



(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)



1-0034846

(51)⁷ C07D 271/08; C07D 413/04; A61K
31/4245; A61P 35/00

(13) B

(21) 1-2016-02054

(22) 07/11/2014

(86) PCT/US2014/064531 07/11/2014

(87) WO 2015/070007 14/05/2015

(30) 61/901,689 08/11/2013 US

(45) 27/02/2023 419

(43) 25/10/2016 343A

(73) INCYTE HOLDINGS CORPORATION (US)

1801 Augustine Cut-Off, Wilmington, DE 19803, United States of America

(72) TAO, Ming (US); FRIETZE, William (US); MELONI, David J. (US); WENG, Lingkai (US); ZHOU, Jiacheng (US); PAN, Yongchun (US).

(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) QUY TRÌNH TỔNG HỢP CHẤT ỨC CHẾ INDOLAMIN 2,3-ĐIOXYGENAZA

(57) Đơn yêu cầu cấp bằng độc quyền sáng chế này đề xuất các quy trình và các chất trung gian để tạo ra 4-({2-[(aminosulfonyl)amino]etyl}amino)-N-(3-bromo-4-florophenyl)-N'-hydroxy-1,2,5-oxadiazol-3-carboximidamit, là chất ức chế indolamin 2,3-đioxygenaza, có thể được dùng để điều trị bệnh ung thư và các rối loạn bệnh lý khác.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Đơn yêu cầu cấp bằng độc quyền sáng chế này đề cập đến quy trình và các chất trung gian để tạo ra 4-({2-[(aminosulfonyl)amino]etyl}amino)-N-(3-bromo-4-florophenyl)-N'-hydroxy-1,2,5-oxadiazol-3-carboximidamit, mà là chất ức chế indolamin 2,3-dioxygenaza có thể được dùng để điều trị bệnh ung thư và các rối loạn bệnh lý khác.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Tryptophan (Trp) là một axit amin thiết yếu cần thiết cho quy trình sinh tổng hợp các protein, niacin và chất dẫn truyền thần kinh 5-hydroxytryptamin (serotonin). Enzym indolamin 2,3-dioxygenaza (còn được gọi là INDO hoặc IDO) xúc tác bước thứ nhất và là bước giới hạn tốc độ trong quá trình thoái biến L-tryptophan thành N-formyl-kynurenin. Ở tế bào của người, hiện tượng cạn kiệt Trp do hoạt tính IDO gây ra là cơ chế tác động diệt vi khuẩn chủ yếu do gamma interferon (IFN- γ) gây ra. Sự kích thích IFN- γ gây hoạt hóa IDO, mà dẫn đến cạn kiệt Trp, nhờ đó làm dừng sự phát triển của tác nhân gây bệnh nội bào phụ thuộc Trp như *Toxoplasma gondii* và *Chlamydia trachomatis*. Hoạt tính IDO còn có tác dụng chống tăng sinh đối với nhiều tế bào của khối u, và quá trình cảm ứng bởi IDO được quan sát *in vivo* trong quá trình đào thải các khối u dị sinh, biểu thị vai trò tiềm năng đối với enzym này trong quá trình đào thải khối u (Daubener, *et al.*, 1999, *Adv. Exp. Med. Biol.*, 467: 517-24; Taylor, *et al.*, 1991, *FASEB J.*, 5: 2516-22).

Đã quan sát thấy rằng các tế bào HeLa mà đã được nuôi cấy cùng với các tế bào lympho của máu ngoại biên (peripheral blood lymphocytes - PBL) có được kiểu hình ức chế miễn dịch thông qua sự điều biến tăng hoạt tính IDO. Tin rằng hiện tượng giảm mức độ tăng sinh PBL khi điều trị bằng interleukin-2 (IL2) khiến IDO được giải phóng ra khỏi các tế bào của khối u đáp lại hiện tượng tiết IFNG nhờ PBL. Tác dụng này có thể bị đảo ngược bằng cách điều trị bằng 1-metyl-tryptophan (1MT), là chất ức chế IDO đặc hiệu. Đã có đề xuất rằng hoạt tính IDO ở các tế bào của khối u có thể có tác dụng làm suy yếu đáp ứng kháng u (Logan, *et al.*, 2002, *Immunology*, 105: 478-87).

Gần đây, vai trò điều biến miễn dịch của hiện tượng kiệt Trp đã được quan tâm đáng kể. Một vài bằng chứng gợi ý rằng IDO liên quan đến việc gây dung nạp miễn dịch. Các nghiên cứu về quá trình mang thai của động vật có vú, tính kháng khối u, tình trạng nhiễm khuẩn mạn tính và các bệnh tự miễn đã cho thấy rằng các tế bào biểu hiện IDO có

thể ức chế đáp ứng tế bào T và thúc đẩy sự dung nạp. Đã quan sát thấy sự dị hóa nhanh Trp ở các bệnh và các rối loạn bệnh lý liên quan đến sự hoạt hóa miễn dịch của tế bào, như nhiễm khuẩn, ác tính, các bệnh tự miễn và bệnh AIDS, cũng như trong thai kỳ. Ví dụ, đã quan sát thấy lượng IFN nhiều hơn và lượng cao hơn của các chất chuyển hóa Trp trong nước tiểu ở các bệnh tự miễn; đã có giả thiết rằng hiện tượng kiệt Trp toàn thân hoặc tại chỗ xuất hiện ở các bệnh tự miễn có thể liên quan đến các triệu chứng thoái biến và các triệu chứng gây hao mòn ở các bệnh lý này. Ủng hộ giả thuyết này, lượngIDO cao đã được quan sát ở các tế bào phân lập được từ hoạt dịch của khớp bị viêm. IFN cũng tăng ở các bệnh nhân nhiễm virus gây suy giảm miễn dịch ở người (HIV) và mức độ tăng IFN liên quan đến tiên lượng bệnh xấu đi. Do đó, đã có đề xuất rằng IDO được sinh ra một cách mạn tính do nhiễm HIV, và còn gia tăng hơn nữa do các hiện tượng nhiễm cơ hội, và rằng hiện tượng mất Trp mạn tính làm khởi phát cơ chế chịu trách nhiệm về chứng suy mòn, mất trí và bệnh tiêu chảy và có thể ức chế miễn dịch ở các bệnh nhân AIDS (Brown, *et al.*, 1991, *Adv. Exp. Med. Biol.*, 294: 425-35). Để đạt được mục đích này, đã phát hiện rằng sự ức chế IDO có thể làm gia tăng số lượng của tế bào T đặc hiệu đối với virus và đồng thời làm giảm số lượng của tế bào đơn nhân lớn bị nhiễm bởi virus ở mô hình chuột mắc bệnh HIV (Portula *et al.*, 2005, *Blood*, 106: 2382-90).

Tin rằng, IDO đóng vai trò trong các quy trình ức chế miễn dịch mà ngăn cản sự đào thải bào thai trong tử cung. Hơn 40 năm trước, đã quan sát thấy rằng, trong thai kỳ, thai của động vật có vú khác hẳn về mặt di truyền sống sót cho dù bất kỳ điều gì được dự đoán theo miễn dịch học cấy ghép mô (Medawar, 1953, *Symp. Soc. Exp. Biol.* 7: 320-38). Việc tách mẹ và bào thai về mặt giải phẫu và tính non nớt về mặt kháng nguyên của bào thai không thể giải thích hoàn toàn sự sống sót quá trình ghép cùng loài ở bào thai. Gần đây, sự quan tâm đã tập trung vào khả năng dung nạp về mặt miễn dịch của cơ thể mẹ. Vì IDO được biểu hiện bởi các tế bào hợp bào nuôi của người và nồng độ tryptophan toàn thân giảm trong thai kỳ bình thường, đã có giả thiết rằng sự biểu hiện IDO ở bề mặt chung giữa cơ thể mẹ và bào thai là cần thiết để ngăn ngừa đào thải về mặt miễn dịch ghép cùng loài bào thai. Để thử nghiệm giả thuyết này, chuột nhất mang thai (mang bào thai giống hệt về mặt di truyền hoặc bào thai dị sinh) được cho tiếp xúc với 1MT, và quan sát thấy sự đào thải nhanh tất cả các thai dị sinh do tế bào T gây ra. Do đó, bằng cách làm dị hóa tryptophan, thai của động vật có vú dường như ngăn chặn hoạt tính của tế bào T và bảo vệ chính nó không bị đào thải, và phong bế dị hóa tryptophan trong quá trình mang

thai ở chuột to cho phép các tế bào T của cơ thể mẹ gây ra hiện tượng đào thải cấy ghép bào thai (Munn, *et al.*, 1998, *Science*, 281: 1191-3).

Bằng chứng tiếp theo về cơ chế kháng miễn dịch của khối u nhờ thoái biến tryptophan bởi IDO xuất phát từ quan sát thấy rằng hầu hết các loại u của người đều biểu hiện IDO theo cách cơ định, và sự biểu hiện đó của IDO bởi các tế bào sinh miễn dịch trong khối u của chuột ngăn cản quá trình đào thải chúng ở chuột nhắt đã được gây miễn dịch sơ bộ. Tác dụng này đi kèm với hiện tượng thiếu tích tụ các tế bào T đặc hiệu ở vị trí khối u và có thể bị lại giống một phần bởi việc điều trị toàn thân chuột nhắt bằng chất ức chế IDO, khi không có độc tính đáng chú ý. Do đó, đã có gợi ý rằng hiệu quả của tác dụng tiêu diệt nhằm mục đích chữa bệnh đối với các bệnh nhân ung thư có thể được cải thiện bằng cách dùng đồng thời chất ức chế IDO (Uyttenhove *et al.*, 2003, *Nature Med.*, 9: 1269-74). Cũng đã thấy rằng chất ức chế IDO, 1-MT, có thể có tác dụng hiệp đồng với các tác nhân hóa trị liệu để khử mức độ sinh trưởng của khối u ở chuột nhắt, cho thấy rằng việc ức chế IDO còn có thể làm gia tăng hoạt tính điều trị u của các phép điều trị thông thường độc đối với tế bào (Muller *et al.*, 2005, *Nature Med.*, 11: 312-9).

Một cơ chế góp phần vào hiện tượng không đáp ứng về mặt miễn dịch học đối với các loại u có thể là sự thể hiện các kháng nguyên của khối u bởi các APC gây dung nạp của vật chủ. Phân nhóm gồm các tế bào thể hiện kháng nguyên (antigen-presenting cell - APC) biểu hiện IDO của người mà đồng thời biểu hiện CD123 (IL3RA) và CCR6 và ức chế sự tăng sinh của tế bào T cũng đã được bộc lộ. Cả các tế bào tua thành thực và chưa thành thực tương tác với CD123 ức chế hoạt tính của tế bào T, và tác dụng ức chế IDO này bị phong bế bởi 1MT (Munn, *et al.*, 2002, *Science*, 297: 1867-70). Đã có biểu hiện rằng hạch bạch huyết dẫn khối u (tumor-draining lymph node - TDLN) của chuột chứa phân nhóm gồm các tế bào tua của u tương bào (plasmacytoid dendritic cell - pDC) mà biểu hiện theo cách cơ định lượng IDO có tác dụng ức chế miễn dịch. Mặc dù chỉ chứa 0,5% tế bào hạch bạch huyết, *in vitro*, các pDC này ngăn chặn một cách hiệu nghiệm đáp ứng của tế bào T đối với các kháng nguyên đã được thể hiện bằng chính các pDC và, theo cách vượt trội, còn ngăn chặn các đáp ứng của tế bào T đối với các kháng nguyên bên thứ ba đã được thể hiện bằng các APC không mang tính ngăn chặn. Trong quần thể pDC, phần lớn hoạt tính ngăn chặn được thể hiện bởi IDO chức năng khác biệt với phân nhóm pDC mới đồng thời biểu hiện CD19 đánh dấu dòng B. Do đó, đã có giả thiết rằng sự ngăn chặn do IDO gây ra bởi pDC ở TDLN tạo ra môi trường vi mô tại chỗ mà có tính chất

ngăn chặn một cách hiệu nghiệm đáp ứng của tế bào T chống khối u của vật chủ (Munn, *et al.*, 2004, *J. Clin. Invest.*, 114(2): 280–90).

IDO làm thoái biến gốc indol của tryptophan, serotonin và melatonin, và khởi phát quá trình sản sinh các chất chuyển hóa có hoạt tính thần kinh và các chất chuyển hóa điều biến miễn dịch, được gọi chung là kynurenin. Bằng cách làm kiệt tại chỗ tryptophan và làm tăng kynurenin dẫn đến làm chết tế bào theo chương trình, IDO được biểu hiện bởi các tế bào tua (DC) có thể tác động đáng kể đến khả năng tăng sinh và sống sót của tế bào T. Quá trình cảm ứng bởi IDO ở DC có thể là cơ chế chung đối với việc dung nạp xóa bỏ được dẫn bởi tế bào T điều hòa. Vì các đáp ứng gây dung nạp này có thể được mong đợi xảy ra trong nhiều loại tình trạng sinh bệnh lý, nên việc chuyển hóa tryptophan và sản sinh kynurenin có thể là giao diện quan trọng giữa hệ miễn dịch và hệ thần kinh (Grohmann, *et al.*, 2003, *Trends Immunol.*, 24: 242-8). Ở trạng thái kích hoạt miễn dịch liên tục, mức độ sẵn có của Trp huyết thanh tự do bị giảm bớt và, do hệ quả của việc giảm mức sản sinh serotonin, nên các chức năng của serotonin cũng có thể bị ảnh hưởng (Wirleitner, *et al.*, 2003, *Curr. Med. Chem.*, 10: 1581-91).

Một cách đáng ngạc nhiên, đã quan sát thấy rằng việc dùng interferon- α gây ra các tác dụng phụ về mặt tâm lý thần kinh, như các triệu chứng trầm cảm và các thay đổi về chức năng nhận thức. Ảnh hưởng trực tiếp đến việc dẫn truyền thần kinh của serotonin có thể góp phần vào các tác dụng phụ này. Ngoài ra, vì việc hoạt hóa IDO dẫn đến lượng tryptophan, là tiền chất của serotonin (5-HT), giảm nên IDO có thể đóng vai trò trong các tác dụng phụ về mặt tâm lý thần kinh này bằng cách khử mức độ tổng hợp 5-HT trung tâm. Hơn thế nữa, các chất chuyển hóa kynurenin như 3-hydroxy-kynurenin (3-OH-KYN) và axit quinolinic (QUIN) có các tác dụng độc đối với chức năng của não. 3-OH-KYN có khả năng gây ra căng thẳng do oxy hóa bằng cách tăng mức độ sản sinh các loại oxy có hoạt tính phản ứng (ROS), và QUIN có thể tạo ra kích thích quá mức các thụ thể N-methyl-D-aspartat (NMDA) vùng hải mã, mà dẫn đến việc làm chết tế bào theo chương trình và teo vùng hải mã. Cả hiện tượng sản sinh ROS quá mức và hiện tượng teo vùng hải mã gây ra bởi kích thích NMDA quá mức đều có liên quan đến chứng trầm cảm (Wichers and Maes, 2004, *J. Psychiatry Neurosci.*, 29: 11–17). Do đó, hoạt tính IDO có thể đóng vai trò đối với chứng trầm cảm.

Các chất phân tử nhỏ ức chế của IDO đang được phát triển để điều trị hoặc ngăn ngừa các bệnh liên quan đến IDO như các bệnh nêu trên. Ví dụ, oxadiazol và các chất ức

chếIDO dị vòng khác được thông báo trong công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số US 2006/0258719 và US 2007/0185165. Công bố đơn PCT số WO 99/29310 thông báo về các phương pháp làm thay đổi tính miễn dịch gián tiếp do tế bào T gây ra bao gồm việc làm thay đổi nồng độ ngoại bào tại chỗ của tryptophan và các chất chuyển hóa tryptophan, bằng cách sử dụng chất ức chếIDO như 1-metyl-DL-tryptophan, p-(3-benzofuranyl)-DL-alanin, p-[3-benzo(b)thienyl]-DL-alanin, và 6-nitro-L-tryptophan (Munn, 1999). Các phương pháp tạo ra các tế bào thể hiện kháng nguyên để làm gia tăng hoặc giảm khả năng dung nạp của tế bào T (Munn, 2003) đã được thông báo trong công bố đơn quốc tế số WO 03/087347, cũng đã được công bố trong patent châu Âu số 1501918. Các hợp chất indolamin-2,3-dioxygenaza (IDO) có hoạt tính ức chế còn được thông báo trong công bố đơn quốc tế số WO 2004/094409; và công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 2004/0234623 đề xuất các phương pháp điều trị đối tượng mắc bệnh ung thư hoặc nhiễm khuẩn bằng cách dùng chất ức chế indolamin-2,3-dioxygenaza kết hợp với phương thức điều trị bệnh khác.

Dựa vào các dữ liệu thử nghiệm biểu thị vai trò đối vớiIDO trong khả năng ức chế miễn dịch, tính kháng và/hoặc đào thải khối u, tình trạng nhiễm khuẩn mạn tính, nhiễm HIV, AIDS (kể cả các biểu hiện của nó như chứng suy mòn, mất trí và bệnh tiêu chảy), các bệnh tự miễn hoặc các rối loạn (như bệnh viêm đa khớp dạng thấp), và dung nạp miễn dịch và ngăn ngừa đào thải thai *in utero*, các tác nhân xử lý hướng đến ngăn chặn thoái biến tryptophan bằng cách ức chế hoạt tínhIDO là điều mong muốn. Các chất ức chế củaIDO có thể được sử dụng để hoạt hóa các tế bào T và do đó làm gia tăng mức độ hoạt hóa tế bào T khi các tế bào T bị ngăn chặn bởi quá trình thai, khối u ác tính hoặc virus như HIV. Việc ức chếIDO còn có thể là chiến lược điều trị bệnh quan trọng đối với các bệnh nhân mắc các bệnh thần kinh hoặc các bệnh tâm lý thần kinh hoặc các rối loạn bệnh lý như chứng trầm cảm.

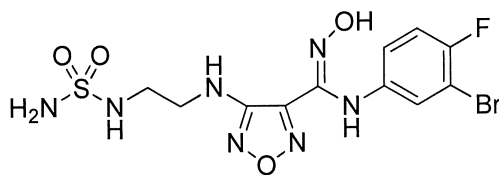
Do tính hữu dụng của các chất ức chếIDO, có nhu cầu phát triển quy trình mới để tạo ra các chất ức chếIDO. Đơn yêu cầu cấp bằng độc quyền sáng chế này nhằm giải quyết nhu cầu đó và các nhu cầu khác.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là giải quyết các nhu cầu nêu trên. Do đó, sáng chế đề xuất các quy trình và chất trung gian để tạo ra 4-({2-[(aminosulfonyl)amino]etyl}amino)-N-(3-bromo-4-florophenyl)-N'-hydroxy-1,2,5-oxadiazol-3-carboximidamit, là chất ức chế

indolamin 2,3-dioxygenaza có tác dụng điều trị bệnh ung thư và các rối loạn bệnh lý khác.

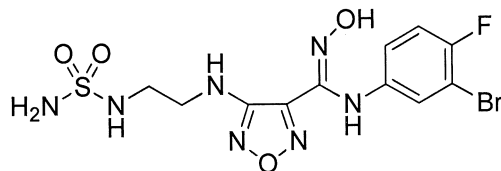
Hợp chất 4-({2-[(aminosulfonyl)amino]etyl}amino)-N-(3-bromo-4-florophenyl)-N'-hydroxy-1,2,5-oxadiazol-3-carboximidamit có Công thức I:



I

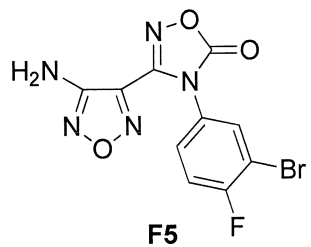
là chất ức chế enzyme indolamin 2,3-dioxygenaza (còn được gọi là IDO). Hợp chất có công thức I, cũng như quy trình điều chế và sử dụng nó, đã được bộc lộ trong patent Mỹ số 8,088,803, mà nội dung của tài liệu này được đưa vào đây hoàn toàn bằng cách viện dẫn. Các chất trung gian và các quy trình theo sáng chế giúp thỏa mãn nhu cầu hiện tại về việc phát triển của các chất ức chế IDO dùng để điều trị các bệnh lý nghiêm trọng.

Đơn yêu cầu cấp bằng độc quyền sáng chế này đề xuất, trong số nhiều đối tượng khác, các chất trung gian và các quy trình điều chế hợp chất có công thức I:

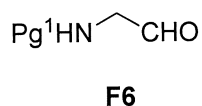


I

Do đó, đơn yêu cầu cấp bằng độc quyền sáng chế này đề xuất quy trình bao gồm việc cho hợp chất có công thức F5:

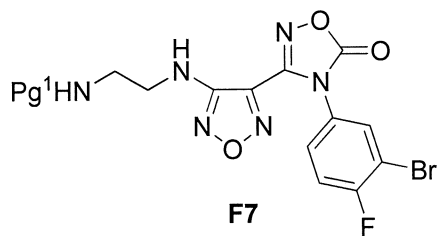


phản ứng với aldehyt có công thức F6:



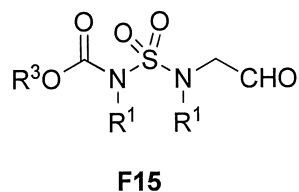
F6

để tạo ra hợp chất có công thức F7:

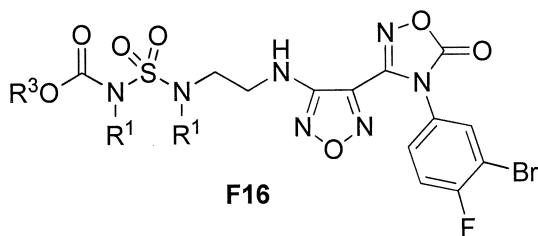


trong đó Pg¹ được định nghĩa dưới đây.

Đơn yêu cầu cấp bằng độc quyền sáng chế này còn đề xuất quy trình bao gồm việc cho hợp chất có công thức F15:

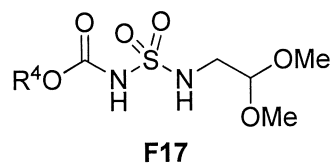


phản ứng với hợp chất có công thức F5 để tạo ra hợp chất có công thức F16:

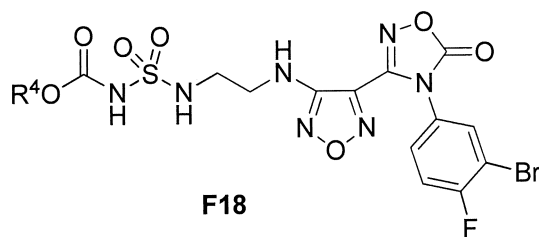


trong đó R¹ và R³ được xác định dưới đây.

Đơn yêu cầu cấp bằng độc quyền sáng chế này còn đề xuất quy trình bao gồm việc cho hợp chất có công thức F17:



phản ứng với hợp chất có công thức F5 để tạo ra hợp chất có công thức F18:



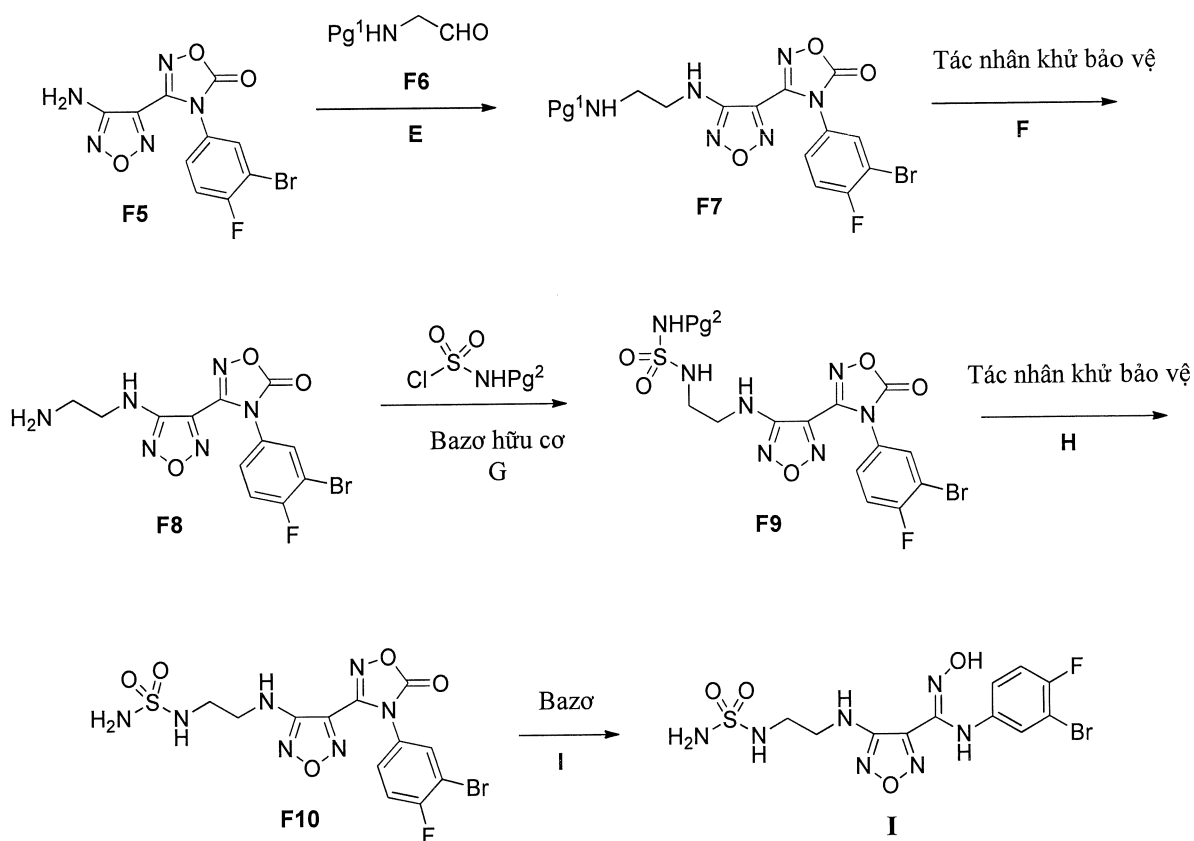
trong đó R⁴ được định nghĩa dưới đây.

Mô tả chi tiết sáng chế

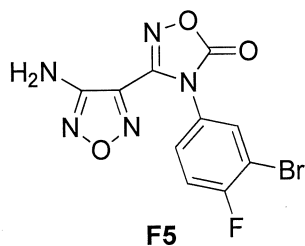
Trong khi một vài bước của các quy trình này được minh họa trong các Sơ đồ được thể hiện dưới đây, dự định rằng các bước riêng rẽ của quy trình có thể được yêu cầu bảo hộ một cách riêng rẽ hoặc theo cách kết hợp bất kỳ (ví dụ, trên Sơ đồ I, các bước E, F, G, H, và I có thể được yêu cầu bảo hộ một cách riêng rẽ hoặc kết hợp). Các quy trình này không nhằm để giới hạn ở quy trình tổng thể có từng bước và tất cả các bước trong các Sơ đồ dưới đây.

Do đó, sơ đồ chung để điều chế hợp chất có công thức I được bộc lộ trên Sơ đồ 1.

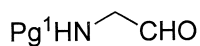
Sơ đồ 1



Do đó, sáng chế đề xuất quy trình bao gồm việc cho hợp chất có công thức F5:

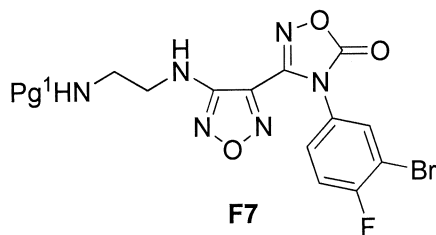


phản ứng với aldehyt có công thức F6:



F6

trong đó Pg^1 là nhóm bảo vệ amino, để tạo ra hợp chất có công thức F7:



F7

Các nhóm bảo vệ amin Pg^1 có thể được dùng để ngăn ngừa các phản ứng không mong muốn của nhóm amin trong khi thực hiện biến nạp mong muốn. Các nhóm bảo vệ amino cho phép dễ dàng gắn cộng hóa trị vào nguyên tử nitơ cũng như phân cắt chọn lọc ra khỏi nguyên tử nitơ. “Các nhóm bảo vệ amin” thích hợp, như alkoxycarbonyl (như etoxycarbonyl, *tert*-butoxycarbonyl (Boc), benzyloxycarbonyl (Cbz), 9-florenylmethyloxycarbonyl (Fmoc), và các nhóm tương tự), axyl (như axetyl (Ac), benzoyl (Bz), và các chất tương tự), sulfonyl (như metansulfonyl, triflometansulfonyl, và các nhóm tương tự), arylalkyl (như benzyl, 4-metoxybenzyl, diphenylmetyl, triphenylmetyl (trityl), và các nhóm tương tự), alkenylalkyl (như allyl, prenyl, và các nhóm tương tự), diarylmetylenyl (như $(\text{C}_6\text{H}_5)_2\text{C}=\text{N}$, và các nhóm tương tự), và silyl (như *tert*-butyldimetylsilyl, triisopropylsilyl, và các nhóm tương tự), mà chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này đã biết. Hóa học về các nhóm bảo vệ amino có thể được thấy trong tài liệu: Wuts and Greene, *Greene's Protective Groups in Organic Synthesis*, 4th Ed., pp 696-926, John Wiley & Sons: New York, 2006, mà nội dung của tài liệu này được đưa vào đây hoàn toàn bằng cách viện dẫn

Theo một số phương án, Pg^1 là etoxycarbonyl, *tert*-butoxycarbonyl, benzyloxycarbonyl, hoặc 9-florenylmethyloxycarbonyl.

Theo một số phương án, Pg^1 là C_{1-6} alkoxycarbonyl.

Theo một số phương án, Pg^1 là *tert*-butoxycarbonyl.

Các dung môi thích hợp cho Bước E bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, metanol hoặc tetrahydrofuran (THF), axetonitril và các dung môi tương tự. Các dung môi hydrocarbon đã được halogen hóa (tức là các alkan đã được halogen hóa, như điclorometan, clorofom, đicloetan hoặc tetracloetan) cũng có thể được sử dụng.

Theo một số phương án, phản ứng nêu trên được thực hiện trong thành phần dung môi chứa tetrahydrofuran. Thuật ngữ thành phần dung môi được dùng trong bản mô tả này có thể chỉ một dung môi hoặc hỗn hợp gồm các dung môi. Theo một số phương án, thành phần dung môi là dung môi hữu cơ. Theo một số phương án, phản ứng được thực hiện trong thành phần dung môi chứa dung môi hydrocacbon đã được halogen hóa. Theo một số phương án, dung môi hydrocacbon đã được halogen hóa là điclorometan.

Theo một số phương án, phản ứng nêu trên được thực hiện trong thành phần dung môi chứa axetonitril.

Theo một số phương án, phản ứng nêu trên được thực hiện trong thành phần dung môi chứa điclorometan và axetonitril.

Theo một số phương án, phản ứng nêu trên được thực hiện với sự có mặt của chất khử.

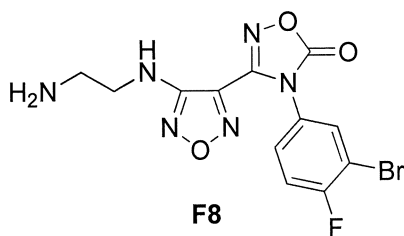
Chất khử có thể là hợp chất bất kỳ có khả năng khử hợp chất hữu cơ đến trạng thái oxy hóa thấp hơn. Việc khử thông thường bao gồm bước bổ sung các nguyên tử hydro hoặc loại bỏ các nguyên tử oxy khỏi nhóm. Ví dụ, các aldehyt như F6 có thể được khử với sự có mặt của amin có công thức F5 (Bước E, Sơ đồ 1) bằng cách bổ sung hydro, ở dạng khí hydro (H_2) vào hoặc bằng cách sử dụng chất phản ứng hydrua (như $NaB(OAc)_3H$, $NaBH_4$, $LiAlH_4$, và các chất tương tự); bằng cách sử dụng triphenylphosphin; hoặc bằng cách sử dụng kết hợp natri iotua, clotrimetylsilan, và metanol. Theo một số phương án, bước này có thể được thực hiện trong các điều kiện axit với sự có mặt của axit (như axit trifloaxetic). Theo một số phương án, bước này có thể được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ $-15^\circ C$ đến $30^\circ C$, ví dụ, từ $-15^\circ C$ đến $0^\circ C$, từ $-5^\circ C$ đến $5^\circ C$, từ $-5^\circ C$ đến $0^\circ C$, hoặc từ $0^\circ C$ đến $45^\circ C$.

Theo một số phương án, chất khử là chất khử bohydrua (ví dụ, $NaB(OAc)_3H$, $NaBH_4$, hoặc tác nhân khử hydrua khác chứa bo).

Theo một số phương án, chất khử bohydrua là natri triaxetoxibohydrua.

Theo một số phương án, phản ứng được thực hiện với sự có mặt của axit trifloaxetic.

Theo một số phương án, quy trình này còn bao gồm việc khử bảo vệ hợp chất có công thức F7 để tạo ra hợp chất có công thức F8:



Các tác nhân khử bảo vệ amino là hữu dụng cho bước F này là đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này, như các tác nhân trong tài liệu của Wuts và Greene (*nêu trên*). Cụ thể, các nhóm bảo vệ amino nêu trên có thể được loại ra một cách thích hợp bằng cách sử dụng nhiều tác nhân khử bảo vệ amino có sẵn mà đặc hiệu với các nhóm khác nhau nêu trên mà không ảnh hưởng đến phần mong muốn khác của hợp chất này. Nhóm *tert*-butoxycarbonyl có thể được loại ra (ví dụ, được thủy phân) khỏi nguyên tử nitơ, ví dụ, bằng cách xử lý bằng axit (như axit clohydric, axit trifloaxetic, axit toluensulfonic, và các chất tương tự); kết hợp các chất phản ứng (ví dụ, hỗn hợp gồm axetyl clorua và metanol) đã biết để tạo ra axit; hoặc axit Lewis (ví dụ, $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$). Nhóm benzyloxycarbonyl có thể được loại ra (ví dụ, được hydro phân) khỏi nguyên tử nitơ, ví dụ, bằng cách xử lý bằng hydro và chất xúc tác (như paladi trên cacbon).

Theo một số phương án, tác nhân khử bảo vệ amino là axit trifloaxetic. Theo một số phương án, tác nhân khử bảo vệ amino chứa axit trifloaxetic và >0,5% thể tích của nước, ví dụ, >1,0% thể tích của nước, >1,5% thể tích của nước, >2,0% thể tích của nước, nằm trong khoảng từ 2% đến 10% thể tích của nước, nằm trong khoảng từ 10% đến 20% thể tích của nước, hoặc nằm trong khoảng từ 20% đến 50% thể tích của nước. Theo một số phương án, tác nhân khử bảo vệ amino có thể là hỗn hợp gồm axit trifloaxetic và nước theo tỷ lệ thể tích khoảng 98:2. Theo một số phương án, tác nhân khử bảo vệ amino có thể là axit clohydric, tùy ý trong dung môi (ví dụ, nước, THF, đioxan, etyl axetat, v.v.). Theo một số phương án, thành phần dung môi là etyl axetat. Theo một số phương án, tác nhân khử bảo vệ amino có thể là axit clohydric tùy ý trong dung môi như rượu (như isopropanol, metanol hoặc etanol). Các dung môi hydrocacbon đã được halogen hóa (ví dụ, điclorometan, clorofom, đicloetan hoặc tetracloetan) cũng có thể được sử dụng. Theo một số phương án, tỷ lệ phân tử gam của axit clohydric và hợp chất có công thức F7 là khoảng 6,0, khoảng 5,0, khoảng 4,0, khoảng 3,0, khoảng 2,0, khoảng 1,0, hoặc khoảng 1,1. Theo một số phương án, bước F có thể được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ -10°C đến 60°C , ví dụ, từ -10°C đến 0°C , từ 0°C đến 25°C , nằm trong khoảng từ 25°C đến nhiệt độ 45°C , hoặc từ 45°C đến 60°C .

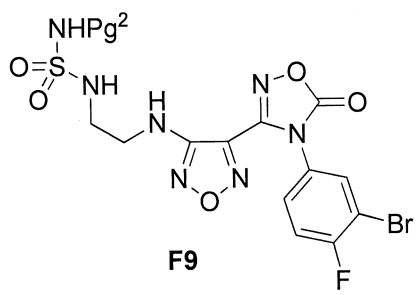
Theo một số phương án, việc khử bảo vệ bao gồm bước cho hợp chất có công thức F7 phản ứng với axit clohydric.

Theo một số phương án, việc khử bảo vệ bao gồm bước cho hợp chất có công thức F7 phản ứng với axit clohydric trong thành phần dung môi chứa isopropanol.

Theo một số phương án, việc khử bảo vệ bao gồm bước cho hợp chất có công thức F7 phản ứng với axit clohydric trong thành phần dung môi chứa dung môi hydrocacbon đã được halogen hóa.

Theo một số phương án, dung môi hydrocacbon đã được halogen hóa là điclometan.

Theo một số phương án, sáng chế còn bao gồm bước cho hợp chất có công thức F8 phản ứng với $\text{Pg}^2\text{-NH-SO}_2\text{-X}$, với sự có mặt của bazơ hữu cơ để tạo ra hợp chất có công thức F9:



trong đó:

Pg^2 là nhóm bảo vệ amino; và

X là halo.

Theo một số phương án, $\text{Pg}^2\text{-NH-SO}_2\text{Cl}$ có thể được điều chế và được dùng ngay lập tức trong phản ứng với hợp chất có công thức F8. Nhóm bảo vệ Pg^2 có thể được chọn từ nhóm bất kỳ trong số các nhóm bảo vệ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này để bảo vệ các amin hoặc các sulfonamid (như nhóm nêu trên dùng cho Pg^1). Theo một số phương án, Pg^2 có thể là nhóm alkoxycarbonyl (như *tert*-butoxycarbonyl).

Các dung môi thích hợp bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các dung môi hydrocacbon đã được halogen hóa như điclometan và các nhóm tương tự. Bazơ hữu cơ có thể là bazơ bất kỳ mà dùng để trung hòa HCl được tạo ra trong phản ứng của hợp chất có công thức F8 và clorua amino-sulfonyl được bảo vệ. Bazơ hữu cơ có thể bao gồm các amin không vòng bậc ba như tri(C_{1-6})alkylamin (ví dụ, triethylamin, diisopropyletylamin (DIPEA) và các chất tương tự), các amin vòng bậc ba (ví dụ, N-metyl piperidin, 1,4-

điazabicyclo[2.2.2]octan (DABCO) và các chất tương tự). Theo một số phương án, bazơ hữu cơ có thể là trietylamin. Theo một số phương án, bước này có thể được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ -15°C đến 60°C , ví dụ, từ -15°C đến 0°C , từ 0°C đến 25°C , nằm trong khoảng từ 25°C đến 45°C , hoặc từ 45°C đến 60°C .

Theo các phương án này, $\text{Pg}^2\text{-NH-SO}_2\text{Cl}$ có thể thu được theo phản ứng của rượu (như, etanol, rượu *tert*-butylic và các chất tương tự) với clorosulfonyl isoxyanat ($\text{ClS(O)}_2\text{NCO}$).

Theo một số phương án, Pg^2 là etoxycarbonyl, *tert*-butoxycarbonyl, benzyloxycarbonyl, hoặc 9-florenylmetyloxycarbonyl.

Theo một số phương án, Pg^2 là C_{1-6} alkoxy carbonyl.

Theo một số phương án, Pg^2 là *tert*-butoxycarbonyl.

Theo một số phương án, phản ứng được thực hiện trong thành phần dung môi chứa dung môi hydrocacbon đã được halogen hóa.

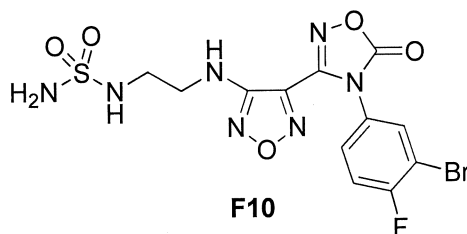
Theo một số phương án, dung môi hydrocacbon đã được halogen hóa là điclorometan.

Theo một số phương án, bazơ hữu cơ chứa tri(C_{1-6})alkylamin.

Theo một số phương án, bazơ hữu cơ là trietylamin.

Theo một số phương án, X là clo.

Theo một số phương án, sáng chế còn bao gồm bước khử bảo vệ hợp chất có công thức F9 để tạo ra hợp chất có công thức F10:

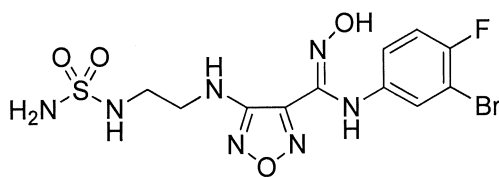


Theo một số phương án, các tác nhân khử bảo vệ thích hợp có thể bao gồm các tác nhân nêu trên để khử bảo vệ hợp chất có công thức F7.

Theo một số phương án, việc khử bảo vệ bao gồm bước cho hợp chất có công thức F9 phản ứng với axit clohydric. Theo một số phương án, việc khử bảo vệ bao gồm bước cho hợp chất có công thức F9 phản ứng với axit clohydric trong thành phần dung môi chứa rượu. Theo một số phương án, rượu là etanol. Theo một số phương án, việc khử bảo

vệ bao gồm bước cho hợp chất có công thức F9 phản ứng với axit clohydric trong thành phần dung môi chứa etyl axetat.

Theo một số phương án, sáng chế còn bao gồm bước cho hợp chất có công thức F10 phản ứng với bazơ để tạo ra hợp chất có công thức I:



I.

Bazơ có thể được sử dụng để chuyển hóa (ví dụ, thủy phân) vòng oxadiazolon trong F10 để lộ ra amidoxim ở hợp chất có công thức I, tùy ý trong dung môi (Bước I, Sơ đồ 1). Sự bảo vệ của amidoxim như oxadiazolon có thể được dùng để ngăn ngừa về tổng thể các phản ứng ngược của nhóm hydroxyl hoặc phản ứng của amidoxim. Bazơ có thể là bazơ vô cơ như hydroxit của kim loại kiềm (ví dụ, NaOH, LiOH, KOH, Mg(OH)₂, v.v.); hoặc bazơ hữu cơ như amin không vòng (ví dụ, triethylamin, diisopropyletylamin (DIPEA), v.v.) hoặc amin vòng (ví dụ, pyrrolidin, piperidin, v.v.). Bazơ có thể được sẵn có ở dạng nhựa (như Amberlite® và các loại tương tự). Theo một số phương án khác, bazơ có thể được cung cấp ở dạng dung dịch nước (ví dụ, khoảng dung dịch 0,5N, khoảng dung dịch 1N, khoảng dung dịch 1,5N, khoảng dung dịch 2,5N, dung dịch từ 3N đến 5N, dung dịch từ 5N đến 10N). Theo một số phương án, bazơ là hydroxit của kim loại kiềm (như, natri hydroxit). Theo một số phương án, bazơ có thể là dung dịch nước NaOH 2N. Theo một số phương án, dung môi có thể là etanol hoặc tetrahydrofuran (THF). Theo một số phương án, dung môi có thể là hỗn hợp gồm etanol và nước. Theo một số phương án, phản ứng của hợp chất có công thức F10 với bazơ để tạo ra hợp chất có công thức I có thể được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ -10°C đến 60°C, ví dụ, từ -10°C đến 20°C, từ 0°C đến 30°C, từ 0°C đến 10°C, hoặc từ 0°C đến 5°C.

Theo một số phương án, bazơ chứa hydroxit của kim loại kiềm.

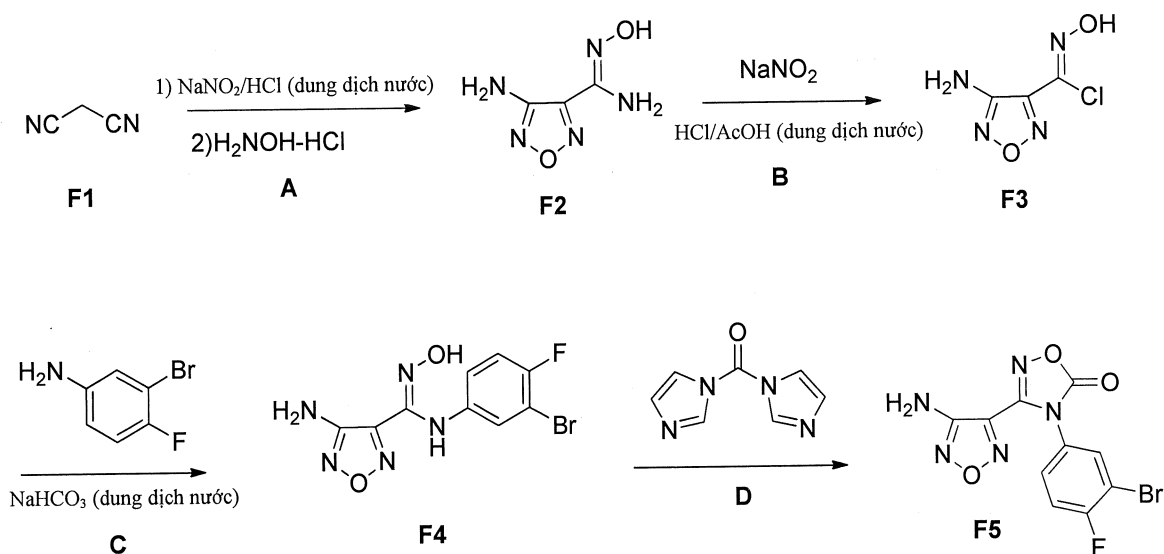
Theo một số phương án, hydroxit của kim loại kiềm là natri hydroxit.

Theo một số phương án, phản ứng được thực hiện trong thành phần dung môi chứa tetrahydrofuran, nước và etanol.

Theo một số phương án, hợp chất có công thức F5, có thể thu được theo trình tự các bước được thể hiện trên Sơ đồ 2. Việc điều chế chất trung gian, 4-amino-*N'*-hydroxy-

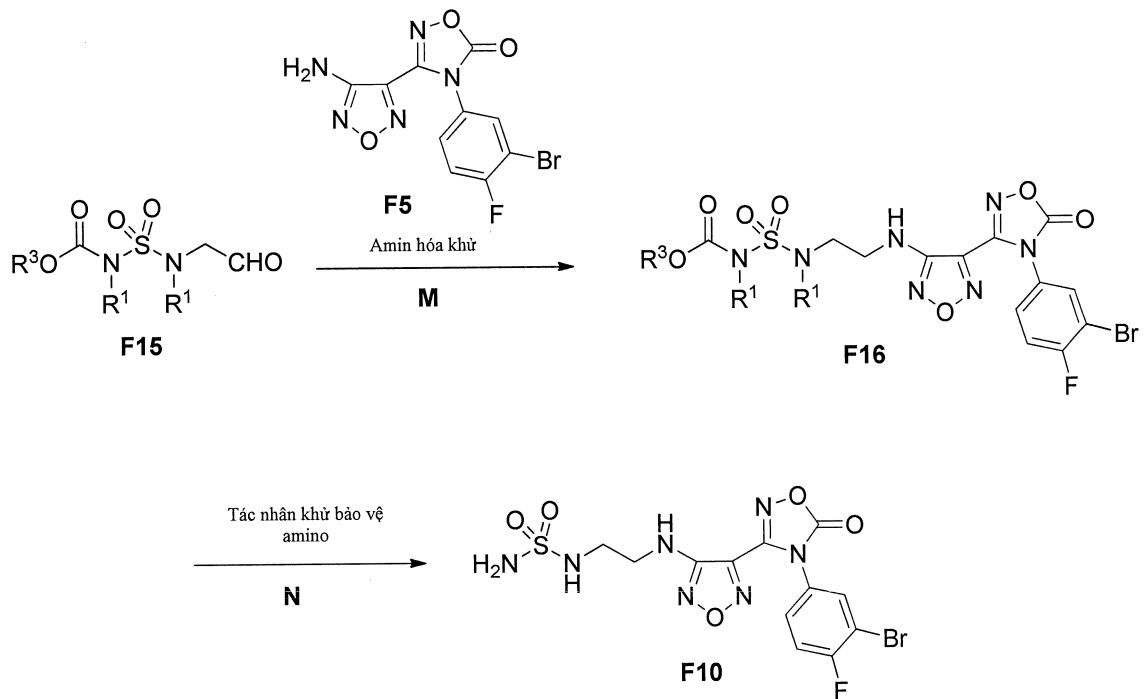
1,2,5-oxadiazol-3-carboximidamit F2, đã được bộc lộ trong tài liệu: *J. Heterocycl. Chem.* (1965), 2, 253, mà nội dung của tài liệu này được đưa vào đây hoàn toàn bằng cách viện dẫn, và sự chuyển hóa hợp chất này thành clo oxim F3 đã được bộc lộ trong tài liệu: *Synth. Commun.* (1988), 18, 1427, mà nội dung của tài liệu này được đưa vào đây hoàn toàn bằng cách viện dẫn. Theo một số phương án, clo oxim có công thức F3 có thể được liên hợp với 3-bromo-4-floanilin, tùy ý trong dung môi (như nước), tiếp theo bổ sung natri bicacbonat, để tạo ra amidoxim có công thức F4. Sau đó, nhóm chức amidooxim của hợp chất có công thức F4 có thể được chuyển hóa thành oxadiazolon hoặc Công thức F5 bằng cách sử dụng N,N-carbonyldiimidazol (DCI) trong dung môi (như etyl axetat, đioxan, THF và dung môi tương tự), ở nhiệt độ cao như khoảng 50°C, khoảng 60°C, khoảng 70°C, khoảng 80°C, khoảng 90°C, hoặc khoảng 100°C.

Sơ đồ 2

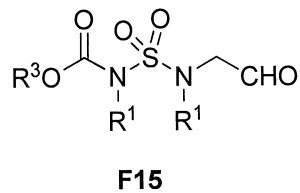


Theo cách khác, hợp chất có công thức F10 có thể thu được thông qua trình tự các bước được thể hiện trên Sơ đồ 3.

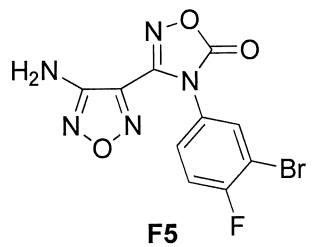
Sơ đồ 3



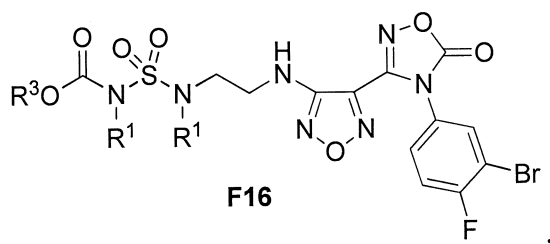
Theo một số phương án, đơn yêu cầu cấp bằng độc quyền sáng chế này đề xuất quy trình bao gồm bước cho hợp chất có công thức F15:



phản ứng với hợp chất có công thức F5:



để tạo ra hợp chất có công thức F16:



trong đó:

mỗi nhóm R^1 độc lập là nhóm bảo vệ amino; và

R^3 là C_{1-6} alkyl hoặc benzyl.

Theo một số phương án, R^1 là C_{2-4} alkenyl- C_{1-3} alkyl hoặc phenyl- C_{1-3} alkyl, trong đó phenyl- C_{1-3} alkyl tùy ý được thế bằng 1, 2, hoặc 3 nhóm C_{1-4} alkoxy được chọn độc lập.

Theo một số phương án, R^1 là C_{2-4} alkenyl- C_{1-3} alkyl hoặc phenyl- C_{1-3} alkyl, trong đó phenyl- C_{1-3} alkyl tùy ý được thế bằng 1, 2, hoặc 3 nhóm metoxy.

Theo một số phương án, R^1 là alyl.

Theo một số phương án, R^1 là 4-metoxybenzyl.

Theo một số phương án, R^3 là C_{1-6} alkyl.

Theo một số phương án, R^3 là *tert*-butyl.

Theo một số phương án, R^3 là C_{1-4} alkyl.

Theo một số phương án, R^3 là butyl.

Tốt hơn, nếu phản ứng này được thực hiện với sự có mặt của chất khử. Chất khử có thể là hợp chất bất kỳ có khả năng khử hợp chất hữu cơ đến trạng thái oxy hóa thấp hơn. Theo một số phương án, chất khử có thể là khí hydro với sự có mặt của chất xúc tác hoặc chất phản ứng hydrua (như $NaB(OAc)_3H$, $NaBH_4$, $LiAlH_4$ và các chất tương tự); bằng cách sử dụng triphenylphosphin; hoặc bằng cách sử dụng kết hợp natri iodua, clotrimetylsilan, và metanol. Theo một số phương án, bước này có thể được thực hiện với sự có mặt của axit như axit trifloaxetic. Các dung môi thích hợp đối với bước này bao gồm rượu isopropylic, THF, đioxan, hoặc các chất tương tự. Theo một số phương án, bước này có thể được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ $-15^\circ C$ đến $30^\circ C$, ví dụ, từ $-15^\circ C$ đến $0^\circ C$, từ $-5^\circ C$ đến $5^\circ C$, từ $-5^\circ C$ đến $0^\circ C$, từ 0 đến $5^\circ C$, hoặc từ $0^\circ C$ đến $45^\circ C$.

Theo một số phương án, phản ứng được thực hiện trong thành phần dung môi chứa tetrahydrofuran.

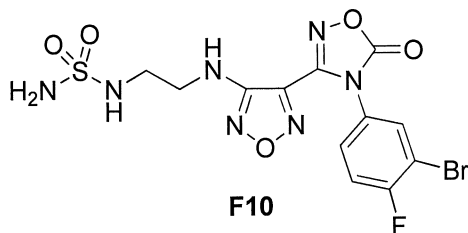
Theo một số phương án, phản ứng được thực hiện với sự có mặt của chất khử.

Theo một số phương án, chất khử là chất khử bohydrua.

Theo một số phương án, chất khử bohydrua là natri triaxetoxibohydrua.

Theo một số phương án, phản ứng được thực hiện với sự có mặt của axit trifloaxetic.

Theo một số phương án, sáng chế còn bao gồm bước khử bảo vệ hợp chất có công thức F16 để tạo ra hợp chất có công thức F10:



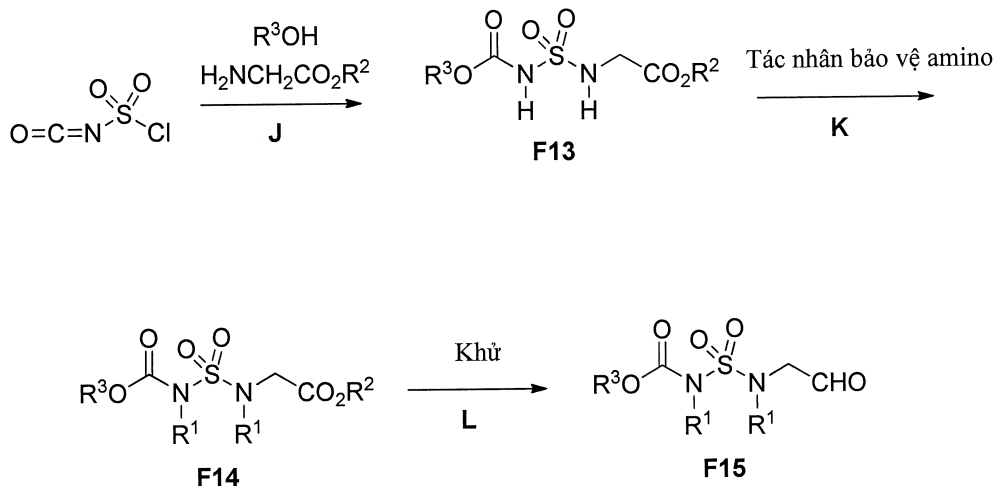
Việc xử lý hợp chất F16 để thế R¹N bằng NH₂ có thể được hoàn thành theo các phương pháp khử bảo vệ đối với các nhóm bảo vệ amin cụ thể mà chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này đã biết, như phương pháp nêu trong tài liệu: Wuts and Greene, *Greene's Protective Groups in Organic Synthesis*, 4th Ed., pp 696-926, John Wiley & Sons: New York, 2006. Theo một số phương án, trong đó R¹ là allyl, tác nhân khử bảo vệ có thể là chất xúc tác paladi (ví dụ, Pd(Ph₃P)₄, Pd/C, hoặc Pd(dba)DPPB). Theo một số phương án, khi R¹ là 4-metoxymethyl, tác nhân khử bảo vệ có thể bao gồm axit hữu cơ (như axit trifloaxetic hoặc axit metansulfonic, và các chất tương tự); axit vô cơ (như axit clohydric); hydro và paladi; hoặc natri trong amoniac lỏng. Việc khử bảo vệ có thể được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 30°C đến 90°C, ví dụ, từ 50°C đến 100°C, hoặc từ 60°C đến 80°C.

Theo một số phương án, việc khử bảo vệ bao gồm bước cho hợp chất có công thức F16 phản ứng với axit trifloaxetic.

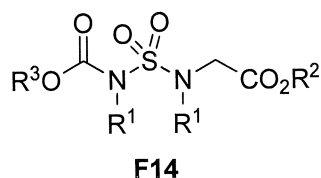
Theo một số phương án, việc khử bảo vệ bao gồm bước cho hợp chất có công thức F16 phản ứng với axit clohydric.

Hợp chất F15 có thể được tạo thành bởi quy trình ba bước (các bước J, K và L) từ clorosulfonylisoxyanat, như được thể hiện trên Sơ đồ 4.

Sơ đồ 4



Do đó, đơn yêu cầu cấp bằng độc quyền sáng chế này còn đề xuất quy trình, trong đó hợp chất có công thức F15 thu được theo quy trình bao gồm bước xử lý hợp chất có công thức F14:



bằng chất khử để tạo ra hợp chất có công thức F15; trong đó R² là C₁₋₄ alkyl; và R³ được định nghĩa ở trên.

Theo một số phương án, R² là metyl.

Theo một số phương án, R² là etyl.

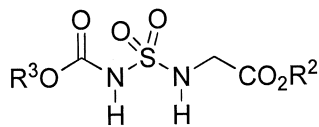
Theo một số phương án, việc khử có thể được thực hiện bằng diisobutyl nhôm hydrua (DIBAL-H). Các dung môi thích hợp bao gồm các dung môi hydrocarbon đã được halogen hóa như điclometan, clorofom, đicloetan, tetracloetan, và các dung môi tương tự. Theo một số phương án, việc khử có thể được thực hiện ở nhiệt độ trong phòng, ví dụ, nằm trong khoảng từ -80°C đến 30°C, từ -78°C đến 0°C, từ 0°C đến 30°C, hoặc nằm trong khoảng từ 25°C đến 30°C.

Theo một số phương án, việc xử lý được thực hiện trong dung môi hydrocarbon đã được halogen hóa.

Theo một số phương án, dung môi hydrocarbon đã được halogen hóa là điclometan.

Theo một số phương án, chất khử là diisobutyl nhôm hydrua.

Theo một số phương án, hợp chất có công thức F14 thu được theo quy trình bao gồm bước bảo vệ hợp chất có công thức F13:



F13

bằng một hoặc nhiều tác nhân bảo vệ amino được chọn độc lập để tạo ra hợp chất có công thức F14.

Nhóm bảo vệ R¹ trong công thức F14 có thể được chọn từ các nhóm bảo vệ amino khác nhau đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này (*nêu trên*). Theo một số phương án, tác nhân bảo vệ amino là alyl bromua hoặc 4-metoxybenzyl clorua.

Theo một số phương án, một hoặc nhiều tác nhân bảo vệ amino được chọn từ alyl bromua và 4-metoxybenzyl clorua.

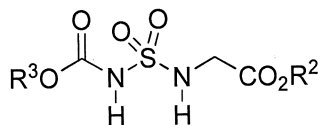
Theo một số phương án, việc bảo vệ được thực hiện với sự có mặt của bazơ.

Theo một số phương án, bazơ là kali cacbonat.

Theo một số phương án, việc bảo vệ được thực hiện trong thành phần dung môi chứa axetonitril.

Theo một số phương án, việc điều chế hợp chất có công thức F13 có thể thu được bằng cách xử lý clorosulfonylisoxyanat bằng rượu R³OH (trong đó R³ được định nghĩa như trên) và glyxin este H₂NCH₂CO₂R², trong đó R² là C₁₋₄ alkyl. Theo một số phương án, bước J được thực hiện với sự có mặt của axit hữu cơ (như axit axetic, axit benzoic, axit trifloaxetic). Các dung môi thích hợp đối với bước này bao gồm diclometan, clorofom, đicloetan, tetracloetan, và các nhóm tương tự.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức F13:



F13

trong đó:

R² là C₁₋₄ alkyl; và

R^3 là C_{1-6} alkyl hoặc benzyl.

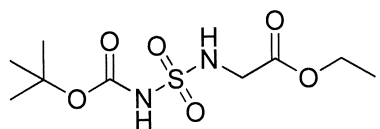
Theo một số phương án, R^2 là methyl.

Theo một số phương án, R^2 là ethyl.

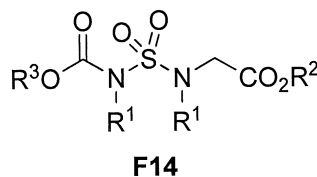
Theo một số phương án, R^3 là C_{1-6} alkyl.

Theo một số phương án, R^3 là *tert*-butyl.

Theo một số phương án, hợp chất có công thức F13 là ethyl-2-((N-(*tert*-butoxycarbonyl)sulfamoyl)amino)axetat:



Theo một số phương án, sáng chế còn đề xuất hợp chất có công thức F14:



trong đó:

mỗi nhóm R^1 độc lập là nhóm bảo vệ amino;

R^2 là C_{1-4} alkyl; và

R^3 là C_{1-6} alkyl hoặc benzyl.

Theo một số phương án, R^1 là C_{2-4} alkenyl- C_{1-3} alkyl hoặc phenyl- C_{1-3} alkyl, trong đó phenyl- C_{1-3} alkyl tùy ý được thế bằng 1, 2, hoặc 3 nhóm C_{1-4} alkoxy được chọn độc lập.

Theo một số phương án, R^1 là alyl.

Theo một số phương án, R^1 là 4-methoxybenzyl.

Theo một số phương án, R^2 là methyl.

Theo một số phương án, R^2 là ethyl.

Theo một số phương án, R^3 là C_{1-6} alkyl.

Theo một số phương án, R^3 là *tert*-butyl.

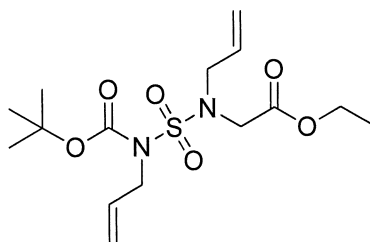
Theo một số phương án, R^3 là C_{1-4} alkyl.

Theo một số phương án, R^3 là butyl.

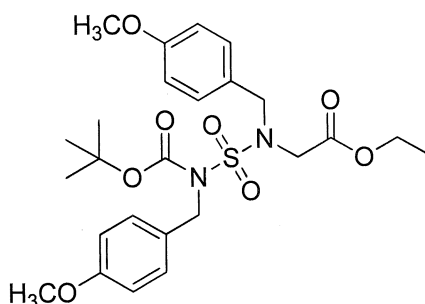
Theo một số phương án, R^3 là C_{1-4} alkyl.

Theo một số phương án, R^3 là butyl.

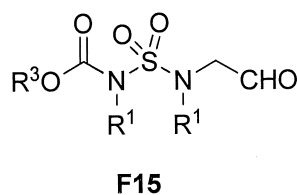
Theo một số phương án, hợp chất có công thức F14 là etyl-2-(allyl(N-allyl-N-(*tert*-butoxycarbonyl)sulfamoyl)amino) axetat:



Theo một số phương án, hợp chất có công thức F14 là etyl-2-(4-metoxymethyl(N-4-metoxymethyl-N-(*tert*-butoxycarbonyl) sulfamoyl)amino)axetat:



Theo một số phương án, đơn yêu cầu cấp bằng độc quyền sáng chế này đề xuất hợp chất có công thức F15:



trong đó:

R^3 là C_{1-6} alkyl hoặc benzyl; và

mỗi nhóm R^1 độc lập là nhóm bảo vệ amino.

Theo một số phương án, R^1 là C_{2-4} alkenyl- C_{1-3} alkyl hoặc phenyl- C_{1-3} alkyl, trong đó phenyl- C_{1-3} alkyl tùy ý được thế bằng 1, 2, hoặc 3 nhóm C_{1-4} alkoxy được chọn độc lập.

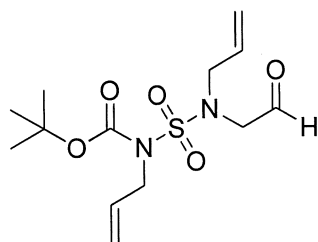
Theo một số phương án, R^1 là allyl.

Theo một số phương án, R^1 là 4-metoxymethyl.

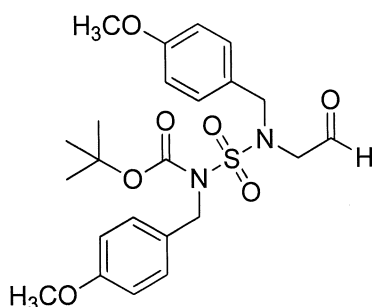
Theo một số phương án, R^3 là C_{1-6} alkyl.

Theo một số phương án, R^3 là *tert*-butyl.

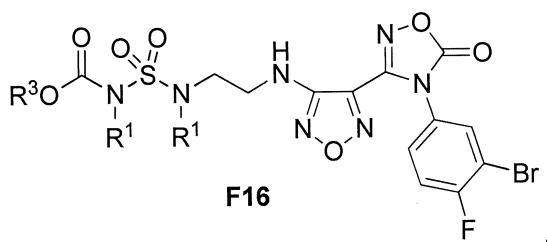
Theo một số phương án, hợp chất có công thức F15 là *tert*-butyl alyl{[allyl(2-oxoethyl)amino]sulfonyl}carbamate:



Theo một số phương án, hợp chất có công thức F15 là *tert*-butyl(4-methoxybenzyl){[(4-methoxybenzyl)(2-oxoethyl)amino]sulfonyl}carbamate:



Theo một số phương án, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức F16:



trong đó R^3 là C_{1-6} alkyl hoặc benzyl và mỗi nhóm R^1 độc lập là nhóm bảo vệ amino.

Theo một số phương án, R^1 là C_{2-4} alkenyl- C_{1-3} alkyl hoặc phenyl- C_{1-3} alkyl, trong đó phenyl- C_{1-3} alkyl tùy ý được thế bằng 1, 2, hoặc 3 nhóm C_{1-4} alkoxy được chọn độc lập.

Theo một số phương án, R^1 là alyl.

Theo một số phương án, R^1 là 4-methoxybenzyl.

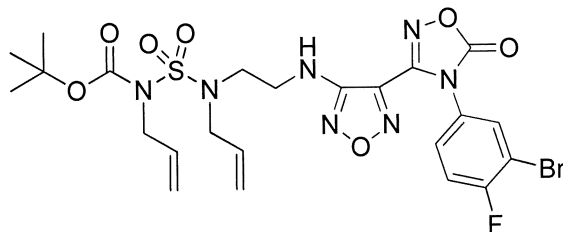
Theo một số phương án, R^3 là C_{1-6} alkyl.

Theo một số phương án, R^3 là *tert*-butyl.

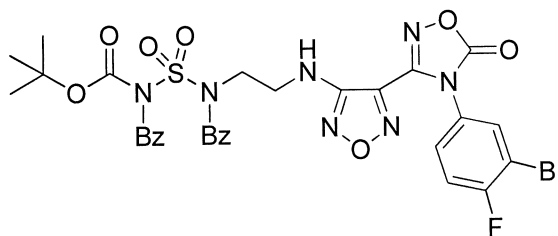
Theo một số phương án, R^3 là C_{1-4} alkyl.

Theo một số phương án, R^3 là butyl.

Theo một số phương án, hợp chất có công thức F16 là *tert*-butyl alyl(*N*-allyl-*N*-(2-(4-(4-(3-bromo-4-fluorophenyl)-5-oxo-4,5-dihydro-1,2,4-oxadiazol-3-yl)-1,2,5-oxadiazol-3-ylamino)ethyl)sulfamoyl)carbamate:

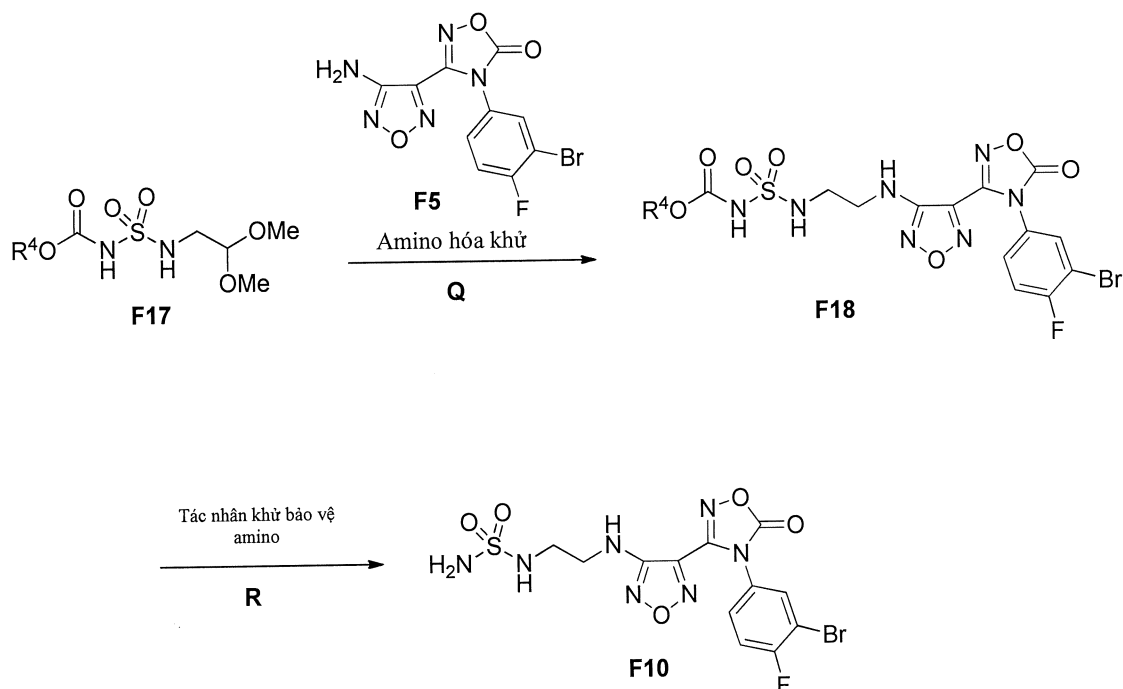


Theo một số phương án, hợp chất có công thức F16 là *tert*-butyl (4-metoxymethyl)-(*N*-(4-metoxymethyl)-*N*-(2-(4-(4-(3-bromo-4-fluorophenyl)-5-oxo-4,5-dihydro-1,2,4-oxadiazol-3-yl)-1,2,5-oxadiazol-3-ylamino)ethyl)sulfamoyl)carbamate:

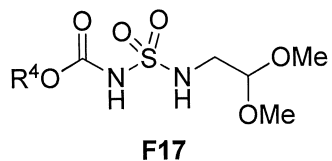


Sơ đồ 5 mô tả cách khác để điều chế hợp chất có công thức F10.

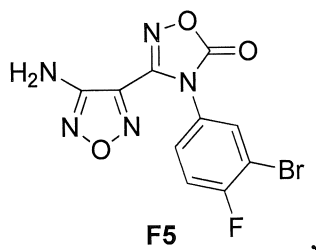
Sơ đồ 5



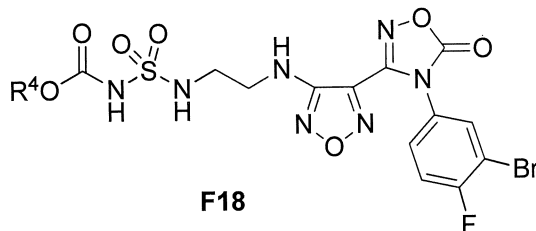
Sáng chế còn đề xuất quy trình bao gồm việc cho hợp chất có công thức F17:



trong đó R⁴ là C₁₋₆ alkyl, C₁₋₆ haloalkyl, benzyl, hoặc 9*H*-florene-9-ylmetyl, phản ứng với hợp chất có công thức F5:



để tạo ra hợp chất có công thức F18:



Theo một số phương án, R⁴ là *tert*-butyl.

Theo một số phương án, R⁴ là benzyl.

Theo một số phương án, R⁴ là etyl.

Theo một số phương án, R⁴ là C₁₋₃ haloalkyl.

Theo một số phương án, R⁴ là 2,2,2-tricloroetyl.

Theo một số phương án, R⁴ là 9*H*-florene-9-ylmetyl.

Trong bước Q, các hợp chất có công thức F18 có thể được điều chế, theo một số phương án, bằng cách cho hợp chất có công thức F17 phản ứng với hợp chất amin có công thức F5 với sự có mặt của chất khử.

Theo một số phương án, phản ứng được thực hiện với sự có mặt của chất khử.

Chất khử có thể là hợp chất bất kỳ có khả năng khử hợp chất hữu cơ đến trạng thái oxy hóa thấp hơn, ví dụ, bằng cách sử dụng hợp chất hữu cơ chứa silan như tri(C₁₋₃ alkyl)silan (ví dụ, triethylsilan); hydro nguyên tố hoặc bằng cách sử dụng chất phản ứng

hydrua (như $\text{NaB}(\text{OAc})_3\text{H}$, NaBH_4 , LiAlH_4 và các chất tương tự); bằng cách sử dụng triphenylphosphin; hoặc bằng cách sử dụng kết hợp natri iđua, clotrimetylsilan, và metanol. Theo một số phương án, bước này có thể được thực hiện với sự có mặt của axit như axit trifloaxetic. Các dung môi thích hợp bao gồm, nhưng không giới hạn ở các dung môi hydrocacbon đã được halogen hóa (ví dụ, điclometan, clorofom, đicloetan hoặc tetracloetan). Theo một số phương án, dung môi hydrocacbon đã được halogen hóa là 1,2-đicloetan.

Theo một số phương án, chất khử là hợp chất hữu cơ chứa silan.

Theo một số phương án, chất khử là $\text{tri}(\text{C}_{1-3} \text{ alkyl})\text{silan}$.

Theo một số phương án, chất khử là trietylsilan.

Theo một số phương án, phản ứng được thực hiện với sự có mặt của axit hữu cơ.

Theo một số phương án, axit hữu cơ là axit trifloaxetic.

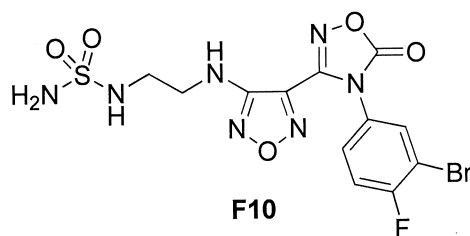
Theo một số phương án, axit hữu cơ là axit metansulfonic.

Theo một số phương án, phản ứng được thực hiện trong thành phần dung môi chứa dung môi hydrocacbon đã được halogen hóa.

Theo một số phương án, dung môi hydrocacbon đã được halogen hóa là điclometan.

Theo một số phương án, dung môi hydrocacbon đã được halogen hóa là 1,2-đicloetan.

Theo một số phương án, quy trình này còn bao gồm bước khử bảo vệ hợp chất có công thức F18 để tạo ra hợp chất có công thức F10:



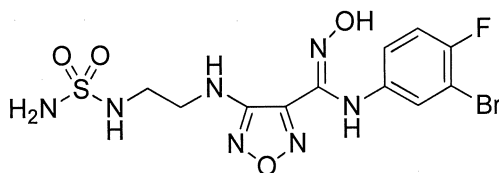
Theo một số phương án, các phương pháp khử bảo vệ đối với các nhóm bảo vệ amin cụ thể (như các carbamat) mà chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này đã biết, như phương pháp trong tài liệu: Wuts and Greene, *Greene's Protective Groups in Organic Synthesis*, 4th Ed., pp 696-926, John Wiley & Sons: New York, 2006. Ví dụ, nhóm *tert*-butoxycarbonyl (ví dụ, trong đó R^4 là *tert*-butyl) có thể được loại ra (ví dụ, được thủy

phân) khỏi nguyên tử nitơ, ví dụ, bằng cách xử lý bằng axit (như axit clohydric, axit trifloaxetic, axit toluensulfonic, và các chất tương tự); kết hợp các chất phản ứng (ví dụ, hỗn hợp gồm axetyl clorua và metanol) đã biết để tạo ra axit; hoặc axit Lewis (ví dụ, $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$). Nhóm benzyloxycarbonyl (ví dụ, khi R^4 là benzyl) có thể được loại ra (ví dụ, được hydro phân) khỏi nguyên tử nitơ, ví dụ, bằng cách xử lý bằng hydro và chất xúc tác (như paladi trên cacbon). Các nhóm metoxycarbonyl và etoxycarbonyl (tức là khi R^4 là methyl hoặc ethyl) có thể được loại ra bằng cách xử lý bằng bazơ vô cơ (như KOH hoặc K_2CO_3); kết hợp các chất phản ứng (ví dụ, hỗn hợp gồm axetyl clorua, natri iotua và axetonitril); hoặc bằng cách xử lý bằng axit (ví dụ, HBr, AcOH). Nhóm 2,2,2-tricloetoxycarbonyl có thể được loại bỏ, ví dụ, bằng cách xử lý bằng chất xúc tác (ví dụ, Zn/AcOH hoặc Cd/AcOH). Các dung môi thích hợp đối với bước này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, metanol hoặc tetrahydrofuran (THF), axetonitril và các nhóm tương tự. Theo một số phương án, việc xử lý được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 30°C đến 90°C , ví dụ, từ 50°C đến 100°C , hoặc từ 60°C đến 80°C .

Theo một số phương án, việc khử bảo vệ bao gồm bước cho hợp chất có công thức F18 phản ứng với kẽm với sự có mặt của axit axetic.

Theo một số phương án, việc khử bảo vệ được thực hiện trong thành phần dung môi chứa tetrahydrofuran.

Theo một số phương án, quy trình này còn bao gồm bước cho hợp chất có công thức F10 phản ứng với bazơ để tạo ra hợp chất có công thức I:



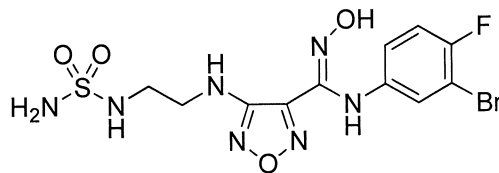
I.

Theo một số phương án, bazơ chứa kim loại kiềm hydroxit.

Theo một số phương án, kim loại kiềm hydroxit là natri hydroxit.

Theo một số phương án, phản ứng được thực hiện trong thành phần dung môi chứa tetrahydrofuran, nước và etanol.

Theo một số phương án, quy trình này còn bao gồm bước chuyển hóa hợp chất có công thức F18 thành hợp chất có công thức I:



I,

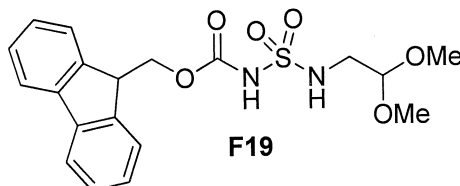
trong đó bước chuyển hóa bao gồm bước kết hợp hợp chất có công thức F18 với bazơ để tạo ra hỗn hợp thứ nhất. Theo một số phương án, bazơ là N,N-bis(2-aminoethyl)etan-1,2-di-amin.

Theo một số phương án, bước chuyển hóa còn bao gồm việc bổ sung axit vào hỗn hợp thứ nhất. Theo một số phương án, axit này là dung dịch nước của axit mạnh. Theo một số phương án, dung dịch nước của axit mạnh là dung dịch nước của axit clohydric.

Theo một số phương án, bước chuyển hóa được thực hiện trong thành phần dung môi chứa tetrahydrofuran và etyl axetat.

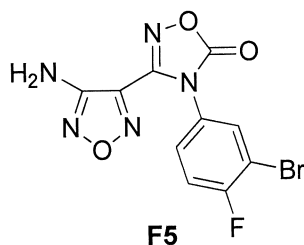
Đơn yêu cầu cấp bằng độc quyền sáng chế này còn đề xuất quy trình bao gồm bước:

i) cho hợp chất có công thức F19:



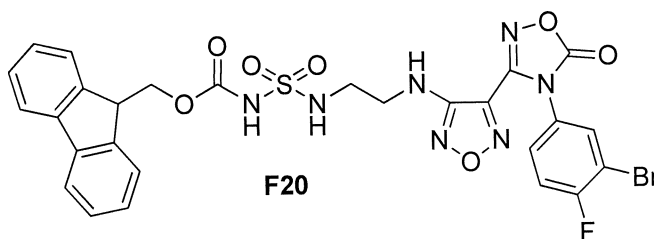
F19

phản ứng với hợp chất có công thức F5:



F5

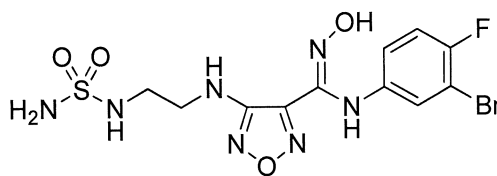
với sự có mặt của triethylsilan và axit metansulfonic để tạo ra hợp chất có công thức F20:



F20

và

ii) chuyển hóa hợp chất có công thức F20 thành hợp chất có công thức I:

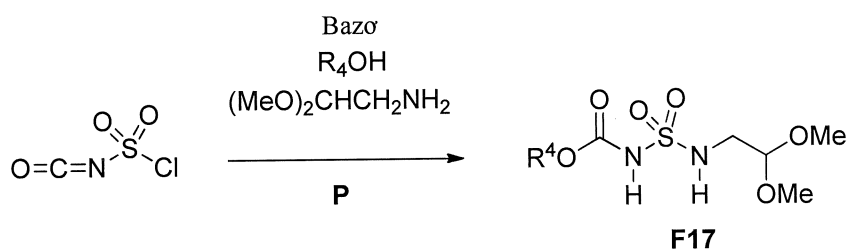


I,

trong đó bước chuyển hóa bao gồm bước kết hợp hợp chất có công thức F20 với *N,N*-bis(2-aminoethyl)etan-1,2-điamin. Theo một số phương án, bước chuyển hóa còn bao gồm bước bổ sung dung dịch nước của axit clohydric sau khi kết hợp.

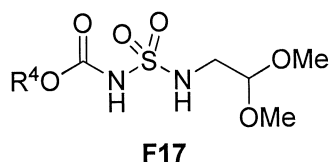
Hợp chất F17 có thể được tạo thành bởi quy trình một bước (Bước P) từ clorosulfonylisoxyanat, như được thể hiện trên Sơ đồ 6.

Sơ đồ 6



Theo một số phương án, chế phẩm hợp chất có công thức F17 có thể thu được bằng cách xử lý clorosulfonylisoxyanat bằng 2,2-đimetoxyetanamin và rượu R^4OH (R^4 được xác định như nêu trên), tùy ý trong dung môi (ví dụ, dung môi hydrocacbon đã được halogen hóa như điclometan, clorofom, đicloetan, tetracloetan). Theo một số phương án, bước này được thực hiện với sự có mặt của bazơ. Bazơ có thể là bazơ hữu cơ như amin không vòng (ví dụ, trietylamin, diisopropyletylamin (DIPEA), v.v.) hoặc amin vòng (ví dụ, pyrrolidin, piperidin, v.v.); hoặc bazơ vô cơ như kiềm (ví dụ, NaOH, LiOH, KOH, $Mg(OH)_2$, v.v.). Theo một số phương án, phản ứng được thực hiện trong dung môi, ví dụ, dung môi hydrocacbon đã được halogen hóa như điclometan, clorofom, đicloetan, hoặc tetracloetan.

Theo một số phương án, đơn yêu cầu cấp bằng độc quyền sáng chế này còn đề xuất hợp chất có công thức F17:



trong đó R^4 là C_{1-6} alkyl, C_{1-6} haloalkyl, hoặc benzyl.

Theo một số phương án, R^4 là *tert*-butyl.

Theo một số phương án, R^4 là benzyl.

Theo một số phương án, R^4 là ethyl.

Theo một số phương án, R^4 là C_{1-3} haloalkyl.

Theo một số phương án, R^4 là 2,2,2-trichloroethyl.

Theo một số phương án, R^4 là 9*H*-florene-9-ylmethyl.

Theo một số phương án, hợp chất có công thức F17 là *tert*-butyl N-(2,2-đimetoxyetyl)sulfamoylcarbamat.

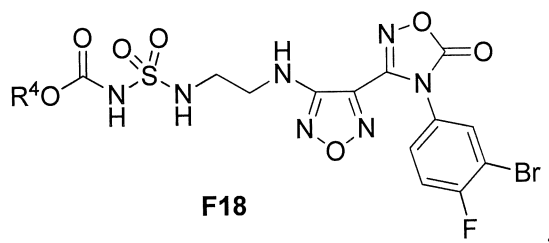
Theo một số phương án, hợp chất có công thức F17 là benzyl N-(2,2-đimetoxyetyl)sulfamoylcarbamat.

Theo một số phương án, hợp chất có công thức F17 là ethyl N-(2,2-đimetoxyetyl)sulfamoylcarbamat.

Theo một số phương án, hợp chất có công thức F17 là 2,2,2-trichloroethyl N-(2,2-đimetoxyetyl)sulfamoylcarbamat.

Theo một số phương án, hợp chất có công thức F17 là (9*H*-florene-9-yl)methyl N-(2,2-đimetoxyetyl)sulfamoylcarbamat.

Theo một số phương án, đơn yêu cầu cấp bằng độc quyền sáng chế này còn đề xuất hợp chất có công thức F18:



trong đó, R^4 là C_{1-6} alkyl, C_{1-6} haloalkyl, hoặc benzyl.

Theo một số phương án, R^4 là *tert*-butyl.

Theo một số phương án, R^4 là benzyl.

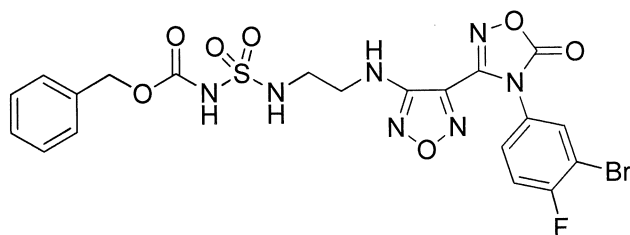
Theo một số phương án, R^4 là ethyl.

Theo một số phương án, R^4 là C_{1-3} haloalkyl.

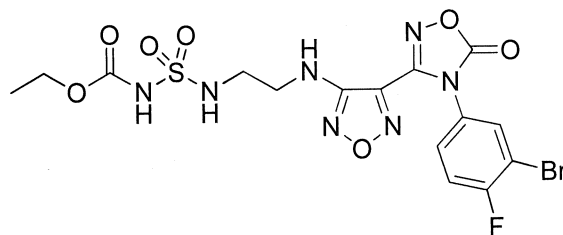
Theo một số phương án, R^4 là 2,2,2-trichloroethyl.

Theo một số phương án, R⁴ là 9*H*-florene-9-ylmetyl.

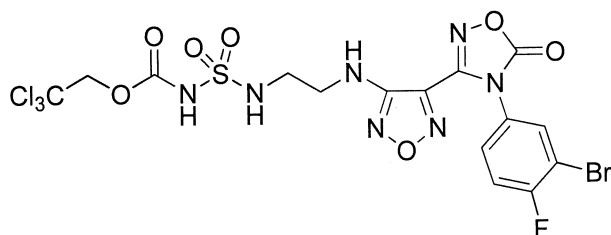
Theo một số phương án, hợp chất có công thức F18 là benzyl ({[2-({[4-(3-bromo-4-florophenyl)-5-oxo-4,5-dihydro-1,2,4-oxadiazol-3-yl]-1,2,5-oxadiazol-3-yl} amino)etyl]amino} sulfonyl)carbamate:



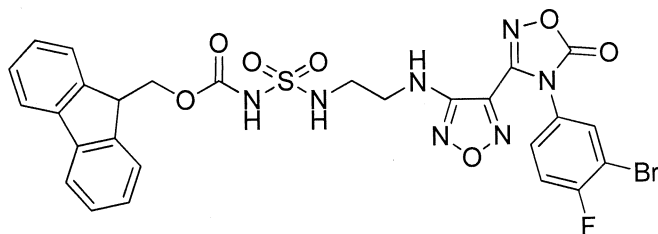
Theo một số phương án, hợp chất có công thức F18 là etyl ({[2-({[4-(3-bromo-4-florophenyl)-5-oxo-4,5-dihydro-1,2,4-oxadiazol-3-yl]-1,2,5-oxadiazol-3-yl} amino)etyl]amino} sulfonyl)carbamate:



Theo một số phương án, hợp chất có công thức F18 là 2,2,2-tricloroetyl ({[2-({[4-(3-bromo-4-florophenyl)-5-oxo-4,5-dihydro-1,2,4-oxadiazol-3-yl]-1,2,5-oxadiazol-3-yl} amino)etyl]amino} sulfonyl)carbamate:



Theo một số phương án, hợp chất có công thức F18 là (9*H*-florene-9-yl)metyl N-(2-((4-((3-bromo-4-florophenyl)-5-oxo-4,5-dihydro-1,2,4-oxadiazol-3-yl)-1,2,5-oxadiazol-3-yl)amino)etyl)sulfamoylcarbamate:



Thuật ngữ “alkyl” được sử dụng trong bản mô tả này một cách riêng rẽ hoặc cùng với thuật ngữ gốc khác nữa để chỉ nhóm hydrocacbon bão hòa mạch thẳng hoặc mạch nhánh, có từ 1 đến 6 nguyên tử cacbon, từ 1 đến 4 nguyên tử cacbon, hoặc từ 1 đến 3 nguyên tử cacbon. Các nhóm alkyl làm ví dụ bao gồm metyl, etyl, n-propyl, isopropyl, n-butyl, isobutyl, sec-butyl, *tert*-butyl, và các nhóm tương tự.

Thuật ngữ “alkenyl” được dùng trong bản mô tả này để chỉ nhóm alkyl có một hoặc nhiều nối đôi cacbon-cacbon. Theo một số phương án, nhóm alkyl này có từ 2 đến 6 nguyên tử cacbon, từ 2 đến 4 nguyên tử cacbon, hoặc từ 2 đến 3 nguyên tử cacbon. Các nhóm alkenyl làm ví dụ bao gồm etenyl (vinyl), propenyl, và các nhóm tương tự.

Thuật ngữ “alkenylalkyl” được dùng trong bản mô tả này để chỉ nhóm có công thức –alkyl-alkenyl. Theo một số phương án, alkenylalkyl nhóm là alyl.

Thuật ngữ “haloalkyl” được dùng trong bản mô tả này một cách riêng rẽ hoặc cùng với gốc bổ sung để chỉ nhóm alkyl được thế bằng một hoặc nhiều nguyên tử halogen được chọn độc lập từ F, Cl, Br, và I. Các nhóm haloalkyl làm ví dụ bao gồm CF₃, CHF₂, CH₂CF₃, và các nhóm tương tự.

Thuật ngữ “alkoxy” được dùng trong bản mô tả này để chỉ nhóm –O-alkyl. Theo một số phương án, nhóm alkyl có từ 1 đến 6 nguyên tử cacbon, từ 1 đến 4 nguyên tử cacbon, hoặc từ 1 đến 3 nguyên tử cacbon. Các nhóm alkoxy làm ví dụ bao gồm metoxy, etoxy, propoxy (ví dụ, n-propoxy và isopropoxy), t-butoxy, và các nhóm tương tự.

Thuật ngữ “trialkylamin” được dùng trong bản mô tả này để chỉ nguyên tử nito được thế bằng ba nhóm alkyl được chọn độc lập. Theo một số phương án, mỗi nhóm alkyl có từ 2 đến 6 nguyên tử cacbon, từ 2 đến 4 nguyên tử cacbon, hoặc từ 2 đến 3 nguyên tử cacbon. Ví dụ, các nhóm trialkylamin bao gồm trimetylamin, trietylamin, và các nhóm tương tự.

Thuật ngữ “alkoxycarbonyl” được dùng trong bản mô tả này để chỉ nhóm có công thức –C(O)–O-alkyl. Theo một số phương án, nhóm alkyl có từ 2 đến 6 nguyên tử cacbon, từ 2 đến 4 nguyên tử cacbon, hoặc từ 2 đến 3 nguyên tử cacbon. Các nhóm alkoxycarbonyl làm ví dụ bao gồm etoxycarbonyl, *tert*-butoxycarbonyl (Boc), và các nhóm tương tự.

Các dung môi hydrocacbon đã được halogen hóa là các alkan đã được halogen hóa, như điclometan, clorofom, dicloetan hoặc tetracloetan, trong đó alkan có thể là mạch nhánh hoặc mạch thẳng có từ 1 đến 12 nguyên tử cacbon, từ 1 đến 6 nguyên tử cacbon,

hoặc từ 1 đến 4 nguyên tử cacbon với một hoặc nhiều nguyên tử halo. Theo một số phương án, dung môi hydrocacbon đã được halogen hóa là alkan đã được clo hóa có từ 1 đến 12 nguyên tử cacbon, từ 1 đến 6 nguyên tử cacbon, hoặc từ 1 đến 4 nguyên tử cacbon.

Trong bản mô tả này, các phần tử thể cho các hợp chất theo sáng chế có thể được bộc lộ thành nhóm hoặc trong các khoảng. Các tác giả sáng chế dự định rằng sáng chế bao gồm cả từng tập hợp con riêng rẽ của các nhóm này và các khoảng này.

Dự định rằng các hợp chất theo sáng chế là ổn định. Thuật ngữ “ổn định” được dùng trong bản mô tả này để chỉ hợp chất mà đủ mạnh để không bị phân tách đến mức độ tinh khiết hữu ích ra khỏi hỗn hợp phản ứng, và tốt hơn nếu có khả năng tạo thành tác nhân điều trị bệnh hiệu quả.

Cần phải hiểu thêm rằng một số dấu hiệu nhất định theo sáng chế, mà để rõ ràng, được bộc lộ trong phạm vi các phương án riêng biệt, cũng có thể được kết hợp thành một phương án. Ngược lại, các dấu hiệu khác nhau theo sáng chế mà, để ngắn gọn, đã được bộc lộ trong phạm vi của một phương án, cũng có thể được tách riêng hoặc kết hợp lại theo cách thích hợp.

Các hợp chất theo sáng chế còn dự định bao gồm tất cả chất đồng phân dị hình có thể. Các chất đồng phân dị hình cis và trans của các hợp chất được bộc lộ và có thể tách được ở dạng hỗn hợp gồm các chất đồng phân hoặc ở các dạng chất đồng phân đã được tách.

Các hợp chất theo sáng chế còn bao gồm các dạng hổ biến. Các dạng hổ biến tạo ra đôi liên kết đơn với liên kết đôi bên cạnh cùng với việc đồng thời di trú proton.

Các hợp chất theo sáng chế còn có thể bao gồm tất cả các đồng vị của các nguyên tử xuất hiện ở các chất trung gian hoặc các hợp chất cuối cùng. Các đồng vị bao gồm các nguyên tử có cùng số thứ tự nguyên tử nhưng số khối lượng khác nhau. Ví dụ, các đồng vị của hydro bao gồm triti và đơteri.

Theo một số phương án, các hợp chất theo sáng chế, và các muối của chúng, được tách một cách đáng kể. Thuật ngữ “được tách một cách đáng kể” có nghĩa là hợp chất này là ít nhất một phần hoặc hầu như được tách ra khỏi môi trường nơi nó được tạo ra hoặc phát hiện. Tách một phần có thể bao gồm, ví dụ, chế phẩm giàu hợp chất theo sáng chế. Được tách một cách đáng kể có thể bao gồm các chế phẩm chứa ít nhất khoảng 50%, ít nhất khoảng 60%, ít nhất khoảng 70%, ít nhất khoảng 80%, ít nhất khoảng 90%, ít nhất

khoảng 95%, ít nhất khoảng 97%, hoặc ít nhất khoảng 99% trọng lượng hợp chất theo sáng chế, hoặc muối của nó. Các phương pháp tách các hợp chất và muối của chúng là thông thường trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Đơn yêu cầu cấp bằng độc quyền sáng chế này còn bao gồm muối của các hợp chất theo sáng chế. Thuật ngữ “muối” được dùng trong bản mô tả này để chỉ các chất dẫn xuất của các hợp chất đã được bộc lộ, trong đó hợp chất gốc được cải biến bằng cách chuyển hóa gốc axit hoặc gốc bazơ hiện có thành dạng muối của nó. Các ví dụ về muối bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các muối của axit vô cơ (như HCl, HBr, H_2SO_4) hoặc axit hữu cơ (như axit axetic, axit benzoic, axit trifloaxetic) với các gốc bazơ như các amin; các muối của chất kiềm (như Li, Na, K, Mg, Ca) hoặc hữu cơ (như trialkylamoni) với các gốc axit như axit carboxylic; và các chất tương tự. Các muối theo sáng chế này có thể được tổng hợp từ hợp chất gốc mà chứa gốc bazơ hoặc gốc axit theo các phương pháp hóa học thông thường. Nói chung, các muối này có thể được điều chế bằng cách cho các dạng axit hoặc các dạng bazơ của các hợp chất này phản ứng với lượng tỷ lệ của bazơ hoặc axit thích hợp trong nước hoặc trong dung môi hữu cơ, hoặc trong hỗn hợp gồm cả hai hợp chất này; nói chung, các môi chất không chứa nước như ete, etyl axetat, etanol, isopropanol, hoặc axetonitril (ACN) được ưu tiên.

Đơn yêu cầu cấp bằng độc quyền sáng chế này còn bao gồm các muối được dụng của các hợp chất theo sáng chế. “Các muối được dụng” bao gồm phân nhóm gồm “các muối” nêu trên mà là các muối không độc thông thường của hợp chất gốc được tạo ra, ví dụ, từ các axit vô cơ hoặc hữu cơ không độc. Danh mục các muối thích hợp được tìm thấy trong tài liệu: *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 17th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1985, p. 1418 và *Journal of Pharmaceutical Science*, 66, 2 (1977), từng tài liệu trong số này được đưa vào đây hoàn toàn bằng cách viện dẫn. Thuật ngữ “được dụng” được dùng trong bản mô tả này để chỉ các hợp chất, các nguyên liệu, các dược phẩm, và/hoặc các dạng liều mà, trong phạm vi đánh giá y học hợp lý, là thích hợp để sử dụng tiếp xúc với mô của người và động vật mà không có độc tính, kích ứng, phản ứng dị ứng quá mức, hoặc vấn đề hoặc biến chứng khác, phù hợp với tỷ lệ hợp lý giữa lợi ích và nguy cơ.

Các quy trình được bộc lộ trong bản mô tả này có thể được theo dõi bằng phương pháp thích hợp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, việc tạo ra sản phẩm có thể được theo dõi bằng quang phổ, như phổ cộng hưởng từ hạt nhân (ví dụ, ^1H hoặc ^{13}C),

phổ hồng ngoại, phép phổ quang kế (ví dụ, cực tím nhìn thấy được), hoặc phép đo phổ khối; hoặc theo phương pháp sắc ký như phương pháp sắc ký lỏng cao áp (HPLC) hoặc sắc ký lớp mỏng. Các hợp chất thu được theo các phản ứng có thể được tinh chế theo phương pháp thích hợp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, sắc ký (áp suất trung bình) trên chất hấp phụ thích hợp (ví dụ, silicagel, nhôm oxit và các chất tương tự), sắc ký lỏng cao áp, hoặc sắc ký lớp mỏng điều chế; chưng cất; làm thăng hoa, nghiền tán nhỏ, hoặc kết tinh lại. Nói chung, độ tinh khiết của các hợp chất được xác định theo các phương pháp vật lý như đo nhiệt độ nóng chảy (trong trường hợp là chất rắn), thu phổ NMR, hoặc thực hiện tách theo phương pháp sắc ký lỏng cao áp. Nếu nhiệt độ nóng chảy giảm, nếu các tín hiệu không mong muốn trong phổ NMR bị giảm, hoặc nếu các pic ngoại lai trong vết sắc ký lỏng cao áp bị loại bỏ, thì có thể nói rằng hợp chất này đã được tinh chế. Theo một số phương án, các hợp chất này được tinh chế ở mức độ đáng kể.

Việc điều chế các hợp chất có thể bao gồm bước bảo vệ và bước khử bảo vệ đối với các nhóm hóa học khác nhau. Nhu cầu về việc bảo vệ và khử bảo vệ, và lựa chọn các nhóm bảo vệ thích hợp có thể dễ dàng được xác định bởi chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này. Hóa học về các nhóm bảo vệ có thể được thấy, ví dụ, trong tài liệu: Wuts and Greene, *Greene's Protective Groups in Organic Synthesis*, 4th Ed., John Wiley & Sons: New York, 2006, mà nội dung của tài liệu này được đưa vào đây hoàn toàn bằng cách viện dẫn

Các phản ứng của các quy trình được bộc lộ trong bản mô tả này có thể được thực hiện trong các dung môi thích hợp mà có thể dễ dàng được chọn bởi chuyên gia trong lĩnh vực tổng hợp hữu cơ. Các dung môi thích hợp có thể hầu như không có hoạt tính phản ứng với các nguyên liệu ban đầu (các chất phản ứng), các chất trung gian, hoặc các sản phẩm ở nhiệt độ thực hiện phản ứng, tức là nhiệt độ nằm trong khoảng từ nhiệt độ đóng băng của dung môi đến nhiệt độ sôi của dung môi. Phản ứng nhất định có thể được thực hiện trong một dung môi hoặc hỗn hợp gồm nhiều dung môi. Tùy theo bước phản ứng, (các) dung môi thích hợp cho bước phản ứng cụ thể có thể được chọn lọc. Các dung môi thích hợp bao gồm nước, alkan (như pentan, hexan, heptan, xyclohexan, v.v., hoặc hỗn hợp của chúng), các dung môi thơm (như benzen, toluen, xylen, v.v.), rượu (như metanol, etanol, isopropanol, v.v.), ete (như đialkylete, metyl *tert*-butyl ete (MTBE), tetrahydrofuran (THF), dioxan, v.v.), este (như etyl axetat, butyl axetat, v.v.), các dung môi hydrocacbon đã được halogen hóa (như điclorometan (DCM), clorofom, đicloetan, tetracloetan), đimetylformamit (DMF), đimetylsulfoxit (DMSO), axeton, axetonitril

(ACN), hexamethylphosphoramit (HMPA) và N-metyl pyrrolidon (NMP). Các dung môi này có thể được dùng trong ở dạng ướt hoặc khan.

Việc phân giải các hỗn hợp triệt quang gồm các hợp chất có thể được thực hiện theo phương pháp bất kỳ trong số nhiều phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Phương pháp làm ví dụ bao gồm kết tinh lại phân đoạn bằng cách sử dụng “axit phân giải không đối xứng” là axit hữu cơ quay quang và axit hữu cơ tạo muối. Các tác nhân phân giải thích hợp đối với các phương pháp kết tinh lại phân đoạn, ví dụ, là các axit quay quang, như dạng D và dạng L của axit tartric, axit điaxetyltartric, axit đibenzoyltartric, axit mandelic, axit malic, axit lactic hoặc các axit camphorsulfonic quay quang khác nhau. Việc phân giải các hỗn hợp triệt quang còn có thể được thực hiện bằng cách rửa giải trên cột đã nạp tác nhân phân giải quay quang (ví dụ, đinitrobenzoylphenylglyxin). Chế phẩm dung môi rửa giải thích hợp có thể được xác định bởi chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Phương pháp sử dụng

Hợp chất có công thức I có thể ức chế hoạt tính của enzym indolamin-2,3-dioxygenaza (IDO). Ví dụ, hợp chất có công thức I có thể được dùng để ức chế hoạt tính của IDO trong tế bào hoặc ở cá thể có nhu cầu điều biến enzym bằng cách dùng hợp chất có công thức I với lượng ức chế.

Các hợp chất có công thức I có thể được dùng trong các phương pháp ức chế sự thoái biến của tryptophan trong hệ chứa các tế bào biểu hiện IDO như mô, sinh vật sống, hoặc dịch nuôi cấy tế bào. Theo một số phương án, đơn yêu cầu cấp bằng độc quyền sáng chế này đề xuất các phương pháp làm thay đổi (ví dụ, làm tăng) lượng tryptophan ngoại bào ở động vật có vú bằng cách dùng lượng hữu hiệu của hợp chất có công thức I. Các phương pháp đo lượng tryptophan và mức độ thoái biến của tryptophan là thông thường trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Các hợp chất có công thức I có thể được dùng trong các phương pháp ức chế ngăn chặn miễn dịch như ức chế miễn dịch do IDO gây ra ở bệnh nhân bằng cách cho bệnh nhân dùng hợp chất có công thức I với lượng hữu hiệu. Việc ức chế miễn dịch IDO do gây ra có liên quan đến, ví dụ, các bệnh ung thư, sự sinh trưởng của khối u, di căn, nhiễm virus, sao chép virus, v.v.

Các hợp chất có công thức I cũng có thể được dùng trong các phương pháp điều trị các bệnh liên quan đến hoạt tính hoặc sự biểu hiện, kể cả hoạt tính khác thường và/hoặc hiện tượng biểu hiện quá mức, của IDO ở cá thể (ví dụ, bệnh nhân) bằng cách cho cá thể có nhu cầu điều trị đó dùng lượng hữu hiệu để điều trị bệnh hoặc liều của hợp chất có công thức I hoặc được phẩm của chúng. Ví dụ, các bệnh có thể bao gồm bệnh, rối loạn bệnh lý hoặc tình trạng bệnh lý bất kỳ mà liên quan trực tiếp hoặc gián tiếp với sự biểu hiện hoặc hoạt tính của enzym IDO, như biểu hiện quá mức hoặc hoạt tính khác thường. Bệnh liên quan đến IDO còn có thể bao gồm bệnh, rối loạn bệnh lý hoặc tình trạng bệnh lý bất kỳ mà có thể được phòng ngừa, làm thuyên giảm, hoặc chữa trị bằng cách điều biến hoạt tính enzym. Các ví dụ về các bệnh liên quan đến IDO bao gồm bệnh ung thư, nhiễm virus như nhiễm HIV, nhiễm HCV, chứng trầm cảm, các bệnh rối loạn thoái hóa thần kinh như bệnh Alzheimer và bệnh Huntington, chấn thương, bệnh đục thủy tinh thể liên quan đến tuổi tác, cấy ghép cơ quan (ví dụ, tình trạng đào thải ghép tạng), và các bệnh tự miễn bao gồm bệnh hen, bệnh viêm đa khớp dạng thấp, bệnh xơ cứng rải rác, bệnh viêm dị ứng, bệnh viêm ruột, bệnh vẩy nến và bệnh ban đỏ toàn thân. Ví dụ, các bệnh ung thư có thể điều trị theo các phương pháp nêu trong bản mô tả này bao gồm bệnh ung thư ruột kết, tụy, vú, tuyến tiền liệt, phổi, não, buồng trứng, cổ tử cung, tinh hoàn, thận, đầu và cổ, u bạch huyết, bệnh bạch cầu, u hắc tố, và các bệnh tương tự. Hợp chất có công thức I còn có thể được dùng để điều trị bệnh béo phì và chứng thiếu máu cục bộ.

Thuật ngữ “tế bào” được dùng trong bản mô tả này có nghĩa là tế bào *in vitro*, *ex vivo* hoặc *in vivo*. Theo một số phương án, tế bào *ex vivo* có thể là phần của mẫu mô được cắt từ sinh vật như động vật có vú. Theo một số phương án, tế bào *in vitro* có thể là tế bào trong dịch nuôi cấy tế bào. Theo một số phương án, tế bào *in vivo* là tế bào sống trong sinh vật như động vật có vú.

Thuật ngữ “cho tiếp xúc” được dùng trong bản mô tả này để chỉ việc đưa các gốc đã chỉ định lại với nhau trong một hệ *in vitro* hoặc một hệ *in vivo*. Ví dụ, việc cho enzym IDO “tiếp xúc” với hợp chất có công thức I bao gồm việc cho cá thể hoặc bệnh nhân, như người, có IDO, dùng hợp chất có công thức I cũng như, ví dụ, đưa hợp chất có công thức I vào mẫu chứa chế phẩm tế bào hoặc chế phẩm tinh khiết chứa enzym IDO.

Thuật ngữ “cá thể” hoặc “bệnh nhân” được dùng trong bản mô tả này một cách thay thế nhau, để chỉ động vật bất kỳ, bao gồm các động vật có vú, tốt hơn là chuột nhất,

chuột to, các động vật gặm nhấm khác, thỏ, chó, mèo, lợn, gia súc, cừu, ngựa, hoặc các động vật linh trưởng, và tốt nhất là người.

Thuật ngữ “lượng hữu hiệu để điều trị” được dùng trong bản mô tả này để chỉ lượng hoạt chất hoặc được chất mà thể hiện đáp ứng sinh học hoặc đáp ứng điều trị ở mô, hệ cơ quan, động vật, cá thể hoặc người được tìm kiếm bởi nhà nghiên cứu, bác sỹ thú y, bác sỹ điều trị hoặc thầy thuốc.

Thuật ngữ “điều trị” hoặc “điều trị bệnh” được dùng trong bản mô tả này để chỉ 1) việc phòng bệnh; ví dụ, phòng bệnh, tình trạng bệnh lý hoặc rối loạn bệnh lý ở cá thể mà đã từng có khả năng mắc bệnh, tình trạng bệnh lý hoặc rối loạn bệnh lý nhưng chưa mắc hoặc biểu hiện bệnh lý học hoặc triệu chứng học của bệnh; 2) việc ức chế bệnh; ví dụ, việc ức chế bệnh, tình trạng bệnh lý hoặc rối loạn bệnh lý ở cá thể mà đang mắc hoặc đang biểu hiện bệnh lý học hoặc triệu chứng học của bệnh, tình trạng bệnh lý hoặc rối loạn bệnh lý (tức là ngăn chặn sự phát triển tiếp của bệnh lý học và/hoặc triệu chứng học), hoặc 3) làm thuyên giảm bệnh; ví dụ, làm thuyên giảm bệnh, tình trạng bệnh lý hoặc rối loạn bệnh lý ở cá thể mà đang mắc hoặc đang biểu hiện bệnh lý học hoặc triệu chứng học của bệnh, tình trạng bệnh lý hoặc rối loạn bệnh lý (tức là đảo ngược bệnh lý học và/hoặc triệu chứng học).

Phép điều trị kết hợp

Một hoặc nhiều được chất bổ sung hoặc các phương pháp điều trị bệnh, ví dụ, các tác nhân kháng virus, các tác nhân hóa trị liệu hoặc các tác nhân điều trị ung thư khác, các chất tăng cường miễn dịch, các chất ức chế miễn dịch, bức xạ, vacxin kháng u và vacxin kháng virus, phép điều trị bệnh bằng xytokin (ví dụ, IL2, GM-CSF, v.v.), và/hoặc các chất ức chế tyrosin kinaza có thể được sử dụng kết hợp với hợp chất có công thức I để điều trị các bệnh liên quan đến IDO, các rối loạn bệnh lý hoặc các tình trạng bệnh lý. Các tác nhân có thể được kết hợp với hợp chất có công thức I ở dạng liều đơn, hoặc các tác nhân có thể được dùng đồng thời hoặc liên tục ở dạng các liều riêng rẽ.

Các tác nhân kháng virus thích hợp được dự tính để sử dụng kết hợp với hợp chất có công thức I có thể chứa các chất ức chế transcriptaza nghịch nucleosit và nucleotit (các NRTI), các chất ức chế transcriptaza nghịch phi nucleosit (các NNRTI), các chất ức chế proteaza và các thuốc kháng kháng virus.

Các NRTI thích hợp làm ví dụ bao gồm zidovudin (AZT); didanosin (ddI); zalcitabin (ddC); stavudin (d4T); lamivudin (3TC); abacavir (1592U89); adefovir dipivoxil [bis(POM)-PMEA]; lobucavir (BMS-180194); BCH-10652; emitritabin [(-)-FTC]; beta-L-FD4 (còn được gọi beta-L-D4C và được gọi là beta-L-2', 3'-đicleoxy-5-floxytiden); DAPD, ((-)-beta-D-2,6,-diamino-purin dioxolan); và lodenosin (FddA). Các NNRTI thích hợp điển hình bao gồm nevirapin (BI-RG-587); delaviradin (BHAP, U-90152); efavirenz (DMP-266); PNU-142721; AG-1549; MKC-442 (1-(etoxy-metyl)-5-(1-metyletyl)-6-(phenylmetyl)-(2,4(1H,3H)-pyrimidinđion); và (+)-calanol A (NSC-675451) và B. Các chất ức chế proteaza thích hợp điển hình bao gồm saquinavir (Ro 31-8959); ritonavir (ABT-538); indinavir (MK-639); nelfnavir (AG-1343); amprenavir (141W94); lasinavir (BMS-234475); DMP-450; BMS-2322623; ABT-378; và AG-1 549. Các tác nhân khác kháng virus bao gồm hydroxyurê, ribavirin, IL-2, IL-12, pentafusit và dự án Yissum số 11607.

Các tác nhân hóa trị liệu thích hợp hoặc các tác nhân điều trị ung thư khác bao gồm, ví dụ, các tác nhân alkyl hóa (bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các mù tạt nitơ, các chất dẫn xuất etylenimin, các alkyl sulfonat, nitrosoure và các triazen) như mù tạt uraxil, clometin, xyclophosphamit (CytosanTM), ifosfamid, melphalan, clorambuxil, pipobroman, trietylen-melamin, trietylen-thiophosphoramin, busulfan, carmustin, lomustin, streptozoxin, dacarbazin, và temozolomit.

Trong điều trị u hắc tố, các tác nhân thích hợp để sử dụng kết hợp với hợp chất có công thức I bao gồm: dacarbazin (DTIC), tùy ý, cùng với các thuốc hóa trị khác như carmustin (BCNU) và cisplatin; “chế độ trị liệu Dartmouth” bao gồm DTIC, BCNU, cisplatin và tamoxifen; kết hợp cisplatin, vinblastin, và DTIC; hoặc temozolomit. Các hợp chất theo sáng chế còn có thể được kết hợp với các thuốc điều trị miễn dịch, bao gồm các xytokin như interferon alpha, interleukin 2, và yếu tố hoại tử u (TNF) trong việc điều trị u hắc tố.

Hợp chất có công thức I còn có thể được sử dụng kết hợp với liệu pháp điều trị bằng vaccin trong việc điều trị u hắc tố. Theo một vài cách, vaccin kháng u hắc tố là tương tự các vaccin kháng virus mà được dùng để ngăn ngừa các bệnh gây ra bởi virus như bệnh bại liệt, bệnh sởi, và bệnh quai bị. Các tế bào u hắc tố hoặc phần của các tế bào u hắc tố đã được làm yếu được gọi là các kháng nguyên có thể được tiêm vào bệnh nhân để kích thích hệ miễn dịch của cơ thể nhằm phá hủy các tế bào u hắc tố.

Các u hắc tố mà giới hạn ở cánh tay hoặc chân còn có thể được điều trị bằng kết hợp các tác nhân bao gồm hợp chất có công thức I, bằng cách áp dụng quy trình truyền vào chi sót cao tách biệt. Quy trình điều trị này tạm thời tách phần tuần hoàn trong chi đó ra khỏi phần còn lại của cơ thể và tiêm các liều lượng cao chất hóa trị vào động mạch nuôi chi đó, bằng cách đó cung cấp liều cao vào vùng khối u mà không khiến các bộ phận nội tạng tiếp xúc với các liều này mà nếu không thì có thể gây ra tác dụng phụ. Thông thường, chất lưu được làm ấm đến nhiệt độ nằm trong khoảng từ 102°F (38,89°C) đến 104°F (40°C). Melphalan là thuốc thường được dùng nhiều nhất trong quy trình hóa trị này. Nó thường được cấp cùng với tác nhân khác, được gọi là yếu tố hoại tử u (TNF) (xem phần về các xytokin).

Các tác nhân hóa trị liệu thích hợp hoặc các tác nhân điều trị ung thư khác bao gồm, ví dụ, các chất chống chuyển hóa (bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các chất đối kháng axit folic, các chất tương tự pyrimidin, các chất tương tự purin và các chất ức chế adenosin deaminaza) như metotrexat, 5-floraxil, floxuridin, xytarabin, 6-mercaptopurin, 6-thioguanin, fludarabin phosphat, pentostatin, và gemxitabin.

Các tác nhân hóa trị liệu thích hợp hoặc các tác nhân điều trị ung thư khác còn bao gồm, ví dụ, một số sản phẩm tự nhiên và các chất dẫn xuất của chúng (ví dụ, vinca alkaloit, thuốc kháng sinh kháng u, các enzym, lymphokin và epipodophyllotoxin) như vinblastin, vincristin, vindesin, bleomycin, dactinomycin, daunorubixin, doxorubixin, epirubixin, idarubixin, ara-C, paclitaxel (TAXOL™), mithramycin, deoxycoformycin, mitomycin-C, L-asparaginaza, các interferon (đặc biệt là IFN- α), etoposid, và teniposid.

Các tác nhân khác độc đối với tế bào bao gồm navelben, CPT-11, anastrozol, letrozol, capexitabin, reloxafin, xyclophosphamid, ifosamid, và droloxafin.

Cũng thích hợp là các tác nhân độc đối với tế bào như epidophyllotoxin; enzym chống ung thư; chất ức chế topoisomeraza; procarbazine; mitoxantron; các phức phối trí platin như cis-platin và carboplatin; các tác nhân cải biến đáp ứng sinh học; các chất ức chế sinh trưởng; các tác nhân điều trị kháng hormon; leucovorin; tegafur; và các yếu tố sinh trưởng sinh huyết.

(Các) tác nhân khác điều trị bệnh ung thư bao gồm các tác nhân điều trị kháng thể như trastuzumab (Herceptin), các kháng thể đối với các phân tử kích thích đồng thời như CTLA-4, 4-1BB và PD-1, hoặc các kháng thể đối với các xytokin (IL-10, TGF- β , v.v.).

Các tác nhân điều trị ung thư khác còn bao gồm các tác nhân mà phong bế sự di trú tế bào miễn dịch như các chất đối kháng đối với các thụ thể hóa ứng động, kể cả CCR2 và CCR4.

Các tác nhân điều trị ung thư khác còn bao gồm các tác nhân mà làm tăng hệ miễn dịch như các tá dược hoặc tác nhân vận chuyển tế bào T nhận nuôi.

Các vacxin chống ung thư bao gồm các tế bào tua, các peptit tổng hợp, các vacxin ADN và các virus tái tổ hợp.

Các phương pháp dùng an toàn và hiệu quả hầu hết các tác nhân hóa trị liệu là đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ngoài ra, việc dùng chúng được bộc lộ trong các tài liệu thông thường. Ví dụ, việc dùng nhiều tác nhân hóa trị liệu được bộc lộ trong tài liệu "*Physicians' Desk Reference*" (PDR, ví dụ, xuất bản năm 1996, Medical Economics Company, Montvale, NJ), toàn bộ nội dung của nó được đưa vào đây bằng cách viện dẫn như được nêu trong toàn bộ tài liệu này.

Các dược phẩm và các dạng liều

Khi được dùng làm dược chất, hợp chất có công thức I có thể được dùng ở dạng các dược phẩm mà là sự kết hợp của hợp chất có công thức I và chất mang dược dụng. Các dược phẩm này có thể được bào chế theo cách đã biết trong lĩnh vực dược, và có thể được dùng theo nhiều đường khác nhau, tùy theo mong muốn điều trị cục bộ hay điều trị toàn thân và theo vùng cần được điều trị. Có thể dùng khu trú (bao gồm trong mắt và vào màng nhầy kể cả phân phối trong mũi, âm đạo và qua đường trực tràng), phổi (ví dụ, bằng cách hít vào hoặc xịt bột hoặc sol khí vào, kể cả bằng máy tạo khí dung; trong khí quản, trong mũi, biểu bì và qua da), mắt, qua đường miệng hoặc ngoài đường tiêu hóa. Các phương pháp để phân phối vào mắt có thể bao gồm dùng khu trú (thuốc nhỏ mắt), tiêm dưới kết mạc, tiêm quanh mắt hoặc tiêm vào trong buồng dịch kính hoặc đưa vào bằng ống thông bóng hoặc các vật gắn vào mắt được đặt bằng cách phẫu thuật vào bao kết mạc. Cách dùng ngoài đường tiêu hóa bao gồm qua đường tĩnh mạch, trong động mạch, dưới da, trong khoang màng bụng, hoặc tiêm bắp tiêm hoặc truyền; hoặc trong sọ, ví dụ, dùng trong nội tủy mạch hoặc trong não thất. Cách dùng ngoài đường tiêu hóa có thể ở dạng một liều cao đơn nhất, hoặc có thể, ví dụ, là bằng bơm truyền liên tục. Các dược phẩm và các chế phẩm để dùng khu trú có thể bao gồm các miếng dán da, các loại dầu bôi, các loại nước xức, các loại kem bôi, các loại gel, thuốc nhỏ giọt, viên đặt hậu môn, thuốc xịt, chất

lông và các loại bột. Chất mang thông thường dùng cho dược phẩm, trong nước, nền bột hoặc nền dầu, các chất làm đặc và các chất tương tự có thể là cần thiết hoặc mong muốn.

Các dược phẩm chứa hợp chất có công thức I có thể được bào chế kết hợp với một hoặc nhiều chất mang dược dụng. Trong quá trình bào chế các dược phẩm theo sáng chế, hoạt chất thường được trộn với tá dược, pha loãng bằng tá dược hoặc được bao trong chất mang đó ở dạng, ví dụ, viên nang, gói nhỏ, gói giấy, hoặc vật chứa khác. Khi tá dược làm chất pha loãng, nó có thể là nguyên liệu rắn, bán rắn, hoặc lỏng, mà hoạt động như chất dẫn, chất mang hoặc môi trường cho hoạt chất. Do đó, các dược phẩm có thể ở dạng viên nén, viên tròn, bột, viên ngậm, gói nhỏ, viên con nhộng, viên ngọt, huyền phù, nhũ tương, dung dịch, siro, sol khí (ở dạng rắn hoặc trong môi trường lỏng), dầu bôi chứa, ví dụ, đến 10% trọng lượng hoạt chất, viên nang gelatin mềm và cứng, viên đặt hậu môn, dung dịch vô trùng để tiêm truyền, và bột được đóng gói vô trùng.

Trong quá trình bào chế dược phẩm, hoạt chất có thể được nghiền để tạo ra cỡ hạt thích hợp trước khi kết hợp với các thành phần khác. Nếu hoạt chất là gần như không hòa tan, hoạt chất này có thể được nghiền đến cỡ hạt bé hơn lỗ sàng cỡ 200. Nếu hoạt chất hầu như hòa tan trong nước, cỡ hạt có thể được điều chỉnh bằng cách nghiền để tạo ra phân bố hầu như đồng nhất trong chế phẩm, ví dụ khoảng lỗ sàng cỡ 40.

Một số ví dụ về các tá dược thích hợp bao gồm lactoza, dextroza, sucroza, sorbitol, manitol, tinh bột, gôm acacia, canxi phosphat, alginat, tragacan, gelatin, canxi silicat, xenluloza vi tinh thể, polyvinylpyrrolidon, xenluloza, nước, siro, và metyl xenluloza. Các chế phẩm có thể còn bao gồm: các tác nhân làm trơn như talc, magie stearat, và dầu khoáng; các tác nhân thẩm ướt; tác nhân nhũ hóa và tác nhân tạo huyền phù; các chất bảo quản như metyl- và propylhydroxy-benzoat; các chất tạo ngọt; và các tác nhân tạo vị. Các dược phẩm theo sáng chế có thể được bào chế sao cho tạo ra giải phóng hoạt chất nhanh, từ từ hoặc chậm sau khi cho bệnh nhân dùng bằng cách áp dụng các quy trình đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Các dược phẩm có thể được bào chế ở dạng liều đơn vị, mỗi liều chứa khoảng từ 5mg đến 100mg, thường nằm trong khoảng từ 10mg đến 30mg, hoạt chất. Thuật ngữ "dạng liều đơn vị" được dùng để chỉ các đơn vị riêng rẽ về mặt vật lý thích hợp làm liều đơn nhất cho đối tượng là người và các động vật có vú khác, mỗi đơn vị chứa lượng định trước hoạt chất đã được tính để tạo ra tác dụng điều trị mong muốn, kết hợp với tá dược thích hợp.

Hoạt chất có thể có hiệu quả trong khoảng liều lượng rộng và thường được dùng với lượng có tác dụng điều trị. Tuy nhiên, cần phải hiểu rằng lượng hợp chất này được dùng trên thực tế thường sẽ do thầy thuốc quyết định, theo tình huống cụ thể, bao gồm tình trạng cần được điều trị, đường dùng được chọn, hợp chất cụ thể được dùng, tuổi, thể trọng, và đáp ứng của từng bệnh nhân, mức độ nặng của các triệu chứng của bệnh nhân, và các yếu tố tương tự.

Để bào chế các dược phẩm rắn như viên nén, hoạt chất chính được trộn với tá dược để tạo ra dược phẩm sơ chế rắn chứa hỗn hợp đồng nhất gồm hợp chất có công thức I. Khi đề cập đến các dược phẩm sơ chế này là đồng nhất, hoạt chất thường được phân tán đều trong toàn bộ dược phẩm này sao cho dược phẩm này có thể dễ dàng được phân chia tiếp thành các dạng liều đơn vị hữu hiệu bằng nhau như các viên nén, các viên tròn và các viên nang. Sau đó, chế phẩm sơ chế rắn này được phân chia tiếp thành dạng liều đơn vị thuộc các loại nêu trên chứa, ví dụ, từ 0,1mg đến 500mg hoạt chất theo sáng chế này.

Các viên nén hoặc các viên tròn chứa hợp chất có công thức I có thể được bao hoặc được bào chế theo cách khác để tạo ra dạng liều có ưu điểm về hoạt động kéo dài. Ví dụ, viên nén hoặc viên tròn có thể chứa thành phần liều bên trong và thành phần liều bên ngoài, thành phần sau ở dạng lớp bao lên thành phần trước. Hai thành phần này có thể được tách bằng lớp bao tan trong ruột mà nó có tác dụng chống lại quá trình phân rã trong dạ dày và cho phép thành phần bên trong đi qua ở trạng thái nguyên vẹn đến tá tràng hoặc tri hoãn được sự phân giải. Nhiều loại nguyên liệu có thể được sử dụng cho các lớp bọc hoặc bao tan trong ruột như vậy, các nguyên liệu này bao gồm nhiều axit polyme và các hỗn hợp gồm các axit polyme với các nguyên liệu này như senlac, rượu xetylic, và xenluloza axetat.

Các dạng lỏng trong đó các hợp chất và các dược phẩm theo sáng chế này có thể được kết hợp vào để dùng qua đường miệng hoặc bằng cách tiêm bao gồm dung dịch nước, siro đã được tạo vị một cách thích hợp, các huyền phù trong nước hoặc trong dầu, và nhũ tương đã được tạo vị với các loại dầu ăn được như dầu hạt bông, dầu vừng, dầu dừa, hoặc dầu lạc, cũng như các loại cồn ngọt và các chất dẫn được dùng tương tự.

Các dược phẩm để xông hoặc bơm bao gồm dung dịch và các loại huyền phù trong các dung môi nước hoặc hữu cơ hữu cơ, hoặc hỗn hợp của chúng, và các loại bột. Các dược phẩm lỏng hoặc rắn có thể chứa các tá dược được dùng thích hợp như trên. Theo một số phương án, các dược phẩm được dùng qua đường miệng hoặc đường hô hấp qua

mũi nhằm tác dụng tại chỗ hoặc toàn thân. Các dược phẩm có thể được tạo khí dung bằng cách sử dụng các khí trơ. Dung dịch đã được tạo khí dung có thể được hít trực tiếp từ thiết bị tạo khí dung hoặc thiết bị tạo khí dung có thể được gắn vào nút gạc trên mặt nạ, hoặc máy thở áp suất dương không liên tục. Các dược phẩm dạng dung dịch, huyền phù, hoặc bột có thể được dùng qua đường miệng hoặc qua đường mũi từ các dụng cụ mà phân phối chế phẩm theo cách thích hợp.

Lượng hợp chất hoặc dược phẩm được dùng cho bệnh nhân thay đổi tùy theo thuốc được dùng, mục đích của việc dùng thuốc, như phòng bệnh hay điều trị bệnh, trạng thái của bệnh nhân, cách dùng thuốc, và các yếu tố tương tự. Trong các ứng dụng điều trị, các dược phẩm có thể được cho bệnh nhân đã mắc bệnh dùng với lượng đủ để chữa trị hoặc kìm hãm ít nhất một phần triệu chứng của bệnh này và các biến chứng của nó. Lượng hữu hiệu sẽ phụ thuộc vào tình trạng bệnh được điều trị cũng như theo quyết định của thầy thuốc điều trị tùy theo các yếu tố như mức độ nặng của bệnh, tuổi, thể trọng và tình trạng chung của bệnh nhân, và các yếu tố tương tự.

Các dược phẩm được dùng cho bệnh nhân có thể ở dạng các dược phẩm nêu trên. Các dược phẩm này có thể được tiệt trùng theo các kỹ thuật tiệt trùng thông thường, hoặc có thể được lọc tiệt trùng. Dung dịch nước có thể được bao gói để sử dụng nguyên dạng, hoặc được sấy khô ở nhiệt độ thấp, chế phẩm sấy khô ở nhiệt độ thấp được kết hợp với chất mang vô trùng trong nước trước khi dùng. Độ pH của các chế phẩm chứa hợp chất này thường nằm trong khoảng từ 3 đến 11, tốt hơn là từ 5 đến 9 và tốt nhất là từ 7 đến 8. Cần phải hiểu rằng việc sử dụng thành phần nhất định trong số các tá dược, các chất mang, hoặc các chất làm ổn định nêu trên sẽ tạo ra các muối dược dụng.

Liều điều trị bệnh của hợp chất có công thức I có thể thay đổi theo, ví dụ, mục đích sử dụng cụ thể mà áp dụng điều trị đó, cách dùng hợp chất này, sức khỏe và tình trạng của bệnh nhân, và quyết định của thầy thuốc kê đơn. Tỷ phần hoặc nồng độ của hợp chất có công thức I trong dược phẩm có thể thay đổi tùy theo nhiều yếu tố bao gồm liều lượng, các tính chất hóa học (ví dụ, tính kỵ nước), và đường dùng. Ví dụ, hợp chất có công thức I có thể được đưa vào dung dịch nước đệm sinh lý chứa khoảng 0,1% đến 10% trọng lượng/thể tích hợp chất này để dùng ngoài đường tiêu hóa. Một số khoảng liều lượng thông thường nằm trong khoảng từ 1µg/kg đến 1g/kg thể trọng hàng ngày. Theo một số phương án, khoảng liều lượng nằm trong khoảng từ 0,01mg/kg đến 100mg/kg thể trọng hàng ngày. Liều lượng có thể phụ thuộc vào các biến số như loại và mức độ diễn

tiến của bệnh hoặc rối loạn bệnh lý, tình trạng sức khỏe chung của bệnh nhân cụ thể, hiệu quả sinh học tương đối của hợp chất được chọn, thành phần tá dược, và đường dùng của nó. Lượng hữu hiệu có thể được ngoại suy từ đường cong liều lượng-đáp ứng thu được *in vitro* hoặc từ hệ thử nghiệm trên mẫu động vật.

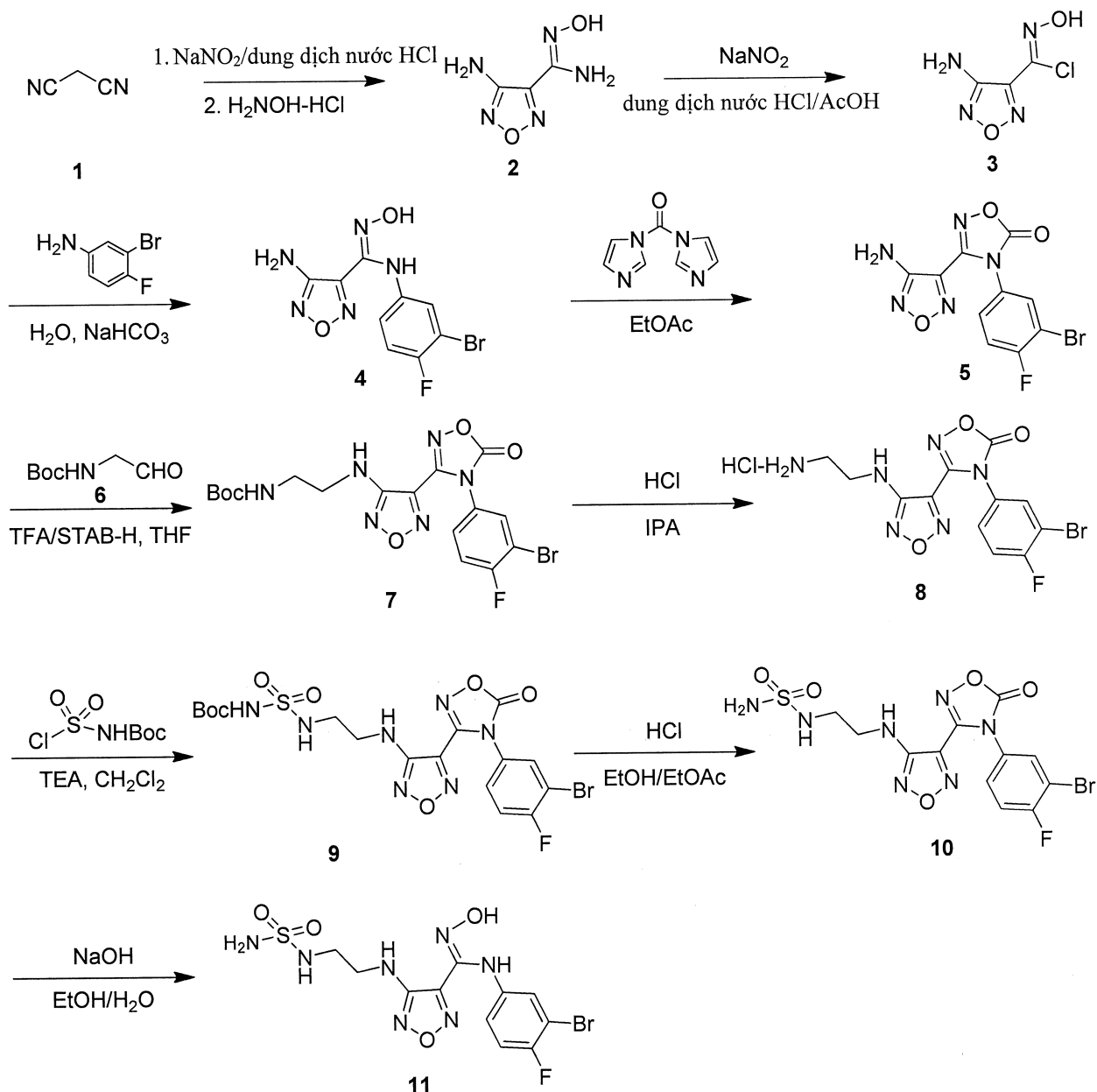
Hợp chất có công thức I cũng có thể tạo bào chế kết hợp với một hoặc nhiều hoạt chất bổ sung mà có thể bao gồm được chất bất kỳ như các tác nhân kháng virus, các loại vaccin, các kháng thể, các chất tăng cường miễn dịch, các tác nhân chặn miễn dịch, các tác nhân kháng viêm và các chất tương tự.

Đơn yêu cầu cấp bằng độc quyền sáng chế này còn bao gồm các kit được dụng hữu ích, ví dụ, để điều trị hoặc phòng các bệnh liên quan đến IDO hoặc các rối loạn bệnh lý, bệnh béo phì, bệnh đái tháo đường và các bệnh khác được đề cập đến trong bản mô tả này bao gồm một hoặc nhiều vật chứa mà chứa được phẩm chứa lượng hữu hiệu để điều trị bệnh của hợp chất có công thức I. Các kit này còn có thể bao gồm, nếu muốn, một hoặc nhiều thành phần kit được thông thường khác nhau, ví dụ, vật chứa với một hoặc nhiều chất mang được dụng, vật chứa bổ sung, v.v., như để được nhận thấy đối với chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này. Hướng dẫn sử dụng ở dạng được cài vào hoặc ở dạng nhãn, biểu thị lượng các thành phần sẽ được dùng, hướng dẫn cách dùng, và/hoặc hướng dẫn cách trộn các thành phần, cũng có thể được bao gồm trong kit này.

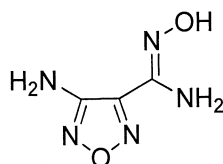
Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế sẽ được bộc lộ một cách chi tiết dựa vào các ví dụ cụ thể. Các ví dụ sau được bộc lộ chỉ nhằm mục đích minh họa, và không nhằm giới hạn phạm vi của sáng chế theo cách bất kỳ nào. Chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này dễ dàng nhận biết nhiều loại thông số không quan trọng mà có thể được thay đổi hoặc được cải biến để tạo ra các kết quả ngang bằng.

Ví dụ 1. Tổng hợp 4-({2-[(aminosulfonyl)amino]ethyl}amino)-N-(3-bromo-4-florophenyl)-N'-hydroxy-1,2,5-oxadiazol-3-carboximidamit



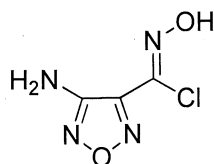
Bước A: 4-amino-*N*'-hydroxy-1,2,5-oxadiazol-3-carboximidamid (2)



Malononitril [Aldrich, sản phẩm # M1407] (320,5g, 5mol) được bổ sung vào nước (7l), được làm nóng sơ bộ đến nhiệt độ 45°C và khuấy ở nhiệt độ 45°C trong thời gian 5 phút. Dung dịch thu được làm nguội trong bể nước đá và natri nitrit (380g, 5,5mol, 1,1 đương lượng) được bổ sung vào. Khi nhiệt độ đạt đến 10°C , dung dịch axit clohydric 6N (55ml) được bổ sung vào. Phản ứng tỏa nhiệt nhẹ được đảm bảo khi nhiệt độ đạt đến

16°C. Sau 15 phút bể làm lạnh được loại bỏ và hỗn hợp phản ứng này được khuấy trong thời gian 1,5 giờ ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 16°C đến 18°C. Hỗn hợp phản ứng này được giảm nhiệt độ đến 13°C và 50% hydroxylamin hydroclorua trong nước (990g, 15mol, 3,0 đương lượng) được bổ sung toàn bộ một lần. Nhiệt độ được tăng đến 26°C. Khi phản ứng tỏa nhiệt giảm bớt, bể làm lạnh được loại bỏ và tiếp tục khuấy trong thời gian 1 giờ ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 26°C đến 27°C, sau đó nó được đưa từ từ đi hồi lưu. Duy trì việc hồi lưu trong thời gian 2 giờ và sau đó hỗn hợp phản ứng được phép làm lạnh dần qua đêm. Hỗn hợp phản ứng này được khuấy trong bể nước đá và axit clohydric 6N (800ml) được bổ sung vào thành nhiều phần trong thời gian 40 phút để điều chỉnh đến độ pH7,0. Tiếp tục khuấy trong bể nước đá ở nhiệt độ 5°C. Chất kết tủa được gom bằng cách lọc, rửa sạch kỹ bằng nước và làm khô trong lò chân không (50°C) để tạo ra sản phẩm mong muốn (644g, 90%) ở dạng rắn màu trắng đục. ^{13}C NMR (75 MHz, CD_3OD): δ 156,0, 145,9, 141,3; $\text{C}_3\text{H}_5\text{N}_5\text{O}_2$ (phân tử lượng (MW) 143,10), LCMS (EI) m/e 144,0 ($\text{M}^+ + \text{H}$).

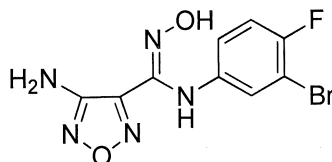
Bước B: 4-amino-N-hydroxy-1,2,5-oxadiazol-3-carboximidoyl clorua (3)



4-amino-N'-hydroxy-1,2,5-oxadiazol-3-carboximidamit(422g, 2,95mol) được bổ sung vào hỗn hợp gồm nước (5,9l), axit axetic (3l) và axit clohydric 6N (1,475l, 3,0 đương lượng) và huyền phù được khuấy ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 42°C đến 45°C cho đến khi thu được dung dịch trong. Natri clorua (518g, 3,0 đương lượng) được bổ sung vào và dung dịch này được khuấy trong bể đá/nước/metanol. Dung dịch chứa natri nitrit (199,5g, 0,98 đương lượng) trong nước (700ml) được bổ sung trong thời gian 3,5 giờ trong khi duy trì nhiệt độ thấp hơn 0°C. Sau khi bổ sung xong, tiếp tục khuấy trong bể nước đá trong thời gian 1,5 giờ và sau đó hỗn hợp phản ứng được nâng nhiệt độ lên đến 15°C. Chất kết tủa được gom bằng cách lọc, rửa sạch kỹ bằng nước, được đưa vào etyl axetat (3,4l), xử lý bằng natri sulfat khan (500g) và khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 1 giờ. Huyền phù này được lọc qua natri sulfat (200g) và dịch lọc được cô trên thiết bị làm bay hơi kiểu quay. Cặn được hòa tan trong metyl *tert*-butyl ete (5,5l), xử lý bằng than hoạt tính (40g), khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 40 phút và lọc

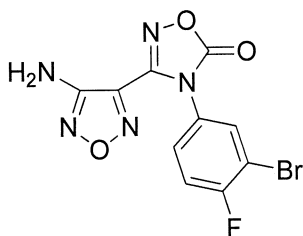
qua xelit. Dung môi được loại bỏ trong thiết bị làm bay hơi kiểu quay và sản phẩm tạo ra được làm khô trong lò chân không (45°C) để tạo ra sản phẩm mong muốn (256g, 53,4%) ở dạng rắn màu trắng đục. ^{13}C NMR (100MHz, CD_3OD) δ 155,8, 143,4, 129,7; $\text{C}_3\text{H}_3\text{ClN}_4\text{O}_2$ (phân tử lượng (MW) 162,53), LCMS (EI) m/e 163/165 ($\text{M}^+ + \text{H}$).

Bước C: 4-Amino-N-(3-bromo-4-florophenyl)-N'-hydroxy-1,2,5-oxadiazol-3-carboximidamit (4)



4-Amino-N-hydroxy-1,2,5-oxadiazol-3-carboximidoyl clorua (33,8g, 208mmol) được trộn với nước (300ml). Ở nhiệt độ 60°C, 3-bromo-4-florophenyl (Sigma-Aldrich) (43,6g, 229mmol, 1,1 đương lượng) được bổ sung vào huyền phù và khuấy trong thời gian 10 phút. Dung dịch chứa natri bicacbonat (26,3g, 313mmol, 1,5 đương lượng) trong nước (300ml) được bổ sung vào trong thời gian 15 phút và khuấy ở nhiệt độ 60°C. Sau khi khuấy 20 phút, phân tích LCMS biểu thị hoàn thành phản ứng. Sau đó, hỗn hợp phản ứng này được giảm nhiệt độ đến nhiệt độ trong phòng và chiết bằng etyl axetat (2 x 300ml). Dung dịch etyl axetat kết hợp được làm khô trên natri sulfat khan và cô để tạo ra sản phẩm mong muốn (65g, 99%) ở dạng rắn màu trắng đục, mà được dùng trong phản ứng tiếp theo mà không cần tinh chế thêm. $\text{C}_9\text{H}_7\text{BrFN}_5\text{O}_2$ (phân tử lượng (MW) 316,09), LCMS (EI) m/e 316/318 ($\text{M}^+ + \text{H}$).

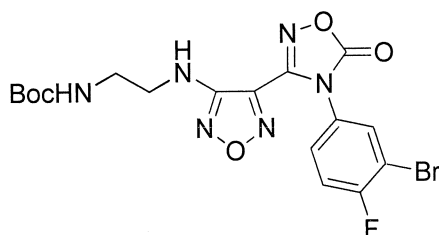
Bước D: 3-(4-amino-1,2,5-oxadiazol-3-yl)-4-(3-bromo-4-florophenyl)-1,2,4-oxadiazol-5-(4H)-on (5)



Hỗn hợp gồm 4-amino-N-(3-bromo-4-florophenyl)-N'-hydroxy-1,2,5-oxadiazol-3-carboximidamit (65,7g, 208mmol), *N,N*-carbonyldiimidazol (Sigma-Aldrich) (50,6g, 312mmol, 1,5 đương lượng), và etyl axetat (750ml) được nâng nhiệt độ lên đến 60°C và khuấy trong thời gian 20 phút. Phân tích LCMS biểu thị phản ứng đã hoàn thành. Hỗn

hợp phản ứng này được giảm nhiệt độ đến nhiệt độ trong phòng, được rửa bằng axit clohydric 1N (2 x 750ml), được làm khô trên natri sulfat, và cô. Sản phẩm thô được nghiền cùng với hỗn hợp gồm diclometan, etyl axetat, và dietyl ete để tạo ra sản phẩm mong muốn (60,2g, 85%) ở dạng rắn màu trắng đục. ^1H NMR (300MHz, DMSO- d_6) δ 8,05 (m, 1H), 7,69 (m, 1H), 7,57 (t, 1H, $J = 8,7$ Hz), 6,58 (s, 2H); $\text{C}_{10}\text{H}_5\text{BrFN}_5\text{O}_3$ (phân tử lượng (MW) 342,08), LCMS (EI) m/e 342/344 ($\text{M}^+ + \text{H}$).

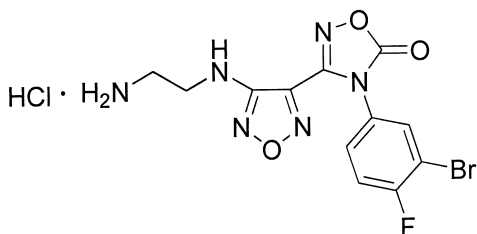
Bước E: tert-butyl [2-({4-[2-(3-bromo-4-florophenyl)-5-oxo-2,5-đihydro-1,2,4-oxadiazol-3-yl]-1,2,5-oxadiazol-3-yl}amino)ethyl]carbamate (7)



Natri triaxetoxibohydrua (10,59g, 49,97mmol, 10,0 đương lượng) được bổ sung thành nhiều phần vào dung dịch chứa axit trifloaxetic (20,0ml) và tetrahydrofuran (10,0ml) và khuấy trong khí quyển nitơ. Hỗn hợp này được khuấy trong thời gian 10 phút ở nhiệt độ trong phòng và sau đó được làm lạnh đến nhiệt độ -5°C . Dung dịch chứa 3-(4-amino-1,2,5-oxadiazol-3-yl)-4-(3-bromo-4-florophenyl)-1,2,4-oxadiazol-5(4H)-on (1,71g, 5,0mmol) và *tert*-butyl (2-oxoethyl)carbamate (Sigma-Aldrich) (1,99g, 12,5mmol, 2,5 đương lượng) trong THF (15,0ml) được bổ sung nhỏ giọt trong thời gian 30 phút và khuấy trong khi duy trì nhiệt độ thấp hơn 0°C . Hỗn hợp phản ứng này được khuấy ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ -5°C đến 0°C và phần bổ sung của *tert*-butyl (2-oxoethyl)carbamate (0,20g, 1,2mmol, 0,24 đương lượng) trong THF (1,0ml) được bổ sung nhỏ giọt với khoảng cách thời gian 20 phút, 40 phút, 4 giờ. Sắc ký lỏng cao áp biểu thị phản ứng đã hoàn thành sau 5,25 giờ. Hỗn hợp phản ứng này được rót vào natri bicacbonat lạnh (500ml) và dung dịch này được khuấy ở nhiệt độ trong phòng qua đêm. Chất kết tủa được gom bằng cách lọc và rửa bằng nước muối. Cặn thu được được trộn với heptan (40ml) và dietyl ete (40ml) và khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 5 giờ. Chất kết tủa được gom bằng cách lọc, rửa bằng dietyl ete và làm khô trong lò chân không để tạo ra sản phẩm mong muốn (1953mg, 80,5%) ở dạng rắn màu trắng đục, ^1H NMR (300MHz, DMSO- d_6) δ 8,08 (m, 1H), 7,71 (m, 1H), 7,59 (t, 1H, $J = 8,7$ Hz), 6,94 (m, 1H), 6,52 (m,

1H), 3,32 (m, 2H), 3,15 (m, 2H), 1,36 (s, 9H); C₁₇H₁₈BrFN₆O₅ (phân tử lượng (MW) 485,26); LCMS (EI) *m/e* 507/509 (M⁺ + Na).

Bước F: 3-{4-[(2-aminoethyl)amino]-1,2,5-oxadiazol-3-yl}-4-(3-bromo-4-florophenyl)-1,2,4-oxadiazol-5(4H)-on hydroclorua (8)



Phương pháp A (điều chế từ *tert*-butyl [2-(4-[2-(3-bromo-4-florophenyl)-5-oxo-2,5-dihydro-1,2,4-oxadiazol-3-yl]-1,2,5-oxadiazol-3-yl)amino)etyl]carbamate; *Bước E*):

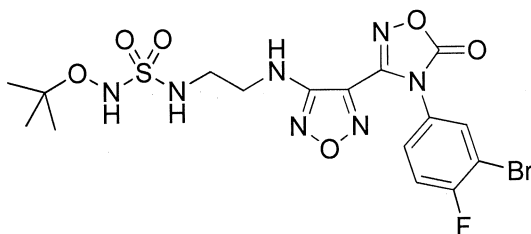
Tert-butyl [2-(4-[2-(3-bromo-4-florophenyl)-5-oxo-2,5-dihydro-1,2,4-oxadiazol-3-yl]-1,2,5-oxadiazol-3-yl)amino)etyl]carbamate (20g, 41,2mmol) và isopropanol (255ml) được nạp vào bình dung tích 500ml. Huyền phù đặc được khuấy ở nhiệt độ trong phòng. Khí hydroclorua (7,55g, 207mmol, 5,0 đương lượng) được bổ sung vào huyền phù đặc bằng ống thủy tinh dưới bề mặt trong thời gian 16 phút. Sau đó, etyl axetat (111ml) được bổ sung vào mẻ này và hỗn hợp phản ứng này được nâng nhiệt độ lên đến 43°C và khuấy trong thời gian 7,5 giờ. Mẻ này được giảm nhiệt độ đến 19°C và etyl axetat (44ml) được bổ sung vào. Huyền phù đặc được lọc và cặn thu được được rửa bằng etyl axetat (2 x 55ml). Chất rắn đã tách được làm khô trong điều kiện áp suất giảm ở nhiệt độ 45°C trong thời gian 15 giờ để tạo ra sản phẩm mong muốn (16,61g, hiệu suất 95,5%) ở dạng rắn màu trắng đục đến trắng, ¹H NMR (300MHz, DMSO-*d*₆) δ 8,11 (bs, 3H), 7,78 (m, 1H), 7,73 (m, 1H), 7,59 (t, 1H, *J* = 8,7 Hz), 6,74 (t, 1H, *J* = 6,1 Hz), 3,50 (m, 2H), 3,02 (m, 2H); C₁₂H₁₁BrClFN₆O₃, (phân tử lượng (MW) 421,61; C₁₂H₁₀BrFN₆O₃ đối với bazơ tự do, phân tử lượng (MW) 385,15), LCMS (EI) *m/e* 385/387 (M⁺ + H).

Phương pháp B (điều chế trực tiếp từ 3-(4-amino-1,2,5-oxadiazol-3-yl)-4-(3-bromo-4-florophenyl)-1,2,4-oxadiazol-5(4H)-on; *Bước D*):

Natri triaxetoxibohyđrua (2,33g, 11,0mmol, 11,0 đương lượng) được trộn với axit trifloaxetic (12,0ml, 155,8mmol, 155,8 đương lượng). Dung dịch thu được được trộn ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 30 phút. Dung dịch chứa 3-(4-amino-1,2,5-oxadiazol-3-yl)-4-(3-bromo-4-florophenyl)-1,2,4-oxadiazol-5(4H)-on (hợp chất có công

thức **5**, 0,342g, 1,0mmol) và *tert*-butyl (2-oxoethyl)carbamate (Sigma-Aldrich) (1,04g, 6,51mmol, 6,5 đương lượng) trong điclorometan (10,0ml) và axetonitril (6,0ml) được khuấy trong khí quyển N₂. Dung dịch này được làm lạnh đến nhiệt độ -5°C và dung dịch chứa natri triaxetoxibohyđrua và axit trifloaxetic được bổ sung nhỏ giọt vào trong thời gian 5 phút. Hỗn hợp phản ứng này được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 4 giờ. Sắc ký lỏng cao áp và LC-MS (M⁺ - Boc + H: 385/387, kiểu bromua) biểu thị tỷ lệ giữa sản phẩm mong muốn và nguyên liệu ban đầu là 4 chia 1. Hỗn hợp này được cô và pha loãng bằng điclorometan (10ml). Dung dịch này được làm lạnh đến nhiệt độ 0°C và natri hydroxit 4N được bổ sung từ từ trong khi duy trì nhiệt độ nằm trong khoảng từ 0°C đến 5°C để điều chỉnh độ pH nằm trong khoảng từ 8 đến 9. Lớp nước được chiết bằng điclorometan (3 x 10ml). Dung dịch điclorometan tổ hợp được rửa bằng natri bicacbonat và nước muối, được làm khô trên natri sulfat và cô. Sau đó, cặn thô được hòa tan trong điclorometan (6,0ml) và dung dịch thu được làm lạnh đến nhiệt độ 0°C. Axit clohydric 4N trong đioxan (3,0ml) được bổ sung nhỏ giọt ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 0°C đến 5°C. Hỗn hợp này được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 20 phút. Chất kết tủa được gom bằng cách lọc, rửa bằng dietyl ete, và làm khô trong chân không để tạo ra sản phẩm mong muốn (289mg, 54%) ở dạng rắn màu trắng đục, ¹H NMR (300MHz, DMSO-*d*₆) δ 8,11 (bs, 3H), 7,78 (m, 1H), 7,73 (m, 1H), 7,59 (t, 1H, *J* = 8,7 Hz), 6,74 (t, 1H, *J* = 6,1 Hz), 3,50 (m, 2H), 3,02 (m, 2H); C₁₂H₁₁BrClFN₆O₃, (phân tử lượng (MW) 421,61; C₁₂H₁₀BrFN₆O₃ đối với bazơ tự do, MW 385,15), LCMS (EI) *m/e* 385/387 (M⁺ + H).

Bước G: tert-butyl ({[2-({4-[4-(3-bromo-4-florophenyl)-5-oxo-4,5-dihydro-1,2,4-oxadiazol-3-yl]-1,2,5-oxadiazol-3-yl}amino)ethyl]amino}sulfonyl)carbamate (9)



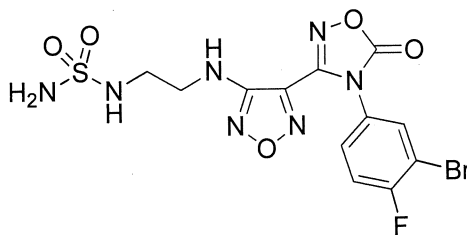
Bình phản ứng thủy tinh dung tích 20-l được nạp 3-{4-[(2-aminoethyl)amino]-1,2,5-oxadiazol-3-yl}-4-(3-bromo-4-florophenyl)-1,2,4-oxadiazol-5(4*H*)-on hydroclorua (1200g, 2,846mol) và điclorometan (6,5l) ở nhiệt độ trong phòng. Trietylamin (950g,

9,39mol, 3,3 đương lượng) được bổ sung vào mẻ này trong thời gian 7 phút. Sau đó, mẻ này được làm lạnh đến nhiệt độ $-14,6^{\circ}\text{C}$.

Bình đáy tròn dung tích 5-l được nạp *tert*-butanol (253g, 3,41mol, 1,2 đương lượng) và điclotetan (2,6l). Dung dịch này được làm lạnh đến nhiệt độ $0,9^{\circ}\text{C}$. Clorosulfonyl isoxyanat (463g, 3,27mol, 1,15 đương lượng) được bổ sung vào dung dịch này trong thời gian 43 phút trong khi duy trì mẻ này nhiệt độ dưới 10°C . Dung dịch *tert*-butyl (clorosulfonyl)carbamate tạo ra được giữ ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 3°C đến 5°C trong thời gian 1 giờ.

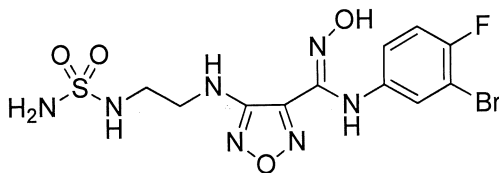
Dung dịch chứa *tert*-butyl (clorosulfonyl)carbamate được bổ sung vào bình phản ứng trong thời gian hơn 73 phút trong khi duy trì mẻ này nhiệt độ dưới 0°C . Sau đó, mẻ này được làm ấm đến nhiệt độ 10°C trong thời gian hơn 1 giờ và sau đó được khuấy ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 10°C đến 14°C trong thời gian 1 giờ. Nước (4,8l) được bổ sung vào mẻ này và hỗn hợp phản ứng đã tới được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 14,5 giờ. Mẻ này được để yên và các pha phân tách. Dung dịch điclotetan được tách giữ trong bình phản ứng và nạp axit axetic (513g) vào trong thời gian 25 phút để làm kết tủa sản phẩm. Huyền phù đặc tạo thành được khuấy ở nhiệt độ 20°C trong thời gian 2,5 giờ. Sản phẩm được tách bằng cách lọc và rửa bằng điclotetan (1,8l). Sản phẩm được làm khô trong điều kiện áp suất giảm (-30inHg) ở nhiệt độ 45°C trong thời gian 16 giờ để tạo ra sản phẩm mong muốn (1342g, hiệu suất 83,5%) ở dạng rắn màu trắng. ^1H NMR (400MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 10,90 (s, 1 H), 8,08 (dd, $J = 6,2, 2,5$ Hz, 1 H), 7,72 (m, 1 H), 7,59 (t, $J = 8,6$ Hz, 1 H), 6,58 (t, $J = 5,7$ Hz, 1 H), 3,38 (dd, $J = 12,7, 6,2$ Hz, 2 H), 3,10 (dd, $J = 12,1, 5,9$ Hz, 2 H), 1,41 (s, 9 H). $\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{BrFN}_7\text{O}_7\text{S}$ (phân tử lượng (MW) 564,34), LCMS (EI) m/e 585,9/587,9 ($\text{M}^+ + \text{Na}$).

Bước H: N-[2-({4-[4-(3-bromo-4-fluorophenyl)-5-oxo-4,5-dihydro-1,2,4-oxadiazol-3-yl]-1,2,5-oxadiazol-3-yl}amino)ethyl]sulfamit (10)



Etanol (12l) được bổ sung vào bình dung tích 20-l chứa *tert*-butyl ({[2-({4-[4-(3-bromo-4-florophenyl)-5-oxo-4,5-dihydro-1,2,4-oxadiazol-3-yl]-1,2,5-oxadiazol-3-yl}amino)etyl]amino}sulfonyl)carbamate (1200g, 2,126mol) ở nhiệt độ 20°C. Hỗn hợp thu được được khuấy ở nhiệt độ trong phòng và được nạp khí hydroclorua (472g, 12,9mol, 6,07 đương lượng). Mẻ này được nâng nhiệt độ lên đến 50°C và nhiệt độ được duy trì trong thời gian 3 giờ cho đến khi hoàn thành phản ứng. Dung môi được loại bỏ bằng chân không chưng cất ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 33°C đến 39°C và 6kg sản phẩm chưng cất được gom. Etyl axetat (6,8l, 6,1kg) được bổ sung vào mẻ này và được chưng cất để gom 5,1kg sản phẩm chưng cất. Etyl axetat (7,2l, 6,48kg) được bổ sung vào mẻ này và được chưng cất để gom 5,1kg sản phẩm chưng cất. Etyl axetat (2,4l, 2,14kg) được bổ sung vào mẻ này để điều chỉnh tỷ lệ dung môi. ¹H NMR biểu thị tỷ lệ mol giữa etyl axetat và etanol là 1,0:0,1. Dung dịch này được nâng nhiệt độ lên đến 65°C. *n*-Heptan (4,1kg) được bổ sung vào dung dịch này ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 60°C đến 65°C trong thời gian hơn 43 phút. Huyền phù đặc tạo thành được khuấy ở nhiệt độ 65°C trong thời gian 1 giờ. Huyền phù đặc được giảm nhiệt độ đến 20°C trong thời gian 2,5 giờ và khuấy ở nhiệt độ đó trong thời gian 15 giờ. Sản phẩm được gom bằng cách lọc và rửa bằng *n*-heptan (2,42l). Sản phẩm được làm khô trong điều kiện áp suất giảm ở nhiệt độ 45°C trong thời gian 65 giờ để tạo ra sản phẩm mong muốn (906g, hiệu suất 91,8%) ở dạng rắn màu trắng đục. ¹H NMR (400MHz, DMSO-*d*₆) δ 8,08 (dd, *J* = 6,2) 7,72 (m, 1 H), 7,59 (t, *J* = 8,7 Hz, 1 H), 6,67 (t, *J* = 5,9 Hz, 1H), 6,55 (s, 2H) 6,52 (t, *J* = 6,0 Hz, 1 H), 3,38 (dd, *J* = 12,7, 6,3 Hz, 2 H), 3,11 (dd, *J* = 12,3, 6,3 Hz, 2H); C₁₂H₁₁BrFN₇O₅S (phân tử lượng (MW) 464,23), LCMS (EI) *m/e* 485,8/487,8 (M⁺ - C₅H₈O₂ + Na).

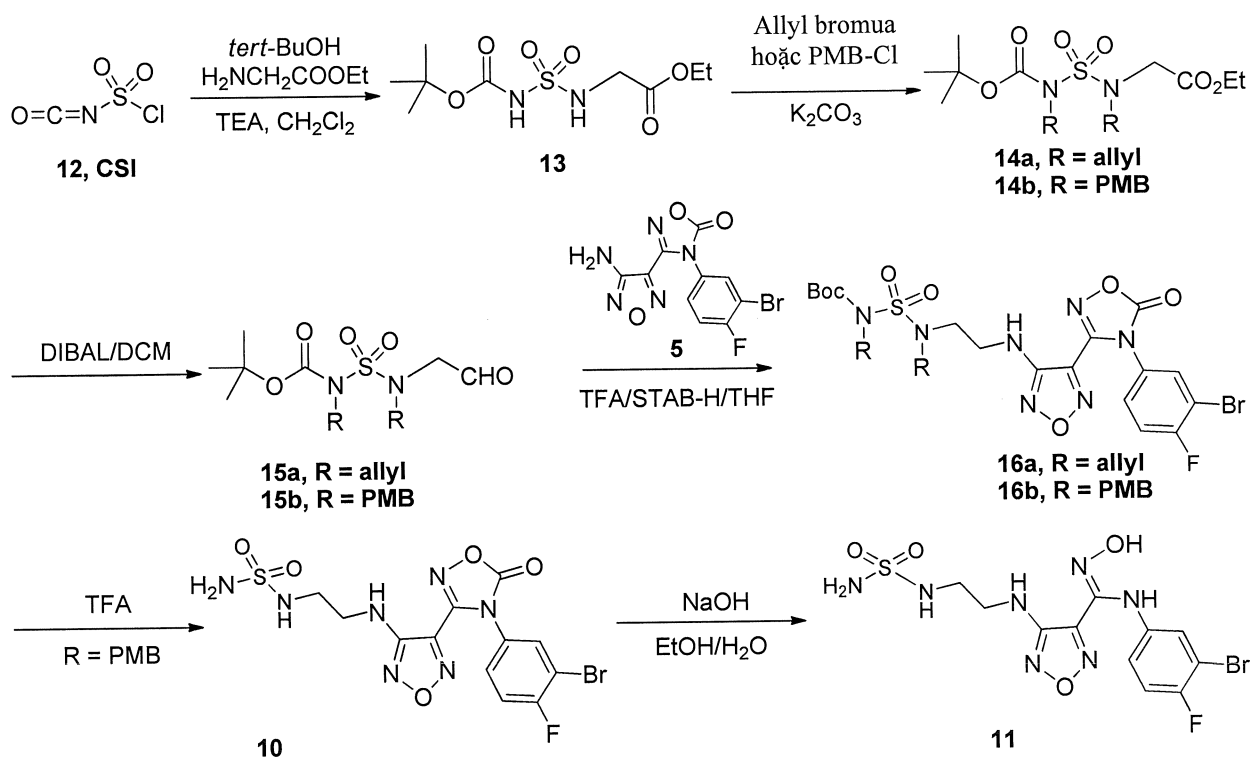
Bước I: 4-({2-[(Aminosulfonyl)amino]etyl}amino)-N-(3-bromo-4-florophenyl)-N'-hydroxy-1,2,5-oxadiazol-3-carboximidamit (11)



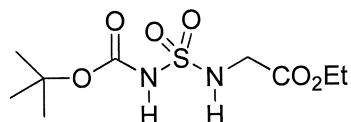
N-[2-({4-[4-(3-bromo-4-florophenyl)-5-oxo-4,5-dihydro-1,2,4-oxadiazol-3-yl]-1,2,5-oxadiazol-3-yl}amino)etyl]sulfamit (799,4g, 1,72mol) và THF (3,2l) được bổ sung vào bình phản ứng thủy tinh dung tích 20l. Dung dịch thu được khuấy ở nhiệt độ 20°C trong thời gian 7 phút và sau đó được nạp nước (1,6l). Mẻ này được giảm nhiệt độ đến

2°C và nạp 30% trọng lượng dung dịch natri hydroxit (475ml, 666,4g, 4,99mol, 2,9 đương lượng) trong thời gian 8 phút. Mẻ này được nâng nhiệt độ lên đến 20°C và nhiệt độ được duy trì trong 16 giờ. Sau đó, mẻ này được nạp metyl *tert*-butyl ete (8,0l) trong 23 phút. Nước (2,7l) được bổ sung vào và mẻ này được làm lạnh đến nhiệt độ 0°C. Sau đó, mẻ này được nạp 85% trọng lượng axit phosphoric (370,7g, 3,22mol, 1,9 đương lượng) trong thời gian 9 phút. Mẻ này được nâng nhiệt độ lên đến 20°C và khuấy trong thời gian 1 giờ. Mẻ này được để yên và các pha phân tách. Lớp hữu cơ được giữ lại trong bình phản ứng và được nạp nước (2,9l) và 85% trọng lượng axit phosphoric (370,7g, 3,22mol) và khuấy ở nhiệt độ 20°C trong thời gian 1 giờ. Mẻ này được để yên và các pha phân tách. Lớp hữu cơ được giữ lại trong bình phản ứng và được nạp nước (3,2l) và khuấy ở nhiệt độ 20°C trong thời gian 1 giờ. Mẻ này được để yên và các pha phân tách. Dung dịch hữu cơ được giữ lại trong bình phản ứng và được chưng cất trong điều kiện áp suất giảm ở nhiệt độ 20°C để loại bỏ 3,4kg sản phẩm chưng cất. Etanol (4,8l) được nạp vào mẻ này và mẻ này được chưng cất đến thể tích 3,2l. Quy trình chưng cất này được lặp lại thêm một lần. Etanol (0,6l) được bổ sung vào mẻ này để điều chỉnh thể tích của mẻ này đến 4l. Mẻ này được khuấy ở nhiệt độ 20°C trong thời gian 16 giờ và sau đó được nạp nước (6,39l). Huyền phù đặc tạo ra được khuấy ở nhiệt độ 20°C trong thời gian 5 giờ. Sản phẩm được gom bằng cách lọc và rửa hai lần bằng hỗn hợp gồm etanol (529ml) và nước (1059ml). Sản phẩm được làm khô trong điều kiện áp suất giảm ở nhiệt độ 45°C trong thời gian 65 giờ để tạo ra sản phẩm mong muốn (719,6g, 95,4%) ở dạng rắn màu trắng. ¹H NMR (400MHz, DMSO-*d*₆): δ 11,51 (s, 1 H), 8,90 (s, 1 H), 7,17 (t, *J* = 8,8 Hz, 1 H), 7,11 (dd, *J* = 6,1, 2,7 Hz, 1 H), 6,76 (m, 1 H), 6,71 (t, *J* = 6,0 Hz, 1 H), 6,59 (s, 2 H), 6,23 (t, *J* = 6,1 Hz, 1 H), 3,35 (dd, *J* = 10,9, 7,0 Hz, 2 H), 3,10 (dd, *J* = 12,1, 6,2 Hz, 2 H); C₁₁H₁₃BrFN₇O₄S (phân tử lượng (MW) 438,23), LCMS (EI) *m/e* 437,9/439,9 (M⁺ + H).

Ví dụ 2. Quy trình khác điều chế N-[2-({4-[4-(3-bromo-4-florophenyl)-5-oxo-4,5-dihydro-1,2,4-oxadiazol-3-yl]-1,2,5-oxadiazol-3-yl}amino)etyl]sulfamit

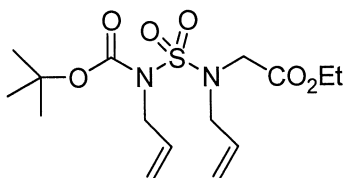


Bước 1: *Etyl* {[*(tert*-butoxycarbonyl)-amino]sulfonyl}aminoaxetat (13)



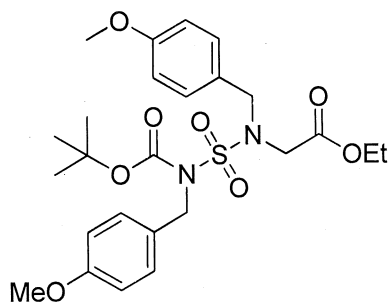
Dung dịch chứa clorosulfonylisoxyanat (Sigma-Aldrich) (5,0ml, 57,4mmol) trong điclorometan (100ml) được làm lạnh đến nhiệt độ 0°C. Rượu *tert*-butylic (4,26g, 57,4mmol, 1,0 đương lượng) được bổ sung điclorometan (100ml) qua phễu cấp liệu. Dung dịch này được khuấy ở nhiệt độ 0°C trong thời gian 30 phút. Glyxin etyl este hydroclorua (8,82g, 63,2mmol, 1,1 đương lượng) được bổ sung nhỏ giọt vào trietylamin (20,0ml, 144mmol, 2,5 đương lượng) ở nhiệt độ 0°C. Hỗn hợp phản ứng này được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 4 giờ. Phản ứng được pha loãng bằng điclorometan (100ml) và rửa bằng axit clohydric 0,1N và nước muối. Lớp hữu cơ được làm khô trên natri sulfat và cô để tạo ra sản phẩm mong muốn (13,2g, 81,4%) ở dạng rắn thô màu trắng đục, mà được dùng trong phản ứng tiếp theo mà không cần tinh chế thêm. ^1H NMR (300MHz, DMSO- d_6) δ 10,88 (s, 1H), 8,07 (t, 1H, $J = 6,1$ Hz), 4,08 (q, 2H, $J = 7,1$ Hz), 3,78 (d, 2H, $J = 6,1$ Hz), 1,40 (s, 9H), 1,18 (t, 3H, $J = 7,1$ Hz).

Bước 2a. *Etyl* (allyl{[allyl(*tert*-butoxycarbonyl)amino]sulfonyl}amino)axetat (14a)



Etyl (1-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)sulfonyl-2,2-dimethylpropan-1-yl-3-oxopropanoate) (1,0g, 3,54mmol) được trộn với kali cacbonat (2,45g, 17,7mmol, 5,0 đương lượng) và axetonitril (23,0ml) trong khí quyển N₂ ở nhiệt độ trong phòng. Allyl bromua (1,84ml, 21,2mmol, 6,0 đương lượng) được bổ sung nhỏ giọt vào. Hỗn hợp phản ứng này được nâng nhiệt độ lên đến 70°C và khuấy ở nhiệt độ đó trong thời gian 14 giờ. Sắc ký lỏng cao áp (HPLC) và phân tích LCMS biểu thị phản ứng đã hoàn thành. Hỗn hợp phản ứng được lọc và dịch lọc được cô. Cặn được hòa tan trong điclorometan và rửa bằng natri bicacbonat và nước muối. Lọc hữu cơ được làm khô trên natri sulfat và cô để tạo ra sản phẩm mong muốn (1,11g, 87%) ở dạng rắn thô màu trắng đục, mà được dùng trong phản ứng tiếp theo mà không cần tinh chế thêm. ¹H NMR (300MHz, DMSO-*d*₆) δ 5,75 (m, 2H), 5,20 (m, 4H), 4,12 (m, 6H), 3,89 (m, 2H), 1,43 (s, 9H), 1,18 (t, 3H, J = 8,7 Hz).

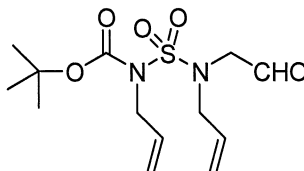
Bước 2b. Etyl (1-((tert-butoxycarbonyl)(4-metoxybenzyl)amino)sulfonyl-2,2-dimethylpropan-1-yl-3-oxopropanoate) (14b)



Etyl (1-((*tert*-butoxycarbonyl) amino)sulfonyl-2,2-dimethylpropan-1-yl-3-oxopropanoate) (1,00g, 4,0mmol) được trộn với *N,N*-dimetylformamit (DMF, 6,0ml) và khuấy ở nhiệt độ trong phòng. Natri iodua (0,01g, 0,1mmol, 0,025 đương lượng), kali cacbonat (2,40g, 20mmol, 5,0 đương lượng) và *para*-metoxybenzyl clorua (2,64ml, 19,5mmol, 4,875 đương lượng) được bổ sung vào hỗn hợp này. Hỗn hợp phản ứng này được nâng nhiệt độ lên đến 80°C và khuấy ở nhiệt độ 80°C trong thời gian 2 giờ. Phân tích LCMS biểu thị phản ứng đã hoàn thành. Hỗn hợp phản ứng này được giảm nhiệt độ đến nhiệt độ trong phòng và lọc qua xelit. Tầng xelit được rửa bằng điclorometan và các phần lọc hữu cơ đã tổ hợp được cô. Phần cặn đã cô được hòa tan trong điclorometan (20ml) và được rửa bằng natri bicacbonat (5 x 12ml)

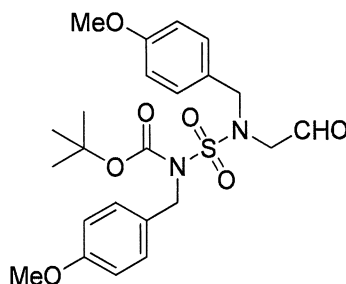
và nước muối. Lớp hữu cơ được làm khô trên natri sulfat và được cô. Cặn được tinh chế trên silicagel (từ 0% đến 40% ethyl axetat/hexan gradien rửa giải) để tạo ra sản phẩm mong muốn (1,39g, 80%) ở dạng rắn màu trắng đục. ^1H NMR (300MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 7,22 (m, 2H), 7,14 (m, 2H), 6,88 (m, 4H), 4,64 (s, 2H), 4,33 (s, 2H), 4,03 (q, 2H, $J = 7,1$ Hz), 3,92 (s, 2H), 3,72 (s, 3H), 3,71 (s, 3H), 1,39 (s, 9H), 1,14 (t, 3H, $J = 7,1$ Hz).

Bước 3a. Tert-butyl allyl{[allyl(2-oxoethyl)amino]sulfonyl}carbamate (15a)



Dung dịch chứa ethyl (allyl{[allyl(*tert*-butoxycarbonyl)amino]sulfonyl}amino)axetat (1,11g, 3,05mmol) trong điclorometan (15ml) ở nhiệt độ -78°C trong khí quyển N_2 được xử lý bằng diisobutylaluminun hydrua 1,0M trong điclorometan (3,66ml, 3,66mmol, 1,2 đương lượng). Hỗn hợp phản ứng này được khuấy ở nhiệt độ -78°C trong thời gian 1 giờ và sau đó được tôi bằng metanol (1,5ml) và xử lý bằng dung dịch natri kali tartrat bão hòa (65ml). Dung dịch này được khuấy ở nhiệt độ phòng qua đêm. Sau đó, lớp nước được chiết bằng điclorometan (3 x 20ml). Dung dịch điclorometan kết hợp được rửa bằng nước muối, được làm khô trên natri sulfat, được lọc, và cô để tạo ra sản phẩm mong muốn (0,62g, 64%) ở dạng dầu thô không màu đặc, mà được sử dụng trong phản ứng tiếp theo mà không cần tinh chế thêm. ^1H NMR (300MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 9,45 (s, 1H), 5,76 (m, 2H), 5,18 (m, 4H), 4,15 (m, 4H), 3,72 (m, 2H), 1,43 (s, 9H).

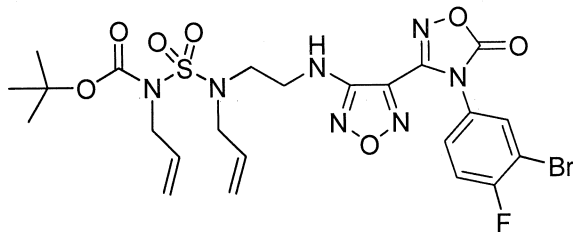
Bước 3b. tert-butyl (4-metoxybenzyl){[(4-metoxybenzyl)(2-oxoethyl)amino]sulfonyl}carbamate (15b)



Dung dịch chứa ethyl {[[(*tert*-butoxycarbonyl)(4-metoxybenzyl)amino]sulfonyl}(4-metoxybenzyl)amino]axetat (5,30g, 10mmol) trong điclorometan (20,0ml) ở nhiệt độ -78°C

trong khí quyển N₂ được xử lý bằng diisobutyl nhôm hydrua 1,0M trong điclorometan (12,2ml, 12,2mmol, 1,22 đương lượng). Hỗn hợp phản ứng này được khuấy ở nhiệt độ -78°C trong thời gian 3 giờ. Sau đó, hỗn hợp phản ứng được tôi bằng metanol (3ml) và xử lý bằng điclorometan (100ml) và dung dịch bão hòa chứa natri kali tartrat (150ml). Dung dịch này được khuấy ở nhiệt độ trong phòng qua đêm. Sau đó, lớp nước được chiết bằng điclorometan (3 x 20ml). Dung dịch điclorometan kết hợp được rửa bằng nước muối, được làm khô trên natri sulfat và cô. Sau đó, cặn này được tinh chế trên silicagel (rửa giải theo gradient 0% đến 30% etyl axetat/hexan) để tạo ra sản phẩm mong muốn (3,45g, 71%) ở dạng rắn màu trắng đục. ¹H NMR (300MHz, DMSO-*d*₆) δ 9,24 (s, 1H), 7,23 (m, 4H), 6,88 (m, 4H), 4,68 (s, 2H), 4,31 (s, 2H), 4,07 (s, 2H), 3,72 (s, 3H), 3,71 (s, 3H), 1,40 (s, 9H).

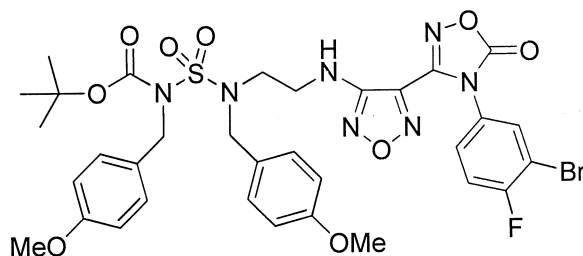
Bước 4a. Tert-butyl alyl(N-allyl-N-(2-(4-(4-(3-bromo-4-fluorophenyl)-5-oxo-4,5-dihydro-1,2,4-oxadiazol-3-yl)-1,2,5-oxadiazol-3-ylamino)ethyl)sulfamoyl)carbamate (16a)



Natri triaxetoxybohydrua (1,06g, 5,0mmol, 1,0 đương lượng), axit trifloaxetic (TFA, 2,0ml, 26mmol) và tetrahydrofuran (THF, 1,0ml) ở nhiệt độ môi trường được bổ sung vào bình dung tích 50-ml. Hỗn hợp này được làm lạnh đến nhiệt độ -5°C trong khí quyển N₂ và khuấy ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 0°C đến 5°C trong thời gian 10 phút. 3-(4-amino-1,2,5-oxadiazol-3-yl)-4-(3-bromo-4-fluorophenyl)-1,2,4-oxadiazol-5(4*H*)-on (0,171g, 5,0mmol; Bước D) và *tert*-butyl alyl{[allyl(2-oxoethyl)amino]sulfonyl}carbamate (0,398g, 2,5mmol, 0,5 đương lượng) trong THF (1,5ml) được bổ sung nhỏ giọt vào dung dịch này ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 0°C đến 5°C trong thời gian 5 phút. Hỗn hợp phản ứng tạo thành được khuấy trong khí quyển N₂ ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 0°C đến 5°C. Tại các thời điểm 20 phút, 40 phút, và 2,5 giờ, dung dịch chứa *tert*-butyl alyl{[allyl(2-oxoethyl)amino]sulfonyl}carbamate (0,040g, 0,125mmol, 0,25 đương lượng) trong THF (0,20ml) được bổ sung nhỏ giọt ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 0°C đến 5°C. Tại thời điểm 2,5 giờ, dung dịch chứa natri triaxetoxybohydrua (0,211g, 1,0mmol, 0,2 đương lượng) trong axit trifloaxetic (TFA, 1,5ml, 9,5mmol) được bổ sung ở nhiệt độ nằm

trong khoảng từ 0°C đến 5°C. Hỗn hợp phản ứng này được nâng nhiệt độ lên đến nhiệt độ trong phòng và khuấy qua đêm. Sau đó, hỗn hợp phản ứng này được rót vào dung dịch natri cacbonat lạnh bão hòa chứa (50ml) và chiết bằng điclorometan (3 x 20ml). Các phần chiết điclorometan kết hợp được rửa bằng nước muối, được làm khô trên natri sulfat, và cô. Sau đó, cặn được tinh chế trên silicagel (rửa giải theo gradien 0% đến 75% etyl axetat/hexan) để tạo ra sản phẩm mong muốn (0,239g, 74,2%) ở dạng rắn màu trắng đục, ^1H NMR (300MHz, DMSO- d_6) δ 8,07 (m, 1H), 7,71 (m, 1H), 7,58 (t, 1H, $J = 8,7$ Hz), 6,62 (m, 1H), 5,77 (m, 2H), 5,19 (m, 4H), 4,17 (m, 2H), 3,89 (m, 2H), 3,44 (m, 2H), 3,38 (m, 2H), 1,42 (s, 9H); $\text{C}_{23}\text{H}_{27}\text{BrFN}_7\text{O}_7\text{S}$ (phân tử lượng (MW) 644,47), LCMS (EI) m/e 544/546 ($\text{M}^+ - \text{Boc} + \text{H}$).

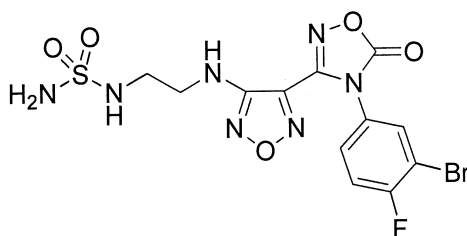
Bước 4b. Tert-butyl N-(2-(4-(4-(3-bromo-4-florophenyl)-5-oxo-4,5-dihydro-1,2,4-oxadiazol-3-yl)-1,2,5-oxadiazol-3-ylamino)ethyl)-N-(4-metoxybenzyl)sulfonyl(4-metoxybenzyl)carbamate (16b)



Natri triaxetoxibohydrua (0,50g, 2,37mmol, 4,74 đương lượng), axit trifloaxetic (TFA, 1,0ml, 13mmol) và tetrahydrofuran ở nhiệt độ môi trường được bổ sung vào bình dung tích 50-ml. Hỗn hợp này được làm lạnh đến nhiệt độ nằm trong khoảng từ 0°C đến 5°C trong khí quyển N_2 và khuấy ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 0°C đến 5°C trong thời gian 10 phút. *tert*-butyl (4-metoxybenzyl){[(4-metoxybenzyl)(2-oxoethyl)amino]sulfonyl}-carbamate (0,40g, 0,84mmol, 1,68 đương lượng) và 3-(4-amino-1,2,5-oxadiazol-3-yl)-4-(3-bromo-4-florophenyl)-1,2,4-oxadiazol-5(4*H*)-on (0,17g, 0,50mmol; Bước D) trong tetrahydrofuran (THF, 1,50ml) được bổ sung vào dung dịch này ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 0°C đến 5°C. Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 0°C đến 5°C trong thời gian 45 phút và sau đó dung dịch chứa *tert*-butyl (4-metoxybenzyl){[(4-metoxybenzyl)(2-oxoethyl) amino]sulfonyl}carbamate (0,12g, 0,20mmol, 0,4 đương lượng) trong THF (0,50ml) được bổ sung vào ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 0°C đến 5°C. Sau khi khuấy ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 0°C đến 5°C trong thời gian 1 giờ, hỗn hợp phản ứng được nâng nhiệt độ từ từ lên đến nhiệt độ trong phòng

và khuấy. Tại các thời điểm 2,5 giờ và 4,5 giờ, axit trifloaxetic (0,25ml) được bổ sung vào. Tại thời điểm 5 giờ, dung dịch chứa *tert*-butyl (4-metoxymethyl) {[[(4-metoxymethyl)(2-oxoethyl)amino]sulfonyl}carbamate (0,060g, 0,1mmol, 0,2 đương lượng) trong THF (0,20ml) được bổ sung vào. Tại thời điểm 6,5 giờ, dung dịch chứa natri triaxetoxymethyl (0,060g, 0,24mmol, 0,48 đương lượng) trong axit trifloaxetic (0,25ml) được bổ sung vào. Sắc ký lỏng cao áp (HPLC) biểu thị vẫn còn khoảng 4% nguyên liệu ban đầu 3-(4-amino-1,2,5-oxadiazol-3-yl)-4-(3-bromo-4-fluorophenyl)-1,2,4-oxadiazol-5(4*H*)-on (từ Bước D). Hỗn hợp phản ứng này được khuấy ở nhiệt độ trong phòng qua đêm. Sắc ký lỏng cao áp (HPLC) biểu thị phản ứng đã hoàn thành. Hỗn hợp phản ứng này được rót vào dung dịch natri cacbonat bão hòa lạnh chứa (50ml) và hỗn hợp này được chiết bằng diclometan (3 x 20ml). Các phần chiết diclometan kết hợp được rửa bằng nước muối, được làm khô trên natri sulfat, và cô. Sau đó, cặn được tinh chế trên silicagel (rửa giải theo gradient từ 0% đến 30% ethyl axetat/hexan) để tạo ra sản phẩm mong muốn (0,33g, 82,5%) ở dạng rắn màu trắng đục. ¹H NMR (300MHz, DMSO-*d*₆) δ 8,06 (m, 1H), 7,69 (m, 1H), 7,57 (t, 1H, *J* = 8,7 Hz), 7,22 (m, 4H), 6,87 (m, 4H), 6,48 (m, 1H), 4,72 (s, 2H), 4,36 (s, 2H), 3,70 (s, 6H), 3,39 (m, 2H), 3,31 (m, 2H), 1,37 (s, 9H); C₃₃H₃₅BrFN₇O₉S (phân tử lượng (MW) 804,64), LCMS (EI) *m/e* 826/828 (M⁺ - Boc + Na).

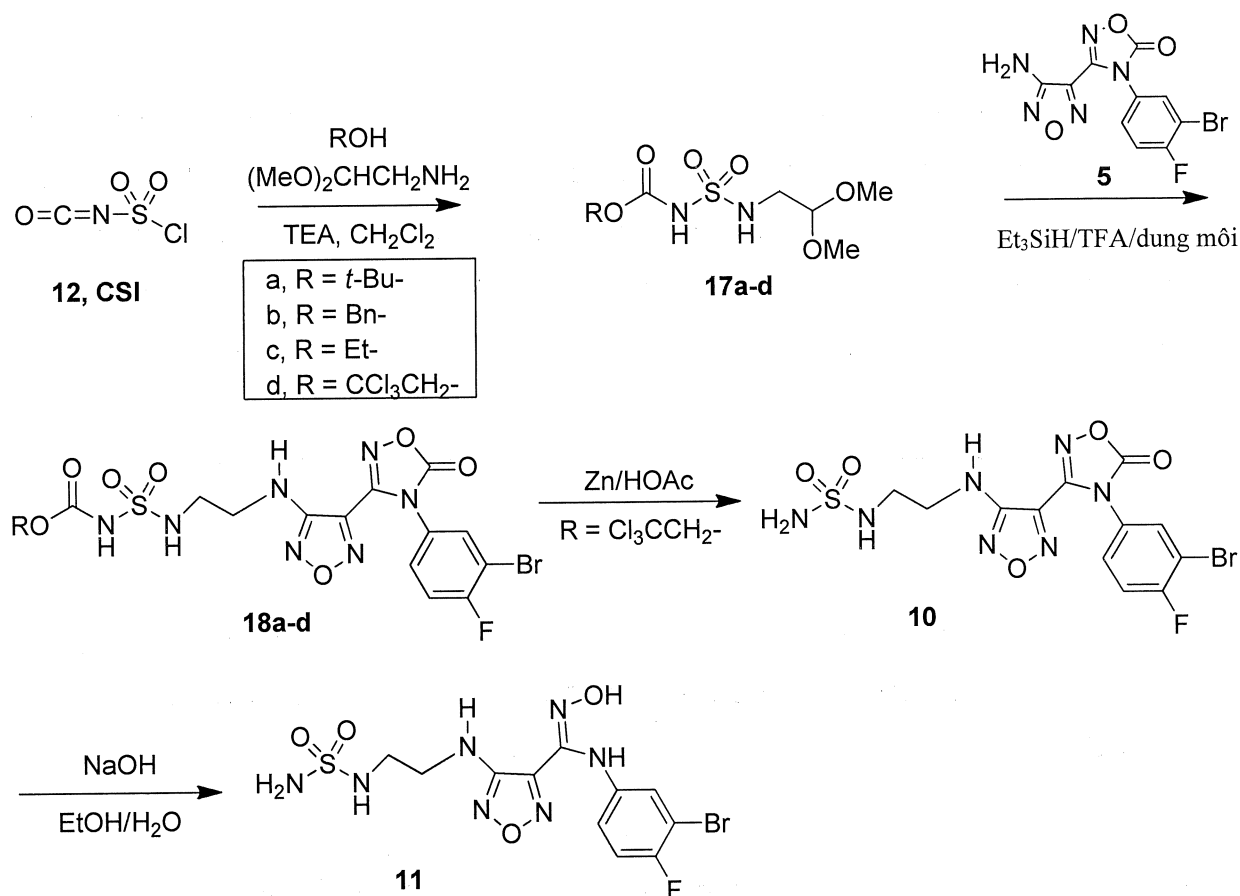
Bước 5: N-[2-({4-[4-(3-bromo-4-fluorophenyl)-5-oxo-4,5-dihydro-1,2,4-oxadiazol-3-yl]-1,2,5-oxadiazol-3-yl}amino)ethyl]sulfamit (10)



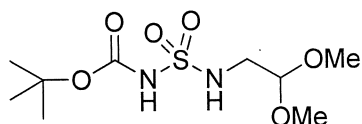
Tert-butyl {[[2-({4-[4-(3-bromo-4-fluorophenyl)-5-oxo-4,5-dihydro-1,2,4-oxadiazol-3-yl]-1,2,5-oxadiazol-3-yl}amino)ethyl](4-metoxymethyl)amino]sulfonyl}(4-metoxymethyl)carbamate (40,2mg, 0,050mmol) trong axit trifloaxetic (TFA, 0,50ml, 6,5mmol) ở nhiệt độ môi trường được bổ sung vào bình dung tích 25-ml. Hỗn hợp phản ứng này được nâng nhiệt độ lên đến 70°C trong khí quyển N₂ và khuấy trong thời gian 1 giờ. Sắc ký lỏng cao áp (HPLC) biểu thị phản ứng đã hoàn thành. Hỗn hợp phản ứng này

được giảm nhiệt độ đến nhiệt độ trong phòng và TFA được làm bay hơi. TFA còn lại được loại bỏ bằng cách xử lý bằng điclorometan (3 x 10ml), tiếp theo làm bay hơi trong chân không. Sau đó, cặn này được nghiền cùng với điclorometan và metanol để tạo ra sản phẩm mong muốn (20mg, 87%) ở dạng rắn thô màu trắng đục, ^1H NMR (400MHz, DMSO- d_6) δ 8,08 (dd, $J = 6,2, 2,5$ Hz, 1 H), 7,72 (m, 1 H), 7,59 (t, $J = 8,7$ Hz, 1 H), 6,67 (t, $J = 5,9$ Hz, 1H), 6,55 (s, 2H) 6,52 (t, $J = 6,0$ Hz, 1 H), 3,38 (dd, $J = 12,7, 6,3$ Hz, 2 H), 3,11 (dd, $J = 12,3, 6,3$ Hz, 2H); $\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{BrFN}_7\text{O}_5\text{S}$ (phân tử lượng (MW) 464,23), LCMS (EI) m/e 487,8/489,8 ($\text{M}^+ + \text{Na}$).

Ví dụ 3. Quy trình khác điều chế *N*-[2-({4-[4-(3-bromo-4-florophenyl)-5-oxo-4,5-dihydro-1,2,4-oxadiazol-3-yl]-1,2,5-oxadiazol-3-yl}amino)ethyl]sulfamit



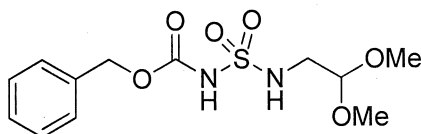
Bước 1a. tert-butyl N-(2,2-đimetoxyetyl)sulfamoylcarbamate (17a)



Dung dịch chứa clorosulfonylisoxyanat (11,32g, 80mmol) trong điclorometan (120ml) được làm lạnh đến nhiệt độ 0°C. Rượu *tert*-butylic (7,65ml, 80,0mmol, 1,0

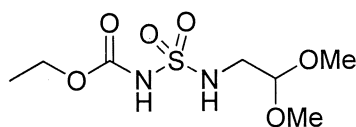
đương lượng) được bổ sung vào qua phễu cấp liệu. Hỗn hợp này được khuấy ở nhiệt độ 0°C trong thời gian 1,5 giờ. Dung dịch chứa aminoaxetalđehyt đimetyl axetal (8,76ml, 80,0mmol, 1,0 đương lượng) và trietylamin (TEA, 33,4ml, 240mmol, 3,0 đương lượng) trong metylen clorua (DCM 120,0ml) được bổ sung nhỏ giọt qua phễu cấp liệu vào hỗn hợp này. Hỗn hợp phản ứng này được nâng nhiệt độ lên đến nhiệt độ trong phòng và khuấy qua đêm. Hỗn hợp phản ứng được xử lý bằng axit clohydric 0,1N và lớp hữu cơ được rửa bằng nước muối, làm khô trên natri sulfat và cô để tạo ra sản phẩm mong muốn (15,6g, 68,5%) ở dạng rắn thô màu trắng đục, mà được sử dụng cho phản ứng tiếp theo mà không cần tinh chế thêm: ^1H NMR (300MHz, DMSO- d_6) δ 10,84 (s, 1H), 7,62 (t, 1H, $J = 6,0$ Hz), 4,38 (t, 1H, $J = 5,5$ Hz), 3,24 (s, 6H), 2,96 (dd, 2H, $J = 5,8$ Hz), 1,41 (s, 9H).

Bước 1b. Benzyl N-(2,2-đimetoxyetyl)sulfamoylcarbamate (17b)



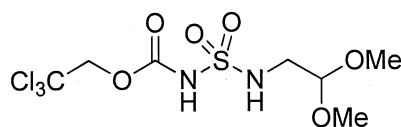
Dung dịch chứa clorosulfonylisoxyanat (16,26g, 114,9mmol) trong điclorometan (100ml) được làm lạnh đến nhiệt độ 0°C. Rượu benzylic (12,44g, 115,0mmol, 1,0 đương lượng) được bổ sung vào qua phễu cấp liệu. Hỗn hợp này được khuấy ở nhiệt độ 0°C trong thời gian 0,5 giờ. Hỗn hợp gồm aminoaxetalđehyt đimetyl axetal (13,25g, 126,0mmol, 1,1 đương lượng) và trietylamin (TEA, 17,4g, 172mmol, 1,5 đương lượng) bổ sung nhỏ giọt qua phễu cấp liệu được vào hỗn hợp này ở nhiệt độ dưới 15°C. Hỗn hợp phản ứng này được nâng nhiệt độ lên đến nhiệt độ trong phòng và khuấy qua đêm. Hỗn hợp phản ứng này được xử lý bằng axit clohydric 0,5N (100ml) và pha hữu cơ đã gom được rửa bằng nước muối, làm khô trên natri sulfat và cô trong chân không để tạo ra sản phẩm mong muốn (23,5g, 64,3%) ở dạng rắn thô màu trắng đục. ^1H NMR (300MHz, DMSO- d_6) δ 11,29 (s, 1H), 7,90 (t, 1H, $J = 6,0$ Hz), 7,37 (m, 5H), 5,12 (s, 2H), 4,35 (t, 1H, $J = 5,5$ Hz), 3,21 (s, 6H), 2,97 (dd, 2H, $J = 5,8$ Hz).

Bước 1c. Etyl N-(2,2-đimetoxyetyl)sulfamoylcarbamate (17c)



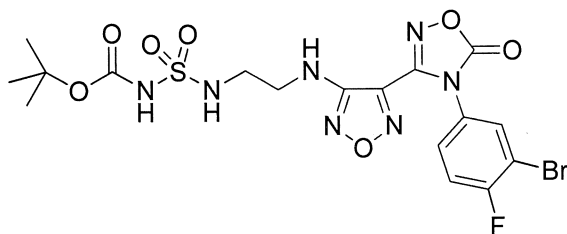
Dung dịch chứa clorosulfonylisoxyanat (11,32g, 80mmol) trong điclorometan (120ml) được làm lạnh đến nhiệt độ 0°C. Etanol (4,67ml, 80,0mmol, 1,0 đương lượng) được bổ sung vào qua phễu cấp liệu. Hỗn hợp này được khuấy ở nhiệt độ 0°C trong thời gian 1,5 giờ. Dung dịch chứa aminoaxetaldehyt dimetyl axetal (8,76ml, 80,0mmol, 1,0 đương lượng), triethylamin (TEA, 33,4ml, 240mmol, 3,0 đương lượng) trong điclorometan (DCM, 120,0ml) được bổ sung nhỏ giọt qua phễu cấp liệu vào hỗn hợp này ở nhiệt độ 0°C. Hỗn hợp phản ứng này được nâng nhiệt độ lên đến nhiệt độ trong phòng và khuấy qua đêm. Hỗn hợp phản ứng được xử lý bằng axit clohydric 0,1N và pha hữu cơ đã gom được rửa bằng nước muối, làm khô trên natri sulfat và cô trong chân không để tạo ra sản phẩm mong muốn (11,2g, 55%) ở dạng rắn thô màu trắng đục. ^1H NMR (300MHz, DMSO- d_6) δ 11,13 (s, 1H), 7,81 (t, 1H, $J = 6,0$ Hz), 4,37 (t, 1H, $J = 5,5$ Hz), 4,09 (q, 2H, $J = 7,1$ Hz), 3,23 (s, 6H), 2,97 (dd, 2H, $J = 5,8$ Hz), 1,19 (t, 3H, $J = 7,1$ Hz).

Bước 1d. 2,2,2-Tricloroetyl N-(2,2-đimetoxyetyl)sulfamoylcarbamat (17d)



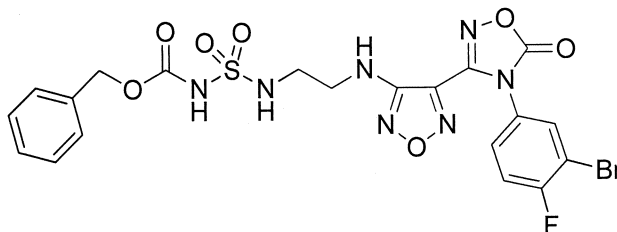
Dung dịch chứa clorosulfonylisoxyanat (6,96ml, 80mmol) trong điclorometan (120ml) được làm lạnh đến nhiệt độ 0°C. 2,2,2-tricloroetanol (7,67ml, 80,0mmol, 1,0 đương lượng) được bổ sung qua phễu cấp liệu ở nhiệt độ 0°C. Hỗn hợp này được khuấy ở nhiệt độ 0°C trong thời gian 1,5 giờ. Sau đó, dung dịch chứa aminoaxetaldehyt dimetyl axetal (8,76ml, 80,0mmol, 1,0 đương lượng) và triethylamin (TEA, 33,4ml, 240mmol, 3,0 đương lượng) trong điclorometan (DCM, 120,0ml) được bổ sung nhỏ giọt qua phễu cấp liệu vào hỗn hợp này ở nhiệt độ 0°C. Hỗn hợp phản ứng này được nâng nhiệt độ lên đến nhiệt độ trong phòng và khuấy ở nhiệt độ trong phòng qua đêm. Hỗn hợp phản ứng được xử lý bằng axit clohydric 0,1N và pha hữu cơ đã gom được rửa bằng nước muối, làm khô trên Na_2SO_4 , và cô để tạo ra sản phẩm mong muốn (28,01g, 97%) ở dạng rắn thô màu trắng đục, mà được dùng trong phản ứng tiếp theo mà không cần tinh chế thêm. ^1H NMR (300MHz, DMSO- d_6) δ 11,79 (s, 1H), 8,08 (t, 1H, $J = 5,9$ Hz), 4,90 (s, 2H), 4,37 (t, 1H, $J = 5,5$ Hz), 3,23 (s, 6H), 3,00 (dd, 2H, $J = 5,7$ Hz).

Bước 2a. tert-butyl ({[2-({[4-(3-bromo-4-florophenyl)-5-oxo-4,5-đihydro-1,2,4-oxadiazol-3-yl]-1,2,5-oxadiazol-3-yl}amino)etyl]amino}sulfonyl)carbamat (18a)



Hỗn hợp gồm 3-(4-amino-1,2,5-oxadiazol-3-yl)-4-(3-bromo-4-fluorophenyl)-1,2,4-oxadiazol-5(4*H*)-on (103mg, 0,302mmol, 1,5 đương lượng; Bước D) và *tert*-butyl *N*-(2,2-dimetoxyetyl)sulfamoylcarbamát (57,2mg, 0,201mmol) trong điclorometan (1,0ml) được khuấy trong khí quyển N₂ ở nhiệt độ trong phòng. Axit trifloaxetic (0,50ml, 6,5mmol) và trietylsilan (80,2μl, 0,502mmol, 2,5 đương lượng) được bổ sung nhỏ giọt vào hỗn hợp này. Hỗn hợp phản ứng này được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 2 giờ. Sắc ký lỏng cao áp (HPLC) biểu thị mức độ chuyển hóa khoảng 30%. Hỗn hợp phản ứng này được làm lạnh đến nhiệt độ 0°C và được tôi bằng dung dịch natri bicacbonat bão hòa đến độ pH~ 8. Hỗn hợp này được chiết trong etyl axetat (3 x 10ml). Các dịch chiết hữu cơ kết hợp được rửa bằng nước muối, làm khô trên natri sulfat và cô. Cặn được tinh chế theo phương pháp sắc ký lớp mỏng điều chế (50% etyl axetat/hexan) để tạo ra sản phẩm mong muốn (27,5mg, 29,5%) ở dạng rắn màu trắng đục. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 10,90 (s, 1H), 8,08 (dd, *J* = 6,2, 2,5Hz, 1H), 7,72 (m, 1H), 7,59 (t, *J* = 8,6Hz, 1H), 6,58 (t, *J* = 5,7Hz, 1H), 3,38 (dd, *J* = 12,7, 6,2Hz, 2H), 3,10 (dd, *J* = 12,1, 5,9Hz, 2H), 1,41 (s, 9H). C₁₇H₁₉BrFN₇O₇S (phân tử lượng (MW) 564,34), LCMS (EI) *m/e* 485,8/487,8 (M⁺ - C₅H₈O₂ + Na).

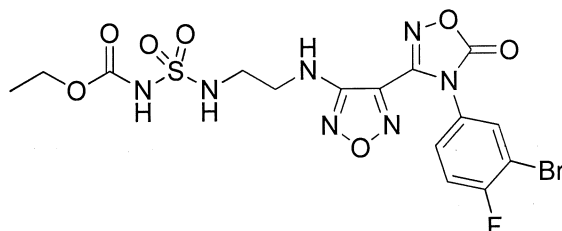
Bước 2b. Benzyl ({[2-({[4-(3-bromo-4-fluorophenyl)-5-oxo-4,5-dihydro-1,2,4-oxadiazol-3-yl]-1,2,5-oxadiazol-3-yl}amino)etyl]amino}sulfonyl)carbamát (18*b*)



Hỗn hợp gồm 3-(4-amino-1,2,5-oxadiazol-3-yl)-4-(3-bromo-4-fluorophenyl)-1,2,4-oxadiazol-5(4*H*)-on (68mg, 0,20mmol; thu được theo bước D) và benzyl {[2,2-dimetoxyetyl]amino}sulfonyl}carbamát (191mg, 0,60mmol, 3,0 đương lượng) trong 1,2-đicloetan (3,0ml) được làm lạnh đến nhiệt độ 0°C. Axit trifloaxetic (1,0ml, 13,0mmol) và trietylsilan

(105µl, 0,66mmol, 3,3 đương lượng) được bổ sung nhỏ giọt vào hỗn hợp này. Hỗn hợp phản ứng này được khuấy ở nhiệt độ 0°C trong thời gian 2 giờ. Sắc ký lỏng cao áp (HPLC) biểu thị phản ứng đã hoàn thành. Hỗn hợp phản ứng này được làm lạnh đến nhiệt độ 0°C và được tôi bằng dung dịch natri bicacbonat bão hòa đến độ pH~ 8. và hỗn hợp phản ứng đã tôi được chiết bằng EtOAc (3 x 10ml). Các dịch chiết hữu cơ kết hợp được rửa bằng nước muối, được làm khô trên natri sulfat và cô. Sau đó, cặn này được khuấy trong hỗn hợp gồm heptan và diethyl ete qua đêm. Các chất rắn được gom bằng cách lọc, rửa bằng heptan và được sấy khô trong chân không để tạo ra sản phẩm mong muốn (125mg, 99%) ở dạng rắn thô màu trắng đục. ¹H NMR (300MHz, DMSO-*d*₆) δ 11,31 (s, 1H), 8,05 (m, 1H), 7,87 (m, 1H), 7,68 (m, 1H), 7,56 (m, 1H), 7,32 (m, 5H), 6,54 (m, 1H), 5,07 (s, 2H), 3,29 (m, 2H), 3,09 (m, 2H); C₂₀H₁₇BrFN₇O₇S (phân tử lượng (MW) 598,36), LCMS *m/e* 598/600 (M⁺ + H).

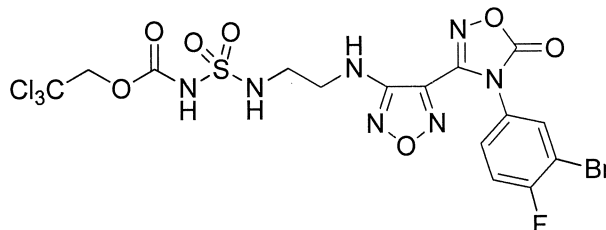
Bước 2c. Etyl ({[2-({4-[4-(3-bromo-4-florophenyl)-5-oxo-4,5-dihydro-1,2,4-oxadiazol-3-yl]-1,2,5-oxadiazol-3-yl}amino)ethylamino}sulfonyl)carbamate (18c)



Hỗn hợp gồm 3-(4-amino-1,2,5-oxadiazol-3-yl)-4-(3-bromo-4-florophenyl)-1,2,4-oxadiazol-5(4*H*)-on (68mg, 0,20mmol; thu được theo bước D) và etyl {[2,2-đimetoxyetyl]amino}sulfonyl}carbamate (154mg, 0,600mmol, 3,0 đương lượng) trong 1,2-đicloetan (2,50ml, 31,7mmol) được khuấy ở nhiệt độ 0°C. Axit trifloaxetic (1,00ml, 13,0mmol) và trietylsilan (105µl, 0,66mmol, 3,3 đương lượng) được bổ sung nhỏ giọt vào hỗn hợp này. Hỗn hợp phản ứng này được khuấy ở nhiệt độ 0°C trong thời gian 3 giờ. Sắc ký lỏng cao áp (HPLC) biểu thị mức độ chuyển hóa thành sản phẩm mong muốn 97,5%. Hỗn hợp phản ứng này được làm lạnh đến nhiệt độ 0°C và được tôi bằng dung dịch natri bicacbonat bão hòa đến độ pH~8. Hỗn hợp này được chiết trong etyl axetat (3 x 10ml). Các dịch chiết hữu cơ kết hợp được rửa bằng nước muối, được làm khô trên natri sulfat và cô. Cặn được khuấy trong hỗn hợp gồm heptan và diethyl ete qua đêm. Các chất rắn được gom bằng cách lọc, được rửa bằng heptan để tạo ra sản phẩm mong muốn (95mg, 88%) ở dạng rắn thô màu trắng đục, ¹H NMR (300MHz, DMSO-*d*₆) δ 11,18 (s, 1H), 8,08

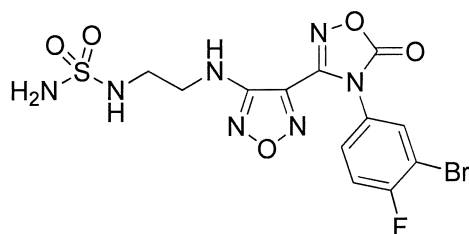
(m, 1H), 7,70 (m, 2H), 7,59 (t, 1H, $J = 8,7$ Hz), 6,56 (s, 1H), 4,04 (d, 2H, $J = 7,2$ Hz), 3,35 (m, 2H), 3,11 (m, 2H), 1,15 (t, 3H, $J = 7,2$ Hz); $C_{15}H_{15}BrFN_7O_7S$ (phân tử lượng (MW) 536,29), LCMS (EI) m/e 536/538 ($M^+ + H$).

Bước 2d. 2,2,2-Tricloroetyl ({[2-(4-[4-(3-bromo-4-florophenyl)-5-oxo-4,5-đihydro-1,2,4-oxadiazol-3-yl]-1,2,5-oxadiazol-3-yl]amino)etyl]amino}sulfonyl)carbamate (18d)



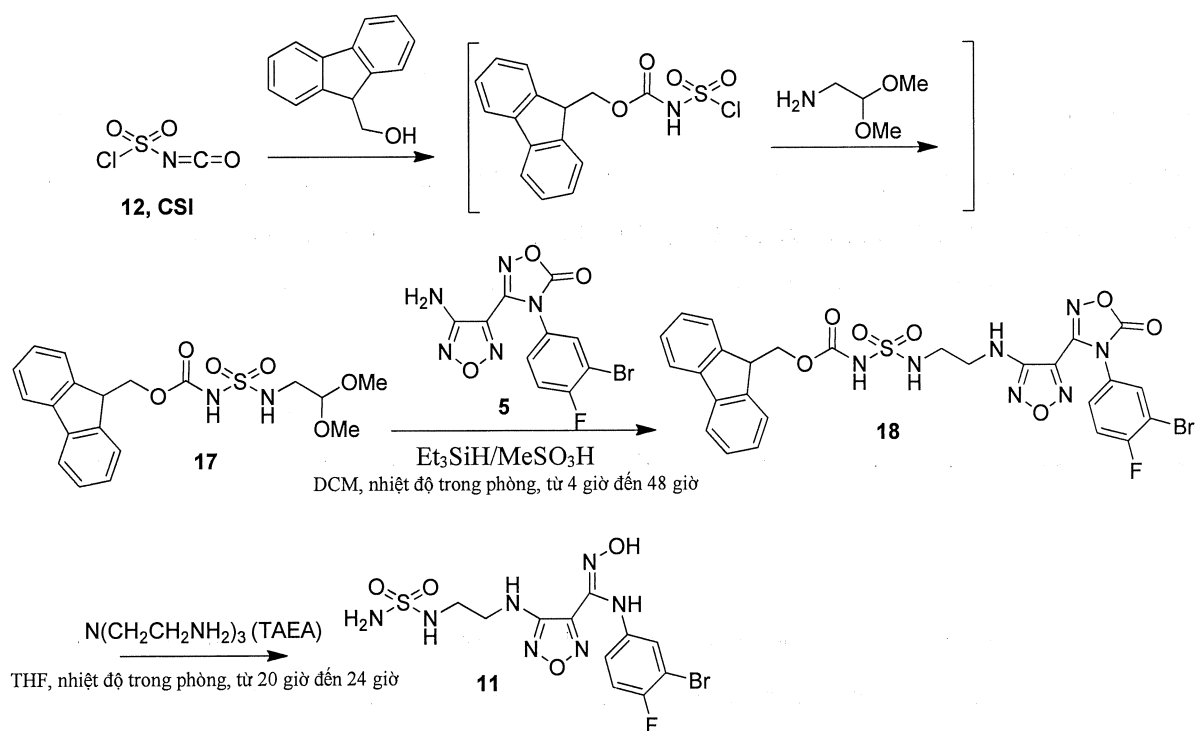
Huyền phù chứa 3-(4-amino-1,2,5-oxadiazol-3-yl)-4-(3-bromo-4-florophenyl)-1,2,4-oxadiazol-5(4H)-on (hợp chất có công thức **5**, 0,680g, 1,99mmol) và 2,2,2-tricloroetyl {[2,2-đimetoxyetyl]amino}sulfonyl]carbamate (hợp chất có công thức **17d**, 2,22g, 6,17mmol, 3,1 đương lượng) trong điclorometan (DCM, 6,0ml) được khuấy ở nhiệt độ trong phòng. Trietylsilan (1,27ml, 7,95mmol, 4,0 đương lượng) và dung dịch chứa axit trifloaxetic (TFA, 3,0ml, 39,0mmol) trong điclorometan (DCM, 2,0ml) được bổ sung vào hỗn hợp này trong khi duy trì nhiệt độ của hỗn hợp phản ứng dưới 30°C. Hỗn hợp phản ứng trở nên đồng nhất sau 5 phút khuấy trộn ở nhiệt độ trong phòng và được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 1 giờ. Sắc ký lỏng cao áp (HPLC) biểu thị phản ứng đã hoàn thành. Phản ứng này được lọc và chất kết tủa được tạo huyền phù trong hỗn hợp gồm điclorometan và heptan (tỷ lệ giữa điclorometan với heptan là 1 chia 9 theo thể tích). Huyền phù này được khuấy ở nhiệt độ trong phòng qua đêm. Chất kết tủa được gom bằng cách lọc và rửa bằng 10% điclorometan trong heptan và làm khô trong chân không để tạo ra sản phẩm mong muốn (1,15g, 90,4%) ở dạng rắn màu trắng đục, mà được dùng trong phản ứng tiếp theo mà không cần tinh chế thêm. 1H NMR (300MHz, DMSO- d_6) δ 11,85 (s, 1H), 8,07 (m, 2H), 7,70 (m, 1H), 7,57 (t, 1H, $J = 8,7$ Hz), 6,56 (m, 1H), 4,88 (m, 2H), 3,37 (m, 2H), 3,16 (m, 2H); $C_{15}H_{12}BrCl_3FN_7O_7S$ (phân tử lượng (MW) 639,62), LCMS (EI) m/e 638/640/642 ($M^+ + H$).

Bước 3. N-[2-(4-[4-(3-bromo-4-florophenyl)-5-oxo-4,5-đihydro-1,2,4-oxadiazol-3-yl]-1,2,5-oxadiazol-3-yl]amino)etyl]sulfamit (10)

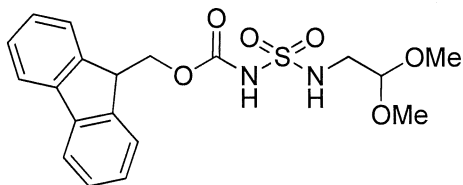


Dung dịch chứa 2,2,2-tricloroetyl ($\{[2-(\{4-[4-(3\text{-bromo-4-florophenyl})-5\text{-oxo-4,5-dihydro-1,2,4-oxadiazol-3-yl]-1,2,5-oxadiazol-3-yl\} \text{amino})\text{etyl}]\text{amino}\} \text{sulfonyl}\} \text{carbamat}$) (320mg, 0,50mmol; thu được theo bước Q, phương pháp D) trong tetrahydrofuran (THF, 4,0ml) được khuấy ở nhiệt độ trong phòng. Dung dịch axit axetic (0,30ml, 5,3mmol) và vảy kẽm (160mg, 2,5mmol, 5,0 đương lượng) liên tục được bổ sung vào. Hỗn hợp phản ứng này được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 3 giờ. Sắc ký lỏng cao áp (HPLC) biểu thị phản ứng đã hoàn thành. Hỗn hợp phản ứng này được lọc qua xelit và xelit này được rửa bằng THF. Dịch lọc kết hợp được cô trong chân không và cặn thu được hòa tan trong etyl axetat (20ml). Dung dịch etyl axetat được rửa bằng natri cacbonat đã bão hòa và nước muối, làm khô trên natri sulfat và cô. Nguyên liệu thô được kết tinh ra khỏi etyl axetat và diethyl ete để tạo ra sản phẩm mong muốn (147mg, 63%) ở dạng rắn màu trắng đục.

Ví dụ 4. Quy trình khác điều chế thay thế 4-({2-[(aminosulfonyl)amino]etyl}amino)-N-(3-bromo-4-florophenyl)-N'-hydroxy-1,2,5-oxadiazol-3-carboximidamit



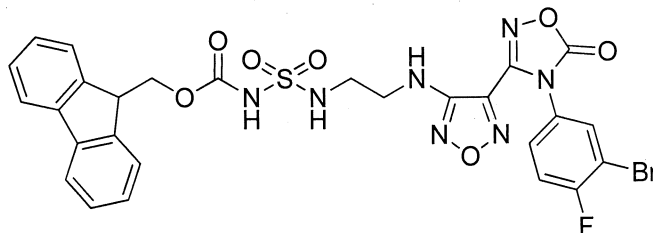
Bước 1. (9H-floren-9-yl)metyl N-(2,2-đimetoxyetyl)sulfamoylcarbamat



9-florenylmetanol (50,0g, 255mmol) và DCM khan (382ml) ở nhiệt độ trong phòng được nạp bình đầy tròn 4 cổ loại dung tích 2l đã được sấy khô trong lò. Huyền phù đặc tạo thành được làm nguội trong bể đá đến nhiệt độ nằm trong khoảng từ 0°C đến 5°C. Dung dịch chứa clorosulfonyl isoxyanat (CSI, 23,0ml, 264mmol) trong DCM khan (127ml) được bổ sung nhỏ giọt vào huyền phù đặc thông qua phễu cấp liệu trong 22 phút, duy trì nhiệt độ hỗn hợp của phản ứng ở nhiệt độ < 5°C. Hỗn hợp thu được được khuấy ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 0°C đến 5°C trong thời gian 1,75 giờ, tạo ra huyền phù đặc màu trắng. Dung dịch chứa aminoaxetaldehyt dimetyl axetal (27,9ml, 255mmol) trong DCM khan (382ml) và 4-metylmorpholin (84,0ml, 764mmol) được bổ sung vào hỗn hợp này ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 0°C đến 5°C trong thời gian 71 phút. Sau đó, hỗn hợp phản ứng tạo thành được khuấy trong bể nước đá trong thời gian 1,5 giờ. Khi sắc ký lỏng cao áp (HPLC) biểu thị phản ứng đã hoàn thành, hỗn hợp phản ứng này được axit hóa bằng cách bổ sung nhỏ giọt dung dịch axit phosphoric 1,0M (H₃PO₄, trong nước, 640ml) trong thời gian 22 phút đến độ pH nằm trong khoảng từ 1 đến 2. Sau đó, nước (300ml), EtOAc (2150ml) và heptan (250ml) được bổ sung vào và hỗn hợp thu được được khuấy trong thời gian 10 phút. Hai pha này được tách và lớp hữu cơ được rửa liên tục bằng nước (500ml), heptan (300ml) và nước (2 x 500ml) và làm khô trên MgSO₄. Dịch lọc được cô trong chân không đến khô. Các chất rắn tạo ra được hoà tan lại trong EtOAc (600ml) ở nhiệt độ 65°C và dung dịch ấm được lọc trong bình đầy tròn dung tích 3l sạch. Dịch lọc được giảm nhiệt độ đến nhiệt độ trong phòng và khuấy trong thời gian 2,5 giờ trước khi heptan (1200ml) được bổ sung vào qua phễu cấp liệu trong thời gian 80 phút. Sau khi khuấy qua đêm ở nhiệt độ trong phòng, hỗn hợp này được làm nguội trong bể nước đá trong thời gian 1 giờ. Các chất rắn tạo ra được gom bằng cách lọc, rửa bằng 25% EtOAc/heptan (250ml), và làm khô qua đêm ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40°C đến 45°C trong chân không để tạo ra 9H-floren-9-ylmethyl [(2,2-dimethoxyethyl)amino]sulfonylcarbamate (91,3g, hiệu suất 88%) ở dạng bột màu trắng. ¹H NMR (300MHz, DMSO-*d*₆) δ 11,43 (s, 1H), 7,98 – 7,85 (m, 3H), 7,76 (d, *J* = 7,5 Hz, 2H), 7,43 (t, *J* = 7,2 Hz, 2H), 7,33 (td, *J* = 7,4, 1,1 Hz, 2H), 4,44 – 4,33 (m, 3H), 4,33 – 4,22 (m, 1H), 3,23 (s,

6H), 2,99 (t, $J = 5,8$ Hz, 2H) ppm.

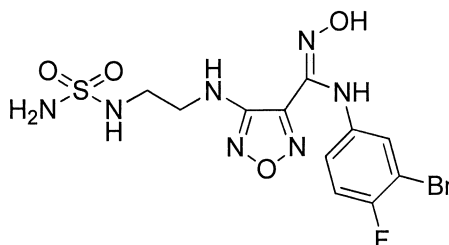
Bước 2. 9H-Floren-9-ylmetyl ({[2-({4-[4-(3-bromo-4-florophenyl)-5-oxo-4,5-đihydro-1,2,4-oxadiazol-3-yl]-1,2,5-oxadiazol-3-yl}amino)etyl]amino}sulfonyl)carbamát



Axit metansulfonic (MeSO_3H , 8,46g, 88,04mmol) và trietylsilan (Et_3SiH , 8,37g, 71,96mmol) ở nhiệt độ môi trường được bổ sung vào huyền phù được khuấy chứa 3-(4-amino-1,2,5-oxadiazol-3-yl)-4-(3-bromo-4-florophenyl)-1,2,4-oxadiazol-5(4H)-on (10,00g, 29,23mmol) trong DCM (160ml) trong thời gian 10 phút để tạo ra huyền phù đặc. 9H-floren-9-ylmetyl{[(2,2-đimetoxyetyl)amino}sulfonyl}carbamát (12,25g, 30,14mmol) rắn được bổ sung vào từng phần (1g/3 phút đến 4 phút; trong thời gian 1 giờ) trong khi duy trì nhiệt độ bên trong ở nhiệt độ thấp hơn khoảng 20°C bằng cách sử dụng bể nước. Sau khi bổ sung xong, hỗn hợp thu được được khuấy ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 13°C đến 22°C trong thời gian 3 ngày. Trietylsilan bổ sung (Et_3SiH , 0,1755g, 1,51mmol) và 9H-floren-9-ylmetyl{[(2,2-đimetoxyetyl)amino}sulfonyl}carbamát (0,3082g, 0,76mmol) được bổ sung vào và hỗn hợp thu được được khuấy ở nhiệt độ môi trường trong thời gian 23 giờ nữa. Rượu isopropylic (IPA, 15ml) được bổ sung vào và hỗn hợp thu được được khuấy ở nhiệt độ môi trường trong thời gian 1 giờ. Heptan (100ml) được bổ sung vào và hỗn hợp này được khuấy ở nhiệt độ môi trường trong thời gian 2 giờ nữa. Các chất rắn được gom bằng cách lọc, rửa bằng IPA/heptan (1/5; 2 x 30ml) và heptan (2 x 30ml), và làm khô trong chân không để tạo ra 9H-floren-9-ylmetyl ({[2-({4-[4-(3-bromo-4-florophenyl)-5-oxo-4,5-đihydro-1,2,4-oxadiazol-3-yl]-1,2,5-oxadiazol-3-yl}amino)etyl]amino}sulfonyl)carbamát ở dạng rắn màu trắng (18,30g, hiệu suất 91,1%). ^1H NMR (500MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 11,44 (s, 1H), 8,07 (dd, $J = 6,2, 2,5$ Hz, 1H), 7,90 (t, $J = 5,6$ Hz, 1H), 7,88 (d, $J = 7,6$ Hz, 2H), 7,72 (d, $J = 7,0$ Hz, 2H), 7,71 (ddd, $J = 8,9, 4,3, 2,6$ Hz, 1H), 7,57 (dd, $J = 8,7, 8,7$ Hz, 1H), 7,40 (t, $J = 7,4$ Hz, 2H), 7,31 (td, $J = 7,4, 1,0$ Hz, 2H), 6,55 (t, $J = 6,0$ Hz, 1H), 4,35 (d, $J = 7,3$ Hz, 2H), 4,25 (t, $J = 7,2$ Hz, 1H), 3,39 (q, $J = 6,4$ Hz, 2H), 3,15 (q, $J = 6,3$ Hz, 2H); ^{13}C NMR (126 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 159,03 (d, $J = 248,7$ Hz), 156,61 (s), 155,22 (s), 151,55 (s), 148,67 (s), 143,29 (s), 140,68

(s), 133,82 (s), 133,39 (s), 130,05 (d, $J = 8,5$ Hz), 128,54 (d, $J = 3,2$ Hz), 127,73 (s), 127,07 (s), 125,24 (s), 120,11 (s), 117,42 (d, $J = 24,0$ Hz), 108,19 (d, $J = 22,5$ Hz), 66,70 (s), 46,17 (s), 43,34 (s), 40,79 (s) ppm; ^{19}F NMR (376 MHz, DMSO- d_6) δ -103,99 – -107,39 (m) ppm.

Bước 3. 4-({2-[(Aminosulfonyl)amino]etyl}amino)-N-(3-bromo-4-florophenyl)-N'-hydroxy-1,2,5-oxadiazol-3-carboximidamit



9H-floren-9-ylmetyl({[2-({4-[4-(3-bromo-4-florophenyl)-5-oxo-4,5-dihydro-1,2,4-oxadiazol-3-yl]-1,2,5-oxadiazol-3-yl}amino)etyl]amino}sulfonyl)carbamit (25,0g, 36,4mmol) và THF khan (250ml) ở nhiệt độ môi trường được nạp vào trong bình đáy tròn 4 cổ dung tích 1l để tạo ra dung dịch đồng nhất. Dung dịch này sau đó được làm lạnh đến nhiệt độ nằm trong khoảng từ 0°C đến 5°C trong bể nước đá trước khi *N,N*-bis(2-aminoetyl)etan-1,2-điamin (114ml, 728mmol) được bổ sung nhỏ giọt trong thời gian 35 phút qua phễu cấp liệu. Phễu cấp liệu được rửa bằng THF khan (50ml) và nước rửa được bổ sung vào hỗn hợp phản ứng. Bể làm lạnh được loại bỏ và phản ứng được nâng nhiệt độ từ từ lên đến nhiệt độ môi trường và khuấy ở nhiệt độ môi trường trong thời gian 2,5 giờ. EtOAc (400ml) được bổ sung vào và hỗn hợp thu được chuyển sang bình đáy tròn 4 cổ loại dung tích 2l và làm lạnh đến nhiệt độ nằm trong khoảng từ 0°C đến 5°C trong bể nước đá. Dung dịch nước chứa 2,0M HCl (400ml, 800,0mmol) được bổ sung nhỏ giọt vào thông qua phễu cấp liệu, trong khi duy trì nhiệt độ bên trong ở nhiệt độ dưới 10°C. Hai pha này được tách và pha nước được chiết bằng EtOAc (200ml). Các phân đoạn hữu cơ được kết hợp và làm nguội đến nhiệt độ nằm trong khoảng từ 6°C đến 7°C. Dung dịch nước chứa 2,0M HCl (200,0ml, 400,0mmol) được bổ sung nhỏ giọt vào phân đoạn hữu cơ lạnh, duy trì nhiệt độ bên trong ở nhiệt độ dưới 10°C. Hai pha này được tách và lớp hữu cơ được rửa bằng nước (2 x 400ml), làm khô trên MgSO_4 , và cô trong điều kiện áp suất giảm thành siro màu vàng nhạt. Siro này được hòa tan trong EtOAc (60,0ml) để tạo ra dung dịch đồng nhất. Dung dịch chứa DCM (250,0ml) và *tert*-butyl methyl ete (TBME, 100,0ml) được bổ sung nhỏ giọt vào dung dịch này. Huyền phù đặc tạo thành được khuấy

qua đêm ở nhiệt độ trong phòng, sau đó được làm nguội trong bể nước đá trong thời gian 1 giờ. Các chất rắn được gom bằng cách lọc, rửa bằng 250ml dung dịch lạnh chứa DCM (150ml) và TBME (100ml), và làm khô trong chân không để tạo ra 14,4g sản phẩm thô mong muốn ở dạng rắn màu trắng.

Sản phẩm thô được hòa tan trong EtOAc (140,0ml) ở nhiệt độ 60°C và dung dịch ấm được lọc. Dịch lọc được giảm nhiệt độ đến nhiệt độ trong phòng trước khi heptan (100,0ml) được bổ sung nhỏ giọt vào trong thời gian 55 phút. Sau đó, hỗn hợp thu được được khuấy qua đêm ở nhiệt độ trong phòng. Các chất rắn được gom bằng cách lọc, rửa bằng hỗn hợp gồm heptan và EtOAc (75ml) theo tỷ lệ 2:1, và làm khô trong chân không ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40°C đến 50°C đến trọng lượng không đổi để tạo ra 4-({2-[(aminosulfonyl)amino]ethyl}amino)-*N*-(3-bromo-4-florophenyl)-*N'*-hydroxy-1,2,5-oxadiazol-3-carboximidamit (12,9g, hiệu suất 81%) ở dạng rắn màu trắng.

Ví dụ A: Thử nghiệm enzym indolamin 2,3-dioxygenaza (IDO) của người

Indolamin 2,3-dioxygenaza (IDO) của người với đuôi His ở đầu tận cùng N được biểu hiện ở *E.coli* và được tinh chế đến đồng nhất. IDO xúc tác quá trình oxy hóa phân cắt nhân pyrrol indol của tryptophan để tạo ra *N'*-formylkynurenin. Các thử nghiệm này được thực hiện ở nhiệt độ trong phòng như đã được bộc lộ trong các tài liệu bằng cách sử dụng 95nM IDO và 2mM D-Trp với sự có mặt của 20mM ascorbat, 5μM xanh metylen và 0,2mg/ml catalaza trong dung dịch đệm chứa 50mM kali phosphat (độ pH 6,5). Tốc độ phản ứng ban đầu được ghi nhận bằng cách theo dõi liên tục mức hấp thụ tăng ở 321nm do sự tạo ra *N'*-formylkynurenin (xem tài liệu: Sono, M., *et al.*, 1980, *J. Biol. Chem.* 255, 1339-1345). Hợp chất có công thức I được thử trong thử nghiệm này của Ví dụ A và thấy có $IC_{50} < 200nM$.

Ví dụ B: Xác định mức độ hoạt tính ức chế trong thử nghiệm indolamin 2,3-dioxygenaza (IDO)/kynurenin trên cơ sở tế bào HeLa

Các tế bào HeLa (#CCL-2) thu được từ Bộ Sưu tập Nuôi cấy Mô của Mỹ (American Type Tissue Culture Collection) (ATCC, Manassas, VA) và được duy trì theo cách thông thường trong môi trường cần thiết tối thiểu (eagle) với 2mM L-glutamin và Earle's BSS được điều chỉnh để chứa 1,5g/l natri bicacbonat, 0,1mM axit amin không cơ bản, 1mM natri pyruvat và 10% huyết thanh bào thai bò (tất cả đều do Invitrogen cung

cấp). Các tế bào được giữ ở nhiệt độ 37°C trong buồng ủ đã được tạo ẩm được cấp 5% CO₂. Thử nghiệm này được thực hiện như sau: các tế bào HeLa được cấy vào đĩa nuôi cấy loại 96 lỗ ở mật độ 5×10^3 mỗi lỗ và cho sinh trưởng qua đêm. Vào ngày tiếp theo, IFN- γ (nồng độ cuối cùng 50ng/ml) và các dung dịch pha loãng theo bậc của các hợp chất có công thức (trong tổng thể tích 200 μ l môi trường nuôi cấy) được bổ sung vào các tế bào. Sau 48 giờ ủ, 140 μ l dịch nổi mỗi lỗ được chuyển sang đĩa 96 lỗ mới. 10 μ l axit tricloaxetic 6,1N (#T0699, do Sigma cung cấp) được trộn vào trong từng lỗ và ủ ở nhiệt độ 50°C trong thời gian 30 phút để thủy phân *N*-formylkynurenin đã được tạo ra bởi indolamin2,3-dioxygenaza thành kynurenin. Sau đó, hỗn hợp phản ứng này được ly tâm trong thời gian 10 phút ở tốc độ 2500 vòng/phút để loại bỏ cặn. 100 μ l dịch nổi mỗi lỗ được chuyển sang đĩa 96 lỗ khác và được trộn với 100 μ l dung dịch chứa 2% (trọng lượng/thể tích) *p*-đimetylaminobenzaldehyt (#15647-7, do Sigma-Aldrich cung cấp) trong axit axetic. Màu vàng thu được từ Kynurenin được đo ở 480nm bằng cách sử dụng đầu đọc vi đĩa SPECTRAMax 250 (do Molecular Devices cung cấp). L-kynurenin (#K8625, do Sigma cung cấp) được dùng làm chuẩn. Các chuẩn (240 μ M, 120 μ M, 60 μ M, 30 μ M, 15 μ M, 7,5 μ M, 3,75 μ M, 1,87 μ M) được điều chế trong 100 μ l môi trường nuôi cấy và được trộn với 2% (trọng lượng/thể tích) *p*-đimetylaminobenzaldehyt với thể tích ngang bằng. Mức độ ức chế theo phần trăm ở nồng độ riêng lẻ được xác định và thu trị số trung bình của các dữ liệu kép. Các dữ liệu được phân tích bằng cách sử dụng hồi quy không tuyến tính để tạo ra trị số IC₅₀ (Prism Graphpad). Xem tài liệu: Takikawa O, *et al.*, 1988, *J. Biol. Chem.*, 263(4): 2041-8.

Ví dụ C: Xác định tác động của các chất ức chế IDO đối với mức độ tăng sinh tế bào T mà bị ngăn chặn bởi các tế bào tua biểu hiện IDO

Các tế bào đơn nhân được gom từ các tế bào đơn nhân ngoại vi của người theo quy trình gạn bạch cầu. Sau đó, bạch cầu đơn nhân to được cấy ở mật độ 1×10^6 tế bào/lỗ vào đĩa loại 96 lỗ, bằng cách sử dụng môi trường RPMI 1640 có bổ sung 10% huyết thanh của bào thai bò và 2mM L-glutamin (tất cả đều do Invitrogen cung cấp). Tế bào bám dính được giữ trên đĩa này sau khi nuôi cấy qua đêm ở 37°C. Sau đó, các tế bào đơn nhân bám dính được kích thích trong thời gian 5 ngày đến 7 ngày bằng 100ng/ml GM-CSF (# 300-03, PeproTech) và 250ng/ml IL-4 (#200-04, PeproTech), tiếp theo hoạt hóa bằng 5 μ g/ml LPS từ *Salmonella typhimurium* (#437650, do Sigma cung cấp) và 50ng/ml IFN- γ (# 285-

IF, R&D Systems) trong thời gian 2 ngày nữa để cảm ứng quá trình thành thực của tế bào tua.

Sau khi hoạt hóa tế bào tua, môi trường được thế bằng RPMI 1640 hoàn chỉnh có bổ sung 100 đến 200U/ml IL-2 (#CYT-209, ProSpec-Tany TechnoGene) và 100ng/ml kháng thể CD3 (#555336, PharMingen), các tế bào T ($2 \text{ đến } 3 \times 10^5$ tế bào/lỗ), và các dung dịch chứa các hợp chất IDO pha loãng theo bậc. Sau khi ủ trong thời gian 2 ngày nữa, mức độ tăng sinh tế bào T được đo theo thử nghiệm kết hợp BrdU, bằng cách sử dụng kit đo mức độ tăng sinh tế bào theo màu ELISA theo hướng dẫn của nhà sản xuất (#1647229, Roche Molecular Biochemicals). Các tế bào được nuôi cấy một cách liên tục trong thời gian 16 giờ đến 18 giờ khi có mặt $10\mu\text{M}$ dung dịch gắn nhãn BrdU. Sau đó, môi trường gắn nhãn được loại bỏ, và $200\mu\text{l}$ FixDenat mỗi lỗ được bổ sung vào các tế bào và ủ trong thời gian 30 phút ở nhiệt độ trong phòng. Dung dịch FixDenat được loại bỏ và dung dịch làm việc thể tiếp hợp kháng thể kháng BrdU-POD được bổ sung vào ở nồng độ $100\mu\text{l/lỗ}$. Phản ứng được thực hiện trong thời gian 90 phút ở nhiệt độ trong phòng. Sau đó, kháng thể thể tiếp hợp được loại bỏ, và các tế bào được rửa ba lần bằng $200\mu\text{l/lỗ}$ dung dịch rửa. Cuối cùng, dung dịch cơ chất được bổ sung vào ở nồng độ $100\mu\text{l/lỗ}$ và các kết quả thu được bằng cách sử dụng đầu đọc vi đĩa (Spectra Max PLUS, Molecular Devices) trong quá trình hiện màu. Nhiều số liệu đọc tại các thời điểm khác thu được để đảm bảo dữ liệu trong khoảng tuyến tính. Dữ liệu được thu theo cách thông thường từ các thử nghiệm lặp lại, và các đối chứng thích hợp cũng được đưa vào. Xem: Terness P, *et al.* 2002, *J. Exp. Med.*, 196(4): 447-57; và Hwu, P, *et al.* 2000, *J. Immunol.*, 164(7): 3596-9.

Ví dụ D: Thử nghiệm *in vivo* của các chất ức chế IDO đối với hoạt tính kháng u

Hiệu quả kháng u *in vivo* có thể được thử nghiệm bằng cách áp dụng quy trình đã cải biến ghép u cùng loài/khác loài. Ví dụ, đã được bộc lộ trong các tài liệu rằng sự ức chế IDO có thể có tác dụng hiệp đồng với phương pháp hóa trị độc đối với tế bào ở con chuột nhất miễn dịch tốt (Muller, A.J., *et al.* 2005, *Nat. Med.* 11:312-319). Thấy rằng tính hiệp đồng này phụ thuộc vào các tế bào T theo so sánh các tác dụng hiệp đồng của chất ức chế IDO khảo sát ở mô hình ghép u khác loài ở chuột (ví dụ, B16 và các biến dị có liên quan, CT-26, LLC) sinh trưởng ở con chuột nhất miễn dịch tốt bẩm sinh với tác dụng quan sát được ở con chuột nhất giống hệt đã được điều trị bằng kháng thể kháng CD4

trung hòa, hoặc cùng các loại u sinh trưởng ở con chuột nhất bị suy yếu miễn dịch (ví dụ, nu/nu).

Quan niệm về tác dụng điều trị khối u khác biệt ở con chuột nhất miễn dịch tốt so với con chuột nhất bị suy yếu miễn dịch còn có thể cho phép thử nghiệm các chất ức chế IDO khảo sát như các tác nhân đơn. Ví dụ, các loại u LLC sinh trưởng tốt ở dòng vật chủ giống hệt của chúng, C57Bl/6. Tuy nhiên, nếu các con chuột nhất này được điều trị bằng chất ức chế IDO 1-MT (so với thuốc vờ) thì mức độ hình thành các loại khối u bị trì hoãn đáng kể, ám chỉ rằng sự ức chế IDO có tính ức chế sinh trưởng (Friberg, M., *et al*, 2002, *Int. J. Cancer* 101:151-155). Theo logic này, có thể thẩm định hiệu quả của việc ức chế IDO ở mô hình khối u ghép khác loài mô LLC sinh trưởng ở con chuột nhất miễn dịch tốt C57Bl/6 và so sánh với các tác động của các chất ức chế IDO đối với sự sinh trưởng của khối u LLC ở con chuột nhất trụi lông hoặc chuột nhất SCID (hoặc chuột nhất C57BL/6 đã được điều trị bằng các kháng thể mà trung hòa hoạt tính của tế bào T). Do các tác động làm giảm hoạt tính ngăn chặn miễn dịch gián tiếp thông qua khối u của IDO sẽ khác nhau tùy theo tiềm năng sinh miễn dịch của các mô hình u khác nhau, các cải biến di truyền có thể được thực hiện đối với các tế bào của khối u để làm gia tăng tiềm năng sinh miễn dịch của chúng. Ví dụ, sự biểu hiện GM-CSF ở các tế bào B16.F10 làm tăng tiềm năng sinh miễn dịch của chúng (Dranoff, G., *et al*. 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 90:3539-3543). Như vậy, ở một vài mô hình khối u (ví dụ, B16.F10) có thể tạo ra [đa] dòng mà biểu hiện các protein kích thích miễn dịch như GM-CSF và thử nghiệm tác dụng ức chế sinh trưởng của các chất ức chế IDO đối với các loại u thiết lập từ các tế bào này của khối u ở cả con chuột nhất miễn dịch tốt và con chuột nhất bị suy yếu về miễn dịch.

Cách thức thứ ba để đánh giá hiệu quả của các chất ức chế IDO *in vivo* sử dụng các mô hình ghép mô cùng loài/ghép mô khác loài ở mô chuột ‘tiền-miễn dịch’. Ở các mô hình này, con chuột nhất miễn dịch tốt được gây miễn cảm đối với kháng nguyên hoặc các kháng nguyên của khối u cụ thể để làm giống tác dụng tiêm chủng chống khối u nhằm mục đích điều trị bệnh. Việc này mỗi con chuột nhất đáp ứng kháng u gián tiếp qua hệ miễn dịch khi con chuột nhất được thử thách tiếp bằng các dòng tế bào khối u của con chuột (có các kháng nguyên tương tự của khối u so với loại đã được dùng để gây miễn dịch) ở các thử nghiệm mô ghép khác loài. Đã thấy rằng sự biểu hiện của IDO làm cùn đáp ứng kháng u và cho phép mô ghép khác loài sinh trưởng nhanh hơn. Quan trọng là, sự phát triển của các loại u trong mô hình này bị ức chế bởi chất ức chế IDO 1-MT (Uyttenhove, C., *et al*. 2003, *Nat. Med.* 9:1269-1274). Mô hình này là đặc biệt hấp dẫn vì

hoạt tính IDO cho phép khối u P815 sinh trưởng và do đó sự ức chế đặc hiệu IDO sẽ có tính ức chế.

Cuối cùng, việc gây miễn dịch có tác dụng điều trị có thể được áp dụng để đánh giá tác động của các chất ức chế IDO *in vivo*. Ví dụ, đã thể hiện rằng bằng cách sử dụng các tế bào B16-BL6 có thể thách thức chuột nhắt Blk/6 bằng cách tiêm tĩnh mạch các tế bào của khối u sau khi điều trị bằng peptit sinh miễn dịch đã được xác định tính chất (ví dụ, TRP-2) biểu hiện bởi các tế bào của khối u (Ji, *et al.*, 2005, *J. Immunol*, 175: 1456-63). Quan trọng là, hệ miễn dịch các tác nhân cải biến, như kháng thể kháng CTL-4, có thể cải thiện đáp ứng với việc gây miễn dịch nhằm mục đích điều trị này. Tác động của các chất ức chế IDO có thể được đánh giá theo cách tương tự – gây miễn dịch bằng peptit của khối u có hoặc không có chất ức chế IDO. Hiệu quả được đánh giá theo thời gian sống sót của con vật (thời gian đến lúc mắc bệnh) hoặc theo số đo mức độ di căn của khối u vào phổi và/hoặc các bộ phận khác tại các thời điểm xác định.

Ở mô hình bất kỳ trong toàn bộ các mô hình nêu trên, còn có thể đo một cách trực tiếp và/hoặc gián tiếp số lượng và/hoặc hoạt tính của các tế bào miễn dịch của hoạt tính phản ứng với khối u. Các phương pháp đo số lượng và/hoặc mức độ hoạt tính của các tế bào miễn dịch phản ứng với khối u đã được thiết lập và có thể được thực hiện bằng cách áp dụng các kỹ thuật quen thuộc đối với chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này (*Current Protocols in Immunology*, Vol. 4, Coligan, J. E., *et al.*; *Immunotherapy of Cancer*, Human Press, 2006, Disis, M.L. và các tài liệu viện dẫn trong đó). Về mặt khái niệm, hiện tượng giảm các tác dụng ngăn chặn miễn dịch của IDO có thể làm tăng số lượng hoặc hoạt tính phản ứng của các tế bào miễn dịch đặc hiệu của khối u. Ngoài ra, sự ức chế IDO có thể còn làm tăng số lượng hoặc mức độ hoạt tính phản ứng của các tế bào miễn dịch phản ứng với khối u khi kết hợp với các phép điều trị khác, ví dụ các tác nhân hóa trị liệu và/hoặc tác nhân điều biến miễn dịch (ví dụ, kháng thể kháng CTLA4).

Tất cả các thử nghiệm ghép cùng loài/ghép khác loài có thể được thực hiện bằng cách áp dụng các kỹ thuật chuẩn đối với khối u (xem tài liệu: Corbett, *et al.*, trong *Cancer Drug Discovery and Development: Anticancer Drug Development Guide: Preclinical Screening, Clinical, and Approval*, 2nd Ed. Teicher, B.A. and Andrews, P.A., Humana Press Inc.: Totowa, NJ, 2004). Việc tách dòng và đưa gen (ví dụ, IDO, GM-CSF) vào dòng tế bào u, có thể được thực hiện bằng cách áp dụng các kỹ thuật quen thuộc đối với chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này (xem tổng quan trong tài liệu: Sambrook, J. and

Russel, D., *Molecular Cloning: A laboratory Manual (tái bản lần thứ 3)*, Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, NY, 2001).

Ví dụ E: Thử nghiệm *in vivo* các chất ức chế IDO ở mô hình bệnh viêm não ở người do virus gây suy giảm miễn dịch-1 (HIV-1)

1. Phân lập tế bào và nhiễm virus

Các bạch cầu đơn nhân to và PBL có thể thu được bằng cách rửa lắng ly tâm ngược dòng các gói gan bạch cầu từ các cá thể cho huyết thanh dương tính HIV-1, 2 và viêm gan B. Các bạch cầu đơn nhân to này được cấy vào dịch nuôi cấy huyền phù bằng cách sử dụng các bình Teflon trong môi trường Eagle đã được cải biến theo Dulbecco (DMEM, do Sigma-Aldrich cung cấp) có bổ sung 10% huyết thanh của người đã được gom và đã được làm bất hoạt bởi nhiệt, 1% glutamin, 50µg/ml gentamixin, 10µg/ml xiprofloxacin (do Sigma cung cấp), và 1000U/ml yếu tố kích thích ruột kết đại thực bào của người tái tổ hợp tinh chế ở mức độ cao. Sau bảy ngày nuôi cấy, MDM nhiễm HIV-1_{ADA} ở chỉ số nhiễm đa bội bằng 0,01.

2. Chuột nhắt Hu-PBL-NOD/SCID HIVE

Chuột nhắt đực NOD/C.B-17 SCID bốn tuần tuổi có thể mua được (Jackson Laboratory). Con vật được duy trì trong chuồng cách biệt cỡ nhỏ vô trùng trong điều kiện không có tác nhân gây bệnh. Tất cả các con vật được tiêm trong khoang màng bụng với kháng CD122 của chuột (0,25mg/con chuột) ba ngày trước khi cấy ghép PBL và tiêm hai lần kháng thể asialo-GM1 của thỏ (0,2mg/con chuột) (Wako) một ngày trước và ba ngày sau khi tiêm PBL (20×10^6 tế bào/con chuột). MDM đã nhiễm HIV-1_{ADA} (3×10^5 tế bào trong 10µl) được tiêm trong sọ (i.c.) tám ngày sau hoàn nguyên PBL tạo ra chuột nhắt hu-PBL-NOD/SCID HIVE. Ngay sau khi tiêm i.c. MDM nhiễm HIV-1, các con chuột nhắt hu-PBL-NOD/SCID HIVE được cấy dưới da (s.c) đối chứng (chất dẫn) hoặc viên hợp chất viên (giải phóng chậm 14 ngày hoặc 28 ngày, Innovative Research). Các thử nghiệm ban đầu được thiết kế để xác nhận cảm ứng CTL đặc hiệu virus ở các con chuột hu PBL-NOD/SCID HIVE đã được điều trị bằng các hợp chất IDO. Điều này được xác nhận bằng cách nhuộm tetrane và phân tích bệnh học thần kinh về sự loại bỏ MDM ra khỏi mô não. Sau đó, thử nghiệm được thiết kế để phân tích người tế bào lympho hoàn nguyên, các loại

đáp ứng miễn dịch thể dịch, và các thay đổi về mặt bệnh học thần kinh. Trong các thử nghiệm này, động vật được lấy máu vào ngày thứ 7 và được giết vào ngày thứ 14 và ngày thứ 21 sau khi tiêm i.c. MDM của người. Máu đã gom trong các ống nghiệm chứa EDTA được sử dụng để đếm tế bào theo dòng chảy và huyết tương được sử dụng để phát hiện HIV-1 p24 bằng cách áp dụng ELISA (Beckman Coulter™). Các kháng thể đặc hiệu HIV-1 được dò thấy theo các thử nghiệm thấm tây theo chỉ dẫn của nhà sản xuất (kit Cambridge Biotech HIV-1 Western blot, Calypte Biomedical). Lượng kháng thể virus đặc hiệu tương tự được phát hiện thấy ở động vật đối chứng và con vật đã được điều trị bằng hợp chất. Tổng cộng ba thử nghiệm độc lập có thể được thực hiện bằng cách sử dụng ba cá thể cho bạch cầu của người khác nhau.

3. FACSscan máu ngoại biên và lá lách ở chuột nhắt hu PBL-NOD/SCID HIVE

Phân tích FACS hai màu có thể được thực hiện đối với máu ngoại biên ở tuần 1 đến 3 và các tế bào lá lách ở tuần 2 và 3 sau khi tiêm i.c. MDM của người. Các tế bào được ủ với Ab đơn dòng (mAb) đã tiếp hợp florocrom đối với CD4, CD8, CD56, CD3, IFN- γ của người (eBioscience) trong thời gian 30 phút ở 4°C. Để đánh giá đáp ứng miễn dịch của tế bào, tiến hành nhuộm IFN- γ nội bào kết hợp với kháng CD8 của người và kháng CD45 của chuột đã tiếp hợp FITC để loại bỏ các tế bào của chuột. Để xác định CTL đặc hiệu Ag, tiến hành nhuộm tetrame đã tiếp hợp allophycoxyanin đối với HIV-1^{gag} (p17 (aa77-85) SLYNTVATL, SL-9) và HIV-1^{pol} [(aa476-485) ILKEPVHGV, IL-9] trên các tế bào lá lách đã được kích thích bằng phytohemagglutinin/interleukin-2 (PHA/IL-2). Các tế bào được nhuộm theo đề xuất của NIH/National Institute of Allergy and Infectious Disease, National Tetrame Core Facilities. Dữ liệu được phân tích bằng FACS Calibur™ bằng cách áp dụng phần mềm CellQuest (Becton Dickinson Immunocytometry System).

4. Phân tích mô bệnh học và hình ảnh

Mô não được gom vào ngày thứ 14 và 21 sau khi tiêm i.c. MDM, được cố định trong paraformaldehyt đệm phosphat 4% và gắn vào parafin hoặc được làm đông lạnh ở -80°C để sử dụng sau. Các phần tránh dính từ các khối gắn vào được cắt để xác định vị trí tiêm. Đối với mỗi con chuột, 30 đến 100 phần theo thứ tự (dày 5 μ m) được cắt ra từ vị trí tiêm MDM của người và 3 đến 7 lát cắt (10 phần riêng) được phân tích. Các phần não được khử parafin bằng xylen và được hydrat hóa trong gradien rượu. Nhuộm hóa mô

miễn dịch theo quy trình gián tiếp cơ bản, bằng cách thu hồi kháng nguyên nhờ làm nóng đến 95°C trong 0,01mol/l dung dịch đệm xitrat trong thời gian 30 phút để thu hồi kháng nguyên. Để xác định các tế bào của người trong não của chuột, mAb với vimentin (theo tỷ lệ 1:50, dòng 3B4, Dako Corporation), mà xác định tất cả các bạch cầu của người được sử dụng. Các tế bào lympho MDM và CD8⁺ của người lần lượt được dò thấy bằng các kháng thể CD68 (pha loãng theo tỷ lệ 1:50, dòng KP 1) và CD8 (pha loãng theo tỷ lệ 1:50, dòng 144B). Các tế bào nhiễm virus được đánh dấu bằng mAb với HIV-1 p24 (theo tỷ lệ 1:10, dòng Kal-1, tất cả do Dako cung cấp). Các tế bào tiểu thần kinh đệm có phản ứng của chuột được dò thấy bằng kháng thể Iba-1 (theo tỷ lệ 1:500, Wako). Sự biểu hiệnIDO của người (huIDO) được thấy nhờ Ab thu được từ Department of Cell Pharmacology, Central Research Institute, Graduate School of Medicine, Hokkaido University, Sapporo, Japan. Các kháng thể chính được dò thấy với các kháng thể phụ thích hợp đã được biotinyl hóa và được thấy nhờ các phức avidin-biotin (kit Vectastain Elite ABC, Vector Laboratories) và peroxidaza của cây củ cải cay (HRP) được liên hợp polyme dextran (EnVision, Dako Corporation). Các phần nhuộm miễn dịch được nhuộm ngược lại bằng hematoxylin của Mayer. Các phần mà kháng thể sơ cấp bị xóa bỏ khỏi đó hoặc kiểu tương đương IgG không liên quan được đưa dùng làm đối chứng. Hai quan sát viên độc lập theo kiểu mù đếm số lượng tế bào lympho CD8⁺, CD68⁺ MDM và các tế bào HIV-1 p24⁺ ở từng phần từ mỗi con chuột. Xét nghiệm trên kính hiển vi được thực hiện bằng kính hiển vi Nikon Eclipse 800 (Nikon Instruments Inc). Phân tích bán định lượng đối với Iba1 (phần trăm diện tích chiếm bởi vết nhuộm miễn dịch) được thực hiện theo phân tích hình ảnh có trợ giúp của máy tính (Image-Pro®Plus, Media Cybernetics) như đã nêu trên.

5. Phân tích thống kê

Dữ liệu có thể được phân tích bằng cách sử dụng Prism (Graph Pad) với thử nghiệm *t* của Student để so sánh và ANOVA. Trị số *P* < 0,05 được coi là có ý nghĩa.

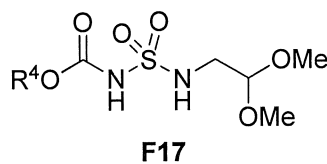
6. Tài liệu viện dẫn

Poluektova LY, Munn DH, Persidsky Y, and Gendelman HE (2002). Generation of cytotoxic T cells against virus-infected human brain macrophages in murine model of HIV-1 encephalitis. *J. Immunol.* 168(8):3941-9.

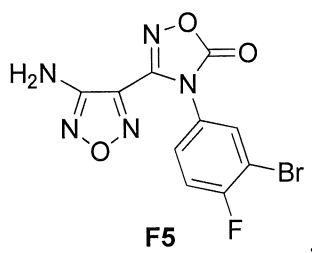
Các cải biến khác nhau theo sáng chế, ngoài các quy trình được bộc lộ trong bản mô tả này, là rõ ràng đối với chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này đã biết từ phần mô tả trên. Các cải biến này cũng được dự định nằm trong phạm vi các điểm yêu cầu bảo hộ kèm theo. Mỗi tài liệu viện dẫn, bao gồm tất cả patent, các đơn yêu cầu cấp patent, và các công bố, đã trích dẫn trong đơn yêu cầu cấp bằng độc quyền sáng chế này được đưa vào đây hoàn toàn bằng cách viện dẫn.

YÊU CẦU BẢO HỘ

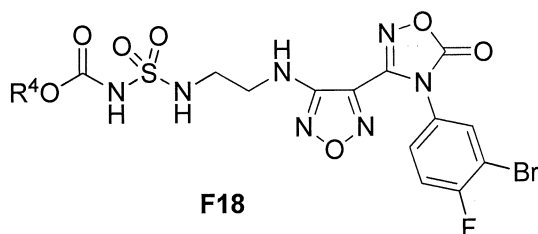
1. Quy trình bao gồm bước cho hợp chất có công thức F17:



trong đó R^4 là C_{1-6} alkyl, C_{1-6} haloalkyl, benzyl, hoặc 9H-floren-9-ylmetyl, phản ứng với hợp chất có công thức F5:

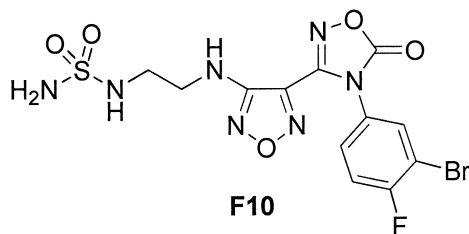


để tạo ra hợp chất có công thức F18:

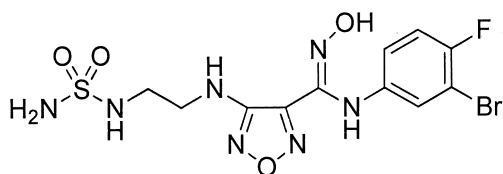


2. Quy trình theo điểm 1, trong đó R^4 là *tert*-butyl.
3. Quy trình theo điểm 1, trong đó R^4 là benzyl.
4. Quy trình theo điểm 1, trong đó R^4 là etyl.
5. Quy trình theo điểm 1, trong đó R^4 là 2,2,2-trichloroethyl.
6. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 2 đến 5, trong đó phản ứng được thực hiện với sự có mặt của chất khử.
7. Quy trình theo điểm 6, trong đó chất khử là triethylsilan.
8. Quy trình theo điểm 6 hoặc điểm 7, trong đó phản ứng được thực hiện với sự có mặt của axit hữu cơ.

9. Quy trình theo điểm 8, trong đó axit hữu cơ là axit trifloaxetic.
10. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 2 đến 9, trong đó quy trình này còn bao gồm bước khử bảo vệ hợp chất có công thức F18 để tạo ra hợp chất có công thức F10:

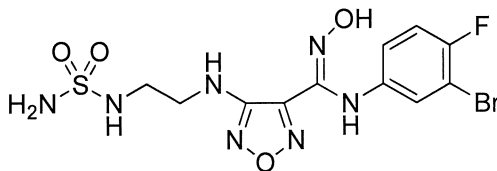


11. Quy trình theo điểm 10, trong đó việc khử bảo vệ bao gồm bước cho hợp chất có công thức F18 phản ứng với kẽm với sự có mặt của axit axetic.
12. Quy trình theo điểm 10 hoặc điểm 11, trong đó quy trình này còn bao gồm bước cho hợp chất có công thức F10 phản ứng với bazơ để tạo ra hợp chất có công thức I:



I.

13. Quy trình theo điểm 12, trong đó bazơ là natri hydroxit.
14. Quy trình theo điểm 1, trong đó R⁴ là 9H-floren-9-ylmetyl.
15. Quy trình theo điểm 14, trong đó phản ứng được thực hiện với sự có mặt của chất khử.
16. Quy trình theo điểm 15, trong đó chất khử là trietylsilan.
17. Quy trình theo điểm 15 hoặc điểm 16, trong đó phản ứng được thực hiện với sự có mặt của axit hữu cơ.
18. Quy trình theo điểm 17, trong đó axit hữu cơ là axit metansulfonic.
19. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 14 đến 18, trong đó quy trình này còn bao gồm bước chuyển hóa hợp chất có công thức F18 thành hợp chất có công thức I:



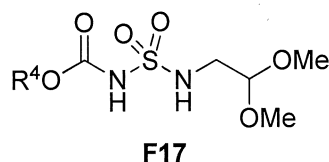
I,

trong đó bước chuyển hóa này bao gồm bước kết hợp hợp chất có công thức F18 với bazo để tạo ra hỗn hợp thứ nhất.

20. Quy trình theo điểm 19, trong đó bazo là *N,N*-bis(2-aminoethyl)etan-1,2-điamin.

21. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 19 đến 20, trong đó bước chuyển hóa còn bao gồm bước bổ sung dung dịch nước axit clohydric vào hỗn hợp thứ nhất.

22. Hợp chất có công thức F17:



trong đó R⁴ là C₁₋₆ haloalkyl, benzyl, hoặc 9*H*-florene-9-ylmetyl.

23. Hợp chất là *tert*-butyl *N*-(2,2-đimetoxyetyl)sulfamoylcarbamat.

24. Hợp chất theo điểm 22, trong đó hợp chất này là benzyl *N*-(2,2-đimetoxyetyl)sulfamoylcarbamat.

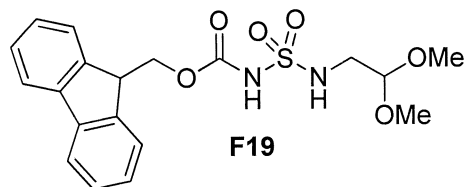
25. Hợp chất là etyl *N*-(2,2-đimetoxyetyl)sulfamoylcarbamat.

26. Hợp chất theo điểm 22, trong đó hợp chất này là 2,2,2-tricloroetyl *N*-(2,2-đimetoxyetyl)sulfamoylcarbamat.

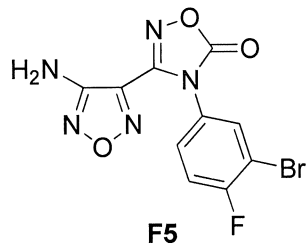
27. Hợp chất theo điểm 22, trong đó hợp chất này là (9*H*-florene-9-yl)metyl *N*-(2,2-đimetoxyetyl)sulfamoylcarbamat.

28. Quy trình bao gồm các bước:

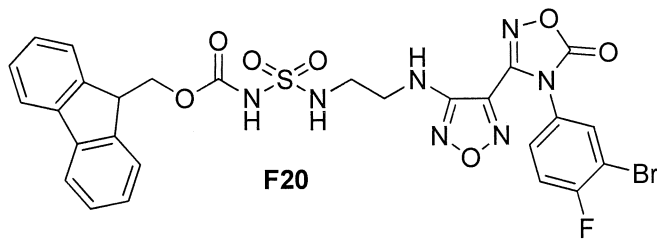
i) cho hợp chất có công thức F19:



phản ứng với hợp chất có công thức F5:

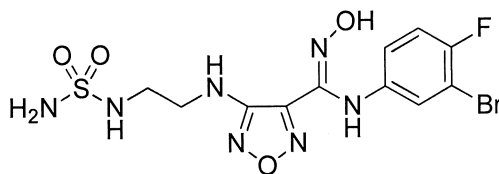


với sự có mặt của triethylsilan và axit metansulfonic để tạo ra hợp chất có công thức F20:



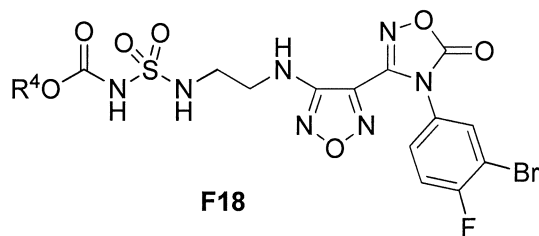
và

ii) chuyển hóa hợp chất có công thức F20 thành hợp chất có công thức I:



trong đó bước chuyển hóa bao gồm bước kết hợp hợp chất có công thức F20 với N,N-bis(2-aminoethyl)etan-1,2-điamin.

29. Hợp chất có công thức F18:



trong đó R^4 là benzyl, etyl, C_{1-3} haloalkyl, 2,2,2-tricloroethyl hoặc 9H-fluoren-9-ylmetyl.

30. Hợp chất theo điểm 29, trong đó R^4 là benzyl.
31. Hợp chất theo điểm 29, trong đó R^4 là etyl.
32. Hợp chất theo điểm 29, trong đó R^4 là C_{1-3} haloalkyl.
33. Hợp chất theo điểm 29, trong đó R^4 là 2,2,2-tricloroethyl.
34. Hợp chất theo điểm 29, trong đó R^4 là 9H-fluoren-9-ylmetyl.