



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)  
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0051716

(51)<sup>2020.01</sup> A61K 31/4725; C07D 401/06; A61P  
25/00

(13) B

(21) 1-2022-00403

(22) 29/06/2020

(86) PCT/EP2020/068181 29/06/2020

(87) WO2021/001286 07/01/2021

(30) 19183641.0 01/07/2019 EP

(45) 25/09/2025 450

(43) 25/04/2022 409A

(73) UCB Biopharma SRL (BE)

60, Allée de la Recherche, 1070 Brussels, Belgium

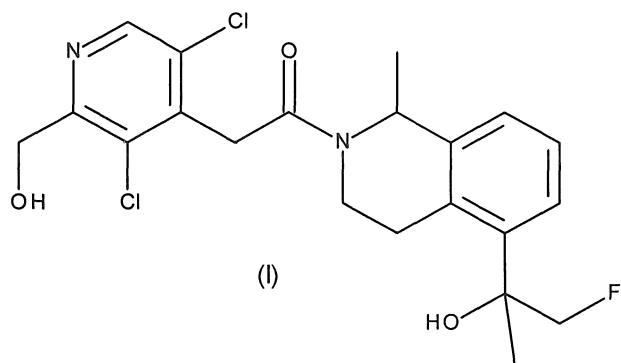
(72) VALADE Anne (FR).

(74) Công ty TNHH Sở hữu trí tuệ Thảo Thọ Quyền (INVENCO.,LTD)

(54) DẪN XUẤT TETRAHYDROISOQUINOLIN ĐƯỢC THỂ VÀ DƯỢC PHẨM  
CHỨA DẪN XUẤT NÀY

(21) 1-2022-00403

(57) Sáng chế đề cập đến các hợp chất có công thức (I),



mà là các chất điều biến hoạt tính dương tính với D1 và do đó có lợi làm được chất để điều trị bệnh có liên quan đến các thụ thể D1.

### **Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập**

Sáng chế đề cập đến dẫn xuất tetrahydroisoquinolin dùng trong điều trị. Cụ thể là sáng chế đề cập đến dẫn xuất tetrahydroisoquinolin được thể có hoạt tính được dụng. Hợp chất này hoạt động như một chất điều biến hoạt tính dương tính với D1 và do đó có lợi làm được chất để điều trị bệnh có liên quan đến các thụ thể D1.

### **Tình trạng kỹ thuật của sáng chế**

Monoamin dopamin hoạt động thông qua hai họ GPCR để điều biến chức năng vận động, cơ chế khen thưởng, quá trình nhận thức và các chức năng sinh lý khác. Cụ thể là, dopamin hoạt động dựa trên các noron thông qua các thụ thể giống D1, bao gồm dopamin D1 và D5, mà chủ yếu liên kết với protein G Gs và nhờ đó kích thích sự tổng hợp cAMP, các thụ thể giống D2, mà bao gồm D2, D3 và D4, mà gắn kết với các protein G Gi/q và làm giảm sự tổng hợp cAMP. Các thụ thể này được biểu hiện rộng rãi ở các vùng khác nhau trên não. Cụ thể là, các thụ thể D1 tham gia vào nhiều chức năng sinh lý và các quá trình hành vi. Các thụ thể D1, ví dụ, có liên quan đến độ mềm dẻo của khớp thần kinh, chức năng nhận thức và các chức năng vận động hướng đích, các thụ thể này cũng tham gia vào các quá trình khen thưởng. Do chúng có vai trò trong một số quá trình sinh lý/thần kinh, các thụ thể D1 có liên quan đến nhiều rối loạn bao gồm các triệu chứng tiêu cực và nhận thức ở bệnh tâm thần phân liệt, suy giảm nhận thức có liên quan đến liệu pháp chống loạn thần cổ điển, hội chứng xung động, rối loạn tăng động giảm chú ý (ADHD), bệnh Parkinson và các rối loạn vận động có liên quan, rối loạn trương lực, bệnh Huntington, chứng sa sút trí tuệ kèm thể Lewy, bệnh Alzheimer, chứng suy giảm nhận thức có liên quan đến tuổi, suy giảm nhận thức nhẹ (mild cognitive impairment-MCI), rối loạn giấc ngủ do lệ thuộc thuốc, chứng lãnh đạm.

Đã được chứng minh là khó phát triển các phân tử nhỏ có sinh khả dụng qua đường miệng nhằm vào các thụ thể D1. Các chất chủ vận D1 được phát triển cho đến nay thường được đặc trưng bởi một gốc catechol và do đó việc sử dụng chúng trong

lâm sàng bị giới hạn ở các liệu pháp điều trị xâm lấn. Việc đạt được tính chọn lọc đủ cũng là thách thức do mức tương đồng cao ở vị trí gắn kết phối tử giữa các typ phụ của thụ thể dopamin (ví dụ, dopamin D1 và D5). Ngoài ra, các chất chủ vận D1 có liên quan đến các tác dụng phụ giới hạn tiềm ẩn bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở chứng rối loạn vận động và chứng giảm huyết áp.

Do đó, vẫn còn nhu cầu về việc tạo ra các chất mới mà có thể điều biến các thụ thể D1.

Vẫn còn nhiều sự quan tâm trong việc xác định các chất điều biến hoạt tính của GPCR, vừa làm các công cụ để hiểu được các cơ chế của thụ thể vừa làm các chất điều trị tiềm năng. Các GPCR đại diện cho họ lớn nhất của các thụ thể trên bề mặt tế bào và một số lượng lớn thuốc bán trên thị trường trực tiếp hoạt hóa hoặc phong bế các con đường truyền tín hiệu qua trung gian các thụ thể này. Tuy nhiên, một vài GPCR (ví dụ, các thụ thể peptid), đã được chứng minh là thách thức khi phát triển các phân tử nhỏ hoặc để đạt được đủ độ chọn lọc do mức tương đồng cao ở vị trí gắn kết với phối tử giữa các typ phụ (ví dụ, dopamin D1 và D5 hoặc D2 và D3). Do đó, nhiều nghiên cứu thuốc đã chuyển sang việc xác định các phân tử nhỏ mà nhắm vào các vị trí khác biệt với chất chủ vận tự nhiên đồng lập thể. Các phối tử mà gắn kết với các vị trí này sẽ gây ra sự thay đổi cấu hình ở GPCR nhờ đó điều biến hoạt tính chức năng của thụ thể. Các phối tử chuyển hoạt tính có phạm vi hoạt tính đa dạng bao gồm khả năng làm cho có tiềm năng (chất điều biến hoạt tính dương, PAM) hoặc làm suy giảm (chất điều biến hoạt tính âm, NAM) các tác dụng của phối tử nội sinh, bằng cách tác động đến ái lực và/hoặc hiệu quả. Cũng như tính chọn lọc typ phụ, các chất điều biến hoạt tính có thể có các lợi thế tiềm năng khác từ quan điểm khám phá dược chất như không tác dụng trực tiếp hoặc hiệu quả thực sự; chỉ tăng cường tác dụng của chất dẫn truyền nguyên thể tại vị trí và khi nó được giải phóng; xu hướng gây khử nhạy giảm khi tiếp xúc ổn định với chất chủ vận cũng như là xu hướng gây ra các tác dụng phụ có liên quan đến đích giảm.

Các hợp chất theo sáng chế làm tăng cường tác dụng của các chất chủ vận D1 hoặc của phối tử nội sinh trên các thụ thể D1 thông qua cơ chế chuyển hoạt tính, và do đó là chất điều biến hoạt tính dương tính với D1 (D1 PAM).

Hợp chất theo sáng chế, mà là D1 PAM, do đó sẽ có lợi trong điều trị và/hoặc phòng ngừa các bệnh hoặc rối loạn mà liên quan đến các thụ thể D1. Các bệnh như vậy bao gồm các dấu hiệu về nhận thức và tiêu cực ở bệnh tâm thần phân liệt, suy giảm nhận thức có liên quan đến liệu pháp dùng thuốc an thần, suy giảm nhận thức nhẹ (Mild cognitive impairment-MCI), bốc hỏa, rối loạn tăng động giảm tập trung (Attention-Deficit Hyperactivity Disorder-ADHD), bệnh Parkinson và các rối loạn vận động khác, rối loạn trương lực, chứng sa sút trí tuệ Parkinson, bệnh Huntington, chứng sa sút trí tuệ kèm thể Lewy, bệnh Alzheimer, chứng lệ thuộc thuốc, rối loạn giấc ngủ, bệnh lãnh cảm, tổn thương tủy sống hoặc đau do bệnh thần kinh.

Công bố đơn quốc tế số WO 2013/051869 A1 mô tả các dẫn xuất 3,4-dihydro-1H-isoquinolin-2-yl nhất định mà là các chất đối kháng NK2.

Công bố đơn quốc tế số WO2008/109336 A1 mô tả các hợp chất tetrahydroisoquinolin nhất định mà là các chất điều biến của các thụ thể histamin H3.

Công bố đơn quốc tế số WO2014/193781 A1 mô tả các dẫn xuất 3,4-dihydroisoquinolin-2(1H)-yl nhất định hữu dụng để điều trị chứng suy giảm nhận thức có liên quan đến bệnh Parkinson hoặc bệnh tâm thần phân liệt.

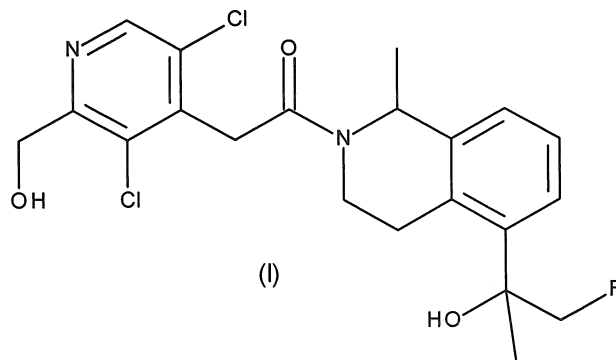
Công bố đơn quốc tế số WO2016/055479 mô tả các dẫn xuất 3,4-dihydroisoquinolin-2(1H)-yl được thể và các chất tương tự của chúng mà có thể hữu dụng để điều trị các bệnh có liên quan đến các thụ thể D1.

Công bố đơn quốc tế số WO2019/204418 mô tả các dẫn xuất pyrazo-tetrahydroisoquinolin nhất định mà là các chất điều biến hoạt tính dương tính với D1 và có thể là hữu dụng để điều trị bệnh Parkinson và các rối loạn vận động khác, bệnh Alzheimer, bệnh tâm thần phân liệt, và rối loạn tăng động giảm tập trung (Attentiondeficit hyperactivity disorder-ADHD).

Tuy nhiên, vẫn còn nhu cầu phát triển các chất điều biến hoạt tính dương tính với D1 hiệu quả kết hợp được cả các đặc tính dược lực học và dược động học có lợi đồng thời làm giảm các tác dụng phụ truyền thống đi kèm với các phương pháp điều trị có liên quan đến các chất chủ vận D1 chọn lọc, như ví dụ các rối loạn vận động hoặc rối loạn nhận thức.

### **Bản chất kỹ thuật của sáng chế**

Sáng chế đề cập đến hợp chất 2-[3,5-diclo-2-(hydroxymetyl)-4-pyridyl]-1-[5-[2-flu-1-hydroxy-1-metyl-etyl]-1-metyl-3,4-dihydro-1H-isoquinolin-2-yl]etenon có công thức (I),



hoặc muối dược dụng của nó.

Hợp chất theo sáng chế được bộc lộ trong phạm vi chung của công bố đơn quốc tế số WO2016/055479. Tuy nhiên, tài liệu này không bộc lộ riêng hợp chất có công thức (I) như được bộc lộ trên đây, hoặc muối dược dụng của nó.

Sáng chế cũng đề cập đến hợp chất có công thức (I) như nêu trên hoặc muối dược dụng của nó, dùng để điều trị.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế cũng đề cập đến hợp chất có công thức (I) như nêu trên, hoặc muối dược dụng của nó, dùng để điều trị và/hoặc phòng ngừa bệnh và/hoặc rối loạn có liên quan đến các thụ thể D1.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến hợp chất có công thức (I) như nêu trên, hoặc muối dược dụng của nó, dùng để điều trị và/hoặc phòng ngừa các triệu chứng tiêu cực và nhận thức ở bệnh tâm thần phân liệt, suy giảm nhận thức có liên quan đến liệu pháp sử dụng thuốc an thần, suy giảm nhận thức nhẹ (MCI), hội chứng xung động, rối loạn tăng động giảm chú ý (Attention-Deficit Hyperactivity Disorder-ADHD), bệnh Parkinson và rối loạn vận động khác, rối loạn trương lực, chứng mất trí do Parkinson, bệnh Huntington, chứng sa sút trí tuệ kèm thể Lewy, bệnh Alzheimer, chứng lệ thuộc thuốc, rối loạn giấc ngủ, chứng lãnh đạm, chấn thương cột sống hoặc đau do bệnh thần kinh.

Theo một phương án cụ thể của khía cạnh này, sáng chế đề cập đến hợp chất có công thức (I) như nêu trên, hoặc muối dược dụng của nó để điều trị bệnh Parkinson và

các rối loạn vận động khác, bệnh Alzheimer, hoặc hoặc các triệu chứng tiêu cực và nhận thức ở bệnh tâm thần phân liệt.

Do đó, theo một khía cạnh cụ thể, sáng chế đề cập đến hợp chất có công thức (I), như nêu trên, hoặc muối dược dụng của nó, dùng để điều trị bệnh Parkinson và các rối loạn vận động khác.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến việc sử dụng hợp chất có công thức (I) như nêu trên, hoặc muối dược dụng của nó, để sản xuất thuốc hữu dụng để điều trị và/hoặc phòng ngừa bệnh và/hoặc rối loạn có liên quan đến các thụ thể D1.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến việc sử dụng hợp chất có công thức (I) như nêu trên, hoặc muối dược dụng của nó, để sản xuất thuốc hữu dụng để điều trị và/hoặc phòng ngừa các triệu chứng tiêu cực và nhận thức ở bệnh tâm thần phân liệt, suy giảm nhận thức có liên quan đến liệu pháp sử dụng thuốc an thần, suy giảm nhận thức nhẹ (MCI), hội chứng xung động, rối loạn tăng động giảm chú ý (ADHD), bệnh Parkinson và rối loạn vận động khác, rối loạn trương lực, chứng mất trí do Parkinson, bệnh Huntington, chứng sa sút trí tuệ kèm thể Lewy, bệnh Alzheimer, chứng lệ thuộc thuốc, rối loạn giấc ngủ, chứng lãnh đạm, chấn thương cột sống hoặc đau do bệnh thần kinh.

Theo một phương án cụ thể của khía cạnh này, sáng chế đề cập đến việc sử dụng hợp chất có công thức (I) như nêu trên, hoặc muối dược dụng của nó để sản xuất thuốc hữu dụng để điều trị bệnh Parkinson và các rối loạn vận động khác, bệnh Alzheimer, hoặc các triệu chứng tiêu cực và nhận thức ở bệnh tâm thần phân liệt.

Theo một khía cạnh cụ thể, sáng chế đề xuất việc sử dụng hợp chất có công thức (I), như nêu trên, hoặc muối dược dụng của nó, để sản xuất thuốc hữu dụng để điều trị bệnh Parkinson và các rối loạn vận động khác.

Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp điều trị và/hoặc phòng ngừa các rối loạn mà được chỉ định sử dụng chất điều biến hoạt tính dương tính D1, mà bao gồm cho bệnh nhân cần điều trị sử dụng một lượng hữu hiệu của hợp chất có công thức (I) như nêu trên, hoặc muối dược dụng của nó.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp điều trị và/hoặc phòng ngừa các triệu chứng tiêu cực và nhận thức ở bệnh tâm thần phân liệt, suy giảm nhận thức có liên quan đến liệu pháp dùng thuốc an thần, suy giảm nhận thức nhẹ

(MCI), bốc hỏa, rối loạn tăng động giảm tập trung (ADHD), bệnh Parkinson và các rối loạn vận động khác, rối loạn trương lực, chứng sa sút trí tuệ Parkinson, bệnh Huntington, chứng sa sút trí tuệ kèm thể Lewy, bệnh Alzheimer, chứng lệ thuộc thuốc, rối loạn giấc ngủ, bệnh lãnh cảm, tổn thương tủy sống hoặc đau do bệnh thần kinh, mà bao gồm cho bệnh nhân cần điều trị sử dụng một lượng hữu hiệu của hợp chất có công thức (I) như nêu trên, hoặc muối được dụng của nó.

Theo một phương án cụ thể của khía cạnh này, sáng chế đề cập đến phương pháp điều trị bệnh Parkinson và các rối loạn vận động khác, bệnh Alzheimer, hoặc các triệu chứng tiêu cực và nhận thức ở bệnh tâm thần phân liệt, mà bao gồm cho bệnh nhân cần điều trị sử dụng một lượng hữu hiệu của hợp chất có công thức (I) như nêu trên, hoặc muối được dụng của nó.

Theo một khía cạnh cụ thể, sáng chế đề cập đến phương pháp điều trị bệnh Parkinson và các rối loạn vận động khác, mà bao gồm cho bệnh nhân cần điều trị sử dụng một lượng hữu hiệu của hợp chất có công thức (I) như nêu trên, hoặc muối được dụng của nó.

### Mô tả chi tiết sáng chế

Để sử dụng trong dược phẩm, các muối của hợp chất có công thức (I) phải là các muối được dụng. Tuy nhiên, các muối khác, có thể hữu dụng để điều chế hợp chất có công thức (I) hoặc các muối được dụng của nó. Các nguyên tắc chuẩn để chọn lọc và điều chế các muối được dụng này được mô tả, ví dụ, trong tài liệu *Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection và Use*, ed. P.H. Stahl & C.G. Wermuth, Wiley-VCH, 2002. Các muối được dụng thích hợp của hợp chất có công thức (I) bao gồm các muối cộng axit mà có thể được tạo thành bằng cách trộn dung dịch của hợp chất có công thức (I) với dung dịch của một axit được dụng chẳng hạn.

Cần hiểu rằng mỗi nguyên tử riêng lẻ có mặt trong công thức (I), hoặc trong công thức được mô tả sau đây, thực tế có thể có mặt ở dạng đồng vị bất kỳ trong số các đồng vị có nguồn gốc trong tự nhiên của nó, trong đó ưu tiên (các) đồng vị có nhiều nhất. Do đó, bằng cách ví dụ, mỗi nguyên tử hydro riêng lẻ có mặt trong công thức (I), hoặc trong công thức được mô tả sau đây, có thể có mặt ở dạng nguyên tử  $^1\text{H}$ ,  $^2\text{H}$  (đơteri) hoặc  $^3\text{H}$  (trititi), tốt hơn là  $^1\text{H}$ . Tương tự, bằng cách ví dụ, mỗi nguyên tử



cacbon riêng lẻ có mặt trong công thức (I), hoặc trong công thức được mô tả sau đây, có thể có mặt dưới dạng nguyên tử  $^{12}\text{C}$ ,  $^{13}\text{C}$  hoặc  $^{14}\text{C}$ , tốt hơn là  $^{12}\text{C}$ .

Sáng chế còn bao gồm các solvat của các hợp chất có công thức (I) trên đây trong phạm vi của sáng chế. Các solvat như vậy có thể được tạo thành với các dung môi hữu cơ thông thường hoặc nước.

Sáng chế cũng bao gồm trong phạm vi của nó các đồng tinh thể của các hợp chất có công thức (I) trên đây. Thuật ngữ kỹ thuật “đồng tinh thể” được sử dụng để mô tả tình trạng trong đó các thành phần phân tử trung tính có mặt trong hợp chất tinh thể với tỷ lệ tỷ lệ lượng xác định. Quy trình điều chế các đồng tinh thể được chất cho phép tiến hành các cải biến đối với dạng tinh thể của dược chất, mà kết quả là có thể làm thay đổi các đặc tính hóa lý của nó mà không làm ảnh hưởng đến hoạt tính sinh học được dự tính của nó (xem tài liệu *Pharmaceutical Salts và Co-crystals*, ed. J. Wouters & L. Quere, RSC Publishing, 2012).

Các hợp chất theo sáng chế có thể tồn tại ở các dạng đa hình khác nhau. Mặc dù không được chỉ ra rõ ràng trong công thức trên đây, song các dạng này được dự định là được bao gồm trong phạm vi của sáng chế.

Sáng chế cũng bao gồm trong phạm vi của nó các dạng tiền dược chất của các hợp chất có công thức (I) và các phạm vi nhỏ và các nhóm nhỏ của nó.

Hợp chất có công thức (I) chứa 2 tâm bất đối và do đó tồn tại dưới dạng các chất đồng phân không đối quang. Sáng chế được hiểu là mở rộng đến việc sử dụng các chất đồng phân không đối quang này, và hỗn hợp của chúng theo tỷ lệ bất kỳ. Do đó, hợp chất có công thức (I) được dự định là đại diện cho tất cả các chất đồng phân lập thể riêng rẽ và tất cả hỗn hợp có thể có của chúng, trừ khi được chỉ ra hoặc thể hiện theo cách khác.

Một khía cạnh cụ thể theo sáng chế đề xuất hợp chất 2-[3,5-diclo-2-(hydroxymetyl)-4-pyridyl]-1-[(1S)-5-[(1S)-2-flo-1-hydroxy-1-metyl-etyl]-1-metyl-3,4-dihydro-1H-isoquinolin-2-yl]etenon có công thức (IA),

CC(C)(O)CC

Để điều trị các bệnh, hợp chất có công thức (I) hoặc muối được dụng của nó có thể sử dụng với liều hằng ngày hữu hiệu và được sử dụng ở dạng dược phẩm.

Để bào chế được phẩm theo sáng chế, một hoặc nhiều hợp chất có công thức (I) muối được dụng của nó được trộn kỹ với chất mang hoặc chất pha loãng được theo các kỹ thuật bào chế thông thường đã biết đối với người thực hành có hiểu biết bình thường trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Dược phẩm theo sáng chế có thể được dùng qua đường miệng, ngoài đường  
 óa chẳng hạn, tức là, trong tĩnh mạch, trong cơ hoặc dưới da, nội tủy mạc, bằng  
 không hít hoặc trong mũi.

8

Cuối cùng hoạt chất có thể được trộn với chất pha loãng trợ hoặc chất mang được dụng không độc như tinh bột hoặc lactoza. Tùy ý, các dược phẩm này cũng có thể chứa chất kết dính như xenluloza vi tinh thể, gôm tragacan hoặc gelatin, chất gây rã như axit alginic, chất làm trơn như magie stearat, chất gây trượt như silic dioxit keo, chất làm ngọt như sucroza hoặc sacarin, hoặc chất tạo màu hoặc chất điều vị như bạc hà hoặc metyl salixylat.

Sáng chế cũng đề cập đến các dược phẩm mà có thể giải phóng hoạt chất theo cách kiểm soát được. Các dược phẩm mà có thể được dùng để sử dụng ngoài đường tiêu hóa là ở dạng thông thường như dung dịch hoặc hỗn dịch chứa nước hoặc chứa dầu thường được đựng trong ampun, bơm tiêm dùng một lần, lọ nhựa hoặc thủy tinh hoặc đồ chứa để truyền.

Ngoài hoạt chất, các dung dịch hoặc hỗn dịch này cũng có thể tùy ý chứa chất pha loãng vô trùng như nước để tiêm, dung dịch nước muối sinh lý, dầu, polyetylen glycol, glyxerin, propylen glycol hoặc các dung môi tổng hợp khác, chất kháng khuẩn như rượu benzylic, chất chống oxy hóa như axit ascorbic hoặc natri bisulphit, chất tạo chelat như axit etylen diamin-tetra-axetic, các dung dịch đệm như axetat, xitrat hoặc phosphat và các chất để điều chỉnh nồng độ mol như natri clorua hoặc dextroza.

Các dạng dược phẩm này được bào chế bằng cách sử dụng các phương pháp mà thường được sử dụng bởi dược sỹ.

Lượng hợp chất sử dụng trong sáng chế cần để phòng ngừa hoặc điều trị tình trạng bệnh cụ thể sẽ khác nhau tùy thuộc vào hợp chất được chọn và tình trạng bệnh của bệnh nhân được điều trị. Tuy nhiên, nói chung liều hàng ngày có thể nằm trong khoảng từ 0,05 đến 3000 mg, thông thường từ 0,5 mg đến 1000 mg đối với các dược phẩm dùng ngoài đường tiêu hóa.

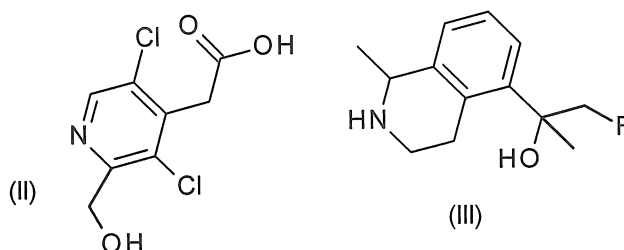
Hợp chất theo sáng chế, hoặc muối dược dụng của nó có thể được sử dụng một mình (liều pháp đơn) hoặc kết hợp với L-dopa (liều pháp kết hợp). Một mình hoặc kết hợp với các phần nhỏ của các liều L-dopa là cần thiết để làm thuyên giảm tình trạng khó vận động ở các bệnh nhân, các hợp chất có công thức (I) theo sáng chế, hoặc muối dược dụng của nó, có thể được sử dụng để điều trị rối loạn vận động có liên quan đến việc sử dụng L-dopa. Ví dụ, nếu hợp chất có công thức (I) theo sáng chế được sử dụng với các phần nhỏ của các liều L-dopa được dùng cho bệnh nhân hoặc được sử dụng

một mình để thay cho L-dopa, được tin rằng hợp chất có công thức(I) theo sáng chế sẽ có hiệu quả chống lại khả năng khó vận động mà không gây ra chứng rối loạn vận động khó chịu. Do đó, được tin là hợp chất theo sáng chế có thể hữu dụng để điều trị các dấu hiệu suy giảm vận động và rối loạn vận động do levodopa gây ra (LID).

Do đó, theo một khía cạnh cụ thể, sáng chế cũng đề cập đến hợp chất có công thức (I), mà hữu dụng để điều trị rối loạn vận động do levodopa gây ra (LID).

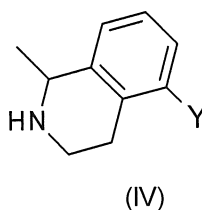
Hợp chất theo sáng chế, hoặc muối dược dụng của nó có thể được sử dụng một mình hoặc kết hợp với dược chất khác.

Hợp chất có công thức (I) có thể được điều chế bằng quy trình bao gồm cho hợp chất trung gian có công thức (II) phản ứng với hợp chất trung gian có công thức (III),



Muối hydroclorua của hợp chất trung gian (III) sau đó được cho phản ứng với hợp chất trung gian có công thức (II) với sự có mặt của hợp chất (2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphat (HBTU) hoặc chất liên kết khác đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, trong dung môi thích hợp, ví dụ dimethylformamit, với lượng dư bazơ, ví dụ N,N-diisopropyletylamin.

Các hợp chất trung gian có công thức (III) có thể được điều chế bằng quy trình bao gồm cho hợp chất trung gian có công thức (IV) trong đó Y là halogen, ví dụ bromo, phản ứng với floaxeton sẵn có trên thị trường.

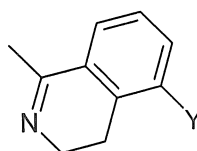


Phản ứng này được thực hiện thích hợp bằng cách trao đổi kim loại-halogen, ví dụ khi có mặt *n*-BuLi, trong dung môi thích hợp, ví dụ tetrahydrofuran, ở nhiệt độ

thấp, theo các phương pháp đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Trong các phản ứng trên đây, nhóm amino của các hợp chất trung gian có công thức (III) và (IV) đầu tiên thường sẽ được bảo vệ bằng nhóm bảo vệ thích hợp, ví dụ nhóm *tert*-butoxycarbonyl, theo các phương pháp đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, trước khi được cho phản ứng với các chất phản ứng khác.

Các hợp chất trung gian có công thức (IIIa) có thể được điều chế bằng quy trình có liên quan đến phản ứng của hợp chất trung gian có công thức (V),

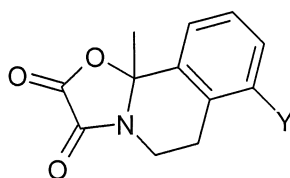


(V)

trong đó Y là như được nêu trên đây.

Phản ứng này được thực hiện thích hợp với sự có mặt của chất khử thích hợp, ví dụ natri borohydrua, trong dung môi thích hợp, ví dụ etanol, ở nhiệt độ thấp, theo các phương pháp đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Các hợp chất trung gian có công thức (V) có thể được điều chế bằng quy trình có liên quan đến phản ứng của hợp chất trung gian có công thức (VI),

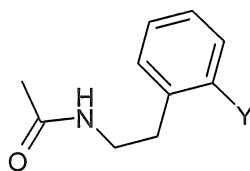


(VI)

trong đó Y là như được nêu trên đây.

Phản ứng này được thực hiện thích hợp khi có mặt axit sulfuric trong dung môi thích hợp, ví dụ metanol, ở nhiệt độ phòng.

Hợp chất trung gian có công thức (VI) có thể được điều chế bằng quy trình có liên quan đến phản ứng của hợp chất trung gian sẵn có trên thị trường (VII),

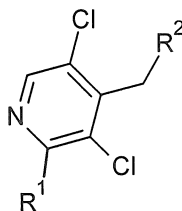


(VII)

trong đó Y là như được nêu trên đây.

Phản ứng này thường được thực hiện khi có mặt oxalyl clorua, trong dung môi thích hợp, ví dụ diclometan, ở nhiệt độ thấp, sau đó bổ sung sắt (III) clorua ở nhiệt độ phòng.

Hợp chất trung gian có công thức (II) có thể được điều chế bằng quy trình nhiều bước có liên quan đến phản ứng của các hợp chất trung gian có công thức (VIII),



(VIII)

trong đó

$R^1$  là hydro,  $-CH_2OH$ ,  $-COOR^a$  hoặc Y như nêu trên;

$R^2$  là  $-COOR^a$ ; và

$R^a$  là hydro hoặc  $C_{1-6}$  alkyl.

Trong bước thứ nhất, hợp chất trung gian có công thức (VIII) trong đó  $R^1$  là hydro và  $R^a$  là metyl được phản ứng với chất oxy hóa, ví dụ axit m-cloperbenzoic (m-CPBA) ở nhiệt độ thấp, trong dung môi thích hợp, ví dụ diclometan, để thu được N-oxit tương ứng.

Trong bước thứ hai, N-oxit thu được dưới dạng kết quả của bước thứ nhất, được phản ứng với photpho oxybromua để thu được hợp chất trung gian có công thức tương ứng (VIII) trong đó  $R^1$  là Y như nêu trên đây, và  $R^a$  là metyl.

Trong bước thứ ba, hợp chất trung gian có công thức (VIII) trong đó  $R^1$  là Y như nêu trên, được phản ứng với carbon monoxit khi có mặt bazơ, ví dụ N,N-diisopropyletylamin, khi có mặt chất xúc tác kim loại chuyển tiếp, ví dụ 1,4-bis(diphenylphosphino)butan-paladi (II) clorua, để thu được hợp chất trung gian có

công thức (VIII) tương ứng trong đó  $R^1$  là  $-\text{COOR}^a$ , và  $R^a$  là metyl. Phản ứng được thực hiện thích hợp ở áp suất cao và ở nhiệt độ cao.

Nhóm este ở gốc  $R^1$  của hợp chất trung gian sau được khử sau đó thành rượu tương ứng, sau đó thủy phân nhóm este ở gốc  $R^2$  thành axit carboxylic tương ứng, để thu được hợp chất trung gian có công thức (II). Phản ứng này được thực hiện theo các phương pháp đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này và như được chỉ rõ thêm trong các ví dụ đi kèm.

Hợp chất trung gian có công thức (VIII) trong đó  $R^1$  là hydro và  $R^a$  là metyl, có thể được điều chế theo các phương pháp tương tự với các phương pháp được mô tả trong các ví dụ đi kèm hoặc các phương pháp chuẩn đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Trong đó hỗn hợp của các sản phẩm được tạo ra từ quy trình bất kỳ trong số các quy trình được mô tả trên đây để điều chế các hợp chất theo sáng chế, sản phẩm mong muốn có thể được tách ra từ đó ở giai đoạn thích hợp bằng các phương pháp thông thường như HPLC điều chế; hoặc sắc ký cột sử dụng, ví dụ, silica và/hoặc alumin kết hợp với hệ dung môi thích hợp.

Nếu các quy trình được mô tả trên đây để điều chế các hợp chất theo sáng chế làm tăng hỗn hợp các chất đồng phân lập thể, thì các chất đồng phân này có thể được tách ra bằng các kỹ thuật thông thường. Cụ thể là, nếu mong muốn tạo ra chất đồng phân đối ảnh cụ thể của hợp chất có công thức (I) thì chất đồng phân đối ảnh này có thể được tạo ra từ hỗn hợp tương ứng của các chất đồng phân đối ảnh bằng cách sử dụng quy trình thích hợp thông thường để phân giải các chất đồng phân đối ảnh. Do đó, ví dụ, các dẫn xuất của chất đồng phân không đối quang, ví dụ các muối, có thể được tạo ra bằng phản ứng của hỗn hợp các chất đồng phân đối ảnh có công thức (I), ví dụ raxemat, và hợp chất không đối xứng thích hợp, ví dụ bazơ không đối xứng. Các chất đồng phân không đối quang sau đó được tách ra bằng các phương pháp thích hợp bất kỳ, ví dụ bằng phương pháp kết tinh, và chất đồng phân đối ảnh mong muốn được thu hồi, ví dụ bằng cách xử lý bằng axit trong trường hợp chất đồng phân không đối quang là muối. Theo một quy trình phân giải khác raxemat có công thức (I) có thể được tách ra bằng cách sử dụng HPLC không đối xứng. Hơn nữa, nếu muốn, chất đồng phân đối ảnh cụ thể có thể được tạo ra bằng cách sử dụng hợp chất trung gian

không đối xứng thích hợp trong một quy trình trong số các quy trình được mô tả trên đây. Theo cách khác, chất đồng phân đối ảnh cụ thể có thể được tạo ra bằng cách tiến hành phản ứng chuyển hóa sinh học nhờ enzym đặc hiệu với chất đồng phân đối ảnh, ví dụ phản ứng thủy phân este nhờ esterase, và sau đó chỉ tinh chế axit đã thủy phân tinh khiết về mặt chất đồng phân đối ảnh từ thể đối quang este không phản ứng. Sắc ký, tái kết tinh và các quy trình phân tách thông thường khác cũng có thể được sử dụng với các hợp chất trung gian hoặc các sản phẩm cuối trong đó mong muốn thu được chất đồng phân dị hình cụ thể theo sáng chế. Theo cách khác, chất đồng phân đối ảnh không mong muốn có thể được racemic hóa thành chất đồng phân đối ảnh mong muốn, khi có mặt axit hoặc bazơ, theo các phương pháp đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, hoặc theo các phương pháp được mô tả trong các ví dụ đi kèm.

Trong suốt trình tự bất kỳ trong số các trình tự tổng hợp nêu trên có thể cần và/hoặc mong muốn bảo vệ các nhóm phản ứng hoặc các nhóm dễ phản ứng trên phân tử bất kỳ trong số các phân tử quan tâm. Điều này có thể đạt được bằng cách sử dụng các nhóm bảo vệ thông thường, như các nhóm được mô tả trong tài liệu *Protective Groups in Organic Chemistry*, ed. J.F.W. McOmie, Plenum Press, 1973; và T.W. Greene & P.G.M. Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley & Sons, 3rd edition, 1999. Các nhóm bảo vệ có thể được loại bỏ ở giai đoạn thích hợp bất kỳ tiếp theo bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết trong giải pháp kỹ thuật đã biết.

Các hợp chất có công thức (I) theo sáng chế không hoạt hóa trực tiếp thụ thể dopamin D1, nhưng tăng cường tác dụng của các chất chủ vận D1 hoặc phối tử nội sinh trên các thụ thể D1, dopamin, thông qua cơ chế chuyển hoạt tính, và do đó là chất điều biến hoạt tính dương tính với D1 (PAM D1).

Dopamin và các chất chủ vận D1 khác trực tiếp hoạt hóa thụ thể dopamin D1 bởi chính chúng.

Các thử nghiệm đã được thiết kế để đánh giá tác dụng của các hợp chất theo sáng chế khi không có mặt dopamin (“thử nghiệm hoạt hóa”) và khi có mặt dopamin (“thử nghiệm điện thế”).



Thử nghiệm hoạt hóa đánh giá khả năng kích thích sự tổng hợp của adenosinmonophosphat vòng (cAMP) trong thử nghiệm huỳnh quang phân giải theo thời gian đồng nhất (Homogeneous Time Resolved Fluorescent-HTRF), với mức tăng đối đa cAMP nhờ tăng nồng độ của chất chủ vận nội sinh, dopamin, được xác định là hoạt hóa 100%.

Khi được thử nghiệm, các hợp chất có công thức (I) theo các ví dụ thiếu các tác dụng trực tiếp đáng kể giống chất chủ vận bởi vì chúng chỉ hoạt hóa ít hơn 20% (so với đáp ứng tối đa dopamin) khi có mặt ở nồng độ 10  $\mu$ M.

Thử nghiệm điện thế đánh giá khả năng của các hợp chất trong việc làm tăng lượng cAMP được sinh ra khi dopamin có nồng độ ở ngưỡng thấp. Nồng độ của dopamin được sử dụng ([EC20]) được thiết kế để tạo ra mức kích thích bằng 20% so với đáp ứng tối đa (100%) được nhận thấy khi tăng nồng độ của dopamin. Để đo điện thế này hợp chất có nồng độ cao và dopamin có nồng độ [EC20] được ủ và điện thế được đo khi tăng tổng hợp cAMP và nồng độ của hợp chất mà tạo ra 50% điện thế của lượng cAMP được đo.

Khi được thử nghiệm trong thử nghiệm cAMP HTRF, các hợp chất có công thức (I) theo các ví dụ có các giá trị pEC50 lớn hơn khoảng 6,5 mà chứng tỏ là chúng là các chất điều biến hoạt tính dương tính với D1.

Việc ức chế thụ thể GABA<sub>A</sub> được biết đến là có liên quan mật thiết đến chứng co giật và động kinh. Do đó, mong muốn phát triển các hợp chất mà là các chất điều biến hoạt tính dương tính với D1 và đồng thời làm giảm các tác dụng này.

Khi được thử nghiệm trong thử nghiệm ức chế thụ thể GABA-A như được mô tả ở đây, các hợp chất có công thức (I) có tỷ lệ ức chế thụ thể GABA<sub>A</sub> nhỏ hơn hoặc bằng 20% được đo ở nồng độ 10  $\mu$ M của hợp chất có công thức (I).

Vấn đề có thể phải đối mặt khi phát triển các hợp chất dùng để điều trị là khả năng các hợp chất nhất định ức chế enzyme CYP450. Việc ức chế các enzyme này có thể tác động đến việc tiếp xúc của các hợp chất này hoặc của các hợp chất khác mà có thể được đồng sử dụng cho bệnh nhân, do đó có khả năng làm thay đổi độ an toàn và hiệu

quả tương ứng của chúng. Do đó, mong muốn phát triển các hợp chất mà làm giảm tối thiểu khả năng ức chế này.

Khả năng ức chế CYP450 của hợp chất có công thức (I) theo sáng chế đã được thử nghiệm bằng cách đánh giá mức giảm hoạt tính CYP450 có thể có ở các tế bào gan của người được ủ với các hợp chất theo sáng chế với nồng độ tăng dần.

Khi được thử nghiệm trong thử nghiệm ức chế CYP3A4 ở nồng độ 1 và 20 $\mu$ M theo quy trình được mô tả trong sáng chế, hợp chất có công thức (I) theo sáng chế có mức ức chế dưới 40%, lý tưởng là dưới 30%.

Khi phát triển hợp chất dùng để điều trị, quan trọng là phải quan tâm đến sự bài tiết của nó một khi nó được sử dụng vào cơ thể.

Mức thanh thải là một thông số cung cấp thông tin đó vì nó đại diện cho thể tích của huyết tương (hoặc máu) được làm sạch hoàn toàn hợp chất quan tâm theo đơn vị thời gian. Mức thanh thải này thường được biểu diễn dưới dạng ml/phút/kg hoặc L/giờ. Sau đó nó có thể được so sánh với lưu lượng máu sinh lý bất kỳ (ví dụ lưu lượng máu ở gan) để đánh giá liệu mức thanh thải là thấp, vừa phải hay cao.

Nếu mức thanh thải là thấp, tùy thuộc vào thể tích phân bố, có thể cần liều thấp và để có được thời gian tác dụng tương đối dài. Khi mức thanh thải là cao, một lần nữa tùy thuộc vào thể tích phân bố, có thể cần liều cao và thời gian tác dụng tương đối ngắn.

Độ thanh thải nói chung được đánh giá bằng cách ủ tế bào gan và tính toán tỷ lệ, giả sử con đường bài tiết chính là chuyển hóa, theo các quy trình được mô tả ở đây. Mức thanh thải thực chất được đánh giá từ các tế bào gan được biểu diễn dưới dạng  $\mu$ l/phút/ $10^6$  tế bào.

Khi được thử nghiệm trong thử nghiệm thanh thải như được mô tả ở đây, hợp chất có công thức (I) theo sáng chế cần có mức thanh thải nhỏ hơn khoảng 10  $\mu$ l/phút/ $10^6$  tế bào.

#### Thử nghiệm cAMP HTRF

Các điều kiện cụ thể mà các hợp chất được thử nghiệm là được mô tả dưới đây.

##### a. Phương pháp nuôi cấy tế bào D1

Các tế bào được nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C trong môi trường ẩm chứa 5% CO<sub>2</sub>. Các tế bào được nuôi cấy trong môi trường DMEM-F12+GlutaMAX™-I (GIBCO®, Invitrogen, Merelbeke, Belgium) chứa 10% huyết thanh bào thai bò (BioWhittaker®, Lonza, Verviers, Belgium), 400 µg/mL Genetixin (GIBCO®), 100 IU/mL Penicillin và 100 IU/mL Streptomycin (Pen-Strep solution, BioWhittaker®). Các tế bào nguyên bào sợi chuột LMtk (Ltk-) biểu hiện thụ thể dopamin D1 (BioSignal Inc, Montreal, Canada, now Perkin Elmer) được sử dụng vì chúng đã được thể hiện là kết hợp hiệu quả và tạo ra các đáp ứng chức năng mạnh mẽ (Watts *et al*, 1995).

#### b. Thử nghiệm cAMP

Việc đánh giá các thay đổi về adenosinmonophosphat vòng nội bào (cAMP) được tiến hành bằng kit thử nghiệm động học HTRF cAMP do CisBio (Codolet, France) sản xuất. Sử dụng công nghệ huỳnh quang phân giải theo thời gian đồng nhất, thử nghiệm này được dựa trên sự cạnh tranh giữa cAMP nguyên thể được sản sinh bởi các tế bào và cAMP được đánh dấu thuốc nhuộm d2. Việc gắn kết của chất đánh dấu được xác định bằng kháng thể kháng cAMP được đánh dấu cryptat. Các tác dụng của một mình hợp chất (tác dụng chủ vận) được xác định bằng cách tiến hành thử nghiệm khi không có mặt dopamin, trong khi đó tác dụng của hợp chất ở dạng chất điều biến hoạt tính dương (PAM) được xác định khi có mặt dopamin ở nồng độ EC<sub>20</sub>. Các tế bào (20.000 mỗi lỗ) được ủ trong 384 đĩa trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng trong một thể tích cuối là 20 µL HBSS (Lonza, với canxi, magie và dung dịch đệm HEPES 20 mM, pH 7,4) chứa: isobutyl metylxanthin (Sigma, nồng độ cuối 0,1 mM), hợp chất thử nghiệm với các nồng độ khác nhau (thông thường nằm trong khoảng từ 10<sup>-9,5</sup>M đến 10<sup>-4,5</sup>M) khi có mặt và không có mặt dopamin (nồng độ cuối 1,1 nM). Sau đó phản ứng được kết thúc và các tế bào được phân giải bằng cách bổ sung chất phản ứng phát hiện d2 trong dung dịch đệm phân giải (10 microL) và chất phản ứng cryptant trong dung dịch đệm phân giải (10 microl) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Sau đó phản ứng được ủ thêm 60 phút ở nhiệt độ phòng và thay đổi tỷ lệ phát huỳnh quang HTRF được xác định theo hướng dẫn của nhà sản xuất bằng cách sử dụng thiết bị đọc đĩa Envision (Perkin Elmer, Zaventem, Belgium) với sự kích thích laser. Toàn bộ các lần ủ được tiến hành hai lần và các kết quả thu được được so sánh với đường cong nồng độ-tác dụng đối với dopamin (10<sup>-11</sup>M đến 10<sup>-6</sup>M).

### c. Phân tích số liệu

Số liệu được phân tích bằng Excel và PRISM (phần mềm GraphPad) để thu được  $pEC_{50}$  và Erel nhờ phương trình logistic 4 thông số (DeLean et al, 1978) trong đó Erel là đáp ứng tối đa phù hợp của hợp chất thử nghiệm trừ đi mức cơ sở được biểu thị dưới dạng phần trăm so với đáp ứng thu được với dopamin mà được xác định là bằng 100%.

$pEC_{50}$  của hợp chất là  $-\log_{10}$  của nồng độ của hợp chất mà tạo ra 50% điện thế của các mức cAMP.

Erel là hiệu quả tương đối, được xác định là % điện thế cực đại do hợp chất tạo ra so với đáp ứng tối đa thu được khi tăng nồng độ dopamin (Erel bằng 1= đáp ứng tối đa với dopamin).

Khi được thử nghiệm trong thử nghiệm này, hợp chất có công thức (Ia) có giá trị  $pEC_{50}$  bằng khoảng 6,9 và hợp chất có công thức (Ib) có giá trị  $pEC_{50}$  bằng khoảng 6,7.

Erel tương ứng được biểu thị bởi hợp chất có công thức (Ia) là khoảng 64% và Erel tương ứng được biểu thị bởi hợp chất có công thức (Ib) là khoảng 61%.

### Các nghiên cứu kẹp ráp nối tự động trên các tế bào có thụ thể GABA<sub>A</sub>

Các tế bào CHO-K1 biểu hiện ổn định các tiểu đơn vị  $\alpha 1$ ,  $\beta 2$  và  $\gamma 2$  của thụ thể GABA<sub>A</sub> của người được sử dụng. Các tế bào được thu hoạch bằng cách sử dụng trypsin và được giữ trong môi trường không chứa huyết thanh ở nhiệt độ trong phòng. Các tế bào được rửa và tái huyền phù trong dung dịch ngoại bào trước khi thử nghiệm.

#### Các nghiên cứu kẹp ráp nối

Các thử nghiệm trên các kênh GABA<sub>A</sub> ( $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ ) của người được tiến hành bằng cách sử dụng thử nghiệm kẹp ráp nối tự động (IonFlux™ HT). Các hợp chất được thử nghiệm ở ba nồng độ (0,1, 1, và 10 $\mu$ M) trong 3 đến 4 tế bào. Dung dịch bên ngoài để ghi dòng điện GABA<sub>A</sub> bao gồm natri clorua 137mM, kali clorua 4 mM, canxi clorua 1,8mM, magie clorua 1mM, HEPES 10mM, và glucoza 10 mM. Cả dung dịch bên ngoài và dung dịch bên trong được chuẩn độ bằng NaOH hoặc KOH để thu được độ pH bằng 7,35 hoặc 7,3, tương ứng. Dung dịch pipet bên trong chứa kali florua 70mM, kali clorua 60mM, natri clorua 70mM, HEPES 5mM, EGTA 5mM, và magie ATP

4mM. Nồng độ cuối của chất dẫn được dùng để pha loãng hợp chất là 0,33% DMSO trong mỗi lỗ. Bicucullin (0,032 đến 100 $\mu$ M) được sử dụng làm chất ức chế đối chứng dương. GABA (15 $\mu$ M) được sử dụng làm chất chủ vận. Toàn bộ các kết quả ghi đều được thu từ điện thế giữ bằng -60mV.

Trình tự bổ sung hợp chất là như sau: bổ sung một lần GABA có nồng độ EC<sub>80</sub> để thiết lập đáp ứng cơ bản. Mỗi nồng độ của hợp chất được sử dụng trong 30 giây sau đó bổ sung 15 $\mu$ M GABA khi có mặt hợp chất này trong 2 giây. Quy trình này được lặp lại với nồng độ hợp chất tăng dần. Dòng điện hướng đỉnh để đáp ứng với việc bổ sung GABA khi có mặt hợp chất ở một nồng độ được đo. Toàn bộ số liệu về hợp chất đã được chuẩn hóa đến dòng đỉnh cơ sở bằng cách bổ sung 15 $\mu$ M GABA trong 2 giây.

Khi được thử nghiệm trong thử nghiệm nêu trên, ở nồng độ 10 $\mu$ M, hợp chất có công thức (Ia) có tỷ lệ ức chế thụ thể GABA<sub>A</sub> là khoảng 13%.

Khi được thử nghiệm trong thử nghiệm nêu trên, ở nồng độ 10 $\mu$ M, hợp chất có công thức (Ib) thể hiện tỷ lệ ức chế thụ thể GABA<sub>A</sub> là khoảng 20%.

Đánh giá in vitro điện thế ức chế CYP3A4 bằng cách sử dụng các vi thể của người đã bảo quản lạnh

Mục đích của thử nghiệm vi thể của người là để xác định điện thế ức chế của hợp chất có công thức (I) bằng cách đo hoạt tính CYP3A4 sau khi đồng ức chế nó với midazolam, một cơ chất CYP3A4 đặc hiệu.

Đối với mục đích này, các vi thể của người được bảo quản lạnh (các mẫu người cho được gộp lại) được chia đều lên đĩa đã phủ collagen có 48 lỗ để nồng độ cuối cùng là 0,25 mg/ml. Hợp chất UCB sau đó được bổ sung vào các lỗ ở nồng độ 1 $\mu$ M và 20  $\mu$ M hai lần. Sau 30 phút ủ, midazolam được bổ sung ở nồng độ 2,5  $\mu$ M. Sau 15 phút, một phần nhỏ được loại bỏ và được đưa vào một thể tích tương đương của metanol chứa chất chuẩn nội. Các mẫu được ly tâm ở tốc độ 2500 rpm ở 4°C trong 20 phút. Một phần nhỏ dịch nổi được pha loãng bằng nước đã khử ion và lượng 1-hydroxymidazolam được định lượng bằng cách sử dụng các phương pháp chung LC MS/MS.

Các nồng độ được so sánh với các nồng độ thu được sau khi ủ midazolam ở cùng nồng độ nhưng không ủ trước với hợp chất UCB. Các kết quả được thể hiện dưới dạng % ức chế.

Hợp chất có công thức (Ia) theo sáng chế thể hiện tỷ lệ phần trăm ức chế của CYP3A4 bằng khoảng 28% ở nồng độ 20 $\mu$ M và khoảng 20% ở nồng độ 1 $\mu$ M.

#### Thử nghiệm Azamulin

Các tế bào gan của người được bảo quản lạnh (một nhóm gồm 20 mẫu của người cho, mẽ BSU từ Celsis/IVT/Bioreclamation) được rã đông theo hướng dẫn của nhà cung cấp. Khả năng sống (ngoại trừ xanh trypan) là cao hơn 75%. Các lần ủ sơ bộ (250  $\mu$ L huyền phù các tế bào gan ở mật độ  $2 \times 10^6$  tế bào gan/mL) được tiến hành với môi trường William, chứa glutamin 2 mM và Hepes 15 mM, trong các đĩa có 48 lỗ ở nhiệt độ +37°C, trong tủ ủ (5% CO<sub>2</sub>), trong điều kiện khuấy nhẹ (thiết bị khuấy rung, Titramax 100, khoảng 300 rpm) trong suốt 30 phút. Sau khi ủ sơ bộ, tiến hành ủ bằng cách bổ sung vào tế bào gan, 250  $\mu$ L môi trường nuôi cấy (xem thành phần trên đây) chứa hợp chất UCB (1 $\mu$ M) hoặc midazolam (đối chứng dương). Nồng độ cuối cùng của hợp chất UCB trong các dung dịch ủ là 0,5  $\mu$ M. Huyền phù tế bào được làm đồng nhất lại bằng cách hút pipet ra-vào hai lần. Sau 0, 30, 60, 120, 180 và 240 phút ủ, phản ứng được dừng bằng cách chuyển 50  $\mu$ L hỗn hợp ủ vào lỗ thích hợp từ đĩa có 96 lỗ chứa 50  $\mu$ L axetonitril đã làm lạnh trên đá với ketoconazol 1  $\mu$ M làm chất chuẩn nội. Trước mỗi lần lấy mẫu, hỗn hợp ủ tế bào được làm đồng nhất lại bằng cách hút bằng pipet ra-vào hai lần.

Các mẫu được phân tích bằng phương pháp phân tích sinh học LC-MS-MS để đo nồng độ của hợp chất UCB. Profin nồng độ theo thời gian được dựng để xác định độ thanh thải nội tại (Clint) được biểu diễn dưới dạng  $\mu$ L/phút/ $10^6$  tế bào.

Nếu được ủ với huyền phù tế bào gan của người ở các nồng độ khác nhau, thì độ thanh thải nội tại (Clint) của hợp chất có công thức (Ia) theo sáng chế là bằng 8,8  $\mu$ L/phút/ $10^6$  tế bào và độ thanh thải nội tại (Clint) của hợp chất có công thức (Ib) là khoảng 9,2  $\mu$ L/phút/ $10^6$  tế bào.

Các ví dụ sau minh họa quy trình điều chế hợp chất có công thức (I) theo sáng chế.

**Ví dụ thực hiện sáng chế**

Các thuật ngữ viết tắt/các tác nhân phản ứng thông thường

ACN: axetonitril

cAMP: adenosinmonophosphat vòng

Dung dịch nước muối: Dung dịch natri clorua chứa nước bão hòa

*n*Bu: *n*-butyl

*t*Bu: *tert*-butyl

CHO: buồng trứng chuột hamster Trung Quốc

m-CPBA: axit 3-cloperbenzoic

CYP450: cytochrom P450

DCM: diclometan

DMF: *N,N*-Dimetylformamit

DMSO: dimetylsulfoxit

EC<sub>20/50</sub>: nồng độ mà tại đó tạo ra 20%/50% của đáp ứng tối đa

EGTA: axit Egtazic

Erel: hiệu quả tương đối

ES<sup>+</sup>: ion hóa phun điện ở chế độ ion dương

Et: etyl

EtOH : etanol

Et<sub>2</sub>O: dietyl ete

EtOAc: etyl axetat

Axit GABA:  $\gamma$ -aminobutyric

h: giờ

HEPES: axit 4-(2-Hydroxyetyl)-1-piperazineetansulfonic

HPLC: sắc ký lỏng hiệu năng cao

HTRF: huỳnh quang phân giải theo thời gian đồng nhất

LCMS: phương pháp khối phổ sắc ký lỏng

LDA: lithi diisopropylamit

MeOH: metanol

min.: phút

NMR: cộng hưởng từ hạt nhân

*i*PrOH: isopropanol

rt: nhiệt độ phòng

SFC: sắc ký lỏng siêu tới hạn

TEA: triethylamin

THF: tetrahydrofuran

TLC: sắc ký lớp mỏng

Các tên IUPAC được xác định bằng Biovia Draw 16.1.

#### Các phương pháp phân tích

Toàn bộ các phản ứng sử dụng các tác nhân phản ứng nhạy với không khí hoặc độ ẩm được tiến hành trong môi trường khí nitơ hoặc argon sử dụng các dung môi khô và đồ thủy tinh. Các dung môi và các chất phản ứng trên thị trường thường được sử dụng mà không cần tinh chế thêm, kể cả các dung môi khan nếu thích hợp (nói chung các sản phẩm Sure-Seal™ từ Aldrich Chemical Company hoặc AcroSeal™ từ ACROS Organics). Nói chung các phản ứng được tiến hành các phân tích sắc ký lớp mỏng hoặc phân tích khối phổ.

Các phân tích HPLC được tiến hành bằng cách sử dụng hệ thống Agilent 1100 series HPLC được lắp với cột Waters XBridge MS C18, 5 pm, 150 X 4,6 mm. Gradient chạy từ 100% dung môi A (nước/ACN/dung dịch amoni format 85/5/10 (thể tích/thể tích/thể tích)) đến 100% dung môi B (nước-/ACN/dung dịch amoni format 5/85/10 (thể tích/thể tích/thể tích)) trong 6 phút và giữ ở 100% B trong 5 phút. Tốc độ dòng được để ở 8 mL/phút trong 6 phút sau đó được tăng lên ở tốc độ 3 mL/phút trong 2 phút và giữ ở 3 mL/phút trong 3 phút. Tỷ lệ phân tách 1/25 chỉ được sử dụng trước nguồn API. Sắc ký được tiến hành ở nhiệt độ 45°C. Dung dịch amoni format (pH~8,5) được điều chế bằng cách hòa tan amoni format (630 mg) trong nước (1 L) và bổ sung amoni hydroxit 30% (500 µL).

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này hiểu rằng các thời gian lưu khác nhau có thể thu được đối với số liệu LC nếu các điều kiện phân tích khác nhau được sử dụng.

Các số đo phổ khối theo phương thức LCMS được tiến hành như sau:

- Đối với rửa giải bazơ, các phân tích được tiến hành bằng cách sử dụng:



Thiết bị đo phổ khối bốn cực đơn giản QDA Waters được sử dụng cho phân tích LCMS. Thiết bị đo phổ khối này được trang bị nguồn ESI và UPLC Acquity Hclass với bộ dò mảng diot (200 đến 400 nm). Số liệu được thu khi quét MS đầy đủ từ m/z 70 đến 800 theo phương thức dương với rửa giải bazơ. Phân tách pha đảo được tiến hành ở nhiệt độ 45°C trên cột Waters Acquity UPLC BEHC18 1,7  $\mu$ m (2,1 x 50 mm) để rửa giải bazơ. Giải hấp gradien được tiến hành với nước/ACN/amoni format (95/5/63 mg/L) (dung môi A) và ACN/nước/amoni format (95/5/63 mg/L) (dung môi B). Thể tích tiêm: 1  $\mu$ L. Dòng chảy đủ trong MS.

Chương trình bazơ “4 phút”

| Thời gian<br>(phút) | A<br>(%) | B<br>(%) | Tốc độ<br>dòng<br>(mL/phút) |
|---------------------|----------|----------|-----------------------------|
| 0                   | 99       | 1        | 0,4                         |
| 0,3                 | 99       | 1        | 0,4                         |
| 3,2                 | 0        | 100      | 0,4                         |
| 3,25                | 0        | 100      | 0,5                         |
| 4                   | 0        | 100      | 0,5                         |

Chương trình bazơ “10 phút”

| Thời gian<br>(phút) | A<br>(%) | B<br>(%) | Tốc độ<br>dòng<br>(mL/phút) |
|---------------------|----------|----------|-----------------------------|
| 0                   | 99       | 1        | 0,4                         |
| 0,8                 | 99       | 1        | 0,4                         |
| 5,3                 | 0        | 100      | 0,4                         |
| 5,35                | 0        | 100      | 0,5                         |
| 7,30                | 0        | 100      | 0,5                         |

- Đối với rửa giải axit, các phân tích được tiến hành bằng cách sử dụng:

Thiết bị đo phổ khối bốn cực đơn giản QDA Waters được sử dụng cho phân tích LCMS. Thiết bị đo phổ khối này được trang bị nguồn ESI và UPLC Acquity Hclass với bộ dò mảng diot (200 đến 400 nm). Số liệu thu được khi quét MS đầy đủ từ

m/z 70 đến 800 theo phương thức dương với rửa giải axit. Phân tách pha đảo được tiến hành ở nhiệt độ 45°C trên cột Waters Acquity UPLC HSS T3 1,8  $\mu$ m (2,1 x 50 mm) đối với rửa giải axit. Giải hấp gradien được tiến hành với nước/ACN/TFA (95/5/0,5 mL/L) (dung môi A) và ACN (dung môi B). Thể tích tiêm: 1  $\mu$ L. Dòng chảy đủ trong MS.

Chương trình axit “4 phút”

| Thời gian<br>(phút) | A<br>(%) | B<br>(%) | Tốc độ<br>dòng<br>(mL/phút) |
|---------------------|----------|----------|-----------------------------|
| 0                   | 99       | 1        | 0,4                         |
| 0,3                 | 99       | 1        | 0,4                         |
| 3,2                 | 5        | 95       | 0,4                         |
| 3,25                | 5        | 95       | 0,5                         |
| 4                   | 5        | 95       | 0,5                         |

Chương trình axit “10 phút”

| Thời gian<br>(phút) | A<br>(%) | B<br>(%) | Tốc độ<br>dòng<br>(mL/phút) |
|---------------------|----------|----------|-----------------------------|
| 0                   | 99       | 1        | 0,4                         |
| 0,8                 | 99       | 1        | 0,4                         |
| 5,3                 | 5        | 95       | 0,4                         |
| 5,35                | 5        | 95       | 0,5                         |
| 7,30                | 5        | 95       | 0,5                         |

Các nguyên liệu thô có thể được tinh chế bằng sắc ký pha thường, sắc ký pha đảo (axit hoặc bazơ), phân tách không đối xứng hoặc tái kết tinh.

Sắc ký pha đảo thông thường được tiến hành bằng cách sử dụng cột silicagel (silicagel cỡ rây 100:200 hoặc cột Puriflash®-50SIHC-JP từ Interchim).

Sắc ký pha đảo điều chế được tiến hành như sau:

- Tinh chế LCMS (phương thức bazơ, LCMS điều chế) bằng cách sử dụng thiết bị đo phổ khối bốn cực ba vạch SQD hoặc QM Waters được sử dụng để tinh chế

LCMS. Thiết bị phổ khối này được trang bị nguồn ESI và bơm tứ phân Waters có bộ kiểm soát Prep LC với bộ dò mảng diot (210 đến 400 nm).

Các thông số MS: Điện áp mao mạch ESI 3 kV. Điện áp côn và bộ chiết 10. Nhiệt độ phong bế nguồn 120°C. Nhiệt độ khử solvat 300°C. Dòng khí đầu côn 30 L/giờ (nitơ), dòng khí khử solvat 650 L/giờ. Số liệu thu được khi quét MS hoàn toàn từ m/z 100 đến 700 theo phương thức dương với rửa giải axit hoặc bazơ.

Các thông số LC: Phân tách pha đảo được tiến hành trên cột XBridge prep OBD C18 (5 µm, 30 x 50 mm) (rửa giải bazơ). Giải hấp gradien được tiến hành với nước (dung môi A), ACN (dung môi B), amoni bicacbonat trong nước 8 g/L + 500 µL/L NH<sub>4</sub>OH 30% (dung môi C) (pH~8,5). Tốc độ dòng HPLC: 35 mL/phút đến 60 mL/phút, thể tích tiêm: 1 mL. Tỷ lệ phân tách được để ở +/- 1/6000 đến MS.

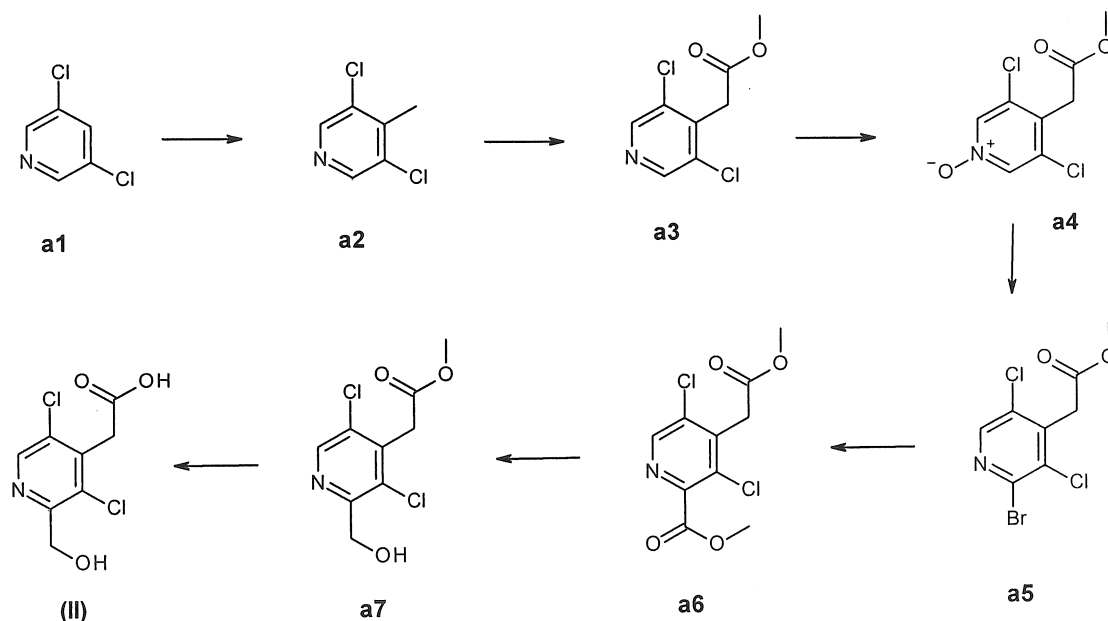
| Thời gian<br>(phút) | A<br>(%) | B<br>(%) | C<br>(%) | Tốc độ<br>dòng<br>(mL/phút) |
|---------------------|----------|----------|----------|-----------------------------|
| 0                   | 85       | 5        | 10       | 35                          |
| 1                   | 85       | 5        | 10       | 35                          |
| 7                   | 5        | 85       | 10       | 35                          |
| 9                   | 5        | 95       | 0        | 60                          |
| 12                  | 5        | 95       | 0        | 60                          |
| 12,5                | 85       | 5        | 10       | 35                          |
| 16                  | 85       | 5        | 10       | 35                          |

Các nguyên liệu thô có thể được tinh chế bằng sắc ký pha thường, sắc ký pha đảo (axit hoặc bazơ), phân tách không đối xứng hoặc tái kết tinh.

Các sản phẩm thường được làm khô trong chân không trước khi tiến hành phân tích lần cuối và tiến hành thử nghiệm sinh học.

Toàn bộ phổ NMR thu được ở 250 MHz, 300 MHz, 400 MHz hoặc 500 MHz.

1. Điều chế hợp chất trung gian (II)-Axit 2-[3,5-diclo-2-(hydroxymetyl)-4-pyridyl]axetic



1.1. Điều chế 3,5-diclo-4-metyl-pyridin a2

LDA (1,86 L, dung dịch 2M trong THF, 3,72 mol) và THF (5,0 L) được nạp trong bình phản ứng trong môi trường khí nitơ. 3,5-Diclo-4-metyl-pyridin a1 (500 g, 3,38 mol) được bổ sung ở  $-20^{\circ}\text{C}$  và hỗn hợp phản ứng được khuấy ở  $-10^{\circ}\text{C}$  trong 30 phút. Hỗn hợp phản ứng được làm lạnh đến  $-70^{\circ}\text{C}$  và methyl iodua (815 g, 5,74 mol) được bổ sung. Hỗn hợp được để ấm đến nhiệt độ phòng và được khuấy trong 4 giờ. Toàn bộ quy trình được tiến hành trên bốn mẻ có cùng kích cỡ mà được thực hiện song song với nhau. Hỗn hợp được làm lạnh đến  $0^{\circ}\text{C}$  và được dập tắt bằng nước (5 L) và khuấy trong 10 phút. Pha nước được chiết bằng etyl axetat (2 x 3 L) và pha hữu cơ hỗn hợp được rửa hai lần bằng dung dịch nước muối (10 L), làm khô bằng natri sulfat khan, lọc và cô trong chân không. Sản phẩm thô được tinh chế bằng cách tái kết tinh từ ethanol (4 L) ở  $-70^{\circ}\text{C}$  để thu được 3,5-diclo-4-metyl-pyridin a2 dưới dạng chất rắn màu vàng (1,5 kg, hiệu suất 68,5%).

1.2. Điều chế methyl 2-(3,5-diclo-4-pyridyl)axetat-hợp chất trung gian a3

3,5-Diclo-4-metyl-pyridin a2 (375 g, 2,31 mol) và DMF (1,87 L) được nạp vào bình phản ứng và hỗn hợp phản ứng được làm lạnh xuống  $15^{\circ}\text{C}$ . Kali tert-butoxit (779 g, 6,94 mol) được bổ sung trong môi trường khí nitơ ở  $10-15^{\circ}\text{C}$  và hỗn hợp phản ứng được khuấy ở  $15^{\circ}\text{C}$  trong 30 phút. Dimetyl cacbonat (730 g, 8,10 mol) được bổ sung ở

10-15°C và hỗn hợp được khuấy trong 4 giờ ở 30°C. Toàn bộ quy trình được tiến hành trên 4 mẻ có cùng kích thước mà được thực hiện song song với nhau. Hỗn hợp được làm lạnh đến 0°C và phản ứng được dập tắt bằng nước (10 L) và khuấy trong 10 phút. Hỗn hợp phản ứng được lọc và bánh lọc được rửa hai lần bằng etyl axetat (2 L). Pha nước được chiết hai lần bằng etyl axetat (3 L) và pha hữu cơ hỗn hợp được rửa hai lần bằng dung dịch nước muối (5 L), làm khô bằng natri sulfat khan, lọc và cô trong chân không để thu được metyl 2-(3,5-diclo-4-pyridyl)axetat a3 dưới dạng dung dịch màu nâu đen (1,3 kg, hiệu quả 63,8%) mà được sử dụng trong bước tiếp theo mà không cần tinh chế thêm.

1.3. Điều chế metyl 2-(3,5-diclo-1-oxido-pyridin-1-ium-4-yl)axetat-hợp chất trung gian a4

Metyl 2-(3,5-diclo-4-pyridyl)axetat a3 (650 g, 2,95 mol) và diclometan (3,25 L) được nạp vào bình phản ứng. m-CPBA (1,27 kg, 5,91 mol, độ tinh khiết 80%) được bổ sung ở 0°C trong môi trường khí nitơ và hỗn hợp phản ứng được khuấy ở 25°C trong 5 giờ. Toàn bộ quy trình được tiến hành trên hai mẻ có cùng kích cỡ mà được thực hiện song song với nhau. Hỗn hợp được làm lạnh đến 0°C và phản ứng được dập tắt bằng nước (4 L) và khuấy trong 10 phút. Hỗn hợp phản ứng được lọc và bánh lọc được rửa hai lần bằng diclometan (3 L). Pha nước được chiết hai lần bằng diclometan (2 L) và pha hữu cơ hỗn hợp được rửa ba lần bằng dung dịch  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  bão hòa (15 L) và hai lần bằng dung dịch nước muối (10 L) sau đó làm khô trên natri sulfat khan, lọc và cô trong chân không. Cặn được tinh chế bằng sắc ký silicagel (ete dầu mỏ:etyl axetat 20:1 đến 1:1) để thu được metyl 2-(3,5-diclo-1-oxido-pyridin-1-ium-4-yl)axetat a4 dưới dạng chất rắn màu vàng (900 g, hiệu suất 64,2%).

1.4. Điều chế metyl 2-(2-bromo-3,5-diclo-4-pyridyl)axetat-hợp chất trung gian a5

Metyl 2-(3,5-diclo-1-oxido-pyridin-1-ium-4-yl)axetat a4 (900 g, 3,81 mol) và axetonitril (8 L) được nạp vào bình phản ứng ở 20°C. Photpho oxybromua ( $\text{POBr}_3$ , 1,09 kg, 3,81 mol) được bổ sung ở 0°C trong môi trường khí nitơ và hỗn hợp phản ứng được khuấy ở 25°C trong 12 giờ. Toàn bộ quy trình được tiến hành trên một mẻ khác (quy mô 1,64 mol) song song và hai mẻ này được thực hiện cùng nhau. Hỗn hợp được làm lạnh đến 0°C và phản ứng được dập tắt bằng nước (3 L) và khuấy trong 10 phút.

Pha nước được chiết hai lần bằng etyl axetat (2 L). Pha hữu cơ hỗn hợp được rửa hai lần bằng dung dịch nước muối (5 L), làm khô bằng natri sulfat khan, lọc và cô trong chân không. Cặn được tinh chế bằng sắc ký silicagel (ete dầu mỏ:etyl axetat 50:1 đến 1:1) để thu được metyl 2-(2-bromo-3,5-diclo-4-pyridyl)axetat a5 dưới dạng chất rắn màu trắng ngà (503 g, hiệu suất 43%).

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8,32 (s, 1H), 4,07 (s, 2H), 3,75 (s, 3H)

1.5. Điều chế metyl 3,5-diclo-4-(2-metoxi-2-oxo-etyl)pyridin-2-carboxylat-hợp chất trung gian a6

Bổ sung N,N-diisopropyletylamin (2,42 mL, 14,6 mmol) và 1,4-bis(diphenylphosphino)butan-paladi (II) clorua (91 mg, 0,15 mmol) vào dung dịch chứa metyl 2-(2-bromo-3,5-diclo-4-pyridyl)axetat a5 (3 g, 10,03 mmol) trong metanol (60 mL). Bình phản ứng được phun rửa ba lần khí nitơ sau đó được điều áp (3 lần phun rửa) với 5 bar carbon monoxit và hỗn hợp được gia nhiệt ở  $80^\circ\text{C}$  trong 3 giờ. Hỗn hợp phản ứng được lọc ở nhiệt độ phòng qua đệm xelit và dung môi được loại bỏ trong điều kiện áp suất giảm. Sản phẩm thô được tinh chế bằng sắc ký cột. (Biotage SNAP Ultra 25 g. Chất rửa giải: etyl axetat:hexan 1:1). Dung môi được loại bỏ trong chân không để thu được 3,5-diclo-4-(2-metoxi-2-oxo-etyl)pyridin-2-carboxylat a6 dưới dạng dung dịch màu vàng (1,84 g, hiệu suất 66%).

LCMS ( $\text{MH}^+$ ): 278

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  8,75 (s, 1H), 4,12 (s, 2H), 3,93 (s, 3H), 3,68 (s, 3H).

1.6. Điều chế metyl 2-[3,5-diclo-2-(hydroxymetyl)-4-pyridyl]axetat-hợp chất trung gian a7

Bổ sung natri borohydrua (124 mg, 3,29 mmol) vào dung dịch chứa metyl 3,5-diclo-4-(2-metoxi-2-oxo-etyl)pyridin-2-carboxylat a6 (305 mg, 1,09 mmol) trong THF (10 mL) ở nhiệt độ phòng và hỗn hợp phản ứng được để khuấy ở nhiệt độ phòng trong 18 giờ. Hỗn hợp phản ứng được lọc và dung môi được loại trong chân không. Sản phẩm thô được tinh chế bằng sắc ký cột (Biotage SNAP Ultra 25 g. Chất rửa giải: diclometan:metanol 100:0 đến 90:10). Dung môi được loại trong chân không để thu được metyl 2-[3,5-diclo-2-(hydroxymetyl)-4-pyridyl]axetat a7 dưới dạng chất rắn (139 mg, hiệu suất 50%).

LCMS ( $MH^+$ ): 250

$^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  8,51 (s, 1H), 4,78 (s, 2H), 4,04 (s, 2H), 3,74 (s, 3H). Proton OH không được quan sát.

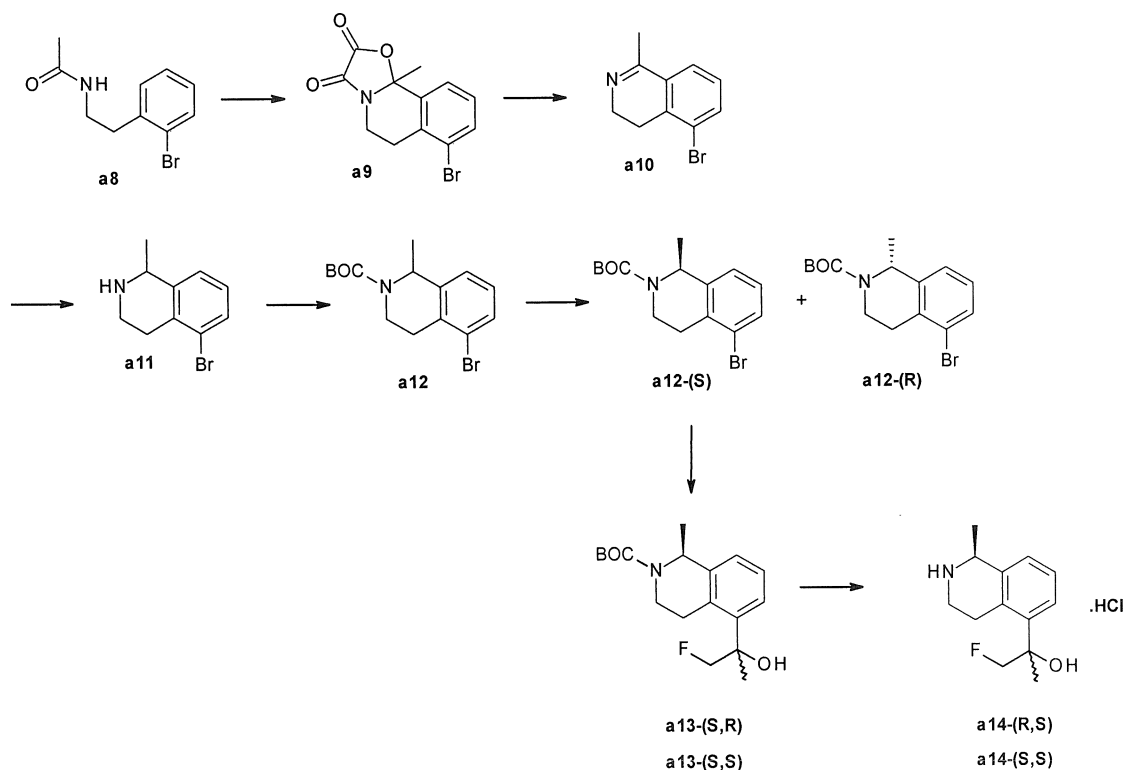
1.7. Điều chế hợp chất trung gian (II)-Axit 2-[3,5-diclo-2-(hydroxymetyl)-4-pyridyl]axetic.

Bổ sung lithi hydroxit monohydrat (25,2 g, 589 mmol) vào dung dịch chứa methyl 2-[3,5-diclo-2-(hydroxymetyl)-4-pyridyl]axetat a7 (98,1 g, 392 mmol) trong hỗn hợp chứa THF (1,1 L) và nước (110 mL). Hỗn hợp thu được được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 18 giờ trước khi nó được cô trong chân không. Cặn được làm bay hơi đồng sôi với toluen (3 x 250 mL) để thu được axit 2-[3,5-diclo-2-(hydroxymetyl)-4-pyridyl]axetic (II) dưới dạng bột màu trắng ngà chảy tự do (92,6 g, hiệu suất 100%). Sản phẩm được sử dụng trong bước tiếp theo mà không cần tinh chế thêm.

$^1H$  NMR (400 MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$  8,54 (s, 1H), 4,62 (s, 2H), 2,46 (s, 2H). Hai proton OH không được phát hiện.

2. Điều chế hợp chất trung gian (III)

Điều chế (1R)-1-flo-2-[(1S)-1-metyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-5-yl]propan-2-ol hydroclorua a14-(R,S) và (1S)-1-flo-2-[(1S)-1-metyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-5-yl]propan-2-ol hydroclorua a14-(S,S)



2.1. Điều chế hợp chất trung gian (VI)-7-bromo-10b-metyl-6,10b-dihydro-5H-[1,3]oxazolo[2,3-a]isoquinolin-2,3-dion a9

Bổ sung nhỏ giọt oxalyl clorua (72 mL, 838,7 mmol) vào dung dịch chứa N-[2-(2-bromophenyl)etyl]axetamit a8 (nguồn thị trường, 106,5 g, 439,8 mmol) trong DCM (1,5 L) ở 0°C. Hỗn hợp được khuấy ở 0°C trong 2 giờ, sau đó được để ấm đến nhiệt độ phòng và khuấy trong 3 giờ. Sau đó, hỗn hợp phản ứng được làm lạnh đến 0°C và sít (III) clorua (86 g, 530,2 mmol) được bổ sung trong 2 phần. Hỗn hợp phản ứng được để ấm đến nhiệt độ phòng, khuấy qua đêm ở nhiệt độ phòng, pha loãng bằng DCM (2,5 L) và sau đó dập tắt ở 0°C bằng dung dịch amoniac đậm đặc 12M (200 mL). Lốp hữu cơ được làm khô trên Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, lọc và cô trong chân không thu được 108 g 7-bromo-10b-metyl-6,10b-dihydro-5H-[1,3]oxazolo[2,3-a]isoquinolin-2,3-dion a9 dưới dạng chất rắn màu nâu, mà được sử dụng trong bước tiếp theo mà không cần tinh chế thêm.

Hiệu suất (chất thô): 83%.

LCMS (ES<sup>+</sup>): 296/298 (M+H)<sup>+</sup>.

2.2. Điều chế hợp chất trung gian (V)-5-bromo-1-metyl-3,4-dihydroisoquinolin a10

Bổ sung nhỏ giọt axit sulfuric (75 mL) vào huyền phù chứa 7-bromo-10b-metyl-6,10b-dihydro-5H-[1,3]oxazolo[2,3-a]isoquinolin-2,3-dion a9 (108 g, 364,72 mmol) trong MeOH (1,5 L). Hỗn hợp phản ứng được khuấy qua đêm ở 65°C, sau đó dập tắt ở 0°C bằng dung dịch amoniac đậm đặc 15M (300 mL). Cô hỗn hợp trong chân không và nước (300 mL) được bổ sung. Lốp nước được chiết 6 lần bằng DCM (1 L). Lốp hữu cơ được làm khô trên MgSO<sub>4</sub>, lọc và cô trong chân không để thu được 86,44 g 5-bromo-1-metyl-3,4-dihydroisoquinolin a10 dưới dạng chất rắn màu nâu, mà được sử dụng trong bước tiếp theo mà không cần tinh chế thêm.

Hiệu suất (chất thô): định lượng.

HPLC (phương thức bazơ): RT 4,75 phút, độ tinh khiết 87%.

2.3. Điều chế hợp chất trung gian (IV)-5-bromo-1-metyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin a11

Bổ sung natri borohydrua (13,2 g, 349 mmol) từng phần (13\*1 g) vào dung dịch chứa 5-bromo-1-metyl-3,4-dihydroisoquinolin a10 (86,44 g, 385,9 mmol) trong EtOH



(2 L) ở 0°C. Hỗn hợp được khuấy ở 0°C trong 2 giờ, sau đó dung dịch nước HCl 5N (250 mL) được bổ sung ở 0°C. Hỗn hợp phản ứng được khuấy qua đêm ở nhiệt độ phòng, sau đó EtOH được cô trong chân không. DCM (1 L) được bổ sung và hỗn hợp được đập tắt ở 0°C bằng dung dịch amoniac đậm đặc 6M (400 mL). Lớp hữu cơ được chiết hai lần bằng DCM (500 mL), làm khô trên MgSO<sub>4</sub>, lọc và cô trong chân không để thu được 83 g 5-bromo-1-metyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin a11 dưới dạng chất rắn màu nâu, mà được sử dụng trong bước tiếp theo mà không cần tinh chế thêm.

Hiệu suất (chất thô): 95%.

HPLC (phương thức bazo): RT 4,53 phút, độ tinh khiết 80%.

2.4. Điều chế tert-butyl 5-bromo-1-metyl-3,4-dihydroisoquinolin-2(1H)-carboxylat-các hợp chất trung gian a12, a12-S và a12-R

Bổ sung TEA (160 mL, 1136 mmol) vào dung dịch chứa 5-bromo-1-metyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin a11 (78 g, 345 mmol) trong DCM (1 L) ở 0°C. Sau đó, dung dịch chứa di-tert-butyl dicacbonat (65 g, 294,8 mmol) trong DCM (250 mL) được bổ sung nhỏ giọt ở 0°C. Hỗn hợp phản ứng được khuấy qua đêm ở nhiệt độ phòng và được đập tắt bằng nước (100 mL). Lớp hữu cơ được làm khô trên MgSO<sub>4</sub>, lọc và cô trong chân không. Cặn được nghiền hai lần trong hỗn hợp chứa MeOH/n-hexan (1:2, 450 mL) để thu được 63 g tert-butyl 5-bromo-1-metyl-3,4-dihydroisoquinolin-2(1H)-carboxylat a12 (Hiệu suất: 56%, HPLC (phương thức bazo): RT 6,59 phút, độ tinh khiết 98%) dưới dạng chất rắn màu trắng.

Phân tách bất đối xứng (SFC, Welko 01(R,R), 50\*227 mm, 360 mL/phút, 220 nm, 25°C, chất rửa giải: từ 20% iPrOH) raxemat tert-butyl 5-bromo-1-metyl-3,4-dihydroisoquinolin-2(1H)-carboxylat a12 thu được:

- 25,1 g tert-butyl (1S)-5-bromo-1-metyl-3,4-dihydroisoquinolin-2(1H)-carboxylat a12-S dưới dạng chất rắn.

Hiệu suất: 22%.

HPLC (phương thức bazo): RT 6,59 phút, độ tinh khiết 91%.

Phân tích bất đối xứng (LC, Welko-01 (R,R), 250\*4,6 mm, 1 mL/phút, 220 nm, 30°C, chất rửa giải: iPrOH/n-heptan/DEA 50/50/0,1) RT 4,86 phút, 97,7% ee.

- 29,3 g tert-butyl (1R)-5-bromo-1-metyl-3,4-dihydroisoquinolin-2(1H)-carboxylat a12-R dưới dạng chất rắn.

Hiệu suất: 26%.

HPLC (phương thức bazo): RT 6,59 phút, độ tinh khiết 98%.

Phân tích bất đối xứng (LC, Welko-01 (R,R), 250\*4,6 mm, 1 mL/phút, 220 nm, 30°C, chất rửa giải: iPrOH/n-heptan/DEA 50/50/0,1) RT 5,62 phút, 92,4% ee.

2.5. Điều chế tert-butyl (1S)-5-[(1R)-2-flo-1-hydroxy-1-metyl-etyl]-1-metyl-3,4-dihydro-1H-isoquinolin-2-carboxylat hợp chất trung gian a13-(S,R) và tert-butyl (1S)-5-[(1S)-2-flo-1-hydroxy-1-metyl-etyl]-1-metyl-3,4-dihydro-1H-isoquinolin-2-carboxylat-hợp chất trung gian a13-(S,S)

tert-Butyl (1S)-5-bromo-1-metyl-3,4-dihydro-1H-isoquinolin-2-carboxylat a12-S (7 g, 21,45 mmol) được hòa tan trong tetrahydrofuran khô (107 mL) ở -78°C. n-BuLi (32,93 mmol) được bổ sung nhỏ giọt và hỗn hợp được khuấy ở -78°C trong 10 phút. Floaxeton (4,78 mL, 64,2 mmol) được bổ sung và hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ. Hỗn hợp phản ứng được dập tắt bằng dung dịch nước HCl 1N (350 mL), sau đó chiết ba lần bằng diclometan. Lóp hữu cơ được làm khô trên MgSO<sub>4</sub>, lọc và cô trong chân không. Cặn được tinh chế bằng sắc ký pha đảo (phương thức bazo, LC chuẩn). Phân tách bất đối (LC, chiralpak IC, 80\*380 mm, 300 mL/phút, 220 nm, 30°C, chất rửa giải: 10% iPrOH trong heptan) thu được:

- 1,137 g tert-butyl (1S)-5-[(1R)-2-flo-1-hydroxy-1-metyl-etyl]-1-metyl-3,4-dihydro-1H-isoquinolin-2-carboxylat a13-(S,R) dưới dạng chất rắn màu be.

Hiệu suất: 16%

LCMS (ES<sup>+</sup>): 268,0 (M-tBu+H)<sup>+</sup>.

Phân tích bất đối xứng (LC, Welko-01 (R,R), 150\*4,6 mm, 1,5 mL/phút, 220 nm, 30°C, chất rửa giải: iPrOH/n-heptan/DEA 10/90/0.1): RT 2,37 phút, 100% ee.

- 1,074 g tert-butyl (1S)-5-[(1S)-2-flo-1-hydroxy-1-metyl-etyl]-1-metyl-3,4-dihydro-1H-isoquinolin-2-carboxylat a13-(S,S) dưới dạng chất rắn màu be.

Hiệu suất: 15%

LCMS (ES<sup>+</sup>): 268,0 (M-tBu+H)<sup>+</sup>.

Phân tích bất đối xứng (LC, Welko-01 (R,R), 150\*4,6 mm, 1,5 mL/phút, 220 nm, 30°C, chất rửa giải: iPrOH/n-heptan/DEA 10/90/0.1): RT 2,72 phút, 100% ee.

2.6. Điều chế (1R)-1-flo-2-[(1S)-1-metyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-5-yl]propan-2-ol hydroclorua a14-(R,S) và (1S)-1-flo-2-[(1S)-1-metyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-5-yl]propan-2-ol hydroclorua-hợp chất trung gian a14-(S,S)

*tert*-Butyl (1S)-5-[(1R)-2-flo-1-hydroxy-1-metyl-etyl]-1-metyl-3,4-dihydro-1H-isoquinolin-2-carboxylat a13-(S,R) (1,137 g, 3,516 mmol) được hòa tan trong dioxan (18 mL) ở nhiệt độ phòng. Dung dịch HCl 4N trong dioxan (8,8 mL, 35 mmol) được bổ sung. Hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ phòng qua đêm. Hỗn hợp phản ứng được cô trong chân không để thu được 950 mg (1R)-1-flo-2-[(1S)-1-metyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-5-yl]propan-2-ol hydroclorua a14-(R,S) dưới dạng chất rắn màu be.

Hiệu suất (chất thô): định lượng.

LCMS (ES<sup>+</sup>): 224,0 (M+H)<sup>+</sup>.

(1S)-1-flo-2-[(1S)-1-metyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-5-yl]propan-2-ol hydroclorua a14-(S,S)

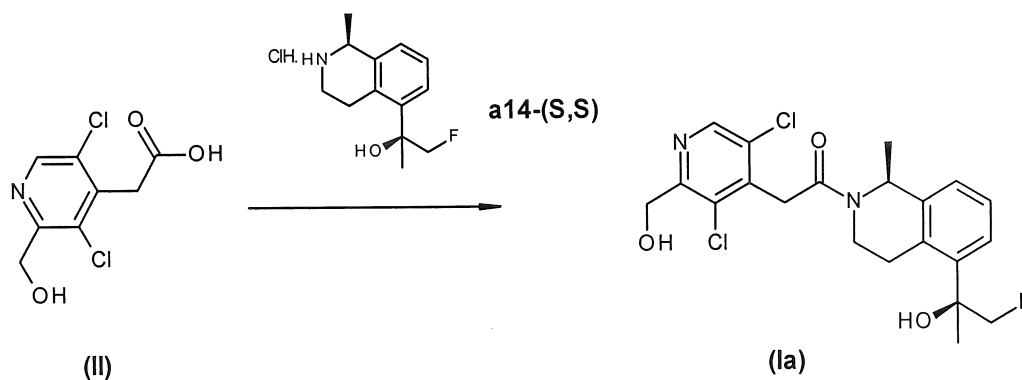
Hợp chất a14-(S,S) có thể được tổng hợp theo phương pháp tương tự sử dụng *tert*-butyl (1S)-5-[(1S)-2-flo-1-hydroxy-1-metyl-etyl]-1-metyl-3,4-dihydro-1H-isoquinolin-2-carboxylat a13-(S,S) làm nguyên liệu ban đầu.

Hiệu suất (chất thô): định lượng.

LCMS (ES<sup>+</sup>): 224 (M+H)<sup>+</sup>.

### 3. Quy trình điều chế hợp chất có công thức (I)

3.1. Điều chế hợp chất có công thức (Ia) - 2-[3,5-diclo-2-(hydroxymetyl)-4-pyridyl]-1-[(1S)-5-[(1S)-2-flo-1-hydroxy-1-metyl-etyl]-1-metyl-3,4-dihydro-1H-isoquinolin-2-yl]etanon



Bổ sung (2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexaflophosphat (HBTU, 217 mg, 0,571 mmol) vào dung dịch chứa axit 2-[3,5-diclo-2-(hydroxymetyl)-4-pyridyl]axetic A (112 mg, 0,476 mmol) và (2S)-1-flo-2-[(1S)-1-metyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-5-yl]propan-2-ol hydroclorua a14-(S,S) (136 mg, 0,524 mmol) trong DMF (6 mL). Sau đó, N,N-diisopropyletylamin (0,24 mL, 1,43 mmol) được bổ sung ở nhiệt độ phòng và hỗn hợp được khuấy trong 2 giờ. Hỗn hợp phản ứng được dập tắt bằng nước và chiết hai lần bằng etyl axetat. Sau đó, các lớp hữu cơ kết hợp được làm khô trên  $\text{MgSO}_4$ , lọc và dung môi được loại trong chân không để thu được sản phẩm thô. Sản phẩm thô được tinh chế bằng sắc ký pha đảo (phương thức bazo) và dung môi được loại trong chân không để thu được 2-[3,5-diclo-2-(hydroxymetyl)-4-pyridyl]-1-[(1S)-5-[(1S)-2-flo-1-hydroxy-1-metyl-etyl]-1-metyl-3,4-dihydro-1H-isoquinolin-2-yl]etanon **1** (116 mg, hiệu suất 55%) dưới dạng chất rắn.

LCMS: 441( $\text{MH}^+$ )

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  8,59 (2s, 1H, chất đồng phân hình học), 7,37 – 7,09 (m, 3H), 5,48 (m, 1H), 5,34 (m, 2H), 4,72 – 4,53 (m, 3H), 4,53 – 4,25 (m, 1,3H), 4,25 – 4,03 (m, 1,7H), 4,02 – 3,69 (m, 2H), 3,48 (m, 0,7H), 3,38 – 3,33 (m, 0,3H tín hiệu một phần dưới nước), 3,31 – 3,07 (m, 1H), 1,60 (d,  $J = 6,7$  Hz, 1H), 1,53 (m, 3H), 1,37 (d,  $J = 6,7$  Hz, 2H).

3.2. Điều chế hợp chất có công thức (Ib) 2-[3,5-diclo-2-(hydroxymetyl)-4-pyridyl]-1-[(1S)-5-[(1R)-2-flo-1-hydroxy-1-metyl-etyl]-1-metyl-3,4-dihydro-1H-isoquinolin-2-yl]etanon

Hợp chất nêu ở đề mục được điều chế theo quy trình tương tự với quy trình được mô tả cho hợp chất có công thức (Ia) bắt đầu từ (2S)-1-flo-2-[(1R)-1-metyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-5-yl]propan-2-ol hydroclorua a14-(S,R).

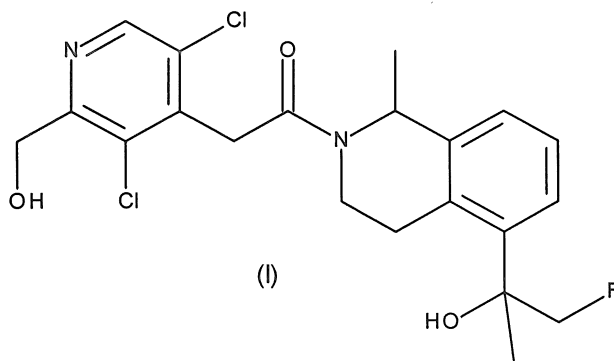
LCMS: 441( $\text{MH}^+$ )

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  8,58 (2s, 1H, 2 chất đồng phân hình học), 7,42 – 7,07 (m, 4H), 5,47 (s, 1H, các chất đồng phân hình học), 5,41 – 5,24 (m, 2H), 4,85 – 4,66 (m, 1H), 4,57 – 4,24 (m, 2H), 4,09 (s, 3H), 4,01 – 3,70 (m, 2H), 3,58 – 3,19 (m, 1H tín hiệu một phần dưới nước), 1,59 (d,  $J = 6,7$  Hz, 1H), 1,53 (m, 3H), 1,36

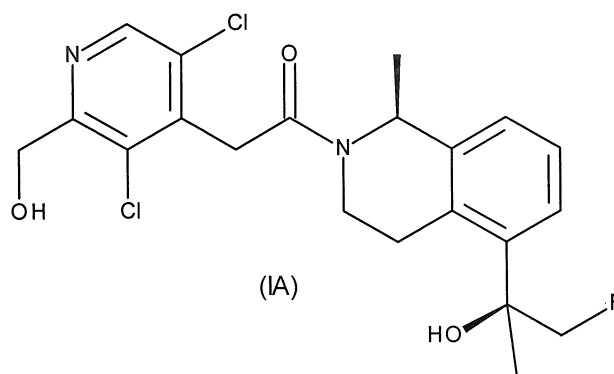
(dd,  $J = 6,8, 2,0$  Hz, 2H).

## YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Hợp chất có công thức (I), hoặc muối được dụng của nó,



2. Hợp chất có công thức (I) theo điểm 1, trong đó hợp chất này là 2-[3,5-diclo-2-(hydroxymetyl)-4-pyridyl]-1-[(1S)-5-[(1S)-2-flo-1-hydroxy-1-metyl-etyl]-1-metyl-3,4-dihydro-1H-isoquinolin-2-yl]etanon và có công thức (IA)



3. Dược phẩm chứa hợp chất có công thức (I) theo điểm 1, hoặc muối được dụng của nó, cùng với chất mang được dụng.