



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ
(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ
(51)⁷ C07D 403/04; C07D 417/04; A61K (13) B
31/506; A61P 25/30



1-0040935

(21) 1-2019-03958 (22) 23/01/2018
(86) PCT/US2018/014792 23/01/2018 (87) WO2018/136917 26/07/2018
(30) 62/449,270 23/01/2017 US
(45) 26/08/2024 437 (43) 25/10/2019 379A
(73) NOVARTIS AG (CH)
Lichtstrasse 35, 4056 Basel, Switzerland
(72) AMRUTKAR, Dipak, Vasantrao (IN); FOSTER, Kelly (US); JACOBSEN, Thomas,
Amos (DK); JEFSON, Martin, R. (US); KEANEY, Gregg, F. (US); LARSEN, Janus,
Schreiber (DK); NIELSEN, Karin, Sandager (DK).
(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) CHẤT ĐIỀU BIẾN KÊNH KALI VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA CHÚNG

(57) Sáng chế đề cập đến các hợp chất và muối dược dụng của chúng, và dược phẩm chứa chúng, hữu ích để điều trị nhiều bệnh, rối loạn hoặc tình trạng bệnh liên quan đến kênh kali.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến các hợp chất và muối được dụng của chúng, và được phẩm chứa chúng, hữu ích để điều trị nhiều bệnh, rối loạn hoặc tình trạng bệnh liên quan đến kênh kali.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Trong số các kênh ion, các kênh kali là phổ biến và đa dạng nhất, được tìm thấy trong nhiều loại tế bào của động vật như thần kinh, cơ, tuyến, miễn dịch, sinh sản, và mô biểu bì. Các kênh này cho phép dòng kali đi vào và/hoặc đi ra khỏi tế bào trong một số điều kiện nhất định. Các kênh này được điều hòa, ví dụ, bằng tính nhạy canxi, cổng điện áp, các chất truyền tin thứ cấp, phối tử ngoại bào, và tính nhạy ATP.

Sự rối loạn chức năng của kênh kali và sự rối loạn chức năng do các nguyên nhân khác làm ảnh hưởng đến các kênh kali này đã được biết là tạo ra sự mất kiểm soát tế bào, chức năng sinh lý bị thay đổi, và tình trạng bệnh. Do có khả năng điều biến chức năng kênh ion và/hoặc khôi phục hoạt tính kênh ion, các chất điều biến kênh kali được sử dụng quá trình điều trị được lý của nhiều loại bệnh học và có khả năng đáp ứng nhiều chỉ định điều trị bệnh rộng hơn nữa.

Kênh kali được hoạt hóa bằng canxi dẫn truyền mức độ nhỏ (kênh SK) là họ phụ của kênh K^+ được hoạt hóa bằng ion Ca^{2+} và họ kênh SK này có 4 thành viên là SK1, SK2, SK3, và SK4 (thường được gọi là chất dẫn truyền trung gian). Đặc biệt, vai trò sinh lý của các kênh SK đã được nghiên cứu trong hệ thần kinh mà ở đó chúng là, ví dụ, chất điều hòa quan trọng của sự kích thích thần kinh và sự giải phóng chất dẫn truyền thần kinh, và trong cơ trơn mà ở đó chúng là yếu tố quyết định trong sự điều biến trương lực mạch, hệ cơ phế-khí quản, niệu đạo, tử cung hoặc dạ dày-ruột.

Do đó, các chất điều biến phân tử nhỏ của kênh ion kali có thể có khả năng điều trị rất nhiều bệnh đặc trưng bởi sự rối loạn chức năng của kênh ion kali và sự rối loạn chức năng do các nguyên nhân khác làm ảnh hưởng đến kênh kali này.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề cập đến các hợp chất và các muối được dụng của chúng, và được phẩm chứa chúng, hữu ích trong việc điều trị các bệnh liên quan đến sự rối loạn chức năng của các kênh ion kali và sự rối loạn chức năng do các nguyên nhân khác ảnh hưởng đến các kênh kali này (ví dụ, xem Bảng 1).

Các hợp chất được mô tả ở đây được phát hiện là có một hoặc nhiều đặc tính có lợi sau đây: độ tan cao, tỷ lệ ở dạng tự do trong não ở mức cao, ức chế hERG không đáng kể hoặc không ức chế hERG, thời gian bán hủy *in vivo* được kéo dài, độ sinh khả dụng tốt, độ ổn định ở vi thể gan cao, tính thấm như tính thấm qua màng nhân tạo song song (parallel artificial membrane permeability: PAMPA) được tăng lên, và/hoặc mức độ ức chế Cyp thấp. Ví dụ, xem số liệu so sánh trong Bảng 2 và Bảng 3.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 là biểu đồ thể hiện hiệu quả của hợp chất có công thức 1 sau khi sử dụng liều qua đường miệng (PO) đối với chứng run do harmalin gây ra.

Fig.2 thể hiện hiệu quả và mức độ đáp ứng liều của hợp chất có công thức 1 theo tỷ lệ % khả năng vận động

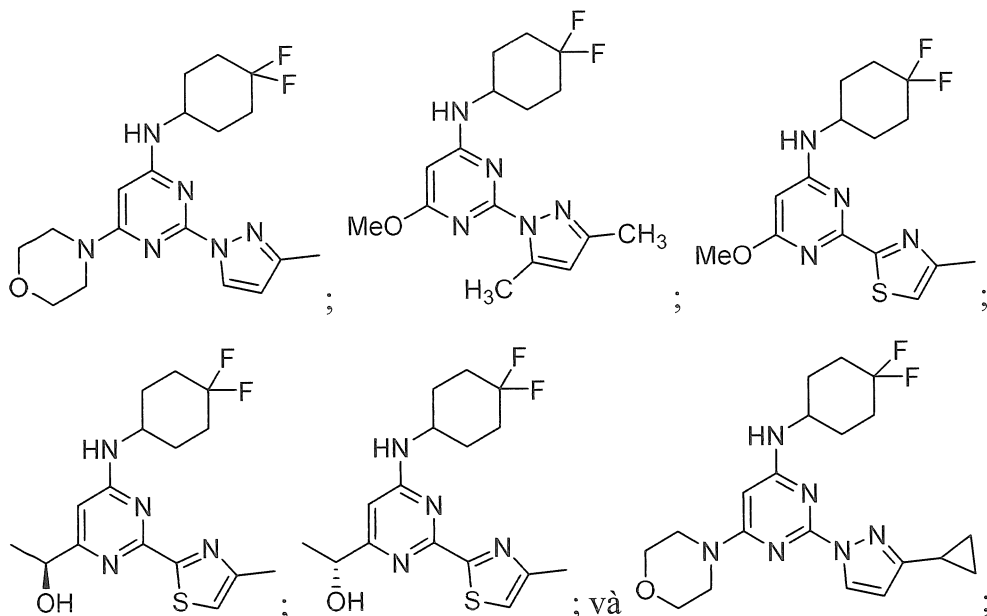
Fig.3 thể hiện hiệu quả của hợp chất có công thức 1 đối với tính không đều về sự phát ra dòng điện của tế bào Purkinje trong các lát cắt *ex vivo* từ chuột chuyển gen SCA2 58Q.

Fig.4 thể hiện hiệu quả của hợp chất có công thức 1 đối với chứng mất điều hòa cơ sở trong mô hình chuột đi không vững do mắc chứng mất điều hòa từng đợt 2 (EA2).

Mô tả chi tiết sáng chế

1. Các hợp chất

Sáng chế đề xuất các hợp chất có công thức:



hoặc các muối được dụng của chúng.

2. Các định nghĩa

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, các thuật ngữ “đối tượng” và “bệnh nhân” có thể được sử dụng thay thế lẫn nhau và để chỉ động vật có vú cần điều trị, ví dụ, các động vật nuôi (ví dụ, chó, mèo, và động vật tương tự), các động vật trang trại (ví dụ, bò cái, lợn, ngựa, cừu, dê và động vật tương tự) và động vật dùng cho phòng thí nghiệm (ví dụ, chuột nhắt, chuột thường, chuột lang và chuột tương tự). Thông thường, đối tượng là người cần điều trị.

Khi hóa học lập thể của hợp chất theo sáng chế được gọi tên hoặc thể hiện bằng cấu trúc, chất đồng phân lập thể được gọi tên hoặc thể hiện này có độ tinh khiết ít nhất là 60%, 70%, 80%, 90%, 99% hoặc 99,9% trọng lượng so với tất cả chất đồng phân lập thể còn lại. Độ tinh khiết theo tỷ lệ % trọng lượng so với tất cả các chất đồng phân lập thể còn lại là tỷ lệ trọng lượng của một chất đồng phân lập thể so với trọng lượng của các chất đồng phân lập thể còn lại. Khi chất đồng phân đối ảnh đơn được gọi tên hoặc thể hiện bằng cấu trúc, chất đồng phân đối ảnh được gọi tên hoặc thể hiện bằng cấu trúc này có độ tinh khiết về mặt quang học ít nhất là 60%, 70%, 80%, 90%, 99% hoặc 99,9% trọng lượng. Tỷ lệ % độ tinh khiết quang theo trọng lượng là tỷ lệ trọng lượng của chất đồng phân đối ảnh so với trọng lượng của chất đồng phân đối ảnh này cộng với trọng lượng chất đồng phân dị cấu quang học của nó.

Khi hợp chất theo sáng chế được gọi tên hoặc thể hiện bằng cấu trúc mà không

thể hiện hóa học lập thể, và hợp chất này có một tâm không đối xứng, cần hiểu rằng tên hoặc cấu trúc này bao gồm cả một chất đồng phân đối ảnh của hợp chất tự do từ chất đồng phân dị hình và dị cấu quang học tương ứng, hỗn hợp racemic của hợp chất này, và các hỗn hợp được làm giàu về một chất đồng phân đối ảnh so với chất đồng phân dị cấu quang học tương ứng của nó.

Sáng chế đề xuất các muối được dụng cũng như các dạng trung tính của các hợp chất được mô tả ở đây. Để sử dụng trong y học, các muối của các hợp chất này để chỉ “các muối được dụng” không độc. Các dạng muối được dụng bao gồm các muối axit/anion hoặc muối bazơ/cation được dụng. Các muối bazơ/cation được dụng bao gồm các muối natri, kali, canxi, magie, dietanolamin, n-metyl-D-glucamin, L-lysin, L-arginin, amoni, etanolamin, piperazin và trietanolamin. Các muối axit/anion được dụng bao gồm, ví dụ, các muối axetat, benzensulfonat, benzoat, bicacbonat, bitartrat, cacbonat, xitrat, dihydroclorua, gluconat, glutamat, glycolylarsanilat, hexylresorxinat, hydrobromua, hydroclorua, malat, maleat, malonat, mesylat, nitrat, salixylat, stearat, succinat, sulfat, tartrat, và tosylat.

Thuật ngữ “chất mang, chất phụ trợ hoặc chất dẫn thuốc được dụng” để chỉ chất mang, chất phụ trợ hoặc chất dẫn thuốc không độc mà không làm mất hoạt tính dược lý của hợp chất mà nó được bào chế với. Các chất mang, chất phụ trợ hoặc chất dẫn thuốc được dụng có thể được sử dụng trong các dược phẩm được bộc lộ ở đây bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các chất trao đổi ion, nhôm oxit, nhôm stearat, lexitin, các protein huyết thanh như albumin huyết thanh của người, các chất đệm như phosphat, glyxin, axit sorbic, kali sorbat, các hỗn hợp glyxerit từng phần của axit béo thực vật bão hòa, nước, muối hoặc các chất điện phân, như protamin sulfat, dinatri hydrophosphat, kali hydrophosphat, natri clorua, các muối kẽm, silic oxit dạng keo, magie trisilicat, polyvinyl pyrolidon, các chất trên cơ sở xenluloza, polyetylen glycol, natri carboxymetylxenluloza, polyacrylat, sáp, polyme khối polyetylen-polyoxypropylen, polyetylen glycol và lanolin.

Các thuật ngữ “sự điều trị”, “điều trị” và “việc điều trị” thể hiện việc làm đảo ngược, làm giảm bớt, làm giảm khả năng phát triển hoặc ức chế sự tiến triển của bệnh hoặc rối loạn, hoặc một hoặc nhiều triệu chứng của nó, như được mô tả ở đây. Theo một số phương án, việc điều trị có thể được sử dụng sau khi một hoặc nhiều triệu

chúng đã phát triển, nghĩa là việc điều trị triệu chứng. Theo các phương án khác, việc điều trị có thể được sử dụng khi không có mặt các triệu chứng. Ví dụ, việc điều trị có thể được sử dụng cho đối tượng mắc cảm trước khi khởi phát các triệu chứng (ví dụ, theo lịch sử của các triệu chứng và/hoặc theo các yếu tố di truyền hoặc mắc cảm khác), nghĩa là việc điều trị dự phòng. Việc điều trị cũng có thể được tiếp tục sau khi các triệu chứng được cải thiện, ví dụ, để ngăn ngừa hoặc làm chậm sự tái phát của chúng.

Thuật ngữ “lượng có hiệu quả” hoặc “lượng có hiệu quả điều trị” bao gồm lượng của hợp chất được mô tả ở đây mà sẽ tạo ra đáp ứng sinh học hoặc y học của đối tượng.

3. Mục đích, bào chế và sử dụng

Theo một số phương án, các hợp chất và dược phẩm được bộc lộ ở đây hữu ích trong việc điều trị các bệnh và/hoặc rối loạn liên quan đến hoạt tính của kênh kali. Các bệnh và/hoặc rối loạn này bao gồm, ví dụ, các bệnh thần kinh và thoái hóa thần kinh (ví dụ, bệnh Parkinson, các chứng run, bệnh Alzheimer, bệnh sa sút trí tuệ, bệnh xơ cứng cột bên teo cơ (amyotrophic lateral sclerosis: ALS), chứng mất điều hòa, rối loạn lo âu, rối loạn trầm cảm, rối loạn tâm trạng, tình trạng suy giảm trí nhớ và thiếu tập trung, rối loạn lưỡng cực, chứng loạn tâm thần, bệnh tâm thần phân liệt, bệnh tổn thương não do chấn thương, và cơn ngủ kịch phát), bệnh tim và các tình trạng bệnh liên quan (ví dụ, bệnh tim thiếu máu cục bộ, bệnh tim mạch vành, đau thắt ngực, và chứng co thắt mạch vành), bệnh chuyển hóa và các bệnh về bàng quang (ví dụ, chứng co thắt bàng quang, chứng tiểu tiện không tự chủ, sự tắc dòng ra từ bàng quang, sự rối loạn chức năng dạ dày-ruột, hội chứng ruột kích thích, và bệnh đái tháo đường), các triệu chứng cai thuốc liên quan đến việc làm ngừng chứng nghiện, và các tình trạng bệnh khác liên quan đến sự điều biến kênh kali, ví dụ như các bệnh về đường hô hấp, bệnh động kinh, chứng co giật, cơn động kinh, cơn vắng ý thức, chứng co thắt mạch, các rối loạn ở thận (ví dụ, bệnh thận đa nang), sự rối loạn chức năng cương dương, bệnh tiêu chảy xuất tiết, chứng thiếu máu cục bộ, chứng thiếu máu cục bộ não, chứng đau kinh, bệnh Reynaud, chứng tập tễnh cách hồi, hội chứng Sjorgren, chứng loạn nhịp, chứng cao huyết áp, chứng loạn dưỡng tăng trương lực cơ, tình trạng co cứng, chứng khô miệng, sự tăng insulin-huyết, đẻ non, chứng hói, bệnh ung thư, sự ngăn chặn miễn dịch, chứng đau nửa đầu và chứng đau.

Sáng chế còn mô tả phương pháp điều biến hoạt tính của kênh kali ở đối tượng bao gồm bước sử dụng hợp chất được mô tả ở đây. Theo phương án khác, sáng chế đề xuất phương pháp điều biến tích cực kênh SK2 trong tế bào bao gồm bước cho tế bào này tiếp xúc với hợp chất được mô tả ở đây.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất các hợp chất và dược phẩm dùng để điều trị các chứng run. Các chứng run bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, chứng run khi nghỉ ngơi, chứng run khi hoạt động, chứng run tư thế, chứng run vận động, chứng run vận động tự ý, chứng run khi thực hiện một hoạt động cụ thể, và chứng run tự phát. Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất các hợp chất và dược phẩm được dùng để điều trị chứng run tư thế và chứng run khi hoạt động. Ví dụ về chứng run tư thế và/hoặc chứng run khi hoạt động bao gồm chứng run vô căn, hội chứng Parkinson do dược chất, chứng run do bệnh thần kinh, và các chứng run do độc tố (ví dụ, cai rượu hoặc do tiếp xúc với các kim loại nặng). Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất các hợp chất và dược phẩm được sử dụng để điều trị chứng run vô căn.

Sáng chế còn mô tả phương pháp điều trị chứng run vô căn ở đối tượng bao gồm bước sử dụng hợp chất hoặc muối được dùng hoặc dược phẩm được mô tả ở đây.

Chứng run vô căn là một trong số các rối loạn thần kinh phổ biến nhất, ảnh hưởng đến ~0,9% dân số chung. Chứng run vô căn được đặc trưng bởi chứng run khi hoạt động của các chi trên và ít phổ biến ở đầu, giọng nói và cơ thể. Tiền sử gia đình mắc chứng run vô căn có thể được xác định ở khoảng một nửa số bệnh nhân, điều này gợi ý thành phần di truyền. Việc uống rượu thường làm giảm tạm thời chứng run.

Theo một số phương án, sáng chế mô tả phương pháp điều trị bệnh hoặc tình trạng bệnh được chọn từ bệnh thoái hóa thần kinh, bệnh sa sút trí tuệ, bệnh tim, các triệu chứng cai thuốc liên quan đến việc làm ngừng chứng nghiện, bệnh chuyển hóa, và bệnh về bàng quang. Theo các phương án khác, sáng chế mô tả phương pháp điều trị bệnh hoặc tình trạng bệnh được chọn từ chứng mất điều hòa, chứng loạn trương lực cơ, bệnh Parkinson, bệnh thiếu máu cục bộ, bệnh tổn thương não do chấn thương, bệnh xơ cứng cột bên teo cơ, chứng cao huyết áp, bệnh vỡ xơ động mạch, bệnh đái tháo đường, chứng loạn nhịp, chứng bàng quang hoạt động quá mức, và các triệu chứng cai thuốc do việc ngừng lạm dụng rượu và lạm dụng các dược chất khác. Theo một số phương án, sáng chế mô tả phương pháp điều trị chứng mất điều hòa. Theo

một số phương án, sáng chế mô tả phương pháp điều trị chứng mất điều hòa tủy sống-tiểu não.

Sáng chế đề xuất được phẩm chứa hợp chất được mô tả ở đây; và chất mang được dụng. Các được phẩm này có thể được sử dụng để điều trị một hoặc nhiều bệnh hoặc tình trạng bệnh đã mô tả trên đây.

Các được phẩm được bộc lộ ở đây có thể được sử dụng qua đường miệng, ngoài đường tiêu hóa, bằng cách phun khí dung, qua đường khu trú, đường trực tràng, đường mũi, đường trong má, đường âm đạo hoặc bằng nguồn cấy. Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "ngoài đường tiêu hóa" bao gồm tiêm dưới da, trong tĩnh mạch, trong cơ, trong khớp, trong bao hoạt dịch, trong xương ức, trong vỏ, trong gan, trong tổn thương và trong sọ hoặc các kỹ thuật tiêm truyền khác. Các liều dùng dạng lỏng, được phẩm dùng để tiêm, dạng phân tán là chất rắn, và các dạng liều dùng để sử dụng khu trú hoặc qua chân bì của hợp chất được bao gồm trong sáng chế.

Lượng của hợp chất theo sáng chế có thể được kết hợp với các chất mang để tạo ra được phẩm ở dạng liều dùng đơn sẽ thay đổi tùy theo bệnh nhân cần được điều trị và chế độ sử dụng cụ thể. Theo một số phương án, được phẩm theo sáng chế có thể được bào chế sao cho liều dùng nằm trong khoảng từ 0,01 đến 100 mg/kg thể trọng/ngày của hợp chất theo sáng chế, ví dụ như nằm trong khoảng từ 0,1 đến 100 mg/kg thể trọng/ngày, có thể được sử dụng cho bệnh nhân điều trị bằng các được phẩm này.

Cũng cần hiểu rằng chế độ điều trị và liều dùng cụ thể đối với bệnh nhân cụ thể bất kỳ sẽ phụ thuộc vào nhiều yếu tố, bao gồm độ tuổi, trọng lượng cơ thể, tình trạng sức khỏe chung, giới tính, chế độ ăn, thời gian sử dụng, tỷ lệ bài tiết, sự kết hợp được chất, sự đánh giá của bác sĩ điều trị, và mức độ nặng của bệnh cụ thể được điều trị. Lượng của hợp chất theo sáng chế trong được phẩm cũng sẽ phụ thuộc vào hợp chất cụ thể trong được phẩm này.

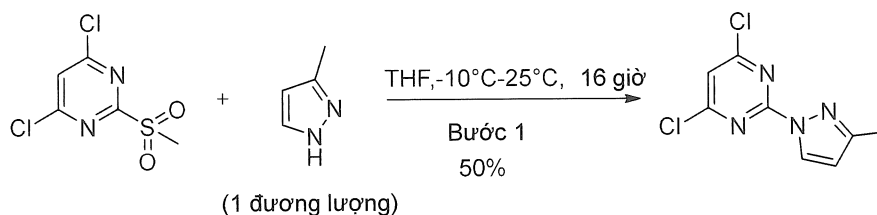
Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ làm đại diện sau đây được dự định để minh họa sáng chế, và không dự định để cũng như không được hiểu là làm giới hạn phạm vi của sáng chế.

Hợp chất N-(4,4-difloxyclohexyl)-2-(3-methyl-1H-pyrazol-1-yl)-6-

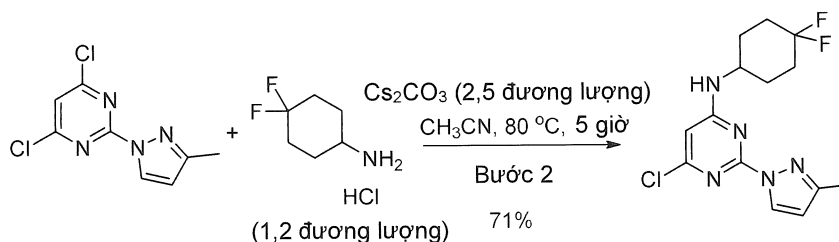
morpholinopyrimidin-4-amin

Bước 1:



Bình đáy tròn được trang bị thanh khuấy đã phủ teflon được nạp hợp chất 4,6-diclo-2-(metylsulfonyl)pyrimidin (20,0g, 88,080mmol, 1,0 đương lượng) trong tetrahydrofuran ở nhiệt độ -10°C và 3-metyl-1H-pyrazol (7,23g, 88,080mmol, 1,0 đương lượng) được cho thêm nhỏ giọt trong khoảng 5 phút bằng ống tiêm. Hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 16 giờ ở nhiệt độ 25°C và sự kết thúc của phản ứng được xác định bằng phương pháp TLC. Hỗn hợp phản ứng được phân bố giữa nước (500ml) và etyl axetat (500ml). Lớp hữu cơ được tách ra và lớp nước được chiết bằng etyl axetat (2 * 100ml). Lớp hữu cơ kết hợp được làm khô bằng natri sulfat, được lọc, và cô dưới áp suất giảm để thu được sản phẩm thô, sản phẩm này được tinh chế bằng cách sắc ký cột (etyl axetat/hexan làm hệ dung môi) để thu được hợp chất 4,6-diclo-2-(3-metyl-1H-pyrazol-1-yl)pyrimidin (10,0g, 43,859mmol, hiệu suất 50%) dưới dạng tinh khiết là chất rắn màu trắng. MS (MH⁺): m/z=229,1.

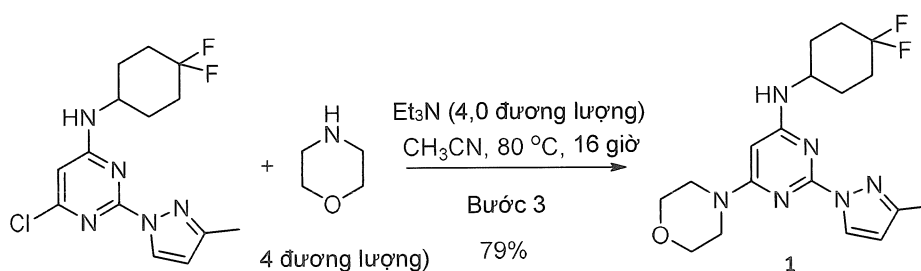
Bước 2:



Bình đáy tròn được trang bị thanh khuấy đã phủ teflon được nạp hợp chất 2,4-diclo-6-metylpyrimidin (11,0g, 48,24mmol, 1,0 đương lượng), 4,4-difloxyclohexan-1-amin hydroclorua (9,89g, 57,89mmol, 1,2 đương lượng), và Cs₂CO₃ (39,19g, 120,61mmol, 2,5 đương lượng) trong axetonitril (200ml). Hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 5 giờ ở nhiệt độ 80°C và sự kết thúc của phản ứng được xác định bằng phương pháp TLC. Hỗn hợp phản ứng được làm nguội đến nhiệt độ trong phòng và được phân bố giữa nước (100ml) và etyl axetat (200ml). Lớp hữu cơ được tách ra và

lớp nước được chiết bằng etyl axetat (2x100ml). Lớp hữu cơ kết hợp được làm khô bằng natri sulfat, được lọc, và cô dưới áp suất giảm để thu được sản phẩm thô, sản phẩm này được tinh chế bằng cách sắc ký cột (etyl axetat/hexan làm hệ dung môi) để thu được hợp chất 6-clo-N-(4,4-difloxylohexyl)-2-(3-metyl-1H-pyrazol-1-yl)pyrimidin-4-amin (11,0g, 33,62mmol, 71%) dưới dạng chất rắn màu trắng ngà. MS (MH⁺): m/z=328,1.

Bước 3:



Bình đáy tròn được trang bị thanh khuấy đã phủ teflon được nạp hợp chất 6-clo-N-(4,4-difloxylohexyl)-2-(3-metyl-1H-pyrazol-1-yl)pyrimidin-4-amin (14,0g, 42,79mmol, 1,0 đương lượng), morpholin (14,91ml, 171,19mmol, 4,0 đương lượng), và triethylamin (23,89ml, 171,19mmol, 4,0 đương lượng) trong axetonitril (200ml). Hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 16 giờ ở nhiệt độ 80°C và sự kết thúc của phản ứng được xác định bằng phương pháp TLC. Hỗn hợp phản ứng được làm nguội đến nhiệt độ trong phòng và được phân bố giữa nước (100ml) và etyl axetat (300ml). Lớp hữu cơ được tách ra và lớp nước được chiết bằng etyl axetat (2x100ml). Lớp hữu cơ kết hợp được làm khô bằng natri sulfat, được lọc, và cô dưới áp suất giảm để thu được sản phẩm thô, sản phẩm này được tinh chế bằng cách sắc ký cột (etyl axetat/hexan làm hệ dung môi) để thu được hợp chất N-(4,4-difloxylohexyl)-2-(3-metyl-1H-pyrazol-1-yl)-6-morpholinopyrimidin-4-amin (có công thức 1) (12,8g, 33,84mmol, hiệu suất 79%) dưới dạng chất rắn màu trắng ngà.

Số liệu phân tích:

MS (MH⁺): m/z=379,2; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-D₆): δ 8,41 (d, *J* = 2 Hz, 1H), 7,07 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H), 6,25 (d, *J* = 2,4 Hz, 1H), 5,53 (s, 1H), 3,9 (bs, 1H), 3,67 (t, *J* = 4,4 Hz, 4H), 3,49 (s, 4H), 2,23 (s, 3 H), 2,23-1,97 (m, 3H), 1,92-1,90 (m, 3H), 1,55-1,53 (m, 2H). ¹H NMR, bằng cách tích phân, cho thấy có 3 sự cộng hưởng proton trong vùng thơm và 1 sự cộng hưởng rộng tương ứng với proton có thể trao đổi ở vị trí

N-18. Quan sát được các proton thơm dưới dạng hai vạch đôi và một vạch đơn, điều này thể hiện hai proton liền kề, và một proton thơm tách ra. Trong vùng béo, quan sát được sự cộng hưởng tương ứng với 20 proton, cho thấy 1 vạch đơn khác biệt. Sự tích phân các cộng hưởng này tương ứng với hai sự cộng hưởng vạch đôi-vạch đôi trong vùng trường cao, một sự cộng hưởng với proton vạch bội chồng lên nhau một phần, và bốn vạch bội trong vùng trường thấp, hai trong số chúng chồng lên nhau một phần. Các vạch bội béo trong vùng trường cao có liên quan đến gốc morpholin của cấu trúc. Các vạch bội trong vùng trường thấp được chia nhỏ thêm bằng vùng lân cận của CF_2 với các proton này. Trong phép phân tích sắc ký lỏng-phổ khối LC/MS với độ phân giải cao (high resolution: HR), quan sát được ion giả phân tử ($\text{M}+\text{H}^+$) ở điện áp tạo phân mảnh thấp (70V) trong chế độ ion dương ESI với m/z bằng 379,20580. Quan sát được ion nổi bật khác ở m/z bằng 779,38575 được cho là sản phẩm cộng dime trong nguồn $2\text{M} + \text{Na}^+$.

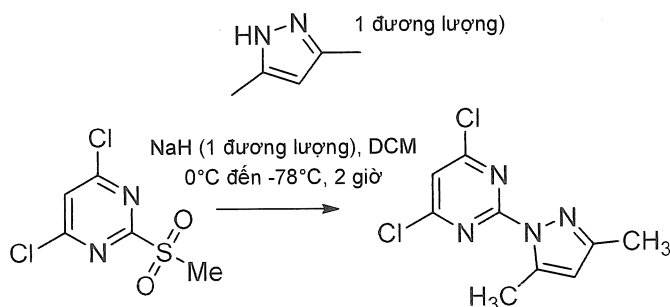
Số liệu phổ ^{13}C NMR cho thấy có 14 sự cộng hưởng cacbon riêng biệt và được tạo ra từ phổ cacbon ^{13}C khử ghép nối thu được ở nhiệt độ 25°C trong CDCl_3 . 14 sự cộng hưởng là phù hợp với cấu trúc có công thức 1 trong đó bốn cặp của 18 nguyên tử cacbon tương đương về mặt quang phổ. Quan sát được một sự cộng hưởng cacbon (C-12 ở 77,05 ppm) bị che một phần bởi sự cộng hưởng CHCl_3 trong phổ này. Sự có mặt của cacbon ở sự cộng hưởng này được khẳng định bằng cách thu thập phổ ^{13}C trong C_6D_6 ; quan sát được sự cộng hưởng ở 79,7 ppm mà không bị nhiễu từ đỉnh dung môi, ngoài tất cả các sự cộng hưởng còn lại quan sát được. Quan sát được vạch ba ($2J = 244$ Hz) với sự cộng hưởng C-22 bằng 122,29, quan sát được hai vạch ba bổ sung ở 31,53 ppm (C-21 và C-23, $3J = 24,93$ Hz), và ở 31,53 ppm (C-20 và C-24, $4J = 5,37$ Hz). Mỗi vạch ba quan sát được là phù hợp với sự thay thế F2 ở vị trí C-22, và sự giảm hằng số kết hợp đối với flo do số lượng liên kết can thiệp tăng lên.

Tính liên kết cacbon-proton, và tính liên kết cacbon-cacbon (qua các môi trường quan 2 và 3 liên kết C-C-H) của khung phân tử được khẳng định bằng cách thu thập phổ NMR 2D. Tính liên kết C-H trực tiếp được khẳng định bằng phổ HSQC, và tính liên kết của 2 và 3 liên kết được chứng minh bằng phổ HMBC. Mỗi tương quan chéo trong khoảng ngắn và dài (so với 2 hoặc 3 liên kết) là phù hợp với sự liên kết được dự đoán từ cấu trúc được đề xuất. Cuối cùng, số liệu về sự dịch chuyển hóa học quan sát

được được phân định như được thể hiện trên đây là phù hợp với sự dịch chuyển hóa học của ^1H và ^{13}C được dự đoán bằng máy tính đối với cấu trúc đã đề xuất.

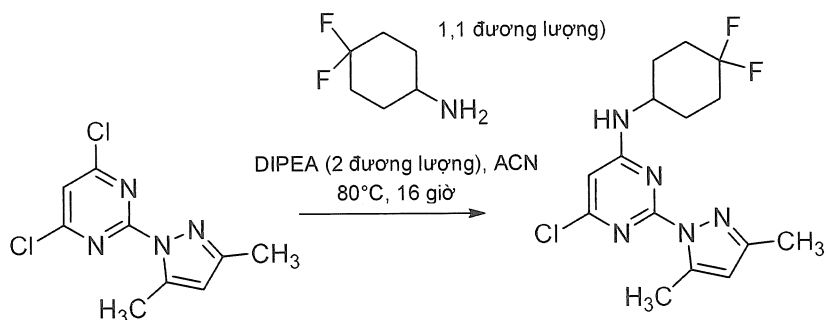
Hợp chất N-(4,4-difloxylohexyl)-2-(3,5-dimetyl-1H-pyrazol-1-yl)-6-metoxypyrimidin-4-amin

Bước 1:



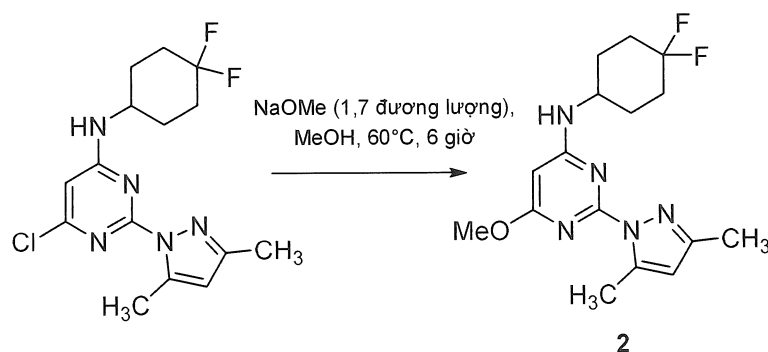
Bình đáy tròn được làm khô bằng ngọn lửa, có bốn cổ, dung tích 5000ml, được trang bị cánh khuấy đã phủ teflon (5cm) có gắn đĩa thủy tinh (cổ 1), nút chặn (cổ 2), và phễu bổ sung có nút chặn (cổ 3) và bộ điều chỉnh lượng khí nitơ dạng ống hình chữ U ở đầu vào-đầu ra được nạp đầy dầu (cổ 4), được nạp huyền phù của natri hydrua (35,2g, 880mmol, 1 đương lượng) trong diclometan (1000ml) được cho thêm 3,5-dimetylpyrazol (84,6g, 880mmol, 1 đương lượng) ở nhiệt độ 0°C và hỗn hợp phản ứng này được khuấy ở nhiệt độ trong phòng. Sau 30 phút, 4,6-diclo-2-(metylsulfonyl)pyrimidin (200g, 880mmol, 1 đương lượng) (được hòa tan trong diclometan (1000ml)) được cho thêm nhỏ giọt qua phễu nhỏ giọt vào hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ -78°C. Hỗn hợp phản ứng này được khuấy ở cùng nhiệt độ và sự kết thúc của phản ứng được xác định bằng phương pháp TLC và UPLC. Sau 2 giờ, hỗn hợp phản ứng được tôi bằng nước ở nhiệt độ -78°C và được pha loãng bằng diclometan. Sau 5 phút, diclometan được lắng gạn và rửa bằng dung dịch nước muối. Lớp hữu cơ được làm khô bằng natri sulfat, được lọc, và cô dưới áp suất giảm để thu được sản phẩm thô, sản phẩm này được tinh chế bằng cách sắc ký cột sử dụng etyl axetat và ete dầu mỏ làm dung môi để thu được hợp chất 4,6-diclo-2-(3,5-dimetyl-1H-pyrazol-1-yl) pyrimidin (138g, 567,71mmol, 65%) dưới dạng chất rắn màu trắng ngà. MS (MH⁺): m/z = 244,2.

Bước 2:



Bình đáy tròn được làm khô bằng ngọn lửa, có ba cổ, dung tích 2000ml, được trang bị thanh khuấy đã phủ teflon (5cm), một vách ngăn (cổ 1), nút chặn (cổ 3) và thiết bị ngưng tụ hồi lưu được trang bị bộ điều chỉnh lượng khí nitơ dạng ống hình chữ U ở đầu vào-đầu ra được nạp đầy dầu (cổ 2), được nạp dung dịch chứa hợp chất 4,6-diclo-2-(3,5-dimetyl-1H-pyrazol-1-yl) pyrimidin (136g, 559,4mmol, 1 đương lượng) trong axetonitril (1500ml), sau đó nạp 4,4-difloxylohexylamin hydroclorua (105,6g, 615,4mmol, 1,1 đương lượng) và N,N-diisopropyl etylamin (194,88ml, 1118,8mmol, 2 đương lượng). Hỗn hợp phản ứng được gia nhiệt ở nhiệt độ 80°C trong 16 giờ. Sự kết thúc của phản ứng được xác định bằng phương pháp TLC và UPLC. Hỗn hợp phản ứng được cô và phần cặn được nghiền thành bột với nước (500ml). Chất rắn tạo thành được lọc, rửa bằng ete dầu mỏ, được làm khô trong chân không để thu được hợp chất 6-clo-N-(4,4-difloxylohexyl)-2-(3,5-dimetyl-1H-pyrazol-1-yl)pyrimidin-4-amin (191g, 556mmol, >95%) dưới dạng chất rắn màu trắng ngà. MS (MH⁺): m/z = 342,0.

Bước 3:

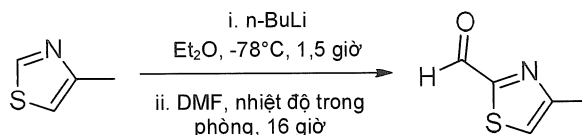


Bình đáy tròn được làm khô bằng ngọn lửa, có ba cổ, dung tích 250ml, được trang bị thanh khuấy đã phủ teflon (2cm), một vách ngăn (cổ 1), nút chặn (cổ 3) và thiết bị ngưng tụ hồi lưu được trang bị bộ điều chỉnh lượng khí nitơ dạng ống hình chữ U ở đầu vào-đầu ra được nạp đầy dầu (cổ 2), được nạp dung dịch chứa hợp chất 6-clo-N-(4,4-difloxylohexyl)-2-(3,5-dimetyl-1H-pyrazol-1-yl)pyrimidin-4-amin (20g,

58,51mmol, 1 đương lượng) trong metanol, sau đó nạp natri metoxit (21% trong metanol, 5,37g, 99,47mmol, 1,7 đương lượng). Hỗn hợp phản ứng được gia nhiệt đến 60°C, và sự kết thúc của phản ứng được xác định bằng phương pháp TLC và UPLC. Sau 5 giờ, hỗn hợp phản ứng được cô dưới áp suất giảm và phần cặn được pha loãng bằng etyl axetat, được rửa bằng nước, và rửa bằng dung dịch nước muối. Lớp hữu cơ được làm khô bằng natri sulfat, được lọc, và cô dưới áp suất giảm để thu được sản phẩm thô, sản phẩm này được tinh chế bằng cách sắc ký cột sử dụng etyl axetat trong ete dầu mỏ làm hệ dung môi để thu được hợp chất N-(4,4-difloxylohexyl)-2-(3,5-dimethyl-1H-pyrazol-1-yl)-6-metoxypyrimidin-4-amin (có công thức 2) [16g (11g (độ tinh khiết 99%)+ 5g (độ tinh khiết 92%), 47,41mmol, ~80%) dưới dạng chất rắn màu trắng. MS (MH⁺): m/z =338,1. Số liệu phân tích: ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ 7,45 (bs, 1H), 6,06 (s, 1H), 5,72 (s, 1H), 4,01 (bs, 1H), 3,85 (s, 3H), 2,55 (s, 3H), 2,17 (s, 3H), 2,11- 1,82 (m, 6H), 1,60-1,55 (m, 2H).

Hợp chất N-(4,4-difloxylohexyl)-6-metoxy-2-(4-methylthiazol-2-yl) pyrimidin-4-amin

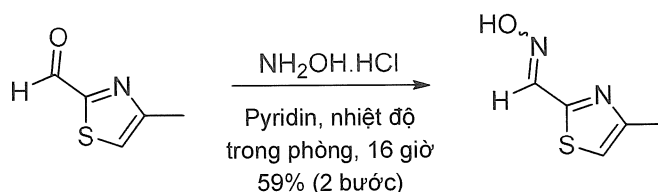
Bước 1:



Bình đáy tròn có ba cổ được trang bị thanh khuấy đã phủ teflon được nạp ete dietyl (250ml) và n-BuLi (241,98ml, 604,96mmol, 2,5M trong hexan) được chuyển ở nhiệt độ -78°C. Dung dịch chứa hợp chất 4-methylthiazol (50,0g, 504,13mmol) trong ete dietyl (200ml) được cho thêm trong khoảng thời gian 30 phút. Hỗn hợp phản ứng này chuyển thành huyền phù màu vàng nhạt. Sau 1,5 giờ, DMF (58,54ml, 756,20mmol) được cho thêm vào và hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 16 giờ. Quá trình phản ứng được theo dõi bằng phương pháp TLC. Sau khi phản ứng kết thúc, hỗn hợp được rót vào dung dịch HCl lạnh (400ml, 4N) trong khi khuấy và được tách thành hai lớp. Lớp hữu cơ được rửa bằng dung dịch HCl lạnh (2 x 80ml, 4N)). Các lớp nước kết hợp được bazơ hóa từ từ bằng K₂CO₃ (độ pH = 7) và được chiết bằng ete dietyl (3 x 150ml). Các lớp hữu cơ kết hợp được làm khô bằng natri sulfat và được làm bay hơi đến khi khô ở nhiệt độ trong phòng trong chân không để

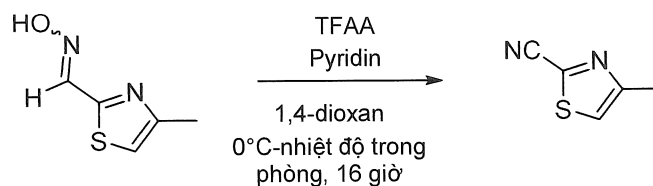
thu được hợp chất 4-methylthiazol-2-carbaldehyt (60,0g, dạng thô) dưới dạng chất lỏng màu vàng nhạt. Chất thô này được sử dụng trong bước tiếp theo mà không cần tinh chế thêm.

Bước 2:



Bình đáy tròn có hai cổ được trang bị thanh khuấy đã phủ teflon được nạp hợp chất 4-methylthiazol-2-carbaldehyt (60,0g, chất thô) trong pyridin (38,04ml, 472,40mmol). Hydroxylamin hydroclorua (32,82g, 472,40mmol) được cho thêm từng phần trong khoảng thời gian 15 phút. Hỗn hợp phản ứng này được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 16 giờ trong môi trường nitơ. Quá trình phản ứng được theo dõi bằng phương pháp TLC. Sau khi phản ứng kết thúc, hỗn hợp này được rót vào nước đã làm lạnh bằng nước đá và khuấy trong 20 phút, chất rắn thu được được lọc và làm khô trong chân không để thu được hợp chất 4-methylthiazol-2-carbaldehyt oxim (40,0g, 281,69mmol, 59% qua hai bước) dưới dạng chất rắn màu trắng ngà. MS (MH⁺): m/z=143,0.

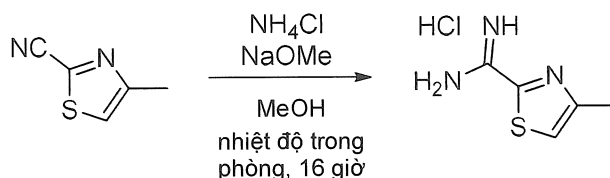
Bước 3:



Bình đáy tròn có hai cổ được trang bị thanh khuấy đã phủ teflon được nạp dung dịch chứa hợp chất 4-methylthiazol-2-carbaldehyt oxim (35,0g, 246,44mmol) và pyridin (87,33ml, 1084,35mmol) trong 1,4-dioxan (140ml). Anhydrit trifloaxetic (51,38ml, 369,66mmol) được cho thêm từ từ ở nhiệt độ -10°C và được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 16 giờ. Quá trình phản ứng được theo dõi bằng phương pháp TLC. Sau khi phản ứng kết thúc, hỗn hợp được pha loãng bằng nước (250ml) và chiết bằng ete dietyl (3 x 350ml). Các lớp hữu cơ kết hợp được rửa bằng nước (2 x 250ml), nước muối (100ml), được làm khô bằng natri sulphat và cô dưới áp suất giảm để thu

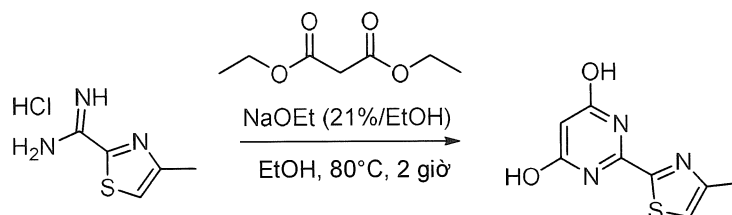
được hợp chất 4-methylthiazol-2-carbonitril (35,0g, chất thô) dưới dạng chất lỏng màu nâu nhạt. Chất thô này được sử dụng trong bước tiếp theo mà không cần tinh chế thêm. Số liệu phân tích: $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6): δ 7,90 (s, 1 H), 2,51 (s, 3 H).

Bước 4:



Bình đáy tròn có hai cổ được trang bị thanh khuấy đã phủ teflon được nạp hợp chất 4-methylthiazol-2-carbonitril (35,0g, chất thô) trong metanol (280ml) và natri metoxit (16,77g, 310,45mmol) được thêm vào. Sau khi khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 3 giờ, amoni clorua (30,19g, 564,66mmol) được thêm vào và hỗn hợp được khuấy trong 16 giờ nữa. Quá trình phản ứng được theo dõi bằng phương pháp TLC. Sau khi phản ứng kết thúc, hỗn hợp được lọc và rửa bằng metanol. Phần nước lọc được cô dưới áp suất giảm và phần cặn được nghiền thành bột với ete dietyl (150ml). Chất rắn tạo thành được lọc và làm khô trong chân không để thu được hợp chất 4-methylthiazol-2-carboximidamit hydroclorua (35,0g, chất thô) dưới dạng chất rắn màu trắng ngà. Chất thô này được sử dụng trong bước tiếp theo mà không cần tinh chế thêm. MS (MH^+): $m/z=142,0$.

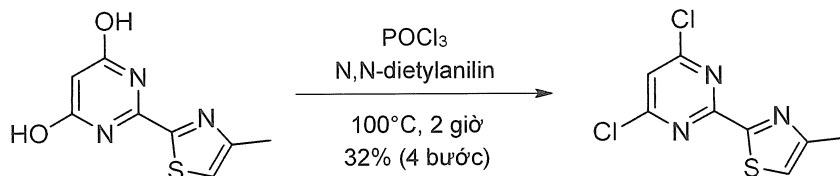
Bước 5:



Bình đáy tròn có hai cổ được trang bị thanh khuấy đã phủ teflon được nạp hợp chất 4-methylthiazol-2-carboximidamit hydroclorua (35,0g, chất thô) trong ethanol (350ml) và dietyl malonat (150,81ml, 988,64mmol). Natri etoxit (320ml, 988,64mmol, 21% trong EtOH) được cho thêm nhỏ giọt ở nhiệt độ trong phòng và được gia nhiệt đến nhiệt độ 85°C . Sau 3 giờ, hỗn hợp phản ứng được cô dưới áp suất giảm. Nước (20ml) được thêm vào và hỗn hợp này được axit hóa bằng HCl 1,5N (độ

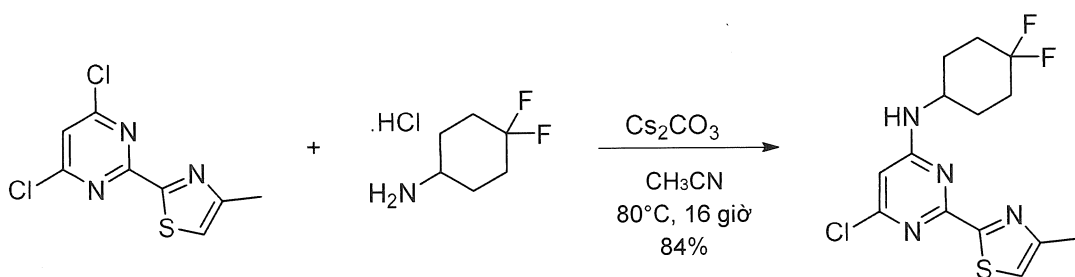
pH = 2-3). Chất rắn thu được được lọc và làm khô trong chân không để thu được hợp chất 2-(4-metylthiazol-2-yl) pyrimidin-4,6-diol (29,0g, chất thô) dưới dạng chất rắn màu vàng nhạt. Chất thô này được sử dụng trong bước tiếp theo mà không cần tinh chế thêm. MS (MH⁺): m/z=210,0.

Bước 6:



Bình đáy tròn có hai cổ được trang bị thanh khuấy đã phủ teflon được nạp huyền phù của hợp chất 2-(4-metylthiazol-2-yl) pyrimidin-4,6-diol (29,0g, chất thô) và POCl₃ (290ml). N,N-diethylanilin (37,84ml, 235,85mmol) được thêm vào ở nhiệt độ trong phòng và được gia nhiệt hồi lưu ở nhiệt độ 100°C trong 2 giờ. Quá trình phản ứng được theo dõi bằng phương pháp TLC. Lượng POCl₃ dư được loại bỏ bằng cách chưng cất. Phần cặn được pha loãng bằng 500ml nước lạnh, được làm trung hòa bằng dung dịch natri bicacbonat bão hòa, được chiết bằng ete dietyl (2 x 500ml). Các lớp hữu cơ kết hợp được rửa bằng nước (3 x 200ml), nước muối (100ml), được làm khô bằng natri sulfat và cô dưới áp suất giảm. Phần cặn được nghiền thành bột với n-pentan (100ml). Chất rắn thu được được lọc và làm khô trong chân không để thu được hợp chất 2-(4,6-diclopyrimidin-2-yl)-4-metylthiazol có công thức 7 (19,5g, 79,59mmol, 32% qua bốn bước) dưới dạng chất rắn màu vàng nhạt. MS (MH⁺): m/z=245,9.

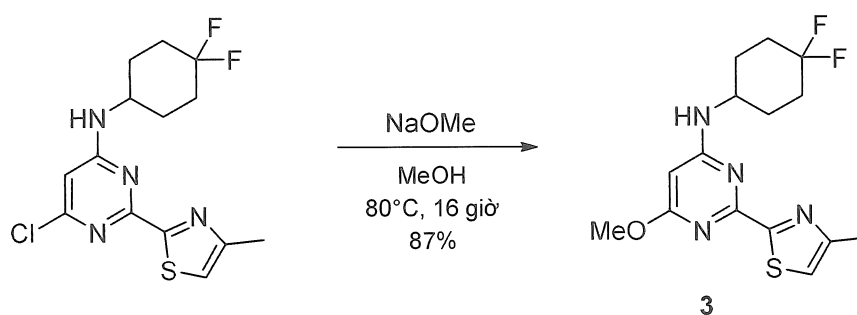
Bước 7:



Bình đáy tròn có hai cổ được trang bị thanh khuấy đã phủ teflon được nạp huyền phù của hợp chất 2-(4,6-diclopyrimidin-2-yl)-4-metylthiazol (19,0g, 77,56 mmol) và 4,4-diflorocyclohexan-1-amin hydroclorua (13,30g, 77,56mmol) trong axetonitril (190ml). Xesi cacbonat (37,89g, 116,34mmol) được thêm vào và hỗn hợp

phản ứng được gia nhiệt ở nhiệt độ 80°C trong 16 giờ. Quá trình phản ứng được theo dõi bằng phương pháp TLC. Hỗn hợp phản ứng được làm nguội đến nhiệt độ trong phòng, được lọc, và chất rắn được rửa bằng ethyl axetat (500ml). Phần nước lọc được rửa bằng nước (2 x 100ml), nước muối (100ml), được làm khô bằng natri sulfat, và cô dưới áp suất giảm. Phần cặn được tinh chế bằng cách sắc ký cột (silicagel cỡ 60-120), được rửa giải bằng EtOAc 15% trong hexan. Các phân đoạn liên quan chứa hợp chất cần thiết được kết hợp và làm bay hơi đến khi khô dưới áp suất giảm để thu được hợp chất 6-clo-N-(4,4-difloxylohexyl)-2-(4-metylthiazol-2-yl)pyrimidin-4-amin (22,5g, 65,25mmol, 84%) dưới dạng chất rắn có bột màu trắng ngà. MS (MH⁺): m/z=344,9.

Bước 8:

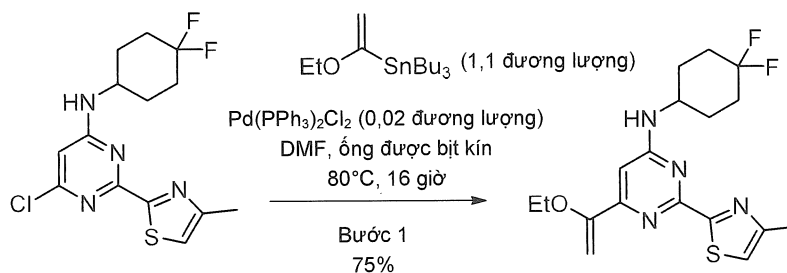


Bình đáy tròn có hai cổ được trang bị thanh khuấy đã phủ teflon được nạp hợp chất 6-clo-N-(4, 4-difloxylohexyl)-2-(4-metylthiazol-2-yl) pyrimidin-4-amin (27,0g, 78,47mmol) trong metanol (450ml). Natri metoxit (21,19g, 392,36mmol) được thêm vào và hỗn hợp này được gia nhiệt đến nhiệt độ 80°C trong 16 giờ. Quá trình phản ứng được theo dõi bằng phương pháp TLC. Lượng metanol dư được loại bỏ dưới áp suất giảm và phần cặn được pha loãng bằng dung dịch amoni clorua trong nước 10% (100ml) và được chiết bằng ethyl axetat (3 x 150ml). Các lớp hữu cơ kết hợp được rửa bằng nước (2 x 100ml), nước muối (100ml), được làm khô bằng natri sulphat và cô dưới áp suất giảm. Phần cặn được tinh chế bằng cách sắc ký cột (silicagel cỡ 60-120) rửa giải bằng EtOAc 35-40% trong hexan. Các phân đoạn liên quan chứa hợp chất đích được kết hợp và làm bay hơi đến khi khô dưới áp suất giảm để thu được hợp chất N-(4,4-difloxylohexyl)-6-metoxi-2-(4-metylthiazol-2-yl) pyrimidin-4-amin (có công thức **3**) (23,4g, 68,82mmol, 87%) dưới dạng chất rắn màu trắng ngà. MS (MH⁺): m/z=341,0. Số liệu phân tích: ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ 7,41 (s, 1 H), 7,40 (s, 1 H), 5,81 (s, 1 H), 3,87 (s, 3 H), 2,43 (s, 3 H), 2,08-1,89 (m, 6 H), 1,61-1,52 (m, 2

H).

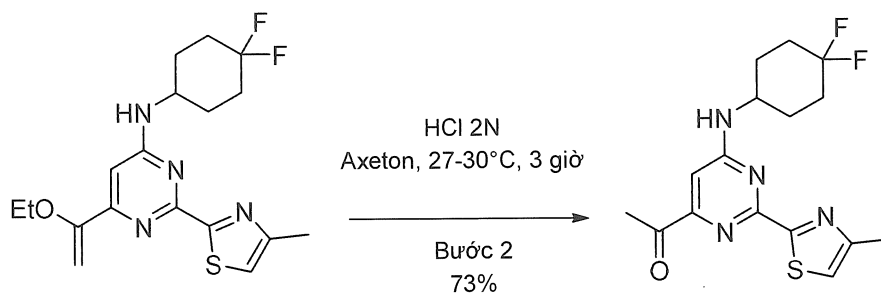
Hợp chất (S)-1-(6-((4,4-difloxylohexyl)amino)-2-(4-metylthiazol-2-yl)pyrimidin-4-yl)etan-1-ol

Bước 1:



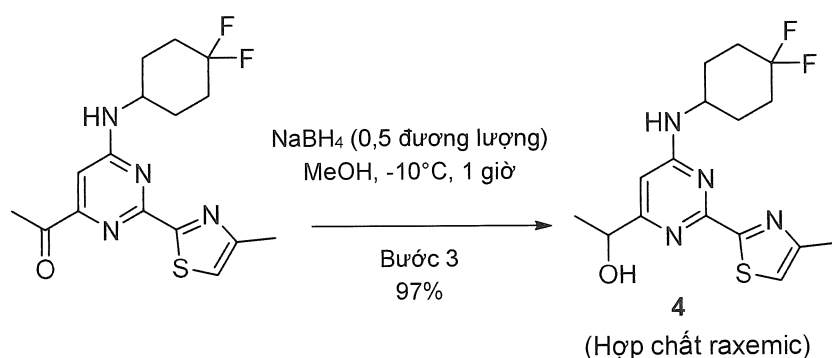
Ống được bịt kín có dung tích 250ml, được trang bị thanh khuấy đã phủ teflon (2cm), được nạp dung dịch chứa hợp chất 6-clo-N-(4,4-difloxylohexyl)-2-(4-metylthiazol-2-yl)pyrimidin-4-amin (4,9g, 14,24mmol, 1,0 đương lượng) và tributyl(1-etoxyvinyl)stanan (5,65g, 15,66mmol, 1,1 đương lượng) trong N,N-dimetylformamit (60ml). Hỗn hợp phản ứng được loại khí bằng cách sử dụng khí argon trong thời gian từ 5 đến 10 phút, sau đó cho thêm bis(triphenylphosphin) paladi(II) diclorua (0,2g, 0,28mmol, 0,02 đương lượng). Hỗn hợp phản ứng này được bịt kín và gia nhiệt ở nhiệt độ 80°C trong 16 giờ (sự kết thúc của phản ứng được xác định bằng phương pháp LCMS) và được làm nguội đến nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp phản ứng được pha loãng bằng nước (300ml) và chiết bằng etyl axetat (2 x 150ml). Các chất hữu cơ kết hợp được làm khô bằng natri sulfat, được lọc, và làm bay hơi để thu được sản phẩm thô dưới dạng chất rắn dính màu nâu nhạt. Chất thô này được tinh chế bằng cách sắc ký cột (etyl axetat/hexan làm hệ dung môi) để thu được hợp chất N-(4,4-difloxylohexyl)-6-(1-etoxyvinyl)-2-(4-metylthiazol-2-yl)pyrimidin-4-amin (4,1g, 10,78mmol, 75%) dưới dạng chất rắn màu trắng ngà. MS (MH⁺): m/z=381,0.

Bước 2:



Bình đáy tròn được trang bị thanh khuấy đã phủ teflon được nạp hợp chất N-(4,4-difloxylohexyl)-6-(1-etoxyvinyl)-2-(4-metylthiazol-2-yl)pyrimidin-4-amin (9,0g, 23,67mmol, 1,0 đương lượng) trong axeton (120ml), sau đó cho thêm dung dịch nước axit clohydric 2N (20ml). Hỗn hợp phản ứng này được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 3 giờ và sự kết thúc của phản ứng được xác định bằng phương pháp LCMS. Hỗn hợp phản ứng được cô để loại bỏ axeton, pha loãng bằng nước đã làm lạnh bằng nước đá (100ml), được bazơ hóa bằng dung dịch natri cacbonat bão hòa, và chiết bằng etyl axetat (2 x 100ml). Các chất hữu cơ kết hợp được làm khô bằng natri sulfat, được lọc và làm bay hơi dưới áp suất giảm để thu được sản phẩm thô dưới dạng chất rắn dính màu nâu nhạt. Chất thô này được tinh chế bằng cách sắc ký cột (etyl axetat/hexan làm hệ dung môi) để thu được hợp chất 1-(6-((4,4-difloxylohexyl)amino)-2-(4-metylthiazol-2-yl)pyrimidin-4-yl)etan-1-on (6,1g, 17,32mmol, 73%) dưới dạng chất rắn màu trắng ngà. MS (MH⁺): m/z=353,0.

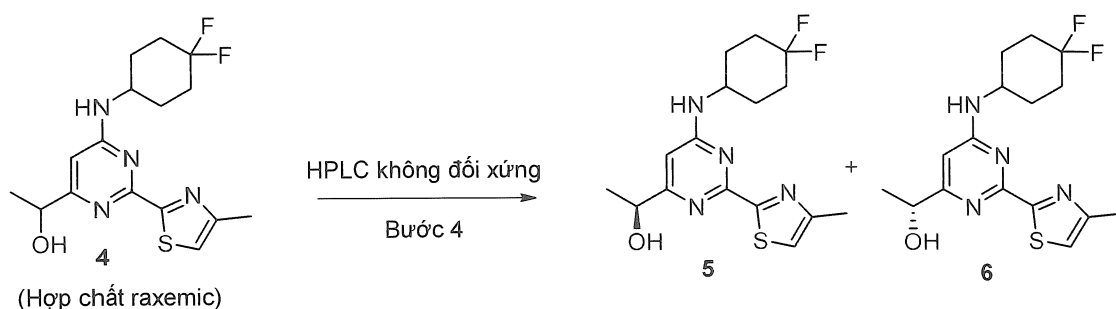
Bước 3:



Bình đáy tròn được trang bị thanh khuấy đã phủ teflon được nạp hợp chất 1-(6-((4,4-difloxylohexyl)amino)-2-(4-metylthiazol-2-yl)pyrimidin-4-yl)etan-1-on (5,6g, 15,90mmol, 1,0 đương lượng) trong metanol (80ml) ở nhiệt độ -10°C, sau đó nạp natri bohydrua (0,302g, 7,95mmol, 0,5 đương lượng). Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở cùng nhiệt độ trong 1 giờ và sự kết thúc của phản ứng được xác định bằng phương

pháp LCMS. Hỗn hợp phản ứng được tôi bằng nước và cô dưới áp suất giảm để loại bỏ metanol. Phần cặn được pha loãng bằng nước đã làm lạnh bằng nước đá (100ml) và chiết bằng etyl axetat (2 x 100ml). Các chất hữu cơ kết hợp được làm khô bằng natri sulfat, được lọc và làm bay hơi dưới áp suất giảm để thu được hợp chất 1-(6-((4,4-difloxylohexyl)amino)-2-(4-metylthiazol-2-yl)pyrimidin-4-yl)etan-1-ol có công thức **4** (5,5g, 15,53mmol, 97%) dưới dạng chất rắn màu trắng ngà của hỗn hợp raxemic. MS (MH⁺): m/z=355,0.

Bước 4:

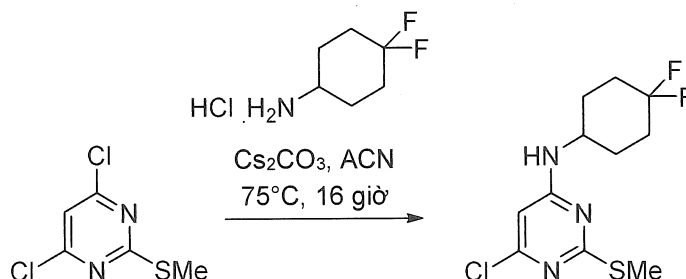


Hợp chất raxemic 1-(6-((4,4-difloxylohexyl)amino)-2-(4-metylthiazol-2-yl)pyrimidin-4-yl)etan-1-ol có công thức **4** (5,5g) được tinh chế bằng phương pháp HPLC không đối xứng (cột: Chiralpak-IC (250*20*5,0μ); Pha động A:N-Hexan (DEA 0,1%), Pha động B: IPA:DCM (90:10) hỗn hợp đẳng dòng: 50:50 (A:B); tốc độ dòng: 15,0ml/phút; 120/lần bơm; thời gian thực hiện: 15 phút) để thu được hợp chất (S)-1-(6-((4,4-difloxylohexyl)amino)-2-(4-metylthiazol-2-yl)pyrimidin-4-yl)etan-1-ol có công thức **5** (2,1g, 5,93mmol, 38%) dưới dạng chất rắn màu trắng ngà từ các phân đoạn rửa giải thứ nhất (đỉnh-1, RT= 4,24 phút). MS (MH⁺): m/z=355,0, ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ 7,59-7,57 (d, *J* = 6,0 Hz, 1H), 7,37(s, 1H), 6,64 (s, 1H), 5,37-5,36 (d, *J* = 4,4 Hz, 1H), 4,52-4,50 (t, *J* = 11,2 Hz, 5,6 Hz, 1H), 4,05 (bs, 1H), 2,43 (s, 3H), 2,10-1,96 (m, 6H), 1,62-1,59 (m, 2H), 1,35-1,33 (d, *J* = 6,4 Hz, 3H). Chất đồng phân đối ảnh khác: (R)-1-(6-((4,4-difloxylohexyl)amino)-2-(4-metylthiazol-2-yl)pyrimidin-4-yl)etan-1-ol có công thức **6** (2,05g, 5,78mmol, 37%) dưới dạng chất rắn màu trắng ngà từ các phân đoạn rửa giải thứ hai (đỉnh-2, RT= 6,45 phút). MS (MH⁺): m/z=355,0. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ 7,60-7,59 (d, *J* = 5,6 Hz, 1H), 7,37(s, 1H), 6,64 (s, 1H), 5,38 (bs, 1H), 4,52-4,51 (d, *J* = 6,8 Hz, 1H),

4,10 (bs, 1H), 2,43 (s, 3H), 2,10-1,91 (m, 6H), 1,65-1,57 (m, 2H), 1,35-1,34 (d, $J = 6,8$ Hz, 3H).

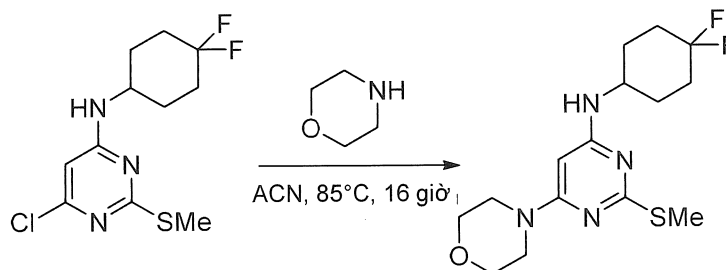
Hợp chất 2-(3-cyclopropyl-1H-pyrazol-1-yl)-N-(4,4-difloxylohexyl)-6-morpholinopyrimidin-4-amin

Bước 1:



Bình đáy tròn được làm khô bằng ngọn lửa, có ba cổ, dung tích 1000ml, được trang bị thanh khuấy đã phủ teflon (3cm), một vách ngăn (cổ 1), nút chặn (cổ 3) và thiết bị ngưng tụ hồi lưu được trang bị bộ điều chỉnh lượng khí nitơ dạng ống hình chữ U ở đầu vào-đầu ra được nạp đầy dầu (cổ 2), được nạp dung dịch chứa hợp chất 4,6-diclo-2-(methylthio)pyrimidin (150g, 768,94mmol, 1,0 đương lượng) trong axetonitril (1500ml), sau đó nạp 4,4-difloxylohexylamin hydroclorua (158,35g, 922,733mmol) và xesi cacbonat (526g, 1614mmol, 2,1 đương lượng). Hỗn hợp phản ứng được gia nhiệt ở nhiệt độ 75°C trong 16 giờ. Hỗn hợp phản ứng này được lọc để loại bỏ lượng xesi cacbonat dư, sau đó phần nước lọc được cô dưới áp suất giảm để thu được 210g (hiệu suất 93%) hợp chất 6-clo-N-(4,4-difloxylohexyl)-2-(methylthio)pyrimidin-4-amin dưới dạng chất rắn màu vàng nhạt. MS (MH⁺): $m/z = 294,0$.

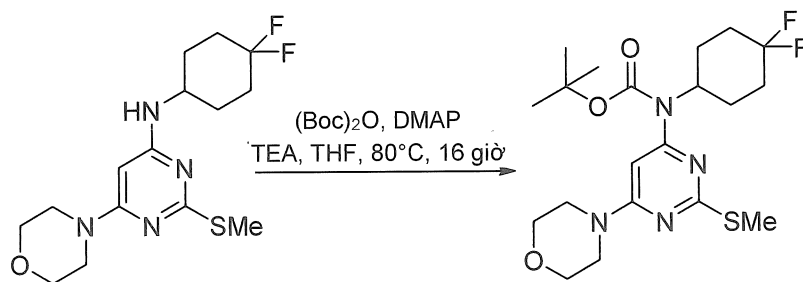
Bước 2:



Dung dịch chứa hợp chất 6-clo-N-(4,4-difloxylohexyl)-2-(methylthio)pyrimidin-4-amin (60g, 204,24mmol, 1,0 đương lượng) và morpholin (35,6ml, 408,48mmol, 2,0 đương lượng) trong axetonitril (600ml) được gia nhiệt ở

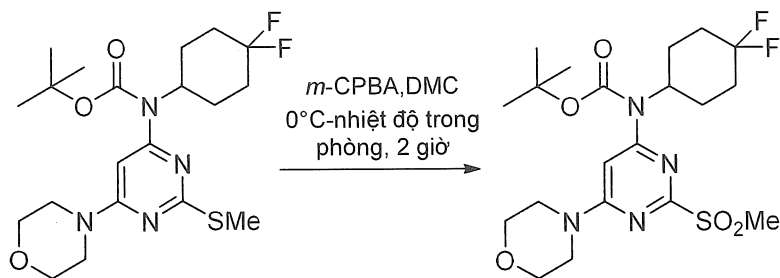
nhiệt độ 85°C trong ống được bịt kín trong 16 giờ. Sau khi phản ứng kết thúc, hỗn hợp phản ứng được cô, và phần cặn tạo thành được tôi bằng nước đã làm lạnh bằng nước đá. Chất rắn thu được được lọc và rửa bằng nước (500ml), hexan (250ml), được làm khô trong môi trường có độ chân không cao để thu được hợp chất N-(4,4-difloxylohexyl)-2-(metylthio)-6-morpholinopyrimidin-4-amin dưới dạng chất rắn màu trắng ngà (62g, hiệu suất 88%). MS (MH⁺): m/z =345,2.

Bước 3:



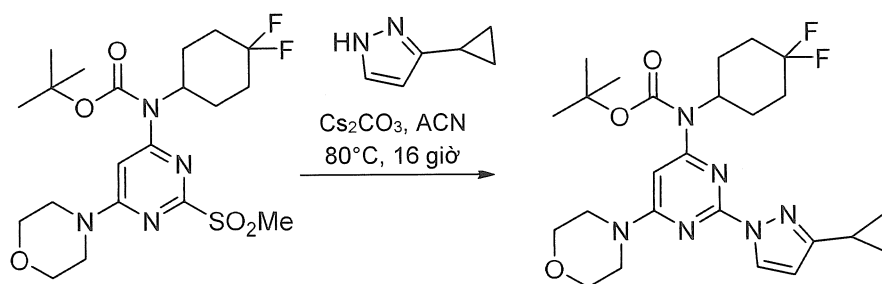
Bình đáy tròn được làm khô bằng ngọn lửa, có ba cổ, dung tích 100ml, được trang bị thanh khuấy đã phủ teflon (3cm), một vách ngăn (cổ 1), nút chặn (cổ 3) và thiết bị ngưng tụ hồi lưu được trang bị bộ điều chỉnh lượng khí nitơ dạng ống hình chữ U ở đầu vào-đầu ra được nạp đầy dầu (cổ 2), được nạp dung dịch chứa hợp chất N-(4,4-difloxylohexyl)-2-(metylthio)-6-morpholino pyrimidin-4-amin (1g, 2,90 mmol) trong tetrahydrofuran (15ml), sau đó được nạp hợp chất 4-N,N-dimetylaminopyridin (0,1g, 0,87mmol, 0,3 đương lượng), trietylamin (1,2ml, 8,71mmol, 3,0 đương lượng) và Boc anhydrit (3,16g, 14,51mmol, 5,0 đương lượng), sau đó hỗn hợp phản ứng được gia nhiệt ở nhiệt độ 80°C trong 16 giờ. Sau khi phản ứng kết thúc, hỗn hợp phản ứng này được tôi bằng nước và chiết bằng etyl axetat (2x75ml). Lớp hữu cơ kết hợp được làm khô bằng natri sulfat khan và được cô để thu được hợp chất tert-butyl (4,4-difloxylohexyl)(2-(metylthio)-6-morpholino pyrimidin-4-yl)carbamate dưới dạng gôm màu vàng (1,1g, 85%). MS (MH⁺): m/z =445,2.

Bước 4:



Bình đáy tròn có một cổ, dung tích 100ml, được nối với thiết bị ngưng tụ hồi lưu được trang bị bộ điều chỉnh lượng khí nitơ dạng ống hình chữ U ở đầu vào-đầu ra được nạp đầy dầu, thanh khuấy đã phủ teflon (1cm), được nạp dung dịch chứa hợp chất tert-butyl (4,4-difloxyclohexyl)(2-(metylthio)-6-morpholinopyrimidin-4-yl)carbamate (50g, 112,47mmol) trong diclometan (600ml), sau đó nạp axit 3-cloperbenzoic (axit *m*-cloperbenzoic) (58,2g, 337,42mmol, 3,0 đương lượng) ở nhiệt độ 0°C. Hỗn hợp phản ứng được làm ấm từ từ đến nhiệt độ trong phòng và khuấy trong 30 phút. Sau khi phản ứng kết thúc, hỗn hợp phản ứng được tời bằng dung dịch bicacbonat bão hòa và chiết bằng diclometan (2x250ml). Lóp hữu cơ kết hợp được làm khô bằng natri sulfat khan và được cô để thu được hợp chất tert-butyl (4,4-difloxyclohexyl)(2-(metylsulfonyl)-6-morpholinopyrimidin-4-yl)carbamate dưới dạng gôm màu trắng ngà (52g, hiệu suất 97%). MS (MH⁺): *m/z* = 477,3.

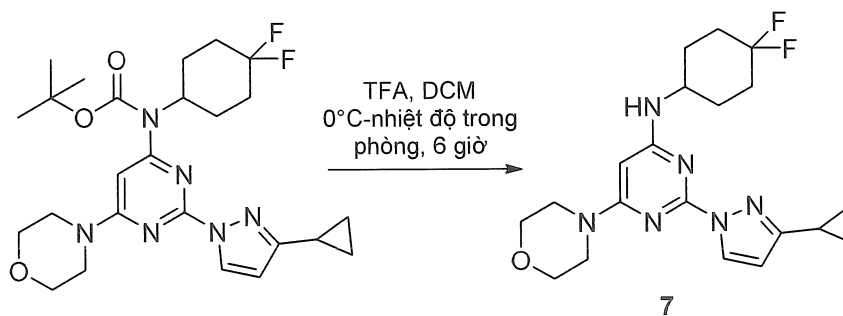
Bước 5:



Bình đáy tròn có một cổ, dung tích 100ml, được nối với thiết bị ngưng tụ hồi lưu được trang bị bộ điều chỉnh lượng khí nitơ dạng ống hình chữ U ở đầu vào-đầu ra được nạp đầy dầu, thanh khuấy đã phủ teflon (2cm), được nạp dung dịch chứa hợp chất tert-butyl (4,4-difloxyclohexyl)(2-(metylsulfonyl)-6-morpholinopyrimidin-4-yl)carbamate (0,9g, 1,88mmol) trong axetonitril (10ml), sau đó nạp 3-xyclopropyl-1H-pyrazol (0,3g, 2,83mmol, 1,5 đương lượng) và xesi cacbonat (1,23g, 3,77mmol, 2,0 đương lượng). Hỗn hợp phản ứng được gia nhiệt ở nhiệt độ 80°C trong 16 giờ, và sự kết thúc của phản ứng được xác định bằng phương pháp TLC và LCMS. Hỗn hợp

phản ứng được lọc và phần nước lọc được cô. Sản phẩm thô được tinh chế bằng cách sắc ký cột sử dụng silicagel cỡ 60-120 với etyl axetat-ete dầu mỏ làm hệ dung môi. Chất tách được được làm khô trong chân không để thu được hợp chất tert-butyl (2-(3-xyclopropyl-1H-pyrazol-1-yl)-6-morpholinopyrimidin-4-yl)(4,4-difloxylohexyl) carbamat dưới dạng chất rắn màu trắng ngà (0,8g, 84%). MS (MH⁺): m/z =505.

Bước 6:



Bình đáy tròn được làm khô bằng ngọn lửa, có ba cổ, dung tích 100ml, được trang bị thanh khuấy đã phủ teflon (2cm), một vách ngăn (cổ 1), nút chặn (cổ 3) và bộ điều chỉnh lượng khí nitơ dạng ống hình chữ U ở đầu vào-đầu ra được nạp đầy dầu (cổ 2), được nạp dung dịch tert-butyl (2-(3-xyclopropyl-1H-pyrazol-1-yl)-6-morpholinopyrimidin-4-yl)(4,4-difloxylohexyl)carbamate (1,2g, 1,98mmol, 1 đương lượng) trong diclometan (40ml), sau đó nạp axit trifloaxetic (2,5ml, 32,55mmol, 16,4 đương lượng) ở nhiệt độ 0°C. Hỗn hợp phản ứng được làm ấm từ từ đến nhiệt độ trong phòng và được khuấy ở cùng nhiệt độ này trong 6 giờ. Sự kết thúc của phản ứng được xác định bằng phương pháp TLC và UPLC. Hỗn hợp phản ứng được cô và phần cặn tạo thành được tôi bằng dung dịch natri bicacbonat bão hòa 10%, được chiết bằng etyl axetat (2x100ml), và cô dưới áp suất giảm để thu được sản phẩm thô. Sản phẩm thô này được tinh chế bằng cách sắc ký cột sử dụng silica gel cỡ 60-120, etyl axetat-ete dầu mỏ làm hệ dung môi. Chất rắn tạo thành được làm khô trong chân không để thu được hợp chất 2-(3-xyclopropyl-1H-pyrazol-1-yl)-N-(4,4-difloxylohexyl)-6-morpholinopyrimidin-4-amin có công thức 7 (0,73g, 90%). MS (MH⁺): m/z=405. Số liệu phân tích: ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ 8,39 (d, *J* = 2,4 Hz, 1H), 7,08 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H), 6,14 (d, *J* = 2,80 Hz, 1H), 5,53 (s, 1H), 3,88 (s, 1H), 3,69-3,67 (m, 4H), 3,50 (m, 4H), 1,99-1,90 (m, 7H), 1,56-1,54 (m, 2H), 0,93-0,89 (m, 2H), 0,72-0,71 (m, 2H).

Thử nghiệm sinh học

Hoạt tính sinh học được xác định như sau. Dòng ion qua các kênh K^+ được hoạt hóa bằng ion Ca^{2+} dẫn truyền mức độ nhỏ (kênh SK, kiểu phụ 2) được xác định bằng cách sử dụng cấu hình tế bào toàn phần của kỹ thuật kẹp ráp nối (patch-clamp) trong thiết bị kẹp ráp nối bằng cách sử dụng các tế bào nuôi cấy mô HEK293 biểu hiện kênh SK2 như được mô tả trong tài liệu: Hougaard et al., British Journal of Pharmacology 151, 655 – 665, May 8, 2007, toàn bộ nội dung của tài liệu này được đưa vào đây để tham khảo. Theo một khía cạnh, một hợp chất được xác định là chất điều biến biến cấu dương (Positive Allosteric Modulator: PAM) nếu hợp chất đó làm tăng dòng trong thử nghiệm này, ví dụ, nếu giá trị SC_{100} của hợp chất này là nhỏ hơn hoặc bằng $10\mu M$ như được xác định bằng thử nghiệm này. Giá trị SC_{100} được xác định là nồng độ của hợp chất làm tăng dòng cơ sở lên 100%.

Giá trị SC_{100} được thể hiện trong Bảng 1.

Chuột đực Sprague Dawley được cho sử dụng chất dẫn thuốc, hoặc hợp chất có công thức 1 với liều 10 hoặc 30 mg/kg qua đường miệng trước khi tiêm harmalin 30 phút để đánh giá hiệu quả điều trị của hợp chất có công thức 1 đối với chứng run do harmalin gây ra. Ngay sau khi tiêm harmalin, các con chuột được cho vào thiết bị định lượng mức độ run và số lần run được đếm trong 60 phút. Tín hiệu của sự run được tạo ra khi dải chất dẫn truyền là kim loại ở mức nhỏ được làm khớp với chân trước bên phải của chuột di chuyển trong trường điện từ được tạo ra bởi anten vòng trong thiết bị thử nghiệm. Tín hiệu ra từ bộ khuếch đại được số hóa với tỷ lệ lấy mẫu ở 1000Hz và tín hiệu này được xử lý và phân tích bằng cách sử dụng chương trình phần mềm LabView (National Instruments). Để làm giảm đến mức tối thiểu tín hiệu từ hành động vận động bằng chân mút và liếm lông, tín hiệu này được lọc bằng bộ lọc sự vận động không trọng lượng trung bình trong 128-mili giây, và các lần run với biên độ $> 0,5V$ và kéo dài > 300 mili giây theo thời gian được đếm làm một lần run. Các số liệu được phân tích trong các bin là một phút trong khoảng thời gian thử nghiệm và được thể hiện dưới dạng tổng số lần run trong tổng thời gian thử nghiệm là 60 phút. Như được thể hiện trên Fig.1, quan sát được sự ức chế đáng kể số lần run với liều 30 mg/kg của hợp chất có công thức 1.

Tác dụng làm giảm chứng run của hợp chất có công thức 1 cũng đã được chứng minh bởi kết quả xác định tần xuất run của toàn bộ cơ thể bằng gia tốc kế kiểu tầm lực.

Chứng run của toàn bộ cơ thể được xác định bằng thiết bị theo dõi chứng run San Diego Instruments (San Diego, California, Mỹ). Các con chuột được điều trị sơ bộ bằng hợp chất có công thức 1 với liều 3, 10, hoặc 30 mg/kg qua đường miệng 30 phút trước khi sử dụng harmalin với liều qua đường trong màng bụng. Chứng run được xác định trong 30 phút sau khi sử dụng harmalin, và các số liệu được phân tích bằng phương pháp chuyển dạng Fourier nhanh và kết quả được thể hiện dưới dạng phổ công suất theo tần số. Harmalin làm tăng đáng kể phổ công suất trong dải tần số nằm trong khoảng từ 10 đến 14Hz. Trong khoảng này, cả ba liều 3, 10, và 30 mg/kg đều làm giảm đáng kể chứng run. Các số liệu được phân tích thêm bằng cách tính tỷ lệ % khả năng vận động (percent Motion Power: %MP), được xác định theo công suất trong dải tần số nằm trong khoảng từ 9 đến 13Hz chia cho tổng công suất trong toàn bộ phổ (0 – 30Hz) nhân với 100. Bằng phép phân tích này, liều 3, 10, và 30 mg/kg làm giảm đáng kể chứng run do harmalin gây ra (harmalin + chất dẫn thuốc (n=13); harmalin + hợp chất có công thức 1 với liều 3 mg/kg (n=8), $P<0,01$; hợp chất có công thức 1 với liều 10 mg/kg (n=16) và hợp chất có công thức 1 với liều 30 mg/kg (n=13), tương ứng, $P<0,05$) (Fig.2).

Tóm lại, các số liệu này cho thấy rằng hợp chất có công thức 1 làm giảm đáng kể chứng run do harmalin gây ra được xác định bằng hai mô hình thử nghiệm khác nhau.

Mức độ mà các hợp chất điều biến kênh SK2 *in vivo* được thể hiện theo tỷ lệ %SK2 SC₁₀₀, là tỷ lệ của nồng độ được chất dạng tự do trong não với hiệu lực xác định được của hợp chất đối với kênh SK2. Tỷ lệ này được tính như sau: $C_{FB} = C_{MB} \times BFF$, trong đó C_{MB} là nồng độ của hợp chất được xác định bằng phương pháp sắc ký lỏng-phổ khối từ não được thu hoạch ngay sau khi ghi được hiện tượng run (Bảng 1, “Nồng độ trong não xác định được”). C_{FB} là lượng hợp chất tự do không được tạo phức với protein và do đó không tiếp xúc với kênh SK2 (Bảng 1, “Nồng độ trong não ở dạng tự do theo lý thuyết”). BFF là tỷ lệ dạng tự do trung bình của hợp chất khi được xác định bằng phương pháp thẩm tách cân bằng trong các thử nghiệm riêng biệt

(nồng độ hợp chất thử nghiệm 1 μM được ủ trong dịch đồng thể mô não chuột 10% trong 5 giờ ở nhiệt độ 37°C) (Bảng 1, “tỷ lệ dạng tự do trong não”). Dược chất dạng tự do trong não có thể tương tác với kênh SK2 (C_{FB}) thu được bằng cách nhân tổng nồng độ trong não xác định được (C_{MB}) với tỷ lệ dạng tự do trung bình (BFF).

Sau đó, lượng hợp chất tự do được thể hiện theo hiệu lực của hợp chất này đối với kênh SK2 như sau: $\%SK2\ SC_{100} = C_{\text{FB}} / SK2\ SC_{100} \times 100$, trong đó SK2 SC_{100} (Bảng 1, “SK2 SC_{100} ”) là giá trị hiệu lực xác định được của hợp chất đối với kênh SK2 và $\%SK2\ SC_{100}$ (Bảng 1, “ $\%SK2\ SC_{100}$ ”) là nồng độ dạng tự do trong não (C_{FB}) được chuẩn hóa với SK2 SC_{100} . Các giá trị được thể hiện trong Bảng 1.

Bảng 1

Hợp chất	Liều có hiệu quả ở mức tối thiểu (mg/kg)	Nồng độ trong não xác định được (μM)	Tỷ lệ dạng tự do trong não xác định được	Nồng độ dạng tự do trong não theo lý thuyết (μM)	SK2 SC_{100} xác định được (μM)	Tỷ lệ % SK2 SC_{100} theo lý thuyết
1	30	1,3	0,065	0,08	0,5	16

Hiệu quả đối với tính không đều về sự phát ra dòng điện của tế bào Purkinje trong các lát cắt *Ex Vivo* từ chuột chuyển gen SCA2 58Q

Trong các lát cắt tiểu não từ chuột SCA2 58Q, các tế bào thần kinh Purkinje có sự phát ra dòng điện không ổn định, có thể xác định theo sự tăng hệ số biến thiên của khoảng thời gian đỉnh (ISI CV), kết quả về tính đều của khoảng thời gian phát ra dòng điện giữa các điện thế tác động. Sự khác biệt về ISI CV giữa chuột kiểu dại (N=8) và SCA2 58Q (N=11) được thể hiện trên Fig.3 ($P < 0,005$). Việc thực hiện tiếp theo cũng được thể hiện với hợp chất có công thức 1 với liều 1 (N=11) hoặc 3 μM (N=10) làm đảo ngược một phần sự tăng giá trị ISI CV quan sát được trong các lát cắt tiểu não từ chuột SCA2 58Q mười một tháng tuổi ($P < 0,05$). Các số liệu này cho thấy rằng hợp chất có công thức 1 có tác dụng điều hòa sự phát ra dòng điện của tế bào Purkinje bằng cách khôi phục một phần khoảng thời gian đỉnh trong mô hình chuột này mắc chứng mất điều hòa tủy sống-tiểu não.

Đánh giá hiệu quả của hợp chất trong mô hình chuột đi không vững mắc chứng mất điều hòa từng đợt 2 (Episodic Ataxia 2: EA2)

Hợp chất có công thức 1 đã được chứng minh là có hiệu quả trong mô hình động vật thích hợp mắc chứng mất điều hòa di truyền (EA2) và ET (chứng run do harmalin gây ra). Để thử nghiệm xem hợp chất có công thức 1 có thể làm giảm chứng mất điều hòa trong mô hình bệnh hay không, hợp chất này được đánh giá trong mô hình chuột “đi không vững” EA2. Các con chuột này mắc chứng mất điều hòa cơ bản do tính không đều về sự phát ra dòng điện trong máy tạo nhịp tim của tế bào Purkinje do đột biến mất chức năng trong kênh P/Q Ca^{2+} (chính protein này được đột biến trong SCA6), gây ra chứng mất điều hòa từng đợt 2 (EA2). Các con chuột được đánh giá trong thiết bị có nền dạng thanh song song để đếm tự động số lần chân động vật trượt qua các thanh kim loại cách đều nhau và tổng khoảng cách chuột di chuyển. Sau đó, chứng mất điều hòa cơ sở được thể hiện dưới dạng tỷ lệ mất điều hòa, tỷ lệ này là tổng số lần trượt chân chia cho tổng khoảng cách di chuyển của chuột tính theo cm. Sự tăng tỷ lệ mất điều hòa giữa chuột kiểu dại và chuột EA2 được thể hiện trên Fig.4.

Trong nghiên cứu này, chuột EA2 (8-10 tháng tuổi; n=18) được tiêm hợp chất có công thức 1 hoặc chất dẫn thuốc qua đường trong màng bụng 30 phút trước khi được đưa vào thiết bị có nền dạng thanh song song. Các con chuột được đánh giá trong mô hình nghiên cứu chéo với mỗi con chuột được cho sử dụng cả chất dẫn thuốc và hợp chất có công thức 1 với liều 10 mg/kg. Khoảng thời gian ngừng sử dụng các liều của hợp chất là ba ngày. Với liều được sử dụng trong nghiên cứu này, quan sát được hợp chất có công thức 1 làm đảo ngược hoàn toàn sự tăng tỷ lệ mất điều hòa ở chuột EA2 so với chuột kiểu dại. Các số liệu này cho thấy rằng hợp chất có công thức 1 khôi phục đặc tính bình thường trong phép đo này về chức năng vận động bình thường trong mô hình chứng mất điều hòa di truyền tiểu não.

Các lợi thế so sánh

Các nghiên cứu sau đây chứng minh các lợi thế kỹ thuật khác của các hợp chất theo sáng chế.

Các thử nghiệm về độ tan trong nước (độ tan động học) của các hợp chất được

thực hiện trong nước muối đệm phosphat (độ pH = 7,4) được xác định bằng phương pháp bình lắc. Trong thử nghiệm này, dung dịch gốc DMSO của hợp chất thử nghiệm được cho vào dung dịch đệm, sau đó làm cân bằng (lắc), lọc và xác định lượng hòa tan bằng phương pháp HPLC-UV. Các điều kiện được sử dụng trong thử nghiệm này được tóm tắt dưới đây. Các kết quả được thể hiện trong Bảng 2 và Bảng 3.

- Nồng độ hợp chất: 200 μ M với DMSO 1% (n=2)
- Dung dịch đệm: hệ chất đệm phosphat 0,05M, độ pH = 7,4
- Khoảng thời gian làm cân bằng: 16 giờ ở nhiệt độ trong phòng (~23°C) kèm theo khuấy

- Chuẩn bị mẫu: lọc
- Phép phân tích: HPLC-UV
- Các hợp chất tham chiếu: Cafein (độ tan cao) và diethylstilbestrol (độ tan thấp)

Việc lập profin tính ổn định chuyển hóa của các hợp chất được thực hiện trong vi thể gan. Trong thử nghiệm này, hợp chất thử nghiệm được ủ với vi thể gan với sự có mặt của NADPH trong 2 thời điểm ở nhiệt độ 37°C. Khi kết thúc quá trình ủ, hỗn hợp phản ứng được tôi bằng axetonitril chứa chất chuẩn nội và lượng còn lại của hợp chất gốc được xác định bằng phương pháp LC-MS/MS. Các điều kiện được sử dụng trong thử nghiệm này được tóm tắt dưới đây. Các kết quả được thể hiện trong Bảng 2.

- Thời gian ủ: 0 và 30 phút ở độ pH = 7,4, nhiệt độ 37°C
- Nồng độ thử nghiệm: 1 μ M trong DMSO 0,02% ở độ pH = 7,4 (n=2)
- Nồng độ NADPH trong thử nghiệm: 1mM
- Nồng độ protein trong vi thể gan trong thử nghiệm: 0,5mg/ml
- Phép phân tích: LC-MS/MS
- Số liệu được thông báo: tỷ lệ % hợp chất gốc còn lại (%PCR)
- Các hợp chất tham chiếu về độ thanh thải cao và thấp được sử dụng
- Các loài được thử nghiệm: chuột nhắt, chuột thường, chó, khỉ, và người

Các hợp chất được mô tả ở đây được thử nghiệm về mức độ ức chế CYP so với 5 thể đồng dạng (3A4, 2D6, 2C9, 2C19 và 1A2). Trong thử nghiệm này, các cơ chất đặc hiệu với thể đồng dạng CYP được ủ với vi thể gan của người (human liver microsome: HLM) với sự có mặt của các hợp chất thử nghiệm, và sự tạo ra chất chuyển hóa được xác định. Tỷ lệ % ức chế sự tạo ra chất chuyển hóa với nồng độ khác

nhau của các hợp chất thử nghiệm được tính toán và nồng độ IC₅₀ được xác định. Các điều kiện được sử dụng trong thử nghiệm được tóm tắt dưới đây. Các kết quả được thể hiện trong Bảng 2.

- Nồng độ của dược chất thử nghiệm (chất ức chế): 8 nồng độ khác nhau (từ 100 μ M đến 0,005 μ M)

- Chất nền: vi thể gan của người (Invitrogen, life technologies)

- Cơ chất dò đặc hiệu sẽ được sử dụng đối với các thể đồng dạng được thể hiện dưới đây:

- CYP3A4: Midazolam

- CYP2D6: Bufuralol

- CYP2C9: Diclofenac

- CYP2C19: Mephynitoin

- CYP1A2: Phenacetin

- Đồng yếu tố: NADPH (nồng độ cuối 1mM trong thử nghiệm)

- Phép phân tích mẫu: LC-MS/MS (các chất chuyển hóa)

- Các chất ức chế tham chiếu cụ thể được đưa vào tất cả các thử nghiệm (Ketoconazole/Quinidine/Sulphaphenazole/Ticlopidine/Furafylline)

- Chất đệm: chất đệm kali phosphat (100mM), độ pH = 7,4

- Nồng độ DMSO trong thử nghiệm: 0,1%

- Phân tích số liệu: tỷ lệ % ức chế so với đối chứng

Các hợp chất được thử nghiệm trong thử nghiệm hERG kênh kali ở tim. hERG gây ra dòng chính lưu được làm trễ nhanh (I_{Kr}) trong tâm thất của người. Sự ức chế dòng I_{Kr} là nguyên nhân phổ biến nhất của sự kéo dài khả năng hoạt động của tim do các dược chất không phải được chất điều trị bệnh tim. Ví dụ, xem tài liệu: Brown, A.M. and Rampe, D. (2000). Drug-induced long QT syndrome: is HERG the root of all evil? Pharmaceutical News 7, 15-20.

Các tế bào HEK-293 được chuyển nhiễm ổn định với cADN hERG. Các thể chuyển nhiễm ổn định được chọn lọc bằng cách đồng biểu hiện với gen kháng G418 được kết hợp vào plasmit biểu hiện. Áp suất chọn lọc được duy trì bằng cách đưa G418 vào môi trường nuôi cấy. Các tế bào được nuôi cấy trong môi trường Eagle được cải biến của Dulbecco/hỗn hợp chất dinh dưỡng F-12 (D-MEM/F-12) được bổ

sung huyết thanh bào thai bò 10%, penicillin G natri 100 U/ml, streptomycin sulfat 100 µg/ml và G418 500 µg/ml. Kết quả nuôi cấy tế bào được lưu giữ trong hồ sơ tại phòng thí nghiệm Charles River.

Các tế bào được chuyển đến buồng ghi kết quả và được siêu dung hợp với dung dịch đối chứng là chất dẫn thuốc. Dung dịch pipet dùng cho các lần ghi kết quả của tế bào toàn phần là (thành phần tính theo mM): kali aspartat, 130; MgCl₂, 5; EGTA, 5; ATP, 4; HEPES, 10; độ pH được điều chỉnh đến 7,2 bằng KOH. Dung dịch pipet được điều chế theo mẻ, tạo phân phân ước, được bảo quản đông lạnh, và phân phân ước mới được rã đông mỗi ngày. Ống pipet ráp nối được tạo ra từ ống mao dẫn thủy tinh bằng cách sử dụng dụng cụ kéo vi pipet P-97 (Sutter Instruments, Novato, CA). Bộ khuếch đại kẹp ráp nối có bán trên thị trường được sử dụng để ghi kết quả của tế bào toàn phần. Trước khi số hóa, kết quả dòng được lọc thông thấp với tỷ lệ một phần năm tần số lấy mẫu.

Mức độ ức chế sự khởi phát và trạng thái ổn định của dòng hERG được xác định bằng cách sử dụng kiểu xung với biên độ cố định (điều chỉnh xung sớm: +20 mV trong 2 giây; xung thử nghiệm: -50mV trong 2 giây) được lặp lại ở mỗi thời điểm cách nhau 10 giây, từ điện thế duy trì bằng -80mV. Dòng đỉnh cuối được xác định bằng cách sử dụng bước 2 giây với xung -50 mV.

Sử dụng một nồng độ của sản phẩm thử nghiệm với mỗi tế bào ($n = 3$). Dòng đỉnh được xác định trong khi tiến hành thử nghiệm. Trạng thái ổn định được duy trì trong ít nhất 30 giây trước khi sử dụng sản phẩm thử nghiệm hoặc đối chứng dương. Dòng đỉnh được xác định cho đến khi đạt được trạng thái ổn định mới. Các kết quả được thể hiện trong Bảng 2.

Thu được số liệu về độ sinh khả dụng qua đường miệng ở chuột như sau. Các kết quả được thể hiện trong Bảng 2.

- Chủng/giới tính của chuột: Sprague Dawley/chuột đực
- Tuổi/trọng lượng cơ thể: từ 6 đến 8 tuần/250-300g
- Số lượng chuột trong mỗi nhóm: $n=3$
- Tổng số nhóm: 2 (1mpk qua đường IV và 10mpk qua đường PO)
- Đường sử dụng: đường miệng (PO)/trong tĩnh mạch (IV)
- Thể tích dùng liều: trong tĩnh mạch (2ml/kg) & đường miệng (10ml/kg)

- Dạng bào chế của chất dẫn thuốc: dạng bào chế chuẩn hoặc được đề xuất bởi nhà cung cấp

Mức liều dùng (qua đường IV và đường miệng): 1mg/kg; trong tĩnh mạch và 10mg/kg; qua đường miệng hoặc như được đề xuất

- Khi đói/no: việc dùng liều qua đường miệng sẽ được thực hiện với động vật bị nhịn đói qua đêm

Tần suất dùng liều: một liều

- Các thời điểm lấy máu: (57 mẫu huyết tương để phân tích)

- Sử dụng qua đường IV – 10 thời điểm (trước khi dùng liều; 5 phút; 15 phút; 30 phút; 1 giờ; 2 giờ; 4 giờ; 6 giờ; 8 giờ; 24 giờ) [n=3 con chuột]

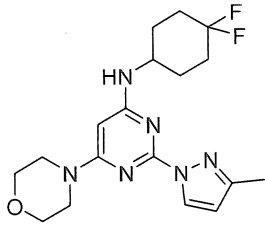
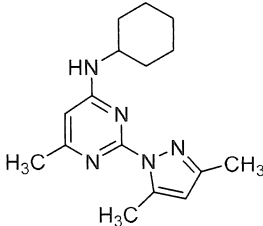
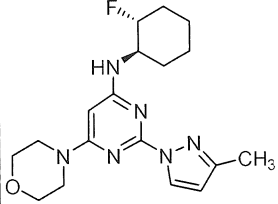
- Sử dụng qua đường PO – 9 thời điểm (trước khi dùng liều; 15 phút; 30 phút; 1 giờ; 2 giờ; 4 giờ; 6 giờ; 8 giờ; 24 giờ) [n=3 con chuột]

- Lấy mẫu máu: ống thông tĩnh mạch cổ

- Chất chống đông: K2 EDTA 0,2%

- Phân tích mẫu bằng phương pháp phân tích sinh học loại phát hiện được phát triển để ước tính lượng hợp chất thử nghiệm trong huyết tương bằng cách sử dụng hệ LC-MS/MS.

Bảng 2

	 Hợp chất có công thức 1	 Hợp chất so sánh A	 Hợp chất so sánh B
Hiệu lực đối với SK2 (SC ₁₀₀) ^a	400nM	1380nM	5800nM
Tỷ lệ dạng tự do trong não ^a	6,1%	1,2%	không xác định
Độ tan động học	0,074	0,017	không xác định

(mg/ml)				
Độ ổn định trong vi thể gan [†]	Chuột nhất	47%	1%	không xác định
	Chuột thường	60%	1%	không xác định
	Chó	54%	2%	không xác định
	Khỉ	46%	1%	không xác định
	Người	84%	50%	không xác định
Nồng độ ức chế đối với Cyp1A2 (IC ₅₀)		> 10uM	640nM	không xác định
Nồng độ ức chế đối với Cyp3A4 (IC ₅₀)		> 10uM	> 10uM	không xác định
Nồng độ ức chế đối với Cyp2D6 (IC ₅₀)		> 10uM	790nM	không xác định
Nồng độ ức chế đối với hERG (IC ₅₀)		> 10uM	> 10uM	không xác định
Độ sinh khả dụng qua đường miệng [§]		81%	5%	không xác định

SC₁₀₀ = nồng độ tạo ra sự gấp đôi của dòng trong kênh

^a Sự khác biệt nhỏ về số lượng khi so sánh với bảng trước đó do sự khác biệt không đáng kể về giá trị trung bình thu được từ các thử nghiệm sau đó.

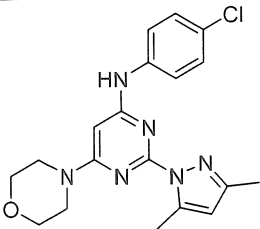
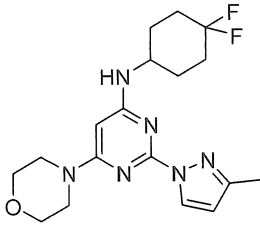
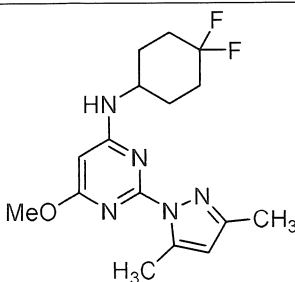
[†] tỷ lệ % còn lại ở thời điểm 1 giờ

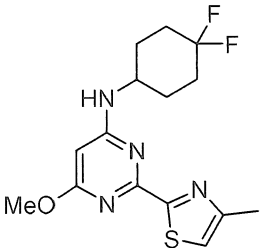
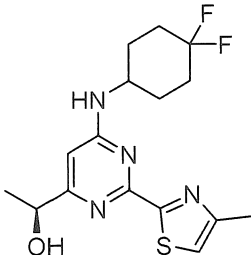
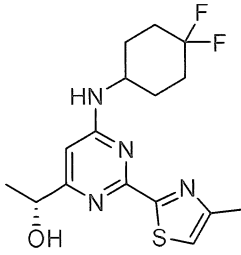
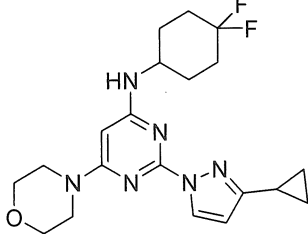
[§] 10 mg/kg qua đường PO, 0,5 mg/kg qua đường IV ở chuột

Như được thể hiện bằng số liệu trong Bảng 2 trên đây, hợp chất có công thức 1

có hiệu lực đối với SK2 cao hơn 3 lần so với hợp chất so sánh A và có hiệu lực đối với SK2 cao hơn 14 lần so với hợp chất so sánh B. Hợp chất có công thức 1 cũng có độ tan tốt hơn, tỷ lệ BFF cao hơn, độ ổn định vi thể cao hơn, và độ sinh khả dụng qua đường miệng cao hơn so với hợp chất so sánh A. Sự cải thiện chung về tỷ lệ BFF và độ tan so với hợp chất so sánh A và hợp chất so sánh C là dẫn xuất phenyl cũng được chứng minh so với các hợp chất được mô tả ở đây như được thể hiện trong Bảng 3. Hợp chất có công thức 1 được sao chép lại từ phần trên đây để dễ so sánh.

Bảng 3

	Tỷ lệ dạng tự do trong não	Độ tan động học (mg/ml)
 Hợp chất so sánh C	0,16%	0,001
 Hợp chất có công thức 1	6,1%	0,074
 Hợp chất có công thức 2	2,76%	0,031

 Hợp chất có công thức 3	2,69%	0,0709
 Hợp chất có công thức 5	4,20%	0,0803
 Hợp chất có công thức 6	4,31%	0,0667
 Hợp chất có công thức 7	1,55%	0,0497

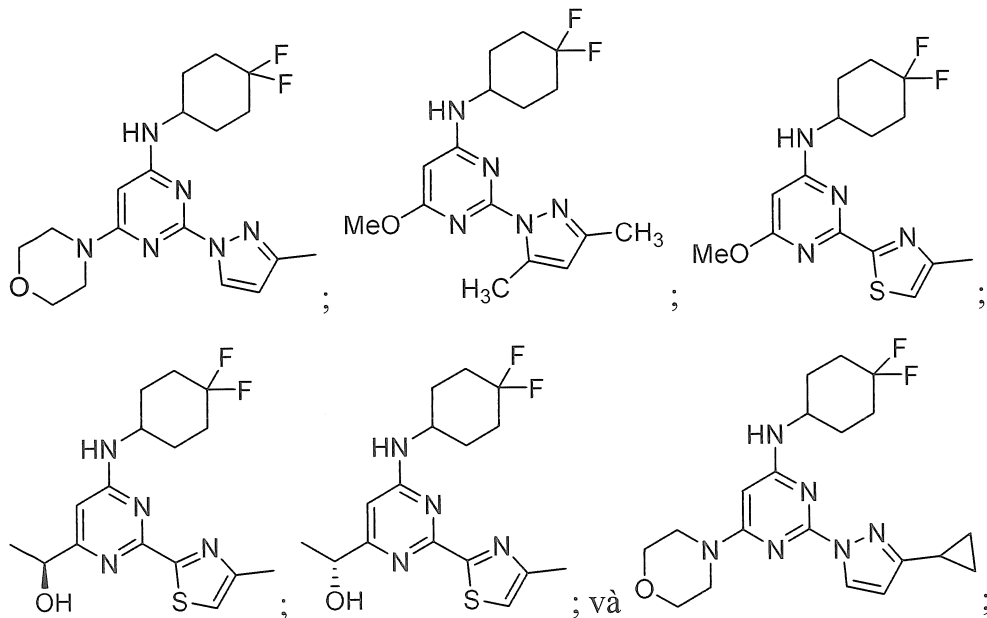
Trong khi nhiều phương án của sáng chế đã được mô tả, rõ ràng là các ví dụ cơ bản của sáng chế có thể được thay đổi để tạo ra các phương án khác để sử dụng các hợp chất và phương pháp theo sáng chế này. Do đó, cần hiểu rằng phạm vi của sáng chế này sẽ được xác định bởi phần yêu cầu bảo hộ kèm theo chứ không phải các phương án cụ thể đã được thể hiện bằng cách ví dụ.

Nội dung của tất cả các tài liệu viện dẫn (bao gồm cả các tài liệu chuyên ngành, Bằng độc quyền sáng chế, đơn đăng ký sáng chế đã công bố, và đơn đăng ký sáng

chế) được nêu trong toàn bộ đơn sáng chế này được kết hợp rõ ràng vào đây để tham khảo toàn bộ nội dung của chúng. Trừ khi được định nghĩa theo cách khác, tất cả các thuật ngữ khoa học và kỹ thuật được sử dụng ở đây có nghĩa như thường được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này.

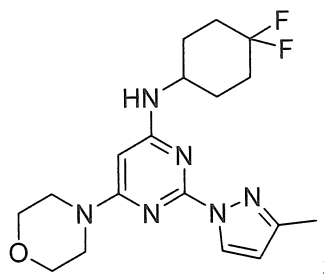
YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Hợp chất có công thức:



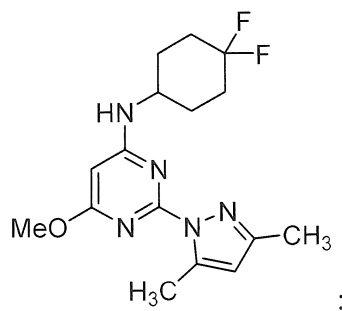
hoặc muối được dụng của nó.

2. Hợp chất theo điểm 1, trong đó hợp chất này có công thức:



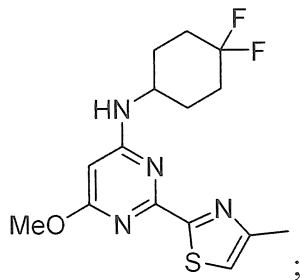
hoặc muối được dụng của nó.

3. Hợp chất theo điểm 1, trong đó hợp chất này có công thức:



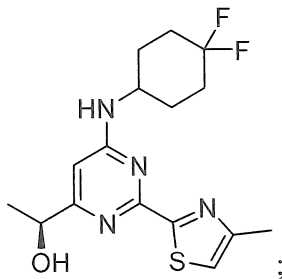
hoặc muối được dụng của nó.

4. Hợp chất theo điểm 1, trong đó hợp chất này có công thức:



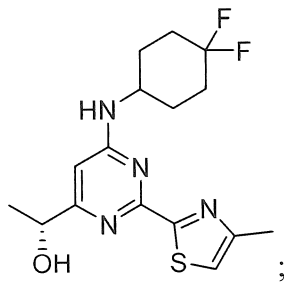
hoặc muối được dụng của nó.

5. Hợp chất theo điểm 1, trong đó hợp chất này có công thức:



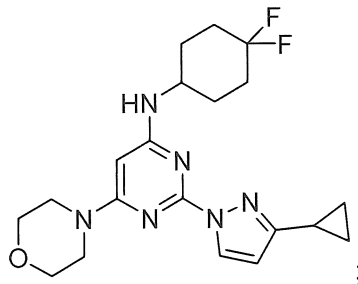
hoặc muối được dụng của nó.

6. Hợp chất theo điểm 1, trong đó hợp chất này có công thức:



hoặc muối được dụng của nó.

7. Hợp chất theo điểm 1, trong đó hợp chất này có công thức:



hoặc muối được dụng của nó.

8. Dược phẩm chứa hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7, hoặc muối dược dụng của nó; và chất mang dược dụng.

FIG. 1

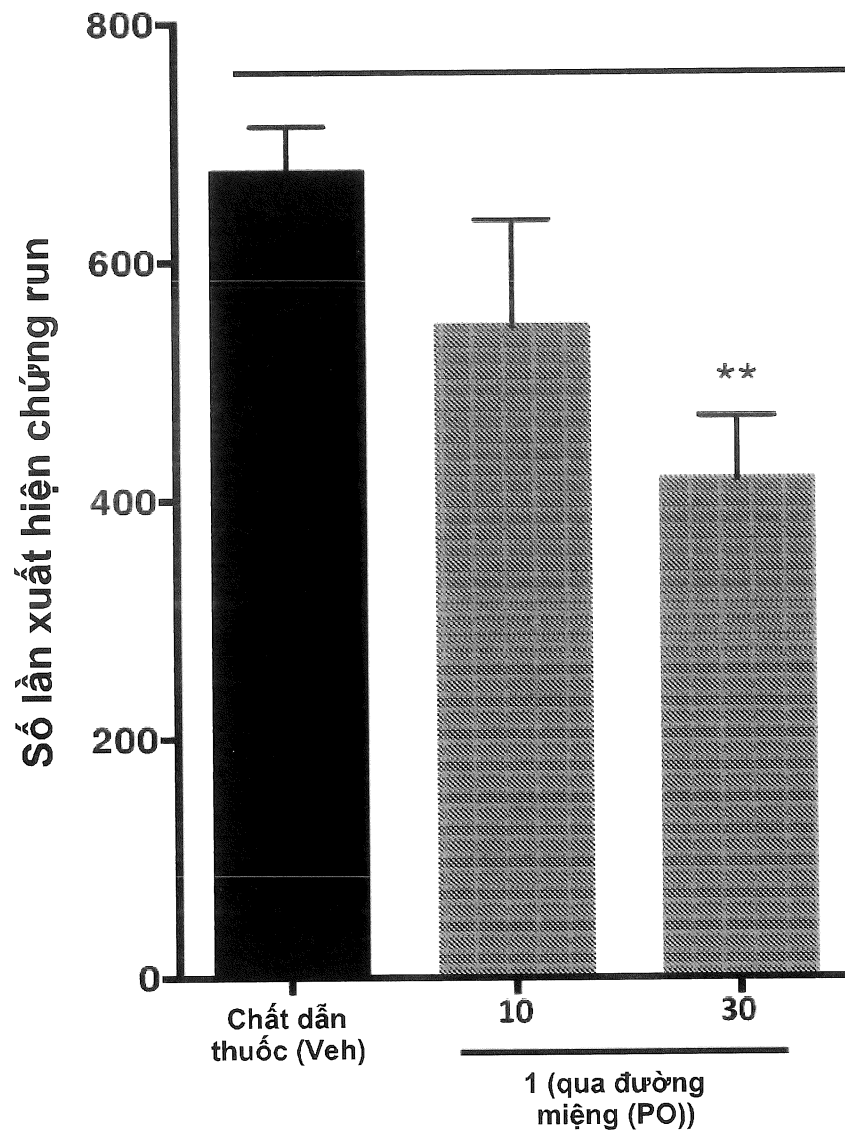
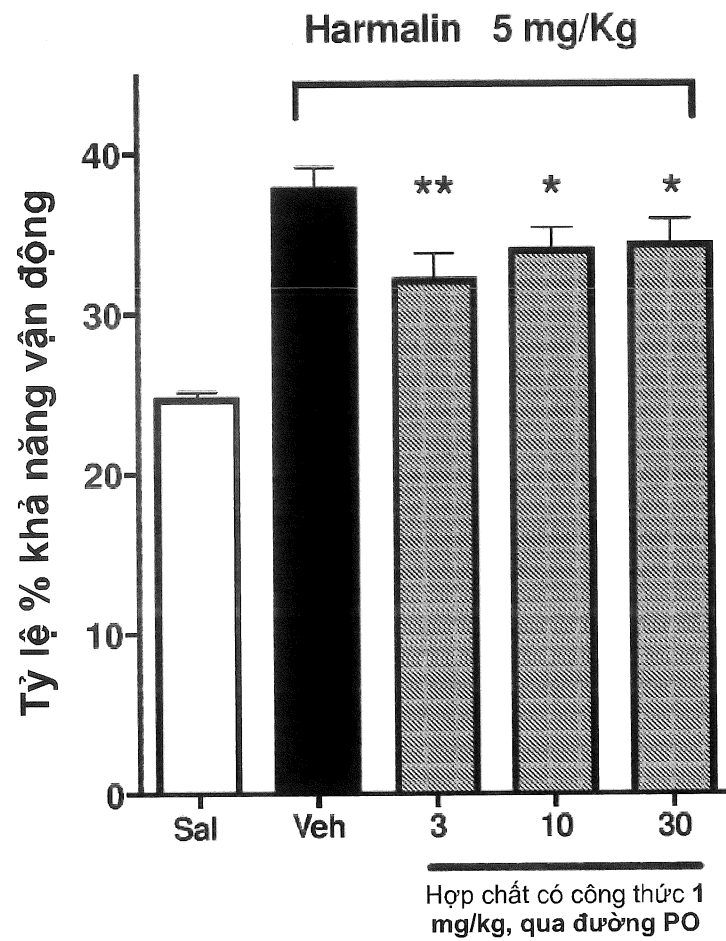


FIG. 2



* $p < 0,05$, thử nghiệm T

** $p < 0,01$, thử nghiệm T

FIG. 3

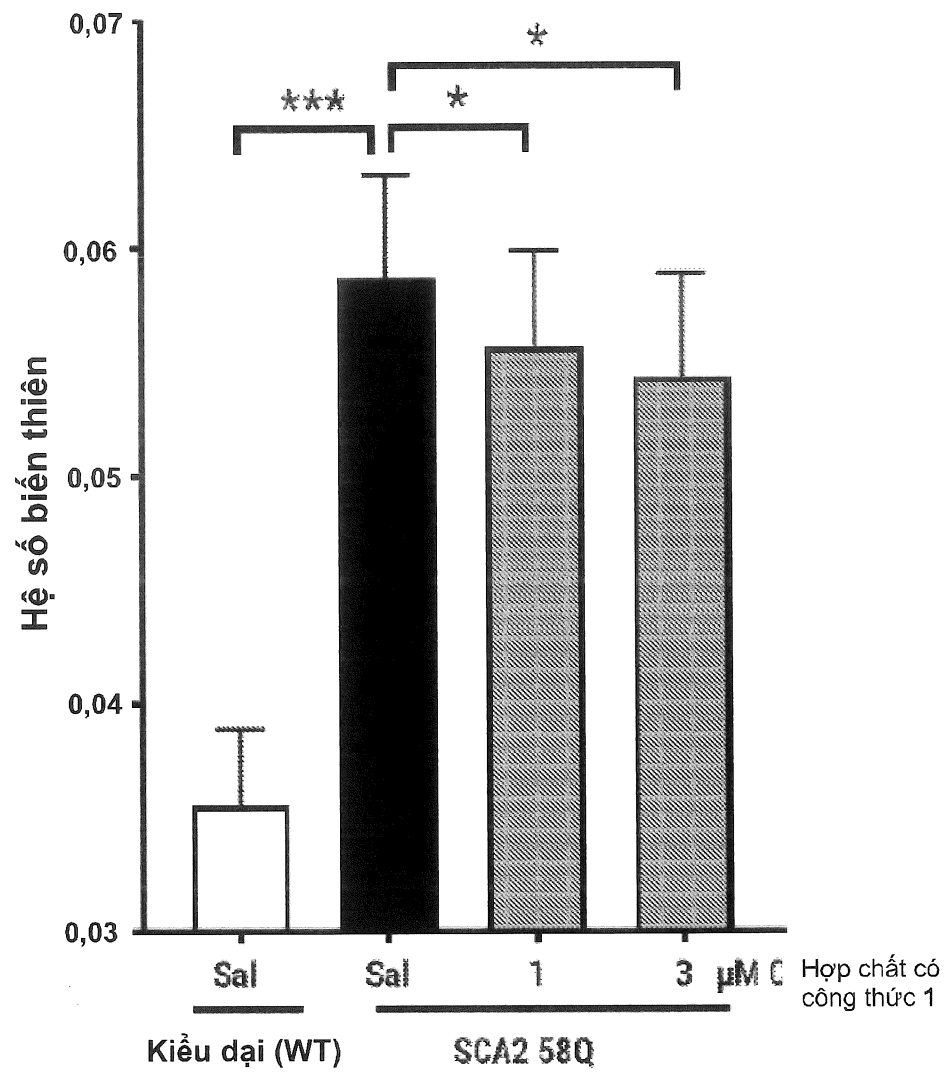
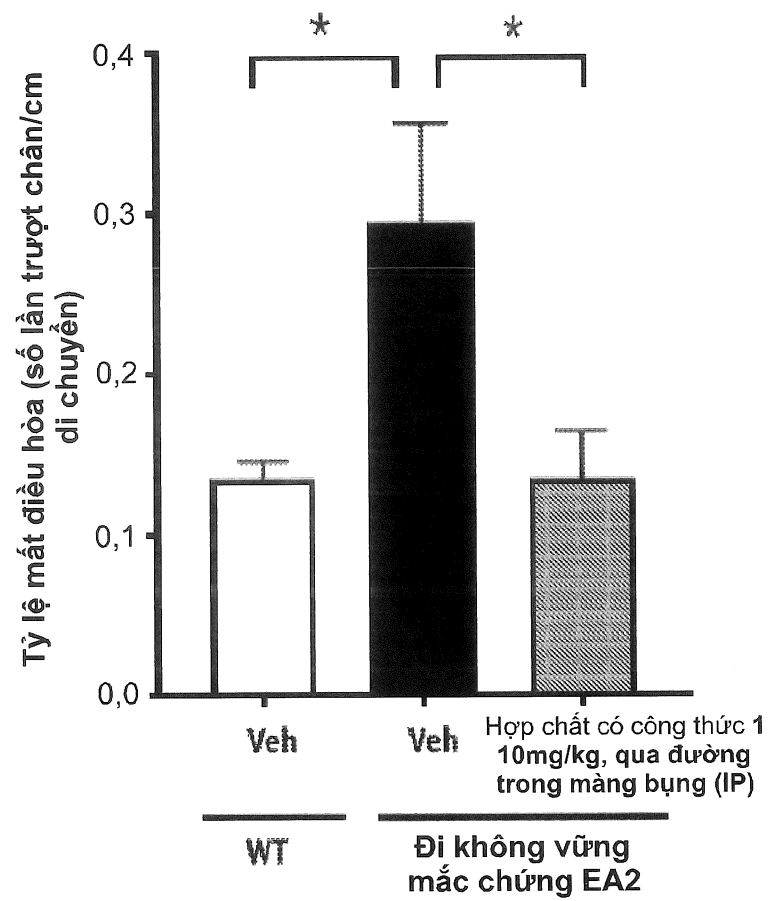
*** $P < 0,005$ * $P < 0,05$

FIG. 4



* $p < 0,05$, thử nghiệm T