



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẢNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0035234

(51)⁷ C07D 471/04; A61K 31/4155; A61K 31/437 (13) B

(21) 1-2019-05828

(22) 24/03/2017

(86) PCT/KR2017/003194 24/03/2017

(87) WO 2018/174320 A1 27/09/2018

(45) 25/04/2023 421

(43) 30/01/2020 382A

(73) ST PHARM CO., LTD. (KR)

231, Hyeomnyeok-ro, Siheung-si, Gyeonggi-do 15086, Republic of Korea

(72) KIM, Bong Jin (KR); LEE, Ill Young (KR); KIM, Jae Hak (KR); SHIN, Hong Suk (KR); SON, Jong Chan (KR); LEE, Chong-Kyo (KR); KIM, Kyungjin (KR); KIM, Uk-il (KR); NAM, Hwa Jung (KR).

(74) Công ty TNHH một thành viên Sở hữu trí tuệ VCCI (VCCI-IP CO.,LTD)

(54) HỢP CHẤT PYROLOPYRIDIN VÀ CHẾ PHẨM KHÁNG VIRUT CHỨA HỢP CHẤT NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến hợp chất pyrolopyridin có công thức hóa học I, raxemat hoặc chất đồng phân lập thể của nó, hoặc muối dược dụng của nó; và phương pháp điều chế hợp chất này. Hợp chất có công thức hóa học I thể hiện tính chọn lọc và hoạt tính kháng virus cao chống lại virus gây suy giảm miễn dịch ở người (HIV), với độc tính thấp; do đó, nó hữu ích làm chất trị liệu cho sự lây nhiễm virus, cụ thể, sự lây nhiễm HIV.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến hợp chất kháng virus, cụ thể hơn, hợp chất thể hiện tính chọn lọc và hoạt tính sinh lý cao chống lại virus gây suy giảm miễn dịch ở người (HIV), phương pháp điều chế hợp chất này, và sử dụng hợp chất này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Hội chứng suy giảm miễn dịch mắc phải (AIDS) gây ra bởi sự lây nhiễm virus gây suy giảm miễn dịch ở người (HIV). Có hai loại HIV, HIV-1 và HIV-2, và loại phổ biến nhất trên toàn cầu là HIV-1. Để điều trị AIDS, các chất ức chế enzym đã được phát triển theo các cơ chế hoạt động của HIV. Phụ thuộc vào điểm hoạt động, các chất ức chế này được phân loại thành chất ức chế phiên mã ngược nucleosit (NRTI), chất ức chế proteaza (PI), chất ức chế liên hiệp, và chất ức chế integraza.

Các chất ức chế integraza được phân loại thành các chất ức chế điểm xúc tác và các chất ức chế điểm không xúc tác. Nghiên cứu về các chất ức chế integraza điểm xúc tác đã được tiến hành tích cực cho đến nay, và ba loại thuốc đã được phát triển và có sẵn trên thị trường. Raltegravir, được phát triển trong 2008, là thuốc đại diện. Trong khi đó, cơ chế hoạt động của các chất ức chế integraza điểm không xúc tác được đưa ra bởi Ziger Debyser, et al. (Frauke Christ, Zeger Debyser et al., Nature Chemical Biology, 2010, Vol. 6, 442), và sự phát triển của các chất ức chế đối với cơ chế hoạt động này đã được tiến hành tích cực.

Ngoài ra, nhiều nghiên cứu đã được tiến hành để phát triển thuốc hữu hiệu để điều trị chống lại các virus kháng thuốc. Các chất trị liệu này được kiểm soát trong hỗn hợp của hai hoặc bốn thuốc mà thể hiện các cơ chế hoạt động khác nhau, mà được gọi là các liệu pháp kháng retrovirus hoạt tính cao (HAART), nhờ đó dẫn đến hiệu quả kéo dài cuộc sống. Mặc dù có những nỗ lực như trên, tuy nhiên, AIDS chưa được chữa khỏi hoàn toàn, và do độc tính thuốc và biểu hiện của sự đối kháng với chất trị liệu hiện tại, sự phát triển của thuốc mới đang được yêu cầu liên tục.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề kỹ thuật cần giải quyết

Trong nỗ lực giải quyết những vấn đề nêu trên, các tác giả đã tiến hành những nghiên cứu sâu rộng để tìm kiếm các chất trị liệu AIDS mới, và kết quả là, tìm ra rằng các hợp chất pyrolopyridin có khung mới có tác dụng ức chế sự tăng sinh của HIV. Sáng chế đã được hoàn thành trên cơ sở những phát hiện này.

Do đó, một mục đích của sáng chế là đề xuất hợp chất pyrolopyridin mới và muối được dụng của nó, mà thể hiện tác dụng ức chế sự tăng sinh HIV-1 bằng cách ức chế hoạt tính của các enzym integraza của HIV-1, và cũng thể hiện kết quả tốt đối với đặc tính thuốc và các thử nghiệm độc tính cơ bản.

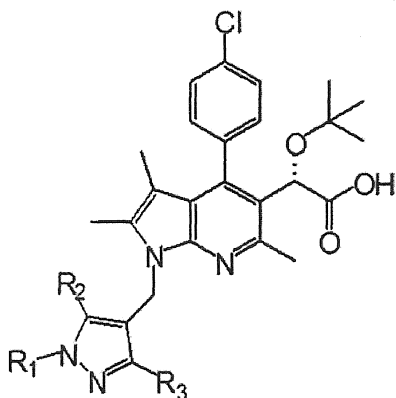
Mục đích còn lại của sáng chế là đề xuất phương pháp điều chế hợp chất pyrolopyridin mới như được mô tả ở trên, và muối được dụng của nó.

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất được phẩm bao gồm hợp chất nêu trên làm thành phần hoạt tính.

Cách thức giải quyết vấn đề

Khía cạnh thứ nhất của sáng chế là đề xuất hợp chất có công thức hóa học I dưới đây, raxemat hoặc chất đồng phân lập thể của nó, hoặc muối được dụng của nó:

Công thức hóa học I



trong đó,

R₁ được chọn từ nhóm bao gồm C₁₋₆ alkyl không được thế hoặc được thế bằng nguyên tử halogen, benzyl không được thế hoặc được thế bằng C₁₋₃ alkyl hoặc halogen,

C₁₋₃ alkyloxymetyl, C₁₋₃ alkyl carbamat, và sulfonyl không được thế hoặc được thế bằng C₁₋₃ alkyl, và

R₂ và R₃ độc lập là hydro, C₁₋₆ alkyl, hoặc nguyên tử halogen,

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất hợp chất trong đó R₁ là C₁₋₆ alkyl, raxemat hoặc chất đồng phân lập thể của nó, hoặc muối được dụng của nó.

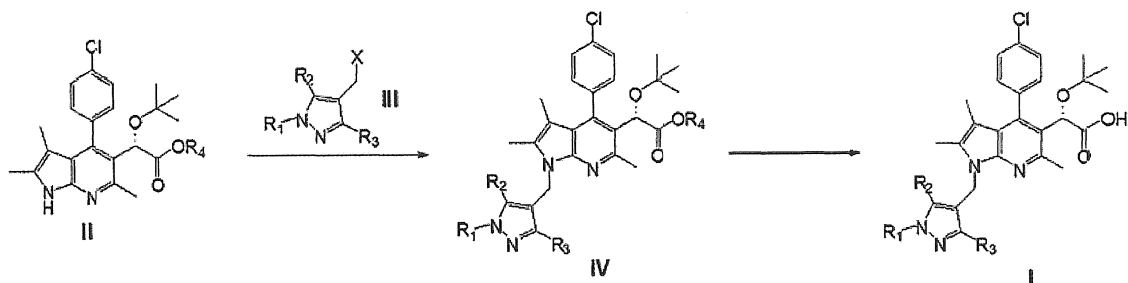
Theo phương án khác, sáng chế đề xuất hợp chất trong đó R₁ là metyl, và R₂ và R₃ độc lập là hydro, metyl hoặc cloro, raxemat hoặc chất đồng phân lập thể của nó, hoặc muối được dụng của nó.

Theo phương án khác nữa, sáng chế đề xuất hợp chất trong đó R₁ là metyl, và cả hai R₂ và R₃ là hydro, raxemat của chất đồng phân lập thể của nó, hoặc muối được dụng của nó.

Cụ thể, nguyên tử halogen là clo, brom hoặc nguyên tử flo.

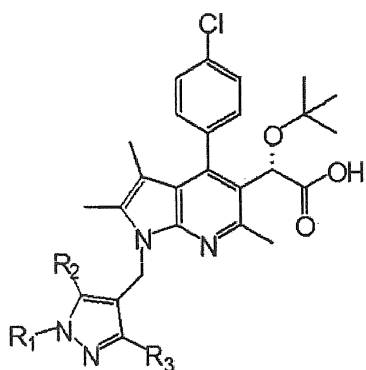
Khía cạnh thứ hai của sáng chế đề xuất phương pháp điều chế hợp chất của công thức hóa học I theo sơ đồ phản ứng 1 dưới đây:

Sơ đồ phản ứng 1



Cụ thể, phương pháp điều chế hợp chất của công thức hóa học I,

Công thức hóa học I

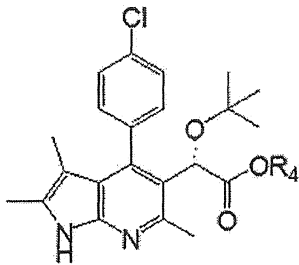


, bao gồm:

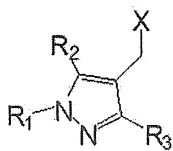
1) bước thứ nhất là cho hợp chất có công thức hóa học II phản ứng với hợp chất

có công thức hóa học III để điều chế hợp chất có công thức hóa học IV,

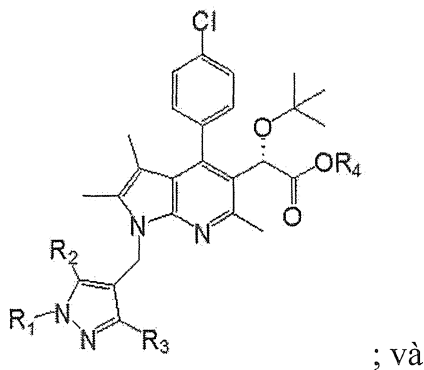
Công thức hóa học II



Công thức hóa học III



Công thức hóa học IV



2) bước thứ hai là thủy phân hợp chất có công thức hóa học IV,

trong đó,

R_1 được chọn từ nhóm bao gồm C_{1-6} alkyl không được thế hoặc được thế bằng nguyên tử halogen, benzyl không được thế hoặc được thế bằng C_{1-3} alkyl hoặc halogen, C_{1-3} alkyloxymetyl, C_{1-3} alkyl carbamat, và sulfonyl không được thế hoặc được thế bằng C_{1-3} alkyl, và

R_2 và R_3 độc lập là hydro, C_{1-6} alkyl, hoặc nguyên tử halogen,

R_4 là C_{1-6} alkyl, và

X là halo, metansulfonyl, toluensulfonyl hoặc triflorometansulfonyl.

Cụ thể, R_4 có thể là metyl hoặc etyl, và X có thể là clo hoặc p-toluensulfonyl.

Trong bước thứ nhất của phương pháp điều chế hợp chất của công thức hóa học I, tỷ lệ mol giữa hợp chất của công thức hóa học II và hợp chất của công thức hóa học III tốt hơn là 1:2 đến 1:5, nhưng không bị giới hạn ở đó.

Trong bước thứ nhất, dung môi phản ứng có thể là diclometan, dimetylformamit, tetrahydrofuran, hoặc hỗn hợp bất kỳ của chúng, nhưng không bị giới hạn ở đó.

Bước thứ nhất có thể được thực hiện trong 2 giờ đến 18 giờ, nhưng không bị giới hạn ở đó.

Bước thứ nhất có thể được thực hiện với sự có mặt của xesi cacbonat, và dimetylformamit tốt hơn là được sử dụng làm dung môi.

Trong bước thứ nhất, xesi cacbonat được sử dụng với lượng tốt hơn là từ 2 đến 5 tương đương với hợp chất của công thức hóa học II.

Tại thời điểm này, nhưng không bị giới hạn ở đó, nhiệt độ phản ứng tốt hơn là 40°C đến 100°C, và thời gian phản ứng tốt hơn là 4 giờ đến 18 giờ.

Ví dụ, hợp chất có công thức hóa học II, mà được sử dụng làm nguyên liệu khởi đầu để điều chế hợp chất của công thức hóa học I theo sáng chế, có thể được điều chế theo phương pháp được mô tả trong ví dụ điều chế của WO 2013/073875A1.

Trong bước thứ hai, sự thủy phân có thể được thực hiện với lithi hydroxit, canxi hydroxit, bari hydroxit hoặc kali hydroxit, nhưng không bị giới hạn ở đó. Tốt hơn là, kali hydroxit hoặc lithi hydroxit có thể được sử dụng.

Trong sự thủy phân, kali hydroxit hoặc lithi hydroxit có thể được sử dụng 3 đến 8 tương đương với hợp chất của công thức hóa học IV, nhưng không bị giới hạn ở đó.

Sự thủy phân trong bước thứ hai có thể được thực hiện tại nhiệt độ trong phòng, hoặc nhiệt độ thay đổi ở 35°C đến 50°C.

Trong sự thủy phân, nước, metanol, tetrahydrofuran hoặc hỗn hợp bất kỳ của chúng có thể được sử dụng làm dung môi, nhưng không bị giới hạn ở đó.

Theo phương án khác, sự thủy phân được thực hiện với lithi hydroxit trong dung môi được trộn, ví dụ, 4N natri hydroxit/metanol, hoặc tetrahydrofuran/metanol/nước.

Sự thủy phân có thể được thực hiện đặc biệt trong 6 giờ đến 18 giờ, nhưng không

bị giới hạn ở đó.

Khía cạnh thứ ba của sáng chế là đề xuất chế phẩm kháng virus bao gồm hợp chất có công thức hóa học I được mô tả ở trên, raxemat hoặc chất đồng phân lập thể của nó, hoặc muối được dụng của nó.

Cụ thể, chế phẩm nêu trên là chế phẩm kháng virus gây suy giảm miễn dịch ở người (HIV).

Mô tả chi tiết sáng chế

Theo sáng chế, ví dụ cụ thể của hợp chất của công thức hóa học I có thể là axit (S)-2-(tert-butoxy)-2-(4-(4-clophenyl)-2,3,6-trimetyl-1-((1-metyl-1H-pyrazol-4-yl)metyl)-1H-pyrol[2,3-b]pyridin-5-yl)axetic, hoặc

axit (S)-2-(tert-butoxy)-2-(1-((5-cloro-1,3-dimetyl-1H-pyrazol-4-yl)metyl)-4-(4-clophenyl)-2,3,6-trimetyl-1H-pyrol[2,3-b]pyridin-5-yl)axetic.

Hợp chất của công thức hóa học I của sáng chế được điều chế như ở trên có thể tạo muối, cụ thể, muối được dụng. Muối được dụng phù hợp không bị giới hạn cụ thể miễn là nó là muối được sử dụng điển hình trong lĩnh vực, như muối cộng axit (Refer to J. Pharm. Sci., 1977, 66, 1).

Ví dụ ưu tiên của axit cho muối cộng axit được dụng bao gồm axit vô cơ như axit clohydric, axit hydrobromic, axit phosphoric, axit orthophosphoric hoặc axit sulfuric; hoặc axit hữu cơ như axit metansulfonic, axit benzensulfonic, axit toluensulfonic, axit axetic, axit propionic, axit lactic, axit xitric, axit fumaric, axit malic, axit sucxinic, axit salixylic, axit maleic, axit glyxerophosphoric hoặc axit axetylsalixylic.

Muối kim loại được dụng cũng có thể thu được theo phương pháp thông thường với bazơ. Ví dụ, hợp chất của công thức hóa học I có thể được hòa tan trong lượng dư của dung dịch của hydroxit kim loại kiềm hoặc hydroxit kim loại kiềm thổ, muối không hòa tan của hợp chất có thể được lọc, và dịch lọc sau đó có thể được làm bay hơi và sấy khô, để thu được muối kim loại được dụng của hợp chất.

Muối không được chấp nhận tính được dụng hoặc solvat của hợp chất của công thức hóa học I có thể được sử dụng làm chất trung gian trong việc điều chế hợp chất của công thức hóa học I, hoặc muối được dụng hoặc solvat của nó.

Hợp chất của công thức hóa học I theo sáng chế bao gồm không chỉ các muối được dụng của nó, mà còn các solvat và các hydrat của nó mà có thể được điều chế từ đó. Các chất đồng phân lập thể của hợp chất có công thức hóa học I và các chất trung gian của nó có thể được điều chế theo phương pháp thông thường.

Ngoài ra, hợp chất của công thức hóa học I theo sáng chế có thể được điều chế hoặc dưới dạng tinh thể hoặc dưới dạng phi tinh thể. Khi hợp chất của công thức hóa học I được điều chế dưới dạng tinh thể, nó có thể được hydrat hóa hoặc solvat hóa một cách tùy chọn.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất chế phẩm kháng virus bao gồm, làm thành phần hoạt tính, hợp chất của công thức hóa học I được mô tả ở trên, hoặc muối được dụng, hydrat hoặc solvat của nó. Trong trường hợp đó, chế phẩm kháng virus đặc biệt là chế phẩm kháng virus gây suy giảm miễn dịch ở người (HIV).

Trong các ví dụ thử nghiệm của sáng chế, đã được tìm ra rằng hợp chất có công thức hóa học I là chất nền rất tốt, mà tính độc tế bào của nó là thấp, tác dụng ức chế HIV là rất tốt và hoạt tính sinh lý là cao, và mà thể hiện độ an toàn trong kết quả thử nghiệm độc tính cơ bản và có độ tan phù hợp cho các đặc tính thuốc.

Dược phẩm theo sáng chế có thể được tạo thành dưới dạng dùng qua đường miệng hoặc dạng tiêm. Ví dụ, dạng dùng qua đường miệng bao gồm viên nén, viên nang và tương tự, và dạng này chứa chất pha loãng (ví dụ, lactoza, dextroza, sucroza, mannitol, sorbitol, xenluloza và/hoặc glyxin) và chất keo (ví dụ, silic oxit, bột talc, axit stearic, hoặc muối magie hoặc canxi của axit stearic, hoặc polyetylen glycol), ngoại trừ thành phần hoạt tính. Viên nén có thể chứa chất kết dính như magie nhôm silicat, hồ tinh bột, gelatin, tragacanth, metyl xenluloza, natri carboxymetyl xenluloza hoặc polyvinyl picolidin, và tùy từng trường hợp, có thể chứa chất phân rã như tinh bột, aga, axit alginic hoặc muối natri của nó, hoặc hỗn hợp đun sôi và/hoặc chất hấp thụ, chất màu, chất tạo mùi hương, và chất ngọt. Dạng tiêm tốt hơn là dịch huyền phù hoặc dung dịch dạng nước đẳng trương.

Chế phẩm nêu trên có thể được tiệt trùng và/hoặc có thể chứa tá dược như chất bảo quản, chất ổn định, bột thấm nước hoặc chất thúc đẩy tạo nhũ tương, muối để điều chỉnh áp suất thẩm thấu và/hoặc chất đệm, và chất nền hữu ích trị liệu khác bất kỳ.

Dạng nêu trên có thể được điều chế bằng cách trộn điển hình, phương pháp phủ hoặc tạo hạt, và có thể chứa thành phần hoạt tính nằm trong khoảng từ 0,1 đến 75% trọng lượng, và tốt hơn là nằm trong khoảng từ 1 đến 50% trọng lượng. Dạng liều đơn vị cho động vật có vú nằm trong khoảng từ 50 đến 70 kg chứa khoảng từ 10 đến 200mg thành phần hoạt tính.

Liều được ưu tiên của hợp chất theo sáng chế thay đổi phụ thuộc vào điều kiện và trọng lượng của bệnh nhân, diễn tiến của bệnh, dạng của thuốc, đường sử dụng và khoảng thời gian sử dụng, nhưng có thể được chọn phù hợp bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực. Liều dùng hàng ngày có thể được dùng qua đường miệng hoặc đường tiêm trong một liều đơn hoặc chia liều.

Dược phẩm của sáng chế có thể được dùng cho động vật có vú bao gồm chuột cống, chuột nhắt, động vật nuôi, con người và tương tự, thông qua các đường khác nhau. Tất cả các đường để sử dụng có thể được chiêm nghiệm và có thể được kiểm soát, ví dụ, qua đường miệng, trực tràng, hoặc tiêm tĩnh mạch, tiêm bắp, tiêm dưới da, tiêm màng cứng tử cung hoặc tiêm nội não.

Hiệu quả sáng chế

Hợp chất có công thức hóa học I theo sáng chế, raxemat hoặc chất đồng phân lập thể của nó, hoặc muối được dụng, hydrat hoặc solvat của nó thể hiện tính chọn lọc và hoạt tính sinh lý cao chống lại virus gây suy giảm miễn dịch ở người (HIV) với độc tính thấp, và vì vậy hữu ích để điều trị sự lây nhiễm virus, cụ thể, sự lây nhiễm virus gây suy giảm miễn dịch ở người (HIV).

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết viện dẫn tới các ví dụ và các ví dụ điều chế dưới đây. Tuy nhiên, các ví dụ và các ví dụ điều chế dưới đây được đưa ra chỉ nhằm mục đích minh họa, và phạm vi của sáng chế không bị giới hạn ở đó.

Ví dụ điều chế 1: Điều chế muối 4-(clometyl)-1-metyl-1H-pyrazol hydroclorua

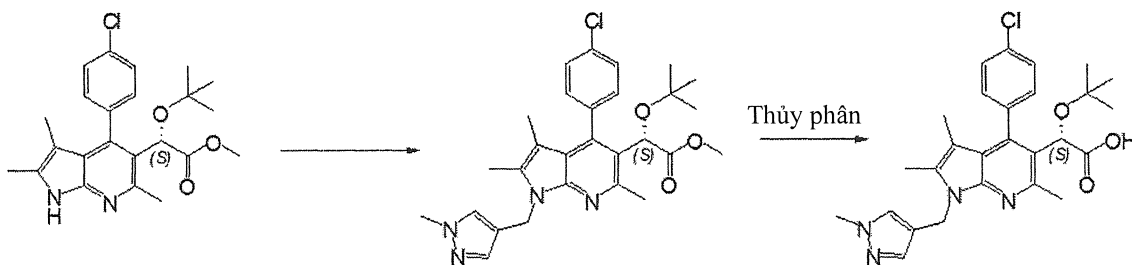
Diclotetan(1,8mL) và trietylamin (2 giọt) được bổ sung vào (1-metyl-1H-pyrazol-4-yl) metanol (380mg, 3,39mmol) được điều chế theo phương pháp đã biết (Frey, R. R., et al, J. Med. Chem., 2008, 51, 3777-3787), và sau đó hỗn hợp thu được được làm

mát đến 0°C. Dung dịch mà trong đó thionyl clorua (0,62mL) được hòa tan trong toluen (1,8mL) được bổ sung chậm vào đó, và hỗn hợp được khuấy trong 2 giờ ở 30°C. Dung môi và lượng dư của thionyl clorua được loại bỏ khỏi dung dịch phản ứng dưới áp suất giảm để thu được hợp chất đích. Hợp chất được sử dụng trong phản ứng tiếp theo mà không cần tinh chế.

Ví dụ điều chế 2: Điều chế 4-(bromometyl)-5-cloro-1,3-dimetyl-1H-pyrazol

(5-Cloro-1,3-dimetyl-1H-pyrazol-4-yl)metanol (937mg, 5,8mmol) được điều chế theo phương pháp đã biết (Attardo, G.; Triphy, S., PCT Int. Appl. 2010, WO 2010-132999 A1) được hòa tan trong diclometan (40mL) và sau đó, được làm mát đến 0°C. Dung dịch mà trong đó phospho tribromua (0,54mL, 5,8mmol) được pha loãng với diclometan (5mL) được bổ sung chậm vào đó, và sau đó hỗn hợp thu được được khuấy trong 1,5 giờ tại nhiệt độ trong phòng. Dung môi được loại bỏ khỏi dung dịch phản ứng dưới áp suất giảm để thu được hợp chất đích. Hợp chất được sử dụng trong phản ứng tiếp theo mà không cần tinh chế.

Ví dụ 1: Axit (S)-2-(tert-butoxy)-2-(4-(4-clophenyl)-2,3,6-trimetyl-1-((1-metyl)-1H-pyrazol-4-yl)metyl)-1H-pyrol[2,3-b]pyridin-5-yl)axetic.



Bước 1: Metyl(S)-2-(tert-butoxy)-2-(4-(4-clophenyl)-2,3,6-trimetyl-1H-pyrol[2,3-b]pyridin-5-yl)axetat (700mg, 1,69mmol) được hòa tan trong dimetylformamit (14mL), và sau đó xesi cacbonat (2,75 g, 8,45mmol) và 10 giọt trietylamin được bổ sung vào đó. Sau khi nhiệt độ được điều chỉnh đến 40°C, hợp chất thu được trong ví dụ điều chế 1 (560mg, 3,39mmol) được bổ sung trong phần ở đó trong 1 giờ. Hỗn hợp thu được được khuấy trong 18 giờ ở nhiệt độ tương tự để hoàn thành phản ứng. Dung dịch phản ứng được làm mát bằng bình nước đá, và nước (50mL) được bổ sung vào đó, và phần thu được được khuấy trong 10 phút. Các chất rắn tạo ra được lọc và được rửa với nước. Không cần sấy khô, chất rắn thu được được tinh chế bằng sắc ký cột

silica gel (chất rửa giải: etyl axetat/n-hexan = 1/2 và 1/1) để tạo ra hợp chất đích (430mg, 50%).

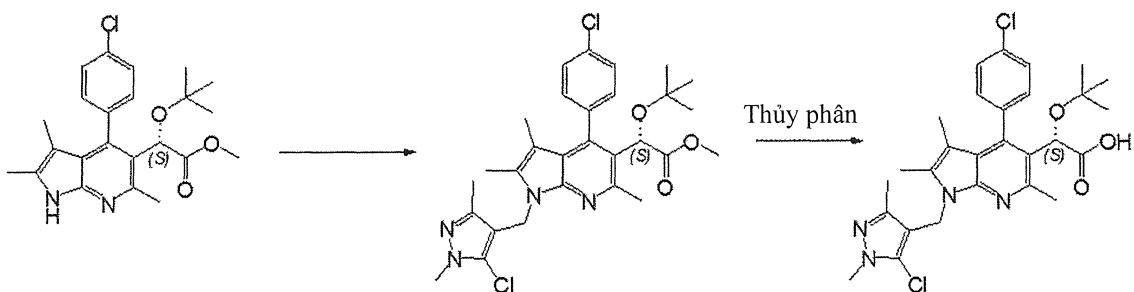
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz) δ 1,01(s, 9H), 1,49(s, 3H), 2,30(s, 3H), 2,75(s, 3H), 3,69(s, 3H), 3,83(s, 3H), 5,11(s, 1H), 5,32(s, 2H), 7,30(m, 2H), 7,44-7,47(m, 4H); MS(EI, m/e)= 509(M^+).

Bước 2: Sau khi hợp chất (369mg, 0,724mmol) thu được trong bước 1 được hòa tan trong tetrahydrofuran (5,5mL), natri hydroxit 4N trong metanol (0,98mL) được bổ sung vào đó, và hỗn hợp thu được được khuấy trong 18 giờ ở 35°C. Dung dịch phản ứng được làm mát đến 10°C và sau đó được trung hòa bằng cách bổ sung 4N axit clohydric. Sau khi dung môi được loại bỏ khỏi dung dịch phản ứng dưới áp suất giảm, phần dư được tinh chế bằng sắc ký cột silica gel (chất rửa giải: diclometan/metanol=95/5 và 90/10) để tạo ra hợp chất đích (260mg, 73%) trong chất rắn màu trắng.

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 500 MHz) δ 1,00(s, 9H), 1,52(s, 3H), 2,31(s, 3H), 2,72(s, 3H), 3,80(s, 3H), 5,14(s, 1H), 5,37(bs, 2H), 7,34-7,53(m, 6H);

MS(EI, m/e)= 495(M^+).

Ví dụ 2: axit (S)-2-(tert-butoxy)-2-(1-((5-cloro-1,3-dimetyl-1H-pyrazol-4-yl)metyl)-4-(4-clophenyl)-2,3,6-trimetyl-1H-pyrololo[2,3-b]pyridin-5-yl)axetic.



Hợp chất đích (30mg, 44%) thu được bằng cách cho metyl(S)-2-(tert-butoxy)-2-(4-(4-clophenyl)-2,3,6-trimetyl-1H-pyrololo[2,3-b]pyridin-5-yl)axetat (200mg, 0,48mmol) phản ứng với hợp chất thu được trong ví dụ điều chế 2 (432mg, 1,44mmol) theo cách tương tự như trong ví dụ 1.

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 500 MHz) δ 1,00(s, 9H), 1,49(s, 3H), 1,90(s, 3H), 2,19(s, 3H), 2,68(s, 3H), 3,75(s, 3H), 5,20(s, 1H), 2,28(dd, J = 40,7, 15,8 Hz, 2H), 7,24(d, J = 7,4 Hz, 1H), 7,47-7,39(m, 2H), 7,63(d, J = 7,4 Hz, 1H);

MS(EI, m/e)= 544(M⁺).

Ví dụ thử nghiệm 1: Điều tra tác dụng ức chế chống lại HIV-1(loại hoang dã/đột biến) và thử nghiệm độc tế bào của hợp chất theo sáng chế

Để thấy được tác dụng ức chế HIV-1 (loại hoang dã/đột biến) của hợp chất theo sáng chế, thử nghiệm tác dụng ức chế HIV-1 (loại hoang dã/đột biến) được thực hiện *in vitro* theo phương pháp đã biết dưới đây (H. Tanaka et al., J. Med. Chem., 1991, 34, 349). Các tế bào MT-4 được sử dụng làm các tế bào chủ, và mức độ của hợp chất của sáng chế ức chế độc tế bào cho các tế bào MT-4 lây nhiễm virus được điều tra.

Thứ nhất, các tế bào MT-4 được phân tán trong môi trường nuôi cấy tại nồng độ của 1×10^4 tế bào/lỗ, và HIV-1 được tiêm sao cho nồng độ là 500 TCID₅₀ (nồng độ mà 50% tế bào bị lây nhiễm ở đó)/lỗ. ngay sau khi tiêm, sự phân tán tế bào được chuyển vào 100 μ L vào tấm microtiter phẳng mà trong đó mẫu của hợp chất theo sáng chế được đặt. Mẫu được tiêm trong khoảng từ 4 đến 5 ngày ở 17°C, và hiệu quả ức chế virus được xác định bằng phương pháp MTT. Ngoài ra, khả năng sống sót của các tế bào bị lây nhiễm trong thử nghiệm được quan sát thấy bằng phương pháp MTT để xác định mức độ của tính độc tế bào. Để làm hợp chất đối chứng, azidothymidin (AZT), Raltegravir, Dolutegravir, và Elvitegravir được sử dụng. Các kết quả được thể hiện trong các Bảng 1 và 2 dưới đây.

[Bảng 1]

Các hợp chất	Loại HIV-1(IIIB) hoang dã trong các tế bào MT-4
	EC ₅₀ (nM)*
Ví dụ 1	3,23
Ví dụ 2	25,7
Raltegravir	5,85
AZT	2,24

* EC₅₀: nồng độ của sự ức chế 50% của sự lây nhiễm HIV

[Bảng 2]

	NL4-3 wt	4736_2*	4736_4*	8070_1*	8070_2*	1556_1*
	IC ₅₀ (nM)	IC ₅₀ (nM)	IC ₅₀ (nM)	IC ₅₀ (nM)	IC ₅₀ (nM)	IC ₅₀ (nM)
Ví dụ 1	3,6	1,1	3,4	0,9	3,4	3,4
AZT	38,4	29,7	34,6	34,7	57,6	33,1
Raltegravir	4,6	351	351	4,322	3,844	3,757

Dolutegravir	3,2	3,5	3	8,5	4,4	3,2
Elvitegravir	<0,10	410	320	>10000	N/A	276

* Bản sao HIV-1: Các đột biến kháng Raltegravir
(4736_2/4736_4/8070_1/8070_2/1556_1)

** IC₅₀: Một nửa nồng độ ức chế tối đa

Ví dụ thử nghiệm 2: Thử nghiệm dược động học của hợp chất theo sáng chế

Các thử nghiệm được thực hiện để phát hiện những thay đổi trong động học *in vivo* bao gồm hấp thụ, phân phối, trao đổi chất và bài tiết *in vivo* đối với hợp chất của ví dụ 1 của sáng chế. Ông được chèn vào trong tĩnh mạch cổ và tĩnh mạch đùi của chuột cống. Thuốc được dùng trong tĩnh mạch đùi trong trường hợp tiêm tĩnh mạch, và thuốc được dùng trong khoang miệng trong trường hợp dùng qua đường miệng. Máu được thu hồi từ tĩnh mạch cổ trong thời gian được xác định trước.

Nồng độ liều là 1mg/kg để tiêm tĩnh mạch, và là 2mg/kg để dùng qua đường miệng. sau khi ly tâm máu để tách huyết tương, các mẫu huyết tương và mẫu nước tiểu được xử lý sơ bộ với dung môi hữu cơ phù hợp, và sau đó nồng độ của thuốc được phân tích bằng LC-MS/MS. Từ dữ liệu của nồng độ thuốc trong máu theo thời gian mà được phân tích sau khi dùng qua đường miệng và truyền tĩnh mạch, thông số dược động học không ngăn được tính toán bằng WinNonlin (Pharsight, USA).

[Bảng 3]

Các thông số dược động học trong chuột cống đực			
Hợp chất	Các thông số	IV, 1mg/kg	PO, 2mg/kg
Hợp chất của ví dụ 1	T _{tối đa} (giờ)	-	3,2
	C _{tối đa} (nM)	-	914
	T _{1/2} (giờ)	8,63	8,66
	AUC _t (hr*nM)	6,081	8,734
	AUC _∞ (hr*nM)	6,508	10,423
	CL (L/kg/hr)	0,323	-
	V _{ss} (L/kg)	1,77	-
	F (%)		71,8

Ví dụ thử nghiệm 3: Thử nghiệm tính ổn định trao đổi chất *In vitro* của hợp chất theo sáng chế

Thử nghiệm tính ổn định trao đổi chất *in vitro* được tiến hành cho hợp chất của ví dụ 1 của sáng chế. Để xác nhận tính ổn định trao đổi chất *in vitro*, thời gian bán hủy vi lập thể gan của hợp chất được quan sát thấy. Hợp chất trong thuốc phản ứng với NADPH sử dụng vi lập thể gan đặc trưng cho loài (chuột cống, chó, khỉ, và con người) chứa nhiều enzym chuyển hóa, và sau đó thời gian bán hủy của thuốc được xác định bằng cách định lượng bằng LC-MS/MS theo phút. Tìm ra rằng hợp chất của ví dụ 1 là hợp chất ổn định với thời gian bán hủy là 2 hoặc 3 giờ, hoặc cao hơn.

[Bảng 4]

Tính ổn định vi lập thể gan ($T_{1/2}$, phút)				
Các hợp chất	Gan chuột cống ($T_{1/2}$, phút)	Gan chó ($T_{1/2}$, phút)	Gan khỉ ($T_{1/2}$, phút)	Gan người ($T_{1/2}$, phút)
Hợp chất của ví dụ 1	>145	>145	133,3	135,9
Kiểm soát (Testosteron)	0,7	23,6	13,0	19,7

Ví dụ thử nghiệm 4: Thử nghiệm ức chế CYP450 của hợp chất theo sáng chế

Thử nghiệm ức chế CYP450 được thực hiện cho hợp chất của sáng chế. Để các vi lập thể gan của con người (0,25mg/ml), chất đệm phosphat 0,1 M (pH 7,4) và các dung dịch hỗn hợp thuốc của 5 enzym chuyển hóa thuốc (CYP1A2, CYP2C9, CYP2D6, CYP3A4 và CYP19) (dung dịch hỗn hợp A: Phenaxetin 50 μ M, S-mephenytoin 100 μ M, dextromethorphan 5nM, midazolam 2,5 μ M, dung dịch hỗn hợp B: tolbutamit 100 μ M), hợp chất của ví dụ 1 được bổ sung ở nồng độ từ 0 và 10 μ M, tương ứng, và sau đó được nuôi cấy ở 37°C trong 15 phút. Sau đó, để kết thúc phản ứng, dung dịch axetonitril chứa tiêu chuẩn nội (clorpropamit) được bổ sung vào đó, và hỗn hợp thu được được ly tâm (14,000 rpm, 4°C) trong 5 phút. chất hoạt động bề mặt sau đó được tiêm vào hệ thống LC/MS/MS và các chất chuyển hóa của các thuốc nền được phân tích đồng thời để nhờ đó đánh giá các hoạt tính của hợp chất thử nghiệm ức chế các enzym chuyển hóa thuốc. Được đánh giá rằng hợp chất của ví dụ 1 không thể hiện hoạt tính ức chế chống lại 5 enzym CYP này.

[Bảng 5]

Sự ức chế CYP (% hoạt tính kiểm soát) tại 10 μ M					
Hợp chất	1A2	2C9	2D6	3A4	2C19
Hợp chất của ví dụ 1	113,6	68,5	101,6	92,1	101,6

Ví dụ thử nghiệm 5: Khảo nghiệm kênh hERG K⁺ của hợp chất theo sáng chế

Khảo nghiệm kênh hERG K⁺ được thực hiện để dự đoán tính độc tim cho hợp chất theo sáng chế. Hoạt tính hERG của hợp chất được đo bằng HERG-HEK293 sử dụng kẹp phẳng tự động [PatchXpress 7000A]. Phương pháp này là phương pháp phổ biến nhất để nghiên cứu kênh ion, mà trong đó dòng chảy của các ion qua kênh được đo trực tiếp bằng kẹp điện áp. Trị số IC₅₀ của kênh hERG K⁺ cho hợp chất của ví dụ 1 là 66,7 μ M. Trị số IC₅₀ dưới 10 μ M là tiêu chuẩn mà nó được xác định để có thể thể hiện tính độc tim. Do đó, hợp chất của ví dụ 1, mà trị số của nó là lớn hơn chỉ tiêu này, được xác định là an toàn.

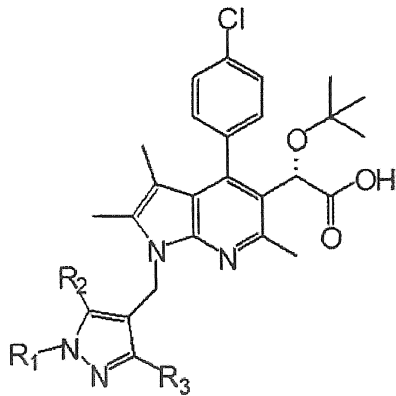
[Bảng 6]

Khảo nghiệm kênh hERG K ⁺ (phương pháp ghi kẹp)	
Các hợp chất	IC ₅₀ (μ M)
Hợp chất của ví dụ 1	66,7
Kiểm soát (Astemizol)	0,079

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Hợp chất có công thức hóa học I dưới đây, raxemat hoặc chất đồng phân lập thể của nó, hoặc muối dược dụng của nó:

Công thức hóa học I



trong đó:

R_1 là C_{1-6} alkyl, và R_2 và R_3 độc lập là hydro.

2. Hợp chất theo điểm 1, raxemat hoặc chất đồng phân lập thể của nó, hoặc muối dược dụng của nó, trong đó R_1 là metyl.
3. Chế phẩm kháng virus chứa hợp chất có công thức hóa học I theo điểm 1 hoặc 2, raxemat hoặc chất đồng phân lập thể của nó, hoặc muối dược dụng của nó.