



(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)



1-0037209

(51)⁷ A61K 31/4965; A61K 31/438; A61K 31/4545; A61P 31/06; A61K 31/498; A61K 45/06; A61K 31/437; A61K 31/47 (13) B

(21) 1-2019-05277

(22) 28/02/2018

(86) PCT/EP2018/054860 28/02/2018

(87) WO 2018/158280 07/09/2018

(30) 17158607.6 01/03/2017 EP

(45) 25/10/2023 427

(43) 25/11/2019 380A

(73) JANSSEN SCIENCES IRELAND UNLIMITED COMPANY (IE)
Barnahely, Ringaskiddy, Co Cork, Ireland

(72) ANDRIES, Koenraad Jozef Lodewijk Marcel (BE); KOUL, Anil (IN); VILLELLAS ARILLA, Maria Cristina (ES).

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

(54) SẢN PHẨM KẾT HỢP

(57) Sáng chế đề cập đến các sản phẩm kết hợp mới, hữu ích trong điều trị bệnh lao.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến các sản phẩm kết hợp mới. Sáng chế cũng đề cập đến các sản phẩm kết hợp như vậy để dùng làm thuốc, ví dụ, trong điều trị các bệnh nhiễm khuẩn, bao gồm các bệnh do tác nhân gây bệnh là mycobacteria gây ra như *Mycobacterium tuberculosis*. Các sản phẩm kết hợp như vậy có thể có lợi trong điều trị bệnh lao.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Mycobacterium tuberculosis là tác nhân gây ra bệnh lao (tuberculosis: TB), một loại bệnh nhiễm trùng nghiêm trọng và có thể gây tử vong có phân bố toàn thế giới. Ước tính từ Tổ chức Y tế Thế giới (World Health Organization) chỉ ra rằng có hơn 8 triệu người tiếp xúc với TB mỗi năm, và 2 triệu người chết vì bệnh lao hằng năm. Trong thập kỷ qua, số ca TB đã tăng 20% trên toàn thế giới với gánh nặng lớn nhất thuộc về các cộng đồng nghèo nhất. Nếu xu hướng này vẫn tiếp tục, tỷ lệ mắc TB sẽ tăng lên 41% trong hai mươi năm tới. Năm mươi năm kể từ khi giới thiệu hóa trị hữu hiệu, TB vẫn là nguyên nhân gây nhiễm hàng đầu, sau AIDS, gây tử vong ở người lớn trên thế giới. Sự phức tạp hóa dịch TB là sự gia tăng các chủng kháng đa thuốc, và sự cộng sinh chết người với HIV. Những người dương tính với HIV và nhiễm TB có khả năng phát triển TB hoạt tính cao gấp 30 lần những người âm tính với HIV và TB là nguyên nhân gây tử vong cho một trong mỗi ba người bị HIV/AIDS trên toàn thế giới.

Các phương pháp tiếp cận hiện có để điều trị bệnh lao đều bao gồm kết hợp nhiều chất. Ví dụ, chế độ được Cơ quan Y tế Hoa Kỳ (U.S. Public Health Service) khuyến cáo là kết hợp isoniazid, rifampixin và pyrazinamid trong hai tháng, tiếp theo là isoniazid và rifampixin riêng rẽ trong bốn tháng nữa. Các thuốc này được tiếp tục trong bảy tháng nữa ở các bệnh nhân bị nhiễm HIV. Đối với các bệnh nhân bị nhiễm các chủng kháng đa thuốc của *M. tuberculosis*, các chất như ethambutol, streptomycin, kanamycin, amikacin, capreomycin, ethionamid, cycloserin, ciprofloxacin và ofloxacin được bổ sung vào các liệu pháp kết hợp. Hiện không có một chất riêng rẽ nào hữu hiệu

trong điều trị lâm sàng bệnh lao, hoặc kết hợp bất kỳ các chất tạo khả năng điều trị trong thời gian nhỏ hơn sáu tháng.

Có nhu cầu y tế cao về các thuốc mới hoặc các thuốc kết hợp mới để cải thiện điều trị hiện tại bằng cách cho phép các chế độ tạo điều kiện thuận lợi cho sự tuân thủ của bệnh nhân và nhà cung cấp. Các chế độ ngắn hơn và các chế độ cần đến giám sát ít hơn là cách tốt nhất để đạt được mục đích này. Hầu hết lợi ích từ điều trị có được là trong 2 tháng đầu, trong suốt giai đoạn tăng liều, hoặc giai đoạn diệt khuẩn, khi bốn thuốc được dùng cùng nhau; tải lượng vi khuẩn giảm đáng kể, và bệnh nhân trở nên không bị nhiễm trùng. Giai đoạn tiếp tục từ 4 đến 6 tháng, hoặc giai đoạn khử trùng, cần loại bỏ trực khuẩn dai dẳng và giảm thiểu nguy cơ tái phát. Các thuốc hoặc kết hợp thuốc mới mà có khả năng rút ngắn điều trị còn 2 tháng hoặc ít hơn có thể rất có lợi. Cũng có thể có lợi là làm giảm số lượng thuốc được yêu cầu. Việc tạo điều kiện tuân thủ bằng cách yêu cầu giám sát với cường độ ít hơn cũng có thể có lợi. Hiển nhiên, các thuốc mới hoặc các kết hợp thuốc mới làm giảm cả tổng thời gian điều trị và tần suất dùng thuốc có thể mang lại lợi ích lớn nhất.

Sự phức tạp hóa dịch TB là sự gia tăng mắc các chủng kháng đa thuốc hoặc MDR-TB. Có tới 4% tổng số ca trên toàn thế giới được coi là MDR-TB – các ca này kháng các thuốc hữu hiệu nhất thuộc chuẩn bốn thuốc, isoniazid và rifampin. MDR-TB tử vong khi không được điều trị và không thể điều trị thỏa đáng nhờ liệu pháp chuẩn, nên việc điều trị cần đến 2 năm dùng thuốc "lựa chọn thứ hai". Các thuốc này thường không độc, đắt và hiệu quả không đáng kể. Khi không có liệu pháp hữu hiệu, các bệnh nhân MDR-TB bị nhiễm tiếp tục lây bệnh, tạo thành các đợt nhiễm mới với các chủng MDR-TB. Có nhu cầu y tế cao về các liệu pháp mới (ví dụ, liệu pháp kết hợp) có thể chứng tỏ hoạt tính đối với các chủng kháng thuốc, cụ thể là các chủng MDR.

Thuật ngữ “kháng thuốc” như được sử dụng trên đây hoặc sau đây là thuật ngữ được hiểu rõ bởi chuyên gia trong lĩnh vực vi sinh vật học. Mycobacterium kháng thuốc là Mycobacterium không còn mẫn cảm với ít nhất một thuốc hữu hiệu trước đó; đã phát triển khả năng chịu được sự tấn công kháng sinh bởi ít nhất một thuốc hữu hiệu trước đó. Chủng kháng thuốc có thể truyền khả năng chống chịu đó cho thế hệ sau của nó. Tính kháng nói trên có thể là do các đột biến di truyền ngẫu nhiên trong tế bào vi khuẩn làm biến đổi tính mẫn cảm của nó với thuốc riêng rẽ hoặc với các thuốc khác nhau.

Bệnh lao MDR là dạng cụ thể của bệnh lao kháng thuốc do vi khuẩn kháng ít nhất isoniazid và rifampixin (kháng hoặc không kháng các thuốc khác), mà hiện nay là hai thuốc kháng TB mạnh nhất. Do đó, bất kể khi được sử dụng trên đây hoặc sau đây, “kháng thuốc” bao gồm kháng đa thuốc.

Yếu tố khác trong kiểm soát dịch bệnh TB là vấn đề TB tiềm ẩn. Mặc dù có hàng chục chương trình kiểm soát bệnh lao (TB), khoảng 2 tỷ người bị nhiễm *M. tuberculosis*, dù không có triệu chứng. Khoảng 10% số ca này có nguy cơ phát triển TB hoạt tính trong suốt cuộc đời họ. Dịch bệnh TB toàn cầu bùng phát bởi sự nhiễm TB ở các bệnh nhân HIV và sự phát sinh các chủng TB kháng đa thuốc (MDR-TB). Sự tái hoạt hóa TB tiềm ẩn là yếu tố nguy cơ cao để phát triển bệnh và chiếm 32% số ca tử vong ở các đối tượng nhiễm HIV. Để kiểm soát dịch bệnh TB, cần phát hiện các thuốc mới có thể tiêu diệt trực khuẩn không hoạt động hoặc tiềm ẩn. TB không hoạt động có thể được tái hoạt hóa để gây bệnh bởi một vài yếu tố như sự ức chế tính miễn dịch của vật chủ bằng cách sử dụng các chất ức chế miễn dịch như kháng thể kháng yếu tố hoại tử α hoặc interferon- γ . Trong trường hợp của các bệnh nhân dương tính với HIV, điều trị dự phòng duy nhất khả dụng đối với TB tiềm ẩn là hai chế độ ba tháng rifampixin, pyrazinamid. Hiệu quả của chế độ điều trị này vẫn chưa rõ ràng và ngoài ra thời gian điều trị là ràng buộc quan trọng trong các môi trường có tài nguyên giới hạn. Do đó, rất cần nhận dạng các thuốc mới, chúng có thể đóng vai trò chất hóa dự phòng đối với các đối tượng mang trực khuẩn TB tiềm ẩn.

Trực khuẩn lao đi vào các đối tượng khỏe mạnh do hít phải; chúng bị thực bào bởi các đại thực bào trong phế nang của phổi. Điều này dẫn đến đáp ứng miễn dịch hiệu nghiệm và sự tạo thành các u hạt, gồm các đại thực bào bị nhiễm *M. tuberculosis* bao quanh bởi các tế bào T. Sau khoảng thời gian 6-8 tuần, đáp ứng miễn dịch của vật chủ gây chế các tế bào bị nhiễm do sự hoại tử và sự tích tụ chất bã có trực khuẩn ngoại bào nhất định, bao quanh bởi các đại thực bào, các tế bào dạng biểu mô và các lớp mô lympho ở ngoại vi. Trong trường hợp của các đối tượng khỏe mạnh, hầu hết mycobacteria bị tiêu diệt trong các môi trường này nhưng tỷ lệ nhỏ trực khuẩn vẫn sống sót và được cho là tồn tại ở trạng thái không sao chép, giảm chuyển hóa và chống chịu khả năng tiêu diệt bởi các thuốc kháng TB như isoniazid. Các trực khuẩn này có thể vẫn tồn tại trong các môi trường sinh lý biến đổi ngay cả trong suốt cuộc đời của đối tượng mà không biểu hiện triệu chứng lâm sàng bất kỳ của bệnh. Tuy nhiên, ở 10% số ca, các

trực khuẩn tiền ản này có thể tái hoạt hóa để gây bệnh. Một giả thuyết về sự phát triển của các vi khuẩn dai dẳng này là môi trường sinh lý bệnh trong các tổn thương của người, tức là áp lực oxy giảm, chất dinh dưỡng hạn chế và độ pH axit. Các yếu tố này được cho là khiến cho các vi khuẩn này có kiểu hình chịu được đa số thuốc kháng mycobacterium.

Ngoài việc kiểm soát dịch bệnh TB, nảy sinh vấn đề kháng các thuốc kháng sinh lựa chọn đầu tiên. Một số ví dụ quan trọng bao gồm *Streptococcus pneumoniae* kháng penicillin, enterococci kháng vancomycin, *Staphylococcus aureus* kháng methicillin, salmonellae kháng đa thuốc.

Hậu quả của sự kháng thuốc kháng sinh là nghiêm trọng. Các bệnh nhiễm trùng do vi khuẩn kháng thuốc không đáp ứng với điều trị, dẫn đến bệnh tật kéo dài và nguy cơ tử vong cao hơn. Các thất bại điều trị còn dẫn đến thời gian nhiễm trùng lâu hơn, làm gia tăng số người bị nhiễm trùng chuyển vào cộng đồng và do đó khiến cho dân cư nói chung có nguy cơ mắc bệnh nhiễm trùng kháng thuốc.

Bệnh viện là thành phần quan trọng của vấn đề kháng thuốc kháng sinh toàn cầu. Sự kết hợp của các bệnh nhân dễ mắc cao, việc sử dụng thuốc kháng sinh tăng liều và kéo dài, và sự nhiễm trùng chéo đã dẫn đến các bệnh nhiễm vi khuẩn gây bệnh kháng thuốc cao.

Việc tự điều trị bằng thuốc kháng sinh là yếu tố chính khác góp phần gây ra sự kháng thuốc. Việc tự điều trị bằng thuốc kháng sinh có thể không cần thiết, thường được định liều không thỏa đáng, hoặc không chứa lượng thỏa đáng hoạt chất.

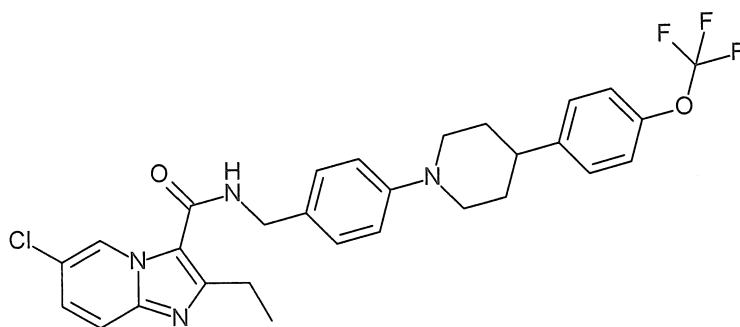
Sự tuân thủ của bệnh nhân đối với điều trị được khuyến cáo là vấn đề chính khác. Các bệnh nhân quên dùng thuốc, ngừng điều trị khi họ bắt đầu cảm thấy tốt hơn, hoặc có thể có thời gian đầy đủ, nhờ đó tạo thành môi trường lý tưởng cho vi khuẩn thích nghi thay vì bị tiêu diệt.

Do phát sinh sự kháng đa thuốc kháng sinh, các bác sỹ phải đối mặt với các bệnh nhiễm trùng mà chưa có liệu pháp hữu hiệu. Tỷ lệ mắc, tỷ lệ tử vong, và chi phí tài chính cho các bệnh nhiễm trùng như vậy đặt gánh nặng ngày càng tăng lên các hệ thống y tế trên toàn thế giới.

Do đó, rất cần có các liệu pháp mới để điều trị các bệnh nhiễm khuẩn, đặc biệt là các bệnh nhiễm mycobacterium.

Như được nêu trên đây, đã có một vài thuốc để điều trị bệnh lao, ví dụ, pyrazinamid (thường được viết tắt là PZA). Thuốc này được biết là ức chế vi khuẩn, nhưng cũng diệt khuẩn đối với vi khuẩn lao có hoạt tính sao chép. Nó không được sử dụng dưới dạng thuốc riêng rẽ, mà thường được sử dụng kết hợp với isoniazid và rifampixin để điều trị bệnh lao.

Có một vài thuốc đã biết khác được sử dụng để điều trị bệnh lao, có thể hoạt động nhờ các cơ chế tác động khác nhau. Ví dụ, bài tạp chí trong *Nature Medicine*, **19**, 1157-1160 (2013) của Pethe và các đồng tác giả “Discovery of Q203, a potent clinical candidate for the treatment of tuberculosis” nhận dạng hợp chất cụ thể được thử nghiệm kháng *M. tuberculosis*. Hợp chất này, Q203, được mô tả dưới đây.



Cho rằng nó hoạt động bằng cách ngăn cản ATP synthaza trong *M. tuberculosis*, và sự ức chế hoạt tính cytochrom *bc₁* là kiểu tác động cơ bản. Cytochrom *bc₁* là thành phần thiết yếu của chuỗi vận chuyển cần cho quá trình tổng hợp ATP.

Thuốc dự kiến lâm sàng này cũng được bàn luận trong bài tạp chí, *J. Medicinal Chemistry*, 2014, 57 (12), pp5293-5305. Nó được cho là có hoạt tính chống lại bệnh lao MDR, và có hoạt tính chống lại chủng *M. tuberculosis* H37Rv ở MIC₅₀ là 0.28 nM bên trong các đại thực bào. Số liệu đối chiếu dương tính (bằng cách sử dụng các hợp chất kháng TB đã biết bedaquilin, isoniazid và moxifloxacin) cũng được thông báo. Tài liệu này cũng gợi ý phương thức tác động, trên cơ sở nghiên cứu với các thể đột biến. rõ ràng rằng Q203 có hoạt tính cao chống lại cả vi khuẩn sao chép và vi khuẩn không sao chép.

Các tài liệu khác đề cập đến Q203 và các chất tương tự bao gồm các tài liệu sáng chế WO 2011/113606 và WO 2015/014993. Công bố đơn quốc tế số WO 2012/143796 bộc lộ các hợp chất để sử dụng trong điều trị viêm.

Các tài liệu khác bộc lộ các hợp chất có thể hữu ích trong việc ức chế hoạt tính cytochrom *bc₁* bao gồm Công bố đơn quốc tế các số WO 2017/001660 và WO 2017/001661, các tài liệu này được đưa vào trong bản mô tả này theo cách viện dẫn.

Như được nêu trên đây, sản phẩm kết hợp thuốc chống lao cũng được biến đến, với một số sản phẩm kết hợp được WHO khuyến cáo sử dụng. Các liệu pháp kết hợp được mô tả trong một số tài liệu bao gồm WO 2015/107482, tài liệu này bộc lộ sản phẩm kết hợp thuốc chống lao bao gồm cụ thể phân tử vòng lớn, phân tử này được thử nghiệm kết hợp với: rifampixin và/hoặc ethambutol; amoxicillin và/hoặc ethionamid; và isoniazid và/hoặc rifampixin. Tài liệu này cũng bộc lộ rằng phân tử vòng lớn này có thể được kết hợp với nhiều thuốc khác, bao gồm pyrazinamid hoặc Q203, trong nhóm thuốc chống lao có thể có. Một số bài tạp chí còn bộc lộ các sản phẩm kết hợp thuốc chống lao, ví dụ *Nature Communications*, Lamprecht and co., 2016, 7, 12393, tài liệu này thử nghiệm, trong số các thuốc khác, Q203 kết hợp với thuốc chống lao khác như clofazamin và bedaquilin.

Rất có lợi nếu phát hiện các sản phẩm kết hợp mới và/hoặc các sản phẩm kết hợp thuốc đã biết tốt hơn với điều kiện: - sản phẩm kết hợp có thể vẫn giữ nguyên tác điều trị (ví dụ, các dạng vi khuẩn kháng thuốc đã cho); và – việc tiếp cận các sản phẩm kết hợp tốt nhất cuối cùng sẽ cải thiện kết quả ở bệnh nhân.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Đã phát hiện ra rằng một số sản phẩm kết hợp, để sử dụng trong điều trị bệnh lao, được phát hiện là đặc biệt hữu hiệu (như được mô tả sau đây trong các kết quả sinh học). Các sản phẩm kết hợp như vậy được phát hiện là hiệp đồng và do đó được bao hàm trong phạm vi của sáng chế. Nói chung, thấy rằng việc kết hợp pyrazinamid (PZA) và chất ức chế cytochrom *bc₁* (ví dụ, Q203, như được xác định trên đây, hoặc chất khác, như được mô tả trong bản mô tả này) dẫn đến các hoạt tính vô cùng hiệu nghiệm trong việc tiêu diệt *Mycobacterium tuberculosis*.

Do đó, theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất:

- sản phẩm kết hợp bao gồm:
 - (i) PZA, hoặc muối được dụng của nó; và
 - (ii) Chất ức chế cytochrom *bc₁*, hoặc muối được dụng của nó,

sản phẩm kết hợp này có thể gọi là “sản phẩm kết hợp theo sáng chế”.

Dựa vào các kết quả quan sát được với sản phẩm kết hợp gồm PZA và chất ức chế cytochrom bc_1 , về hoạt tính hiệu nghiệm, sáng chế cũng đề xuất:

- sản phẩm kết hợp gồm có (ví dụ, về cơ bản gồm có) các hoạt chất sau:
 - (i) PZA, hoặc muối được dụng của nó; và
 - (ii) Chất ức chế cytochrom bc_1 , hoặc muối được dụng của nó,

sản phẩm kết hợp này cũng có thể gọi là “sản phẩm kết hợp theo sáng chế”.

Các sản phẩm kết hợp như vậy theo sáng chế là hữu ích làm thuốc. Ví dụ, các sản phẩm kết hợp như vậy có thể cụ thể là hữu ích trong điều trị bệnh nhiễm mycobacterium (đặc biệt là *Mycobacterium tuberculosis*, which cũng có thể gọi là “tuberculosis” trong bản mô tả này). Nhằm mục đích của sáng chế, tuberculosis có nghĩa là dạng tuberculosis bất kỳ như dạng hoạt tính hoặc dạng tiềm ẩn. Dạng tiềm ẩn (hoặc không hoạt động) được chi tiết hóa dưới đây. Dạng này cũng có thể bao gồm dạng kháng thuốc của tuberculosis (ví dụ, dạng kháng đa thuốc, dạng MDR, bao gồm dạng kháng đa thuốc mở rộng). Sản phẩm kết hợp theo sáng chế có thể được cho là có hiệu quả chống lại MDR tuberculosis mặc dù MDR chỉ tính kháng do vi khuẩn kháng ít nhất isoniazid và rifampixin (kháng hoặc không kháng các thuốc khác), và do đó pyrazinamid (PZA) và Q203 (là ví dụ về chất ức chế cytochrom bc_1), và do đó sản phẩm kết hợp theo sáng chế, do đó có thể vẫn hữu ích trong điều trị MDR tuberculosis.

Tuy nhiên, mặc dù cho rằng chỉ hai thuốc của sản phẩm kết hợp này có thể là đủ (ví dụ, đủ hiệu nghiệm), các sản phẩm kết hợp như vậy theo sáng chế có thể còn bao gồm các thuốc kháng khuẩn bổ sung (ví dụ, kháng tuberculosis). Ví dụ, một hoặc nhiều (ví dụ, một hoặc hai) chất kháng khuẩn sau (ví dụ, kháng tuberculosis) (hoặc các muối được dụng của chúng) có thể được nêu ngoài hai thuốc thiết yếu (ví dụ, để tạo ra sản phẩm kết hợp bộ ba hoặc bộ bốn, v.v.):

- các thuốc kháng khuẩn khác được biết là ngăn cản chuỗi hô hấp của *Mycobacterium tuberculosis*, bao gồm ví dụ các chất ức chế trực tiếp ATP synthase (ví dụ, bedaquilin, ví dụ, bedaquilin fumarat, hoặc các hợp chất khác bất kỳ có thể đã được bộc lộ trong tình trạng kỹ thuật), các chất ức chế $ndh2$ (ví dụ, clofazimin);

- các thuốc kháng khuẩn khác mà có thể hướng đích chuỗi vận chuyển electron, ví dụ, hướng đích cytochrom bd oxidaza (ví dụ, Các chất tương tự Aurachin D);
- các thuốc mycobacterium khác ví dụ rifampixin (=rifampin); isoniazid; pyrazinamid; amikacin; ethionamid; ethambutol; streptomycin; axit para-aminosalicylic; cycloserin; capreomycin; kanamycin; thioaxetazon; PA-824; delamanid; quinolon/floquinolon (như ví dụ moxifloxacin, gatifloxacin, ofloxacin, ciprofloxacin, sparfloxacin); phân tử vòng lớn (như ví dụ claritromycin, amoxycillin với axit clavulanic); rifamycin; rifabutin; rifapentin; cũng như các thuốc khác, mà hiện đang được phát triển (nhưng chưa thể đưa ra thị trường; xem, ví dụ, <http://www.newtbdrugs.org/pipeline.php>), ví dụ, delamanid, pretonamid và dạng tương tự.

Chất ức chế cytochrom bc_1 , được đề cập đến trong bản mô tả này, và có thể được đề cập cụ thể là hợp chất ức chế cytochrom bc_1 trong ETC của *Mycobacterium tuberculosis*, nhờ đó ngăn cản quá trình tổng hợp ATP dẫn đến ngăn không cho vi khuẩn này sao chép, hoặc tiêu diệt nó. Theo một phương án, sự ức chế cytochrom bc_1 bởi hợp chất như vậy là phương thức tác động nguyên thủy (chống lại *Mycobacterium tuberculosis*). “ức chế” trong ngữ cảnh này có nghĩa là hợp chất được chỉ ra là ức chế (cytochrom bc_1) hoặc được biết là ức chế, ví dụ, trong xét nghiệm hoặc thử nghiệm có liên quan, ví dụ, như được mô tả sau đây. Ví dụ, hợp chất có thể được thử hoạt tính kháng khuẩn bằng thử nghiệm bất kỳ trong số các thử nghiệm được lý từ 1 đến 4 được mô tả dưới đây and, theo một phương án, được hiểu là nằm trong phạm vi của thuật ngữ “chất ức chế” trong ngữ cảnh này nếu hoạt tính kháng khuẩn được đo, ví dụ, nếu giá trị IC_{50} nhỏ hơn 10 μM (hoặc nếu giá trị pIC_{50} lớn hơn 5). Để định rõ một hợp chất có phải là chất ức chế cytochrom bc_1 hay không (hoạt động chủ yếu thông qua phương thức tác động đó), việc tạo các thể đột biến kháng hợp chất và tiếp theo xác định trình tự của toàn hệ gen có thể được thực hiện như được thực hiện bài tạp chí *Nature Medicine* viện dẫn trong bản mô tả này (tức là bài tạp chí *Nature Medicine*, **19**, 1157-1160 (2013) của Pethe và các đồng tác giả, nội dung của nó được đưa vào trong bản mô tả này theo cách viện dẫn, cụ thể là chi tiết được cung cấp xoay quanh việc xác nhận hợp chất là chất ức chế cytochrom bc_1). Ví dụ, các giá trị MIC_{50} có thể được thử nghiệm chống lại các chủng đột biến của *Mycobacterium tuberculosis*. Nếu các thể đột biến làm gia tăng MIC_{50} đối với hợp chất được thử nghiệm (ví dụ, gia tăng vài cấp khuếch đại, như tăng

gấp 10 lần hoặc 50 lần hoặc, theo một phương án, 100 lần hoặc cao hơn) nhưng vẫn miễn cảm với các thuốc chống lao khác hoặc thuốc chống lao chuẩn, tiếp theo hợp chất là “chất ức chế *bc_I*” khi đột biến này có mặt trong cấu trúc dưới phân tử cytochrom *b* (*qcrB*, còn gọi là Rv2196 của phức chất cytochrom *bc_I*). Phân tích trình tự (ví dụ, của *qcrB*) cũng có thể xác nhận rằng đột biến Thr313 thành alanin hoặc isoloxin gắn liền với tính kháng hợp chất được thử nghiệm, nhờ đó cũng xác nhận rằng hợp chất được thử nghiệm là “chất ức chế *bc_I*”. Hơn thế nữa, việc đưa đột biến Ala313 trở lại bằng tái tổ hợp tương đồng vào *Mycobacterium tuberculosis* gốc H37Rv có thể được thử nghiệm để xem liệu nó có mang lại tính kháng hợp chất được thử nghiệm hay không, điều này có thể còn chứng tỏ rằng đột biến thay thế này có thể dự trực tiếp và đặc hiệu vào cơ chế kháng, cũng xác nhận thêm rằng hợp chất được thử nghiệm là “chất ức chế *bc_I*”. Hợp chất bất kỳ hướng đích chuỗi hô hấp có thể ức chế hiệu nghiệm quá trình sản xuất ATP – và do đó chất ức chế cytochrom *bc_I* cũng có thể ngăn cản quá trình tổng hợp ATP, ví dụ, làm giảm mức ATP (ví dụ, ATP nội bào). Do đó, thử nghiệm thích hợp có thể được thực hiện để đo mức ATP nội bào (để xác định liệu hợp chất thử nghiệm có làm giảm mức ATP hay không) và (a) (các) thử nghiệm khác có thể được thực hiện sau đó để xác định, ví dụ, hợp chất liên quan liệu có hướng đích ATP synthaza hay không (ví dụ, bedaquilin là chất ức chế ATP synthaza) hoặc chất ức chế cytochrom *bc_I*, ví dụ, bằng cách thực hiện các thử nghiệm đột biến như được chỉ ra trên đây.

Hiện chưa có thử nghiệm enzym nào về “chất ức chế *bc_I*”, và sở dĩ như vậy là do phức chất *bcc* (thông tin thêm về phức chất này được tìm thấy tại <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4205543/>) được cho là tương tác trực tiếp với các enzym khác (để truyền electron) và hoạt động dưới dạng siêu phức.

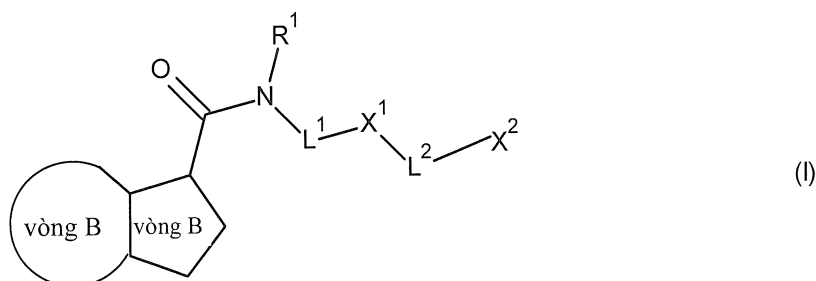
Theo một phương án, các chất ức chế *bc_I* cụ thể có thể được đề cập bao gồm:

Q203 (ví dụ, ở dạng không phải muối);

hợp chất bất kỳ trong số các hợp chất được bộc lộ trong các đơn sáng chế quốc tế WO 2011/113606 và WO 2015/014993, nội dung của hai tài liệu này được đưa vào trong bản mô tả này theo cách viện dẫn;

hợp chất bất kỳ trong số các hợp chất được bộc lộ trong các đơn sáng chế quốc tế WO 2017/001660 và WO 2017/001661, nội dung của hai tài liệu này được đưa vào trong bản mô tả này theo cách viện dẫn.

Ví dụ, chất ức chế cytochrom *bc*₁ có thể hợp chất có công thức chung sau (I):



ví dụ, trong đó:

vòng A là vòng thơm có 5 cạnh chứa một hoặc nhiều (ví dụ, một hoặc hai) nguyên tử khác loại (ví dụ, nitơ);

vòng B là vòng thơm có 6 cạnh chứa một hoặc nhiều (ví dụ, một hoặc hai) nguyên tử khác loại (ví dụ, nitơ);

vòng A và vòng B cùng nhau tạo thành hai vòng thơm dung hợp ở vị trí 6,5 chứa một đến bốn (ví dụ, 2 hoặc 3) nguyên tử khác loại (ví dụ, nguyên tử nitơ);

vòng A và vòng B tùy ý được thế bằng một hoặc nhiều phần tử thế được chọn từ X^a;

L¹ là nhóm liên kết tùy ý -C(R^a)(R^b)-;

R^a và R^b độc lập là H hoặc C₁₋₃ alkyl, hoặc được liên kết với nhau tạo thành vòng cacbon có 3 đến 5 cạnh;

X¹ là nhóm liên kết thơm tùy ý được thế bằng một hoặc nhiều phần tử thế được chọn từ X^b;

L² là vòng liên kết chứa nitơ (ví dụ, vòng đơn, vòng đôi hoặc vòng spiro ví dụ, như được mô tả trong bản mô tả này) tùy ý được thế bằng một hoặc nhiều phần tử thế được chọn từ X^c;

X² là -S(O)₂-Y¹, -C(O)-Y², -Y³ hoặc -O-Y⁴;

Y³ và Y⁴ độc lập là halo (ví dụ, flo; ví dụ, chỉ trong trường hợp của Y³), C₁₋₆ alkyl (tùy ý được thế bằng một hoặc nhiều nguyên tử flo; ví dụ, trong trường hợp của Y³ có thể

tạo thành nhóm vinylic, tức là $=C$ được gắn trực tiếp, và tùy ý được thế tiếp) hoặc nhóm thơm tùy ý được thế bằng một hoặc nhiều phần tử thế được chọn từ X^d ;

Y^1 và Y^2 độc lập là C_{1-6} alkyl (tùy ý được thế bằng một hoặc nhiều nguyên tử flo) hoặc nhóm thơm (tùy ý được thế bằng một hoặc nhiều phần tử thế được chọn từ X^e);

X^a , X^b , X^c , X^d và X^e độc lập là một hoặc nhiều phần tử thế độc lập được chọn từ halo (ví dụ, clo hoặc flo), $-CN$, C_{1-6} alkyl (tùy ý được thế bằng một hoặc nhiều phần tử thế được chọn từ flo và $-OC_{1-3}$ alkyl, trong đó chính nhóm alkyl đề cập sau có thể tùy ý được thế bằng một hoặc nhiều nguyên tử flo) và $-OC_{1-6}$ alkyl (tùy ý được thế bằng một hoặc nhiều nguyên tử flo). Để tránh nhầm lẫn, khi có hơn một phần tử thế X^a đến X^e có mặt (ví dụ, hai phần tử thế X^b trên gốc X^1), thì các phần tử thế X^b có thể giống hoặc khác nhau.

Theo một phương án, hợp chất có công thức (I) có thể là hợp chất trong đó:

khi X^2 là $-S(O)_2-Y^1$ hoặc $-C(O)-Y^2$, thì nhóm như vậy được gắn với nguyên tử khác loại (ví dụ, nguyên tử nitơ) của nhóm liên kết chứa nitơ L^2 (các ví dụ về nhóm L^2 có thể được mô tả dưới đây).

Theo một phương án, hợp chất có công thức (I) có thể là hợp chất trong đó:

L^1 là không có mặt; hoặc

L^1 là $-CH_2-$.

Theo một phương án, hợp chất có công thức (I) là hợp chất trong đó:

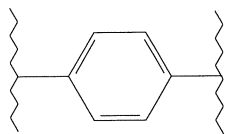
R^a và R^b độc lập là H hoặc C_{1-3} alkyl (và, theo một phương án, là H).

Theo một phương án, hợp chất có công thức (I) có thể là hợp chất trong đó:

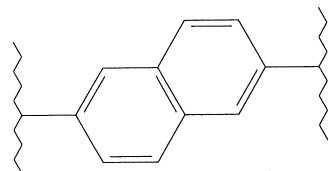
nhóm liên kết thơm X^1 là phenyl, naptyl hoặc nhóm heteraryl hai vòng dung hợp ở vị trí 6,6 hoặc 6,5 (chứa một đến ba, ví dụ, một hoặc hai, nguyên tử khác loại);

nhóm liên kết thơm X^1 là yếu tố liên kết dạng vòng cacbon (ví dụ, phenylen, naphtylen) hoặc dị vòng (ví dụ, hai vòng dung hợp ở vị trí 6,6 hoặc 6,5), do đó có thể là các nhóm sau (trong đó đường ngoặc thứ nhất là điểm gắn với gốc L^1):

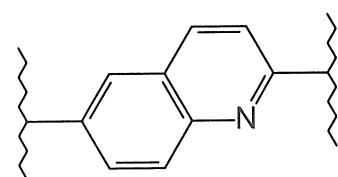
-phenylen- (đặc biệt là 1,4-phenylen), ví dụ:



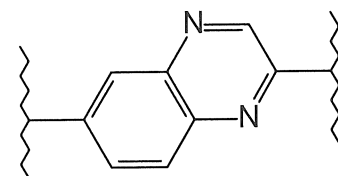
-naphtylen, ví dụ:



-quinolylen (như 2-quinolylen), ví dụ:



-quinoxaliny1 (như 2-quinolylen), ví dụ:



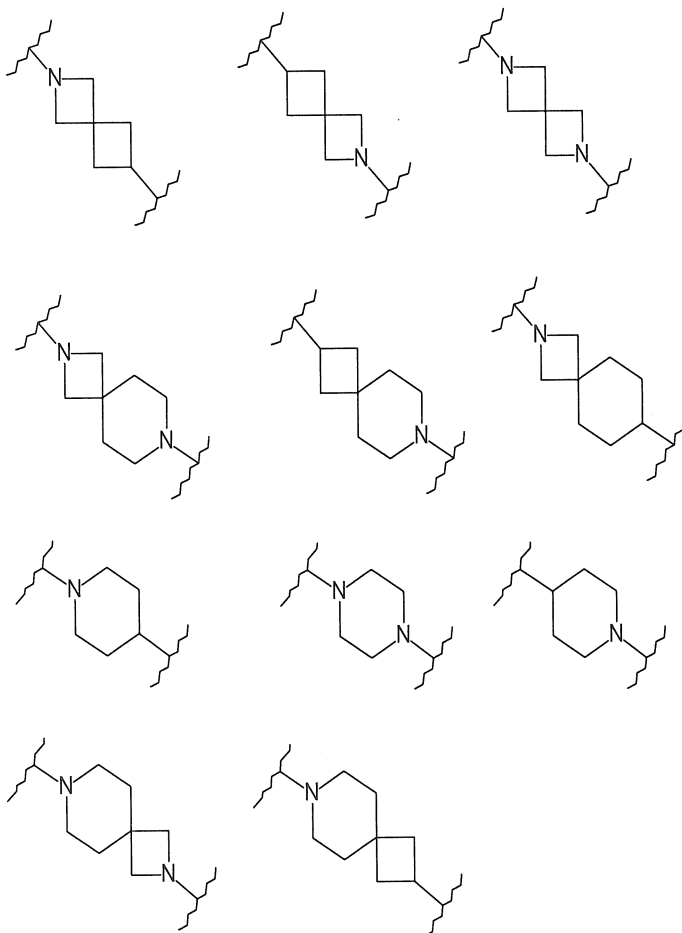
theo một phương án, gốc X^1 là nhóm liên kết thom vòng cacbon (ví dụ, phenylen hoặc naphtylen, ví dụ, như được mô tả trên đây); và/hoặc

theo một phương án, nhóm liên kết thom X^1 là không được thể (bằng phần tử thể X^b có thể có).

Theo một phương án, hợp chất có công thức (I) có thể là hợp chất trong đó:

nhóm liên kết chứa nitơ L^2 là vòng chứa nitơ có 3 đến 8 cạnh (ví dụ, 4 đến 6 cạnh), ví dụ, trong đó nguyên tử nitơ liên kết trực tiếp với X^1 , và trong đó vòng nitơ có thể tạo thành một phần của vòng khác (ví dụ, vòng khác có 3 đến 8 cạnh hoặc 4 đến 6 cạnh), để tạo thành, ví dụ, vòng spiro hoặc vòng dung hợp;

các nhóm L^2 sau có thể được đề cập cụ thể trong bản mô tả này (trong đó đường ngoặc trên là điểm gắn với X^1 và trong đó đường ngoặc dưới là điểm gắn với X^2):



; và/hoặc

nhóm (hoặc vòng) liên kết chứa nitơ L^2 là không được thế (bằng một hoặc nhiều phần tử thế được chọn từ X^c).

Theo một phương án, hợp chất có công thức (I) là hợp chất trong đó:

X^2 là $-Y^3$ hoặc $-O-Y^4$;

Y^3 và Y^4 độc lập là nhóm thiom phenyl, naptyl hoặc nhóm heteraryl hai vòng dung hợp ở vị trí 6,6 hoặc 6,5 (chứa một đến ba, ví dụ, một hoặc hai, nguyên tử khác loại), tất cả các nhóm này tùy ý được thế như được xác định trong bản mô tả này (ví dụ, Y^3 và Y^4 có thể là phenyl, tùy ý được thế, ví dụ, ở vị trí para, bằng X^d);

X^d là một hoặc nhiều (ví dụ, một) phần tử thế được chọn từ C_{1-3} alkyl và $-OC_{1-3}alkyl$ (cả hai gốc alkyl đề cập sau này đều tùy ý được thế bằng một hoặc nhiều nguyên tử flo, để tạo thành, ví dụ phần tử thế $-CF_3$ hoặc $-OCF_3$).

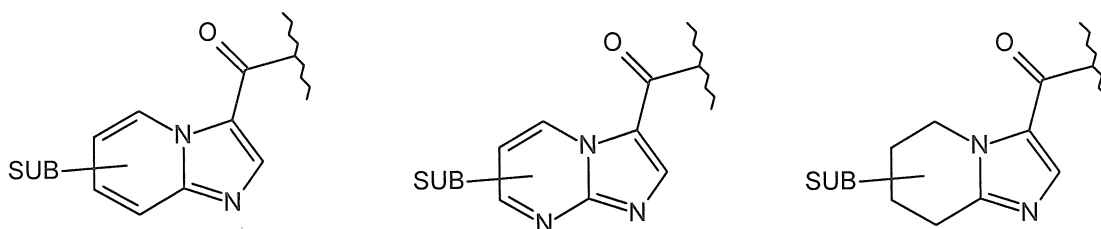
Theo một phương án, hợp chất có công thức (I) là hợp chất trong đó:

X^2 là $-S(O)_2-Y^1$ hoặc $-C(O)-Y^2$; và

theo một khía cạnh, Y^1 và Y^2 độc lập là C_{1-6} (ví dụ, C_{1-3}) alkyl tùy ý được thế bằng một hoặc nhiều nguyên tử flo (để tạo thành ví dụ, nhóm $-CF_3$); hoặc

theo khía cạnh khác, Y^1 và Y^2 độc lập là nhóm thơm (ví dụ, nhóm thơm vòng cacbon) tùy ý được thế như được xác định trong bản mô tả này (ví dụ, Y^1 và Y^2 có thể là phenyl tùy ý được thế bằng một hoặc nhiều phần tử thế X^e ; trong đó X^e có thể là C_{1-3} alkyl hoặc $-O-C_{1-3}$ alkyl, các gốc alkyl này tùy ý được thế bằng một hoặc nhiều nguyên tử flo, để tạo thành ví dụ, nhóm $-CF_3$).

Cụ thể, hợp chất có công thức I có thể chứa dạng vòng đôi sau được xác định bởi vòng A và vòng B:



trong đó “SUB” là một hoặc nhiều phần tử thế (như được xác định trong bản mô tả này) mỗi phần tử thế nằm tại vị trí bất kỳ trong số các vị trí khả dụng của một trong hai vòng của dạng vòng đôi; và

theo một phương án, vòng A và vòng B cùng nhau là cấu trúc thứ nhất được mô tả (imidazopyridin).

Cụ thể, chất ức chế cytochrom bc_1 là hợp chất đặc hiệu như được xác định trong bản mô tả này.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1 thể hiện mức đo CFU trong 14 nhóm nghiên cứu sau khi kết thúc điều trị, như được mô tả sau đây (11 nhóm nghiên cứu bao gồm các chế độ điều trị bao gồm BDQ, Q203, PZA, Cpd X hoặc các sản phẩm kết hợp của chúng, và 3 nhóm nghiên cứu là các nhóm đối chứng; để biết thêm chi tiết, xem các ví dụ dưới đây).

Mô tả chi tiết sáng chế

Các hoạt chất (ví dụ, thiết yếu là PZA và chất ức chế cytochrom bc_1 , và/hoặc các chất kháng khuẩn tùy ý khác) của sản phẩm kết hợp theo sáng chế cũng có thể ở dạng

muối được dụng. Các muối được dụng bao gồm muối cộng axit và muối cộng bazơ. Các muối như vậy có thể được tạo ra bằng các phương pháp thông thường, ví dụ, bằng phản ứng của dạng bazơ tự do của hoạt chất liên quan (ví dụ, PZA, chất ức chế cytochrom bc_1 hoặc chất kháng khuẩn tùy ý khác) với một hoặc nhiều đương lượng axit hoặc bazơ thích hợp, tùy ý trong dung môi, hoặc trong môi trường mà trong đó muối này không tan được, tiếp theo là loại bỏ dung môi nói trên, hoặc môi trường nói trên, bằng cách sử dụng các kỹ thuật chuẩn (ví dụ, *in vacuo*, sấy khô ở nhiệt độ thấp hoặc lọc). Muối cũng có thể được điều chế bằng cách trao đổi ion trái dấu của hợp chất theo sáng chế ở dạng muối với ion trái dấu khác, ví dụ bằng cách sử dụng nhựa trao đổi ion thích hợp.

Các muối cộng axit được dụng được đề cập trên đây có nghĩa là bao gồm các dạng muối cộng axit không độc có hoạt tính điều trị mà hoạt chất liên quan (ví dụ, PZA, chất ức chế cytochrom bc_1 hoặc chất kháng khuẩn tùy ý khác) có thể tạo thành. Các muối cộng axit được dụng này có thể thu được một cách thích hợp bằng cách xử lý dạng bazơ này bằng axit thích hợp như vậy. Các axit thích hợp bao gồm, ví dụ, axit vô cơ như các axit halohydric, ví dụ, axit clohydric hoặc axit bromhydric, axit sulfuric, axit nitric, axit phosphoric và axit tương tự; hoặc axit hữu cơ như, ví dụ, axit axetic, axit propanoic, axit hydroxyacetic, axit lactic, axit pyruvic, axit oxalic (tức là axit etandioic), axit malonic, axit succinic (tức là axit butandioic), axit maleic, axit fumaric, axit malic, axit tartaric, axit citric, axit metansulfonic, axit etansulfonic, axit benzensulfonic, axit *p*-toluensulfonic, axit xyclamic, axit salixylic, axit *p*-aminosalixylic, axit pamoic và axit tương tự.

Nhằm mục đích của sáng chế solvat, tiền dược chất, N-oxit và chất đồng phân lập thể của hoạt chất liên quan (ví dụ, PZA, chất ức chế cytochrom bc_1 hoặc chất kháng khuẩn tùy ý khác) cũng được bao gồm trong phạm vi của sáng chế.

Thuật ngữ “tiền dược chất” của hợp chất liên quan theo sáng chế bao gồm hợp chất bất kỳ mà, sau khi dùng qua đường miệng hoặc ngoài đường tiêu hóa, được chuyển hóa *in vivo* tạo thành hợp chất đó với lượng phát hiện được bằng thực nghiệm, và trong khoảng thời gian định trước (ví dụ, trong khoảng định liều từ 6 đến 24 giờ (tức là một đến bốn lần mỗi ngày)). Để tránh nhầm lẫn, thuật ngữ dùng “ngoài đường tiêu hóa” bao gồm tất cả các dạng dùng không phải dùng qua đường miệng.

Tiền dược chất của các hợp chất được đề cập trong bản mô tả này (ví dụ, có công thức (I)) có thể được điều chế bằng cách cải biến các nhóm chức có mặt trên hợp chất theo cách sao cho các cải biến này được cắt, *in vivo* khi tiền dược chất như vậy được dùng cho đối tượng là động vật có vú. Các cải biến thường đạt được bằng cách tổng hợp hợp chất gốc có phần tử thể tiền dược chất. Tiền dược chất bao gồm các hợp chất được đề cập trong bản mô tả này (ví dụ, có công thức (I)) trong đó nhóm hydroxyl, amino, sulfhydryl, carboxy hoặc cacbonyl trong hợp chất đó được liên kết với nhóm bất kỳ có thể được phân cắt *in vivo* để lần lượt tạo ra nhóm tự do hydroxyl, amino, sulfhydryl, carboxy hoặc cacbonyl.

Các ví dụ về tiền dược chất bao gồm, nhưng không giới hạn ở, este và carbamat có các nhóm chức hydroxy, các nhóm este có các nhóm chức carboxyl, các dẫn xuất N-axyl và các bazơ N-Mannich. Thông tin chung về tiền dược chất có thể được tìm thấy, ví dụ, trong Bundegaard, H. "Design of Prodrugs" p. 1-92, Elsevier, New York-Oxford (1985).

Các hợp chất có công thức (I) có thể chứa các liên kết đôi và do đó có thể tồn tại dưới dạng các chất đồng phân hình học *E* (*entgegen*) và *Z* (*zusammen*) quanh mỗi liên kết đôi riêng lẻ. Các chất đồng phân vị trí cũng có thể được bao hàm bởi các hợp chất có công thức (I). Tất cả các chất đồng phân như vậy (ví dụ, nếu hợp chất theo sáng chế hợp nhất liên kết đôi hoặc vòng dung hợp, thì các dạng *cis* và *trans* được bao hàm) và sản phẩm kết hợp của chúng được bao gồm trong phạm vi của sáng chế (ví dụ, các chất đồng phân vị trí riêng lẻ và hỗn hợp của các chất đồng phân vị trí có thể được bao gồm trong phạm vi của sáng chế).

Các hợp chất có công thức (I) cũng có thể có hiện tượng hõ biến. Tất cả các dạng hõ biến (hoặc tautome) và sản phẩm kết hợp của chúng được bao gồm trong phạm vi của sáng chế. Thuật ngữ "tautome" hoặc "dạng hõ biến" chỉ các chất đồng phân cấu trúc có các năng lượng khác nhau có thể chuyển hóa lẫn nhau nhờ rào năng lượng thấp. Ví dụ, các tautome proton (còn gọi là tautome dị biến proton) bao gồm chuyển hóa lẫn nhau nhờ sự di chuyển của một proton, như các đồng phân hóa keto-enol và imin-enamin. Các tautome hóa trị bao gồm chuyển hóa lẫn nhau bằng cách tổ chức lại một số electron liên kết.

Các hợp chất có công thức (I) có thể còn chứa một hoặc nhiều nguyên tử cacbon không đối xứng và có thể do đó có hiện tượng đồng phân quang học và/hoặc hiện tượng đồng phân không đối quang. Các đồng phân không đối quang có thể được tách bằng cách sử dụng các kỹ thuật thông thường, ví dụ, sắc ký hoặc kết tinh phân đoạn. Các đồng phân lập thể có thể được tách ra bằng cách tách hỗn hợp raxemic hoặc hỗn hợp khác của các hợp chất bằng cách sử dụng các kỹ thuật thông thường, ví dụ, kết tinh phân đoạn hoặc HPLC. Theo cách khác các chất đồng phân quang học mong muốn có thể được tạo ra bằng phản ứng của các nguyên liệu quang hoạt thích hợp trong các điều kiện mà sẽ không gây ra sự raxemic hóa hoặc sự epime hóa (tức là phương pháp ‘nguồn không đối xứng’), bằng phản ứng của nguyên liệu thích hợp với ‘nhóm phụ trợ không đối xứng’ mà tiếp theo có thể được loại bỏ ở giai đoạn thích hợp, bằng cách tạo dẫn xuất (tức là phân giải, bao gồm phân giải động lực), ví dụ với axit đồng bất đối tiếp theo là tách các dẫn xuất đồng phân không đối quang bằng các phương pháp thông thường như sắc ký, hoặc bằng phản ứng với chất phản ứng không đối xứng hoặc chất xúc tác không đối xứng thích hợp đều trong các điều kiện được chuyên gia trong lĩnh vực này biết rõ.

Tất cả các đồng phân lập thể (bao gồm nhưng không giới hạn ở đồng phân không đối quang, chất đồng phân đối ảnh và atropisome) và sản phẩm kết hợp của chúng (ví dụ, sản phẩm kết hợp raxemic) được bao gồm trong phạm vi của công thức (I).

Trong các cấu trúc được thể hiện trong bản mô tả này, khi hóa học lập thể của nguyên tử không đối xứng cụ thể bất kỳ không được chỉ rõ, thì tất cả các đồng phân lập thể đều được bao hàm và bao gồm dưới dạng các hợp chất có công thức (I). Khi hóa học lập thể được chỉ rõ bằng hình nêm in đậm hoặc đường đứt nét đại diện cho cấu hình cụ thể, thì đồng phân lập thể đó được coi là được chỉ rõ và được xác định.

Các hợp chất có công thức (I) có thể tồn tại ở dạng không solvat cũng như dạng solvat với các dung môi được dụng như nước, etanol, và dạng tương tự, và dự tính rằng cả dạng solvat và dạng không solvat đều được bao hàm.

Các hợp chất có công thức (I) cũng bao hàm các hợp chất được đánh dấu bằng đồng vị giống như các hợp chất được viện dẫn trong bản mô tả này, song một hoặc nhiều nguyên tử được thay bằng nguyên tử có khối lượng nguyên tử hoặc số khối khác

với khối lượng nguyên tử hoặc số khối thường được tìm thấy trong tự nhiên (hoặc nguyên tử phổ biến nhất được tìm thấy trong tự nhiên). Tất cả các đồng vị của nguyên tử hoặc nguyên tố cụ thể bất kỳ như được chỉ rõ trong bản mô tả này được bao hàm trong phạm vi của công thức (I). các đồng vị được lấy làm ví dụ có thể được hợp nhất vào các hợp chất có công thức (I) bao gồm các đồng vị của hydro, cacbon, nitơ, oxy, phospho, lưu huỳnh, flo, clo và iot, như ^2H , ^3H , ^{11}C , ^{13}C , ^{14}C , ^{13}N , ^{15}O , ^{17}O , ^{18}O , ^{32}P , ^{33}P , ^{35}S , ^{18}F , ^{36}Cl , ^{123}I , và ^{125}I . Một số hợp chất có công thức (I) được đánh dấu bằng đồng vị (ví dụ, các hợp chất được đánh dấu bằng ^3H và ^{14}C) là hữu ích trong hợp chất và cho các thử nghiệm phân bố cơ chất đến mô. Các đồng vị phân triti (^3H) và cacbon-14 (^{14}C) là hữu ích do chúng dễ điều chế và dễ phát hiện. Ngoài ra, việc thay thế bằng các đồng vị nặng hơn như đơteri (tức là, ^2H) có thể mang lại các lợi ích điều trị nhất định do độ bền chuyển hóa cao hơn (ví dụ, chu kỳ bán hủy *in vivo* gia tăng hoặc yêu cầu liều lượng giảm) và do đó có thể được ưu tiên trong một số trường hợp. Các đồng vị phát xạ positron như ^{15}O , ^{13}N , ^{11}C và ^{18}F là hữu ích cho các nghiên cứu chụp cắt lớp phát xạ positron (positron emission tomography: PET) để kiểm tra sự choán chỗ nhận cơ chất. Các hợp chất có công thức (I) được đánh dấu bằng đồng vị có thể thường được điều chế bằng các quy trình sau giống như các quy trình được bộc lộ trong phần Mô tả chi tiết sáng chế/Ví dụ thực hiện sáng chế dưới đây, bằng cách thay thế chất phản ứng được đánh dấu bằng đồng vị cho chất phản ứng không được đánh dấu bằng đồng vị.

Trừ khi có quy định khác, các nhóm C_{1-q} alkyl (trong đó q là giới hạn trên của phạm vi) được xác định trong bản mô tả này có thể là mạch thẳng hoặc, khi có số lượng thỏa đáng (tức là tối thiểu hai hoặc ba, nếu thích hợp) nguyên tử cacbon, là mạch nhánh, và/hoặc mạch vòng (để tạo thành nhóm C_{3-q} -xycloalkyl). Các nhóm xycloalkyl như vậy có thể dạng vòng đơn hoặc dạng vòng đôi và có thể còn được liên kết cầu. Ngoài ra, khi có số lượng thỏa đáng (tức là tối thiểu bốn) nguyên tử cacbon, các nhóm như vậy cũng có thể là dạng vòng một phần. Các nhóm alkyl như vậy cũng có thể là no hoặc, khi có số lượng thỏa đáng (tức là tối thiểu hai) nguyên tử cacbon, là không no (tạo thành, ví dụ, nhóm C_{2-q} alkenyl hoặc C_{2-q} alkynyl).

Thuật ngữ “halo”, khi được sử dụng trong bản mô tả này, tốt hơn là bao gồm flo, clo, brom và iodo.

Các nhóm thơm có thể là aryl hoặc heteroaryl. Khi chỉ rõ rằng các nhóm thơm là vòng cacbon, các nhóm như vậy cũng có thể được gọi là “aryl”. Các nhóm aryl có thể được đề cập bao gồm C₆₋₂₀, như C₆₋₁₂ (ví dụ, C₆₋₁₀) các nhóm aryl. Các nhóm như vậy có thể dạng vòng đơn, dạng vòng đôi hoặc vòng ba và có từ 6 đến 12 (ví dụ, 6 đến 10) vòng nguyên tử cacbon, trong đó ít nhất một vòng là thơm. C₆₋₁₀ các nhóm aryl bao gồm phenyl, naphthyl và dạng tương tự, như 1,2,3,4-tetrahydronaphthyl. Điểm gắn của các nhóm aryl có thể nhờ nguyên tử bất kỳ của hệ vòng. Ví dụ, khi nhóm aryl là đa vòng điểm gắn có thể nhờ nguyên tử bao gồm nguyên tử của vòng không thơm. Tuy nhiên, khi các nhóm aryl là đa vòng (ví dụ, dạng vòng đôi hoặc vòng ba), tốt hơn là chúng được liên kết với phần còn lại của phân tử nhờ vòng thơm. Các nhóm aryl được ưu tiên nhất có thể được đề cập trong bản mô tả này là “phenyl”.

Các nhóm dị vòng thơm cũng có thể được gọi là các nhóm “heteroaryl”, và khi được sử dụng trong bản mô tả này chỉ nhóm thơm chứa một hoặc nhiều nguyên tử khác loại (ví dụ, một đến bốn nguyên tử khác loại) tốt hơn là được chọn từ N, O và S. Các nhóm heteroaryl bao gồm các nhóm có từ 5 đến 20 cạnh (ví dụ, từ 5 đến 10 cạnh) và có thể là dạng vòng đơn, vòng đôi hoặc vòng ba, với điều kiện ít nhất một trong số các vòng này là thơm (để tạo thành, ví dụ, nhóm dị vòng thơm dạng vòng đơn, vòng đôi hoặc vòng ba). Khi nhóm heteroaryl là đa vòng điểm gắn có thể nhờ nguyên tử bất kỳ bao gồm nguyên tử của vòng không thơm. Tuy nhiên, khi các nhóm heteroaryl là đa vòng (ví dụ, dạng vòng đôi hoặc vòng ba), tốt hơn là chúng được liên kết với phần còn lại của phân tử *nhờ vòng thơm*. Cũng tốt hơn nếu mỗi vòng riêng lẻ, khi heteroaryl là đa vòng, là thơm. Các nhóm heteroaryl có thể được đề cập bao gồm 3,4-dihydro-1*H*-isoquinoliny, 1,3-dihydroisoindoly, 1,3-dihydroisoindoly (ví dụ, 3,4-dihydro-1*H*-isoquinolin-2-yl, 1,3-dihydroisoindol-2-yl, 1,3-dihydroisoindol-2-yl; tức là các nhóm heteroaryl được liên kết nhờ vòng không thơm), hoặc, tốt hơn là, acridiny, benzimidazolyl, benzodioxany, benzodioxepiny, benzodioxolyl (bao gồm 1,3-benzodioxolyl), benzofurany, benzofurazany, benzothiadiazolyl (bao gồm 2,1,3-benzothiadiazolyl), benzothiazolyl, benzoxadiazolyl (bao gồm 2,1,3-benzoxadiazolyl), benzoxaziny (bao gồm 3,4-dihydro-2*H*-1,4-benzoxaziny), benzoxazolyl, benzomorpholiny, benzoselenadiazolyl (bao gồm 2,1,3-benzoselenadiazolyl), benzothienyl, carbazolyl, chromany, cinnoliny, furany, imidazolyl, imidazo[1,2-*a*]-pyridyl, indazolyl, indoliny, indolyl, isobenzofurany, isochromany, isoindoliny,

isoindolyl, isoquinolyl, isothiazolyl, isothiochromanyl, isoxazolyl, naphthyridinyl (bao gồm 1,6-naphthyridinyl or, tốt hơn là, 1,5-naphthyridinyl và 1,8-naphthyridinyl), oxadiazolyl (bao gồm 1,2,3-oxadiazolyl, 1,2,4-oxadiazolyl và 1,3,4-oxadiazolyl), oxazolyl, phenazinyl, phenothiazinyl, phtalazinyl, pteridinyl, purinyl, pyranyl, pyrazinyl, pyrazolyl, pyridazinyl, pyridyl, pyrimidinyl, pyrrolyl, quinazolinyl, quinolyl, quinolizyl, quinoxalyl, tetrahydroisoquinolyl (bao gồm 1,2,3,4-tetrahydroisoquinolyl và 5,6,7,8-tetrahydroisoquinolyl), tetrahydroquinolyl (bao gồm 1,2,3,4-tetrahydroquinolyl và 5,6,7,8-tetrahydroquinolyl), tetrazolyl, thiadiazolyl (bao gồm 1,2,3-thiadiazolyl, 1,2,4-thiadiazolyl và 1,3,4-thiadiazolyl), thiazolyl, thiochromanyl, thiophenetyl, thienyl, triazolyl (bao gồm 1,2,3-triazolyl, 1,2,4-triazolyl và 1,3,4-triazolyl) và dạng tương tự. Phần tử thế trên các nhóm heteroaryl có thể, nếu thích hợp, nằm trên nguyên tử bất kỳ trong hệ vòng bao gồm nguyên tử khác loại. Điểm gắn của các nhóm heteroaryl có thể *nhờ nguyên tử bất kỳ* in hệ vòng bao gồm (nếu thích hợp) nguyên tử khác loại (như a nguyên tử nitơ), hoặc nguyên tử trên vòng cacbon dung hợp bất kỳ mà có thể có mặt dưới dạng một phần của hệ vòng. Các nhóm heteroaryl cũng có thể ở dạng *N*- hoặc *S*- oxy hóa. Các nhóm heteroaryl được đề cập trong bản mô tả này có thể được chỉ rõ là dạng vòng đơn hoặc dạng vòng đôi. Khi các nhóm heteroaryl là đa vòng trong đó có mặt vòng không thơm, thì vòng không thơm đó có thể được thế bằng một hoặc nhiều nhóm =O. Các nhóm heteroaryl được ưu tiên nhất có thể được đề cập trong bản mô tả này là các nhóm thơm có 5 hoặc 6 cạnh chứa 1, 2 hoặc 3 nguyên tử khác loại (ví dụ, tốt hơn là được chọn từ nitơ, oxy và lưu huỳnh).

Có thể chỉ rõ rằng nhóm heteroaryl là dạng vòng đơn hoặc dạng vòng đôi. Trong trường hợp khi chỉ rõ rằng heteroaryl là dạng vòng đôi, thì nó có thể gồm dạng vòng đơn có 5, 6 hoặc 7 cạnh (ví dụ, vòng heteroaryl dạng vòng đơn) dung hợp với vòng có 5, 6 hoặc 7 cạnh khác (ví dụ, vòng aryl hoặc heteroaryl dạng vòng đơn).

Nguyên tử khác loại có thể được đề cập bao gồm phospho, silic, bo và, tốt hơn là, oxy, nitơ và lưu huỳnh.

Khi các nhóm “thơm” được đề cập trong bản mô tả này, chúng có thể là aryl hoặc heteroaryl. Khi “các nhóm liên kết thơm” được đề cập trong bản mô tả này, chúng có thể là aryl hoặc heteroaryl, như được xác định trong bản mô tả này, là dạng vòng

đơn (hoặc, theo phương án khác, đa vòng) và được gắn với phần còn lại của phân tử nhờ các nguyên tử có thể có bất kỳ của nhóm liên kết đó. Tuy nhiên, khi, nhóm liên kết thom vòng cacbon cụ thể được đề cập, thì các nhóm thom như vậy có thể không chứa nguyên tử khác loại, tức là chúng có thể là aryl (mà không phải heteroaryl).

Để tránh nhầm lẫn, khi được đề cập trong bản mô tả này rằng nhóm có thể được thể bằng một hoặc nhiều phân tử thế (ví dụ, được chọn từ C₁₋₆ alkyl), thì các phân tử thế này (ví dụ, các nhóm alkyl) là độc lập với nhau. Tức là, các nhóm như vậy có thể được thể bằng cùng phân tử thế (ví dụ, cùng phân tử thế alkyl) hoặc phân tử thế khác (ví dụ, alkyl).

Tất cả các dấu hiệu riêng lẻ (ví dụ, các dấu hiệu ưu tiên) được đề cập trong bản mô tả này có thể được đưa vào một cách độc lập hoặc kết hợp với dấu hiệu khác bất kỳ (bao gồm dấu hiệu ưu tiên) được đề cập trong bản mô tả này (do đó, các dấu hiệu ưu tiên có thể được đưa vào kết hợp với các dấu hiệu ưu tiên khác, hoặc một cách độc lập giữa chúng).

Chuyên gia trong lĩnh vực này sẽ nhận thấy rằng các hợp chất có công thức (I) mà là đối tượng của sáng chế bao gồm các hợp chất ổn định. Tức là, các hợp chất có công thức (I) bao gồm các hợp chất đủ mạnh để chịu được việc tách ra khỏi, ví dụ, hỗn hợp phản ứng đến mức tinh khiết hữu ích.

Sản phẩm kết hợp theo sáng chế có thể hữu ích trong điều trị tuberculosis hoạt động và cũng có thể hữu ích trong điều trị tuberculosis tiềm ẩn hoặc không hoạt động. Sản phẩm kết hợp có thể có hiệu quả do có tác dụng kìm hãm vi khuẩn, nhưng cũng có thể có tác dụng diệt khuẩn. Đã chỉ ra rằng chúng cũng có thể hữu ích trong điều trị tuberculosis tiềm ẩn do sản phẩm kết hợp (hoặc một thành phần thiết yếu bất kỳ của sản phẩm kết hợp, ví dụ, chất ức chế *bc₁*, như Q203) có thể tác động bằng cách ngăn cản ATP synthaza, mà cũng có thể tác động đến tuberculosis tiềm ẩn trực khuẩn. Có lợi nếu sản phẩm kết hợp có hiệu quả chống lại tuberculosis hoạt động và cũng chống lại tuberculosis tiềm ẩn, ví dụ, có thể có tác động đến hoặc tiêu diệt tuberculosis tiềm ẩn trực khuẩn. Để kiểm soát dịch lao, điều quan trọng là tuberculosis tiềm ẩn có thể được tái hoạt hóa để gây ra tuberculosis hoạt động, và một số yếu tố có thể ảnh hưởng đến biến cố này, ví dụ, sự ức chế tính miễn dịch của vật chủ bằng cách sử dụng các chất ức chế miễn dịch (như kháng thể chống lại yếu tố hoại tử α hoặc interferon- γ). Liều của

sản phẩm kết hợp (và mỗi hoạt chất của sản phẩm kết hợp) có thể bị ảnh hưởng nếu nó được sử dụng để điều trị tuberculosis hoạt động hoặc tiềm ẩn.

Lượng của mỗi dược chất nên là lượng có hiệu quả tạo ra đáp ứng sinh học hoặc đáp ứng thuốc. Liều hằng ngày của dược chất có thể tất nhiên thay đổi theo các yếu tố như: - đã được phê chuẩn (ví dụ, bởi cơ quan quản lý thích hợp như EMA hoặc US FDA) các liều hằng ngày được khuyến cáo; - tác dụng của các liều thấp hơn các liều đã được phê chuẩn (hoặc đang được nghiên cứu trong các thử nghiệm lâm sàng); - khả năng dung nạp của bệnh nhân; - liều hằng ngày của dược chất (hoặc các dược chất) khác tạo thành một phần của sản phẩm kết hợp liên quan; - các tác dụng hiệp đồng bất kỳ giữa các thành phần của sản phẩm kết hợp; - cách dùng.

Liên quan đến liều, nói chung, các kết quả thỏa đáng sẽ thu được khi hợp chất liên quan của sản phẩm kết hợp theo sáng chế được dùng ở liều hằng ngày không vượt quá 1 hoặc 2 gam, ví dụ, nằm trong khoảng từ 1 đến 50 mg/kg hoặc nằm trong khoảng từ 10 đến 50 mg/kg thể trọng. Tuy nhiên, các liều có thể được điều chỉnh tùy theo tỷ lệ đáp ứng.

Các liều hằng ngày đối với PZA (hoặc muối được dụng của nó) có thể, ví dụ, nằm trong khoảng từ 15 đến 30 mg/kg (lên đến 2g), hoặc, chế độ định liều khác là từ 50 đến 75 mg/kg (lên đến 3g) hai lần/tuần. Do đó, các liều hằng ngày có thể giữa ví dụ, 500 mg và 2000 mg (ví dụ, khoảng 1000, khoảng 1500 hoặc khoảng 2000 mg).

Các liều hằng ngày đối với chất ức chế cytochrom *bc₁* (ví dụ, Q203, hoặc muối được dụng của nó) có thể, ví dụ, nằm trong khoảng từ 1,5 đến 15 mg/kg (lên đến 1g). Do đó các liều hằng ngày có thể ví dụ, giữa 50 mg và 1000 mg và, theo một phương án, có thể giữa 50 mg và 250 mg (ví dụ, khoảng 50, 75, 100, 150 hoặc 200 mg) hoặc theo phương án khác có thể giữa 50 mg và 800 mg (ví dụ, giữa 100 mg và 800 mg, ví dụ, khoảng 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700 hoặc 800 mg).

Các thuốc kháng khuẩn bổ sung tùy chọn mà có thể được bao gồm trong sản phẩm kết hợp theo sáng chế có thể được dùng ở các liều hằng ngày được khuyến cáo bởi cơ quan quản lý (khi ví dụ, được phê chuẩn kết hợp với các thuốc kháng khuẩn khác), và tốt hơn là được dùng ở liều hằng ngày không vượt quá 1 hoặc 2 gam, ví dụ, nằm trong khoảng từ 1 đến 50 mg/kg thể trọng (ví dụ, nằm trong khoảng từ 1 đến 25

mg/kg, nằm trong khoảng từ 1,5 đến 25 mg/kg, hoặc nằm trong khoảng từ 2 đến 15 mg/kg thể trọng).

Mặc dù sản phẩm kết hợp theo sáng chế được thấy là có lợi (ví dụ, hiệp đồng, như được lấy ví dụ trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế), thì các sản phẩm kết hợp như vậy được cho là có, theo một phương án, lợi điểm có thể ở chỗ ít (hoặc không) cần đến các thuốc kháng khuẩn (kháng tuberculosis) khác trong giai đoạn điều trị, và/hoặc, theo phương án khác, lợi điểm có thể ở chỗ các liều (ví dụ, các liều hằng ngày) của một trong hai thành phần thiết yếu của sản phẩm kết hợp (PZA hoặc chất ức chế cytochrom *bc₁*) và/hoặc chất kháng khuẩn tùy chọn bổ sung bất kỳ (như được xác định trong bản mô tả này) có thể nhỏ hơn dự tính (ví dụ, nhỏ hơn các liều có thể được khuyến cáo bởi cơ quan quản lý, khi dán nhãn để sử dụng kết hợp với chất kháng khuẩn khác như rifampin/isoniazid và/hoặc ethambutol, hoặc nhỏ hơn liều được thử nghiệm trong các thử nghiệm lâm sàng). Do đó, các liều hằng ngày dự tính của PZA, hoặc muối được dụng của nó, có thể nằm trong khoảng từ 7,5 đến 15 mg/kg (lên đến 1g). Do đó, các liều hằng ngày có thể giữa ví dụ, 250 mg và 1000 mg (ví dụ, khoảng 250, 500, khoảng 750 hoặc khoảng 1000 mg). và các liều hằng ngày dự tính của chất ức chế cytochrom *bc₁* (ví dụ, Q203, hoặc muối được dụng của nó) có thể nằm trong khoảng từ 0,75 đến 7,5 mg/kg (lên đến 500 mg). Do đó các liều hằng ngày có thể ví dụ, giữa 25 mg và 500 mg và, theo một phương án, có thể là giữa 25 mg và 125 mg (ví dụ, khoảng 25, 50, 75 hoặc 100 mg).

Tất cả các lượng được đề cập trong bản mô tả này là chỉ dạng tự do (tức là dạng không phải muối). Các giá trị được cho dưới đây là các đương lượng dạng tự do, tức là, các lượng nếu như dạng tự do được dùng. Nếu các muối được dùng các lượng này cần được tính theo hàm của tỷ số phân tử lượng giữa muối và dạng tự do.

Các liều (ví dụ, các liều hằng ngày) được mô tả trong bản mô tả này được tính cho thể trọng trung bình được chỉ rõ, và cần được tính lại trong trường hợp của các ứng dụng cho khoa nhi, hoặc khi được sử dụng với các bệnh nhân có thể trọng hầu như khác nhau.

Thời gian điều trị đối với tuberculosis có thể lớn hơn một năm. Tuy nhiên, cho rằng thời gian điều trị có thể được làm giảm bằng cách sử dụng sản phẩm kết hợp theo sáng chế. Ví dụ, thời gian điều trị có thể 36 tuần hoặc ít hơn, ví dụ, 24 tuần hoặc ít hơn.

Theo một số phương án, thời gian điều trị có thể nhỏ hơn 20 tuần, ví dụ, 16 tuần hoặc ít hơn, hoặc, 12 tuần hoặc ít hơn.

Theo các khía cạnh, sáng chế đề xuất sản phẩm kết hợp theo sáng chế, như được mô tả trong bản mô tả này, để sử dụng làm thuốc hoặc dược phẩm. Các sản phẩm kết hợp như vậy có thể hữu ích trong điều trị bệnh do *Mycobacterial tuberculosis* gây ra (ví dụ, trong điều trị tuberculosis).

Do đó, sáng chế cũng đề xuất dược phẩm (hoặc chế phẩm dược) bao gồm chất mang dược dụng và, làm hoạt chất, lượng có tác dụng điều trị của sản phẩm kết hợp theo sáng chế. Các sản phẩm kết hợp như vậy có thể được điều chế thành dược phẩm như được mô tả sau đây.

Do đó, theo khía cạnh khác sáng chế đề xuất phương pháp điều trị bệnh nhân đau ốm do, hoặc có nguy cơ, bệnh do *Mycobacterial tuberculosis* gây ra (tuberculosis), phương pháp này bao gồm dùng lượng có tác dụng điều trị của sản phẩm kết hợp theo sáng chế hoặc dược phẩm theo sáng chế. Theo một phương án, bệnh nhân là người.

Theo các phương án khác, được mô tả là phương pháp điều trị như được xác định trong bản mô tả này trong đó phương pháp còn bao gồm khoảng thời gian điều trị như được xác định trong bản mô tả này (ví dụ, thời gian điều trị 36 tuần hoặc ít hơn, 24 tuần hoặc ít hơn hoặc, theo phương án cụ thể, khoảng thời gian điều trị 16 tuần hoặc ít hơn hoặc 12 tuần hoặc ít hơn). Theo cách khác, được đề xuất là sản phẩm kết hợp để sử dụng như được mô tả trong bản mô tả này, trong đó sử dụng là trong khoảng thời gian xác định (ví dụ, thời gian điều trị 36 tuần hoặc ít hơn, 24 tuần hoặc ít hơn hoặc, theo phương án cụ thể, khoảng thời gian điều trị 16 tuần hoặc ít hơn hoặc 12 tuần hoặc ít hơn).

Các thành phần hoặc các thuốc kháng khuẩn của sản phẩm kết hợp theo sáng chế (bao gồm hai thuốc kháng khuẩn thiết yếu của sản phẩm kết hợp và các thuốc tùy chọn khác) có thể được điều chế riêng rẽ (ví dụ, như được xác định trong bản mô tả này) hoặc có thể được điều chế cùng nhau để tạo thành, ví dụ, chế phẩm liều cố định. Chế phẩm đề cập sau này có thể có lợi về sự tuân thủ. Theo một số phương án, hai (hoặc tùy ý nhiều hơn) thuốc kháng khuẩn của sản phẩm kết hợp theo sáng chế có thể được dùng cùng nhau, theo các phương án khác các thuốc kháng khuẩn (của sản phẩm kết hợp) có thể được dùng tuần tự, trong khi theo các phương án khác nữa chúng có thể được dùng

hầu như đồng thời. Theo một số phương án đề cập sau, việc dùng là dùng tuân tự các thuốc kháng khuẩn trong vòng 30 phút hoặc ít hơn so với nhau, theo một số phương án 15 phút hoặc ít hơn so với nhau. Theo một số phương án, các thuốc kháng khuẩn được dùng một lần/ngày, hầu như đồng thời mỗi ngày. Ví dụ, các thuốc kháng khuẩn được dùng trong khoảng thời gian 4 giờ theo thời gian dùng ban đầu vào ngày thứ nhất, tức là, ± 2 giờ, hoặc ± 1 giờ, hoặc theo các phương án khác nữa ± 30 phút theo thời gian dùng ban đầu vào ngày thứ nhất.

Theo một số phương án, các thuốc kháng khuẩn theo sáng chế được dùng dưới dạng riêng biệt là viên nang dùng qua đường miệng hoặc viên nén dùng qua đường miệng. Các chế phẩm khác có thể bao gồm các hệ phân tán rắn.

Do đó, khi sản phẩm kết hợp được đề cập trong bản mô tả này, sản phẩm kết hợp như vậy có thể là chế phẩm duy nhất bao gồm tất cả các thuốc kháng khuẩn của sản phẩm kết hợp theo sáng chế (tức là hai thuốc thiết yếu được đề cập trong bản mô tả này và, tùy ý, một hoặc nhiều thuốc kháng khuẩn bổ sung) hoặc nó có thể là sản phẩm kết hợp (như kit nhiều phần) trong đó mỗi thuốc kháng khuẩn của sản phẩm kết hợp theo sáng chế có thể đóng gói cùng nhau dưới các dạng riêng biệt (mỗi dạng bao gồm một trong số các thuốc kháng khuẩn) hoặc dưới hai hoặc nhiều dạng (tùy theo tổng số lượng các thuốc kháng khuẩn trong sản phẩm kết hợp theo sáng chế). Theo một phương án, mỗi thuốc kháng khuẩn của sản phẩm kết hợp theo sáng chế được điều chế riêng biệt và/hoặc cũng được đóng gói riêng biệt nhưng có thể được dán nhãn để sử dụng kết hợp với một hoặc nhiều thuốc kháng khuẩn khác của sản phẩm kết hợp theo sáng chế. Các thuốc kháng khuẩn của sản phẩm kết hợp (như được mô tả trong bản mô tả này) có thể được dùng cùng nhau, được dùng tuân tự, hoặc được dùng hầu như đồng thời. Do đó các dạng liều riêng lẻ của mỗi thuốc kháng khuẩn có thể được dùng dưới các dạng riêng biệt (ví dụ, dưới dạng viên nén hoặc viên nang riêng biệt) như được mô tả trong bản mô tả này or, theo các phương án khác, có thể được dùng dưới dạng duy nhất chứa cả ba hoạt chất hoặc dưới hai dạng (một dạng chứa hai hoạt chất bất kỳ trong số các hoạt chất này và dạng kia chứa hoạt chất còn lại).

Các thuốc kháng khuẩn của sản phẩm kết hợp theo sáng chế có thể được điều chế thành các dạng dược phẩm khác nhau cho các mục đích dùng. Như được đề cập

trong bản mô tả này, việc điều chế này có thể được thực hiện trên thuốc kháng khuẩn riêng lẻ hoặc sản phẩm kết hợp của các thuốc kháng khuẩn tạo thành một phần của sản phẩm kết hợp theo sáng chế. Nếu thích hợp, các dược phẩm có thể bao gồm các dược phẩm thường được sử dụng cho các thuốc dùng toàn thân. Để điều chế dược phẩm, thuốc kháng khuẩn liên quan (hoặc sản phẩm kết hợp của các thuốc kháng khuẩn liên quan) được kết hợp bằng cách trộn nhuyển với chất mang dược dụng, chất mang này có thể ở các dạng khác nhau tùy theo dạng chế phẩm cần dùng. Các dược phẩm này cần ở dạng liều đơn vị thích hợp, cụ thể, để dùng qua đường miệng hoặc bằng cách tiêm ngoài đường tiêu hóa. Ví dụ, trong điều chế các dược phẩm ở dạng liều dùng qua đường miệng, môi trường được thông thường bất kỳ có thể được sử dụng như, ví dụ, nước, glycol, dầu, rượu và dạng tương tự trong trường hợp của các chế phẩm lỏng dùng qua đường miệng như huyền phù, xi rô, cốm ngọt, nhũ tương và dung dịch; hoặc các chất mang rắn như tinh bột, đường, cao lanh, chất pha loãng, chất làm trơn, chất liên kết, chất gây rã và dạng tương tự trong trường hợp của bột, viên tròn, viên nang và viên nén. Do dễ dùng, viên nén và viên nang là các dạng liều đơn vị dùng qua đường miệng có lợi nhất trong trường hợp này các chất mang dược rắn hiển nhiên được sử dụng. Đối với dược phẩm dùng ngoài đường tiêu hóa, chất mang sẽ thường bao gồm nước vô trùng, ít nhất trong phần lớn, mặc dù các thành phần khác, ví dụ, để hỗ trợ hòa tan, có thể được bao gồm. Dung dịch tiêm, ví dụ, có thể được điều chế trong đó chất mang bao gồm dung dịch nước muối, dung dịch glucoza hoặc hỗn hợp gồm nước muối và dung dịch glucoza. Huyền phù tiêm cũng có thể được điều chế trong trường hợp này các chất mang lỏng thích hợp, chất tạo huyền phù và dạng tương tự có thể được sử dụng. Cũng được bao gồm là các chế phẩm dạng rắn mà dự tính là được chuyển hóa, ngay trước khi sử dụng, thành các chế phẩm dạng lỏng.

Tùy theo cách dùng, dược phẩm sẽ tốt hơn là bao gồm từ 0,05 đến 99 % trọng lượng, tốt hơn là từ 0,1 đến 70 % trọng lượng, thậm chí tốt hơn là từ 0,1 đến 50 % trọng lượng (các) hoạt chất, và, từ 1 đến 99,95 % trọng lượng, tốt hơn là từ 30 đến 99,9 % trọng lượng, thậm chí tốt hơn là từ 50 đến 99,9 % trọng lượng chất mang dược dụng, tất cả các tỷ lệ phần trăm là trên cơ sở tổng trọng lượng của dược phẩm.

Dược phẩm bất kỳ được đề cập trong bản mô tả này (ví dụ, dược phẩm bao gồm một thuốc kháng khuẩn hoặc sản phẩm kết hợp của các thuốc kháng khuẩn của sản phẩm kết hợp theo sáng chế) có thể còn chứa các thành phần khác đã biết trong lĩnh vực

này, ví dụ, chất làm trơn, chất ổn định, chất đệm, chất nhũ hóa, chất điều chỉnh độ nhớt, chất hoạt động bề mặt, chất bảo quản, chất điều vị hoặc chất màu.

Đặc biệt có lợi nếu điều chế các dược phẩm nêu trên ở dạng liều đơn vị để dễ dùng và đồng nhất liều. Dạng liều đơn vị như được sử dụng trong bản mô tả này chỉ các đơn vị riêng biệt về mặt vật lý thích hợp làm các dạng liều đơn vị, mỗi đơn vị chứa lượng định trước của hoạt chất được tính để tạo ra tác dụng điều trị mong muốn gắn liền với chất mang dược cần có. Các ví dụ về các dạng liều đơn vị như vậy là viên nén (bao gồm viên nén được khía hoặc được bao), viên nang, viên tròn, gói bột, viên nhện, thuốc đạn, dung dịch hoặc huyền phù tiêm và dạng tương tự, và các dạng chia nhỏ của chúng.

Như được đề cập trên đây, sản phẩm kết hợp của các thuốc kháng khuẩn như được mô tả trong bản mô tả này có thể được dùng cùng nhau, được dùng tuần tự, hoặc được dùng hầu như đồng thời (như được mô tả trong bản mô tả này). Do đó các dạng liều riêng lẻ của mỗi thuốc kháng khuẩn có thể được dùng dưới các dạng riêng biệt (ví dụ, dưới dạng viên nén hoặc viên nang riêng biệt) như được mô tả trong bản mô tả này hoặc, theo phương án khác, có thể được dùng dưới dạng duy nhất chứa toàn bộ hoạt chất hoặc dưới dạng hai hoặc nhiều dạng (ví dụ, khi có ba thuốc kháng khuẩn, thì một dạng chứa hai thuốc bất kỳ và dạng kia chứa thuốc còn lại).

Sáng chế cũng đề xuất quy trình sản xuất dược phẩm như được xác định trong bản mô tả này bao gồm kết hợp bất kỳ một (hoặc hơn, ví dụ, hai hoạt chất thiết yếu và, tùy ý, các thuốc kháng khuẩn bổ sung như được xác định trong bản mô tả này) trong số các hoạt chất của sản phẩm kết hợp theo sáng chế, với một (hoặc nhiều) tá dược hoặc chất mang dược dụng.

Sáng chế cũng đề xuất quy trình sản xuất sản phẩm kết hợp như được xác định trong bản mô tả này bao gồm:

- kết hợp mỗi thành phần (ví dụ, dưới dạng các dược phẩm riêng rẽ) của sản phẩm kết hợp và đóng gói cùng nhau (ví dụ, dưới dạng kit nhiều phần) hoặc chỉ rõ rằng sử dụng dự tính là kết hợp (với các thành phần khác); và/hoặc
- kết hợp mỗi thành phần để sản xuất dược phẩm chứa các thành phần như vậy.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Điều chế chung

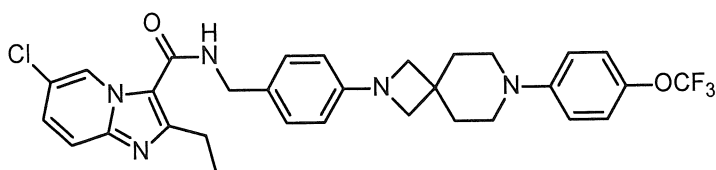
Các hợp chất theo sáng chế có thể thường được điều chế bằng một loạt các bước, mỗi bước có thể được chuyên gia trong lĩnh vực này biết rõ hoặc được mô tả trong bản mô tả này.

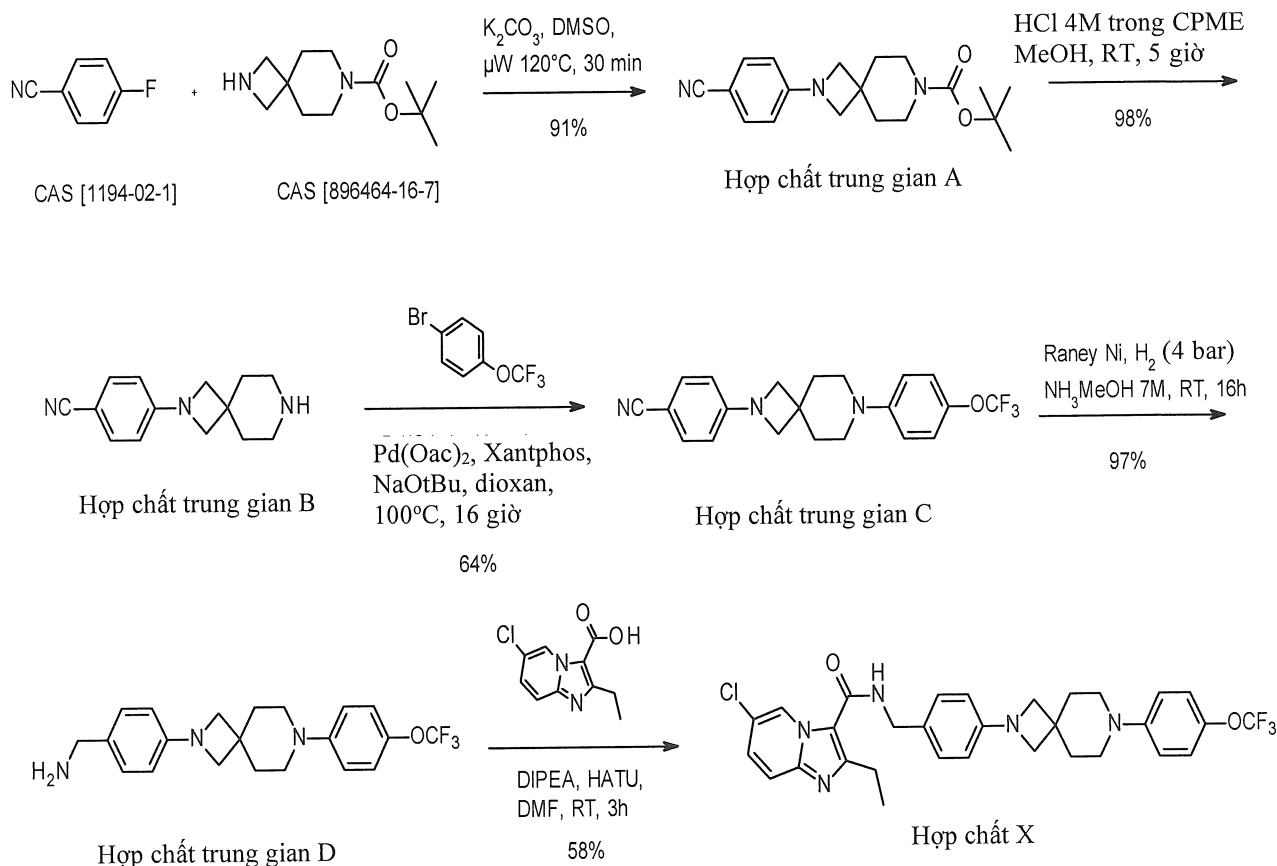
Phân thực nghiệm

Q203 có thể được điều chế theo các phương pháp được mô tả trong các tài liệu được đề cập trên đây, ví dụ, tài liệu sáng chế WO 2011/113606 và/hoặc bài tạp chí *J. Medicinal Chemistry*, 2014, 57 (12), pp5293-5305 hoặc *Nature Medicine*, **19**, 1157-1160 (2013) của Pethe và các đồng tác giả “Discovery of Q203, a potent clinical candidate for the treatment of tuberculosis”. Ví dụ, trong WO 2011/113606, hợp chất (289) ở trang 126 cung cấp số liệu xác định đối với Q203, và các phương pháp điều chế được mô tả ở các trang 17-30, trong *Nature Medicine*, việc tổng hợp hợp chất được mô tả trong phần kèm theo “Online Methods” cũng như trong ấn phẩm *J. Medicinal Chemistry* trong các phần thực nghiệm.

Các chất ức chế khác đối với hoạt tính cytochrom bc1, có thể là các chất được bộc lộ (và được điều chế bằng cách sử dụng các phương pháp được bộc lộ) trong các đơn sáng chế quốc tế WO 2017/001660 và WO 2017/001661, cả hai tài liệu này đều được đưa vào trong bản mô tả này theo cách viện dẫn.

Hợp chất X – là Hợp chất 28, như được mô tả trong WO 2017/001660, và được điều chế theo các quy trình được mô tả trong bản mô tả này.



Tổng hợp Hợp chất X**Điều chế hợp chất trung gian A**

Huyền phù gồm tert-butyl-2,7-diazaspiro[3.5]nonan-7-carboxylat (CAS [896464-16-7], 2,6 g, 11,49 mmol), 4-flobenzonitril (CAS [1194-02-1], 2,78 g, 22,98 mmol) và kali cacbonat (7,94 g, 57,44 mmol) trong DMSO (40 mL) được gia nhiệt ở 120 °C bằng cách sử dụng lò vi sóng kiểu đơn (Biotage Initiator60) với công suất đầu ra nằm trong khoảng từ 0 đến 400 W trong 30 phút [thời gian giữ cố định]. Hỗn hợp được pha loãng trong EtOAc, được rửa bằng nước (3x), nước muối (3x), được sấy khô trên MgSO₄, được lọc ra và được cho bay hơi. Sản phẩm thô này được tinh chế bằng LC điều chế (silica không đều, 15-40 μm, 24 g, Grace, nạp lỏng, gradien pha động: Heptan/EtOAc từ 90/10 đến 80/20). Các phân đoạn chứa sản phẩm được kết hợp và dung môi được loại bỏ in vacuo thu được 2,9 g hợp chất trung gian A dưới dạng chất rắn màu trắng (77%).

Điều chế hợp chất trung gian B

HCl 3M trong CPME (22,1 mL, 88,6 mmol) được bổ sung vào dung dịch chứa hợp chất trung gian A (2,9 g, 8,86 mmol) trong metanol (50 mL) ở 0 °C. Hỗn hợp thu

được được làm ấm đến nhiệt độ trong phòng và được khuấy trong 5 giờ. Dung dịch được cho bay hơi, phần cặn được được đồng sôi với MeOH (hai lần) thu được 4,22 g hợp chất thô. Chất thô này được tinh chế bằng LC điều chế (SiOH không đều, 15-40 μm , 40 g, Grace, nạp khô (silica), gradien pha động: từ DCM/MeOH/aqNH₃ 100/0/0 đến 90/10/1). Các phân đoạn chứa sản phẩm được kết hợp và dung môi được loại bỏ in vacuo thu được 1,25 g hợp chất trung gian B, dưới dạng chất rắn màu trắng (62%).

Điều chế hợp chất trung gian C

Trong bình Schlenck, hỗn hợp gồm hợp chất trung gian B (1 g, 4,40 mmol), 4-bromotriflometoxybenzen (CAS [407-14-7], 0,981 mL, 6,60 mmol) và natri t-butoxit (1,69 g, 17,6 mmol) trong 1,4-dioxan (70 mL) được loại khí bằng cách sục N₂ trong 10 phút trước khi bổ sung paladi axetat (0,099 g, 0,44 mmol) và Xantphos (0,255 g, 0,44 mmol). Hỗn hợp thu được được khuấy qua đêm ở 100 °C, tiếp theo được làm nguội xuống nhiệt độ trong phòng và được lọc qua đệm Celite®. Bánh được rửa bằng EtOAc và phần lọc được cho bay hơi đến khô. Phần cặn được hòa tan trong EtOAc và được rửa bằng nước muối (2x). Lọc hữu cơ được sấy khô trên MgSO₄, được lọc và được cô đến khô. Sản phẩm thô này được tinh chế bằng LC điều chế (Regular SiOH 15-40 μm , 24 g Grace, nạp khô (SiOH), gradien pha động: từ Heptan/EtOAc 95:5 đến 70:30). Các phân đoạn chứa sản phẩm được kết hợp và dung môi được loại bỏ in vacuo thu được 1,07 g hợp chất trung gian C dưới dạng chất rắn màu trắng nhạt (63%).

Điều chế hợp chất trung gian D

Trong nồi hấp, dung dịch chứa hợp chất trung gian C (3,73 g, 9,63 mmol) trong amoniac 7N trong MeOH (70 mL) được bổ sung Raney Nickel (2,45 g, 41,8 mmol) và hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ trong phòng ở áp suất H₂ 3 bar trong 3 giờ. Hỗn hợp được hấp thụ vào EtOAc và được lọc trên đệm Celite®, được rửa bằng EtOAc. Phần lọc được cho bay hơi in vacuo thu được 3,68 g hợp chất trung gian D dưới dạng chất rắn màu trắng nhạt (87%), được sử dụng dưới dạng như vậy cho bước tiếp theo.

Điều chế Hợp chất X

Diisopropyletylamin (1,74 mL, 10,2 mmol) và HATU (1,94 g, 5,10 mmol) lần lượt được bổ sung vào dung dịch chứa axit 6-clo-2-etylimidazo[1,2-a]pyridin-3-carboxylic (CAS [1216142-18-5], 0,8 g, 3,40 mmol) trong DMF (40 mL). Hỗn hợp thu được được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 20 phút, tiếp theo dung dịch chứa

hợp chất trung gian D (1,47 g, 3,74 mmol) trong DMF (1 mL) được bổ sung và hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 2 ngày. EtOAc, nước muối, dung dịch nước NaHCO_3 và nước được bổ sung, lớp nước được chiết bằng EtOAc (hai lần). Các lớp hữu cơ đã kết hợp được rửa bằng nước/nước muối (tỷ lệ 1/9; 4 lần), được sấy khô trên MgSO_4 , được lọc và được cô thu được hợp chất thô. Phần cặn được tinh chế bằng LC điều chế (SiOH không đều, 15-40 μm , 80 g Grace, nạp khô (trên SiOH), gradien pha động: từ Heptan/EtOAc: 70/30 đến 20/80). Các phân đoạn chứa sản phẩm được kết hợp và dung môi được loại bỏ in vacuo thu được 1,50 g dưới dạng chất rắn màu be. Chất rắn này được cho bay hơi cùng với EtOH (4 lần), được nghiền thành bột trong EtOH, được lọc ra và được rửa bằng EtOH (3 lần) thu được 1,18 g dưới dạng chất rắn màu trắng. Nó được sấy khô trong điều kiện chân không cao ở 50 °C trong 5 giờ thu được 1,17 g Hợp chất X dưới dạng chất rắn màu trắng (58%).

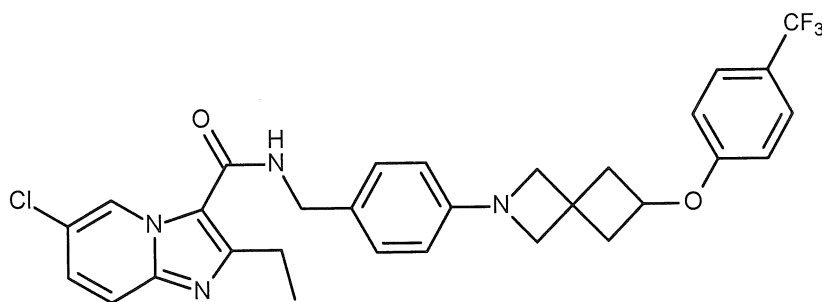
^1H NMR (500 MHz, DMSO-d_6) δ ppm 9,06 (d, $J=1,3$ Hz, 1 H) 8,39 (t, $J=5,8$ Hz, 1 H) 7,66 (d, $J=9,5$ Hz, 1 H) 7,45 (dd, $J=9,5, 2,2$ Hz, 1 H) 7,19 (br d, $J=8,5$ Hz, 2 H) 7,17 (br d, $J=8,8$ Hz, 2 H) 7,02 (d, $J=8$ Hz, 2 H) 6,42 (d, $J=8,5$ Hz, 2 H) 4,41 (d, $J=5,8$ Hz, 2 H) 3,57 (s, 4H) 3,17 - 3,19 (m, 4 H) 2,96 (q, $J=7,5$ Hz, 2 H) 1,79 - 1,89 (m, 4 H) 1,25 (t, $J=7,5$ Hz, 3 H)

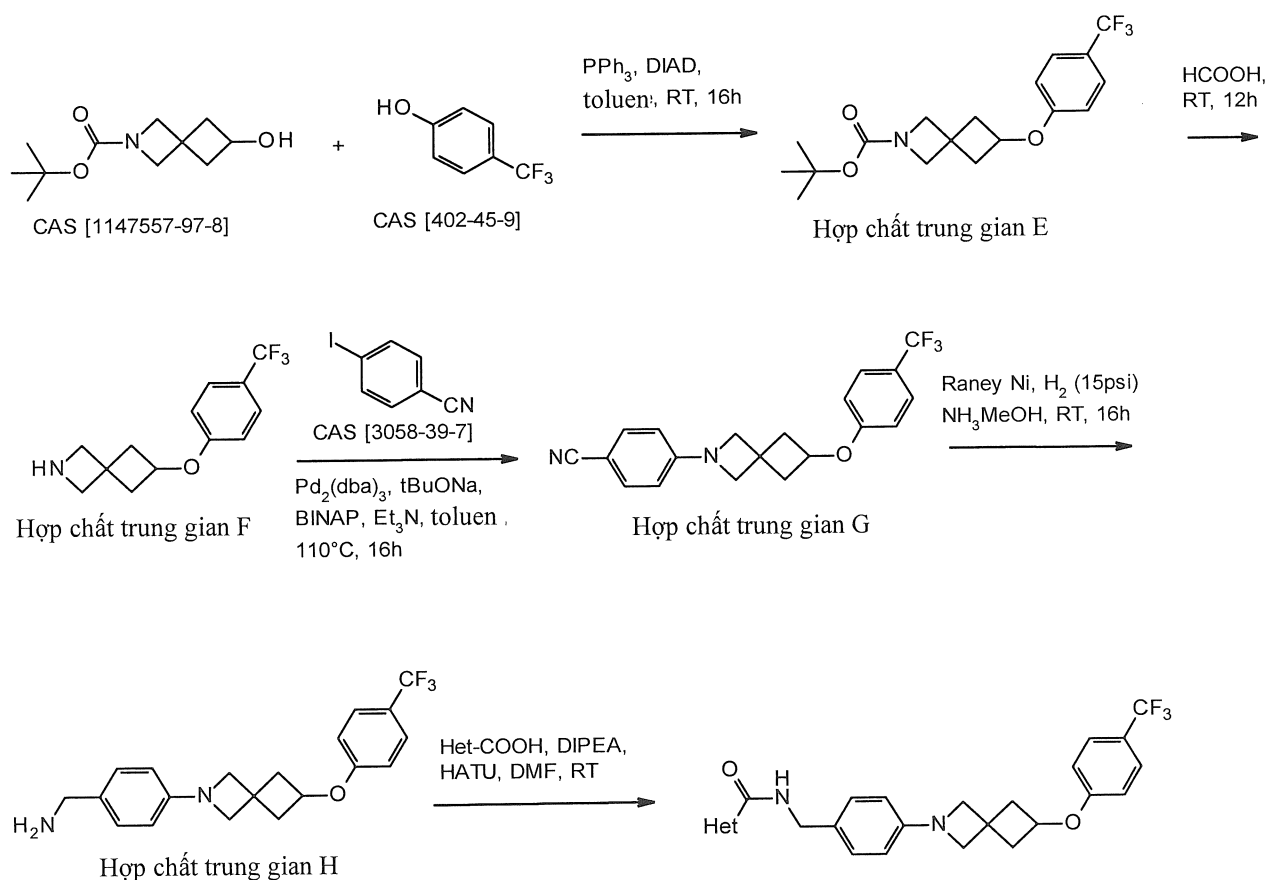
Điểm nóng chảy: 182,77 °C / -65,98 J/g (DSC: 25°C đến 350°C/10°Cmin/40 μl Al)

LC-MS: RT: 3,84, UV % diện tích: 98,23, MW: 597,20, BPM1: 598,6, BPM2: 596,4

Hợp chất Y

Hợp chất Y này được điều chế theo các quy trình được mô tả trong Công bố đơn quốc tế số WO 2017/001660 (xem Hợp chất 72):



Tổng hợp Hợp chất Y**Điều chế hợp chất trung gian E**

DIAD (1,40 g, 6,92 mmol) trong toluen (10 mL) được bổ sung vào dung dịch chứa tert-butyl 6-hydroxy-2-azaspiro[3.3]heptan-2-carboxylat (CAS [1147557-97-8], 1,2 g, 5,63 mmol), 4-(triflometyl)phenol (CAS [402-45-9], 1,10 g, 6,75 mmol), và triphenylphosphin (2,31 g, 8,80 mmol) trong toluen (40 mL) ở 0 °C dưới dòng N₂. Hỗn hợp được khuấy qua đêm ở nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp được cô. Sản phẩm thô này được tinh chế bằng sắc ký cột trên silicagel (ete dầu hỏa/etyl axetat từ 1/0 đến 3/1). Phân đoạn mong muốn được thu gom và được cô thu được hợp chất trung gian E, 2 g, 99%.

Điều chế hợp chất trung gian F

Hỗn hợp gồm hợp chất trung gian E (2 g, 5,60 mmol) trong axit formic (10 mL) được khuấy trong 12 giờ. Hỗn hợp được cô thu được hợp chất trung gian F, 1,4 g, 97%.

Điều chế hợp chất trung gian G

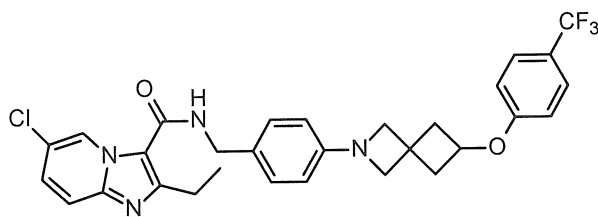
Dung dịch chứa hợp chất trung gian F (1,4 g, 5,44 mmol), 4-iodobenzonitril (CAS [3058-39-7], 0,99 g, 5,44 mmol), BINAP (0,203 g, 0,33 mmol), Pd₂(dba)₃ (0,1 g,

0,11 mmol), natri *tert*-butoxit (1,57 g, 16,33 mmol) và trietylamin (0,38 mL) trong toluen (50 mL) được khuấy qua đêm ở 110°C dưới dòng N₂. Hỗn hợp được cô. Phần cặn được hòa tan trong CH₂Cl₂ (100 mL) và nước (100 mL). Lớp hữu cơ được rửa bằng nước muối (100 mL), được sấy khô trên MgSO₄ và được lọc. Phần lọc được cô. Sản phẩm thô này được tinh chế bằng sắc ký cột trên silicagel (etyl axetat / ete dầu hỏa từ 0 đến 1/5). Phân đoạn mong muốn được thu và được cô thu được hợp chất trung gian G, 1,8 g, 92%.

Điều chế hợp chất trung gian H

Hỗn hợp gồm hợp chất trung gian G (0,2 g, 0,56 mmol) trong amoniac 7N trong metanol (20 mL) được hydro hóa bằng Raney Nickel (20 mg) dưới dạng chất xúc tác ở 25 °C (15 Psi) trong 16 giờ. Sau khi hấp thụ H₂, chất xúc tác được lọc ra và phần lọc được cô thu được hợp chất trung gian H, 0,2 g, 99%.

Điều chế Hợp chất Y



Hợp chất Y

Do đó, Hợp chất Y được điều chế bắt đầu từ axit 6-clo-2-etylimidazo[3,2-a]pyridin-3-carboxylic CAS [1216142-18-5] và hợp chất trung gian H (mà phản ứng liên hợp có thể được thực hiện trong điều kiện tiêu chuẩn, ví dụ, trong dung dịch DMF chứa axit carboxylic, HATU và diisopropylamin, hợp chất trung gian H có thể được bổ sung, được khuấy trong 2 giờ ở nhiệt độ trong phòng, và sản phẩm thu được có thể được tách/tinh chế bằng cách sử dụng các phương pháp chuẩn) thu được 0,035 g, 28%.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δppm 9,52 (s, 1 H) 7,53 (d, *J*=8,38 Hz, 3 H) 7,29 (dd, *J*=9,48, 1,98 Hz, 1 H) 7,23 (d, *J*=8,38 Hz, 2 H) 6,86 (d, *J*=8,82 Hz, 2 H) 6,46 (d, *J*=8,38 Hz, 2 H) 5,99 (br, s, 1 H) 4,64 - 4,70 (m, 1 H) 4,58 (d, *J*=5,29 Hz, 2 H) 3,95 (s, 2H) 3,90 (s, 2 H) 2,94 (q, *J*=7,50 Hz, 2 H) 2,80 (ddd, *J*=10,47, 6,95, 2,87 Hz, 2 H) 2,43(ddd, *J*=10,25, 6,73, 3,31 Hz, 2 H) 1,38 (t, *J*=7,50 Hz, 3 H)

Pyrazinamit (PZA) là thuốc cũ do đó cũng có thể sử dụng rộng rãi.

Ví dụ về được phẩm

Xác định MIC để thử nghiệm các hợp chất chống lại *M. tuberculosis*.

THỬ NGHIỆM 1

Các dung dịch thích hợp chứa hợp chất thử nghiệm và hợp chất tham chiếu được tạo ra trong các đĩa 96 lỗ chứa môi trường 7H9. Các mẫu chứa chủng *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv được lấy từ môi trường nuôi cấy ở pha sinh trưởng logarit. Trước hết, các mẫu này được pha loãng thu được mật độ quang 0,3 ở bước sóng 600 nm và tiếp theo được pha loãng 1/100, thu được nguyên liệu cấy khoảng 5×10^5 đơn vị tạo thành khuẩn lạc/lỗ. Các đĩa được ủ ở 37°C trong túi nhựa để ngừa bay hơi. Sau 7 ngày, resazurin được bổ sung vào tất cả các lỗ. Hai ngày sau, mức huỳnh quang được đo trên Gemini EM Microplate Reader với bước sóng kích thích 543 nm và bước sóng phát xạ 590 nm và các giá trị MIC₅₀ và/hoặc pIC₅₀ (hoặc dạng tương tự, ví dụ, IC₅₀, IC₉₀, pIC₉₀, v.v.) được tính.

THỬ NGHIỆM 2

Đĩa nhựa vi chuẩn độ 96 lỗ vô trùng, đáy tròn được nạp 100 µl canh trường Middlebrook (1x) 7H9. Tiếp theo, 100 µl môi trường nữa được bổ sung vào cột 2. Dung dịch gốc (200 x nồng độ thử nghiệm cuối) chứa các hợp chất được bổ sung theo 2 µl thể tích vào loại hai lỗ ở cột 2 để cho phép đánh giá các tác dụng của chúng đến sự sinh trưởng của vi khuẩn. Loạt pha loãng hai lần được thực hiện trực tiếp trong các đĩa vi chuẩn độ từ cột 2 đến 11 bằng cách sử dụng pipet nhiều kênh. Đầu pipet được thay sau mỗi 3 lần pha loãng để giảm thiểu sai số do dùng pipet với các hợp chất kỵ nước. Các mẫu đối chứng không xử lý có nguyên liệu cấy (cột 1) và không có nguyên liệu cấy (cột 12) được bao gồm trong mỗi đĩa vi chuẩn độ. Khoảng 10000 CFU/lỗ *Mycobacterium tuberculosis* (chủng H37RV), theo thể tích 100 µl trong canh trường Middlebrook (1x) 7H9, được bổ sung vào các hàng A đến H, ngoại trừ cột 12. Thể tích tương tự của canh trường không có nguyên liệu cấy được bổ sung vào cột 12 ở hàng A đến H. Các môi trường nuôi cấy được ủ ở 37°C trong 7 ngày trong không khí được giữ ẩm (thiết bị ủ có van lộ thiên và thông khí liên tục). Vào ngày 7, sự sinh trưởng của vi khuẩn được kiểm tra bằng mắt thường.

Nồng độ ức chế tối thiểu 90% (MIC₉₀) được xác định là nồng độ mà tại đó không quan sát thấy sự sinh trưởng của vi khuẩn.

THỬ NGHIỆM 3: Thử nghiệm diệt khuẩn theo thời gian

Hoạt tính diệt khuẩn hoặc kìm hãm vi khuẩn của các hợp chất có thể được xác định trong thử nghiệm diệt khuẩn theo thời gian bằng cách sử dụng phương pháp pha loãng canh trường. Trong thử nghiệm diệt khuẩn theo thời gian đối với *Mycobacterium tuberculosis* (chủng H37RV), nguyên liệu cấy *M. tuberculosis* là 10^6 CFU / ml trong canh trường Middlebrook (1x) 7H9. Các hợp chất kháng khuẩn được sử dụng ở nồng độ 0,1 đến 10 lần MIC₉₀. Các ống tiếp nhận chất không kháng khuẩn được dùng làm đối chứng sinh trưởng nuôi cấy. Các ống chứa vi sinh vật và hợp chất thử nghiệm được ủ ở 37 °C. Sau 0, 1, 4, 7, 14 và 21 ngày ủ, mẫu được lấy ra để xác định số đếm bằng mắt thường bằng cách pha loãng theo bậc (10^{-1} to 10^{-6}) trong môi trường Middlebrook 7H9 và cấy (100 µl) lên thạch Middlebrook 7H11. Các đĩa được ủ ở 37 °C trong 21 ngày và số lượng khuẩn lạc được xác định. Đường cong diệt khuẩn có thể được xây dựng bằng cách vẽ log₁₀CFU/ml theo thời gian. Tác dụng diệt khuẩn thường được xác định dưới dạng 3-log₁₀ giảm số lượng CFU/ml so với nguyên liệu cấy không được xử lý. Hiệu ứng kéo dài (carryover effect) có thể có của thuốc được loại bỏ bằng cách pha loãng theo bậc và đếm số lượng khuẩn lạc ở độ pha loãng cao nhất được sử dụng cho bước cấy.

THỬ NGHIỆM 4 (cũng xem thử nghiệm 1 trên đây; trong thử nghiệm này chủng khác với chủng *Mycobacterium tuberculosis* được sử dụng)

Các dung dịch thích hợp chứa hợp chất thử nghiệm và hợp chất tham chiếu được tạo ra trong các đĩa 96 lỗ chứa môi trường 7H9. Các mẫu chứa chủng *Mycobacterium tuberculosis* EH 4.0 (361.269) được lấy từ môi trường nuôi cấy ở pha sinh trưởng cân bằng. Các mẫu này trước hết được pha loãng thu được mật độ quang 0,3 ở bước sóng 600 nm và tiếp theo được pha loãng 1/100, thu được nguyên liệu cấy khoảng 5×10^5 đơn vị tạo thành khuẩn lạc/lỗ. Các đĩa được ủ ở 37°C trong túi nhựa để ngừa bay hơi. Sau 7 ngày, resazurin được bổ sung vào tất cả các lỗ. Hai ngày sau, mức huỳnh quang được đo trên Gemini EM Microplate Reader với bước sóng kích thích 543 nm và bước sóng phát xạ 590 nm và các giá trị MIC₅₀ và/hoặc pIC₅₀ (hoặc dạng tương tự, ví dụ, IC₅₀, IC₉₀, pIC₉₀, v.v.) được tính. Giá trị pIC₅₀ có thể được ghi lại dưới đây dưới dạng µg/mL.

Kết quả

Các hợp chất có thể / được thử nghiệm trong thử nghiệm 1, 2, 3 và/hoặc 4 được mô tả trên đây (trong phần “Ví dụ về dược phẩm”).

Ví dụ sinh học – kết hợp

Protocol

Các hợp chất được sử dụng là như sau:

- Bedaquilin – “BDQ”
- “các chất ức chế *bc₁*” sau: - Q203 - Cpd “X” (xem thực nghiệm)
- Pyrazinamid (PZA)

Thiết kế nghiên cứu

Có 14 nhóm nghiên cứu và 6 chuột nhất/nhóm

Nhóm nghiên cứu	Điều trị (hợp chất/liều tính bằng mg/kg)	Nồng độ chế phẩm
1	BDQ 3 mg/kg	0,3 mg/ml
2	Q203 20 mg/kg	2,0 mg/ml
3	Cpd X 20 mg/kg	2,0 mg/ml
4	PZA 150 mg/kg	15 mg/ml
5	BDQ 3 mg/kg + PZA 150 mg/kg	0,3 mg/ml + 15 mg/ml
6	Q203 20 mg/kg + PZA 150 mg/kg	2 mg/ml + 15 mg/ml
7	Cpd X 20 mg/kg + PZA 150 mg/kg	2 mg/ml + 15 mg/ml
8	BDQ 3 mg/kg + Q203 20 mg/kg	0,3 mg/ml + 2 mg/ml
9	BDQ 3 mg/kg + Cpd X 20 mg/kg	0,3 mg/ml + 2 mg/ml
10	BDQ 3 mg/kg + Q203 20 mg/kg + PZA 150 mg/kg	0,3 mg/ml + 2 mg/ml + 150 mg/ml
11	BDQ 3 mg/kg + Cpd X 20 mg/kg + PZA 150 mg/kg	0,3 mg/ml + 2 mg/ml + 150 mg/ml
12	Đối chứng C1 (ngày 1)	

13	Đối chứng C2 (ngày 12)	
14	Đối chứng C3 (ngày 41)	

Nói chung, như có thể thấy từ bảng trên đây, các liều sau của các hợp chất và nồng độ chế phẩm liên quan được đưa ra:

- bedaquilin (BDQ) – được dùng ở liều 3 mg/kg; nồng độ chế phẩm là 0,3 mg/ml
- “chất ức chế bc_1 ” Q203 hoặc Cpd X – mỗi chất được dùng ở liều 3 mg/kg; nồng độ chế phẩm là 2 mg/ml
- pyrazinamit (PZA) – được dùng ở liều 150 mg/kg; nồng độ chế phẩm là 150 mg/ml

Phương pháp

Tất cả các điều trị đều được đánh giá trên chủng thí nghiệm H37Rv.

Tất cả các chế phẩm đều được điều chế trong 20% HP-B-CD, và được sử dụng cho 5 lần điều trị (một tuần).

Đối với mỗi tuần định liều, chế phẩm mới được điều chế.

Tất cả các chế phẩm đều là dung dịch và được bảo quản ở 4°C trong quá trình nghiên cứu.

Độ ổn định của BDQ và Q203 trong chế phẩm đã được thử nghiệm trước đó, đối với PZA và Cpd X độ ổn định được thử nghiệm sau một tuần và được coi là chấp nhận được đối với cả hai hợp chất

Thời gian biểu, sau khi chuột được gây nhiễm

Đối chứng mổ khám xác 1	Ngày 1
Đối chứng mổ khám xác 2	Ngày 12
Điều trị ban đầu (đối với các nhóm không phải đối chứng)	Ngày 12
Điều trị cuối (đối với các nhóm không phải đối chứng)	Ngày 37
Đối chứng mổ khám xác 3	Ngày 41

Nhóm điều trị mổ khám xác	Ngày 41
---------------------------	---------

Chuột nhất được gây nhiễm bằng chủng *Mycobacterium tuberculosis*.

Chủng MTB mẫn cảm với thuốc H37Rv (chủng gốc 8) được làm tan bằng ở nhiệt độ môi trường và được pha loãng 13 lần trong PBS để tiêm cho chuột. Khi 0,2 mL dung dịch pha loãng này được tiêm, mỗi chuột tiếp nhận 10^6 vi khuẩn.

90 chuột (6 chuột bổ sung) Swiss ngoại phối cái 5 tuần tuổi, Charles River, được tiêm vào tĩnh mạch đuôi bằng 0,2 ml huyền phù vi khuẩn chứa $\pm 10^6$ đơn vị tạo thành khuẩn lạc (colony forming unit: CFU)

Lưu ý: do không có chuột chết trong giai đoạn nhiễm 12 ngày, nên 6 chuột nhất còn lại được sử dụng làm “Đối chứng mổ khám xác 3” (vào ngày 41).

Định liều (đối với các nhóm không phải đối chứng)

Bắt đầu định liều là vào ngày 12

Tất cả các nhóm đều được cân một lần/tuần và thể trọng trung bình/nhóm được sử dụng để tính thể tích liều.

Tất cả các chuột nhất đều được định liều qua đường miệng bằng 10 ml/kg chế phẩm thích hợp, ngoại trừ các nhóm đối chứng, các nhóm này không được điều trị.

Tất cả các nhóm đều được điều trị một lần/ngày (vào các ngày làm việc) trong 4 tuần liên tiếp (do đó, 5 lần/tuần, tổng cộng 20 liều/đợt điều trị).

Liều/đợt điều trị cuối được dùng vào ngày 37.

Giết mổ

Vào ngày 1 sau nhiễm, 6 chuột nhất đối chứng được giết mổ và phổi và lách được thu và được làm lạnh sâu ở -80°C .

Vào ngày 12 sau nhiễm, 6 chuột nhất đối chứng được giết mổ và phổi và lách được thu và được làm lạnh sâu ở -80°C .

Vào ngày 41, tất cả các con đối chứng và điều trị được giết mổ, phổi và lách được thu và được làm lạnh sâu ở -80°C .

Toàn bộ lách được cân, và bảo quản trong lọ cryo ở -80° dưới dạng cơ quan dự trữ.

Toàn bộ phổi được thu vào ống đồng nhất hóa.

Đánh giá bệnh nhiễm và điều trị

Mức độ nghiêm trọng của bệnh nhiễm và hiệu quả điều trị được đánh giá bằng cách đếm số lượng đơn vị tạo thành khuẩn lạc (CFU) trong phổi.

Phổi được làm tan và 2,5 ml PBS (+Ca/Mg) được bổ sung vào mỗi ống.

Phổi được làm đồng nhất và năm dung dịch pha loãng theo bậc 10 lần được tạo ra trong PBS (+Ca/Mg), 111 µl dịch đồng nhất + 1 ml PBS.

Từ mỗi phổi riêng lẻ, 200 µl huyền phù không được pha loãng và năm dung dịch pha loãng theo bậc 10 lần, được cấy lên đĩa thạch 7H11 (6 lỗ) chứa hỗn hợp gồm chất kháng sinh và chất kháng nấm để ngừa nhiễm bẩn.

CFU được đếm sau khi ủ ở 37°C trong 3 tuần.

Tác dụng diệt khuẩn của điều trị được xác định là sự giảm đáng kể số lượng CFU trung bình trong nhóm được điều trị so với giá trị trước điều trị.

Môi trường điều chế

Thạch 7H11 + 0,4% than hoạt tính + chất kháng sinh

* hòa tan 8,4 g thạch Middlebrook 7H11 (BD 283810) trong 360 ml Aqua dest. chứa 2,0 ml glyxerol (AnalaR NORMAPUR, 24388.295)

* bổ sung 0,4% hoặc 1,6 g than hoạt tính (SIGMA C9157)

* hấp ở 121°C trong 15 phút và làm lạnh xuống 55°C

* bổ sung 40 ml Middlebrook OADC Enrichment (BD 211886)

* giữ ở 55°C

* Bổ sung chất kháng sinh

Amphotericin B: bổ sung 4,0 ml dung dịch gốc 10 mg/ml trong nước (nồng độ cuối = 100 µg/ml)

Polymyxin B: bổ sung 0,4 ml dung dịch gốc 25 mg/ml trong nước (nồng độ cuối = 25 µg /ml)

Carbenecillin: bổ sung 0,4 ml dung dịch gốc 50 mg/ml trong nước (nồng độ cuối = 50 μg /ml)

Trimethoprim: bổ sung 0,4 ml dung dịch gốc 20 mg/ml trong DMSO (nồng độ cuối = 20 μg /ml)

- * dùng pipet lấy 4 ml dung dịch thạch/6 lỗ
- * cho kết tụ trong 45 phút trong Laminar Air Flow (có nắp nửa mở)
- * bảo quản ở 4°C cho đến khi sử dụng (trong tối đa 1 tháng)

Kết quả

Nhóm nghiên cứu	Điều trị (hợp chất/liều tính bằng mg/kg)	log10 trung bình	Độ lệch chuẩn
1	BDQ 3 mg/kg	4,46	0,49
2	Q203 20 mg/kg	4,55	0,08
3	Cpd X 20 mg/kg	4,75	0,22
4	PZA 150 mg/kg	3,47	0,45
5	BDQ 3 mg/kg + PZA 150 mg/kg	1,46	0,28
6	Q203 20 mg/kg + PZA 150 mg/kg	1,18	0,19
7	Cpd X 20 mg/kg + PZA 150 mg/kg	1,20	0,25
8	BDQ 3 mg/kg + Q203 20 mg/kg	4,29	0,25
9	BDQ 3 mg/kg + Cpd X 20 mg/kg	4,24	0,20
10	BDQ 3 mg/kg + Q203 20 mg/kg + PZA 150 mg/kg	1,10	0,00
11	BDQ 3 mg/kg + Cpd X 20 mg/kg + PZA 150 mg/kg	1,10	0,00
12	Đối chứng C1 (ngày 1)	4,82	0,51
13	Đối chứng C2 (ngày 12)	5,68	0,34
14	Đối chứng C3 (ngày 41)	6,00	0,48

Các kết quả trên đây có thể quan sát được khi tham chiếu đến Fig. 1, là hình vẽ thể hiện mỗi giá trị log10 trung bình đối với CFU của mỗi một trong 14 nhóm nghiên cứu. nó cũng cho thấy giá trị “ngưỡng” 1,10, mà về cơ bản là giá trị mà tại đó CFU (hoặc mức nhiễm khuẩn) thấp tới mức nó không thể đo được một cách chính xác, hoặc CFU thấp hơn mức phát hiện được.

Có thể thấy rằng, so với các nhóm đối chứng:

- việc dùng các chất đơn lẻ (bedaquilin riêng rẽ, chất ức chế bc_1 riêng rẽ, hoặc pyrazinamit riêng rẽ) dẫn đến log10 CFU trung bình vẫn tương đối cao, với pyrazinamit có các tác dụng tốt nhất bằng cách làm giảm đến log10 trung bình 3,47
- việc dùng sản phẩm kết hợp “kép” bedaquilin với chất ức chế bc_1 dẫn đến mức giảm log10 CFU trung bình không đáng kể (đến 4,29 và 4,24)
- việc dùng sản phẩm kết hợp “kép” với pyrazinamit cho mức giảm CFU bất ngờ, lớn hơn tác dụng cộng gộp đơn thuần; sản phẩm kết hợp “kép” với pyrazinamit thể hiện tác dụng hiệp đồng như có thể thấy rõ từ mức giảm log10 CFU trung bình; cụ thể, sản phẩm kết hợp “kép” gồm pyrazinamit và chất ức chế “ bc_1 ” (Q203 hoặc Cpd X) cho giá trị log10 trung bình thấp nhất, trong số tất cả các sản phẩm kết hợp kép được thử nghiệm
- khi các sản phẩm kết hợp kép hiệp đồng cao nhất (pyrazinamit + chất ức chế bc_1) được kết hợp thêm với bedaquilin, các sản phẩm kết hợp bộ ba này loại bỏ hữu hiệu tất cả các CFU phát hiện được ở chuột nhất đạt giá trị ngưỡng 1,10

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Sản phẩm kết hợp gồm có các hoạt chất sau:
 - (i) PZA, hoặc muối được dụng của nó; và
 - (ii) Chất ức chế cytochrom bc_1 , hoặc muối được dụng của nó.
2. Sản phẩm kết hợp theo điểm 1, trong đó chất ức chế cytochrom bc_1 là Q203, hoặc muối được dụng của nó.
3. Sản phẩm kết hợp theo điểm 1 hoặc 2, trong đó liều hằng ngày của PZA (hoặc muối được dụng của nó) nằm trong khoảng từ 15 đến 30 mg/kg (lên đến 2g).
4. Sản phẩm kết hợp theo điểm bất kỳ nêu trên, trong đó liều hằng ngày của chất ức chế cytochrom bc_1 (hoặc muối được dụng của nó) nằm trong khoảng từ 1,5 đến 15 mg/kg (lên đến 1g).
5. Dược phẩm chứa sản phẩm kết hợp theo điểm bất kỳ nêu trên, và tá dược hoặc chất pha loãng được dụng.
6. Dược phẩm theo điểm 5, trong đó chất ức chế cytochrom bc_1 là Q203, hoặc muối được dụng của nó.
7. Quy trình sản xuất dược phẩm theo điểm 5 hoặc 6 bao gồm kết hợp các hoạt chất của sản phẩm kết hợp với một (hoặc nhiều) tá dược hoặc chất mang được dụng.
8. Sản phẩm kết hợp chứa các hoạt chất sau:
 - (i) PZA, hoặc muối được dụng của nó; và
 - (ii) Chất ức chế cytochrom bc_1 , hoặc muối được dụng của nó.
9. Sản phẩm kết hợp theo điểm 8, còn chứa các thuốc kháng khuẩn bổ sung.
10. Sản phẩm kết hợp theo điểm 9, trong đó các thuốc kháng khuẩn bổ sung là các thuốc chống lao được chọn từ:
 - các thuốc được biết là ngăn cản chuỗi hô hấp của *Mycobacterium tuberculosis*;
 - các thuốc kháng khuẩn khác mà có thể hướng đích chuỗi vận chuyển electron; và
 - các thuốc mycobacterium khác.
11. Sản phẩm kết hợp theo điểm 9, trong đó các thuốc kháng khuẩn bổ sung là:

- bedaquilin; và/hoặc
- clofazimin.

12. Sản phẩm kết hợp theo điểm 9, trong đó các thuốc kháng khuẩn bổ sung được chọn từ: các chất ức chế trực tiếp ATP synthaza, các chất ức chế $ndh2$; các thuốc hướng đích cytochrom bd oxidaza; rifampixin (=rifampin); isoniazid; pyrazinamid; amikacin; ethionamid; ethambutol; streptomycin; axit para-aminosalicylic; cycloserin; capreomycin; kanamycin; thioaxetazon; PA-824; delamanid; quinolon/floquinolon; phân tử vòng lớn; rifamycin; rifabutin; rifapentin; delamanid và/hoặc pretonamid.

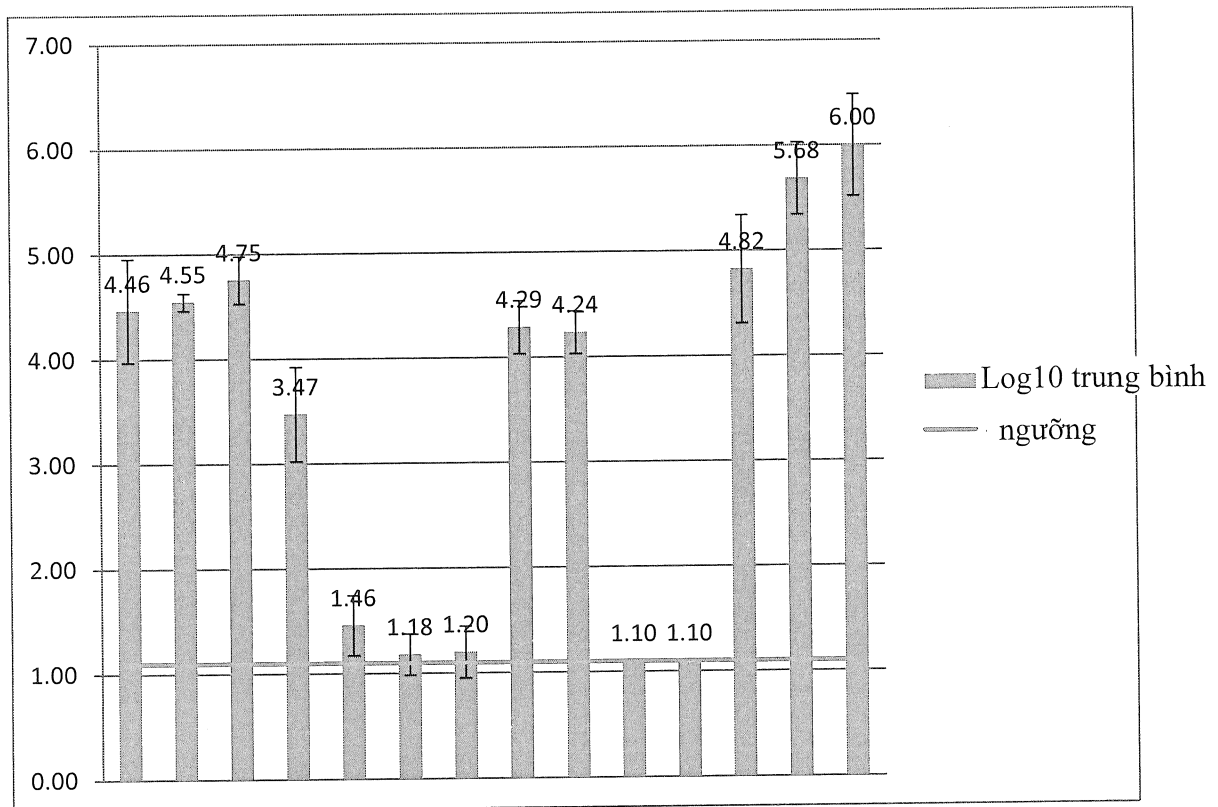


Fig. 1