



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ
(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11) 
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ
1-0045966
(51)^{2020.01} C07D 215/36; C07D 417/12; C07D (13) B
401/12; A61K 31/47

(21) 1-2021-02106 (22) 19/09/2019
(86) PCT/US2019/052024 19/09/2019 (87) WO 2020/061378 26/03/2020
(30) 62/733,558 19/09/2018 US; 62/733,562 19/09/2018 US; 62/782,933 20/12/2018 US;
62/789,641 08/01/2019 US; 62/811,904 28/02/2019 US
(45) 26/05/2025 446 (43) 26/07/2021 400A
(73) Novo Nordisk Health Care AG (CH)
The Circle 32/38 8058 Zurich Switzerland
(72) ERICSSON, Anna (US); GREEN, Neal (US); GUSTAFSON, Gary (US); LANCIA,
David R., Jr. (US); MARSHALL, Gary (US); MITCHELL, Lorna (NZ); RICHARD,
David (US); WANG, Zhongguo (US); FORSYTH, Sanjeev (US); KELLY, Patrick,
F. (US); MONDAL, Madhu (US); RIBADENEIRA, Maria (US); SCHROEDER,
Patricia (CA).
(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) HỢP CHẤT HOẠT HÓA PYRUVAT KINAZA R (PKR) DÙNG TRONG ĐIỀU
TRỊ BỆNH TẾ BÀO HÌNH LƯỖI LIÊM VÀ CHẾ PHẨM CHỨA NÓ

(21) 1-2021-02106

(57) Hợp chất hoạt hóa pyruvat kinaza R có thể được sử dụng để điều trị bệnh tế bào hình lưỡi liềm (SCD). Phương pháp và chế phẩm để điều trị SCD được đề xuất trong bản mô tả này, bao gồm hợp chất trị liệu được thiết kế dưới dạng hợp chất 1.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến việc điều trị bệnh tế bào hình lưỡi liềm (SCD), bao gồm việc điều trị cho bệnh nhân được chẩn đoán mắc SCD bằng cách cho dùng hợp chất hoạt hóa pyruvat kinase R (PKR).

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Bệnh tế bào hình lưỡi liềm (SCD) là bệnh thiếu máu tan huyết mãn tính do di truyền dạng đột biến của hemoglobin (Hgb), Hgb hình lưỡi liềm (HgbS) gây ra. Nó là bệnh thiếu máu tan huyết di truyền phổ biến nhất, làm ảnh hưởng đến 70000 đến 80000 bệnh nhân ở Mỹ (US). SCD được đặc trưng bởi sự polyme hóa HgbS ở hồng cầu (RBC) khi HgbS ở trạng thái được khử oxy (deoxy-HgbS), dẫn đến biến dạng hình lưỡi liềm. Tế bào hình lưỡi liềm kết tụ ở mao mạch dẫn đến biến cố tắc mạch thường biểu hiện dưới dạng khủng hoảng cấp tính và đau đớn dẫn đến thiếu máu cục bộ mô, nhồi máu và tổn thương mô lâu dài. Hồng cầu ở bệnh nhân SCD có xu hướng dễ vỡ do lưỡi liềm và các yếu tố khác gây ra, và chấn thương cơ học của tuần hoàn gây ra tán huyết và thiếu máu mãn tính. Cuối cùng, các RBC bị tổn thương có các bề mặt bất thường bám vào và làm tổn thương nội mạc mạch máu, gây ra phản ứng tăng sinh/viêm làm cơ sở cho đột quỵ mạch máu lớn và có khả năng tăng huyết áp động mạch phổi. Nói chung, điều này góp phần vào tỷ lệ mắc bệnh đáng kể và tăng tỷ lệ tử vong liên quan đến bệnh này.

Hiện nay, việc trị liệu SCD còn thiếu. Phương pháp chữa duy nhất đã được biết cho SCD là cấy tế bào thân tạo huyết mà có rủi ro nghiêm trọng, thường chỉ được khuyến nghị cho các ca nghiêm trọng nhất, và đa phần chỉ được đề nghị cho trẻ em có người cho là anh chị em đồng huyết phù hợp. Liệu pháp gen cũng đang được nghiên cứu với kết quả sơ bộ có triển vọng; tuy nhiên, có những rào cản tiếp cận thị trường, chủ yếu là chi phí cao và sự phức tạp trong điều trị, có khả năng hạn chế việc sử dụng rộng rãi trong thời gian ngắn. Có rất ít tiến bộ trong các liệu pháp điều trị SCD trong hai thập kỷ qua. Hydroxyure (HU) tạo ra HgbF làm gián đoạn quá trình trùng hợp HgbS, và do đó có tác dụng làm giảm sự khởi phát của các cuộc khủng hoảng tắc mạch và các di chứng bệnh lý của SCD. Trong khi HU được sử dụng rộng rãi như một liệu pháp xương sống cho

SCD, nó vẫn chỉ có hiệu quả một phần và có liên quan đến độc tính, chẳng hạn như suy tủy và gây quái thai. Bệnh nhân điều trị HU vẫn bị tán huyết, thiếu máu và các cơn tắc mạch, cho thấy cần có các liệu pháp điều trị hiệu quả hơn, thay thế hoặc kết hợp với HU. Ngoài HU, can thiệp điều trị chủ yếu là chăm sóc hỗ trợ, nhằm mục đích kiểm soát các triệu chứng của SCD. Ví dụ, truyền máu giúp chữa bệnh thiếu máu và các biến chứng SCD khác bằng cách tăng số lượng hồng cầu bình thường. Tuy nhiên, việc truyền máu nhiều lần sẽ dẫn đến tình trạng thừa sắt và cần có các liệu pháp thải sắt để tránh hậu quả là tổn thương mô. Ngoài những cách tiếp cận này, thuốc giảm đau được sử dụng để kiểm soát cơn đau.

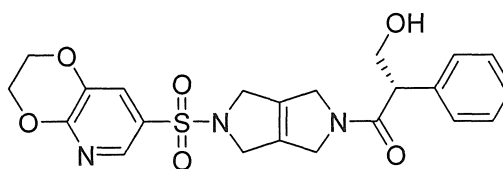
Với tiêu chuẩn chăm sóc SCD hiện tại, có nhu cầu y tế rõ ràng về một liệu pháp điều chỉnh bệnh, không xâm lấn với các profin an toàn và hiệu quả thích hợp.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Một khía cạnh của sáng chế liên quan đến các phương pháp điều trị SCD bao gồm việc sử dụng một lượng chất hoạt hóa pyruvat kinaza R (PKR) có hiệu quả điều trị cho bệnh nhân cần được chẩn đoán mắc SCD. Pyruvat kinaza R (PKR) là dạng đồng phân của pyruvat kinaza được biểu hiện trong các tế bào hồng cầu, và là enzym quan trọng trong quá trình đường phân. Sáng chế một phần dựa trên phát hiện ra rằng việc kích hoạt PKR có thể nhắm mục tiêu đến cả cá liềm, bằng cách giảm deoxy-HgbS và tán huyết. Có thể đạt được mục tiêu tan máu bằng cách cải thiện tính toàn vẹn của màng RBC. Một khía cạnh của sáng chế là thừa nhận rằng việc kích hoạt PKR có thể làm giảm 2,3-diphosphoglyxerat (2,3-DPG), dẫn đến giảm deoxy-HgbS (và do đó, hình lưỡi liềm), cũng như có thể làm tăng ATP, thúc đẩy sức khỏe của màng và làm giảm quá trình tán huyết. Một khía cạnh khác của sáng chế là công nhận rằng việc kích hoạt PKR có thể làm giảm 2,3-diphosphoglyxerat (2,3-DPG), chất này ức chế quá trình khử oxy Hgb/làm tăng ái lực oxy của HgbS và dẫn đến giảm deoxy-HgbS (và do đó, tạo hình lưỡi liềm), cũng như có thể làm tăng ATP, giúp tăng cường sức khỏe của màng và làm giảm quá trình tán huyết. Theo đó, theo một phương án, kích hoạt PKR (ví dụ, bằng cách sử dụng một lượng hợp chất kích hoạt PKR có hiệu quả điều trị cho bệnh nhân được chẩn đoán mắc SCD) làm giảm sự hình thành hồng cầu thông qua việc giảm mức 2,3-diphosphoglyxerat (2,3-DPG), do đó làm giảm sự trùng hợp của Hgb hình lưỡi liềm (HgbS) thành các khối kết tụ cứng làm biến dạng tế bào. Hơn nữa, theo một số phương án, kích hoạt PKR có thể góp phần vào tính toàn vẹn tổng thể của màng tế bào hồng cầu

thông qua việc tăng mức độ adenosin triphosphat (ATP), được dự đoán là làm giảm các biến cố tắc mạch và tan máu gây ra các cơn đau cấp tính và thiếu máu ở bệnh nhân SCD.

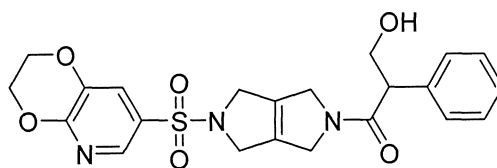
Tốt hơn là, bệnh nhân được chẩn đoán mắc SCD được điều trị bằng hợp chất là hợp chất hoạt hóa PKR. Chất hoạt hóa PKR có thể là hợp chất được xác định là hợp chất hoạt hóa PKR hoặc chế phẩm được xác định là chế phẩm hoạt hóa PKR có giá trị AC_{50} nhỏ hơn $1\ \mu\text{M}$ bằng cách sử dụng thử nghiệm phát quang được mô tả trong ví dụ 2, hoặc muối được dụng và/hoặc dạng rắn khác của chúng. Ví dụ, hợp chất hoạt hóa PKR có thể là hợp chất (S)-1-(5-((2,3-dihydro-[1,4]dioxino[2,3-b]pyridin-7-yl)sulfonyl)-3,4,5,6-tetrahydropyrrolo[3,4-c]pyrrol-2(1H)-yl)-3-hydroxy-2-phenylpropan-1-on (hợp chất 1):



1,

hoặc muối được dụng của chúng. Hợp chất 1 là hợp chất hoạt hóa PKR lựa chọn, có khả dụng sinh học qua đường miệng, có tác dụng làm giảm 2,3-DPG, tăng ATP và có tác dụng chống tạo hình lưới liềm ở các mô hình bệnh với biên độ điều trị rộng liên quan đến độc tính tiền lâm sàng.

Hợp chất hoạt hóa PKR có thể dễ dàng được xác định là hợp chất có công thức I:



I,

hoặc muối được dụng của chúng, (ví dụ, hợp chất 1 và hỗn hợp của hợp chất 1 với đồng phân lập thể của nó) có giá trị AC_{50} nhỏ hơn $1\ \mu\text{M}$ sử dụng phép thử phát quang được mô tả trong ví dụ 2.

Theo các phương án khác, hợp chất hoạt hóa PKR có thể là bất kỳ trong số các hợp chất được liệt kê trong Fig. 1, hoặc muối được dụng của chúng.

Hợp chất hoạt hóa PKR, như 1-(5-((2,3-dihydro-[1,4]dioxino[2,3-b]pyridin-7-yl)sulfonyl)-3,4,5,6-tetrahydropyrrolo[3,4-c]pyrrol-2(1H)-yl)-3-hydroxy-2-phenylpropan-1-on, hoặc muối được dụng của nó, hữu dụng trong được phẩm để điều trị cho bệnh nhân được chẩn đoán mắc SCD. Hợp chất hoạt hóa PKR, như bất kỳ trong số các hợp chất được liệt kê trong Fig. 1, hoặc muối được dụng của chúng, rất hữu ích trong được phẩm để điều trị bệnh nhân được chẩn đoán mắc SCD. Chế phẩm chứa hợp chất có công thức I (ví dụ, hợp chất 1), hoặc muối được dụng của chúng, có thể thu được bằng các quy trình nhất định cũng được đề xuất ở đây. Chế phẩm chứa bất kỳ hợp chất nào được liệt kê trong Fig. 1, hoặc muối được dụng của chúng, có thể thu được bằng các quy trình nhất định cũng được đề xuất ở đây.

Phương pháp điều trị SCD được đề xuất trong bản mô tả này có thể đưa ra sự bảo vệ lớn hơn chống lại khủng hoảng tắc mạch và thiếu máu tan máu, so với các liệu pháp hiện có và mới nổi. Do đó, việc sử dụng hợp chất hoạt hóa PKR, như hợp chất 1, cung cấp phương pháp điều trị mới và cải tiến hoặc đơn lẻ hoặc kết hợp với các loại thuốc hoạt động thông qua các cơ chế thay thế, như hydroxyure (HU). Ngoài ra, việc sử dụng hợp chất hoạt hóa PKR, như bất kỳ hợp chất nào được liệt kê trong Fig. 1, cung cấp phương pháp điều trị mới và cải tiến hoặc đơn lẻ hoặc kết hợp với các loại thuốc hoạt động thông qua các cơ chế thay thế, như hydroxyure (HU).

Mô tả vắn tắt hình vẽ

Fig. 1 là bảng của hợp chất hoạt hóa PKR.

Fig. 2 là giản đồ cho thấy mối quan hệ của việc hoạt hóa PKR với việc giảm các hậu quả lâm sàng của bệnh tế bào hình lưỡi liềm (SCD).

Fig. 3 là biểu đồ hiển thị đường cong phân ly oxyhemoglobin và các yếu tố điều chỉnh bằng cách vẽ biểu đồ mối quan hệ giữa độ bão hòa hemoglobin (phần trăm) so với áp suất riêng phần của oxy (mmHg).

Fig. 4A là sơ đồ tổng hợp hóa học các hợp chất có công thức I, bao gồm tổng hợp hợp chất 1 (được đề xuất riêng trên Fig. 4B).

Fig. 4B là sơ đồ tổng hợp hóa học cho hợp chất 1.

Fig. 4C là tổng hợp hóa học chung của các hợp chất được liệt kê trên Fig. 1.

Fig. 5 là biểu đồ thể hiện sự hoạt hóa PKR-R510Q tái tổ hợp với hợp chất 1, vẽ biểu đồ tốc độ chuẩn hóa so với nồng độ của phosphoenolpyruvat (PEP) (ví dụ 3).

Fig. 6 là biểu đồ dữ liệu thể hiện hoạt hóa PKR-R510Q tái tổ hợp bằng hợp chất 1 trong thử nghiệm enzym của ví dụ 3.

Fig. 7 là biểu đồ dữ liệu thể hiện hoạt hóa PKR trong các tế bào hồng cầu của con người được điều trị bằng hợp chất 1 (ví dụ 4).

Fig. 8A và Fig. 8B là biểu đồ dữ liệu thể hiện hiệu quả điều trị bằng hợp chất 1 trên oxyhemoglobin sự phân ly trong RBC từ bệnh nhân SCD (ví dụ 5). Fig. 8A cho thấy mỗi điểm dữ liệu ở dạng thang độ xám, trong khi Fig. 8B cho thấy cùng một dữ liệu với các đường cách điệu.

Fig. 9 là biểu đồ dữ liệu thể hiện đường cong delta của độ bão hòa hemoglobin ở các độ căng oxy khác nhau đối với các tế bào hồng cầu của bệnh nhân SCD (ví dụ 5). Khoảng đo lường là 1 mmHg.

Fig. 10 là biểu đồ dữ liệu thể hiện hiệu quả của hợp chất 1 với việc tạo lưới liên tế bào SCD của con người trong điều kiện thiếu oxy (ví dụ 5).

Mỗi Fig. 11A (nghiên cứu 1) và Fig. 11B (nghiên cứu 2) là biểu đồ thể hiện thay đổi quan sát được ở mức 2,3-DPG trong máu từ chuột sau 7 ngày điều trị uống một lần mỗi ngày (QD) với hợp chất 1 (ví dụ 6).

Fig. 12 là biểu đồ thể hiện thay đổi quan sát được ở mức 2,3-DPG trong máu từ chuột sau 7 ngày điều trị uống một lần mỗi ngày (QD) với hợp chất 1 (ví dụ 6, nghiên cứu 2).

Fig. 13A (nghiên cứu 1) và Fig. 13B (nghiên cứu 2) là biểu đồ dữ liệu đo nồng độ ATP trong tế bào hồng cầu của chuột sau 7 ngày điều trị bằng đường uống một lần mỗi ngày (QD) với hợp chất 1 (ví dụ 6).

Mỗi Fig. 14A và Fig. 14B là biểu đồ dữ liệu thể hiện độ bão hòa oxy trong RBC sau 7 ngày điều trị bằng đường uống với hợp chất 1 trong mô hình SCD ở chó (ví dụ 7).

Mỗi Fig. 15A và Fig. 15B là biểu đồ dữ liệu thể hiện thay đổi độ bão hòa oxy trong RBC sau 7 ngày điều trị bằng đường uống với hợp chất 1 trong mô hình SCD ở chó (ví dụ 7).

Fig. 16 là biểu đồ dữ liệu thể hiện tỷ lệ phần trăm tế bào hình lưới liềm trong mô hình chó mắc bệnh SCD sau 7 ngày điều trị bằng đường uống với hợp chất 1 (ví dụ 7).

Fig. 17 là biểu đồ dữ liệu thể hiện số lượng hồng cầu lưới trong các tế bào trong mô hình SCD ở chó sau 7 ngày điều trị bằng đường uống với hợp chất 1 (ví dụ 7).

Fig. 18 là biểu đồ của mức 2,3-DPG trong máu được đo theo thời gian ở những người tình nguyện khỏe mạnh nhận được một liều hợp chất 1 hoặc giả dược.

Fig. 19 là biểu đồ của mức 2,3-DPG trong máu được đo 24 giờ sau khi dùng liều ở người tình nguyện khỏe mạnh nhận được một liều hợp chất 1 hoặc giả dược.

Fig. 20 là biểu đồ của giá trị P50 được đo 24 giờ sau khi dùng liều ở người tình nguyện khỏe mạnh nhận được một liều hợp chất 1 hoặc giả dược.

Fig. 21 là biểu đồ của giá trị P50 được đo trước khi dùng liều và 24 giờ sau khi dùng liều ở người tình nguyện khỏe mạnh nhận được một liều hợp chất 1 hoặc giả dược.

Fig. 22 là biểu đồ của mức 2,3-DPG trong máu được đo theo thời gian ở người tình nguyện khỏe mạnh nhận được liều hợp chất 1 hoặc giả dược hàng ngày trong 14 ngày.

Fig. 23 là biểu đồ của mức 2,3-DPG trong máu được đo vào ngày 14 ở người tình nguyện khỏe mạnh nhận được liều hợp chất 1 hoặc giả dược hàng ngày trong 14 ngày.

Fig. 24 là biểu đồ của giá trị P50 được đo vào ngày 14 ở người tình nguyện khỏe mạnh nhận được liều hợp chất 1 hoặc giả dược hàng ngày trong 14 ngày.

Fig. 25 là biểu đồ của giá trị P50 được đo trước khi dùng liều và vào ngày 14 ở người tình nguyện khỏe mạnh nhận được liều hợp chất 1 hoặc giả dược hàng ngày trong 14 ngày.

Fig. 26 là biểu đồ của mức ATP trong máu được đo vào ngày 14 ở người tình nguyện khỏe mạnh nhận được liều hợp chất 1 hoặc giả dược hàng ngày trong 14 ngày.

Fig. 27 là biểu đồ thể hiện sự khác biệt trong các giá trị P50 được xác định trước khi dùng liều và 24 giờ sau khi dùng liều (nhóm SAD) và 24 giờ sau khi dùng liều vào ngày 14 (nhóm MAD) ở người tình nguyện khỏe mạnh được dùng hợp chất 1 hoặc giả dược.

Fig. 28 là biểu đồ vẽ biểu đồ nồng độ trong máu của hợp chất 1 (ng/mL) đo được ở bệnh nhân tình nguyện khỏe mạnh (HV) trên trục thứ nhất (bên trái) và nồng độ 2,3-DPG (microgam/mL) đo được ở bệnh nhân HV này trên trục thứ hai (bên phải) sau khi dùng một liều duy nhất hợp chất 1 (400 mg).

Fig. 29 là biểu đồ phân tán của mức 2,3-DPG và giá trị P50 quan sát được ở người tình nguyện khỏe mạnh ở nhóm SAD và MAD.

Mô tả chi tiết sáng chế

Phương pháp điều trị SCD tốt hơn là bao gồm việc cho dùng lượng hữu hiệu trị liệu của hợp chất (ví dụ, hợp chất 1) làm giảm sự polyme hóa HgbS, ví dụ bằng cách tăng ái lực HgbS cho oxy. Phương pháp điều trị SCD cũng tốt hơn là bao gồm việc cho dùng lượng hữu hiệu trị liệu của hợp chất (ví dụ, bất kỳ trong số các hợp chất nêu trên Fig. 1) làm giảm sự polyme hóa HgbS, ví dụ bằng cách tăng ái lực HgbS cho oxy. Phương pháp giảm mức 2,3-DPG và/hoặc tăng ATP ở RBC của người bao gồm cho dùng hợp chất hoạt hóa PKR, như bất kỳ hợp chất nào được liệt kê trong Fig. 1. Kết hợp các tác động này phù hợp với việc cung cấp các liệu pháp để giảm bớt sự tạo lưới liềm HgbS và cải thiện sức khỏe màng RBC, đưa ra cơ chế điều chỉnh bệnh duy nhất để điều trị SCD.

Hợp chất hoạt hóa PKR, như hợp chất 1, hữu dụng để thúc đẩy hoạt tính trong con đường đường phân. Hợp chất hoạt hóa PKR, như bất kỳ hợp chất nào được liệt kê trong Fig. 1, cũng hữu ích để thúc đẩy hoạt động trong con đường đường phân. Là enzym xúc tác bước cuối cùng của quá trình đường phân, PKR tác động trực tiếp đến sức khỏe trao đổi chất và các chức năng chính của RBC. Hợp chất hoạt hóa PKR (ví dụ, hợp chất 1), rất hữu ích để giảm 2,3-DPG và tăng ATP. Hợp chất hoạt hóa PKR (ví dụ, bất kỳ hợp chất nào được liệt kê trong Fig. 1), rất hữu ích để giảm 2,3-DPG và tăng ATP. Hợp chất hoạt hóa PKR (ví dụ, hợp chất 1 hoặc bất kỳ hợp chất nào được liệt kê trong Fig. 1, tốt nhất là hợp chất 1) cũng hữu ích để tăng ái lực oxy Hgb trong RBC. Tiết lộ một phần dựa trên khám phá rằng hoạt hóa PKR là một phương thức điều trị cho SCD, theo đó quá trình trùng hợp HgbS và tạo hình lưới liềm RBC được giảm xuống thông qua giảm mức 2,3-DPG và tăng ATP.

SCD là rối loạn máu di truyền phổ biến nhất và biểu hiện lâm sàng với các tình trạng bệnh lý nghiêm trọng tiềm ẩn liên quan đến gánh nặng đáng kể về thể chất, tình

cảm và kinh tế. Ví dụ, các cơn đau cấp tính do tắc mạch máu có thể gây suy nhược và cần phải có phản ứng y tế nhanh chóng. Thiếu máu tán huyết mãn tính gây mệt mỏi và thường cần truyền máu và chăm sóc hỗ trợ. Theo thời gian, sự vận chuyển oxy bị suy giảm qua vi mạch dẫn đến tổn thương cơ quan và mô. Trong khi có một số lựa chọn có sẵn để điều trị các triệu chứng, việc quản lý bệnh tổng thể sẽ được hưởng lợi từ các liệu pháp nhắm vào các quá trình ngược dòng để ngăn ngừa tắc mạch và tan máu.

Các triệu chứng lâm sàng được mô tả phần lớn là do sự xáo trộn về hình dạng và chức năng màng RBC do sự kết tụ của các phân tử HgbS. Không giống như Hgb bình thường, HgbS polyme hóa khi nó ở trạng thái khử oxy và cuối cùng gây ra màng cứng biến dạng không thể đi qua các mạch máu nhỏ, do đó ngăn chặn dòng máu bình thường qua vi mạch. Sự mất tính đàn hồi của màng cũng làm tăng quá trình tán huyết, làm giảm tuổi thọ của RBC. Hơn nữa, ATP tế bào giảm và tổn thương oxy hóa góp phần làm cho màng RBC hình lưới liềm cứng hơn và yếu hơn màng RBC bình thường. Màng bị tổn thương có xu hướng bám chặt vào mạch máu lớn hơn, dẫn đến tan máu, tăng tập hợp các RBC hình lưới liềm, tăng đông máu và viêm liên quan đến khủng hoảng tắc mạch.

Nguyên nhân cơ bản của hiện tượng tạo hình lưới liềm là sự hình thành các tập hợp deoxy-HgbS cứng nhắc làm thay đổi hình dạng tế bào và do đó tác động đến sinh lý tế bào và độ đàn hồi của màng. Các tập hợp này là các polyme có cấu trúc cao của HgbS đã khử oxy; dạng oxy hóa không polyme hóa. Quá trình polyme hóa được thúc đẩy bởi sự thay đổi cấu trúc tinh thể từ trạng thái thư giãn (R) liên kết với oxy sang trạng thái căng thẳng không liên kết (T). Sau đó, một số dư lượng nhất định trong chuỗi β của HgbS có thể tương tác theo một cách cụ thể và lặp đi lặp lại, tạo điều kiện cho sự polyme hóa.

Nồng độ của deoxy-HgbS phụ thuộc vào một số yếu tố, nhưng yếu tố chủ yếu là áp suất riêng phần của oxy (PO_2). Oxy liên kết thuận nghịch với các phần heme của phân tử Hgb. Khi máu được cung cấp oxy chảy qua mao mạch đến các mô và cơ quan ngoại vi đang tích cực tiêu thụ oxy, PO_2 giảm xuống và Hgb giải phóng oxy. Sự liên kết của oxy với Hgb là hợp tác và mối quan hệ với mức PO_2 phù hợp với đường cong xích ma (Fig. 3). Mối quan hệ này có thể bị ảnh hưởng bởi nhiệt độ, pH, cacbon dioxid và chất trung gian đường phân 2,3-DPG. 2,3-DPG liên kết trong khoang trung tâm của tetramer Hgb, gây ra các thay đổi dị ứng và làm giảm ái lực của Hgb với oxy. Do đó, các phương pháp điều trị làm tăng ái lực với oxy (tức là giảm quá trình khử oxy) của

HgbS có lẽ sẽ làm giảm sự hình thành polyme, thay đổi màng tế bào và các hậu quả lâm sàng liên quan đến SCD.

Một khía cạnh của sáng chế là hướng đích hoạt hóa PKR để giảm mức 2,3-DPG, dựa vào vai trò của PKR trong việc kiểm soát tốc độ đường phân trong RBC. Sự giảm 2,3-DPG khi hoạt hóa PKR đã được chứng minh trong các nghiên cứu tiền lâm sàng và ở người tình nguyện khỏe mạnh và bệnh nhân bị thiếu hụt pyruvat kinaza. Ngoài ra, hoạt hóa PKR sẽ làm tăng ATP, và đã được quan sát thấy làm như vậy trong các nghiên cứu tương tự. Với vai trò của ATP trong việc duy trì màng tế bào RBC khỏe mạnh và bảo vệ khỏi sức ép oxy hóa, việc nâng cao mức độ của nó có thể mang lại tác động có lợi rộng rãi. Do đó, việc hoạt hóa PKR mang lại tiềm năng cho hiệu ứng 2,3-DPG (tức là giảm tổn thương màng tế bào do phản ứng polyme hóa HgbS) được tăng cường nhờ sự hỗ trợ của ATP đối với tính toàn vẹn của màng. Chính nhờ thay đổi này mà chất hoạt hóa PKR có thể tác động tích cực đến thay đổi sinh lý dẫn đến các bệnh lý lâm sàng của SCD (Fig. 2). Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp cải thiện tình trạng thiếu máu và các biến chứng liên quan đến thiếu máu ở bệnh nhân SCD (ví dụ: ≥ 12 tuổi) với Hgb SS hoặc bệnh thiếu máu vùng biến thể Hgb SB⁰.

Hợp chất 1 là chất hoạt hóa PKR chọn lọc, khả dụng sinh học dùng qua đường miệng đã được chứng minh là làm giảm 2,3-DPG, tăng ATP và có tác dụng chống bệnh tật ở các mô hình bệnh tật với biên độ điều trị rộng liên quan đến độc tính tiền lâm sàng.

Phương pháp điều trị có thể bao gồm việc cho đối tượng cần điều trị dùng lượng hữu hiệu trị liệu của (i) hợp chất hoạt hóa PKR (ví dụ, hợp chất được bộc lộ ở đây), hoặc muối được dụng của chúng; hoặc (ii) chế phẩm hoạt hóa PKR (ví dụ, được phẩm bao gồm hợp chất được bộc lộ ở đây, hoặc muối được dụng của nó và chất mang được dụng). Được phẩm có thể được sử dụng bằng miệng ở bất kỳ dạng bào chế nào được chấp nhận bằng miệng. Theo một số phương án, để tăng thời gian tồn tại của tế bào hồng cầu, hợp chất, chế phẩm hoặc được phẩm được mô tả ở đây được thêm trực tiếp vào máu toàn phần hoặc các tế bào được đóng gói bên ngoài cơ thể hoặc được cung cấp trực tiếp cho đối tượng (ví dụ, bệnh nhân). Bệnh nhân và/hoặc đối tượng có thể được chọn để điều trị bằng cách sử dụng hợp chất được mô tả ở đây bằng cách đánh giá trước tiên bệnh nhân và/hoặc đối tượng để xác định xem đối tượng có cần hoạt hóa PKR hay không và đối tượng được xác định là cần hoạt hóa PKR, sau đó sử dụng hợp chất hoạt hóa PKR cho đối tượng trong chế phẩm được dụng. Bệnh nhân và/hoặc đối tượng có thể được chọn

để điều trị bằng cách sử dụng hợp chất được mô tả ở đây bằng cách đánh giá trước tiên bệnh nhân và/hoặc đối tượng để xác định xem đối tượng có được chẩn đoán mắc SCD hay không, và nếu đối tượng được chẩn đoán mắc SCD, sau đó cho đối tượng sử dụng hợp chất hoạt hóa PKR trong chế phẩm được dụng. Ví dụ, việc sử dụng lượng có hiệu quả điều trị của hợp chất hoạt hóa PKR có thể bao gồm việc sử dụng tổng cộng khoảng 25 mg - 1500 mg hợp chất 1 mỗi ngày, với liều lượng đơn hoặc chia nhỏ. Theo một số phương án, hợp chất 1 được sử dụng cho bệnh nhân được chẩn đoán mắc SCD với tổng số liều mỗi ngày một lần (QD) là 25 mg, 50 mg, 75 mg, 100 mg, 125 mg, 150 mg và/hoặc cao hơn nếu được dung nạp (ví dụ: 250 mg, 300 mg, 500 mg, 600 mg, 1000 mg và/hoặc 1500 mg). Theo một số phương án, liều dùng cho người từ 80 đến 130 mg hợp chất 1 được sử dụng một lần mỗi ngày (QD) cho bệnh nhân có nhu cầu sử dụng (ví dụ: bệnh nhân được chẩn đoán mắc SCD). Theo một số phương án, hợp chất hoạt hóa PKR được sử dụng với lượng 400 mg mỗi ngày (ví dụ: 400 mg QD hoặc 200 mg BID). Theo một số phương án, hợp chất 1 hoặc muối được dụng của nó được sử dụng với lượng 400 mg mỗi ngày (ví dụ: 400 mg QD hoặc 200 mg BID). Theo một số phương án, hợp chất bất kỳ được liệt kê trong Fig. 1 hoặc muối được dụng của chúng được sử dụng với lượng 400 mg mỗi ngày (ví dụ: 400 mg QD hoặc 200 mg BID). Theo một số phương án, hợp chất hoạt hóa PKR được sử dụng với lượng 700 mg mỗi ngày (ví dụ: 700 mg QD hoặc 350 mg BID). Theo một số phương án, hợp chất 1 hoặc muối được dụng của nó được sử dụng với lượng 700 mg mỗi ngày (ví dụ: 700 mg QD hoặc 350 mg BID). Theo một số phương án, hợp chất bất kỳ được liệt kê trong Fig. 1 hoặc muối được dụng của chúng được sử dụng với lượng 700 mg mỗi ngày (ví dụ, 700 mg QD hoặc 350 mg BID). Theo một số phương án, hợp chất hoạt hóa PKR được sử dụng với lượng 100 mg, 200 mg, 400 mg, 600 mg, 700 mg, 1100 mg hoặc 1500 mg mỗi ngày, với liều lượng đơn hoặc chia làm nhiều lần. Theo một số phương án, hợp chất 1 hoặc muối được dụng của nó được sử dụng với lượng 100 mg, 200 mg, 400 mg, 600 mg, 700 mg, 1100 mg, hoặc 1500 mg mỗi ngày, với liều lượng đơn hoặc chia nhỏ. Theo một số phương án, hợp chất bất kỳ trong số các hợp chất được liệt kê trong Fig. 1 hoặc muối được dụng của chúng được sử dụng với lượng đơn lẻ là 100 mg, 200 mg, 400 mg, 600 mg, 700 mg, 1100 mg hoặc 1500 mg mỗi ngày, một liều hoặc chia liều.

Phương pháp điều trị cho bệnh nhân được chẩn đoán mắc SCD có thể bao gồm việc cho bệnh nhân cần điều trị dùng hợp chất trị liệu hướng đích giảm deoxy-HgbS, có

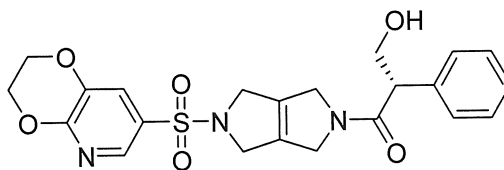
thể hoặc không thể trực tiếp cải thiện tính toàn vẹn của màng RBC. Hợp chất 1 đã được chứng minh là làm giảm 2,3-DPG và tăng ATP, và giảm sự tạo hình lưới liềm của tế bào đã được chứng minh trong các mô hình bệnh tật. Theo đó, theo một số phương án, các phương pháp điều trị không chỉ có thể giải quyết sự tạo hình lưới liềm mà còn cả chứng tán huyết và thiếu máu.

Phương pháp điều trị cho bệnh nhân được chẩn đoán mắc bệnh tế bào hình lưới liềm, và hợp chất hoạt hóa PKR để sử dụng trong phương pháp này, có thể bao gồm việc cho bệnh nhân dùng hợp chất hoạt hóa PKR (ví dụ, chế phẩm chứa một hoặc nhiều hợp chất có công thức I, như hợp chất 1 hoặc hỗn hợp của hợp chất 1 và hợp chất 2) với lượng đủ để giảm mức 2,3-DPG trong hồng cầu của bệnh nhân. Theo một số phương án, lượng này đủ để giảm mức 2,3-DPG ít nhất 30% sau 24 giờ, hoặc cao hơn (ví dụ: giảm mức 2,3-DPG trong hồng cầu của bệnh nhân ít nhất 40% sau 24 giờ). Theo một số phương án, lượng này đủ để giảm mức 2,3-DPG xuống 30-50% sau 24 giờ. Theo một số phương án, lượng này đủ để giảm mức 2,3-DPG xuống 40-50% sau 24 giờ. Theo một số phương án, lượng này đủ để giảm mức 2,3-DPG ít nhất 25% sau 12 giờ. Theo một số phương án, lượng này đủ để giảm mức 2,3-DPG xuống 25-45% sau 12 giờ. Theo một số phương án, lượng này đủ để giảm mức 2,3-DPG ít nhất 15% sau 6 giờ. Theo một số phương án, lượng này đủ để giảm mức 2,3-DPG xuống 15-30% sau 6 giờ. Theo một số phương án, lượng này đủ để giảm mức 2,3-DPG ít nhất 40% vào ngày điều trị thứ 14. Theo một số phương án, lượng này đủ để giảm mức 2,3-DPG xuống 40-60% vào ngày điều trị thứ 14. Theo một số phương án, lượng này đủ để giảm ít nhất 50% mức 2,3-DPG vào ngày thứ 14 của quá trình điều trị. Theo một số phương án, lượng đủ để giảm mức 2,3-DPG xuống 50-60% vào ngày 14 của quá trình điều trị.

Phương pháp điều trị cho bệnh nhân được chẩn đoán mắc bệnh tế bào hình lưới liềm, và hợp chất hoạt hóa PKR để sử dụng trong phương pháp này, cũng có thể bao gồm việc cho bệnh nhân dùng hợp chất hoạt hóa PKR (ví dụ, chế phẩm chứa một hoặc nhiều hợp chất có công thức I, như hợp chất 1 hoặc hỗn hợp của hợp chất 1 và hợp chất 2) với lượng hàng ngày đủ để tăng nồng độ ATP trong máu của bệnh nhân. Theo một số phương án, lượng này đủ để tăng nồng độ ATP trong máu lên ít nhất 40% vào ngày điều trị 14 hoặc cao hơn (ví dụ: ít nhất 50% vào ngày điều trị thứ 14). Theo một số phương án, lượng này đủ để tăng nồng độ ATP trong máu lên 40-65% vào ngày điều trị thứ 14. Theo một số phương án, lượng này đủ để tăng nồng độ ATP trong máu lên ít

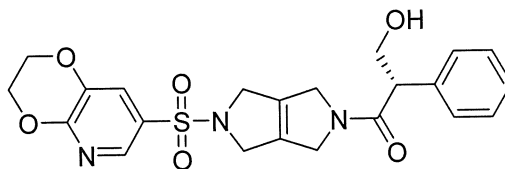
nhất 50% vào ngày điều trị 14 hoặc cao hơn (ví dụ: ít nhất 50% vào ngày điều trị thứ 14). Theo một số phương án, lượng này đủ để tăng nồng độ ATP trong máu lên 50-65% vào ngày điều trị thứ 14.

Trong một số ví dụ, dược phẩm bao gồm hợp chất 1 có thể được sử dụng trong phương pháp điều trị bệnh nhân được chẩn đoán mắc bệnh hồng cầu hình lưỡi liềm, phương pháp này bao gồm việc sử dụng cho bệnh nhân 400 mg hợp chất 1 một lần mỗi ngày (QD)



1.

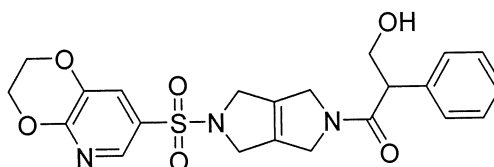
Trong một số ví dụ, dược phẩm chứa hợp chất 1 có thể được sử dụng trong phương pháp điều trị cho bệnh nhân được chẩn đoán mắc bệnh tế bào hình lưỡi liềm, phương pháp này bao gồm việc cho bệnh nhân dùng 200 mg hợp chất 1 hai lần mỗi ngày (BID)



1.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất hợp chất hoạt hóa PKR có công thức

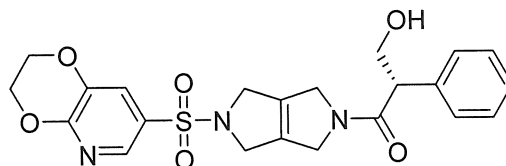
I:



I,

hoặc muối được dụng của nó. Theo một số phương án, hợp chất hoạt hóa PKR là 1-(5-((2,3-dihydro-[1,4]dioxino[2,3-b]pyridin-7-yl)sulfonyl)-3,4,5,6-tetrahydropyrrolo[3,4-c]pyrrol-2(1H)-yl)-3-hydroxy-2-phenylpropan-1-on.

Hợp chất có công thức I tốt hơn là hợp chất 1:

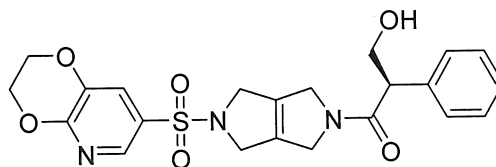


1,

hoặc muối được dụng của nó. Theo một số phương án, hợp chất có công thức I là (S)-1-(5-((2,3-dihydro-[1,4]dioxino[2,3-b]pyridin-7-yl)sulfonyl)-3,4,5,6-tetrahydropyrrolo[3,4-c]pyrrol-2(1H)-yl)-3-hydroxy-2-phenylpropan-1-on.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất hợp chất hoạt hóa PKR mà là bất kỳ trong số các hợp chất nêu trên Fig. 1, hoặc muối được dụng của nó.

Sáng chế cũng đề xuất chế phẩm (ví dụ dược phẩm) chứa hợp chất có công thức I. Theo một số phương án, chế phẩm được đề xuất chứa hợp chất có công thức I chứa hỗn hợp của hợp chất 1 và hợp chất 2:



2,

hoặc muối được dụng của nó. Sáng chế cũng đề xuất chế phẩm (ví dụ dược phẩm) chứa bất kỳ trong số các hợp chất nêu trên Fig. 1, hoặc muối được dụng của nó.

Dược phẩm chứa chế phẩm hoạt hóa PKR chứa hợp chất có công thức (I) có thể được bào chế để cho dùng qua đường miệng (ví dụ, dưới dạng viên nang hoặc viên nén). Ví dụ, hợp chất 1 có thể được kết hợp với các tá dược trong thành phần thích hợp để tạo thành dạng bào chế đơn vị đường uống, như viên nang hoặc viên nén, chứa liều mục tiêu của hợp chất 1. Sản phẩm thuốc có thể được bào chế bằng cách sản xuất đầu tiên hợp chất 1 dưới dạng thành phần dược hoạt tính (API), tiếp theo là nén/nghiền con lăn với tá dược nội hạt và trộn với tá dược dạng hạt phụ. Sản phẩm thuốc có thể chứa API của hợp chất 1 và các thành phần tá dược trong bảng 1 trong viên nén với liều lượng mong muốn của hợp chất 1 (ví dụ, viên nén 25 mg hoặc 100 mg được tạo thành từ thành phần dược phẩm trong bảng 1). Vật liệu pha trộn có thể được nén để tạo thành viên nén và sau đó được bao màng.

Dược phẩm tốt hơn là chứa khoảng 30-70% khối lượng của (S)-1-(5-((2,3-dihydro-[1,4]dioxino[2,3-b]pyridin-7-yl)sulfonyl)-3,4,5,6-tetrahydropyrrolo[3,4-c]pyrrol-2(1H)-yl)-3-hydroxy-2-phenylpropan-1-on, và tá dược được dùng ở dạng bào chế dùng qua đường miệng.

Bảng 1. Dược phẩm mẫu của hợp chất 1 để cho dùng qua đường miệng

Chức năng	% Chế phẩm (khối lượng)	Thành phần mẫu
API	30-70%	Hợp chất 1
Chất độn	15-40%	Xenluloza vi tinh thể
Chất gắn kết khô	2-10%	Crospovidon Kollidon CL
Chất gây trượt	0,25-1,25%	Silic dioxit dạng keo
Chất bôi trơn	0,25-1,00%	Magie Stearat, Hyqual

Theo một số phương án, chế phẩm được đề xuất chứa hợp chất có công thức I chứa hỗn hợp của (S)-1-(5-((2,3-dihydro-[1,4]dioxino[2,3-b]pyridin-7-yl)sulfonyl)-3,4,5,6-tetrahydropyrrolo[3,4-c]pyrrol-2(1H)-yl)-3-hydroxy-2-phenylpropan-1-on và (R)-1-(5-((2,3-dihydro-[1,4]dioxino[2,3-b]pyridin-7-yl)sulfonyl)-3,4,5,6-tetrahydropyrrolo[3,4-c]pyrrol-2(1H)-yl)-3-hydroxy-2-phenylpropan-1-on. Theo một số phương án, chế phẩm được đề xuất chứa hợp chất có công thức I là hỗn hợp của hợp chất 1 và hợp chất 2 là một phần của chế phẩm hoạt hóa PKR. Theo một số phương án, hợp chất có công thức I là raxemic. Theo một số phương án, hợp chất có công thức I bao gồm khoảng 50% hợp chất 1 và khoảng 50% hợp chất 2. Theo một số phương án, hợp chất có công thức I không phải là raxemic. Theo một số phương án, hợp chất có công thức I không bao gồm khoảng 50% của hợp chất 1 và khoảng 50% của hợp chất 2. Theo một số phương án, hợp chất có công thức I chứa khoảng 99-95%, khoảng 95-90%, khoảng 90-80%, khoảng 80-70%, hoặc khoảng 70-60% của hợp chất 1. Theo một số phương án, hợp chất có công thức I bao gồm khoảng 99%, 98%, 95%, 90%, 80%, 70%, hoặc 60% của hợp chất 1.

Theo một số phương án, chế phẩm hoạt hóa PKR chứa hỗn hợp của hợp chất 1 và hợp chất 2. Theo một số phương án, chế phẩm hoạt hóa PKR chứa hỗn hợp của hợp chất 1 và hợp chất 2, trong đó chế phẩm hoạt hóa PKR chứa lượng hữu hiệu trị liệu của hợp chất 1.

Chế phẩm chứa hợp chất có công thức I có thể được điều chế như được thể hiện trên Fig. 4A và Fig. 4B. Các hợp chất có công thức I có thể thu được bằng sơ đồ tổng hợp hóa học chung của Fig. 4A. Hợp chất 1 có thể thu được bằng con đường tổng hợp hóa học Fig. 4A hoặc Fig. 4B. Tóm lại, các hợp chất có công thức I (Fig. 4A) và/hoặc hợp chất 1 (Fig. 4B) có thể thu được từ một chuỗi bốn bước phản ứng từ các nguyên liệu ban đầu có bán trên thị trường. 7-bromo-2H, 3H- [1,4] dioxino [2,3-b] pyridin có bán trên thị trường được xử lý bằng hỗn hợp n-butyl liti và dibutylmagie, tiếp theo là sulfuryl clorua để tạo ra sulfonyl clorua 3. Xử lý 3 với tert-butyl 1H, 2H, 3H, 4H, 5H, 6H-pyrrolo [3,4-c] pyrrol-2-carboxylat khi có mặt triethylamin (TEA) tạo thành monosulfonamid được bảo vệ bằng Boc 4. Sau đó, hợp chất 4 được khử bảo vệ với sự có mặt của axit trifloaxetic (TFA) để tạo ra 5, gốc tự do của monosulfonamid. Bước cuối cùng để tạo ra hợp chất 1 (Fig. 4B) hoặc hợp chất 1 và hợp chất 2 (Fig. 4A) là sự kết hợp amit của axit 5 và axit tropic với sự có mặt của 1-[bis(dimethylamino)metylen]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridi 3-oxit hexaflo-phosphat (HATU).

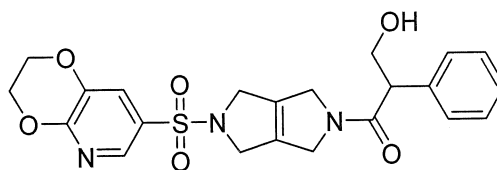
Hợp chất nêu trên Fig. 1 có thể được điều chế như được thể hiện trên Fig. 4C và như được mô tả trong Công bố đơn số WO 2018/175474, ngày 27 tháng 9 năm 2018. Nói chung, các hợp chất được liệt kê trong Fig. 1 có thể được điều chế bằng cách axyl hóa và sulfonyl hóa các nhóm amin bậc hai của hexahydropyrrolopyrrol 6. Ví dụ, sulfonyl hóa 6 với sulfonyl clorua 7 thích hợp tạo ra sulfonyl hexahydropyrrolopyrrol 8, sau đó được xử lý bằng axit cacboxylic 9 thích hợp với sự có mặt của thuốc thử nối amit (ví dụ, HATU) để tạo ra hợp chất 10 (Đường 1). Ngoài ra, axyl hóa 6 bằng axit cacboxylic 9 thích hợp với sự có mặt của thuốc thử nối amit tạo ra axyl hexahydropyrrolopyrrol 11, sau đó được xử lý bằng sulfonyl clorua 7 thích hợp để thu được hợp chất 10 (Đường 2). Như người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật sẽ hiểu, các nhóm bảo vệ đã biết, phản ứng chức năng hóa và kỹ thuật phân tách có thể được sử dụng kết hợp với các Đường 1 và 2 để có được các hợp chất nêu trên Fig. 1.

Phương pháp điều trị SCD cũng bao gồm cho dùng lượng hữu hiệu trị liệu của hợp chất có hoạt tính sinh học (ví dụ, phân tử nhỏ, axit nucleic, hoặc kháng thể hoặc liệu

pháp khác) làm giảm sự polyme hóa HgbS, ví dụ bằng cách tăng ái lực HgbS cho oxy. Theo một số phương án, phương pháp điều trị SCD bao gồm việc cho bệnh nhân cần điều trị dùng hợp chất có hoạt tính sinh học mà làm giảm phần trăm tế bào hình lưỡi liềm trong mô hình chuột bị bệnh hồng cầu hình lưỡi liềm được cung cấp trong ví dụ 7 ở đây sau 7 ngày điều trị bằng đường uống với hợp chất. Theo một số phương án, hợp chất có hoạt tính sinh học là hợp chất bất kỳ (bao gồm các phân tử nhỏ, axit nucleic, protein hoặc kháng thể), trong mô hình bệnh hồng cầu hình lưỡi liềm được cung cấp trong ví dụ 7, thể hiện một hoặc nhiều đặc điểm sau: (a) tăng ái lực của oxy với Hgb trong điều kiện thiếu oxy; (b) giảm P50 trong điều kiện thiếu oxy; (c) giảm tỷ lệ hồng cầu hình lưỡi liềm ở áp suất oxy thấp; (d) tăng thời gian tạo hình lưỡi liềm của tế bào; và/hoặc (e) làm tăng Hgb ít nhất khoảng 1 g/dL.

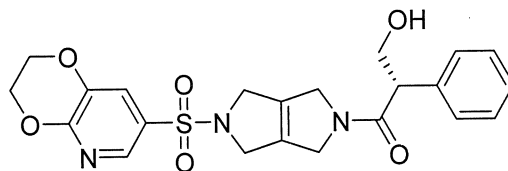
Theo các phương án khác, sáng chế đề cập đến mỗi trong số các phương án đánh số sau:

1. Chế phẩm chứa hợp chất hoạt hóa PKR có công thức I, hoặc muối được dụng của nó:



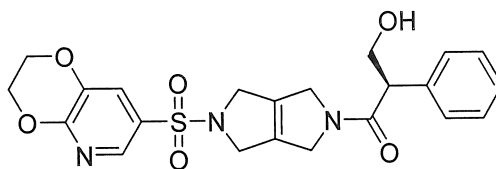
I.

2. Chế phẩm theo phương án 1, trong đó hợp chất có công thức I là hợp chất 1, hoặc muối được dụng của nó:



1.

3. Chế phẩm theo phương án 2, trong đó chế phẩm chứa hỗn hợp của hợp chất 1 và hợp chất 2, hoặc muối được dụng của nó:



2.

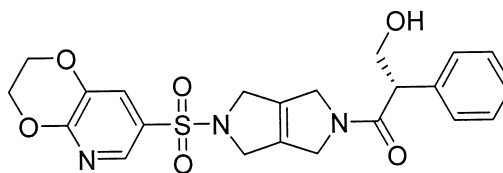
4. Chế phẩm theo phương án 1, chứa hợp chất: 1-(5-((2,3-dihydro-[1,4]dioxino[2,3-b]pyridin-7-yl)sulfonyl)-3,4,5,6-tetrahydropyrrolo[3,4-c]pyrrol-2(1H)-yl)-3-hydroxy-2-phenylpropan-1-on.

5. Chế phẩm theo phương án bất kỳ trong số các phương án 1-4, được bào chế dưới dạng dạng bào chế đơn vị dùng qua đường miệng.

6. Phương pháp điều trị cho bệnh nhân được chẩn đoán mắc bệnh tế bào hình lưỡi liềm (SCD), phương pháp này bao gồm việc cho bệnh nhân cần điều trị dùng lượng hữu hiệu trị liệu của dược phẩm chứa (S)-1-(5-((2,3-dihydro-[1,4]dioxino[2,3-b]pyridin-7-yl)sulfonyl)-3,4,5,6-tetrahydropyrrolo[3,4-c]pyrrol-2(1H)-yl)-3-hydroxy-2-phenylpropan-1-on, hoặc muối được dụng của nó.

7. Phương pháp theo phương án 6, trong đó phương pháp bao gồm việc cho dùng qua đường miệng dược phẩm chứa (S)-1-(5-((2,3-dihydro-[1,4]dioxino[2,3-b]pyridin-7-yl)sulfonyl)-3,4,5,6-tetrahydropyrrolo[3,4-c]pyrrol-2(1H)-yl)-3-hydroxy-2-phenylpropan-1-on, dưới dạng hợp chất hoạt hóa PKR duy nhất trong dược phẩm.

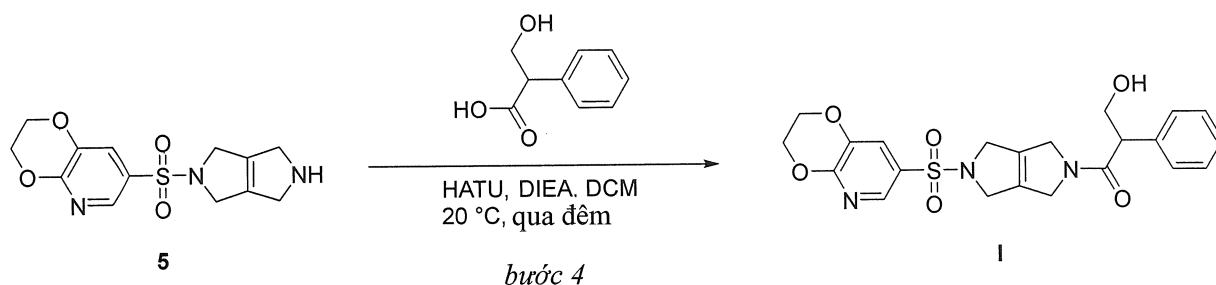
8. Phương pháp điều trị cho bệnh nhân được chẩn đoán mắc bệnh tế bào hình lưỡi liềm (SCD), phương pháp bao gồm việc cho bệnh nhân cần điều trị dùng lượng hữu hiệu trị liệu của dược phẩm chứa hợp chất 1:



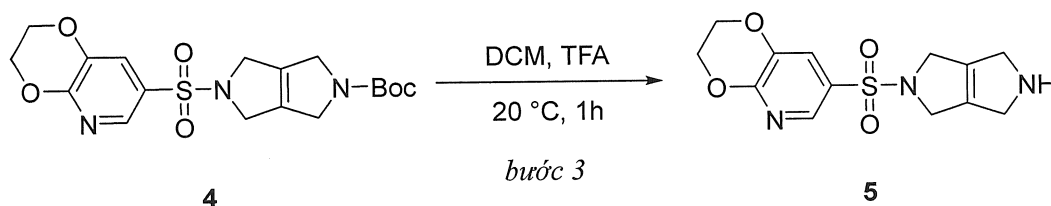
1,

hoặc muối được dụng của nó.

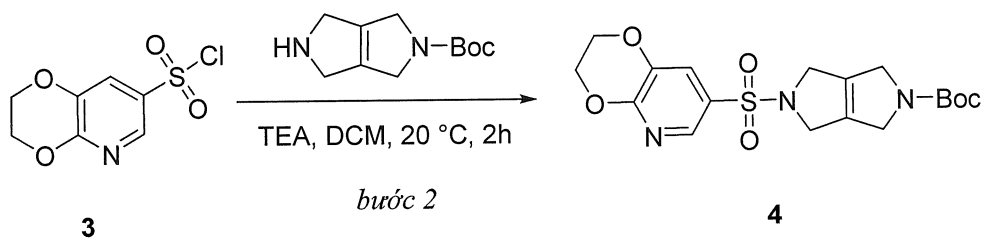
9. Chế phẩm chứa hợp chất có công thức I thu được bằng quy trình bao gồm bước chuyển hóa hợp chất 5 thành hợp chất có công thức I trong phản ứng được mô tả như bước 4:



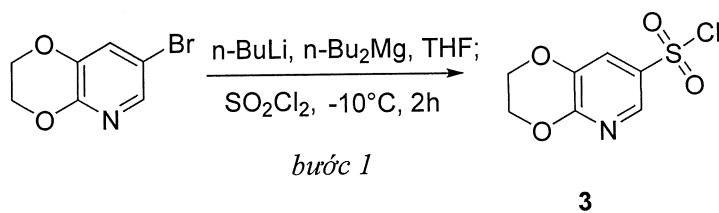
10. Chế phẩm theo phương án 9, trong đó quy trình còn bao gồm đầu tiên thu hợp chất 5 từ hợp chất 4 bằng quy trình bao gồm bước 3:



11. Chế phẩm theo phương án 10, trong đó quy trình còn chứa đầu tiên thu hợp chất 4 từ hợp chất 3 bằng quy trình bao gồm bước 2:



12. Chế phẩm theo phương án 11, trong đó quy trình còn chứa đầu tiên thu hợp chất 3 từ quy trình bao gồm bước 1:

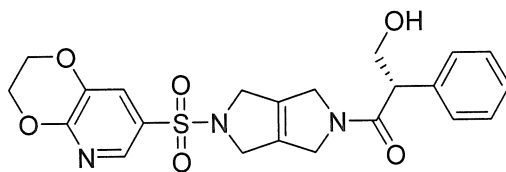


13. Phương pháp điều trị cho bệnh nhân được chẩn đoán mắc bệnh tế bào hình lưỡi liềm (SCD), phương pháp này bao gồm việc cho bệnh nhân cần điều trị dùng lượng hữu hiệu trị liệu của hợp chất hoạt hóa PKR có giá trị AC_{50} nhỏ hơn 1 μM sử dụng thử nghiệm ánh sáng được mô tả trong ví dụ 2.

14. Phương pháp theo phương án 13, trong đó hợp chất hoạt hóa PKR là hợp chất 1.

15. Phương pháp theo phương án bất kỳ trong số các phương án 13-14, trong đó hợp chất hoạt hóa PKR được cho bệnh nhân cần điều trị dùng qua đường miệng.

16. Sử dụng hợp chất 1:



1

hoặc muối được dùng của nó, để điều trị cho bệnh nhân được chẩn đoán mắc bệnh tế bào hình lưỡi liềm (SCD).

17. Sử dụng hợp chất hoạt hóa PKR có giá trị AC_{50} nhỏ hơn $1\ \mu\text{M}$ sử dụng thử nghiệm ánh sáng được mô tả trong ví dụ 2, trong việc điều trị cho bệnh nhân được chẩn đoán mắc bệnh tế bào hình lưỡi liềm.

18. Phương pháp theo phương án bất kỳ trong số các phương án 6-8 hoặc 13-15, bao gồm việc cho dùng hợp chất 1 một lần mỗi ngày.

19. Phương pháp theo phương án bất kỳ trong số các phương án 6-8 hoặc 13-15, bao gồm việc cho dùng tổng 25 mg-1500 mg hợp chất 1 mỗi ngày.

20. Phương pháp theo phương án bất kỳ trong số các phương án 18-19, bao gồm việc cho dùng tổng 25mg -130 mg hợp chất 1 mỗi ngày.

21. Phương pháp điều trị cho bệnh nhân được chẩn đoán mắc SCD, bao gồm việc cho bệnh nhân dùng lượng hữu hiệu trị liệu của hợp chất hoạt hóa PKR, trong đó hợp chất hoạt hóa PKR này, trong mô hình bệnh tế bào hình lưỡi liềm ở chó được cung cấp trong ví dụ 10, thể hiện một hoặc nhiều đặc điểm sau: (a) tăng ái lực của oxy với Hgb trong điều kiện thiếu oxy; (b) giảm P50 trong điều kiện thiếu oxy; (c) giảm tỷ lệ RBC hình lưỡi liềm ở áp suất oxy thấp; (d) tăng thời gian tạo hình lưỡi liềm của tế bào; và/hoặc (e) làm tăng Hgb ít nhất khoảng $1\ \text{g/dL}$.

22. Phương pháp theo phương án 21, trong đó hợp chất hoạt hóa PKR là kháng thể.

23. Phương pháp theo phương án 21, trong đó hợp chất hoạt hóa PKR là protein.

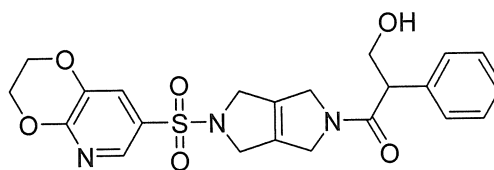
24. Phương pháp theo phương án 21, trong đó hợp chất hoạt hóa PKR là axit nucleic.

25. Phương pháp theo phương án 21, trong đó hợp chất hoạt hóa PKR là axit nucleic ADN.

26. Phương pháp theo phương án 21, trong đó hợp chất hoạt hóa PKR là axit nucleic ARN.

Theo các phương án khác, sáng chế đề cập đến mỗi trong số các phương án được đánh số sau:

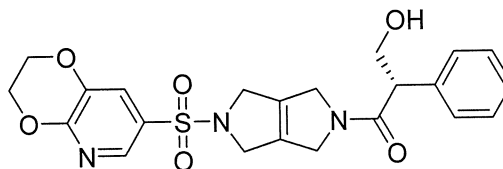
1. Hợp chất hoạt hóa PKR để sử dụng trong phương pháp điều trị cho bệnh nhân được chẩn đoán mắc bệnh tế bào hình lưỡi liềm (SCD), bao gồm việc cho bệnh nhân dùng hợp chất hoạt hóa PKR với lượng có hiệu quả điều trị bệnh, trong đó hợp chất hoạt hóa PKR là hợp chất có công thức I:



I,

hoặc muối được dùng của nó, có giá trị AC_{50} nhỏ hơn $1 \mu M$ sử dụng thử nghiệm ánh sáng được mô tả trong ví dụ 2.

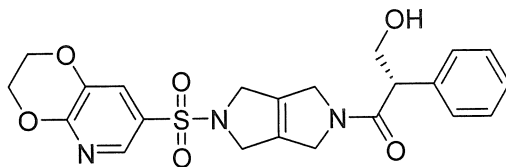
2. Hợp chất hoạt hóa PKR theo phương án 1, trong đó hợp chất hoạt hóa PKR này là hợp chất 1:



1,

hoặc muối được dùng của nó.

3. Hợp chất hoạt hóa PKR theo phương án 1, trong đó hợp chất hoạt hóa PKR này là hợp chất 1:



1.

4. Hợp chất hoạt hóa PKR theo phương án 3, trong đó hợp chất hoạt hóa PKR này được cho dùng với lượng 25-1500 mg mỗi ngày.

5. Hợp chất hoạt hóa PKR theo phương án 3, trong đó hợp chất hoạt hóa PKR này được cho dùng một lần hàng ngày với lượng 250 mg, 300 mg, 500 mg, 600 mg, 1000 mg hoặc 1500 mg mỗi ngày.

6. Hợp chất hoạt hóa PKR theo phương án 3, trong đó hợp chất hoạt hóa PKR này được cho dùng một lần hàng ngày với lượng 100 mg mỗi ngày.

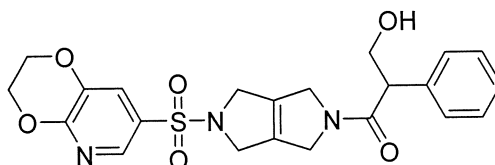
7. Hợp chất hoạt hóa PKR theo phương án 3, trong đó hợp chất hoạt hóa PKR này được cho dùng một lần hàng ngày với lượng 600 mg mỗi ngày.

8. Hợp chất hoạt hóa PKR theo phương án 3, trong đó hợp chất hoạt hóa PKR này được cho dùng một lần mỗi ngày.

9. Hợp chất hoạt hóa PKR theo phương án 3, trong đó hợp chất hoạt hóa PKR này được cho bệnh nhân dùng qua đường miệng.

10. Hợp chất hoạt hóa PKR theo phương án 3, trong đó hợp chất 1 là hợp chất hoạt hóa PKR duy nhất được cho bệnh nhân dùng.

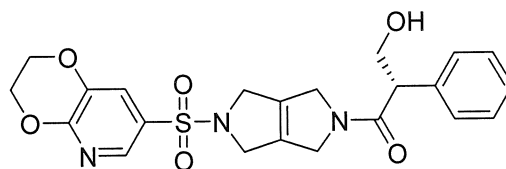
11. Hợp chất hoạt hóa PKR để sử dụng trong phương pháp điều trị cho bệnh nhân được chẩn đoán mắc bệnh tế bào hình lưỡi liềm, bao gồm việc cho bệnh nhân dùng hợp chất hoạt hóa PKR với lượng đủ để giảm mức 2,3-DPG trong tế bào hồng cầu của bệnh nhân ít nhất 30% sau 24 giờ, trong đó hợp chất hoạt hóa PKR này là hợp chất có công thức I:



I,

hoặc muối được dụng của nó, có giá trị AC_{50} nhỏ hơn $1\text{ }\mu\text{M}$ sử dụng thử nghiệm ánh sáng được mô tả ở ví dụ 2.

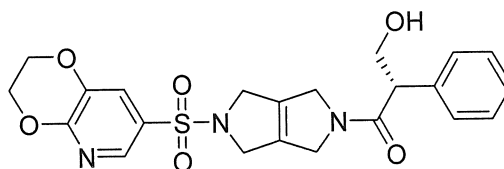
12. Hợp chất hoạt hóa PKR theo phương án 11, trong đó hợp chất hoạt hóa PKR này là hợp chất 1:



1,

hoặc muối được dụng của nó.

13. Hợp chất hoạt hóa PKR theo phương án 1, trong đó hợp chất hoạt hóa PKR này là hợp chất 1:



1.

14. Hợp chất hoạt hóa PKR theo phương án 13, trong đó hợp chất 1 là hợp chất hoạt hóa PKR duy nhất được cho bệnh nhân dùng.

15. Hợp chất hoạt hóa PKR theo phương án bất kỳ trong số các phương án 11-14, trong đó hợp chất hoạt hóa PKR này được cho bệnh nhân dùng qua đường miệng.

16. Hợp chất hoạt hóa PKR theo phương án bất kỳ trong số các phương án 11-15, trong đó hợp chất hoạt hóa PKR này được cho dùng một lần mỗi ngày.

17. Hợp chất hoạt hóa PKR theo phương án bất kỳ trong số các phương án 11-16, trong đó hợp chất hoạt hóa PKR này được cho dùng với lượng đủ để giảm mức 2,3-DPG ở hồng cầu của bệnh nhân ít nhất 40% sau 24 giờ.

18. Hợp chất hoạt hóa PKR theo phương án bất kỳ trong số các phương án 11-17, trong đó hợp chất hoạt hóa PKR này được cho dùng với lượng hàng ngày đủ để tăng mức máu ATP của bệnh nhân ít nhất 40% vào ngày 14 điều trị.

19. Hợp chất hoạt hóa PKR theo phương án bất kỳ trong số các phương án 11-15, trong đó hợp chất hoạt hóa PKR này được cho dùng với lượng 100 mg, 200 mg, 400 mg, 600 mg, 700 mg, 1100 mg, hoặc 1500 mg mỗi ngày.

20. Hợp chất hoạt hóa PKR theo phương án bất kỳ trong số các phương án 11-15, trong đó hợp chất hoạt hóa PKR này được cho dùng với lượng 200 mg mỗi ngày.

21. Hợp chất hoạt hóa PKR theo phương án 20, trong đó hợp chất hoạt hóa PKR này được cho dùng với lượng 200 mg mỗi ngày một lần mỗi ngày (QD).

22. Hợp chất hoạt hóa PKR theo phương án 20, trong đó hợp chất hoạt hóa PKR này được cho dùng với lượng 100 mg mỗi ngày hai lần mỗi ngày (BID).

23. Hợp chất hoạt hóa PKR theo phương án bất kỳ trong số các phương án 11-15, trong đó hợp chất hoạt hóa PKR này được cho dùng với lượng 400 mg mỗi ngày.

24. Hợp chất hoạt hóa PKR theo phương án 23, trong đó hợp chất hoạt hóa PKR này được cho dùng với lượng 400 mg một lần mỗi ngày (QD).

25. Hợp chất hoạt hóa PKR theo phương án 23, trong đó hợp chất hoạt hóa PKR này được cho dùng với lượng 200 mg hai lần mỗi ngày (BID).

26. Hợp chất hoạt hóa PKR theo phương án bất kỳ trong số các phương án 11-15, trong đó hợp chất hoạt hóa PKR này được cho dùng với lượng 600 mg mỗi ngày.

27. Hợp chất hoạt hóa PKR theo phương án 26, trong đó hợp chất hoạt hóa PKR này được cho dùng với lượng 300 mg hai lần mỗi ngày (BID).

28. Hợp chất hoạt hóa PKR theo phương án bất kỳ trong số các phương án 11-15, trong đó hợp chất hoạt hóa PKR này được cho dùng với lượng 700 mg mỗi ngày.

29. Hợp chất hoạt hóa PKR theo phương án 28, trong đó hợp chất hoạt hóa PKR này được cho dùng với lượng 700 mg một lần mỗi ngày (QD).

30. Hợp chất hoạt hóa PKR theo phương án 28, trong đó hợp chất hoạt hóa PKR này được cho dùng với lượng 350 mg hai lần mỗi ngày (BID).

Sáng chế cho phép người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này tạo ra và sử dụng sáng chế được cung cấp ở đây theo nhiều phương án khác nhau. Các thay đổi, sửa đổi và cải tiến khác nhau của sáng chế dễ dàng xảy ra đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, bao gồm các thay đổi, sửa đổi, thay thế và cải

tiền nhất định cũng là một phần của sáng chế. Theo đó, mô tả và hình vẽ ở trên là ví dụ để minh họa cho khám phá được đề xuất trong bản mô tả này.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Là enzyme xúc tác bước cuối cùng của quá trình đường phân, PKR làm cơ sở cho các phản ứng tác động trực tiếp đến sức khỏe trao đổi chất và các chức năng chính của RBC. Các ví dụ sau đây chứng minh cách hoạt hóa PKR bởi hợp chất 1 tác động đến RBC. Tác động chính của hợp chất 1 lên RBC là làm giảm 2,3-DPG được đề xuất để giảm tạo lưới liềm Hgb và hậu quả của nó đối với RBC và phân phối oxy đến các mô. Hợp chất 1 cũng làm tăng ATP, có thể cung cấp các nguồn trao đổi chất để hỗ trợ tính toàn vẹn của màng tế bào và bảo vệ chống mất khả năng biến dạng và tăng mức độ tan máu trong SCD. Với sự kết hợp các tác dụng của hợp chất 1 có trên RBC, nó có khả năng làm giảm các di chứng lâm sàng của Hgb hình lưới liềm và mang lại lợi ích điều trị cho bệnh nhân SCD.

Hợp chất 1 được thiết kế hợp chất hoạt hóa PKR được điều chế như được mô tả ở ví dụ 1, và được kiểm tra hoạt động hoạt hóa PKR trong xét nghiệm sinh hóa của ví dụ 2.

Hoạt tính enzyme sinh học của PKR (tức là, tạo ra ATP và/hoặc pyruvat) đã được đánh giá trong các thử nghiệm enzyme và tế bào với hợp chất 1, như được mô tả trong ví dụ 3 và ví dụ 4, tương ứng. Kết quả từ các thử nghiệm enzyme cho thấy hợp chất 1 là chất kích hoạt của wt-PKR tái tổ hợp và PKR đột biến, (ví dụ: R510Q), là một trong các đột biến PKR phổ biến nhất ở Bắc Mỹ. PKR tồn tại ở cả trạng thái dime và tetrame, nhưng hoạt động hiệu quả nhất như tetrame. Hợp chất 1 là chất hoạt hóa dị ứng của PKR và được chứng minh là ổn định dạng tetrame của PKR, do đó làm giảm K_m (hằng số Michaelis-Menten) cho PEP.

Tương tự, kết quả từ thử nghiệm với RBC từ bệnh nhân là người mắc SCD thể hiện rằng điều trị bằng hợp chất 1 gây ra sự thay đổi về P50 (PO_2 ở độ bão hòa hemoglobin 50%) và sự thay đổi này có liên quan đến việc tăng ái lực với oxy khi có mặt của hợp chất 1 (ví dụ 5). Hơn nữa, hợp chất 1 làm giảm sự tạo hình lưới liềm trong điều kiện thiếu oxy nghiêm trọng. Dữ liệu được tổng hợp lại cho thấy rằng hợp chất 1 có thể làm giảm hậu quả lâm sàng của tế bào hình lưới liềm bằng cách giảm sự tạo hình lưới liềm tế bào thông qua việc tăng ái lực với oxy đến từ hoạt hóa PKR.

Kiểm tra in vivo ở chuột (ví dụ 6 và 7) đã chứng minh sự hoạt hóa PKR ở chuột wt, và cung cấp đánh giá tác động lên RBC và Hgb trong mô hình SCD ở chó. Hợp chất 1 được dung nạp tốt cho đến liều cao nhất được thử nghiệm, và sự tiếp xúc tăng theo tỷ lệ với liều lượng. Mức 2,3-DPG giảm $> 30\%$ đối với liều ≥ 120 mg/kg hợp chất 1 (AUC_{0-24} từ 0 đến 24 giờ ($AUC_{0-24} > 5200$ giờ·ng/mL) và mức ATP tăng $> 40\%$ đối với ≥ 60 mg/kg hợp chất 1 ($AUC_{0-24} > 4000$ giờ·ng/mL). Trong hai nghiên cứu với mô hình SCD ở chuột, ái lực oxy tăng, giảm sự tạo hình lưới liềm và tăng Hgb đã được quan sát thấy ex vivo trong RBC từ chuột sau 7 ngày dùng (bình thường) qua đường miệng hợp chất 1. Tổng hợp lại, dữ liệu hỗ trợ lợi ích điều trị liên quan đến phơi nhiễm của hợp chất 1 đối với điều trị SCD.

Theo một số phương án, liều hàng ngày nằm trong khoảng từ 100 mg đến 1500 mg hợp chất hoạt hóa PKR được cho người dùng. Theo một số phương án, liều hàng ngày nằm trong khoảng từ 100 mg đến 1500 mg hợp chất 1 được cho người dùng. Theo một số phương án, liều hàng ngày nằm trong khoảng từ 100 mg đến 1500 mg của bất kỳ trong số các hợp chất nêu trên Fig. 1 được cho người dùng. Cụ thể là, tổng liều hàng ngày nằm trong khoảng 100 mg – 600 mg hợp chất hoạt hóa PKR có thể được cho người dùng (bao gồm, ví dụ, liều 100 mg, 200 mg, 300 mg, 400 mg, 500 mg, hoặc 600 mg, mỗi ngày, theo một hoặc liều được chia). Cụ thể là, tổng liều hàng ngày nằm trong khoảng 100 mg – 600 mg hợp chất 1 có thể được cho người dùng (bao gồm, ví dụ, liều 100 mg, 200 mg, 300 mg, 400 mg, 500 mg, hoặc 600 mg, mỗi ngày, theo một hoặc liều được chia). Cụ thể là, tổng liều hàng ngày nằm trong khoảng 100 mg – 600 mg của bất kỳ trong số các hợp chất nêu trên Fig. 1 có thể được cho người dùng (bao gồm, ví dụ, liều 100 mg, 200 mg, 300 mg, 400 mg, 500 mg, hoặc 600 mg, mỗi ngày, theo một hoặc liều được chia). Theo một số phương án, liều hàng ngày 400 mg (ví dụ, 400 mg QD hoặc 200 mg BID) hợp chất hoạt hóa PKR được cho người dùng. Theo một số phương án, liều hàng ngày 400 mg (ví dụ, 400 mg QD hoặc 200 mg BID) hợp chất 1, hoặc muối được dụng của nó, được cho người dùng. Theo một số phương án, liều hàng ngày 400 mg (ví dụ, 400 mg QD hoặc 200 mg BID) của bất kỳ trong số các hợp chất nêu trên Fig. 1 được cho người dùng.

Ví dụ 1: Tổng hợp hợp chất có công thức I

Hợp chất hoạt hóa PKR 1 thu được bằng phương pháp được mô tả trong bản mô tả này và sơ đồ phản ứng được thể hiện trên Fig. 4A và/hoặc Fig. 4B. Hợp chất 1 có khối lượng phân tử là 457,50 Da.

Bước 1. 2H,3H-[1,4]dioxino[2,3-b]pyridin-7-sulfonyl clorua (3)

Bình đáy tròn 100 mL được làm sạch và được duy trì với môi trường nitơ tro được đặt dung dịch *n*-BuLi trong hexan (2,5 M, 2 mL, 5,0 mmol, 0,54 equiv) và dung dịch *n*-Bu₂Mg trong heptan (1,0 M, 4,8 mL, 4,8 mmol, 0,53 equiv). Dung dịch thu được được khuấy trong 10 phút ở RT (20 °C). Tiếp theo là thêm từng giọt dung dịch 7-bromo-2H, 3H- [1,4] dioxino [2,3-b] pyridin (2 g, 9,26 mmol, 1,00 đương lượng) trong tetrahydrofuran (16 mL) với khuấy ở -10 °C trong 10 phút. Hỗn hợp thu được được khuấy trong 1 giờ ở -10 °C. Hỗn hợp phản ứng được thêm từ từ vào dung dịch sulfuryl clorua (16 mL) ở -10 °C. Hỗn hợp thu được được khuấy trong 0,5 giờ ở -10 °C. Sau đó, phản ứng được dập tắt bằng cách thêm cẩn thận 30 mL dung dịch amoni clorua bão hòa ở 0 °C. Hỗn hợp thu được được chiết bằng 3x50 mL diclometan. Các lớp hữu cơ được kết hợp, làm khô qua natri sulfat khan, được lọc và cô đặc trong chân không. Cặn được tinh chế bằng sắc ký cột silicagel, rửa giải bằng etyl axetat/ete dầu hỏa (1:3). Điều này cung cấp 1,3 g (60%) 2H,3H-[1,4]dioxino[2,3-b]pyridin-7-sulfonyl clorua ở dạng chất rắn màu trắng. LCMS m/z: tính cho C₇H₆ClNO₄S: 235,64; theo thử nghiệm: 236 [M+H]⁺.

Bước 2. tert-Butyl 5-[2H,3H-[1,4]dioxino[2,3-b]pyridin-7-sulfonyl]-1H,2H,3H,4H,5H,6H-pyrrolo[3,4-c]pyrol-2-carboxylat (4)

Bình đáy tròn 100 mL được đặt 2H,3H-[1,4]dioxino[2,3-b]pyridin-7-sulfonyl clorua (1,3 g, 5,52 mmol, 1,00 equiv), *tert*-butyl 1H,2H,3H,4H,5H,6H-pyrrolo[3,4-c]pyrol-2-carboxylat (1,16 g, 5,52 mmol), diclometan (40 mL), và trietylamin (1,39 g, 13,74 mmol, 2,49 equiv). Dung dịch được khuấy trong 2 giờ ở 20 °C, sau đó được pha loãng với 40 mL nước. Hỗn hợp thu được được chiết bằng 3x30 mL diclometan. Các lớp hữu cơ được kết hợp, làm khô qua natri sulfat khan, được lọc và cô đặc trong chân không. Cặn được tinh chế bằng sắc ký cột silicagel, rửa giải bằng diclometan/metanol (10:1). Điều này cung cấp 1,2 g (53%) *tert*-butyl 5-[2H,3H-[1,4]dioxino[2,3-b]pyridin-7-sulfonyl]-1H, 2H, 3H, 4H, 5H, 6H-pyrrolo[3,4-c]pyrol-2-carboxylat ở dạng chất rắn màu vàng. LCMS m/z: tính cho C₁₈H₂₃N₃O₆S: 409,46; theo thử nghiệm: 410 [M+H]⁺.

Bước 3. 2-[2H,3H-[1,4]dioxino[2,3-b]pyridin-7-sulfonyl]-1H,2H,3H,4H,5H,6H-pyrrolo[3,4-c]pyrrol (5)

Bình đáy tròn 100 mL được đặt *tert*-butyl 5-[2H,3H-[1,4]dioxino[2,3-b]pyridin-7-sulfonyl]-1H,2H,3H,4H,5H,6H-pyrrolo[3,4-c]pyrrol-2-carboxylat (1,2 g, 2,93 mmol, 1,00 equiv), diclometan (30 mL), và axit trifloaxetic (6 mL). Dung dịch được khuấy trong 1 giờ ở 20 °C. Hỗn hợp thu được được cô trong chân không. Phần cặn được hòa tan trong 10 mL metanol và độ pH được điều chỉnh đến 8 bằng natri bicacbonat (2 mol/L). Dung dịch thu được được chiết bằng 3x10 mL diclometan. Các lớp hữu cơ được kết hợp, làm khô qua natri sulfat khan, được lọc và cô đặc trong chân không. Sản phẩm thô được tinh chế bằng sắc ký cột silicagel, rửa giải bằng diclometan/metanol (10:1). Điều này cung cấp 650 mg (72%) của 2-[2H,3H-[1,4]dioxino[2,3-b]pyridin-7-sulfonyl]-1H,2H,3H,4H,5H,6H-pyrrolo[3,4-c]pyrrol là chất rắn màu vàng. LCMS *m/z*: tính cho C₁₃H₁₅N₃O₄S: 309,34; theo thử nghiệm: 310 [M+H]⁺.

Bước 4. (*S*)-1-(5-[2H,3H-[1,4]dioxino[2,3-b]pyridin-7-sulfonyl]-1H,2H,3H,4H,5H,6H-pyrrolo[3,4-c]pyrrol-2-yl)-3-hydroxy-2-phenylpropan-1-on (1) và (*R*)-1-(5-[2H,3H-[1,4]dioxino[2,3-b]pyridin-7-sulfonyl]-1H,2H,3H,4H,5H,6H-pyrrolo[3,4-c]pyrrol-2-yl)-3-hydroxy-2-phenylpropan-1-on (2)

Bình đáy tròn 100 mL được đặt 2-[2H,3H-[1,4]dioxino[2,3-b]pyridin-7-sulfonyl]-1H,2H,3H,4H,5H,6H-pyrrolo[3,4-c]pyrrol (150 mg, 0,48 mmol, 1,00 equiv), axit 3-hydroxy-2-phenylpropanoic (97 mg, 0,58 mmol, 1,20 equiv), diclometan (10 mL), HATU (369 mg, 0,97 mmol, 2,00 equiv) và DIEA (188 mg, 1,46 mmol, 3,00 equiv). Dung dịch thu được được khuấy qua đêm ở 20 °C. Hỗn hợp phản ứng được pha loãng với 20 mL nước và sau đó được chiết bằng 3x20 mL diclometan. Các lớp hữu cơ được kết hợp, làm khô qua natri sulfat khan, được lọc và cô đặc trong chân không. Cặn được tinh chế bằng cách rửa giải prep-TLC với diclometan/metanol (20:1) và được tinh chế thêm bằng prep-HPLC (Cột: Cột chuẩn bị OBD XBridge C18, 100 Å, 5 µm, 19 mm x 250 mm; Pha động A: nước (10 mmol/L NH₄HCO₃), Pha động B: MeCN; Gradient: 15% B đến 45% B trong 8 phút; Tốc độ dòng: 20 mL/phút; Máy dò UV: 254 nm). Hai chất đối quang được phân tách bằng prep-HPLC không đối xứng (Cột, Daicel CHIRALPAK®IF, 2,0 cm x 25 cm, 5 µm; pha động A: DCM, pha B: MeOH (giữ 60% MeOH trong 15 phút); Tốc độ dòng chảy: 16 mL/phút; Máy dò, UV 254 & 220 nm). Điều này dẫn đến đỉnh 1 (2, Rt: 8,47 phút) 9,0 mg (4%) của (*R*)-1-(5-[2H,3H-[1,4]

dioxino[2,3-*b*]pyridin-7-sulfonyl]-1H, 2H, 3H, 4H, 5H, 6H-pyrrolo[3,4-*c*]pyrrol-2-yl)-3-hydroxy-2-phenylpropan-1-on ở dạng chất rắn màu vàng; và đỉnh 2 (1, Rt: 11,83 phút) 10,6 mg (5%) của (S)-1-(5-[2H,3H-[1,4]dioxino[2,3-*b*]pyridin-7-sulfonyl]-1H, 2H, 3H, 4H, 5H, 6H-pyrrolo[3,4-*c*]pyrrol-2-yl)-3-hydroxy-2-phenylpropan-1-on ở dạng chất rắn màu vàng.

(1): ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8,13 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H), 7,61 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H), 7,31-7,20 (m, 5H), 4,75 (t, $J = 5,2$ Hz, 1H), 4,50-4,47 (m, 2H), 4,40-4,36 (m, 1H), 4,32-4,29 (m, 2H), 4,11-3,87 (m, 8H), 3,80-3,77 (m, 1H), 3,44-3,41 (m, 1H). LC-MS (ESI) m/z : tính cho $\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_6\text{S}$: 457,13; theo thử nghiệm: 4580 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

(2): ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8,13 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H), 7,60 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H), 7,31-7,18 (m, 5H), 4,75 (t, $J = 5,2$ Hz, 1H), 4,52-4,45 (m, 2H), 4,40-4,36 (m, 1H), 4,34-4,26 (m, 2H), 4,11-3,87 (m, 8H), 3,80-3,78 (m, 1H), 3,44-3,43 (m, 1H). LC-MS (ESI) m/z : tính cho $\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_6\text{S}$: 457,13; theo thử nghiệm: 458,0 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

*Bước 5. (S)-1-(5-[2H,3H-[1,4]dioxino[2,3-*b*]pyridin-7-sulfonyl]-1H,2H,3H,4H,5H,6H-pyrrolo[3,4-*c*]pyrrol-2-yl)-3-hydroxy-2-phenylpropan-1-on (1)*

Theo cách khác, hợp chất 1 có thể được tổng hợp sử dụng quy trình được mô tả trong bản mô tả này là bước 5. Dung dịch 7-((3,4,5,6-tetrahydropyrrolo[3,4-*c*]pyrrol-2(1H)-yl)sulfonyl)-2,3-dihydro-[1,4]dioxino[2,3-*b*]pyridin (130,9 mg, 0,423 mmol) trong DMF (2,5 ml) được giảm nhiệt độ trên bề mặt nước đá, sau đó được xử lý bằng axit (S)-3-hydroxy-2-phenylpropanoic (84,8 mg, 0,510 mmol), HATU (195,5 mg, 0,514 mmol), và DIEA (0,30 mL, 1,718 mmol) và được khuấy ở nhiệt độ môi trường qua đêm. Dung dịch được pha loãng bằng EtOAc (20 mL), được rửa liên tục bằng nước (20 mL) và nước muối (2x20 mL), làm khô (MgSO_4), lọc, xử lý bằng silicagel, và được làm bay hơi trong áp suất giảm. Nguyên liệu được sắc ký bằng Biotage MPLC (cột 10 g silica gel, 0 đến 5% MeOH trong DCM) để tạo ra chất rắn màu trắng, hơi dính. Mẫu được hấp thụ trên silicagel và được sắc ký (cột 10 g silicagel, 0 đến 100% EtOAc trong hexan) để cung cấp (2S)-1-(5-[2H,3H-[1,4]dioxino[2,3-*b*]pyridin-7-sulfonyl]-1H,2H,3H,4H,5H, 6H-pyrrolo[3,4-*c*]pyrrol-2-yl)-3-hydroxy-2-phenylpropan-1-on (106,5 mg, 0,233 mmol, hiệu suất 55%) ở dạng chất rắn màu trắng.

Ví dụ 2: Thử nghiệm hóa sinh để xác định hoạt tính hoạt hóa PKR

Hợp chất hoạt hóa PKR có thể được xác định bằng thử nghiệm phát quang sinh hóa của ví dụ 2. Hoạt động kích hoạt PKR của một loạt hợp chất hóa học được đánh giá bằng cách sử dụng thử nghiệm phát quang bên dưới, bao gồm các hợp chất được chỉ định là hợp chất 1, hợp chất 2 và các hợp chất 6, 7 và 8 bên dưới các hợp chất được liệt kê trong Fig. 1.

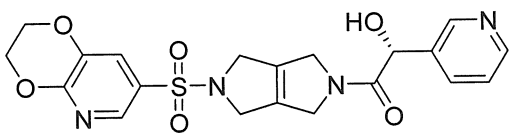
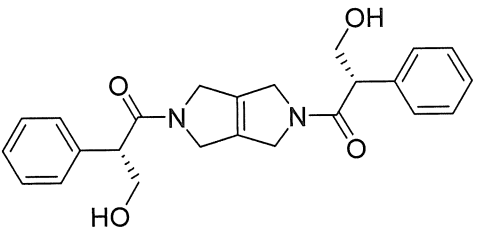
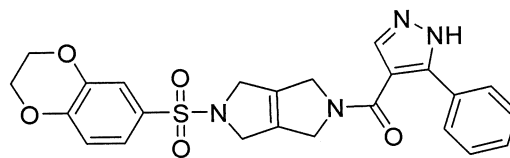
Đối với mỗi hợp chất được thử nghiệm, khả năng hoạt hóa PKR được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm phát quang sau đây. Hiệu quả của quá trình phosphoryl hóa adenosin-5'-diphosphat (ADP) bằng PKR được xác định bởi Kinase Glo Plus Assay (Promega) khi có hoặc không có FBP (D-fructoza-1,6-diphosphat; BOC Sciences, CAS: 81028-91-3) như sau. Trừ khi có chỉ định khác, tất cả thuốc thử đều được mua từ Sigma-Aldrich. Tất cả các thuốc thử được chuẩn bị trong dung dịch đệm chứa 50 mM Tris-HCl, 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂ và 0,01% Triton X100, 0,03% BSA, và 1 mM DTT. Enzym và PEP (phosphoenolpyruvat) được thêm ở mức 2x vào tất cả các giếng của đĩa sẵn sàng xét nghiệm có chứa các dung dịch pha loãng nối tiếp của các hợp chất thử nghiệm hoặc phương tiện DMSO. Nồng độ enzym cuối cùng đối với PKR (wt), PKR (R510Q) và PKR (G332S) lần lượt là 0,8 nM, 0,8 nM và 10 nM. Nồng độ PEP cuối cùng là 100 μ M. Hỗn hợp Enzym/PEP được ủ với các hợp chất trong 30 phút ở RT trước khi bắt đầu thử nghiệm với việc bổ sung 2x ADP và KinaseGloPlus. Nồng độ cuối cùng của ADP là 100 μ M. Nồng độ cuối cùng của KinaseGloPlus là 12,5%. Đối với các thử nghiệm có chứa FBP, thuốc thử đó được thêm vào ở 30 μ M khi bắt đầu phản ứng. Các phản ứng được phép tiến triển trong 45 phút ở RT cho đến khi sự phát quang được ghi lại bởi BMG PHERAstar FS Multilabel Reader. Hợp chất này được thử nghiệm ba lần ở nồng độ từ 42,5 μ M đến 2,2 nM trong 0,83% DMSO. Các phép đo AC₅₀ thu được bằng thuật toán phù hợp bốn tham số tiêu chuẩn của ActivityBase XE Runner (tối đa, tối thiểu, độ dốc và AC₅₀). Giá trị AC₅₀ cho hợp chất là nồng độ (μ M) tại đó hoạt độ dọc theo đường cong logistic bốn tham số phù hợp với nửa chừng giữa tối thiểu và tối đa hoạt tính.

Như được trình bày trong Bảng 2 và 3 dưới đây và trong Fig. 1, các giá trị AC₅₀ được xác định như sau: $\leq 0,1 \mu\text{M}$ (+++); $> 0,1 \mu\text{M}$ và $\leq 1,0 \mu\text{M}$ (++) ; $> 1,0 \mu\text{M}$ và $\leq 40 \mu\text{M}$ (+); $> 40 \mu\text{M}$ (0).

Bảng 2. Dữ liệu thử nghiệm ánh sáng

Hợp chất	AC ₅₀ (PKRG332S)	AC ₅₀ (PKRR510Q)	AC ₅₀ (WT)
1	++	+++	+++
2	+	+	+

Bảng 3. Dữ liệu thử nghiệm ánh sáng bổ sung

Hợp chất	Cấu trúc	AC ₅₀ (PKRG332S)	AC ₅₀ (PKRR510Q)
6		++	+
7		0	0
8		0	0

Hợp chất và chế phẩm được mô tả trong bản mô tả này là hoạt chất của PKR kiểu dại và một số đột biến PKR nhất định có hoạt tính thấp hơn so với kiểu dại. Các đột biến như vậy trong PKR có thể ảnh hưởng đến hoạt động của enzym (hiệu suất xúc tác), đặc tính điều hòa và/hoặc khả năng điều nhiệt của enzym. Một ví dụ về đột biến PKR là G332S. Một ví dụ khác về đột biến PKR là R510Q.

Ví dụ 3: Thử nghiệm enzym của hợp chất hoạt hóa PKR

Hiệu quả của hợp chất 1 2 μ M trên vận tốc tối đa ($V_{\max}$) và PEP K_m (hằng số Michaelis-Menten, tức là nồng độ PEP tại đó $v = \frac{1}{2}V_{\max}$) được đánh giá cho wt-PKR và PKR-R510Q. Các thử nghiệm được tiến hành khi có và không có fructoza-1,6-

bisphosphat (FBP), hoạt chất dị ứng đã biết của PKR. Đánh giá được thực hiện lên đến 60 phút tại RT, và $V_{\max}$ và PEP K_m đã được tính toán. Ảnh hưởng của hợp chất 1 lên $V_{\max}$ thay đổi từ không ảnh hưởng đến tăng nhẹ (xem Fig. 5 để biết đường cong đại diện). Hợp chất 1 liên tục làm giảm K_m PEP, thường là ~2 lần, đối với wt-PKR và PKR-R510Q khi có hoặc không có FBP (bảng 4), chứng tỏ rằng hợp chất 1 có thể nâng cao tốc độ PKR ở nồng độ sinh lý của PEP.

Bảng 4. Hiệu quả của hợp chất 1 lên thông số động học enzym PKR

Enzym	Thông số động học ^a	Không FBP		30 μ M FBP	
		DMSO	2 μ M Hợp chất 1	DMSO	2 μ M Hợp chất 1
WT-PKR	$V_{\max}$	1,00	1,14	1,19	1,16
	PEP K_m	4,84	2,44	1,98	1,00
PKR R510Q	$V_{\max}$	1,54	1,56	1,00	1,29
	PEP K_m	6,20	1,70	2,01	1,00

^aTất cả các giá trị ở bảng 4 được chuẩn hóa thành 1,00, so với các giá trị khác trong cùng một hàng.

Hoạt hóa wt-PKR và PKR-R510Q bằng các nồng độ khác nhau của hợp chất 1 được đánh giá về nồng độ PEP ở hoặc dưới K_m . Hợp chất 1 làm tăng tốc độ hình thành ATP, với giá trị AC_{50} nằm trong khoảng từ <0,05 đến <0,10 μ M và phạm vi hoạt hóa lần tối đa <2,0 đến <3,0 (tức là, <200% đến <300%) (bảng 5). Dữ liệu đại diện từ PKR-R510Q cho thấy hiệu quả phụ thuộc vào nồng độ (Fig. 6).

Bảng 5. Hoạt hóa kiểu đại và đột biến PKR bằng hợp chất 1

PK Enzym	Hoạt hóa gấp tối đa	AC_{50} (μ M)
WT-PKR	<2,0	<0,05
PKR R510Q	<3,0	<0,10

Ví dụ 4: Thử nghiệm tế bào của hợp chất hoạt hóa PKR

Hoạt hóa wt-PKR bằng hợp chất 1 ở hồng cầu của người trưởng thành ex vivo được đánh giá trong RBC tinh khiết được mua từ Research Blood Components. Các tế bào được xử lý bằng hợp chất 1 trong 3 giờ trong môi trường chứa glucoza được rửa sạch, ly giải và xét nghiệm bằng cách sử dụng Biovision Pyruvate Kinase Assay (K709-100). Thử nghiệm được lặp lại nhiều lần để tính đến sự khác biệt giữa người cho và người cho và phạm vi động tương đối hẹp. Mức tăng hoạt hóa tối đa trung bình (Max-Min) là <100% và nồng độ hiệu quả trung bình 50% (EC₅₀) là <125 nM (bảng 6). wt-PKR được hoạt hóa theo cách phụ thuộc vào nồng độ (Fig. 7).

Bảng 6. Hoạt hóa PKR kiểu đại ở hồng cầu của người được xử lý bằng hợp chất

1

Nhân rộng	Tối đa - Tối thiểu (%)	EC ₅₀ (nM)
1	<125	<250
2	<150	<150
3	<100	<50
4	<50	<50
Trung bình	<100	<125

RBC của chuột được phân lập tươi từ toàn bộ máu sử dụng gradient Ficoll và được thử nghiệm bằng phương pháp tương tự với phương pháp được sử dụng ở thử nghiệm RBC của người. Mức tăng hoạt hóa tối đa và các giá trị EC₅₀ có thể so sánh với các hiệu ứng trong RBC của người (bảng 7).

Bảng 7. Hiệu quả của hợp chất 1 lên hoạt hóa PKR ở hồng cầu của chuột

Nhân rộng	Tối đa - Tối thiểu (%)	EC ₅₀ (nM)
1	<50	<125
2	<100	<125
Trung bình	<100	<125

Ví dụ 5: Dược ex vivo của hợp chất hoạt hóa PKR

Hồng cầu từ bệnh nhân SCD được sử dụng để đánh giá ảnh hưởng của hợp chất 1 lên ái lực của Hgb với oxy (tức là ái lực với oxy) và liềm trong điều kiện thiếu oxy. Các tế bào được ủ ở 37 °C trong 1, 2 và 3 giờ với dung dịch muối đệm HEPES (HBS) (chưa xử lý), HBS + dimetyl sulfoxit (DMSO) (vật truyền), hoặc hợp chất 1 10 μ M. Để đánh giá sự phân ly oxy, đường cong cân bằng Hgb oxy được thu thập trong quá trình khử oxy.

Độ bão hòa hemoglobin được chuyển sang trái trong các tế bào được xử lý bằng hợp chất 1 và không phải trong các tế bào không được xử lý hoặc được xử lý DMSO 0,5% (Fig. 8A và Fig. 8B). Ái lực oxy tăng lên tương ứng với sự thay đổi đáng kể (nhưng có giới hạn) trong P50 từ 29 đến 25 mmHg sau 1 giờ được duy trì cho đến ít nhất 3 giờ, thời điểm cuối cùng được đánh giá (bảng 8). Đáng chú ý, ái lực oxy trong 2 giờ đầu tiên của quá trình ủ không bị ảnh hưởng bởi DMSO.

Bảng 8. Hiệu quả của hợp chất 1 về độ bão hòa hemoglobin^a

Thời gian ủ (giờ)	Độ bão hòa hemoglobin		
	Chưa được xử lý ^a	DMSO (0,5%)	Hợp chất 1 (10 μ M)
1	1,18	1,18	1,05
2		1,18	1,00
3		1,30	1,02

^aTất cả các giá trị ở bảng 8 được chuẩn hóa thành 1,00, so với các giá trị khác. ^b Các tế bào chưa được xử lý được rửa RBC ở 40% hematocrit trong môi trường mà không cần ủ.

Ở mỗi PO₂, sự thay đổi trung bình ở độ bão hòa Hgb trong các tế bào được xử lý bằng hợp chất 1 rõ ràng nhất là khoảng 25 mmHg, so với PO₂ bình thường là 26,7 mmHg (Fig. 9). Do đó, sự thay đổi ái lực oxy xảy ra khi căng thẳng oxy có liên quan đến hiện tượng tạo lưới liềm. Ở 2 giờ, độ bão hòa Hgb cao hơn khoảng 10% so với các tế bào được xử lý DMSO. Có sự khác biệt rõ ràng giữa các tế bào được điều trị bằng hợp chất 1 và tế bào được điều trị bằng DMSO ở PO₂ thấp hơn (khoảng 10 mmHg ở nồng độ oxy 1% đến 2%) ngay cả sau 1 giờ.

Hợp chất 1 (10 μM) giảm tạo hình lưới liên tế bào trong điều kiện thiếu oxy nặng là 2% oxy ($\text{PO}_2 < 20 \text{ mmHg}$) trong lên đến 20 min (bảng 9). Phần trăm bảo vệ (tức là, mức độ hoạt hóa trong các tế bào được xử lý, được bình thường hóa thành mức độ hoạt hóa trong các tế bào không được điều trị sau khi tiếp xúc với điều kiện thiếu oxy nghiêm trọng) đạt tối đa 16% ở 15 phút trong điều kiện thiếu oxy (Fig. 10) và duy trì ở mức 15 % vào thời điểm cuối cùng được đo.

Bảng 9. Hiệu quả của hợp chất 1 lên việc tạo hình lưới liên của tế bào SCD của người ở điều kiện thiếu oxy

Thời gian trong điều kiện thiếu oxy (min)	% thực tế bảo hình lưới liên		% Bảo vệ
	DMSO (0,5%)	Hợp chất 1 (10 μM)	
0	7	10	
2	41	47	-15
5	57	49	14
10	61	54	11
15	68	57	16
20	71	60	15

Ví dụ 6: Nghiên cứu dược động học/dược lực học của hợp chất 1 ở chuột kiểu đại

Hai nghiên cứu dược động học (PK)/dược lực học (PD) được thực hiện trên chuột Balb/c được sử dụng hợp chất 1 một lần mỗi ngày bằng đường uống (được bào chế trong 10% Cremophor EL/10% PG/80% nước DI) cho 7 ngày (QD $\times$ 7) ở liều 0 (vật truyền), 3,75, 7,5, 15, 30, 60 mg/kg (nghiên cứu 1); 0 (vật truyền), 7,5, 15, 30, 60, 120 hoặc 240 mg/kg (nghiên cứu 2). Vào ngày thứ 7, máu toàn phần được thu thập 24 giờ sau khi dùng thuốc và đông lạnh nhanh. Các mẫu sau đó được rã đông và phân tích bằng LC/MS để tìm mức 2,3-DPG và ATP. Trong cả hai nghiên cứu, hợp chất 1 được dung nạp tốt.

Không có dấu hiệu lâm sàng bất lợi nào được quan sát và không có sự khác biệt về sự thay đổi trọng lượng cơ thể so với nhóm vật truyền.

Mức 2,3-DPG giảm khi xử lý hợp chất 1 (Fig. 11A và Fig. 11B (nghiên cứu 1 và 2) và Fig. 12 (nghiên cứu 2)). Nói chung, mức giảm $> 20\%$ ở ≥ 15 mg/kg hợp chất 1 và $> 30\%$ đối với 120 và 240 mg/kg hợp chất 1. Cùng với đó, kết quả từ liều cao nhất cung cấp bằng chứng in vivo rằng 2,3-DPG giảm với hoạt hóa PKR.

Đánh giá mức ATP trong các nghiên cứu này cho thấy rằng điều trị bằng hợp chất 1 làm tăng mức ATP. Trong nghiên cứu 1, ATP tăng 21% và 79% tương ứng với 30 và 60 mg/kg hợp chất 1 so với vật truyền, và trong nghiên cứu 2, mức ATP tăng khi tiếp xúc với liều lượng lên đến 120 mg/kg hợp chất 1 với mức tối đa tăng $\sim 110\%$ so với vật truyền (Fig. 13A và Fig. 13B). Ở liều cao nhất, 240 mg/kg hợp chất 1, mức ATP tăng 45%. Mức độ ATP tương quan với phơi nhiễm hợp chất 1 theo cách tương tự trong cả hai nghiên cứu.

Ví dụ 7: Kiểm tra hợp chất hoạt hóa PKR ở mẫu chuột Berkeley SS

Việc xóa gen được nhắm mục tiêu và gen chuyển của người trong mô hình chuột Berkeley SS dẫn đến các con chuột hầu như chỉ biểu hiện HgbS ở người (Pásztty C. Transgenic and gene knock-out mouse models of sickle cell anemia and the thalassemias. Curr Opin Hematol. 1997 Mar;4(2):88-93) và bắt chước các đặc điểm di truyền, huyết học và mô bệnh học của SCD ở người. Chúng bao gồm RBC hình lưỡi liềm không thể phục hồi, thiếu máu và bệnh lý đa cơ quan.

Hiệu quả của hợp chất 1 lên ái lực Hgb cho oxy, tỷ lệ phần trăm tế bào hình lưỡi liềm và/hoặc Hgb được đánh giá ở chuột Berkley SS. Hai nghiên cứu đã được thực hiện khi các con chuột nhận được 0 hoặc 1000 ppm hợp chất 1 tùy thích trong bình thường của chuột trong 7 ngày. Máu được lấy vào ngày thứ 7 và phân tích trong điều kiện thiếu oxy. Các thông số hồng cầu được đo bằng ADVIA.

Các phát hiện tương đối nhất quán giữa hai nghiên cứu. Ái lực của oxy với Hgb trong điều kiện thiếu oxy được tăng lên và P50 giảm (Fig. 14A, Fig. 14B, Fig. 15A và Fig. 15B). Tác động tích cực đối với việc tạo hình lưỡi liềm đã được quan sát thấy rằng tỷ lệ phần trăm RBC hình lưỡi liềm ở áp suất oxy thấp đã giảm (Fig. 16) và thời gian tạo hình lưỡi liềm tăng lên khi điều trị bằng hợp chất 1. Hơn nữa, Hgb đã tăng ≈ 1 g/dL. Cùng với nhau, các thay đổi này ủng hộ giả thuyết rằng hợp chất 1 sẽ làm giảm sự tạo

hình lưới liềm của tế bào và tác động tích cực đến các biến chứng lâm sàng của RBC hình lưới liềm. Hợp chất 1 cũng làm giảm mức độ hồng cầu lưới ở các con chuột được điều trị (Fig. 17), biểu hiện của việc giảm ly giải hồng cầu.

Ví dụ 8: Nghiên cứu SAD/MAD để đánh giá độ an toàn, dược động học và dược lực học của hợp chất 1 ở người tình nguyện khỏe mạnh và bệnh nhân bệnh tế bào hình lưới liềm

Hợp chất 1 sẽ được đánh giá trong nghiên cứu ngẫu nhiên, có đối chứng với giả dược, mù đôi, tăng dần một lần và nhiều liều tăng dần để đánh giá tính an toàn, dược động học và dược lực học của hợp chất 1 ở người tình nguyện khỏe mạnh và bệnh nhân mắc bệnh tế bào hình lưới liềm. Việc sử dụng hợp chất 1 được bộc lộ ở đây để điều trị bệnh tế bào hình lưới liềm ở người.

Hợp chất 1 là chất chủ vận phân tử nhỏ dùng qua đường miệng của isozym hồng cầu pyruvat kinaza (PKR) đang được phát triển để điều trị bệnh thiếu máu huyết tán. Nghiên cứu thử nghiệm lâm sàng trên người này sẽ đặc trưng cho tính an toàn, khả năng dung nạp và dược động học/dược lực học (PK/PD) của một liều tăng dần và nhiều liều tăng dần của hợp chất 1 trong bối cảnh nghiên cứu pha 1 ở người tình nguyện khỏe mạnh và bệnh nhân bệnh hồng cầu hình liềm. ảnh hưởng của thực phẩm đối với sự hấp thụ của hợp chất 1 cũng sẽ được đánh giá, ở người tình nguyện khỏe mạnh.

Các mục tiêu của nghiên cứu bao gồm như sau:

1. Để đánh giá tính an toàn và khả năng dung nạp của một liều tăng dần và nhiều liều tăng dần của hợp chất 1 ở người tình nguyện khỏe mạnh và bệnh nhân bệnh tế bào hình lưới liềm (SCD).
2. Để mô tả dược động học (PK) của hợp chất 1.
3. Để đánh giá mức độ 2,3-diphosphoglyxerat (DPG) và adenosin triphosphat (ATP) trong các tế bào hồng cầu (RBC) của người tình nguyện khỏe mạnh và bệnh nhân SCD sau khi dùng một lần và nhiều liều hợp chất 1.
4. Để đánh giá mối quan hệ giữa nồng độ hợp chất 1 trong huyết tương và các tác động tiềm tàng trên khoảng QT ở người tình nguyện khỏe mạnh.

5. Để đánh giá ảnh hưởng của các liều tăng dần của hợp chất 1 lên các thông số điện tâm đồ (ECG) khác (nhịp tim, khoảng PR và QRS và hình thái sóng T) ở người tình nguyện khỏe mạnh.

6. Để khám phá tác dụng thức ăn trên PK của hợp chất 1 ở người tình nguyện khỏe mạnh.

7. Để khám phá mối liên quan của các biến số phản ứng và phơi nhiễm của hợp chất 1 (như an toàn, dược lực học (PD), các thông số huyết học nếu thích hợp).

8. Để khám phá tác dụng của hợp chất 1 sau liều đơn và nhiều liều trên chức năng RBC.

9. Để khám phá tác động của hợp chất 1 sau khi dùng nhiều liều ở bệnh nhân SCD đối với chuyển hóa RBC, viêm và đông máu.

Đây là nghiên cứu lần đầu ở người (FIH), pha 1 của hợp chất 1 sẽ đặc trưng cho tính an toàn, PK và PD của hợp chất 1 sau một liều duy nhất và sau khi dùng liều lặp lại đầu tiên ở người tình nguyện trưởng thành khỏe mạnh và sau đó ở thanh thiếu niên hoặc người lớn mắc bệnh tế bào hình lưỡi liềm. Nhóm nghiên cứu và các biện pháp can thiệp được chỉ định sử dụng trong nghiên cứu được tóm tắt trong bảng 10. Ban đầu, phạm vi liều của hợp chất 1 trong nhóm leo thang theo liều tăng dần (SAD) sẽ được khám phá ở đối tượng khỏe mạnh. Việc ghi danh các đối tượng khỏe mạnh vào nhóm leo thang liều tăng dần (MAD) trong 2 tuần sẽ được bắt đầu khi tính an toàn và PK từ ít nhất hai nhóm SAD có sẵn để thông báo về liều lượng cho phần MAD kéo dài 2 tuần của nghiên cứu. Các nhóm MAD sau đó sẽ chạy song song với các nhóm liều đơn. Một nhóm liều duy nhất được lên kế hoạch để hiểu ảnh hưởng của thực phẩm (FE) đối với PK của hợp chất 1. Sau khi nghiên cứu SAD và FE ở các đối tượng khỏe mạnh được hoàn thành, độ an toàn, PK và PD của một liều duy nhất của hợp chất 1 đã được phát hiện là an toàn ở những đối tượng khỏe mạnh sau đó sẽ được đánh giá ở đối tượng mắc bệnh tế bào hình lưỡi liềm (SCD). Sau đó, nghiên cứu nhiều liều ở các đối tượng SCD sẽ được bắt đầu sau khi hoàn thành nghiên cứu MAD ở người tình nguyện khỏe mạnh. Hợp chất 1 sẽ được sử dụng dưới dạng viên nén 25 mg và 100 mg được phân phối dùng qua đường miệng.

Bảng 10.

Nhóm	Các can thiệp được chỉ định
<i>Thử nghiệm: Nhóm liều tăng dần ở đối tượng khỏe mạnh</i> Nhóm đối tượng tình nguyện khỏe mạnh được chọn ngẫu nhiên 6: 2 nhận một liều duy nhất của hợp chất 1 hoặc giả dược. Nhóm đầu tiên sẽ nhận được 200 mg hợp chất 1 hoặc giả dược. Tăng liều sẽ xảy ra nếu hợp chất 1 hoặc giả dược được dung nạp. Liều tối đa của hợp chất 1 hoặc giả dược sẽ là 1500 mg. Liều dự kiến cho các nhóm SAD được liệt kê trong bảng 11.	<i>Thuốc: Hợp chất 1/Giả dược</i> Đối tượng tình nguyện khỏe mạnh sẽ nhận hợp chất 1/giả dược và được theo dõi các tác dụng phụ khi đang nghiên cứu dược động học và được lực học
<i>Thử nghiệm: Nhiều nhóm liều tăng dần ở đối tượng khỏe mạnh</i> Nhóm đối tượng tình nguyện khỏe mạnh được chọn ngẫu nhiên 9: 3 để nhận hợp chất 1 hoặc giả dược trong 14 ngày dùng thuốc liên tục. Nhóm đầu tiên sẽ nhận được 100 mg hợp chất 1 hoặc giả dược mỗi ngày X 14 ngày. Ngoài ra, nhóm đầu tiên sẽ nhận được 200 mg (ví dụ: 100 mg BID hoặc 200 mg QD) của hợp chất 1 hoặc giả dược mỗi ngày X 14 ngày. Liều tối đa của hợp chất 1/giả dược sẽ là 600 mg hợp chất 1/giả dược mỗi ngày trong 14 ngày. Liều lượng dự kiến cho các nhóm MAD được liệt kê trong bảng 12.	<i>Thuốc: Hợp chất 1/Giả dược</i> Đối tượng tình nguyện khỏe mạnh sẽ nhận hợp chất 1/giả dược và được theo dõi các tác dụng phụ khi đang nghiên cứu dược động học và được lực học
<i>Thử nghiệm: Nhóm về tác dụng thực phẩm ở đối tượng khỏe mạnh</i> Nhóm đối tượng tình nguyện khỏe mạnh gồm 10 đối tượng sẽ nhận được một liều hợp chất 1 duy nhất cùng với thức ăn và không có thức ăn. Liều lượng sẽ được thực hiện theo liều lượng xác định theo giao thức. Nhóm đối tượng người tình nguyện khỏe mạnh gồm 10 đối tượng sẽ nhận được một liều hợp chất 1 duy nhất cùng với thức ăn và không có thức ăn. Liều lượng sẽ là 500 mg hợp chất 1, nhưng có thể thay đổi dựa trên profin được	<i>Thuốc: Hợp chất 1</i> Đối tượng khỏe mạnh sẽ nhận được Hợp chất 1 có hoặc không có thức ăn và trải qua các nghiên cứu dược động học

Nhóm	Các can thiệp được chỉ định
động học của hợp chất 1 được quan sát trong nhóm SAD ban đầu và profin an toàn của hợp chất 1 được quan sát ở nhóm SAD và MAD trước đó.	
<i>Thử nghiệm: Nhóm liều tăng dần ở đối tượng SCD</i> Nhóm đối tượng bệnh tế bào hình lưỡi liềm ngẫu nhiên 6:2 nhận một liều duy nhất của hợp chất 1 hoặc giả dược. Liều hợp chất 1/giả dược được sử dụng sẽ là liều được cho là an toàn ở những đối tượng khỏe mạnh. Liều của hợp chất 1/giả dược được sử dụng cũng sẽ là liều được phát hiện là có hoạt tính được lực học (ví dụ: dẫn đến giảm 2,3-DPG) ở đối tượng khỏe mạnh.	<i>Thuốc: Hợp chất 1/Giả dược</i> Đối tượng SCD sẽ nhận hợp chất 1/giả dược và được theo dõi các tác dụng phụ khi đang nghiên cứu được động học và được lực học
<i>Thử nghiệm: Nhiều nhóm liều tăng dần ở đối tượng SCD</i> Nhóm đối tượng bệnh tế bào hình lưỡi liềm ngẫu nhiên 9: 3 để nhận hợp chất 1 hoặc giả dược trong 14 ngày dùng thuốc liên tục. Liều của hợp chất 1/giả dược được sử dụng sẽ là liều thấp hơn liều tối đa có thể dung nạp được đánh giá ở người tình nguyện khỏe mạnh MAD. Liều của hợp chất 1/giả dược cũng sẽ là liều được phát hiện là có hoạt tính được lực học (ví dụ: dẫn đến giảm RBC 2,3-DPG và tăng RBC ATP) ở người tình nguyện khỏe mạnh MAD.	<i>Thuốc: Hợp chất 1/Giả dược</i> Đối tượng SCD sẽ nhận hợp chất 1/giả dược và được theo dõi các tác dụng phụ khi đang nghiên cứu được động học và được lực học

Bảng 11.

Mức liều/Nhóm	Liều lượng	Độ mạnh viên nén (#/ngày)
SAD 1	200 mg	100 mg (2/ngày)
SAD 2	400 mg	100 mg (4/ngày)
SAD 3	700 mg	100 mg (7/ngày)

SAD 4	1100 mg	100 mg (11/ngày)
SAD 5	1500 mg	100 mg (15/ngày)

Bảng 12.

Mức liều/Nhóm	Liều lượng	Độ mạnh viên nén (#/ngày)
MAD 1	100 mg	100 mg (1/ngày) hoặc 25 mg (4/ngày)
MAD 2	200 mg	100 mg (2/ngày)
MAD 3	400 mg	100 mg (4/ngày)
MAD 4	600 mg	100 mg (6/ngày)

Các biện pháp kết quả

Các biện pháp kết quả chính:

1. Tỷ lệ mắc, tần suất và mức độ nghiêm trọng của các tác dụng ngoại ý (AE) trên mỗi CTCAE v5.0 của một liều tăng dần duy nhất và nhiều liều tăng dần của hợp chất 1 ở người lớn khỏe mạnh tình nguyện và bệnh nhân SCD.

[Khung thời gian: Lên đến 3 tuần theo dõi]

2. Nồng độ tối đa quan sát được trong huyết tương (C_{max})

[Khung thời gian: Lên đến 3 tuần kiểm tra]

3. Thời gian đến nồng độ tối đa trong huyết tương quan sát được (T_{max})

[Khung thời gian: Lên đến 3 tuần kiểm tra]

4. Diện tích dưới đường cong nồng độ-thời gian trong huyết tương từ thời điểm 0 cho đến mốc thời gian 24 giờ (AUC₀₋₂₄)

[Khung thời gian: Lên đến 3 tuần kiểm tra]

5. Diện tích dưới đường cong nồng độ-thời gian trong huyết tương từ thời điểm 0 cho đến thời điểm cuối cùng có thể định lượng được (AUC_{0-last})

[Khung thời gian: Lên đến 3 tuần kiểm tra]

6. Diện tích dưới đường cong nồng độ-thời gian trong huyết tương từ thời gian không đến vô cùng (AUC_{0-inf})

[Khung thời gian: Lên đến 3 tuần kiểm tra]

7. Chu kỳ bán hủy đầu cuối ($t_{1/2}$)

[Khung thời gian: Lên đến 3 tuần kiểm tra]

8. Độ thanh thải rõ ràng (CL/F)

[Khung thời gian: Lên đến 3 tuần kiểm tra]

9. Khối lượng phân phối rõ ràng (Vd/F)

[Khung thời gian: Lên đến 3 tuần kiểm tra]

10. Cố định tỷ lệ xử lý đầu cuối (Lz)

[Khung thời gian: Lên đến 3 tuần kiểm tra]

11. Thanh thải thận (CIR)

[Khung thời gian: Lên đến 3 tuần kiểm tra]

Các biện pháp kết quả thứ cấp:

12. Thay đổi mức cơ bản của 2,3-diphosphoglyxerat (DPG) và adenosin triphosphat (ATP) trong các tế bào hồng cầu (RBC) của người tình nguyện khỏe mạnh và bệnh nhân SCD sau khi dùng liều đơn và nhiều liều hợp chất 1.

[Khung thời gian: Lên đến 3 tuần kiểm tra]

13. Ước tính dựa trên mô hình về sự thay đổi so với khoảng QT cơ bản được hiệu chỉnh bằng cách sử dụng công thức hiệu chỉnh của Fridericia (QTcF) và khoảng tin cậy 90% ở C_{max} ước tính sau một liều duy nhất của hợp chất 1 ở người tình nguyện khỏe mạnh.

[Khung thời gian: lên đến 7 ngày]

14. Thay đổi so với nhịp tim ban đầu sau một liều duy nhất của hợp chất 1 ở người tình nguyện khỏe mạnh

[Khung thời gian: lên đến 7 ngày]

15. Thay đổi so với PR ban đầu sau một liều duy nhất của hợp chất 1 ở người tình nguyện khỏe mạnh

[Khung thời gian: lên đến 7 ngày]

16. Thay đổi so với QRS ban đầu sau một liều duy nhất của hợp chất 1 ở người tình nguyện khỏe mạnh

[Khung thời gian: lên đến 7 ngày]

17. Thay đổi so với hình thái sóng T ban đầu sau một liều duy nhất hợp chất 1 ở người tình nguyện khỏe mạnh

[Khung thời gian: lên đến 7 ngày]

Các biện pháp kết quả thăm dò:

18. Ảnh hưởng của thực phẩm lên C_{max} , AUC_{0-24}/AUC_{last}

19. Ảnh hưởng của AUC_{last}/AUC_{0-24} , C_{max} , nồng độ tối thiểu trong huyết tương (C_{min}), tỷ lệ đỉnh trên đáy, độ tuyến tính của liều, tỷ lệ tích lũy đến độ an toàn, PD và các thông số huyết học quan tâm, được đánh giá bằng phân tích phản ứng phối ngẫu nhiên

20. Ảnh hưởng của việc giảm 2,3-DPG trong RBC trên đường cong phân ly oxyhemoglobin (P_{50} ; áp suất riêng phần của O_2 tại đó 50% hemoglobin bão hòa với O_2) sau một liều duy nhất và sau khi dùng liều mãn tính hợp chất 1

21. Ảnh hưởng của việc dùng liều hợp chất 1 mãn tính đối với khả năng biến dạng của RBC bình thường và SCD bằng phép đo ektacytacy gradient thẩm thấu và phép đo ektacytacy gradient oxy

22. Ảnh hưởng của liều lượng hợp chất 1 mãn tính đối với đáp ứng của SCD RBC đối với stress oxy hóa ở bệnh nhân SCD (bao gồm đánh giá mức độ glutathion, glutathion peroxidaza và superoxit dismutaza)

23. Ảnh hưởng của liều lượng hợp chất 1 mãn tính lên các dấu hiệu viêm có thể đo được ở bệnh nhân SCD (protein phản ứng C, ferritin, interleukin [IL] -1 β , IL-6, IL-8, và yếu tố hoại tử khối u- α)

24. Ảnh hưởng của việc dùng liều hợp chất 1 mãn tính đối với các dấu hiệu có thể đo lường của tăng đông máu ở bệnh nhân SCD (phức hợp D-dime, prothrombin 1,2 và thrombin-antithrombin [TAT])

Đặc tính đủ điều kiện

- Độ tuổi tối thiểu: 18 tuổi (người tình nguyện khỏe mạnh); 12 tuổi (đối tượng SCD)

- Độ tuổi tối đa: 60 tuổi

- Giới tính: Tất cả

- Dựa trên giới tính: Không

- Chấp nhận người tình nguyện khỏe mạnh: Có

Tiêu chí lựa chọn:

- Người tình nguyện khỏe mạnh: đối tượng phải từ 18 đến 60 tuổi; SCD: đối tượng phải từ 12 đến 50 tuổi

- Đối tượng phải có khả năng hiểu và ký sự đồng ý bằng văn bản được thông báo, phải đạt được trước khi hoàn thành bất kỳ thủ tục nào liên quan đến nghiên cứu.

- Đối tượng nói chung phải có sức khỏe tốt, dựa trên kết quả lịch sử y tế, khám sức khỏe, các dấu hiệu quan trọng, hồ sơ phòng thí nghiệm và ECG 12 đạo trình.

- Đối tượng phải có chỉ số khối lượng cơ thể (BMI) nằm trong khoảng từ 18 kg/m² đến 33 kg/m² (bao gồm cả) và trọng lượng cơ thể tối thiểu là 50 kg (đối tượng người tình nguyện khỏe mạnh) hoặc 40 kg (đối tượng SCD)

- Đối với đối tượng SCD, bệnh tế bào hình lưỡi liềm trước đó được xác nhận bằng điện di huyết sắc tố hoặc kiểu gen chỉ ra một trong các kiểu gen hemoglobin sau: Hgb SS, bệnh thiếu máu vùng biến thể Hgb S β ⁺, bệnh thiếu máu vùng biến thể Hgb S β ⁰, hoặc Hgb SC

- Tất cả nam giới và nữ giới có tiềm năng sinh con phải đồng ý sử dụng chế độ tránh thai được chấp nhận về mặt y tế trong thời gian tham gia nghiên cứu và tối đa 90 ngày sau đó.

- Đối tượng phải sẵn sàng tuân theo tất cả các yêu cầu và hạn chế của nghiên cứu.

Tiêu chí loại trừ:

- Bằng chứng về tình trạng bệnh lý nghiêm trọng về mặt lâm sàng hoặc tình trạng khác có thể gây trở ngại đáng kể cho việc hấp thụ, phân phối, chuyển hóa hoặc bài tiết của thuốc nghiên cứu, hoặc đặt đối tượng vào nguy cơ không thể chấp nhận được với tư cách là người tham gia nghiên cứu này

- Lịch sử các bệnh tim nghiêm trọng về mặt lâm sàng bao gồm rối loạn tình trạng

- Các nghiên cứu về huyết học, chức năng thận và gan bất thường

- Lịch sử lạm dụng thuốc hoặc rượu

Kết quả (người tình nguyện khỏe mạnh)

Bốn nhóm SAD khỏe mạnh được đánh giá ở liều 200, 400, 700 và 1000 mg, và bốn nhóm MAD khỏe mạnh nhận được tổng liều hàng ngày từ 200 đến 600 mg trong 14 ngày ở liều QD hoặc BID (100 mg BID, 200 mg BID, 300 mg BID, và 400 mg QD). Trong nhóm về hiệu ứng thực phẩm (FE), 10 đối tượng khỏe mạnh nhận được 200 mg hợp chất 1 QD có và không có thức ăn.

Không có sự kiện bất lợi nghiêm trọng (SAE) hoặc AE nào dẫn đến việc rút thuốc được báo cáo trong nhóm SAD và MAD của người tình nguyện khỏe mạnh. Trong các đánh giá PK, hợp chất 1 được hấp thu nhanh chóng với T_{max} trung bình là 1 giờ sau khi uống. Tiếp xúc với liều đơn tăng nhiều hơn so với tỷ lệ với liều ở liều ≥ 700 mg. Trong phân phối nhiều liều BID hoặc QD, PK tuyến tính được quan sát thấy ở tất cả các mức liều (100-300 mg BID, 400 mg QD), và tiếp xúc duy trì ổn định cho đến ngày 14, không có tác dụng tích lũy. Phơi nhiễm hợp chất 1 trong điều kiện cho ăn/nhịn ăn cũng tương tự.

Hoạt tính PD đã được chứng minh ở tất cả các mức liều được đánh giá ở các đối tượng được điều trị bằng hợp chất 1 (bảng 13). Bảng 13 báo cáo sự thay đổi tỷ lệ phần trăm tối đa trung bình trong 2,3-DPG, ATP và P50 trên tất cả các liều và thời điểm trong nhóm thuần tập SAD và MAD. Như được trình bày trong bảng 13, sự giảm trung bình trong 2,3-DPG và P50, và sự gia tăng trung bình trong ATP, so với mức ban đầu, đã được quan sát thấy trong cả hai nhóm SAD và MAD. Trong vòng 24 giờ sau khi sử dụng một liều hợp chất 1 duy nhất, sự giảm 2,3-DPG với sự gia tăng tương ứng trong P50 đã được quan sát thấy. Sau 14 ngày sử dụng hợp chất 1, các hiệu ứng PD này được duy trì

cùng với sự gia tăng ATP so với ban đầu. Theo đó, mức giảm tối đa trung bình của nồng độ 2,3-DPG ít nhất là khoảng 40% ở bệnh nhân dùng hợp chất 1 trong nghiên cứu SAD và ít nhất khoảng 50% ở bệnh nhân dùng hợp chất 1 trong nghiên cứu MAD.

Bảng 13. Tóm tắt tỷ lệ phần trăm thay đổi tối đa trung bình trong các biện pháp PD chính từ đường cơ sở

Yếu tố đánh dấu PD	Số liệu thống kê	SAD		MAD	
		Giả dược (N = 8)	Hợp chất 1 (N = 24)	Giả dược (N = 12)	Hợp chất 1 (N = 36)
2,3-DPG	Trung bình (95% CI)	-19,5 (-25,0, -14,0)	-46,8 (-50,3, -43,2)	-17,0 (-22,9, -11,1)	-56,3 (-58,9, -53,7)
	Giá trị P		<0,0001		<0,0001
ATP	Trung bình (95% CI)	9,2 (0,5, 18,0)	24,4 (18,4, 30,3)	7,2 (-0,3, 14,7)	68,5 (63,6, 73,3)
	Giá trị P		0,0094		<0,0001
P ₅₀	Trung bình (95% CI)	0,9 (-1,2, 2,9)	-15,6 (-17,5, -13,8)	-0,8 (-3,0, 1,4)	-15,9 (-17,2, -14,5)
	Giá trị P		<0,0001		<0,0001

Trong nhóm SAD, mức 2,3-DPG trong máu của đối tượng được đo định kỳ sau khi dùng thuốc bằng phương pháp LC-MS/MS đủ tiêu chuẩn để định lượng 2,3-DPG trong máu. Nồng độ 2,3-DPG trong máu giảm được quan sát thấy trong 6 giờ sau khi dùng một liều hợp chất 1 ở tất cả các mức liều (các mốc thời gian trước đó không được thu thập). Mức giảm tối đa 2,3-DPG thường xảy ra ~24 giờ sau liều đầu tiên với mức giảm duy trì ~48-72 giờ sau khi dùng. Bảng 14 báo cáo tỷ lệ phần trăm thay đổi trung bình của nồng độ 2,3-DPG trong máu, so với ban đầu, được đo theo thời gian ở người tình nguyện khỏe mạnh sau một liều duy nhất của hợp chất 1 (200 mg, 400 mg, 700 mg hoặc 1000 mg) hoặc giả dược. Theo đó, mức giảm trung bình của nồng độ 2,3-DPG, so với mức ban đầu, ít nhất là khoảng 30% ở tất cả các mức liều được thử nghiệm 24 giờ sau khi dùng một liều duy nhất.

Bảng 14. Phần trăm thay đổi trung bình ở các mức 2,3-DPG

Thời gian sau khi dùng liều	Liều lượng				
	Giả dược	200 mg	400 mg	700 mg	1000 mg
0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
6	-7,8	-18	-23	-29	-20
8	-7,6	-17	-29	-28	-31
12	-4,0	-25	-40	-41	-44
16	-6,0	-33	-35	-46	-50
24	-2,0	-31	-39	-49	-48
36	-6,9	-33	-38	-46	-47
48	-15	-29	-31	-48	-47
72	-6,9	-18	-30	-33	-21

Fig. 18 là biểu đồ của mức 2,3-DPG trong máu được đo theo thời gian ở người tình nguyện khỏe mạnh mà nhận một liều hợp chất 1 (200 mg, 400 mg, 700 mg, hoặc 1000 mg) hoặc giả dược. Như thể hiện trong Fig. 18, người tình nguyện khỏe mạnh nhận hợp chất 1 đã giảm nồng độ 2,3-DPG trong máu, đối tượng tương đối nhận được giả dược. Fig. 19 là biểu đồ của nồng độ 2,3-DPG trong máu được đo trong 24 giờ sau khi dùng liều ở người tình nguyện khỏe mạnh nhận một liều hợp chất 1 (200 mg, 400 mg, 700 mg hoặc 1000 mg) hoặc giả dược. Như thể hiện trong Fig. 19, người tình nguyện khỏe mạnh được dùng hợp chất 1 đã giảm nồng độ 2,3-DPG trong máu ở 24 giờ sau khi dùng liều, so với đối tượng được dùng giả dược.

Trong nhóm SAD, P50 của đối tượng (PO_2 ở độ bão hòa hemoglobin 50%) được xác định sau khi dùng liều 24 giờ. P50 được đo trong 24 giờ sau khi giảm một liều duy nhất của hợp chất 1 ở tất cả các mức liều được thử nghiệm (mức giảm trung bình dao động từ ~3-5 mmHg). Bảng 15 báo cáo sự thay đổi tuyệt đối trung bình trong P50, so với ban đầu, được đo trong 24 giờ sau một liều duy nhất của hợp chất 1 (200 mg, 400 mg, 700 mg hoặc 1000 mg) hoặc giả dược ở người tình nguyện khỏe mạnh.

Bảng 15. Thay đổi tuyệt đối trung bình trong P50 (mmHg)

Liều lượng	Thay đổi tuyệt đối trung bình
Giả dược	0,20
200 mg	-2,91
400 mg	-3,41
700 mg	-4,85
1000 mg	-5,05

Fig. 20 là biểu đồ của giá trị P50 được đo 24 giờ sau khi dùng liều ở người tình nguyện khỏe mạnh mà nhận một liều hợp chất 1 (200 mg, 400 mg, 700 mg, hoặc 1000 mg) hoặc giả dược. Như được thể hiện trong Fig. 20, người tình nguyện khỏe mạnh nhận hợp chất 1 đã giảm P50 so với đối tượng nhận được giả dược. Fig. 21 là biểu đồ của các giá trị P50 được đo trước liều và 24 giờ sau liều ở người tình nguyện khỏe mạnh đã nhận một liều duy nhất của hợp chất 1 (200 mg, 400 mg, 700 mg hoặc 1000 mg) hoặc giả dược. Như thể hiện trong Fig. 21, người tình nguyện khỏe mạnh nhận hợp chất 1 đã giảm P50 so với ban đầu, trong khi đối tượng nhận được giả dược thì không.

Trong nhóm MAD, mức 2,3-DPG trong máu của đối tượng được đo định kỳ sau khi dùng thuốc bằng phương pháp LC-MS/MS đủ tiêu chuẩn để định lượng 2,3-DPG trong máu. Mức giảm tối đa 2,3-DPG vào ngày 14 là 55% so với ban đầu (trung bình). Mức 2,3-DPG đạt mức đáy và duy trì vào ngày 1 và chưa trở lại mức ban đầu 72 giờ sau liều cuối cùng vào ngày 14. Bảng 16 báo cáo phần trăm thay đổi trung bình của nồng độ 2,3-DPG trong máu, so với ban đầu, được đo theo thời gian sau liều đầu tiên vào ngày 1 và ngày 14 ở người tình nguyện khỏe mạnh nhận được liều hàng ngày của hợp chất 1 (100 mg BID, 200 mg BID hoặc 300 mg BID) hoặc giả dược trong 14 ngày. Theo đó, mức giảm trung bình của nồng độ 2,3-DPG, so với ban đầu, ít nhất là khoảng 25% ở tất cả các mức liều được thử nghiệm 24 giờ sau khi dùng liều đầu tiên vào ngày thứ nhất và ít nhất khoảng 40% ở tất cả các mức liều lượng được kiểm tra 24 giờ sau khi dùng liều đầu tiên vào ngày 14.

Bảng 16. Tỷ lệ phần trăm thay đổi trung bình ở các mức 2,3-DPG (ngày 1 và 14)

Thời gian sau liều hàng ngày đầu tiên	Liều lượng							
	100 mg BID		200 mg BID		300 mg BID		Giả dược	
	Ngày		Ngày		Ngày		Ngày	
	1	14	1	14	1	14	1	14
0	0,0	-42,0	0,0	-48,2	0,0	-59,4	0,0	-7,6
6	-16,1	-44,3	-13,1	-48,5	-18,8	-53,0	-2,9	-10,9
8	-12,1	-44,7	-22,3	-44,3	-23,8	-54,2	-0,6	-1,6
12	-18,1	-43,6	-23,1	-42,2	-31,6	-55,3	-7,1	-1,6
16	-18,4	-43,9	-33,9	-42,9	-40,7	-52,4	-6,7	-5,3
24	-27,8	-44,1	-43,5	-44,3	-50,8	-52,1	1,1	-10,7
48		-34,7		-38,7		-44,5		-1,0
72		-20,2		-20,2		-32,9		-7,0

Fig. 22 là biểu đồ của mức 2,3-DPG trong máu được đo theo thời gian ở người tình nguyện khỏe mạnh mà nhận liều hàng ngày của hợp chất 1 (100 mg BID, 200 mg BID, 300 mg BID, hoặc 400 mg QD) hoặc giả dược trong 14 ngày. Như thể hiện trong Fig. 22, người tình nguyện khỏe mạnh nhận hợp chất 1 đã giảm nồng độ 2,3-DPG trong máu, đối tượng tương đối nhận được giả dược. Fig. 23 là biểu đồ của nồng độ 2,3-DPG trong máu được đo vào ngày 14 ở người tình nguyện khỏe mạnh đã nhận được liều hàng ngày của hợp chất 1 (100 mg BID, 200 mg BID, 300 mg BID hoặc 400 mg QD) hoặc giả dược cho 14 ngày. Như thể hiện trong Fig. 23, người tình nguyện khỏe mạnh được dùng hợp chất 1 đã giảm mức 2,3-DPG trong máu, so với người được dùng giả dược.

Trong nhóm MAD, P50 của đối tượng (PO₂ ở độ bão hòa hemoglobin 50%) được xác định vào ngày thứ 14. Giá trị P50 đo được sau 14 ngày dùng hai lần mỗi ngày đã giảm ở tất cả các mức liều được thử nghiệm (mức giảm trung bình dao động từ ~3-5 mmHg). Bảng 17 báo cáo sự thay đổi tuyệt đối trung bình trong P50, so với ban đầu, được đo vào ngày 14 ở người tình nguyện khỏe mạnh đã nhận được liều hàng ngày của hợp chất 1 (100 mg BID, 200 mg BID hoặc 300 mg BID) hoặc giả dược trong 14 ngày.

Bảng 17. Thay đổi tuyệt đối trung bình ở P50 (mmHg) (Ngày 14)

Liều lượng	Thay đổi tuyệt đối trung bình
Giả dược	-0,38
100 mg BID	-3,26
200 mg BID	-4,14
300 mg BID	-5,34

Fig. 24 là biểu đồ của giá trị P50 được đo vào ngày 14 ở người tình nguyện khỏe mạnh mà nhận liều hàng ngày của hợp chất 1 (100 mg BID, 200 mg BID, 300 mg BID, hoặc 400 mg QD) hoặc giả dược trong 14 ngày. Như thể hiện trong Fig. 24, người tình nguyện khỏe mạnh nhận hợp chất 1 đã giảm P50 so với đối tượng nhận được giả dược. Fig. 25 là biểu đồ của các giá trị P50 được đo trước liều và vào ngày 14 ở người tình nguyện khỏe mạnh đã nhận được liều hàng ngày của hợp chất 1 (100 mg BID, 200 mg BID, 300 mg BID hoặc 400 mg QD) hoặc giả dược trong 14 ngày. Như thể hiện trong Fig. 25, người tình nguyện khỏe mạnh nhận hợp chất 1 đã giảm P50 so với ban đầu, trong khi đối tượng nhận được giả dược thì không.

Trong nhóm MAD, mức ATP trong máu của đối tượng được đo vào ngày 14 bằng phương pháp LC-MS/MS đủ tiêu chuẩn để định lượng ATP trong máu. Mức ATP đã tăng lên so với ban đầu vào ngày thứ 14 và vẫn tăng trong 60 giờ sau liều cuối cùng. Bảng 18 báo cáo tỷ lệ phần trăm thay đổi trung bình của nồng độ ATP trong máu, so với mức ban đầu, được đo theo thời gian sau liều đầu tiên vào ngày 14 ở người tình nguyện khỏe mạnh nhận được liều hàng ngày của hợp chất 1 (100 mg BID, hoặc 200 mg BID) hoặc giả dược trong 14 ngày.

Bảng 18. Phần trăm thay đổi trung bình trong các mức ATP (Ngày 14)

Thời gian sau liều hàng ngày đầu tiên	Liều lượng		
	100 mg BID	200 mg BID	Giả dược
0	41,5	55,3	-0,5
6	43,8	48,1	2,8

Thời gian sau liều hàng ngày đầu tiên	Liều lượng		
	100 mg BID	200 mg BID	Giả dược
8	47,8	58,4	-4,1
12	45,4	56,2	2,3
16	44,8	57,0	-6,8
24	55,0	64,0	2,9
48	52,2	58,9	4,7
72	49,2	54,0	2,2

Fig. 26 là biểu đồ của mức ATP trong máu được đo vào ngày 14 ở người tình nguyện khỏe mạnh mà nhận liều hàng ngày của hợp chất 1 (100 mg BID, 200 mg BID, 300 mg BID, hoặc 400 mg QD) hoặc giả dược trong 14 ngày. Như thể hiện trong Fig. 26, người tình nguyện khỏe mạnh được dùng hợp chất 1 đã có sự gia tăng nồng độ ATP trong máu, so với người được dùng giả dược.

Fig. 27 là biểu đồ thể hiện sự khác biệt về giá trị P50 được xác định trước liều và 24 giờ sau liều (nhóm SAD) và 24 giờ sau liều vào ngày 14 (nhóm MAD) ở người tình nguyện khỏe mạnh được dùng hợp chất 1 hoặc giả dược. Như thể hiện trong Fig. 27, người tình nguyện khỏe mạnh nhận hợp chất 1 đã trải qua sự thay đổi (giảm) P50 so với ban đầu, trong khi đối tượng nhận được giả dược thì không.

Fig. 28 là biểu đồ vẽ biểu đồ nồng độ trong máu của hợp chất 1 (ng/mL) đo được ở bệnh nhân tình nguyện khỏe mạnh (HV) trên trục thứ nhất (bên trái) và nồng độ 2,3-DPG (microgam/mL) đo được ở các bệnh nhân HV này trên trục thứ hai (bên phải) sau khi dùng một liều duy nhất của hợp chất 1 (400 mg). Các ký hiệu đặc thể hiện các trung bình hình học và sai số chuẩn của nồng độ hợp chất 1 trong huyết tương và 2,3 DPG quan sát được. Như được thể hiện trong hình, điều biến 2,3 DPG quan sát được không theo dõi trực tiếp được động học trong huyết tương (nồng độ trong máu của hợp chất 1) nơi mà được lực học tối đa (tức là mức tối thiểu của nồng độ 2,3-DPG, tại thời điểm ~24h) xảy ra gần 24h sau khi đạt cực đại được động học (tức là tối đa của đường cong PK, tại thời điểm ~1-2h). Đáp ứng được lực học quan sát được ở HV là lâu bền, với thời

gian bán hủy PD được tính toán là ~20h, trong đó sự suy giảm 2,3-DPG được quan sát thấy lâu sau khi không phát hiện được nồng độ thuốc trong huyết tương. Tổng hợp lại, điều này cho thấy rằng việc xác định liều có hoạt tính được lý không thể được thực hiện đầy đủ bằng cách sử dụng các thông số dược động học ($C_{max}/C_{min}/AUC$) một cách riêng biệt, mà hỗ trợ một cách tiếp cận bao gồm tích hợp mối quan hệ dược động học/dược lực học thời gian để cung cấp nền tảng bằng chứng rằng liều lượng QD có thể khả thi ở bệnh nhân bệnh tế bào hình lưỡi liềm.

Fig. 29 là biểu đồ phân tán của mức 2,3-DPG và giá trị P50 quan sát được ở người tình nguyện khỏe mạnh ở nhóm SAD và MAD. Ký hiệu đặc biểu diễn mức P50/2,3-DPG quan sát được ở người tình nguyện khỏe mạnh định lượng với hợp chất 1 lúc 24 giờ sau liều dùng cuối cùng. Dữ liệu ban đầu đại diện cho dữ liệu P50/2,3 DPB thu được trước khi điều trị hợp chất 1 và từ người tình nguyện khỏe mạnh được phân liều với giả dược. Mối quan hệ tương quan thuận giữa mức 2,3 DPG và p50 đã được quan sát thấy ở bệnh nhân dùng các liều khác nhau.

Ví dụ 9: Phân tích ATP và 2,3 DPG ở toàn bộ máu K2EDTA bằng LC-MS/MS

Quy trình sau đây được sử dụng để phân tích ATP và 2,3-DPG trong K2EDTA máu toàn phần của con người bằng cách sử dụng quy trình chiết xuất kết tủa protein và phân tích bằng LC-MS/MS.

Phương pháp phân tích sinh học này áp dụng cho các thông số được mô tả dưới đây:

Khoảng thử nghiệm	25000-1500000 ng/mL
Thể tích chiết	15,0 μ L
Loại/Chất nền/Chất chống đông	Nước làm đại diện cho K2EDTA máu toàn phần của con người
Kiểu chiết	Kết tủa protein
Lưu trữ mẫu	80 °C
Khối phổ kế	API-5500
Phần mềm tiếp nhận	Hệ thống Analyst/ Aria

Các biện pháp phòng ngừa sau đây được tuân theo:

1. Mẫu chuẩn và mẫu QC được chuẩn bị trên nước đá và đựng trong hộp nhựa.
2. Mẫu nghiên cứu và mẫu QC được rã đông trên nước đá.
3. Chiết được thực hiện trên nước đá.

Các định nghĩa và từ viết tắt sau đây được sử dụng:

CRB	Chuyển các khoảng trống khắc phục hậu quả
FT	Làm đông lạnh
MPA	Pha động A
MPB	Pha động B
NA	Không áp dụng
NR	Rửa kim
RT	Thời gian lưu
SIP	Đang tiến hành ổn định
TBD	Cần được xác định

Các hóa chất, chất nền, và chất phản ứng sau đây được sử dụng:

Toàn bộ máu của người K ₂ EDTA, BioreclamationIVT hoặc tương đương (Lưu ý: BioReclamationIVT và BioIVT được xem là tương đương)
Axetonitril (ACN), loại HPLC hoặc tốt hơn
Amoni axetat (NH ₄ OAc), loại HPLC hoặc tương đương
Amoni hydroxit (NH ₄ OH, 28-30%), loại ACS hoặc tốt hơn
Dimetylsulfoxit (DMSO), loại ACS hoặc tốt hơn
Axit formic (FA), loại ACS 88%
Isopropanol (IPA), loại HPLC hoặc tốt hơn
Metanol (MeOH), loại HPLC hoặc tốt hơn
Nước (H ₂ O), Milli-Q hoặc loại HPLC

ATP – Chất phân tích, chất tài trợ hoặc chất cung cấp
ATP-IS- IS, chất tài trợ hoặc chất cung cấp
2,3-DPG - Chất phân tích, chất tài trợ hoặc chất cung cấp
2,3-DPG-IS- IS, chất tài trợ hoặc chất cung cấp

Quy trình sau đây được sử dụng để điều chế chất phản ứng. Mọi khối lượng và thể tích áp dụng được liệt kê đều là danh nghĩa và có thể được điều chỉnh theo tỷ lệ miễn là đạt được chế phẩm đích:

Dung dịch	Chế phẩm dung dịch cuối cùng	Thể tích danh nghĩa để điều chế dung dịch	Điều kiện lưu trữ
Pha động A (MPA)	10mM Amoni axetat trong nước độ pH 8,5	Cân khoảng 770,8 mg amoni axetat; bổ sung vào chai 1000mL nước. Điều chỉnh pH thành 8,3-8,7 sử dụng amoni hydroxit.	Nhiệt độ môi trường
Pha động B (MPB)	5:95 MPA:ACN	Bổ sung 50,0 mL MPA vào 950 mL CAN. Mix.	Nhiệt độ môi trường
Rửa kim 1 (NR1)	25:25:25:25:0,1 (v:v:v:v) MeOH:ACN:H ₂ O:IPA:NH ₄ OH	Bổ sung 500 mL MeOH, 500 mL ACN, 500 mL H ₂ O, 500 mL IPA, và 2 mL NH ₄ OH. Mix.	Nhiệt độ môi trường
Rửa kim 2 (NR2)	90:10:0,1 (v:v:v) H ₂ O:MeOH:FA	Bổ sung 2 mL FA vào 200 mL MeOH và 1800 mL H ₂ O. Mix.	Nhiệt độ môi trường

Các chất chuẩn hiệu chuẩn được chuẩn bị bằng cách sử dụng nước làm chất nền theo bảng trình bày dưới đây. Chất chuẩn đã chỉ định được chuẩn bị bằng cách pha loãng thể tích tăng vọt được chỉ định của dung dịch gốc với thể tích chất nền được chỉ định.

Chất chuẩn hiệu chuẩn	Dung dịch gốc	Nồng độ gốc (ng/mL)	Thể tích tăng đột biến (mL)	Thể tích chất nền (mL)	Thể tích cuối cùng (mL)	Nồng độ cuối cùng (ng/mL)
STD-6	gốc ATP	60000000	0,0100	0,380	0,400	1500000
	gốc 2,3-DPG	60000000	0,0100			
STD-5	STD-6	1500000	0,100	0,200	0,300	500000
STD-4	STD-6	1500000	0,0500	0,325	0,375	200000
STD-3	STD-6	1500000	0,0250	0,350	0,375	100000
STD-2	STD-5	500000	0,0500	0,450	0,500	50000
STD-1	STD-5	500000	0,0250	0,475	0,500	25000
Cond.	STD-5	500000	0,0250	0,975	1,00	12500

Tiêu chuẩn kiểm soát chất lượng được lập bằng cách sử dụng nước làm chất nền theo bảng trình bày dưới đây. Tiêu chuẩn kiểm soát chất lượng đã chỉ ra được chuẩn bị bằng cách pha loãng thể tích tăng vọt được chỉ định của dung dịch gốc với thể tích chất nền được chỉ định.

Tiêu chuẩn kiểm soát chất lượng	Dung dịch gốc	Nồng độ gốc (ng/mL)	Thể tích tăng đột biến (mL)	Thể tích chất nền (mL)	Thể tích cuối cùng (mL)	Nồng độ cuối cùng (ng/mL)
QC-cao	gốc ATP	60000000	0,160	7,68	8,00	1200000
	gốc 2,3-DPG	60000000	0,160			
QC-trung bình	QC-cao	1200000	1,50	4,50	6,00	300000
QC-thấp	QC- trung bình	300000	1,50	4,50	6,00	75000

Dung dịch tạo gai chuẩn nội được chuẩn bị với nồng độ cuối cùng là 12500 ng/mL ATP và 2,3-DPG bằng cách pha loãng dung dịch gốc của ATP và 2,3-DPG ở nồng độ 1000000 ng/mL với nước. 0,200 mL mỗi dung dịch gốc ATP và 2,3-DPG được pha loãng với 15,6 mL nước để tạo ra thể tích cuối cùng là 16,0 mL ở nồng độ cuối cùng là 12500 ng/mL ATP và 2,3-DPG.

Quy trình sau đây được sử dụng để chiết mẫu trước khi phân tích qua LC-MS/MS. 15,0 μ L chất chuẩn hiệu chuẩn, kiểm soát chất lượng, mẫu trắng và mẫu được trích dẫn vào tấm 96 lỗ. 50,0 μ L dung dịch chất chuẩn nội được thêm vào tất cả các mẫu trên tấm, ngoại trừ các mẫu trắng nền; 50,0 μ L nước được thêm vào các mẫu trắng nền. Sau đó, 150 μ L nước được thêm vào tất cả các mẫu trên tấm. Sau đó, tấm được đập và khuấy trộn bằng xoáy ở tốc độ cao trong 10 phút, sau đó 750 μ L metanol được thêm vào tất cả các mẫu trên tấm. Tấm được bao phủ và khuấy trộn bằng xoáy trong khoảng 1 phút. Sau đó, tấm được ly tâm với tốc độ khoảng 3500 vòng/phút ở khoảng 4 °C trong năm phút. Sau khi ly tâm, bộ xử lý chất lỏng được sử dụng để chuyển 50 μ L mỗi mẫu vào tấm 96 lỗ mới và 200 μ L axetonitril được thêm vào tất cả các mẫu trên tấm. Tấm mới chuẩn bị được đập và khuấy bằng xoáy trong khoảng 1 phút. Sau đó, tấm được ly tâm với tốc độ khoảng 3500 vòng/phút ở khoảng 4 °C trong 2 phút.

Thông số LC và điều kiện gradient sau đây được sử dụng để phân tích các mẫu được chiết:

Thông số LC		
Cột phân tích	Nhà cung cấp:	SeQuant
	Mô tả:	ZIC-pHILIC
	Kích thước:	50 mm x 2,1 mm
	Nhiệt độ lò sưởi cột:	40 °C
Giá đỡ tấm	Vị trí:	Ngăn xếp lạnh
	Điểm đặt ngăn xếp lạnh:	5 °C
Pha động	Pha động A (MPA)	10mM Amoni axetat trong nước độ pH 8,5
	Pha động B	5:95 MPA:ACN

	(MPB)	
Thể tích tiêm	5 µL	

Gradient LC				
Bước	Thời gian (s)	Dòng (mL/min)	Cài đặt gradient	% MPB
1	50	0,400	Bước	5
2	30	0,400	Dốc	95
3	70	0,400	Bước	5

Dữ liệu được thu thập bắt đầu ở 0,08 min và được thu thập trên độ dài của số dữ liệu là 0,70 min.

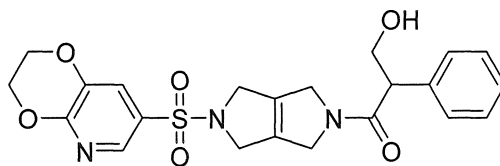
Thông số MS sau đây được sử dụng để phân tích mẫu chiết sử dụng khối phổ kế API-5500:

Giao diện:	Ion hóa phun ion Turbo, chế độ ion dương	
Chế độ quét:	Giám sát nhiều phản ứng (MRM)	
Thông số quét:	Cha mẹ/sản phẩm:	Thời gian chờ (ms):
	506,0/159,0	50
	521,0/159,0	25
	265,0/166,8	50
	268,0/169,8	25
Nhiệt độ nguồn:	400 °C	

Dữ liệu MS thu thập được được phân tích và nồng độ mẫu được định lượng bằng cách sử dụng tỷ lệ diện tích đỉnh với kiểu hồi quy tuyến tính $1/x^2$.

Yêu cầu bảo hộ

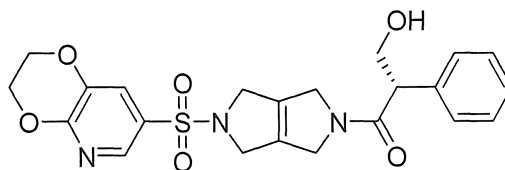
1. Hợp chất có công thức I:



I,

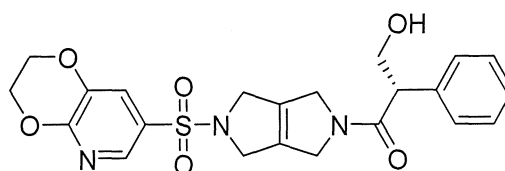
hoặc muối được dụng của nó.

2. Hợp chất theo điểm 1, hoặc muối được dụng của nó, trong đó hợp chất có công thức I là hợp chất 1:



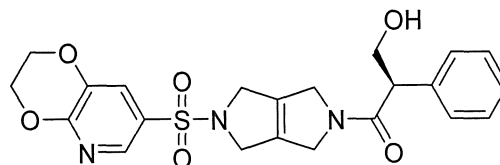
1.

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



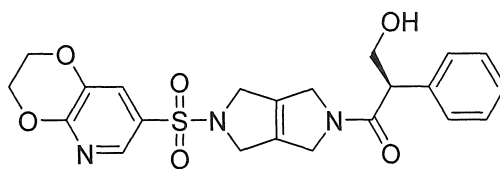
1.

4. Hợp chất theo điểm 1, hoặc muối được dụng của nó, trong đó hợp chất có công thức I là hợp chất 2:



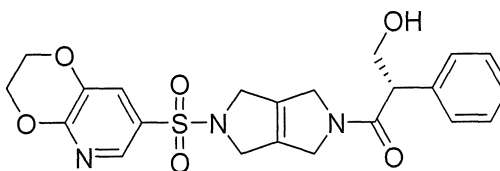
2.

5. Hợp chất theo điểm 1, trong đó hợp chất có công thức I là hợp chất 2:



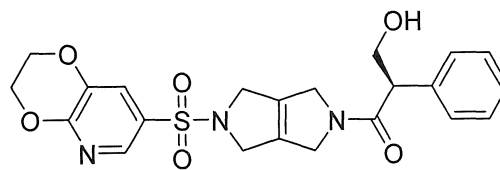
2.

6. Chế phẩm chứa hỗn hợp của hợp chất 1:



1,

hoặc muối dược dụng của nó, và hợp chất 2:

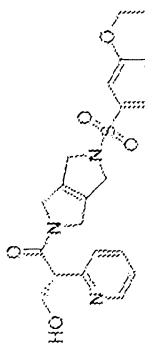
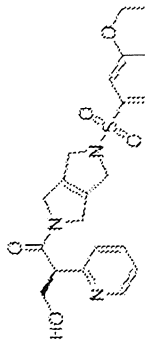


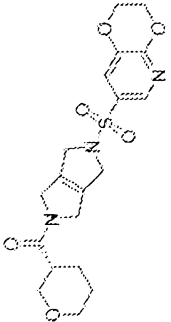
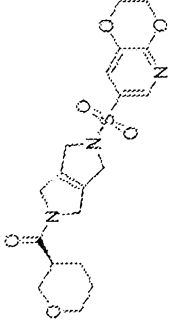
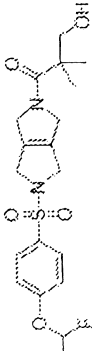
2,

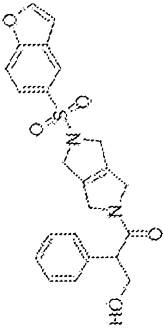
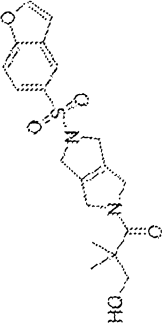
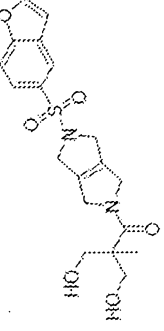
hoặc muối dược dụng của nó.

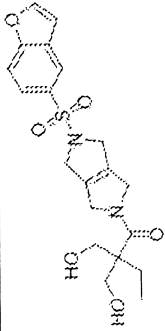
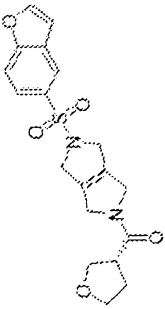
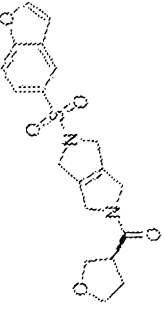
7. Chế phẩm theo điểm 6, trong đó hợp chất 1 có mặt với lượng có hiệu quả điều trị bệnh.

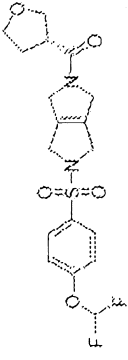
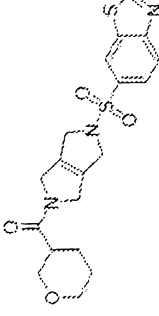
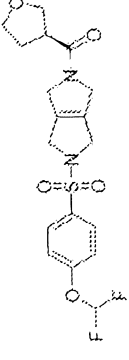
Fig. 1

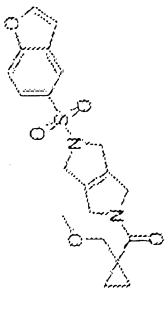
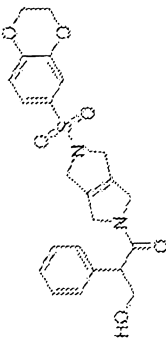
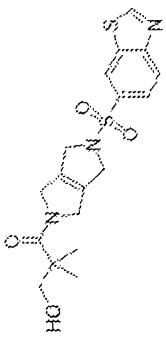
Hợp chất số	Cấu trúc và tên	LCMS	¹ H NMR	AC ₅₀ (G332S)	AC ₅₀ (R510Q)	AC ₅₀ (WT)
3 ^a	 (R)-1-(5-((2,3-dihydro-[1,4]dioxino[2,3-b]pyridin-7-yl)sulfonyl)-3,4,5,6-tetrahydropyrrolo[3,4-c]pyrrol-2(1H)-yl)-3-hydroxy-2-(pyridin-2-yl)propan-1-ol	<i>m/z</i> : 459,0	(400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆): δ 8,45-8,43 (m, 1H), 8,14 (d, <i>J</i> = 2,4 Hz, 1H), 7,74-7,62 (m, 1H), 7,61 (d, <i>J</i> = 2,4 Hz, 1H), 7,30-7,22 (m, 2H), 4,80 (t, <i>J</i> = 5,2 Hz, 1H), 4,50-4,48 (m, 2H), 4,40- 4,37 (m, 1H), 4,32-4,30 (m, 2H), 4,05-3,91 (m, 9H), 3,70-3,65 (m, 1H).	+	++	+++
4 ^a	 (S)-1-(5-((2,3-dihydro-[1,4]dioxino[2,3-b]pyridin-7-yl)sulfonyl)-3,4,5,6-tetrahydropyrrolo[3,4-c]pyrrol-2(1H)-yl)-3-hydroxy-2-(pyridin-2-yl)propan-1-ol	<i>m/z</i> : 459,0	(400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆): δ 8,45-8,43 (m, 1H), 8,14 (d, <i>J</i> = 2,4 Hz, 1H), 7,74-7,62 (m, 1H), 7,62 (d, <i>J</i> = 2,4 Hz, 1H), 7,30-7,22 (m, 2H), 4,80 (t, <i>J</i> = 5,20 Hz, 1H), 4,50-4,48 (m, 2H), 4,40- 4,37 (m, 1H), 4,32-4,30 (m, 2H), 4,05-3,91 (m, 9H), 3,70-3,65 (m, 1H).		+	+

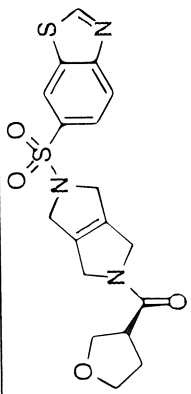
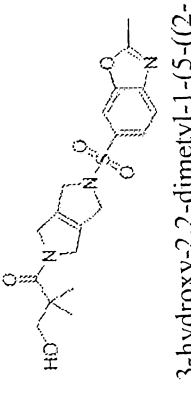
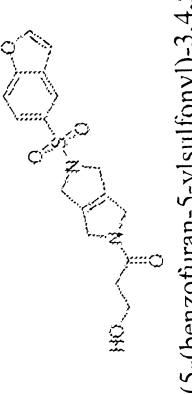
Hợp chất số	Cấu trúc và tên	LCMS	¹ H NMR	AC ₅₀ (G332S)	AC ₅₀ (R510Q)	AC ₅₀ (WT)
5 ^b	 (R)-5-((2,3-dihydro-[1,4]dioxino[2,3-b]pyridin-7-yl)sulfonyl)-3,4,5,6-tetrahydropyrrolo[3,4-c]pyrrol-2(1H)-yl)(tetrahydro-2H-pyran-3-yl)metanon	<i>m/z</i> : 422	(400 MHz, CDCl ₃): δ 8,31 (s, 1H), 7,60 (s, 1H), 4,57-4,50 (m, 2H), 4,36-4,25 (m, 4H), 4,15-4,09 (m, 6H), 3,94-3,88 (m, 2H), 3,56-3,50 (m, 1H), 3,49-3,33 (m, 1H), 2,63-2,60 (m, 1H), 1,95-1,78 (m, 2H), 1,67-1,61 (m, 2H).	+	+	++
6 ^b	 (S)-5-((2,3-dihydro-[1,4]dioxino[2,3-b]pyridin-7-yl)sulfonyl)-3,4,5,6-tetrahydropyrrolo[3,4-c]pyrrol-2(1H)-yl)(tetrahydro-2H-pyran-3-yl)metanon	<i>m/z</i> : 422	(400 MHz, CDCl ₃): δ 8,30 (s, 1H), 7,61 (s, 1H), 4,54-4,52 (m, 2H), 4,35-4,27 (m, 4H), 4,15-4,09 (m, 6H), 3,95-3,90 (m, 2H), 3,56-3,50 (m, 1H), 3,42-3,35 (m, 1H), 2,65-2,60 (m, 1H), 1,95-1,78 (m, 2H), 1,67-1,62 (m, 2H).	0	0	+
7	 1-(5-((4-(difluoromethoxy)phenyl)sulfonyl)-3,4,5,6-tetrahydropyrrolo[3,4-c]pyrrol-2(1H)-yl)-3-hydroxy-2,2-dimethylpropan-1-ol	<i>m/z</i> : 417	(300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆): δ ppm 7,89-7,92 (m, 2H), 7,39-7,42 (d, <i>J</i> = 7,8 Hz, 2H), 7,17-7,66 (t, <i>J</i> = 73,2 Hz, 1H), 4,68-4,72 (t, <i>J</i> = 5,4 Hz, 1H), 3,90-4,50 (m, 8H), 3,40-3,42 (d, <i>J</i> = 5,4 Hz, 2H), 1,09 (s, 6H).	+++	++	++

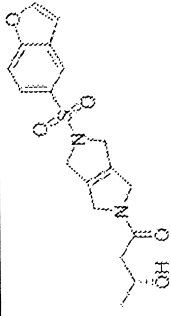
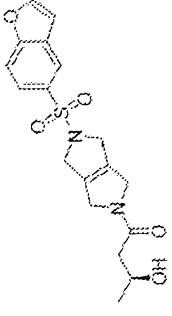
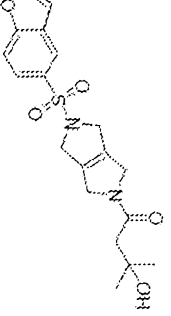
Hợp chất số	Cấu trúc và tên	LCMS	¹ H NMR	AC ₅₀ (G332S)	AC ₅₀ (R510Q)	AC ₅₀ (WT)
8	 1-(5-(benzofuran-5-ylsulfonyl)-3,4,5,6-tetrahydropyrrolo[3,4-c]pyrrol-2(1H)-yl)-3-hydroxy-2-phenylpropan-1-ol	<i>m/z</i> : 439				+++
9	 1-(5-(benzofuran-5-ylsulfonyl)-3,4,5,6-tetrahydropyrrolo[3,4-c]pyrrol-2(1H)-yl)-3-hydroxy-2,2-dimethylpropan-1-ol	<i>m/z</i> : 391				+++
10	 1-(5-(benzofuran-5-ylsulfonyl)-3,4,5,6-tetrahydropyrrolo[3,4-c]pyrrol-2(1H)-yl)-3-hydroxy-2-(hydroxymethyl)-2-methylpropan-1-ol	<i>m/z</i> : 407				+++

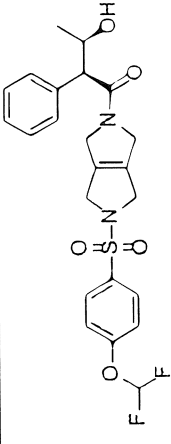
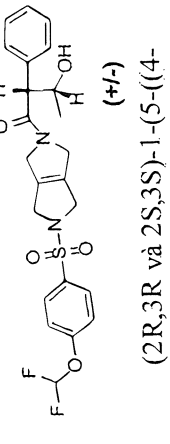
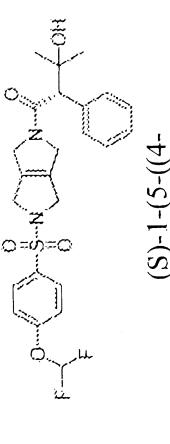
Hợp chất số	Cấu trúc và tên	LCMS	¹ H NMR	AC ₅₀ (G332S)	AC ₅₀ (R510Q)	AC ₅₀ (WT)
11	 1-(5-(benzofuran-5-ylsulfonyl)-3,4,5,6-tetrahydropyrrolo[3,4-c]pyrrol-2(1H)-yl)-2,2-bis(hydroxymethyl)butan-1-ol	<i>m/z</i> : 421				++
12	 (R)-(5-(benzofuran-5-ylsulfonyl)-3,4,5,6-tetrahydropyrrolo[3,4-c]pyrrol-2(1H)-yl)(tetrahydrofuran-3-yl)metanon	<i>m/z</i> : 389, 1				++
13	 (S)-(5-(benzofuran-5-ylsulfonyl)-3,4,5,6-tetrahydropyrrolo[3,4-c]pyrrol-2(1H)-yl)(tetrahydrofuran-3-yl)metanon	<i>m/z</i> : 389, 1				++

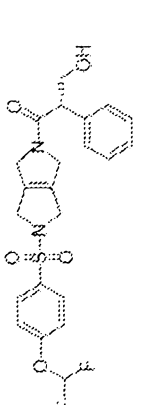
Hợp chất số	Cấu trúc và tên	LCMS	¹ H NMR	AC ₅₀ (G332S)	AC ₅₀ (R510Q)	AC ₅₀ (W/T)
14	 (R)-(5-((4-(difluoromethoxy)phenyl)sulfonyl)-3,4,5,6-tetrahydropyrrolo[3,4-c]pyrrol-2(1H)-yl)(tetrahydrofuran-3-yl)metanone	<i>m/z</i> : 415	(300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆): δ ppm 7,89-7,94 (m, 2H), 7,40- 7,42 (d, 2H), 7,18-7,66 (t, <i>J</i> = 72 Hz, 1H) 3,83-4,29 (m, 9H), 3,62-3,74 (m, 3H), 3,06-3,16 (m, 1H), 1,94-2,07 (m, 2H).	++	+	++
15	 (5-(benzo[d]thiazol-6-ylsulfonyl)-3,4,5,6-tetrahydropyrrolo[3,4-c]pyrrol-2(1H)-yl)(tetrahydro-2H-pyran-3-yl)metanone	<i>m/z</i> : 420	(300MHz, CDCl ₃): δ ppm 9,22 (s, 1H), 8,54 (d, <i>J</i> = 1,2 Hz, 1H), 8,29 (d, <i>J</i> = 8,7 Hz, 1 H), 7,97 (dd, <i>J</i> = 8,7 Hz, <i>J</i> = 1,8 Hz, 1H), 4,24-4,12 (m, 8H), 3,94-3,90 (m, 2H), 3,54-3,41 (m, 2H), 2,65-2,55 (m, 1H), 1,86-1,81 (m, 2H), 1,67-1,49 (m, 2H). (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆):	0	+	++
16	 (S)-(5-((4-(difluoromethoxy)phenyl)sulfonyl)-3,4,5,6-tetrahydropyrrolo[3,4-c]pyrrol-2(1H)-yl)(tetrahydrofuran-3-yl)metanone	<i>m/z</i> : 415	δ ppm 7,95-7,98 (m, 2H), 7,35- 7,42 (m, 2H), 6,79-7,28 (t, <i>J</i> = 72 Hz, 1H) 3,80-4,32 (m, 14H), 3,24-3,40 (m, 1H), 2,22 (m, 2H) .	++	+	++

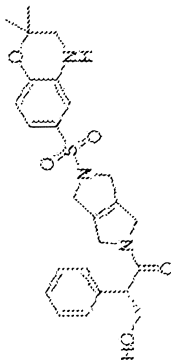
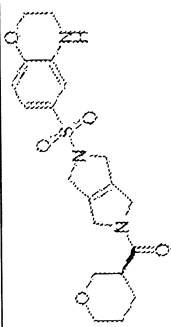
Hợp chất số	Cấu trúc và tên	LCMS	¹ H NMR	AC ₅₀ (G332S)	AC ₅₀ (R510Q)	AC ₅₀ (WT)
17	 (5-(benzofuran-5-ylsulfonyl)-3,4,5,6-tetrahydropyrrolo[3,4-c]pyrrol-2(1H)-yl)(1-(methoxymethyl)cyclopropyl)metanon	m/z: 403				++
18	 1-(5-((2,3-dihydrobenzo[b][1,4]dioxin-6-yl)sulfonyl)-3,4,5,6-tetrahydropyrrolo[3,4-c]pyrrol-2(1H)-yl)-3-hydroxy-2-phenylpropan-1-on	m/z: 457		0	+++	
19	 1-(5-(benzo[d]thiazol-6-ylsulfonyl)-3,4,5,6-tetrahydropyrrolo[3,4-c]pyrrol-2(1H)-yl)-3-hydroxy-2,2-dimethylpropan-1-on	m/z: 408		0	++	++

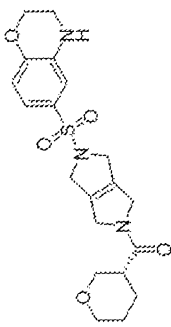
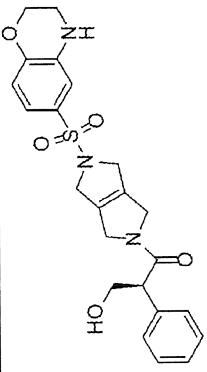
Hợp chất số	Cấu trúc và tên	LCMS	¹ H NMR	AC ₅₀ (G332S)	AC ₅₀ (R510Q)	AC ₅₀ (WT)
20	 (R)-(5-(benzo[d]thiazol-6-ylsulfonyl)-3,4,5,6-tetrahydropyrrolo[3,4-c]pyrrol-2(1H)-yl)(tetrahydrofuran-3-yl)methanon	m/z: 406		++	+	++
21	 3-hydroxy-2,2-dimethyl-1-(5-((2-methylbenzo[d]oxazol-6-yl)sulfonyl)-3,4,5,6-tetrahydropyrrolo[3,4-c]pyrrol-2(1H)-yl)propan-1-ol	m/z: 406				+
22	 1-(5-(benzofuran-5-ylsulfonyl)-3,4,5,6-tetrahydropyrrolo[3,4-c]pyrrol-2(1H)-yl)-3-hydroxypropan-1-ol	m/z: 363				++

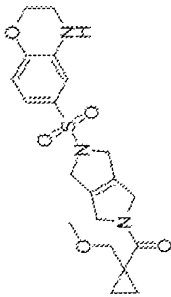
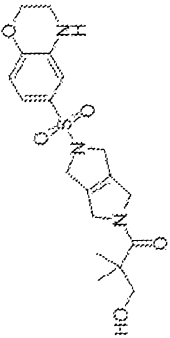
Hợp chất số	Cấu trúc và tên	LCMS	¹ H NMR	AC ₅₀ (G332S)	AC ₅₀ (R510Q)	AC ₅₀ (WT)
23	 (R)-1-(5-(benzofuran-5-ylsulfonyl)-3,4,5,6-tetrahydropyrrolo[3,4-c]pyrrol-2(1H)-yl)-3-hydroxybutan-1-ol	<i>m/z</i> : 377				++
24	 (S)-1-(5-(benzofuran-5-ylsulfonyl)-3,4,5,6-tetrahydropyrrolo[3,4-c]pyrrol-2(1H)-yl)-3-hydroxybutan-1-ol	<i>m/z</i> : 377				++
25	 1-(5-(benzofuran-5-ylsulfonyl)-3,4,5,6-tetrahydropyrrolo[3,4-c]pyrrol-2(1H)-yl)-3-hydroxy-3-methylbutan-1-ol	<i>m/z</i> : 391, 14				++

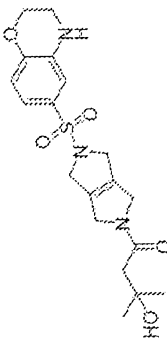
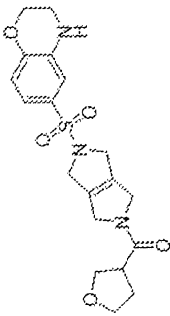
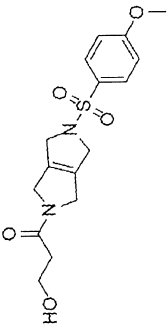
Hợp chất số	Cấu trúc và tên	LCMS	¹ H NMR	AC ₅₀ (G332S)	AC ₅₀ (R510Q)	AC ₅₀ (WT)
26	 (2S,3R và 2R,3S)-1-(5-((4-(difluoromethoxy phenyl)sulfonyl)-3,4,5,6-tetrahydropyrrolo[3,4-c]pyrrol-2(1H)-yl)-3-hydroxy-2-phenylbutan-1-ol (+/-)	<i>m/z</i> : 479,0	(300MHz, CDCl ₃): δ ppm 7,85-7,80 (m, 2H), 7,37-7,23 (m, 7H), 6,59 (t, <i>J</i> = 72,6 Hz, 1 H), 4,45-4,37 (m, 1H), 4,25- 3,95 (m, 7H), 3,78-3,74 (m, 1H), 3,39 (d, <i>J</i> = 3,9 Hz, 1H), 1,05 (d, <i>J</i> = 6,3 Hz, 3 H).	+++	+++	+++
27	 (2R,3R và 2S,3S)-1-(5-((4-(difluoromethoxy)phenyl)sulfonyl)-3,4,5,6-tetrahydropyrrolo[3,4-c]pyrrol-2(1H)-yl)-3-hydroxy-2-phenylbutan-1-ol (+/-)	<i>m/z</i> : 479	(300MHz, CDCl ₃): δ ppm 7,84-7,81 (m, 2H), 7,35-7,26 (m, 7H), 6,59 (t, <i>J</i> = 72,6 Hz, 1 H), 4,35-3,97 (m, 8H), 3,76- 3,71 (m, 1H), 3,36-3,34 (m, 1H), 1,06 (dd, <i>J</i> = 13,2 Hz, <i>J</i> = 6,3 Hz, 3H)	+++	++	+++
28	 (S)-1-(5-((4-(difluoromethoxy)phenyl)sulfonyl)-3,4,5,6-tetrahydropyrrolo[3,4-c]pyrrol-2(1H)-yl)-3-hydroxy-2-methyl-2-phenylbutan-1-ol	<i>m/z</i> : 493	(300MHz, CDCl ₃): δ ppm 7,83 (d, <i>J</i> = 8,7 Hz, 2H), 7,36-7,23 (m, 7H), 6,59 (t, <i>J</i> = 72,6 Hz, 1H), 4,28-3,85 (m, 8H), 3,32 (s, 1H), 1,39 (s, 3H), 0,92 (s, 3H)	+++	+	++

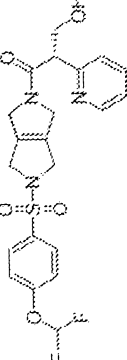
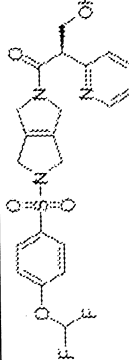
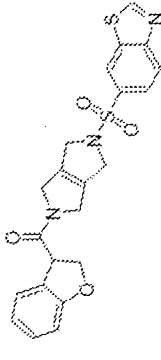
Hợp chất số	Cấu trúc và tên	LCMS	¹ H NMR	AC ₅₀ (G332S)	AC ₅₀ (R510Q)	AC ₅₀ (WT)
29	 (S)-1-(5-(benzo[d]thiazol-6-yl)sulfonyl)-3,4,5,6-tetrahydropyrrolo[3,4-c]pyrrol-2(1H)-yl)-3-hydroxy-2-phenylpropan-1-ol	<i>m/z</i> : 456	(300MHz, CDCl ₃): δ ppm 9,20 (s, 1H), 8,49 (s, 1H), 8,25 (d, <i>J</i> = 6,6 Hz, 1H), 7,94 (d, <i>J</i> = 8,7 Hz, 1H), 7,31-7,20 (m, 5H), 4,26-4,03 (m, 8H), 3,73-3,64 (m, 3H)	+++	+++	+++
30	 (R)-1-(5-(benzo[d]thiazol-6-yl)sulfonyl)-3,4,5,6-tetrahydropyrrolo[3,4-c]pyrrol-2(1H)-yl)-3-hydroxy-2-phenylpropan-1-ol	<i>m/z</i> : 456	(300MHz, CDCl ₃): δ ppm 9,22 (s, 1H), 8,49 (s, 1H), 8,26 (d, <i>J</i> = 8,4 Hz, 1H), 7,94 (dd, <i>J</i> = 8,4 Hz, <i>J</i> = 1,8 Hz, 1H), 7,34-7,20 (m, 5H), 4,30-4,03 (m, 8H), 3,75-3,69 (m, 3H)	++	++	++
31	 (S)-1-(5-((4-(difluoromethoxy)phenyl)sulfonyl)-3,4,5,6-tetrahydropyrrolo[3,4-c]pyrrol-2(1H)-yl)-3-hydroxy-2-phenylpropan-1-ol	<i>m/z</i> : 465	(300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆): δ ppm 7,89-7,85 (m, 2H), 7,64-7,15 (m, 8H), 4,76 (t, <i>J</i> = 5.1 Hz, 1H), 4,40-4,36 (m, 1H), 4,04-3,82 (m, 8H), 3,80-3,77 (m, 1H), 3,48-3,41 (m, 1H)	+++	+++	+++

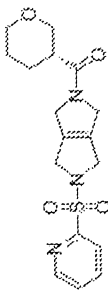
Hợp chất số	Cấu trúc và tên	LCMS	¹ H NMR	AC ₅₀ (G332S)	AC ₅₀ (R510Q)	AC ₅₀ (WT)
32	 (S)-1-(5-((2,2-dimethyl-3,4-dihydro-2H-benzo[b][1,4]oxazin-6-yl)sulfonyl)-3,4,5,6-tetrahydropyrrolo[3,4-c]pyrrol-2(1H)-yl)-3-hydroxy-2-phenylpropan-1-ol	<i>m/z</i> : 484,0	(300MHz, DMSO- <i>d</i> ₆): δ ppm 7,29-7,28 (m, 5H), 7,04 (s, 1H), 6,9-6,85 (m, 1H), 6,76 (d, <i>J</i> = 8,4 Hz, 1H), 6,35 (s, 1H), 4,85-4,70 (m, 1H), 4,50- 4,30 (m, 1H), 3,97-3,93 (m, 8H), 3,90-3,80 (m, 1H), 3,35-3,50 (m, 1H) , 3,02 (d, <i>J</i> = 2,1 Hz, 2H), 1,24 (s, 6H).	0	+++	+++
33 ^c	 (S)-5-((3,4-dihydro-2H-benzo[b][1,4]oxazin-6-yl)sulfonyl)-3,4,5,6-tetrahydropyrrolo[3,4-c]pyrrol-2(1H)-yl tetrahydro-2H-pyran-3-yl metanon	<i>m/z</i> : 420	(300 MHz, CDCl ₃): δ ppm 7,24-7,19 (m, 2H), 6,89 (d, <i>J</i> = 6,6 Hz, 1H), 4,44-4,34 (d, 2H), 4,25- 4,18 (m, 2H), 4,12 (s, 6H), 3,95-3,91 (m, 2H), 3,56-3,37 (m, 4H), 2,66- 2,62 (m, 1H), 1,89-1,68 (m, 4H).	0	+	+

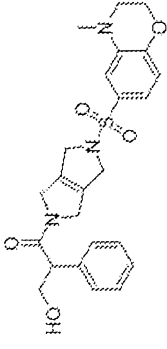
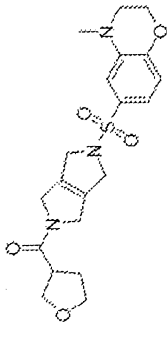
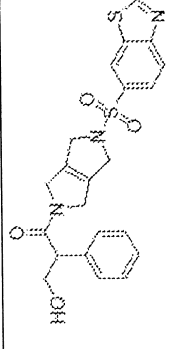
Hợp chất số	Cấu trúc và tên	LCMS	¹ H NMR	AC ₅₀ (G332S)	AC ₅₀ (R510Q)	AC ₅₀ (WT)
34 ^c	 (R)-5-((3,4-dihydro-2H-benzo[b][1,4]oxazin-6-yl)sulfonyl)-3,4,5,6-tetrahydropyrrolo[3,4-c]pyrrol-2(1H)-yl(tetrahydro-2H-pyran-3-yl) metanon	<i>m/z</i> : 420	(300 MHz, CDCl ₃): δ ppm 7,17-7,11 (m, 2H), 6,88 (d, <i>J</i> = 8,1 Hz, 1H), 4,33-4,25 (m, 4H), 4,12 (s, 6H), 3,95-3,91 (m, 2H), 3,56-3,37 (m, 4H), 2,67-2,57 (m, 1H), 1,89- 1,66 (m, 4H).	++	+++	+++
35	 (S)-1-(5-((3,4-dihydro-2H-benzo[b][1,4]oxazin-6-yl)sulfonyl)-3,4,5,6-tetrahydropyrrolo[3,4-c]pyrrol-2(1H)-yl)-3-hydroxy-2-phenylpropan-1-ol	<i>m/z</i> : 456		+++	+++	+++

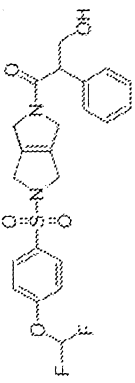
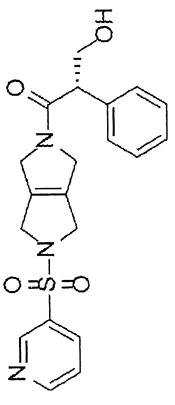
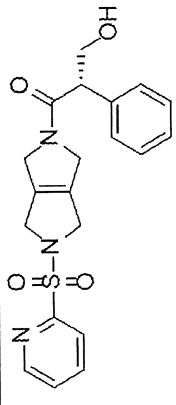
Hợp chất số	Cấu trúc và tên	LCMS	¹ H NMR	AC ₅₀ (G332S)	AC ₅₀ (R510Q)	AC ₅₀ (WT)
36	 (5-((3,4-dihydro-2H-benzo[b][1,4]oxazin-6-yl)sulfonyl)-3,4,5,6-tetrahydropyrrolo[3,4-c]pyrrol-2(1H)-yl)(1-(metoxymethyl)cyclopropyl)metanon	<i>m/z</i> : 420		0	+	++
37	 1-(5-((3,4-dihydro-2H-benzo[b][1,4]oxazin-6-yl)sulfonyl)-3,4,5,6-tetrahydropyrrolo[3,4-c]pyrrol-2(1H)-yl)-3-hydroxy-2,2-dimethylpropan-1-ol	<i>m/z</i> : 408		0	+++	++

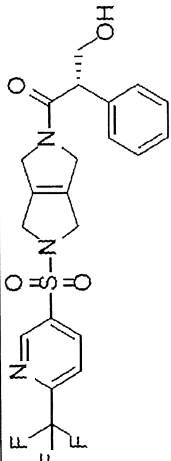
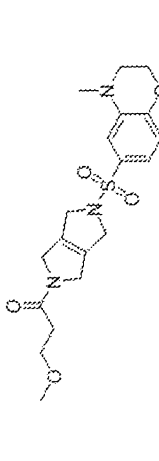
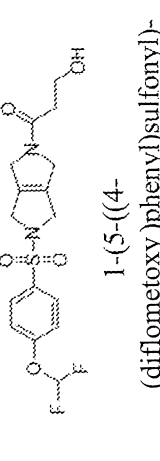
Hợp chất số	Cấu trúc và tên	LCMS	¹ H NMR	AC ₅₀ (G332S)	AC ₅₀ (R510Q)	AC ₅₀ (WT)
38	 1-((3,4-dihydro-2H-benzo[b][1,4]oxazin-6-yl)sulfonyl)-3,4,5,6-tetrahydropyrrolo[3,4-c]pyrrol-2(1H)-yl)-3-hydroxy-3-methylbutan-1-ol	<i>m/z</i> : 408				
39	 (5-((3,4-dihydro-2H-benzo[b][1,4]oxazin-6-yl)sulfonyl)-3,4,5,6-tetrahydropyrrolo[3,4-c]pyrrol-2(1H)-yl)(tetrahydrofuran-3-yl) metanon	<i>m/z</i> : 406		+++	++	++
40	 3-hydroxy-1-(5-((4-methoxyphenyl)sulfonyl)-3,4,5,6-tetrahydropyrrolo[3,4-c]pyrrol-2(1H)-yl)propan-1-ol				+	

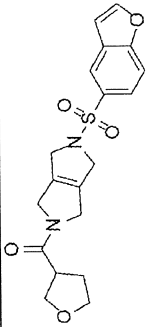
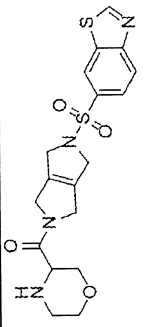
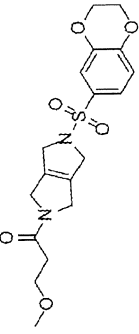
Hợp chất số	Cấu trúc và tên	LCMS	¹ H NMR	AC ₅₀ (G332S)	AC ₅₀ (R510Q)	AC ₅₀ (WT)
41 ^d	 (S)-1-(5-((4-(difluoromethoxy)phenyl)sulfonyl)-3,4,5,6-tetrahydropyridol[3,4-c]pyrrol-2(1H)-yl)-3-hydroxy-2-(pyridin-2-yl)propan-1-ol	<i>m/z</i> : 466	(300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆): δ ppm 8,45-8,47 (m, 1H), 7,90-7,87 (m, 2H), 7,70-7,75 (m, 1H), 7,37 (t, <i>J</i> = 73,2 Hz, 1H), 7,23-7,37 (m, 4H), 4,70-4,85 (m, 1H), 4,37-4,42 (m, 1H), 4,03-4,06 (m, 9H), 3,70-3,72 (m, 1H).	+++	+++	+++
42 ^d	 (R)-1-(5-((4-(difluoromethoxy)phenyl)sulfonyl)-3,4,5,6-tetrahydropyridol[3,4-c]pyrrol-2(1H)-yl)-3-hydroxy-2-(pyridin-2-yl)propan-1-ol	<i>m/z</i> : 466	(300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆): δ ppm 8,45-8,47 (m, 1H), 7,90-7,87 (m, 2H), 7,70-7,75 (m, 1H), 7,31 (t, <i>J</i> = 73,2 Hz, 1H), 7,23-7,31 (m, 4H), 4,70-4,85 (m, 1H), 4,38-4,42 (m, 1H), 4,03-4,06 (m, 9H), 3,69-3,72 (m, 1H).	+++	+++	+++
43	 (S)-(benzo[d]thiazol-6-yl)sulfonyl)-3,4,5,6-tetrahydropyridol[3,4-c]pyrrol-2(1H)-yl)(2,3-dihydrobenzofuran-3-yl) metanon	<i>m/z</i> : 454	(300MHz, DMSO- <i>d</i> ₆): δ ppm 9,66 (s, 1H), 8,84 (d, <i>J</i> = 1,5 Hz, 1H), 8,32 (d, <i>J</i> = 8,4 Hz, 1H), 7,99 (dd, <i>J</i> ₁ = 8,7 Hz, <i>J</i> ₂ = 1,8 Hz, 1H), 7,14-7,09 (m, 2H), 6,80-6,75 (m, 2H), 4,67-4,38 (m, 5H), 4,18 (s, 4H), 4,01 (m, 2H).	++	+	++

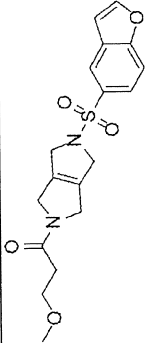
Hợp chất số	Cấu trúc và tên	LCMS	¹ H NMR	AC ₅₀ (G332S)	AC ₅₀ (R510Q)	AC ₅₀ (WT)
44^e	 (R)-(5-(pyridin-2-ylsulfonyl)-3,4,5,6-tetrahydropyrrolo[3,4-c]pyrrol-2(1H)-yl)(tetrahydro-2H-pyran-3-yl) metanon	<i>m/z</i> : 364,0	(400 MHz, CDCl ₃): δ 8,73-8,69 (m, 1H), 8,03-7,88 (m, 2H), 7,56-7,42 (m, 1H), 4,43-4,26 (m, 6H), 4,16 (d, <i>J</i> = 3,6 Hz, 2H), 3,98-3,87 (m, 2H), 3,54 (t, <i>J</i> = 12,0 Hz, 1H), 3,50-3,34 (m, 1H), 2,68-2,49 (m, 1H), 1,96-1,76 (m, 2H), 1,69-1,48 (m, 2H).	+	0	+
45^e	 (S)-(5-(pyridin-2-ylsulfonyl)-3,4,5,6-tetrahydropyrrolo[3,4-c]pyrrol-2(1H)-yl)(tetrahydro-2H-pyran-3-yl) metanon	<i>m/z</i> : 364,2	(400 MHz, CDCl ₃): δ 8,75-8,67 (m, 1H), 8,04-7,88 (m, 2H), 7,58-7,39 (m, 1H), 4,43-4,26 (m, 6H), 4,18-4,16 (m, 2H), 4,00-3,89 (m, 2H), 3,54 (t, <i>J</i> = 12,0 Hz, 1H), 3,48-3,29 (m, 1H), 2,69-2,48 (m, 1H), 1,95-1,76 (m, 2H), 1,72-1,58 (m, 2H).	++	+	++

Hợp chất số	Cấu trúc và tên	LCMS	¹ H NMR	AC ₅₀ (G332S)	AC ₅₀ (R510Q)	AC ₅₀ (WT)
46	 3-hydroxy-1-(5-((4-methyl-3,4-dihydro-2H-benzo[b][1,4]oxazin-6-yl)sulfonyl)-3,4,5,6-tetrahydropyrrolo[3,4-c]pyrrol-2(1H)-yl)-2-phenylpropan-1-one	<i>m/z</i> : 470,2		0	0	+++
47	 (5-((4-methyl-3,4-dihydro-2H-benzo[b][1,4]oxazin-6-yl)sulfonyl)-3,4,5,6-tetrahydropyrrolo[3,4-c]pyrrol-2(1H)-yl)(tetrahydrofuran-3-yl) metanon	<i>m/z</i> : 420,2		0	+	++
48	 1-(5-(benzo[d]thiazol-6-ylsulfonyl)-3,4,5,6-tetrahydropyrrolo[3,4-c]pyrrol-2(1H)-yl)-3-hydroxy-2-phenylpropan-1-one	<i>m/z</i> : 456,1		+++	+++	+++

Hợp chất số	Cấu trúc và tên	LCMS	¹ H NMR	AC ₅₀ (G332S)	AC ₅₀ (R510Q)	AC ₅₀ (WT)
49	 1-((4-(difluoromethoxy)phenyl)sulfonyl)-3,4,5,6-tetrahydropyrrolo[3,4-c]pyrrol-2-yl)-3-hydroxypropan-1-ol	<i>m/z</i> : 465,1		+++	+++	+++
50	 (2S)-3-hydroxy-2-phenyl-1-[5-(pyridin-3-sulfonyl)-1H,2H,3H,4H,5H,6H-pyrrolo[3,4-c]pyrrol-2-yl]propan-1-ol	<i>m/z</i> : 400,3		++	++	++
51	 (2S)-3-hydroxy-2-phenyl-1-[5-(pyridin-2-sulfonyl)-1H,2H,3H,4H,5H,6H-pyrrolo[3,4-c]pyrrol-2-yl]propan-1-ol	<i>m/z</i> : 400,3		++	+++	+++

Hợp chất số	Cấu trúc và tên	LCMS	¹ H NMR	AC ₅₀ (G332S)	AC ₅₀ (R510Q)	AC ₅₀ (WT)
52	 (2S)-3-hydroxy-2-phenyl-1-(5-((6-(trifluoromethyl)pyridin-3-yl)sulfonyl)-1H,2H,3H,4H,5H,6H-pyrrolo[3,4-c]pyrrol-2-yl)propan-1-ol	<i>m/z</i> : 468,2		++	+	++
53	 3-methoxy-1-(5-((4-methyl-3,4-dihydro-2H-benzo[b][1,4]oxazin-6-yl)sulfonyl)-3,4,5,6-tetrahydropyrrolo[3,4-c]pyrrol-2(1H)-yl)propan-1-ol ; và	<i>m/z</i> : 408,2		0	+	++
54	 1-(5-((4-(difluoromethoxy)phenyl)sulfonyl)-3,4,5,6-tetrahydropyrrolo[3,4-c]pyrrol-2(1H)-yl)-3-hydroxypropan-1-ol .	<i>m/z</i> : 391,1			+	+

Hợp chất số	Cấu trúc và tên	LCMS	¹ H NMR	AC ₅₀ (G332S)	AC ₅₀ (R510Q)	AC ₅₀ (WT)
55	 (5-(benzofuran-5-ylsulfonyl)-3,4,5,6-tetrahydropyrrolo[3,4-c]pyrrol-2(1H)-yl)(tetrahydrofuran-3-yl) metanon					
56	 (5-(benzo[d]thiazol-6-ylsulfonyl)-3,4,5,6-tetrahydropyrrolo[3,4-c]pyrrol-2(1H)-yl)(morpholin-3-yl) metanon			0	+	
57	 1-(5-((2,3-dihydrobenzo[b][1,4]dioxin-6-yl)sulfonyl)-3,4,5,6-tetrahydropyrrolo[3,4-c]pyrrol-2(1H)-yl)-3-metoxypentan-1-on			+++	++	

Hợp chất số	Cấu trúc và tên	LCMS	¹ H NMR	AC ₅₀ (G332S)	AC ₅₀ (R510Q)	AC ₅₀ (WT)
58	 1-(5-(benzofuran-5-ylsulfonyl)-3,4,5,6-tetrahydropyrrolo[3,4-c]pyrrol-2(1H)-yl)-3-methoxypropan-1-ol			+++	++	

^a Hợp chất **3** và **4** là các chất đồng phân đối hình, nhưng hóa học lập thể tuyệt đối chưa được xác định; ^bHợp chất **5** và **6** là các chất đồng phân đối hình, nhưng hóa học lập thể tuyệt đối chưa được xác định; ^cHợp chất **33** và **34** là các chất đồng phân đối hình, nhưng hóa học lập thể tuyệt đối chưa được xác định; ^dHợp chất **41** và **42** là các chất đồng phân đối hình, nhưng hóa học lập thể tuyệt đối chưa được xác định; ^eHợp chất **44** và **45** là các chất đồng phân đối hình, nhưng hóa học lập thể tuyệt đối chưa được xác định.

Fig. 2

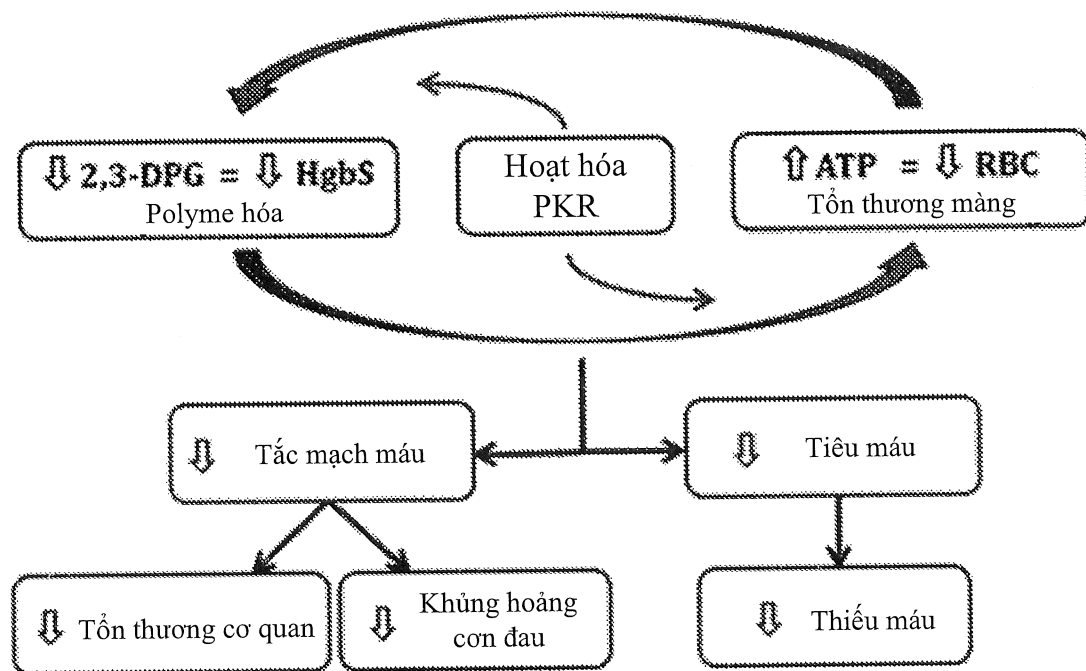


Fig. 3

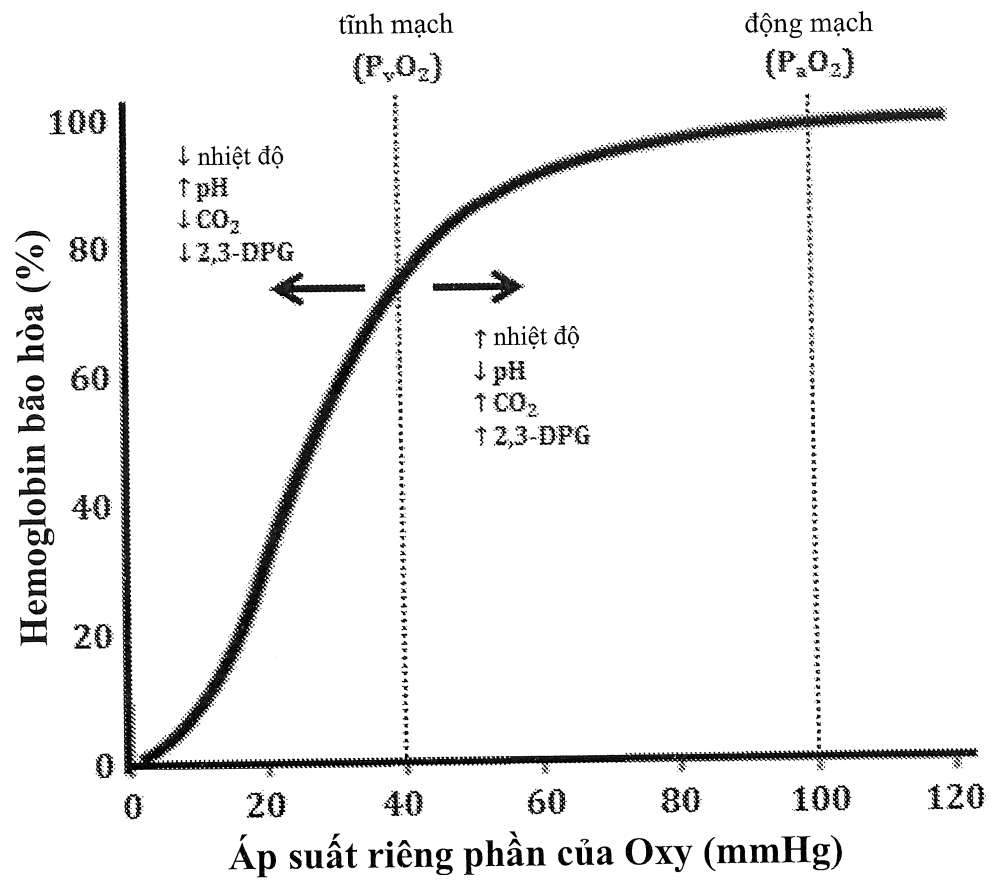


Fig. 4A

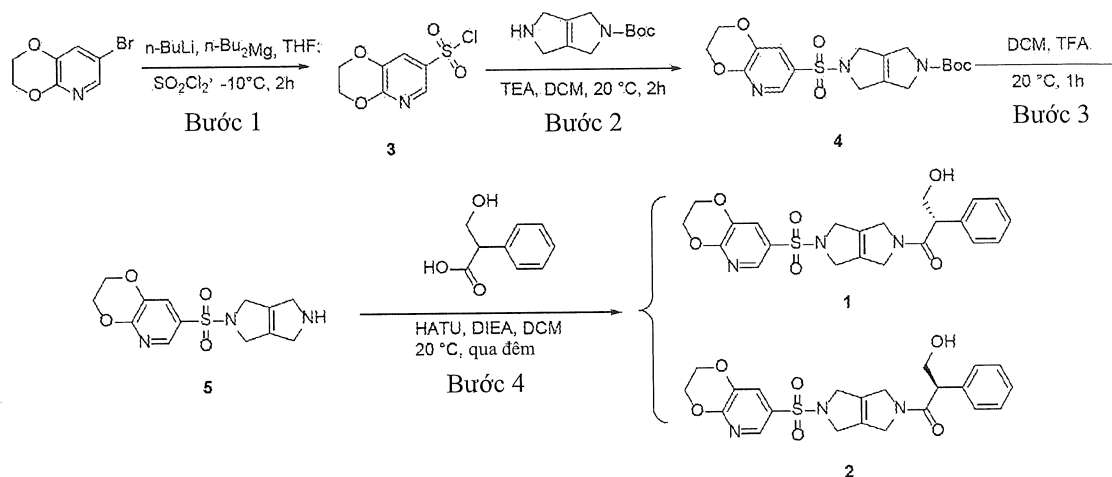


Fig. 4B

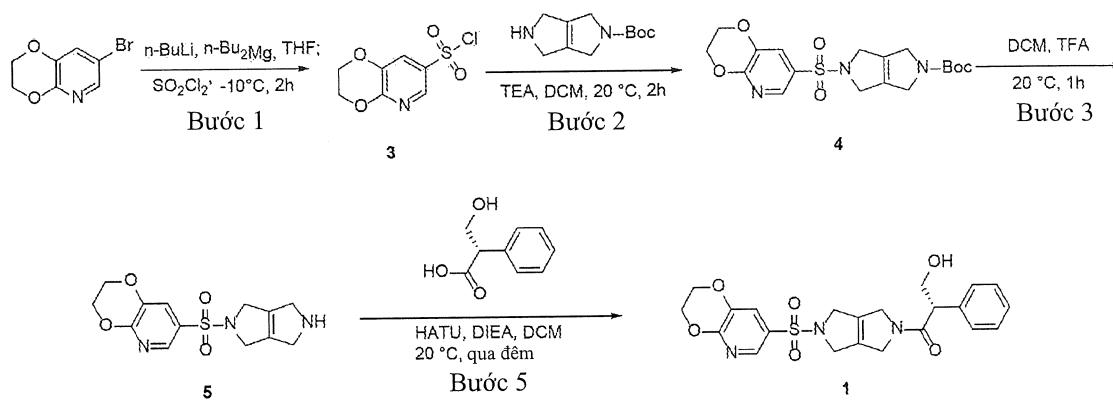


Fig. 4C

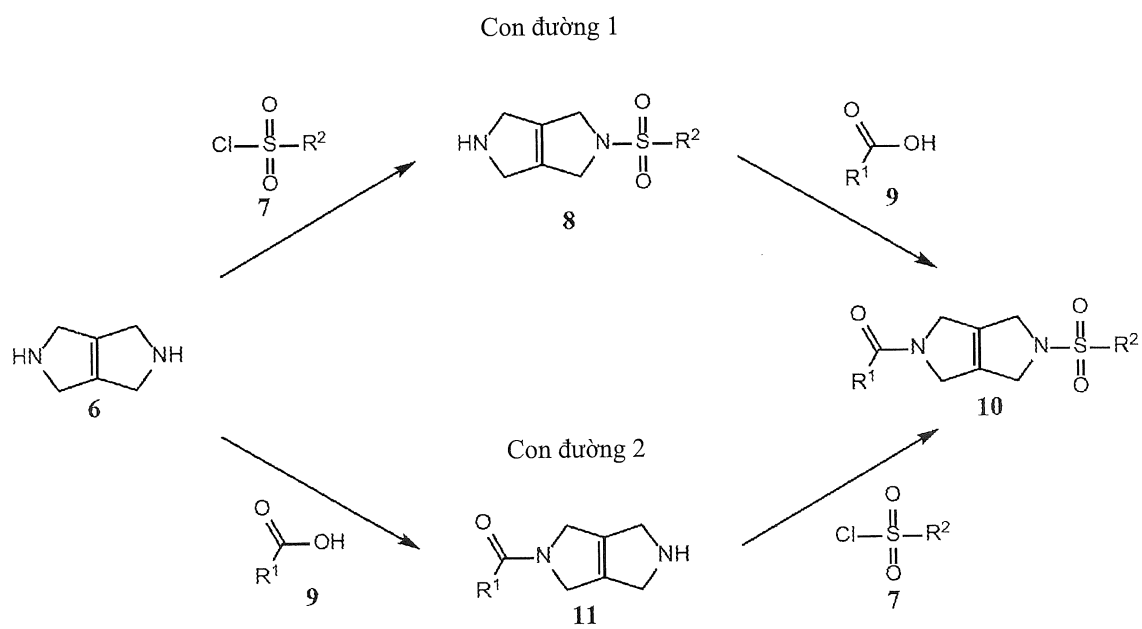


Fig. 5

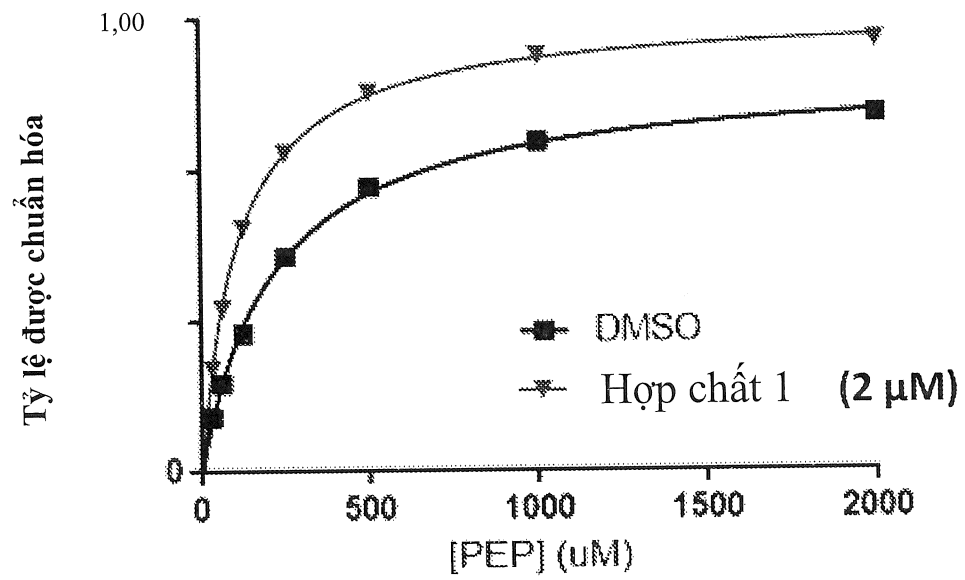


Fig. 6

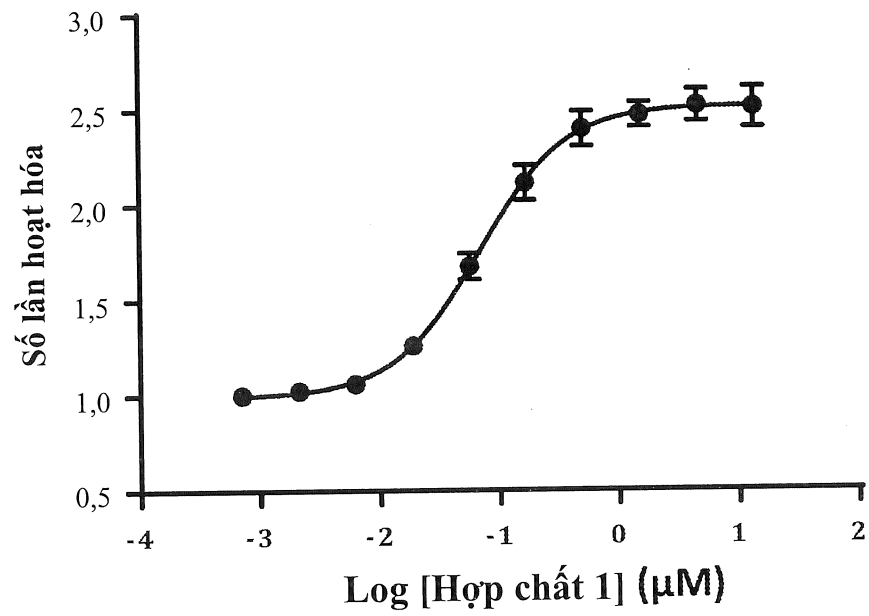


Fig. 7

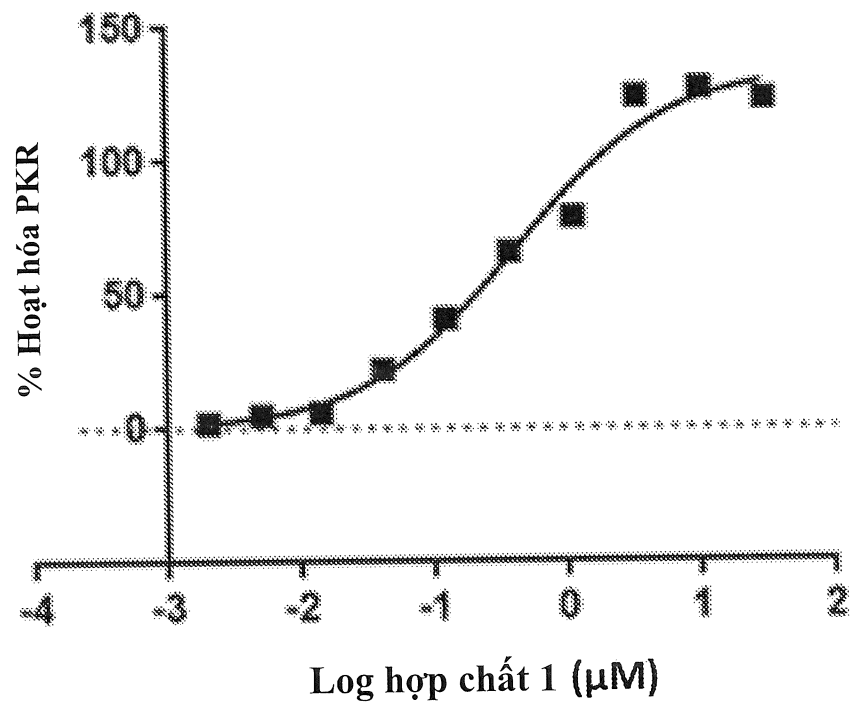


Fig. 8A

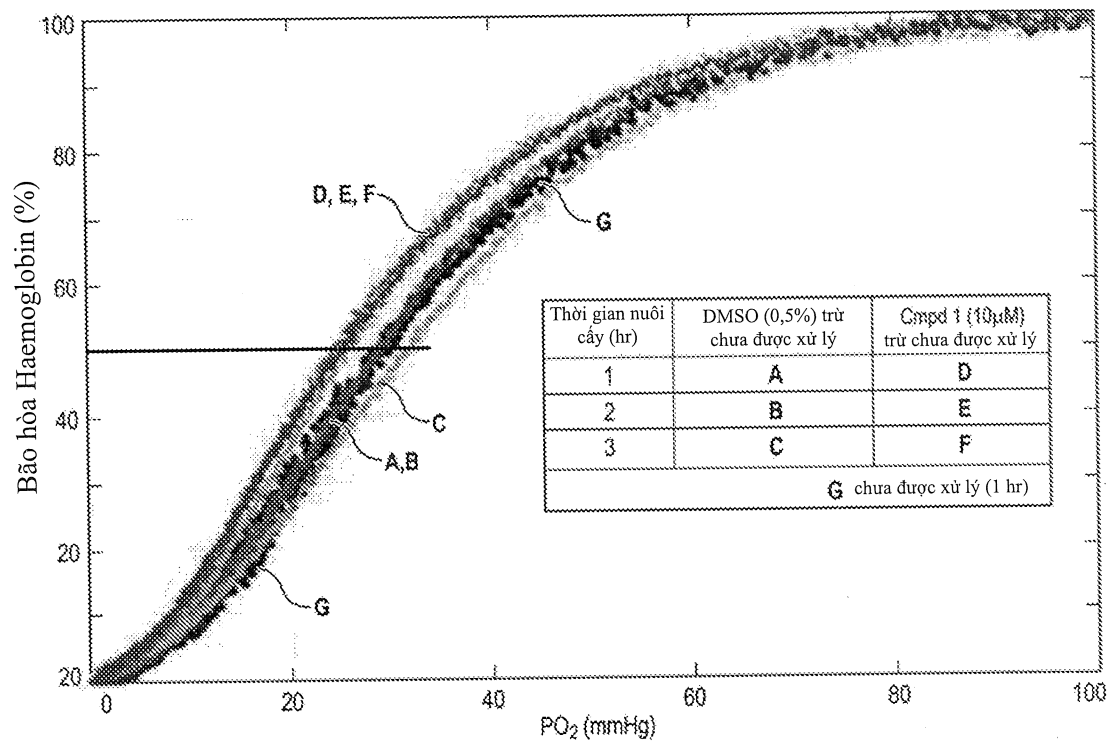


Fig. 8B

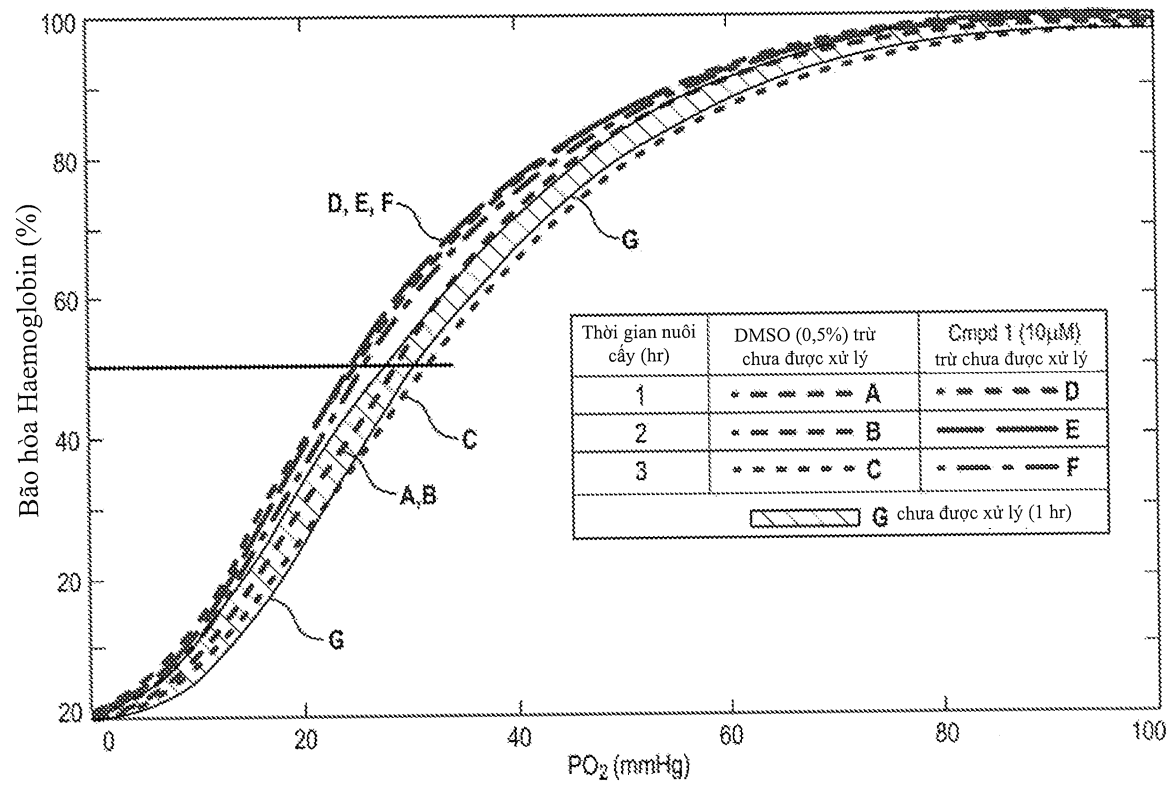


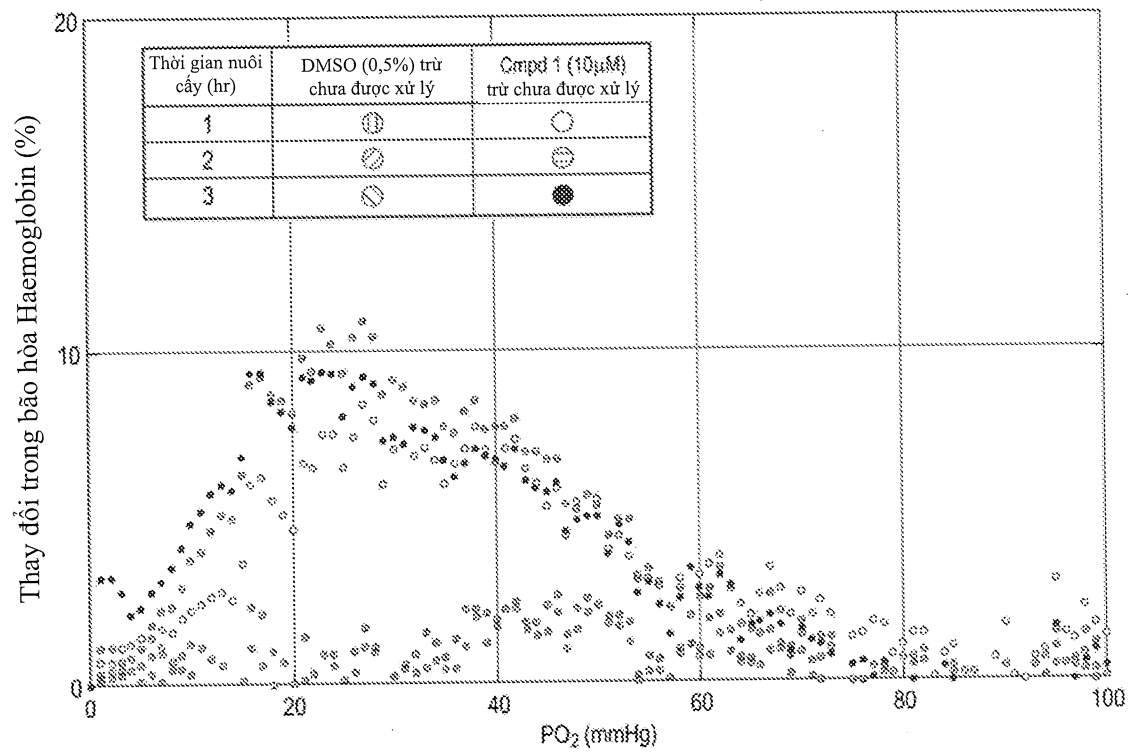
Fig. 9

Fig. 10

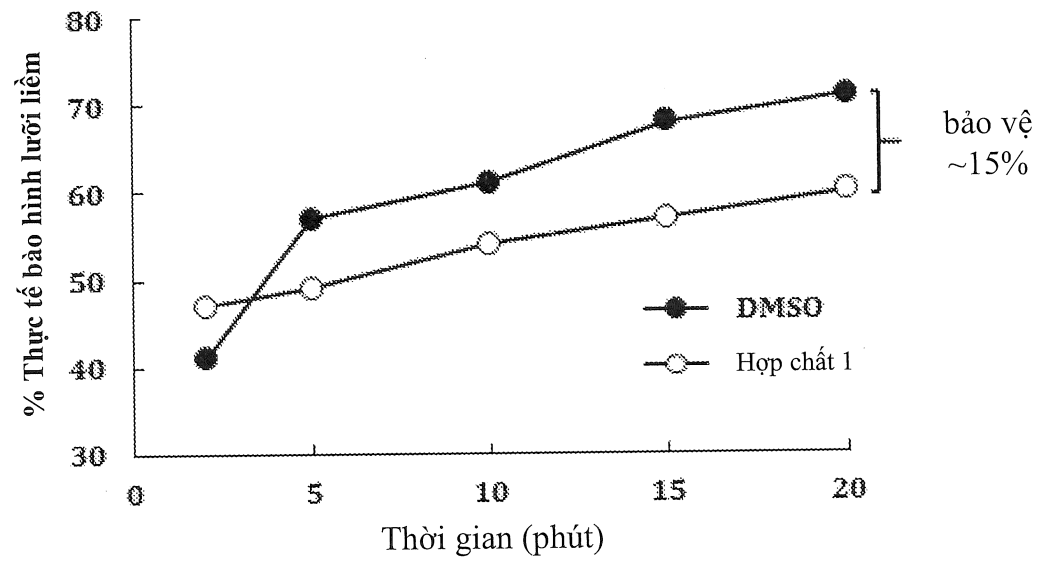


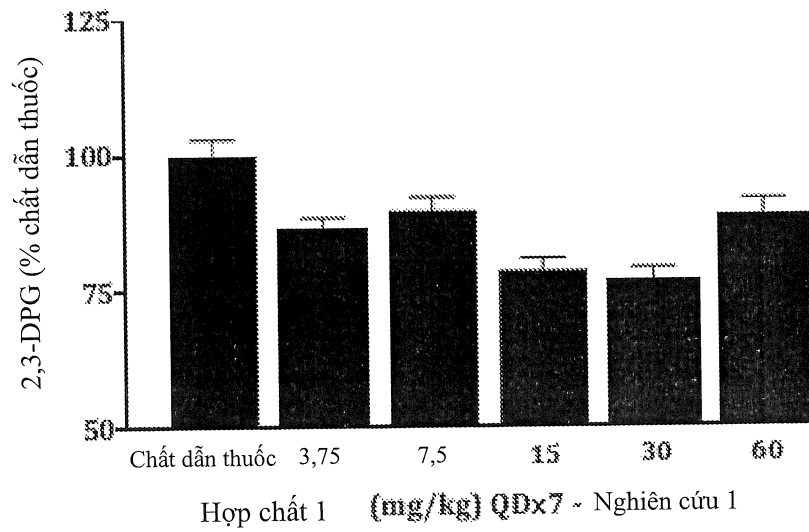
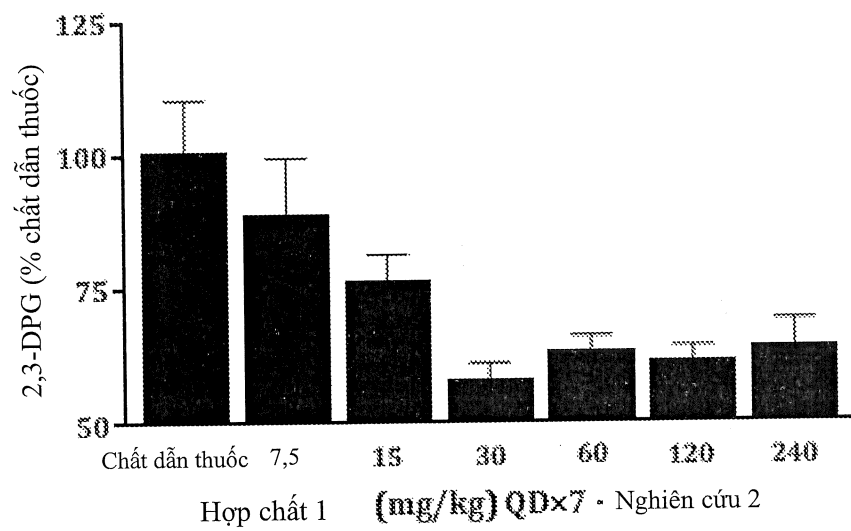
Fig. 11A**Fig. 11B**

Fig. 12

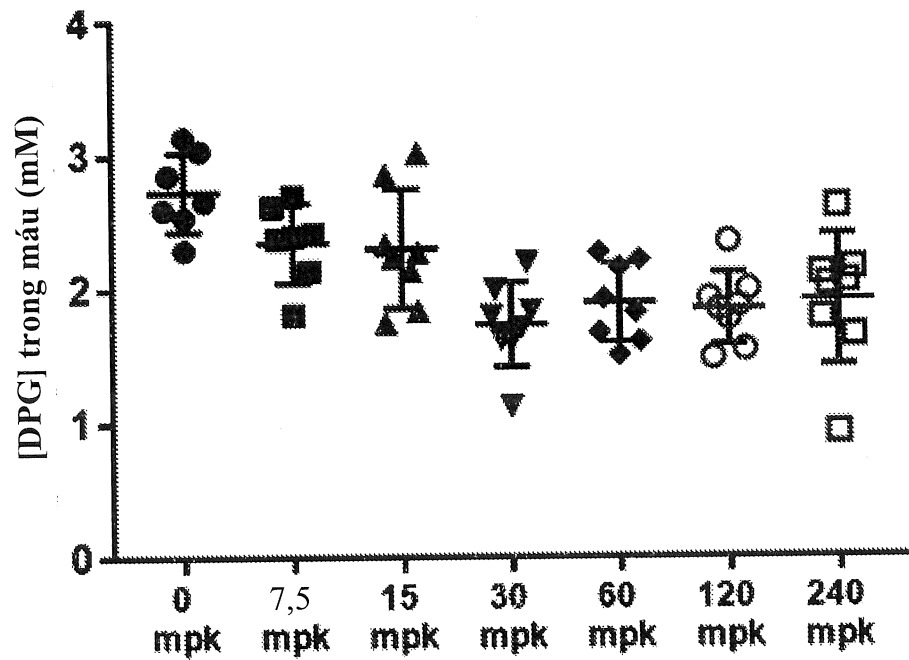


Fig. 13A

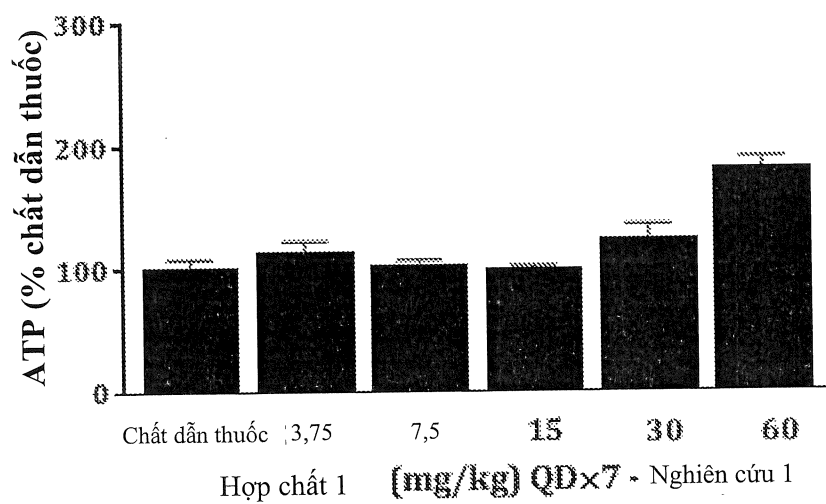


Fig. 13B

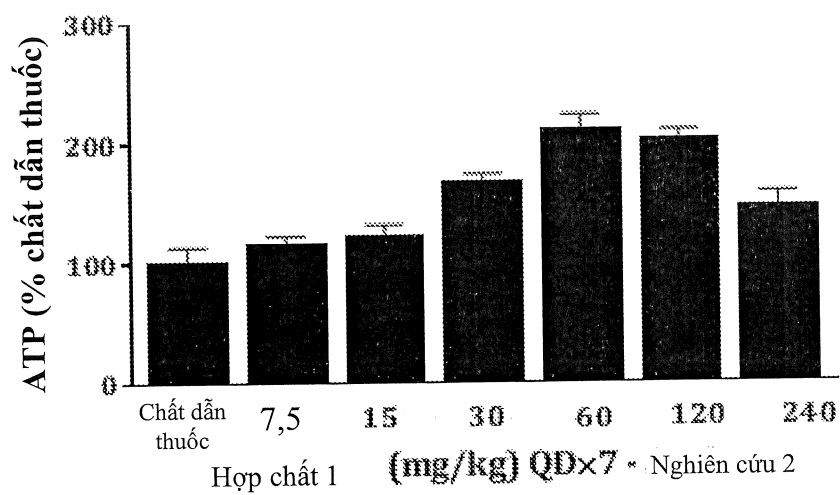


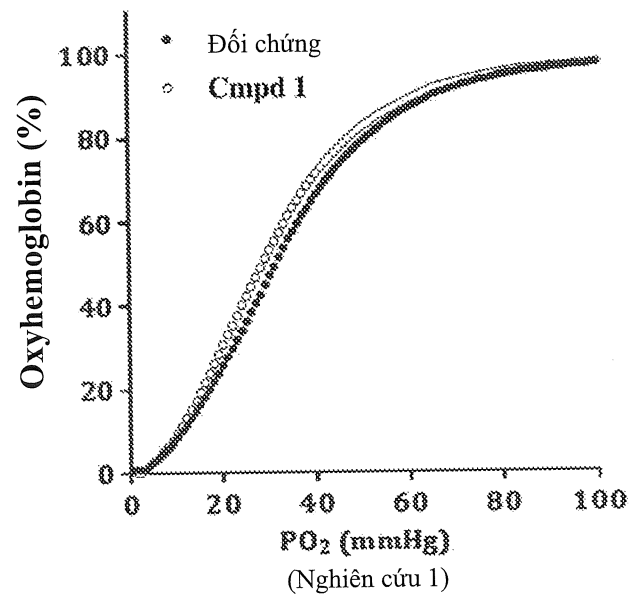
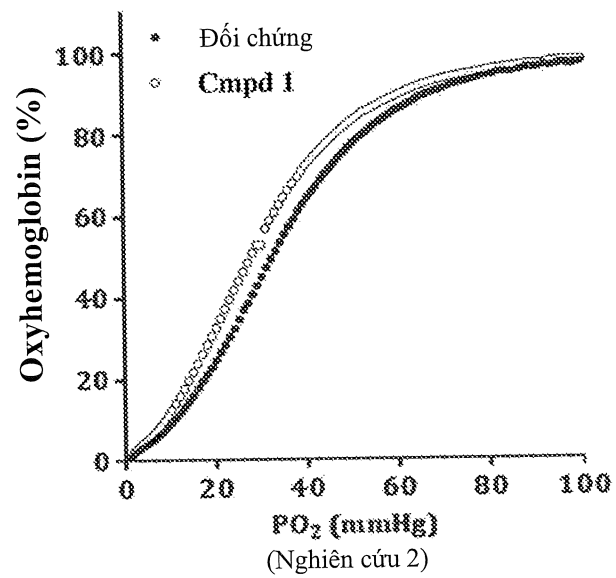
Fig. 14A**Fig. 14B**

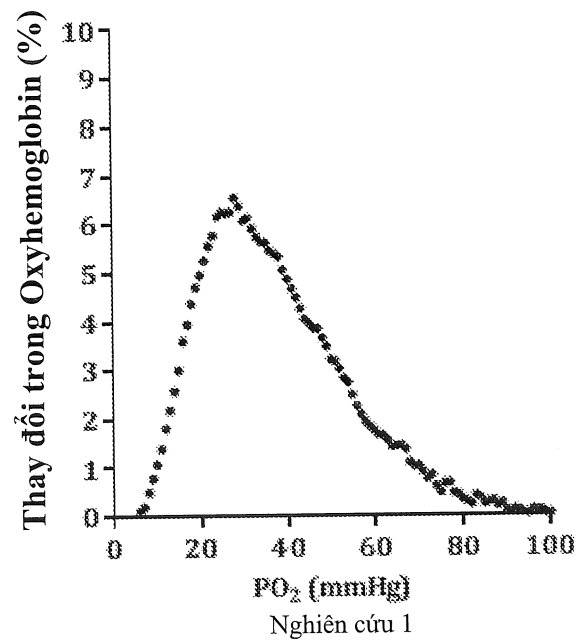
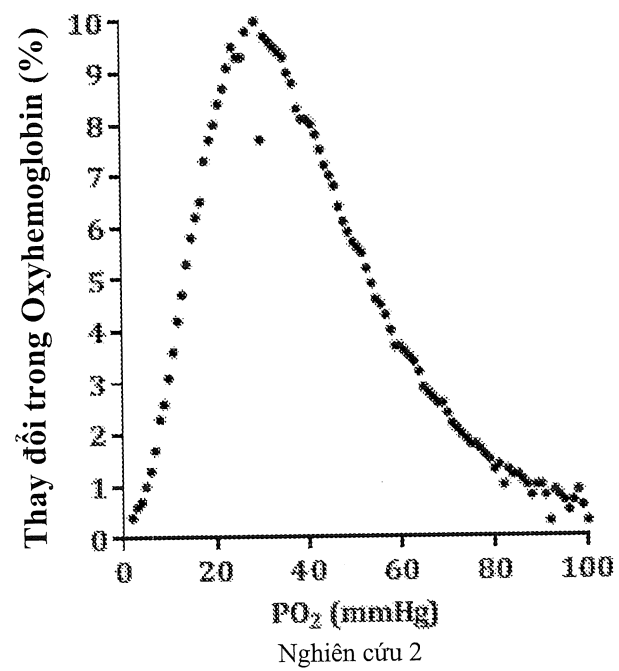
Fig. 15A**Fig. 15B**

Fig. 16

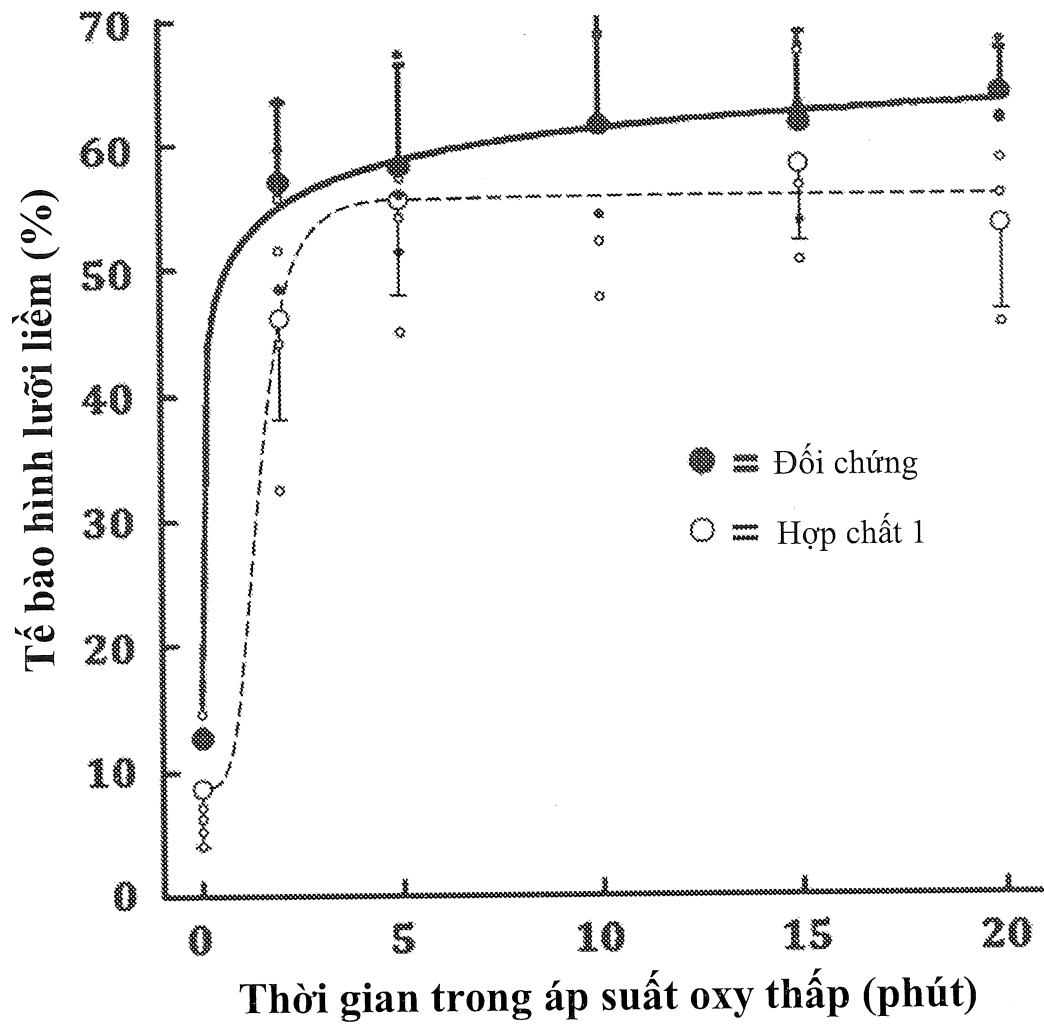


Fig. 17

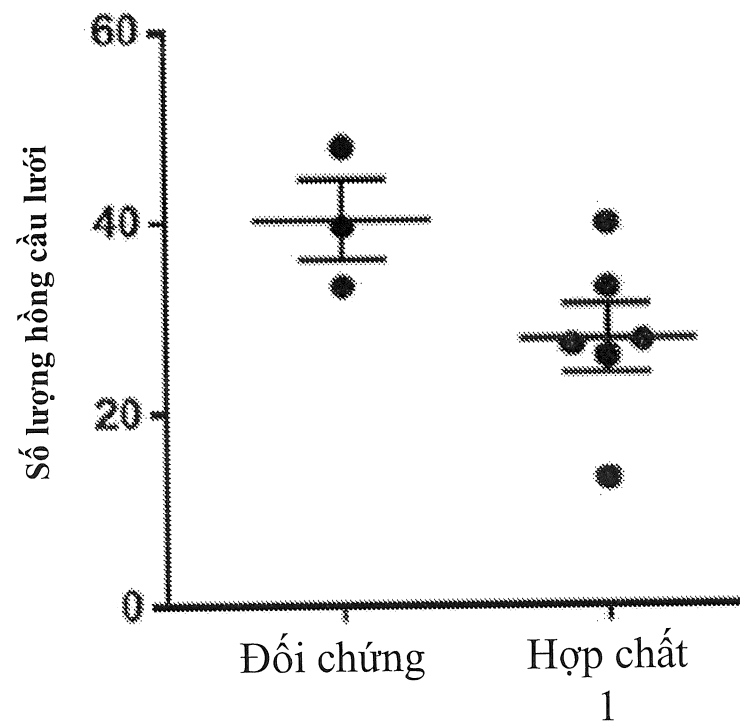


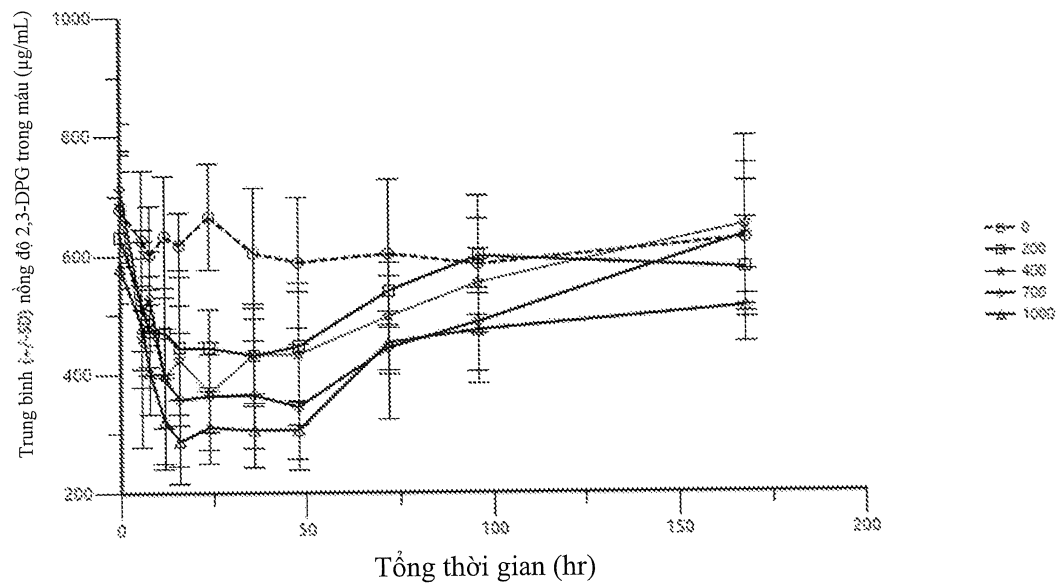
Fig. 18

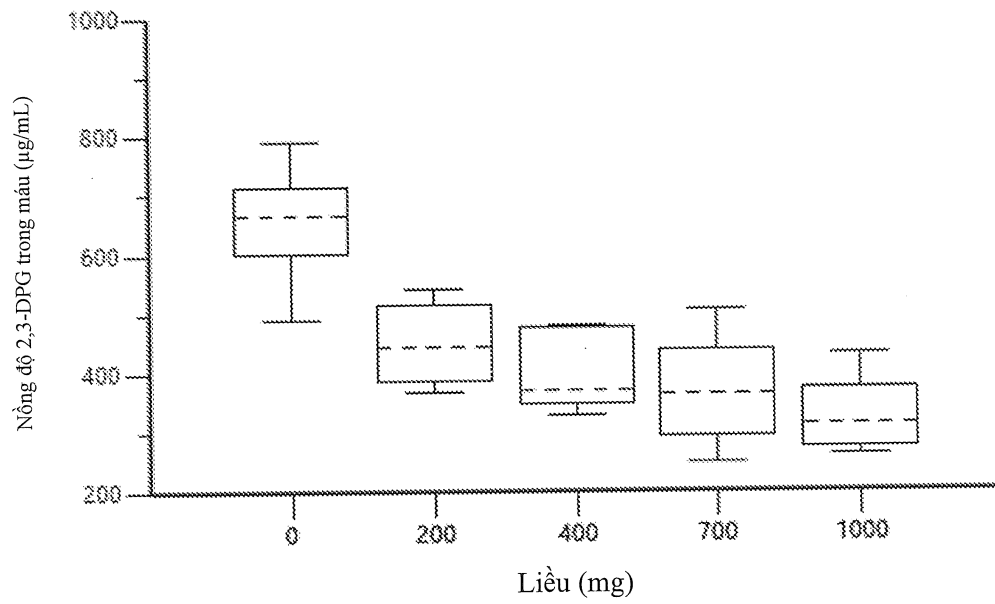
Fig. 19

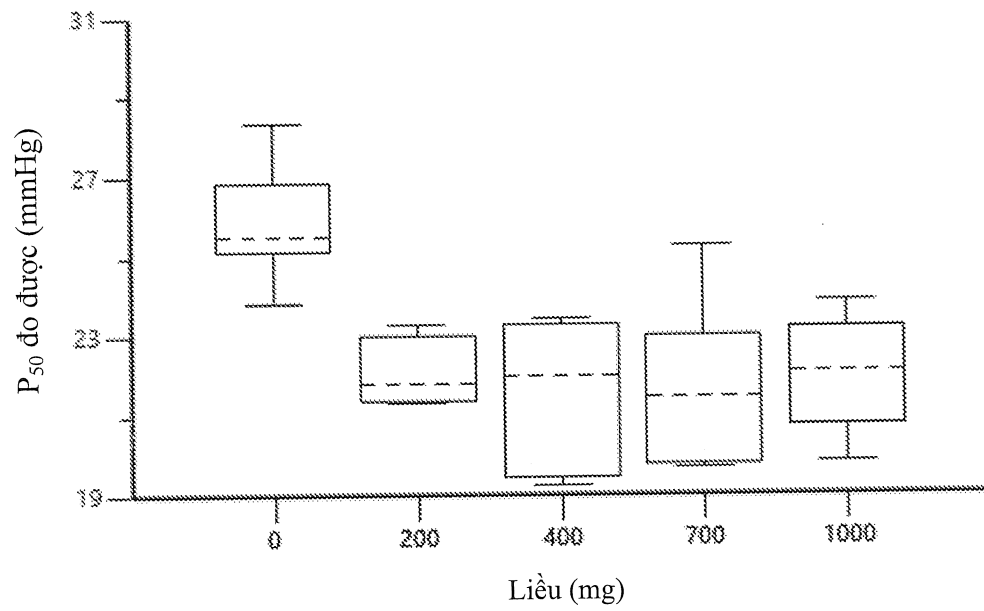
Fig. 20

Fig. 21

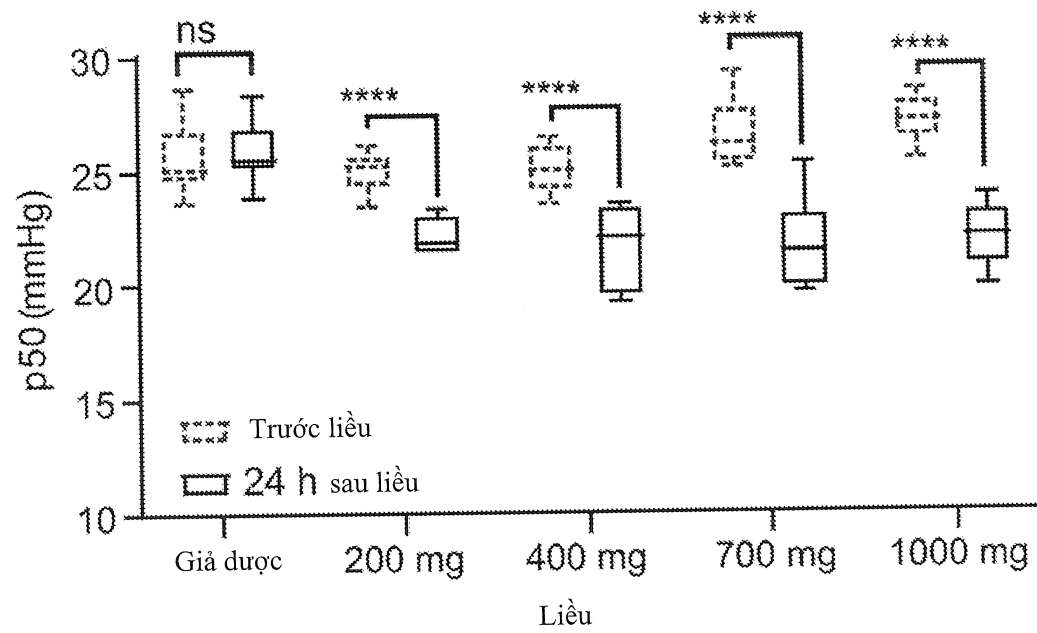


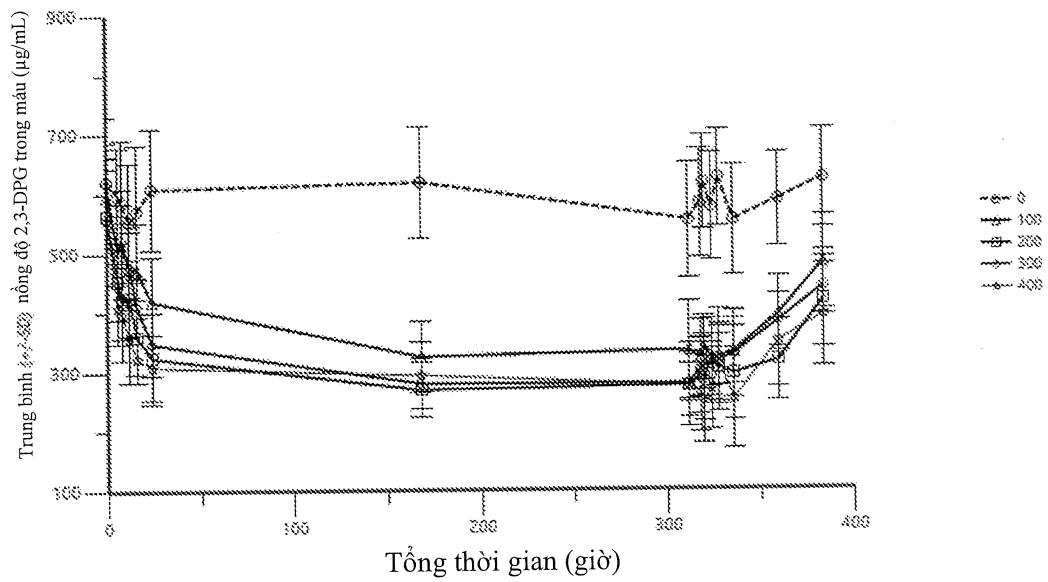
Fig. 22

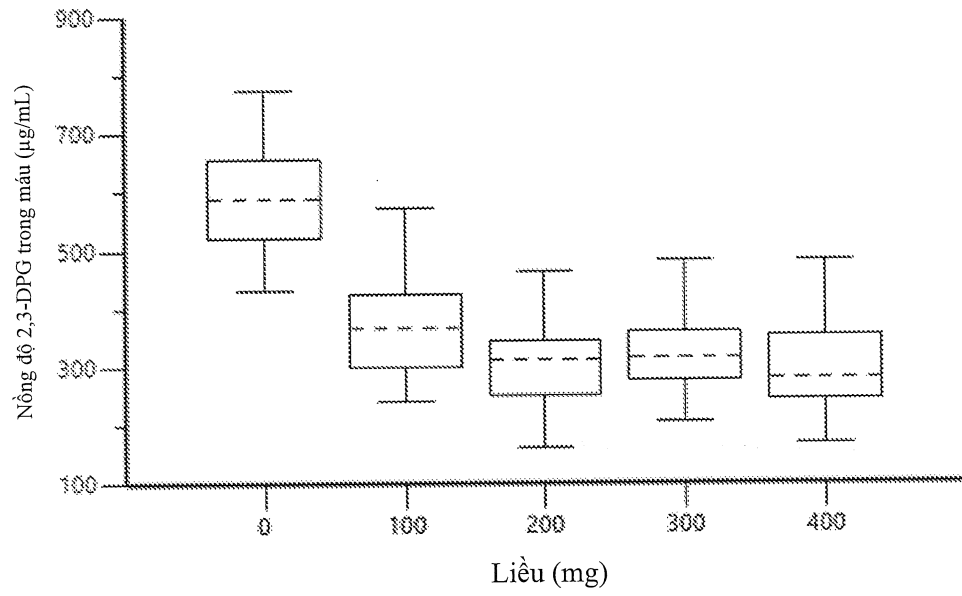
Fig. 23

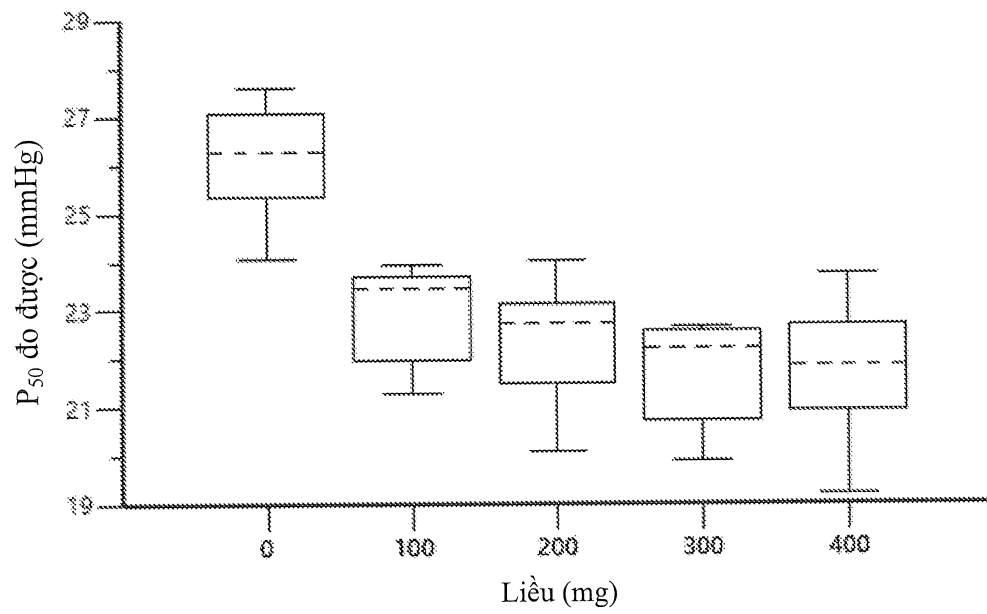
Fig. 24

Fig. 25

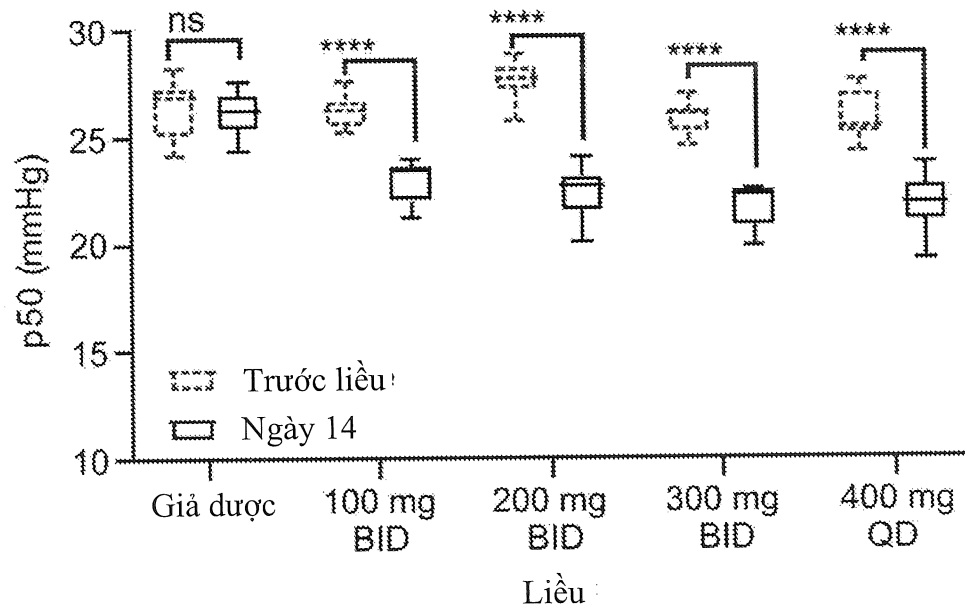


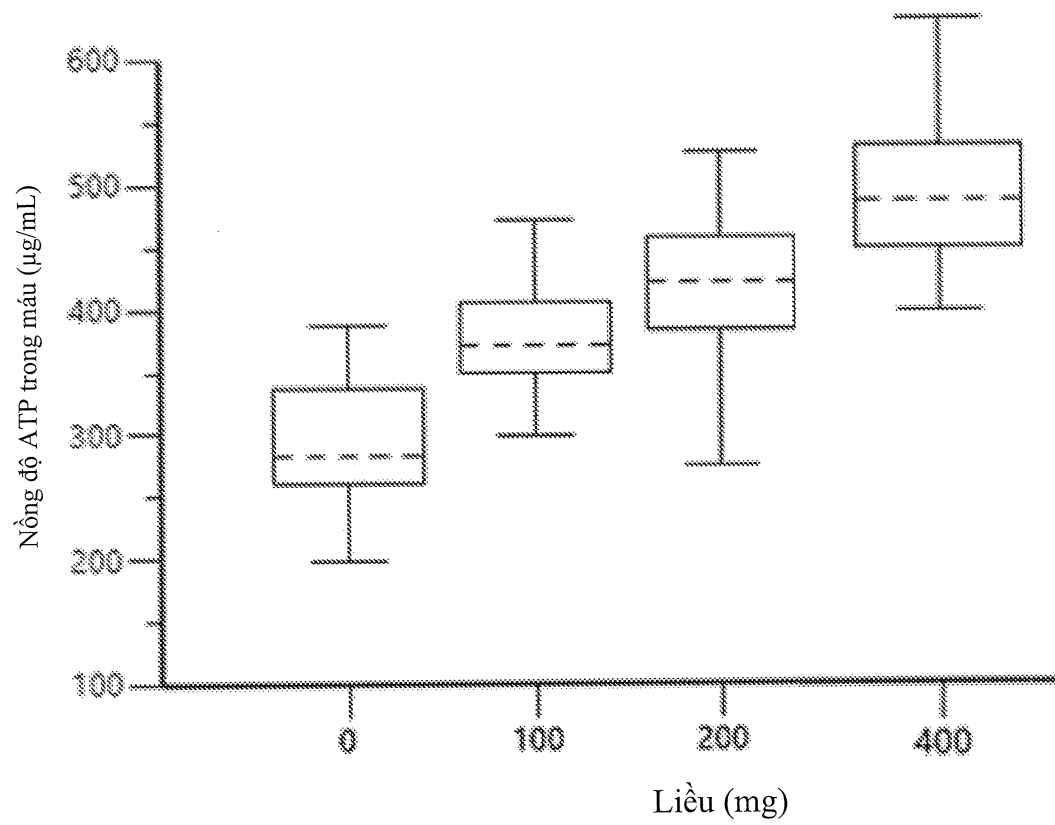
Fig. 26

Fig. 27

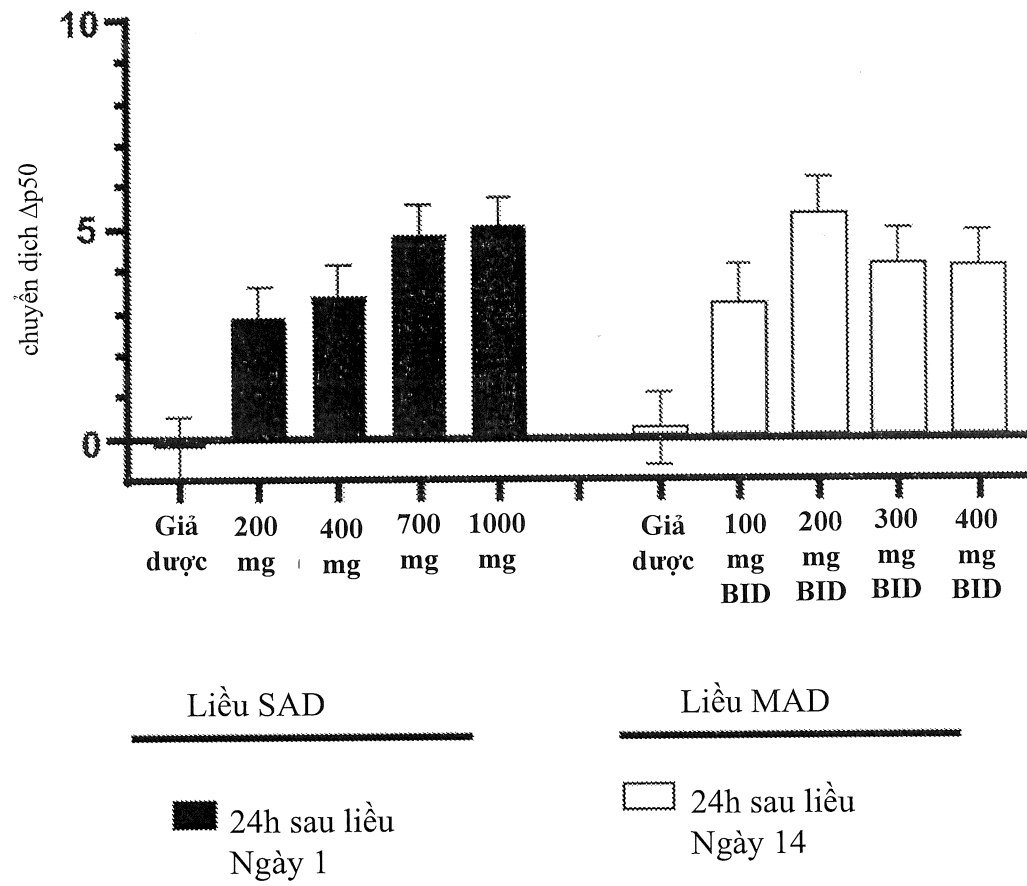


Fig. 28

400 mg SAD

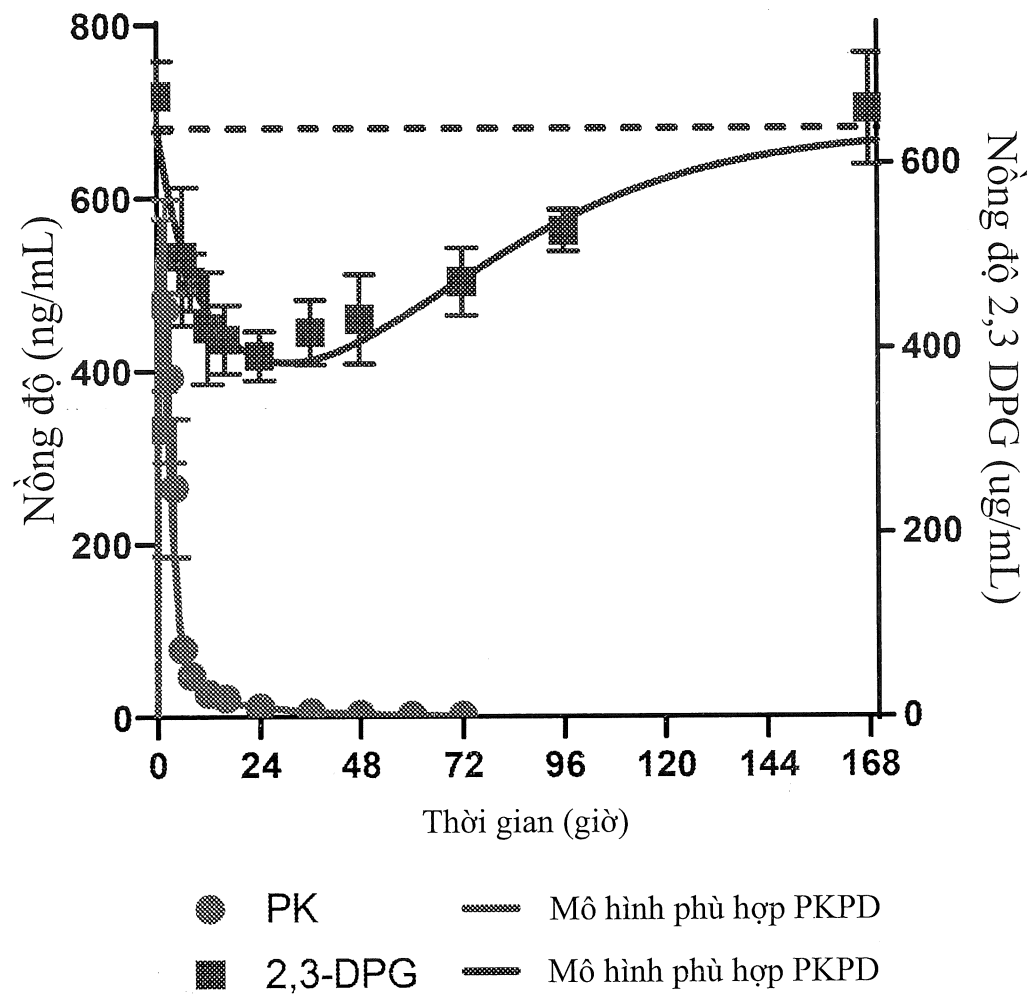
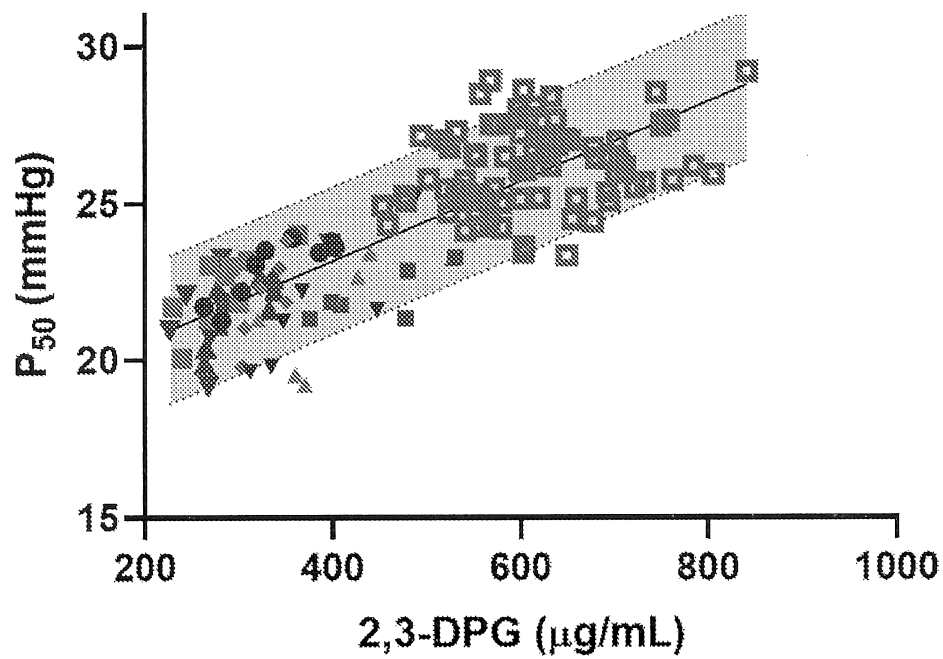


Fig. 29

Sức khỏe tình nguyện viên
 P_{50} với 2,3-DPG



■ Đường cơ sở

- | | |
|---------------|------------------|
| ■ 200 mg SAD | ● 100 mg BID MAD |
| ▲ 400 mg SAD | ■ 200 mg BID MAD |
| ▼ 700 mg SAD | ▲ 300 mg BID MAD |
| ◆ 1000 mg SAD | ▼ 400 mg QD MAD |