



(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)



1-0044797

(51)^{2020.01} A61K 31/4439; C07D 405/14; A61P
3/10

(13) B

(21) 1-2021-08450

(22) 19/06/2020

(86) PCT/US2020/038617 19/06/2020

(87) WO2020/263695 30/12/2020

(30) 62/868,117 28/06/2019 US; 62/904,906 24/09/2019 US

(45) 25/04/2025 445

(43) 25/04/2022 409A

(71) ELI LILLY AND COMPANY (US)

Lilly Corporate Center, Indianapolis, Indiana 46206-6288, United States of America

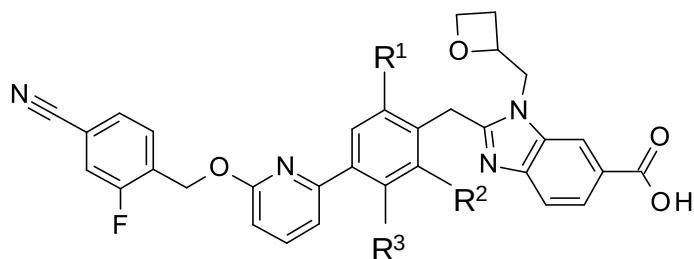
(72) COATES, David Andrew (US); FIELDS, Todd (US); HO, Joseph Daniel (US); QU, Fucheng (US).

(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) CHẤT CHỦ VẬN THỤ THỂ PEPTIT GIỐNG GLUCAGON 1 VÀ DƯỢC PHẨM
CHỨA HỢP CHẤT NÀY

(21) 1-2021-08450

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



(I)

hoặc muối dược dụng của nó. Hợp chất này hữu dụng để điều trị bệnh đái tháo đường typ II. Sáng chế cũng đề cập đến dược phẩm chứa hợp chất này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến chất chủ vận thụ thể peptit giống glucagon 1 và sử dụng hợp chất này trong trị liệu để điều trị bệnh bệnh đái tháo đường typ II.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Peptit giống glucagon 1 (GLP-1) là thành viên thuộc họ incretin của hormon peptit được tiết bởi tế bào nội tiết ruột L. GLP-1 cảm ứng việc giải phóng insulin từ tế bào beta theo cách phụ thuộc glucoza. Tuy nhiên, GLP-1 được chuyển hóa nhanh chóng nên chỉ có tỷ lệ phần trăm nhỏ GLP-1 có thể được sử dụng để gây tiết insulin. Để bù đắp điều này, các chất chủ vận thụ thể GLP-1 (GLP-1R) đã được phát triển để tăng cường việc tiết insulin như một phương pháp điều trị bệnh đái tháo đường typ II.

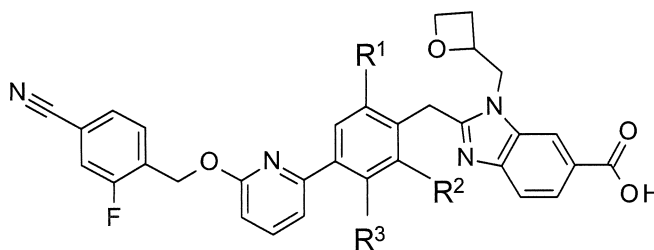
Phần lớn chất chủ vận GLP-1R đã được phê chuẩn để điều trị bệnh đái tháo đường typ II là các chất tiêm được. Bệnh nhân thường thích dùng thuốc qua đường uống hơn vì những hạn chế liên quan đến tiêm như bất tiện, đau và có thể gây kích ứng vị trí tiêm.

WO2018/109607 bộc lộ dẫn xuất benzimidazol, mà được mô tả là chất chủ vận GLP-1R.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Tuy nhiên, vẫn có nhu cầu về chất chủ vận GLP-1R thay thế. Cụ thể, vẫn có nhu cầu về chất chủ vận GLP-1R mà có thể được dùng qua đường miệng. Đặc biệt có nhu cầu về các chất chủ vận GLP-1R có hiệu lực được cải thiện, profin độc tính thuận lợi và/hoặc profin được động học hỗ trợ việc dùng theo liều một lần mỗi ngày.

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



Công thức I

trong đó

R^1 là H hoặc F;

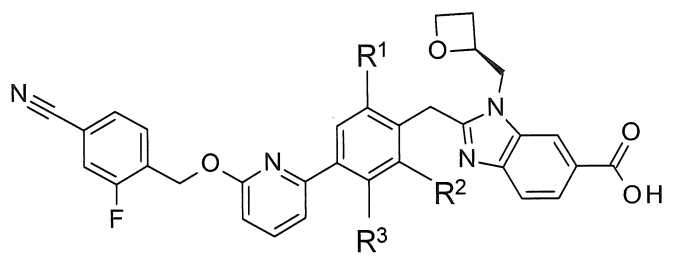
R^2 là H hoặc F, và

R^3 là H hoặc CH_3 ;

hoặc muối dược dụng của chúng.

Công thức I bao gồm tất cả các chất đồng phân đối ảnh riêng rẽ, và hỗn hợp của chúng, cũng như chất triệt quang, và muối dược dụng của chúng.

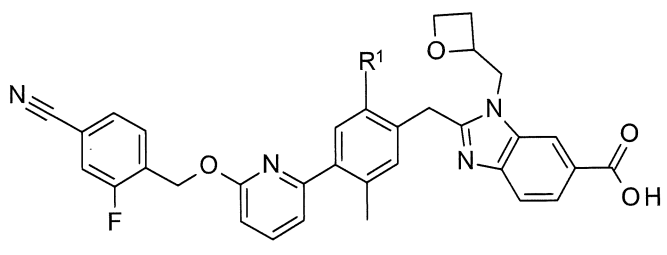
Theo một phương án, sáng chế đề cập đến hợp chất có công thức:



Công thức Ia

hoặc muối dược dụng của chúng.

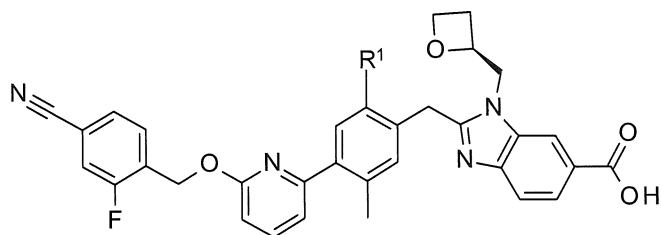
Theo một phương án, sáng chế đề cập đến hợp chất có công thức:



Công thức II

trong đó R^1 là H hoặc F, hoặc muối dược dụng của chúng.

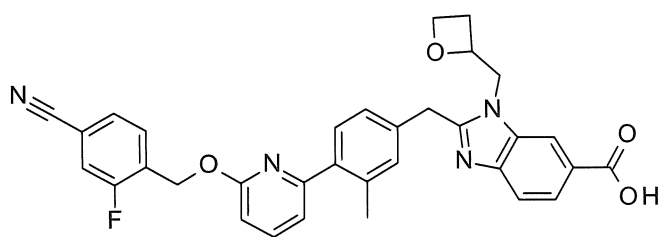
Theo một phương án, sáng chế đề cập đến hợp chất có công thức:



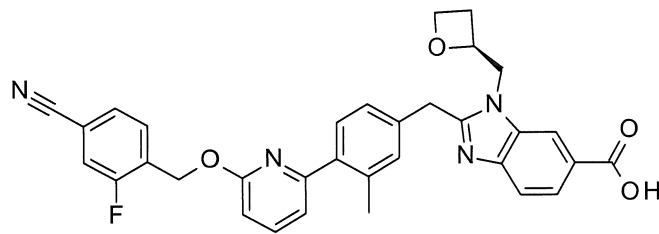
Công thức IIa

trong đó R¹ là H hoặc F, hoặc muối được dụng của chúng.

Theo một phương án, hợp chất này là hợp chất có công thức:

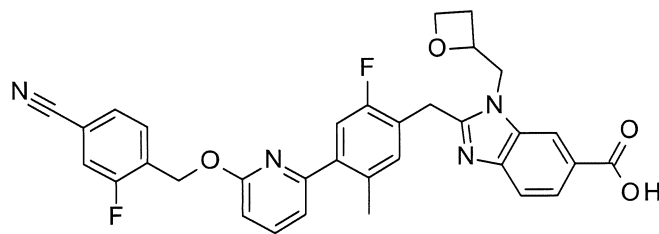


hoặc muối được dụng của chúng. Theo một phương án ưu tiên, hợp chất này là hợp chất có công thức:

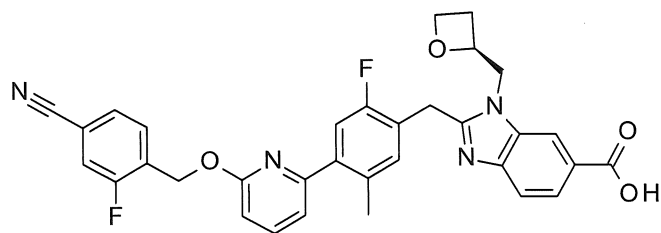


hoặc muối được dụng của chúng.

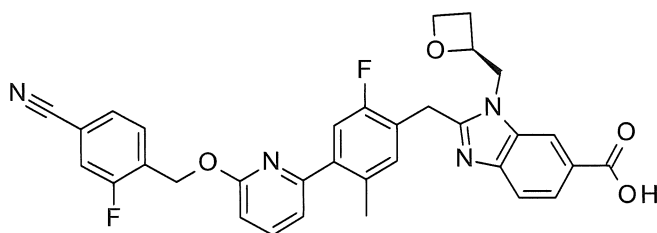
Theo một phương án, hợp chất này là hợp chất có công thức:



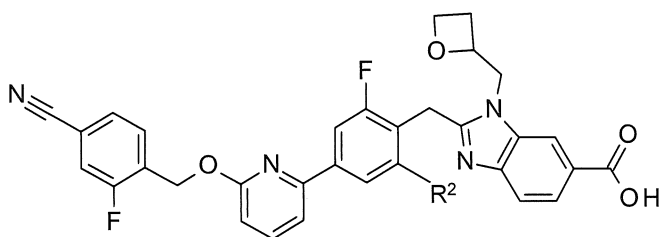
hoặc muối được dụng của chúng. Theo một phương án ưu tiên, hợp chất này là hợp chất có công thức:



hoặc muối được dụng của chúng. Theo một phương án đặc biệt ưu tiên, sáng chế đề cập đến muối *tert*-butylamin (còn được gọi là muối erbumin) của:



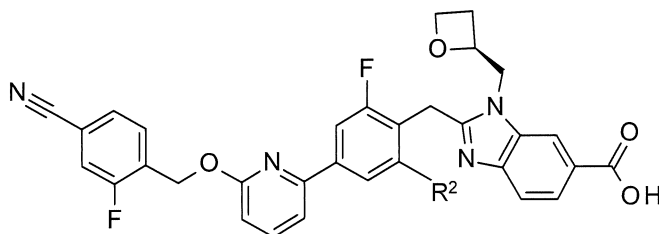
Theo một phương án, sáng chế đề cập đến hợp chất có công thức:



Công thức III

trong đó R^2 là H hoặc F, hoặc muối được dụng của chúng.

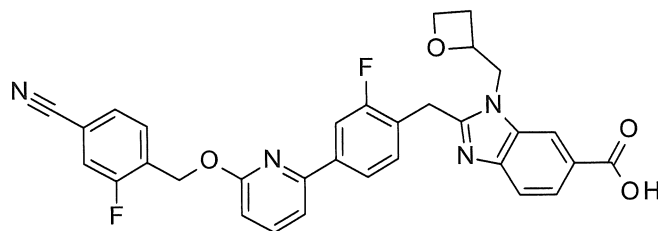
Theo một phương án, sáng chế đề cập đến hợp chất có công thức:



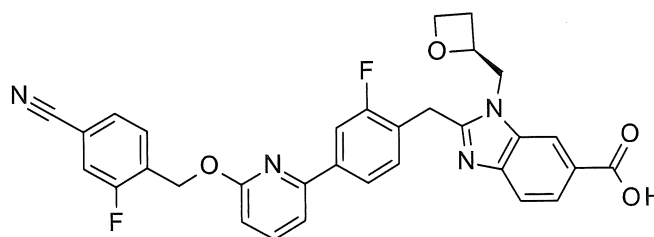
Công thức IIIa

trong đó R^2 là H hoặc F, hoặc muối được dụng của chúng.

Theo một phương án, hợp chất này là hợp chất có công thức:

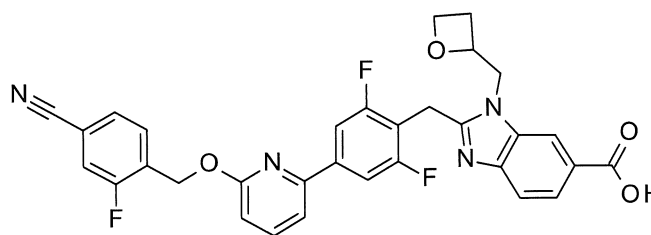


hoặc muối được dụng của chúng. Theo một phương án ưu tiên, hợp chất này là hợp chất có công thức:

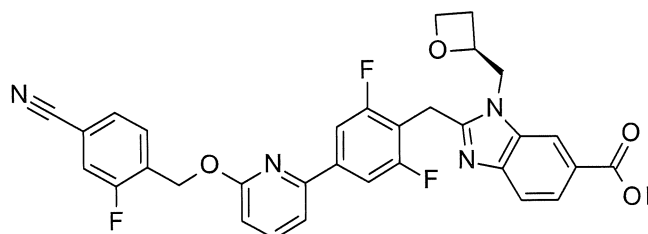


hoặc muối được dụng của chúng.

Theo một phương án, hợp chất này là hợp chất có công thức:



hoặc muối được dụng của chúng. Theo một phương án ưu tiên, hợp chất này là hợp chất có công thức:



hoặc muối được dụng của chúng.

Công thức I bao gồm công thức Ia, Ib, II, IIa, IIb, III, IIIa và IIIb và tham chiếu đến Công thức I dưới đây, ví dụ trong phương pháp điều trị và sử dụng trong trị liệu, cũng sẽ được coi như một tham chiếu đến mỗi và tất cả các công thức con này.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến chế phẩm được dụng chứa hợp chất có công thức I, hoặc muối được dụng của chúng, và ít nhất một chất mang, chất pha loãng hoặc tá được dụng được dụng. Theo một phương án ưu tiên, được phẩm được bào chế để dùng qua đường miệng.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến phương pháp điều trị cho động vật có vú bị bệnh đái tháo đường typ II, phương pháp này bao gồm việc sử dụng cho động vật có vú có nhu cầu điều trị được phẩm chứa lượng hữu hiệu của hợp chất có công thức I, hoặc muối được dụng của chúng, và ít nhất một chất mang, chất pha loãng hoặc tá được dụng được dụng. Theo một phương án, được phẩm được bào chế để sử dụng qua đường miệng. Tốt hơn là, động vật có vú là người.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến phương pháp điều trị cho động vật có vú bị bệnh đái tháo đường typ II, phương pháp này bao gồm việc sử dụng cho động vật có vú có nhu cầu điều trị một lượng hữu hiệu của hợp chất có công thức I, hoặc muối được dụng của chúng. Theo một phương án ưu tiên, động vật có vú là người.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến phương pháp hạ mức glucoza huyết ở động vật có vú, phương pháp này bao gồm việc sử dụng cho động vật có vú có nhu cầu điều trị một lượng hữu hiệu của hợp chất có công thức I, hoặc muối được dụng của chúng. Theo một phương án ưu tiên, động vật có vú là người.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến phương pháp điều trị chứng tăng đường huyết ở động vật có vú, phương pháp này bao gồm việc sử dụng cho động vật có vú có nhu cầu điều trị một lượng hữu hiệu của hợp chất có công thức I, hoặc muối được dụng của chúng. Theo một phương án ưu tiên, động vật có vú là người.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến hợp chất có công thức I, hoặc muối được dụng của chúng, để sử dụng trong trị liệu.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến hợp chất có công thức I, hoặc muối được dụng của chúng, để sử dụng trong điều trị bệnh đái tháo đường typ II.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến hợp chất có công thức I, hoặc muối được dụng của chúng, để sử dụng trong việc hạ mức glucoza huyết.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến hợp chất có công thức I, hoặc muối được dụng của chúng, để sử dụng trong điều trị chứng tăng đường huyết.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến việc sử dụng hợp chất có công thức I, hoặc muối được dụng của chúng, để sản xuất thuốc nhằm điều trị bệnh đái tháo đường typ II.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến việc sử dụng hợp chất có công thức I, hoặc muối được dụng của chúng, để sản xuất thuốc nhằm hạ mức glucoza huyết.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến việc sử dụng hợp chất có công thức I, hoặc muối được dụng của chúng, trong sản xuất thuốc để điều trị chứng tăng đường huyết.

Theo một phương án ưu tiên, hợp chất có Công thức I được dùng qua đường miệng. Theo một phương án ưu tiên, hợp chất có Công thức I được dùng một lần mỗi ngày. Theo một phương án được ưu tiên khác, việc sử dụng trong trị liệu là sử dụng ở người.

Mô tả chi tiết sáng chế

Thuật ngữ “muối được dụng” được sử dụng ở đây để chỉ muối của hợp chất theo sáng chế được coi là có thể chấp nhận để sử dụng trong lâm sàng và/hoặc thú y. Các ví dụ về muối được dụng và các phương pháp luận chung để điều chế chúng có thể được tìm thấy trong “Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection and Use” P. Stahl, *et al.*, 2nd Revised Edition, Wiley-VCH, 2011 and S.M. Berge, *et al.*, “Pharmaceutical Salts”, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1977, 66(1), 1-19.

Ví dụ về dược phẩm và các quy trình điều chế dược phẩm này có thể được tìm thấy trong tài liệu chuyên ngành “Remington: The Science and Practice of Pharmacy”, Loyd, V., *et al.* Eds., 22nd Ed., Mack Publishing Co., 2012. Theo một phương án, dược phẩm này có thể được bào chế để sử dụng qua đường miệng. Tốt hơn là dược phẩm được bào chế thành viên nén, viên nang, hoặc dung dịch. Viên nén, viên nang, hoặc dung dịch này có thể chứa hợp chất có công thức I với lượng hữu hiệu để điều trị cho bệnh nhân cần điều trị.

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. Bác sĩ chăm sóc, với tư cách là người có kỹ năng trong lĩnh vực này, có thể dễ dàng xác định một

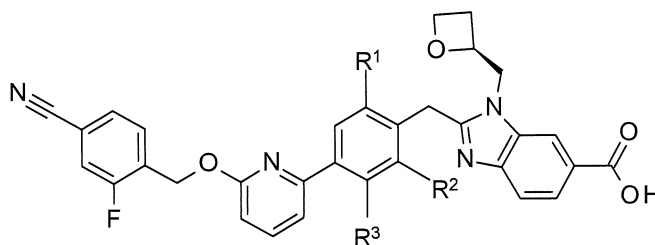
lượng hữu hiệu bằng cách sử dụng các kỹ thuật thông thường và bằng cách quan sát kết quả thu được trong các trường hợp tương tự. Các yếu tố được cân nhắc trong việc xác định lượng hoặc liều hữu hiệu của một hợp chất bao gồm: khi hợp chất hoặc muối của nó sẽ được sử dụng; thì có sử dụng đồng thời các chất khác hay không, nếu được sử dụng; các loài động vật có vú được điều trị; kích thước, độ tuổi và sức khỏe chung của nó; mức độ liên quan hoặc mức độ nghiêm trọng của rối loạn; phản ứng của từng cá thể động vật có vú; phương thức sử dụng; đặc điểm sinh khả dụng của chế phẩm được sử dụng; chế độ liều đã chọn; và các tình huống liên quan khác; Hợp chất theo sáng chế có tác dụng với liều mỗi ngày nằm trong khoảng từ 0,01 đến 15 mg/kg thể trọng.

Như được sử dụng ở đây, các thuật ngữ “việc điều trị”, “điều trị” hoặc “sự điều trị” đề cập đến việc hạ, làm giảm, hoặc đảo ngược sự tiến triển hoặc mức độ nghiêm trọng của triệu chứng, rối loạn, hoặc tình trạng bệnh hiện có, như chứng tăng đường huyết, mà có thể bao gồm việc tăng tiết insulin.

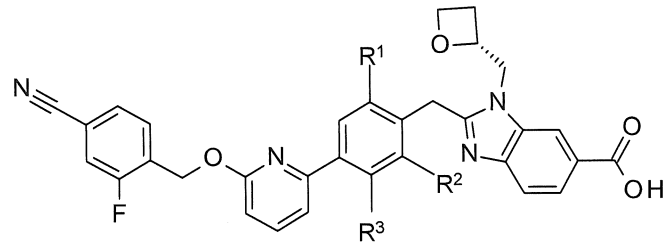
Hợp chất có công thức I có thể được bào chế thành dược phẩm để sử dụng theo đường bất kỳ mà làm cho hợp chất này sinh khả dụng. Tốt hơn là các dược phẩm này để sử dụng qua đường miệng. Các dược phẩm như vậy và các quy trình bào chế chúng là đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này (xem, ví dụ, Remington, 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 hữu dụng trong sử dụng để trị liệu theo sáng chế, với một số cấu hình được ưu tiên.

Hợp chất theo sáng chế bao gồm:



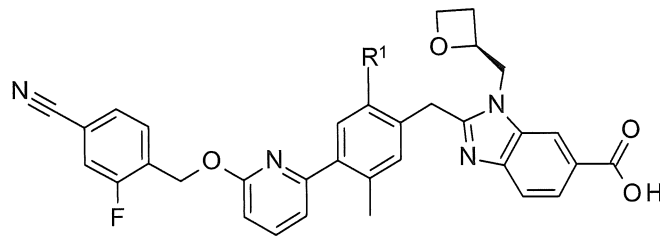
Công thức Ia; và



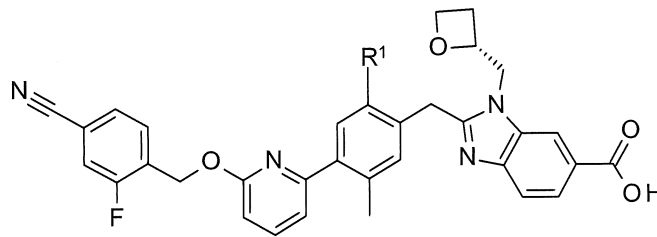
Công thức Ib,

hoặc muối được dụng của chúng.

Các hợp chất khác của sáng chế bao gồm:



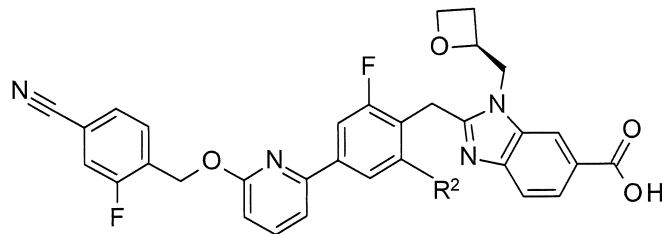
Công thức IIa; và



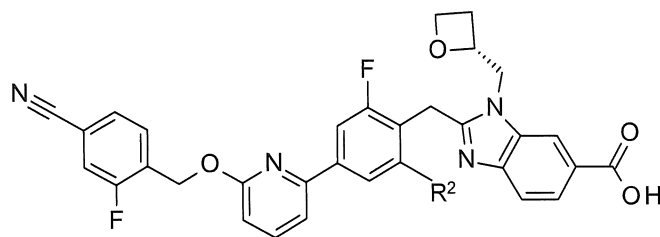
Công thức IIb,

hoặc muối được dụng của chúng.

Các hợp chất khác của sáng chế bao gồm:



Công thức IIIa; và



Công thức IIIb,

hoặc muối được dụng của chúng.

Mặc dù sáng chế bao gồm tất cả các chất đồng phân đối ảnh riêng rẽ, hỗn hợp của chúng, và các chất triệt quang, các hợp chất có Công thức Ia, IIa và IIIa, và muối được dụng của chúng, đặc biệt ưu tiên.

Các chất đồng phân đối ảnh riêng lẻ có thể được tách riêng hoặc được phân tách 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).

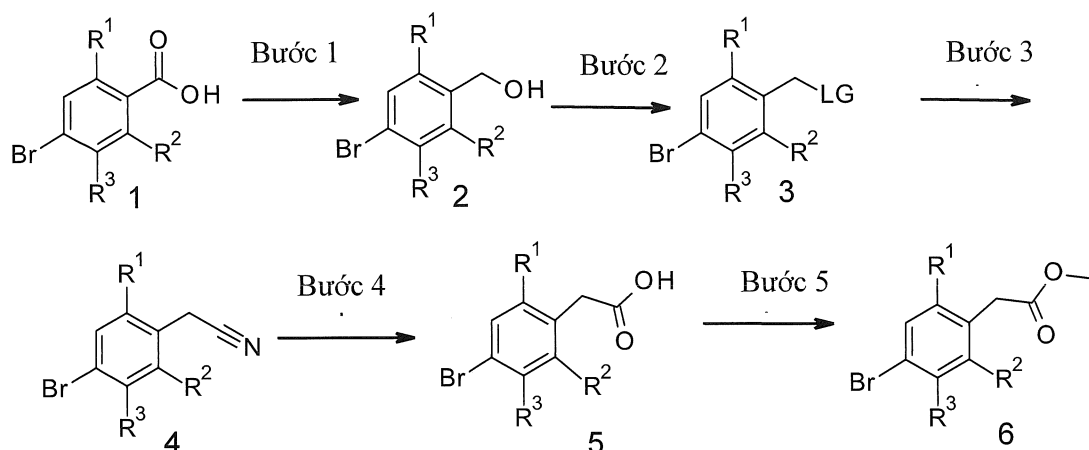
Muối được dụng của hợp chất theo sáng chế có thể được tạo ra, ví dụ, bằng phản ứng của hợp chất có công thức I và bazơ được dụng thích hợp trong dung môi thích hợp trong điều kiện tiêu chuẩn đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này (xem, ví dụ, Bastin, R.J., *et al.*; *Org. Process. Res. Dev.*, 4, 427-435, 2000 and Berge, S.M., *et al.*; *J. Pharm. Sci.*, 66, 1-19, 1977). Muối ưu tiên là muối *tert*-butyl amin (hoặc erbumin).

Một số ký hiệu viết tắt được sử dụng ở đây được định nghĩa theo Daub G.H., *et al.*, "The Use of Acronyms in Organic Chemistry" *Aldrichimica Acta*, 1984, 17(1), 6-23. Các ký hiệu viết tắt nhất định được định nghĩa dưới đây: "ACN" để chỉ axetonitril; "ATP" để chỉ adenosin triphosphat; "BSA" để chỉ Albumin huyết thanh bò; "cAMP" để chỉ adenosin-3',5'-monophosphat vòng; "DCM" để chỉ diclometan hoặc metylen clorua; "DIPEA" để chỉ N,N-diisopropyletylamin; "DMF" để chỉ N,N-dimetylformamit; "DMSO" để chỉ dimetyl sulfoxit; "EC₅₀" để chỉ nồng độ của chất tạo ra 50% đáp ứng của hoạt tính đích so với hợp chất đối chứng dương xác định trước (giá trị EC₅₀ ^{tuyệt đối});

“ES/MS” để chỉ phổ khối phun điện tử; “EtOAc” để chỉ ethyl axetat; “HATU” để chỉ 1-[bis(dimethylamino)metylen]-1*H*-1,2,3-triazolo[4,5-*b*]pyridini 3-oxid hexaflophosphat; “HEK” để chỉ thận phôi người; “HEPES” để chỉ axit 4-(2-hydroxyetyl)-1-piperazinetsulfonic; “h” để chỉ giờ, tương ứng; “MeOH” để chỉ metanol hoặc rượu metylic; “min” để chỉ phút; “Pd(dppf)Cl₂” để chỉ [1,1'-bis(diphenylphosphino)feroxen]diclopaladi(II); “RT” để chỉ nhiệt độ trong phòng; và “THF” để chỉ tetrahydrofuran.

Các hợp chất theo sáng chế có thể được điều chế bằng nhiều quy trình khác nhau, một số quy trình trong đó được minh họa trong các quy trình ví dụ điều chế và ví dụ dưới đây. Các bước tổng hợp cụ thể cho mỗi quy trình được mô tả có thể được kết hợp theo các cách khác nhau để điều chế các hợp chất theo sáng chế, hoặc muối của nó. Sản phẩm của mỗi bước dưới đây có thể được thu hồi bằng các phương pháp thông thường bao gồm phương pháp chiết, làm bay hơi, kết tủa, sắc ký, lọc, nghiền và kết tinh. Các chất phản ứng và nguyên liệu ban đầu đều dễ dàng kiếm được đối với người có kiến thức trung bình trong lĩnh vực. Các chất đồng phân, chất đồng phân đối ảnh, chất đồng phân không đối quang riêng rẽ có thể được phân tách hoặc tách ở thời điểm thuận lợi bất kỳ trong quá trình tổng hợp, bằng cách phương pháp như, kỹ thuật kết tinh chọn lọc hoặc sắc ký bất đối (Xem ví dụ, J. Jacques, *et al.*, “*Enantiomers, Racemates, and Resolutions*”, John Wiley and Sons, Inc., 1981, and E.L. Eliel and S.H. Wilen, “*Stereochemistry of Organic Compounds*”, Wiley-Interscience, 1994). Các sơ đồ, các quá trình điều chế và các ví dụ dưới đây được nêu ra nhằm minh họa thêm cho sáng chế và không làm giới hạn phạm vi của sáng chế.

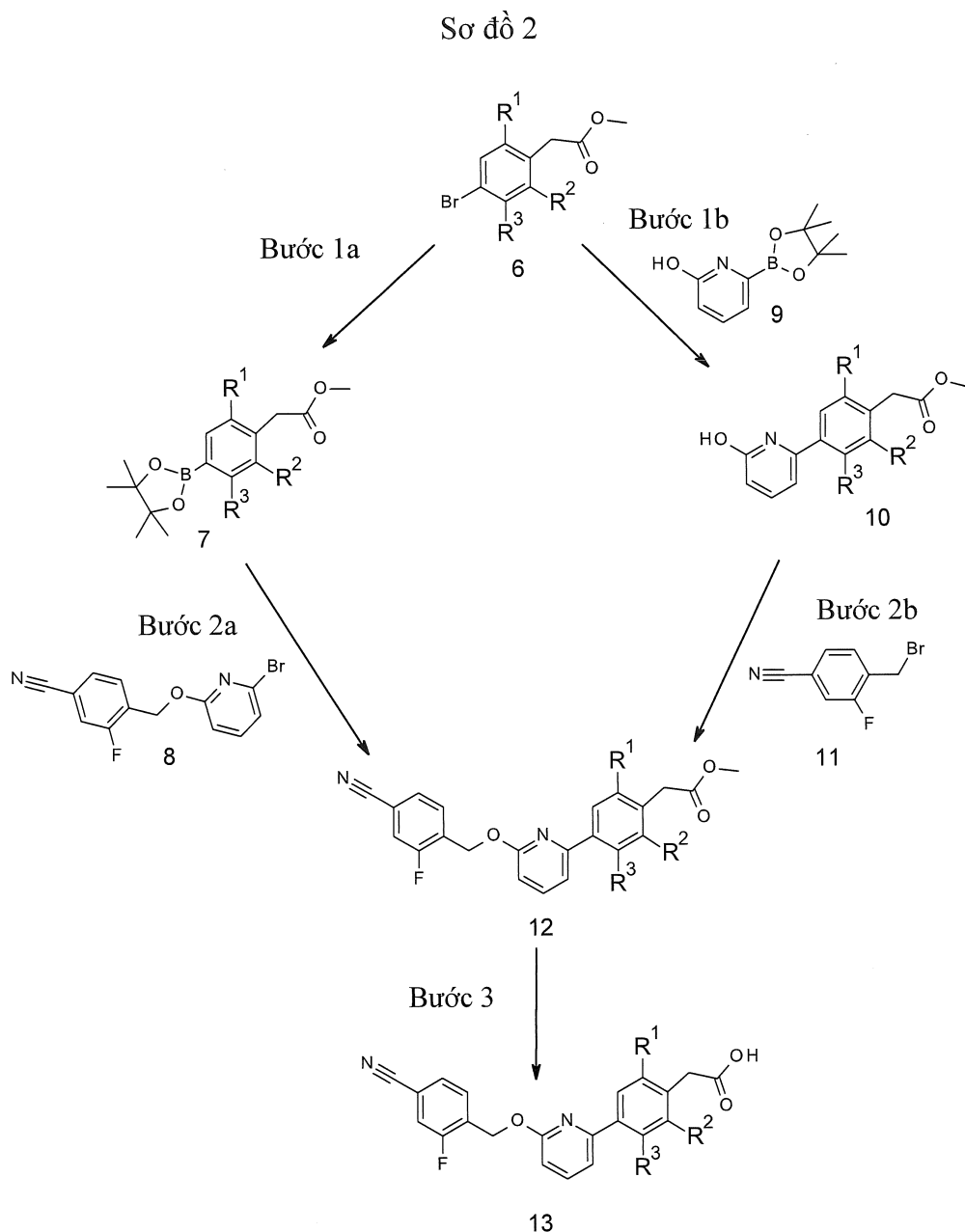
Sơ đồ 1



LG: nhóm rời chuyển

R^1 , R^2 và R^3 là như được xác định trong Công thức I

Sơ đồ 1 thể hiện quy trình tổng hợp hợp chất trung gian 6, mà được sử dụng để điều chế các hợp chất có công thức I. Axit benzoic 1 đầu tiên trải qua quá trình khử bằng phức chất boran dimetylsulfit trong bước 1 để tạo ra rượu 2. Rượu này được chuyển hóa thành nhóm rời chuyển (LG, hợp chất trung gian 3). Ví dụ, rượu trong hợp chất trung gian 2 có thể được chuyển hóa thành nhóm mesylat bằng cách sử dụng metansulfonyl clorua ở -15°C trong bước 2, hoặc nó có thể được chuyển hóa thành bromua bằng cách sử dụng phospho tribromua ở 0°C . Hợp chất trung gian 3 được phản ứng với NaCN trong bước 3 để tạo ra nitril 4. Nitril 4 được chuyển hóa với KOH ở nhiệt độ cao trong bước 4 để tạo ra axit 5, mà sau đó được este hóa trong bước 5 để tạo ra hợp chất trung gian 6 bằng cách sử dụng oxalyl clorua, DMF, và metanol.

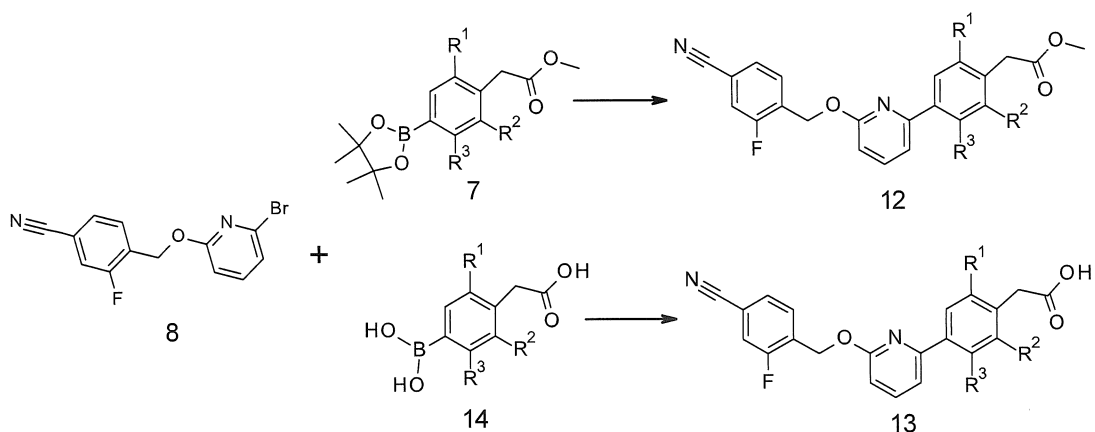


R^1 , R^2 và R^3 là như được xác định trong Công thức I

Sơ đồ 2 minh họa quy trình điều chế hợp chất trung gian quan trọng 12 để điều chế các hợp chất có công thức I qua hai con đường. Trong con đường thứ nhất, aryl halogenua 6 trải qua quá trình Miyura boryl hóa/kết hợp Suzuki trong một bình: sử dụng bis(pinacolato)diboron, Pd(dppf)Cl_2 , và kali axetat ở nhiệt độ cao, aryl halogenua 6 được chuyển hóa trong bước 1a thành boronic este 7, trong đó bromopyridin 8 và K_2CO_3 được bổ sung vào phản ứng (bước 2a) tạo ra hợp chất trung gian 12. Trong con đường thứ hai, quy trình hai bước được sử dụng: Phản ứng kết hợp Suzuki của aryl halogenua 6 với pinacol este của axit 6-hydroxypyridin-2-boronic 9 bằng cách sử dụng Pd(dppf)Cl_2 và

K_2CO_3 ở nhiệt độ cao (bước 1b) tạo ra hợp chất trung gian 10, mà sau đó được alkyl với 4-(bromometyl)-3-flobenzonitril 6 bằng cách sử dụng Ag_2CO_3 ở nhiệt độ cao (bước 2b) để tạo ra hợp chất trung gian 12. Thủy phân este hợp chất trung gian 12 trong bước 3 bằng cách sử dụng LiOH thu được hợp chất trung gian axit 13.

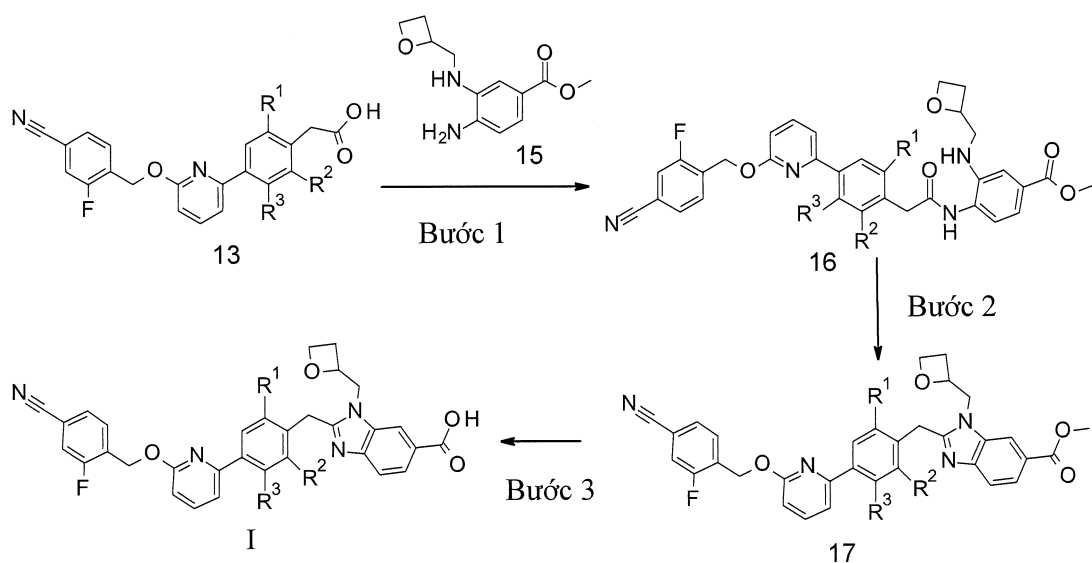
Sơ đồ 3



R^1 , R^2 và R^3 là như được xác định trong Công thức I

Ngoài ra, các chất trung gian quan trọng 12 và 13 có thể được điều chế theo Sơ đồ 3, phản ứng kết hợp bromopyridin 8 với boronic este 7 hoặc axit boronic 14 bằng cách sử dụng $Pd(dppf)Cl_2$ và kali cacbonat ở nhiệt độ cao.

Sơ đồ 4



R^1 , R^2 và R^3 là như được xác định trong Công thức I

Sơ đồ 4 thể hiện phản ứng chuyển hóa của hợp chất trung gian quan trọng 13 thành các hợp chất có Công thức I. Phản ứng kết hợp amit trong bước 1 bằng cách sử dụng HATU và dianilin 15 tạo ra hợp chất trung gian 16. Phản ứng vòng hóa (bước 2) được thực hiện bằng cách gia nhiệt hợp chất trung gian 16 trong axit axetic để tạo ra benzimidazol 17. Cuối cùng, trong bước 3 các hợp chất có công thức I thu được bằng cách thủy phân hợp chất 17 bằng cách sử dụng LiOH.

Quy trình điều chế

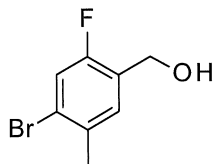
LC-ES/MS được tiến hành trên hệ thống sắc ký lỏng AGILENT® HP1200. Các kết quả đo phổ khối phun điện tử (thu được theo chế độ dương và/hoặc âm) được tạo ra trên phổ khối kế bốn cực Mass Selective Detector có giao diện với HPLC mà có thể có hoặc không có ELSD. Các điều kiện LC-ES/MS (độ pH thấp): Cột: 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 1 μL; Dung môi A: 10 mM NH₄HCO₃ độ 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.

Mẫu nhiễu xạ bột tia X (XRPD) của các chất rắn kết tinh thu được trên thiết bị nhiễu xạ bột tia X Bruker D4 Endeavor, có trang bị nguồn CuKα và bộ dò Vantec, vận hành ở điện thế 35 kV và cường độ 50 mA. Mẫu được quét trong khoảng góc nhiễu xạ 2θ từ 4 đến 40°, với kích thước bước góc nhiễu xạ 2θ là 0,008° và tốc độ quét là 0,5 giây/bước, và sử dụng độ phân kỳ 1,0 mm, bộ chống tán xạ cố định 6,6 mm, và các khe dò 11,3 mm. Bột khô được đưa lên bộ chứa mẫu bằng thạch anh và bề mặt trơn thu được bằng cách sử dụng con trượt thủy tinh. Nhiễu xạ đồ dạng tinh thể được thu thập ở nhiệt độ môi trường xung quanh và độ ẩm tương đối. Các vị trí đỉnh tinh thể được xác định trong dụng cụ MDI-Jade sau khi toàn bộ dịch chuyển mẫu trên cơ sở chất chuẩn nội

NIST 675 với các đỉnh ở 8,853 và 26,774 ở góc $2\theta^\circ$. Đã biết rõ trong lĩnh vực tinh thể học là, đối với một dạng tinh thể nhất định bất kỳ, thì cường độ tương đối của các đỉnh nhiễu xạ có thể thay đổi do sự định hướng được ưu tiên xuất phát từ các yếu tố như hình thái tinh thể hoặc dạng tinh thể. Khi xuất hiện tác động của sự định hướng được ưu tiên, thì cường độ đỉnh bị thay đổi, nhưng các vị trí đỉnh đặc trưng của dạng đa hình là không thay đổi. Xin xem, ví dụ, The United States Pharmacopeia #23, National Formulary #18, pages 1843-1844, 1995. Ngoài ra, cũng đã biết rõ trong lĩnh vực tinh thể học là, đối với một dạng tinh thể nhất định bất kỳ, thì các vị trí đỉnh ở góc có thể thay đổi một chút. Chẳng hạn, các vị trí đỉnh có thể dịch chuyển do biến đổi nhiệt độ mà mẫu được phân tích tại đó, sự thay thế mẫu, hoặc sự có mặt hoặc không có mặt chất chuẩn nội. Trong trường hợp này, biến thiên vị trí đỉnh là $\pm 0,2\ 2\theta^\circ$ được coi là có tính đến các biến thiên tiềm năng này gây cản trở việc xác định rõ ràng dạng tinh thể được chỉ ra. Cấu hình của dạng tinh thể có thể được tạo ra dựa trên dạng kết hợp đơn nhất các đỉnh phân biệt.

Quy trình điều chế 1

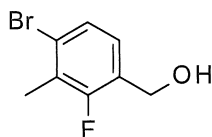
(4-Bromo-2-fluoro-5-methylphenyl)methanol



Bổ sung: Axit 4-bromo-2-fluoro-5-methylbenzoic (100 g, 421 mmol), THF (200 mL) và boran (dimethyl phức hợp sulfua, 2 mol/L dung dịch trong THF, 210 mL, 10 mmol) vào bình cầu. Khuấy hỗn hợp ở RT qua đêm. Ngừng phản ứng bằng HCl (dung dịch nước 1,0 N, 50 mL) và lọc hỗn hợp. Cô dịch lọc *trong chân không* và tách phần còn lại giữa EtOAc (400 mL) và nước (400 mL). Rửa các chất hữu cơ bằng dung dịch NaCl bão hòa (400 mL), làm khô bằng Na_2SO_4 , lọc, và cô để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục ở dạng rắn (93,5 g, 99%). $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7,29 (d, $J = 7,9$ Hz, 1H), 7,26 (d, $J = 9,1$ Hz, 1H), 4,69 (s, 2H), 2,38 (s, 3H).

Quy trình điều chế 2

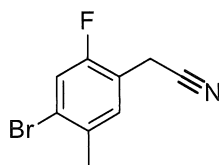
(4-Bromo-2-fluoro-3-methylphenyl)methanol



Điều chế hợp chất nêu ở đề mục về cơ bản giống như được mô tả trong Quy trình điều chế 1 bằng cách sử dụng axit 4-bromo-2-fluoro-3-methylbenzoic. Tinh chế sản phẩm bằng sắc ký cột silicagel sử dụng gradien từ 10 đến 35% EtOAc trong hexan. Thời gian lưu tại đỉnh LC-ES/MS: 1,01 phút.

Quy trình điều chế 3

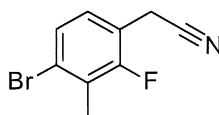
2-(4-Bromo-2-fluoro-5-methylphenyl)acetonitril



Hòa tan (4-bromo-2-fluoro-5-methylphenyl)methanol (92 g, 420 mmol) trong DCM (500 mL) và bổ sung triethylamin (120 mL, 861 mmol). Làm lạnh hỗn hợp xuống -15 °C và bổ sung từng giọt dung dịch metansulfonyl clorua (40 mL, 517 mmol) trong DCM (30 mL) vào hỗn hợp phản ứng. Khuấy hỗn hợp trong 30 phút ở nhiệt độ trong phòng. Tách hỗn hợp phản ứng giữa DCM (500 mL) và nước (500 mL). Rửa các chất hữu cơ bằng dung dịch NaCl bão hòa (500 mL), làm khô bằng Na₂SO₄, lọc, và cô. Hòa tan phần còn lại trong DMF (400 mL) và làm lạnh hỗn hợp bằng bồn băng. Bổ sung NaCN (21,0 g, 429 mmol) trong một phần vào hỗn hợp phản ứng và khuấy ở nhiệt độ trong phòng qua đêm. Tách hỗn hợp giữa EtOAc (400 mL) và nước (500 mL). Rửa các chất hữu cơ bằng dung dịch NaCl bão hòa (500 mL), làm khô bằng Na₂SO₄, lọc, và cô. Tinh chế phần còn lại bằng sắc ký cột silicagel sử dụng gradien từ 10 đến 30% EtOAc trong hexan để thu được hợp chất nêu ở đề mục (47,0 g, 48%) ở dạng dầu. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7,34 (d, *J* = 8,7 Hz, 1H), 7,32 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H), 3,71 (s, 2H), 2,41 (s, 3H).

Quy trình điều chế 4

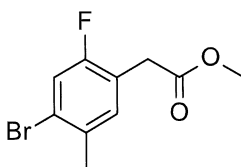
2-(4-Bromo-2-fluoro-3-methyl-phenyl)acetonitril



Trộn cùng nhau (4-bromo-2-flo-3-metyl-phenyl)metanol (1,90 g, 8,67 mmol) và DCM (20 mL). Làm lạnh hỗn hợp xuống 0 °C, sau đó bổ sung từng giọt phospho tribromua (1,0 mL, 11 mmol). Khuấy hỗn hợp ở 0 °C trong 15 phút, sau đó bazơ hóa hỗn hợp bằng dung dịch NaHCO₃ bão hòa (10 mL). Chiết hỗn hợp bằng DCM (40 mL). Rửa các chất hữu cơ bằng nước muối (30mL), làm khô bằng (Na₂SO₄), lọc và cô để thu được chất rắn. Hòa tan chất rắn trong DMSO (10 mL), sau đó bổ sung NaCN (0,60 g, 13,0 mmol) và khuấy trong 1 giờ. Tách hỗn hợp giữa EtOAc (50 mL) và nước (50 mL). Rửa các chất hữu cơ bằng nước muối (50 mL), làm khô bằng Na₂SO₄, lọc và cô để thu được sản phẩm ở dạng chất rắn (1,3 g, 64%). Thời gian lưu tại đỉnh LC-ES/MS: 1,17 phút

Quy trình điều chế 5

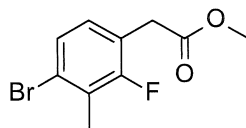
Metyl 2-(4-bromo-2-flo-5-metyl-phenyl)axetat



Bổ sung: 2-(4-bromo-2-flo-5-metylphenyl)axetonitril (1,20 g, 5,10 mmol), etanol (5 mL), nước (3 mL), và kali hydroxit (0,90 g, 16 mmol) vào bình. Gia nhiệt hỗn hợp ở 90 °C qua đêm. Làm lạnh hỗn hợp bằng bồn băng và axit hóa bằng HCl 1,0 M đến độ pH=4-5, sau đó tách hỗn hợp giữa EtOAc (30 mL) và nước (30 mL). Rửa các chất hữu cơ bằng dung dịch NaCl bão hòa (30 mL), làm khô bằng Na₂SO₄, lọc, và cô để thu được axit 2-(4-bromo-2-flo-5-metyl-phenyl)axetic ở dạng rắn. Hòa tan hợp chất này trong DCM (10 mL), sau đó bổ sung DMF (0,05 mL, 0,6 mmol) và oxalyl clorua (0,5 mL, 6 mmol) ở nhiệt độ trong phòng. Khuấy hỗn hợp ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút, sau đó bổ sung từng giọt MeOH (2 mL, 49,4 mmol). Sau 30 phút, loại bỏ dung môi trong chân không và tách phần còn lại giữa EtOAc (40 mL) và NaHCO₃ 5% (30 mL). Rửa các chất hữu cơ bằng dung dịch NaCl bão hòa (40 mL), làm khô bằng Na₂SO₄, lọc, và cô để thu được hợp chất nêu ở đề mục ở dạng dầu (1,1 g, 80%). ES/MS m/z (⁷⁹Br, ⁸¹Br) 278,280 (M+NH₄⁺).

Quy trình điều chế 6

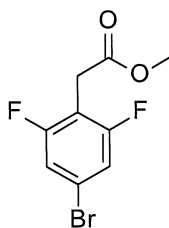
Metyl 2-(4-bromo-2-flo-3-metyl-phenyl)axetat



Điều chế hợp chất nêu ở đề mục về cơ bản giống như được mô tả trong Quy trình điều chế 5 bằng cách sử dụng 2-(4-bromo-2-fluoro-3-methylphenyl)axetonitril. Thời gian lưu tại đỉnh LC-ES/MS: 1,22 phút.

Quy trình điều chế 7

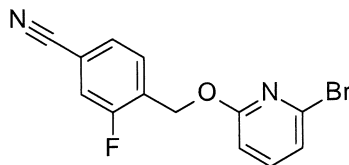
Metyl 2-(4-bromo-2,6-diflophenyl)axetat



Trộn axit 4-bromo-2,6-diflophenylaxetic (3,30 g, 12,5 mmol), DCM (20 mL), DMF (0,05 mL, 0,6 mmol), và oxalyl clorua (1,3 mL, 15 mmol). Khuấy hỗn hợp ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút, sau đó bổ sung từng giọt MeOH (1,5 mL, 37 mmol, 100 % khối lượng). Cô hỗn hợp và tách giữa EtOAc (30 mL) và dung dịch NaHCO₃ bão hòa (15 mL). Rửa các chất hữu cơ bằng dung dịch NaCl bão hòa (30 mL), làm khô bằng Na₂SO₄, lọc, và cô để thu được hợp chất nêu ở đề mục ở dạng dầu (3,41 g, năng suất định lượng), được sử dụng mà không cần tinh chế thêm trong Quy trình điều chế 10. ES/MS m/z (⁷⁹Br, ⁸¹Br) 265,267 (M+H).

Quy trình điều chế 8

4-[(6-Bromo-2-pyridyl)oxyMetyl]-3-flo-benzonitril

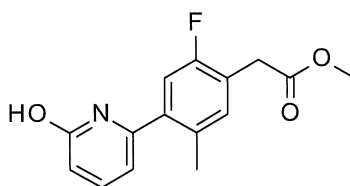


Hòa tan 2-bromo-6-flopyridin (2,50 g, 13,8 mmol) và 3-flo-4-(hydroxymetyl)benzonitril (2,15 g, 13,8 mmol) trong 1,4-dioxan (25 mL) và bổ sung từng giọt dung dịch kali *tert*-butoxit (20 % khối lượng trong THF, 10,0 mL, 16,6 mmol)

trong 12 phút ở nhiệt độ trong phòng. Gia nhiệt hỗn hợp phản ứng ở 40 °C trong 30 phút. Rót hỗn hợp vào dung dịch K₂CO₃ (1M) và chiết hai lần bằng EtOAc. Rửa các chất hữu cơ bằng nước và dung dịch NaCl bão hòa, làm khô bằng Na₂SO₄, lọc, và cô. Làm khô phần còn lại trong lò chân không ở 50 °C để thu được hợp chất nêu ở đề mục (4,23 g, 95%) ở dạng chất rắn màu vàng nhạt. ES/MS *m/z* (⁷⁹Br, ⁸¹Br) 307,309 (M+H).

Quy trình điều chế 9

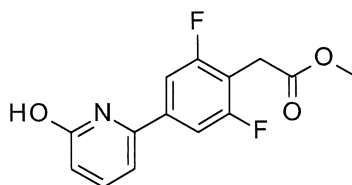
Metyl 2-[2-flo-4-(6-hydroxy-2-pyridyl)-5-metyl-phenyl]axetat



Bổ sung pinacol este của axit 6-hydroxypyridin-2-boronic (1,6 g, 6,9 mmol), metyl 2-(4-bromo-2-flo-5-metyl-phenyl)axetat (2,2 g, 8,4 mmol), THF (15 mL), nước (1 mL), và kali cacbonat (2,0 g, 14 mmol). Làm sạch hỗn hợp bằng nitơ trong 10 phút, sau đó bổ sung Pd(dppf)Cl₂ (0,26 g, 0,35 mmol) và gia nhiệt ở 75 °C trong 2 giờ. Tách hỗn hợp giữa EtOAc (30 mL) và nước (30 mL). Rửa các chất hữu cơ bằng dung dịch NaCl bão hòa (30 mL), làm khô bằng Na₂SO₄, lọc và cô để thu được hợp chất nêu ở đề mục (1,4 g, 74%) ở dạng rắn. ES/MS *m/z* 276 (M+H), 274 (M-H).

Quy trình điều chế 10

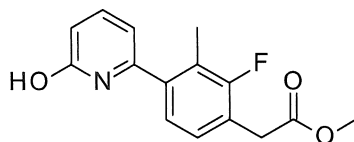
Metyl 2-[2,6-diflo-4-(6-hydroxy-2-pyridyl)phenyl]axetat



Điều chế hợp chất nêu ở đề mục về cơ bản giống như được mô tả trong Quy trình điều chế 9 bằng cách sử dụng metyl 2-(4-bromo-2,6-diflophenyl)axetat, gia nhiệt hỗn hợp phản ứng ở 75 °C qua đêm. ES/MS *m/z* 280 (M+H).

Quy trình điều chế 11

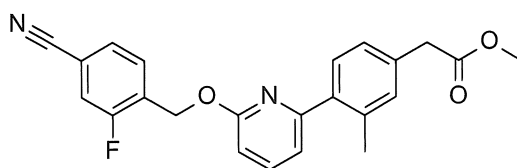
Metyl 2-[2-flo-4-(6-hydroxy-2-pyridyl)-3-metyl-phenyl]axetat



Điều chế hợp chất nêu ở đề mục về cơ bản giống như được mô tả trong Quy trình điều chế 9 bằng cách sử dụng methyl 2-(4-bromo-2-fluoro-3-methyl-phenyl)acetat, gia nhiệt hỗn hợp phản ứng ở 75 °C qua đêm (18 giờ). ES/MS m/z 276 (M+H), 274 (M-H).

Quy trình điều chế 12

Methyl 2-[4-[6-[(4-cyano-2-fluorophenyl)methoxy]-2-pyridyl]-3-methyl-phenyl]acetat

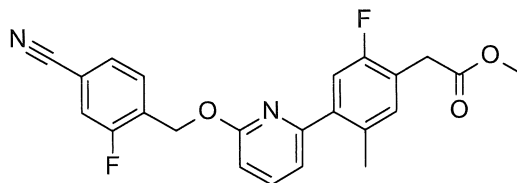


Hòa tan axit 2-(4-bromo-3-methylphenyl)acetic (10,7 g, 45,8 mmol) trong DCM (50 mL). Làm lạnh hỗn hợp trong bể băng/nước, sau đó bổ sung oxalyl clorua (4,8 mL, 55 mmol) và DMF (0,1 mL). Lấy bể băng/nước và được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ. Bổ sung từng giọt MeOH (6,0 mL) trong 2 phút và khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Cô hỗn hợp phản ứng *trong chân không* và hòa tan phần còn lại trong EtOAc. Rửa các chất hữu cơ bằng dung dịch bão hòa NaHCO₃ và dung dịch NaCl bão hòa. Làm khô các chất hữu cơ bằng Na₂SO₄, sau đó lọc và cô. Với phần còn lại, bổ sung bis(pinacolato)diboron (12,8 g, 50,4 mmol) và kali axetat (13,6 g, 137 mmol). Sục khí nitơ qua hỗn hợp phản ứng trong 15 phút, sau đó bổ sung Pd(dppf)Cl₂ (phức với DCM, 1,13 g, 1,37 mmol). Gia nhiệt hỗn hợp phản ứng dưới nitơ ở 85 °C trong 15 giờ trong bể dầu, sau đó lấy bình phản ứng ra khỏi bể dầu. Hòa tan kali cacbonat (9,49 g, 68,7 mmol) trong nước (60 mL), sục khí nitơ toàn bộ dung dịch trong 10 phút, và sau đó bổ sung dung dịch này vào hỗn hợp phản ứng tiếp theo là 4-[(6-bromo-2-pyridyl)oxymethyl]-3-fluorobenzonitril (14,1 g, 45,8 mmol). Sục khí nitơ qua toàn bộ hỗn hợp phản ứng trong 5 phút và gia nhiệt dưới nitơ ở 85 °C trong 6 giờ. Làm lạnh hỗn hợp phản ứng đến gần RT và cô *trong chân không* để loại bỏ phần lớn 1,4-dioxan. Pha loãng hỗn hợp này bằng EtOAc (200 mL) và rửa bằng nước và dung dịch NaCl bão hòa. Làm khô các chất hữu cơ bằng Na₂SO₄, sau đó lọc và cô. Tinh chế sản phẩm thô bằng sắc ký

cột silicagel sử dụng gradien từ 5 đến 50% EtOAc trong hexan để thu được hợp chất nêu ở đề mục (13,3 g, 70%) ở dạng chất rắn màu vàng nhạt. ES/MS m/z 391 (M+H).

Quy trình điều chế 13

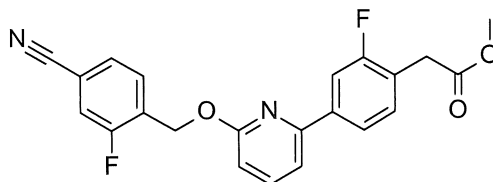
Metyl 2-[4-[6-[(4-xyano-2-flo-phenyl)metoxy]-2-pyridyl]-2-flo-5-metyl-phenyl]axetat



Bổ sung metyl 2-[2-flo-4-(6-hydroxy-2-pyridyl)-5-metyl-phenyl]axetat (1,40 g, 5,09 mmol), 1,4-dioxan (35 mL), bạc cacbonat (1,7 g, 6,2 mmol), và 4-(bromoMetyl)-3-flobenzonitril (1,4 g, 6,2 mmol) vào bình. Gia nhiệt hỗn hợp ở 60 °C qua đêm. Lọc chất rắn và cô dịch lọc. Tinh chế phần còn lại bằng sắc ký cột silicagel bằng cách sử dụng 12 đến 55% EtOAc trong hexan để thu được hợp chất nêu ở đề mục (1,60 g, 77%) ở dạng rắn. ES/MS m/z 409 (M+H), 407 (M-H).

Quy trình điều chế 14

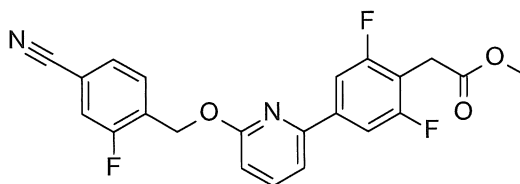
Metyl 2-[4-[6-[(4-xyano-2-flo-phenyl)metoxy]-2-pyridyl]-2-flo-phenyl]axetat



Nạp 4-[(6-bromo-2-pyridyl)oxymetyl]-3-flo-benzonitril (2,02 g, 6,58 mmol), metyl 2-(2-flo-4-(4,4,5,5-tetrametyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)phenyl)axetat (2,99 g, 9,88 mmol), K₂CO₃ (2,30 g, 16,5 mmol), 1,4-dioxan (30 mL) và nước (10 mL) vào bình. Sục khí nitơ toàn bộ hỗn hợp trong 10 phút. Bổ sung phức Pd(dppf)Cl₂ DCM (492 mg, 0,658 mmol) vào hỗn hợp và gia nhiệt đến 80 °C dưới nitơ trong 5 giờ. Làm lạnh hỗn hợp phản ứng, pha loãng bằng EtOAc (75 mL) và lọc qua đệm Celite®. Rửa dịch lọc bằng nước và dung dịch NaCl bão hòa, làm khô bằng Na₂SO₄, lọc và cô. Tinh chế phần cần thu được bằng sắc ký cột silicagel với gradien từ 5 đến 90% EtOAc trong hexan để thu được hợp chất nêu ở đề mục (2,68 g, 94%). ES/MS m/z 395 (M+H).

Quy trình điều chế 15

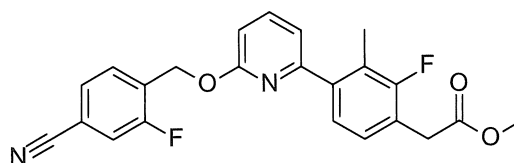
Metyl 2-[4-[6-[(4-xyano-2-flo-phenyl)metoxy]-2-pyridyl]-2,6-diflo-phenyl]axetat



Điều chế hợp chất nêu ở đề mục về cơ bản giống như được mô tả trong Quy trình điều chế 13 bằng cách sử dụng metyl 2-[2,6-diflo-4-(6-hydroxy-2-pyridyl)phenyl]axetat, gia nhiệt hỗn hợp phản ứng ở 80°C qua đêm. ES/MS m/z 413 (M+H).

Quy trình điều chế 16

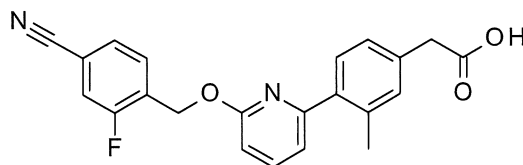
Metyl 2-[4-[6-[(4-xyano-2-flo-phenyl)metoxy]-2-pyridyl]-2-flo-3-metyl-phenyl]axetat



Điều chế hợp chất nêu ở đề mục về cơ bản giống như được mô tả trong Quy trình điều chế 13 bằng cách sử dụng metyl 2-[2-flo-4-(6-hydroxy-2-pyridyl)-3-metyl-phenyl]axetat, gia nhiệt hỗn hợp phản ứng ở 80 °C trong 3 giờ. ES/MS m/z 409 (M+H).

Quy trình điều chế 17

Axit 2-[4-[6-[(4-xyano-2-flo-phenyl)metoxy]-2-pyridyl]-3-metyl-phenyl]axetic

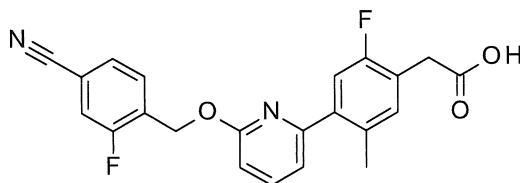


Bổ sung metyl 2-[4-[6-[(4-xyano-2-flo-phenyl)metoxy]-2-pyridyl]-3-metyl-phenyl]axetat (1,20 g, 3,07 mmol), ACN (20 mL), nước (10 mL), và lithi hydroxit (0,35 g, 15 mmol) vào bình. Gia nhiệt hỗn hợp ở 45 °C trong 3 giờ. Làm lạnh hỗn hợp bằng bồn băng và axit hóa bằng HCl 1,0 M đến độ pH = 4-5. Tách hỗn hợp giữa EtOAc (30 mL) và nước (30 mL). Rửa các chất hữu cơ bằng nước muối (30 mL), làm khô bằng

Na₂SO₄, lọc, và cô để thu được hợp chất nêu ở đề mục (1,1g, 95%) ở dạng rắn. ES/MS m/z 377 (M+H).

Quy trình điều chế 18

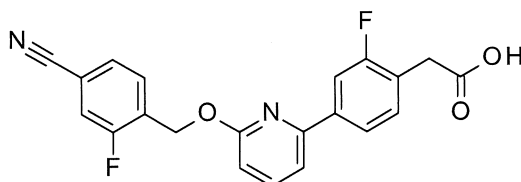
Axit 2-[4-[6-[(4-xyano-2-flo-phenyl)methoxy]-2-pyridyl]-2-flo-5-metyl-phenyl]axetic



Bổ sung methyl 2-[4-[6-[(4-xyano-2-flo-phenyl)methoxy]-2-pyridyl]-2-flo-5-metyl-phenyl]axetat (1,6 g, 3,9 mmol), ACN (20 mL), nước (6 mL), và lithi hydroxit (0,45 g, 19 mmol) vào lọ nhỏ. Gia nhiệt hỗn hợp ở 45 °C trong 2 giờ, làm lạnh hỗn hợp bằng bồn băng, và axit hóa bằng HCl 1,0 M đến độ pH = 4-5. Tách hỗn hợp giữa EtOAc (50 mL) và nước (50 mL). Rửa các chất hữu cơ bằng dung dịch NaCl bão hòa (50 mL), làm khô bằng Na₂SO₄, lọc và cô để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục (1,55g, 100%) ở dạng rắn. ES/MS m/z 395 (M+H).

Quy trình điều chế 19

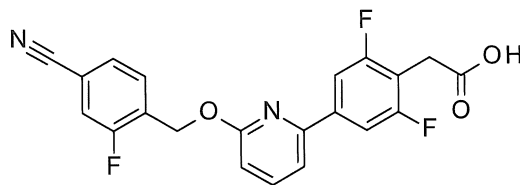
Axit 2-[4-[6-[(4-xyano-2-flo-phenyl)methoxy]-2-pyridyl]-2-flo-phenyl]axetic



Hòa tan methyl 2-[4-[6-[(4-xyano-2-flo-phenyl)methoxy]-2-pyridyl]-2-flo-phenyl]axetat (2,68 g, 6,25 mmol) trong THF (50 mL), sau đó bổ sung lithi hydroxit (797 mg, 32,9 mmol) và nước (20 mL). Sau khi khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 5 giờ, điều chỉnh độ pH của hỗn hợp phản ứng đến 5 bằng dung dịch HCl (1M). Loại bỏ dung môi bay hơi *trong chân không* để thu được huyền phù đặc chứa nước. Lọc và làm khô chất rắn này để thu được hợp chất nêu ở đề mục (2,24 g, 88%). ES/MS m/z 381 (M+H).

Quy trình điều chế 20

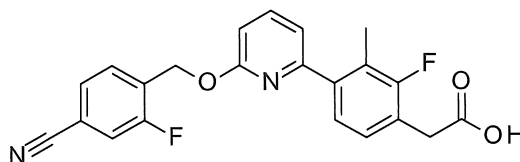
Axit 2-[4-[6-[(4-xyano-2-flo-phenyl)methoxy]-2-pyridyl]-2,6-diflo-phenyl]axetic



Điều chế hợp chất nêu ở đề mục về cơ bản giống như được mô tả trong Quy trình điều chế 18 bằng cách sử dụng Metyl 2-[4-[6-[(4-xyano-2-flo-phenyl)methoxy]-2-pyridyl]-2,6-diflo-phenyl]axetat. ES/MS m/z 399 (M+H).

Quy trình điều chế 21

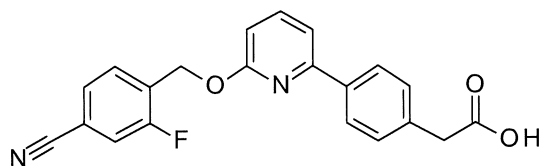
Axit 2-[4-[6-[(4-xyano-2-flo-phenyl)methoxy]-2-pyridyl]-2-flo-3-metyl-phenyl]axetic



Điều chế hợp chất nêu ở đề mục về cơ bản giống như được mô tả trong Quy trình điều chế 17 bằng cách sử dụng Metyl 2-[4-[6-[(4-xyano-2-flo-phenyl)methoxy]-2-pyridyl]-2-flo-3-metyl-phenyl]axetat. ES/MS m/z 395 (M+H).

Quy trình điều chế 22

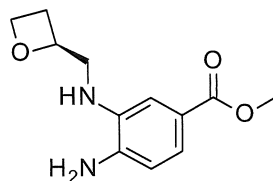
Axit 2-[4-[6-[(4-xyano-2-flo-phenyl)methoxy]-2-pyridyl]phenyl]axetic



Trộn đồng thời 4-[(6-bromo-2-pyridyl)oxy]Metyl-3-flo-benzonitril (0,70 g, 2,3 mmol) và axi t2-(4-boronophenyl)axetic (0,64 g, 3,4 mmol), THF (15 mL), nước (5 mL) và kali cacbonat (0,63 g, 4,6 mmol). Làm sạch hỗn hợp bằng nitơ trong 10 phút, sau đó bổ sung Pd(dppf)Cl₂ (0,085 g, 0,11 mmol) và gia nhiệt hỗn hợp ở 75 °C trong 8 giờ. Axit hóa hỗn hợp đến độ pH=4-5 bằng dung dịch HCl (1 M). Tách hỗn hợp giữa EtOAc (50 mL) và nước (50 mL). Rửa các chất hữu cơ bằng nước muối (50 mL), làm khô bằng (Na₂SO₄), sau đó lọc và cô. Tinh chế phần còn lại bằng sắc ký cột silicagel sử dụng gradien từ 25 đến 65% EtOAc trong hexan để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục (800 mg, hiệu suất 97%) ở dạng rắn. ES/MS m/z 363,0 (M+H).

Quy trình điều chế 23

Metyl 4-amino-3-[[[(2S)-oxetan-2-ylMetyl]amino]benzoat

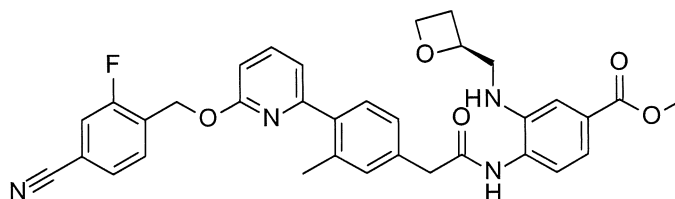


Dung dịch metyl 3-flu-4-nitro-benzoat (2,0 g, 10 mmol) trong THF (10 mL) và DMF (10 mL) bổ sung triethylamin (3,1 mL, 22 mmol) ở nhiệt độ trong phòng. Dung dịch màu vàng nhạt được bổ sung [(2S)-oxetan-2-yl]metanamin (Austin Chemical Company, 1,0 g, 11 mmol) và khuấy dung dịch màu rỉ sét qua đêm. Pha loãng hỗn hợp phản ứng bằng EtOAc (100 mL) và nước (50 mL). Tách lớp hữu cơ và sau đó chiết lại lớp nước bằng EtOAc (2×50 mL). Kết hợp các chất hữu cơ và rửa bằng dung dịch NaCl bão hòa. Làm khô các chất hữu cơ bằng Na_2SO_4 , lọc, cô, và làm khô phần còn lại trong điều kiện chân không cao. Bước này tạo ra metyl 4-nitro-3-[[[(2S)-oxetan-2-ylmetyl]amino]benzoat thô (2,8 g, 10 mmol) ở dạng chất rắn màu vàng (ES/MS m/z 267 (M+H)).

Tiếp theo, hòa tan metyl 4-nitro-3-[[[(2S)-oxetan-2-ylmetyl]amino]benzoat (2,8 g, 10 mmol) trong THF (50 mL) và bổ sung paladi trên cacbon (5% được làm ướt trước bằng nước, 0,5 g). Làm sạch trong chân không hỗn hợp phản ứng bằng hydro sau đó khuấy dưới bóng khí hydro ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ, trong thời gian này màu vàng biến mất. Lọc hỗn hợp qua Celite® và cô để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục (2,4g, 99%). ES/MS m/z 237 (M+H).

Quy trình điều chế 24

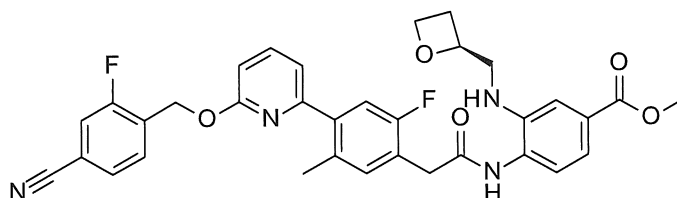
Metyl 4-[[[2-[4-[6-[(4-cyano-2-flu-phenyl)methoxy]-2-pyridyl]-3-methyl-phenyl]acetyl]amino]-3-[[[(2S)-oxetan-2-ylmetyl]amino]benzoat



Bổ sung axit 2-[4-[6-[(4-xyano-2-flo-phenyl)methoxy]-2-pyridyl]-3-methyl-phenyl]axetic (1,10 g, 2,92 mmol), DMF (10 mL), HATU (1,4 g, 3,6 mmol), methyl 4-amino-3-[[[(2S)-oxetan-2-ylmethyl]amino]benzoat (0,76 g, 3,2 mmol), và DIPEA (1,5 mL, 8,6 mmol) vào lọ nhỏ. Khuấy hỗn hợp ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút, sau đó tách giữa EtOAc (30 mL) và nước (30 mL). Rửa các chất hữu cơ bằng dung dịch NaCl bão hòa (30 mL), sau đó làm khô bằng Na₂SO₄, lọc, và cô. Tinh chế phần còn lại bằng sắc ký cột silicagel sử dụng gradien từ 10 đến 35% EtOAc trong DCM để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục (1,2 g, 69%) ở dạng rắn. ES/MS *m/z* 595 (M+1), 593 (M-1).

Quy trình điều chế 25

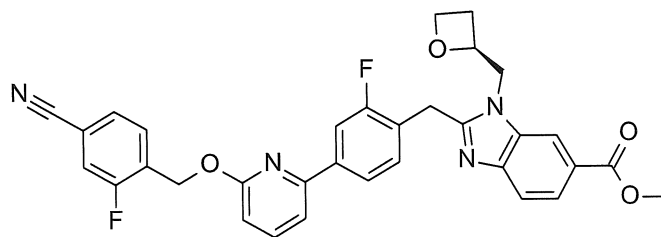
Methyl 4-[[2-[4-[6-[(4-xyano-2-flo-phenyl)methoxy]-2-pyridyl]-2-flo-5-methyl-phenyl]axetyl]amino]-3-[[[(2S)-oxetan-2-ylmethyl]amino]benzoat



Bổ sung: Axit 2-[4-[6-[(4-xyano-2-flo-phenyl)methoxy]-2-pyridyl]-2-flo-5-methyl-phenyl]axetic (1,20 g, 3,04 mmol), DMF (15 mL), HATU (1,2 g, 3,1 mmol), Methyl 4-amino-3-[[[(2S)-oxetan-2-ylmethyl]amino]benzoat (0,80 g, 3,4 mmol) và DIPEA (1,5 mL, 8,6 mmol) vào bình cầu. Khuấy hỗn hợp ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút, sau đó tách giữa EtOAc (30 mL) và nước (30 mL). Rửa các chất hữu cơ bằng dung dịch NaCl bão hòa (30 mL), sau đó làm khô bằng Na₂SO₄, lọc và cô. Tinh chế phần còn lại bằng sắc ký cột silicagel sử dụng gradien từ 10 đến 35% EtOAc trong DCM để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục ở dạng rắn (1,20 g, 64%). ES/MS *m/z* 613 (M+1), 611 (M-H).

Quy trình điều chế 26

Methyl 2-[[4-[6-[(4-xyano-2-flo-phenyl)methoxy]-2-pyridyl]-2-flo-phenyl]metyl]-3-[[[(2S)-oxetan-2-yl]metyl]benzimidazol-5-carboxylat

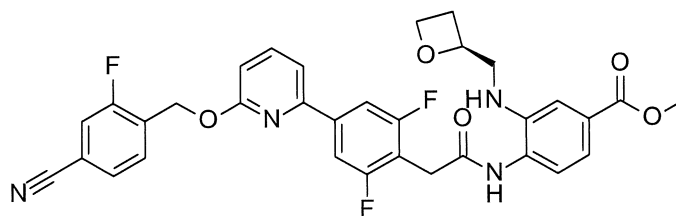


Bổ sung axit 2-[4-[6-[(4-xyano-2-flo-phenyl)metoxy]-2-pyridyl]-2-flo-phenyl]axetic (205 mg, 0,540 mmol), Metyl 4-amino-3-[[[(2S)-oxetan-2-ylmetyl]amino]benzoat (116 mg, 0,490 mmol), HATU (224 mg, 0,589 mmol), DIPEA (0,26 mL, 1,5 mmol), và DMF (5 mL) vào bình cầu đáy tròn. Sau khi khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 3,5 giờ, pha loãng hỗn hợp phản ứng bằng EtOAc (30 mL) và rửa với nước và dung dịch NaCl bão hòa. Làm khô các chất hữu cơ bằng Na_2SO_4 , lọc và cô. Tinh chế phần còn lại bằng sắc ký cột silicagel sử dụng gradien từ 0 đến 10% MeOH trong DCM để thu được amit trung gian (326 mg). ES/MS m/z 599 (M+H).

Gia nhiệt amit trung gian bằng axit axetic (5 mL) ở 50 °C trong 15 giờ. Cô hỗn hợp phản ứng *trong chân không* và hòa tan phần còn lại trong EtOAc (25 mL). Rửa các chất hữu cơ bằng dung dịch bão hòa NaHCO_3 và dung dịch NaCl bão hòa. Làm khô các chất hữu cơ bằng Na_2SO_4 , lọc và cô. Tinh chế sản phẩm thu được bằng sắc ký cột silicagel sử dụng gradien từ 20 đến 100% EtOAc trong hexan để thu được hợp chất nêu ở đề mục (152 mg, 52%). ES/MS m/z 581 (M+H).

Quy trình điều chế 27

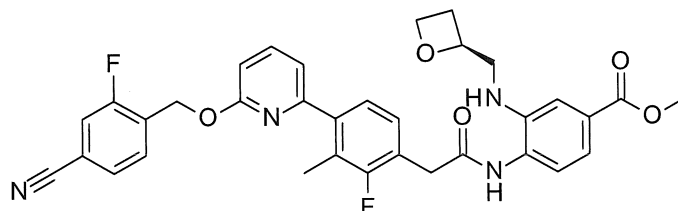
Metyl 4-[[2-[4-[6-[(4-xyano-2-flo-phenyl)metoxy]-2-pyridyl]-2,6-diflo-phenyl]axetyl]amino]-3-[[[(2S)-oxetan-2-ylmetyl]amino]benzoat



Điều chế hợp chất nêu ở đề mục về cơ bản giống như được mô tả trong Quy trình điều chế 24 bằng cách sử dụng axit 2-[4-[6-[(4-xyano-2-flo-phenyl)metoxy]-2-pyridyl]-2,6-diflo-phenyl]axetic. Thu gom sản phẩm kết tủa trong quá trình tạo nước bằng cách lọc và sử dụng mà không cần tinh chế thêm. ES/MS m/z 617 (M+H), 615 (M-H).

Quy trình điều chế 28

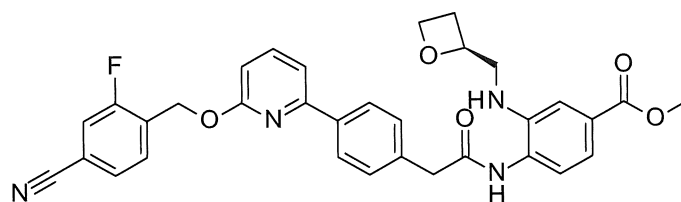
Metyl 4-[[2-[4-[6-[(4-xyano-2-flo-phenyl)metoxy]-2-pyridyl]-2-flo-3-metyl-phenyl]axetyl]amino]-3-[[[(2S)-oxetan-2-ylmetyl]amino]benzoat



Điều chế hợp chất nêu ở đề mục về cơ bản giống như được mô tả trong Quy trình điều chế 24 bằng cách sử dụng axit 2-[4-[6-[(4-xyano-2-flo-phenyl)metoxy]-2-pyridyl]-2-flo-3-metyl-phenyl]axetic. ES/MS m/z 613 (M+H), 611 (M-H).

Quy trình điều chế 29

Metyl 4-[[2-[4-[6-[(4-xyano-2-flo-phenyl)metoxy]-2-pyridyl]phenyl]axetyl]amino]-3-[[[(2S)-oxetan-2-ylmetyl]amino]benzoat

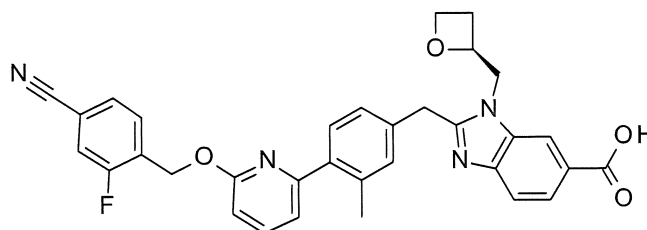


Điều chế hợp chất nêu ở đề mục về cơ bản giống như được mô tả trong Quy trình điều chế 25 bằng cách sử dụng axit 2-[4-[6-[(4-xyano-2-flo-phenyl)metoxy]-2-pyridyl]phenyl]axetic. ES/MS m/z 581,0 (M+H), 579,0 (M-H).

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1

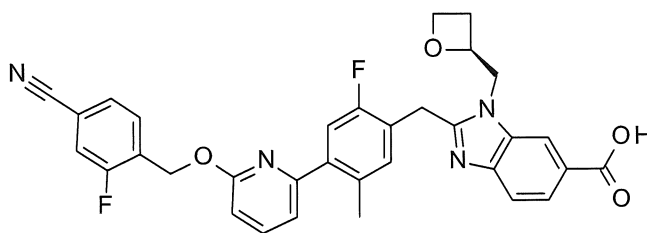
Axit 2-[[4-[6-[(4-xyano-2-flo-phenyl)metoxy]-2-pyridyl]-3-metyl-phenyl]metyl]-3-[[[(2S)-oxetan-2-yl]metyl]benzimidazol-5-carboxylic



Bổ sung methyl 4-[[2-[4-[6-[(4-cyano-2-fluorophenyl)methoxy]-2-pyridyl]-3-methylphenyl]acetamido]-3-[[2-(2S)-oxetan-2-ylmethyl]amino]benzoate (1,2 g, 2,0 mmol) và axit axetic vào lọ nhỏ (6 mL). Gia nhiệt hỗn hợp ở 80 °C trong 2 giờ, sau đó loại bỏ dung môi *trong chân không*. Tách phần còn lại giữa EtOAc (30 mL) và dung dịch NaHCO₃ (5%, 20 mL). Rửa các chất hữu cơ bằng dung dịch NaCl bão hòa (30 mL), làm khô bằng Na₂SO₄, lọc, và cô. Hòa tan phần còn lại trong ACN (5 mL) và nước (3 mL), sau đó bổ sung vào hỗn hợp LiOH (0,22 g, 9,2 mmol) và khuấy ở 50 °C trong 2 giờ. Loại bỏ dung môi *trong chân không*. Tinh chế phần còn lại bằng sắc ký nhanh pha đảo sử dụng gradien từ 20 đến 35% ACN trong dung dịch NH₄HCO₃ 5% để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục (900 mg, 79%) ở dạng rắn. ES/MS *m/z* 563 (M+H), 561 (M-H).

Ví dụ 2

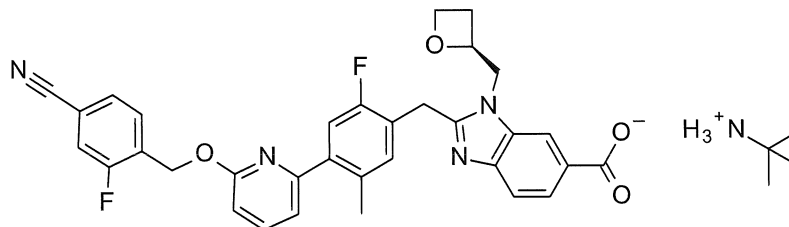
Axit 2-[[4-[6-[(4-cyano-2-fluorophenyl)methoxy]-2-pyridyl]-2-fluor-5-methylphenyl]methyl]-3-[[2-(2S)-oxetan-2-yl]methyl]benzimidazol-5-carboxylic



Bổ sung methyl 4-[[2-[4-[6-[(4-cyano-2-fluorophenyl)methoxy]-2-pyridyl]-2-fluor-5-methylphenyl]acetamido]-3-[[2-(2S)-oxetan-2-ylmethyl]amino]benzoate (1,20 g, 1,96 mmol) và axit axetic (15 mL) vào lọ nhỏ, sau đó gia nhiệt hỗn hợp ở 80 °C trong 2 giờ. loại bỏ dung môi *trong chân không*. Tách phần còn lại giữa EtOAc (30 mL) và dung dịch NaHCO₃ (5%, 20 mL). Rửa các chất hữu cơ bằng dung dịch NaCl bão hòa (30 mL), làm khô bằng Na₂SO₄, lọc, và cô. Hòa tan phần còn lại trong ACN (10 mL) và nước (4 mL), sau đó bổ sung vào hỗn hợp LiOH (0,24 g, 10 mmol) và khuấy ở 50 °C trong 2 giờ. Axit hóa hỗn hợp bằng dung dịch axit xitric bão hòa đến pH = 4-5. Loại bỏ dung môi *trong chân không*. Tinh chế phần còn lại bằng sắc ký nhanh pha đảo sử dụng gradien từ 20 đến 35% ACN trong dung dịch NH₄HCO₃ 5% để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục (745 mg, 66%) ở dạng rắn. ES/MS *m/z* 581 (M+H), 579 (M-H).

Ví dụ 2a

tert-Butylamoni;2-[[4-[6-[(4-xyano-2-flo-phenyl)metoxy]-2-pyridyl]-2-flo-5-metyl-phenyl]metyl]-3-[[2S)-oxetan-2-yl]metyl]benzimidazol-5-carboxylat



Phương pháp 1 – điều chế mà không có mầm tinh thể

Huyền phù axit 2-[[4-[6-[(4-xyano-2-flo-phenyl)metoxy]-2-pyridyl]-2-flo-5-metyl-phenyl]metyl]-3-[[2S)-oxetan-2-yl]metyl]benzimidazol-5-carboxylic (555 mg, 0,96 mmol) trong axeton (6 mL) trong khi khuấy ở tốc độ 800 vòng/phút ở 50 °C, thu được huyền phù đặc chất rắn màu trắng. Bổ sung *tert*-butylamin (115 µL, 1,09 mmol, 1,14 đương lượng) quan sát thấy hỗn hợp rõ ràng sau đó thu được một chất rắn màu trắng. Khuấy huyền phù đặc này ở 50 °C trong 1 giờ, sau đó tắt gia nhiệt và khuấy mẫu cho đến khi nó đạt đến nhiệt độ trong phòng. Lọc sạch chất rắn bằng lọc chân không và làm khô tại chỗ trong 15 phút dưới luồng nitơ, sau đó làm khô *trong chân không* ở nhiệt độ 50 °C trong 1 giờ để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục (612 mg, 98%).

Phương pháp 2 – Điều chế với mầm tinh thể

Trộn đồng thời axit 2-[[4-[6-[(4-xyano-2-flo-phenyl)metoxy]-2-pyridyl]-2-flo-5-metyl-phenyl]metyl]-3-[[2S)-oxetan-2-yl]metyl]benzimidazol-5-carboxylic (50 g, 86,1 mmol), axeton (658 mL), và nước (42 mL), và gia nhiệt hỗn hợp 50 °C. Lọc hỗn hợp bằng giấy GF/F và rửa bằng axeton:nước với tỷ lệ 94:6 thể tích:thể tích (25 mL). Gia nhiệt dung dịch thu được ở 50 °C. Điều chế dung dịch *tert*-butylamin (10 mL, 94,7 mmol, 1,1 đương lượng) và axeton:nước với tỷ lệ 94:6 thể tích/thể tích (25 mL). Bổ sung một phần dung dịch *tert*-butylamin (7 mL) sau đó là mầm tinh thể *tert*-butylamoni; 2-[[4-[6-[(4-xyano-2-flo-phenyl)metoxy]-2-pyridyl]-2-flo-5-metyl-phenyl]metyl]-3-[[2S)-oxetan-2-yl]metyl]benzimidazol-5-carboxylat (50 mg). Bổ sung dung dịch *tert*-butylamin còn lại trong khoảng 1 giờ qua bơm xylanh ở tốc độ 0,47 mL/phút. Gia nhiệt huyền phù tạo thành ở 50 °C trong 2 giờ, sau đó làm lạnh hỗn hợp đến nhiệt độ môi trường qua đêm. Lọc huyền phù đặc và rửa bằng axeton (2 × 100 mL). Làm khô bánh

uớt ở 50 °C trong chân không đến khối lượng không đổi để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục (51,8 g, 92%) ở dạng chất rắn màu vàng nhạt.

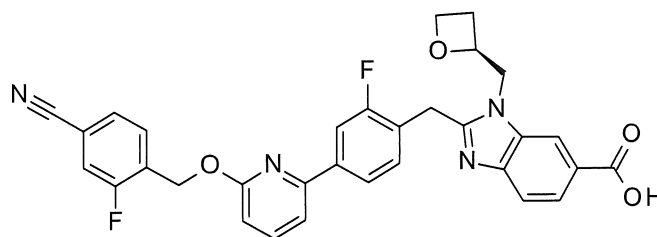
Mẫu được điều chế của hợp chất nêu ở đề mục được đặc trưng bởi mẫu XRD bằng cách sử dụng bức xạ CuK α do có đỉnh nhiễu xạ (giá trị 2-theta) như được mô tả trong bảng 1 dưới đây, và cụ thể là có các đỉnh ở 6,9 kết hợp với một hoặc nhiều đỉnh được chọn từ nhóm bao gồm 16,3 và 22,5; với dung sai đối với góc nhiễu xạ là 0,2 độ.

Bảng 1. Đỉnh nhiễu xạ bột tia X của *tert*-butylamoni; 2-[[4-[6-[(4-xyano-2-flo-phenyl)methoxy]-2-pyridyl]-2-flo-5-metyl-phenyl]metyl]-3-[[[(2S)-oxetan-2-yl]metyl]benzimidazol-5-carboxylat

Đỉnh	Góc (°2-Theta) +/- 0,2°	Cường độ tương đối (% của đỉnh có cường độ lớn nhất)
1	5,5	26,20%
2	6,9	64,90%
3	11,2	49,20%
4	16,3	100,00%
5	17,1	34,70%
6	19,6	53,00%
7	21,8	43,10%
8	22,5	93,80%
9	27,3	41,10%
10	28,0	37,90%

Ví dụ 3

Axit 2-[[4-[6-[(4-xyano-2-flo-phenyl)methoxy]-2-pyridyl]-2-flo-phenyl]metyl]-3-[(2S)-oxetan-2-ylmetyl]benzimidazol-5-carboxylic

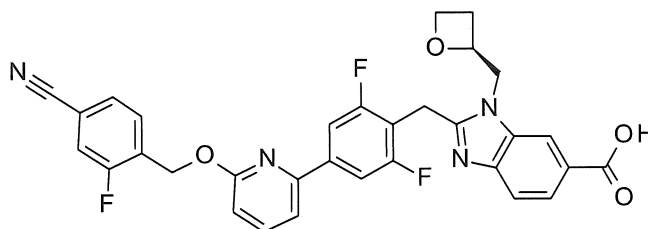


Hòa tan metyl 2-[[4-[6-[(4-xyano-2-flo-phenyl)methoxy]-2-pyridyl]-2-flo-phenyl]metyl]-3-[[[(2S)-oxetan-2-yl]metyl]benzimidazol-5-carboxylat (152 mg, 0,256

mmol) trong THF (6 mL), sau đó bổ sung lithi hydroxit (31 mg, 1,26 mmol) và nước (2 mL). Khuấy hỗn hợp ở nhiệt độ trong phòng trong 16 giờ, sau đó điều chỉnh độ pH đến 6 bằng dung dịch HCl (1N). Loại bỏ THF *trong chân không* và thu gom chất rắn còn lại bằng cách lọc. Tinh chế bằng sắc ký nhanh pha đảo sử dụng gradien từ 10 đến 40% ACN trong dung dịch NH_4HCO_3 (10 mM, pH 10) để thu được hợp chất nêu ở đề mục (60 mg, 41%). ES/MS m/z 567 (M+H).

Ví dụ 4

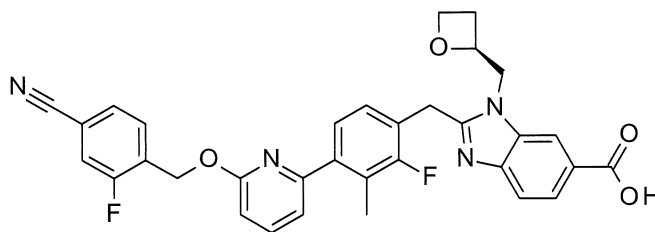
Axit 2-[[4-[6-[(4-xyano-2-flo-phenyl)metoxy]-2-pyridyl]-2,6-diflo-phenyl]metyl]-3-[(2S)-oxetan-2-ylmetyl]benzimidazol-5-carboxylic



Điều chế hợp chất nêu ở đề mục về cơ bản giống như được mô tả trong Ví dụ 1 bằng cách sử dụng methyl 4-[[2-[4-[6-[(4-xyano-2-flo-phenyl)metoxy]-2-pyridyl]-2,6-diflo-phenyl]axetyl]amino]-3-[(2S)-oxetan-2-ylmetyl]amino]benzoat. Tinh chế sản phẩm bằng sắc ký nhanh pha đảo sử dụng gradien từ 30 đến 50% ACN trong dung dịch NH_4HCO_3 (10 mM, độ pH=10). ES/MS m/z 585 (M+H), 583 (M-H).

Ví dụ 5

Axit 2-[[4-[6-[(4-xyano-2-flo-phenyl)metoxy]-2-pyridyl]-2-flo-3-metyl-phenyl]metyl]-3-[(2S)-oxetan-2-yl]metyl]benzimidazol-5-carboxylic

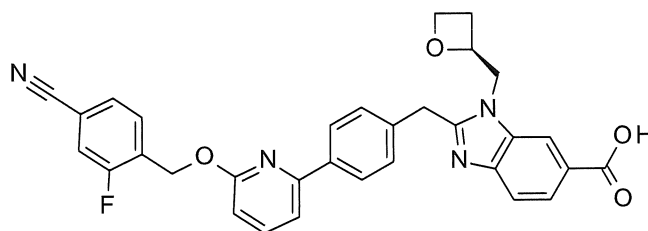


Điều chế hợp chất nêu ở đề mục về cơ bản giống như được mô tả trong ví dụ 2 bằng cách sử dụng methyl 4-[[2-[4-[6-[(4-xyano-2-flo-phenyl)metoxy]-2-pyridyl]-2-flo-3-metyl-phenyl]axetyl]amino]-3-[(2S)-oxetan-2-ylmetyl]amino]benzoat. Tinh chế sản

phẩm by sắc ký nhanh pha đảo sử dụng gradien từ 5 đến 40% ACN trong dung dịch NH_4HCO_3 5%. ES/MS m/z 581 (M+H), 579 (M-H).

Ví dụ 6

Axit 2-[[4-[6-[(4-cyano-2-fluorophenyl)methoxy]-2-pyridyl]phenyl]methyl]-3-[[[(2S)-oxetan-2-yl]methyl]benzimidazol-5-carboxylic



Điều chế hợp chất nêu ở đề mục về cơ bản giống như được mô tả trong ví dụ 1 bằng cách sử dụng methyl 4-[[2-[4-[6-[(4-cyano-2-fluorophenyl)methoxy]-2-pyridyl]phenyl]acetate]amino]-3-[[[(2S)-oxetan-2-ylmethyl]amino]benzoate. Tinh chế sản phẩm thô bằng sắc ký nhanh pha đảo sử dụng gradien từ 20 đến 35% ACN trong dung dịch NH_4HCO_3 5%. ES/MS m/z 549,0 (M+H), 547,1 (M-H).

Thử nghiệm sinh học

Thử nghiệm cAMP ở tế bào HEK293 biểu hiện thụ thể GLP-1 của người

Hoạt tính chức năng của thụ thể GLP-1 được xác định bằng cách sử dụng việc tạo thành cAMP ở dòng tế bào vô tính HEK293 biểu hiện GLP-1R (số truy nhập NCBI NP_002053) ở mật độ biểu hiện là 581 ± 94 (n=6) và 104 ± 12 (n=5) fmol/mg protein (được xác định bằng cách sử dụng phương pháp phân tích khả năng liên kết cạnh tranh tương đồng [^{125}I]GLP-1(7-36) NH_2). Tế bào biểu hiện thụ thể hGLP-1R được xử lý với hợp chất (đường cong đáp ứng nồng độ 20 điểm trong DMSO, dung dịch pha loãng trực tiếp Labcyte Echo 2,75 lần, đĩa 384 giếng Corning Cat# 3570) trong DMEM (Gibco Cat# 31053) được bổ sung 1X GlutaMAXTM (Gibco Cat# 35050), casein bò 0,1% (Sigma C4765-10ML), 250 μM IBMX (3-Isobutyl-1-methylxanthin, Acros Cat# 228420010) và 20 mM HEPES (Gibco Cat# 15630) trong thể tích thử nghiệm 20 μL (nồng độ DMSO cuối cùng là 0,5%). Sau khi ủ trong 30 phút ở 37°C, mức gia tăng cAMP nội bào thu được được định lượng bằng cách sử dụng kit thử nghiệm CisBio cAMP Dynamic 2 HTRF (62AM4PEJ). Một cách vắn tắt, mức cAMP trong tế bào được

phát hiện bằng cách bổ sung thể liên hợp cAMP-d2 vào dung dịch đệm phân giải tế bào (10 μ L) sau đó là kháng thể kháng cAMP-Eu³⁺-Cryptat, cũng vào dung dịch đệm phân giải tế bào (10 μ L). Thử nghiệm cạnh tranh thu được được ủ trong ít nhất 60 phút ở nhiệt độ trong phòng, sau đó được phát hiện sử dụng dụng cụ PerkinElmer Envision® với kích thích ở 320 nm và phát xạ ở 665 nm và 620 nm. Các đơn vị hình ảnh (phát ra ở 665nm/620nm*10000) tỷ lệ nghịch với lượng cAMP có mặt và được chuyển thành nM cAMP/giếng bằng cách sử dụng đường cong tiêu chuẩn cAMP. Lượng cAMP tạo ra (nM) trong mỗi giếng được chuyển hóa thành tỷ lệ phần trăm đáp ứng tối đa quan sát được với GLP-1(7-36)NH₂ của người. Giá trị EC₅₀ tương đối và tỷ lệ phần trăm cao nhất (E_{max}) thu được bằng cách phân tích hồi quy không tuyến tính bằng cách sử dụng tỷ lệ phần trăm đáp ứng cực đại theo nồng độ của hợp chất được bổ sung, được khớp với phương trình logic bốn thông số. Dữ liệu EC₅₀ và E_{max} khi các hợp chất của các ví dụ 1-6 được thử nghiệm trong thử nghiệm cAMP được mô tả ở trên bằng cách sử dụng tế bào HEK293 biểu hiện 581 và 104 fmol/mg GLP-1R lần lượt được thể hiện trong các bảng 2 và 3. Dữ liệu này chỉ ra rằng các hợp chất của các ví dụ 1-6 là các chất chủ vận của thụ thể GLP-1 của người.

Bảng 2. Dòng tế bào HEK293 với mật độ biểu hiện GLP-1R, đáp ứng cAMP nội bào là 581 fmol/mg

Ví dụ	EC ₅₀ (nM) $\pm$ SEM (n)	E _{max} (%) $\pm$ SEM (n)
1	9,33 $\pm$ 1,36 (n = 6)	99,5 $\pm$ 2,53 (n = 6)
2	1,14 $\pm$ 0,315 (n = 6)	104 $\pm$ 4,35 (n = 6)
3	3,08 $\pm$ 0,379 (n = 5)	99 $\pm$ 3,69 (n = 5)
4	3,99 $\pm$ 0,378 (n = 3)	99,2 $\pm$ 4 (n = 3)
5	6,45 $\pm$ 0,934 (n = 3)	105 $\pm$ 2,43 (n = 3)
6	20 $\pm$ 6,51 (n = 4)	101 $\pm$ 3,42 (n = 4)

Bảng 3. Dòng tế bào HEK293 với mật độ biểu hiện GLP-1R, đáp ứng cAMP nội bào là 104 fmol/mg

Ví dụ	EC ₅₀ (nM) $\pm$ SEM (n)	E _{max} (%) $\pm$ SEM (n)
1	20 $\pm$ 3,25 (n = 6)	71,4 $\pm$ 2,26 (n = 6)
2	3,97 $\pm$ 0,61 (n = 6)	79,2 $\pm$ 3,2 (n = 6)
3	10 $\pm$ 2,3 (n = 5)	81,7 $\pm$ 3,86 (n = 5)
4	9,59 $\pm$ 2,36 (n = 3)	78,3 $\pm$ 5,1 (n = 3)

5	$23,6 \pm 5,43$ (n = 3)	$76,7 \pm 3,88$ (n = 3)
6	$47,7 \pm 17,9$ (n = 4)	$80,3 \pm 3,1$ (n = 4)

Thử nghiệm khả năng dung chịu glucoza trong màng bụng *in vivo* ở chuột được gắn gen GLP-1R của người

Hiệu lực của các hợp chất được lấy làm ví dụ trong việc giảm nồng độ glucoza huyết *in vivo* được xác định bằng cách sử dụng chuột biểu hiện GLP-1R người (số truy nhập NCBI NP_002053) từ locut di truyền *Glp-1r* của chuột (Jun, L.S., *et al.*, PLoS One. 2014 9:e93746). Chuột bị bỏ đói qua đêm được sử dụng qua đường miệng hợp chất thử nghiệm được hòa tan trong 10% Kolliphor® (HS15) trong Polyeteylen Glycol 400 (PEG400). Một giờ sau khi sử dụng theo liều, động vật được sử dụng glucoza bằng cách tiêm trong màng bụng (2 g/kg), và mức glucoza huyết được đo liên tục trong hai giờ tiếp theo bằng máy đo đường huyết. Phạm vi liều của hợp chất thử nghiệm được phân phối và diện tích dưới đường cong với các tính toán cho mỗi nhóm liều được xác định và phù hợp với mô hình logic bốn tham số để tính toán hiệu lực *in vivo* ở dạng giá trị ED₅₀ với khoảng tin cậy 95%. Khi được thử nghiệm trong thử nghiệm khả năng dung chịu glucoza trong màng bụng *in vivo*, các hợp chất của các ví dụ 1-3 thể hiện hiệu lực trong việc giảm nồng độ glucoza huyết ở chuột biểu hiện GLP-1R người với các giá trị ED₅₀ (và khoảng tin cậy 95%) như được thể hiện trong bảng 4, mà chỉ ra rằng các hợp chất này là chất chủ vận GLP-1R có hiệu lực có thể sử dụng qua đường miệng ở chuột.

Bảng 4. Hiệu quả hạ glucoza huyết ở chuột biểu hiện GLP-1R người

Ví dụ	Giá trị ED ₅₀ hạ glucoza huyết (mg/kg)	Khoảng tin cậy 95%
1	0,09	0,0301-0,2592
2	0,07	0,0246-0,1808
3	0,06	0,013-0,246

Dược động học ở nhóm linh trưởng không phải người (NHP):

Các hợp chất thử nghiệm được sử dụng qua tĩnh mạch (IV) cho khỉ cynomolgus được bị đói ở 0,5 mg/kg (sử dụng thể tích liều là 1 mL/kg). Loạt mẫu máu được thu thập ở 0,08, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8, 12, và 24 giờ sau khi sử dụng liều đối với dùng liều lớn trong tĩnh mạch. Sau khi xử lý bằng chất kết tụ EDTA, thu được huyết tương bằng cách ly tâm và bảo quản ở -70 °C cho đến khi thực hiện phân tích bằng phương pháp LC-

MS/MS. Nồng độ vật phẩm thử nghiệm được xác định trong huyết tương. Phân tích không chia ngăn được sử dụng để tính mức độ thanh thải khỏi huyết tương và thể tích phân bố ở trạng thái ổn định. Bảng 5 thể hiện dữ liệu dược động học đối với các hợp chất của các ví dụ 1-3 trong thử nghiệm này. Những dữ liệu này, một phần, được sử dụng để cung cấp thông tin về các dự báo PK cơ học của con người đề xuất một cấu trúc dược động học của con người để hỗ trợ việc sử dụng một lần mỗi ngày.

Bảng 5. Dược động học ở khỉ *Cynomolgus*

Ví dụ	Độ thanh thải khỏi huyết tương (mL/phút/kg)	Thể tích phân bố (L/kg)	Tá dược lỏng*
1	13	1,2	A
2	11	1,1	A
3	6	1,1	B

*Tá dược lỏng A - 5% DMSO và 95% (20% CAPTISOL® (khối lượng/thể tích) trong nước; Tá dược lỏng B - 20% captisol (khối lượng/thể tích) trong nước + 1 đương lượng mol NaOH

Thử nghiệm hoạt tính enzym phosphodiesteraza 10 (PDE10)

Để tạo ra protein phosphodiesteraza 10A1 (PDE10A1), dòng PDE10A1 chiều dài đầy đủ tương ứng với GenBank ID AAD32595.1 được tách dòng vào trong pFastBac1 (Invitrogen). Protein PDE10A1 với đuôi FLAG đầu tận C được biểu hiện bằng cách gây nhiễm cho tế bào côn trùng bằng baculovirus và được tinh chế bằng cách sử dụng agarose kết hợp với kháng thể kháng FLAG M2-(Sigma) và sắc ký loại trừ kích thước trên cột Superdex 200 (GE Healthcare) và được bảo quản ở -80°C trong các lượng nhỏ (20 mM Tris-HCl, độ pH=7,5, 150 mM NaCl, 10% Glyxerol).

Hoạt tính enzym PDE10A1 được đo bằng thử nghiệm độ lân cận nhấp nháy (SPA) trên cơ sở ytri silicat mà phát hiện được các nucleotit monophotphat phóng xạ nhưng không phải là monophotphat vòng. Dung dịch đệm phân tích chứa 50 mM Tris-HCl độ pH=7,5, 8 mM MgCl_2 , 3,4 mM EDTA, và 0,1% BSA (Sigma). Thử nghiệm được thực hiện trên đĩa 384 lỗ (3706, Corning) trong tổng thể tích là 50 μl : chứa 24 μl enzym PDE10A1, 1 μl hợp chất thử nghiệm và 25 μl nucleotit vòng. Các hợp chất thử nghiệm được pha loãng trong DMSO tinh khiết sử dụng đường cong đáp ứng nồng độ mười điểm với hệ số pha loãng 3 lần và 1 μl được phân phối bằng âm thanh vào các đĩa

xét nghiệm bằng cách sử dụng Echo555 (LabCyte). 24 μ l protein PDE10A1 được ủ với 1 μ l hợp chất trong 30 phút trước khi phản ứng được bắt đầu bằng việc bổ sung cơ chất [3 H]-cGMP (6,5 Ci/mmol, Perkin Elmer). Nồng độ cuối cùng của các thành phần là 70 pM PDE10A1, 80 nM (3 H -cGMP), và 2% DMSO trong dung dịch đệm phân tích. Nồng độ hợp chất tối đa trong hỗn hợp phản ứng là 10 μ M. Hỗn hợp phản ứng được ủ trong 60 phút ở nhiệt độ trong phòng trước khi ngừng phản ứng và bổ sung hạt SPA với lượng 400 mg/mỗi giếng (RPNQ0150, Perkin Elmer). Hoạt độ phóng xạ liên kết hạt (sản phẩm) được định lượng 12 giờ sau đó bằng máy đếm Microbeta (Perkin Elmer). Dữ liệu được chuẩn hóa thành tỷ lệ % ức chế và các giá trị IC_{50} được tính bằng phương trình logic bốn tham số như được mô tả (Campbell, R.M.; Dymshitz, J.; Eastwood, B.J.; et al. "Data Standardization for Results Management." In: Sittampalam, G.S.; Grossman, A.; Brimacombe, K.; et al.; eds. *Assay Guidance Manual*. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004.). Bảng 6 thể hiện hoạt tính của các hợp chất của các ví dụ 1-4 trong thử nghiệm này. Các dữ liệu này thể hiện rằng các hợp chất của các ví dụ 1 đến 4 có ái lực liên kết yếu với PDE10A, mà chỉ ra rằng giảm nguy cơ nhiễm độc.

Bảng 6. Hiệu lực ức chế PDE10A1 *in vitro*

Ví dụ	IC_{50} (μ M), n = 1
1	>10
2	7,43
3	>10
4	5,41

Thử nghiệm gắn kết phối tử phóng xạ ái lực với kênh hERG K^+ của người

Ái lực của hợp chất đối với kênh hERG K^+ của người ở tế bào HEK-293 chuyển nhiễm được đánh giá trong thử nghiệm gắn kết phối tử phóng xạ như được mô tả ở đây. Chất đồng nhất màng tế bào (khoảng 40 μ g protein) được ủ trong 60 phút ở 22 °C với 3 nM [3 H]dofetilide với sự có mặt hoặc vắng mặt hợp chất thử nghiệm trong dung dịch đệm chứa 50 mM Tris-HCl (pH 7,4), 10 mM KCl và 1 mM $MgCl_2$. Thử nghiệm được thực hiện ở dạng đĩa 96 giếng với thể tích 200 μ L, chứa tối đa 1% DMSO từ quá trình hòa tan ban đầu của hợp chất thử nghiệm. Sau khi ủ, các mẫu được lọc nhanh trong chân không qua bộ lọc sợi thủy tinh (GF/B, Packard) ngâm trước với 0,3% PEI và rửa nhiều

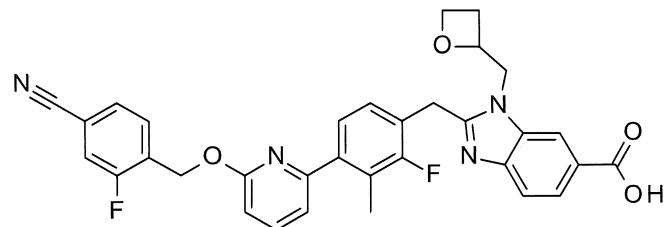
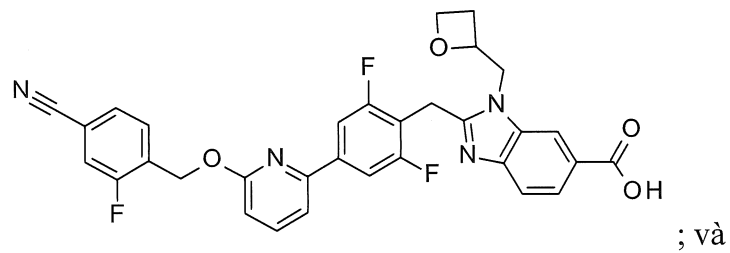
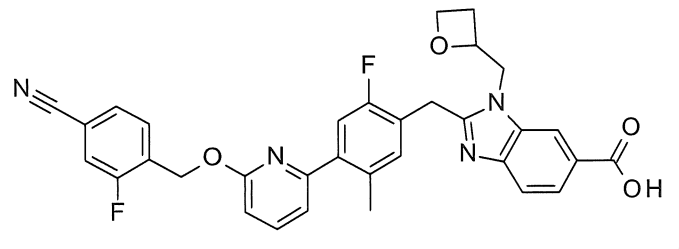
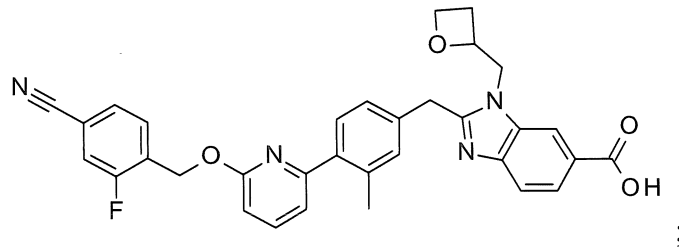
lần với 50 mM Tris-HCl lạnh, 10 mM KCl và 1 mM MgCl₂ sử dụng máy thu hoạch tế bào 96 mẫu (Unifilter, Packard). Các bộ lọc được làm khô và sau đó được đếm độ phóng xạ trong máy đếm nhấp nháy (Topcount, Packard) bằng cách sử dụng dung dịch cocktail nhấp nháy (Microscint 0, Packard). Bảng 7 thể hiện hoạt tính của các hợp chất của các ví dụ 1-3 trong thử nghiệm này, được biểu diễn ở dạng tỷ lệ % ức chế của việc gắn kết phối tử phóng xạ đối chứng. Dữ liệu này thể hiện rằng các hợp chất của các ví dụ 1 đến 3 có hoạt tính ức chế hERG yếu, mà chỉ ra rằng nguy cơ nhiễm độc thấp.

Bảng 7. Tỷ lệ % ức chế phối tử phóng xạ có ái lực với kênh hERG K⁺ của người

Ví dụ	Tỷ lệ % ức chế (%) ở Nồng độ hợp chất 100 μ M, n = 1
1	0
2	54
3	37

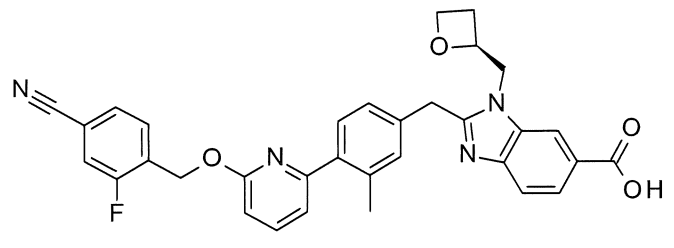
YÊU CẦU BẢO HỘ

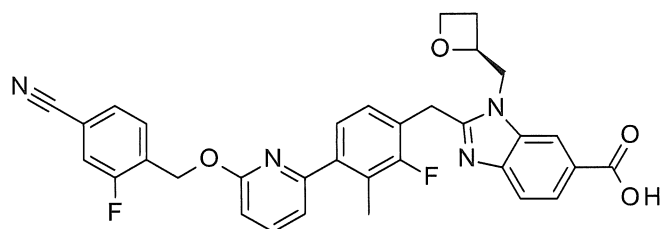
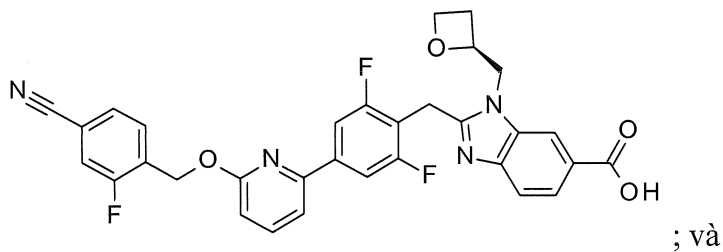
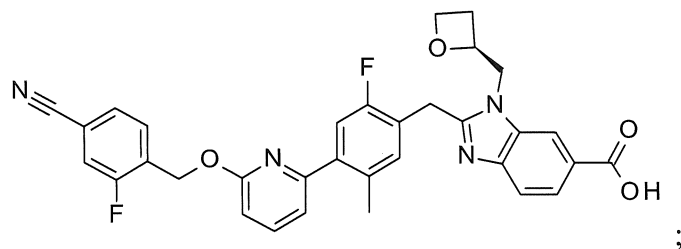
1. Hợp chất được chọn từ nhóm bao gồm:



hoặc muối được dụng của chúng.

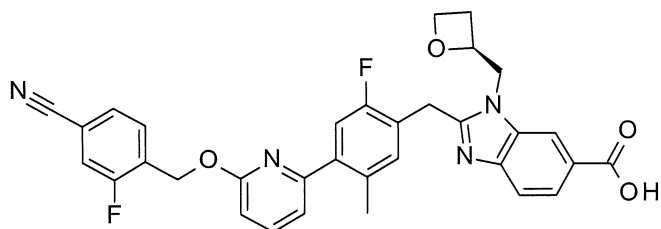
2. Hợp chất theo điểm 1, trong đó hợp chất này được chọn từ nhóm bao gồm:





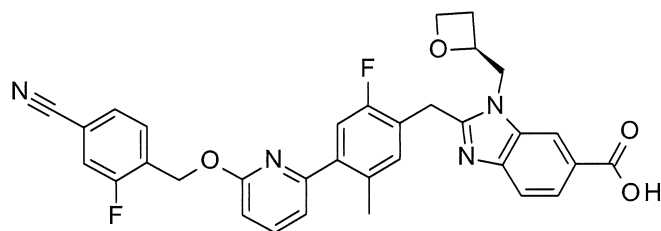
hoặc muối được dụng của chúng.

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



hoặc muối được dụng của chúng.

4. Hợp chất theo điểm 3, trong đó hợp chất này là muối *tert*-butylamin của:



5. Dược phẩm chứa hợp chất, hoặc muối được dụng của chúng, theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4 và ít nhất một chất mang, chất pha loãng hoặc tá dược được dụng.