	0	0	0
Ngày 3	2	6	2	0	0	0
Ngày 4	5	5	0	0	0	0
Ngày 5	6	4	0	0	0	0
Ngày 6	7	3	0	0	0	0

Theo các ví dụ thử nghiệm ở trên, các hợp chất theo sáng chế có cấu trúc siêu hình cầu đạt được chức năng vượt qua hàng rào máu-não. Hơn nữa, ngoài chức năng làm tan huyết khối và chống huyết khối, các hợp chất này còn có hiệu quả trong việc loại bỏ gốc tự do OH, NO, anion superoxit và các gốc tự do khác. Ngoài ra, chỉ cần một liều sử dụng thấp là có hiệu quả đối với việc làm tan huyết khối. Liều cao hơn sẽ cho hiệu quả vượt trội trong việc điều trị đột quy sau 4 giờ kể từ khi khởi phát đột quy. Do vậy, các hợp chất này có triển vọng tốt trong điều trị lâm sàng.

Yêu cầu bảo hộ

1. Hợp chất có công thức Ia sau đây:



trong đó AA được chọn từ nhóm có chứa L-Ala, L-Val, L-Trp, L-Tyr, L-Pro, L-Phe, Gly, L-Ser, L-Ile, L-Thr, L-Lys, L-Leu, L-Gln, L-Asn, L-Asp và L-Glu.

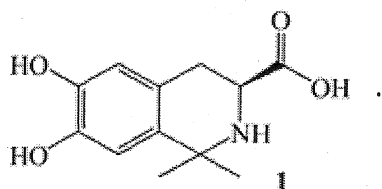
2. Hợp chất theo điểm 1, trong đó AA là L-Lys.

3. Dược phẩm chứa hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1 hoặc 2 và chất mang được.

4. Dược phẩm theo điểm 3, trong đó hợp chất là dạng có cấu trúc siêu cầu nano.

5. Phương pháp điều chế hợp chất có công thức hóa học Ia theo điểm 1, phương pháp này bao gồm các bước sau:

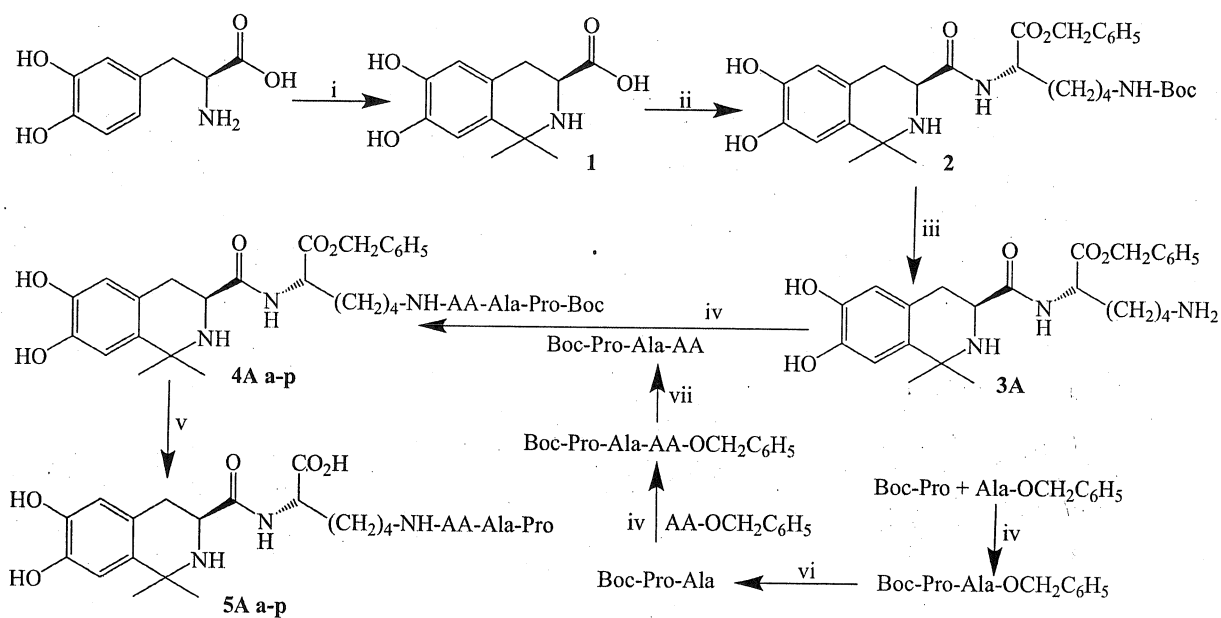
i) tạo ra hợp chất có công thức 1:



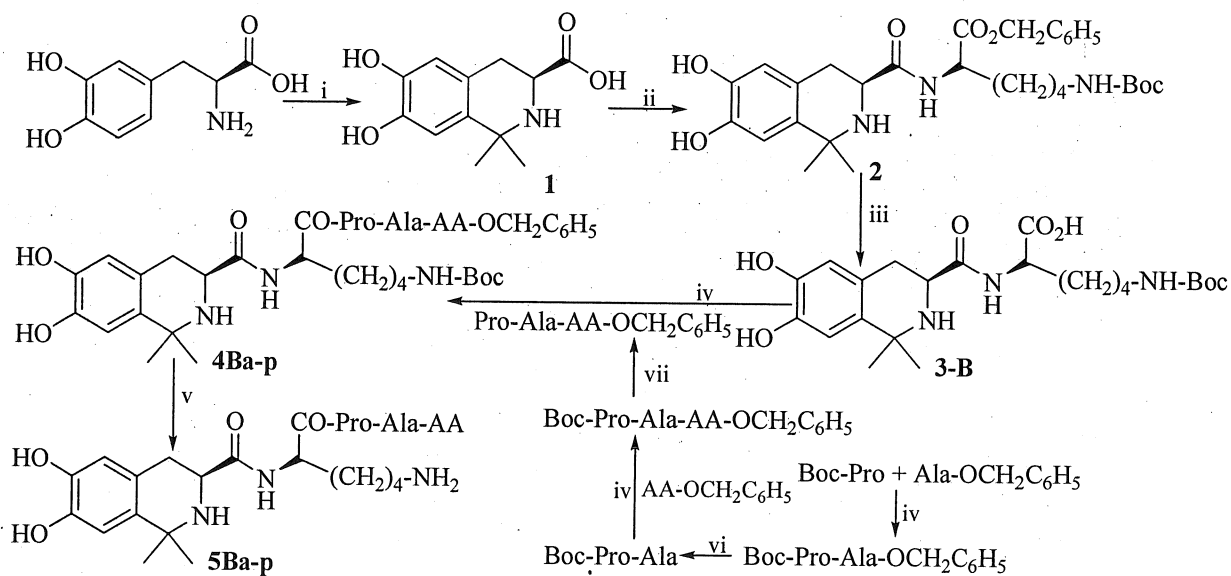
ii) tạo ra nhánh liên kết L-Lys để liên kết và peptit có trình tự Pro-Ala-AA, trong đó AA được chọn từ nhóm bao gồm L-Ala, L-Val, L-Trp, L-Tyr, L-Pro, L-Phe, Gly, L-Ser, L-Ile, L-Thr, L-Lys, L-Leu, L-Gln, L-Asn, L-Asp và L-Glu;

iii) ghép nhóm carboxy của hợp chất có công thức 1 với nhóm α -amit của L-Lys thông qua liên kết peptit; và

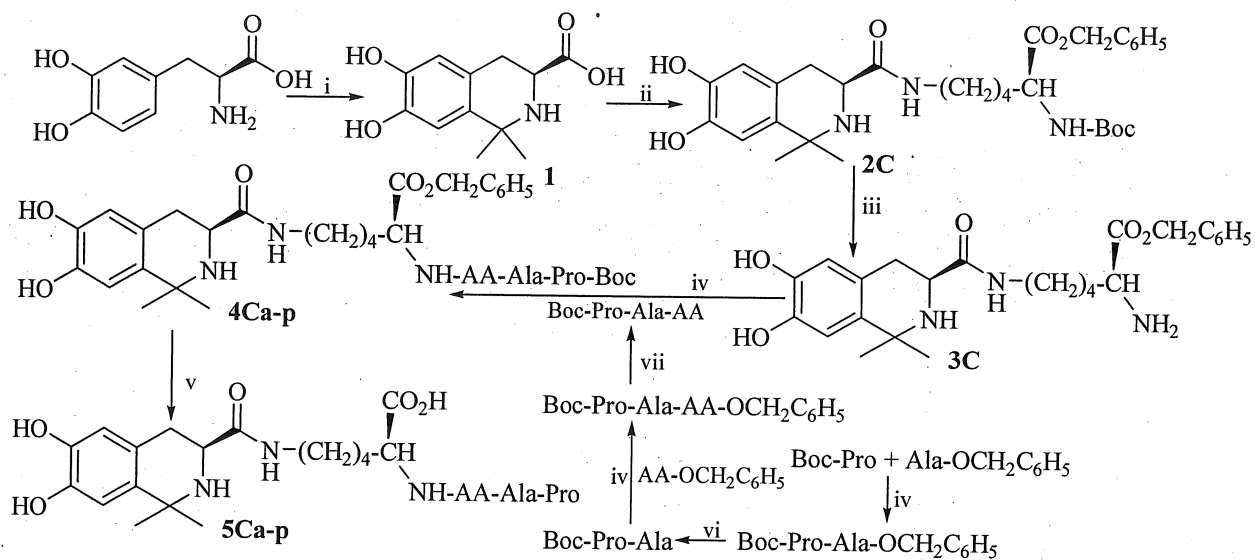
iv) ghép peptit Q có trình tự Pro-Ala-AA với hợp chất thu được tại bước iii) ở điều kiện phản ứng thích hợp, trong đó nhóm carboxy đầu tận cùng C của peptit có trình tự Pro-Ala-AA được ghép với nhóm ϵ -amit của L-Lys thông qua liên kết peptit để tạo ra hợp chất có công thức Ia.



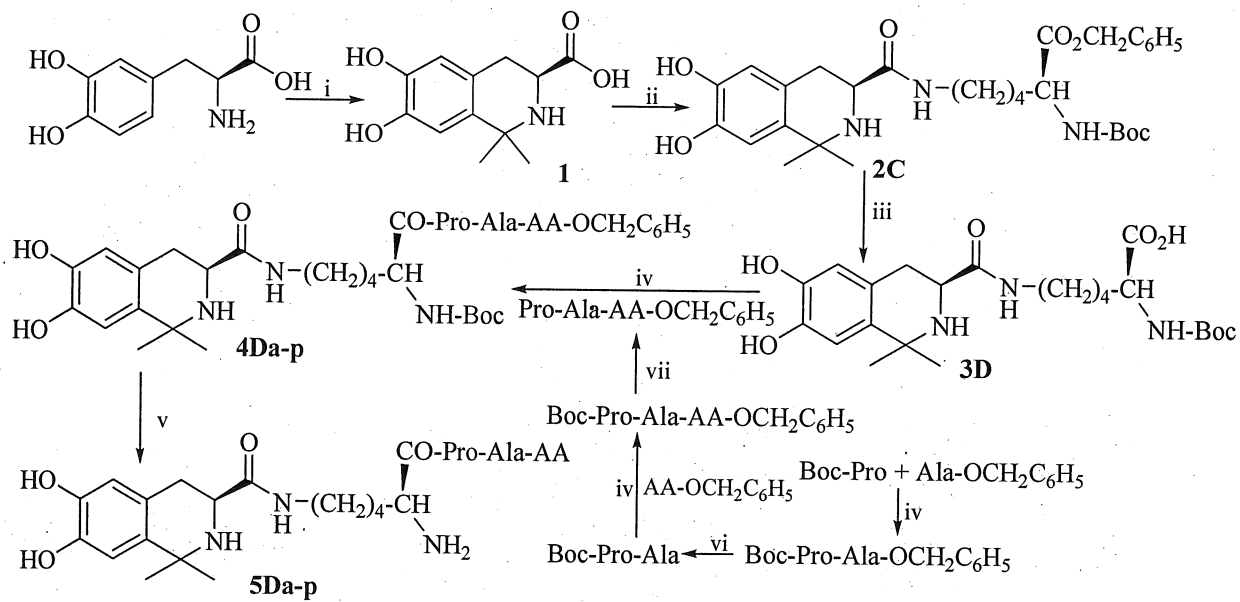
Hình 1



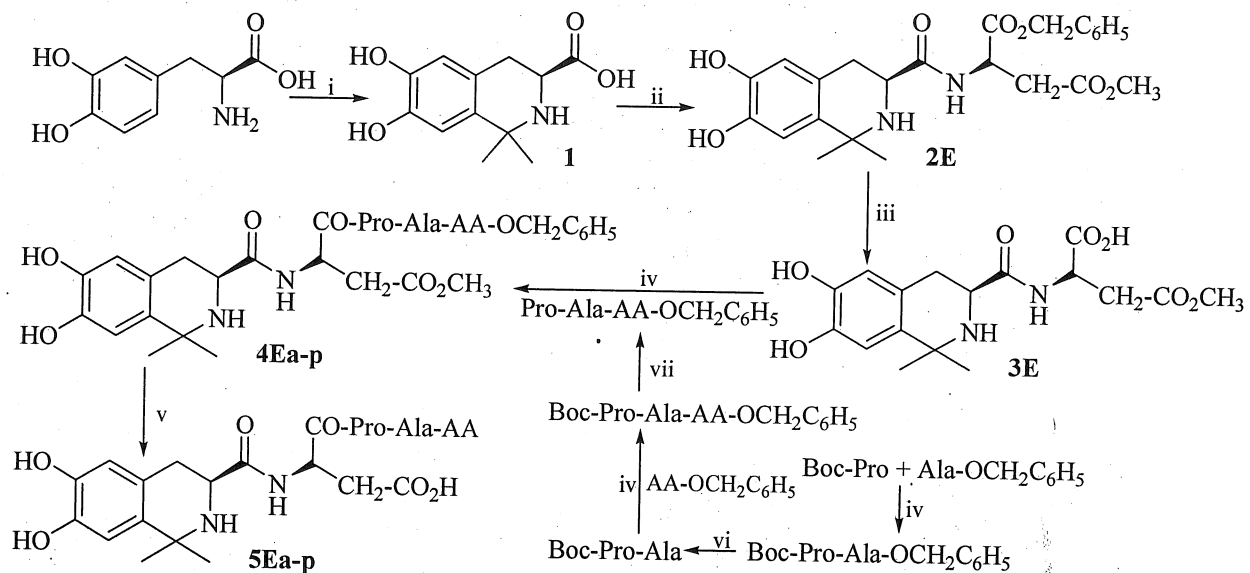
Hình 2



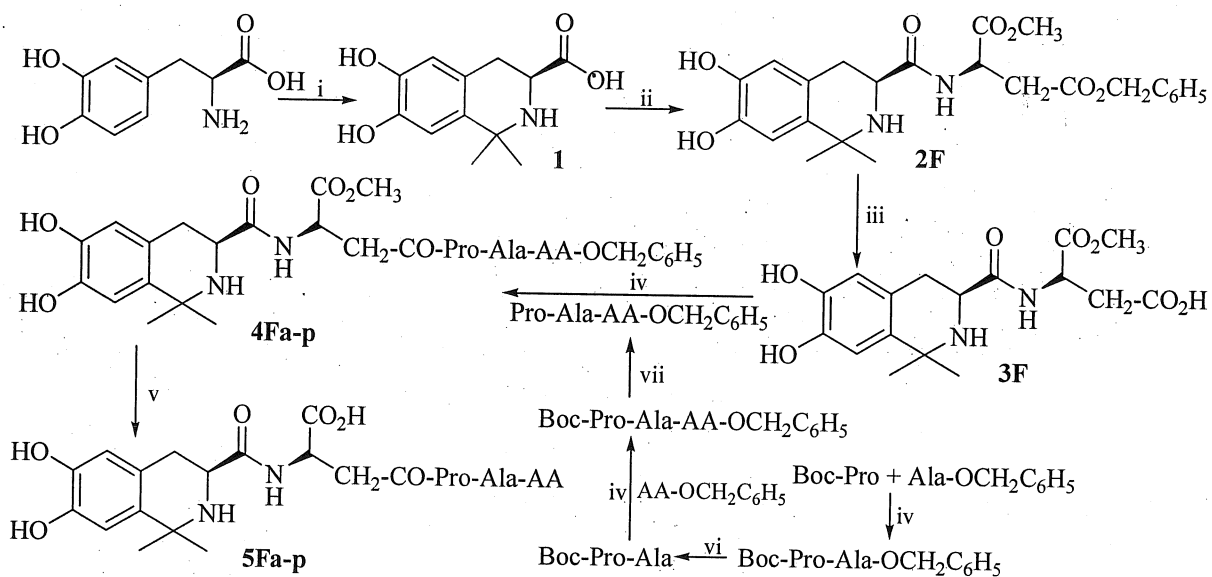
Hình 3



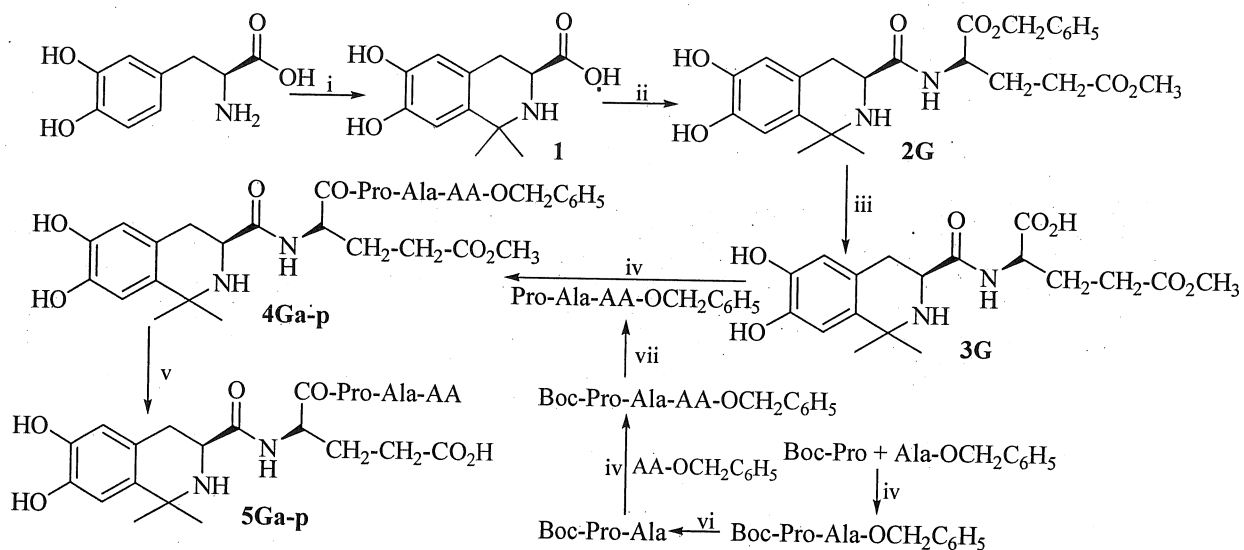
Hình 4



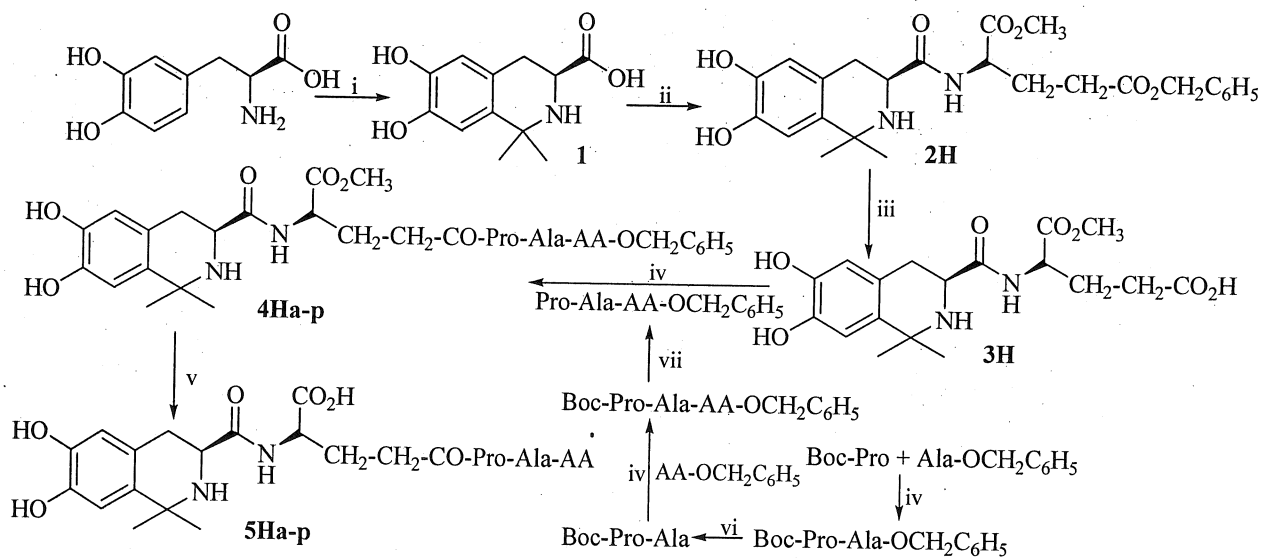
Hình 5



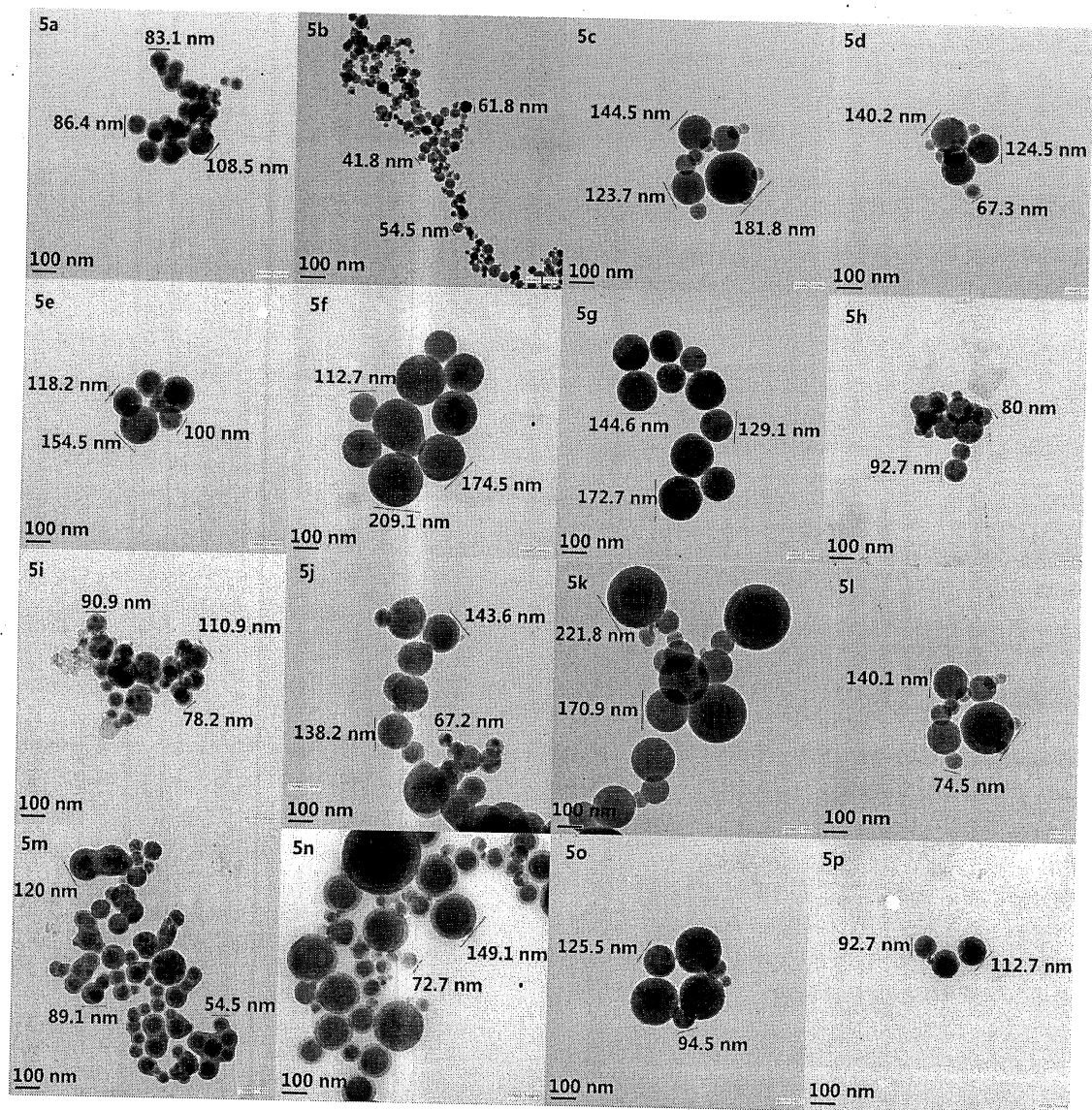
Hình 6



Hình 7



Hình 8



Hình 9