



(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)



1-0027111

(51)⁷ C07D 471/10; C07D 491/10; A61K
31/439; A61P 11/00

(13) B

(21) 1-2017-00662

(22) 08/09/2015

(86) PCT/EP2015/070449 08/09/2015

(87) WO2016/038007 17/03/2016

(30) 14184613.9 12/09/2014 EP

(45) 25/01/2021 394

(43) 25/05/2017 350A

(73) BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH (DE)

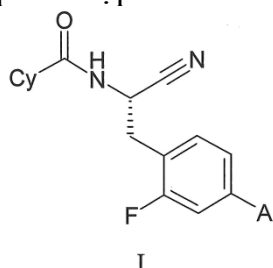
Binger Str. 173, 55216 Ingelheim Am Rhein, Germany

(72) VINTONYAK, Viktor (DE); GRAUERT, Matthias (DE); GRUNDL, Marc (DE);
PAUTSCH, Alexander (DE).

(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) HỢP CHẤT VÒNG XOẮN ĐƯỢC THỂ VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA HỢP CHẤT
NÀY

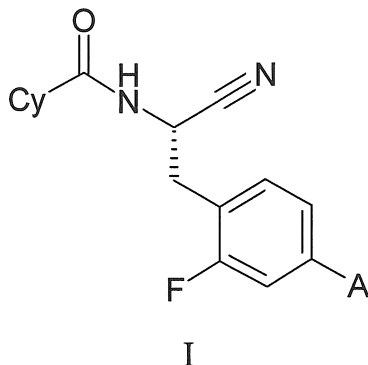
(57) Sáng chế đề cập đến hợp chất có công thức I:



trong đó A và Cy có một trong số các ý nghĩa như được xác định trong bản mô tả và dược phẩm chứa hợp chất này. Các hợp chất theo sáng chế hữu dụng làm chất ức chế Cathepsin C và hữu dụng để điều trị và/hoặc ngăn ngừa các bệnh có liên quan đến hoạt tính dipeptidyl peptidaza I, ví dụ các bệnh hô hấp.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến hợp chất có công thức I



trong đó A và Cy có một trong số các ý nghĩa như được xác định trong bản mô tả và được phẩm chứa hợp chất này. Các hợp chất theo sáng chế hữu dụng làm chất ức chế Cathepsin C và hữu dụng để điều trị và/hoặc ngăn ngừa các bệnh có liên quan đến hoạt tính dipeptidyl peptidaza I, ví dụ các bệnh hô hấp.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

WO2004110988 bộc lộ chất ức chế peptidyl nitril làm chất ức chế dipeptidyl-peptidaza I (DPPI) để điều trị hàng loạt các bệnh.

WO2009074829 và WO2010142985 cũng bộc lộ chất ức chế peptidyl nitril làm chất ức chế dipeptidyl-peptidaza I (DPPI) để điều trị bệnh hen, COPD hoặc viêm mũi dị ứng.

WO2013041497 bộc lộ các hợp chất N-[1-xyano-2-(phenyl)etyl]-2-azabicyclo [2.2.1]heptan-3-carboxamit được thể làm chất ức chế dipeptidyl-peptidaza I (DPPI) để điều trị, ví dụ, các bệnh hô hấp.

Dipeptidyl-aminopeptidaza I (DPPI hay Cathepsin C; EC3.4.141), là một xystein proteaza lysosom có khả năng loại bỏ các dipeptit khỏi đầu tận cùng amino của các cơ chất protein. DPPI đầu tiên được phát hiện bởi Gutman và Fruton năm 1948 (J. Biol. Chem 174: 851-858, 1948). cADN của enzym người này đã được mô tả năm 1995 (Paris et al.; FEBS Lett 369: 326-330, 1995). Protein DPPI được xử lý thành enzym có hoạt tính phân giải protein thành thực gồm một chuỗi nặng, một chuỗi nhẹ, và một propeptit mà vẫn có liên quan đến enzym hoạt tính (Wolters et al.; J. Biol. Chem. 273: 15514-15520, 1998). Trong khi các xystein Cathepsin khác (ví dụ B, H, K, L và S) là

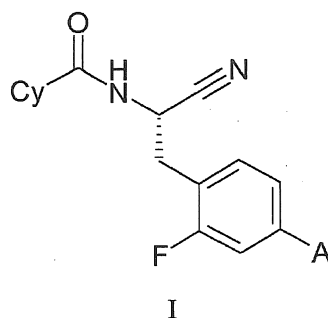
các monome, DPPI là một tetrame 200-kD với 4 tiểu phần giống nhau, mỗi tiểu phần gồm 3 chuỗi polypeptit khác nhau. DPPI được biểu hiện một cách cơ định trong nhiều mô với mức cao ở phổi, thận, gan và lách (Kominami et al.; Biol. Chem. Hoppe Seyler 373: 367-373, 1992). Phù hợp với vai trò của nó trong hoạt hóa các serin proteaza từ tế bào tạo máu, DPPI cũng được biểu hiện ở mức tương đối cao trong bạch cầu trung tính, lympho bào độc tế bào, tế bào giết tự nhiên, đại thực bào phế nang và dưỡng bào. Các dữ liệu gần đây từ chuột thiếu hụt DPPI cho thấy rằng, ngoài việc là một enzym quan trọng trong sự thoái biến protein lysosom, DPPI còn có chức năng là enzym chính trong sự hoạt hóa các serin proteaza hạt trong các lympho bào T độc tế bào và các tế bào giết tự nhiên (granzym A và B; Pham et al.; Proc. Nat. Acad. Sci 96: 8627-8632, 1999), dưỡng bào (chymaza và tryptaza; Wolter et al.; J Biol. Chem. 276: 18551-18556, 2001), và bạch cầu trung tính (Cathepsin G, elastaza và proteinaza 3; Adkison et al.; J Clin. Invest. 109: 363.371, 2002). Khi được hoạt hóa, các proteaza này có khả năng làm thoái biến nhiều thành phần nền ngoại bào khác nhau, mà có thể dẫn đến thương tổn mô và viêm mạn tính.

Do đó, các chất ức chế Cathepsin C có thể là các tác nhân điều trị hữu dụng tiềm năng để điều trị các bệnh viêm mà bạch cầu trung tính-chiếm ưu thế như bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính (chronic obstructive pulmonary disease - COPD), khí thủng phổi, hen, đa xơ cứng, và xơ nang (Guay et al.; Curr. Topics Med. Chem. 10: 708-716, 2010; Laine and Busch-Petersen; Expert Opin. Ther. Patents 20: 497-506, 2010). Viêm khớp dạng thấp cũng là một bệnh viêm mạn tính khác trong đó DPPI có vai trò nhất định. Các bạch cầu trung tính được tập hợp đến vị trí viêm khớp và giải phóng Cathepsin G, elastaza và proteinaza 3, các proteaza được cho là chịu trách nhiệm phá hủy sụn có liên quan đến bệnh viêm khớp dạng thấp. Thực tế, chuột thiếu hụt DPPI được bảo vệ chống lại bệnh viêm khớp cấp do việc chuyển thụ động kháng thể đơn dòng chống lại collagen typ II (Adkison et al.; J Clin. Invest. 109: 363.371, 2002).

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

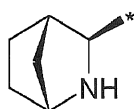
Theo vai trò của DPPI trong việc hoạt hóa các serin proteaza gây viêm nhất định, mục đích của sáng chế là giải quyết những vấn đề và đáp ứng nhu cầu còn tồn tại trong lĩnh vực này. Nhằm mục đích này, sáng chế đề xuất các hợp chất mà ức chế hoạt tính của nó, nhờ đó ức chế hoạt tính serin proteaza sau đó.

Cụ thể, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức I hoặc muối hoặc solvat được dụng của nó,

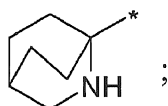


trong đó:

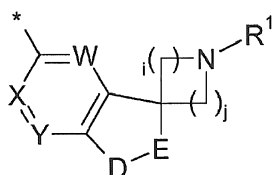
Cy là:



hoặc



A là:



trong đó:

W được chọn từ nhóm gồm CH và N;

X được chọn từ nhóm gồm CH và N;

Y được chọn từ nhóm gồm CH và N;

với điều kiện là tối đa một trong số các nhóm W, X và Y có thể là N;

D-E được chọn từ nhóm gồm N(R²)-C(O), CH₂CH₂, C(O)-O và CH₂-O;

R² được chọn từ nhóm gồm H và C₁₋₃-alkyl;

R¹ được chọn từ nhóm gồm H, C₁₋₃-alkyl, CH₃OCH₂CH₂-, oxetanyl, tetrahydrofuranyl, 4-tetrahydropyranyl và 3-tetrahydropyranyl;

i là 1, 2 hoặc 3;

j là 1, 2 hoặc 3;

với điều kiện là tổng i+j là 2, 3 hoặc 4.

Sáng chế cũng đề xuất được phẩm chứa hợp chất theo sáng chế hoặc chứa hợp chất theo sáng chế và các hợp chất có được tính khác.

Mô tả vắn tắt hình vẽ

Fig. 1 là hình vẽ thể hiện cấu trúc của các phức với phối tử Cathepsin C. Trong đó, Fig.1 (A) là phức của hợp chất ví dụ 11 và Fig.1 (B) là phức của hợp chất ví dụ 16.

Mô tả chi tiết sáng chế

Đã bất ngờ phát hiện rằng các hợp chất vòng xoắn theo sáng chế có

- hoạt tính Cathepsin C (DPPI) cao, tốt hơn là thể hiện IC_{50} [μM] của DPPI $< 0,0050$, đặc biệt tốt hơn là $< 0,0030$,

Hơn nữa, các hợp chất theo sáng chế thể hiện các khả năng sau, mà có lợi cho hiệu quả dược lý của chúng:

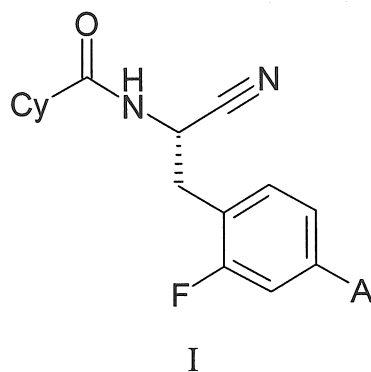
- hoạt tính cao trên tế bào, ví dụ ức chế việc xử lý elastaza của bạch cầu trung tính trong dòng tế bào U937, tốt hơn là thể hiện IC_{50} [μM] $< 0,5$, đặc biệt tốt hơn là $< 0,003$.
- độ chọn lọc cao chống lại các Cathepsin khác, ví dụ Cathepsin K, và
- các đặc tính dược động học mong muốn nói chung, ví dụ độ ổn định chuyển hóa, tốt hơn là thể hiện độ ổn định in vitro khi ủ tiểu thể gan người là $t_{1/2}$ [phút] > 110 , đặc biệt tốt hơn là ≥ 120 .

Cũng bất ngờ phát hiện rằng các hợp chất theo sáng chế thể hiện mức độ ức chế hoạt tính elastaza bạch cầu trung tính cao trong sản phẩm dung giải tế bào dịch rửa phế quản phế nang (bronchoalveolar lavage fluid - BALF) trong mô hình chuột nhắt tương tác với đích.

Hơn nữa, đã bất ngờ phát hiện rằng các hợp chất vòng xoắn theo sáng chế tạo ra cầu muối bổ sung với Glu275 của Cathepsin C mà dẫn đến hoạt tính enzym và hoạt tính trên tế bào cao của loại hợp chất này. Tương tác bổ sung này của amin vòng xoắn (ví dụ spiro-azetidin theo ví dụ 11 và spiro-pyrolidin theo ví dụ 16) đã được kiểm chứng bằng các thử nghiệm đồng kết tinh protein Cathepsin C với các hợp chất theo ví dụ 11 và 16. Trong cả hai trường hợp, nguyên tử nitơ bazơ tạo ra cầu muối với Glu275.

Đã bất ngờ phát hiện rằng vấn đề nêu trên được giải quyết bởi các hợp chất có công thức I theo sáng chế.

Do đó, sáng chế đề cập đến hợp chất có công thức I hoặc muối được dụng của nó,

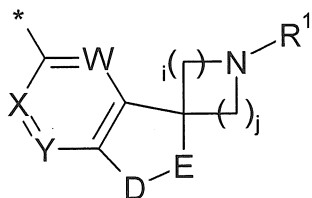


trong đó:

Cy là:



A là:



trong đó:

W được chọn từ nhóm gồm CH và N;

X được chọn từ nhóm gồm CH và N;

Y được chọn từ nhóm gồm CH và N;

với điều kiện là tối đa một trong số W, X và Y có thể là N;

D-E được chọn từ nhóm gồm $N(R^2)-C(O)$, CH_2CH_2 , $C(O)-O$ và CH_2-O ;

R^2 được chọn từ nhóm gồm H và C_{1-3} -alkyl;

R^1 được chọn từ nhóm gồm H, C_{1-3} -alkyl, $CH_3OCH_2CH_2-$, oxetanyl,

tetrahydrofuranyl, 4-tetrahydropyranyl và 3-tetrahydropyranyl;

i là 1, 2 hoặc 3;

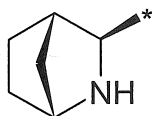
j là 1, 2 hoặc 3;

với điều kiện là tổng $i+j$ là 2, 3 hoặc 4.

Các phương án ưu tiên

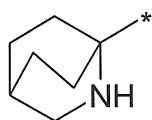
Đặc biệt ưu tiên các hợp chất có công thức I trên đây, hoặc muối được dụng của chúng, trong đó:

Cy là:



Ưu tiên các hợp chất có công thức I trên đây, hoặc muối được dụng của chúng, trong đó:

Cy là:



Ưu tiên các hợp chất có công thức I trên đây, hoặc muối được dụng của chúng, trong đó:

R^1 được chọn từ nhóm gồm H, CH_3 - và oxetanyl;

Ưu tiên các hợp chất có công thức I trên đây, hoặc muối được dụng của chúng, trong đó:

R^2 được chọn từ nhóm gồm H và CH_3 ;

Ưu tiên các hợp chất có công thức I trên đây, hoặc muối được dụng của chúng, trong đó:

R^2 là H.

Ưu tiên các hợp chất có công thức I trên đây, hoặc muối được dụng của chúng, trong đó:

R^2 là CH_3 ;

Ưu tiên các hợp chất có công thức I trên đây, hoặc muối được dụng của chúng, trong đó:

D-E là CH_2 -O

Ưu tiên các hợp chất có công thức I trên đây, hoặc muối được dụng của chúng, trong đó:

R^1 được chọn từ nhóm gồm H, CH_3 và oxetanyl;

R^2 là CH_3 ;

W được chọn từ nhóm gồm CH và N;

X được chọn từ nhóm gồm CH và N;

Y được chọn từ nhóm gồm CH;

với điều kiện là tối đa một trong số W, X và Y có thể là N;

D-E được chọn từ nhóm gồm $N(R^2)-C(O)$, CH_2CH_2 , $C(O)-O$ và CH_2-O ;

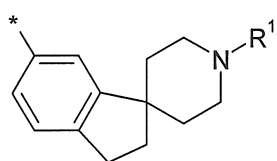
i là 1 hoặc 2;

j là 1 hoặc 2;

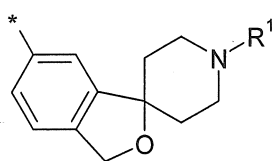
với điều kiện là tổng $i+j$ là 2, 3 hoặc 4.

Ưu tiên các hợp chất có công thức I trên đây, hoặc muối được dụng của chúng, trong đó:

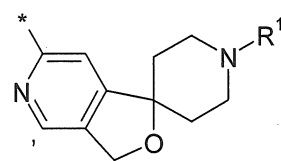
A được chọn từ nhóm gồm các công thức A1 đến A14:



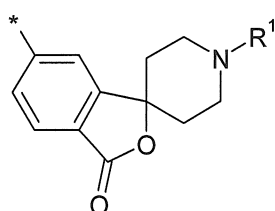
A1



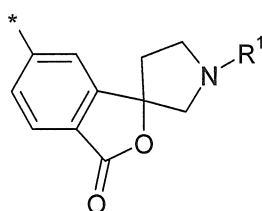
A2



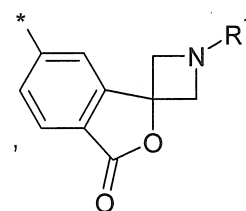
A3



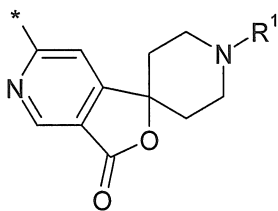
A4



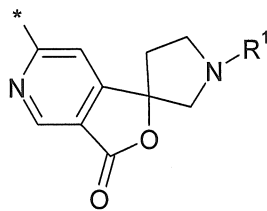
A5



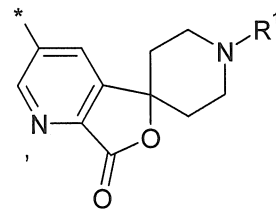
A6



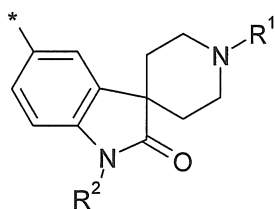
A7



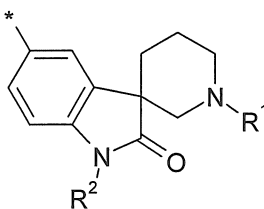
A8



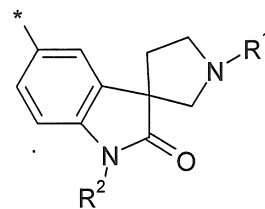
A9



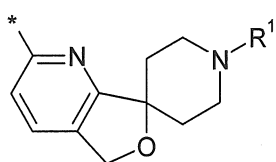
A10



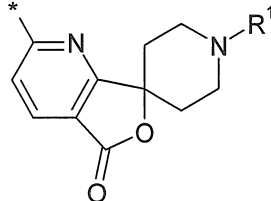
A11



A12



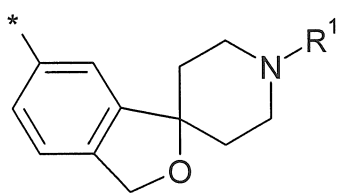
A13



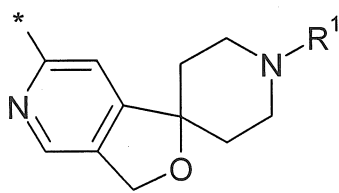
A14

Ưu tiên các hợp chất có công thức I trên đây, hoặc muối dược dụng của chúng, trong đó:

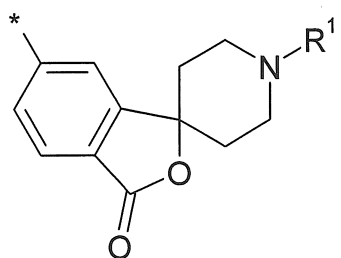
A được chọn từ nhóm gồm A2, A3, A4, A5, A6, A7, A10, A13, và A14.



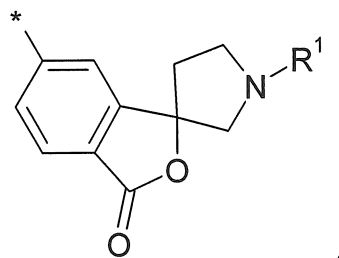
A2,



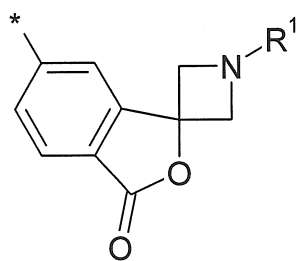
A3,



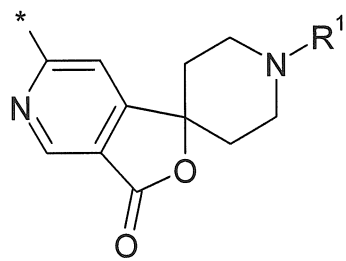
A4,



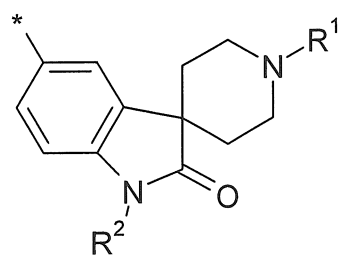
A5



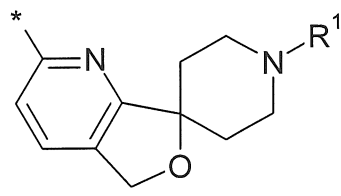
A6,



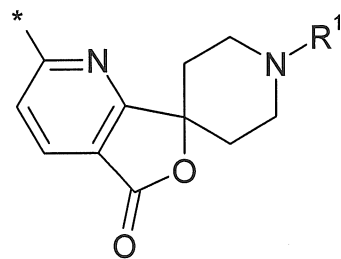
A7,



A10,



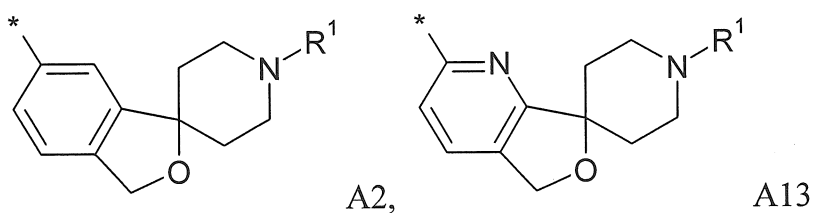
A13,



A14.

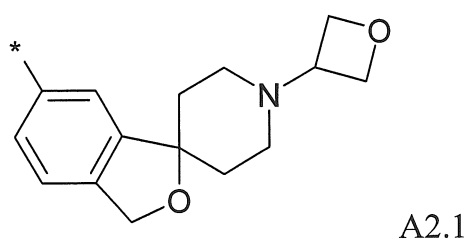
Ưu tiên các hợp chất có công thức I trên đây, hoặc muối dược dụng của chúng, trong đó:

A được chọn từ nhóm gồm A2 và A13



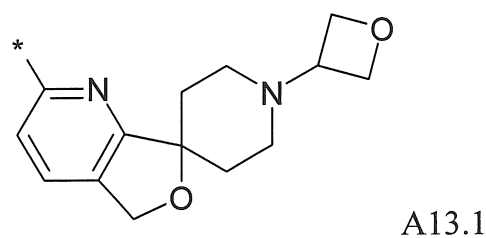
Ưu tiên các hợp chất có công thức I trên đây, hoặc muối dược dụng của chúng, trong đó:

A là nhóm có công thức A2.1.

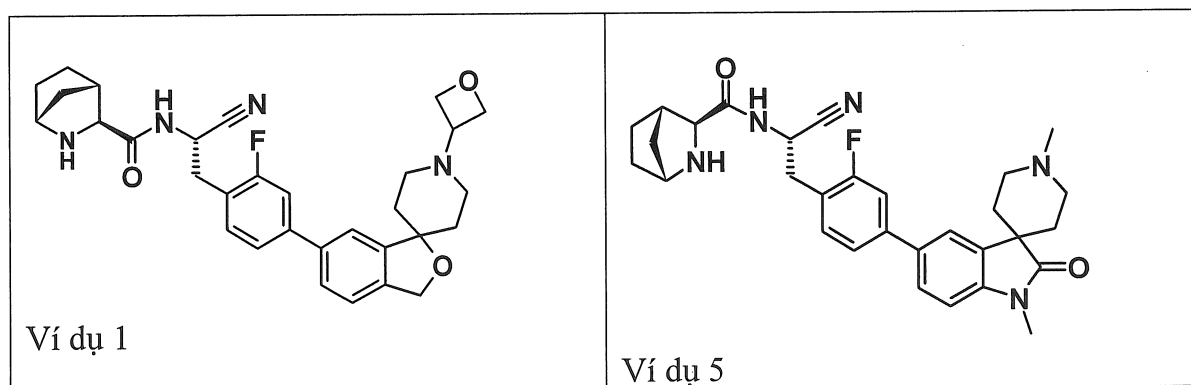


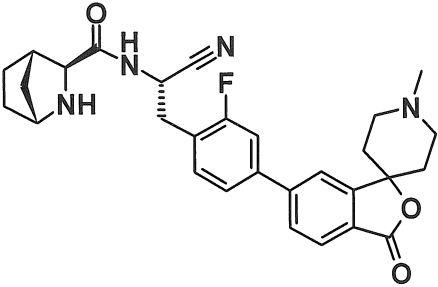
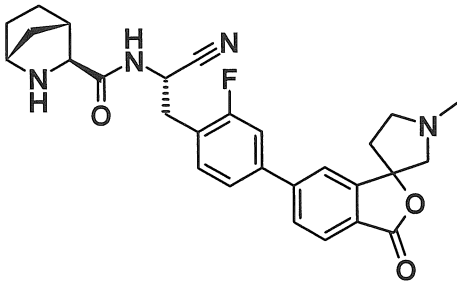
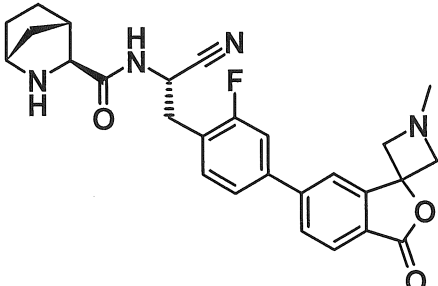
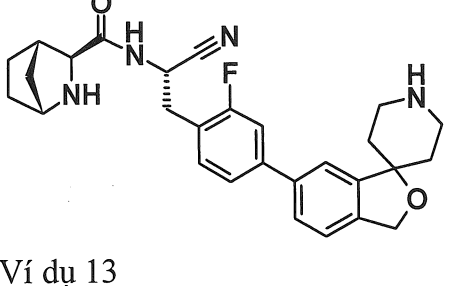
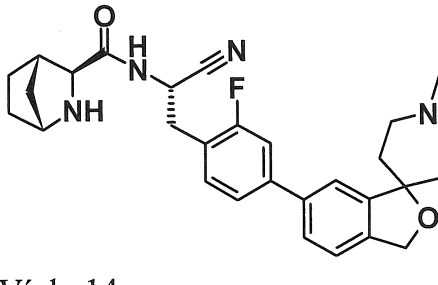
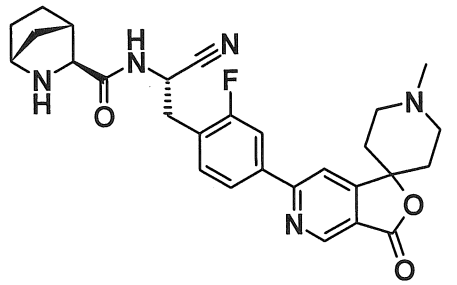
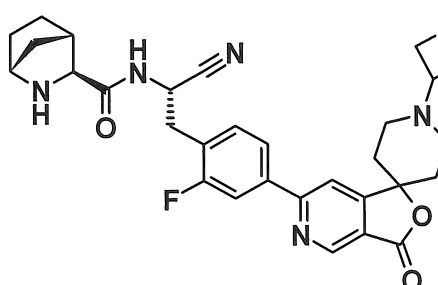
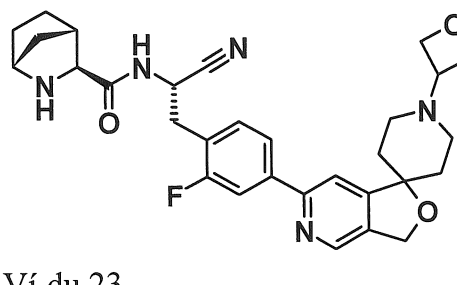
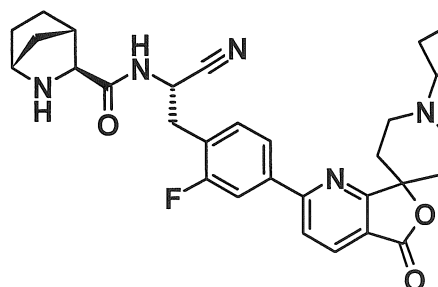
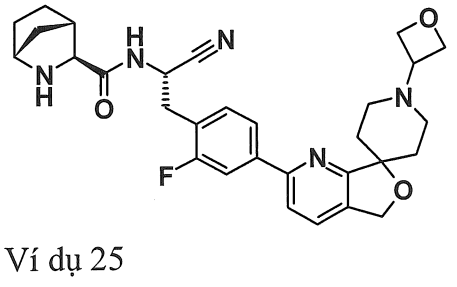
Ưu tiên các hợp chất có công thức I trên đây, hoặc muối dược dụng của chúng, trong đó:

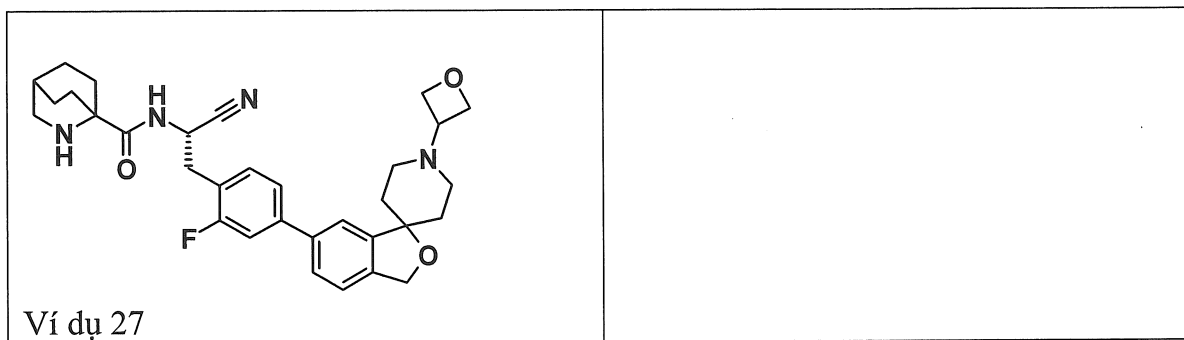
A là nhóm có công thức A13.1



Ưu tiên các hợp chất có công thức I trên đây, được chọn từ nhóm gồm các hợp chất theo ví dụ 1, 5, 8, 10, 12, 13, 14, 19, 22, 23, 24, 25 và 27.



 Ví dụ 8	 Ví dụ 10
 Ví dụ 12	 Ví dụ 13
 Ví dụ 14	 Ví dụ 19
 Ví dụ 22	 Ví dụ 23
 Ví dụ 24	 Ví dụ 25



Ưu tiên các hợp chất có công thức I trên đây, hoặc muối được dụng của chúng, trong đó:

R^1 được chọn từ nhóm gồm H và CH_3 .

Đặc biệt ưu tiên các hợp chất có công thức I trên đây, hoặc muối được dụng của chúng, trong đó:

R^1 là oxetanyl.

Ưu tiên các hợp chất có công thức I trên đây, hoặc muối được dụng của chúng, trong đó:

R^1 được chọn từ nhóm gồm H, CH_3 và oxetanyl;

R^2 được chọn từ nhóm gồm H và CH_3 .

Ưu tiên các hợp chất có công thức I trên đây, hoặc muối được dụng của chúng, trong đó:

R^1 được chọn từ nhóm gồm H và CH_3 ;

R^2 được chọn từ nhóm gồm H và CH_3 .

Ưu tiên các hợp chất có công thức I trên đây, hoặc muối được dụng của chúng, trong đó:

D-E được chọn từ nhóm gồm CH_2-O , $C(O)-O$ và $N(R^2)-C(O)$.

Đặc biệt ưu tiên các hợp chất có công thức I trên đây, hoặc muối được dụng của chúng, trong đó:

D-E được chọn từ nhóm gồm CH_2-O và $C(O)-O$.

Ưu tiên các hợp chất có công thức I trên đây, hoặc muối được dụng của chúng, trong đó:

R^1 được chọn từ nhóm gồm H, CH_3 và oxetanyl;

R^2 được chọn từ nhóm gồm H và CH_3 .

D-E được chọn từ nhóm gồm CH_2-O , $C(O)-O$ và $N(R_2)-C(O)$.

Đặc biệt ưu tiên các hợp chất có công thức I trên đây, hoặc muối được dụng của chúng, trong đó:

R^1 được chọn từ nhóm gồm H, CH_3 , oxetanyl;

D-E được chọn từ nhóm gồm CH_2-O và $C(O)-O$.

Đặc biệt ưu tiên các hợp chất có công thức I trên đây, hoặc muối được dụng của chúng, trong đó:

R^1 được chọn từ nhóm gồm oxetanyl;

D-E được chọn từ nhóm gồm CH_2-O và $C(O)-O$.

Đặc biệt ưu tiên các hợp chất có công thức I trên đây, hoặc muối được dụng của chúng, trong đó:

W là CH;

X là CH;

Y là CH.

Ưu tiên các hợp chất có công thức I trên đây, hoặc muối được dụng của chúng, trong đó:

W là CH;

X là N;

Y là CH.

Ưu tiên các hợp chất có công thức I trên đây, hoặc muối được dụng của chúng, trong đó:

W là N;

X là CH;

Y là CH.

Ưu tiên các hợp chất có công thức I trên đây, hoặc muối được dụng của chúng, trong đó:

W là CH;

X là CH;

Y là N.

Ưu tiên các hợp chất có công thức I trên đây, hoặc muối được dụng của chúng, trong đó:

R^1 được chọn từ nhóm gồm H, CH_3- và oxetanyl;

R^2 được chọn từ nhóm gồm H và CH_3- ;

- D-E được chọn từ nhóm gồm $\text{CH}_2\text{-O}$, C(O)-O và $\text{N(R}_2\text{)-C(O)}$;
 W là CH ;
 X là CH ;
 Y là CH .

Đặc biệt ưu tiên các hợp chất có công thức I trên đây, hoặc muối được dụng của chúng, trong đó:

- R^1 được chọn từ nhóm gồm H , $\text{CH}_3\text{-}$ và oxetanyl;
 D-E được chọn từ nhóm gồm $\text{CH}_2\text{-O}$ và C(O)-O ;
 W là CH ;
 X là CH ;
 Y là CH .

Ưu tiên các hợp chất có công thức I trên đây, hoặc muối được dụng của chúng, trong đó:

- R^1 được chọn từ nhóm gồm H , $\text{CH}_3\text{-}$ và oxetanyl;
 R^2 được chọn từ nhóm gồm H và $\text{CH}_3\text{-}$;
 D-E được chọn từ nhóm gồm $\text{CH}_2\text{-O}$, C(O)-O và $\text{N(R}_2\text{)-C(O)}$;
 W là N ;
 X là CH ;
 Y là CH .

Đặc biệt ưu tiên các hợp chất có công thức I trên đây, hoặc muối được dụng của chúng, trong đó:

- R^1 được chọn từ nhóm gồm H , $\text{CH}_3\text{-}$ và oxetanyl;
 D-E được chọn từ nhóm gồm $\text{CH}_2\text{-O}$ và C(O)-O ;
 W là N ;
 X là CH ;
 Y là CH .

Ưu tiên các hợp chất có công thức I trên đây, hoặc muối được dụng của chúng, trong đó:

- R^1 được chọn từ nhóm gồm H , $\text{CH}_3\text{-}$ và oxetanyl;
 R^2 được chọn từ nhóm gồm H và $\text{CH}_3\text{-}$;
 D-E được chọn từ nhóm gồm $\text{CH}_2\text{-O}$, C(O)-O và $\text{N(R}_2\text{)-C(O)}$;
 W là CH ;

X là N;

Y là CH.

Đặc biệt ưu tiên các hợp chất có công thức I trên đây, hoặc muối được dụng của chúng, trong đó:

R^1 được chọn từ nhóm gồm H, CH_3 - và oxetanyl;

D-E được chọn từ nhóm gồm CH_2 -O và $C(O)$ -O;

W là CH;

X là N;

Y là CH.

Ưu tiên các hợp chất có công thức I trên đây, hoặc muối được dụng của chúng, trong đó:

R^1 được chọn từ nhóm gồm H, CH_3 - và oxetanyl;

R^2 được chọn từ nhóm gồm H và CH_3 -;

D-E được chọn từ nhóm gồm CH_2 -O, $C(O)$ -O và $N(R_2)$ - $C(O)$;

W là CH;

X là CH;

Y là N.

Đặc biệt ưu tiên các hợp chất có công thức I trên đây, hoặc muối được dụng của chúng, trong đó:

R^1 được chọn từ nhóm gồm H, CH_3 - và oxetanyl;

D-E được chọn từ nhóm gồm CH_2 -O và $C(O)$ -O;

W là CH;

X là CH;

Y là N.

Đặc biệt ưu tiên các hợp chất có công thức I trên đây, hoặc muối được dụng của chúng, trong đó A được chọn từ nhóm gồm A2, A3, A4, A5, A6, A7, A8, A9, A10, A11, A12, A13 và A14.

Đặc biệt ưu tiên các hợp chất có công thức I trên đây, hoặc muối được dụng của chúng, trong đó A được chọn từ nhóm gồm A1, A2, A3, A4, A6, A7, A9, A10, A13 và A14.

Đặc biệt ưu tiên các hợp chất có công thức I trên đây, hoặc muối được dụng của chúng, trong đó A được chọn từ A4, A5, A6, A7, A8, A9 và A14.

Đặc biệt ưu tiên các hợp chất có công thức I trên đây, hoặc muối được dụng của chúng, trong đó A được chọn từ nhóm gồm A10, A11 và A12.

Đặc biệt ưu tiên các hợp chất có công thức I trên đây, hoặc muối được dụng của chúng, trong đó A được chọn từ nhóm gồm A2, A3, A9, A13 và A14.

Đặc biệt ưu tiên các hợp chất có công thức I trên đây, hoặc muối được dụng của chúng, trong đó A được chọn từ nhóm gồm A2, A3 và A13.

Đặc biệt ưu tiên các hợp chất có công thức I trên đây, hoặc muối được dụng của chúng, trong đó A là A2.

Đặc biệt ưu tiên các hợp chất có công thức I trên đây, hoặc muối được dụng của chúng, trong đó A là A13.

Ưu tiên các hợp chất có công thức I trên đây, hoặc muối được dụng của chúng, trong đó i là 2 và j là 1.

Ưu tiên các hợp chất có công thức I trên đây, hoặc muối được dụng của chúng, trong đó i là 1 và j là 1.

Đặc biệt ưu tiên các hợp chất có công thức I trên đây, hoặc muối được dụng của chúng, trong đó i là 2 và j là 2.

Ưu tiên các hợp chất có công thức I, trong đó các hợp chất này được chọn từ nhóm gồm các hợp chất theo ví dụ 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 22, 23, 24, 25, 26 và 27.

Định nghĩa bất kỳ và từng định nghĩa về R^1 , R^2 , Cy, A, D, E, W, X, Y, i và j có thể được kết hợp với nhau.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến hợp chất có công thức I hoặc muối được dụng của nó để dùng làm thuốc.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến hợp chất có công thức I hoặc muối được dụng của nó để dùng làm thuốc để điều trị bệnh hen và các bệnh dị ứng, bệnh viêm dạ dày ruột, viêm thận tiểu cầu, bệnh ưa eosin, bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính, nhiễm vi khuẩn gây bệnh, viêm khớp dạng thấp, bệnh ưa bạch cầu trung tính, xơ nang (CF), xơ hóa không ở nang, xơ hóa phổi vô căn, giãn phế quản, viêm mạch liên quan đến kháng thể ANCA, ung thư phổi, khí thũng, viêm phế quản mạn tính, chấn thương phổi cấp (acute lung injury - ALI), hội chứng suy hô hấp cấp (acute respiratory distress syndrome - ARDS), tăng áp phổi, (PAH) và Alpha-1-antitrypsin deficiency (AATD), bệnh béo phì

và tình trạng viêm liên quan, kháng insulin, bệnh tiểu đường, gan nhiễm mỡ và gan thâm mỡ.

Ưu tiên hợp chất có công thức I hoặc muối được dụng của nó để dùng làm thuốc để điều trị bệnh hen và các bệnh dị ứng, bệnh viêm dạ dày ruột, bệnh ưa eosin, bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính, khí thũng, nhiễm vi khuẩn gây bệnh, viêm khớp dạng thấp và xơ vữa động mạch.

Đặc biệt ưu tiên hợp chất có công thức I hoặc muối được dụng của nó để dùng làm thuốc để điều trị bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính và khí thũng.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến dược phẩm, khác biệt ở chỗ dược phẩm này chứa một hoặc nhiều hợp chất có công thức I hoặc muối có dược tính của nó.

Bản mô tả bộc lộ phương pháp điều trị hoặc phòng ngừa bệnh, trong đó chất ức chế hoạt tính DPPI có lợi ích trị liệu, phương pháp này bao gồm bước sử dụng lượng có tác dụng điều trị hoặc phòng ngừa của hợp chất có công thức 1 cho bệnh nhân cần điều trị hoặc phòng ngừa.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến dược phẩm, ngoài hợp chất có công thức I, còn hợp chất có dược tính được chọn từ nhóm gồm các betamimetic (chất hướng beta giao cảm), anticholinergic (ức chế phó giao cảm), corticosteroid, chất ức chế PDE4, chất đối kháng LTD4, chất ức chế EGFR, chất ức chế CRTH2, chất ức chế 5 LO, chất đối kháng thụ thể histamin, chất đối kháng CCR9 và chất ức chế SYK, chất ức chế NE, chất ức chế MMP9 và chất ức chế MMP12, và cả tổ hợp của hai hoặc ba chất hoạt này.

Các thuật ngữ và định nghĩa được sử dụng

Các thuật ngữ không được xác định cụ thể ở đây nên lấy nghĩa được gán cho chúng bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực theo nội dung bộc lộ và ngữ cảnh. Tuy nhiên, theo sử dụng trong bản mô tả này, trừ khi được xác định ngược lại, các thuật ngữ sau đây có ý nghĩa được chỉ rõ và những quy ước sau đây được tuân thủ.

Trong các nhóm, các gốc hoặc các phần định nghĩa dưới đây, số lượng nguyên tử cacbon thường được xác định ở trước nhóm, ví dụ, C₁₋₆-alkyl có nghĩa là nhóm hoặc gốc alkyl có 1 đến 6 nguyên tử cacbon.

Nói chung trong các nhóm đơn như HO, H₂N, S(O), S(O)₂, NC (xyano), HOOC, F₃C hoặc nhóm tương tự, người có kỹ năng có thể thấy (các) điểm liên kết gốc với phân tử từ các hóa trị tự do của bản thân nhóm. Đối với các nhóm kết hợp gồm hai hoặc nhiều

phân nhóm, phân nhóm gọi tên cuối cùng là điểm liên kết gốc, ví dụ, nhóm thế "aryl-C₁₋₄-alkyl-" nghĩa là nhóm aryl mà được liên kết với nhóm C₁₋₄-alkyl-, nhóm này được liên kết với nhân hoặc với nhóm mà nhóm thế được liên kết với nó.

Theo cách khác, "*" chỉ điểm gắn kết trong đơn vị cấu trúc hóa học.

Nếu hợp chất theo sáng chế được mô tả ở dạng tên hóa học và dạng công thức, trong trường hợp có bất kỳ sự không nhất quán nào, thì công thức chiếm ưu thế. Ký hiệu dấu sao có thể được sử dụng trong các công thức-phụ để chỉ liên kết mà kết nối với phân tử lõi khi được xác định.

Nhiều thuật ngữ sau đây có thể được sử dụng lặp lại khi định nghĩa về công thức hoặc nhóm và trong mỗi trường hợp, có một trong số các ý nghĩa đưa ra ở trên, một cách độc lập với nhau.

Thuật ngữ "được thế" theo sử dụng ở đây, có nghĩa là bất kỳ một hoặc nhiều hydro trên nguyên tử xác định được thay thế bằng một phần tử lựa chọn từ nhóm xác định, với điều kiện không được vượt quá hóa trị bình thường của nguyên tử xác định và sự thế dẫn đến một hợp chất ổn định.

Cách diễn giải "phòng ngừa", "dự phòng", "điều trị dự phòng" hoặc "điều trị phòng ngừa" sử dụng ở đây cần được hiểu là đồng nghĩa và với nghĩa là, làm giảm nguy cơ phát triển một tình trạng đã nêu trước đó trong tài liệu này, nhất là ở bệnh nhân có nguy cơ cao về các tình trạng nêu trên hoặc tiền sử bệnh tương ứng, ví dụ, nguy cơ cao phát triển rối loạn chuyển hóa như bệnh tiểu đường hoặc béo phì hoặc rối loạn khác đã nêu ở đây. Do đó, cách diễn giải "phòng ngừa bệnh" theo sử dụng ở đây có nghĩa là việc quản lý và chăm sóc một cá thể có nguy cơ phát triển bệnh trước khi bệnh khởi phát về mặt lâm sàng. Mục đích của việc phòng ngừa là chống lại sự phát triển bệnh, tình trạng hoặc rối loạn và bao gồm việc sử dụng các hoạt chất để phòng ngừa hoặc làm chậm sự khởi phát của triệu chứng hoặc biến chứng và để phòng ngừa hoặc làm chậm sự phát triển của bệnh, tình trạng hoặc rối loạn. Sự thành công của việc điều trị nêu trên được phản ánh về mặt thống kê bởi tần số mắc tình trạng nêu trên giảm ở một quần thể bệnh nhân có nguy cơ về tình trạng này so với quần thể bệnh nhân tương đương không được điều trị phòng ngừa.

Cách diễn giải "điều trị" hoặc "trị liệu" có nghĩa là điều trị trị liệu cho bệnh nhân đã phát triển một hoặc nhiều tình trạng nêu trên ở dạng rõ ràng, cấp tính hoặc mãn tính, bao gồm cả điều trị triệu chứng để làm giảm các triệu chứng của một chỉ định cụ thể

hoặc điều trị nguyên nhân để làm đảo ngược hoặc đảo ngược một phần tình trạng bệnh hoặc để làm chậm sự tiến triển của tình trạng chỉ định trong chừng mực có thể, tùy thuộc vào tình trạng và mức độ trầm trọng của tình trạng này. Do đó, cách diễn giải "điều trị bệnh" theo sử dụng ở đây có nghĩa là, việc quản lý và chăm sóc cho một bệnh nhân đã phát triển bệnh, tình trạng hoặc rối loạn. Mục đích của điều trị là chống lại bệnh, tình trạng hoặc rối loạn. Việc điều trị bao gồm bước sử dụng các hợp chất hoạt tính để loại trừ hoặc kiểm soát bệnh, tình trạng hoặc rối loạn cũng như để làm giảm các triệu chứng hoặc biến chứng kết hợp với bệnh, tình trạng hoặc rối loạn.

Trừ khi được chỉ ra cụ thể, trong toàn bộ phần mô tả và yêu cầu bảo hộ, một tên hoặc công thức hóa học xác định sẽ bao hàm cả các tautome và tất cả các chất đồng phân lập thể, quang học và hình học (ví dụ, các chất đồng phân đối ảnh, các chất đồng phân không đối quang, các chất đồng phân E/Z, v.v.) và các chất triệt quang của chúng cũng như các hỗn hợp với tỷ lệ khác nhau của các chất đồng phân đối ảnh riêng biệt, hỗn hợp của các chất đồng phân không đối quang, hoặc hỗn hợp của dạng bất kỳ trong số các dạng nêu trên khi các chất đồng phân và các chất đồng phân đối ảnh như vậy tồn tại, cũng như các muối, bao gồm cả muối được dụng của chúng và các solvat của chúng, ví dụ như các hydrat bao gồm cả các solvat của các hợp chất tự do hoặc các solvat của muối của hợp chất.

Thuật ngữ "được dụng" được dùng ở đây để chỉ các hợp chất, nguyên liệu, chế phẩm và/hoặc các dạng liều mà, trong phạm vi của đánh giá y tế thích hợp, thích hợp để dùng tiếp xúc với mô người và động vật mà không gây độc hại, kích ứng, phản ứng dị ứng quá mức hoặc không gây ra vấn đề hoặc biến chứng khác và tương xứng với tỷ lệ lợi ích/nguy cơ hợp lý.

Theo sử dụng ở đây, "muối được dụng" được dùng để chỉ các dẫn xuất của các hợp chất được bộc lộ ở đây, trong đó hợp chất gốc được cải biến bằng cách tạo ra các muối axit hoặc bazơ của nó. Ví dụ về các muối được dụng bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các muối axit vô cơ hoặc hữu cơ của các gốc bazơ như các amin; các muối kiềm hoặc hữu cơ của các gốc axit như các axit cacboxylic; và muối tương tự. Ví dụ, các muối như vậy bao gồm các muối của amoniac, L-arginin, betain, benetamin, benzathin, canxi hydroxit, cholin, deanol, dietanolamin (2, 2'-iminobis(etanol)), dietylamin, 2-(dietylamin)-etanol, 2-aminoetanol, etylendiamin, N-etyl-glucamin, hydrabamin, 1H-imidazol, lysin, magie hydroxit, 4-(2-hydroxyetyl)-morpholin, piperazin, kali

hydroxit, 1-(2-hydroxyetyl)-pyrrolidin, natri hydroxit, trietanolamin (2, 2', 2''-nitrilotris(etanol)), trometamin, kẽm hydroxit, axit axetic, axit 2.2-diclo-axetic, axit adipic, axit alginic, axit ascorbic, axit L-aspartic, axit benzensulfonic, axit benzoic, axit 2, 5-dihydroxybenzoic, axit 4-acetamido-benzoic, axit (+)-camphoric, axit (+)-camphor-10-sulfonic, axit cacbonic, axit cinnamic, axit citric, axit cyclamic, axit decanoic, axit dodexylsulfuric, axit etan-1, 2-disulfonic, axit etansulfonic, axit 2-hydroxy-etansulfonic, axit etylendiamintetraaxetic, axit formic, axit fumaric, axit galactaric, axit gentisic, axit D-glucoheptonic, axit D-gluconic, axit D-glucuronic, axit glutamic, axit glutaric, axit 2-oxo-glutaric, axit glycerophosphoric, axit glycin, glycolic, axit hexanoic, axit hippuric, axit hydrobromic, axit clohydric, axit isobutyric, axit DL-lactic, axit lactobionic, axit lauric, lysin, axit maleic, axit (-)-L-malic, axit malonic, axit DL-mandelic, axit metansulfonic, axit galactaric, axit naphtalen-1,5-disulfonic, axit naphtalen-2-sulfonic, axit 1-hydroxy-2-naphthoic, axit nicotinic, axit nitric, axit octanoic, axit oleic, axit orotic, axit oxalic, axit palmitic, axit pamoic (axit embonic), axit phosphoric, axit propionic, axit (-)-L-pyroglutamic, axit salicylic, axit 4-amino-salicylic, axit sebacic, axit stearic, axit suxinic, axit sulfuric, axit tannic, axit (+)-L-tartric, axit thioxyanic, axit p-toluensulfonic và axit undexylenic. Các muối được dùng khác có thể được tạo ra nhờ các cation từ các kim loại như nhôm, canxi, lithi, magie, kali, natri, kẽm và các kim loại tương tự. (Tương tự, xem trong tài liệu Pharmaceutical salts, Birge, S.M. et al., J. Pharm. Sci., (1977), 66, 1-19).

Các muối được dùng theo sáng chế có thể được tổng hợp từ hợp chất gốc mà chứa gốc axit hoặc bazơ bằng các phương pháp hóa học thông thường. Nói chung, các muối này có thể được điều chế bằng cách cho các dạng axit hoặc bazơ tự do của các hợp chất này phản ứng với lượng đủ của bazơ hoặc axit thích hợp trong nước hoặc trong chất pha loãng hữu cơ như ete, etyl axetat, etanol, isopropanol, hoặc axetonitril, hoặc hỗn hợp của chúng.

Muối của các axit khác không phải các axit được đề cập trên đây mà, ví dụ hữu dụng để tinh chế hoặc tách các hợp chất theo sáng chế (ví dụ các muối triflo axetat), cũng là một phần của sáng chế.

Thuật ngữ halogen thường để chỉ flo, clo, brom và iot.

Thuật ngữ "C_{1-n}-alkyl", trong đó n là số nguyên được chọn từ 2, 3, 4, 5 hoặc 6, độc lập hoặc kết hợp với gốc khác được dùng để chỉ gốc hydrocacbon mạch thẳng hoặc mạch

nhánh, không vòng, bão hòa có từ 1 đến n nguyên tử C. Ví dụ thuật ngữ C₁₋₅-alkyl bao gồm các gốc H₃C-, H₃C-CH₂-, H₃C-CH₂-CH₂-, H₃C-CH(CH₃)-, H₃C-CH₂-CH₂-CH₂-, H₃C-CH₂-CH(CH₃)-, H₃C-CH(CH₃)-CH₂-, H₃C-C(CH₃)₂-, H₃C-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-, H₃C-CH₂-CH₂-CH(CH₃)-, H₃C-CH₂-CH(CH₃)-CH₂-, H₃C-CH(CH₃)-CH₂-CH₂-, H₃C-CH₂-C(CH₃)₂-, H₃C-C(CH₃)₂-CH₂-, H₃C-CH(CH₃)-CH(CH₃)- và H₃C-CH₂-CH(CH₂CH₃)-.

Thuật ngữ “oxetanyl” chỉ vòng no 4 cạnh chứa nguyên tử oxy ở vị trí số 3 so với điểm gắn kết.

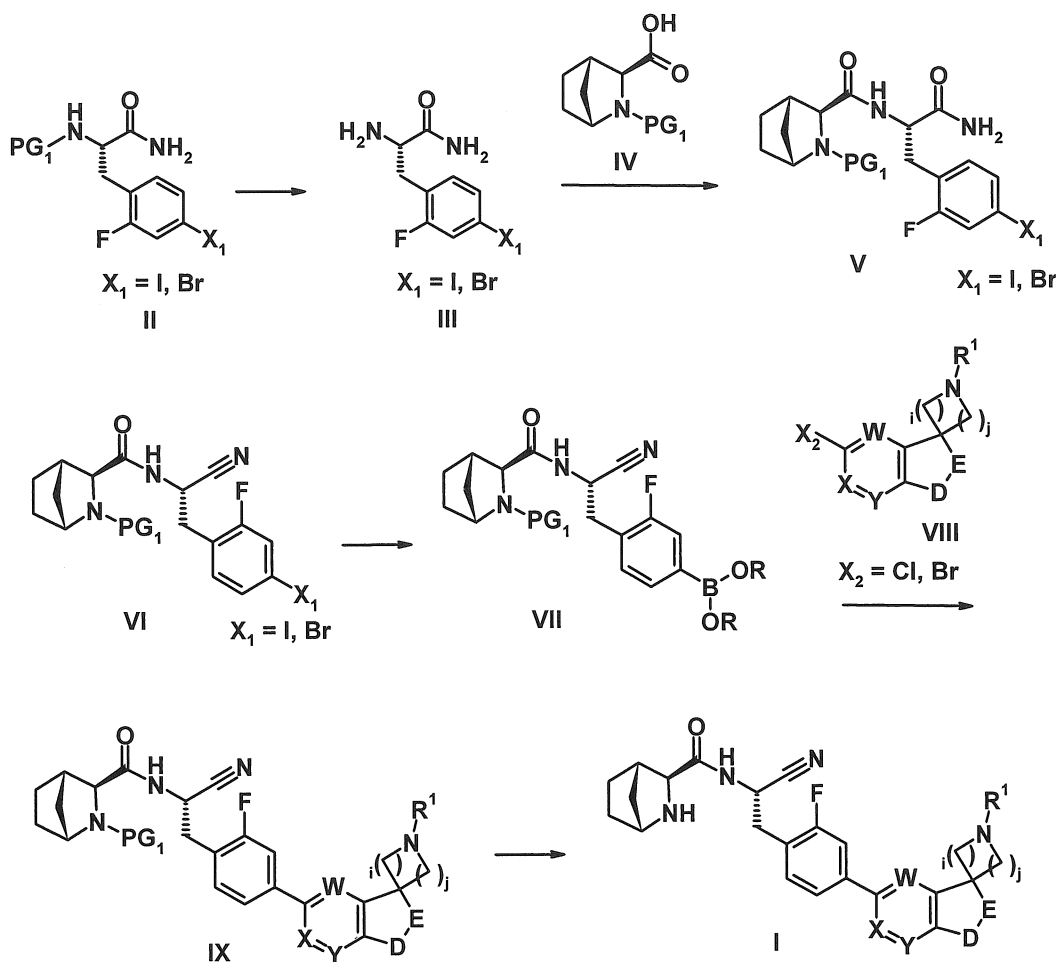
Điều chế

Các phương pháp tổng hợp chung

Sáng chế cũng đề xuất quy trình điều chế hợp chất có công thức I.

Các điều kiện và thời gian phản ứng tối ưu có thể thay đổi tùy thuộc vào các chất phản ứng cụ thể được sử dụng. Trừ khi có quy định khác, dung môi, nhiệt độ, áp suất và các điều kiện phản ứng khác có thể dễ dàng được chọn bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực này. Các quy trình cụ thể được đưa ra trong mục Các ví dụ tổng hợp. Thông thường, tiến trình phản ứng có thể được theo dõi bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng (thin layer chromatography - TLC) hoặc LC-MS, nếu muốn, và các hợp chất trung gian và sản phẩm có thể được tinh chế bằng phương pháp sắc ký trên silica gel, HPLC và/hoặc bằng cách kết tinh lại. Các ví dụ sau đây nhằm minh họa và, như người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực này thừa nhận, các chất phản ứng hoặc điều kiện cụ thể có thể được thay đổi nếu cần đối với từng hợp chất riêng rẽ mà thử nghiệm không phi lý. Các nguyên liệu ban đầu và các hợp chất trung gian được sử dụng trong các phương pháp dưới đây có bán trên thị trường hoặc dễ dàng điều chế được từ các nguyên liệu có bán trên thị trường bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Hợp chất có công thức I có thể được điều chế bằng phương pháp được đưa ra trong Sơ đồ 1, 2, 3 hoặc 4:



Sơ đồ 1

Như được minh họa trong sơ đồ 1, việc bảo vệ và loại bảo vệ các nhóm chức được mô tả trong tài liệu ‘Protective Groups in Organic Synthesis’, của T. W. Greene và P. G. M. Wuts, Wiley-Interscience. Ví dụ, để loại bảo vệ nhóm *tert*-butoxycarbonyl, axit như axit formic, axit trifloaxetic, axit p-toluensulfonic hoặc HCl có thể được sử dụng trong dung môi thích hợp như nước, DCM hoặc dioxan để tạo ra hợp chất có công thức III.

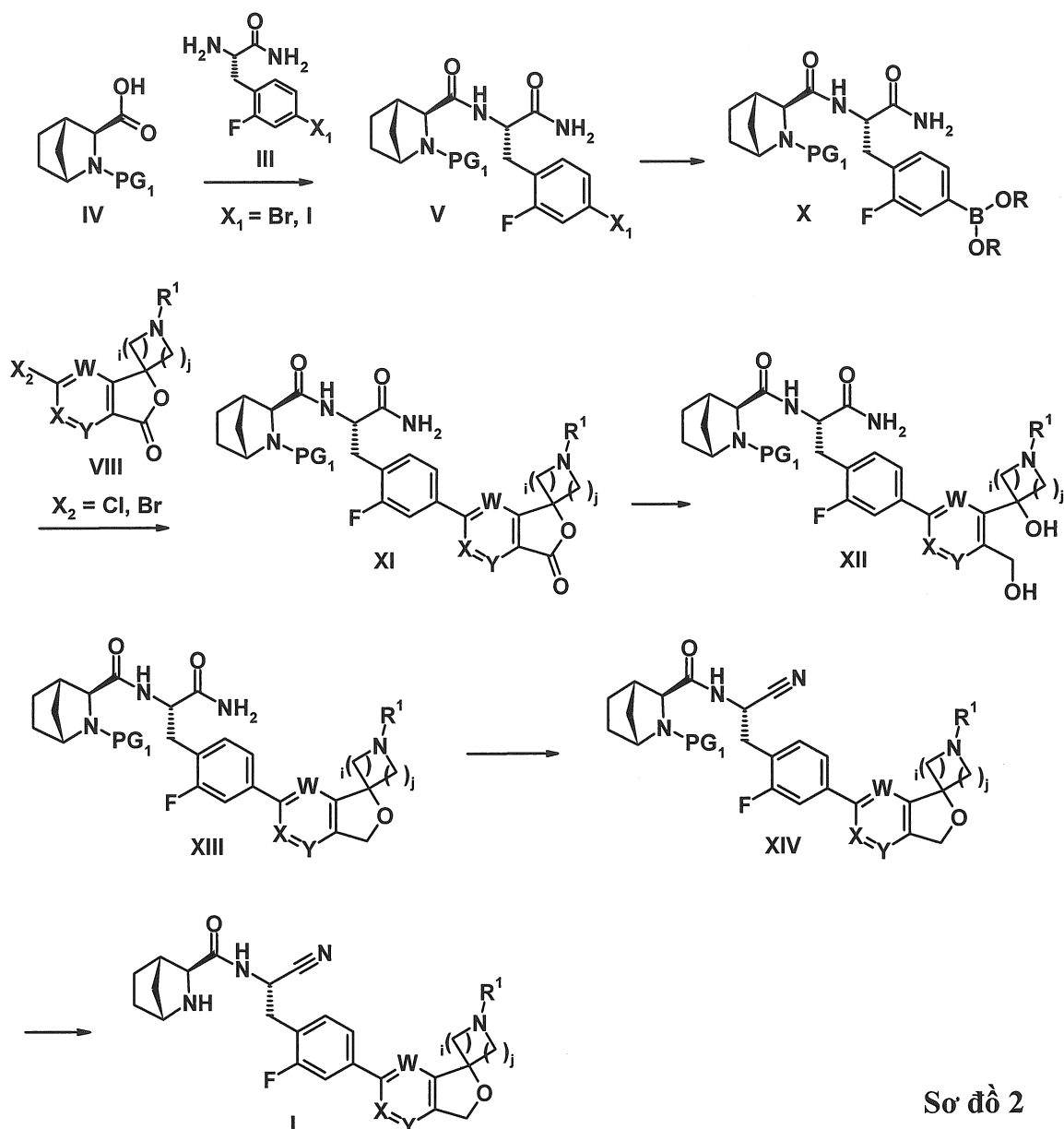
Việc cho axit có công thức IV, trong đó PG_1 là nhóm bảo vệ (ví dụ *tert*-butoxycarbonyl) sử dụng các quy trình trong tài liệu chuẩn để điều chế amit, ví dụ với sự có mặt của bazơ như N,N-diisopropyletylamin (DIPEA) và chất hoạt hóa như HATU hoặc TBTU, phản ứng với amin có công thức III trong dung môi thích hợp, tạo ra hợp chất có công thức V. Các phản ứng kết hợp peptit chuẩn đã biết trong lĩnh vực này (xem ví dụ M. Bodanszky, 1984, The Practice of Peptide Synthesis, Springer-Verlag) có thể được sử dụng trong các quy trình tổng hợp này.

Việc loại nước amit như trong hợp chất có công thức V thành nitril có công thức VI có thể thực hiện được bằng cách sử dụng chất loại nước như (metoxycarbonylsulfamoyl)triethyl amoni hydroxit, trong dung môi thích hợp như diclometan (DCM).

Các hợp chất có công thức VI ($X_1 = \text{I, Br}$) có thể được chuyển thành dẫn xuất axit boronic tương ứng VII, trong đó R có thể là H hoặc alkyl thấp hơn một cách độc lập và các gốc R có thể tạo thành vòng. Ví dụ, hợp chất VI có thể được cho phản ứng với bis(neopentyl glycolato)diboron với sự có mặt của chất xúc tác thích hợp như [1,1'-bis(diphenylphosphino)feroxen]diclopaladi(II), và bazơ thích hợp như kali axetat hoặc natri, kali hoặc xesi cacbonat hoặc phosphat, trong dung môi thích hợp như dioxan, dimetylformamit (DMF), hoặc diclometan (DCM) để tạo ra các dẫn xuất axit boronic VII.

Các hợp chất này có thể được cho phản ứng trong phản ứng hợp chất có công thức VIII ($X_2 = \text{Cl, Br}$) có xúc tác kim loại (chuyển tiếp). Việc kết hợp các halogenua VIII này tạo ra hợp chất có công thức IX. Ví dụ, phản ứng của các halogenua này với axit boronic hoặc este của axit boronic tương ứng VII, trong dung môi thích hợp như dioxan, với sự có mặt của chất xúc tác thích hợp như 1,1'-bis(di-*tert*-butylphosphino)feroxen paladi diclorua và bazơ thích hợp như natri, kali hoặc xesi cacbonat, tạo ra hợp chất có công thức IX.

Việc bảo vệ và loại bảo vệ các nhóm chức được mô tả trong tài liệu 'Protective Groups in Organic Synthesis', của T. W. Greene và P. G. M. Wuts, Wiley-Interscience. Ví dụ, để loại bảo vệ nhóm *tert*-butoxycarbonyl, axit như axit p-toluensulfonic monohydrat có thể được sử dụng trong dung môi thích hợp như axetonitril để tạo ra hợp chất có công thức I.



Sơ đồ 2

Như được minh họa trong sơ đồ 2, việc cho axit có công thức IV, trong đó PG_1 là nhóm bảo vệ (ví dụ *tert*-butoxycarbonyl) sử dụng các quy trình trong tài liệu chuẩn để điều chế amit, ví dụ với sự có mặt của bazơ như N, N-diisopropyletylamin (DIPEA) và chất hoạt hóa như HATU hoặc TBTU, phản ứng với amin có công thức III trong dung môi thích hợp, tạo ra hợp chất có công thức V. Các phản ứng kết hợp peptit chuẩn đã biết trong lĩnh vực này (xem ví dụ M. Bodanszky, 1984, *The Practice of Peptide Synthesis*, Springer-Verlag) có thể được sử dụng trong các quy trình tổng hợp này.

Các hợp chất có công thức V có thể được chuyển thành các dẫn xuất axit boronic X tương ứng theo cách tương tự như quy trình phản ứng được mô tả trong sơ đồ 1.

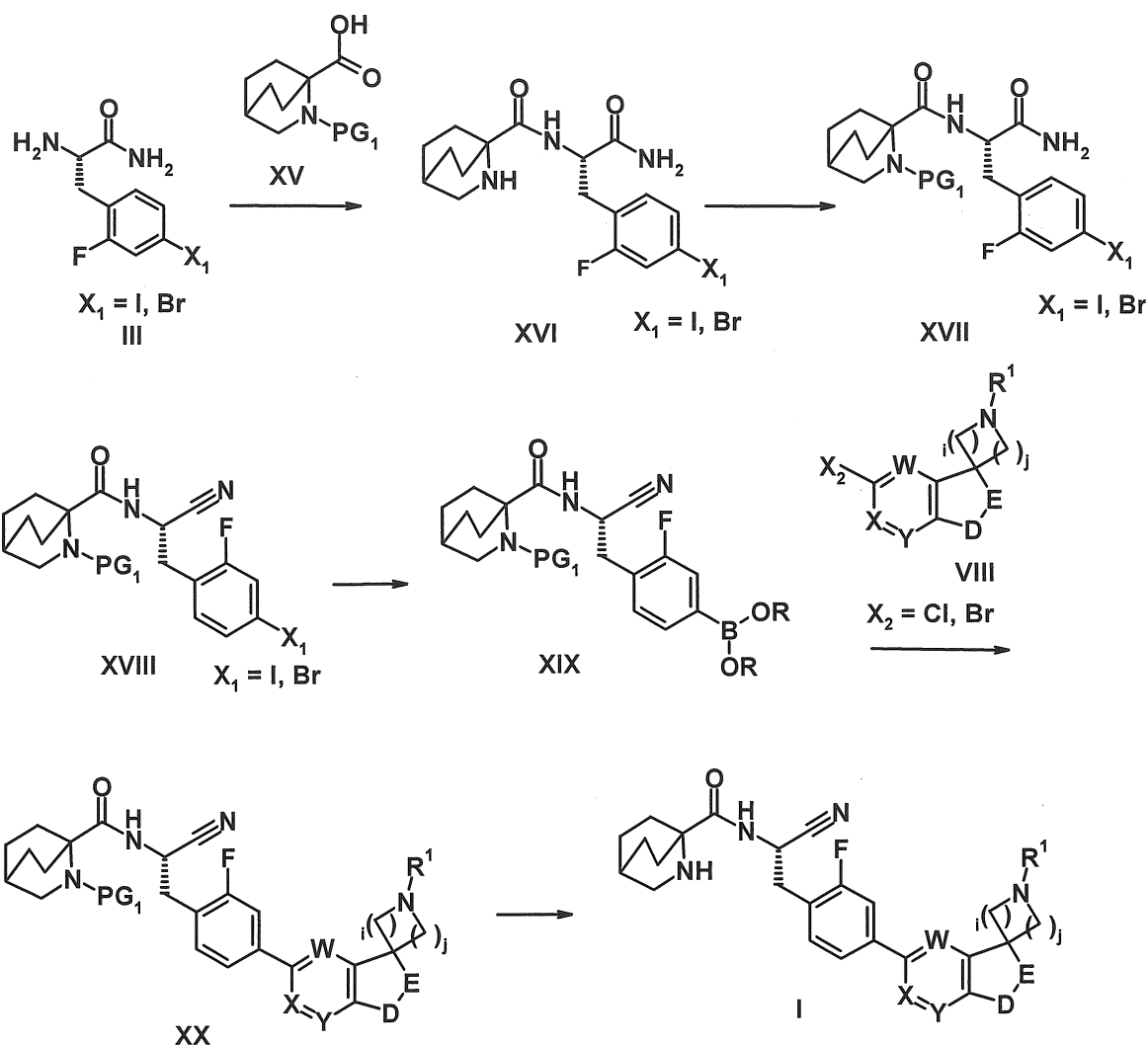
Các hợp chất này có thể được cho phản ứng trong phản ứng của hợp chất có công thức VIII ($X_2 = Cl, Br$) có xúc tác kim loại (chuyển tiếp) để tạo ra hợp chất có công thức XI tương tự với quy trình phản ứng được mô tả trong sơ đồ 1.

Hợp chất có công thức XI có thể được chuyển thành hợp chất có công thức XII bằng cách sử dụng chất khử như lithi hoặc natri bohydrua trong dung môi thích hợp như tetrahydrofuran.

Hợp chất có công thức XII có thể được chuyển thành hợp chất có công thức XIII bằng cách sử dụng các chất phản ứng như p-toluensulfonic anhydrit hoặc metansulfonyl clorua với sự có mặt của bazơ như triethylamin hoặc N,N-diisopropyletylamin (DIPEA) trong dung môi thích hợp như tetrahydrofuran.

Việc loại nước amit như trong hợp chất có công thức XIII thành nitril có công thức XIV có thể thực hiện được bằng cách sử dụng chất loại nước như (metoxycarbonylsulfamoyl)trietyl amoni hydroxit, trong dung môi thích hợp như diclometan (DCM).

Việc bảo vệ và loại bảo vệ các nhóm chức được mô tả trong tài liệu 'Protective Groups in Organic Synthesis', của T. W. Greene và P. G. M. Wuts, Wiley-Interscience. Ví dụ, để loại bảo vệ nhóm *tert*-butoxycarbonyl, axit như axit p-toluensulfonic monohydrat có thể được sử dụng trong dung môi thích hợp như axetonitril để tạo ra hợp chất có công thức I.



Sơ đồ 3

Như được minh họa trong sơ đồ 2, việc cho axit có công thức XV, trong đó PG1 là nhóm bảo vệ (ví dụ *tert*-butoxycarbonyl) sử dụng các quy trình trong tài liệu chuẩn để điều chế amit, ví dụ với sự có mặt của bazơ như N-metylmorpholin và chất hoạt hóa như axit 1-propanphosphonic anhydrit vòng (PPA) với amin có công thức III trong dung môi thích hợp, tạo ra hợp chất có công thức XVI. Các phản ứng kết hợp peptit chuẩn đã biết trong lĩnh vực này (xem Ví dụ M. Bodanszky, 1984, *The Practice of Peptide Synthesis*, Springer-Verlag) có thể được sử dụng trong các quy trình tổng hợp này.

Việc bảo vệ và loại bảo vệ các nhóm chức được mô tả trong tài liệu 'Protective Groups in Organic Synthesis', của T. W. Greene và P. G. M. Wuts, Wiley-Interscience. Ví dụ, để bảo vệ amin có công thức XVI, di-*tert*-butyl dicacbonat có thể được sử dụng trong dung môi thích hợp như diclometan để tạo ra hợp chất có công thức XVII.

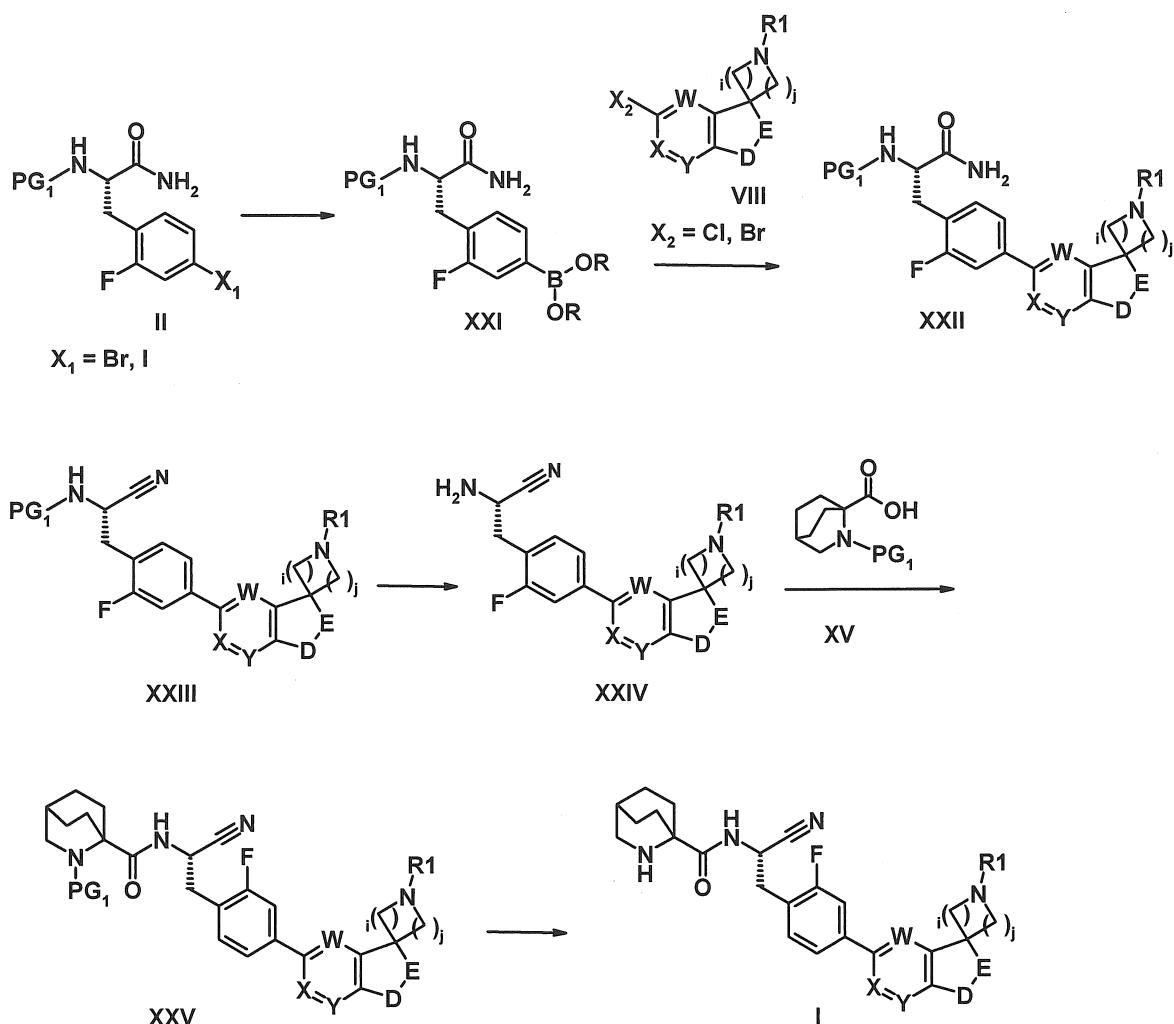
Việc loại nước amit như trong hợp chất có công thức XVII thành nitril có công thức XVIII có thể thực hiện được bằng cách sử dụng chất loại nước như

(metoxycarbonylsulfamoyl)trietyl amoni hydroxit, trong dung môi thích hợp như diclometan (DCM).

Các hợp chất có công thức XVIII ($X_1 = \text{I, Br}$) có thể được chuyển thành dẫn xuất axit boronic tương ứng XIX, trong đó R có thể là H hoặc alkyl thấp hơn một cách độc lập và các gốc R có thể tạo thành vòng. Ví dụ, hợp chất XVIII có thể được cho phản ứng với bis(pinacolato)diboron với sự có mặt của chất xúc tác thích hợp như [1,1'-bis(diphenylphosphino)feroxen]diclopaladi(II), và bazơ thích hợp như kali axetat hoặc natri, kali hoặc xesi cacbonat hoặc phosphat, trong dung môi thích hợp như dioxan, dimetylformamit (DMF), hoặc diclometan (DCM) để tạo ra các dẫn xuất axit boronic XIX.

Các hợp chất này có thể được cho phản ứng trong phản ứng hợp chất có công thức VIII ($X_2 = \text{Cl, Br}$) có xúc tác kim loại (chuyển tiếp). Việc kết hợp các halogenua VIII này tạo ra hợp chất có công thức XX. Ví dụ, phản ứng của các halogenua này với axit boronic hoặc este của axit boronic tương ứng XIX, trong dung môi thích hợp như dioxan, với sự có mặt của chất xúc tác thích hợp như 1,1'-bis(di-*tert*-butylphosphino)feroxen paladi diclorua và bazơ thích hợp như natri, kali hoặc xesi cacbonat, tạo ra hợp chất có công thức XX.

Việc bảo vệ và loại bỏ bảo vệ các nhóm chức được mô tả trong tài liệu 'Protective Groups in Organic Synthesis', của T. W. Greene và P. G. M. Wuts, Wiley-Interscience. Ví dụ, để loại bỏ bảo vệ nhóm *tert*-butoxycarbonyl, axit như axit p-toluensulfonic monohydrat có thể được sử dụng trong dung môi thích hợp như axetonitril để tạo ra hợp chất có công thức I.



Sơ đồ 4

Như được minh họa trong sơ đồ 4, hợp chất có công thức II có thể được chuyển thành dẫn xuất axit boronic tương ứng XXI, trong đó R có thể là H hoặc alkyl thấp hơn một cách độc lập và các gốc R có thể tạo thành vòng. Ví dụ, hợp chất II có thể được cho phản ứng với bis(neopentyl glycolato)diboron với sự có mặt của chất xúc tác thích hợp như [1,1'-bis(diphenylphosphino)feroxen]diclopaladi(II), và bazơ thích hợp như kali axetat hoặc natri, kali hoặc xesi cacbonat hoặc phosphat, trong dung môi thích hợp như dioxan, dimetylformamit (DMF), hoặc diclometan (DCM) để tạo ra các dẫn xuất axit boronic XXI.

Các hợp chất này có thể được cho phản ứng trong phản ứng của hợp chất có công thức VIII có xúc tác kim loại (chuyển tiếp) tương tự với quy trình phản ứng được mô tả trong sơ đồ 1 để tạo ra hợp chất có công thức XXII.

Việc loại nước amit như trong hợp chất có công thức XXII thành nitril có công thức XXIII có thể thực hiện được bằng cách sử dụng chất loại nước như

(metoxycarbonylsulfamoyl)triethyl amoni hydroxit, trong dung môi thích hợp như diclometan (DCM).

Việc bảo vệ và loại bảo vệ các nhóm chức được mô tả trong tài liệu ‘Protective Groups in Organic Synthesis’, của T. W. Greene và P. G. M. Wuts, Wiley-Interscience. Ví dụ, để loại bảo vệ *tert*-butoxycarbonyl, axit như axit p-toluensulfonic monohydrat có thể được sử dụng trong dung môi thích hợp như axetonitril để tạo ra hợp chất có công thức XXIV.

Việc cho axit có công thức XV, trong đó PG1 là nhóm bảo vệ (ví dụ *tert*-butoxycarbonyl) sử dụng các quy trình trong tài liệu chuẩn để điều chế amit, ví dụ với sự có mặt của bazơ như N-metylmorpholin và chất hoạt hóa như axit 1-propanphosphonic anhydrit vòng (PPA) với amin có công thức XXIV trong dung môi thích hợp, tạo ra hợp chất có công thức XXV. Các phản ứng kết hợp peptit chuẩn đã biết trong lĩnh vực này (xem Ví dụ M. Bodanszky, 1984, The Practice of Peptide Synthesis, Springer-Verlag) có thể được sử dụng trong các quy trình tổng hợp này.

Việc bảo vệ và loại bảo vệ các nhóm chức được mô tả trong tài liệu ‘Protective Groups in Organic Synthesis’, của T. W. Greene và P. G. M. Wuts, Wiley-Interscience. Ví dụ, để loại bảo vệ *tert*-butoxycarbonyl, axit như axit p-toluensulfonic monohydrat có thể được sử dụng trong dung môi thích hợp như axetonitril để tạo ra hợp chất có công thức I.

Các biến đổi khác của các hợp chất có công thức I bằng phương pháp đã biết trong lĩnh vực này và được minh họa trong các ví dụ dưới đây, có thể được sử dụng để điều chế các hợp chất khác theo sáng chế.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ tổng hợp

Dưới đây là các hợp chất đại diện của sáng chế, các hợp chất này có thể được điều chế theo các sơ đồ tổng hợp chung, các ví dụ dưới đây và các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các nguyên liệu ban đầu và các hợp chất trung gian có bán trên thị trường và mua được theo danh mục của các hãng ABCR, ACROS, ABLOCK PHARMATECH, ACTIVATE, ALDRICH, APOLLO SCIENTIFIC, ARK PHARM INC, ATLANTIC SCIENTIFIC TECHNOLOGY, BETAPHARM, BEFARM, CHEMBRIDGE CORPORATION, CNH-TECH, ENAMINE LTD, GOLDENBRIDGE PHARMA INC, GVK BIO, MERCACHEM, MOLBRIDGE, WUXI APPTec,

ZERENEX hoặc được tổng hợp theo tài liệu hoặc được mô tả dưới đây trong mục “Tổng hợp các nguyên liệu ban đầu/các chất chiết”

Thời gian lưu trong phương pháp sắc ký lỏng-phổ khối (Liquid chromatography-mass spectroscopy - LCMS) và dữ liệu m/z quan sát được đối với các hợp chất dưới đây thu được bằng một trong các phương pháp sau:

Phương pháp LC-MS V001_007

Mô tả thiết bị	Waters Alliance với DAD và MSD			
Cột	Waters XBridge C18			
Kích thước cột	4,6 x 30 mm			
Kích thước hạt	3,5 μ m			
Gradient/Dung môi Thời gian [phút]	% Sol [H ₂ O, TFA 0,1%]	% Sol [Metanol]	Dòng [ml/phút]	Nhiệt độ [°C]
0,0	95	5	4	60
1,6	0	100	4	60
1,85	0	100	4	60
1,9	95	5	4	60

Phương pháp LC-MS V003_003

Mô tả thiết bị	Waters Alliance với DAD và MSD			
Cột	Waters XBridge C18			
Kích thước cột	4,6 x 30 mm			
Kích thước hạt	3,5 μ m			
Gradient/Dung môi Thời gian [phút]	% Sol [H ₂ O, 0,1% NH ₃]	% Sol [Metanol]	Dòng [ml/phút]	Nhiệt độ [°C]
0,0	95	5	4	60
0,2	95	5	4	60
1,5	0	100	4	60
1,75	0	100	4	60

Phương pháp LC-MS V011_S01

Mô tả thiết bị	Waters Alliance với DAD và MSD			
Cột	Waters XBridge C18			
Kích thước cột	4,6 x 30 mm			
Kích thước hạt	3,5 μ m			
Gradient dung môi thời gian [phút]	% Sol [H ₂ O, 0,1% NH ₃]	% Sol [Axetonitril]	Dòng [ml/phút]	Nhiệt độ [°C]

Mô tả thiết bị			Waters Alliance với DAD và MSD	
0,0	97	3	5	60
0,2	97	3	5	60
1,6	0	100	5	60
1,7	0	100	5	60

Phương pháp LC-MS V012_S01

Mô tả thiết bị			Waters Alliance với DAD và MSD	
Cột			Waters XBridge C18	
Kích thước cột			4,6 x 30 mm	
Kích thước hạt			3,5 µm	
Gradient dung môi thời gian [phút]	% Sol [H ₂ O, TFA 0,1%]	% Sol [Acetonitril]	Dòng [ml/phút]	Nhiệt độ [°C]
0,0	97	3	5	60
0,2	97	3	5	60
1,6	0	100	5	60
1,7	0	100	5	60

Phương pháp LC-MS X001_004

Mô tả thiết bị			Waters Acquity với DAD và MSD	
Cột			Waters XBridge C18	
Kích thước cột			2,1 x 20 mm	
Kích thước hạt			2,5 µm	
Gradient/Dung môi Thời gian [phút]	% Sol [H ₂ O, TFA 0,10%]	% Sol [Metanol]	Dòng [ml/phút]	Nhiệt độ [°C]
0,0	95	5	1,4	60
0,05	95	5	1,4	60
1,00	0	100	1,4	60
1,1	0	100	1,4	60

Phương pháp LC-MS X011_S03

Mô tả thiết bị		Waters Acquity với DAD và MSD		
Cột		Waters Xbridge BEH C18		
Kích thước cột		2,1 x 30 mm		
Kích thước hạt		1,7 µm		

Mô tả thiết bị		Waters Acquity với DAD và MSD		
Gradient dung môi thời gian [phút]	% Sol [H ₂ O, NH ₃ 0,1%]	% Sol [Axetonitril]	Dòng [ml/phút]	Nhiệt độ [°C]
0,00	95	5	1,3	60
0,02	95	5	1,3	60
1,00	0	100	1,3	60
1,10	0	100	1,3	60

Phương pháp LC-MS X012_S02

Mô tả thiết bị		Waters Acquity với DAD và MSD		
Cột		Waters XBridge BEH C18		
Kích thước cột		2,1 x 30 mm		
Kích thước hạt		1,7 µm		
Gradient dung môi thời gian [phút]	% Sol [H ₂ O, 0,1% TFA]	% Sol [Axetonitril]	Dòng [ml/phút]	Nhiệt độ [°C]
0,0	99	1	1,3	60
0,02	99	1	1,3	60
1,00	0	100	1,3	60
1,10	0	100	1,3	60

Phương pháp LC-MS Z011_S03

Mô tả thiết bị		Agilent 1200 với DAD và MSD		
Cột		Waters XBridge C18		
Kích thước cột		3 x 30 mm		
Kích thước hạt		2,5 µm		
Gradient/Dung môi Thời gian [phút]	% Sol [H ₂ O, 0,1%NH ₃]	% Sol [Axetonitril]	Dòng [ml/phút]	Nhiệt độ [°C]
0,00	97	3	2,2	60
0,20	97	3	2,2	60
1,20	0	100	2,2	60
1,25	0	100	3	60
1,40	0	100	3	60

Phương pháp LC-MS Z012_S04

Mô tả thiết bị	Agilent 1200 với DAD và MSD			
Cột	Waters XBridge C18			
Kích thước cột	3 x 30 mm			
Kích thước hạt	2,5 µm			
Gradient/Dung môi Thời gian [phút]	% Sol [H ₂ O, 0,1%NH ₃]	% Sol [Axetonitril]	Dòng [ml/phút]	Nhiệt độ [°C]
0,00	97	3	2,2	60
0,20	97	3	2,2	60
1,20	0	100	2,2	60
1,25	0	100	3	60
1,40	0	100	3	60

Phương pháp LC-MS Z018_S04

Mô tả thiết bị	Agilent 1200 với DAD và MSD			
Cột	Waters Sunfire C18			
Kích thước cột	3 x 30 mm			
Kích thước hạt	2,5 µm			
Gradient dung môi thời gian [phút]	% Sol [H ₂ O, TFA 0,1%]	% Sol [Axetonitril]	Dòng [ml/phút]	Nhiệt độ [°C]
0,00	97	3	2,2	60
0,20	97	3	2,2	60
1,20	0	100	2,2	60
1,25	0	100	3	60
1,40	0	100	3	60

Phương pháp LC-MS Z020_S01

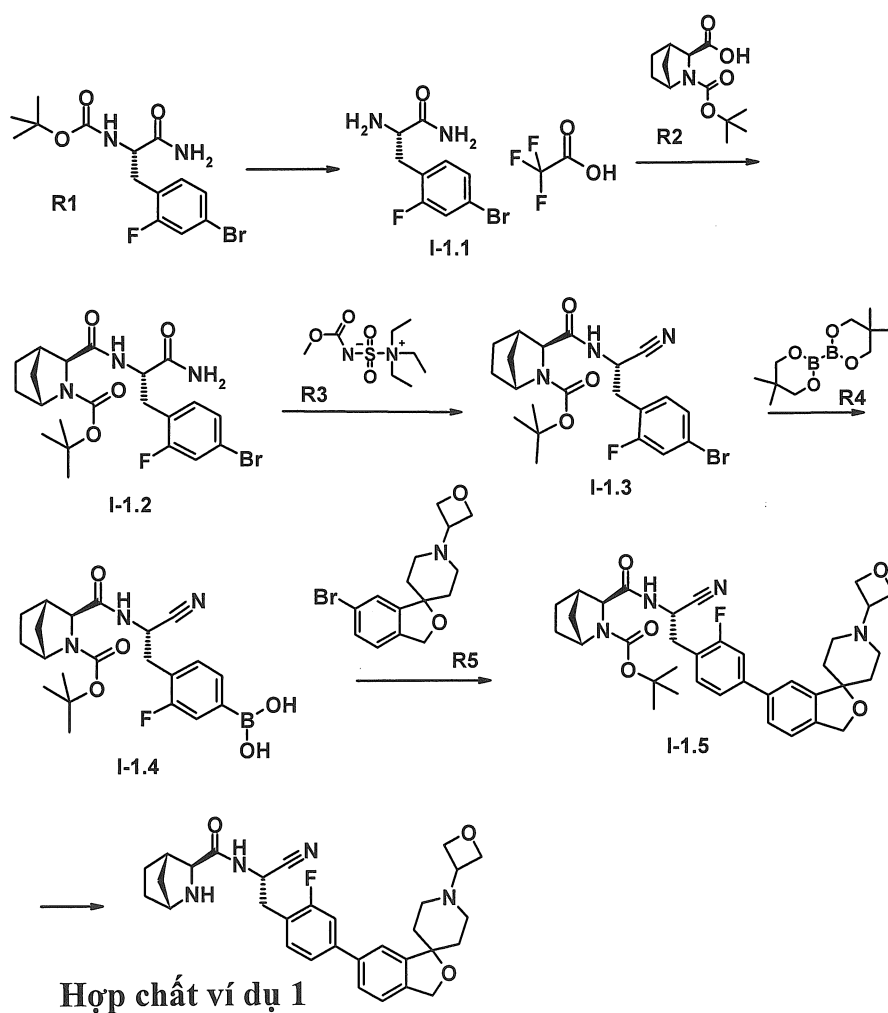
Mô tả thiết bị	Agilent 1200 với DAD và MSD			
Cột	Waters Sunfire C18			
Kích thước cột	3 x 30 mm			
Kích thước hạt	2,5 µm			
Gradient dung môi thời gian [phút]	% Sol [H ₂ O, 0,1%FA]	% Sol [Axetonitril]	Dòng [ml/phút]	Nhiệt độ [°C]
0,00	97	3	2,2	60
0,20	97	3	2,2	60
1,20	0	100	2,2	60
1,25	0	100	3	60
1,40	0	100	3	60

Phương pháp LC-MS Z021_S01

Mô tả thiết bị			Agilent 1200 với DAD và MSD	
Cột			XBridge C18	
Kích thước cột			3 x 30 mm	
Kích thước hạt			2,5 μ m	
Gradien dung môi thời gian [phút]	% Sol [H ₂ O, 0,1%FA]	% Sol [Axetonitril]	Dòng [ml/phút]	Nhiệt độ [°C]
0,00	97	3	2,2	60
0,20	97	3	2,2	60
1,20	0	100	2,2	60
1,25	0	100	3	60
1,40	0	100	3	60

Các phương pháp tổng hợp:

Phương pháp A: Tổng hợp (1S,2S,4R)-N-[(1S)-1-xyano-2-[2-flo-4-[1'-(oxetan-3-yl)spiro[1H-isobenzofuran-3,4'-piperidin]-5-yl]phenyl]azabixyclo[2.2.1]heptan-2-carboxamit (hợp chất ví dụ 1)



Bước 1: Tổng hợp hợp chất trung gian I-1.1

Bổ sung axit trifloaxetic (17,09 mL, 221,48 mmol) vào R1 (20,00 g, 55,37 mmol) trong diclometan (50 mL) và hỗn hợp phản ứng được khuấy qua đêm ở nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp phản ứng được cô đặc, phần cặn được hòa tan trong diclometan (15 mL) và diisopropyl eter (140 mL). Chất kết tủa được lọc ra, rửa bằng diisopropyl eter và làm khô để tạo ra hợp chất I-1.1 dưới dạng muối TFA.

Hiệu suất 99%, m/z 261 $[M+H]^+$, thời gian lưu 0,50 phút, phương pháp LC-MS Z018_S04.

Bước 2: Tổng hợp hợp chất trung gian I-1.2

Bổ sung DIPEA (9,02 mL, 50,67 mmol) vào R2 (13,86 g, 55,72 mmol) trong DMF (65 mL) và làm mát đến 5°C. TBTU (17,89 g, 55,72 mmol) được bổ sung vào và hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 15 phút. Sau đó, hợp chất I-1.1 (muối TFA) (19,0 g, 50,65 mmol), DMF (65 mL) và DIPEA (13,52 mL, 75,98 mmol) được bổ sung vào và hỗn hợp phản ứng được khuấy qua đêm ở nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp phản ứng được pha loãng bằng etyl axetat và chiết bằng nước. Lớp nước được chiết bằng etyl axetat. Các lớp hữu cơ hỗn hợp được rửa bằng nước, dung dịch nước axit clohydric 1mol/L, nước, dung dịch nước natri hydro cacbonat (5%) và rửa lại bằng nước. Lớp hữu cơ được làm khô qua $MgSO_4$, lọc và cô đặc trong chân không. Phần cặn thô được tinh chế bằng phương pháp sắc ký nhanh (chất rửa giải: diclometan/ metanol 95:5).

Hiệu suất 82%, m/z 484 $[M+H]^+$, thời gian lưu 0,91 phút, phương pháp LC-MS Z018_S04.

Bước 3: Tổng hợp hợp chất trung gian I-1.3

Bổ sung R3 (19,68 g, 82,58 mmol) vào I-1.2 (20,0 g, 41,29 mmol) trong diclometan (200 mL) và hỗn hợp phản ứng được khuấy qua đêm ở nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp phản ứng được cô đặc trong chân không, phần cặn được hòa tan trong etyl axetat và chiết bằng nước, dung dịch nước axit axetic 1 mol/L, và nước. Lớp hữu cơ được làm khô qua $MgSO_4$, lọc và cô đặc trong chân không. Phần cặn được kết tinh lại từ axetonitril và lọc ra.

Hiệu suất 71%, m/z 466 $[M+H]^+$, thời gian lưu 0,98 phút, phương pháp LC-MS Z018_S04.

Bước 4: Tổng hợp hợp chất trung gian I-1.4

Bổ sung R4 (799,22 mg, 3,54 mmol), kali axetat (0,947 g, 9,65 mmol) và [1,1'-bis(diphenylphosphino)feroxen]diclopaladi(II), phức với diclometan (1:1) (52,54 mg, 0,064 mmol) vào I-1.3 (1,5 g, 3,22 mmol) trong dioxan (20 mL). Hỗn hợp phản ứng được sục bằng nitơ và đun nóng đến 70 °C trong 1,5 giờ. Hỗn hợp phản ứng được pha loãng bằng diclometan và nước. Hấp hữu cơ được tách và cô đặc trong chân không. Phần cặn được tinh chế bằng phương pháp HPLC đảo pha.

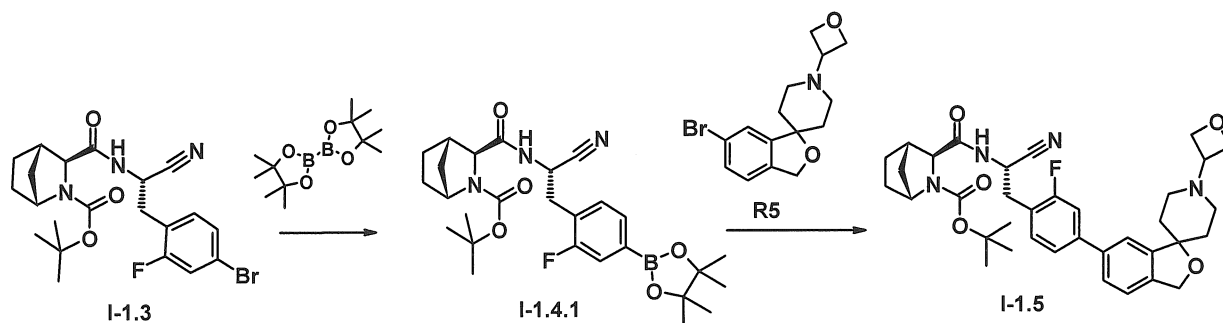
Hiệu suất 94% m/z 332 $[M+H-Boc]^+$, thời gian lưu 0,96 phút, phương pháp LC-MS Z020_S01.

Bước 5: Tổng hợp hợp chất trung gian I-1.5

Bổ sung R5 (301,0 mg, 0,93 mmol) vào hợp chất I-1.4 (400,0 mg, 0,93 mmol) trong axetonitril (18 mL) và hỗn hợp này được sục bằng argon. Dung dịch nước natri cacbonat 2 mol/L (928 μ L, 1.86 mmol) và 1,1'-bis(di-tert-butylphosphino)feroxen paladi diclorua (60,5 mg, 0,09 mmol) được bổ sung vào, hỗn hợp phản ứng được sục lại bằng argon và khuấy ở 80°C trong thiết bị phản ứng vi sóng trong 45 phút. Hỗn hợp phản ứng được pha loãng bằng dung dịch natri hydro cacbonat bão hòa, và chiết bằng etyl axetat vài lần. Lớp hữu cơ được rửa bằng nước muối, làm khô qua Na_2SO_4 , lọc và cô đặc trong chân không. Phần cặn thô được tinh chế bằng phương pháp sắc ký cột silicagel (DCM: MeOH = 98:2 đến 92:8) để tạo ra hợp chất I-1.5.

Hiệu suất 79% m/z 631 $[M+H]^+$, thời gian lưu 1,09 phút, phương pháp LC-MS Z011_S03.

Phương pháp khác để tổng hợp hợp chất trung gian I-1.5



Tổng hợp hợp chất trung gian I-1.4.1

Bổ sung bis(pinacolato)dibo (13,07 g, 51,46 mmol), kali axetat (12,63 g, 128,66 mmol) và [1,1'-bis(diphenylphosphino)feroxen]diclopaladi(II), phức với diclometan (1:1) (1,75 g, 2,14 mmol) vào hợp chất I-1.3 (20 g, 42,89 mmol) trong dioxan (255 mL). Hỗn hợp này được sục bằng nitơ trong 5 phút, đun nóng đến 70 °C và khuấy qua đêm ở

hiệt độ này. Hỗn hợp phản ứng được pha loãng bằng diclometan và nước. Lớp hữu cơ được tách và cô đặc trong chân không. Phần cặn được tinh chế bằng phương pháp sắc ký cột silicagel (ete dầu mỏ: EtOAc = 92:8 đến 34:66).

Hiệu suất 64% m/z 332 $[M+H - \text{Boc} - ((\text{CH}_3)_2\text{CH})_2]^+$, thời gian lưu 0,73 phút, phương pháp LC-MS Z011_S03.

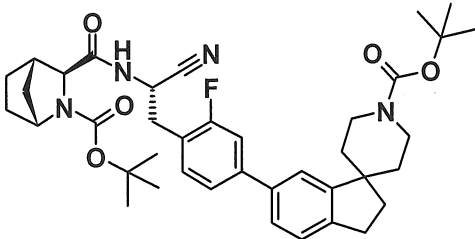
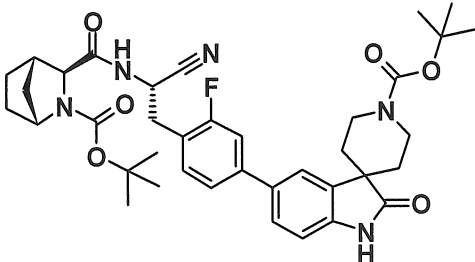
Tổng hợp hợp chất trung gian I-1.5

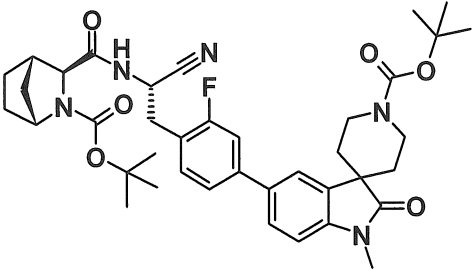
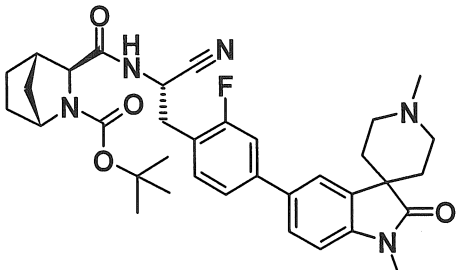
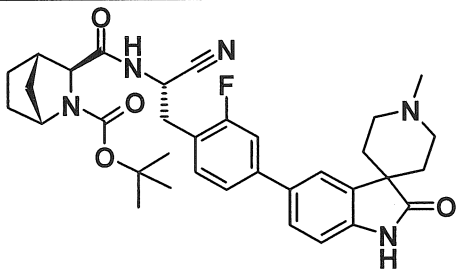
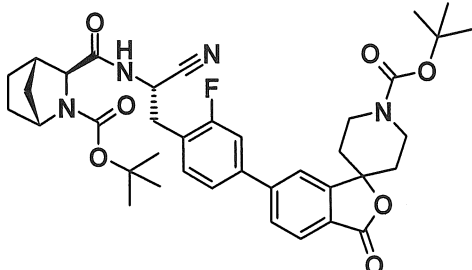
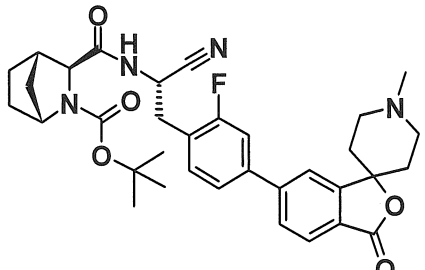
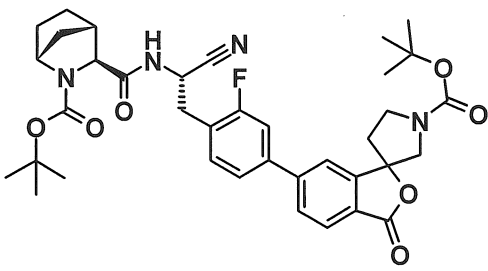
Bổ sung R5 (2,50 g, 7,71 mmol) vào hợp chất I-1.4.1 (3,96 g, 7,71 mmol) trong axetonitril (60 mL) và hỗn hợp này được sục bằng argon. Dung dịch nước natri cacbonat 2 mol/L (7,71 mL, 15.42 mmol) và 1,1'-bis(di-tert-butylphosphino)feroxen paladi diclorua (502,6 mg, 0,77 mmol) được bổ sung vào, hỗn hợp phản ứng được sục lại bằng argon và khuấy ở 80°C trong 90 phút. Hỗn hợp phản ứng được pha loãng bằng dung dịch natri hydro cacbonat bão hòa, và chiết bằng etyl axetat vài lần. Lớp hữu cơ được rửa bằng nước muối, làm khô qua Na_2SO_4 , lọc và cô đặc trong chân không. Phần cặn thô được tinh chế bằng phương pháp sắc ký cột silica gel (DCM: MeOH = 99:1 đến 94:6) để tạo ra hợp chất I-1.5.

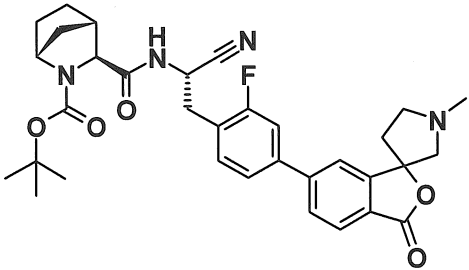
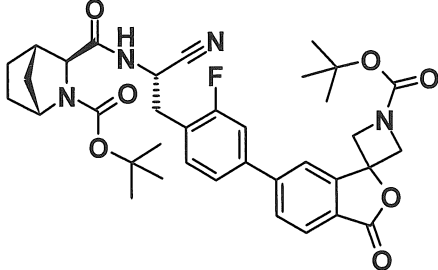
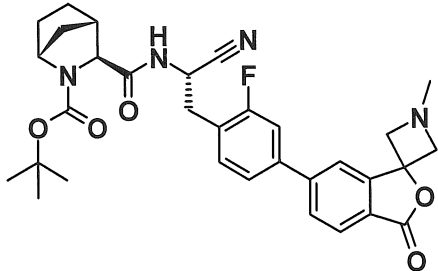
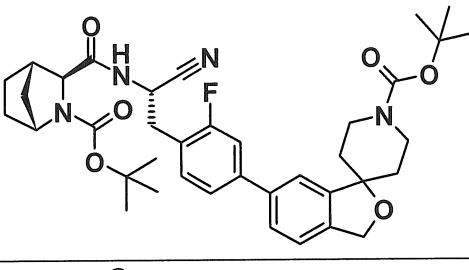
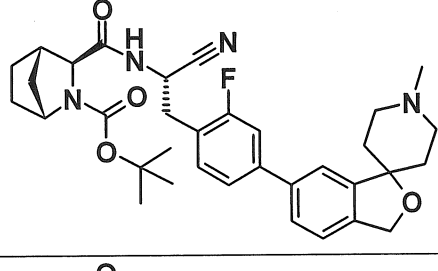
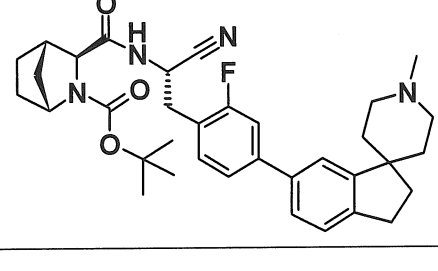
Hiệu suất 75% m/z 631 $[M+H]^+$, thời gian lưu 1,09 phút, phương pháp LC-MS Z011_S03.

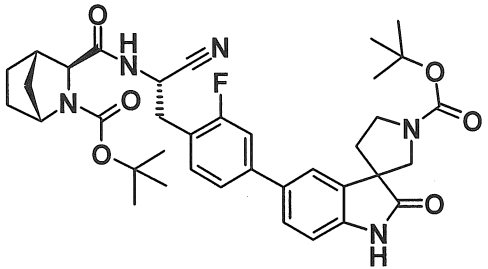
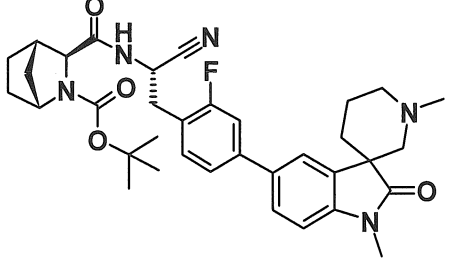
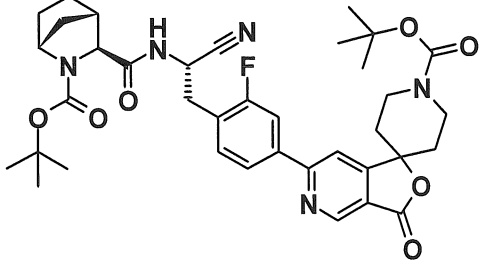
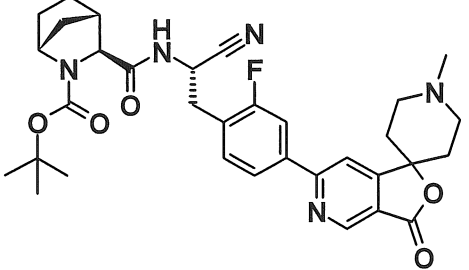
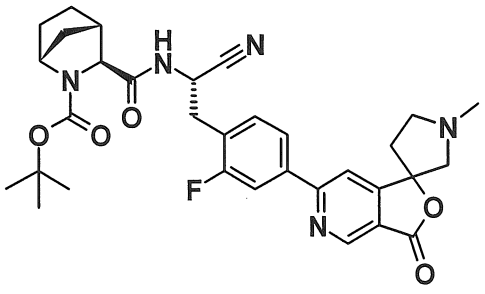
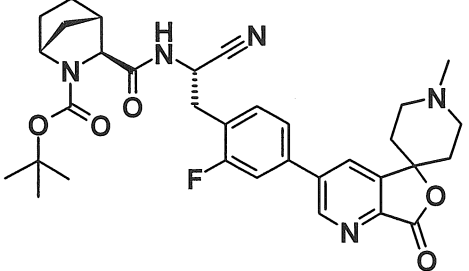
Các hợp chất trung gian được thể hiện trong bảng 1 sau đây được tổng hợp theo cách tương tự từ hợp chất trung gian I-1.4 và các chất chiết thích hợp:

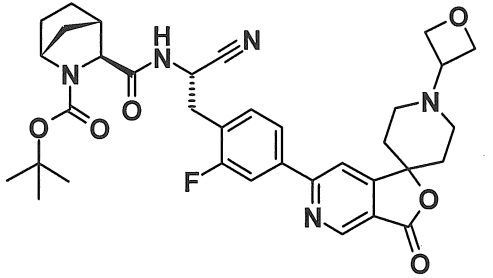
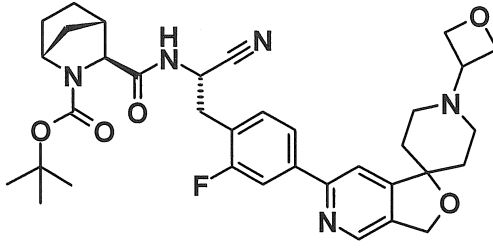
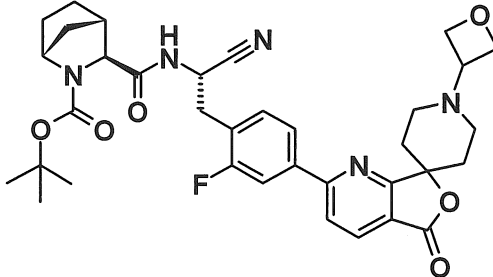
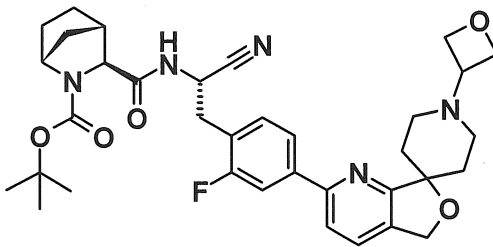
Bảng 1

Hợp chất trung gian	Chất chiết	Cấu trúc của hợp chất trung gian	m/z $[M+H]^+$	Thời gian lưu (phút)	Phương pháp LC-MS
I-1.5.1	R6		517 $[M - \text{Boc-t.but} + H]^+$	1,29	Z012_S04
I-1.5.2	R8		532 $[M - \text{Boc-t.but} + H]^+$	1,14	Z012_S04

I-1.5.3	R9		546 [M-Boc-t.but +H] ⁺	1,19	Z012_S04
I-1.5.4	R10		616	0,95	Z012_S04
I-1.5.5	R10. 1		602	0,91	Z012_S04
I-1.5.6	I-7.2		589 [M-Boc +H] ⁺	1,19	Z012_S04
I-1.5.7	R10. 2		603	0,94	Z012_S04
I-1.5.8	I-7.2.1		575 [M-Boc +H] ⁺	1,15	Z011_S03

I-1.5.9	R10. 3		589	0,95	Z012_S04
I-1.5.10	I- 7.2.2		561 [M- Boc +H] ⁺	1,17	Z012_S04
I-1.5.11	R10. 4		575	1,04	Z011_S03
I-1.5.12	I-7.4		575 [M- Boc +H] ⁺	1,24	Z011_S03
I-1.5.13	R10. 5		589	1,12	Z011_S03
I-1.5.14	R7		587	1,19	Z011_S03

I-1.5.15	R12		574 [M-Boc+H] ⁺	1,10	Z011_S03
I-1.5.16	R10. 6		615	0,80	Z020_S01
I-1.5.17	R14		590 [M-Boc+H] ⁺	1,16	Z011_S03
I-1.5.18	R10. 7		604	1,04	Z011_S03
I-1.5.19	I- 11.1. 1		590	1,02	Z011_S03
I-1.5.20	R15		604	1,03	Z011_S03

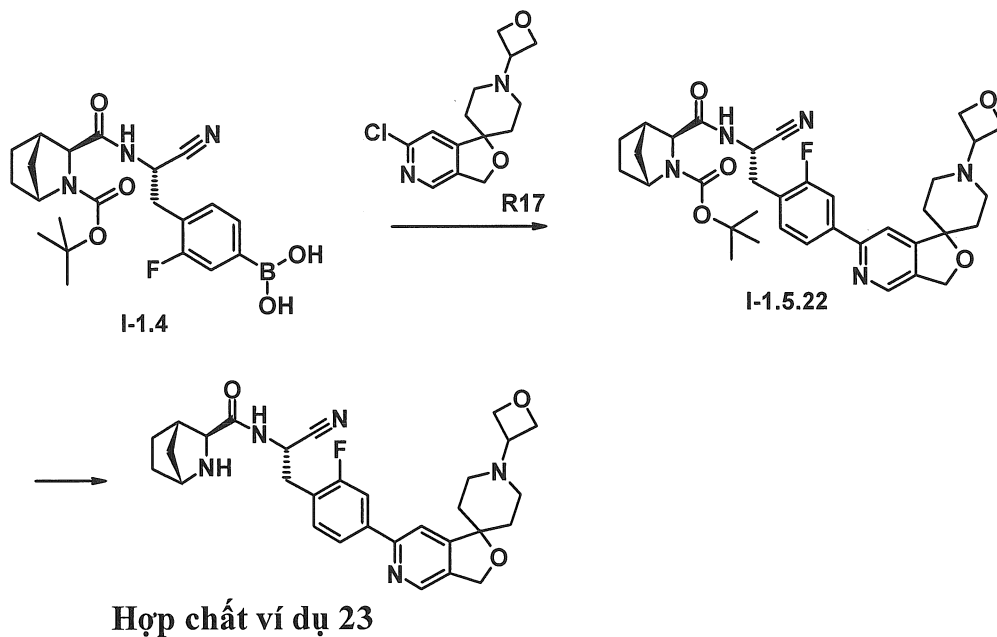
I-1.5.21	R16		546 [M-Boc +H] ⁺	1,00	Z011_S03
I-1.5.22	R17		632	1,03	Z011_S03
I-1.5.23	R18		646	0,90	Z011_S03
I-1.5.24	R19		632	1,04	Z011_S03

Bước 6: Tổng hợp hợp chất ví dụ 1

Bổ sung axit p-toluensulfonic monohydrat (5,49 g, 28,88 mmol) vào hợp chất I-1.5 (3,64 g, 5,78 mmol) trong axetonitril (60 mL) và hỗn hợp phản ứng được khuấy qua đêm ở nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp phản ứng được pha loãng bằng dung dịch natri hydro cacbonat bão hòa, và chiết bằng etyl axetat vài lần. Lóp hữu cơ được rửa bằng nước muối, làm khô qua MgSO₄, lọc và cô đặc trong chân không. Phần cặn thô được tinh chế bằng phương pháp HPLC đảo pha.

Hiệu suất 84% m/z 531 [M+H]⁺, thời gian lưu 1,00 phút, phương pháp LC-MS Z011_S03.

Tổng hợp hợp chất (1S,2S,4R)-N-[(1S)-1-xyano-2-[2-flo-4-[1'-(oxetan-3-yl)spiro [3H-furo[3,4-c]pyridin-1,4'-piperidin]-6-yl]phenyl]ethyl]-3-azabixyclo[2.2.1] heptan-2-carboxamit (hợp chất ví dụ 23)



Bước 1: Tổng hợp hợp chất trung gian I-1.5.22

Bổ sung R17 (48,0 mg, 0,17 mmol) vào hợp chất I-1.4 (92,2 mg, 0,17 mmol) trong axetonitril (3 mL) và hỗn hợp này được sục bằng argon. Dung dịch nước xesi cacbonat 2 mol/L (171 μ L, 0,34 mmol) và 1,1'-bis(di-tert-butylphosphino)feroxen paladi diclorua (11,1 mg, 0,02 mmol) được bổ sung vào, hỗn hợp phản ứng được sục lại bằng argon và khuấy ở 80°C trong thiết bị phản ứng vi sóng trong 45 phút. Hỗn hợp phản ứng được pha loãng bằng dung dịch natri hydro cacbonat bão hòa, và chiết bằng etyl axetat vài lần. Lóp hữu cơ được rửa bằng nước muối, làm khô qua MgSO_4 , lọc và cô đặc trong chân không. Phần cặn thô được tinh chế bằng phương pháp HPLC đảo pha để tạo ra hợp chất I-1.5.22.

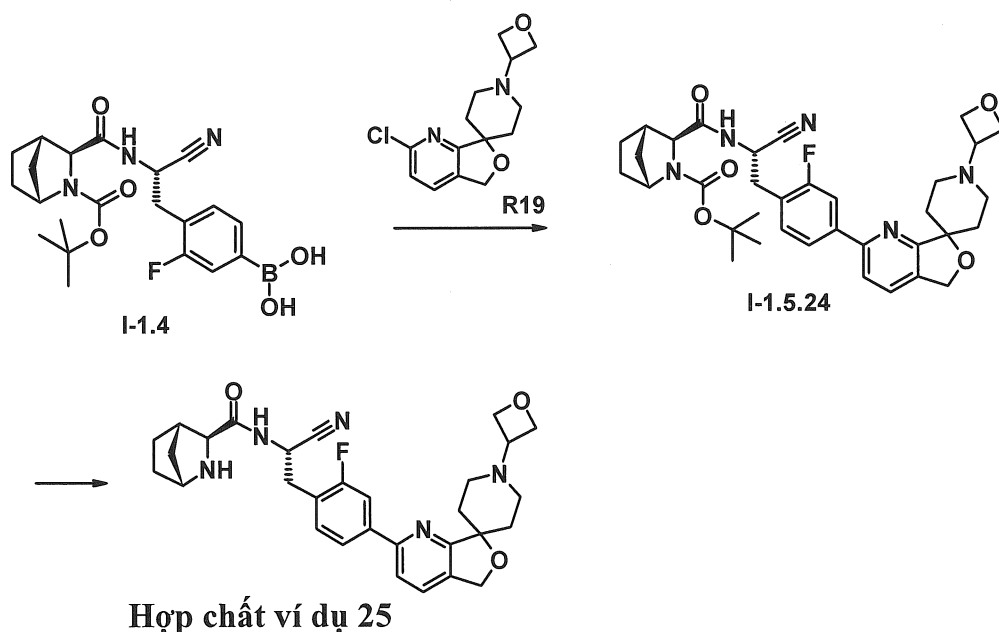
Hiệu suất 52% m/z 632 $[\text{M}+\text{H}]^+$, thời gian lưu 1,04 phút, phương pháp LC-MS Z011_S03.

Bước 2: Tổng hợp hợp chất ví dụ 23

Bổ sung axit p-toluensulfonic monohydrat (84,3 mg, 0,44 mmol) vào hợp chất I-1.5.22 (56,0 mg, 0,09 mmol) trong axetonitril (2 mL) và hỗn hợp phản ứng được khuấy qua đêm ở nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp phản ứng được bazơ hóa bằng TEA, lọc qua màng lọc và tinh chế bằng phương pháp HPLC đảo pha.

Hiệu suất 83% m/z 532 $[M+H]^+$, thời gian lưu 0,96 phút, phương pháp LC-MS Z011_S03.

Tổng hợp (1S,2S,4R)-N-[(1S)-1-xyano-2-[2-flo-4-[1'-(oxetan-3-yl)spiro[5H-furo[3,4-b]pyridin-7,4'-piperidin]-2-yl]phenyl]etyl]-3-azabixyclo[2.2.1]heptan-2-carboxamit (hợp chất ví dụ 25)



Bước 1: Tổng hợp hợp chất trung gian I-1.5.24

Bổ sung R19 (1,50 g, 5,34 mmol) vào hợp chất I-1.4 (2,304 g, 5,34 mmol) trong axetonitril (50 mL) và hỗn hợp này được sục bằng argon. Dung dịch nước natri cacbonat 2 mol/L (5,343 mL, 10,69 mmol) và 1,1'-bis(di-tert-butylphosphino)feroxen paladi diclorua (348,2 mg, 0,53 mmol) được bổ sung vào, hỗn hợp phản ứng được sục lại bằng argon và khuấy ở 70°C trong thiết bị phản ứng vi sóng trong 45 phút. Thêm một lượng hợp chất I-1.4 (150 mg, 0,35 mmol) được bổ sung vào và hỗn hợp phản ứng được khuấy ở 70°C trong 25 phút. Hỗn hợp phản ứng được pha loãng bằng dung dịch natri hydro cacbonat bão hòa, và chiết bằng etyl axetat vài lần. Lớp hữu cơ được rửa bằng nước muối, làm khô qua $MgSO_4$, lọc và cô đặc trong chân không. Phần cặn thô được tinh chế bằng phương pháp sắc ký cột silicagel (DCM: MeOH = 99:1 đến 9:1) để tạo ra hợp chất I-1.5.24.

Hiệu suất 55% m/z 632 $[M+H]^+$, thời gian lưu 1,05 phút, phương pháp LC-MS Z011_S03.

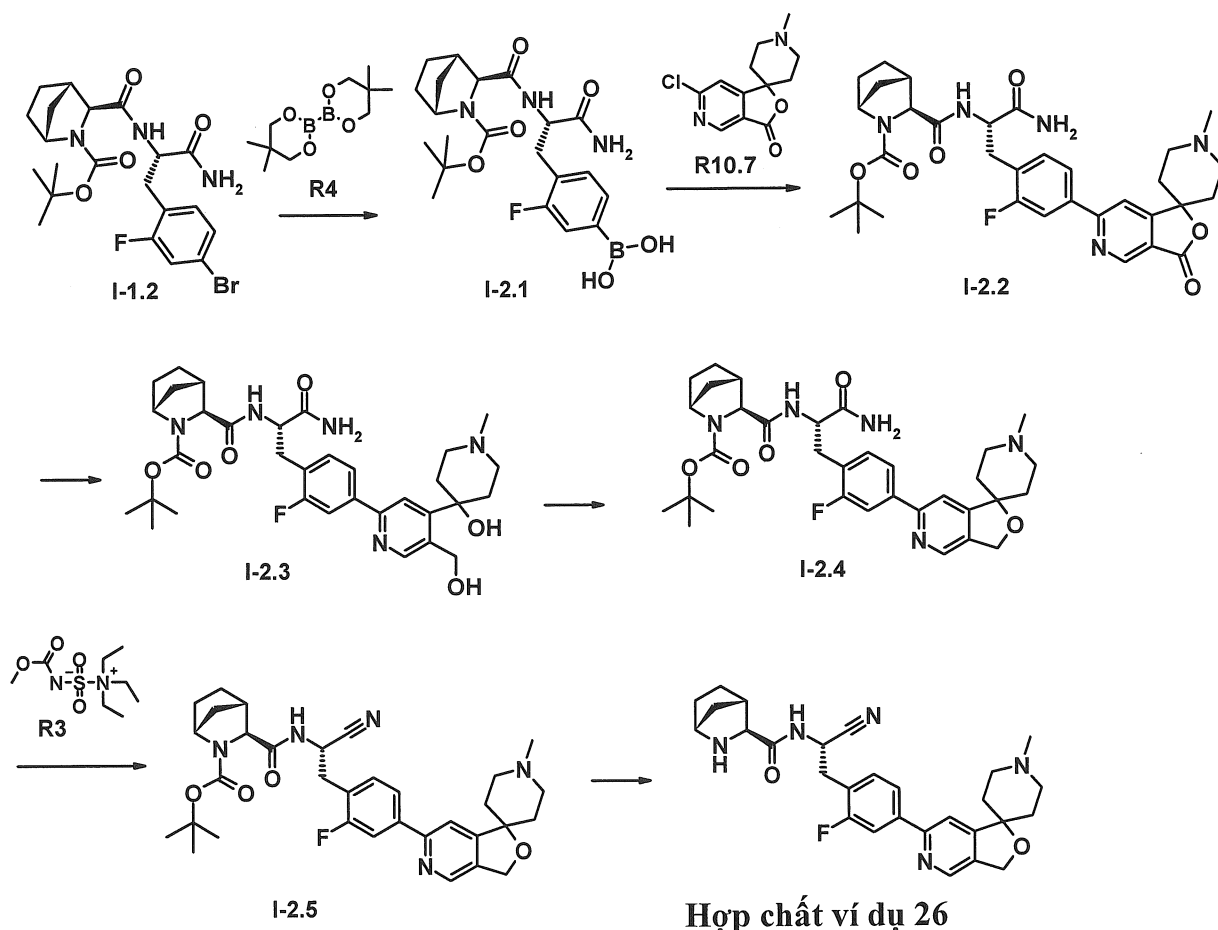
Bước 2: Tổng hợp hợp chất ví dụ 25

Bổ sung axit p-toluensulfonic monohydrat (2,78 g, 14,64 mmol) vào hợp chất I-1.5,24 (1,85 g, 2,93 mmol) trong axetonitril (50 mL) và hỗn hợp phản ứng được khuấy qua đêm ở nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp phản ứng được pha loãng bằng dung dịch natri hydro cacbonat bão hòa, và chiết bằng etyl axetat vài lần. Lớp hữu cơ được rửa bằng nước muối, làm khô qua MgSO_4 , lọc và cô đặc trong chân không. Phần cặn thô được tinh chế bằng phương pháp HPLC đảo pha.

Hiệu suất 88% m/z 532 $[\text{M}+\text{H}]^+$, thời gian lưu 0,97 phút, phương pháp LC-MS Z011_S03.

Phương pháp B

Tổng hợp (1S,2S,4R)-N-[(1S)-1-xyano-2-[2-fluoro-4-(1'-metylspro[3H-furo[3,4-c]pyridin-1,4'-piperidin]-6-yl)phenyl]etyl]-3-azabicyclo[2.2.1]heptan-2-carboxamit (hợp chất ví dụ 26)



Bước 1: Tổng hợp hợp chất trung gian I-2.1

Bổ sung R4 (512,99 mg, 2,27 mmol), kali axetat (607,92 mg, 9,65 mmol) và [1,1'-bis(diphenylphosphino)feroxen]diclopaladi(II), phức với diclometan (1:1) (33,72 mg, 0,041 mmol) vào hợp chất I-1.2 (1,0 g, 2,07 mmol) trong dioxan (10 mL). Hỗn hợp phản

ứng được sục bằng nitơ và đun nóng đến 70 °C qua đêm. Hợp chất R4 (100 mg, 0,44 mmol) và [1,1'-bis(diphenylphosphino)feroxen]diclopaladi(II), phức với diclometan (1:1) (10 mg, 0,01 mmol) được bổ sung tiếp và hỗn hợp phản ứng được khuấy ở 70°C trong 2 giờ. Hỗn hợp phản ứng được pha loãng bằng dung dịch natri hydro cacbonat bão hòa và chiết bằng ethyl axetat. Lớp hữu cơ được rửa bằng nước muối, làm khô qua MgSO₄, lọc và cô đặc trong chân không. Phần cặn được tinh chế bằng phương pháp HPLC đảo pha.

Hiệu suất 50% m/z 450 [M+H]⁺.

Bước 2: Tổng hợp hợp chất trung gian I-2.2

Bổ sung R10.7 (115 mg, 0,46 mmol) vào hợp chất I-2.1 (204,46 mg, 0,46 mmol) trong axetonitril (4 mL) và hỗn hợp này được sục bằng argon. Dung dịch xesi cacbonat 2mol/L (455,09 μ L, 0.91 mmol) và 1,1'-bis(di-tert-butylphosphino)feroxen paladi diclorua (29,66 mg, 0,046 mmol) được bổ sung vào, hỗn hợp phản ứng được sục lại bằng argon và khuấy ở 80°C trong thiết bị phản ứng vi sóng trong 45 phút. Hỗn hợp phản ứng được pha loãng bằng nước, và chiết bằng ethyl axetat. Lớp hữu cơ được rửa bằng nước muối, làm khô qua MgSO₄, lọc và cô đặc trong chân không. Phần cặn được tinh chế bằng phương pháp HPLC đảo pha.

Hiệu suất 75%.

Bước 3: Tổng hợp hợp chất trung gian I-2.3

Bổ sung lithi bohýdrua (2 mol/L, 0,26 mL, 0,51 mmol) vào hợp chất I-2.2 (212 mg, 0,34 mmol) trong THF (5 mL) và hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 3 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp phản ứng được làm ngừng phản ứng bằng metanol, pha loãng bằng nước và ethyl axetat. Lớp hữu cơ được rửa bằng dung dịch natri hydro cacbonat và nước muối, làm khô qua Na₂SO₄, lọc và cô đặc trong chân không.

Hiệu suất 91%.

Bước 4: Tổng hợp hợp chất trung gian I-2.4

Bổ sung TEA (0,22 mL, 1,55 mmol) và p-toluensulfonic anhydrit (121,43 mg, 0,37 mmol) ở 0°C vào hợp chất I-2.3 (194 mg, 0,31 mmol) trong THF (5 mL). Hỗn hợp phản ứng được để cho trở về nhiệt độ trong phòng và khuấy qua đêm. Hỗn hợp phản ứng được làm ngừng phản ứng bằng nước và cô đặc trong chân không. Phần cặn được pha loãng bằng dung dịch natri hydro cacbonat và chiết bằng ethyl axetat. Lớp hữu cơ được

rửa bằng nước muối, làm khô qua Na_2SO_4 , lọc và cô đặc trong chân không. Phần cặn được tinh chế bằng phương pháp HPLC đảo pha.

Hiệu suất 34% m/z 608 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Bước 5: Tổng hợp hợp chất trung gian I-2.5

Bổ sung R3 (63,72 mg, 0,27 mmol) vào hợp chất I-2.4 (65 mg, 0,11 mmol) trong diclometan (2,5 mL) và hỗn hợp phản ứng được khuấy qua đêm ở nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp phản ứng được pha loãng bằng etyl axetat và chiết bằng nước. Lớp hữu cơ được rửa bằng nước muối, làm khô qua MgSO_4 , lọc và cô đặc trong chân không.

Hiệu suất >95%.

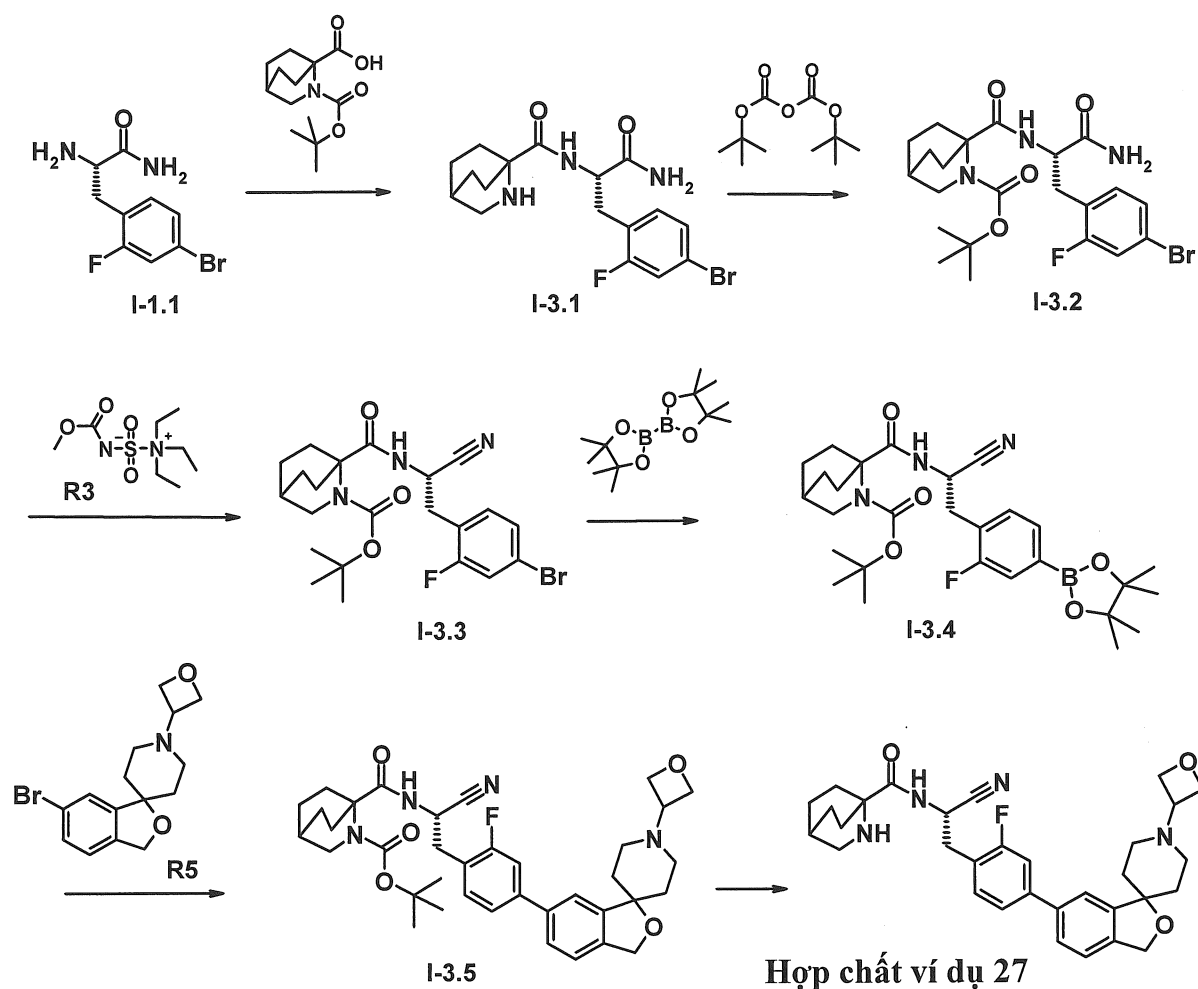
Bước 6: Tổng hợp hợp chất ví dụ 26

Bổ sung axit p-toluensulfonic monohydrat (98,70 mg, 0,52 mmol) vào hợp chất I-2,5 (68 mg, 0,10 mmol) trong axetonitril (2 mL) và hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp phản ứng được bazơ hóa bằng TEA và tinh chế bằng phương pháp HPLC đảo pha.

Hiệu suất 28% m/z 490 $[\text{M}+\text{H}]^+$, thời gian lưu 0,96 phút, phương pháp LC-MS Z011_S03.

Phương pháp C

Tổng hợp N-[(1S)-1-xyano-2-[2-flo-4-[1'-(oxetan-3-yl)spiro[1H-isobenzofuran-3,4'-piperidin]-5-yl]phenyl]etyl]-3-azabixyclo[2.2.2]octan-4-carboxamit (hợp chất ví dụ 27)



Bước 1: Tổng hợp hợp chất trung gian I-3.1

Bổ sung vào dung dịch được làm mát đến 0°C chứa hợp chất I-1.1 (5,80 g, 22,2 mmol), axit 3-tert-butoxycarbonyl-3-azabixyclo[2.2.2]octan-4-carboxylic, được điều chế theo Radchenko *et al. J. Org. Chem.* 2009, 5541-5544 (5,67 g, 22,2 mmol) và N-metyl-morpholin (12,2 mL, 111,0 mmol) trong diclometan khan (67 mL), PPA (13,08 mL (50% trong etyl axetat), 22,2 mmol). Hỗn hợp phản ứng được để cho trở về nhiệt độ trong phòng và khuấy qua đêm. Hỗn hợp phản ứng được pha loãng bằng dung dịch natri hydro cacbonat bão hòa và chiết bằng diclometan vài lần. Lóp hữu cơ được rửa bằng nước muối, làm khô qua MgSO₄, lọc và cô đặc trong chân không để tạo ra hợp chất I-3.1, hợp chất này được sử dụng ở bước tiếp theo mà không cần tinh chế tiếp.

Hiệu suất 73%, *m/z* 398/400 [M+H]⁺, thời gian lưu 0,87 phút, phương pháp LC-MS Z011_S03.

Bước 2: Tổng hợp hợp chất trung gian I-3.2

Bổ sung từng giọt dung dịch chứa di-tert-butyl dicacbonat (6,26 g, 28,70 mmol) trong 20 ml diclometan khan vào dung dịch được làm mát đến 0°C chứa hợp chất I-3.1 (8,625 g, 21,66 mmol) trong 300 mL diclometan khan. Hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 2 giờ ở 0°C, để cho trở về nhiệt độ trong phòng, và khuấy trong 2 ngày. Hỗn hợp phản ứng được cô đặc trong chân không để tạo ra hợp chất I-3.2, hợp chất này được sử dụng ở bước tiếp theo mà không cần tinh chế tiếp.

Hiệu suất 98%, m/z 398/400 $[M+H - \text{Boc}]^+$, thời gian lưu 1,04 phút, phương pháp LC-MS Z011_S03.

Bước 3: Tổng hợp hợp chất trung gian I-3.3

Bổ sung hợp chất R3 (3,96 g, 16,60 mmol) thành bốn phần vào huyền phù chứa hợp chất I-3.2 (5,52 g, 11,07 mmol) trong diclometan khan (70 mL) và hỗn hợp phản ứng được khuấy qua đêm ở nhiệt độ trong phòng. Thêm một lượng hợp chất R3 (791,0 mg, 3,32 mmol) được bổ sung vào và hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 6 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp phản ứng được pha loãng bằng diclometan, rửa bằng dung dịch nước axit tartric 10%, dung dịch natri hydro cacbonat bão hòa, nước muối, làm khô qua MgSO_4 , lọc và cô đặc trong chân không. Phần cặn thu được được tinh chế bằng phương pháp sắc ký cột silicagel (ete dầu mỏ: EtOAc = 94:6 đến 69:31) để tạo ra hợp chất I-3.3.

Hiệu suất 77% m/z 380/382 $[M+H - \text{Boc}]^+$, thời gian lưu 1,10 phút, phương pháp LC-MS Z011_S03.

Bước 4: Tổng hợp hợp chất trung gian I-3.4

Bổ sung bis(pinacolato)dibor (3,24 g, 12,78 mmol), kali axetat (2,21 g, 22,55 mmol) và [1,1'-bis(diphenylphosphino)feroxen]diclopaladi(II), phức với diclometan (1:1) (61,4 mg, 0,08 mmol) vào hợp chất I-3.3 (3,61 g, 7,52 mmol) trong dioxan (45 mL). Hỗn hợp này được sục bằng nitơ trong 5 phút và đun nóng ở 70 °C trong 3 giờ. Hỗn hợp phản ứng được pha loãng bằng nước và chiết bằng diclometan. Lớp hữu cơ được rửa bằng nước muối, làm khô qua MgSO_4 , lọc và cô đặc trong chân không. Phần cặn được tinh chế bằng phương pháp sắc ký cột silicagel (ete dầu mỏ: EtOAc = 100:0 đến 91:9) để tạo ra hợp chất I-3.4.

Hiệu suất 68% m/z 346 $[M+H - \text{Boc} - ((\text{CH}_3)_2\text{CH})_2]^+$, thời gian lưu 0,77 phút, phương pháp LC-MS Z011_S03.

Bước 5: Tổng hợp hợp chất trung gian I-3.5

Bổ sung R5 (0,70 g, 2,16 mmol) vào hợp chất I-3.4 (1,14 g, 2,16 mmol) trong axetonitril (30 mL) và hỗn hợp này được súc bằng argon. Dung dịch nước natri cacbonat 2 mol/L (2,16 mL, 4,32 mmol) và 1,1'-bis(di-tert-butylphosphino)feroxen paladi diclorua (141,0 mg, 0,22 mmol) được bổ sung vào, hỗn hợp phản ứng được súc lại bằng argon trong 5 phút và khuấy ở 80°C trong 70 phút trong thiết bị phản ứng vi sóng. Hỗn hợp phản ứng được pha loãng bằng dung dịch natri hydro cacbonat bão hòa, và chiết bằng etyl axetat vài lần. Lớp hữu cơ được rửa bằng nước muối, làm khô qua MgSO_4 , lọc và cô đặc trong chân không. Phần cặn thô được tinh chế bằng phương pháp sắc ký cột silicagel (DCM: MeOH = 99:1 đến 9:1) để tạo ra hợp chất I-3.5.

Hiệu suất 81% m/z 645 $[\text{M}+\text{H}]^+$, thời gian lưu 1,11 phút, phương pháp LC-MS Z011_S03.

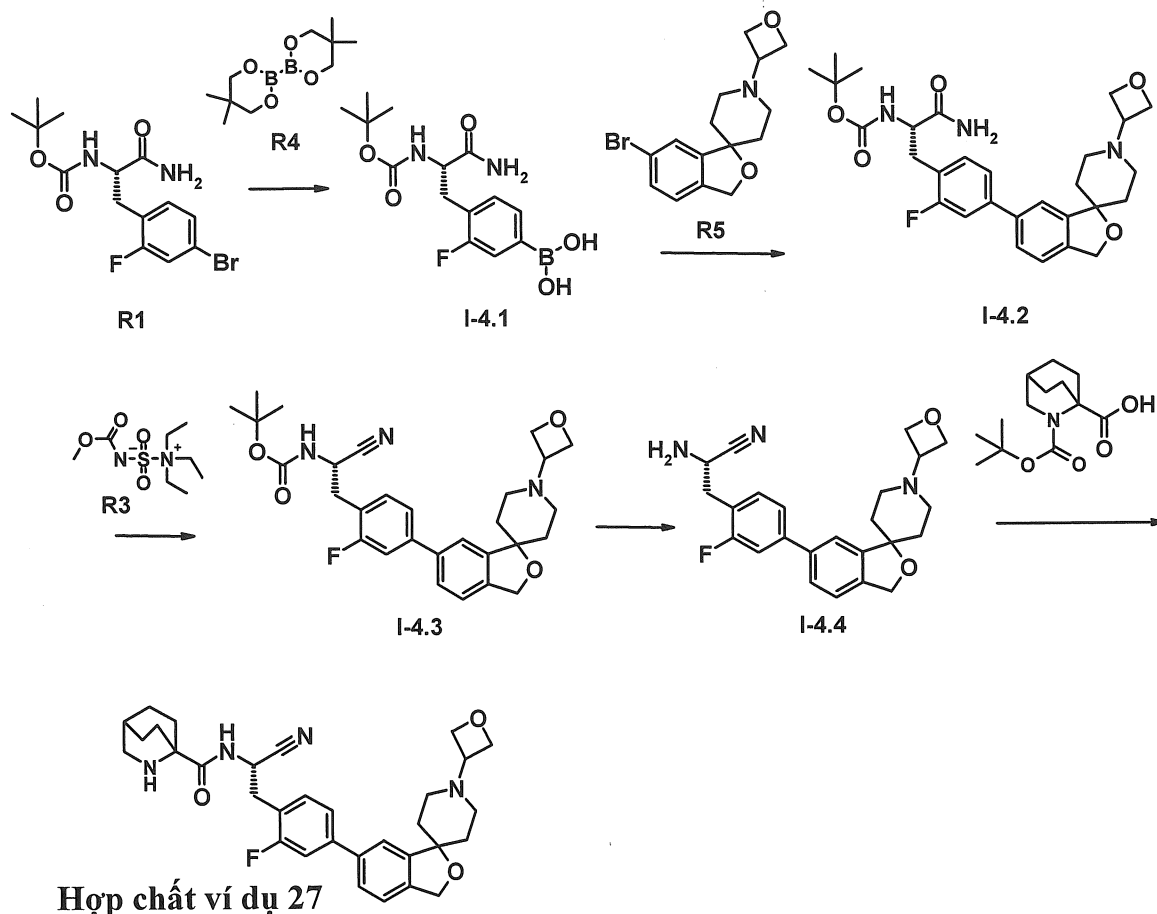
Bước 6: Tổng hợp hợp chất ví dụ 27

Bổ sung axit p-toluensulfonic monohydrat (681,0 mg, 3,58 mmol) vào hợp chất I-3.5 (923,0 mg, 1,43 mmol) trong axetonitril (40 mL) và hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 3 ngày ở nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp phản ứng được trung hòa bằng TEA và cô đặc trong chân không. Nước được bổ sung vào và hỗn hợp phản ứng được chiết bằng etyl axetat vài lần. Lớp hữu cơ được rửa bằng nước muối, làm khô qua MgSO_4 , lọc và cô đặc trong chân không. Phần cặn thô được tinh chế bằng phương pháp HPLC đảo pha.

Hiệu suất 61%, m/z 545 $[\text{M}+\text{H}]^+$, thời gian lưu 1,02 phút, phương pháp LC-MS Z011_S03.

Phương pháp D

Cách khác để tổng hợp N-[(1S)-1-xyano-2-[2-flo-4-[1'-(oxetan-3-yl)spiro[1H-isobenzofuran-3,4'-piperidin]-5-yl]phenyl]ethyl]-3-azabixyclo[2.2.2]octan-4-carboxamit (hợp chất ví dụ 27)



Hợp chất ví dụ 27

Bước 1: Tổng hợp hợp chất trung gian I-4.1

Bổ sung hợp chất R4 (288 mg, 1,28 mmol), kali axetat (277 mg, 2,82 mmol) và [1,1'-bis(diphenylphosphino)feroxen]diclopaladi(II), phức với diclometan (1:1) (15,3 mg, 0,02 mmol) vào hợp chất R1 (340 mg, 0,94 mmol) trong dioxan (7 mL). Hỗn hợp này được sục bằng nitơ và đun nóng đến 70 °C trong 2 giờ. Hỗn hợp phản ứng được pha loãng bằng dung dịch natri hydro cacbonat bão hòa và chiết bằng etyl axetat. Lớp hữu cơ được rửa bằng nước muối, làm khô qua MgSO₄, lọc và cô đặc trong chân không. Phần cặn được tinh chế bằng phương pháp HPLC đảo pha để tạo ra hợp chất I-4.1.

Hiệu suất 90%, *m/z* 325 [M-H]⁻, thời gian lưu 0,94 phút, phương pháp LC-MS Z020_S01.

Bước 2: Tổng hợp hợp chất trung gian I-4.2

Bổ sung R5 (239 mg, 0,70 mmol) vào hợp chất I-4.1 (228 mg, 0,70 mmol) trong axetonitril (10 mL) và hỗn hợp này được sục bằng argon. Dung dịch nước kali cacbonat

2mol/L (700 μ L, 1,4 mmol) và 1,1-bis(di-tert-butylphosphino)feroxen paladi diclorua (46 mg, 0,07 mmol) được bổ sung vào, hỗn hợp phản ứng được súc lại bằng argon và khuấy ở 80°C trong 45 phút trong thiết bị phản ứng vi sóng. Hỗn hợp phản ứng được pha loãng bằng dung dịch natri hydro cacbonat bão hòa và chiết bằng etyl axetat. Lớp hữu cơ được rửa bằng nước muối, làm khô qua MgSO_4 , lọc và cô đặc trong chân không. Phần cặn được tinh chế bằng phương pháp HPLC đảo pha để tạo ra hợp chất I-4.2.

Hiệu suất 80%, m/z 526 $[\text{M}+\text{H}]^+$, thời gian lưu 0,83 phút, phương pháp LC-MS Z011_S03.

Bước 3: Tổng hợp hợp chất trung gian I-4.3

Bổ sung hợp chất R3 (333 mg, 1,4 mmol) vào hợp chất I-4.2 (294 mg, 0,56 mmol) trong diclometan (10 mL) và hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 40 phút ở nhiệt độ trong phòng. DCM được loại bỏ trong chân không, phần cặn thu được được tách giữa etyl axetat và dung dịch nước axit tartric 10%, các pha được tách và pha nước được chiết bằng etyl axetat. Lớp hữu cơ hỗn hợp được rửa bằng dung dịch natri hydro cacbonat bão hòa, nước muối, làm khô qua MgSO_4 , lọc và cô đặc trong chân không để tạo ra hợp chất I-4.3.

Hiệu suất 95%, m/z 508 $[\text{M}+\text{H}]^+$, thời gian lưu 1,06 phút, phương pháp LC-MS Z011_S03.

Bước 4: Tổng hợp hợp chất trung gian I-4.4

Bổ sung axit p-toluensulfonic monohydrat (600 mg, 3,15 mmol) vào hợp chất I-4.3 (320 mg, 0,63 mmol) trong axetonitril (8 mL) và hỗn hợp phản ứng được khuấy qua đêm ở nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp phản ứng được pha loãng bằng dung dịch natri hydro cacbonat bão hòa và chiết bằng etyl axetat ba lần. Lớp hữu cơ được rửa bằng nước muối, làm khô qua MgSO_4 , lọc và cô đặc trong chân không.

Hiệu suất 80%, m/z 408 $[\text{M}+\text{H}]^+$, thời gian lưu 0,90 phút, phương pháp LC-MS Z011_S03.

Bước 5: Tổng hợp hợp chất ví dụ 27

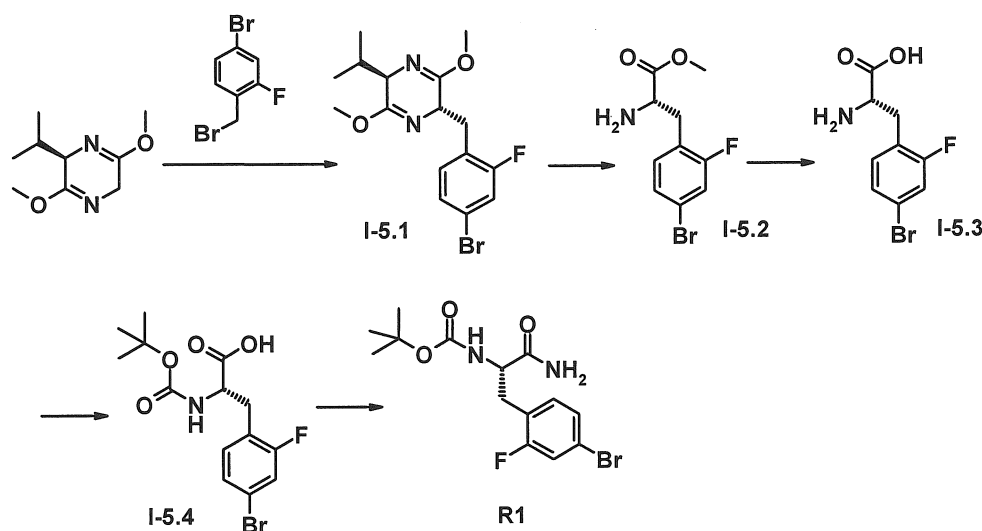
Bổ sung vào hợp chất I-4.4 (30 mg, 0,07 mmol) trong DMF (1 mL) axit 3-tert-butoxycarbonyl-3-azabicyclo[2.2.2]octan-4-carboxylic, được điều chế theo Radchenko *et al. J. Org. Chem.* 2009, 5541-5544 (19 mg, 0,07 mmol), N-metyl-morpholin (16 μ L, 0,15 mmol) và PPA (43 μ L, 50% trong DMF) ở nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 2,5 giờ ở nhiệt độ trong phòng, pha loãng bằng dung dịch natri

hydro cacbonat bão hòa và chiết bằng etyl axetat vài lần. Lớp hữu cơ được rửa bằng nước muối, làm khô qua MgSO_4 , lọc và cô đặc trong chân không. Phần cặn được tinh chế bằng phương pháp HPLC đảo pha để tạo ra hợp chất ví dụ 27 (trong quá trình làm sạch và/hoặc tinh chế việc loại bỏ bảo vệ nhóm Boc xảy ra).

Hiệu suất 32%, m/z 545 $[\text{M}+\text{H}]^+$, thời gian lưu 1,02 phút, phương pháp LC-MS Z011_S03.

Tổng hợp các nguyên liệu ban đầu/các chất chiết

Tổng hợp tert-butyl N-[(1S)-2-amino-1-[(4-bromo-2-fluorophenyl)methyl]-2-oxoethyl]carbamate (R1)



Bước 1: Tổng hợp hợp chất trung gian I-5.1

(2R)-(-)-2,5-Dihydro-3,6-dimethoxy-2-isopropylpyrazin (212 g, 1151 mmol) trong tetrahydrofuran khan (600 mL) được làm mát đến -78°C . Sau đó, n-butyllithi (2,5 M trong hexan, 552 mL, 1381 mmol) được bổ sung vào từng giọt, giữ ở nhiệt độ dưới -78°C . Sau 30 phút 4-bromo-2-fluorobenzyl bromua (324g, 1209 mmol) trong tetrahydrofuran khan (120 mL) được bổ sung vào từng giọt. Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở -78°C trong 1 giờ. Hỗn hợp này được ngừng phản ứng bằng dung dịch NH_4Cl bão hòa và chiết ba lần bằng etyl axetat. Lớp hữu cơ được rửa bằng nước muối, làm khô qua Na_2SO_4 , lọc và làm bay hơi trong chân không. Phần cặn được tinh chế bằng phương pháp sắc ký nhanh (heptan/ etyl axetat = 80/20). Hiệu suất 60%.

Bước 2: Tổng hợp hợp chất trung gian I-5.2

Bổ sung vào hợp chất I-5.1 (104 g, 265 mmol) trong axetonitril (600 mL) dung dịch nước HCl 0,2 M (2788 mL, 558 mmol). Hỗn hợp này được khuấy ở nhiệt độ trong

phòng trong 12 giờ. Hỗn hợp này được chiết bằng dietyl ete và độ pH của lớp nước được điều chỉnh đến ~8 bằng dung dịch NaHCO_3 bão hòa. Sau đó, hỗn hợp này được chiết ba lần bằng etyl axetat. Lớp hữu cơ được rửa bằng nước muối, làm khô qua Na_2SO_4 , lọc và cô đặc. Hiệu suất 80%.

Bước 3: Tổng hợp hợp chất trung gian I-5.3

Hợp chất I-5.2 (62,4 g, 211 mmol) được khuấy trong dung dịch nước HCl 3 M (3 mol/L, 1000 mL) ở 60°C trong 16 giờ. Hỗn hợp này được làm mát và độ pH được điều chỉnh đến ~7 bằng dung dịch nước NaOH 6 M. Sau đó hỗn hợp phản ứng được lọc, rửa ba lần bằng nước và làm khô trong lò chân không ở 40°C trong 12 giờ. Hiệu suất 74%.

Bước 4: Tổng hợp hợp chất trung gian I-5.4

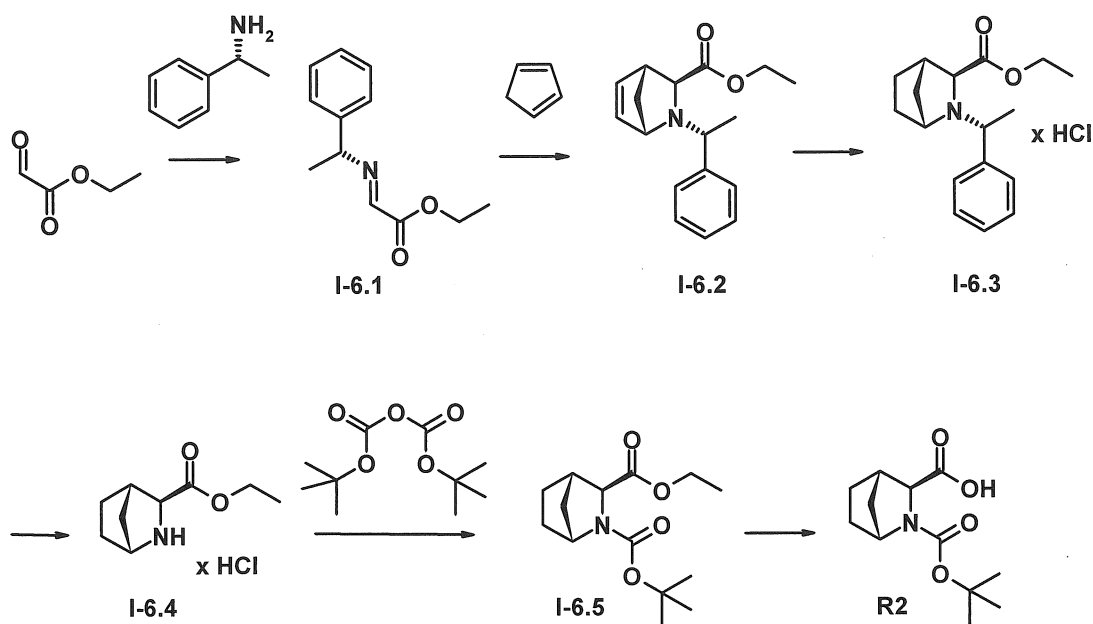
Bổ sung dung dịch nước natri cacbonat 2 M (301 mL, 602 mmol) và di-tertbutyl dicacbonat (138 g, 632 mmol) vào dung dịch chứa hợp chất I-5.3 (151g, 546 mmol) trong 1,4-dioxan (2,2 L). Hỗn hợp này được khuấy trong 4 giờ. Sau đó, nước được bổ sung vào và độ pH được điều chỉnh đến ~4-5 bằng axit xitric. Hỗn hợp này được chiết ba lần bằng etyl axetat. Lớp hữu cơ được rửa bằng nước muối, làm khô qua Na_2SO_4 , lọc và cô đặc. Phần cặn được khuấy trong heptan trong 15 phút và sản phẩm được lọc ra. Hiệu suất 87%.

Bước 5: Tổng hợp hợp chất R1

Bổ sung N-metylmorpholin (72 g, 713 mmol) và TBTU (153 g, 476 mmol) vào hợp chất I-5.4 (181 g, 476 mmol) trong DMF khan (1200 mL) và hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 30 phút. Sau đó, hỗn hợp phản ứng được làm mát đến 0°C và dung dịch nước amoni clorua 35% (47 mL, 856 mmol) được bổ sung vào và hỗn hợp này được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 12 giờ. Nước được bổ sung vào và sản phẩm tạo thành được lọc ra và rửa ba lần bằng nước. Sản phẩm được làm khô trong lò chân không ở 40°C trong 72 giờ. Hiệu suất 64%.

Tổng hợp (1S,2S,4R)-3-[(tert.-butoxy)cacbonyl]-3-azabixcyclo[2.2.1]heptan-2-carboxylat (R2)

Hợp chất này có bán trên thị trường hoặc có thể tổng hợp được theo cách tương tự như cách của Tararov et al, *Tetrahedron Asymmetry* 13 (2002), 25-28.



Bước 1: Tổng hợp hợp chất trung gian I-6.1

Dung dịch ethyl oxoacetat (44,9g, 0,44 mol), mới được chưng cất từ dung dịch có bán trên thị trường trong toluen (ở áp suất 5KPa (50mbar), 55°C) trong diethyle (300 ml) được làm mát đến -10°C, tiếp theo là bổ sung từng giọt (R)-(+)-1-phenyletanamin (53 g, 440 mmol), giữ nhiệt độ dưới 0°C. Sau khi hoàn thành việc bổ sung, $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (91g, 660 mmol) được bổ sung vào, và hỗn hợp thu được được khuấy ở nhiệt độ trong phòng qua đêm. Hỗn hợp này được lọc, nước cái được cô đặc trong chân không và phần còn lại được chưng cất trong áp suất giảm thấp để tạo ra hợp chất I-6.1 (47g, m/z 206 $[\text{M}+\text{H}]^+$, thời gian lưu 1,29 phút, phương pháp LC-MS V003_003). Sản phẩm được sử dụng mà không cần tinh chế tiếp.

Bước 2: Tổng hợp hợp chất trung gian I-6.2

Dung dịch chứa hợp chất I-6.1 (47g, 229 mmol) và 1,3-xyclopentadien (30g, 458 mmol) (mới được chưng cất từ dicyclopentadien) trong DMF (150 ml) và 120 μl nước được làm mát đến 0°C, trước khi bổ sung từng giọt TFA (18 ml, 234 mmol). Hỗn hợp này được khuấy qua đêm ở nhiệt độ trong phòng, sau đó bổ sung vào dung dịch chứa 40g NaHCO_3 trong 1200 ml nước và chiết bằng diethyl ete. Lớp hữu cơ được tách, sau đó rửa bằng dung dịch nước NaHCO_3 và nước, làm khô qua MgSO_4 , và cô đặc trong chân không. Phần cặn được tinh chế bằng phương pháp sắc ký cột silicagel (xyclohexan/ethyl axetat = 9:1) để tạo ra hợp chất I-6.2 (hiệu suất 52% m/z 272 $[\text{M}+\text{H}]^+$, thời gian lưu 0,42 phút, phương pháp LC-MS X001_004).

Bước 3: Tổng hợp hợp chất trung gian I-6.3

Bổ sung Raney niken (2,5 g) vào dung dịch chứa hợp chất I-6.2 (24,8 g, 91 mmol) trong etanol (250 ml), và cho phản ứng ở áp suất 344,74 KPa (50 psi) trong khí quyển hydro ở nhiệt độ trong phòng. Chất xúc tác được lọc ra, dung dịch này được cô đặc trong chân không và phần cặn được tinh chế bằng phương pháp sắc ký cột silicagel (xyclohexan/etyl axetat 9:1). Sau khi làm bay hơi dung môi hữu cơ, sản phẩm thu được được hòa tan lại trong dietyl ete và nghiền tinh chế bằng dung dịch HCl trong dioxan, cô đặc trong chân không, hòa tan lại trong 200 ml etanol và cô đặc trong chân không để tạo ra hợp chất I-6.3 (hiệu suất 78% m/z 274 $[M+H]^+$, thời gian lưu 0,42 phút, phương pháp LC-MS X001_004).

Bước 4: Tổng hợp hợp chất trung gian I-6.4

Bổ sung Pd/C 10% (2,5 g) vào dung dịch chứa hợp chất I-6.3 (22 g, 71 mmol) trong etanol (250 ml), và cho phản ứng ở áp suất 1,5 MPa (15 bar) trong khí quyển hydro ở nhiệt độ trong phòng. Chất xúc tác được lọc ra, dung dịch này được cô đặc trong chân không. Phần cặn được rửa bằng diisopropyl ete để tạo ra hợp chất I-6.4 (hiệu suất 98% m/z 170 $[M+H]^+$, thời gian lưu 0,48 phút, phương pháp LC-MS V001_007).

Bước 5: Tổng hợp hợp chất trung gian I-6.5

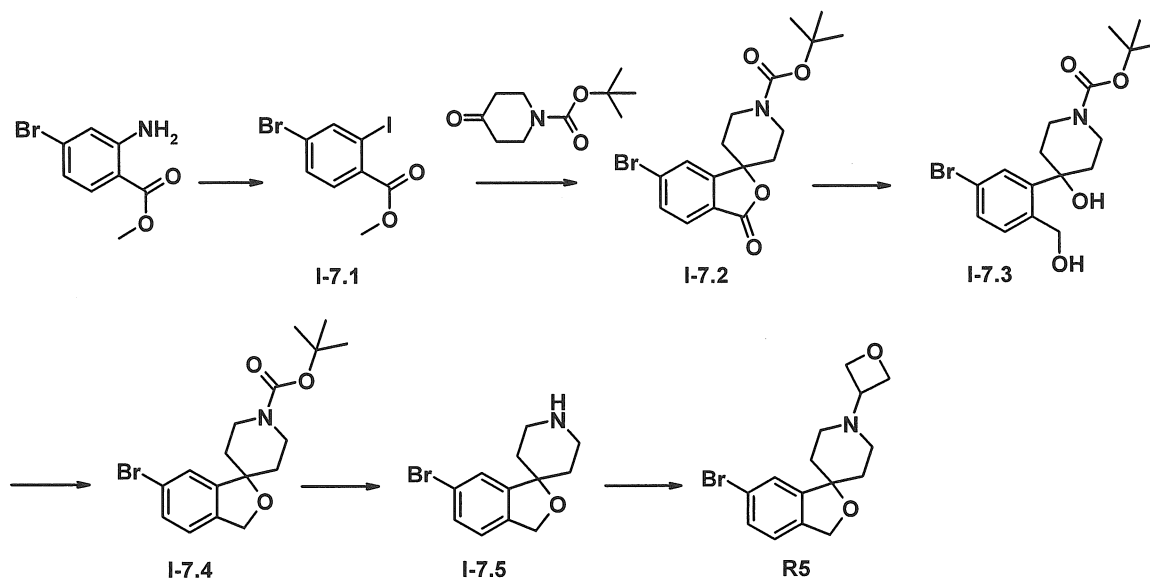
Bổ sung di-tert-butyl dicacbonat (15,9 g, 73 mmol) vào hợp chất I-6.4 (14,3 g, 69,3 mmol) trong dung dịch chứa triethylamin (24,6 ml, 175,3 mmol), THF (150 ml) và nước (2 mL), và hỗn hợp thu được được khuấy trong 40 giờ ở nhiệt độ trong phòng, sau đó cô đặc trong chân không. Etyl axetat được bổ sung vào phần cặn, sau đó chiết bằng nước, dung dịch nước axit axetic 1N và nước, trước khi lớp hữu cơ được làm khô qua $MgSO_4$, lọc và cô đặc trong chân không để tạo ra hợp chất I-6.5 (hiệu suất 95% m/z 270 $[M+H]^+$, thời gian lưu 1,33 phút, phương pháp LC-MS V003_003).

Bước 6: Tổng hợp hợp chất R2

Hỗn hợp chứa hợp chất I-6.5 (16,9 g; 63 mmol) trong axeton (152 ml), nước (50 ml) và lithi hydroxit (3g, 126 mmol) được khuấy qua đêm ở nhiệt độ trong phòng. Nước (100 ml) được bổ sung vào, thể tích được làm giảm trong chân không trước khi làm mát đến 0°C tiếp theo là bổ sung dung dịch nước HCl 1N để axit hóa đến độ pH=2-3, ngay sau đó chiết bằng etyl axetat. Lớp hữu cơ được rửa bằng nước, làm khô ($MgSO_4$) và cô đặc. Phần còn lại, diclometan (100 ml) và xyclohexan (100 ml) được bổ sung vào, thể tích được làm giảm trong chân không còn một nửa và hỗn hợp được ổn định ở 15°C.

Chất kết tủa được lọc ra, rửa bằng xyclohexan để tạo ra hợp chất R2 (hiệu suất 66%, m/z 242 $[M+H]^+$).

Tổng hợp 5-bromo-1'-(oxetan-3-yl)spiro[1H-isobenzofuran-3,4'-piperidin] (R5)



Bước 1: Tổng hợp hợp chất trung gian I-7.1

Metyl 2-amino-4-brombenzoat (10 g, 43,47 mmol) được tạo huyền phù trong axit sulphuric 20% (200 mL) và dung dịch thu được được làm mát đến 0°C. Natri nitrit (3,60 g, 52,16 mmol), hòa tan trong nước (40 mL), được bổ sung từng giọt ở nhiệt độ từ 0°C đến 5°C và hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 40 phút nữa ở nhiệt độ này. Sau đó, dung dịch đã làm mát (khoảng 0°C) chứa kali iodua (14,43 g, 86,93 mmol) trong nước (40 mL) được bổ sung từng giọt và hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 1 giờ ở 5°C. Hỗn hợp phản ứng được rót vào nước đá và chiết bằng etyl axetat. Lớp hữu cơ được rửa bằng nước, dung dịch nước natri thiosulfat 10%, nước muối, làm khô qua Na_2SO_4 và cô đặc trong chân không. Hiệu suất 94%.

Bước 2: Tổng hợp hợp chất trung gian I-7.2

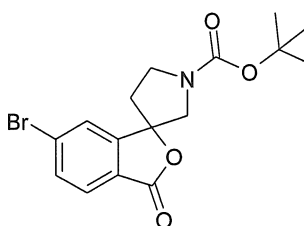
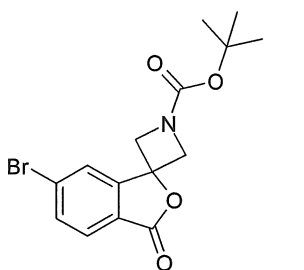
Hợp chất I-7.1 (9,42 g, 27,63 mmol) và tert-butyl 4-oxopiperidin-1-carboxylat (6,24 g, 30,40 mmol) trong THF khan (200 mL) được làm mát đến -70°C. Phức isopropylmagie clorua-lithi clorua (1,3 mol/L trong THF, 23,38 mL, 30,40 mmol) được bổ sung từng giọt và hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 20 phút nữa ở nhiệt độ này, để cho trở về nhiệt độ trong phòng và khuấy trong 45 phút. Hỗn hợp phản ứng được ngừng phản ứng bằng nước và chiết bằng etyl axetat. Lớp hữu cơ được rửa bằng nước muối, làm khô qua Na_2SO_4 và cô đặc trong chân không. Phần cặn thô được tinh chế

bằng phương pháp sắc ký cột nhanh (ete dầu mỏ: EtOAc = 95:5 đến 40:60) để tạo ra hợp chất I-7.2.

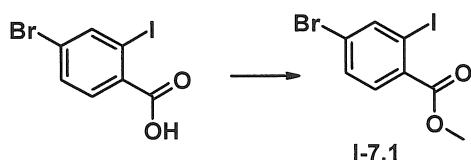
Hiệu suất 74%, m/z 326,328 $[M+H - \text{tert-Bu}]^+$, thời gian lưu 1,09 phút, phương pháp LC-MS Z011_S03.

Các hợp chất trung gian được thể hiện trong Bảng 2 sau đây được tổng hợp theo cách tương tự từ các hợp chất trung gian thích hợp:

Bảng 2

Hợp chất trung gian	Công thức cấu trúc	m/z $[M+H]^+$	thời gian lưu (phút)	Phương pháp LC-MS
I-7.2.1		312; 314 $[M - \text{tert-But} + H]^+$	1,06	Z011_S03
I-7.2.2		298; 300 $[M - \text{tert-But} + H]^+$	1,07	Z012_S04

Phương pháp khác để tổng hợp hợp chất trung gian I-7.1



Bổ sung axit sulphuric đặc (10 mL) vào axit 4-bromo-2-iodobenzoic (9,0 g, 27,53 mmol) trong metanol (50 mL) và hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 90 phút ở 80°C. Hỗn hợp phản ứng được rót vào nước đá, natri hydro cacbonat được bổ sung vào đến khi đạt giá trị pH=7 và hỗn hợp phản ứng được chiết bằng etyl axetat. Lớp hữu cơ được rửa bằng nước muối, làm khô qua MgSO_4 , lọc và cô đặc trong chân không. Hiệu suất 95%.

Bước 3: Tổng hợp hợp chất trung gian I-7.3

Bổ sung lithi bohydrua (2 mol/L trong THF, 21,22 mL, 42,44 mmol) vào hợp chất I-7.2 (8,11 g, 21,22 mmol) trong THF (100 mL) và hỗn hợp phản ứng được khuấy qua

đêm ở nhiệt độ trong phòng. Phép phân tích HPLC-MS cho thấy mức độ chuyển hóa 20%. Thêm một lượng lithi bohryua (2 mol/L trong THF, 27,0 mL, 54,0 mmol) được bổ sung vào từng giọt và hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 6 ngày ở nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp phản ứng được cẩn thận ngừng phản ứng bằng nước trong khi làm mát đến khoảng 0°C bằng bể nước đá. Dung dịch natri hydro cacbonat bão hòa được bổ sung vào hỗn hợp phản ứng, chất kết tủa thu được được lọc ra, và nước cái được chiết bằng ethyl axetat vài lần. Lớp hữu cơ được rửa bằng nước muối, làm khô qua MgSO_4 , lọc và cô đặc trong chân không.

Hiệu suất >95%, m/z 312/314 $[\text{M}+\text{H} - \text{tert-Butyl} - \text{H}_2\text{O}]^+$, thời gian lưu 1,01 phút, phương pháp LC-MS Z011_S03.

Bước 4: Tổng hợp hợp chất trung gian I-7.4

Hợp chất I-7.3 (605 mg, 1,57 mmol) được hòa tan trong THF khan (20 mL) và làm mát đến 0°C, TEA (1,09 mL, 7,83 mmol) và anhydrit p-toluensulfonic (613,44 mg, 1,88 mmol) được bổ sung vào. Hỗn hợp phản ứng được để cho trở về nhiệt độ trong phòng và khuấy qua đêm. Hỗn hợp phản ứng được pha loãng bằng nước và dung dịch natri hydro cacbonat bão hòa và chiết bằng ethyl axetat vài lần. Lớp hữu cơ được rửa bằng nước muối, làm khô qua Na_2SO_4 , lọc và cô đặc trong chân không. Phần cặn được tinh chế bằng phương pháp HPLC đảo pha.

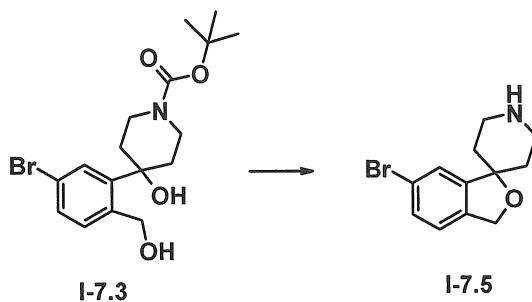
Hiệu suất 72%, m/z 368; 370 $[\text{M}+\text{H}]^+$

Bước 5: Tổng hợp hợp chất trung gian I-7.5

Hợp chất I-7.4 (240 mg, 1,57 mmol) được hòa tan trong DCM khan (2 mL) và TFA (500 μL , 6,53 mmol) được bổ sung vào. Hỗn hợp phản ứng được để trong 70 phút ở nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp phản ứng được cô đặc trong chân không, phần cặn được hòa tan lại trong metanol, lọc qua cột pha rắn (StratoSpheresTM PL-HCO₃ MP Resin) và metanol được loại bỏ trong chân không.

Hiệu suất 97%, m/z 268; 270 $[\text{M}+\text{H}]^+$, nhiệt độ trong phòng 0,93 phút, phương pháp LC-MS Z011_S03.

Phương pháp khác để tổng hợp hợp chất trung gian I-7.5



Hợp chất I-7.3 (8,39 g, 21,71 mmol) được hòa tan trong THF khan (25 mL), dung dịch nước HCl 5N (25 mL) được bổ sung vào và hỗn hợp phản ứng được khuấy ở 90°C trong 30 giờ. Hỗn hợp phản ứng được làm mát đến nhiệt độ trong phòng, bazơ hóa bằng dung dịch natri hydro cacbonat bão hòa và chiết bằng etyl axetat vài lần. Lớp hữu cơ được rửa bằng nước muối, làm khô qua Na₂SO₄, lọc và cô đặc trong chân không.

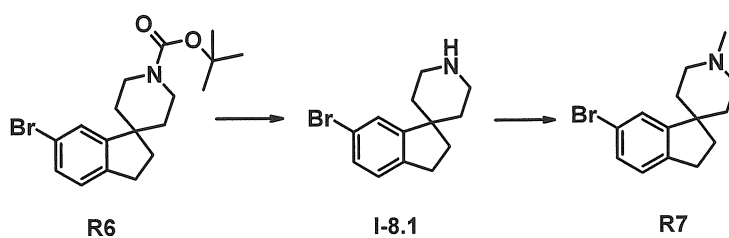
Hiệu suất 76%, *m/z* 268; 270 [M+H]⁺, nhiệt độ trong phòng 0,93 phút, phương pháp LC-MS Z011_S03.

Bước 6: Tổng hợp hợp chất R5

Hợp chất I-7,5 (5,0 g, 18,49 mmol) được hòa tan trong tetrahydrofuran khan (20 mL), 3-oxetanon (1,78 mL, 27,73 mmol) và axit axetic (1,06 mL, 18,49 mmol) được bổ sung vào và hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 25 phút ở nhiệt độ trong phòng. Natri triaxetoxymethydrin (6,82 g, 30,57 mmol) được bổ sung vào và hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 30 phút nữa ở nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp phản ứng được ngừng phản ứng bằng MeOH, pha loãng bằng dung dịch natri hydro cacbonat bão hòa, và chiết bằng etyl axetat vài lần. Lớp hữu cơ được rửa bằng nước muối, làm khô qua MgSO₄ và cô đặc trong chân không để tạo ra hợp chất R5.

Hiệu suất 89%, *m/z* 324, 326 [M+H]⁺, nhiệt độ trong phòng 0,93 phút, phương pháp LC-MS Z011_S03.

Tổng hợp 6-bromo-1'-metyl-spiro[indan-1,4'-piperidin] (R7)



Bước 1: Tổng hợp hợp chất trung gian I-8.1

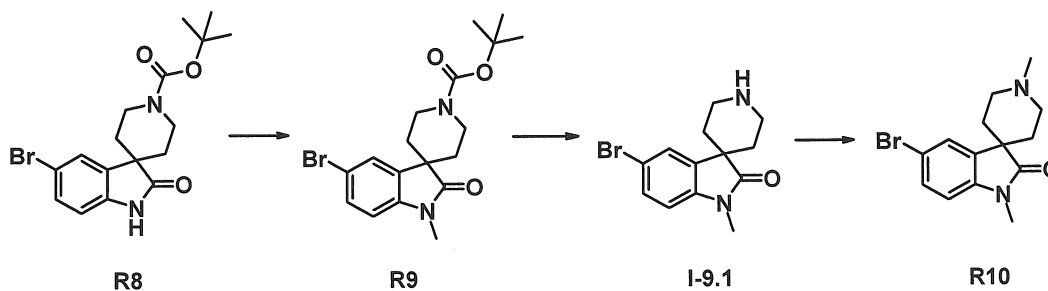
Bổ sung axit trifloaxetic (0,25 mL) vào hợp chất R6 được mua từ hãng WUXI APPTec (200 mg, 0,55 mmol) trong diclometan (3 mL) và hỗn hợp phản ứng được khuấy qua đêm ở nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp phản ứng được cô đặc trong chân không, phần cặn được hòa tan lại trong metanol, lọc qua cột pha rắn (StratoSpheresTM PL-HCO₃ MP Resin) và metanol được loại bỏ trong chân không. Hiệu suất >95%.

Bước 2: Tổng hợp hợp chất R7

Bổ sung formaldehyt (37% trong nước, 0,21 mL, 2,86 mmol) và axit axetic (0,05 mL, 0,86 mmol) vào hợp chất I-8.1 (152 mg, 0,57 mmol) trong metanol (4 mL). Hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 2 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Natri triaxetoxymetanol (302,6 mg, 1,43 mmol) được bổ sung vào và hỗn hợp phản ứng được khuấy 80 phút ở nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp phản ứng được cô đặc, nghiền tinh chế bằng nước và dung dịch natri hydro cacbonat bão hòa và chiết bằng etyl axetat. Lớp hữu cơ được rửa bằng dung dịch natri hydro cacbonat bão hòa và nước muối. Chất kết tủa được lọc ra và dịch lọc được làm khô qua Na₂SO₄, lọc và cô đặc trong chân không để tạo ra hợp chất R7.

Hiệu suất 89%.

Tổng hợp 5-bromo-1,1'-dimetyl-spiro[indolin-3,4'-piperidin]-2-on (R10)



Bước 1: Tổng hợp hợp chất R9

Bổ sung natri hydrua (thể phân tán 60% trong dầu khoáng, 31,5 mg, 0,79 mmol) có làm mát đến 0°C vào hợp chất R8, mua được từ hãng ACTIVATE (200 mg, 0,53 mmol) trong DMF (4 mL) và hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 30 phút nữa ở nhiệt độ trong phòng. Metyl iodua (36 μ L, 0,58 mmol) được bổ sung vào và hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 40 phút ở nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp phản ứng được pha loãng bằng nước và chiết bằng etyl axetat. Lớp hữu cơ được rửa bằng nước và nước muối, làm khô qua Na₂SO₄, lọc và cô đặc trong chân không để tạo ra hợp chất R9. Hiệu suất 98%.

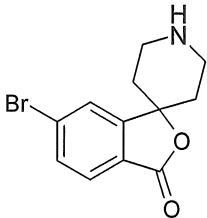
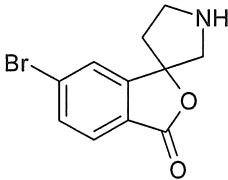
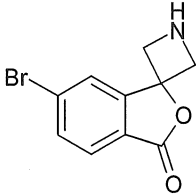
Bước 2: Tổng hợp hợp chất trung gian I-9.1

Bổ sung axit trifloaxetic (0,5 mL) vào hợp chất R9 (191 mg, 0,48 mmol) trong diclometan (5 mL) và hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 20 phút ở nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp phản ứng được cô đặc trong chân không, phần cặn được hòa tan lại trong metanol, lọc qua cột pha rắn (StratoSpheres™ PL-HCO3 MP Resin) và metanol được loại bỏ trong chân không.

Hiệu suất > 95%

Các hợp chất trung gian được thể hiện trong Bảng 3 sau đây được tổng hợp theo cách tương tự từ các hợp chất trung gian thích hợp:

Bảng 3

Hợp chất trung gian	Công thức cấu trúc	m/z [M+H] ⁺	Thời gian lưu (phút)	Phương pháp LC-MS
I-9.1.1		282; 284	0,69	Z012_S04
I-9.1.2		268; 270	0,57	Z021_S01
I-9.1.3		254; 256	0,62	Z012_S04

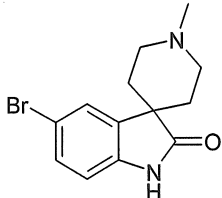
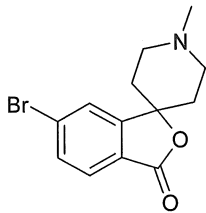
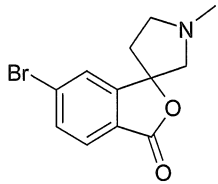
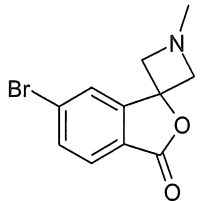
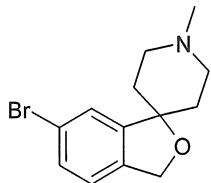
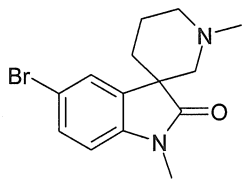
Bước 3: Tổng hợp hợp chất R10

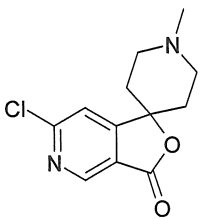
Bổ sung formaldehyt (37% trong nước, 0,19 mL, 2,58 mmol) và axit axetic (0,044 mL, 0,77 mmol) vào hợp chất I-9.1 (152 mg, 0,52 mmol) trong metanol (5 mL). Hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 2 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Natri triaxetoxybohdyrua (273,0 mg, 1,29 mmol) được bổ sung vào và hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 40 phút ở nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp phản ứng được cô đặc, pha loãng bằng nước và dung dịch natri hydro cacbonat bão hòa và chiết bằng etyl axetat. Lớp hữu cơ được rửa bằng nước muối, làm khô qua Na₂SO₄, lọc và cô đặc trong chân không.

Hiệu suất >95%, 309; 311 [M+H]⁺, thời gian lưu 0,75 phút, phương pháp LC-MS Z012_S04.

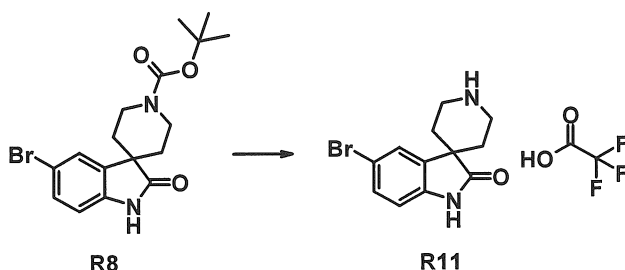
Các hợp chất trung gian được thể hiện trong Bảng 4 sau đây được tổng hợp theo cách tương tự từ các hợp chất trung gian thích hợp:

Bảng 4

Hợp chất trung gian	Công thức cấu trúc	m/z [M+H] ⁺	Thời gian lưu (phút)	Phương pháp LC-MS
R10.1		295; 297	0,69	Z012_S04
R10.2		296; 298	0,70	Z012_S04
R10.3		282; 284	0,68	Z012_S04
R10.4		268; 270	0,62	Z012_S04
R10.5		282; 284	0,77	Z012_S04
R10.6		309; 311	0,59	Z020_S01

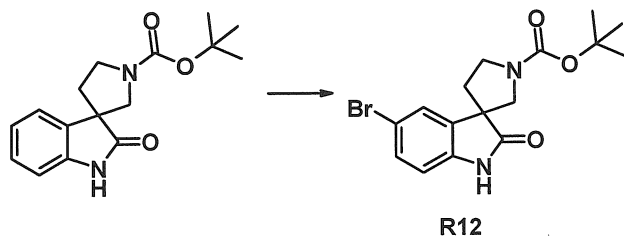
R10.7		253	0,24	Z021_S01
-------	---	-----	------	----------

Tổng hợp muối TFA của hợp chất 5-bromospiro[indolin-3,4'-piperidin]-2-on (R11)



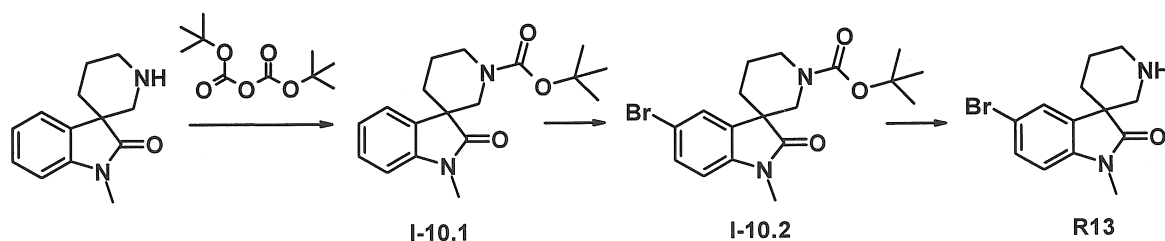
Bổ sung trifloaxetic (0,5 mL) vào hợp chất R8, mua được từ hãng ACTIVATE (150 mg, 0,39 mmol) trong diclometan (3 mL) và hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 45 phút ở nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp phản ứng được cô đặc. Hiệu suất 100%.

Tổng hợp tert-butyl 5-bromo-2-oxo-spiro[indolin-3,3'-pyrrolidin]-1'-carboxylat (R12)



Bổ sung N-bromosuccinimit (30,5 mg, 0,17 mmol) vào tert-butyl 2-oxospiro[indolin-3,3'-pyrrolidin]-1'-carboxylat, mua được từ hãng Zerenex (50,0 mg, 0,17 mmol) trong axetonitril (1,5 mL) và hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 5 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp phản ứng được pha loãng bằng nước và dung dịch natri hydro cacbonat bão hòa và chiết bằng etyl axetat. Lớp hữu cơ được rửa bằng nước muối, làm khô và cô đặc trong chân không. Hiệu suất 80%, m/z 367; 369 $[M+H]^+$

Tổng hợp 5-bromo-1-metyl-spiro[indolin-3,3'-piperidin]-2-on (R13)



Bước 1: Tổng hợp hợp chất trung gian I-10.1

Bổ sung TEA (0,64 mL, 4,62 mmol) và di-tert-butyl dicacbonat (958,6 mg, 4,39 mmol) vào 1-metylspiro[indol-3,3'-piperidin]-2(1H)-on, mua được từ hãng ChemBridge Corporation (1,0 g, 4,62 mmol) trong diclometan (20 mL). Hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 10 phút ở nhiệt độ trong phòng, pha loãng bằng nước và dung dịch natri hydro cacbonat bão hòa và chiết bằng diclometan. Các pha được tách và lớp nước được chiết bằng DCM. Các lớp hữu cơ hỗn hợp được làm khô qua MgSO_4 và cô đặc trong chân không.

Hiệu suất >95%, m/z 261 $[\text{M}+\text{H} - \text{tert-Butyl}]^+$, thời gian lưu 1,06 phút, phương pháp LC-MS Z020_S01.

Bước 2: Tổng hợp hợp chất trung gian I-10.2

Bổ sung N-bromosuccinimit (856,7 mg, 5 mmol) vào hợp chất I-10.1 (1,54 g, 4,87 mmol) trong axetonitril (35 mL) và hỗn hợp phản ứng được khuấy qua đêm ở nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp phản ứng được pha loãng bằng nước và dung dịch natri hydro cacbonat bão hòa và chiết bằng etyl axetat. Lớp hữu cơ được rửa bằng dung dịch natri hydro cacbonat bão hòa và nước muối, làm khô qua Na_2SO_4 , lọc và cô đặc trong chân không.

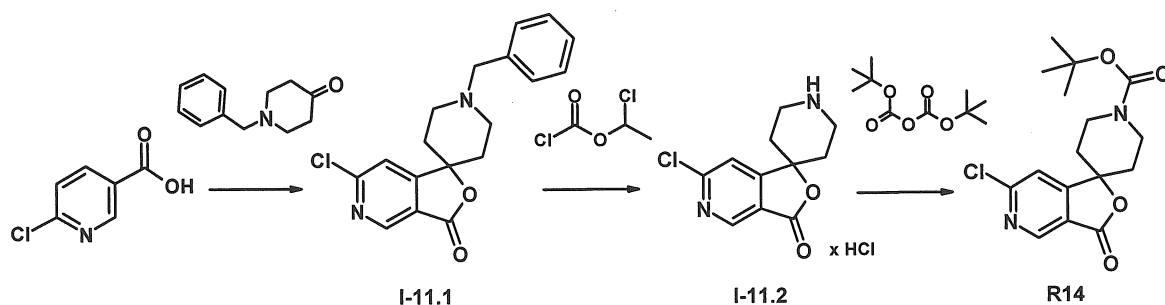
Hiệu suất 93%, m/z 340 $[\text{M}+\text{H} - \text{tert-Butyl}]^+$, thời gian lưu 1,13 phút, phương pháp LC-MS Z020_S01.

Bước 3: Tổng hợp hợp chất R13

Bổ sung axit trifloaxetic (5 mL) vào hợp chất I-10.2 (200 mg, 0,51 mmol) trong diclometan (10 mL) và hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 15 phút ở nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp phản ứng được cô đặc trong chân không và đông khô. Phần cặn còn lại được hòa tan trong diclometan và chiết bằng dung dịch nước natri hydroxit 1mol/L và nước muối. Lớp hữu cơ được làm khô và cô đặc trong chân không.

Hiệu suất 88%, m/z 295; 297 $[\text{M}+\text{H}]^+$, thời gian lưu 0,59 phút, phương pháp LC-MS Z020_S01.

Tổng hợp tert-butyl 6-clo-3-oxo-spiro[furo[3,4-c]pyridin-1,4'-piperidin]-1'-carboxylat (R14)



Bước 1: Tổng hợp hợp chất trung gian I-11.1

Việc tổng hợp hợp chất trung gian I-11.1 được mô tả trong tài liệu EP2072519 A1, p. 36.

Ở -78°C , dung dịch hexan (94 mL, 150,81 mmol) chứa 1,6 M n-butyllithi được bổ sung từng giọt vào dung dịch THF (110 mL) chứa 2,2,6,6-tetrametylpiperidin (16,14 g, 113,10 mmol) và dung dịch thu được được khuấy trong 1 giờ. Sau đó, dung dịch THF (50 mL) chứa axit 6-cloronicotinic (6,0 g, 37,70 mmol) được bổ sung vào từng giọt trong 1 giờ và hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 2 giờ. Dung dịch THF (50 mL) chứa 1-benzyl-4-piperidon (21,6 g, 113,10 mmol) được bổ sung vào từng giọt ở -78°C . Sau khi khuấy trong 2 giờ, nước (70 mL) được bổ sung vào, và hỗn hợp phản ứng được làm ấm đến nhiệt độ trong phòng.

Lớp nước được tách, và lớp hữu cơ được chiết bằng dung dịch nước natri hydroxit 1 N (2x75 mL). Lớp nước thu được được chiết bằng dietyl ete (100 mL), và lớp nước được axit hóa (độ pH~1) bằng cách bổ sung axit clohydric đặc.

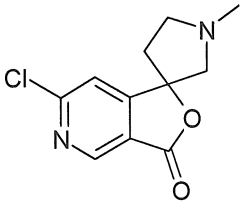
Sau khi khuấy trong 1 giờ, chất kết tủa được lọc ra, rửa bằng nước, và hòa tan trong etyl axetat.

Lớp hữu cơ được rửa bằng dung dịch nước natri hydro cacbonat bão hòa, làm khô qua Na_2SO_4 và cô đặc trong chân không. Phần cặn được rửa bằng dietyl ete.

Hiệu suất 66%, m/z 329 $[\text{M}+\text{H}]^+$, thời gian lưu 0,72 phút, phương pháp LC-MS Z012_S04.

Hợp chất trung gian được thể hiện trong Bảng 5 sau đây được tổng hợp theo cách tương tự từ hợp chất trung gian thích hợp:

Bảng 5

Hợp chất trung gian	Công thức cấu trúc	m/z [M+H] ⁺	thời gian lưu (phút)	Phương pháp LC-MS
I-11.1.1		239	0,75	Z011_S03

Bước 2: Tổng hợp hợp chất trung gian I-11.2

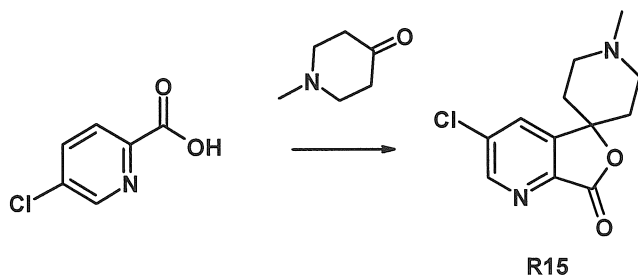
Hợp chất I-11.1 (2,0 g, 6,08 mmol) trong dicloetan (15 mL) được làm mát đến 0°C. Dung dịch chứa 1-cloetyl cloroformat (1,98 mL, 18,25 mmol) trong dicloetan (5 mL) được bổ sung vào từ từ và hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 15 phút nữa ở 0°C. Sau đó, hỗn hợp phản ứng được đun nóng đến hồi lưu và khuấy qua đêm. Hỗn hợp phản ứng được cô đặc trong chân không. Phần cặn được hòa tan trong metanol và đun nóng đến hồi lưu trong 30 phút, trong thời gian này chất kết tủa được tạo thành. Hỗn hợp phản ứng được pha loãng bằng diclometan và chất kết tủa được lọc ra để tạo ra hợp chất I-11.2 (hydroclorua).

Hiệu suất 61%.

Bước 3: Tổng hợp hợp chất R14

Bổ sung TEA (0,51 mL, 3,64 mmol) và di-tert-butyl dicacbonat (396,6 mg, 1,82 mmol) vào hợp chất I-11.2 (500 mg, 1,82 mmol) trong diclometan (10 mL). Hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 20 phút ở nhiệt độ trong phòng, pha loãng bằng nước và dung dịch natri hydro cacbonat bão hòa và chiết bằng diclometan. Lớp hữu cơ được làm khô và cô đặc trong chân không. Hiệu suất 91%.

Tổng hợp 3-clo-1'-metyl-spiro[furo[3,4-b]pyridin-5,4'-piperidin]-7-on (R15)

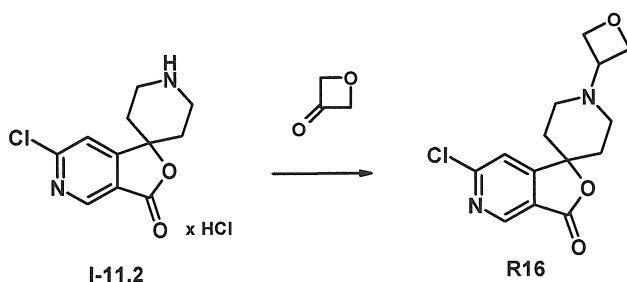


Ở -78°C , dung dịch hexan (2,38 mL, 3,81 mmol) chứa 1,6 M n-butyllithi được bổ sung từng giọt vào dung dịch THF (5 mL) chứa 2,2,6,6-tetramethylpiperidin (0,76 mL, 4,43 mmol) và dung dịch thu được được khuấy trong 1 giờ ở nhiệt độ này. Sau đó, dung dịch THF (1 mL) chứa axit 5-clo-2-pyridincarboxylic (0,2 g, 1,27 mmol) được bổ sung vào từng giọt trong 5 phút và hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 45 phút. Dung dịch THF (1 mL) chứa 1-metyl-4-piperidon (0,44 mL, 3,81 mmol) được bổ sung vào từng giọt ở -78°C . Sau 1 giờ, nước (10 mL) được bổ sung vào, và hỗn hợp phản ứng được làm ấm đến nhiệt độ trong phòng.

Etyl axetat (15 mL) và dung dịch nước NaHCO_3 bão hòa (15 mL) được bổ sung vào hỗn hợp phản ứng và lớp nước được tách. Lớp hữu cơ được chiết bằng dung dịch nước NaHCO_3 bão hòa (2x10 mL). Pha nước hỗn hợp được axit hóa (độ pH~1) bằng cách bổ sung axit clohydric đặc.

Sau khi khuấy trong 1 giờ hỗn hợp phản ứng được bazơ hóa bằng cách bổ sung dung dịch nước NaHCO_3 bão hòa và chiết bằng etyl axetat (4x25 mL). Lớp hữu cơ được rửa bằng nước muối, làm khô qua Na_2SO_4 và cô đặc trong chân không để tạo ra hợp chất R15. Hiệu suất 21%, m/z 253, 255 $[\text{M}+\text{H}]^+$, thời gian lưu 0,41 phút, phương pháp LC-MS Z012_S04.

Tổng hợp 6-clo-1'-(oxetan-3-yl)spiro[furo[3,4-c]pyridin-1,4'-piperidin]-3-on (R16)



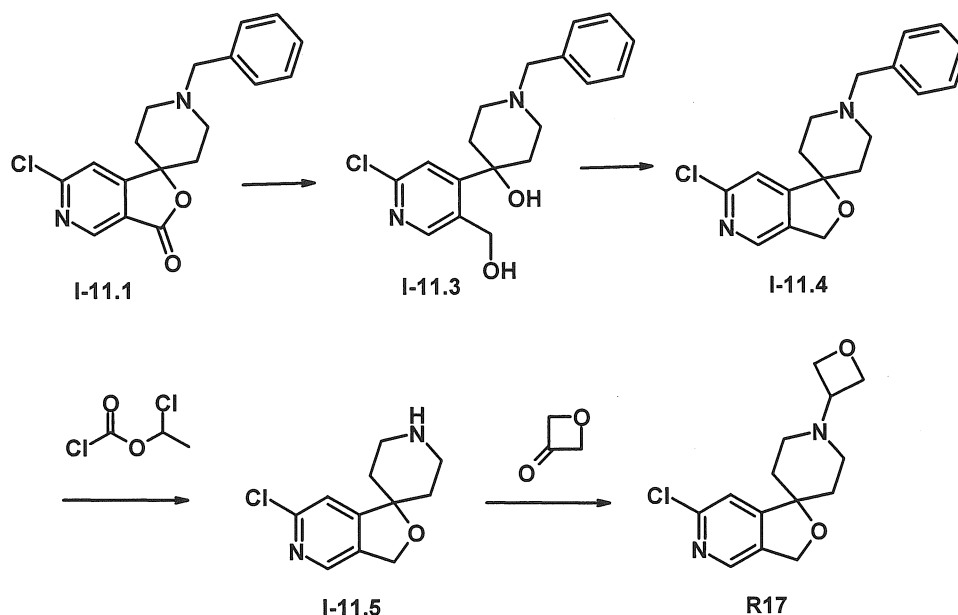
a) Điều chế bazơ tự do:

Hợp chất I-11.2 (200 mg, 0,73 mmol) được hòa tan một phần trong metanol khan, tetraalkyl- amoni cacbonat gắn kết polyme (Aldrich, 540293) được bổ sung vào và hỗn hợp này được khuấy trong 2 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Tetraalkyl- amoni cacbonat gắn kết polyme được lọc ra và metanol được loại bỏ trong chân không để tạo ra bazơ tự do của hợp chất I-11.2.

b) Bazơ tự do của hợp chất I-11.2 được hòa tan trong hỗn hợp diclometan khan (3 mL) / tetrahydrofuran khan (1 mL), 3-oxetanon (0,23 mL, 3,64 mmol) và axit axetic (0,06

mL, 1,1 mmol) được bổ sung vào. Hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 75 phút ở nhiệt độ trong phòng, sau đó bổ sung natri triaxetoxymethydrate và hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 15 phút ở nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp phản ứng được pha loãng bằng dung dịch natri hydro cacbonat bão hòa và chiết bằng ethyl acetat. Lớp hữu cơ được rửa bằng nước muối, làm khô qua Na_2SO_4 và cô đặc trong chân không. Hiệu suất 80%, m/z 295 $[\text{M}+\text{H}]^+$, thời gian lưu 0,75 phút, phương pháp LC-MS Z011_S03.

Tổng hợp 6-chloro-1'-(oxetan-3-yl)spiro[3H-furo[3,4-c]pyridin-1,4'-piperidin] (R17)



Bước 1: Tổng hợp hợp chất trung gian I-11.3

Bổ sung natri bohydrua (345 mg, 9,12 mmol) thành các phần nhỏ vào hợp chất I-11.1 (1,00 g, 3,04 mmol) trong metanol (15 mL) và hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 20 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Thêm một lượng natri bohydrua (750 mg, 19,82 mmol) được bổ sung vào hỗn hợp phản ứng thành 3 phần (mỗi phần 250 mg) trong 5 giờ. Hỗn hợp phản ứng được ngừng phản ứng bằng nước và pha loãng bằng ethyl acetat. Lớp hữu cơ được tách và lớp nước được chiết bằng ethyl acetat. Lớp hữu cơ kết hợp được rửa bằng dung dịch natri hydro cacbonat bão hòa, nước muối, làm khô qua Na_2SO_4 và cô đặc trong chân không. Phần cặn được tinh chế bằng phương pháp HPLC đảo pha để tạo ra hợp chất I-11.3. Hiệu suất 40%, m/z 333 $[\text{M}+\text{H}]^+$, thời gian lưu 0,91 phút, phương pháp LC-MS Z011_S03.

Bước 2: Tổng hợp hợp chất trung gian I-11.4

Bổ sung TEA (0,95 mL, 6,81 mmol) và metansulfonyl clorua (0,26 mL, 3,5 mmol) ở 0°C vào I-11.3 (378 mg, 1,14 mmol) trong THF khan (5 mL), hỗn hợp phản ứng được

để cho trở về nhiệt độ trong phòng và khuấy trong 1 giờ. Hỗn hợp phản ứng được pha loãng bằng dung dịch natri hydro cacbonat bão hòa và chiết bằng etyl axetat. Lớp hữu cơ được rửa bằng nước muối, làm khô qua Na_2SO_4 và cô đặc trong chân không để tạo ra sản phẩm thô, sản phẩm này được sử dụng ở bước tiếp theo mà không cần tinh chế tiếp.

Hiệu suất 95%, m/z 315 $[\text{M}+\text{H}]^+$, thời gian lưu 1,06 phút, phương pháp LC-MS Z011_S03.

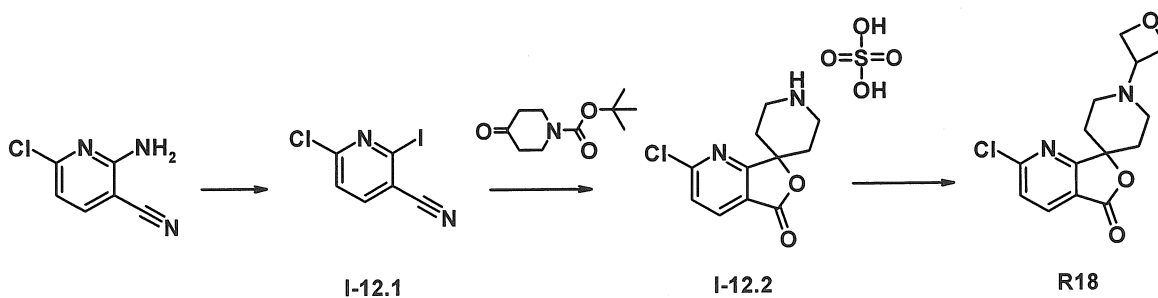
Bước 3: Tổng hợp hợp chất trung gian I-11.5

Bổ sung 1-cloetyl cloroformat (0,42 mL, 3,91 mmol) vào dung dịch chứa hợp chất I-11.4 (246 mg, 0,78 mmol) trong dicloetan (4 mL) và hỗn hợp phản ứng được đun nóng đến hồi lưu và khuấy trong 3 giờ. Dicloetan được loại bỏ trong chân không, phần cặn thu được được hòa tan lại trong metanol (3 mL) và dung dịch thu được được đun hồi lưu trong 30 phút. Hỗn hợp phản ứng được làm mát đến nhiệt độ trong phòng và tinh chế bằng phương pháp HPLC đảo pha để tạo ra hợp chất I-11.5. Hiệu suất 72%, m/z 225 $[\text{M}+\text{H}]^+$, thời gian lưu 0,71 phút, phương pháp LC-MS Z011_S03.

Bước 4: Tổng hợp hợp chất R17

Hợp chất I-11.5 (114 mg, 0,51 mmol) được hòa tan trong tetrahydrofuran khan (2 mL), 3-oxetanon (0,05 mL, 0,76 mmol) và axit axetic (0,044 mL, 0,76 mmol) được bổ sung vào và hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Natri triaxetoxymethydrat (269 mg, 1,27 mmol) được bổ sung vào và hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 15 phút ở nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp phản ứng được pha loãng bằng dung dịch natri hydro cacbonat bão hòa và chiết bằng etyl axetat. Lớp hữu cơ được rửa bằng nước muối, làm khô qua MgSO_4 và cô đặc trong chân không để tạo ra hợp chất R17. Hiệu suất 62%, m/z 281 $[\text{M}+\text{H}]^+$, thời gian lưu 0,76 phút, phương pháp LC-MS Z011_S03.

Tổng hợp 2-clo-1'-(oxetan-3-yl)spiro[furo[3,4-b]pyridin-7,4'-piperidin]-5-on (R18)



Bước 1: Tổng hợp hợp chất trung gian I-12.1

2-Amino-6-clorinonicotinonitril, mua được từ hãng ABLOCK PHARMATECH (2,0 g, 13,02 mmol) được hòa tan trong tetrahydrofuran khan (40 mL), đồng(I) iodua (3,72 g, 19,54 mmol), diiodometan (8,39 mL, 104,2 mmol) và tert-butyl nitrit (6,20 mL, 52,1 mmol) được bổ sung vào. Hỗn hợp phản ứng được đun hồi lưu trong 1,5 giờ, làm mát đến nhiệt độ trong phòng và tất cả các chất dễ bay hơi được loại bỏ trong chân không. Phần cặn thu được được hòa tan trong etyl axetat (100 mL) và rửa bằng dung dịch nước natri thiosulfat 10% (25 mL), dung dịch natri hydro cacbonat bão hòa (25 mL), làm khô qua MgSO_4 , lọc và cô đặc trong chân không. Phần cặn thô được tinh chế bằng phương pháp sắc ký cột nhanh để tạo ra I-12.1 (chất rửa giải: ete dầu mỏ / etyl axetat).

Hiệu suất 74%, m/z 265 $[\text{M}+\text{H}]^+$, thời gian lưu 0,90 phút, phương pháp LC-MS Z012_S04.

Bước 2: Tổng hợp hợp chất trung gian I-12.2

Hợp chất I-12.1 (1,0 g, 3,78 mmol) và tert-butyl 4-oxopiperidin-1-carboxylat (753 mg, 3,78 mmol) được hòa tan trong THF khan (10 mL) và hỗn hợp phản ứng được làm mát đến -65°C . Phức isopropylmagie clorua-lithi clorua (1,3 mol/L trong THF, 3,78 mL, 4,92 mmol) được bổ sung vào từng giọt và hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 10 phút nữa ở nhiệt độ này. Sau đó, hỗn hợp phản ứng được để cho trở về nhiệt độ trong phòng, khuấy trong 20 phút và metanol (0,8 mL, 19,7 mmol) được bổ sung vào. Hỗn hợp phản ứng được làm mát đến 0°C và dung dịch nước axit sulphuric 50% (2,0 mL) được bổ sung vào từng giọt. Hỗn hợp phản ứng được làm ấm đến nhiệt độ trong phòng và khuấy qua đêm. Chất kết tủa màu trắng được lọc ra, rửa bằng THF và làm khô trong chân không để tạo ra hợp chất I-12.2 thô (muối sulfat) dưới dạng chất rắn màu trắng. Sản phẩm thô được sử dụng ở bước tiếp theo không cần tinh chế thêm.

Hiệu suất 94%, m/z 239 $[\text{M}+\text{H}]^+$, thời gian lưu 0,69 phút, phương pháp LC-MS Z011_S03.

Bước 3: Tổng hợp hợp chất R18

a) Điều chế bazơ tự do:

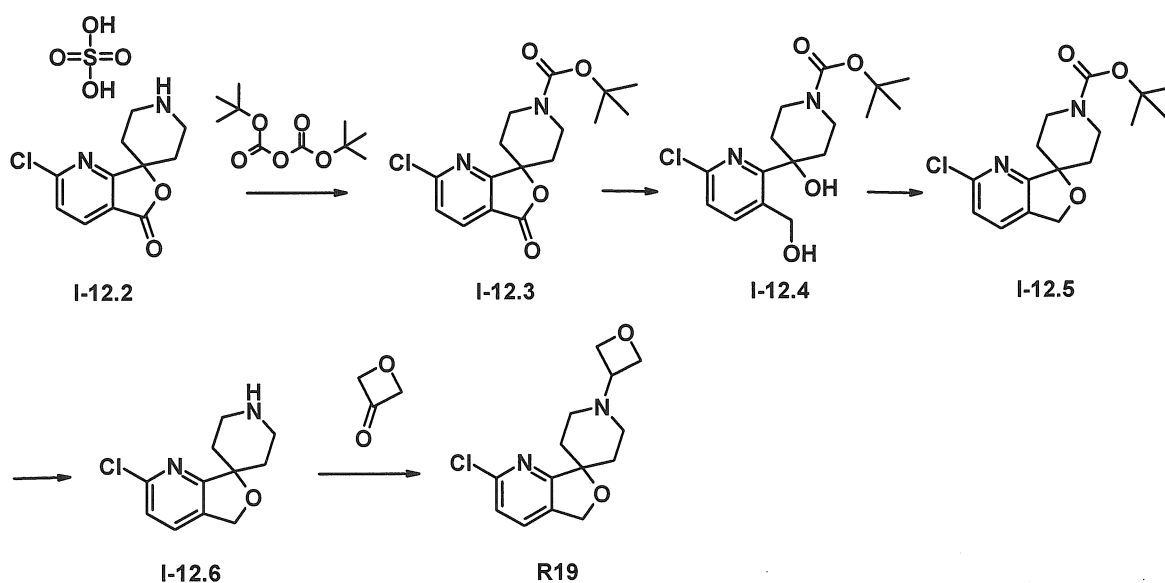
Hợp chất I-12.2 (150 mg, 0,45 mmol) được hòa tan trong hỗn hợp metanol (2 mL) / nước (2 mL), tetraalkylamoni cacbonat gắn kết polyme (Aldrich, 540293) được bổ sung vào và hỗn hợp này được khuấy trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng.

Tetraalkylamoni cacbonat gắn kết polyme được lọc lọc ra, metanol và nước được loại bỏ trong chân không để tạo ra bazơ tự do của hợp chất I-12.2.

b) Phần cặn thu được được hòa tan lại trong hỗn hợp THF (2 mL) / nước (0,1 mL), 3-oxetanon (0,04 mL, 0,67 mmol) và axit axetic (0,038 mL, 0,67 mmol) được bổ sung vào và hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Natri triaxetoxymethydrat được bổ sung vào và hỗn hợp phản ứng được khuấy qua đêm ở nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp phản ứng được pha loãng bằng dung dịch natri hydro cacbonat bão hòa và chiết bằng etyl axetat. Lớp hữu cơ được rửa bằng nước muối, làm khô qua MgSO_4 và cô đặc trong chân không. Phần cặn thô được tinh chế bằng phương pháp sắc ký cột nhanh để tạo ra R18 (chất rửa giải: DCM / MeOH).

Hiệu suất 18%, m/z 295 $[\text{M}+\text{H}]^+$, thời gian lưu 0,74 phút, phương pháp LC-MS Z011_S03.

Tổng hợp 2-clo-1'-(oxetan-3-yl)spiro[5H-furo[3,4-b]pyridin-7,4'-piperidin] (R19)



Bước 1: Tổng hợp hợp chất trung gian I-12.3

Bổ sung TEA (4,04 mL, 28,95 mmol) vào hợp chất I-12.2 (3,25 g, 9,65 mmol) trong diclometan (50 mL), hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 20 phút ở nhiệt độ trong phòng, và di-tert-butyl dicacbonat (2,11 g, 9,65 mmol) được bổ sung vào. Hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 90 phút ở nhiệt độ trong phòng, pha loãng bằng dung dịch natri hydro cacbonat bão hòa và chiết bằng etyl axetat vài lần. Lớp hữu cơ được rửa bằng nước muối, làm khô qua MgSO_4 , cô đặc trong chân không và phần cặn thu được được

ting chế bằng phương pháp sắc ký cột nhanh (ete dầu mỏ: EtOAc = 95:5 đến 60:40) để tạo ra hợp chất I-12.3.

Hiệu suất 49%, m/z 239 $[M-Boc+H]^+$, thời gian lưu 1,03 phút, phương pháp LC-MS Z011_S03.

Bước 2: Tổng hợp hợp chất trung gian I-12.4

Bổ sung natri bohdyrua (2,23 g, 59,03 mmol) và canxi clorua (6,55 g, 59,03 mmol) thành hai phần vào hợp chất I-12.3 (10,0 g, 29,52 mmol) trong etanol (500 mL) và hỗn hợp phản ứng được khuấy qua đêm ở nhiệt độ trong phòng. HPLC-MS cho thấy mức độ chuyển hóa 85% thành sản phẩm mong muốn. Thêm một lượng natri bohdyrua (350 mg, 9,25 mmol) được bổ sung vào và hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 6 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp phản ứng được ngừng phản ứng bằng dung dịch natri hydro cacbonat bão hòa, etanol được loại bỏ trong chân không và phần cặn thu được được nghiền tinh chế bằng etyl axetat. Chất kết tủa tạo thành được lọc ra và nước cái được chiết bằng etyl axetat vài lần. Lốp hữu cơ kết hợp được rửa bằng nước muối, làm khô qua $MgSO_4$, lọc và cô đặc trong chân không. Phần cặn thu được được nghiền tinh chế bằng axetonitril, chất kết tủa tạo thành được lọc ra, nước cái được cô đặc trong chân không và quy trình này được lặp lại hai lần nữa. Các chất kết tủa được kết hợp và làm khô trong chân không để tạo ra hợp chất I-12.4.

Hiệu suất 54%, m/z 243 $[M+H-Boc]^+$, nhiệt độ trong phòng 0,97 phút, phương pháp LC-MS Z011_S03.

Bước 3: Tổng hợp hợp chất trung gian I-12.5

Bổ sung TEA (14,84 mL, 106,64 mmol) và metansulfonyl clorua (5,50 mL, 71,09 mmol) ở 0°C vào hợp chất I-12.4 (6,77 g, 17,77 mmol) trong THF khan (75 mL). Hỗn hợp phản ứng được để cho trở về nhiệt độ trong phòng và khuấy trong 1 giờ. Hỗn hợp phản ứng được pha loãng bằng dung dịch natri hydro cacbonat bão hòa và chiết bằng diclometan vài lần. Lốp hữu cơ được rửa bằng nước muối, làm khô qua $MgSO_4$, cô đặc trong chân không và phần cặn thu được được tinh chế bằng phương pháp sắc ký cột nhanh (ete dầu mỏ: EtOAc = 95:5 đến 72:28) để tạo ra hợp chất I-12.5.

Hiệu suất 65%, m/z 225 $[M+H-Boc]^+$, thời gian lưu 1,07 phút, phương pháp LC-MS Z011_S03.

Bước 4: Tổng hợp hợp chất trung gian I-12.6

Bổ sung axit trifloaxetic (5 mL) vào hợp chất I-12.5 (4,13 g, 12,07 mmol) trong diclometan (15 mL) và hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 3 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp phản ứng được cô đặc trong chân không, phần cặn thu được được hòa tan lại trong metanol (50 mL), tetraalkylamoni cacbonat liên kết polyme (Aldrich, 540293) được bổ sung vào và hỗn hợp này được khuấy trong 30 phút ở nhiệt độ trong phòng. Tetraalkylamoni cacbonat liên kết polyme được lọc ra và metanol được loại bỏ trong chân không để tạo ra hợp chất I-12.6.

Hiệu suất 99%, m/z 225 $[M+H]^+$, thời gian lưu 0,74 phút, phương pháp LC-MS Z011_S03.

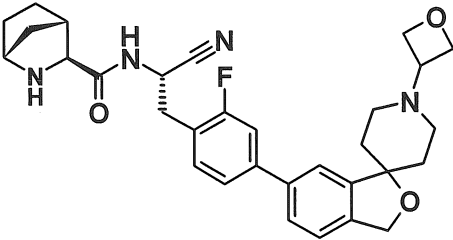
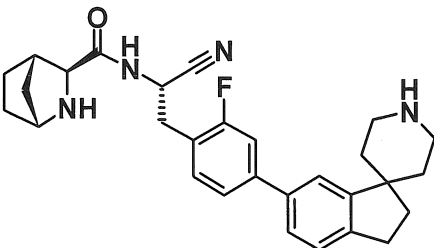
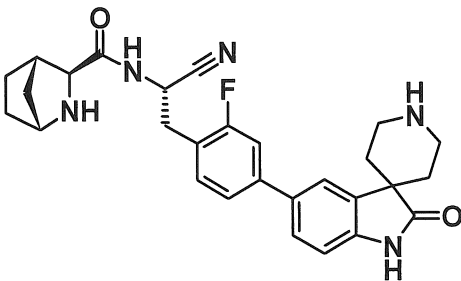
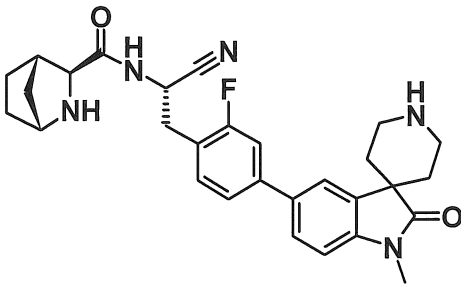
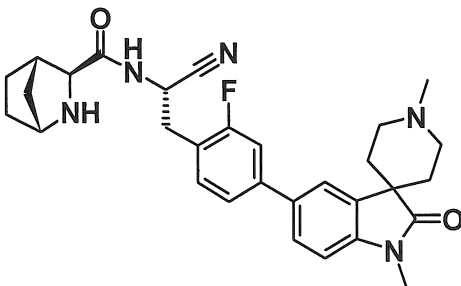
Bước 5: Tổng hợp hợp chất R19

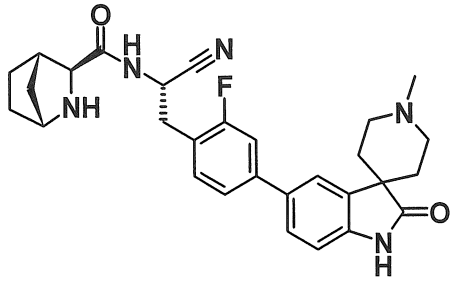
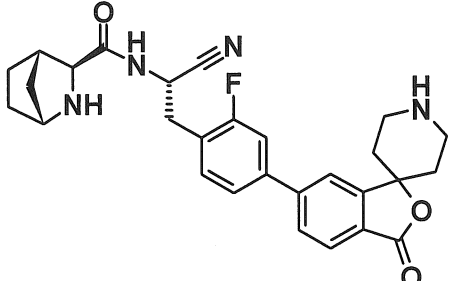
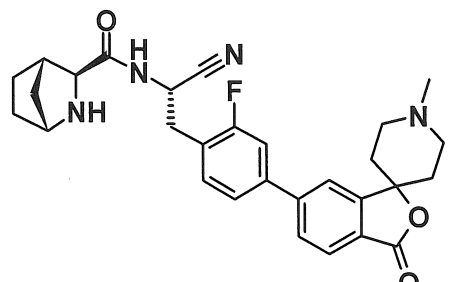
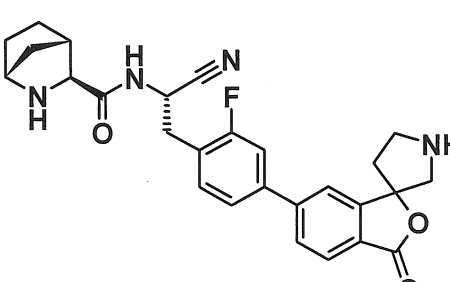
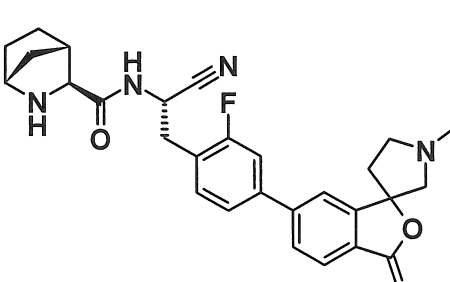
Hợp chất I-12.6 (3,62 g, 12,08 mmol) được hòa tan trong tetrahydrofuran khan (40 mL), 3-oxetanon (1,16 mL, 18,13 mmol) và axit axetic (691 μ L, 12,08 mmol) được bổ sung vào và hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 20 phút ở nhiệt độ trong phòng. Natri triaxetoxymethydrate (6,74 g, 30,21 mmol) được bổ sung vào và hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 25 phút ở nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp phản ứng được ngừng phản ứng bằng metanol, pha loãng bằng dung dịch natri hydro cacbonat bão hòa và chiết bằng etyl axetat vài lần. Lớp hữu cơ được rửa bằng nước muối, làm khô qua $MgSO_4$ và cô đặc trong chân không. Phần cặn thu được được nghiền tinh chế bằng hỗn hợp axetonitril / metanol (9:1), chất kết tủa tạo thành được lọc ra, nước cái được cô đặc trong chân không và quy trình này được lặp lại hai lần nữa. Các chất kết tủa được kết hợp và làm khô trong chân không để tạo ra 2,47 g hợp chất R19. Nước cái được cô đặc trong chân không, phần cặn thu được được hòa tan lại trong axetonitril và tinh chế bằng phương pháp HPLC đảo pha để tạo ra thêm một lượng (0,32 g) hợp chất R19.

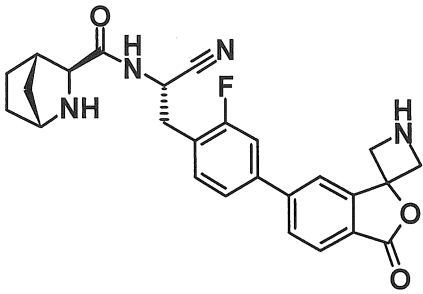
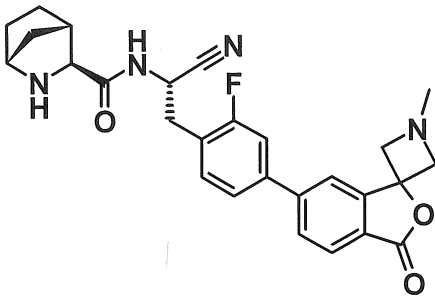
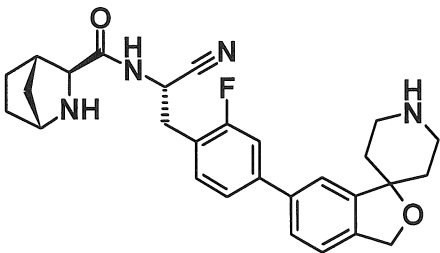
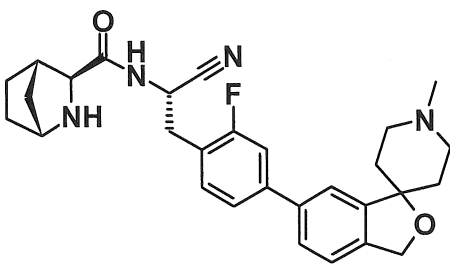
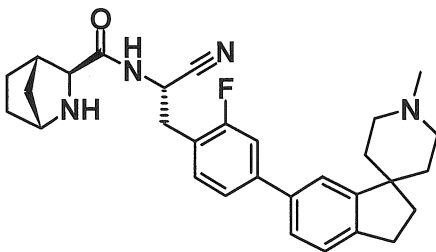
Hiệu suất 78%, m/z 281 $[M+H]^+$, thời gian lưu 0,78 phút, phương pháp LC-MS Z011_S03.

(rt = thời gian lưu). Các phương pháp loại bảo vệ: TSA (axit toluen sulfonic xem ví dụ 1). Hóa học lập thể ở nguyên tử cacbon liên kề với nhóm nitril được gán là: liên kết lập thể nghĩa là chất đồng phân S.

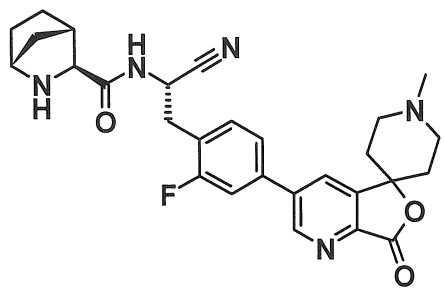
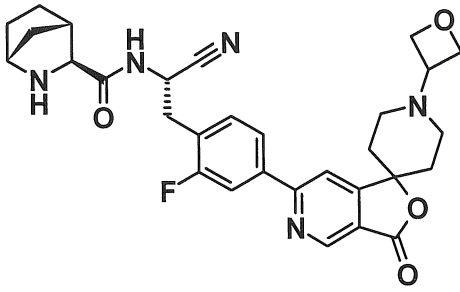
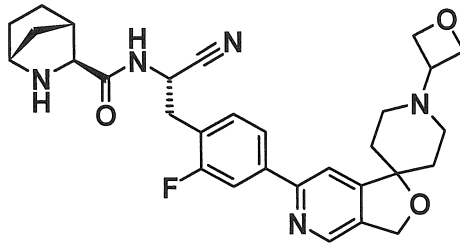
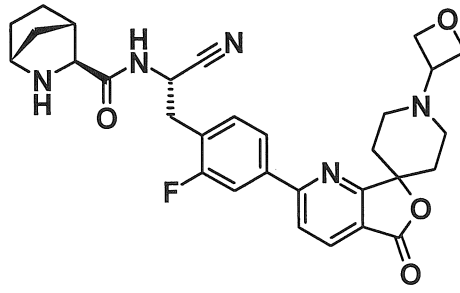
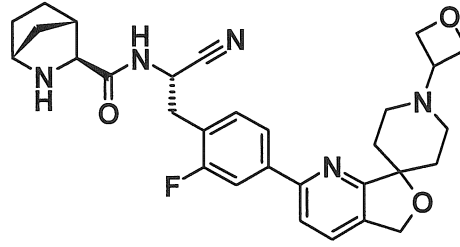
Bảng 6

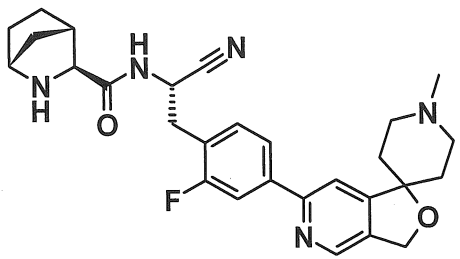
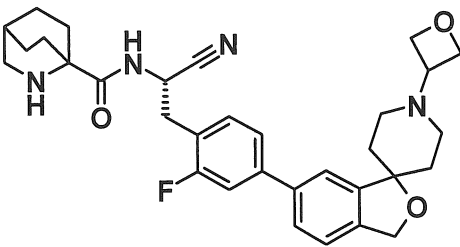
#	Công thức cấu trúc	Chất chiết	Tổng hợp / loại bảo vệ phương pháp HPLC	Hiệu suất [%]
1		I-1.5	A/TSA	84
2		I-1.5.1	A/TSA	>95
3		I-1.5.2	A/TSA	35
4		I-1.5.3	A/TSA	48
5		I-1.5.4	A/TSA	48

6		I-1.5.5	A/TSA	7
7		I-1.5.6	A/TSA	43
8		I-1.5.7	A/TSA	41
9		I-1.5.8	A/TSA	90
10		I-1.5.9	A/TSA	16

11		I-1.5.10	A/TSA	20
12		I-1.5.11	A/TSA	54
13		I-1.5.12	A/TSA	9
14		I-1.5.13	A/TSA	43
15		I-1.5.14	A/TSA	49

16		I-1.5.15	A/TSA	58
17		I-1.5.16	A/TSA	46
18		I-1.5.17	A/TSA	35
19		I-1.5.18	A/TSA	73
20		I-1.5.19	A/TSA	47

21		I-1.5.20	A/TSA	36
22		I-1.5.21	A/TSA	35
23		I-1.5.22	A/TSA	83
24		I-1.5.23	A/TSA	>95
25		I-1.5.24	A/TSA	88

26		I-2.5	B/TSA	28
27		I-3.5	C/TSA	61

Dữ liệu phân tích của các ví dụ

Bảng 7

Ví dụ	m/z [M+H] +	Thời gian lưu [phút]	Phương pháp LC-MS
1	531	1,00	Z011_S03
2	473	1,19	Z011_S03
3	488	0,89	Z012_S04
4	502	0,73	Z012_S04
5	516	0,74	Z012_S04
6	502	0,70	Z012_S04
7	489	0,72	Z012_S04
8	503	0,72	Z012_S04
9	475	0,91	Z011_S03
10	489	0,96	Z011_S03
11	461	0,91	Z011_S03
12	475	0,97	Z011_S03
13	475	0,76	Z012_S04
14	489	1,05	Z011_S03

Ví dụ	m/z [M+H] +	Thời gian lưu [phút]	Phương pháp LC-MS
15	487	1,17	Z011_S03
16	474	0,89	Z011_S03
17	516	0,60	Z020_S01
18	490	0,90	Z011_S03
19	504	0,95	Z011_S03
20	490	0,92	Z011_S03
21	504	0,92	Z011_S03
22	546	0,94	Z011_S03
23	532	0,96	Z011_S03
24	546	0,93	Z011_S03
25	532	0,97	Z011_S03
26	490	0,96	Z011_S03
27	545	1,02	Z011_S03

Bảng 8: Danh mục các chữ viết tắt

ACN	axetonitril
aq.	trong nước
BOC, boc	tert-butyloxycacbonyl
d	ngày
DBU	1,8-diazabixyclo[5.4.0]undec-7-en
DCM	diclometan
DEA	dietylamin
DIPEA	N,N-diisopropyletylamin
DIPE	diisopropyl ete
DMAP	4-dimetylaminopyridin
DMF	N,N-dimetylformamit
DMSO	dimetyl sulfoxit
EA, EtOAc	etyl axetat
FA	axit formic
h	giờ
HATU	o-(7-azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetrametyluroni hexafluoro-phosphat
LiOH	Lithi hydroxit
MeOH	metanol
MeTHF	metyl tetrahydrofuran
min	phút
NaH	natri hydrua
PE	ete dầu mỏ
PPA	anhydrit vòng của axit 1-propanphosphonic
RT, r.t.	nhiệt độ trong phòng, ví dụ 15 - 25 °C
rt	thời gian lưu
TBME	tert-butyl metyl ete
TBTU	o-(1H-benzo-1,2,3-triazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetrametyluroni tetrafluoroborat
TEA	trietylamin
TFA	axit trifloaxetic
THF	tetrahydrofuran
TSA	axit p-toluensulfonic monohydrat

Dữ liệu dược lý

Các dấu hiệu và lợi thế khác của sáng chế sẽ trở nên rõ ràng từ các ví dụ cụ thể sau đây, các ví dụ này nhằm để minh họa cho các nguyên lý của sáng chế.

Ức chế DPPI người (Cathepsin C)

Nguyên liệu: Các đĩa vi chuẩn độ (Optiplate-384 F) mua được từ hãng PerkinElmer (Prod.No. 10 6007270). Cơ chất Gly-Arg-AMC mua được từ Biotrend (Prod.-No.808756 Custom peptide).

Albumin huyết thanh bò (BSA; Prod.No. A3059) và Dithiothreitol (DTT; Prod.No D0632) mua được từ hãng Sigma. Dung dịch đệm TagZyme mua được từ hãng Riedel-de-Haen (Prod.-No. 04269), NaCl mua được từ hãng Merck (Prod.-No. 1.06404.1000) và axit morpholinoetan sulfonic (MES) mua được từ hãng Serva (Prod.-No. 29834). Chất ức chế DPP1 Gly-Phe-DMK mua được từ hãng MP Biomedicals (Prod.-No.03DK00625). DPPI người tái tổ hợp mua được từ hãng Prozymex. Tất cả các nguyên liệu khác đều có bán trên thị trường thuộc loại tốt nhất.

Các dung dịch đệm sau được sử dụng: Dung dịch đệm MES: 25 mM MES, 50 mM NaCl, 5 mM DTT, được điều chỉnh đến độ pH = 6,0, chứa 0,1% BSA; dung dịch đệm TAGZyme: 20 mM NaH₂PO₄, 150 mM NaCl được điều chỉnh đến độ pH 20 = 6,0 bằng HCl

Các điều kiện thử nghiệm: DPPI người tái tổ hợp được pha loãng trong dung dịch đệm TAGZyme đến 1 U/ml (tương ứng với 38,1µg/ml), và sau đó hoạt hóa bằng cách trộn theo tỷ lệ 1:2 với dung dịch nước Cysteamine (2mM) và ủ trong 5 phút ở nhiệt độ trong phòng.

Năm µL hợp chất thử nghiệm (nồng độ cuối 0,1 nM đến 100 µM) trong dung dịch aqua bidest 5 (chứa 4% DMSO, nồng độ DMSO cuối 1%) được trộn với 10 µL DPPI trong dung dịch đệm MES (nồng độ cuối 0,0125 ng/µL) và ủ trong 10 phút. Sau đó, 5 µL cơ chất trong dung dịch đệm MES (nồng độ cuối 50 µM) được bổ sung vào. Sau đó, các đĩa vi chuẩn độ được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút. Sau đó, phản ứng được ngừng bằng cách bổ sung 10 µL Gly-Phe-DMK trong dung dịch đệm 10 MES (nồng độ cuối 1 µM). Cường độ huỳnh quang của các giếng được xác định bằng cách sử dụng thiết bị Molecular Devices SpectraMax M5 Fluorescence Reader (Ex 360 nm, Em 460 nm) hoặc thiết bị Envision Fluorescence Reader (Ex 355 nm, Em 460 nm).

Mỗi đĩa vi chuẩn độ thử nghiệm chứa các giếng với đối chứng chất dẫn (1% DMSO trong dung dịch bidest + 0,075% 15 BSA) làm tham chiếu cho hoạt tính enzym không bị ức chế (100% Ctl; các giá trị cao) và các giếng với chất ức chế (Gly-Phe-DMK, trong dung dịch bidest + 1% DMSO + 0,075%BSA, nồng độ cuối 1 μ M) làm đối chứng cho cường độ huỳnh quang nền (0% Ctl; các giá trị thấp).

Việc phân tích dữ liệu được thực hiện bằng cách tính toán tỷ lệ % huỳnh quang với sự có mặt của hợp chất thử nghiệm so với huỳnh quang của đối chứng chất dẫn sau khi trừ đi cường độ huỳnh quang nền bằng công thức sau:

$$(\text{RFU}(\text{mẫu}) - \text{RFU}(\text{nền})) * 100 / (\text{RFU}(\text{đối chứng}) - \text{RFU}(\text{nền}))$$

Dữ liệu từ các phép tính toán này được sử dụng để đưa ra các giá trị IC₅₀ cho ức chế DPPI tương ứng.

Bảng 9

Ví dụ	Ức chế DPPI IC ₅₀ [μ M]
1	0,0011
2	0,0006
3	0,0003
4	0,0004
5	0,0006
6	0,0002
7	0,0005
8	0,0007
9	0,0005
10	0,0006
11	0,0007
12	0,0005
13	0,0006
14	0,0010
15	0,0005
16	0,0005
17	0,0016

18	0,0016
19	0,0010
20	0,0016
21	0,0014
22	0,0048
23	0,0050
24	0,0027
25	0,0018
26	0,0020
27	0,0029

Xác định hoạt tính elastaza bạch cầu trung tính trong chế phẩm chứa sản phẩm phân giải bào tương U937 sau khi ủ với hợp chất thử nghiệm

Nguyên liệu:

Đĩa Optiplat 384F mua được từ hãng PerkinElmer (Prod. No. #6007270). Các đĩa nuôi cấy tế bào Nunclon 24 giếng (No. 142475) và 96 giếng (No. 267245) mua được từ hãng Nunc. Dimethylsulfoxit (DMSO) mua được từ hãng Sigma (Prod.No. D8418). Nonidet-P40 (NP40) mua được từ hãng USBiological (Prod.No. N3500)

Cơ chất, đặc hiệu với elastaza bạch cầu trung tính, mua được từ hãng Bachem (MeOSuc-Ala-Ala-Pro-Val-AMC; Prod.No. I-1270).

Elastaza của bạch cầu trung tính người mua được từ hãng Calbiochem (Prod.No. 324681)

Đệm:

Dung dịch đệm Tris (100mM Tris; 1M NaCl; pH 7,5)

Dung dịch đệm Tris + HSA 0,1%; Albumin huyết thanh người mua được từ hãng Calbiochem (Cat#. 126658)

Dung dịch đệm serin-proteaza (20mM Tris; 100mM NaCl; pH 7.5) + 0,1%HSA

Dung dịch đệm phân giải serin proteaza: 20mM Tris-HCl; 100mM NaCl pH 7,5; + 0,2% Nonidet-P40;

PBS: nước muối đệm phosphat, không chứa Ca và Mg, mua được từ hãng Gibco

Giống nuôi cấy tế bào:

U937 mua được từ hãng ECACC (Cat.No. 85011440) được nuôi cấy trong huyền phù ở 37°C và 5% CO₂.

Mật độ tế bào: 0,2-1 triệu Tế bào/ml.

Môi trường: RPMI1640 GlutaMAX (No. 61870) với 10% FCS mua được từ hãng Gibco

Gieo và xử lý tế bào:

Các hợp chất trong 100% DMSO được pha loãng trong môi trường (-FCS) với 10% DMSO và pha loãng tiếp theo kế hoạch thử nghiệm.

20 µl dung dịch hợp chất được chuyển vào các giếng tương ứng trong đĩa 24 giếng và pha loãng bằng 2ml huyền phù tế bào/giếng chứa 1×10^5 tế bào/ml (nồng độ DMSO cuối = 0,1%). Hệ số pha loãng hợp chất = 100

Các hợp chất (lên tới 7 nồng độ) được thử nghiệm theo bộ ba bằng 3 giếng đối với đối chứng DMSO 0,1%, ủ trong 48 giờ mà không thay đổi môi trường ở 37°C, 5% CO₂ và độ ẩm tương đối 95%.

Thu tế bào và sản phẩm phân giải tế bào:

Chuyển huyền phù tế bào vào hộp thử nghiệm 96 giếng 2 ml. Tách các tế bào khỏi môi trường bằng cách ly tâm (500 X g; 10 phút; nhiệt độ trong phòng); bỏ dịch nổi. Tạo huyền phù tế bào lại trong 1ml PBS; ly tâm (500 X g; 10 phút; nhiệt độ trong phòng); rửa tế bào hai lần bằng PBS. Bổ sung 80 µl dung dịch đệm phân giải serin proteaza (lạnh băng) vào phần tế bào kết viên; tạo huyền phù lại phần kết viên này và bảo quản trên nước đá trong 10 phút. Loại bỏ mảnh vụn bằng cách ly tâm 1000 X g trong 10 phút ở 4°C. Chuyển 80-100 µl dịch nổi chứa sản phẩm phân giải vào đĩa 96 giếng và bảo quản ngay ở -80°C.

Thử nghiệm hoạt tính elastaza bạch cầu trung tính:

Sản phẩm phân giải lạnh đông được làm tan băng ở 37°C trong 10 phút và bảo quản trên nước đá. Hàm lượng protein được xác định bằng thử nghiệm protein Bradford. Sản phẩm phân giải được pha loãng đến 0,2-0,5 mg/ml protein trong dung dịch đệm serin proteaza + HSA.

Chuẩn: NE (dung dịch gốc 100 µg/ml trong đệm Tris; được bảo quản ở -80°C) được pha loãng trong dung dịch đệm Tris + HSA đến nồng độ 750 ng/ml, và tiếp tục pha loãng hàng loạt theo tỷ lệ 1:2 để tạo đường cong chuẩn.

Dung dịch đệm, mẫu trắng, mẫu chuẩn và mẫu sản phẩm phân giải được chuyển vào đĩa 384 giếng

Kế hoạch chuyển bằng pipet

Mẫu trắng: 5Ml dung dịch đệm Tris + 10 μ l dung dịch đệm serin proteaza + 5 μ l cơ chất

Chuẩn: 5 μ l dung dịch đệm Tris + 10 μ l NE (nồng độ khác nhau) + 5 μ l cơ chất

Sản phẩm phân giải: 5 μ l dung dịch đệm Tris + 10 μ l sản phẩm phân giải + 5 μ l cơ chất

Độ tăng cường độ huỳnh quang (Ex360nm/Em 460nm) được xác định sau 30 phút bằng thiết bị Molecular Device Spectramax M5 Fluorescence Reader. Kết quả được nội suy thành ng/mg protein sản phẩm phân giải bằng các hàm công thức excel. Tỷ lệ phần trăm ức chế trong các mẫu sản phẩm phân giải được điều trị bằng hợp chất được tính toán so với mẫu đối chứng được điều trị bằng DMSO ($100 - (\text{mẫu hợp chất} \times 100) / \text{mẫu đối chứng}$)

Hợp chất thử nghiệm sẽ cho các giá trị ức chế elastaza bạch cầu trung tính từ 0% đến 100%. IC50 được tính toán bằng phần mềm Graphpad Prism; khớp không tuyến tính ($\log(\text{chất ức chế})$ so với đáp ứng -- độ dốc thay đổi). Giá trị IC50 được nội suy dưới dạng nồng độ hợp chất thử nghiệm mà dẫn đến sự giảm hoạt tính elastaza bạch cầu trung tính 50% (so với đối chứng được điều trị bằng DMSO).

Bảng 10

Ví dụ	Giảm hoạt tính NE trong tế bào U937 IC50 [μ M]
1	0,0010
2	0,0068
3	0,5030
4	0,0910
5	0,0023
6	0,0222
7	0,0349
8	0,0008
9	0,0215

Ví dụ	Giảm hoạt tính NE trong tế bào U937 IC ₅₀ [μ M]
10	0,0014
11	0,0107
12	0,0012
13	0,0167
14	0,0011
15	0,0002
16	0,0738
17	0,0006
18	0,2202
19	0,0050
20	0,0232
21	0,0637
22	0,0157
23	0,0075
24	0,0060
25	0,0016
26	0,0046
27	0,0007

Ức chế Cathepsin K người

Nguyên liệu:

Các đĩa vi chuẩn độ (Optiplat-384 F mua được từ hãng PerkinElmer (Prod.No. 6007270). Cơ chất Z-Gly-Pro-Arg-AMC mua được từ hãng Biomol (Prod.-No. P-142). L-xystein (Prod.No. 168149) mua được từ hãng Sigma. Natri axtetat mua được từ hãng Merck (Prod.-No. 6268.0250), EDTA mua được từ hãng Fluka (Prod.-No. 03680). Chất ức chế E-64 mua được từ hãng Sigma (Prod.-No. E3132). Proenzym Cathepsin K người tái tổ hợp mua được từ hãng Biomol (Prod.No. SE-367). Tất cả các nguyên liệu khác đều có bán trên thị trường thuộc loại tốt nhất.

Các dung dịch đệm sau được sử dụng: Dung dịch đệm hoạt hóa: 32,5 mM natri axetat, được điều chỉnh đến độ pH = 3,5 bằng HCl; dung dịch đệm thử nghiệm: 150 mM natri axetat, 4 mM EDTA, 20 mM L-xystein, được điều chỉnh đến độ pH = 5,5 bằng HCl,

Các điều kiện thử nghiệm:

Để hoạt hóa proenzym, 5 μ l procathepsin K được trộn với 1 μ l dung dịch đệm hoạt hóa, và ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút.

5 μ L hợp chất thử nghiệm (nồng độ cuối 0,1 nM đến 100 μ M) trong dung dịch aqua bidest (chứa 4% DMSO, nồng độ DMSO cuối 1%) được trộn với 10 μ L Cathepsin K trong dung dịch đệm thử nghiệm (nồng độ cuối 2 ng/ μ L) và ủ trong 10 phút. Sau đó, 5 μ L cơ chất trong dung dịch đệm thử nghiệm (nồng độ cuối 12,5 μ M) được bổ sung vào. Sau đó, các đĩa được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 60 phút. Sau đó, phản ứng được ngừng bằng cách bổ sung 10 μ L E64 trong dung dịch đệm thử nghiệm (nồng độ cuối 1 μ M). Cường độ huỳnh quang của các giếng được xác định bằng cách sử dụng thiết bị Molecular Devices SpectraMax M5 Fluorescence Reader (Ex 360 nm, Em 460 nm).

Mỗi đĩa vi chuẩn độ thử nghiệm chứa các giếng với đối chứng chất dẫn (1% DMSO trong dung dịch bidest) làm tham chiếu cho hoạt tính enzym-không bị ức chế (100% Ctl; các giá trị cao) và các giếng với chất ức chế (E64 trong dung dịch bidest + 1% DMSO, nồng độ cuối 1 μ M) làm đối chứng cho cường độ huỳnh quang nền (0% Ctl; các giá trị thấp). Việc phân tích dữ liệu được thực hiện bằng cách tính toán tỷ lệ % huỳnh quang với sự có mặt của hợp chất thử nghiệm so với huỳnh quang của đối chứng chất dẫn sau khi trừ đi huỳnh quang nền:

$$(\text{RFU}(\text{mẫu}) - \text{RFU}(\text{nền})) * 100 / (\text{RFU}(\text{đối chứng}) - \text{RFU}(\text{nền}))$$

Dữ liệu từ các phép tính toán này được sử dụng để đưa ra các giá trị IC₅₀ cho ức chế Cathepsin K tương ứng.

Xác định độ ổn định chuyển hóa bằng các tiểu thể gan người

Sự thoái biến do chuyển hóa của hợp chất thử nghiệm được thử nghiệm ở nhiệt độ 37°C bằng các tiểu thể gan người tập hợp. Thể tích ủ sau cùng 100 μ l cho mỗi thời điểm chứa dung dịch đệm TRIS pH 7,6 (0,1M), magie clorua (5mM), protein tiểu thể (1mg/ml) và hợp chất thử nghiệm ở nồng độ cuối 1 μ M. Tiếp sau một giai đoạn ủ sơ bộ

ngắn ở nhiệt độ 37°C, phản ứng được khởi đầu bằng cách bổ sung beta-nicotinamit adenin dinucleotit phosphat ở dạng khử của nó (NADPH, 1mM) và được hoàn thành bằng việc chuyển một lượng phân ước vào trong axetonitril sau các thời điểm khác nhau. Ngoài ra, sự phân hủy không phụ thuộc NADPH được theo dõi trong các phần ủ không có NADPH, được hoàn thành tại thời điểm cuối cùng. [%] hợp chất thử nghiệm còn lại sau khi ủ độc lập NADPH được phản ánh bằng thông số c(đối chứng) (độ ổn định chuyển hóa). Các dung dịch ủ đã làm dừng được tạo viên bằng cách ly tâm (10'000g, 5 phút). Lượng phân ước của lớp nổi trên bề mặt được thử nghiệm bằng phương pháp LC-MS/MS về lượng hợp chất gốc.

Thời gian bán hủy ($t_{1/2}$ INVITRO) được xác định bằng độ dốc của đồ thị bán logarit của biên dạng nồng độ - thời gian. Độ thanh thải nội tại ($CL_{INTRINSIC}$) được tính toán bằng cách xem xét lượng protein trong phần ủ:

$CL_{INTRINSIC} [\mu\text{l}/\text{mphút}/\text{mg protein}] = (\ln 2 / (\text{thời gian bán hủy [phút]} * \text{hàm lượng protein [mg/ml]})) * 1'000.$

Giá trị thời gian bán hủy ($t_{1/2}$ INVITRO) của các hợp chất lựa chọn trong thử nghiệm về độ ổn định chuyển hóa mô tả ở trên được liệt kê trong bảng sau.

Bảng 11

Ví dụ	Độ ổn định in vitro khi ủ tiểu thể gan người $t_{1/2}$ [phút]
1	>130
2	>130
3	>130
4	>130
5	>130
6	110
7	>130
8	74
9	>130
10	>130
11	>130

Ví dụ	Độ ổn định in vitro khi ủ tiểu thể gan người t _{1/2} [phút]
12	46
13	>130
14	>130
15	>130
16	>130
17	60
18	>130
19	>130
20	>130
21	>130
22	>130
23	>130
24	>130
25	>130
26	55
27	120

Mô hình chuột nhắt tương tác với đích

Điều trị bằng hợp chất:

Để theo dõi tác dụng của các hợp chất thử nghiệm lên hoạt tính elastaza bạch cầu trung tính ở các bạch cầu trung tính máu ngoại vi, chuột nhắt Crl:NMRI cái được điều trị như sau:

Nhóm 1 (6 chuột): 0,5 mg/kg hợp chất thử nghiệm trong 0,5% Natrosol (pH 2-3)

Nhóm 2 (6 chuột): 0,5% Natrosol (độ pH = 2-3)

Nhóm 3 (2 chuột): 0,5% Natrosol (độ pH = 2-3)

Các hợp chất thử nghiệm hoặc dung dịch Natrosol được cho sử dụng từ thứ hai đến thứ 6 vào lúc 7:00 giờ sáng và 4:00 giờ chiều mỗi ngày trong tuần thứ nhất của thử

nghiệm và vào thứ hai và thứ ba (7:00 giờ sáng và 4:00 giờ chiều) trong tuần thứ hai. Các hợp chất thử nghiệm hoặc Natrosol được cho dùng qua đường miệng.

Kích thích bằng LPS và chuẩn bị dịch rửa phế quản phế nang:

Vào thứ tư trong tuần thứ hai, các động vật này được điều trị bằng hợp chất thử nghiệm hoặc dung dịch Natrosol như mô tả trên đây (7:00 giờ sáng) tiếp theo bằng cách xông kích thích LPS (lipopolysaccharit):

Nhóm 1 và nhóm 2: Xông LPS 20 phút (E.coli typ huyết thanh 055:B5; 1mg/ml trong PBS) bằng cách sử dụng máy khí dung liên tục MiniHeart Hi-Flo (Westmed)

Nhóm 3: Không kích thích bằng LPS

4 giờ sau khi kích thích bằng LPS dịch rửa phế quản phế nang bằng dung dịch muối Hank 2x1ml mỗi động vật được chuẩn bị từ tất cả các động vật và số tế bào trong dịch rửa này được xác định bằng thiết bị Sysmex XT-1800i. Các tế bào trong dịch rửa được tách bằng cách ly tâm và phân giải trong dung dịch đệm phân giải (100 mM TRIS độ pH = 7,5, 1 M NaCl, 0,2% NP40).

Đo elastaza của bạch cầu trung tính (Neutrophile elastase- NE):

Hoạt tính NE trong sản phẩm phân giải tế bào dịch rửa phế quản phế nang (bronchioalveolar lavage fluid - BALF) được xác định bằng cơ chất NE phát huỳnh quang MeOSuc-Ala-Ala-Pro-Val-AMC (Bachem): 10 µl sản phẩm phân giải tế bào được trộn với 5 µl dung dịch đệm thử nghiệm (20 mM Tris pH 7,5, 100 mM NaCl, 0,1% albumin huyết thanh người) và 5 µl cơ chất (1 mM trong dung dịch đệm thử nghiệm) trong đĩa 384 giếng (Optiplate 384f, PerkinElmer). Hỗn hợp phản ứng được ủ trong 60 phút ở nhiệt độ trong phòng và cường độ huỳnh quang được xác định (kích thích 360 nm, phát xạ 460 nm). Giá trị huỳnh quang thu được được chuẩn hóa thành số bạch cầu trung tính BALF đối với mỗi động vật. Để tính toán mức độ ức chế hoạt tính NE của các hợp chất thử nghiệm, giá trị huỳnh quang của nhóm 1 và nhóm 2 được đem trừ đi giá trị huỳnh quang trung bình của nhóm 3 và tỷ lệ % ức chế hoạt tính NE ở nhóm 1 so với giá trị huỳnh quang trung bình của nhóm 2 được tính toán.

Hoạt tính elastaza bạch cầu trung tính trong sản phẩm phân giải sau khi xử lý trước bằng các chất ức chế Cathepsin C (sử dụng hai lần một ngày trong 7 ngày) được liệt kê trong bảng sau:

Bảng 12

Ví dụ	Mức độ ức chế hoạt tính elastaza bạch cầu trung tính trong sản phẩm phân giải BALF sau khi điều trị trước bằng chất ức chế Cathepsin C (liều: 0,5 mg/kg hai lần một ngày trong 7 ngày)
1	96
25	94

Cấu trúc tinh thể của phức Cathepsin C phối tử

Phương pháp

Protein:

Cathepsin C người tái tổ hợp (Cat C) được tạo ra theo các quy trình sinh học phân tử chuẩn (Tài liệu: 1 - 3).

Kết tinh và ngâm:

Trước khi kết tinh, dung dịch đậm protein được trao đổi với 20 mM Bis-Tris pH 7,0, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 2 mM DTT bằng cột NAP10 (GE Healthcare). Mẫu protein được cô đặc thành 9-10 mg/mL. Các tinh thể được cho phát triển ở 20°C trong giọt treo bằng cách sử dụng 1,0 μ L protein và 1,0 μ L dung dịch well (0,1 M Bis-Tris-Propan pH 6,0-6,5, 18-20% (trọng lượng/thể tích) PEG 3350, 200 mM NaF, 1 mM DDT). Các tinh thể xuất hiện qua đêm và phát triển thành kích thước hoàn thiện trong 2-3 ngày. Các đồng cấu trúc phối tử thu được bằng cách ngâm các tinh thể apo trong dung dịch well có bổ sung 1 mM phối tử tương ứng (bằng cách pha loãng từ dung dịch gốc 100 mM trong DMSO) qua đêm. Sau đó, trước khi thu thập dữ liệu, các tinh thể được làm lạnh đông trong nitơ lỏng bằng 20% glyxerol và dung dịch well làm thành phân bảo vệ khi lạnh đông.

Thu thập dữ liệu, giải thích cấu trúc và tinh chỉnh:

Tất cả các dữ liệu nhiễu xạ được thu thập ở 100 K trên thiết bị phát anot quay (Rigaku) bằng cách sử dụng bức xạ CuK α và xử lý bằng XDS (Tài liệu: 4). Các đồng cấu trúc phối tử được làm sáng tỏ bằng phương pháp sai phân fourier và tinh chỉnh bằng chương trình autoBuster (Global Phasing Ltd.) lặp lại bằng cách tái lập thủ công bằng chương trình Coot (tài liệu: 5). Số liệu thống kê về bước xử lý dữ liệu cuối và tinh chỉnh được liệt kê trong Bảng 13. Chương trình PyMOL (DeLano Scientific LLC) được sử dụng để chuẩn bị hình ảnh.

Kết quả

Cấu trúc của phức Cathepsin C phối tử:

Cấu trúc của Cathepsin C người (Cat C) được mô tả trong tài liệu (tài liệu 2) dưới dạng tetrame chứa bốn tiểu đơn vị giống nhau. Mỗi tiểu đơn vị gồm ba chuỗi: các chuỗi nhẹ và nặng tạo ra vùng xúc tác, trong khi đó vùng gọi là vùng loại trừ phong bế vị trí hoạt động tách túi S2 làm hai và chịu trách nhiệm về hoạt tính exopeptidaza của Cat C. Cấu trúc của Cat C trong phức với hợp chất ví dụ 11 và 16 (Bảng 14, Fig. 1) được xác định để làm sáng tỏ phương thức liên kết của nhóm hợp chất này. Các hợp chất ví dụ 11 và 16 liên kết thông qua tương tác cộng hóa trị của nhóm nitril với Cys234. Hợp chất ví dụ 11 là chất đồng phân đối ảnh đơn với nguyên tử cacbon liên kết với nhóm nitril trong cấu hình (S) trong hi đó hợp chất ví dụ 16 (nguyên tử cacbon vòng xoắn có hóa học lập thể *RS*) là hỗn hợp các chất đồng phân không đối quang. Axit amin hai vòng tiến tới túi S1 của enzym tại đó nó được neo lại bằng các liên kết hydro với các nguyên tử khung của Gly277 và Asn380 cũng như với chuỗi bên của Asp1. Hệ bis-aryl được định hướng vào túi S2 tại đó nó tham gia vào tương tác van der Waals với các gốc Asp1 và Pro3 của vùng loại trừ. Bất ngờ là, các tác giả sáng chế đã quan sát được một tương tác bổ sung của amin vòng xoắn: spiro-azetidin theo ví dụ 11 và spiro-pyrrolidin theo ví dụ 16. Trong cả hai trường hợp nguyên tử nitơ bazơ tạo ra cầu muối với Glu275, điều này phù hợp với hoạt tính enzym cao của nhóm hợp chất này.

Tài liệu tham khảo:

(1) Søren W. Dahl, Torben Halkier, Conni Lauritzen, Iztok Dolenc, John Pedersen, Vito Turk and Boris Turk. (2001) Human Recombinant Pro-dipeptidyl peptidaza I (Cathepsin C) Can Be Activated by Cathepsins L and S but Not by Autocatalytic Processing. *Biochemistry* 40, 1671-1678.

(2) Dusan Turk, Vojko Janjic, Igor Stern, Marjetka Podobnik, Dorian Lamba, Søren Weis Dahl, Connie Lauritzen, John Pedersen, Vito Turk and Boris Turk (2001) Structure of human dipeptidyl peptidase I (cathepsin C): exclusion domain added to an endopeptidaza framework creates the machine for activation of granular serin proteazas. *The EMBO Journal* 20, 6570-6582 .

(3) Furber, M. et al. (2014) Cathepsin C Inhibitors: Property Optimization and Identification of a Clinical Candidate. *J. Med. Chem.*, 57,2357–2367.

(4) Kabsch, W. (2010) XDS. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 66, 125-132.

(5) Emsley, P. & Cowtan, K. (2004) Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 60, 2126-2132.

Bảng 13. Số liệu thống kê về thu thập dữ liệu và tinh chỉnh

Thu thập dữ liệu ¹

Tập dữ liệu	Hợp chất ví dụ 11	Hợp chất ví dụ 16
Bộ phát hiện	Saturn944	Mar345
Nhóm không gian	I222	I222
Kích thước ô mạng đơn vị		
a, b, c (Å)	86,0, 89,3, 114,6	86,5, 88,7, 114,5
Độ phân giải (Å)	1,7	1,5
Tỷ lệ hoàn thiện (%)	81,0 (9,1)	93,3 (43,5)
R _{sym} (%)	4,2 (31,6)	3,5 (28,0)
< I/σ(I) >	32,1 (2,9)	32,5 (4,7)

Tinh chỉnh ²

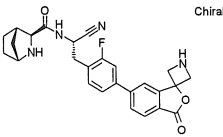
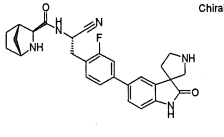
R-hệ số/R-tự do (%)	17,8/19,2	21,3/21,7
Độ dài liên kết Rmsd (Å)	0,008	0,008
Góc liên kết Rmsd (°)	0, 90	0,93

¹ Các giá trị trong dấu ngoặc đơn là cho lớp có độ phân giải cao nhất; R_{sym} =

$$\frac{\sum_{hkl} \sum_i |I_i - \langle I \rangle|}{\sum_{hkl} \sum_i I_i}$$

² R-hệ số = $\frac{\sum_{hkl} ||F_{obs}| - k|F_{calc}||}{\sum_{hkl} |F_{obs}|}$; R-tự do được tính bằng 5% dữ liệu loại trừ khỏi tinh chỉnh; Rmsd, độ lệch trung bình bình phương.

Bảng 14. Các hợp chất được kiểm tra trong tinh thể học tia X

Hợp chất	Hợp chất ví dụ 11	Hợp chất ví dụ 16
Công thức cấu trúc		
Chất đồng phân lập thể	chất đồng phân không đối quang đơn	hỗn hợp các chất đồng phân không đối quang
CatC IC ₅₀ (nM)	0,7	0,5

Dược phẩm

Các chế phẩm thích hợp để sử dụng các hợp chất có công thức I sẽ rõ ràng đối với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực này và bao gồm ví dụ viên nén, thuốc viên, viên nang, thuốc đạn, viên ngậm, viên ngậm dẹt, dung dịch, xi rô, cốm ngọt, túi chứa, dạng tiêm, dạng hít và bột, v.v., tốt hơn là viên nén.

Các viên nén thích hợp có thể thu được, ví dụ, bằng cách trộn một hoặc nhiều hợp chất có công thức I với tá dược đã biết, ví dụ chất pha loãng, chất mang, chất gây rã, chất phụ trợ, chất hoạt động bề mặt, chất kết dính và/hoặc chất làm trơn. Các viên nén cũng có thể gồm nhiều lớp.

Tổ hợp

Hợp chất có công thức chung I có thể được sử dụng riêng biệt hoặc kết hợp với các hoạt chất khác có công thức I theo sáng chế. Các hợp chất có công thức chung I tùy ý cũng có thể được kết hợp với các dược chất khác. Các dược chất này bao gồm, chất chủ vận β 2-adrenoceptor-(hoạt động ngắn và kéo dài-), chất chống-cholinergic (hoạt động ngắn và kéo dài-), các steroid chống viêm (các corticosteroid dùng đường miệng và khu trú), cromoglycat, metylxanthin, các chất giả glucocorticoid đã phân ly, các chất ức chế PDE3, các chất ức chế PDE4, các chất ức chế PDE7, chất đối kháng LTD4, các chất ức chế EGFR, chất chủ vận dopamin, chất đối kháng PAF, dẫn xuất Lipoxin A4, chất điều biến FPRL1, chất đối kháng thụ thể LTB4- (BLT1, BLT2), chất đối kháng thụ thể histamin H1, chất đối kháng thụ thể histamin H4, chất đối kháng thụ thể histamin kép H1/H3, chất ức chế PI3-kinaza, chất ức chế các tyrosin kinaza không thụ thể ví dụ LYN, LCK, SYK, ZAP-70, FYN, BTK hoặc ITK, chất ức chế MAP kinaza ví dụ p38, ERK1,

ERK2, JNK1, JNK2, JNK3 hoặc SAP, chất ức chế đường truyền tín hiệu NF- κ B ví dụ chất ức chế IKK2 kinaza, chất ức chế iNOS, chất ức chế MRP4, chất ức chế sinh tổng hợp leukotrien ví dụ chất ức chế 5-Lipoxygenaza (5-LO), chất ức chế cPLA2, chất ức chế leukotrien A4 hydrolaza hoặc chất ức chế FLAP, chất chống viêm không steroid (Non-steroidal anti-inflammatory agents - NSAIDs), chất đối kháng CRTH2, chất điều biến thụ thể DP1, chất đối kháng thụ thể Thromboxane, chất đối kháng CCR3, chất đối kháng CCR4, chất đối kháng CCR1, chất đối kháng CCR5, chất đối kháng CCR6, chất đối kháng CCR7, chất đối kháng CCR8, chất đối kháng CCR9, chất đối kháng CCR30, chất đối kháng CXCR3, chất đối kháng CXCR4, chất đối kháng CXCR2, chất đối kháng CXCR1, chất đối kháng CXCR5, chất đối kháng CXCR6, chất đối kháng CX3CR3, chất đối kháng Neurokinin (NK1, NK2), chất điều biến thụ thể Sphingosine 1-Phosphat, chất ức chế Sphingosine 1 phosphat lyaza, chất điều biến thụ thể adenosin ví dụ chất chủ vận A2a, chất điều biến thụ thể purinergic ví dụ chất ức chế P2X7, chất hoạt hóa histon deacetylaza (HDAC), chất đối kháng Bradykinin (BK1, BK2), chất ức chế TACE, chất điều biến PPAR gamma, chất ức chế Rho-kinaza, chất ức chế enzym chuyển hóa interleukin 1-beta (ICE), chất điều biến thụ thể Toll-Like (TLR), chất ức chế HMG-CoA reductaza, chất đối kháng VLA-4, chất ức chế ICAM-1, chất chủ vận SHIP, chất đối kháng thụ thể GABAa, chất ức chế ENaC, chất ức chế Prostatein, chất ức chế Matriptaza, chất điều biến thụ thể Melanocortin (MC1R, MC2R, MC3R, MC4R, MC5R), chất đối kháng CGRP, chất đối kháng Endothelin, chất đối kháng TNF α , kháng thể kháng TNF, kháng thể kháng-GM-CSF, kháng thể kháng-CD46, kháng thể kháng-IL-1, kháng thể kháng-IL-2, kháng thể kháng-IL-4, kháng thể kháng-IL-5, kháng thể kháng-IL-13, kháng thể kháng-IL-4/IL-13, kháng thể kháng-TSLP, kháng thể kháng-OX40, chất điều hòa sự sản sinh chất nhầy, chất điều trị miễn dịch, các hợp chất chống phù nề đường thở, các hợp chất chống ho, chất ức chế VEGF, chất ức chế NE, chất ức chế MMP9, chất ức chế MMP12, và cả tổ hợp của hai hoặc ba hoạt chất này.

Các betamimetic, anticholinergic, corticosteroid, chất ức chế PDE4, chất đối kháng LTD4, chất ức chế EGFR, chất ức chế CRTH2, chất ức chế 5-LO, chất đối kháng thụ thể histamin và chất ức chế SYK, chất ức chế NE, chất ức chế MMP9, chất ức chế MMP12, và cả tổ hợp gồm hai hoặc ba hoạt chất, tác là:

- Các betamimetic với corticosteroid, chất ức chế PDE4, chất ức chế CRTH2-hoặc chất đối kháng LTD4,

- Các anticholinergic với betamimetic, corticosteroid, chất ức chế PDE4, chất ức chế CRTH2-hoặc chất đối kháng LTD4,
- Các corticosteroid với chất ức chế PDE4, chất ức chế CRTH2-hoặc chất đối kháng LTD4-
- Chất ức chế PDE4-với chất ức chế CRTH2-hoặc chất đối kháng LTD4-
- Chất ức chế CRTH2-với chất đối kháng LTD4.

Chỉ định

Các hợp chất theo sáng chế và muối được dụng của chúng có hoạt tính là được phẩm, cụ thể làm chất ức chế hoạt tính dipeptidyl peptidaza I, và do đó có thể được sử dụng trong điều trị:

1. Đường hô hấp: các bệnh tắc nghẽn đường thở bao gồm: bệnh hen, bao gồm bệnh hen phế quản, hen do dị ứng, hen do nguyên nhân nội sinh, hen do nguyên nhân ngoại sinh, hen do luyện tập, hen do dùng thuốc (bao gồm hen do aspirin và NSAID) và hen do bụi, cả không liên tục và dai dẳng và ở mọi mức độ nghiêm trọng, và các nguyên nhân gây đáp ứng quá mức ở đường thở; bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính (chronic obstructive pulmonary disease - COPD); viêm phế quản, bao gồm viêm phế quản nhiễm trùng và viêm phế quản ưa eosin; khí thũng; thiếu hụt alpha1-antitrypsin, giãn phế quản; xơ nang; bệnh sarcoid; bệnh phổi người làm vườn và các bệnh liên quan; viêm phổi quá mẫn; xơ hóa phổi, bao gồm viêm xơ phế nang vô căn, viêm phổi kẽ vô căn, điều trị chống ung thư gây biến chứng xơ hóa và nhiễm trùng mạn tính, bao gồm nhiễm tuberculosis và aspergillosis và các tình trạng nhiễm nấm khác; các biến chứng khi ghép phổi; các rối loạn viêm mạch và huyết khối ở hệ mạch máu phổi, viêm đa mạch (u hạt Wegener) và tăng áp phổi; hoạt tính chống ho bao gồm điều trị chứng ho mạn tính có liên quan đến viêm và các tình trạng tiết dịch ở đường thở, và ho do khám bệnh hoặc điều trị; viêm mũi cấp và mạn tính bao gồm viêm mũi medicamentosa, và viêm mũi vụn mạch; viêm mũi dị ứng quanh năm và theo mùa bao gồm viêm mũi tâm thần (hay sốt); bệnh polyp mũi; tình trạng nhiễm virus cấp bao gồm cảm lạnh thông thường, và nhiễm virus hợp bào hô hấp, cúm, coronavirus (bao gồm SARS) và adenovirus;

2. da: bệnh vảy nến, viêm da dị ứng, viêm da tiếp xúc hoặc các chứng viêm da eczema khác, và các phản ứng quá mẫn loại chậm; viêm da do thực vật và viêm da do ánh sáng; viêm da do tăng tiết bã nhờn, viêm da dạng eczemat, bệnh lichen phẳng, bệnh

lichen xơ hoá và teo, viêm da mủ hoại thư, sarcoid da, lupus ban đỏ dạng đĩa, bệnh pemphigus, pemphigoid, hội chứng thượng bì bóng nước, chứng mày đay, chứng phù mạch, chứng viêm mạch nhỏ, hồng ban do nhiễm độc, chứng tăng bạch cầu ái toan da, rụng tóc thành đám, hói đầu ở đàn ông, hội chứng Sweet, hội chứng Weber-Christian, hồng ban đa dạng; viêm mô tế bào, cả do nhiễm trùng và không nhiễm trùng; viêm mô mỡ; u lympho da, ung thư da không phải u hắc tố và các thương tổn do loạn sản khác; các rối loạn do dùng thuốc bao gồm phát ban do thuốc cố định;

3. mắt: viêm bờ mi; viêm kết mạc, bao gồm viêm kết mạc dị ứng quanh năm và mùa đông; viêm móng mắt; viêm màng mạch nhỏ phía trước và phía sau; viêm màng mạch; các rối loạn tự miễn, thoái hóa hoặc viêm ảnh hưởng đến võng mạc; viêm mắt bao gồm viêm mắt giao cảm; bệnh sarcoid; nhiễm trùng bao gồm nhiễm virus, nhiễm nấm, và nhiễm khuẩn;

4. sinh dục - tiết niệu: viêm thận bao gồm viêm thận kẽ và viêm thận tiểu cầu; hội chứng thận hư; viêm bàng quang bao gồm viêm bàng quang cấp và mạn tính (kẽ) và loét Hunner; viêm niệu đạo cấp và mạn tính, viêm tuyến tiền liệt, viêm mào tinh hoàn, viêm buồng trứng và viêm vòi tử cung; viêm âm hộ-âm đạo; bệnh Peyronie; rối loạn chức năng cương (cả nam và nữ);

5. thải loại mảnh ghép đồng loại: sau khi bị bệnh cấp và mạn tính, ví dụ, ghép thận, tim, gan, phổi, tủy xương, da hoặc giác mạc hoặc sau truyền máu; hoặc bệnh ghép chống chủ mạn tính;

6. Các rối loạn tự miễn và dị ứng khác bao gồm viêm khớp dạng thấp, hội chứng ruột kích thích, lupus ban đỏ hệ thống, đa xơ cứng, viêm tuyến giáp Hashimoto, bệnh Graves, bệnh Addison, đái tháo đường, xuất huyết giảm tiểu cầu tự phát, viêm mạc ưa eosin, hội chứng tăng-IgE, hội chứng kháng phospholipit và hội chứng Sazary;

7. Khối u: điều trị các bệnh ung thư phổ biến bao gồm khối u tuyến tiền liệt, khối u vú, khối u phổi, khối u buồng trứng, khối u tuyến tụy, khối u ruột và kết tràng, khối u dạ dày, khối u da và khối u não và các khối u ác tính ảnh hưởng đến tủy xương (bao gồm bệnh bạch cầu) và hệ thống bạch huyết tăng sinh, như u lympho Hodgkin và u lympho không-Hodgkin; bao gồm ngăn ngừa và điều trị bệnh di căn và tái phát khối u, và các hội chứng cận tân sinh; và,

8. Các bệnh truyền nhiễm: bệnh virus như mụn cóc sinh dục, mụn cóc thông thường, mụn cóc bàn chân, viêm gan B, viêm gan C, virus herpes simplex, u mềm lây,

đậu mùa, virus suy giảm miễn dịch ở người (human immunodeficiency virus - HIV), virus papilloma người (HPV), virus cytomegalo (CMV), virus varicella zoster (VZV), virus rhino, virus adeno, virus corona, virus cúm, virus cận-cúm; các bệnh do vi khuẩn như lao và mycobacterium avium, bệnh phong; các bệnh truyền nhiễm khác, như các bệnh do nấm, chlamydia, Candida, aspergillus, cryptococcal meningitis, Pneumocystis carinii, cryptosporidiosis, histoplasmosis, toxoplasmosis, nhiễm trypanosome và leishmaniasis.

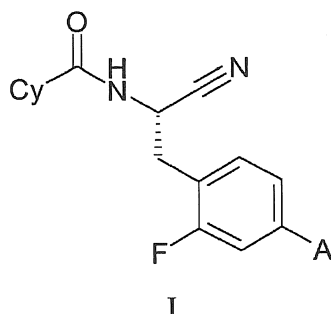
9. đau: Các dữ liệu gần đây thu được từ chuột thiếu hụt Cathepsin C-chỉ ra vai trò điều biến của Cathepsin C trong cảm giác đau. Theo đó, các chất ức chế Cathepsin C cũng có thể hữu dụng trong cơ sở lâm sàng của nhiều loại đau mạn tính khác nhau, ví dụ đau do viêm hoặc đau do bệnh thần kinh.

Để điều trị các bệnh và các tình trạng bệnh lý nêu trên, liều hữu hiệu điều trị sẽ thường nằm trong khoảng từ 0,01 mg đến 100 mg/kg thể trọng trên mỗi liều lượng hợp chất theo sáng chế; tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0,1 mg đến 20 mg/kg thể trọng trên mỗi liều lượng. Ví dụ, để dùng cho người có cân nặng 70kg, khoảng liều lượng sẽ nằm trong khoảng từ 0,7 mg đến 7000 mg trên mỗi liều lượng hợp chất theo sáng chế, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 7,0 mg đến 1400 mg trên mỗi liều lượng. Một số mức độ tối ưu hóa liều thông thường có thể cần thiết để xác định mức và mô hình cấp liều tối ưu. Hoạt chất có thể được dùng từ 1 đến 6 lần một ngày.

Lượng hữu hiệu điều trị thực tế hay liều điều trị tất nhiên sẽ tùy thuộc vào các yếu tố mà người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực này đã biết như độ tuổi và thể trọng của bệnh nhân, đường dùng và mức độ nghiêm trọng của bệnh. Trong trường hợp bất kỳ hoạt chất sẽ được sử dụng với liều và theo cách mà tạo ra lượng hữu hiệu điều trị dựa trên tình trạng đặc biệt của bệnh nhân.

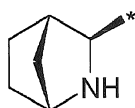
YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Hợp chất có công thức I hoặc muối hoặc solvat được dụng của nó,

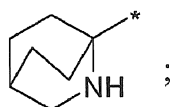


trong đó:

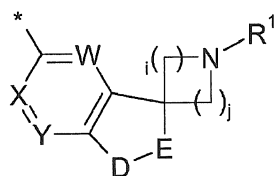
Cy là:



hoặc



A là:



trong đó:

W được chọn từ nhóm gồm CH và N;

X được chọn từ nhóm gồm CH và N;

Y được chọn từ nhóm gồm CH và N;

với điều kiện là tối đa một trong số các nhóm W, X và Y có thể là N;

D-E được chọn từ nhóm gồm $N(R^2)-C(O)$, CH_2CH_2 , $C(O)-O$ và CH_2-O ;

R^2 được chọn từ nhóm gồm H và C_{1-3} -alkyl;

R^1 được chọn từ nhóm gồm H, C_{1-3} -alkyl, $CH_3OCH_2CH_2-$, oxetanyl, tetrahydrofuranyl,

4-tetrahydropyranyl và 3-tetrahydropyranyl;

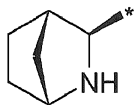
i là 1, 2 hoặc 3;

j là 1, 2 hoặc 3;

với điều kiện là tổng $i+j$ là 2, 3 hoặc 4.

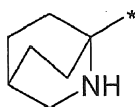
2. Hợp chất có công thức I theo điểm 1, hoặc muối hoặc solvat được dụng của nó, trong đó:

Cy là:



3. Hợp chất có công thức I theo điểm 1, hoặc muối hoặc solvat được dụng của nó, trong đó:

Cy là:



4. Hợp chất có công thức I theo điểm 1, 2 hoặc 3, hoặc muối hoặc solvat được dụng của nó, trong đó:

R^1 được chọn từ nhóm gồm H, CH_3 - và oxetanyl.

5. Hợp chất có công thức I theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, hoặc muối hoặc solvat được dụng của nó, trong đó:

R^2 được chọn từ nhóm gồm H và CH_3 .

6. Hợp chất có công thức I theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, hoặc muối hoặc solvat được dụng của nó, trong đó:

D-E là CH_2-O .

7. Hợp chất có công thức I theo điểm 1 hoặc muối hoặc solvat được dụng của nó, trong đó:

R^1 được chọn từ nhóm gồm H, CH_3 và oxetanyl;

R^2 là CH_3 ;

W được chọn từ nhóm gồm CH và N;

X được chọn từ nhóm gồm CH và N;

Y là CH;

với điều kiện là tối đa một trong số các nhóm W, X và Y có thể là N;

D-E được chọn từ nhóm gồm $N(R^2)-C(O)$, CH_2CH_2 , $C(O)-O$ và CH_2-O ;

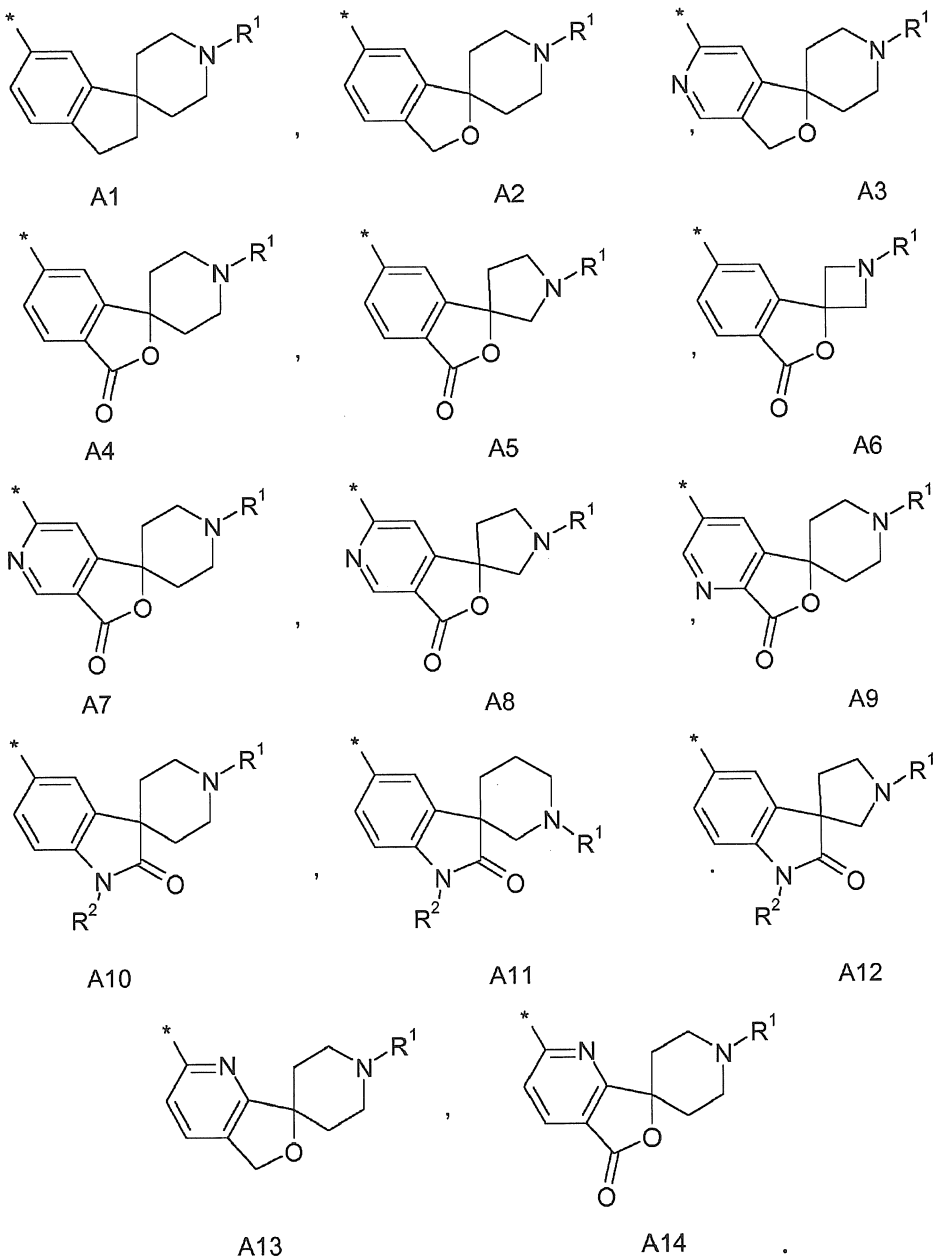
i là 1 hoặc 2;

j là 1 hoặc 2;

với điều kiện là tổng $i+j$ là 2, 3 hoặc 4.

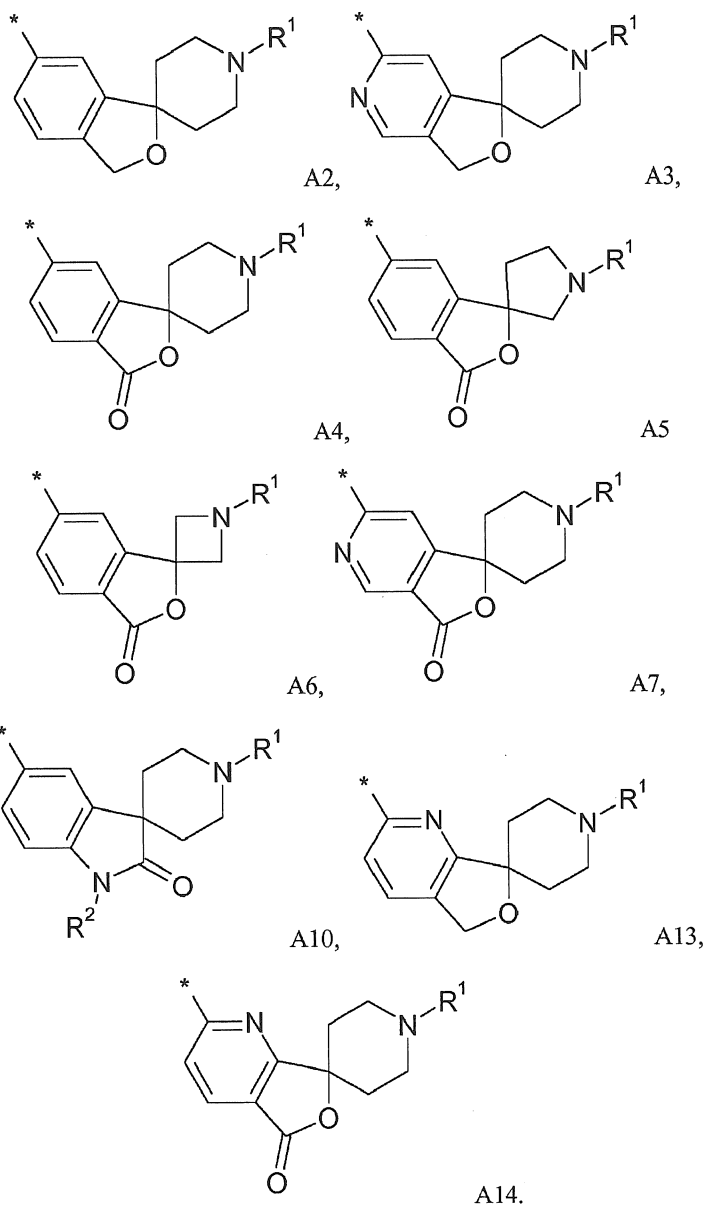
8. Hợp chất có công thức I, theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7, hoặc muối hoặc solvat được dụng của nó, trong đó:

A được chọn từ nhóm gồm các công thức từ A1 đến A14:



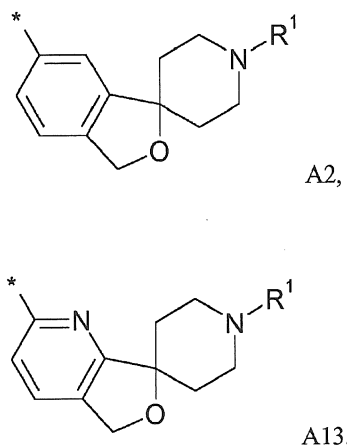
9. Hợp chất có công thức I theo điểm 8, hoặc muối hoặc solvat được dụng của nó, trong đó:

A được chọn từ nhóm gồm A2, A3, A4, A5, A6, A7, A10, A13, và A14:

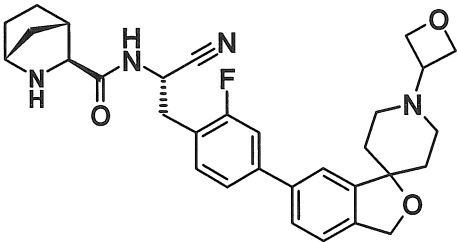
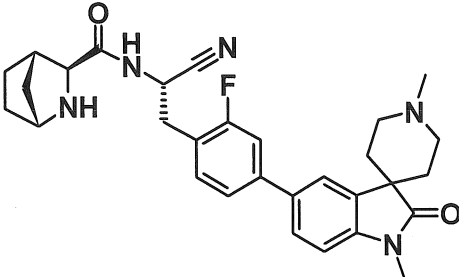
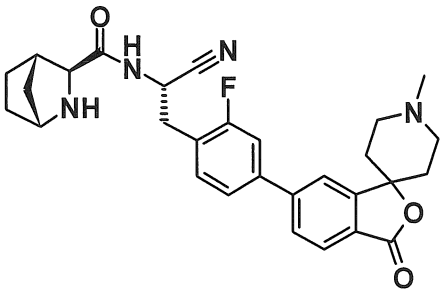
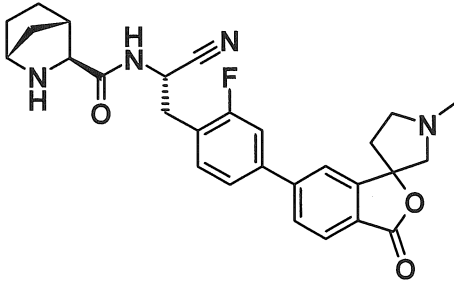
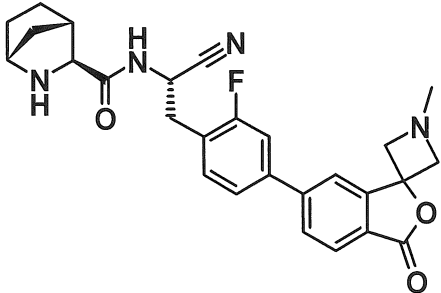
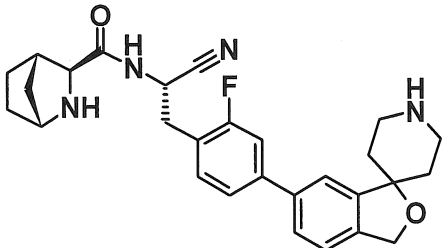
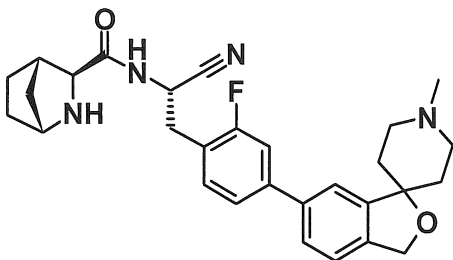
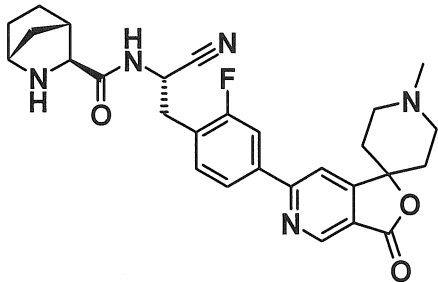


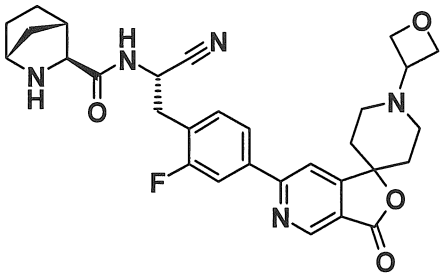
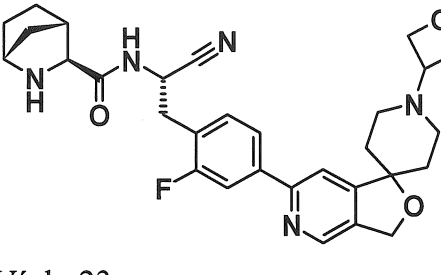
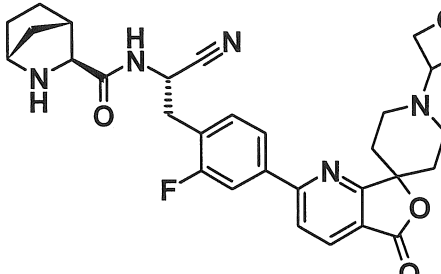
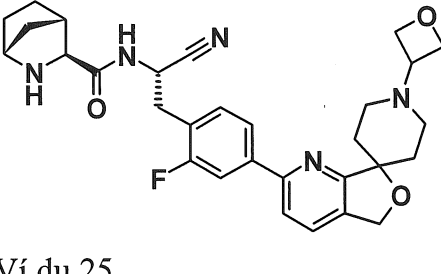
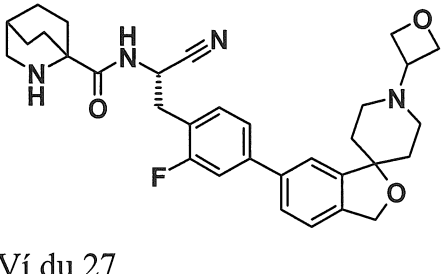
10. Hợp chất có công thức I, theo điểm 8 hoặc 9, hoặc muối hoặc solvat được dựng của nó, trong đó:

A được chọn từ nhóm gồm A2 và A13:



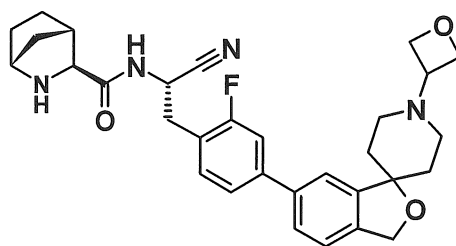
11. Hợp chất có công thức I, theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 10, trong đó hợp chất này được chọn từ nhóm gồm các hợp chất ví dụ 1, 5, 8, 10, 12, 13, 14, 19, 22, 23, 24, 25 và 27:

 Ví dụ 1	 Ví dụ 5
 Ví dụ 8	 Ví dụ 10
 Ví dụ 12	 Ví dụ 13
 Ví dụ 14	 Ví dụ 19

 Ví dụ 22	 Ví dụ 23
 Ví dụ 24	 Ví dụ 25
 Ví dụ 27	

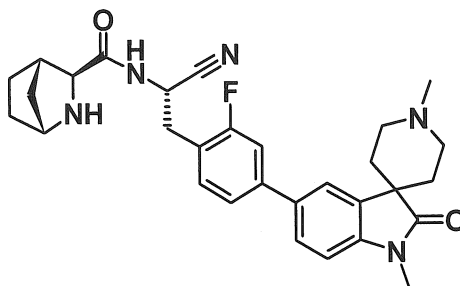
hoặc muối hoặc solvat được dựng của nó.

12. Hợp chất có công thức I theo điểm 11, hoặc muối hoặc solvat được dựng của nó, trong đó hợp chất này là:



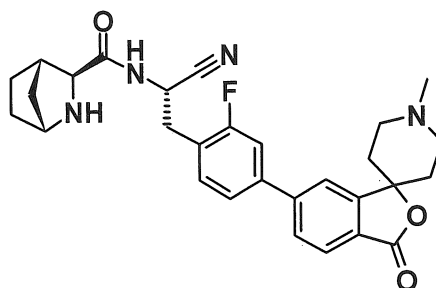
Ví dụ 1.

13. Hợp chất có công thức I theo điểm 11, hoặc muối hoặc solvat được dựng của nó, trong đó hợp chất này là:



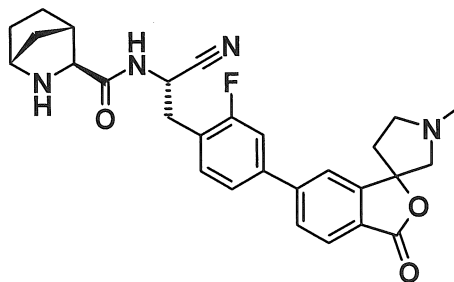
Ví dụ 5.

14. Hợp chất có công thức I theo điểm 11, hoặc muối hoặc solvat được dụng của nó, trong đó hợp chất này là:



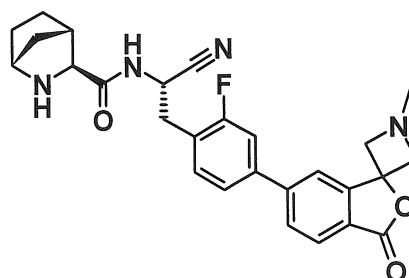
Ví dụ 8.

15. Hợp chất có công thức I theo điểm 11, hoặc muối hoặc solvat được dụng của nó, trong đó hợp chất này là:



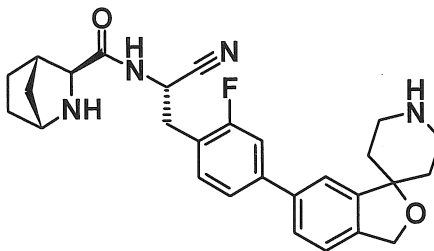
Ví dụ 10.

16. Hợp chất có công thức I theo điểm 11, hoặc muối hoặc solvat được dụng của nó, trong đó hợp chất này là:



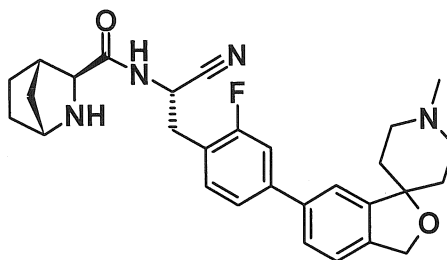
Ví dụ 12.

17. Hợp chất có công thức I theo điểm 11, hoặc muối hoặc solvat được dụng của nó, trong đó hợp chất này là:



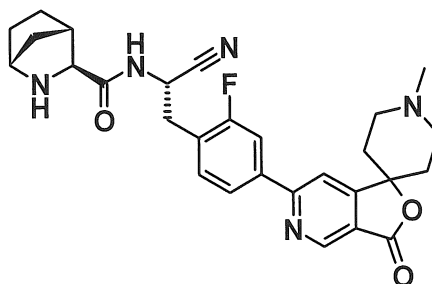
Ví dụ 13.

18. Hợp chất có công thức I theo điểm 11, hoặc muối hoặc solvat được dụng của nó, trong đó hợp chất này là:



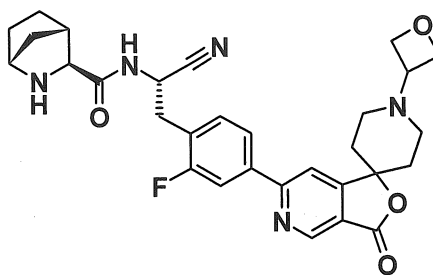
Ví dụ 14.

19. Hợp chất có công thức I theo điểm 11, hoặc muối hoặc solvat được dụng của nó, trong đó hợp chất này là:



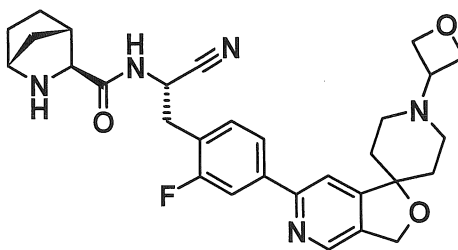
Ví dụ 19.

20. Hợp chất có công thức I theo điểm 11, hoặc muối hoặc solvat được dụng của nó, trong đó hợp chất này là:



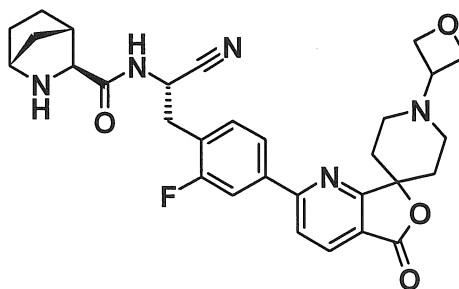
Ví dụ 22.

21. Hợp chất có công thức I theo điểm 11, hoặc muối hoặc solvat được dụng của nó, trong đó hợp chất này là:



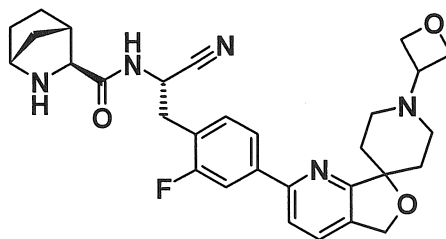
Ví dụ 23.

22. Hợp chất có công thức I theo điểm 11, hoặc muối hoặc solvat được dụng của nó, trong đó hợp chất này là:



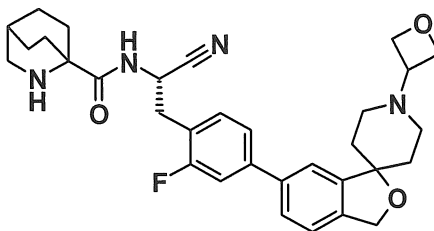
Ví dụ 24.

23. Hợp chất có công thức I theo điểm 11, hoặc muối hoặc solvat được dụng của nó, trong đó hợp chất này là:



Ví dụ 25.

24. Hợp chất có công thức I theo điểm 11, hoặc muối hoặc solvat được dụng của nó, trong đó hợp chất này là:



Ví dụ 27.

25. Dược phẩm, khác biệt ở chỗ, dược phẩm này chứa một hoặc nhiều hợp chất có công thức I theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 24 hoặc muối hoặc solvat được dụng của chúng.

26. Dược phẩm, trong đó dược phẩm này, ngoài hợp chất có công thức I theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 24, còn chứa hợp chất có được tính được chọn từ nhóm gồm các betamimetic, anticholinergic, corticosteroid, các chất ức chế PDE4, các chất đối kháng LTD4, các chất ức chế EGFR, các chất ức chế CRTH2, các chất ức chế 5-LO, các chất đối kháng thụ thể histamin, các chất đối kháng CCR9 và các chất ức chế SYK, các chất ức chế NE, các chất ức chế MMP9, các chất ức chế MMP12, và cả các tổ hợp của hai hoặc ba hoạt chất này.

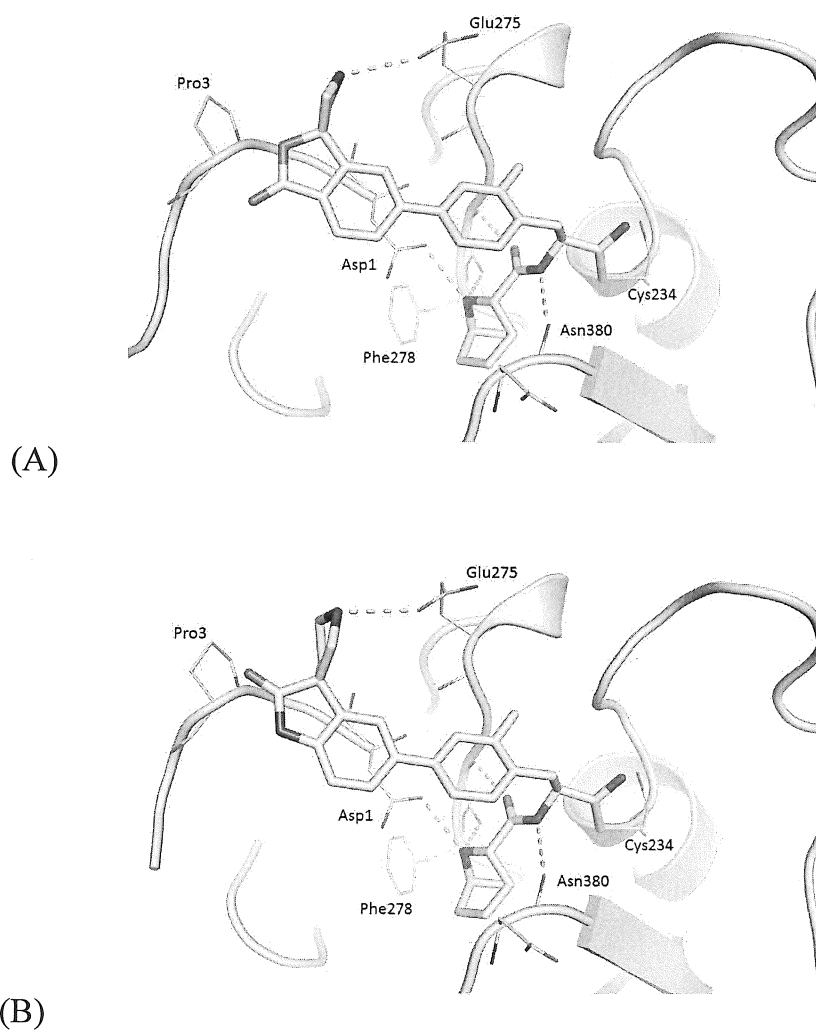


Fig. 1 Cấu trúc của các phức với phối tử Cathepsin C.

(A) Hợp chất ví dụ 11

(B) Hợp chất ví dụ 16

Protein được thể hiện dưới dạng dải, với các gốc chọn lọc được thể hiện dưới dạng thanh. Các phối tử được thể hiện dưới dạng thanh, các liên kết hydro được thể hiện dưới dạng nét đứt.