



(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)



1-0033076

(51)⁷ A61K 31/167; C07C 317/46; C07C
317/44; A61K 31/10; C07C 317/32

(13) B

(21) 1-2019-03604

(22) 05/12/2017

(86) PCT/EP2017/081489 05/12/2017

(87) WO2018/104288 A1 14/06/2018

(30) 16202175.2 05/12/2016 EP

(45) 25/08/2022 413

(43) 25/12/2019 381A

(73) 1. LEAD PHARMA HOLDING B.V. (NL)

Kloosterstraat 9 RK, 5349AB, Oss, Netherlands

2. SANOFI (FR)

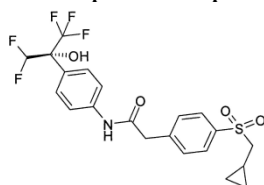
54, Rue de la Boétie, 75008 Paris, FR

(72) CALS Joseph Maria Gerardus Barbara (NL); MACHNIK David (FR); NABUURS
Sander Bernardus (NL); SABUCO Jean-François (FR).

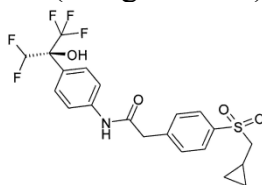
(74) Công ty TNHH Trần Hữu Nam và Đồng sự (TRAN H.N & ASS.)

(54) HỢP CHẤT, QUY TRÌNH ĐIỀU CHẾ HỢP CHẤT, THUỐC VÀ DƯỢC PHẨM
CHỨA HỢP CHẤT NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến hợp chất có (Công thức IA) hoặc (Công thức IB):



(Công thức IA)



(Công thức IB)

hoặc muối dược dụng của nó. Hợp chất này có thể được dùng làm chất ức chế ROR γ và
hữu dụng để điều trị các bệnh liên quan đến ROR γ .

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến hợp chất mà là chất điều biến của $ROR\gamma$, quy trình điều chế, thuốc và được phẩm chứa hợp chất này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Tế bào T hỗ trợ (T_H) đóng vai trò chủ yếu trong hệ miễn dịch đặc hiệu vì chúng phối hợp phòng thủ chống lại mầm bệnh cụ thể. Interleukin 17 (IL-17) tạo ra các dòng giống của tế bào T_H , như tế bào T_H17 , liên quan trực tiếp đến bệnh lý của vô số bệnh tự miễn và bệnh viêm, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, bệnh vẩy nến, bệnh đa xơ cứng, viêm khớp dạng thấp, bệnh Crohn, bệnh hen suyễn, bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính, viêm da cơ địa, viêm khớp vẩy nến, viêm cột sống dính khớp và viêm ruột kích thích.

Interleukin 17 và interleukin 23 (IL-23) là hai xytokin quan trọng trong sinh học T_H17 . IL-17 được tiết ra bởi tế bào T_H17 và là một tác nhân gây viêm mô; IL-23 được thể hiện là tác nhân tham gia chính trong việc khuếch đại và làm ổn định sự tăng sinh của loại tế bào T_H17 thông qua thụ thể IL-23 ($IL-23R$).

Thụ thể độc thân liên quan đến thụ thể axit retinoic γ ($ROR\gamma$) đóng vai trò là tác nhân điều chỉnh chính sự phát triển của tế bào T_H17 , và cũng là một thành phần quan trọng trong tế bào tạo IL-17 không phải T_H17 , như ví dụ tế bào T $\gamma\delta$. Họ gen ROR là một phần của siêu họ thụ thể hoocmon hạt nhân, và gồm có ba thành viên ($ROR\alpha$, $ROR\beta$, và $ROR\gamma$). Mỗi gen được biểu hiện ở các dạng đồng phân khác nhau, khác nhau đầu tiên ở trình tự đầu N của nó. Hai dạng đồng phân của $ROR\gamma$ đã được xác định: $ROR\gamma1$ và $ROR\gamma2$ (còn gọi là $ROR\gamma t$). Thuật ngữ $ROR\gamma$ được dùng ở đây để mô tả cả $ROR\gamma1$ và/hoặc $ROR\gamma2$.

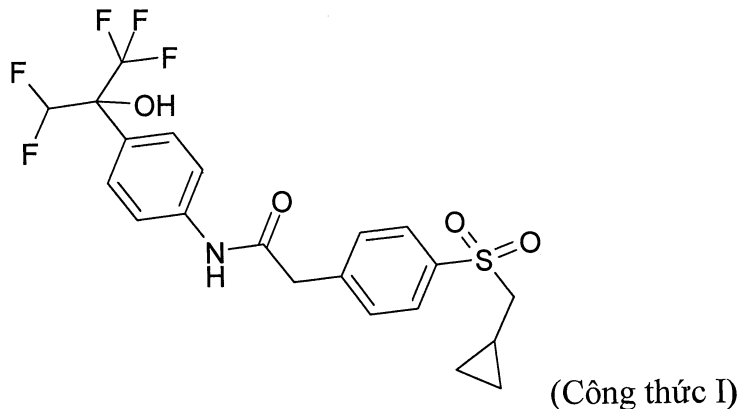
Hợp chất điều biến $ROR\gamma$ đã được mô tả trong đơn sáng chế quốc tế WO2015/082533.

Xét đến vai trò quan trọng của $ROR\gamma$ trong các rối loạn miễn dịch và viêm, mong muốn là điều chế các chất điều biến của $ROR\gamma$ với các đặc tính an toàn được cải

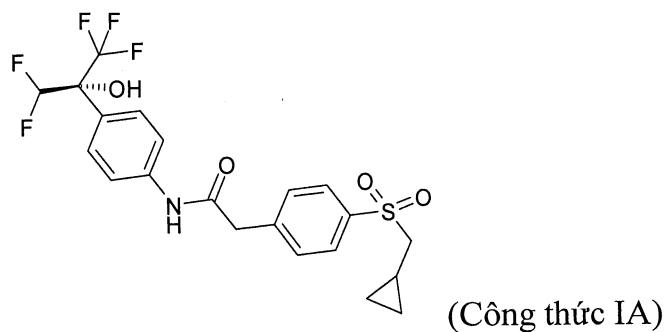
thiện mà có thể được dùng trong điều trị các bệnh trung gian bởi ROR γ . Sáng chế đề xuất hợp chất điều biến ROR γ mới này với các đặc tính an toàn cải thiện.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

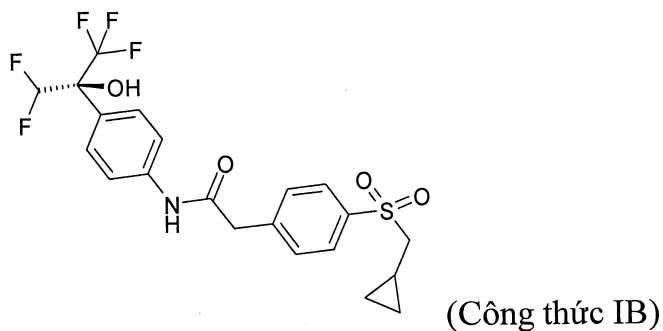
Mục đích của sáng chế là đề xuất hợp chất điều biến ROR γ mới được thể hiện bởi (Công thức I):



và cấu hình tuyệt đối của hợp chất (I) tương ứng với hợp chất có (Công thức IA) hoặc (Công thức IB):



2-{4-[(xyclopropylmetyl)sulfonyl]phenyl}-N-{4-[(1R)-1-(diflometyl)-2,2,2-triflo-1-hydroxyetyl]phenyl}axetamit hoặc muối được dụng của nó.



2-{4-[(cyclopropylmethyl)sulfonyl]phenyl}-N-{4-[(1S)-1-(difluoromethyl)-2,2,2-trifluoro-1-hydroxyethyl]phenyl}acetamide hoặc muối được dùng của nó.

Mô tả chi tiết sáng chế

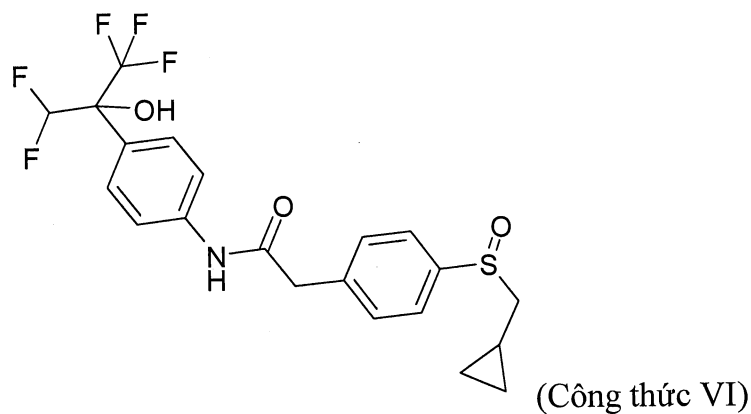
Trừ khi có quy định khác, các định nghĩa sau được đưa ra để minh họa và xác định nghĩa và phạm vi của các thuật ngữ khác nhau được dùng để mô tả các chi tiết của sáng chế trong bản mô tả này.

Thuật ngữ muối được dùng của hợp chất được thể hiện bởi (Công thức I), (Công thức IA) hoặc (Công thức IB) nêu trên thể hiện các muối mà, trong phạm vi phân đoán y học, thích hợp để dùng kết hợp với mô của người và động vật bậc thấp mà không độc tính quá mức, kích ứng, phản ứng dị ứng và tương tự, và xứng với tỷ lệ lợi ích/rủi ro hợp lý. Muối được dùng là đã biết trong lĩnh vực. Chức năng axit của hợp chất có thể được phản ứng với bazơ hữu cơ hoặc bazơ khoáng, như natri hydroxit, kali hydroxit hoặc lithi hydroxit.

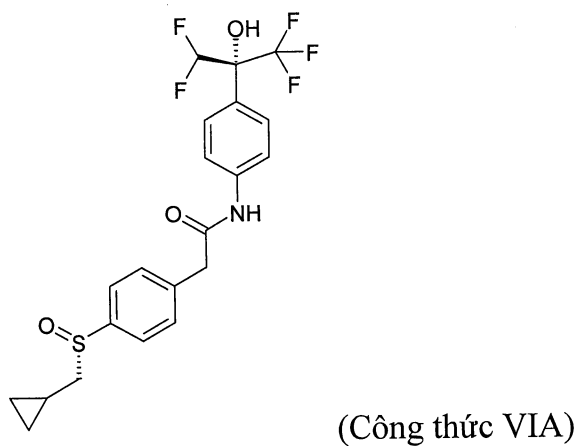
Ngoài hợp chất được thể hiện bởi (Công thức I), (Công thức IA) hoặc (Công thức IB) nêu trên, muối được dùng của nó, solvat và hydrat của nó cũng thuộc phạm vi của sáng chế.

Theo khía cạnh khác của sáng chế, phát hiện ra rằng hợp chất của sáng chế (Công thức I), (Công thức IA) hoặc (Công thức IB) còn có thể được dùng là tiền chất thuốc.

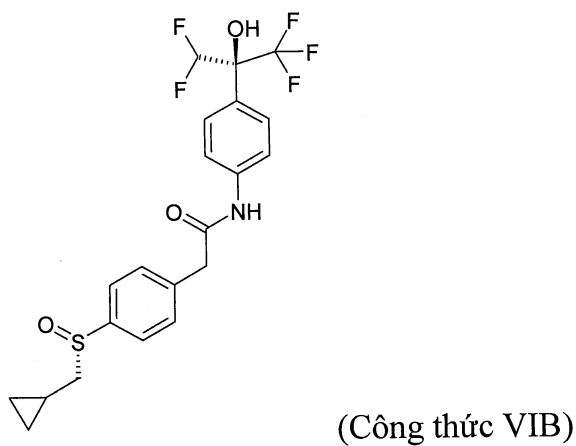
Tiền chất thuốc được xác định là hợp chất có (Công thức VI), (Công thức VIA), (Công thức VIB), (Công thức VIC) hoặc (Công thức VID) mà chúng tương ứng với hợp chất có (Công thức I), (Công thức IA) hoặc (Công thức IB) với nhóm sulfinyl thay vì nhóm sulfonyl. Cấu hình tuyệt đối của tâm không đối xứng của tiền chất thuốc không được xác định và được chỉ định tùy tiện. Đã biết bởi chuyên gia trong lĩnh vực rằng sulfoxit có thể thể hiện độ tan trong nước cải thiện khi so với đối chứng sulfon của nó.



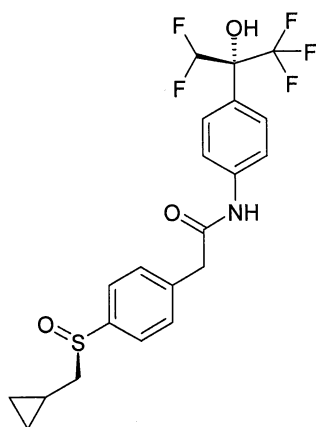
2-[4-(xyclopropylmetylsulfinyl)phenyl]-N-[4-[1-(diflometyl)-2,2,2-triflo-1-hydroxy-ethyl]phenyl]axetamit.



(-)-2-[4-[(S)-xyclopropylmetylsulfinyl]phenyl]-N-[4-[(1R)-1-(diflometyl)-2,2,2-triflo-1-hydroxy-ethyl]phenyl]axetamit hoặc muối được dụng của nó.

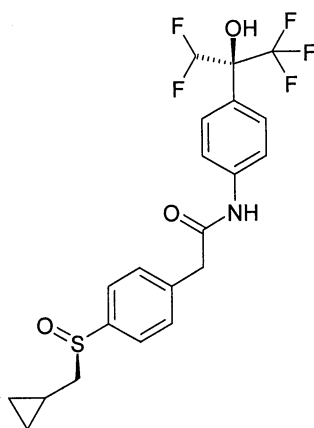


(-)-2-[4-[(S)-xyclopropylmetylsulfinyl]phenyl]-N-[4-[(1S)-1-(diflometyl)-2,2,2-triflo-1-hydroxy-ethyl]phenyl]axetamit hoặc muối được dụng của nó.



(Công thức VIC)

(+)-2-[4-[(R)-xyclopropylmethylsulfinyl]phenyl]-N-[4-[(1R)-1-(difluoromethyl)-2,2,2-trifluoro-1-hydroxy-ethyl]phenyl]axetamid hoặc muối được dụng của nó.



(Công thức VID)

(+)-2-[4-[(R)-xyclopropylmethylsulfinyl]phenyl]-N-[4-[(1S)-1-(difluoromethyl)-2,2,2-trifluoro-1-hydroxy-ethyl]phenyl]axetamid hoặc muối được dụng của nó.

Ngoài ra, hợp chất theo sáng chế thể hiện không có độc tính đáng kể và do đó thích hợp để dùng làm thuốc.

Hợp chất theo sáng chế ức chế hoạt tính ROR γ . Sự điều biến hoạt tính ROR γ có thể được đo bằng cách sử dụng ví dụ nghiên cứu chuyển vị phối tử sinh lý (tự nhiên), thử nghiệm AlphaScreen hoặc FRET sinh hóa, thử nghiệm gen báo cáo GAL4 tế bào, thử nghiệm báo cáo gen khởi động IL-17 hoặc thử nghiệm ELISA IL-17 chức năng bằng cách sử dụng ví dụ lá lách của chuột hoặc tế bào đơn nhân máu ngoại vi của người (PBMCs) được nuôi cấy dưới các điều kiện phân cực T_H17.

Trong các thử nghiệm này, sự tương tác của hợp chất với ROR γ có thể được xác định bằng cách đo, ví dụ, tương tác điều biến hợp chất của peptit dẫn xuất từ đồng

yếu tố với vùng liên kết phối tử ROR γ (IC₅₀), hoặc đo sản phẩm gen của phiên mã trung gian bởi ROR γ được điều biến bởi hợp chất sử dụng, ví dụ, thử nghiệm báo cáo luxiferaza hoặc thử nghiệm ELISA IL-17.

Chuyên gia trong lĩnh vực hiểu rằng giá trị IC₅₀ mong muốn phụ thuộc vào hợp chất được thử. Ví dụ, hợp chất với giá trị IC₅₀ đối với đích sinh học ít hơn 10⁻⁵ M thường được coi là ứng viên để lựa chọn thuốc. Theo một số phương án, giá trị này thấp hơn 10⁻⁶ M.

Biên độ an toàn được đánh giá bằng sự ức chế kênh ion gen liên quan đến ether-à-go-go của người (hERG) và ức chế CYP3A4.

Kênh gen liên quan đến ether-à-go-go của người (hERG, Kv 11.1) đóng vai trò đặc biệt quan trọng trong sự an toàn tim, và thử nghiệm vấu đắp hERG là yêu cầu điều chỉnh cơ bản trước thử nghiệm lâm sàng đầu tiên ở người (hướng dẫn FDA).

Sự ức chế dòng hERG (IKr), liên quan đến pha tái phân cực của điện thế tác động tim, đã thể hiện kéo dài điện thế tác động tim và gây ra sự kéo dài khoảng thời gian QT trong điện tim đồ dẫn đến tăng nguy cơ đối với chứng loạn nhịp tim tâm thất nguy hiểm gọi là “Xoắn đỉnh” ở người.

Thử nghiệm hERG, trong đó hERG được mang vào biểu hiện ở tế bào CHO, tạo ra thông tin sự tương tác của hợp chất với kênh hERG. Độ lớn của dòng đuôi kênh kali hERG được ghi dưới dung dịch đối chứng và dung dịch hợp chất ở các nồng độ khác nhau. Sau đó giá trị IC₅₀ được xác định từ đường cong đáp ứng liều.

Việc nhận diện ức chế CYP3A4 sớm nhất có thể trong khám phá thuốc chủ yếu là ngăn ngừa các tác dụng độc bất lợi tiềm ẩn liên quan đến tương tác thuốc-thuốc (hướng dẫn FDA).

Trong thử nghiệm ức chế CYP3A4, IC₅₀ trong ống nghiệm của hợp chất thử làm chất ức chế trực tiếp chống lại CYP3A4 đã được xác định, bằng cách đo sự ức chế của sự quay vòng của cơ chất dò của CYP3A4 (Midazolam và Testosteron) với chất chuyển hóa cụ thể của nó tức là, 1'-Hydroxymidazolam, 6 β -Hydroxytestosteron, trong vi lập thể gan người.

Chuyên gia trong lĩnh vực hiểu rằng giá trị IC_{50} mong muốn phụ thuộc vào hợp chất được thử. Ví dụ, giá trị IC_{50} càng cao trong thử nghiệm trên, thì sẽ có biên độ an toàn càng tốt, với nguy cơ về vấn đề an toàn tim và tác dụng độc bất lợi tiềm ẩn giảm liên quan đến tương tác thuốc-thuốc.

Sáng chế còn đề cập đến được phẩm chứa hợp chất có (Công thức I), (Công thức IA) hoặc (Công thức IB) hoặc muối được dụng của nó của hợp chất trong hỗn hợp với tá dược được dụng và tùy ý các tác nhân hoạt tính điều trị khác.

Sáng chế còn đề cập đến được phẩm chứa hợp chất có (Công thức IA) hoặc (Công thức IB) hoặc muối được dụng của nó của hợp chất trong hỗn hợp với tá dược được dụng và tùy ý các tác nhân hoạt tính điều trị khác.

Sáng chế còn đề cập đến được phẩm chứa hợp chất có (Công thức I), (Công thức IA) hoặc (Công thức IB) hoặc muối được dụng của nó và một hoặc nhiều tá dược được dụng.

Sáng chế còn đề cập đến được phẩm chứa hợp chất có (Công thức IA) hoặc (Công thức IB) hoặc muối được dụng của nó và một hoặc nhiều tá dược được dụng.

Tá dược phải là “chấp nhận được” theo nghĩa tương thích với các thành phần khác của chế phẩm và không có hại cho người dùng chúng.

Sáng chế còn đề cập đến được phẩm chứa ít nhất một tác nhân hoạt tính chữa bệnh bổ sung.

Sáng chế còn bao gồm hợp chất có (Công thức I), (Công thức IA) hoặc (Công thức IB) kết hợp với một hoặc nhiều (các) thuốc khác.

Sáng chế còn bao gồm hợp chất có (Công thức IA) hoặc (Công thức IB) kết hợp với một hoặc nhiều (các) thuốc khác.

Chế phẩm bao gồm, ví dụ, các loại thích hợp để dùng qua đường miệng, dưới lưỡi, dưới da, trong tĩnh mạch, trong cơ, trong mũi, cục bộ, hoặc trong trực tràng, và tương tự, tất cả ở dạng liều dùng đơn vị để dùng.

Đối với dùng qua đường miệng, hợp chất theo sáng chế có thể được thể hiện là các đơn vị riêng biệt, như viên nén, viên nang, bột, hạt, dung dịch, huyền phù, và tương tự.

Đối với dùng ngoài ruột, dược phẩm của hợp chất theo sáng chế thể được thể hiện là các hợp đơn liều hoặc đa liều, ví dụ chất lỏng để tiêm với lượng định trước, ví dụ trong lọ đóng kín và ống thuốc tiêm, và có thể còn được lưu trữ trong điều kiện khô lạnh (đông khô) chỉ cần thêm chất mang lỏng vô trùng, ví dụ nước, trước khi sử dụng.

Dược trộn với tá dược được dụng này, tác nhân hoạt tính có thể được nén thành các đơn vị liều rắn, như viên thuốc, viên nén, hoặc được xử lý thành viên nang hoặc thuốc đạn. Thuật ngữ chất lỏng được dụng, tác nhân hoạt tính có thể được dùng là chế phẩm lỏng, ví dụ là chế phẩm tiêm, dưới dạng dung dịch, huyền phù, nhũ tương, hoặc là chất xịt, ví dụ chất xịt mũi.

Để tạo ra đơn vị liều rắn, việc sử dụng các phụ gia thông thường như chất độn, chất tạo màu, chất liên kết polyme và tương tự cũng được dự tính. Nói chung bất kỳ tá dược được dụng, mà không gây cản trở chức năng của hợp chất hoạt tính có thể được sử dụng. Các tá dược thích hợp mà hợp chất theo sáng chế có thể được dùng là chế phẩm rắn bao gồm lactoza, tinh bột, dẫn xuất xenluloza và tương tự, hoặc hỗn hợp của nó, được dùng ở lượng thích hợp. Để dùng ngoài ruột huyền phù nước, dung dịch muối đẳng trương và dung dịch tiêm vô trùng có thể được sử dụng, chứa tác nhân phân tán và/hoặc tác nhân thấm ướt được dụng, như propylen glycol hoặc butylen glycol.

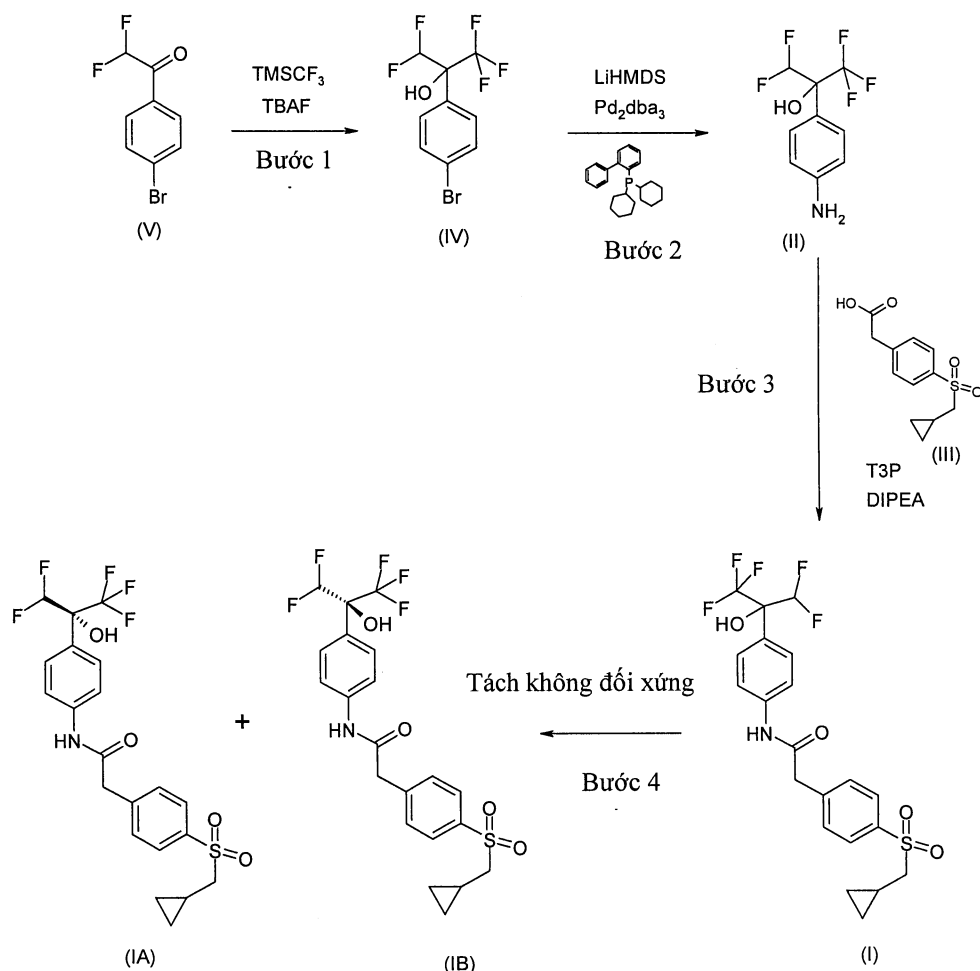
Sáng chế còn bao gồm dược phẩm, như được mô tả trên đây, kết hợp với vật liệu bao gói thích hợp cho chế phẩm này, vật liệu bao gói này bao gồm hướng dẫn để dùng chế phẩm như được mô tả trên đây.

Liều dùng chính xác và chế độ dùng hợp chất theo sáng chế, hoặc dược phẩm của nó, có thể thay đổi với hợp chất cụ thể, đường dùng, và độ tuổi và tình trạng của từng đối tượng được dùng thuốc.

Nói chung việc dùng ngoài ruột đòi hỏi liều dùng thấp hơn so với các cách dùng khác, mà phụ thuộc nhiều hơn vào sự hấp thụ. Tuy nhiên, liều dùng cho người tốt hơn là chứa 0,0001-100 mg mỗi kg trọng lượng cơ thể. Liều dùng mong muốn có thể được thể hiện là một liều hoặc là nhiều liều nhỏ được dùng ở khoảng cách thời gian thích hợp trong ngày.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Hợp chất theo sáng chế có thể được điều chế sẵn theo sơ đồ phản ứng sau, hoặc cải biến của nó, sử dụng vật liệu ban đầu có sẵn, chất phản ứng hoặc các hợp chất trung gian được mô tả trước đây và quy trình tổng hợp thông thường.



Các chữ viết tắt được sử dụng trong sơ đồ này và các chi tiết ví dụ được liệt kê dưới đây và các chữ viết tắt bổ sung cần được coi là đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực hóa tổng hợp.

Các chữ viết tắt được sử dụng ở đây là như sau: TMSCF_3 : Trifluoromethyltrimethylsilan; TBAF: Tetra-*N*-butylamoni florua; TMS: Trimethylsilyl; LiHMDS: lithi bis(trimethylsilyl)amit; $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$: Tris(dibenzylidenacetone)dipaladi(0); T3P: 1-Propanphosphonic anhydrit; DIPEA: Diisopropyletylamin, *N*-etyl-*N*-isopropyl-propan-2-amin; RT: nhiệt độ phòng; DMF: Dimetylformamit; CH_2Cl_2 , DCM: diclometan; THF: Tetrahydrofuran; Et_2O : Dietyl ete; DMSO: Dimetylsulfoxit; EtOH: etanol; TLC: Sắc ký lớp mỏng; EtOAc: etyl axetat; ACN, CH_3CN : axetonitril; MeOH: metanol; TFA: axit trifloaxetic; HCl: axit clohydric; Et_3N , TEA: trietylamin;

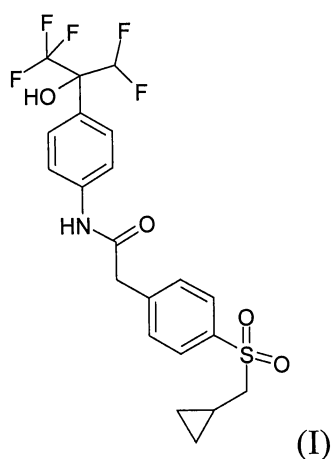
NaCl: natri clorua; NaHCO₃: natri bicarbonat; H₂O: nước; MgSO₄: magiê sulfat; Na₂SO₄: natri sulfat.

Tên hóa học được ưu tiên là tên IUPAC, được tạo ra bằng cách sử dụng Accelrys Draw 4.1.

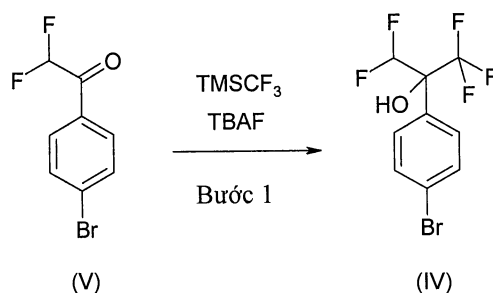
Nếu hợp chất hóa học được đề cập đến bằng cách sử dụng cả cấu trúc hóa học và tên hóa học, và có sự không rõ ràng giữa cấu trúc và tên, cấu trúc được ưu tiên sử dụng.

Ví dụ 1

2-[4-(xyclopropylmetylsulfonyl)phenyl]-N-[4-[1-(diflometyl)-2,2,2-triflo-1-hydroxy-etyl]phenyl]axetamit.



Bước 1:



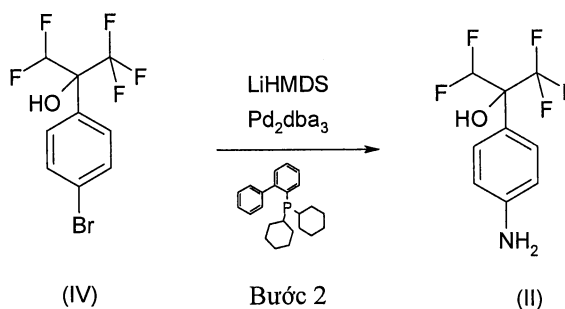
Dung dịch của 1-(4-bromophenyl)-2,2-difluoro-etanon (10,5 g) trong 100 mL THF ở 0°C dưới argon được thêm TMSCF₃ (12,7 g) sau đó thêm dung dịch 1 M của TBAF trong THF (90 mL) qua 45 phút. Hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng, sau đó được pha loãng với Et₂O (200 mL), được rửa bằng nước (2 x 200 mL), nước muối (100 mL), được làm khô và được cô dưới áp suất giảm. Cặn được tinh chế

bằng sắc ký cột trên silica gel, sử dụng EtOAc 0 % đến 20 % trong xyclohexan làm chất rửa giải để tạo ra 11,5 g (84 %) 2-(4-bromophenyl)-1,1,1,3,3-pentafluoropropan-2-ol là dầu màu vàng.

MS(ES⁺) m/z 302,9 / 304,9 [M+H]⁺.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 6,70 (t, $J=53,1$ Hz, 2 H), 7,60 (d, $J=9,2$ Hz, 2 H), 7,69 (d, $J=9,2$ Hz, 2 H), 7,92 (s, 1 H).

Bước 2:



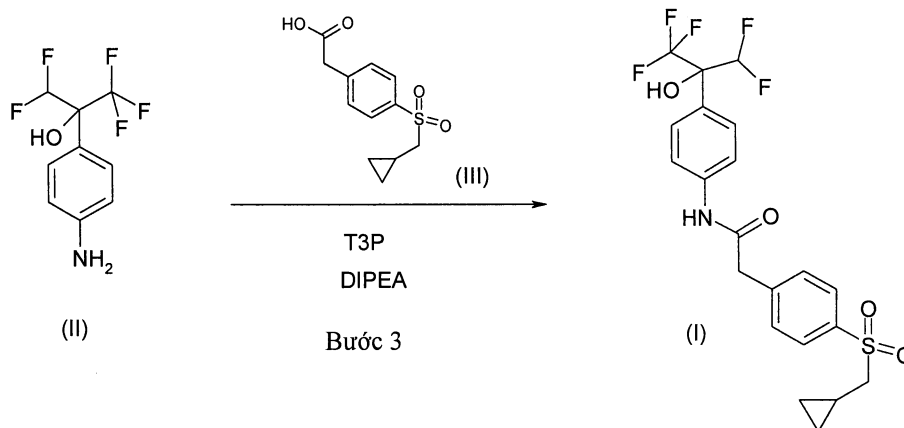
Dung dịch của 2-(4-bromophenyl)-1,1,1,3,3-pentafluoropropan-2-ol (11,4 g) trong THF (100 mL) dưới argon được thêm dung dịch 1 M của LiHMDS trong THF (112 mL),

2-(dicyclohexylphosphino)biphenyl (1,6g) sau đó thêm Pd₂(dba)₃ (2,16g). Hỗn hợp phản ứng được khuấy dưới hồi lưu trong 1 giờ, sau đó được làm nguội xuống 0°C, và dung dịch nước 12N của HCl (15mL) được thêm nhỏ giọt. Sau khi khuấy trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng, hỗn hợp phản ứng được rót lên dung dịch nước bão hòa của NaHCO₃ (400 mL) sau đó được chiết với EtOAc (2x 300 mL). Lớp hữu cơ kết hợp được làm khô và được cô dưới áp suất giảm. Sản phẩm được kết tủa trong DCM, được lọc và được rửa bằng lượng tối thiểu của DCM để tạo ra sản phẩm mong muốn (4,75 g). Phần lọc được tinh chế bằng sắc ký cột trên silica gel, sử dụng EtOAc 0 % đến 50 % trong xyclohexan làm chất rửa giải để tạo ra 1,4 g sản phẩm mong muốn. 2-(4-Aminophenyl)-1,1,1,3,3-pentafluoropropan-2-ol (6,15 g, 68 %) thu được là chất rắn màu trắng đục.

MS(ES⁺) m/z 242,0 [M+H]⁺.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 5,27 (s, 2 H), 6,22 - 6,74 (m, 3 H), 7,11 - 7,35 (m, 3 H).

Bước 3:



Dung dịch của 2-(4-aminophenyl)-1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propan-2-ol (0,55 g) trong DCM (10 mL) được thêm 2-[4-(cyclopropylmethylsulfonyl)phenyl]acetic acid (0,58 g) và N-ethyl-N-isopropyl-propan-2-amin (1,19 mL) sau đó là thêm nhỏ giọt dung dịch 50% của T3P trong DCM (0,8 mL). Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 2 giờ. EtOAc (100 mL) và nước (100 mL) được thêm. Lớp hữu cơ được tách, được rửa bằng nước muối (100 mL), được làm khô qua MgSO_4 , được lọc và được cô dưới áp suất giảm. Cặn được tán bột trong DCM (5 mL), được lọc và được rửa bằng DCM 10% trong pentan (5 mL) sau đó được làm khô để tạo ra 0,72 g (66%) 2-[4-(cyclopropylmethylsulfonyl)phenyl]-N-[4-[1-(difluoromethyl)-2,2,2-trifluoro-1-hydroxyethyl]phenyl]acetamid là chất rắn màu trắng đục.

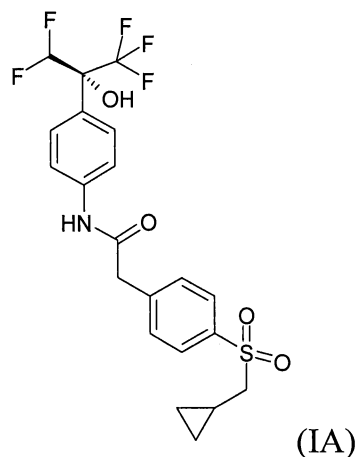
MS(ES^+) m/z 478,1 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Ví dụ 2 và 3

Hai chất đồng phân đối hình được tách từ Ví dụ 1 sắc ký không đối xứng sử dụng cột Chiralpak AD 20 μm , 76,5 x 350 mm và pha động, EtOH:MeOH 90:10, 350 mL/phút, với dò UV ở 254 nm.

Bắt đầu từ 5 g chất triệt quang trong 500 mL EtOH, năm dịch tiêm của dung dịch được thực hiện để thu được, sau khi cô đặc, 2,17 g của Ví dụ 2 (chất đồng phân đối hình thứ nhất được rửa giải) và 2,02 g của Ví dụ 3.

Ví dụ 2 - hợp chất có (Công thức IA): (+)-2-[4-(cyclopropylmethylsulfonyl)phenyl]-N-[4-[(1R)-1-(difluoromethyl)-2,2,2-trifluoro-1-hydroxyethyl]phenyl]acetamid.

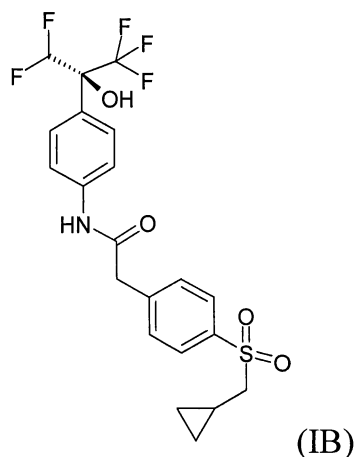


MS(ES⁺) *m/z* 478,1 [M+H]⁺.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 0,11 (m, 2 H), 0,44 (m, 2 H), 0,82 (m, 1 H), 3,24 (d, *J*=7,2 Hz, 2 H), 3,82 (s, 3 H), 6,67 (t, *J*=53,4 Hz, 2 H), 7,57 (d, *J*=9,2 Hz, 2 H), 7,60 (d, *J*=8,5 Hz, 2 H), 7,67 (d, *J*=9,2 Hz, 2 H), 7,70 (s, 1 H), 7,86 (d, *J*=8,5 Hz, 2 H), 10,42 (s, 1 H).

Sự quay quang: [α]_D²⁰ = +1,5° (c = 3mg/mL, DMSO).

Ví dụ 3 - hợp chất có (Công thức IB): (-)-2-[4-(xyclopropylmetylsulfonyl)phenyl]-N-[4-[(1*S*)-1-(diflometyl)-2,2,2-triflo-1-hydroxy-etyl]phenyl]axetamit.



MS(ES⁺) *m/z* 478,0 [M+H]⁺.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 0,11 (m, 2 H), 0,44 (m, 2 H), 0,82 (m, 1 H), 3,24 (d, *J*=7,2 Hz, 2 H), 3,82 (s, 3 H), 6,67 (t, *J*=53,4 Hz, 2 H), 7,56 (d, *J*=9,2 Hz, 2 H), 7,59 (d, *J*=8,5 Hz, 2 H), 7,67 (d, *J*=9,2 Hz, 2 H), 7,70 (s, 1 H), 7,86 (d, *J*=8,5 Hz, 2 H), 10,42 (s, 1 H).

Sự quay quang: $[\alpha]_D^{20} = -4,6^\circ$ ($c = 3\text{mg/mL}$, DMSO).

Ví dụ 4 - nhiễu xạ đơn tinh thể tia X

Cấu hình tuyệt đối của Ví dụ 2 và 3 đã được xác định từ dữ liệu nhiễu xạ đơn tinh thể tia X (XRSCD) sử dụng chu kỳ dị cường và phân tích khác biệt Bijvoet.

Tinh thể đơn của chất lượng tinh thể học thích hợp để xác định cấu trúc tinh thể từ dữ liệu nhiễu xạ đơn tinh thể được phân lập từ thử nghiệm bay hơi chậm của dung dịch của Ví dụ 2 và 3 trong cloform.

Cấu hình tuyệt đối của Ví dụ 2

Dữ liệu được gom trên nhiễu xạ kế đơn tinh thể Bruker Smart Apex. Nguồn tia X vi tụ I μ S molybden được sử dụng, chạy ở 50 kV và 0,6 mA, bức xạ Mo-K α phát quang ($\lambda = 0,710731$ Å). Thiết bị kết hợp điện tích (chip CCD: 4K, 62 mm) là thiết bị dò được định vị ở 6,0 cm. Máy điều lạnh nitơ Oxford Cryosystems (Cryostream dòng Plus 700) cho phép thử nghiệm XRSCD được tiến hành ở 100 K. Tinh thể đơn với kích thước: $25 \times 250 \times 250$ μm^3 đã được gắn từ từ giọt dầu Paratone NTM lên cấu trúc vòng MiTeGen mylar nền thấp. Cầu Ewald đầy của phản xạ được gom (quét 3 omega của 680 khung với độ rộng khung bằng $0,3^\circ$). Thời gian tích tụ được đặt ở 80 giây cho mỗi khung mắc phải.

Ma trận hướng và tế bào đơn vị được thiết lập sử dụng chương trình CELL_NOW (v2008/4). Biên độ phản xạ 3D và tích hợp toàn bộ phản xạ được thực hiện bằng chương trình SAINT (v8.34A). Chương trình TWINABS (v2012/1) được sử dụng để hiệu chỉnh cho Lorentz và các hiệu ứng phân cực và cho mẫu hấp thụ. Ngoài ra, cả dữ liệu HKLF4 và HKLF5 được tạo ra tương ứng để hòa tan và tinh lọc bằng gói chương trình SHELXTL (v2014/7).

Dữ liệu cấu trúc tinh thể là như sau:

- Triclinic, nhóm không gian P1
- $a = 7,9892(13)$ Å, $b = 11,4301(18)$ Å, $c = 11,6936(19)$ Å
- $\alpha = 83,022(2)^\circ$, $\beta = 77,006(2)^\circ$, $\gamma = 81,071(2)^\circ$
- $V = 1023,7(3)$ Å³, $Z = 2$, $T = 100(2)$ K,

- 11704 phản xạ được đo ($3,6 \leq 2\Theta \leq 58,2$), 11704 đơn nhất ($R_{\text{sigma}} = 0,0229$)
- 736 thông số và 3 hạn chế

R_1 cuối là 2,7 % ($I > 2\sigma(I)$) và wR_2 là 7,1 % (tất cả dữ liệu) với $Gof = 1,030$.

Quy trình tiêu chuẩn để xác định cấu trúc tuyệt đối bằng kỹ thuật nhiễu xạ tia X là dựa trên việc xác định tham số Flack (x) với độ không đảm bảo tiêu chuẩn liên quan của nó như là một phần của quy trình sàng lọc bình phương nhỏ nhất. Các giá trị kỳ vọng là 0 (trong 3 esd) để hiệu chỉnh và +1 cho cấu trúc tuyệt đối đảo ngược. Trong trường hợp Ví dụ 2 – hợp chất có (Công thức IA), Flack $x = 0,095(33)$ bằng cách khớp cổ điển với tất cả các cường độ và 0,072(21) từ 3969 chỉ tiêu được chọn (phương pháp Parsons cho độ chính xác cao hơn) chỉ ra rằng Ví dụ 2 – cấu trúc tuyệt đối của hợp chất có (Công thức IA) được xác định một cách đáng tin cậy.

Ngoài ra quy trình sau sàng lọc dựa trên cách tiếp cận thống kê Bayesian được áp dụng (theo cách hoàn toàn khác với cách tiếp cận Flack). Sử dụng kết hợp giữa ước tính khả năng tối đa và thống kê Bayesian, không chỉ nhận được sự chỉ định định tính của cấu trúc tuyệt đối, mà còn ước tính định lượng về độ tin cậy của sự chỉ định đó. Phân tích Ví dụ 2 – cấu trúc tuyệt đối của hợp chất có (Công thức IA) sử dụng phương pháp khả năng đã được thực hiện bằng cách sử dụng gói phần mềm Olex2. Giá trị thu được là Hooft $y = 0,13(5)$ chỉ ra rằng cấu trúc tuyệt đối đã được xác định chính xác (phân tích cặp Bijvoet sử dụng phân bố Student với độ bao phủ cặp Bijvoet 88%: 4639 cặp được sử dụng). Phương pháp cũng đã tính toán rằng xác suất mà cấu trúc được đảo ngược là bằng không.

Do đó, các kết quả này thể hiện rằng cấu trúc tuyệt đối của Ví dụ 2 – hợp chất có (Công thức IA) là R (xác suất bằng 100 %).

Cấu trúc tuyệt đối của Ví dụ 3

Dữ liệu được gom trên nhiễu xạ kế đơn tinh thể Bruker Smart Apex. Nguồn tia X vi tử $I_{\mu S}$ molybden được sử dụng, chạy ở 50 kV và 0,6 mA, bức xạ $Mo-K\alpha$ phát quang ($\lambda = 0,710731 \text{ \AA}$). Thiết bị kết hợp điện tích (chip CCD: 4K, 62 mm) là thiết bị dò được định vị ở 6,0 cm. Máy điều lạnh nitơ Oxford Cryosystems (Cryostream dòng Plus 700) cho phép thử nghiệm XRSCD được tiến hành ở 100 K. Tinh thể đơn với

kích thước: $40 \times 150 \times 200 \mu\text{m}^3$ đã được gắn từ từ giọt dầu Paratone NTM lên cấu trúc vòng MiTeGen mylar nền thấp. Cầu Ewald đầy của phản xạ được gom (quét 3 omega của 680 khung với độ rộng khung bằng $0,3^\circ$). Thời gian tích tụ được đặt ở 75 giây cho mỗi khung mắc phải.

Ma trận hướng và tế bào đơn vị được thiết lập sử dụng bộ chương trình Bruker AXS Apex2 (v2014.11 0). Biên độ phản xạ 3D và tích hợp toàn bộ phản xạ được thực hiện bằng chương trình SAINT (v8.34A). Chương trình SADABS (v2014/5) được sử dụng để hiệu chỉnh cho Lorentz và các hiệu ứng phân cực và cho mẫu hấp thụ. Nhóm không gian tạm được xác định bằng chương trình XPREP (v2014/2). Chương trình SHELXTL XT (v2014/4) được sử dụng để giải quyết cấu trúc bằng phương pháp chia pha bên trong. Chương trình SHELXTL XLMP (v2014/7) được sử dụng để tinh chế dung dịch bằng tính toán ma trận bình phương nhỏ nhất F^2 .

Dữ liệu cấu trúc tinh thể là như sau:

- Triclinic, nhóm không gian P1
- $a = 8,0022(5) \text{ \AA}$, $b = 11,4394(8) \text{ \AA}$, $c = 11,7044(8) \text{ \AA}$
- $\alpha = 83,0030(10)^\circ$, $\beta = 76,9840(10)^\circ$, $\gamma = 80,9850(10)^\circ$
- $V = 1026,83(12) \text{ \AA}^3$, $Z = 2$, $T = 100(2) \text{ K}$
- 10430 phản xạ được đo ($3,6 \leq 2\Theta \leq 57,8$), 8932 đơn nhất
($R_{\text{int}} = 0,0081$)
- 737 thông số và 3 hạn chế

R_1 cuối là 2,5 % ($I > 2\sigma(I)$) và wR_2 là 6,8 % (tất cả dữ liệu) với Gof = 1,024.

Quy trình tiêu chuẩn để xác định cấu trúc tuyệt đối bằng kỹ thuật nhiễu xạ tia X là dựa trên việc xác định tham số Flack (x) với độ không đảm bảo tiêu chuẩn liên quan của nó như là một phần của quy trình sàng lọc bình phương nhỏ nhất. Các giá trị kỳ vọng là 0 (trong 3 esd) để hiệu chỉnh và +1 cho cấu trúc tuyệt đối đảo ngược. Trong trường hợp Ví dụ 3 – hợp chất có (Công thức IB), Flack $x = 0,063(47)$ bằng cách khớp cổ điển với tất cả các cường độ và 0,058(9) từ 3969 chỉ tiêu được chọn (phương pháp Parsons cho độ chính xác cao hơn) chỉ ra rằng Ví dụ 3 – cấu hình tuyệt đối của hợp chất có (Công thức IB) được xác định một cách đáng tin cậy.

Ngoài ra quy trình sau sàng lọc dựa trên cách tiếp cận thống kê Bayesian được áp dụng. Sử dụng kết hợp giữa ước tính khả năng tối đa và thống kê Bayesian, không chỉ nhận được sự chỉ định định tính của cấu trúc tuyệt đối, mà còn ước tính định lượng về độ tin cậy của sự chỉ định đó.

Phân tích Ví dụ 3 – cấu trúc tuyệt đối của hợp chất có (Công thức IB) sử dụng phương pháp khả năng đã được thực hiện bằng cách sử dụng gói phần mềm Olex2. Giá trị thu được là Hooft $y = 0,059(8)$ chỉ ra rằng cấu trúc tuyệt đối đã được xác định chính xác (phân tích cặp Bijvoet sử dụng phân bố Student với độ bao phủ cặp Bijvoet 75 %: 4049 cặp được sử dụng). Phương pháp cũng đã tính toán rằng xác suất mà cấu trúc được đảo ngược là bằng không.

Do đó, các kết quả này thể hiện rằng cấu hình tuyệt đối của Ví dụ 3 – hợp chất có (Công thức IB) là S (xác suất bằng 100 %).

Ví dụ 5 - Thử nghiệm gen báo cáo GAL4 ROR γ

Các ví dụ 2-3 của 'hợp chất của Công thức IA và hợp chất của Công thức IB theo sáng chế và Ví dụ số 37 từ tài liệu WO2015/082533 được thử về khả năng ức chế hoạt tính ROR γ của nó trong thử nghiệm gen báo cáo GAL4 ROR γ .

Quy trình thử nghiệm được mô tả dưới đây và các kết quả được thể hiện trong Bảng 1.

Hệ báo cáo một lai GAL4 sử dụng chỉ số đọc luciferaza đã được thiết lập để xác định sự ức chế ROR γ trong các tế bào 293FT. Vùng liên kết phối tử ROR γ (LBD) được dung hợp với vùng liên kết ADN GAL4 nấm men (DBD) và được đặt dưới sự kiểm soát của trình tự khởi động sớm trung gian cytomegalovirus (CMV) của người, sử dụng vector biểu hiện pFN26A (Promega) và phương pháp tách dòng ADN tái tổ hợp tiêu chuẩn. Để đóng vai trò kiểm soát trong thử nghiệm, vector tương tự được tạo ra trong đó GAL4-DBD được dung hợp với protein virus Herpes simplex 16 (VP16), chất hoạt hóa phiên mã cấu thành.

Để theo dõi tác dụng ức chế của hợp chất lên ROR γ , cấu trúc báo cáo phiên mã được sử dụng. Vector pGL4.35 (Promega) chứa chín bản sao của Trình tự hoạt hóa ngược dòng GAL4 (UAS). Trình tự này thúc đẩy phiên mã của gen báo cáo luciferaza

luc2P đáp ứng lại liên kết của protein dung hợp chứa vùng liên kết ADN GAL4, như ví dụ được biểu hiện bởi vector biểu hiện GAL4-ROR γ -LBD và GAL4-VP16 được mô tả ở trên. Để cho phép protein dung hợp GAL4 điều khiển biểu hiện của gen báo cáo luciferaza, vector biểu hiện pGL4.35 và vector biểu hiện protein dung hợp GAL4 thích hợp được biến nạp số lượng lớn trong các tế bào 293FT sử dụng các kỹ thuật biến nạp tiêu chuẩn.

Ngày sau biến nạp, tế bào được trải vào tấm 96 giếng, hợp chất thử được thêm và tấm được ủ qua đêm. Sau đó, hoạt tính luciferaza của đom đóm được định lượng sử dụng chất phản ứng dò luciferaza và chỉ số đọc phát quang.

Mô tả thử nghiệm chi tiết

Tế bào 293FT (Invitrogen) được biến nạp với vector biểu hiện protein dung hợp GAL4 (như được mô tả ở trên) và cấu trúc gen báo cáo phiên mã (pGL4.35, Promega). 60 μ L chất phản ứng biến nạp *TransIT*-293 (Mirus Bio) được thêm nhỏ giọt vào 1500 μ L môi trường huyết thanh giảm *Opti-MEM* I (Invitrogen) và được ủ ở nhiệt độ phòng (RT) trong 5 đến 20 phút. 1500 μ L hỗn hợp chất phản ứng này được thêm vào 5 μ g vector biểu hiện protein dung hợp GAL4 và 5 μ g cấu trúc gen báo cáo phiên mã, và ủ ở nhiệt độ phòng trong 20 phút.

Để thu được tế bào 293FT từ bình thót cổ T75, môi trường nuôi cấy thứ nhất được lấy khỏi tế bào. Tiếp đó, các tế bào được rửa bằng nước muối đệm phosphat (PBS) (Lonza), sau đó PBS được loại. Để tách tế bào, 1 ml *TrypLE* Express (Invitrogen) được thêm vào bình thót cổ, sau đó ủ ở nhiệt độ phòng đến khi nhìn thấy tế bào bắt đầu tách ra. Các tế bào được gom trong 5 mL môi trường thử nghiệm (môi trường nuôi cấy DMEM (Lonza), 10% FBS thẩm tách (Invitrogen) và Pen/Strep (Lonza)) để thu được huyền phù tế bào đơn. 10×10^6 tế bào quay xuống đáy và tạo huyền phù lại trong 10 mL môi trường thử nghiệm. Sau đó, huyền phù tế bào được thêm vào ống hỗn hợp biến nạp, và sau đó được chuyển toàn bộ sang bình thót cổ T75 (Greiner), sau đó ủ qua đêm (16-24 giờ) ở 37°C và 5% CO₂.

Để sàng lọc hợp chất, các tế bào đã được thu hoạch (như mô tả ở trên) và được tính. 13×10^6 tế bào quay xuống đáy, dịch nổi được hút và các tế bào được tạo huyền phù lại trong 17,3 mL môi trường thử nghiệm để thu được huyền phù tế bào bằng

$0,75 \times 10^6$ tế bào/mL. 80 μ L of huyền phù tế bào (60.000 tế bào) được trải mỗi giếng vào tấm sàng đáy trắng, phẳng, được xử lý nuôi cấy mô, 96 giếng (Greiner).

Hợp chất thử đã được pha loãng, bắt đầu từ 10 mM dung dịch gốc dimethylsulfoxit (DMSO), đến các dịch pha loãng hàng loạt trong DMSO với nồng độ thử nghiệm cuối cùng là 500 lần. Sau đó, các dung dịch này được pha loãng đến 5 lần nồng độ thử nghiệm cuối cùng trong hai bước pha loãng 10 lần trong môi trường thử nghiệm. Nồng độ DMSO cuối cùng của dung dịch hợp chất thử nghiệm 5 lần là 1%. 20 μ L dung dịch hợp chất thử nghiệm 5 lần được thêm vào mỗi giếng thử nghiệm của tấm 96 giếng được mạ trước đó bằng 80 μ L huyền phù tế bào, tạo ra nồng độ thử nghiệm cuối cùng với 0,2% DMSO.

Các tấm được ủ qua đêm (16-24 giờ) ở 37°C và 5% CO₂.

Đối với các chỉ số đọc luciferaza, chất phản ứng luciferaza (Britelite Plus, Perkin Elmer) đã được đưa đến nhiệt độ phòng. Thêm vào mỗi giếng thử nghiệm của tấm sàng lọc 100 μ L chất phản ứng Britelite Plus được pha loãng 2,5 lần, sau đó ủ ở nhiệt độ phòng trong 10 phút. Tín hiệu phát quang luciferaza được đo sử dụng thiết bị đọc vi tấm Wallac Victor (Perkin Elmer).

Giá trị nồng độ ức chế tối đa một nửa (IC₅₀) đối với hợp chất thử được tính toán từ tín hiệu luciferaza sử dụng phần mềm GraphPad Prism (phần mềm GraphPad).

Ví dụ 6 - Thử nghiệm IL-17 của tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC)

Các ví dụ 2-3 của sáng chế và Ví dụ số 37 từ tài liệu WO2015/082533 được thử về khả năng của nó ức chế sản xuất IL-17A trong tế bào đơn nhân máu ngoại vi được kích thích kháng CD3/kháng CD28 (PBMC) được phân lập từ máu của người. Quy trình thử nghiệm được mô tả dưới đây và các kết quả được thể hiện trong Bảng 1.

Thử nghiệm này được thiết kế để đo các mức IL-17A tiết ra từ PBMC được kích thích kháng CD3/kháng CD28 với mục đích đo sự ức chế sản xuất IL-17A trung gian bởi ROR γ .

Mô tả thử nghiệm chi tiết

Môi trường thử nghiệm chứa 90% RPMI 1640 (Lonza), 10% huyết thanh thai bò bất hoạt nhiệt (FBS, Lonza) và 100 U/mL dung dịch penixilin/streptomycin.

Kháng thể kháng CD3 (BD Pharmingen) được pha loãng đến 10 $\mu\text{g/ml}$ trong PBS (Lonza). 30 μL của dung dịch kháng CD3 10 $\mu\text{g/ml}$ được thêm vào 60 giếng bên trong của tấm đáy chữ U được xử lý môi trường nuôi cấy tế bào có 96 giếng (Greiner). Các tấm được ủ qua đêm (16-24 giờ) ở 37°C và 5% CO_2 .

Tế bào đơn nhân máu ngoại vi được tách từ da trâu (Sanquin) sử dụng môi trường tách Ficoll-Paque PREMIUM (GE Healthcare Life Sciences) theo hướng dẫn của nhà sản xuất và tạo huyền phù lại trong môi trường thử nghiệm ở 37°C.

Hợp chất thử đã được pha loãng, bắt đầu từ 10 mM dung dịch gốc dimethylsulfoxit (DMSO), đến các dịch pha loãng hàng loạt trong DMSO với nồng độ thử nghiệm cuối cùng là 200 lần. Sau đó, các dung dịch này được pha loãng trong hai bước pha loãng trong môi trường thử nghiệm đến 5 lần nồng độ thử nghiệm cuối. Nồng độ DMSO của dung dịch hợp chất thử nghiệm 5 lần là 2,5 %.

Kháng thể kháng CD28 (BD Pharmingen) được pha loãng đến 10 $\mu\text{g/mL}$ trong môi trường thử nghiệm. PBMC được pha loãng đến nồng độ bằng $2,2 \times 10^6$ tế bào/mL trong môi trường thử nghiệm ở 37°C.

Để sàng lọc hợp chất, các tấm được phủ kháng CD3 được rửa hai lần bằng PBS; các giếng sau đó được hút sử dụng chân không. Mỗi giếng sàng lọc 90 μL huyền phù PBMC, 30 μL dung dịch kháng CD28 và 30 μL dung dịch hợp chất thử 5 lần được thêm, dẫn đến nồng độ thử nghiệm cuối cùng với 0,5% DMSO. Tất cả các giếng bên ngoài được nạp PBS để ngăn bốc hơi. Các tấm được ủ trong 5 ngày ở 37°C và 5% CO_2 .

Sau khi ủ, các tấm được quay xuống ở 1500 rpm trong 4 phút và dịch nổi được gom. Sau đó, các mức IL-17A trong dịch nổi được xác định bằng cách sử dụng bộ kit IL-17A AlphaLISA (Perkin Elmer) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Giá trị nồng độ ức chế tối đa một nửa (IC_{50}) đối với hợp chất thử được tính toán từ tín hiệu IL-17A sử dụng phần mềm GraphPad Prism (phần mềm GraphPad).

Bảng 1

Ví dụ số	Thử nghiệm gen báo cáo GAL4 <i>RORγ</i> pIC ₅₀			<i>Thử nghiệm IL-17 của PBMC</i> pIC ₅₀		
	Trung bình	Độ lệch chuẩn	Số thử nghiệm	Trung bình	Độ lệch chuẩn	Số cho của người
37	7,9	0,2	5	7,9	0,2	11
2	7,4	0,2	5	7,2	0,2	11
3	7,9	0,2	5	7,6	0,3	11

Ví dụ 7 - Phương pháp kênh hERG

Ví dụ 2-3 của sáng chế và Ví dụ số 37 của tài liệu WO2015/082533 được thử trong ống nghiệm đối với kênh kali hERG (gen liên quan đến Ether-à-go-go của người). Quy trình thử nghiệm được mô tả dưới đây và các kết quả được thể hiện trong Bảng 2.

Mô tả thử nghiệm chi tiết

Các tế bào CHO (buồng trứng của chuột đồng Trung Quốc) đông lạnh biểu hiện ổn định các kênh hERG được rửa đông và được gieo trên nắp đáy thủy tinh trong các đĩa petri. Các tế bào được nuôi cấy trong môi trường F-12 HAM được bổ sung 10% huyết thanh thai bò, 100 IU/mL penixilin, 100 μ g/mL streptomycin và 500 μ g/mL G418 (Invitrogen, Carlsbad, CA) trong khí quyển có 95% không khí/5% CO₂ ở 37°C. Tế bào CHO sẵn sàng để kẹp và sau khi nuôi cấy trong 1-5 ngày. Dòng điện hERG được ghi ở nhiệt độ phòng bằng cách sử dụng kỹ thuật kẹp và toàn bộ tế bào với bộ khuếch đại Axopatch 200B (Thiết bị phân tử, Sunnyvale CA). Điện cực (điện trở 1-3 M Ω) được chế tạo từ các ống mao dẫn thủy tinh TW150F (World Precision Instruments, Sarasota, FL) và nạp đầy dung dịch chứa (tính bằng mM): kali aspartat 120; KCl 20; Na₂ATP 4; HEPES 5; MgCl₂ 1; pH 7,2 được điều chỉnh bằng KOH. Dung dịch ghi bên ngoài bao gồm (tính bằng mM): NaCl 130; KCl 4; natri axetat 2,8; MgCl₂ 1; HEPES, 10; glucoza 10; CaCl₂ 1 ở pH 7,4 được điều chỉnh bằng NaOH. Dòng điện hERG được suy ra bằng 2s xung khử cực đến +20 mV sau đó là tái cực đến -40 mV trong 1,6s từ -80 mV điện thế giữ ở tần số bằng 0,1 Hz. Dòng điện được phân tích bằng cách sử dụng bộ pCLAMP của phần mềm (Thiết

bị phân tử). Các giá trị IC_{50} của thuốc thu được bằng cách sử dụng dòng điện đuôi đỉnh trong bước -40 mV theo khớp bình phương nhỏ nhất không tuyến tính của dữ liệu (phần mềm GraphPad, Inc. San Diego, CA).

Ví dụ 8 - Phương pháp ức chế CYP3A4

Ví dụ 2-3 của sáng chế và Ví dụ số 37 từ tài liệu WO2015/082533 được về ức chế CYP3A4 sử dụng hai mẫu dò khác nhau: midazolam và testosterone.

Quy trình thử nghiệm được mô tả dưới đây và các kết quả được thể hiện trong Bảng 2.

Mô tả thử nghiệm chi tiết

Hợp chất thử được hòa tan trong DMSO ở các nồng độ chọn lọc được thêm vào đệm phosphat (50 mM, pH 7,4) chứa vi lập thể gan người (0,1 mg/mL), MgCl (6 mM) và EDTA (0,5 mM) và cơ chất dò CYP3A, hoặc là midazolam (3 μ M). Hợp chất thử được đánh giá ở các nồng độ 1, 3, 10 và 30 μ M và nồng độ DMSO cuối trong khi ủ là 0,5%. Sau khi thêm NADPH 1 M hỗn hợp được ủ ở 37°C trong 10 phút (midazolam) hoặc 30 phút (testosterone). Phản ứng được kết thúc bằng cách thêm CH₃CN lạnh chứa tiêu chuẩn nội bộ, được ly tâm và hình thành chất chuyển hóa đặc hiệu CYP3A (hoặc là 1'-hydroxymidazolam hoặc 6- β -hydroxytestosterone) được định lượng bằng UPLC-MS/MS. Hoạt tính CYP3A liên quan ở mỗi nồng độ thử được tính toán và các giá trị IC_{50} được xác định sử dụng XLfit.

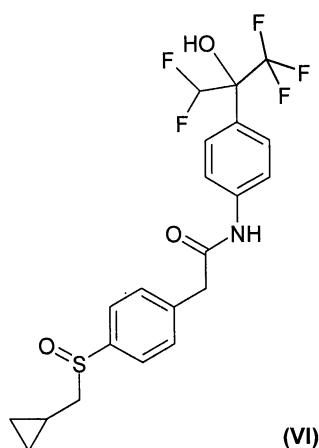
Bảng 2

Ví dụ số	Thử nghiệm ức chế CYP3A4 IC_{50} , μ M		Thử nghiệm ức chế hERG IC_{50} , μ M
	Mẫu dò Midazolam	Mẫu dò Testosterone	
37	10	2,8	4,3
2	24	13	14,2
3	> 30	16	11,2

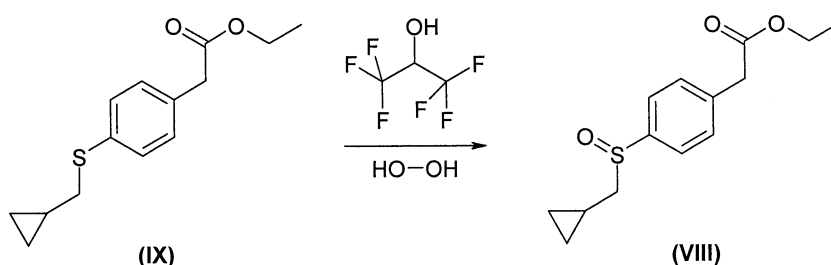
Sáng chế đề xuất hợp chất điều biến ROR γ mới, Ví dụ 2 và 3, mà ức chế hoạt tính ROR γ và nhờ đó cả ức chế hERG và ức chế CYP3A4 đều giảm khi so với hợp chất trong lĩnh vực (ví dụ 37 từ tài liệu WO2015/082533). Do đó thể hiện là hợp chất có (Công thức IA) và (Công thức IB) giới hạn các nguy cơ về vấn đề an toàn tim và tác dụng độc bất lợi tiềm ẩn liên quan đến tương tác thuốc-thuốc tương ứng trong khi duy trì hoạt tính điều biến ROR γ .

Ví dụ 9, 10, 11, 12 và 13: Tổng hợp tiền chất thuốc:

Ví dụ 9 - hợp chất có (Công thức VI): 2-[4-(xyclopropylmetylsulfinyl)phenyl]-N-[4-[1-(diflometyl)-2,2,2-triflo-1-hydroxy-etyl]phenyl]axetamit.



Bước 1:



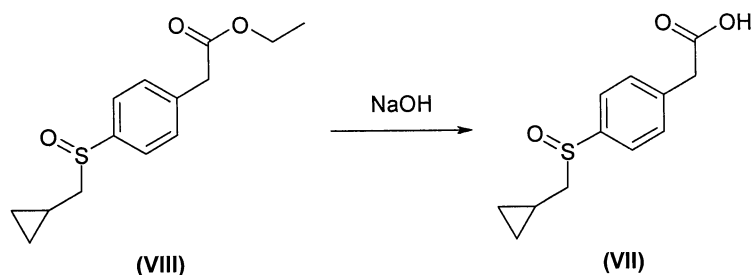
Trong bình thót cổ đáy tròn ba cổ 100mL đặt dưới khí argon, hydro peroxit (2,64 mL, 25,88 mmol, 30% trong nước) được thêm nhỏ giọt vào dung dịch của ethyl 2-[4-(xyclopropylmetylsulfanyl)phenyl]axetat (3 g, 11,98 mmol) trong 1,1,1,3,3,3-hexaflopropan-2-ol (12,53 mL, 113,84 mmol). Hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 30 phút ở nhiệt độ phòng, sau đó dung dịch nước 10% của natri thiosulfat (50 mL) được thêm, sau đó là nước muối (10 mL). Lớp nước được chiết hai lần bằng EtOAc. Chất chiết hữu cơ kết hợp được rửa bằng nước muối, được làm khô qua Na₂SO₄, được

lọc và được cô dưới áp suất giảm. Cặn được bỏ vào ACN (15 mL), được cô dưới áp suất giảm và được làm khô dưới chân không để thu được 3,16 g etyl 2-[4-(xyclopropylmetylsulfinyl)phenyl]axetat là chất rắn màu trắng.

MS(ES⁺) *m/z* 267,1 [M+H]⁺.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 7,62 (d, *J*=8,28 Hz, 2 H), 7,46 (d, *J*=8,28 Hz, 2 H), 4,09 (q, *J*=7,03 Hz, 2 H), 3,76 (s, 2 H), 2,72 - 2,87 (m, 2 H), 1,18 (t, *J*=7,15 Hz, 3 H), 0,82 - 0,96 (m, 1 H), 0,45 - 0,61 (m, 2 H), 0,19 - 0,36 (m, 2 H).

Bước 2:

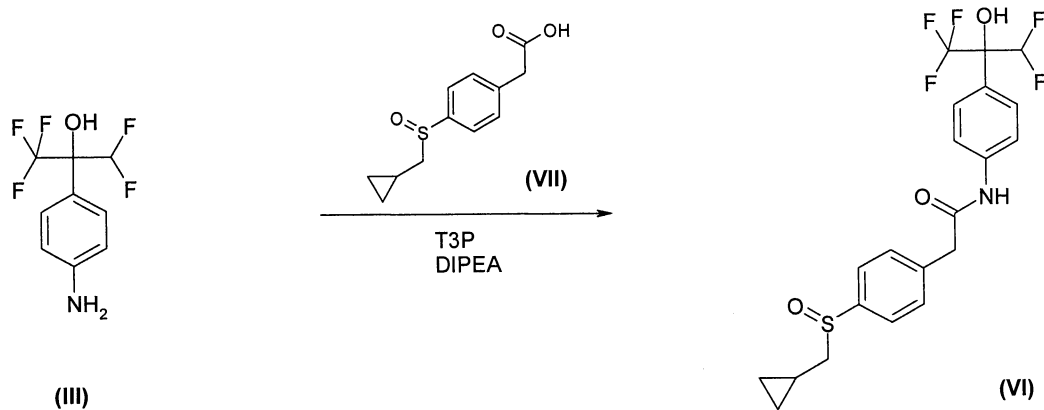


Trong bình thót cổ đáy tròn 100 mL, dung dịch nước 1M của natri hydroxit (5,41 mL, 5,41 mmol) được thêm vào dung dịch của etyl 2-[4-(xyclopropylmetylsulfinyl)phenyl]axetat (400 mg, 1,50 mmol) trong EtOH (25 mL). Hỗn hợp phản ứng được khuấy qua đêm ở nhiệt độ phòng và sau đó được cô dưới chân không. Cặn được bỏ vào nước, sau đó được axit hóa bằng dung dịch nước của HCl 1N đến khi đạt pH 1. Lớp nước được chiết ba lần bằng EtOAc. Lớp hữu cơ kết hợp được rửa một lần bằng nước muối, được làm khô qua Na₂SO₄, được lọc và được cô dưới chân không để thu được 306 mg 2-[4-(xyclopropylmetylsulfinyl)phenyl]axetic axit là chất rắn màu trắng.

MS(ES⁺) *m/z* 239,1 [M+H]⁺.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 7,61 (d, *J*=8,28 Hz, 2 H), 7,46 (d, *J*=8,28 Hz, 2 H), 3,66 (s, 2 H), 2,71 - 2,89 (m, 2 H), 0,85 - 0,96 (m, 1 H), 0,46 - 0,64 (m, 2 H), 0,20 - 0,36 (m, 2 H).

Bước 3:



2-(4-aminophenyl)-1,1,1,3,3-pentafluoro-2-propan-2-ol (151,8 mg, 0,63 mmol), N-ethyl-N-isopropyl-propan-2-amin (0,33 mL, 1,89 mmol) và 2,4,6-Tripropyl-1,3,5,2,4,6-trioxatriphosphinan 2,4,6-trioxit (50% trong DCM, 0,48 mL, 0,82 mmol, nhỏ giọt) được thêm vào dung dịch của 2-[4-(cyclopropylmethylsulfinyl)phenyl]acetic acid (150 mg, 0,63 mmol) trong DCM (25 mL), mà đã đặt dưới khí argon trong bể đá lạnh. Sau khi khuấy trong 30 phút, bể đá lạnh được loại và hỗn hợp phản ứng được khuấy qua đêm ở nhiệt độ phòng. Sau đó, DCM và nước được thêm, và lớp nước được chiết hai lần bằng DCM. Lớp hữu cơ kết hợp được rửa bằng dung dịch nước bão hòa của NaHCO_3 , với dung dịch HCl nước 0,5N, với nước, và cuối cùng với nước muối. Lớp hữu cơ được làm khô với Na_2SO_4 , được lọc và được cô dưới chân không. Cặn được tinh chế bằng sắc ký cột trên silica gel, sử dụng từ 98% đến 95% DCM trong MeOH làm chất rửa giải để tạo ra 206 mg 2-[4-(cyclopropylmethylsulfinyl)phenyl]-N-[4-[1-(difluoromethyl)-2,2,2-trifluoro-1-hydroxy-ethyl]phenyl]axetamid là bột màu trắng đục.

MS(ES⁺) m/z 462,0 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 10,35 (s, 1 H), 7,45 - 7,79 (m, 9 H), 6,38 - 6,88 (m, 1 H), 3,75 (s, 2 H), 2,67 - 2,90 (m, 2 H), 0,75 - 0,96 (m, 1 H), 0,45 - 0,62 (m, 2 H), 0,14 - 0,37 (m, 2 H).

Các ví dụ 10, 11, 12 và 13:

Các chất đồng phân lập thể VIA và VID được tách từ VI bằng sắc ký không đối xứng sử dụng cột Chiralpak AD 20 μm , 350 x 76,5mm và pha động, Heptan:EtOH 50:50, 400 mL/phút với dò UV ở 254 nm.

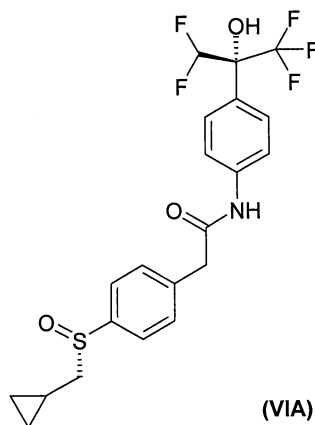
Bắt đầu từ 160 mg chất triệt quang trong 100 mL Heptan:EtOH 50:50, một dịch tiêm của dung dịch được thực hiện để thu được, sau khi cô đặc, 34 mg của Ví dụ 10 (chất đồng phân đối hình thứ nhất được rửa giải), 35 mg Ví dụ 13 (chất đồng phân đối hình cuối cùng được rửa giải), và 70 mg hỗn hợp của Ví dụ 11 và 12.

Các chất đồng phân lập thể VIB và VIC được tách từ hỗn hợp tương ứng bằng sắc ký không đối xứng sử dụng cột Xenluloza-4 5 μ m, 250 x 4,6mm và pha động, Heptan:EtOH 70:30, 45 mL/phút với dò UV ở 254 nm.

Bắt đầu từ 70 mg hỗn hợp trong 8 mL EtOH, bốn dịch tiêm của dung dịch được thực hiện để thu được, sau khi cô đặc, 29 mg của VIB (chất đồng phân đối hình thứ nhất được rửa giải) và 30 mg của VIC.

Ví dụ 10 - hợp chất có (Công thức VIA): (-)-2-[4-[(S)-xyclopropylmetylsulfinyl]phenyl]-N-[4-[(1R)-1-(diflometyl)-2,2,2-triflo-1-hydroxy-ethyl]phenyl]axetamit.

Cấu hình tuyệt đối được chỉ định tùy tiện.



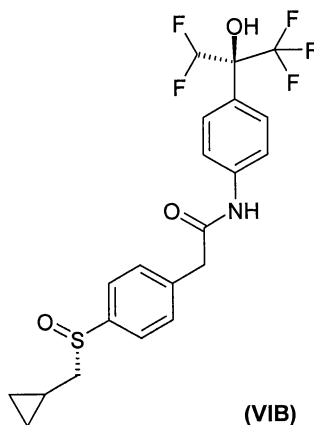
MS(ES⁺) m/z 462,2 [M+H]⁺.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 10,35 (s, 1 H), 7,66 (m, 3 H), 7,63 (d, $J=8,4$ Hz, 2 H), 7,56 (d, $J=9,0$ Hz, 2 H), 7,52 (d, $J=8,4$ Hz, 2 H), 6,64 (t, $J=53,2$ Hz, 1 H), 3,75 (s, 2 H), 2,82 (dd, $J=6,9$ và 13,3 Hz, 1 H), 2,74 (dd, $J=7,7$ và 13,3 Hz, 1 H), 0,89 (m, 1 H), 0,49 đến 0,58 (m, 2 H), 0,23 đến 0,33 (m, 2 H).

Sự quay quang: $[\alpha]_D^{20} = -63,6^\circ$ (c = 3,8 mg/mL, DMSO).

Ví dụ 11 - hợp chất có (Công thức VIB): (-)-2-[4-[(S)-xyclopropylmethylsulfinyl]phenyl]-N-[4-[(1S)-1-(diflometyl)-2,2,2-triflo-1-hydroxy-ethyl]phenyl]axetamit.

Cấu hình tuyệt đối được chỉ định tùy tiện.



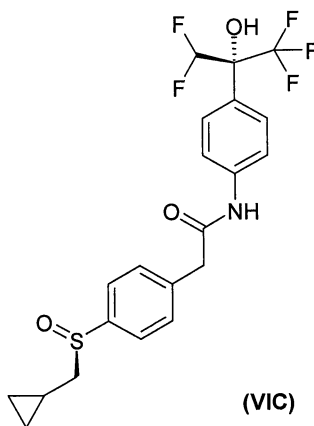
MS(ES⁺) *m/z* 462,2 [M+H]⁺.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 10,35 (s, 1 H), 7,66 (m, 3 H), 7,63 (d, *J*=8,4 Hz, 2 H), 7,56 (d, *J*=9,0 Hz, 2 H), 7,52 (d, *J*=8,4 Hz, 2 H), 6,64 (t, *J*=53,2 Hz, 1 H), 3,75 (s, 2 H), 2,82 (dd, *J*=6,9 và 13,3 Hz, 1 H), 2,74 (dd, *J*=7,7 và 13,3 Hz, 1 H), 0,89 (m, 1 H), 0,49 đến 0,58 (m, 2 H), 0,23 đến 0,33 (m, 2 H).

Sự quay quang: [α]_D²⁰ = -83,1° (*c* = 4,2 mg/mL, DMSO).

Ví dụ 12 - hợp chất có (Công thức VIC): (+)-2-[4-[(R)-xyclopropylmethylsulfinyl]phenyl]-N-[4-[(1R)-1-(diflometyl)-2,2,2-triflo-1-hydroxy-ethyl]phenyl]axetamit.

Cấu hình tuyệt đối được chỉ định tùy tiện.



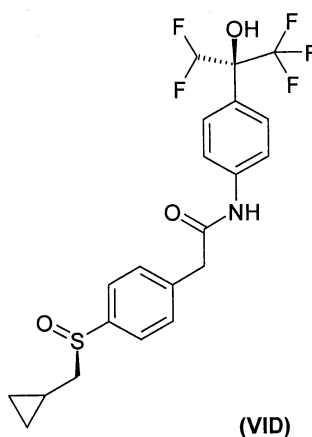
MS(ES⁺) m/z 462,0 [M+H]⁺.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 10,35 (s, 1 H), 7,66 (m, 3 H), 7,63 (d, $J=8,4$ Hz, 2 H), 7,56 (d, $J=9,0$ Hz, 2 H), 7,52 (d, $J=8,4$ Hz, 2 H), 6,64 (t, $J=53,4$ Hz, 1 H), 3,75 (s, 2 H), 2,82 (dd, $J=6,9$ và 13,3 Hz, 1 H), 2,74 (dd, $J=7,7$ và 13,3 Hz, 1 H), 0,89 (m, 1 H), 0,49 đến 0,58 (m, 2 H), 0,23 đến 0,33 (m, 2 H).

Sự quay quang: $[\alpha]_D^{20} = +85,6^\circ$ ($c = 5,8$ mg/mL, DMSO).

Ví dụ 13 - hợp chất có (Công thức VID): (+)-2-[4-[(R)-xyclopropylmethylsulfinyl]phenyl]-N-[4-[(1S)-1-(diflometyl)-2,2,2-triflo-1-hydroxy-ethyl]phenyl]axetamit.

Cấu hình tuyệt đối được chỉ định tùy tiện.



MS(ES⁺) m/z 462,0 [M+H]⁺.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 10,35 (s, 1 H), 7,66 (m, 3 H), 7,63 (d, $J=8,4$ Hz, 2 H), 7,56 (d, $J=9,0$ Hz, 2 H), 7,52 (d, $J=8,4$ Hz, 2 H), 6,64 (t, $J=53,4$ Hz, 1 H), 3,75 (s, 2 H), 2,82 (dd, $J=6,9$ và 13,3 Hz, 1 H), 2,74 (dd, $J=7,7$ và 13,3 Hz, 1 H), 0,89 (m, 1 H), 0,49 đến 0,58 (m, 2 H), 0,23 đến 0,33 (m, 2 H).

Sự quay quang: $[\alpha]_D^{20} = +60,9^\circ$ ($c = 3,8$ mg/mL, DMSO).

Ví dụ 14 - Độ tan cân bằng trong nước

Chế phẩm mẫu

Hợp chất nghiên cứu được cân chính xác với nồng độ đích bằng 2 mg/mL trong đệm phosphat trong nước (50mM ở pH=7,4). Dung dịch được rung lắc qua đêm (máy rung rock'n roll) ở nhiệt độ phòng và bảo vệ khỏi ánh sáng (khoảng 24 giờ). Dung

dịch được lọc trong thiết bị lọc tấm (vi tấm Millipore “Solvinert” với màng lọc PTFE tích hợp; 0,45 μm) và phần lọc được dùng liều bằng phương pháp LC/UV.

Chế phẩm tham khảo (tiêu chuẩn)

Hợp chất nghiên cứu được cân chính xác với nồng độ đích bằng 0,1 mg/mL trong DMSO. Dung dịch được siêu âm ở nhiệt độ phòng và bảo vệ khỏi ánh sáng. Dung dịch tham khảo được dùng liều bằng phương pháp LC/UV và pH của đoạn đã tan được đo.

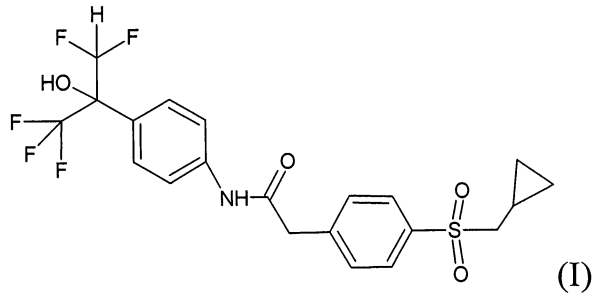
Bảng 3

Ví dụ số	Độ tan pH7,5*($\mu\text{g/mL}$)
2	<1,0
3	<1,0
9	99,4
10	94,8
11	92,5
12	94,4
13	93,0

*pH của đoạn đã tan.

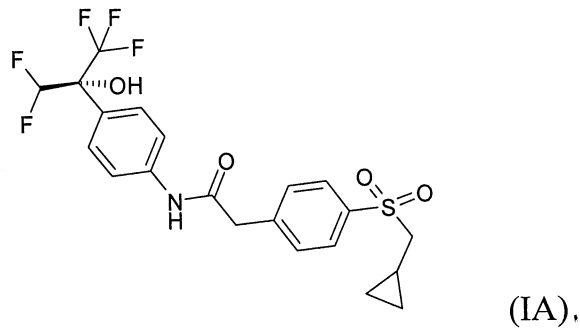
Yêu cầu bảo hộ

1. Hợp chất có công thức I :

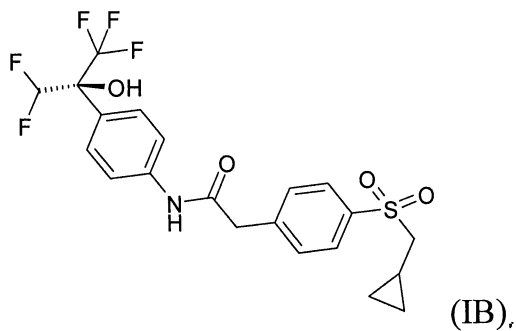


hoặc muối được dụng của nó.

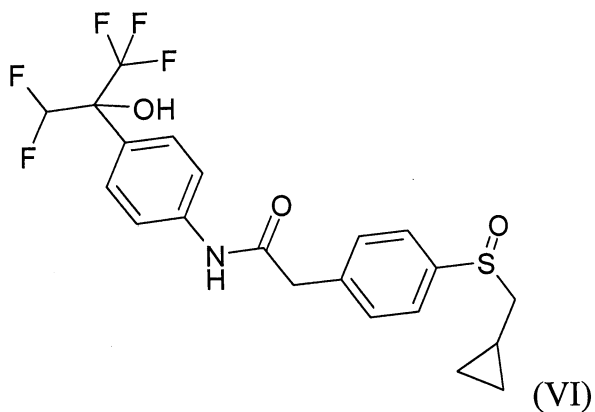
2. Hợp chất theo điểm 1, trong đó cấu hình tuyệt đối tương ứng với hợp chất có (Công thức IA), 2-{4-[(xyclopropylmetyl)sulfonyl]phenyl}-N-{4-[(1R)-1-(diflometyl)-2,2,2-triflo-1-hydroxyetyl]phenyl}axetamit:



3. Hợp chất theo điểm 1, trong đó cấu hình tuyệt đối tương ứng với hợp chất có (Công thức IB), 2-{4-[(xyclopropylmetyl)sulfonyl]phenyl}-N-{4-[(1S)-1-(diflometyl)-2,2,2-triflo-1-hydroxyetyl]phenyl}axetamit:



4. Hợp chất có công thức VI:



2-[4-(xyclopropylmethylsulfinyl)phenyl]-N-[4-[1-(diflometyl)-2,2,2-triflo-1-hydroxy-ethyl]phenyl]axetamit.

(-)-2-[4-[(S)-xyclopropylmethylsulfinyl]phenyl]-N-[4-[(1R)-1-(diflometyl)-2,2,2-triflo-1-hydroxy-ethyl]phenyl]axetamit.

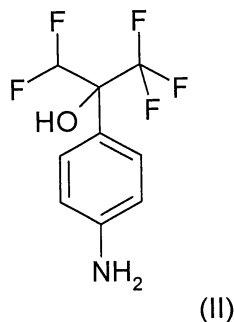
(-)-2-[4-[(S)-xyclopropylmethylsulfinyl]phenyl]-N-[4-[(1S)-1-(diflometyl)-2,2,2-triflo-1-hydroxy-ethyl]phenyl]axetamit.

(+)-2-[4-[(R)-xyclopropylmethylsulfinyl]phenyl]-N-[4-[(1R)-1-(diflometyl)-2,2,2-triflo-1-hydroxy-ethyl]phenyl]axetamit.

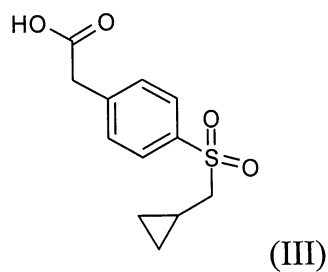
(+)-2-[4-[(R)-xyclopropylmethylsulfinyl]phenyl]-N-[4-[(1S)-1-(diflometyl)-2,2,2-triflo-1-hydroxy-ethyl]phenyl]axetamit.

hoặc muối được dụng của nó.

5. Quy trình điều chế hợp chất có (Công thức I) theo điểm 1, khác biệt ở chỗ, amin có công thức (II):



phản ứng với hợp chất có công thức (III):



6. Thuốc chứa hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4 hoặc muối được dụng của nó.
7. Dược phẩm chứa hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4 hoặc muối được dụng của nó và một hoặc nhiều tá dược được dụng.
8. Dược phẩm theo điểm 7, trong đó dược phẩm này còn chứa ít nhất một chất tác nhân hoạt tính chữa bệnh bổ sung.