



(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)



1-0042397

(51)^{2020.01} A61K 31/4439; A61P 9/04; C07D
213/00; A61P 3/10

(13) B

(21) 1-2021-01790

(22) 29/08/2019

(86) PCT/US2019/048788 29/08/2019

(87) WO2020/051058 12/03/2020

(30) 62/726,520 04/09/2018 US

(45) 27/01/2025 442

(43) 25/06/2021 399

(73) ELI LILLY AND COMPANY (US)

Lilly Corporate Center, Indianapolis, Indiana 46285, United States of America

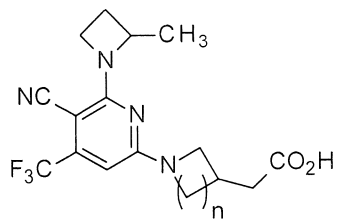
(72) DURHAM, Timothy Barrett (US).

(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) HỢP CHẤT 2,6-DIAMINO PYRIDIN, DƯỢC PHẨM CHỨA HỢP CHẤT NÀY
VÀ QUY TRÌNH BẢO CHẾ DƯỢC PHẨM

(21) 1-2021-01790

(57) Sáng chế đề xuất hợp chất có công thức I:



hoặc muối dược dụng của nó, để điều trị các tình trạng chuyển hóa, như bệnh tiểu đường typ 2, bệnh suy tim, bệnh thận do tiểu đường, và bệnh viêm gan nhiễm mỡ không do rượu. Sáng chế còn đề xuất dược phẩm chứa hợp chất này và quy trình bào chế dược phẩm.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến các hợp chất ức chế ketohexokinaza (ketohexokinase-KHK), được phẩm chứa các hợp chất này và việc sử dụng các hợp chất này để điều trị các tình trạng chuyển hóa nhất định, như bệnh tiểu đường typ 2 (type 2 diabetes mellitus-T2DM), bệnh suy tim, bệnh thận do tiểu đường và bệnh viêm gan nhiễm mỡ không do rượu (non-alcoholic steatohepatitis - NASH).

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Hội chứng chuyển hóa thường được định nghĩa là một nhóm các tình trạng phản ánh qua dinh dưỡng và lối sống ít vận động và các biểu hiện của nó bao gồm T2DM, bệnh gan nhiễm mỡ không do rượu (non-alcoholic fatty liver disease - NAFLD), bệnh béo phì, rối loạn lipid máu, bệnh suy tim và bệnh thận.

T2DM được đặc trưng bởi sự thiếu hụt insulin tương đối do rối loạn chức năng tế bào β tuyến tụy và đề kháng insulin ở các cơ quan đích. Nó chiếm hơn 90% số bệnh nhân mắc bệnh tiểu đường và dẫn đến các biến chứng vi mạch và đại mạch, gây đau khổ về tâm lý và thể chất cho bệnh nhân, đồng thời đặt gánh nặng lớn lên các hệ thống chăm sóc sức khỏe (Davies, M.J., *et al.*; *Lancet*, 389, 2239-2251, 2017).

Bệnh suy tim là hội chứng gây ra bởi những bất thường về cấu trúc hoặc chức năng của tim dẫn đến tăng áp lực trong tim hoặc giảm cung lượng tim khi nghỉ ngơi hoặc khi căng thẳng. Bệnh suy tim là nguyên nhân hàng đầu và ngày càng gia tăng của bệnh tật và tử vong trên toàn thế giới (Teerlink, J.R., *et al.*; *Lancet*, 390, 1981-1995, 2017).

Bệnh thận do tiểu đường phát triển ở gần một nửa số bệnh nhân mắc T2DM và là nguyên nhân hàng đầu của bệnh thận mạn tính trên toàn thế giới. Các thay đổi chuyển hóa liên quan đến bệnh tiểu đường dẫn đến tăng lọc cầu thận, tăng albumin niệu, giảm mức lọc cầu thận và cuối cùng là bệnh thận giai đoạn cuối (Alicic, R.Z., *et al.*; *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.*, 12: 2032-2045, 2017).

NAFLD đại diện cho một loạt bệnh gan có thể dẫn đến NASH tiến triển, xơ hóa, và cuối cùng là ung thư biểu mô tế bào gan và suy gan. Ước tính rằng trong 20 năm tới, NAFLD sẽ trở thành nguyên nhân chính gây ra bệnh tật và tử vong liên quan đến gan cũng như là chỉ định hàng đầu để ghép gan (Bertot, L.C., *et al.*; *Int. J. Mol. Sci.*, 17(5), 774, 2016).

KHK, còn được gọi là fructokinaza, là enzym giới hạn tốc độ liên quan đến chuyển hóa fructoza. Nó xúc tác quá trình phosphoryl hóa fructoza thành fructoza-1-phosphat (F1P), đồng thời gây ra sự suy giảm mức ATP của tế bào. Ngược lại với glucoza, quá trình chuyển hóa fructoza thiếu sự ức chế phản hồi và nó gây ra sự tích tụ các chất trung gian xuôi dòng liên quan đến, ví dụ, quá trình tạo lipid, quá trình tạo glucoza và quá trình phosphoryl hóa oxy hóa (Hannou, S.A., *et al.*; *J. Clin. Invest.*, 128(2), 544-555, 2018). Điều này gây ra những hậu quả tiêu cực về chuyển hóa có liên quan đến một số rối loạn chuyển hóa nghiêm trọng.

KHK tồn tại ở hai dạng tương đồng được nối xen kẽ bao gồm KHK-C và KHK-A khác nhau ở exon 3. KHK-C được biểu hiện chủ yếu ở gan, thận và ruột, trong khi KHK-A phổ biến hơn. Chuột thiếu cả hai dạng tương đồng được bảo vệ hoàn toàn khỏi hội chứng chuyển hóa do fructoza gây ra. Tuy nhiên, các tác dụng chuyển hóa bất lợi càng trầm trọng hơn ở những con chuột chỉ thiếu KHK-A (Ishimoto T, *et al.*; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 109(11), 4320-4325, 2012).

Một số nghiên cứu dịch tễ học và thực nghiệm đã báo cáo rằng việc tiêu thụ fructoza tăng, và chính xác hơn là sự chuyển hóa fructoza tăng, có thể đóng một vai trò quan trọng trong sự phát triển của hội chứng chuyển hóa, đặc biệt trong sự phát triển của T2DM (Softic *et al.*; *J. Clin. Invest.*, 127(11), 4059-4074, 2017), bệnh suy tim (Mirtschink, P., *et al.*; *Eur. Heart J.*, 39, 2497-2505, 2018), bệnh thận do tiểu đường (Cirillo, P., *et al.*; *J. Am. Soc. Nephrol.*, 20, 545-553, 2009) và NAFLD/NASH (Vos, M.B., *et al.*; *Hepatology*, 57, 2525-2531, 2013). Việc ức chế KHK nhắm đích được cho là sẽ hạn chế sự chuyển hóa fructoza và cung cấp các lựa chọn điều trị hiệu quả cho một số rối loạn chuyển hóa.

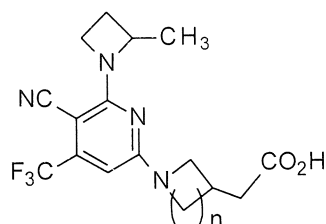
US 2017/0183328 A1 mô tả hợp chất 3-azabicyclo[3.1.0]hexan được thể làm chất ức chế KHK.

Có nhu cầu về các phương pháp điều trị thay thế cho hội chứng chuyển hóa và các chỉ định liên quan bao gồm T2DM, bệnh suy tim, bệnh thận do tiểu đường và

NASH. Đặc biệt, có nhu cầu về các hợp chất có hoạt tính ức chế KHK để cung cấp các phương án điều trị cho các bệnh này. Hơn nữa, có nhu cầu về các chất ức chế KHK hữu hiệu có các đặc tính quan trọng đối với việc sử dụng điều trị ở người, như độ sinh khả dụng qua đường uống và thời gian bán thải đủ để hỗ trợ việc dùng thuốc hàng ngày, hoặc profin tương tác thuốc-thuốc hạn chế.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Do đó, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức I:



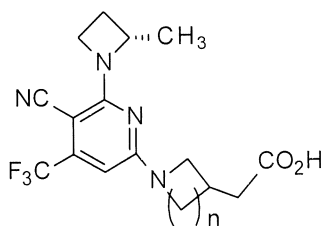
Công thức I

trong đó n là 1 hoặc 2;

hoặc muối dược dụng của nó.

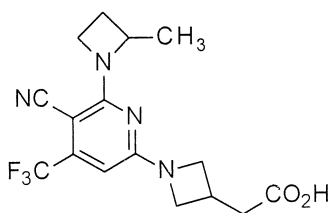
Công thức I bao gồm tất cả các chất đồng phân đối ảnh và các chất đồng phân không đối quang riêng lẻ của chúng, cũng như hỗn hợp của các chất đồng phân đối ảnh và các raxemat.

Theo một phương án cụ thể, hợp chất theo sáng chế là hợp chất có công thức:

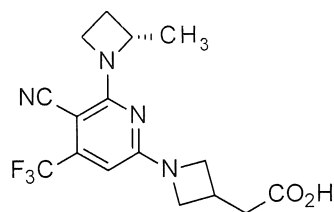


hoặc muối dược dụng của nó.

Theo một phương án, n là 1. Theo phương án này, hợp chất theo sáng chế là hợp chất có công thức:

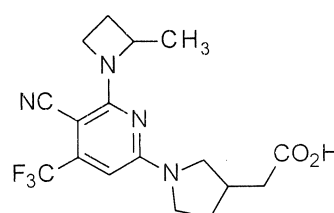


hoặc muối được dụng của nó. Theo một phương án được ưu tiên, hợp chất theo sáng chế là hợp chất có công thức:

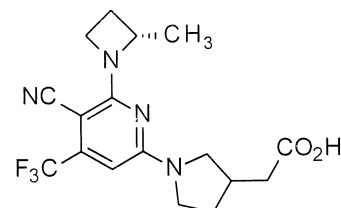


hoặc muối được dụng của nó.

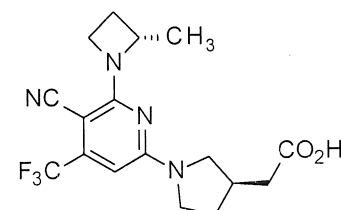
Theo một phương án khác, n là 2. Theo phương án này, hợp chất theo sáng chế là hợp chất có công thức:



hoặc muối được dụng của nó. Theo một phương án được ưu tiên, hợp chất theo sáng chế là hợp chất có công thức:



hoặc muối được dụng của nó. Theo một phương án được ưu tiên khác, hợp chất theo sáng chế là hợp chất có công thức:



hoặc muối được dụng của nó. Theo phương án này, hợp chất theo sáng chế là axit 2-[(3R)-1-[5-xyano-6-[(2S)-2-metylazetidin-1-yl]-4-(triflometyl)-2-pyridyl]pyrolidin-3-yl]axetic hoặc muối được dụng của nó.

Theo một phương án, sáng chế còn mô tả phương pháp điều trị T2DM ở bệnh nhân có nhu cầu điều trị bao gồm việc sử dụng cho bệnh nhân lượng hữu hiệu

của hợp chất có công thức I, hoặc muối được dụng của nó. Theo một phương án được ưu tiên, phương pháp này bao gồm việc sử dụng axit 2-[(3R)-1-[5-xyano-6-[(2S)-2-methylazetidin-1-yl]-4-(triflometyl)-2-pyridyl]pyrolidin-3-yl]axetic, hoặc muối được dụng của nó.

Theo một phương án, sáng chế còn mô tả phương pháp điều trị bệnh suy tim ở bệnh nhân có nhu cầu điều trị bao gồm việc sử dụng cho bệnh nhân lượng hữu hiệu của hợp chất có công thức I, hoặc muối được dụng của nó. Theo một phương án được ưu tiên, phương pháp này bao gồm việc sử dụng axit 2-[(3R)-1-[5-xyano-6-[(2S)-2-methylazetidin-1-yl]-4-(triflometyl)-2-pyridyl]pyrolidin-3-yl]axetic, hoặc muối được dụng của nó.

Theo một phương án, sáng chế còn mô tả phương pháp điều trị bệnh thận do tiểu đường ở bệnh nhân có nhu cầu điều trị bao gồm việc sử dụng cho bệnh nhân lượng hữu hiệu của hợp chất có công thức I, hoặc muối được dụng của nó. Theo một phương án được ưu tiên, phương pháp này bao gồm việc sử dụng axit 2-[(3R)-1-[5-xyano-6-[(2S)-2-methylazetidin-1-yl]-4-(triflometyl)-2-pyridyl]pyrolidin-3-yl]axetic, hoặc muối được dụng của nó.

Theo một phương án, sáng chế còn mô tả phương pháp điều trị NASH ở bệnh nhân có nhu cầu điều trị bao gồm việc sử dụng cho bệnh nhân lượng hữu hiệu của hợp chất có công thức I, hoặc muối được dụng của nó. Theo một phương án được ưu tiên, phương pháp này bao gồm việc sử dụng axit 2-[(3R)-1-[5-xyano-6-[(2S)-2-methylazetidin-1-yl]-4-(triflometyl)-2-pyridyl]pyrolidin-3-yl]axetic, hoặc muối được dụng của nó.

Theo một phương án, sáng chế còn mô tả phương pháp điều trị bệnh thận mạn tính ở bệnh nhân có nhu cầu điều trị bao gồm việc sử dụng cho bệnh nhân lượng hữu hiệu của hợp chất có công thức I, hoặc muối được dụng của nó. Theo một phương án được ưu tiên, phương pháp này bao gồm việc sử dụng axit 2-[(3R)-1-[5-xyano-6-[(2S)-2-methylazetidin-1-yl]-4-(triflometyl)-2-pyridyl]pyrolidin-3-yl]axetic, hoặc muối được dụng của nó.

Theo một phương án, sáng chế còn mô tả phương pháp điều trị bệnh được chọn từ nhóm bao gồm hội chứng chuyển hóa, NAFLD, béo phì, các biến chứng do tiểu đường như bệnh vồng mạc tiểu đường, bệnh tim mạch, bệnh mạch vành hoặc rối loạn lipid máu, ở bệnh nhân có nhu cầu điều trị, bao gồm việc sử dụng cho bệnh

nhân lượng hữu hiệu của hợp chất có công thức I, hoặc muối được dụng của nó. Theo một phương án được ưu tiên, phương pháp này bao gồm việc sử dụng axit 2-[(3R)-1-[5-xyano-6-[(2S)-2-methylazetidin-1-yl]-4-(triflometyl)-2-pyridyl]pyrrolidin-3-yl]axetic, hoặc muối được dụng của nó.

Ngoài ra, theo một phương án, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức I, hoặc muối được dụng của nó, dùng để điều trị bệnh. Theo một phương án cụ thể, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức I, hoặc muối được dụng của nó, dùng để điều trị T2DM. Theo một phương án cụ thể, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức I, hoặc muối được dụng của nó, dùng để điều trị bệnh suy tim. Theo một phương án cụ thể, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức I, hoặc muối được dụng của nó, dùng để điều trị bệnh thận do tiểu đường. Theo một phương án cụ thể, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức I, hoặc muối được dụng của nó, dùng để điều trị NASH. Theo một phương án cụ thể, sáng chế còn đề xuất hợp chất có công thức I, hoặc muối được dụng của nó, dùng để điều trị bệnh thận mạn tính. Theo một phương án, sáng chế còn đề xuất hợp chất có công thức I, hoặc muối được dụng của nó, dùng để điều trị hội chứng chuyển hóa, NAFLD, béo phì, các biến chứng do tiểu đường như bệnh vớng mạc tiểu đường, bệnh tim mạch, bệnh mạch vành hoặc rối loạn lipid máu. Theo một phương án được ưu tiên, hợp chất có công thức I trong các ứng dụng điều trị nêu trên là axit 2-[(3R)-1-[5-xyano-6-[(2S)-2-methylazetidin-1-yl]-4-(triflometyl)-2-pyridyl]pyrrolidin-3-yl]axetic, hoặc muối được dụng của nó.

Ngoài ra, theo một phương án, sáng chế mô tả việc sử dụng hợp chất có công thức I, hoặc muối được dụng của nó, để sản xuất thuốc để điều trị T2DM. Theo một phương án, sáng chế mô tả việc sử dụng hợp chất có công thức I, hoặc muối được dụng của nó, để sản xuất thuốc để điều trị bệnh suy tim. Theo một phương án, sáng chế mô tả việc sử dụng hợp chất có công thức I, hoặc muối được dụng của nó, để sản xuất thuốc để điều trị bệnh thận do tiểu đường. Theo một phương án, sáng chế mô tả việc sử dụng hợp chất có công thức I, hoặc muối được dụng của nó, để sản xuất thuốc để điều trị NASH. Theo một phương án, sáng chế mô tả việc sử dụng hợp chất có công thức I, hoặc muối được dụng của nó, để sản xuất thuốc để điều trị bệnh thận mạn tính. Theo một phương án, sáng chế còn mô tả việc sử dụng hợp chất có công thức I, hoặc muối được dụng của nó, để sản xuất thuốc để điều trị hội chứng chuyển hóa, NAFLD, béo phì, các biến chứng do tiểu đường như bệnh vớng

mạch tiểu đường, bệnh tim mạch, bệnh mạch vành hoặc rối loạn lipit máu. Theo một phương án được ưu tiên, hợp chất có công thức I là axit 2-[(3R)-1-[5-cyano-6-[(2S)-2-methylazetidin-1-yl]-4-(triflormetyl)-2-pyridyl]pyrrolidin-3-yl]axetic, hoặc muối được dụng của nó.

Theo một phương án, sáng chế còn đề xuất được phẩm chứa hợp chất có công thức I, hoặc muối được dụng của nó, với một hoặc nhiều chất mang, chất pha loãng, hoặc tá dược được dụng. Theo một phương án, sáng chế còn đề xuất quy trình bào chế được phẩm bao gồm bước trộn hợp chất có công thức I, hoặc muối được dụng của nó, với một hoặc nhiều chất mang, chất pha loãng, hoặc tá dược được dụng.

Mô tả chi tiết sáng chế

Như được sử dụng trong bản mô tả, các thuật ngữ “điều trị” hoặc “để điều trị” được dùng để chỉ việc hạn chế, làm chậm, làm ngừng lại, hoặc làm đảo ngược sự tiến triển hoặc mức trầm trọng của triệu chứng hoặc rối loạn đã mắc.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "bệnh nhân" dùng để chỉ động vật có vú. Tốt hơn là, bệnh nhân là người.

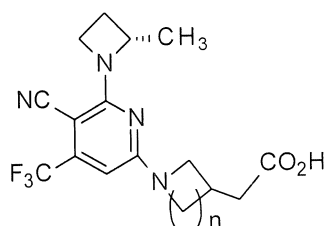
Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “lượng hữu hiệu” được dùng để chỉ lượng hoặc liều của hợp chất có công thức I, hoặc muối được dụng của nó mà, khi cho bệnh nhân dùng liều đơn hoặc đa liều, tạo ra hiệu quả mong muốn ở bệnh nhân được chẩn đoán hoặc điều trị.

Lượng hữu hiệu có thể được xác định bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã biết và bằng cách quan sát kết quả thu được từ những trường hợp tương tự. Khi xác định lượng hữu hiệu đối với bệnh nhân, một số yếu tố có thể được cân nhắc, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở: loại bệnh nhân; kích thước, độ tuổi và thể trạng chung của bệnh nhân; bệnh hoặc rối loạn cụ thể có liên quan; mức độ liên quan hoặc mức độ nghiêm trọng của bệnh hoặc rối loạn này; đáp ứng của từng bệnh nhân; hợp chất cụ thể được sử dụng; phương thức sử dụng; các đặc tính sinh khả dụng của dạng bào chế được sử dụng; chế độ liều lượng được áp dụng; việc sử dụng các biện pháp y học đồng thời khác; và các tình trạng có liên quan khác. Hợp chất theo sáng chế là hữu hiệu với liều mỗi ngày nằm trong khoảng từ 0,1 đến 15 mg/kg thể trọng.

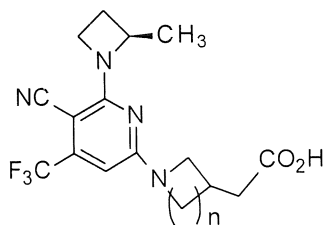
Hợp chất theo sáng chế được bào chế thành dược phẩm để sử dụng theo đường bất kỳ mà làm cho hợp chất này sinh khả dụng. Tốt hơn là, các dược phẩm này là để dùng theo đường miệng. Các dược phẩm như vậy và các quy trình bào chế chúng là đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này (xem, ví dụ, Remington, J. P., “*Remington: The Science and Practice of Pharmacy*”, L.V. Allen, Editor, 22nd Edition, Pharmaceutical Press, 2012).

Các hợp chất có các công thức I và các muối dược dụng của chúng là đặc biệt hữu dụng trong các phương pháp điều trị của sáng chế, với một số cấu hình là được ưu tiên. Danh sách các hợp chất theo sáng chế sau đây mô tả các cấu hình như vậy. Cần phải hiểu rằng những ưu tiên này có thể áp dụng cho các hợp chất theo sáng chế, cũng như các phương pháp điều trị, các ứng dụng điều trị bệnh và các dược phẩm.

Các hợp chất của sáng chế bao gồm:



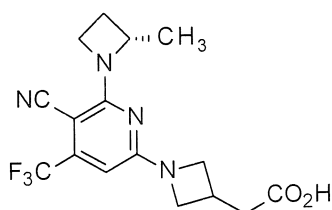
Công thức Ia



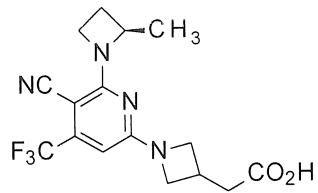
Công thức Ib

và muối dược dụng của chúng.

Các hợp chất khác của sáng chế bao gồm:



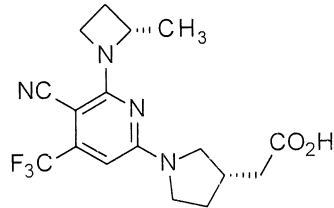
Công thức IIa



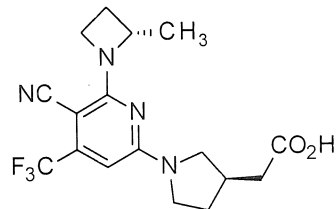
Công thức IIb

và muối được dụng của chúng.

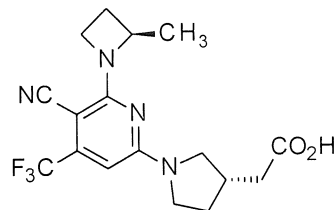
Các hợp chất khác của sáng chế bao gồm:



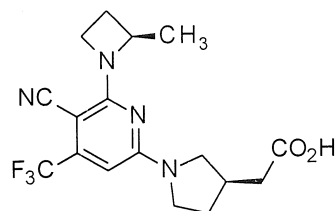
Công thức IIIa'



Công thức IIIa''



Công thức IIIb'



Công thức IIIb''

và muối được dụng của chúng.

Mặc dù sáng chế đề cập đến tất cả các chất đồng phân đối ảnh và chất đồng phân không đối quang riêng lẻ, cũng như hỗn hợp của chúng, bao gồm các raxemat,

các hợp chất có công thức Ia, công thức IIa và IIIa”, và các muối được dụng của chúng, được đặc biệt ưu tiên.

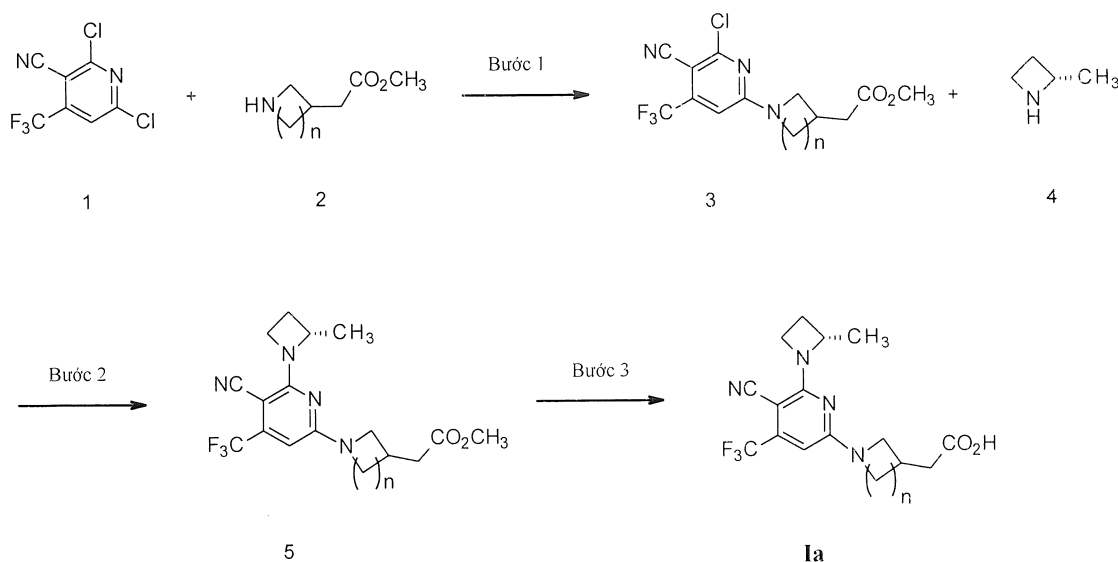
Các chất đồng phân đối ảnh riêng lẻ có thể được tách riêng hoặc được phân giải bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực này ở thời điểm thuận tiện bất kỳ trong quy trình tổng hợp các hợp chất theo sáng chế bằng các phương pháp như kỹ thuật kết tinh chọn lọc hoặc sắc ký bất đối xứng (xem, ví dụ, J. Jacques, *et al.*, “*Enantiomers, Racemates, and Resolutions*”, John Wiley and Sons, Inc., 1981, và E.L. Eliel and S.H. Wilen, “*Stereochemistry of Organic Compounds*”, Wiley-Interscience, 1994), hoặc sắc ký lỏng siêu tới hạn (supercritical fluid chromatography-SFC) (xem, ví dụ, T. A. Berger; “*Supercritical Fluid Chromatography Primer*,” Agilent Technologies, July 2015).

Muối được dụng của các hợp chất theo sáng chế có thể được tạo ra, ví dụ, bằng cách cho dạng trung hòa thích hợp của hợp chất theo sáng chế phản ứng với axit hoặc bazơ được dụng thích hợp trong dung môi thích hợp trong điều kiện tiêu chuẩn đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này (xem, ví dụ, Bastin, R.J., *et al.*; *Org. Process. Res. Dev.*, 4, 427-435, 2000 and Berge, S.M., *et al.*; *J. Pharm. Sci.*, 66, 1-19, 1977).

Các hợp chất của sáng chế, hoặc các muối của chúng, có thể được điều chế theo nhiều quy trình khác nhau đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, một số quy trình trong số các quy trình này được minh họa trong các sơ đồ, ví dụ điều chế và các ví dụ dưới đây. Các sản phẩm của từng bước trong các sơ đồ dưới đây có thể được thu hồi theo các phương pháp thông thường đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này, gồm chiết, làm bay hơi, tạo kết tủa, sắc ký, lọc, nghiền tinh chế, và kết tinh. Trong các sơ đồ dưới đây, tất cả các phần tử thay thế, trừ khi có quy định khác, là như được định nghĩa ở trên. Các chất phản ứng và các nguyên liệu ban đầu đều sẵn có đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các sơ đồ, các quá trình điều chế và các ví dụ dưới đây được nêu ra nhằm minh họa cho sáng chế và không làm giới hạn phạm vi của sáng chế. Ngoài ra, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ thấy rằng các hợp chất có các công thức I có thể được điều chế bằng cách sử dụng nguyên liệu ban đầu hoặc hợp chất trung gian có cấu hình lập thể hóa học tương ứng mà chúng có thể được điều chế bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Các ký hiệu viết tắt nhất định được định nghĩa dưới đây: “ABT” dùng để chỉ 1-aminobenzotriazol; “ACN” dùng để chỉ axetonitril; “BSA” dùng để chỉ albumin huyết thanh bò; “CAS #” dùng để chỉ số đăng ký tóm tắt hóa học; “DCM” dùng để chỉ metylen clorua hoặc diclometan; “DIPEA” dùng để chỉ diisopropyletylamin; “DMEM” dùng để chỉ môi trường Eagle được cải biến Dulbecco; “DMSO” dùng để chỉ dimetyl sulfoxit; “ELSD” dùng để chỉ máy dò tán xạ ánh sáng bay hơi; “ES/MS” dùng để chỉ phép đo khối phổ điện tử; “EtOAc” dùng để chỉ etyl axetat; “EtOH” dùng để chỉ etanol hoặc rượu etylic; “FBS” dùng để chỉ huyết thanh thai bò; “h” dùng để chỉ giờ; “HPLC” dùng để chỉ sắc ký lỏng hiệu năng cao; “Me” dùng để chỉ metyl; “MeOH” dùng để chỉ metanol; “MTBE” dùng để chỉ metyl-tert-butyl ete; “min” dùng để chỉ phút; “m/z” dùng để chỉ tỷ lệ khối lượng trên điện tích; “PBS” dùng để chỉ nước muối đệm phosphat; “Ph” dùng để chỉ phenyl; “RBF” dùng để chỉ bình cầu đáy tròn; “RT” dùng để chỉ nhiệt độ trong phòng; “SCX” dùng để chỉ sự trao đổi cation chọn lọc; “SFC” dùng để chỉ sắc ký lỏng siêu tới hạn; “THF” dùng để chỉ tetrahydrofuran.

Sơ đồ 1



Sơ đồ 1 mô tả quá trình điều chế chung của các hợp chất có công thức I. Trong bước 1, 3-xyano-2,6-diclo-4-(triflometyl)pyridin (1) và amin vòng (2) được cho phản ứng với sự có mặt của bazơ, như NaHCO_3 hoặc DIPEA, trong EtOH hoặc MeOH để tạo thành aminopyridin (3). Theo cách khác, dung môi phản ứng cho

bước này có thể là DCM. Trong bước 2, hợp chất 3 được cho phản ứng với 2-metyl azetidin (4) ở nhiệt độ cao và với sự có mặt của bazơ, như NaHCO_3 hoặc DIPEA, trong EtOH hoặc MeOH để tạo thành diaminopyridin (5). Theo cách khác, dung môi phản ứng cho bước này có thể là THF. Ở bước 3, nhóm este được thủy phân bằng cách sử dụng bazơ như NaOH hoặc LiOH trong MeOH hoặc THF ở nhiệt độ cao để tạo ra hợp chất có công thức Ia. Theo cách khác, bước này có thể được thực hiện bằng cách sử dụng cùng các chất phản ứng trong thiết bị phản ứng vi sóng.

Ví dụ thực hiện sáng chế

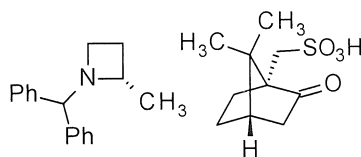
Các ví dụ điều chế và ví dụ

Các ví dụ điều chế và ví dụ sau minh họa thêm cho sáng chế và thể hiện quá trình tổng hợp điển hình của hợp chất theo sáng chế. Các chất phản ứng và nguyên liệu khởi đầu là sẵn có hoặc có thể được tổng hợp một cách dễ dàng đối với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực này. Cần hiểu rằng, các ví dụ điều chế và ví dụ được đưa ra chỉ để minh họa và không mang tính giới hạn và người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực này có thể tiến hành các sửa đổi khác nhau.

LC-ES/MS được tiến hành trên hệ thống sắc ký lỏng AGILENT[®] HP1100. Các kết quả đo phổ khối phun điện tử (thu được theo chế độ dương và/hoặc âm) được tạo ra trên phổ khối kế bốn cực Mass Selective Detector có giao diện với HPLC mà có thể có hoặc không có ELSD. Các điều kiện LC-MS (độ pH thấp): cột: PHENOMENEX[®] GEMINI[®] NX C18 2,0 × 50 mm 3,0 μm, 110 Å; gradien: 5-95% B trong 1,5 phút, sau đó 95% B trong 0,5 phút, nhiệt độ cột: 50 °C +/-10°C; tốc độ dòng: 1,2 mL/phút; thể tích tiêm 1 μL; Dung môi A: nước khử ion với 0,1% HCOOH; dung môi B: ACN với axit formic 0,1%; bước sóng 200-400 nm và 212-216 nm. Nếu HPLC được trang bị ELSD, các cài đặt là nhiệt độ thiết bị bay hơi 45°C, nhiệt độ ống phun 40°C và tốc độ dòng khí 1,6 SLM. Các điều kiện LC-MS khác (độ pH cao): cột: cột Waters xBridge[®] C18 2,1×50 mm, 3,5 μm; gradien: 5-95% B trong 1,5 phút, sau đó 95% B trong 0,5 phút, nhiệt độ cột: 50 °C +/-10°C; tốc độ dòng: 1,2 mL/phút; thể tích tiêm 1μL; Dung môi A: 10 mM NH_4HCO_3 pH 9; Dung môi B: ACN; bước sóng: 200-400 nm và 212-216nm; nếu có ELSD: Nhiệt độ thiết bị bay hơi 45°C, nhiệt độ ống phun 40°C và tốc độ dòng khí 1,60 SLM.

Ví dụ điều chế 1

Muối của axit (2S)-1-Benzhydryl-2-metyl-azetidin [(1R,4S)-7,7-dimetyl-2-oxo-norbornan-1-yl]metansulfonic

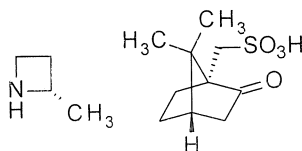


Lắp RBF 3 cổ dung tích 2000 mL với phễu bổ sung, đầu vào nitơ và bộ chuyển đổi nhiệt kế. Làm sạch bình bằng nitơ và bổ sung (3R)-butan-1,3-diol (25 g, 277,4 mmol), DIPEA (127 ml, 731 mmol) và ACN (556 ml). Làm lạnh xuống -30°C. Bổ sung từng giọt anhydrit triflometansulfonic (101 mL, 601 mmol) trong 3 giờ sao cho nhiệt độ bên trong được giữ trong khoảng -35 và -30°C. Sau khi hoàn thành việc bổ sung, khuấy trong 10 phút ở -35 đến -30°C. Bổ sung từng giọt anhydrit triflometansulfonic (1,9 mL, 11 mmol) trong 5 phút sao cho nhiệt độ bên trong được giữ trong khoảng -35 và -30°C. Sau khi hoàn thành việc bổ sung, khuấy trong 10 phút ở -35 đến -30°C. Bổ sung từng giọt DIPEA (127 mL, 731 mmol) trong 15 phút sao cho nhiệt độ bên trong được giữ trong khoảng -35 và -30°C. Sau khi hoàn thành việc bổ sung, khuấy trong 10 phút ở -35 đến -30°C. Trong bình riêng biệt dưới nitơ, hòa tan aminodiphenylmetan (48,0 mL, 270 mmol) trong ACN (49 mL, 935 mmol) và chuyển dung dịch thu được vào phễu bổ sung. Bổ sung từng giọt dung dịch amin vào triflat lạnh trong 40 phút sao cho nhiệt độ bên trong được giữ trong khoảng -20 đến -35°C. Sau khi hoàn thành việc bổ sung, khuấy trong 30 phút ở -35 đến -30°C. Chuyển hỗn hợp phản ứng vào bể nước và gia nhiệt từ từ trong 30 phút. Loại bỏ bể và gia nhiệt hỗn hợp phản ứng đến nhiệt độ trong phòng trong 30 phút. Chuyển bình phản ứng vào vỏ gia nhiệt và gia nhiệt hỗn hợp phản ứng đến 45°C trong 30 phút, sau đó làm lạnh xuống nhiệt độ trong phòng. Rót hỗn hợp phản ứng vào 1200 mL nước và chiết bằng toluen (400 mL x 3). Kết hợp các phần chiết, rửa bằng nước, dung dịch nước NaCl bão hòa, sấy khô bằng Na₂SO₄ khan, lọc và cô bằng thiết bị làm bay hơi quay. Sấy khô nguyên liệu dưới chân không qua đêm. Hòa tan cặn trong DCM (400 mL). Chuẩn bị đệm silic oxit trên phễu thủy tinh xốp và cân bằng nó với 1:1 heptan/EtOAc. Nạp dung dịch sản phẩm lên đệm silic oxit và rửa bằng 1600 mL 1:1 heptan/EtOAc. Cô dịch lọc để tạo thành dầu màu đỏ. Hòa tan dầu này trong MeOH (250 mL) và đặt bình trong bể nước (~10°C). Bổ sung từng

phần axit L(-)-camphorsulfonic (61,6 g, 265 mmol) trong khi giữ nhiệt độ bên trong dưới 20°C. Khuấy hỗn hợp phản ứng trong 15 phút và sau đó cô bằng thiết bị làm bay hơi quay để tạo thành bột màu nâu. Sấy khô bột bằng bơm chân không trong 2 giờ. Hòa tan bột trong 130 mL DCM. Gắn phễu bổ sung vào bình. Sử dụng phễu để bổ sung từ từ 1100 mL EtOAc vào dung dịch đang khuấy. Chuyển hỗn hợp thu được vào cốc có mỏ 4000 mL và khuấy qua đêm trong điều kiện cốc mở với không khí. Làm nguội cốc có mỏ trong bể nước đá trong 10 phút. Thu gom kết tủa trong phễu thủy tinh xộp bằng cách lọc rửa chân không với một lượng tối thiểu của EtOAc lạnh băng. Sấy khô chất rắn trên thủy tinh xộp trong 2 giờ. Hòa tan chất rắn màu trắng thu được trong một lượng tối thiểu của DCM, chuyển vào cốc có mỏ 2000 mL và sau đó pha loãng từ từ với EtOAc cho đến khi dung dịch trong bắt đầu trở nên vẩn đục. Khuấy huyền phù trong 4 giờ trong khi mở với không khí. Thu gom các chất rắn bằng cách lọc chân không sử dụng phễu thủy tinh xộp và sấy khô trên thủy tinh xộp qua đêm để tạo thành hợp chất nêu ở đề mục (111,8 g, 238,06 mmol, hiệu suất 86%) là chất rắn màu trắng, ^1H NMR (400 MHz, d_6 -DMSO): 10,54-10,47 (m, 1H), 7,61 (d, $J = 7,3$ Hz, 5H), 7,47-7,37 (m, 7H), 5,85 (d, $J = 10,3$ Hz, 1H), 4,68-4,61 (m, 1H), 3,91-3,83 (m, 2H), 3,37 (s, 8H), 2,99 (d, $J = 14,6$ Hz, 1H), 2,77-2,68 (m, 1H), 2,51-2,44 (m, 4H), 2,30-2,16 (m, 2H), 1,91-1,81 (m, 2H), 1,42-1,28 (m, 3H), 1,08 (s, 3H), 1,01 (d, $J = 6,6$ Hz, 3H), 0,77 (s, 4H); >98% lượng dư chất đồng phân đối ảnh [HPLC: Chiralcel OJ (10 cm x 4,6 mm, 5 μm), 5 mL/phút, 40°C đẳng dòng 10% EtOH (0,2% $i\text{PrNH}_2$)/CO₂].

Ví dụ điều chế 2

Muối [(1R,4S)-7,7-Dimethyl-2-oxo-norbornan-1-yl]metansulfonat (2S)-2-methylazetidin-1-ium

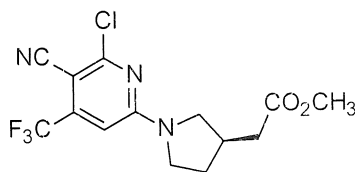


Bổ sung 20% khối lượng Pd(OH)₂ trên cacbon (6,62 g) vào bình Parr 2250 mL. Làm sạch bình bằng nitor và bổ sung 250 mL MeOH. Bổ sung từ từ muối của axit (2S)-1-benzhydryl-2-metyl-azetidin [(1R,4S)-7,7-dimetyl-2-oxo-norbornan-1-yl]metansulfonic (111 g, 236 mmol) được hòa tan trong 250 mL MeOH vào huyền

phù thu được. Đậy kín bình. Làm sạch bằng nitơ, sau đó bằng hydro và gia áp đến 60 PSI. Lắc mạnh bình phản ứng trong thiết bị lắc Parr Shaker trong 15 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Làm sạch bình bằng nitơ và sau đó lọc hỗn hợp phản ứng bằng đệm xelit, rửa bằng MeOH. Cô dịch lọc để tạo thành chất rắn màu trắng và sấy khô dưới chân không. Tạo huyền phù chất rắn trong 780 mL 1:1 MTBE/EtOAc và đun nóng hỗn hợp đến 65°C trong 20 giờ, sau đó làm lạnh xuống nhiệt độ trong phòng và khuấy qua đêm. Thu gom chất rắn bằng cách lọc. Tạo huyền phù chất rắn trong 380 mL MTBE và khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 24 giờ. Thu gom chất rắn màu trắng bằng cách lọc để tạo thành hợp chất nêu ở đề mục (41,5 g, 136,78 mmol, hiệu suất 58%), ^1H NMR (400 MHz, d_6 -DMSO): 8,68-8,55 (m, 1H), 4,51-4,42 (m, 1H), 3,91-3,75 (m, 1H), 3,36 (s, 3H), 2,91 (d, $J = 14,6$ Hz, 1H), 2,69-2,61 (m, 1H), 2,52-2,46 (m, 2H), 2,28-2,22 (m, 1H), 2,17-2,10 (m, 1H), 1,96 (t, $J = 4,5$ Hz, 1H), 1,89-1,79 (m, 1H), 1,43 (d, $J = 6,7$ Hz, 2H), 1,36-1,26 (m, 1H), 1,05 (s, 2H), 0,75 (s, 2H).

Ví dụ điều chế 3

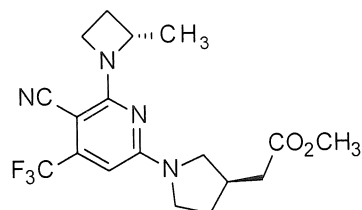
Metyl 2-[(3R)-1-[6-clo-5-xyano-4-(triflometyl)-2-pyridyl]pyrolidin-3-yl]axetat



Bổ sung 3-xyano-2,6-diclo-4-(triflometyl)pyridin (123 mmol, 29,6 g) và EtOH (230 mL) vào RBF. Làm lạnh hỗn hợp xuống 0°C. Bổ sung NaHCO_3 (368 mmol, 31 g), sau đó là dung dịch chứa metyl (R)-pyrolidin-3-axetat hydroclorua (23 g, 123 mmol) trong EtOH (230 mL). Gia nhiệt hỗn hợp phản ứng đến nhiệt độ trong phòng qua đêm. Làm bay hơi hỗn hợp phản ứng đến khô bằng thiết bị làm bay hơi quay. Bổ sung nước (200 mL) và chiết bằng MTBE (2 x 200 mL). Kết hợp các phần chiết và làm bay hơi đến khô. Tinh chế bằng sắc ký trên silicagel sử dụng hexan/MTBE (gradient từ 20 đến 70%) để tạo thành hợp chất nêu ở đề mục (34,7 g, 99,89 mmol, hiệu suất 81%) là chất rắn màu trắng. ES/MS (m/z): 348,0, 350,0 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Ví dụ điều chế 4

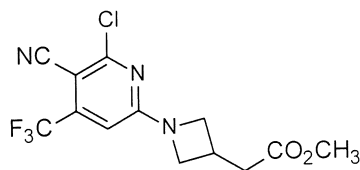
Metyl 2-[(3R)-1-[5-xyano-6-[(2S)-2-metylazetidin-1-yl]-4-(triflometyl)-2-pyridyl]pyrrolidin-3-yl]axetat



Bổ sung metyl 2-[(3R)-1-[6-clo-5-xyano-4-(triflometyl)-2-pyridyl]pyrrolidin-3-yl]axetat (25,5 g, 73,3 mmol), muối [(1R,4S)-7,7-dimetyl-2-oxo-norbornan-1-yl]metansulfonat (2S)-2-metylazetidin-1-ium (88,0 mmol, 26,7 g), MeOH (255 mL), và NaHCO₃ (220 mmol, 18,5 g) vào RBF. Khuấy hỗn hợp ở 65°C trong 16 giờ. Bổ sung muối [(1R,4S)-7,7-dimetyl-2-oxo-norbornan-1-yl]metansulfonat (2S)-2-metylazetidin-1-ium (22,0 mmol, 6,68 g) và NaHCO₃ (147 mmol, 12,3 g) và tiếp tục khuấy trong 32 giờ. Loại bỏ dung môi bằng thiết bị làm bay hơi quay. Bổ sung nước (300 mL) vào cạn và chiết bằng MTBE (2 x 200 mL). Kết hợp các phần chiết và sấy khô bằng MgSO₄ khan, lọc bằng silicagel, và cô đến khô để tạo thành hợp chất nêu ở đề mục (28,0 g, 73,2 mmol, hiệu suất 99%) là chất rắn màu trắng. ES/MS (m/z): 383,2 [M+H]⁺.

Ví dụ điều chế 5

Metyl 2-[1-[6-clo-5-xyano-4-(triflometyl)-2-pyridyl]azetidin-3-yl]axetat

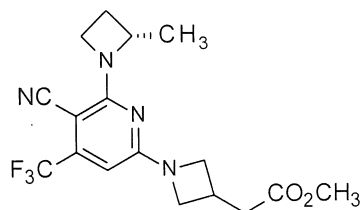


Bổ sung NaHCO₃ (0,549 g, 6,51 mmol) và muối của axit metyl 2-(azetidin-3-yl)axetat trifloaxetic (0,494 g, 2,03 mmol) vào dung dịch chứa 3-xyano-2,6-diclo-4-(triflometyl)pyridin (500 mg, 2,03 mmol) trong EtOH (15 mL). Khuấy hỗn hợp ở nhiệt độ phòng trong 16 giờ. Pha loãng hỗn hợp phản ứng với dung dịch nước NaCl bão hòa (30 mL). Chiết bằng EtOAc (20 mL x 3). Kết hợp các phần chiết và rửa bằng dung dịch nước NaCl bão hòa (30 mL), sấy khô bằng Na₂SO₄ khan, lọc, và

cô. Tinh chế cặn bằng sắc ký cột trên silicagel tách rửa với EtOAc trong ete dầu mỏ (gradient 0-30%) để tạo thành hợp chất nêu ở đề mục (470 mg, 1,41 mmol, hiệu suất 66%) là chất rắn màu trắng. ES/MS (m/z) = 333,9 $[M+H]^+$.

Ví dụ điều chế 6

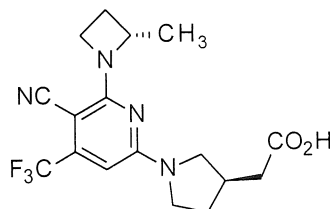
Metyl 2-[1-[5-xyano-6-[(2S)-2-metylazetidin-1-yl]-4-(triflometyl)-2-pyridyl]azetidin-3-yl]axetat



Bổ sung NaHCO_3 (0,173 g, 2,05 mmol) và muối [(1R,4S)-7,7-dimetyl-2-oxo-norbornan-1-yl]metansulfonat (2S)-2-metylazetidin-1-ium (0,194 g, 0,626 mmol) vào dung dịch chứa metyl 2-[1-[6-clo-5-xyano-4-(triflometyl)-2-pyridyl]azetidin-3-yl]axetat (200 mg, 0,569 mmol) trong EtOH (6 mL). Đun nóng hỗn hợp đến 80°C trong 16 giờ. Pha loãng với nước (50 mL) và chiết bằng EtOAc (40 mL x 3). Kết hợp các phần chiết và rửa bằng dung dịch nước NaCl bão hòa (50 mL), sấy khô bằng Na_2SO_4 khan, lọc và cô. Tinh chế cặn bằng sắc ký cột trên silicagel (0%-10%, EtOAc trong ete dầu mỏ) để tạo thành hợp chất nêu ở đề mục (176 mg, 0,46 mmol, hiệu suất 77%) là chất rắn màu trắng. ES/MS (m/z): 383,1 $[M+H]^+$.

Ví dụ 1

Axit 2-[(3R)-1-[5-xyano-6-[(2S)-2-metylazetidin-1-yl]-4-(triflometyl)-2-pyridyl]pyrolidin-3-yl]axetic

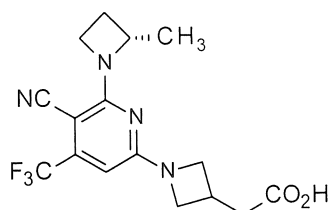


Bổ sung metyl 2-[(3R)-1-[5-xyano-6-[(2S)-2-metylazetidin-1-yl]-4-(triflometyl)-2-pyridyl]pyrolidin-3-yl]axetat (26,5 g, 69,3 mmol), MeOH (265 mL),

và dung dịch nước NaOH 2M (416 mmol, 208 mL) vào RBF. Khuấy hỗn hợp ở 60°C trong 3 giờ. Làm lạnh xuống nhiệt độ trong phòng và loại bỏ MeOH bằng thiết bị làm bay hơi quay. Axit hóa pha chứa nước đến độ pH 3-4 bằng cách sử dụng dung dịch HCl đặc. Chiết bằng EtOAc (400 mL). Rửa lớp hữu cơ bằng nước (200 mL), sấy khô bằng MgSO₄ khan, lọc, và cô đến khô để tạo thành hợp chất nêu ở đề mục (22,5 g, 61,11 mmol, hiệu suất 88%) là bột màu trắng. ES/MS (m/z): 369,2 [M+H]⁺.

Ví dụ 2

Axit 2-[1-[5-xyano-6-[(2S)-2-metylazetidin-1-yl]-4-(triflometyl)-2-pyridyl]azetidin-3-yl]axetic



Bổ sung LiOH (0,04 g, 0,955 mmol) vào hỗn hợp gồm methyl 2-[1-[5-xyano-6-[(2S)-2-metylazetidin-1-yl]-4-(triflometyl)-2-pyridyl]azetidin-3-yl]axetat (176 mg, 0,478 mmol) trong THF (5,00 mL) và nước (1,00 mL). Khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ. Pha loãng với EtOAc (4 mL) và chiết lớp chứa nước bằng EtOAc (2 mL x 3). Kết hợp các phần chiết hữu cơ và rửa bằng dung dịch nước NaCl bão hòa (3 mL x 2), sấy khô bằng Na₂SO₄ khan, lọc, cô để tạo thành hợp chất nêu ở đề mục (128 mg, 0,36 mmol, hiệu suất 78%) là chất rắn màu trắng. ES/MS (m/z) 354,9 [M+H]⁺.

Thử nghiệm

Thử nghiệm hoạt tính của enzyme KHK đối với KHK-C người và KHK-A người

Hiệu lực nội tại của các hợp chất có thể được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm enzyme để xác định việc tạo ra F1P. Các hợp chất được chuẩn bị trong DMSO và được thử nghiệm theo đường cong nồng độ 10 điểm, để tạo ra các nồng độ pha loãng nối tiếp gấp 3 lần của các hợp chất trong đĩa 96 lỗ nằm trong khoảng từ 20 µM đến 1,02 nM. Enzym được chuẩn bị trong dung dịch đệm thử nghiệm [axit 4 - (2-hydroxyetyl) piperazin-1-etansulfonic (HEPES) 50 mM, kali clorua 10 mM, magie clorua 100 mM, tris(2-carboxyetyl)phosphin (TCEP) 2 mM, n-octyl

glucosid 0,01%] và được ủ với các hợp chất ở RT trong 15 phút. Phản ứng được thực hiện trong thể tích 100 μL có chứa nồng độ cơ chất là fructoza (250 μM đối với thử nghiệm KHK-C và 1,25mM đối với thử nghiệm KHK-A) và ATP (150 μM đối với cả hai dạng tương đồng); được ủ tiếp ở RT trong 20 phút. Phản ứng sau đó được dừng lại bằng cách bổ sung dung dịch đệm dừng; bao gồm axit formic 0,2% và 1 $\mu\text{g/ml}$ chất chuẩn nội $^{13}\text{C}_6$ -fructoza-6-phosphat ($^{13}\text{C}_6$ -F6P). Các đĩa được bảo quản trong -20°C cho đến khi phân tích RapidFire MS.

Phân tích MS RapidFire để định lượng F1P:

Hệ thống chiết tự động Agilent 300 RapidFire (Agilent, Santa Clara, CA) với ba bơm bậc bốn HPLC, được liên hợp với phổ khối bốn cực bậc ba Agilent 6495 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) được trang bị nguồn giao diện ion hoá phun điện (electrospray ionization-ESI). Hệ thống RapidFire Mass Spec được trang bị ống chiết pha rắn (solid-phase extraction-SPE) RapidFire C18 (loại C) tái sử dụng được (G9205A).

Dung môi A, được sử dụng để nạp và rửa mẫu, là octylamin 6 mM (Acros Organics 129495000) được đưa đến độ pH 5,0 bằng cách sử dụng axit axetic. Dung môi B, được sử dụng để tách rửa mẫu, là 20% nước trong ACN có chứa 0,1% axit formic. Các mẫu được phân tích liên tiếp bằng cách hút 10 μL vào vòng gom trong chân không trực tiếp từ đĩa nhiều lỗ. Nạp 10 μL mẫu vào ống C18 và rửa bằng cách sử dụng dung môi A với lưu lượng 1,25 ml/phút trong 5000 ms. Sau đó, các chất phân tích được giữ lại được tách rửa cho phổ khối kế bằng cách sử dụng dung môi B với lưu lượng 1,25 ml/phút trong 5000 ms. Hệ thống này được cân bằng lại bằng cách sử dụng dung môi A với lưu lượng 1,25 ml/phút trong 2000 ms.

Lắp phổ khối bốn cực bậc ba với nguồn ESI và theo dõi các chất phân tích bằng phương thức giám sát phản ứng chọn lọc (selected reaction monitoring-SRM) theo kiểu âm tính $[\text{M}-\text{H}]^-$. F1P được theo dõi ở m/z 259,02/96,9 và $^{13}\text{C}_6$ -fructoza-6-phosphat được theo dõi ở m/z 264,99/97. Giá trị tỷ lệ diện tích cho F1P được tính bằng cách sử dụng $^{13}\text{C}_6$ -fructoza-6-phosphat làm chất chuẩn nội.

Các hợp chất của Ví dụ 1 và 2 được thử nghiệm về cơ bản như được mô tả ở trên:

Bảng 1

Ví dụ số	IC_{50} của hKHK-C	IC_{50} của hKHK-A
----------	-----------------------------	-----------------------------

	(nM)	(nM)
1	9	19
2	27	37

Những kết quả này chứng minh rằng các hợp chất của Ví dụ 1 và 2 ức chế hoạt tính enzym của cả KHK-C và KHK-A.

Thử nghiệm hoạt tính tế bào KHK

Hiệu lực có thể được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm tế bào để ức chế sự chuyển hóa fructoza thành F1P bởi KHK tế bào. Tế bào HepG2 được gieo trên đĩa nuôi cấy tế bào 96 lỗ trong môi trường tăng trưởng [Môi trường Eagle được cải biến Dulbecco (DMEM) glucoza cao, 10% huyết thanh thai bò được bất hoạt bằng nhiệt (HI FBS), $1 \times$ Penicillin/streptomycin] và được để cho bám vào qua đêm trong tủ ủ 37°C . Môi trường tăng trưởng được rửa sạch và thay thế bằng môi trường thử nghiệm bao gồm môi trường huyết thanh khử Gibco OptiMEM 1, casein 0,1%, D-Fructoza- $^{13}\text{C}_6$ 8,33 mM, và nồng độ hợp chất nằm trong khoảng từ 100 μM đến 0,0051 μM (đường cong nồng độ 10 điểm). Các đĩa được ủ ở 37°C trong 3 giờ, sau đó môi trường thử nghiệm được hút từ các lỗ chứa tế bào. Sau đó, dung dịch dừng bao gồm metanol 80%, amoni axetat 2 mM, fructoza-6-phosphat- $^{13}\text{C}_6$ 50 ng/mL được thêm vào các tế bào. Các đĩa được bảo quản trong -20°C cho đến khi phân tích RapidFire MS (được mô tả ở trên).

Các hợp chất của Ví dụ 1 và 2 được thử nghiệm về cơ bản như được mô tả ở trên:

Bảng 2

Ví dụ số	IC_{50} của HepG2
1	127
2	316

Những kết quả này chứng minh rằng các hợp chất của Ví dụ 1 và 2 ức chế sự chuyển hóa của fructoza thành F1P.

Phương pháp sắc ký lỏng với đo phổ khối liên tục (LC-MS/MS) cho các thử nghiệm được động học: Các mẫu được chiết bằng cách sử dụng kết tủa protein bằng cách thêm 180 μ L MeOH:ACN (1:1, thể tích/thể tích) có chứa chất chuẩn nội và 25 μ L huyết tương (mẫu động vật gặm nhấm) hoặc 50 μ L huyết tương (mẫu không phải động vật gặm nhấm). Sau đó, mẫu được pha loãng với MeOH:nước (1:1, thể tích/thể tích) để có được nồng độ trong khoảng đường cong tiêu chuẩn. Các mẫu đã pha loãng được phân tích bằng LC-MS/MS sử dụng phổ khối bốn cực bậc ba Sciex API 4000 (Applied Biosystems/MDS; Foster City, CA) được trang bị giao diện TurboIonSpray và hoạt động ở chế độ ion dương. Các chất phân tích được tách bằng sắc ký sử dụng cột Thermo Betasil C18 5 μ m 20X2,1mm Javelin (mẫu động vật gặm nhấm) hoặc cột Advantage ECHIELON C18 4 μ m 20 mm x 2,1 mm ID (mẫu không phải động vật gặm nhấm). Điều kiện LC là nước/amoni bicacbonat 1 M, (2000:10, thể tích/thể tích) (Pha động A) và MeOH/amoni bicacbonat 1 M, (2000:10, thể tích/thể tích) (Pha động B).

Dược động học ở chuột

Các đặc tính dược động học *in vivo* và sự liên quan của chất vận chuyển OATP1A/1B trong việc sử dụng hợp chất trong Ví dụ 1 được chứng minh bằng cách sử dụng chuột kiểu đại FVB và chuột bất hoạt OATP1A/1B (Taconic #10707) (nhịn ăn; n = 4/kiểu gen). Hợp chất trong ví dụ 1 được sử dụng bằng một liều tiêm tĩnh mạch (IV; 1mg/kg; thể tích 1mL/kg) trong chất dẫn. Máu được thu gom từ mỗi con vật ở 0, 0,08, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8, 12 và 24 giờ sau khi tiêm. Gan, lá lách và tuyến tụy được thu gom, cân và truyền dịch ở 24 giờ sau khi tiêm. Nồng độ trong huyết tương và mô của hợp chất trong Ví dụ 1 được xác định bằng phương pháp LC-MS/MS như được mô tả ở trên.

Ở chuột FVB, hợp chất trong ví dụ 1 có thời gian bán thải là 5,43 giờ, độ thanh thải trung bình là 6,91 mL/giờ/kg, thể tích phân bố là 2,74 L/kg, với hệ số phân chia không liên kết trung bình của gan (K_{puu}) là 67,5. Ở chuột bất hoạt OATP1A/1B, hợp chất trong ví dụ 1 có thời gian bán thải là 9,36 giờ, độ thanh thải trung bình là 1,34 mL/giờ/kg, thể tích phân bố là 0,986 L/kg, với hệ số phân chia không liên kết trung bình của gan (K_{puu}) là 24,2. Dữ liệu này cho thấy OATP có liên

quan đến sự hấp thu hợp chất trong ví dụ 1 ở gan của chuột và sự liên quan của chất vận chuyển này ảnh hưởng đến quá trình thanh thải.

Được động học ở chó

Các đặc tính dược động học *in vivo* của Ví dụ 1 được chứng minh bằng cách sử dụng chó săn thỏ (được cho ăn, $n = 3-4$). Hợp chất trong ví dụ 1 được sử dụng bằng một liều uống (PO; 3 mg/kg; thể tích 2 mL/kg) hoặc một liều tiêm tĩnh mạch (IV; 1 mg/kg; thể tích 1 mL/kg) trong chất dẫn. Máu được thu thập từ mỗi con vật ở 0, 0,03 (chỉ nhóm IV), 0,08 (IV), 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 32 (IV), 48 (IV) và 72 (IV) giờ sau khi dùng liều. Nồng độ trong huyết tương của hợp chất trong Ví dụ 1 được xác định bằng phương pháp LC-MS/MS như được mô tả ở trên.

Đối với liều PO, thời gian bán thải trung bình của hợp chất trong Ví dụ 1 là 6,9 giờ và độ sinh khả dụng là ~93%. Đối với liều IV, thời gian bán thải trung bình của hợp chất trong Ví dụ 1 là 7,4 giờ và độ thanh thải trung bình là 2,52 mL/giờ/kg với thể tích phân bố thấp (1,33 L/kg). Dữ liệu này cho thấy hợp chất trong Ví dụ 1 có độ thanh thải toàn phần thấp, thể tích phân phối thấp và độ sinh khả dụng đường uống cao ở chó.

Đặc điểm của các con đường thải trừ chính *in vivo* được chứng minh bằng cách sử dụng chó săn thỏ được đặt ống thông ống mật (bile duct cannulated-BDC) (được cho ăn; $n = 3$). Hợp chất trong ví dụ 1 được sử dụng bằng một liều tiêm tĩnh mạch (IV; 1 mg/kg; thể tích 1 mL/kg) trong chất dẫn. Máu được thu thập từ mỗi con vật ở 0, 0,033, 0,083, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 32, 48 và 72 giờ sau khi tiêm. Mật được thu thập từ mỗi con vật ở 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12, 18, 24, 32, 48 và 72 giờ sau khi dùng liều. Nước tiểu được thu thập ở 12, 24, 48 và 72 giờ và phân được thu thập ở 24, 48 và 72 giờ sau khi dùng liều. Nồng độ của hợp chất trong Ví dụ 1 trong huyết tương, mật, nước tiểu và phân được xác định bằng phương pháp LC-MS/MS như được mô tả ở trên.

Thời gian bán thải trung bình của hợp chất trong Ví dụ 1 là 2,9 giờ và độ thanh thải trung bình là 4,69 mL/giờ/kg với thể tích phân bố thấp (0,546 L/kg). Nồng độ trong nước tiểu của hợp chất trong Ví dụ 1 không đáng kể và ~10% liều IV đã dùng được thu hồi trong mật. Dữ liệu này cho thấy hợp chất trong Ví dụ 1 có sự đào thải qua thận và mật thấp. Nhìn chung, thời gian bán thải thải trừ ở chó được đặt

ống thông mật là 2,9 giờ, nhanh hơn so với thời gian bán thải được xác định ở chó còn nguyên vẹn là 7,4 giờ, cho thấy sự tái tuần hoàn ruột gan.

Dược động học ở khỉ *Cynomolgus*

Các đặc tính dược động *in vivo* của hợp chất trong ví dụ 1 được chứng minh bằng cách sử dụng khỉ *cynomolgus*. Các hợp chất được sử dụng bằng một liều uống (PO; 10 mg/kg; thể tích 5 mL/kg) trong chất dẫn. Máu được thu gom từ mỗi con vật ở 0, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 32, 48, và 72 giờ sau khi dùng liều. Nồng độ trong huyết tương của hợp chất trong Ví dụ 1 được xác định bằng phương pháp LC-MS/MS như được mô tả ở trên.

Thời gian bán thải trung bình của hợp chất trong Ví dụ 1 là 15,3 giờ. Dữ liệu này cho thấy hợp chất trong Ví dụ 1 sinh khả dụng qua đường uống và thải trừ từ từ ở khỉ.

Độ thanh thải nội tại trong tế bào gan người (-/+ ABT)

Phương pháp này nhằm xác định độ thanh thải chuyển hóa *in vitro* bằng cách rút cạn cơ chất trong tế bào gan. Việc ủ khi có và không có ABT, một chất ức chế enzyme *pan*-CYP450, được sử dụng để ước tính sự đóng góp của quá trình chuyển hóa qua trung gian CYP. Tế bào gan người được bảo quản đông khô được làm tan giá ở 37°C, được quay lắng và hoàn nguyên trong môi trường nuôi dưỡng tế bào gan đến mật độ 1×10^6 tế bào sống sót/mL. Đối với đĩa 96 lỗ đã được làm ấm trước, 196 μ L huyền phù tế bào gan được thêm vào mỗi lỗ. Các tế bào được ủ trước có và không có ABT là như sau: để ủ trước ABT, 2 μ L dung dịch ABT 100 mM được thêm vào (2 μ L môi trường không có ABT được thêm vào mẫu đối chứng) và đĩa được ủ ở 37°C trong 30 phút trong điều kiện lắc liên tục (~600 vòng/phút). Sau đó, 2 μ L dung dịch gốc của mẫu thử nghiệm 30 μ M được thêm vào và ở 0, 15, 30, 60, 120, 240 phút, 20 μ L các phần phân ước được lấy ra và dập tắt bằng cách chuyển sang ACN chứa chất chuẩn nội. Sau khi ly tâm ở tốc độ 4000 vòng/phút trong 30 phút, nồng độ phần nổi trên bề mặt được xác định bằng LC-MS/MS. Độ thanh thải được tính từ độ dốc của % hợp chất còn lại theo thời gian.

Độ thanh thải của hợp chất trong Ví dụ 1 bị ức chế bởi ABT là ~12% trong tế bào gan của người, cho thấy sự liên quan hạn chế của các enzym CYP trong sự thanh thải ở gan của hợp chất trong Ví dụ 1.

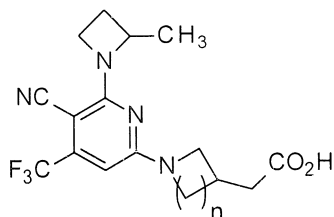
Ức chế OATP1B1 và OATP1B3

Các tế bào OATP1B1, OATP1B3 và đối chứng vector (vector control-VC) được nuôi trong 5% CO₂ ở 37°C trong môi trường ẩm ướt trong DMEM được bổ sung 10% FBS, 50 µg/mL gentamycin và 5 µg/mL blasticidin. Các tế bào được gieo trong các đĩa BioCoat Poly-D-Lysin 24 lỗ. Các tế bào được xử lý với natri butyrat 5 mM trong DMEM được bổ sung 24 giờ trước khi thử nghiệm. Dịch nuôi cấy tế bào được rửa hai lần với PBS đã được làm ấm trước trước khi thử nghiệm. Sau khi rửa, tất cả các loại tế bào được ủ trong 30 phút ở 37°C trong 200 µL dung dịch đệm, dung dịch đệm cộng với nồng độ khác nhau của mẫu thử hoặc với chất ức chế đối chứng dương tính thích hợp. Dựa trên dữ liệu sơ bộ, các nồng độ từ 0,025 đến 12,5 µM đối với OATP1B1 và 0,20 đến 100 µM đối với OATP1B3 (danh nghĩa) được kiểm tra. Khi bắt đầu ủ trước, 50 µL dung dịch đệm được lấy ra để xác định nồng độ mẫu thử trong lỗ bằng LC-MS/MS. Sau thời gian ủ trước, dung dịch đệm được lấy ra. Các thử nghiệm được bắt đầu bằng cách bổ sung 200 µL dung dịch cơ chất (tổng số 400 nM rosuvastatin, bao gồm 1,4 nM rosuvastatin được triti hóa). Việc ủ được thực hiện có và không có chất ức chế. Chất ức chế đối chứng dương tính được sử dụng cho mỗi dòng tế bào là 50 µM rifamycin SV. Các thử nghiệm được thực hiện trong 1 phút ở 37°C, tại đó phản ứng được dừng lại và rửa sạch bằng việc bổ sung 1000 µL PBS lạnh băng cho mỗi lỗ. Mỗi lỗ sau đó được hút và rửa thêm hai lần bằng PBS lạnh băng. Các tế bào trong mỗi lỗ được phân giải trong 400 µL 1% Triton X 100 trong PBS (theo thể tích). Các mẫu được thu thập từ mỗi lỗ từ các đĩa để đếm hoạt tính phóng xạ và nồng độ protein trong mỗi lỗ được xác định bằng phương pháp axit bicinchoninic. Giá trị IC₅₀ được xác định bằng cách điều chỉnh dữ liệu bằng GraphPad Prism. Nồng độ danh nghĩa được chuyển đổi thành nồng độ đo được trước khi điều chỉnh.

Hợp chất trong ví dụ 1 ức chế OATP1B1 mạnh hơn OATP1B3, với giá trị IC₅₀ lần lượt là 0,12 và 5,5 µM.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Hợp chất có công thức:



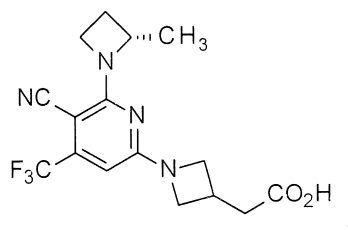
Công thức I,

trong đó n là 1 hoặc 2;

hoặc muối được dụng của nó.

2. Hợp chất theo điểm 1, trong đó n là 1, hoặc muối được dụng của nó.

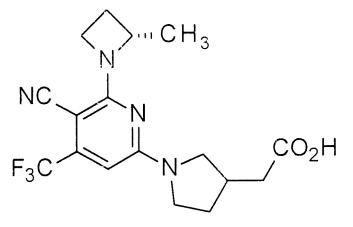
3. Hợp chất theo điểm 2, trong đó hợp chất này là:



hoặc muối được dụng của nó.

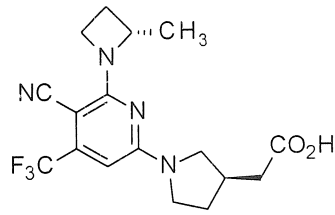
4. Hợp chất theo điểm 1, trong đó n là 2, hoặc muối được dụng của nó.

5. Hợp chất theo điểm 4, trong đó hợp chất này là:



hoặc muối được dụng của nó.

6. Hợp chất theo điểm 5, trong đó hợp chất này là:



hoặc muối dược dụng của nó.

7. Dược phẩm chứa hợp chất, hoặc muối dược dụng của nó, theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6 với một hoặc nhiều chất mang, chất pha loãng, hoặc tá dược dược dụng.

8. Quy trình bào chế dược phẩm bao gồm bước trộn hợp chất, hoặc muối dược dụng của nó, theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6 với một hoặc nhiều chất mang, chất pha loãng, hoặc tá dược dược dụng.